



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS
POTOSÍ**
FACULTAD DE CIENCIAS
CIACYT-UASLP



“Prótesis de menisco mediante impresión 3-D haciendo uso de hidrogel con nanotubos de carbono y gentamicina “

**TESIS PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRA EN CIENCIAS APLICADAS**

Presenta:

INER: Grecia Aranzazú Guerrero Martínez

Asesor: Dr. Hugo Ricardo Navarro Contreras
Co-asesora: Dra. Ma. Guadalupe García Valdivieso

San Luis Potosí, S.L.P., México
25 de febrero del 2022

“Prótesis de menisco mediante impresión 3-D haciendo uso de hidrogel con nanotubos de carbono y gentamicina ”

Asesores:

Dr. Hugo Ricardo Navarro Contreras
CIACyT, UASLP
Asesor

Dra. Ma. Guadalupe
García Valdivieso CIACyT,
UASLP
Co-asesora

Sinodales:

Dra. Claudia Guadalupe Castillo
Martin del Campo
CIACyT, UASLP
Sinodal

Dr. Edgar Guevara Codina
CIACyT, UASLP
Sinodal

Dr. Ángel Gabriel Rodríguez Vázquez
CIACyT, UASLP
Sinodal

DEDICATORIA

A el gran, único e incondicional amor de mi vida, mi santa madre Verónica.

Cada letra de este escrito es dedicada a ti.

Te amo.

AGRADECIMIENTOS

A mi asesor de tesis, Dr. Hugo Navarro, gracias por darme la oportunidad de desarrollar este tema de investigación, motivándome a ser cada día mejor. Gracias por compartir sus conocimientos y tomarse el tiempo de estar al pendiente siempre. Admiro su humildad, su manera tan peculiar de compartir su amor por la ciencia motivando siempre a seguir adelante.

A mis co-asesora y sinodales, Dra. Guadalupe Valdivieso, Dra. Claudia Castillo, Dr. Ángel Gabriel Rodríguez y Dr. Edgar Guevara Codina, por sus atentos comentarios y soporte a lo largo de mi trabajo de tesis.

A la Dra. Valdivieso, gracias por enseñarme a trabajar de manera autónoma, a tomar decisiones de manera rápida y hacer de mi otra persona, con otra mentalidad totalmente distinta.

A la Dra. Claudia Castillo especialmente, quien fue uno de mis mayores soportes a lo largo de este proyecto, gracias por su tiempo, por enseñarme lo bello y complejo que son las células, por brindarme la confianza y oportunidad de ingresar a su laboratorio y realizar mis experimentos. Gracias por ser además de mi sinodal, una motivación y ayudarme en mis días de desesperación, es un gusto y placer trabajar con personas como usted.

A los doctores Elías Pérez y Amir González del Laboratorio de Polímeros en el Instituto de Física, quienes además de brindar el apoyo en realizar mediciones de reología y resolver dudas sobre ello, me enseñó a manejar el equipo, gracias Dr. Amir por su tiempo, sus atentos y oportunos comentarios los cuales fueron de gran ayuda y me llevaron a mejorar en gran medida.

Al Dr. Ángel Gabriel Rodríguez por proporcionar el acceso al Espectrómetro Confocal Raman, por siempre estar al pendiente, gracias por siempre mostrar una sonrisa por las mañanas. Gracias por ser un excelente motivador de todos los INER, usted es y será uno de los doctores que más admiro y respeto.

Al Ing. Antonio Ezquivel, quien mostró completa disponibilidad para asesorarme con los aditamentos y programas para llevar a cabo la impresión de mi material.

A la Dra. Brenda Acosta, quien me apoyó con las mediciones de Reflexión Total Atenuada de Infrarrojo por Transformada de Fourier (ATR-FTIR). Gracias por tomarse el tiempo para enseñarme una técnica completamente nueva para mí.

A mis compañeras de proyecto Kari y Jazmín por sus excelentes pláticas, su apoyo. Gracias por hacer este proyecto más divertido.

A mis compañeros del Lab. de viabilidad celular, Edson y Arleth, gracias por su paciencia, comentarios y sobre todo su amistad.

A Roberto, eres y serás mi mejor amigo investigador. Gracias por siempre estar cuando lo necesite, siempre escucharme, apoyarme y regañarme cuando fue necesario.

A mis compañeros Carlos, Belio y Arenas, gracias por esas buenas y enriquecedoras charlas, por hacer siempre el trabajo más ameno y divertido.

A los mis compañeros de generación por hacer las clases más divertidas y siempre motivarme. En especial a Javi, gracias por tu paciencia y por explicarme cuantas veces fuese necesario.

A mi madre Sra. Verónica, sabes que cada paso que dé a lo largo de mi vida es dedicado completamente a ti, eres mi mayor tesoro y la persona a la cual más admiro. Agradezco esas llamadas hasta altas horas de la noche, tus sabios consejos, tu preocupación y tu coraje para ser la persona que eres y ponernos el ejemplo a todos tus hijos. Madre si tú puedes caminar, yo volaré.

A mi padre y hermanos por siempre apoyarme de una manera particular cada uno de ellos, siempre estar al pendiente y cuestionarme. Los adoro con todo mi corazón.

Agradezco el apoyo económico a CONACYT por la beca de Maestría Núm. 1008586 que me permitió efectuar mi maestría.

Agradezco el acceso al Laboratorio Nacional de Análisis Físicos Químicos y Biológicos del CIACyT UASLP, ya que gracias a ello efectúe mi proyecto de tesis.

CONTENIDO

DEDICATORIA.....	3
AGRADECIMIENTOS	4
LISTA DE FIGURAS	8
LISTA DE TABLAS.....	13
1 RESUMEN.....	14
2 INTRODUCCIÓN.....	16
3 MARCO TEÓRICO	18
3.1 Menisco.....	18
3.1.1 Anatomía.....	18
3.1.2 Composición	18
3.1.3 Biomecánica y funciones	19
3.2 Hidrogeles	21
3.3 Impresión 3D.....	22
3.4 Implantes de menisco e ingeniería de tejidos.	23
3.5 Materiales que componen al hidrogel.....	25
3.5.1 Nanotubos de carbono y su funcionalización.....	25
3.5.2 Quitosano.....	27
3.5.3 Ácido 2-acrilamido-2-metilpropano sulfónico (AMPS).....	28
3.5.4 Nanoarcilla (bentonita)	29
3.5.5 Activación de bentonita	30
3.5.6 Fotoiniciador (i2959)	30
3.5.7 Reticulador (crosslinker)	31
3.5.8 Solución salina amortiguada por fosfatos (PBS).....	32
3.5.9 Sulfato de Gentamicina.....	33
3.6 Técnicas de caracterización.....	34
3.6.1 Espectroscopía Raman.....	34
3.6.2 Espectroscopía infrarroja reflectancia total atenuada FTIR-ATR	36
3.6.3 Espectrofotometría de absorción ultravioleta visible UV-VIS	37
3.6.4 Microscopía electrónica	37
3.6.5 Microscopio Electrónico de Barrido (SEM).....	37
3.6.6 Microscopio electrónico de transmisión de barrido (STEM).....	38
3.6.7 Hinchamiento (swelling)	38
3.6.8 Reología.....	39
3.6.9 Viscosidad.....	39
3.6.10 Módulo de almacenamiento y módulo de pérdida.	41
3.6.11 Actividad metabólica celular: Ensayo de resazurina.....	43

4	HIPÓTESIS.....	44
5	OBJETIVOS.....	44
5.1	General	44
5.2	Secundarios	44
6	METODOLOGÍA.....	45
6.1	Funcionalización de MWCNT	45
6.2	Activación de bentonita	46
6.3	Síntesis de hidrogeles.....	47
6.4	Impresión de hidrogel.....	49
6.5	Caracterización de proceso de funcionalización de MWCNT.....	52
6.5.1	Evaluación de la actividad metabólica de las células HEK293T en presencia de MWCMT y f-MWCNT	53
6.6	Caracterización de bentonita activada	54
6.7	Caracterización de hidrogeles.....	55
6.7.1	Evaluación de la actividad metabólica de las células HEK293T en presencia de hidrogeles.....	56
6.7.2	Análisis estadístico.	58
7	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	59
7.1	Síntesis y caracterización de nanotubos de carbono multicapa con quitosano (f-MWCNT)	59
7.1.1	Cinética de reacción: funcionalización de nanotubos de carbono.....	59
7.1.2	Espectroscopía Raman.....	60
7.1.3	Espectrofotometría de absorción UV-VIS	62
7.1.4	Scanning Transmission Electron Microscope (STEM)	62
7.1.5	Actividad metabólica celular: ensayo de resazurina	64
7.2	Activación ácida de bentonita: espectroscopía FTIR-ATR	66
7.3	Síntesis y caracterización de hidrogel con nanotubos de carbono multicapa y gentamicina para el diseño de prótesis de menisco mediante impresión 3-D.....	68
7.3.1	Cinética de formación de hidrogel propuesta.....	68
7.3.2	Espectroscopía Raman.....	69
7.3.3	Espectroscopía FTIR-ATR.....	71
7.3.4	Hinchamiento (swelling)	74
7.3.4.1	Swelling en hidrogeles con gentamicina.....	75
7.3.5	Reología.....	77
7.3.6	Actividad metabólica celular: ensayo de resazurina	81
7.4	Microscopia electrónica de barrido.....	88

7.5	Impresión 3D.....	93
8	CONCLUSIONES.....	95
8.1	Trabajo a futuro.....	97
9	BIBLIOGRAFÍA.....	98

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. - Anatomía de la rodilla. (Creado con BioRender.com)	18
Figura 2. Variación anatómica de la vascularización y población celular del menisco. [14]	19
Figura 3. Diagrama de cuerpo libre de las fuerzas que actúan sobre el menisco de la rodilla durante la carga. [14]	20
Figura 4. Tipos de hidrogeles	21
Figura 5. Tipos de hidrogeles (a) red de polímero; (b) semi-IPN; (c) IPN completo	22
Figura 6. El implante de menisco de colágeno. a) De izquierda a derecha: implante de menisco de colágeno (CMI) medial y lateral. b) Microscopía electrónica de barrido de CMI. En la superficie superior (triángulo) se interponen algunas crestas regulares con surcos en espiga de unos 70 μm de ancho. La superficie lateral (signo de gato) muestra lagunas de 60 a 90 μm de ancho, formadas por láminas de colágeno interconectadas por fibrillas más delgadas (barra $\frac{1}{4}$ 250 μm).[18]	24
Figura 7. Implante de menisco Actifit®. a) Implante de menisco Actifit medial y lateral. b) Microscopia de estructura porosa y esponjosa del implante de andamio Actifit en una sección transversal. [18]	24
Figura 8. Implante de menisco Nusurface compuesto por una matriz de PCU de policarbonato-uretano, reforzada con polietileno circunferencial, fibras de PE. [18]	25
Figura 9. Funcionalización no covalente de CNT. [24]	26
Figura 10. (a) Estructura química de la quitina (2- Acetilamina-2-desoxi- β -D-(+)-Glucopiranos), (b) del quitano (2-amino-2- desoxi- β -D-Glucopiranos), (c) del quitosano parcialmente desacetilado (copolímero).[27]	27
Figura. 11. Estructura química de ácido 2-acrilamido-2-metilpropano sulfónico (AMPS).[28].....	28
Figura 12. Estructura cristalina genérica de las esmectitas. [30].....	29
Figura 13. Estructura química de Irgacure® 2959 (CAS 106797-53-9, 2-hydroxy1-[4-(2-hydroxyethoxy)phenyl]-2-methyl-1-propanone) usado como fotoiniciador.[34]	31
Figura 14. Estructura química de N, N'-metilenbisacrilamida (MBA) usado como reticulador.[38].....	32
Figura 15. Fórmula estructural del complejo de gentamicina. [7]	33
Figura 16. a) Espectro Raman característico de CNT.[21]	35

Figura 17. Diagrama de un cristal ATR de reflexión única que representa los principios básicos de la técnica. [45]	36
Figura 18. Hidrogel deshidratado (a), hinchado (b) y encogido (c) como resultado de pequeños cambios en los estímulos externos. (Creado con BioRender.com)	39
Figura 19. Esfuerzo de cizalla. (Creado con BioRender.com).....	40
Figura 20. Deformación oscilatoria y respuesta del esfuerzo, mostrando el ángulo de fase entre estímulo y respuesta.[11]	42
Figura 21. Reducción de resazurina a resorufina y reducción reversible de resorufina a dihidroresorufina.....	43
Figura 22. Proceso de funcionalización de nanotubos de carbono multicapa (MWCNT) (Creado con BioRender.com).....	45
Figura 23. Proceso de activación de bentonita. (Creado con BioRender.com)	47
Figura 24. Proceso de síntesis de hidrogel CS/AMPS. (Creado con BioRender.com)	48
Figura 25. Proceso de fabricación de prótesis de menisco mediante segmentación de imágenes.....	49
Figura 26. Secuencia de proceso llevado a cabo para realizar segmentación de imágenes.....	51
Figura 27. Archivo .STL de prótesis de menisco, previo a proceder a ser impresa.	51
Figura 28. Proceso de impresión 3D	52
Figura 29. Proceso de preparación de muestras (MWCNT, CS, f-MWCNT) utilizadas en ensayo de resazurina. (Creado con BioRender.com)	53
Figura 30. Procedimiento de ensayo de resazurina en MWCNT, CS y f-MWCNT	54
Figura 31. Procedimiento llevado a cabo en experimentos de actividad celular metabólica mediante ensayo de resazurina en hidrogeles. (Creado con BioRender.com)	57
Figura 32. Proceso de funcionalización de MWCNT con quitosano.....	59
<i>Figura 33. Espectros Raman de las muestras MWCNT, Quitosano y f-MWCNT. Las líneas punteadas señalan las bandas D y G correspondientes a MWCNT y con * se señalan los modos vibracionales correspondientes a quitosano.....</i>	61
Figura 34. Espectros de absorción UV-VIS de las muestras MWCNT, Quitosano y f-MWCNT.....	62
Figura 35. Micrografías STEM de MWCNT funcionalizados con quitosano	63

Figura 36. Actividad metabólica de las células HEK293T expuestas a MWCNT y f-MWCNT. Se muestra la media \pm DE. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ en comparación con las células de control (solo medio de cultivo).....	65
Figura 37. Espectros FTIR-ATR de Bentonita sin activar y activada a distinto pH	66
Figura 38. Espectros FTIR-ATR de Bentonita sin activar y activada a distintos pH centrándose en el área de mayor interés ($400-1800\text{ cm}^{-1}$).....	68
Figura 39. Proceso de síntesis de hidrogel CS/AMPS. (Creado con BioRender.com)	69
Figura 40. A) espectros Raman correspondientes a Hidrogel con MWCNT (80 gr/cm^2) con concentración 5:1 (CS:BENT activ) a distintos tiempos de polimerización B) Acercamiento correspondiente a bandas asociadas al proceso de fotopolimerización.	71
Figura 41. Espectros FTIR-ATR de hidrogeles polimerizados y sin polimerizar	72
Figura 42. Espectros FTIR-ATR de hidrogeles polimerizados y sin polimerizar en el intervalo de $400-1750\text{ cm}^{-1}$	73
Figura 43. Hinchamiento de hidrogeles a distintos periodos de tiempo. A) Síntesis con concentración 1:1 (CS/BENT activada) a 24 hrs de polimerización y B) Síntesis con concentración 1:1 (CS/BENT activada) a 48 hrs de polimerización.	75
Figura 44. Hinchamiento de hidrogeles a distintos periodos de tiempo. A) Síntesis con concentración 5:1 (CS/BENT activada) a 24 hrs de polimerización y B) Síntesis con concentración 5:1 (CS/BENT activada) a 48 hrs de polimerización	75
Figura 45. Hinchamiento de hidrogeles añadiendo Gentamicina a distintos periodos de tiempo. A) Síntesis con concentración 5:1 (CS/BENT activada) a 24 hrs de polimerización y B) Síntesis con concentración 5:1 (CS/BENT activada) a 48 hrs de polimerización.	76
Figura 46. Hinchamiento de hidrogeles añadiendo Gentamicina a distintos periodos de tiempo. A) Síntesis con concentración 5:1 (CS/BENT activada) a 24 hrs de polimerización y B) Síntesis con concentración 5:1 (CS/BENT activada) a 48 hrs de polimerización	76
Figura 47. Viscosidad de hidrogeles con concentración 1:1 (CS:BENT activ).	78
Figura 48. Viscosidad de hidrogeles con concentración 5:1 (CS:BENT activ)	78
Figura 49. Viscosidad de hidrogeles con Gentamicina, A) Concentración 1:1 (CS:BENT activ.) y B) Concentración 5:1 (CS:BENT activ.)	79
Figura 50. Módulo de pérdida, módulo de almacenamiento y factor de amortiguamiento correspondiente a hidrogeles sin polimerizar.....	80
Figura 51. Módulo de pérdida, módulo de carga y damping factor correspondiente a hidrogeles polimerizados durante 48 hrs y 24 hrs de swelling.	81

Figura 52. Resultados de actividad metabólica celular obtenidos a partir de ensayo de resazurina en hidrogeles con concentración 1:1 (CS: BENT activ) haciendo uso de células HEK293T. Se muestra la media \pm DE. * p <0,05, ** p <0,01, *** p <0,001 en comparación con las células de control positivo CNM (solo medio de cultivo) y negativo CPM (agregando H2O2).	83
Figura 55. Microscopías SEM de hidrogel "INICIAL" con GENT con concentración 5:1 a distintas escalas A. 500 μ m B.30 μ m y C. 5 μ m.	89
Figura 56. Microscopías SEM de hidrogel MWCNT (80 μ g/cm ²) con GENT con concentración 5:1 a distintas escalas A. 500 μ m B y C.	90
Figura 57. Microscopías SEM de hidrogel MWCNT (80 μ g/cm ²) con GENT con concentración 5:1 a distintas escalas A. 500 μ m B 20 μ m y C 10 μ m.	92
Figura 58. Meniscos lateral y medial obtenidos a partir de impresión 3D.	93
Figura 59. Meniscos medial y lateral obtenidos por impresión 3D al ser polimerizados durante 48 horas.	94
Figura 60. Meniscos obtenidos por impresión 3D, con 30 días de ser sumergidos en PBS.	94

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Modelos reométricos. [12]	41
Tabla 2. Síntesis de hidrogeles realizadas	48
Tabla 3. Modos Raman reportados asociados a quitosano. [27].....	60
Tabla 4. Relación I _D /I _G obtenidas a partir de gráfica 32.....	61
Tabla 5. Imágenes obtenidas previo a añadir resazurina.....	64
Tabla 6. Resultados de ensayo de resazurina en MWCNT.....	65
Tabla 7. Bandas relacionadas a materiales existentes en hidrogeles	73
Tabla 8. Viscosidades de hidrogeles a una tasa de corte de 0.1	77
Tabla 9. Hidrogeles a una concentración 1:1 (CS:Bent activ)	82
Tabla 10. Hidrogeles a una concentración 5:1 (CS:Bent activ)	84
Tabla 11. Hidrogeles con Gentamicina	86

1 RESUMEN

Los meniscos de la rodilla, interno y externo son estructuras fibrocartilaginosas con forma de medialuna entre los cóndilos femorales distales y tibiales proximales que proporciona congruencia estructural y absorbe las fuerzas mecánicas. [1] Las lesiones en el menisco son el diagnóstico ortopédico más frecuentemente registrado. Más de 1.5 millones de personas en los Estados Unidos y Europa reciben meniscectomía total o parcial anualmente. Sin embargo, el estrés fisiológico anormal que se ejerce sobre el cartílago articular en el posoperatorio a menudo conduce a osteoartritis de rodilla y la morbilidad relacionada. El trasplante de menisco proporciona una alternativa a la meniscectomía, pero los resultados a largo plazo de dichos trasplantes no son satisfactorios debido a la remodelación tisular deficiente y son controvertidos por cuestiones de compatibilidad y riesgo de transmisión de enfermedad. [2]

Actualmente, se han desarrollado diferentes biomateriales para reemplazar órganos o tejidos dañados. Una de las técnicas de fabricación de biomateriales más innovadoras es la impresión 3D de materiales como hidrogeles, en un concepto de medicina personalizada mediante segmentación de imágenes. A pesar de las propiedades únicas de este tipo de biomaterial, los hidrogeles presentan problemas que limitan su uso en la impresión 3D (bajas viscosidades antes de la reticulación, limitando su capacidad para formar estructuras más grandes sin colapsar), motivando la incorporación de nanomateriales que mejoran estas limitaciones. [3]

Los nanotubos de carbono de paredes múltiples (MWCNT) exhiben una estructura atómica, relación de aspecto y propiedades eléctricas y mecánicas únicas, lo que los convierte en una fibra de refuerzo ideal. [4] Mediante la funcionalización de MWCNT se pueden obtener cambios en las propiedades físicas, como la solubilidad y la dispersión, que son importantes pues permite tener una mejor interacción con las moléculas biológicas. [5][6] Por otro lado, la Gentamicina (GENT) se utiliza por sus propiedades antibióticas para prevenir posibles infecciones. [7]

Por lo anteriormente mencionado, el objetivo de este trabajo es sintetizar un hidrogel con MWCNT y GENT, para ser utilizado como biotinta en la impresión 3D de prótesis de menisco, mediante el uso de monómeros como quitosano (CS) y 2-acrilamida-2-metilpropanosulfonato de sodio (AMPS).

Con el propósito de obtener un hidrogel de doble red, se dispersó una nanoarcilla en ácido acético y solución salina, posteriormente, los monómeros (CS, AMPS) se mezclan mecánicamente con el reticulante, fotoiniciador, MWCNT o MWCNT funcionalizado (f-MWCNT) y finalmente se añade GENT. El hidrogel se utilizará para construir una prótesis de menisco mediante impresión 3D, realizando su polimerización por radiación UV para aportar rigidez a la pieza.

La funcionalización de MWCNT se caracterizó por espectroscopía Raman obteniendo los fonones característicos a 1337 y 1564 cm^{-1} correspondientes a las bandas D y G, además, las bandas características de modos vibracionales C=C encontradas en 1628 y 1636 cm^{-1} permitieron monitorear el proceso de “curado” (polimerización) del polímero resultante; encontrando 48 horas como tiempo óptimo de polimerización. Para establecer interacciones entre GENT y CS, así como la activación de BENT, las muestras se caracterizaron por FTIR-ATR. Finalmente, se obtuvo un factor de hinchamiento del 300% en peso en los hidrogeles sintetizados. Los materiales se caracterizaron por ensayo de resazurina obteniendo valores de actividad metabólica celular del 84%. La viscosidad del material se obtuvo alrededor de 7 $\text{kPa}\cdot\text{s}$ que garantiza la viscosidad para ser extruido por impresión 3D. Como producto final, se llevó a cabo la impresión de meniscos lateral y medial, a través de segmentación de imágenes haciendo uso de imágenes de resonancia magnética y el programa 3D slicer.

Los hidrogeles sintetizados tienen la capacidad de ser utilizados como biotintas para la impresión 3D de prótesis de menisco, ya que presentaron viscosidades adecuadas para ser usadas como biotintas y una vez polimerizados, al ser expuestos en solución salina a una temperatura de 37 °C presentaron un factor de hinchamiento mayor al 300% el cual se mantuvo con el tiempo. Además, mediante pruebas de actividad metabólica celular en células HEK293T, una vez añadida GENT, se considera que estos materiales son adecuados para su uso como prótesis. La adición de MWCNT ó f-MWCNT tuvieron gran influencia en la mejora de las propiedades mecánicas. Por lo que los hidrogeles aquí sintetizados representan un punto de partida para ser utilizados como biotinta de tejidos del tipo cartilaginoso en impresión 3D.

2 INTRODUCCIÓN

La impresión 3D, está captando cada vez más atención para su uso en el campo biomédico. La capacidad de diseñar e imprimir objetos con prácticamente cualquier forma utilizando una amplia gama de materiales, ha permitido la utilización de esta tecnología para aplicaciones biomédicas tanto en investigación básica como en entornos clínicos. La impresión 3D tiene muchas ventajas en comparación con las tecnologías tradicionales, como la capacidad de fabricar componentes complejos específicos, utilización de materiales diversos, fabricación de soportes para crecimiento de tejidos, y un servicio personalizado único. [3]

Unas de las técnicas de fabricación de biomateriales más innovadoras es la impresión 3D de materiales como hidrogeles, en un concepto de medicina personalizada mediante el uso de segmentación de imágenes.

Un hidrogel es una red tridimensional (3D) de polímeros (moléculas de gran tamaño, constituidas por la unión de un gran número de moléculas mucho más pequeñas denominadas monómeros) hidrófilos que pueden hincharse en un medio acuoso o agua y retener una gran cantidad de ésta mientras mantienen la estructura debido a la reticulación química o física de cadenas de polímeros individuales. [8]

A pesar de las propiedades únicas de este tipo de biomaterial, los hidrogeles presentan problemas que limitan su uso en impresión 3D, motivando la incorporación de nanomateriales que mejoran estas limitantes y que además puedan incrementar su biocompatibilidad.

Así los hidrogeles que más se han utilizado en ingeniería de tejido articular por sus propiedades mecánicas son los IPNs (redes interpenetrantes o semi-interpenetrantes) y de doble red. Sin embargo, aparte de los hidrogeles ya mencionados, también se encuentran los hidrogeles de nanocompuestos, en donde se incorpora materiales nanoestructurados para mejorar sus propiedades logrando mimetizar el tejido a replicar.

Así pues, en 1991, S. Iijima [9] descubrió los nanotubos de carbono (CNT por sus siglas en inglés) inspirando a miles de investigadores a explotar sus múltiples aplicaciones en distintas ramas del conocimiento. Tal es el caso del área médica, en donde su estructura atómica única, relación de aspecto, propiedades eléctricas y mecánicas, los hace una fibra de refuerzo ideal en nanocompositos, en este sentido se ha reportado que la adición de CNT en matrices poliméricas, realza las propiedades del polímero [4]. Sin embargo, la falta de solubilidad de MWCNT en medios acuosos ha sido un factor técnico importante. Métodos de funcionalización permiten la posibilidad de solubilizar y dispersar MWCNT en medios acuosos, abriendo así el camino para su manipulación y procesamiento en entornos fisiológicos. [6]

Por lo anteriormente mencionado, se fabricó un hidrogel del tipo IPN haciendo uso de un monómero natural como lo es Quitosano y un monómero artificial, AMPS. Además de agregar MWCNT o f-MWCNT con el fin de obtener hidrogeles con propiedades viscoelásticas semejantes a las del menisco. Finalmente, fue agregado GENT teniendo como propósito principal incrementar la biocompatibilidad del hidrogel.

Debido a la complejidad del hidrogel creado, se caracterizarán sus propiedades. Mediante espectroscopías FTIR-ATR y Raman se caracterizarán los hidrogeles con el fin de verificar interacciones entre sus componentes, así como su proceso de fotopolimerización. Además, mediante pruebas de hinchamiento (*swelling*) se comprueba la síntesis de un hidrogel, es decir, que retenga al menos 10% de su peso en agua.

Reología es la ciencia del flujo y la deformación de la materia, describe la interrelación entre fuerzas, deformaciones y tiempo, es decir, estudia el comportamiento de los fluidos sometidos a diferentes tipos de esfuerzos.

En reología, la viscosidad es una propiedad que determina el flujo de un fluido y se define como la resistencia que tienen ciertas sustancias para fluir y para sufrir deformaciones graduales producto de tensiones. Este parámetro determinará si es posible ser usado como biotinta y por lo tanto poder fabricar una prótesis. [10]

Las propiedades dinámicas de los materiales, incluido su rendimiento de amortiguación, son comúnmente estudiadas, en el que el módulo de almacenamiento (G') y el módulo de pérdida (G'') de la muestra bajo una carga oscilante se controlan en función del tiempo, la temperatura y la frecuencia de la oscilación. Estos módulos cambian con la frecuencia y la temperatura a medida que cambian los movimientos moleculares dentro del polímero. La relación de $G' / G'' = \tan \delta$, que define la capacidad inherente de disipación de energía del material, se usa comúnmente para caracterizar su capacidad de amortiguación. [11]

Mediante ensayos de actividad metabólica celular se buscará obtener hidrogeles aptos para ser usados en prótesis de menisco. Resazurina es un indicador de la capacidad metabólica celular que se ha utilizado desde finales de la década de 1920 para estimar la infestación bacteriana de la leche. Desde entonces, este colorante redox se utiliza como indicador de la actividad celular metabólica en cultivos celulares en diversas aplicaciones. [12]

3 MARCO TEÓRICO

3.1 Menisco

3.1.1 Anatomía

Los dos fibrocartílagos que los griegos denominaron μηνισκος (meniscos) por su aspecto de medialuna, son estructuras de aproximadamente 34 mm de diámetro, interpuestas entre el fémur y la tibia, que promedian 110 mm de longitud cuando los medimos en su borde más periférico, considerando también sus ligamentos de inserción. El menisco medial tiene un aspecto similar a una C en comparación con el menisco lateral que presenta un aspecto más circular, mientras este último tiene las inserciones de sus cuernos anterior y posterior en el área no articular de la meseta tibial, las del menisco medial se insertan en los extremos anterior y posterior del área intercondílea (Figura 1). [13]

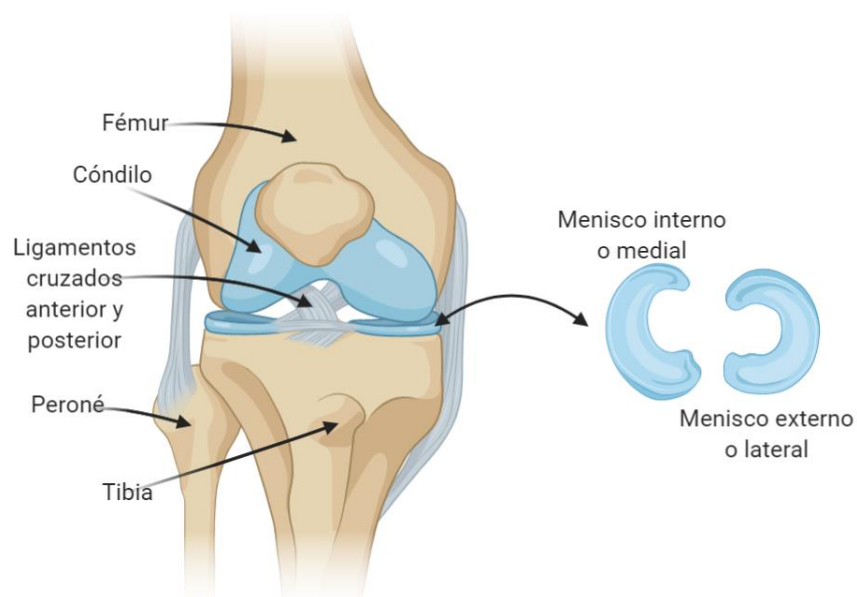


Figura 1. - Anatomía de la rodilla. (Creado con BioRender.com)

3.1.2 Composición

El menisco está compuesto por una matriz extracelular densa (ECM) compuesta principalmente por 72% agua, 22% colágeno, 0.8% glucosaminoglicanos. Su composición en seco es de colágeno (75%), proteínas no colágenas (8-13%), glucosaminoglicanos y glucoproteínas. Las fibras de elastina, que representan el

0.6% del peso seco del menisco, facilitan la recuperación de la forma original del menisco después de una deformación. [13]

Los colágenos son principalmente responsables de la resistencia a la tracción del menisco, contribuyendo hasta el 75% del peso seco de la ECM. En la zona roja, predomina el colágeno de tipo I (composición del 80% en peso seco), con otras variantes de colágeno (de tipo II, III, IV, VI y XVIII) presentes en menos del 1%. Las fibras de colágeno tipo I están orientadas circunferencialmente, en las capas más profundas del menisco, paralelas al borde periférico (figura 2). En la región más superficial de los meniscos, las fibras de tipo I están orientadas en una orientación más radial. Las fibras de "atadura" colocadas radialmente también están presentes en la zona profunda y tejidas entre las fibras circunferenciales para proporcionar integridad estructural. En la zona blanca, el colágeno (75% en peso seco) está compuesto por solo dos tipos de colágeno: los tipos II (60%) y I (40%). Las fibras de colágeno están fuertemente reticuladas y son ideales para transferir cargas de compresión verticales en "tensiones de aro". [14]

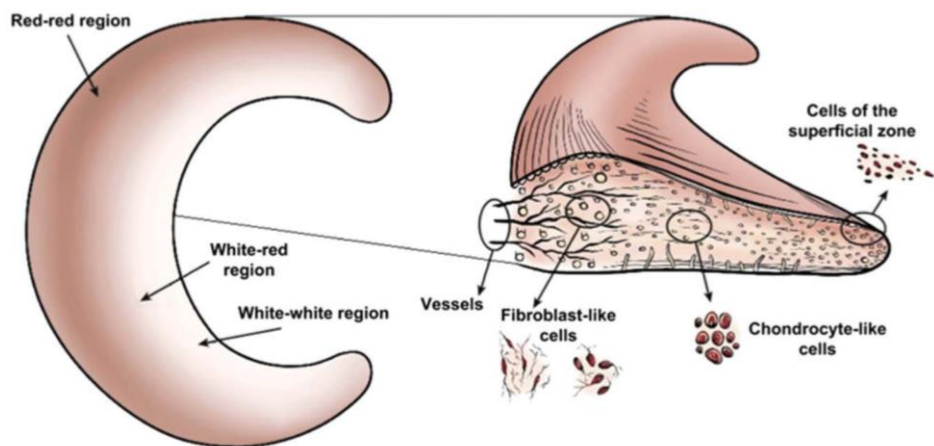


Figura 2. Variación anatómica de la vascularización y población celular del menisco. [14]

3.1.3 Biomecánica y funciones

Las funciones complejas del menisco están intrínsecamente relacionadas con su composición, estructura y morfología. Estas funciones incluyen la transmisión de carga, absorción de impactos, estabilidad, nutrición, lubricación de las articulaciones y propiocepción. También sirven para disminuir las tensiones de contacto y aumentar el área de contacto y la congruencia de la rodilla.

Los estudios biomecánicos han demostrado que aproximadamente 40 a 60% de la carga que actúa sobre la articulación de la rodilla extendida se transmite al menisco (65 a 70% lateral y 40 a 50% medial). En flexión, esto aumenta hasta en un 90%. Durante la carga de peso, las fuerzas axiales comprimen los meniscos, lo que genera tensiones en forma de "aro" (circunferenciales). Las tensiones de aro se basan en la conversión de la fuerza axial en tensión de tracción a través de las fibras de colágeno circunferenciales del menisco (figura 3). El menisco lateral se desplaza más que el menisco medial durante la compresión, pero debido a la anatomía semilunar, la carga se transmite desde el centro de los cóndilos femorales, lo que produce una tensión de tracción hacia la meseta tibial.

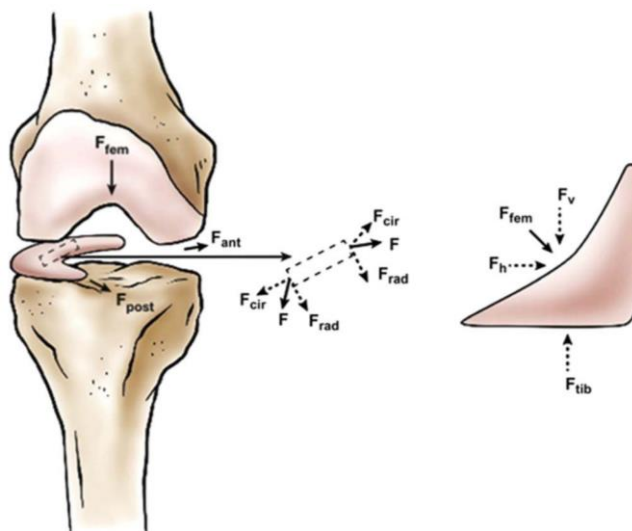


Figura 3. Diagrama de cuerpo libre de las fuerzas que actúan sobre el menisco de la rodilla durante la carga. [14]

La carga, sin embargo, cuando la rodilla está al andar o subir escaleras, ocurren variaciones en las tensiones de contacto. Durante la carga normal, el menisco se comprime por la fuerza descendente del fémur. El menisco se deforma radialmente, pero está anclado por sus cuernos anterior y posterior (F_{ant} y F_{post}). Durante la carga, se generan fuerzas de tracción, compresión y cortante. Una tensión de aro de tracción (F_{cir}) resulta de la deformación radial, mientras que las fuerzas verticales y horizontales (F_v y F_h) resultan de que el fémur comprime la superficie superior curvada del tejido. Una fuerza de reacción radial (F_{rad}) equilibra la fuerza horizontal femoral (F_h). [14]

3.2 Hidrogeles

Los polímeros son macromoléculas, constituidas por la unión de un gran número de moléculas mucho más pequeñas denominadas monómeros. La reacción por la cual estos monómeros se combinan es llamada polimerización.

Un hidrogel es una red tridimensional (3D) de polímeros hidrófilos que pueden hincharse en un medio acuoso o agua y retener una gran cantidad de esta mientras mantienen la estructura debido a la reticulación química o física de cadenas de polímeros individuales. Los hidrogeles fueron reportados por primera vez por Wichterle y Lim (1960). Por definición, se considera a un material como hidrogel cuando este retiene al menos un 10% del peso (volumen) total. La hidrofilia de la red se debe a la presencia de grupos hidrofílicos como $-NH_2$, $-COOH$, $-OH$, $-CONH_2$, $-CONH^-$ y $-SO_3H$. [15]

Los hidrogeles experimentan una transición de fase de volumen significativa o una transición de fase gel-sol en respuesta a ciertos estímulos físicos y químicos. Los estímulos físicos incluyen temperatura, campos eléctricos y magnéticos, composición del solvente, intensidad de luz y presión, mientras que los estímulos químicos o bioquímicos incluyen pH, iones y composiciones químicas específicas. Sin embargo, en la mayoría de los casos, estas transiciones conformacionales son reversibles. La respuesta de los hidrogeles a los estímulos externos está determinada principalmente por la naturaleza del monómero, la densidad de carga, las cadenas y el grado de reticulación. La magnitud de la respuesta también es directamente proporcional al estímulo externo aplicado.

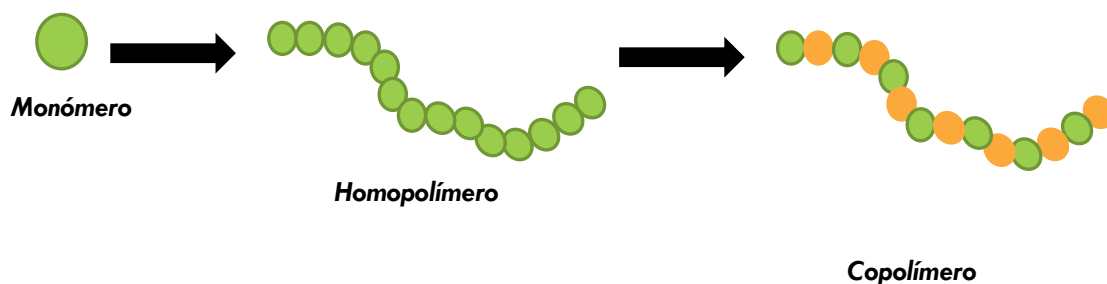


Figura 4. Tipos de hidrogeles

Según los métodos de preparación, los hidrogeles pueden clasificarse en homopolímero, copolímero, red semi-interpenetrante (semi-IPN) y red interpenetrante (IPN). (Ver figuras 4 y 5)

Los homopolímeros contienen solo un tipo de monómero en su estructura y, según la naturaleza del monómero y la técnica utilizada para la polimerización, pueden tener una estructura reticulada también conocida como red tradicional.

Los hidrogeles copoliméricos se componen de dos tipos de monómeros, de los cuales al menos uno es de naturaleza hidrofílica.

El concepto de IPN se remonta al menos hasta 1914, cuando Aylsworth inventó la primera red de polímeros interpenetrantes, sin embargo, el término IPN fue introducido por primera vez por Miller en la década de 1960 en un estudio científico sobre redes de poliestireno.

Una red de IPN se define como una mezcla de dos o más polímeros en una red con al menos uno de los sistemas sintetizados en presencia de otro. Esto da como resultado la formación de una red físicamente reticulada cuando las cadenas poliméricas del segundo sistema se entrelazan o penetran en la red formada por el primer polímero. Cada red individual conserva sus propiedades individuales, por lo que se pueden ver mejoras sinérgicas en propiedades como resistencia o tenacidad. Un IPN se puede distinguir de una mezcla de polímeros en la forma en que un IPN se hincha, pero no se disuelve en solventes y se suprime la fluencia y el flujo.

El IPN se puede distinguir de los otros sistemas múltiples por su estructura bicontinua idealmente formada por reticulación de dos polímeros que están en contacto íntimo, pero sin ningún contacto químico y produce un material con propiedades mejoradas dependiendo de la composición y grado de reticulación (figura 5). [8]

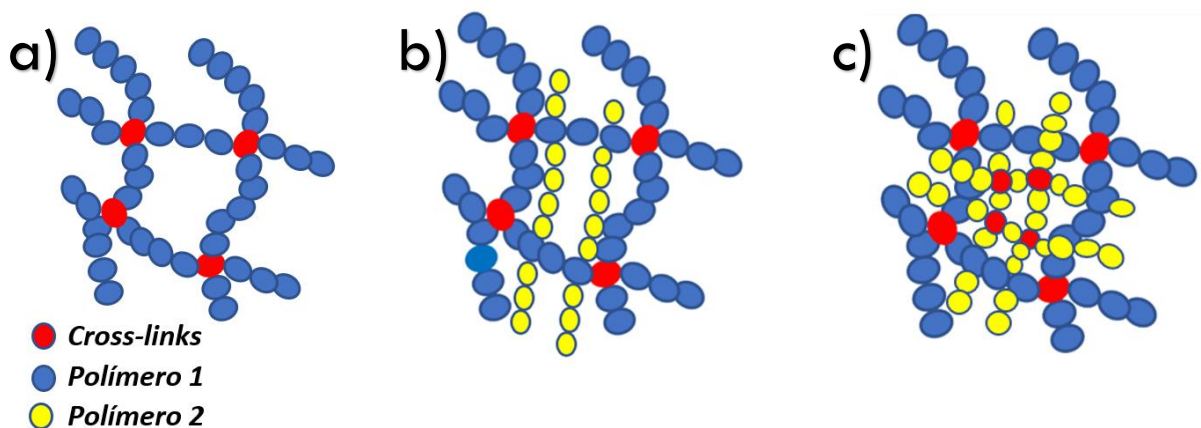


Figura 5. Tipos de hidrogeles (a) red de polímero; (b) semi-IPN; (c) IPN completo

3.3 Impresión 3D

La impresión 3D (término introducido a la terminología MeSH en 2015) se define como “un conjunto de procesos usados para realizar un objeto físico tridimensional, también conocido como “prototipado rápido”. Esto en algunos casos se realiza mediante la aplicación capa por capa de un material sólido a temperatura ambiente, con un punto de fusión conocido controlado por un sistema computarizado para

crear dicho objeto. Esta técnica fue desarrollada originalmente para imprimir capas secuenciales finas de material, seguido de un proceso de curado con luz ultravioleta para formar estructuras sólidas tridimensionales al que se denominó “estereolitografía”, descrita por primera vez en 1986 por Charles W. Hull. [16]

Los materiales actualmente utilizados en el campo de la medicina regenerativa para la reparación y regeneración se basan principalmente en el empleo de polímeros de origen natural o sintéticos. [16][17] Las ventajas de los polímeros naturales para bioimpresión son su similitud con la MEC (matriz extracelular) humana y su bioactividad inherente. La ventaja de los polímeros sintéticos con propiedades físicas específicas es que pueden adaptarse para aplicaciones particulares. Los desafíos en el uso de polímeros sintéticos incluyen una baja biocompatibilidad, productos de degradación tóxica y pérdida de propiedades mecánicas durante la degradación. [16]

3.4 Implantes de menisco e ingeniería de tejidos.

En busca de una solución clínica para las lesiones meniscales se han investigado numerosos materiales con el objetivo es construir un implante meniscal permanente o un andamio para la ingeniería de tejidos meniscales.

A mediados de los ochenta, Veth et al iniciaron una investigación aplicando polímeros sintéticos para la ingeniería de tejidos meniscales. Su objetivo era proporcionar un andamio para reemplazar todo el menisco. La experiencia obtenida en la búsqueda de una prótesis vascular en cirugía cardiovascular los llevó al uso de poliuretanos en la ingeniería de tejidos meniscales.

Uno de los primeros trabajos de investigación que informaron sobre un sustituto permanente del menisco utilizando materiales a base de polímeros fue el de Toyonaga, et al. en 1983. Utilizaron una red de teflón (politetrafluoretileno (PTFE)) hecha de fibras que posteriormente se dobló y enrolló en un cilindro y finalmente fue insertado en la articulación de la rodilla de los perros.

A principios de los 90, Stone, et al. comenzaron a investigar una plantilla de colágeno reabsorbible para la regeneración meniscal. La razón y la base para el uso de estos andamios reabsorbibles fue el trabajo pionero de Yannas, et al. en el reemplazo de la piel humana y la regeneración de los nervios. [18]

Actualmente, existen prótesis de menisco para uso clínico como lo son:

- Implante de menisco de colágeno (CMI® (Collagen Meniscal Implant)). Desarrollado y comercializado por Steadman y su grupo el cual está compuesto por colágeno tipo I con un grosor de 8 mm y longitud de 7.5 cm, procedente del tendón de Aquiles bovino joven, al que añaden ácido hialurónico y condroitin sulfato (figura 6). Está químicamente reticulado con formaldehído y esterilizado usando radiación gamma. [19]

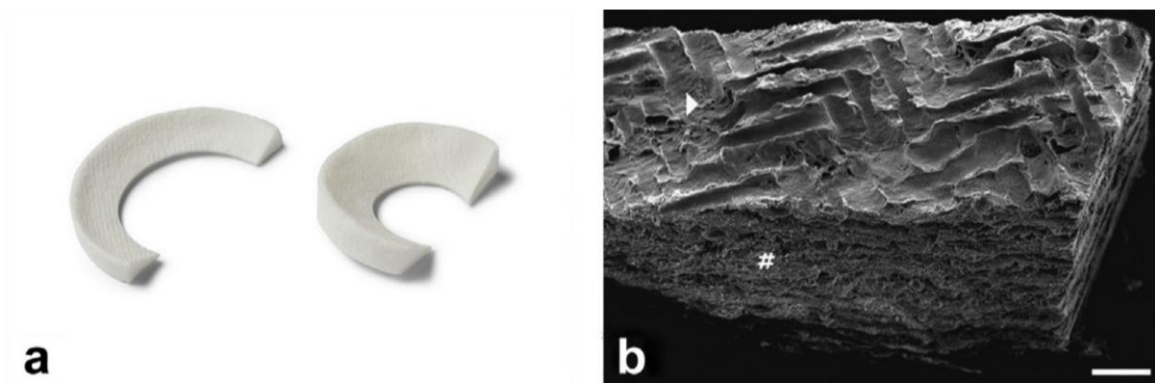


Figura 6. El implante de menisco de colágeno. a) De izquierda a derecha: implante de menisco de colágeno (CMI) medial y lateral. b) Microscopía electrónica de barrido de CMI. En la superficie superior (triángulo) se interponen algunas crestas regulares con surcos en espiga de unos 70 μm de ancho. La superficie lateral (signo de gato) muestra lagunas de 60 a 90 μm de ancho, formadas por láminas de colágeno interconectadas por fibrillas más delgadas (barra $\frac{1}{4}$ 250 μm).[18]

- Actifit® (Orteq Ltd, Londres, Reino Unido) es un andamio acelular hecho de poliuretano y policaprolactona polimérica de degradación lenta (porosidad del 80% y poros que varían en tamaño de 150 a 355 μm) (Figura 7). El armazón meniscal Actifit de Orteq se ha implantado en más de 4000 pacientes con daño irreparable del cartílago meniscal en 30 países de todo el mundo.

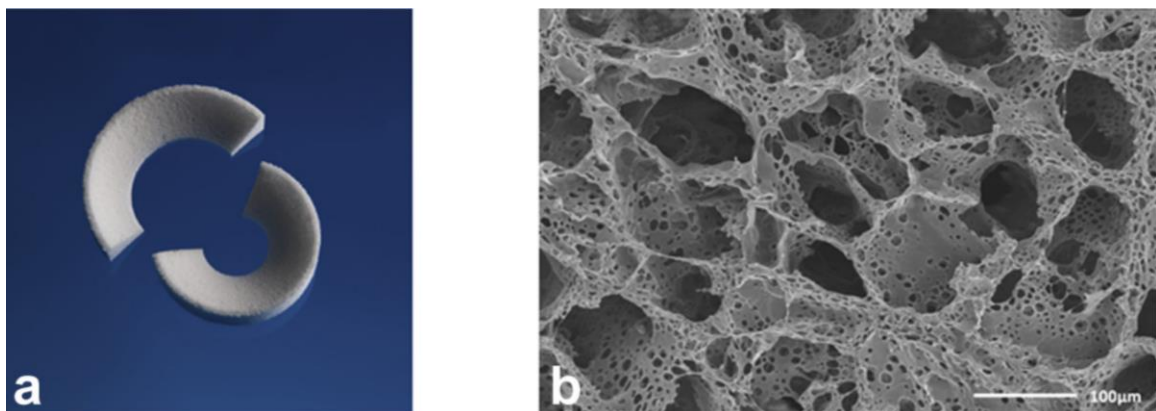


Figura 7. Implante de menisco Actifit®. a) Implante de menisco Actifit medial y lateral. b) Microscopía de estructura porosa y esponjosa del implante de andamio Actifit en una sección transversal. [18]

- NUsurface™ (figura 8). Este es un dispositivo flotante libre (no está fijado) de polietileno de alto peso molecular (UHMWPE) reforzado con policarbonato-uretano (módulo elástico 98 GPa). Se demostró que este

implante de menisco puede redistribuir las cargas en un patrón similar al del menisco natural en condiciones axiales estáticas. Este material es permanente, sin degradación apreciable del tejido o capacidad de infiltración celular.[20]

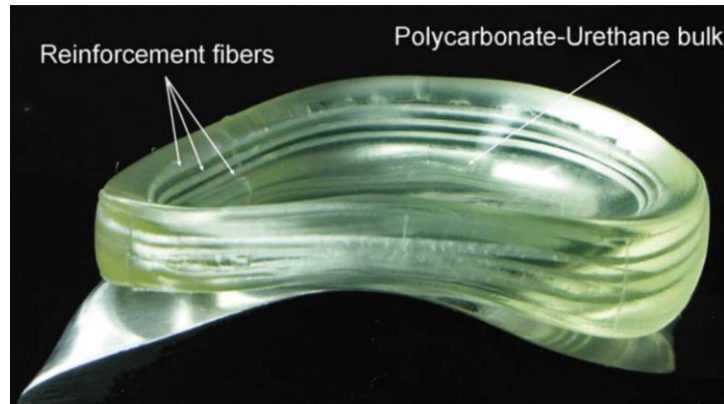


Figura 8. Implante de menisco Nusurface compuesto por una matriz de PCU de policarbonato-uretano, reforzada con polietileno circunferencial, fibras de PE. [18]

3.5 Materiales que componen al hidrogel

3.5.1 Nanotubos de carbono y su funcionalización

Los nanotubos de carbono (CNT) se pueden visualizar como una hoja de grafito que se ha enrollado en un tubo, se forma como una hoja 2-D de átomos de carbono dispuestos en una matriz hexagonal. Existen como estructuras de pared simple (SWCNT) o de paredes múltiples (MWCNT) se componen simplemente de nanotubos de carbono de pared simple concéntricos (figura 9) [21][22].

Poseen un amplio rango de características electrónicas, térmicas y estructurales en función de su diámetro, longitud y quiralidad (ángulo de enrollamiento respecto de la dirección axial del cilindro resultante). Una de sus características de mayor interés en este caso son sus propiedades mecánicas en donde se ha reportado que presentan el módulo de rigidez y la tensión de rotura de 1.5 TPa y 150 GPa, respectivamente [23].

Funcionalización se define como la modificación de propiedades por la adsorción de átomos o moléculas en las paredes exteriores de los nanotubos de carbono. Se pueden obtener cambios en las propiedades físicas, como lo son la solubilidad y dispersión, las cuales son importantes en las propiedades biológicas de los CNT, ya que les permite tener una mejor interacción con moléculas biológicas

Debido a lo mencionado, se han desarrollado distintas metodologías de funcionalización de CNT, las cuales pueden clasificarse de manera general en dos tipos:

- No covalente
- Covalente

En la funcionalización covalente los nanotubos primero son oxidados mediante el uso de ácidos fuertes. Esta oxidación crea defectos en las paredes de los CNT, de tal manera que se generan grupos carboxílicos que incrementan la dispersión y solubilidad en soluciones acuosas. En algunas ocasiones estos defectos superficiales afectan las propiedades estructurales y electrónicas de los CNT, razón por lo cual se utilizan reacciones no covalentes.

La funcionalización no covalente hace uso de biomoléculas y algunos tipos de detergentes. En estos casos estas moléculas “envuelven” al CNT mediante interacciones no covalentes como fuerzas de van der Waals e interacciones de apilamiento π - π (ver figura 9). [24] La funcionalización no covalente de CNT se puede lograr mediante el establecimiento de interacciones π - π (utilizando compuestos aromáticos o polímeros), interacciones electrostáticas e interacciones CH- π entre CNT y biomoléculas. [25] La alta relación superficie-volumen de los CNT permite una alta carga de biomoléculas por unidad de área geométrica.

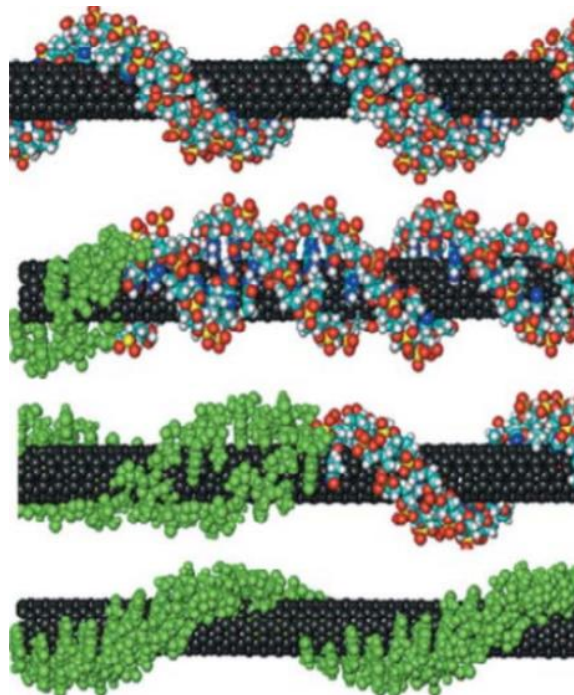


Figura 9. Funcionalización no covalente de CNT. [24]

3.5.2 Quitosano

El quitosano es un copolímero compuesto de unidades de 2-Acetilamina-2-desoxi- β -D-(+)- Glucopiranososa y 2-amino-2-desoxi- β -D Glucopiranososa (figura 10). Su principal fuente es la quitina, la cual es sometida a un proceso de desacetilación termoquímico en un medio alcalino, las condiciones de temperatura, presión, concentración y tiempo determinan el peso molecular del polímero y su grado de desacetilación. [26]

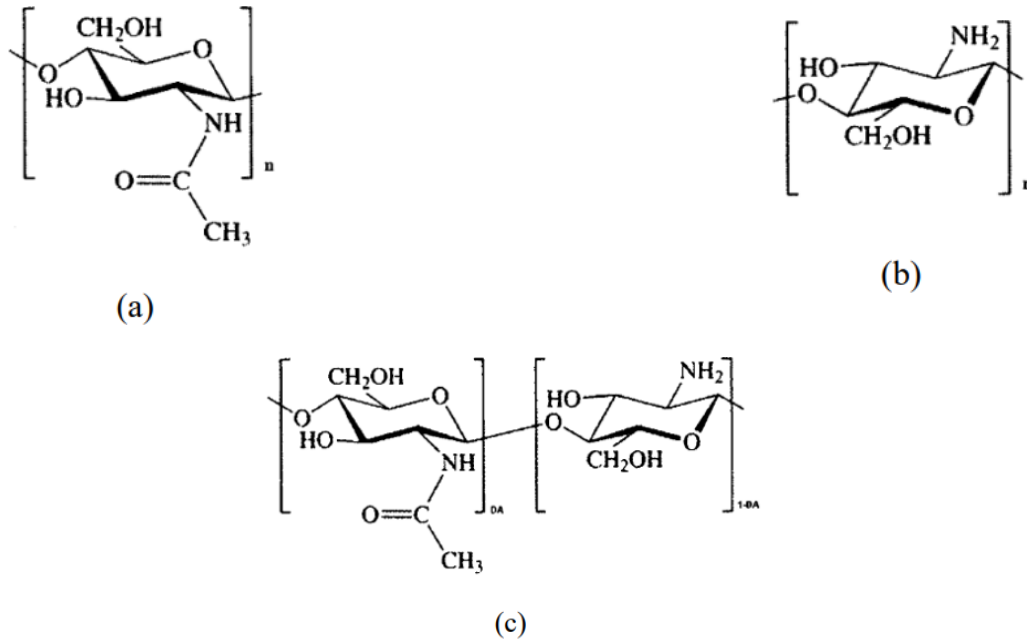
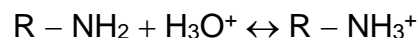


Figura 10. (a) Estructura química de la quitina (2- Acetilamina-2-desoxi- β -D-(+)- Glucopiranososa), (b) del quitano (2-amino-2- desoxi- β -D-Glucopiranososa), (c) del quitosano parcialmente desacetilado (copolímero).[27]

Este biopolímero adquiere el nombre de quitosano cuando el grado de desacetilación de la quitina es mayor o igual al 50% y quitano cuando es del 100%, sus grupos amino permiten que se solubilice fácilmente en medios ácidos, confiriéndole una innumerable cantidad de aplicaciones.

Cuando el número de unidades desacetiladas en la quitina es $\geq 50\%$, pasa de ser completamente insoluble a soluble en medios acuosos ácidos, siendo entonces considerado quitosano.

Lo anterior sucede gracias a que sus grupos amino permiten que se solubilice fácilmente en medios ácidos



Al introducir el quitosano en estado sólido en una solución ácida se ionizan sus grupos amino con los iones H_3O^+ disponibles en la solución (ver reacción de equilibrio). Al protonarse los grupos amino el quitosano se convierte en un polielectrólito catiónico soluble. Lo que le sucede físicamente, es que, al estar ionizadas las aminas, estas son incapaces de formar puentes de hidrogeno con los ácidos carboxílicos del monómero siguiente, adicionalmente, la molécula acetilo es más pesada que la amina y al reducirse la presencia de estas, se ofrece una mayor rotación estérica, incrementándose la flexibilidad de la cadena polimérica y facilitando que el quitosano pase a ser un fluido.[27]

Por otro lado, el paso al estado líquido también se da gracias a que se altera el estado de carga del quitosano y este se convierte en un poli-ión positivo, por lo tanto, empieza a formar parte de los iones disueltos en el medio acuoso. El quitosano es normalmente soluble a un pH menor de 6. [27]

3.5.3 Ácido 2-acrilamido-2-metilpropano sulfónico (AMPS)

En los últimos años, se ha investigado una amplia variedad de monómeros hidrófilos que contienen grupos funcionales como $-\text{COOH}$, $-\text{OH}$, $-\text{CONH}_2$, SO_3H , aminas o R_4N^+ para sintetizar hidrogeles.

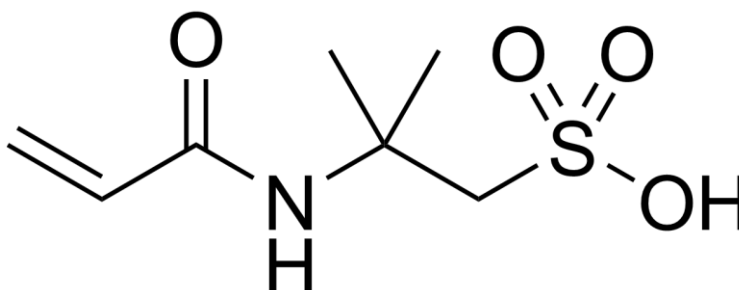


Figura. 11. Estructura química de ácido 2-acrilamido-2-metilpropano sulfónico (AMPS).[28]

El ácido 2-acrilamido-2-metilpropano sulfónico (AMPS) ha recibido atención en los últimos años debido a su estabilidad hidrolítica, no toxicidad y bajo precio (figura 11). Contiene un grupo funcional de ácido sulfónico hidrófilo (SO_2) y un grupo amida no iónico en su estructura molecular, además, se disocia completamente en el rango de pH general. Por tanto, los hidrogeles basados en AMPS exhiben un comportamiento de hinchamiento independiente del pH. AMPS se ha utilizado a menudo como aditivo en la síntesis de resinas para mejorar su rendimiento.[28]

3.5.4 Nanoarcilla (*bentonita*)

Una arcilla es un agregado de minerales y sustancias coloidales resultante de la descomposición química de rocas alumínicas.[29]

Bentonita es un tipo de arcilla compuesta principalmente de montmorillonita que es un aluminosilicato de tipo 2: 1[29]. Una de las clasificaciones posibles de las bentonitas naturales es entre bentonitas altamente hinchables y poco hinchables, también llamadas sódicas y cálcicas, respectivamente. Las bentonitas sódicas contienen principalmente sodio como catión interlaminar, mientras que las bentonitas cálcicas contienen principalmente tanto calcio como magnesio (aunque este último generalmente es menos abundante que el primero) como cationes interlaminares.

La estructura de los minerales de arcilla 2:1 se encuentra representada en la figura 12. Se puede apreciar la estructura antes descrita: tetraedros y octaedros con átomos centrales, coordinados por cuatro y seis átomos de oxígeno, respectivamente. Entre las capas de mineral, para balancear la carga negativa neta, se acomodan iones, como sodio o calcio, que pueden ser intercambiados por otros iones o por sustancias orgánicas.

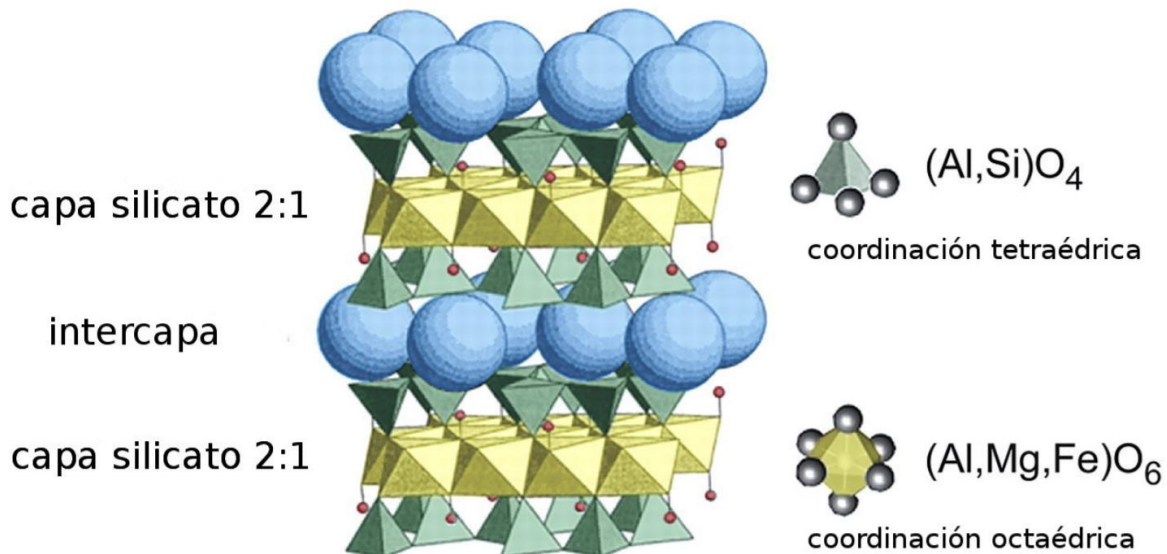


Figura 12. Estructura cristalina genérica de las esmectitas. [30]

La estructura en capas de la arcilla se expande después de humedecerla, Na^+ y Ca^{2+} están fuertemente hidratados en presencia de agua, lo que genera un ambiente hidrófilo en la superficie de la bentonita.

Las aplicaciones industriales de este grupo de minerales se basan en ciertas propiedades físicoquímicas, como su alta superficie específica, su capacidad de

intercambio catiónico, su capacidad de absorción, hidratación e hinchamiento y plasticidad. Convencionalmente, las arcillas modificadas con alquilamonios no son adecuadas para aplicaciones biológicas debido a su toxicidad.[31]

3.5.5 Activación de bentonita

Un tratamiento ácido permite eliminar impurezas y reemplazar los iones interlaminares por iones hidrógeno, mejorando sus propiedades adsorptivas y absorbentes. Por último, un tratamiento organofílico reemplaza los iones intercambiables por iones orgánicos, como compuestos de aminas. [29]

Para ello es necesario desarrollar su capacidad de adsorción mediante un proceso de activación acida de la arcilla. Durante la reacción con el ácido, el área superficial de la arcilla se incrementa debido a la descomposición de la estructura esmectita. El magnesio y, en menor medida, el aluminio son los elementos que se eliminan con mayor facilidad durante la modificación ácida. De manera similar, la activación de la bentonita es un fenómeno complejo que involucra la sustitución de cationes intercambiables, Al^{3+} , Mg^{2+} y Fe^{2+} contra los protones de la hoja octaédrica, lo que mejora la eficacia del blanqueo, mayor hidrofobicidad y estructura de porosidad, superficie mineral de arcilla fuertemente protonada, aumento de la superficie específica de los 20-130 m^2/g originales a más de 200 m^2/g , y generan una mayor afinidad por las moléculas orgánicas.

3.5.6 Fotoiniciador (i2959)

Un fotoiniciador es aquel compuesto que permite efectuar mediante iluminación la polimerización, entrecruzamiento de aquellos componentes que contengan dobles enlaces $\text{C}=\text{C}$.

Las reacciones de fotopolimerización son impulsadas por sustancias químicas que producen radicales libres cuando se exponen a longitudes de onda de luz específicas. Un fotón de una fuente de luz excita o disocia al fotoiniciador en un estado radical de alta energía. Este radical luego induce la polimerización de una solución de macrómero.

Esta polimerización transcurre mediante un mecanismo en cadena donde un intermediario de reacción ataca a un doble enlace $\text{C}=\text{C}$ de una molécula presente, generando a su vez otro intermediario de la misma naturaleza que el anterior, pero de mayor peso molecular ya que incorpora en su estructura una nueva molécula de precursor. El ciclo de propagación del mecanismo en cadena tiene lugar un número suficiente de veces para producir la unión covalente a través de los dobles enlaces $\text{C}=\text{C}$ del número necesario de componentes individuales que conduzcan al entrecruzamiento.[32]

El desarrollo de polímeros fotopolimerizables biocompatibles para aplicaciones de ingeniería de tejidos tiene el potencial de reducir la invasividad y el costo de muchos procedimientos quirúrgicos ya que los polímeros se pueden fabricar a temperaturas y valores de pH cercanos a los rangos fisiológicos e incluso en presencia de materiales biológicamente activos. Además, la capacidad de dirigir la exposición de la luz ultravioleta es particularmente ventajosa para la formación de dispositivos complejos.[33][34]

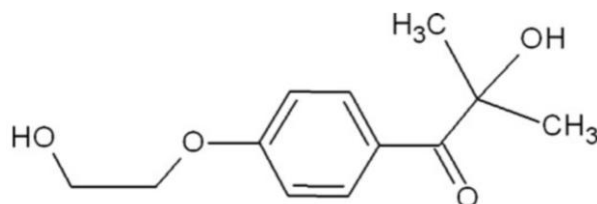


Figura 13. Estructura química de Irgacure® 2959 (CAS 106797-53-9, 2-hydroxy-1-[4-(2-hydroxyethoxy)phenyl]-2-methyl-1-propanone) usado como fotoiniciador.[34]

El fotoiniciador usado en este trabajo es 2-hydroxy-1-[4-(hydroxyethoxy)phenyl]-2-methyl-1-propanone (Irgacure 2959). (figura 13)

Christopher G. Williams y colaboradores [35] evaluaron la toxicidad celular de tres fotoiniciadores sensibles a los rayos ultravioleta 2-hydroxy-1-[4-(hydroxyethoxy)phenyl]-2-methyl-1-propanone (Irgacure 2959), 1-hydroxycyclohexyl-1-phenyl ketone (Irgacure 184) y 2,2-dimethoxy-2-phenylacetophenone (Irgacure 651) en seis poblaciones de células diferentes que se utilizan para la ingeniería de numerosos tejidos (condrocitos de bovinos, células madre mesenquimales derivadas de la médula ósea de cabra, células madre mesenquimales derivadas de la médula ósea humana (Clonetics), células epiteliales corneales de conejo (ATCC), osteoblastos fetales humanos (ATCC) y células germinales embrionarias humanas (línea celular LVEC)). Irgacure 2959 provocó una toxicidad mínima en una amplia gama de tipos y especies de células de mamíferos. Dedujeron que, si bien las diferencias inherentes en las líneas celulares pueden contribuir a la citotoxicidad variable, se observó una correlación entre la tasa de proliferación celular (tiempo de duplicación de la población) y el aumento de la citotoxicidad del fotoiniciador. Las líneas celulares que se dividieron más rápidamente fueron más sensibles a la muerte celular inducida por fotoiniciadores.

3.5.7 Reticulador (crosslinker)

La reticulación es una reacción química por la que los polímeros se unen en cadenas tridimensionalmente formando una especie de red. Tras esta reacción, las propiedades químicas del polímero inicial cambian.[36]

El grado de reticulación juega un papel importante influyendo en la estructura del hidrogel y la capacidad de hinchamiento. Cuanto mayor es el grado de reticulación, menos flexible es un hidrogel para contraerse, hincharse o cambiar de fase en respuesta a los estímulos.

En los últimos años, los hidrogeles derivados de la acrilamida (AAm) han recibido una atención considerable para su uso como sorbentes específicos y como vehículos de soporte en ingeniería biomédica. Los hidrogeles basados en AAm se preparan principalmente mediante reticulante de copolimerización de reticulación por radicales libres. Para aumentar su capacidad de hinchamiento (*swelling*), también se incluye un comonómero iónico en la mezcla de monómeros.[37]

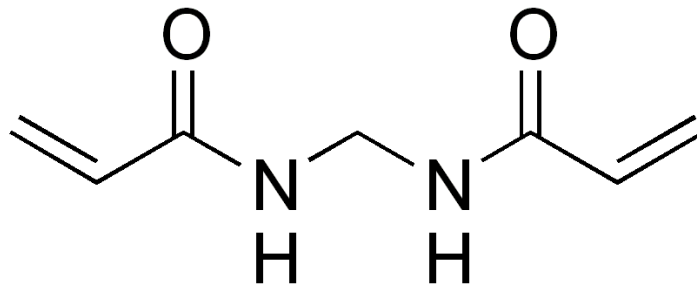


Figura 14. Estructura química de N, N'-metilenbisacrilamida (MBA) usado como reticulador.[38]

Pelton y Chibante [39] informaron de la síntesis de los primeros microgeles sensibles a la temperatura de N-isopropilacrilamida (NIPAAm) reticulada con N, N'-metilenbisacrilamida (MBA). Desde entonces, la mayoría de los estudios han utilizado MBA (figura 14) como reticulante. Karg y col. observaron que los nanogeles PNIPAAm-co-alilacético reticulados con 5% molar de MBA tienen mayor capacidad de hinchamiento que los nanogeles de PNIPAAm-co-ácido vinilacético reticulados con 2% molar de MBA de un estudio anterior. Los autores encontraron el resultado notable ya que, de acuerdo con la teoría del hinchamiento del gel, un aumento en la densidad del reticulante aumenta la entropía elástica, por ejemplo, disminuyendo la capacidad de hinchamiento. Los estudios con hidrogeles (macro) han demostrado que su *swelling* aumenta a medida que aumenta la proporción de MBA, utilizado como reticulante. Esto se ha atribuido al carácter hidrófilo del MBA que hace que la entalpía de mezcla sea un factor más fuerte que la entropía elástica producida por la reticulación, lo que resulta en un aumento neto en el grado de hinchamiento a medida que aumenta la proporción de MBA.

3.5.8 Solución salina amortiguada por fosfatos (PBS)

Constituye una solución amortiguadora de pH comúnmente empleada para procedimientos bioquímicos. Su osmolaridad y concentración de iones (Cl^- , Na^+ y K^+) es muy semejante a la del líquido extracelular de los mamíferos.

Esta solución es isotónica y no-tóxica para las células de los mamíferos. El PBS se emplea como vehículo neutro para células, ya que no modifica el perfil de expresión y funcionamiento celular normal. [40]

3.5.9 Sulfato de Gentamicina

Gentamicina pertenece al grupo farmacéutico J01H. Es un antibiótico del grupo de los aminoglucósidos producido por el actinomiceto micromonospora purpurea. Su acción es bactericida. El mecanismo de acción de gentamicina se debe a su capacidad de penetrar en la bacteria y unirse a las subunidades 30S y 50S de los ribosomas inhibiendo la síntesis proteica. La separación cromatográfica del complejo de gentamicina mostró que consta de 3 componentes principales designados como C₁, C₂ y C_{1a}. [7] [41] (figura 15)

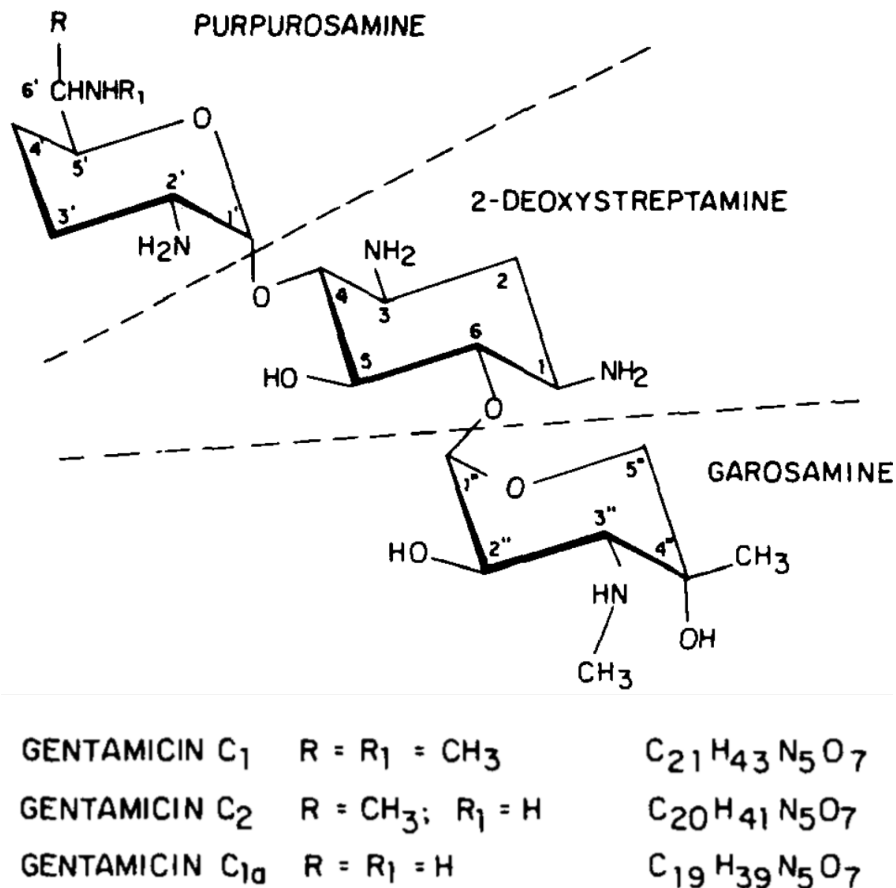


Figura 15. Fórmula estructural del complejo de gentamicina. [7]

Gentamicina ha demostrado ser activa frente a muchas cepas de los siguientes microorganismos:

- Gram-negativos: *Brucella* sp., *Calymnabacterium* sp., *Campylobacter* sp., *Citrobacter* sp., *Enterobacter* sp., *Escherichia coli*, *Serratia* sp., *Salmonella* sp., *Shigella* sp., *Klebsiella* sp., *Proteus* sp. (indol positivo e indol negativo), *Providencia* sp., *Pseudomonas aeruginosa*, *Vibrio* y *Yersinia*.

- Gram-positivos: *Staphylococcus* sp. (incluyendo cepas resistentes a penicilina y meticilina), *Listeria monocytogenes* y algunas cepas de *Staphylococcus epidermidis*.

El rango terapéutico de gentamicina está comprendido entre 5 y 10 µg/ml, siendo el pico no superior a 10-12 µg/ml (medido de 15 a 30 minutos después ser inyectado) y el valle inferior a 2 µg/ml (medido justo antes de la dosis siguiente). Las dosis se expresan en términos de gentamicina base. [41]

La concentración mínima inhibitoria (CMI) para los microorganismos más sensibles a gentamicina (algunos estafilococos, enterobacterias y cepas sensibles de *Pseudomonas aeruginosa*) está entre 0.03 y 2 µg/ml. Los aminoglucósidos son normalmente bactericidas a concentraciones no muy por encima de la CMI. Los microorganismos con CMI de hasta 8 µg/ml son sensibles a gentamicina. [41]

Cuando se administra gentamicina en infusión intravenosa de 1 mg/kg de peso corporal durante un período de 2 horas, las concentraciones séricas alcanzadas son similares a las obtenidas por vía intramuscular (aproximadamente 4 µg/ml). La concentración plasmática máxima en adultos con función renal normal tras la administración intravenosa de 1.5 mg/kg es de 6 µg/ml. Las concentraciones plasmáticas máximas se alcanzan a los 30 minutos y a los 15 minutos después de una infusión intravenosa de 30 minutos y 1 hora, respectivamente.[41]

Se debe evitar el uso de gentamicina tanto conjuntamente como en forma secuencial con medicamentos neuro o nefrotóxicos y diuréticos potentes.

He li y colaboradores, sintetizaron hidrogeles haciendo uso de colágeno, CNT y sulfato de gentamicina, en donde la carga del fármaco se llevó a cabo hinchando el peso conocido de la muestra de hidrogel en solución de sulfato de gentamicina en tampón fosfato (pH 7.4) a 37° C bajo atmósfera de nitrógeno durante 24 h.[42]

3.6 Técnicas de caracterización

3.6.1 Espectroscopía Raman

La espectroscopia Raman es una herramienta muy útil para la caracterización de materiales de carbono. El análisis de las vibraciones moleculares puede proveer información sobre la estructura que se tiene del material, permitiendo su identificación. [43]

En un espectrómetro Raman la muestra se irradia con una fuente intensa de radiación monocromática, normalmente en la región visible del espectro. Desde el punto de vista cuántico, la espectroscopía Raman es el resultado de la colisión inelástica del fotón incidente con los electrones de las moléculas del material, lo cual genera vibraciones cuantizadas llamadas fonones. Cada material dispondrá de un conjunto de frecuencias vibracionales diferentes, propios de su composición molecular. El conjunto de dispersiones producido por cada molécula del material formará el espectro Raman característico de la muestra (figura 16). Una de las mayores ventajas de esta técnica es que el análisis se realiza directamente sobre la muestra sin necesitar ningún tipo de preparación especial. Uno de los obstáculos que pueden presentarse durante la medición es la presencia de impurezas fluorescentes, sin embargo, esto puede corregirse en algunos casos.[44]

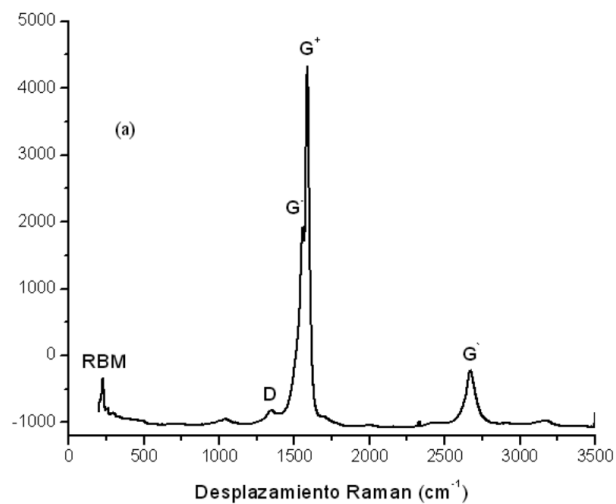


Figura 16. a) Espectro Raman característico de CNT.[21]

La espectroscopía Raman ha sido ampliamente utilizada para caracterizar distintos procesos en CNT, así como para evaluar sus propiedades. La posición, el ancho medio y la intensidad de las bandas se modifican de acuerdo con la forma del carbón que se esté analizando. Las bandas características de los CNT se resumen en el espectro mostrado en la figura 16 de la manera siguiente:

1. Modo de respiración radial (RBM por sus siglas en inglés): Banda de baja frecuencia ($<200 \text{ cm}^{-1}$), su frecuencia depende esencialmente del diámetro del tubo (este modo ha sido observado solamente en CNT de pared simple)
2. Banda D (desorden): Se aprecia a 1340 cm^{-1} y se asigna al grado de desorden en el grafito

3. Banda G o modo tangencial: Banda localizada a altas frecuencias entre 1500 y 1600 cm^{-1} , la cual aparece en varios sistemas de carbono. En CNT esta banda se atribuye al modo de estiramiento E_{2g} del grafito.
4. También pueden observarse modos de segundo orden entre 2450 y 2650 cm^{-1} asignados al primer sobretono de la banda D (con frecuencia recibe el nombre de banda G') y un modo correspondiente a la combinación de modos de las bandas D y G entre 2775 cm^{-1} y 2950 cm^{-1} . [21]

3.6.2 Espectroscopía infrarroja reflectancia total atenuada FTIR-ATR

ATR es un método de muestreo por contacto que involucra un cristal con un alto índice de refracción y excelentes propiedades de transmisión de IR. ATR es una de las técnicas de muestreo más populares utilizadas por espectroscopistas FT-IR porque es rápido, no destructivo y no requiere preparación de muestras.[45]

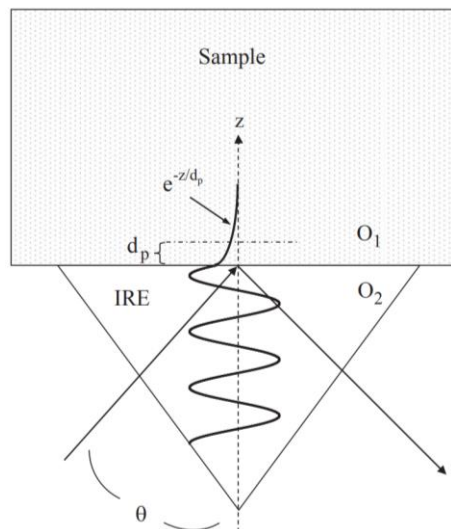


Figura 17. Diagrama de un cristal ATR de reflexión única que representa los principios básicos de la técnica. [45]

El tiempo total de análisis del polímero mediante la técnica ATR es de menos de 1 minuto. Con el muestreo ATR se dirige el haz de infrarrojos hacia un cristal de índice de refracción relativamente más alto. El haz de infrarrojos se refleja en la superficie interna del cristal y crea una onda evanescente, que se proyecta ortogonalmente en la muestra en íntimo contacto con el cristal ATR. Parte de la energía de la onda evanescente es absorbida por la muestra y la radiación reflejada (parte ahora absorbida por la muestra) se devuelve al detector (figura 17). [46]

La profundidad de muestreo del método ATR es de aproximadamente 2 a 15 μm , depende de la longitud de onda y aumenta al disminuir el número de onda.

3.6.3 Espectrofotometría de absorción ultravioleta visible UV-VIS

La espectrofotometría de absorción ultravioleta visible (UV-VIS) se encarga de medir la atenuación de un haz de luz después de su paso a través de una muestra. Esta técnica es comúnmente usada para la detección de grupos funcionales, detección de impurezas, análisis cualitativo y cuantitativo de analitos, medicamentos con grupos cromóforos entre otras aplicaciones. El principio básico de la técnica de UV-VIS es la absorción de radiación de una frecuencia determinada en el rango de longitudes de onda de UV-VIS, realizada por una molécula para producir una transición de un nivel de baja energía a un nivel de mayor energía.

El fundamento de la espectroscopía se debe a la capacidad de las moléculas para absorber radiaciones, entre ellas las radiaciones dentro del espectro UV-visible. Las longitudes de onda de las radiaciones que una molécula puede absorber y la eficiencia con la que se absorben dependen de la estructura atómica y de las condiciones del medio (pH, temperatura, fuerza iónica, constante dieléctrica), por lo que dicha técnica constituye un valioso instrumento para la determinación y caracterización de biomoléculas. [47]

3.6.4 Microscopía electrónica.

Las imágenes de microscopía electrónica se obtienen mediante la detección, procesamiento y visualización de las señales resultantes de las interacciones entre un haz de electrones de alta energía con la materia. Estas interacciones pueden proporcionar información sobre topografía, composición y estructura cristalográfica. [48]

3.6.5 Microscopio Electrónico de Barrido (SEM)

Todos los microscopios electrónicos de barrido (*Scanning Electron Microscope SEM*) constan de un cañón electrónico en una columna de alto vacío, del orden de 10^{-5} mm de Hg, en la cual se genera un haz de electrones de alta energía (5 - 40 keV). Este haz es colimado por una serie de lentes electrónicas y focalizado sobre la muestra analizada. Los detectores registran las señales originadas por la interacción entre el haz de electrones y la muestra, que son procesadas y visualizadas en el sistema final de observación (monitor o pantalla de computadora).[48]

La formación de la imagen depende de las diferentes señales recogidas que se dispersan como consecuencia de la interacción del haz de alta energía con la

muestra. Los electrones retrodispersados y los electrones secundarios se generan dentro del volumen interactivo de la muestra del haz primario y son las dos señales principales que se utilizan para formar imágenes.

Los principales requerimientos que deben presentar las muestras para ser observadas mediante SEM son: ser compatible con operaciones bajo vacío y ser un conductor eléctrico. En el caso de las muestras no conductoras se procede depositar (recubrir) una capa muy fina (nm) de un metal conductor sobre la superficie de la muestra. [49]

La función de las capas delgadas de material conductor es:

1. Incrementar la conductividad eléctrica superficial de la muestra.
2. Incrementar la conductividad térmica de la superficie.
3. En algunos casos, para aumentar la señal SE (secondary electrons) y BSE (back-scattered electrons) de la muestra.

3.6.6 Microscopio electrónico de transmisión de barrido (STEM).

El microscopio electrónico de transmisión de barrido (*Scanning Transmission Electron Microscope STEM*) es una herramienta que proporciona una gama de diferentes modos de imagen con la capacidad de proporcionar información sobre la composición elemental y la estructura electrónica con la máxima sensibilidad, la de un solo átomo. STEM funciona según el mismo principio que el microscopio electrónico de barrido (SEM). La diferencia con SEM es que se utilizan muestras delgadas para que también estén disponibles los modos de transmisión de imágenes. Una de las grandes ventajas es que la preparación de la muestra no requiere más que simplemente rociar o distribuir las nanoestructuras en una película de soporte de carbón perforada delgada disponible comercialmente.

Una de las ventajas clave de STEM es tener varios detectores funcionando simultáneamente para recopilar la máxima información posible de cada escaneo. Existen ventajas importantes al aumentar el voltaje de aceleración. Una mayor penetración de la muestra significa que se pueden tolerar muestras más gruesas; pero lo que es más importante, la disminución de la longitud de onda del electrón conduce a una mayor resolución espacial y la capacidad de ver las configuraciones atómicas reales dentro de la nanoestructura.[50][51]

3.6.7 Hinchamiento (swelling).

La capacidad de mostrar un cambio medible de volumen en respuesta a estímulos externos es una propiedad fundamental de los hidrogeles. Algunos hidrogeles

exhiben este cambio de volumen por hinchamiento (figura 18), mientras que otros experimentan transiciones entre las fases sol y gel.

El grado de reticulación influye en el área permitida para la difusión a través de la red de hidrogel y, posteriormente, en la capacidad de los hidrogeles para absorber agua. La capacidad de absorber agua se representa a partir de la relación de hinchamiento de equilibrio que se muestra en la Ecuación 1, como la relación de la masa de un hidrogel completamente hinchado (en equilibrio con medio acuoso) a la masa de un hidrogel deshidratado (xerogel).[36]

Ecuación 1:

$$S (\%) = \frac{M_t - M_0}{M_0}$$

Donde S es *swelling ratio*, M_t es la masa del gel hinchado en el tiempo t , y M_0 es la masa del xerogel en el tiempo 0. [37]

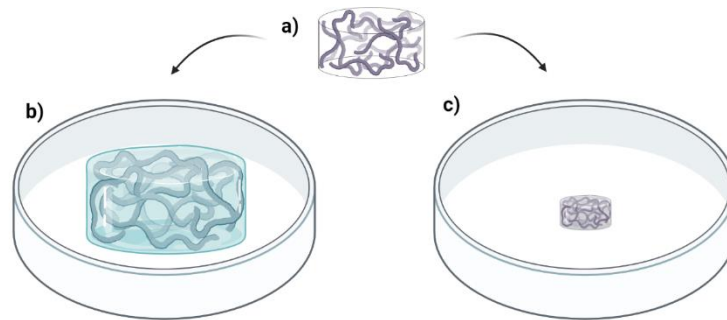


Figura 18. Hidrogel deshidratado (a), hinchado (b) y encogido (c) como resultado de pequeños cambios en los estímulos externos. (Creado con BioRender.com)

3.6.8 Reología

La palabra reología proviene del griego ρειν (reos) la cual significa fluir. La reología es entonces la rama de la física que estudia el comportamiento de los fluidos sometidos a diferentes tipos de esfuerzos.

La reología de fluidos es usada para describir la consistencia de diferentes fluidos, normalmente mediante dos componentes, la viscosidad y la elasticidad.

3.6.9 Viscosidad

La viscosidad dinámica o molecular, μ , se puede definir como una medida de la resistencia a fluir de un fluido. Dicho concepto está definido por la Ley de Newton (ecuación 2), que relaciona el esfuerzo cortante con la velocidad de deformación (gradiente de velocidad).[10]

Ecuación 2:

$$\tau = \mu \cdot \dot{\gamma}$$

donde, μ , es la viscosidad dinámica (Pa·s), τ , es el esfuerzo cortante o de cizalla (Pa), $\dot{\gamma}$, velocidad de deformación (s^{-1})

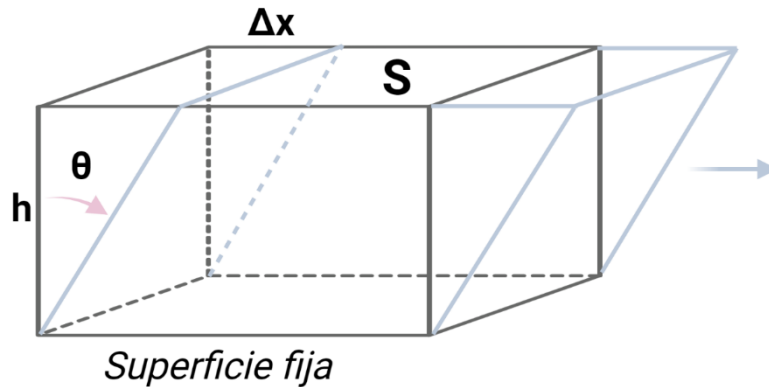


Figura 19. Esfuerzo de cizalla. (Creado con BioRender.com)

Cuando la fuerza F que actúa sobre el cuerpo es paralela a una de las caras mientras que la otra cara permanece fija, se presenta un tipo de deformación denominada de cizallamiento, en el que no hay cambio de volumen, pero sí de forma.

Definimos el esfuerzo (τ) ó shear Stress (en inglés), como F/S la razón entre la fuerza tangencial y el área S de la cara sobre la que se aplica. La deformación por cizalla se define como el cociente $\Delta x/h$, donde Δx es la distancia horizontal que se desplaza la cara sobre la que se aplica la fuerza y h , la altura del cuerpo, tal como vemos en la figura 19. [10]

La velocidad de cizalla nos aporta la velocidad de variación de la deformación, también se llama velocidad de deformación y la definimos matemáticamente de la siguiente forma:

Ecuación 3:
$$\frac{dy}{dt} \equiv \dot{\gamma} \equiv D = \frac{du}{dy} = (s^{-1})$$

En la tabla1 se presenta un sumario de algunos comportamientos de flujo.

Tabla 1. Modelos reométricos. [11]

	Fluidos Ideales	Pseudo-plásticos		Plásticos		
	Newtoniano	Ostwald	Steiger / Ory	Bingham	Casson	Otros
Comportamiento de Flujo $D : f(\tau)$						
Características $D : f(\tau)$	$D = \frac{\tau}{\eta}$	$D_{ostw} = k \tau^n (n > 1)$	$D_s = a \tau^3 + \tau$	$D_s = \frac{\tau - \tau_s}{\eta_s}$	$D_s = \frac{(\sqrt{\tau} - \sqrt{\tau_c})^2}{\eta_c}$	$D = k(\tau - \tau)^n (n < 1)$
Viscosidad $\eta : f(\tau)$	$\eta = \frac{\tau}{D}$			$\eta_s = \frac{\tau - \tau_s}{D_s}$	$\eta_c = \frac{(\sqrt{\tau} - \sqrt{\tau_c})^2}{D_c}$	
Valor de doblagación f	0	0	0	$\tau_s = \tau - D_s \eta_s$	$\tau_c = (\sqrt{\tau} \sqrt{\eta_c} \sqrt{D})^2$	
Límite de la Viscosidad $\eta_0 (D = a_0)$	$\eta_0 = \eta$	$\eta_0 = \infty$	$\eta_0 = \frac{1}{c}$	0	$\eta_0 = \infty$	$\eta_0 = \infty$
Representación logarítmica del comportamiento de flujo $\log \eta : f(\log D)$						

3.6.10 Módulo de almacenamiento y módulo de pérdida.

Para un sólido elástico perfecto, se puede utilizar la ley de Hooke, la cual establece que el esfuerzo de corte es proporcional al desplazamiento (digamos en x) dividido entre el espesor y . Esta es la deformación γ , la cual se define mediante:

Ecuación 4:
$$\gamma = \frac{x}{y} = \frac{dx}{dy}$$

donde en la última igualdad se ha considerado “ x ”, “ y ” como cantidades infinitesimales. Para un sólido ideal (Hookeano), se puede calcular la deformación a partir de las distancias macroscópicas x , y debido a que esta es constante a lo largo de la muestra, aunque en general se tendrá que usar la versión diferencial. Para un sólido Hookeano: $\tau = G\gamma$ es el llamado “módulo de elasticidad”

Sin embargo, los hidrogeles son llamados materiales viscoelásticos, los cuales son los formados por la suma de un componente elástico (Hookeano o no) que absorbe la energía aplicada, transformándola durante la deformación en energía potencial,

de forma que cuando esta cesa, la deformación vuelve a su estado inicial, y un componente viscoso (Newtoniano o no), que absorbe la energía aplicada transformándola en calor y fluyendo.

Para obtener información de las propiedades de los hidrogeles se someten a experimentos oscilatorios, los cuales consisten en aplicar un esfuerzo o deformación sinusoidal:

Ecuación 5:
$$\gamma = \gamma_0 \sin(\omega t)$$

donde γ_0 es la amplitud de la onda de deformación y ω es la frecuencia de oscilación. El esfuerzo resultante a la deformación es:

Ecuación 6:
$$\tau = \tau_0 \sin(\omega t + \delta)$$

donde δ es el ángulo de fase. Las ecuaciones para γ , τ , en estos casos, se han representado en la figura 20. El ángulo de fase δ es cero para los sólidos elásticos y 90° para los líquidos Newtonianos. Un fluido viscoelástico exhibe un ángulo de fase entre cero y 90° .

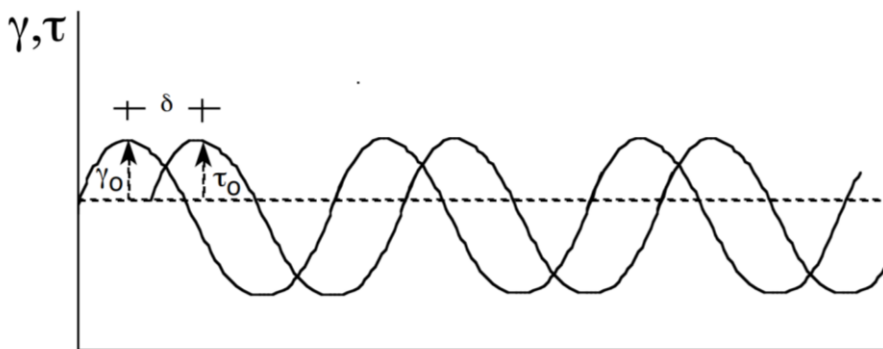


Figura 20. Deformación oscilatoria y respuesta del esfuerzo, mostrando el ángulo de fase entre estímulo y respuesta.[11]

Este tipo de comportamiento puede ser descrito mediante números complejos; en tal sentido, el esfuerzo puede descomponerse en dos componentes, un componente en fase y un componente fuera de fase. Puede definirse entonces un módulo de elasticidad complejo, $G^* = G' + i G''$. La señal G' se denomina el módulo de almacenamiento (elástico) o energía almacenada por ciclo y G'' como el módulo de pérdidas (viscoso) o energía disipada por ciclo.

A bajas frecuencias $G' < G''$ implica que el material se comporta como un líquido. Al aumentar la frecuencia esta tendencia se invierte y cuando $G'' < G'$ el material se comportará como un sólido. [10], [11], [52]

3.6.11 Actividad metabólica celular: Ensayo de resazurina.

Resazurina es un indicador de capacidad metabólica celular que se ha utilizado desde finales de la década de 1920. Desde entonces, este colorante redox se utiliza como indicador del metabolismo activo en cultivos celulares.[12]

El ensayo de resazurina se basa en la reducción intracelular de resazurina a resorufina por células viables metabólicamente activas. Se describen varios mecanismos para la reducción de resazurina por células viables que utilizan NADH y NADPH como fuente de electrones. Estos incluyen la reducción por enzimas mitocondriales o microsomales, por enzimas en la cadena respiratoria [26], o por agentes de transferencia de electrones. (figura 21)

La resazurina se puede disolver en tampones fisiológicos, lo que permite su uso directo en cultivos celulares. La solución de resazurina es una solución de color azul profundo que muestra poca o ninguna fluorescencia intrínseca. Cuando la resazurina se difunde a través de las membranas celulares, las células viables la reducen metabólicamente al producto fluorescente de color rosa, resorufina, que también es permeable. La formación de este producto fluorescente soluble en agua es la principal ventaja en comparación con los ensayos basados en sales de tetrazolio.

Este colorante es poco tóxico para las células (no así otras técnicas descritas), y permite la continuidad de estudios en las mismas células, economizando tiempo y dinero, especialmente en cultivos primarios donde las células son muy escasas y preciadas. Además, es sensible y altamente reproducible. Es posible obtener una medida de absorbancia a una longitud de onda de 570 nm y/o fluorescencia en 530 nm_{ex} y 590 nm_{em}, ya que este colorante tiene propiedades tanto cromóforas como fluoróforas. Pero solo la resorufina se puede determinar fluorimétricamente, en oposición a la resazurina.[53] [54]

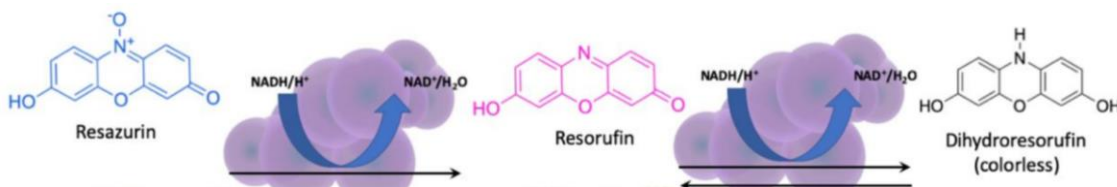


Figura 21. Reducción de resazurina a resorufina y reducción reversible de resorufina a dihidroresorufina. [54]

La curva de aumento de concentración de resorufina tiene solo un rango lineal limitado que depende en gran medida de la temperatura, el pH y la concentración inicial de resazurina. La reducción de resazurina a resorufina no es el paso final de la reacción en algunos casos. Algunas células pueden reducir más activamente la resorufina a dihidroresorufina (figura 21). Este compuesto no muestra fluorescencia y es muy tóxico para las células. La dihidroresorufina puede revertirse

espontáneamente a resorufina, pero la velocidad de reacción de esta reacción inversa es mucho más lenta.

4 HIPÓTESIS

- Mediante un proceso de fotopolimerización se formará una red polimérica la cual será usada como biotinta para obtener como producto final una prótesis con propiedades adecuadas para remplazar el menisco.
- La agregación de MWCNT modificará las propiedades viscoelásticas del hidrogel.
- La funcionalización de MWCNT con CS favorecerá al hidrogel aumentando su actividad metabólica celular, además, al ser añadidos al hidrogel, se verán modificadas sus propiedades viscoelásticas.
- Al añadir GENT al hidrogel se verá favorecida su actividad metabólica celular.

5 OBJETIVOS

5.1 General.

Obtener prótesis de menisco a través de impresión 3D, haciendo uso de f-MWCNT, los polímeros 2-acrilamida-2-metilpropanosulfonato de sodio y quitosano, así como del fármaco gentamicina.

5.2 Secundarios.

- a) Funcionalizar nanotubos de carbono de paredes múltiples (f-MWCNT) con quitosano (CS), caracterizar y comparar sus propiedades respecto a nanotubos de carbono de paredes múltiples (MWCNT).
- b) Activar bentonita (BENT) y caracterizar mediante espectroscopia FTIR-ATR.
- c) Sintetizar hidrogeles con monómeros como 2-acrilamida-2-metilpropanosulfonato de sodio (AMPS) y CS incorporando MWCNT ó f-MWCNT.
- d) Polimerizar hidrogeles mediante radiación de luz UV y dar seguimiento a este proceso mediante espectroscopía Raman.
- e) Verificar interacción de compuestos mediante espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier de reflexión total atenuada (ATR-FTIR).
- f) Analizar morfología mediante Microscopía Electrónica de Barrido.

- g) Analizar la variación de *swelling* en cada hidrogel.
- h) Caracterizar propiedades viscoelásticas del hidrogel.
- i) Realizar ensayos de actividad metabólica celular.
- j) Añadir GENT al hidrogel, caracterizar y comparar sus propiedades respecto hidrogel que no la contengan.
- k) Analizar la morfología por microscopía electrónica de barrido.
- l) Realizar segmentación de menisco e impresión 3D.

6 METODOLOGÍA

6.1 Funcionalización de MWCNT

A continuación, se describe el proceso llevado a cabo para funcionalizar MWCNT con quitosano (CS) (figura 22):

1. Preparar 20 mL de ácido acético al AA (1%)
2. Pesar 20 mg de quitosano, los cuales se añaden a la solución de AA previamente preparada y son mezclados mediante agitación magnética.
3. Pesar 5 mg de MWCNT
4. Agregar MWCNT a la solución de AA/CS anteriormente preparada
5. Sónicar durante 15 min
6. Mediante agitación magnética mezclar durante 60 min.

Finalmente, para su uso en la fabricación de hidrogeles, se secan a una temperatura de 80 °C, obteniendo así f-MWCNT a una concentración 1:4 (MWCNT:CS).

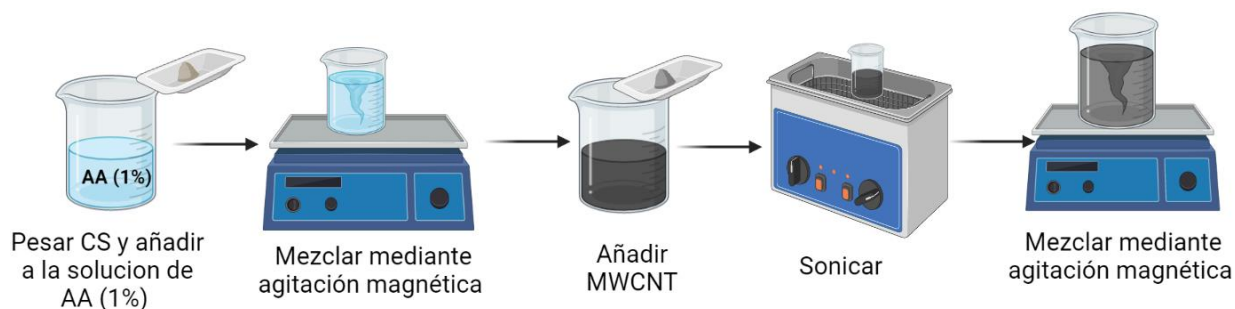


Figura 22. Proceso de funcionalización de nanotubos de carbono multicapa (MWCNT) (Creado con BioRender.com)

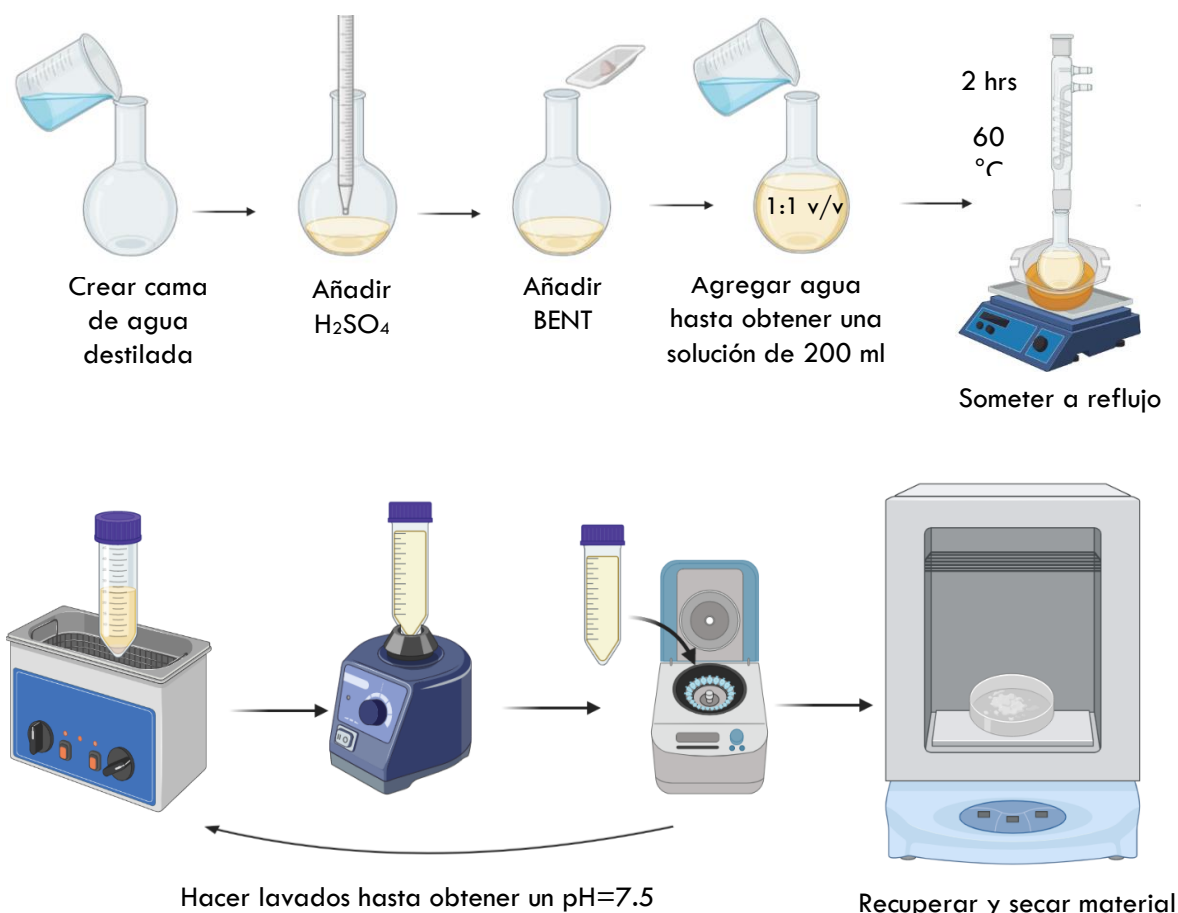
6.2 Activación de bentonita

El proceso de activación del reactivo bentonita (BENT) fue realizado basándose en el proceso descrito en la patente "Procesos para obtener arcillas activadas" (WO 2017/195121 A1) [29]. A continuación, se describe el proceso llevado a cabo.

Activación de Bentonita:

Primeramente, en un matraz bola, crear una pequeña cama de agua destilada. Haciendo uso de una pipeta de vidrio, se añade H_2SO_4 de tal manera que finalmente se obtenga una solución de 200 ml a una concentración 1:1 v/v, a la cual se añaden 15 g de BENT y el agua destilada necesaria para obtener la solución anteriormente mencionada. Someter a reflujo durante dos horas a una temperatura constante de $60\text{ }^\circ\text{C}$, enfríe a temperatura ambiente, recupere el reactivo activado y haga lavados con agua destilada hasta obtener un $\text{pH}=7.5$. Finalmente secar a una temperatura de $80\text{ }^\circ\text{C}$ durante 3 horas.

En la figura 23 se muestra el proceso de activación.



6.3 Síntesis de hidrogeles.

Los pasos seguidos para llevar a cabo la síntesis del hidrogel CS/AMPS se describen a continuación y se muestran en figura 24. La síntesis del hidrogel fue basada en el método seguido por Feichen Yang et al [55].

1. Se disuelve CS y BENT activada en ácido acético (AA) al 1%, bajo agitación mecánica a una temperatura de 80 °C.
2. Una vez que se forma un gel (10 min aprox.), se añade MBA e I2959, además, se agrega el PBS correspondiente a la síntesis. Se deja mezclando mecánicamente hasta incorporar totalmente.
3. Al tener una mezcla homogénea, se añade gota a gota AMPS.
4. Una vez elaborado el hidrogel, por medio de extrusión mecánica por pistón se elabora la pieza deseada
5. Mediante luz ultravioleta, polimerizar la pieza fabricada.
6. Finalmente se obtiene un xerogel.

Se sintetizaron distintos tipos de hidrogeles, teniendo de manera general, 0.12 gr de fotoiniciador (I2959), 0.122 gr de crosslinker (MBA) y 1.33 mL de AMPS.

Finalmente, se obtienen síntesis con una relación 1:1 de CS: BENT activada y síntesis con relación 5:1 de CS: BENT activada. Tanto f-MWCNT como MWCNT pueden ser agregados en el paso 1, dependiendo de la síntesis y la cantidad a agregar.

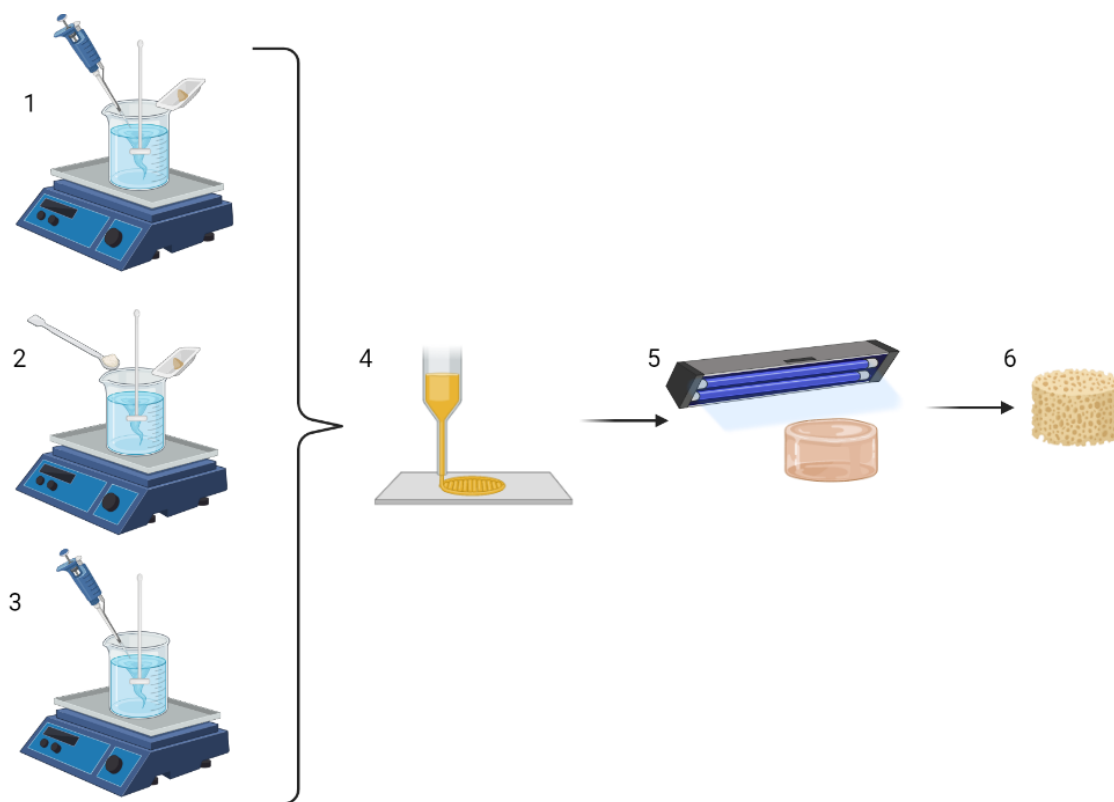


Figura 24. Proceso de síntesis de hidrogel CS/AMPS. (Creado con BioRender.com)

Se prepararon hidrogel de tres concentraciones 10,50 y 80 $\mu\text{g} / \text{cm}^2$ (concentración en $\mu\text{g} / \text{cm}^2 \times 1.6 =$ concentración en $\mu\text{g}/\text{mL}$) de MWCNT, las cuales fueron propuestas por ensayos de resazurina hechos por otros autores y comprobado en este trabajo. [56][57]

A continuación, en la tabla 2 se muestran las variables hechas.

Tabla 2. Síntesis de hidrogel realizadas

Síntesis / Material	MWCNT (gr/cm ²)	f-MWCNT (gr/cm ²)	PBS (mL)	AA (mL)	Síntesis / Material	MWCNT (gr/cm ²)	f-MWCNT (gr/cm ²)	PBS (mL)	AA (mL)
A (1:1)	0	0	15	2.5	H (5:1)	0	0	13.5	2.0
B (1:1)	10	0	15	2.5	I (5:1)	10	0	13.5	2.0
C (1:1)	50	0	15	2.5	J (5:1)	50	0	13.5	2.0
D (1:1)	80	0	15	2.5	K (5:1)	80	0	13.5	2.0
E (1:1)	0	10	15	2.5	L (5:1)	0	10	13.5	2.0
F (1:1)	0	50	15	2.5	M (5:1)	0	50	13.5	2.0
G (1:1)	0	80	15	2.5	N (5:1)	0	80	13.5	2.0

Además, se realizaron 6 síntesis a las cuales fue agregado Sulfato de Gentamicina (GENT) a una concentración de 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ con respecto al contenido de PBS presente en la síntesis. Tres de las síntesis con concentración 1:1 (0.06 gr/mL : 0.06 gr/mL)

y tres más con concentración 5:1 (0.07 gr/mL : 0.014 gr/mL) de CS:BENT activ. Las síntesis fueron las siguientes:

1. INICIAL [0 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$].
2. MWCNT [80 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$].
3. f-MWCNT [80 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$].

Estas síntesis fueron seleccionadas debido a su desempeño en pruebas de actividad metabólica celular.

6.4 Impresión de hidrogel

La elaboración de objetos mediante impresión 3D se realiza a partir de un archivo cuya base estructural es un modelo tridimensional virtual viable, en el caso de su aplicación en medicina, son requeridos los estudios de imagen de un paciente para crear un molde a la medida.

La resonancia magnética nuclear (RMN), la tomografía axial computarizada (TAC) y otras imágenes radiográficas son las principales fuentes para obtener información volumétrica tridimensional de tejidos y órganos. La información obtenida mediante estos recursos se almacenan en un archivo de imágenes digitales (archivo.DICOM, por sus siglas en inglés) que después se utilizan para desarrollar el modelo CAD mediante un proceso de ingeniería inversa. Así, este proceso transforma la “anatomía analítica” en “anatomía sintética”.

En este caso particular, el archivo MRI se descargó de old.mridata.org/fullysampled/knees, mediante el uso del programa 3D Slicer se realizó el proceso de segmentación de imágenes, como se muestra en la captura de pantalla en figura 25.

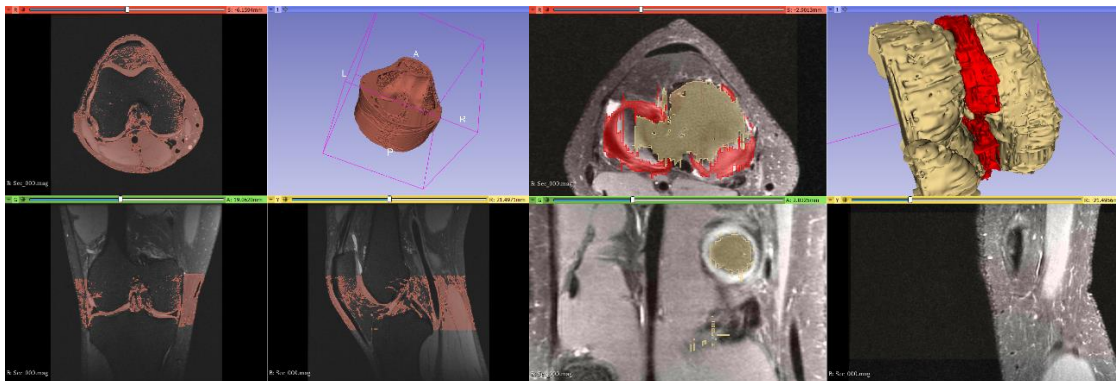
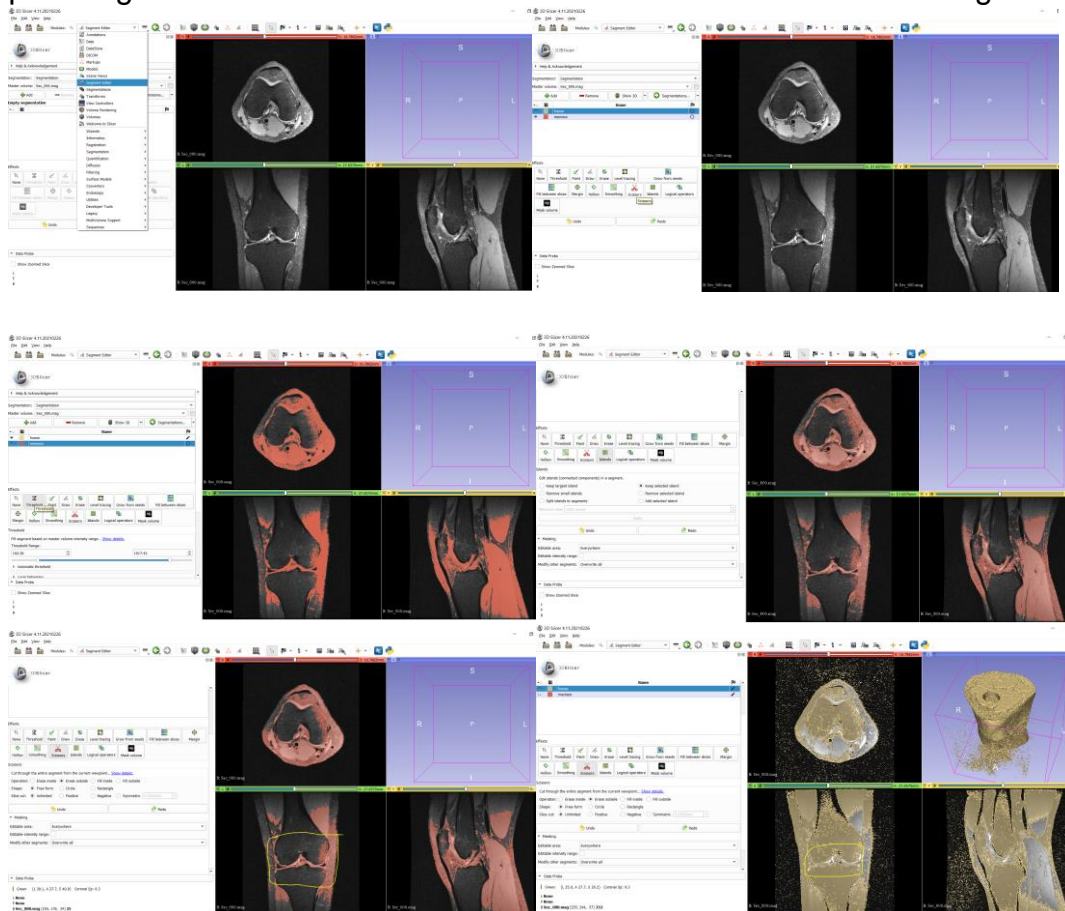


Figura 25. Proceso de fabricación de prótesis de menisco mediante segmentación de imágenes.

A continuación, se describe el proceso llevado a cabo para obtener dicha segmentación (figura 26).

1. Una vez descargado el archivo MRI, dar clic en *DATA* y elegir el archivo correspondiente, en donde automáticamente se observarán diferentes vistas (superior, sagital y frontal)
2. Dar clic en *segment editor* y agregar los tejidos de interés, en este caso solo seleccione hueso y menisco, etiquetados con ese mismo nombre y colores llamativos para hacer más notoria la diferencia entre ambos.
3. Acto seguido, dar clic en *threshold* y ajustar el *range threshold* de manera que sea favorable para el tejido seleccionado.
4. Una vez seleccionado el tejido deseado, dar clic en *keep select island*, dar clic en *scissors/ erase outside* y seleccionar el área de interés, es decir, el área en donde se encuentra el menisco.
5. Repetir el mismo proceso, seleccionando otro tipo de tejido, como se muestra en las imágenes.
6. Finalmente, mediante *draw* y *paint* detallar los tejidos seleccionados imagen por imagen con el fin de obtener el mismo resultado obtenido en la figura 25.



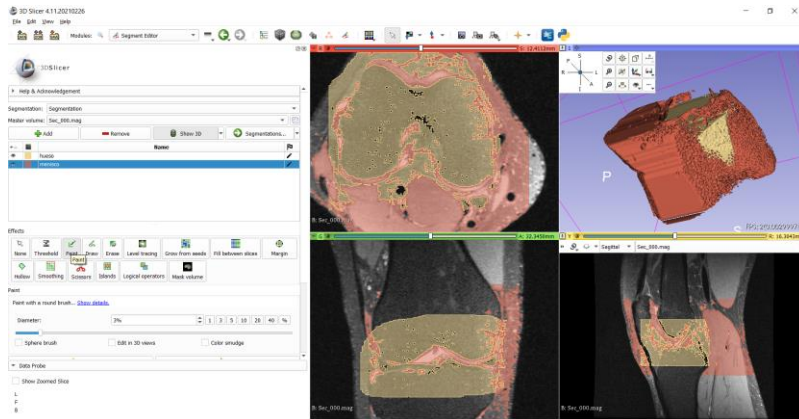


Figura 26. Secuencia de proceso llevado a cabo para realizar segmentación de imágenes.

Un modelo no es sino la representación digital de lo que se planea imprimir mediante algún programa computarizado para modelarlo. En la actualidad existe una amplia variedad de programas de cómputo especializados, útiles en este proceso principalmente los de tipo CAD (computer-aided design o diseño asistido por computadora) y los de tipo CAM (computer-aided manufacturing o fabricación asistida por computadora).

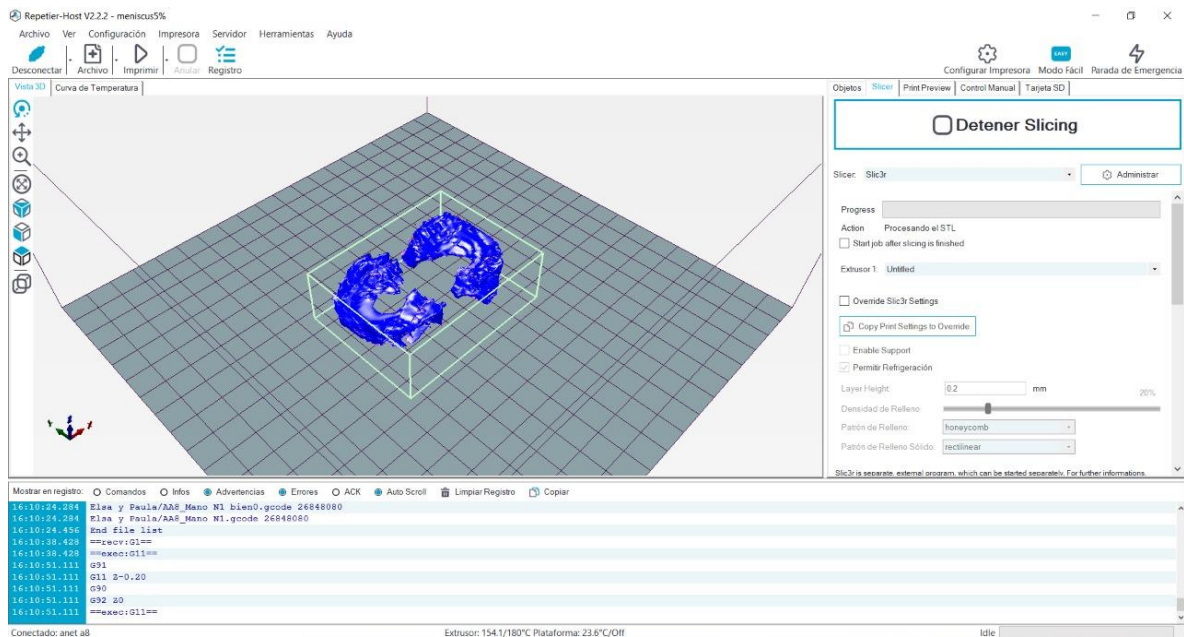


Figura 27. Archivo .STL de prótesis de menisco, previo a proceder a ser impresa.

Este tipo de archivos son, por definición, un constructo tridimensional, virtual e intangible. Para esto es necesario convertir el diseño o modelo a un formato o “idioma” conocido por la impresora con un archivo de extensión .STL

(Stereolitography). A partir de este formato, la impresora ejecuta los comandos para la construcción de cualquier modelo, en coordenadas milimétricas englobadas en el espacio de impresión conforme a los ejes X, Y y Z.[16]

Una vez hecha la segmentación por medio del programa Meshmixer se arreglan los imperfectos de relleno, obteniendo finalmente un archivo.STL.

Para poder llevar a cabo la impresión 3D de piezas con los hidrogeles se hizo una adaptación a una impresora Prusa i3, obteniendo un extrusor mecánico, dicho aditamento se maneja por medio del programa Repetier Host, como se observa en la captura mostrada en la figura 27, el cual además controla la impresora 3D ANET 8, permitiendo así controlar aspectos como la velocidad de impresión, ancho de filamento, temperatura de la cama, relleno de la pieza, etc.

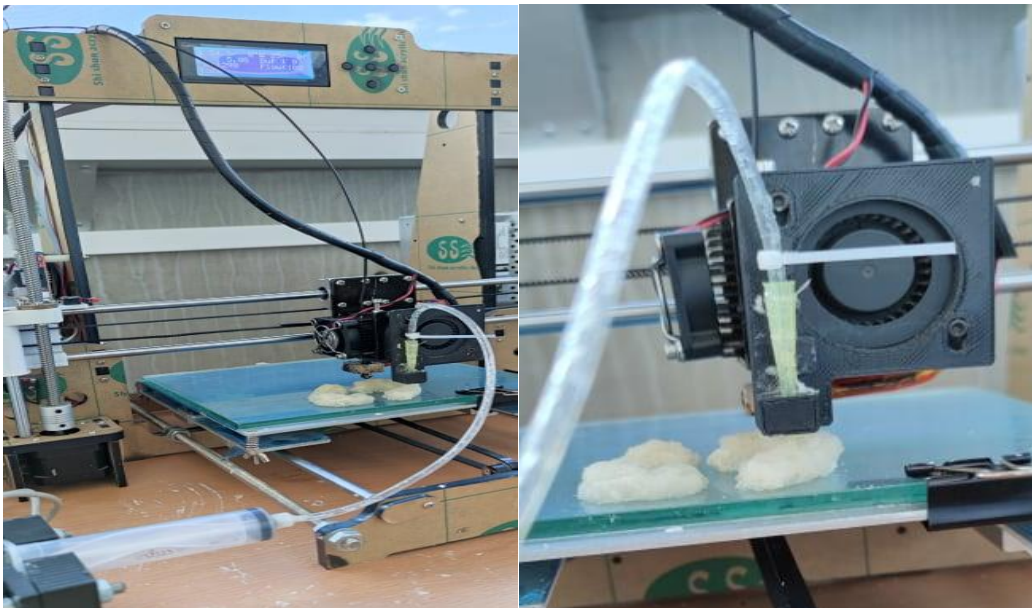


Figura 28. Proceso de impresión 3D

Se encontró que para este hidrogel la velocidad apropiada es de 800 mm/min. En la figura 28 se observa el proceso de impresión por medio de un aditamento procedente de una impresora Prusa i3, la cual fue conectada a la impresora ANET 8, como anteriormente se menciona.

6.5 Caracterización de proceso de funcionalización de MWCNT.

Las muestras CS, MWCNT y f-MWCNT se caracterizaron primeramente realizando mediciones de espectroscopía Raman, se utilizó un equipo Raman Focal Horiba XploRA ONTM™ (Horiba Scientific, Ltd.) a temperatura ambiente, utilizando un láser de 532 nm con filtro del 100%, se utilizó un lente de 20X, haciendo un barrido de 800 a 1800 cm^{-1} , una rejilla de 1800 gr/mm, y un tiempo de adquisición de 20s en

4 acumulaciones con el fin de identificar tanto los modos vibracionales de CS como las bandas características de MWCNTs. (figura 16)

Además, haciendo uso de espectrofotómetro UV-3600i Plus UV-Vis-NIR, a una temperatura ambiente, en un rango de longitud de onda de 200-900 nm se hicieron mediciones de absorción. Los espectros correspondientes a las mediciones de espectrofotometría UV-VIS fueron obtenidos a partir de disoluciones en ácido acético al 1%.

Finalmente, f-MWCNT fueron observados gracias a el uso de microscopía electrónica de barrido de transmisión (STEM) con una magnificación de 50000X, corriente de 0.17nA y voltaje de 30kV (figura 31).

6.5.1 Evaluación de la actividad metabólica de las células HEK293T en presencia de MWCNT y f-MWCNT

Ensayos de resazurina permitieron llevar a cabo el estudio de actividad metabólica celular haciendo uso de células HEK293T.

Las células de riñón embrionario humano 293 (HEK293) son células HEK que se han transformado exponiéndolas a fragmentos cortados de ADN de adenovirus tipo 5. Las células HEK293T se derivan de células HEK293 que expresan el antígeno T grande del virus simio 40 (SV40), que permite la replicación de plásmidos que contienen el origen de replicación SV40, lo que conduce a una alta expresión de proteína. Por estas razones, las células HEK293T crecen bien y pueden transfectarse bien con vectores de expresión de proteínas.[58]

En la figura 29 se describe el procedimiento previo que se llevó a cabo para preparar las muestras antes de ser sometidas al ensayo. En donde las muestras en polvo fueron expuestas a luz ultravioleta con el fin de esterilizar el material. Se disolvió el material en medio de cultivo para obtener concentraciones finales de aproximadamente 10,50 y 80 $\mu\text{g} / \text{cm}^2$ (dosis en $\mu\text{g} / \text{cm}^2 \times 1.6 = \text{dosis en } \mu\text{g} / \text{mL}$). Finalmente, mediante el uso de vortex y ultrasonido se trató de disolver lo mejor y más uniforme posible.



Figura 29. Proceso de preparación de muestras (MWCNT, CS, f-MWCNT) utilizadas en ensayo de resazurina. (Creado con BioRender.com)

Para la evaluación de actividad metabólica celular por medio de resazurina de CS, MWCNT y f-MWCNT se siguió el procedimiento descrito en la figura 30. El experimento fue realizado por triplicado y de manera independiente. Se cultivaron células HEK293T y posteriormente se sembraron a una placa de 96 pozos a una concentración de 10000 células por pozo. Después de 24 horas se agregaron MWCNT y f-MWCNT en tres concentraciones diferentes de MWCNT y f-MWCNT/CS (10,50 y 80 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$). Se incluyó en todos los experimentos un control negativo de muerte y una muestra de CS a una concentración de 200 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$. Se incubaron a 37°C bajo una atmósfera 5% CO_2 . Pasadas las 24 horas se agregaron 100 μL de resazurina previamente preparada para realizar la medición de fluorescencia tres horas después.

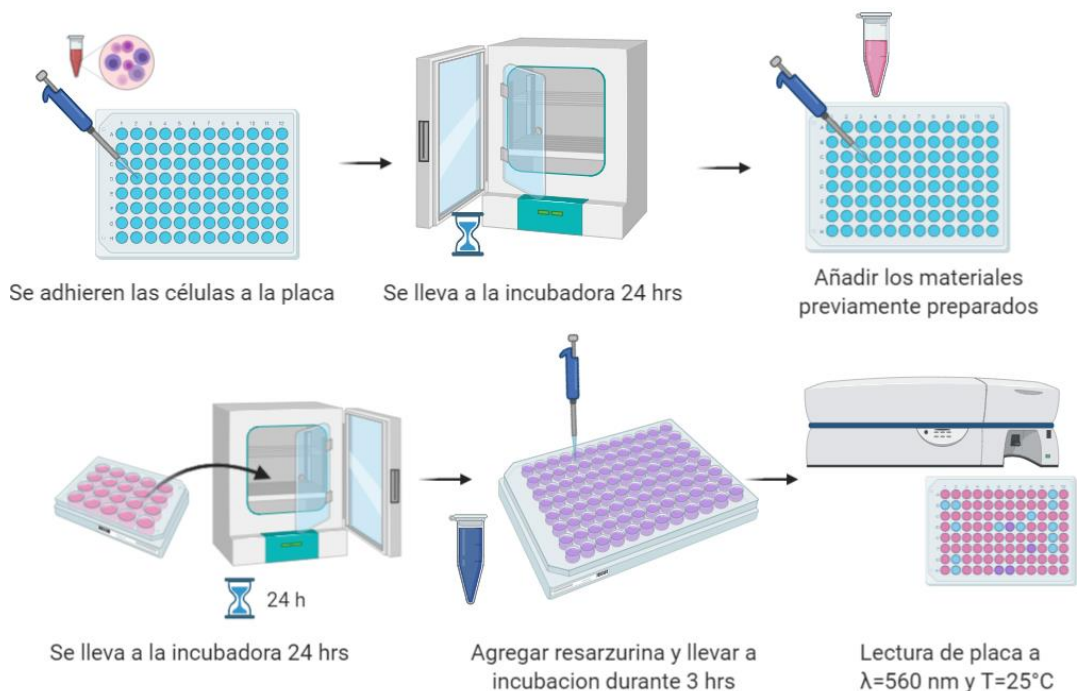


Figura 30. Procedimiento de ensayo de resazurina en MWCNT, CS y f-MWCNT. (Creado con BioRender.com)

6.6 Caracterización de bentonita activada

Las muestras de bentonita activada y sin activar se caracterizaron mediante espectroscopía FTIR-ATR, las mediciones se realizaron en un rango de 400-3800 cm^{-1} en la zona del mediano infrarrojo (MIR), con una resolución de 4 cm^{-1} , haciendo 64 escaneos a temperatura ambiente.

6.7 Caracterización de hidrogeles

Los hidrogeles se caracterizaron realizando mediciones de espectroscopía Raman, se utilizó un equipo Raman Focal Horiba XploRA ONTM™ (Horiba Scientific, Ltd.) a temperatura ambiente, utilizando un láser de 785 nm con filtro del 50%, se utilizó un lente de 20X, haciendo un barrido de 200 a 1700 cm^{-1} , una rejilla de 1800 gr/mm haciendo 2 acumulaciones un tiempo de adquisición de 10s. Todo esto, con el fin de identificar modos vibracionales característicos tanto de los materiales usados en la síntesis del hidrogel y a su vez dar seguimiento del proceso de polimerización. Las mediciones se llevaron a cabo a distintos periodos de tiempo (0,24 y 48 hrs) de exposición a luz UV.

Se secaron hidrogeles antes de ser llevado a cabo el proceso de polimerización durante 15 min a 80°C, obteniendo así muestras sin polimerizar, es decir 0 hrs de polimerización. Por otra parte, hidrogeles fueron expuestos a luz UV durante 24 hrs con el fin de realizar caracterizaciones de espectroscopía FTIR-ATR a distintos tiempos de polimerización (0 y 24 hrs). Las mediciones se hicieron en el rango de 400-3800 cm^{-1} en la zona del mediano infrarojo (MIR), con una resolución de 4 cm^{-1} , haciendo 64 escaneos.

Para las pruebas de hinchamiento “*swelling*” las muestras se polimerizaron bajo luz ultravioleta (365 nm) durante distintos periodos de tiempo (24 y 48 hrs). Para cada hidrogel se polimerizaron 2 muestras cada una correspondiente a un periodo de tiempo distinto, además cada muestra se pesó en su estado seco (xerogel) y se introdujeron en recipientes separados, los cuales contenían 20 ml de PBS a una temperatura controlada de 37°C. Cada muestra se mantuvo un tiempo determinado en PBS y cada cierto periodo de tiempo fueron pesadas las muestras.

La caracterización reológica de los hidrogeles se llevó a cabo haciendo uso de un reómetro Anton-Paar MCR 300.

Las mediciones de viscosidad de los hidrogeles se tomaron antes de polimerizarse, ya que conocer el parámetro de viscosidad es importante debido a su aplicación en impresión 3D (biotinta). Las mediciones se llevaron en geometría plato-plato a una temperatura ambiente (25 °C) y a una altura de 5 mm aproximadamente. Se corrieron a una frecuencia de 1Hz en un intervalo de tazas de corte entre 0.1 y 100 1/s.

Las mediciones correspondientes al módulo de almacenamiento, módulo de pérdida y factor de amortiguación “damping factor” se llevaron a cabo haciendo uso del peltier PP25, a una temperatura constante de 37 °C (temperatura corporal), con una amplitud gamma de 0.001%, se tomaron 100 puntos en un intervalo de frecuencia de 0.1-100 Hz.

Todas las mediciones fueron centradas en muestras que contienen GENT, dado que estas muestras obtuvieron mejores resultados en pruebas de actividad metabólica celular. Las mediciones fueron hechas sobre el material previo a ser polimerizado y después de ser polimerizado durante 48 hrs con un tiempo de *swelling* de 24 hrs.

Finalmente, se observó la morfología de los hidrogeles con concentraciones 5:1 por medio de microscopia electrónica de barrido (SEM) se utilizó un Microscopio Electrónico FEI-Dual Beam. Se realizaron las micrografías en hidrogeles polimerizados con 48 hrs de polimerización. Por medio de la técnica sputtering, llegando a un vacío de 1^{-6} Pa, se agregó una capa fina de aluminio durante un tiempo de 12 min, con el fin de hacer conductoras las muestras y así poder observar de mejor manera su morfología. Las mediciones se llevaron a cabo con una aceleración de haz entre 15 y 30 kV, corriente de 0.17 nA.

6.7.1 Evaluación de la actividad metabólica de las células HEK293T en presencia de hidrogeles.

La evaluación de actividad metabólica celular por medio de resazurina de hidrogeles se llevó a cabo siguiendo el procedimiento descrito a continuación y se muestra en la figura 31.

Experimento de ensayo de viabilidad celular para hidrogeles se realizó por triplicado. Como se describió anteriormente las células HEK293T se sembraron en una concentración de 10,000 células por pozo en donde previamente se polimerizaron los hidrogeles.

Tres transferencias de células HEK293T se adhirieron a una placa de 96 pozos y se dejaron en incubación durante 24 horas:

1. Rellenar moldes (previamente diseñados) con hidrogel.
2. Polimerizar hidrogeles durante aproximadamente 48 hrs.

*Esterilizar materiales haciendo uso de luz UV una noche previo a dar comienzo al experimento, de igual manera se esterilizan todos los materiales que se harán uso para poder llevar a cabo el experimento (pinzas, micropipetas, etc.)

3. En las placas p96 introducir los hidrogeles y agregar 100 μ L de PBS con el fin de hidratar (hinchar) los hidrogeles y llevar a la incubadora durante 24 hrs a 37 °C.
4. Retirar PBS y agregar 100 μ L de medio de cultivo, nuevamente llevar a la incubadora durante 24 hrs a 37 °C.

5. Extraer el sobrenadante y sembrar células HEK293T (10000 células /pozo). Llevar a la incubadora durante 24 hrs a una temperatura de 37 °C.
6. Retirar medio de cultivo y añadir resazurina para realizar la medición de fluorescencia.

Posteriormente se transfiere el sobrenadante de cada pozo y se coloca en otra placa, teniendo especial cuidado en el orden en el cual se traspasa. Una vez realizado el proceso anterior se procede a medir en la absorbancia en el equipo Synergy H1 con una frecuencia de excitación de 560 nm y de emisión de 590 nm.

Se realizaron experimentos de actividad celular metabólica en todas las síntesis realizadas, es decir, las síntesis mencionadas en la tabla 1, los cuales fueron divididos en 3 experimentos distintos que fueron repetidos 2 veces con el fin verificar reproducibilidad. En todos los experimentos se incluyó un control positivo de muerte, (peróxido de hidrogeno (H_2O_2) a una concentración de 10% en peso) y un control negativo de muerte.

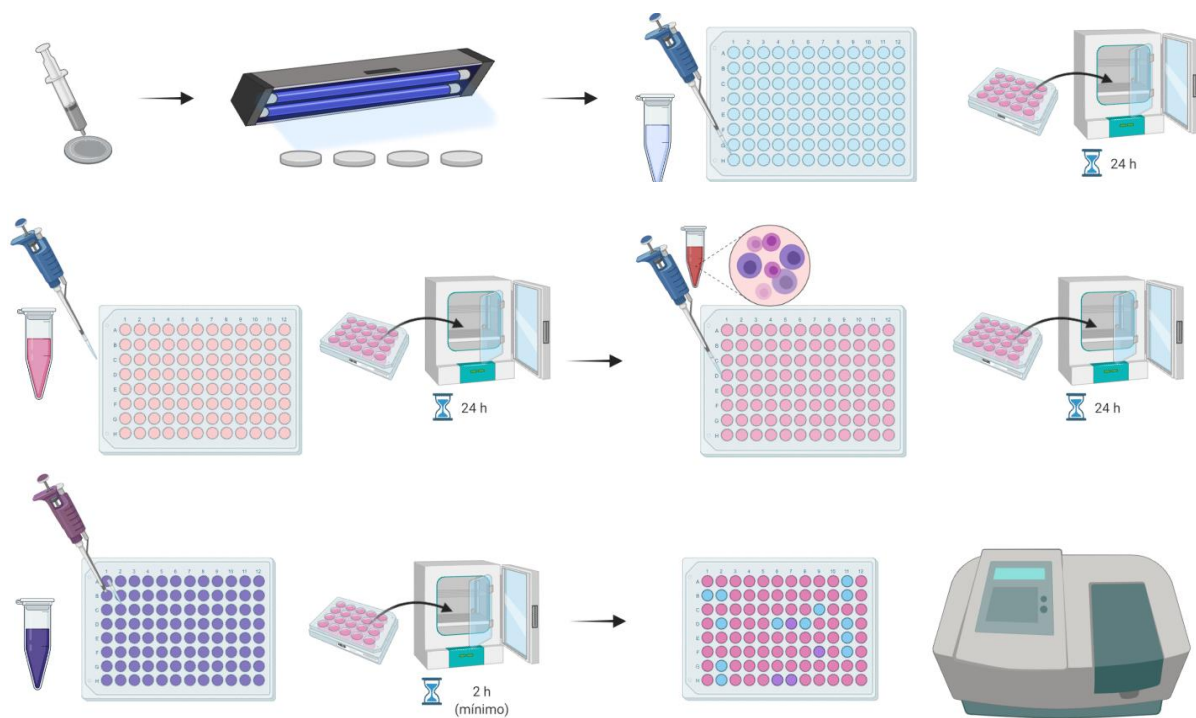


Figura 31. Procedimiento llevado a cabo en experimentos de actividad celular metabólica mediante ensayo de resazurina en hidrogel. (Creado con BioRender.com)

6.7.2 *Análisis estadístico.*

De manera general, los análisis estadísticos se pueden dividir en paramétricos y no paramétricos. Las pruebas paramétricas asumen una distribución normal de valores, o una “curva en forma de campana” esta distribución también se denomina distribución gaussiana. Por lo tanto, una estadística no paramétrica que se utilizan para probar hipótesis cuando los datos no cumplen uno o más de los supuestos de los procedimientos paramétricos, es decir, si la varianza en la población es asimétrica o sesgada, si los datos generados a partir de las medidas son ordinales o nominales, o si el tamaño de la muestra es pequeño, el investigador debe seleccionar una estadística no paramétrica.[59][60]

Debido a que se tienen más de dos muestras independientes y su tamaño es pequeño ($N=6$) se hará uso de las pruebas no paramétricas Kruskal-Wallis, U de Mann-Whitney y finalmente una corrección de Bonferroni. Cabe mencionar que se realizaron pruebas de normalidad.

El test de Kruskal-Wallis, también conocido como test H, se utiliza para comparar tres o más grupos en una variable dependiente que se mide al menos en un nivel ordinal. Si el test de Kruskal-Wallis es significativo, implica que al menos dos grupos de entre los comparados son significativamente diferentes, pero no indica cuales. Para saberlo es necesario compararlos todos entre ellos. Esto implica realizar una corrección del nivel de significancia ó prueba “post-hoc” .[61]

Uno de los métodos de comparación post-hoc más empleados para un test de Kruskal-Wallis es el test U de Mann-Whitney (también llamada prueba de Mann-Whitney-Wilcoxon (MWW). El test U de Mann-Whitney, prueba las diferencias entre dos grupos en una sola variable ordinal sin distribución específica. La corrección de Bonferroni ajusta los valores de p debido al mayor riesgo de un error de tipo I (concluir que una diferencia significativa está presente cuando no lo está) al realizar múltiples pruebas estadísticas.

Es así como todos los experimentos cuantitativos se realizaron por triplicado ($N = 3$, tres transferencias diferentes) y a su vez replicados (hechos dos veces, $N=6$) los resultados se expresaron como valores medios +/- desviaciones estándar. Para los ensayos de rezasurina, su análisis estadístico fue realizado mediante el uso del programa STATISTICA. La prueba no paramétrica U de Mann-Whitney fue usada para comparar dos grupos, en donde cada muestra fue comparada con un control negativo de muerte correspondiente a cada ensayo. Mientras que la comparación entre más de dos grupos se realizó mediante la prueba de Kruskal-Wallis.

7 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1 Síntesis y caracterización de nanotubos de carbono multicapa con quitosano (f-MWCNT)

7.1.1 Cinética de reacción: funcionalización de nanotubos de carbono.

Durante este proceso, el uso de AA tiene una doble función, primeramente, en el caso de las cadenas de quitosano, se pueden realizar modificaciones químicas gracias a la presencia de los grupos funcionales amino ($-\text{NH}_2$), hidroxilo ($-\text{OH}$) y N-acetilo ($-\text{NH}-\text{CO}-\text{CH}_3$) pues sus grupos amino permiten que solubilice fácilmente en medios ácidos.[27] Su segunda función es oxidar a MWCNT, dado que al reaccionar AA ocurre un proceso de oxidación que crean diferentes grupos funcionales en la superficie del tubo, como $-\text{OH}$, $-\text{COH}$ y $-\text{COOH}$ en sus extremos y paredes, permitiendo el acoplamiento de moléculas por medio de unión covalente formando enlaces tipo éster y amidas con CS. [24][62] [63]

El ultrasonido es una fuente utilizada para dispersar en solución los nanotubos, mejorando la interacción entre los diversos grupos funcionales y los orbitales de carbonos sp^2 de los MWCNT. [64]

Este proceso es descrito en la siguiente figura 32:

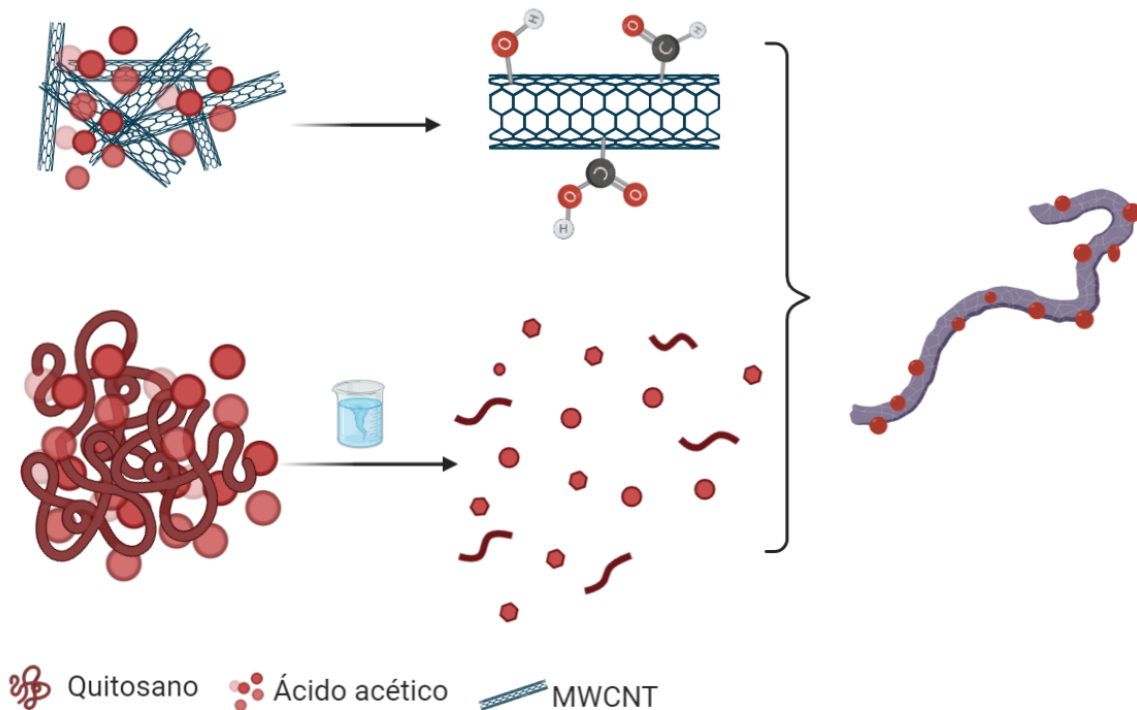


Figura 32. Proceso de funcionalización de MWCNT con quitosano. (Creado con BioRender.com)

7.1.2 Espectroscopía Raman

En la figura 33 se muestran los espectros Raman correspondientes a tres materiales: MWCNT (prístinos), quitosano y f-MWCNT. Este último mencionado corresponde a el producto de la síntesis descrita en la sección 6.1 "funcionalización de MWCNT". Cabe señalar que, a los espectros mostrados, se les sustrajo una línea base haciendo uso del programa Vancouver Raman Algorithm.

En la tabla 3, se resumen los modos vibracionales correspondientes a CS [26]. En la figura 33 se señalan con (*) los modos vibracionales correspondientes a la muestra quitosano y con una línea punteada se señalan las bandas D y G de los CNT ubicadas en 1337 y 1564 cm^{-1} respectivamente.

Tabla 3. Modos Raman reportados asociados a quitosano. [26]

Raman Shift	Asignación	Raman Shift	Asignación
3362w	$\nu(\text{OH})_{\text{HB}}$	1377s	$\delta(\text{CH}_3) + \delta(\text{CH}) + \delta(\text{OH}) + \nu(\phi)$
3308w		1325m	$\nu(\text{CN}) + \delta(\text{CH})$
2932vs	$\nu(\text{CH}_3)$	1263m	$\delta(\text{OH}\cdots\text{O}) + \nu(\text{C-C}) + \nu(\text{C-O}) + \delta(\text{CH}) + \rho(\text{CH}_2)$
2885vs	$\nu(\text{CH}_2)$	1146m	$\nu(\text{C-O-C}) + \nu(\phi) + \nu(\text{C-OH}) + \nu(\text{C-CH}_2) + \delta(\text{CH}) + \rho(\text{CH}_2) + \rho(\text{CH}_3)$
2818shm	$\nu(\text{CH}_3)$	1114s	$\nu(\text{C-O-C}) + \nu(\phi) + \nu(\text{C-OH}) + \nu(\text{C-CH}_2) + \delta(\text{CH}) + \rho(\text{CH}_2) + \rho(\text{CH}_3)$
2743w	$\nu(\text{CH})$	1093s	$\nu(\text{C-O-C}) + \nu(\phi) + \nu(\text{C-OH}) + \nu(\text{C-CH}_2) + \delta(\text{CH}) + \rho(\text{CH}_2) + \rho(\text{CH}_3)$
1654w	$\nu(\text{CO})$	1044shm	$\rho(\text{CH}_3) + \delta(\text{CH}) + \delta(\text{OH})$
1591m	$\delta(\text{NH}_2)$	991shm	$\nu(\phi) + \delta(\text{CH})$
1458m	$\delta(\text{CH})$	936m	$\nu(\text{CN})$
1411m	$\delta(\text{CH}_3) + \delta(\text{CH})$	896m	$\nu(\phi) + \rho(\text{CH}_2)$

Los espectros Raman de los MWCNT (espectro negro) y f-MWCNT (espectro azul) se pueden observar en la (figura 33), se identificaron las bandas características D y G, denominadas, banda de desorden inducido y banda de elongación o vibración tangencial respectivamente. La banda D es indicadora de la presencia de defectos en las paredes, de manera que de la relación de intensidades entre las bandas D y G sugiere que MWCNT presenta CS en sus alrededores. La relación de intensidades de las bandas G (vibración tangencial) y D (desorden inducido) de MWCNT y f-MWCNT fueron de 0.1772 y 0.3699 respectivamente. El aumento en el valor de la relación de las intensidades $I_{D/G}$ es un indicio de la funcionalización de MWCNT con CS. Cabe señalar que esto fue comprobado mediante Scanning Transmission Electron Microscopy (STEM).

A continuación, en la tabla 4 se muestra una comparación entre estas relaciones:

Tabla 4. Relación $I_{D/G}$ obtenidas a partir de gráfica 32.

Muestra	MWCNT	f-MWCNT/CS
Relación $I_{D/G}$	0.1772	0.3699

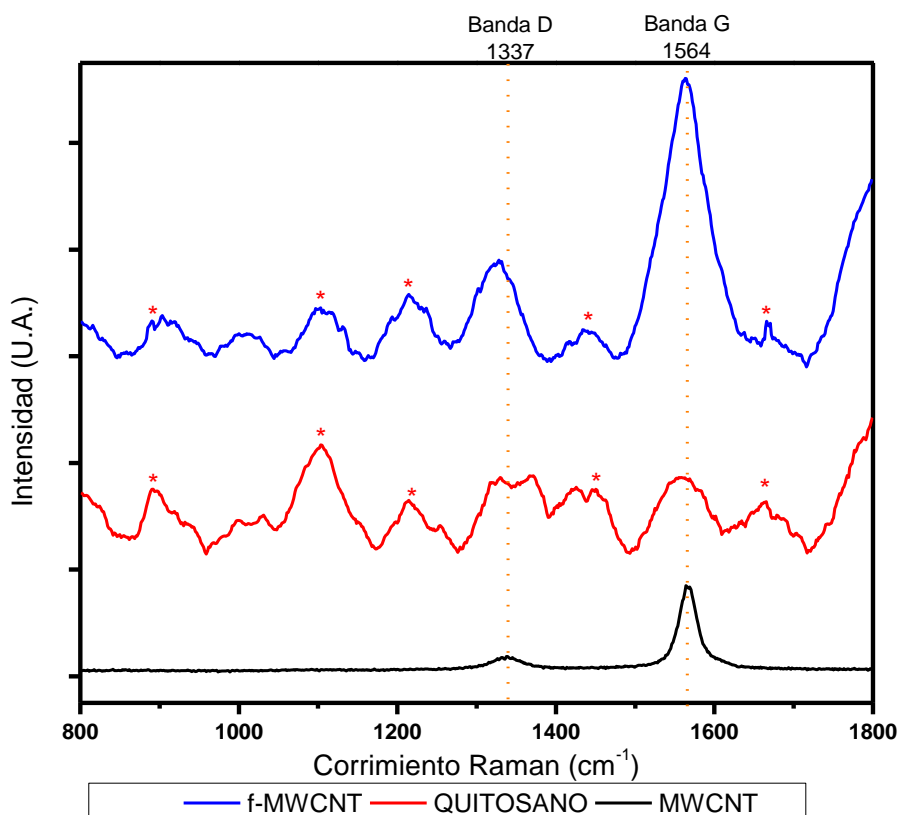


Figura 33. Espectros Raman de las muestras MWCNT, Quitosano y f-MWCNT. Las líneas punteadas señalan las bandas D y G correspondientes a MWCNT y con * se señalan los modos vibracionales correspondientes a quitosano.

7.1.3 Espectrofotometría de absorción UV-VIS

El espectro de MWCNT (espectro negro) en solución mostró una fuerte absorbancia a ~230 nm (figura 34), que se atribuyó a las transiciones $\pi-\pi$ de los enlaces C–C aromáticos, los cuales se han reportado previamente para este tipo de materiales.[10][66]

Tanto el espectro de CS (espectro rojo) y f-MWCNT (espectro azul) muestran una absorción característica de CS en ~200 nm, revelando así la presencia de CS en ambas muestras, sin embargo, el espectro correspondiente a f-MWCNT muestra una mayor absorción, lo cual puede ser atribuido a la presencia de MWCNT. En ~293 nm existe otra banda de absorción en la muestra quitosano, la cual presenta un corrimiento negativo en la muestra f-MWCNT que de igual manera podría atribuirse a procesos de oxidación. [67]

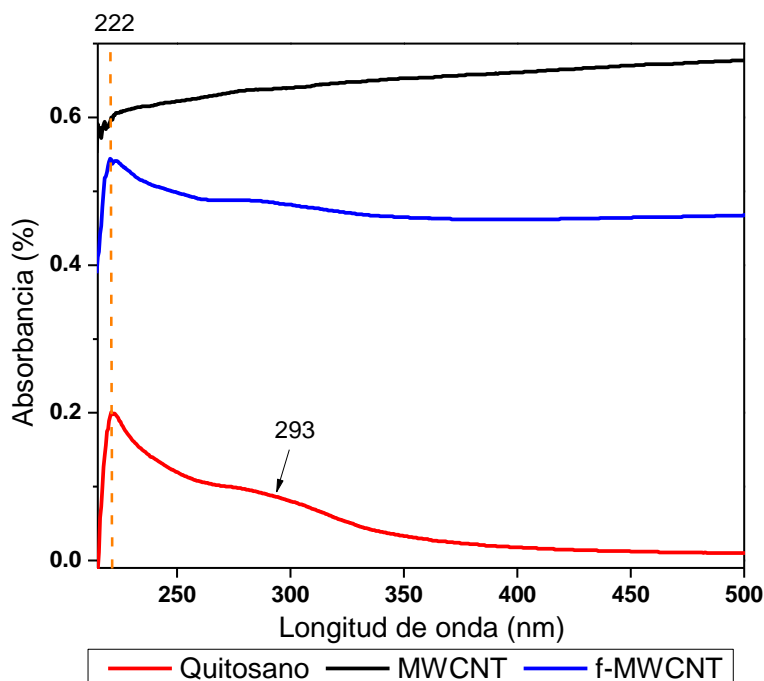


Figura 34. Espectros de absorción UV-VIS de las muestras MWCNT, Quitosano y f-MWCNT.

7.1.4 Scanning Transmission Electron Microscope (STEM)

Por medio de microscopía STEM se pudo comprobar la morfología obtenida de la síntesis f-MWCNT (figura 35) en donde de acuerdo a lo reportado por la literatura, se puede concluir que lo que se observa es un “nanotubo decorado” con quitosano,

imágenes similares a la obtenida fueron observadas por Yuyang Liu [62] y Hui ren Xu [68].

De la imagen ampliada que se muestra, podemos ver que las superficies de nanotubos de carbono están cubiertas con protuberancias de quitosano después de la decoración de la superficie. Esto concuerda con el estado físico de la solución de f-MWCNT dado que el comportamiento hidrofóbico de MWCNT que tienen como una de sus más grandes características, se elimina después de la funcionalización.

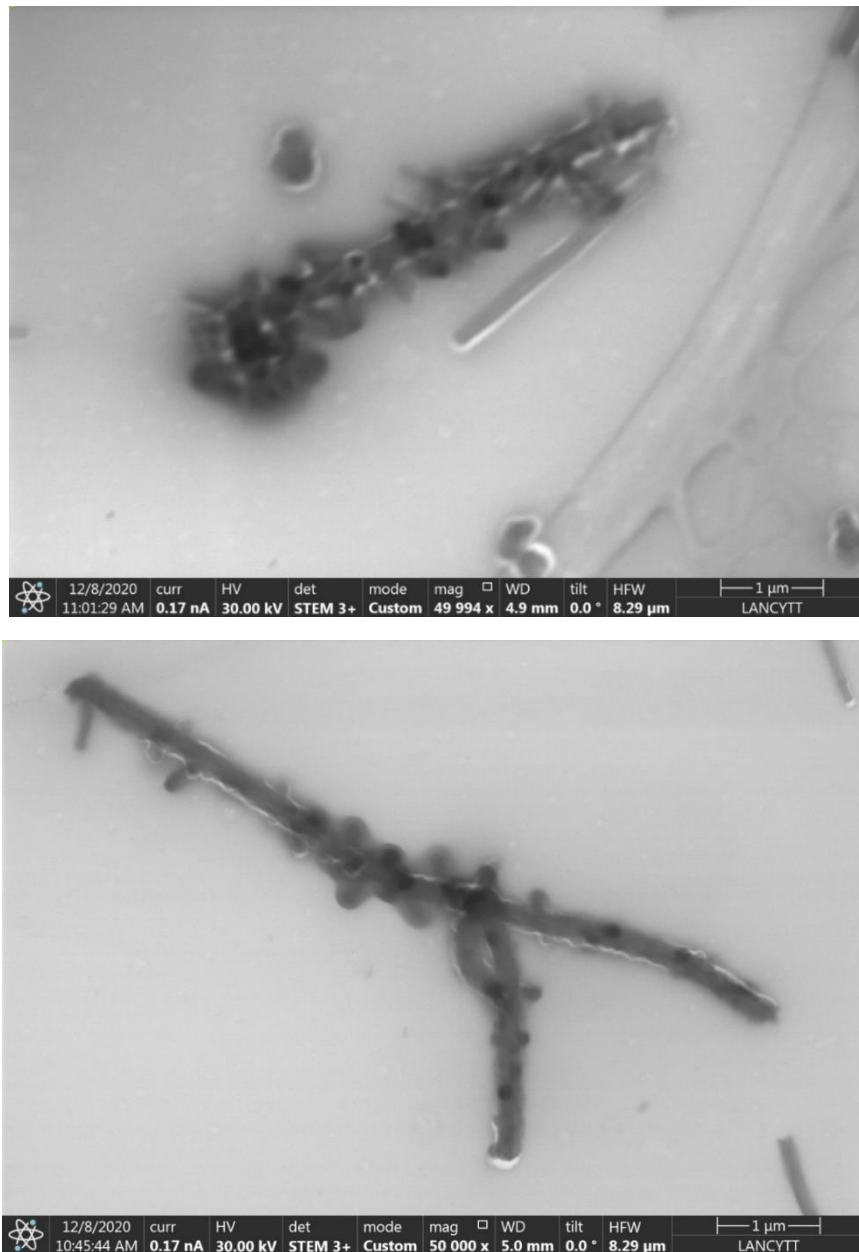
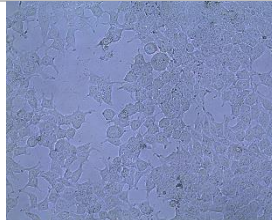
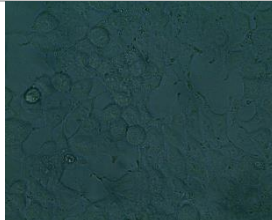
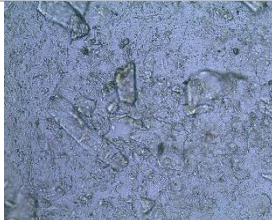
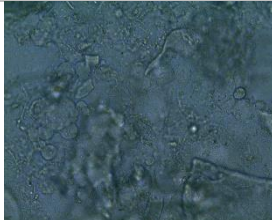
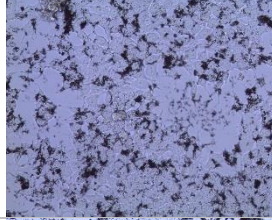
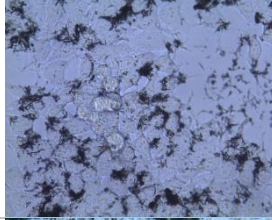
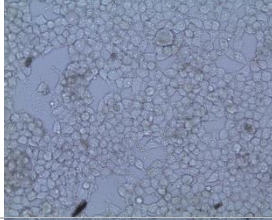
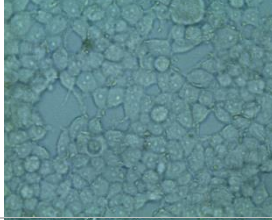
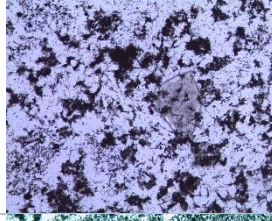
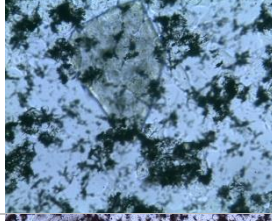

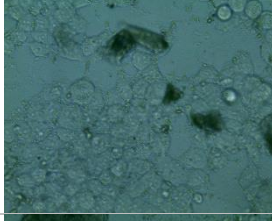
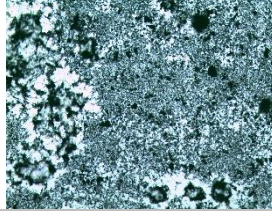
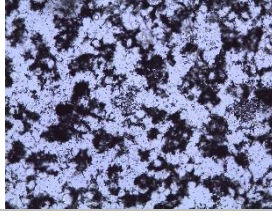
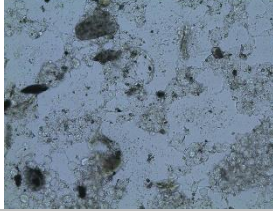
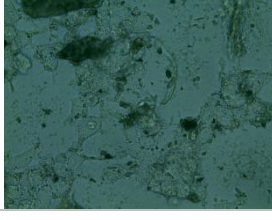


Figura 35. Micrografías STEM de MWCNT funcionalizados con quitosano

7.1.5 Actividad metabólica celular: ensayo de resazurina

La tabla 4 muestra imágenes obtenidas previo a añadir resazurina, en donde se observa que las muestras en donde son añadidas distintas concentraciones de MWCNT, las células están rodeadas por MWCNT.

Tabla 5. Imágenes obtenidas previo a añadir resazurina.

Muestra	Objetivo 20x	Objetivo 40x	Muestra	Objetivo 20x	Objetivo 40x
Control			CS		
MWCNT 10 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$			f-MWCNT 10 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$		
MWCNT 50 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$			f-MWCNT 50 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$		
MWCNT 80 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$			f-MWCNT 80 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$		

La figura 36 y tabla 6 muestra los resultados obtenidos del ensayo de resazurina realizado, en donde, se observa claramente que las muestras MWCNT tienen una menor actividad celular metabólica que f-MWCNT en todas las concentraciones, f-MWCNT en todas las concentraciones mostró una viabilidad mayor al 80%, por lo cual se puede deducir que el proceso de funcionalización se llevó a cabo.

Tabla 6. Resultados de ensayo de resazurina en MWCNT

CONDICIÓN		MEDI	DESV. ESTÁNDAR (DE)
		A	
A	CONTROL NEGATIVO DE MUERTE (CNM)	100	0
B	MWCNT (10 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$)	91.1	8.7
C	MWCNT (50 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$)	48.7	2.3
D	MWCNT (80 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$)	39.2	5.5
E	f-MWCNT (10 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$)	101.7	6.6
F	f-MWCNT (50 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$)	98.5	5.7
G	f-MWCNT (80 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$)	86.3	1.4

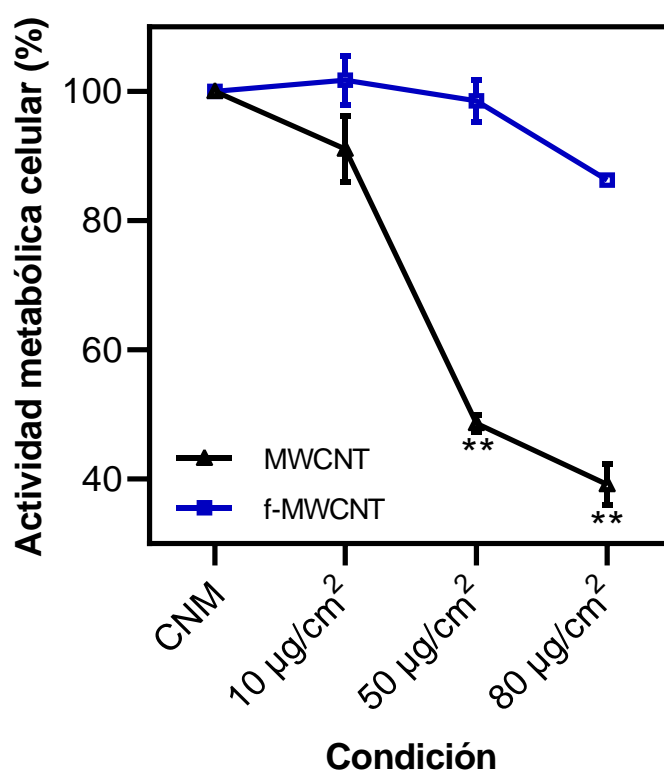


Figura 36. Actividad metabólica de las células HEK293T expuestas a MWCNT y f-MWCNT. Se muestra la media \pm DE. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ en comparación con las células de control (solo medio de cultivo).

Al hacer el análisis estadístico Kruskal-Wallis mediante el programa statistica se obtuvo un valor de $H(6, N=42)=23.59$ y $p=0.0002$, por lo cual se prosiguió a realizar el test U de Mann-Whitney en donde se comparó cada una de las muestras con el control como se muestra en la figura 36.

En donde las muestras MWCNT 50 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ y MWCNT 80 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ presentan valores significativos respecto al control negativo de muerte ($p < 0.05$). Confirmando así el proceso de funcionalización de MWCNT, ya que todas las muestras de f-MWCNT

presentan porcentajes de actividad metabólica celular por encima del 80% y a su vez sus valores no son significativos, permitiendo así su uso en hidrogeles.

7.2 Activación ácida de bentonita: espectroscopía FTIR-ATR

La figura 37 muestra los espectros FTIR-ATR correspondientes a las muestras de bentonita activada a distintos pH y de igual manera en su presentación reactivo sin ser activada. En la figura 37 la muestra correspondiente al reactivo bentonita sin ser activado (línea negra), presenta bandas características al reactivo, localizadas en 443 cm^{-1} (Si-O-Al), 523 cm^{-1} (Si-O-Si), 930 cm^{-1} (Si amorfo), 1040 cm^{-1} (Si amorfo) y 1650 cm^{-1} (Al-Al-OH) [69]–[71]. Además, en la muestra BENT activ. con pH = 7 (línea azul) se observa en la zona por encima de 3000 cm^{-1} una banda correspondiente a grupos -OH y/o humedad de la muestra, esto puede atribuirse a el elevado pH de la muestra, pues como se sabe la concentración de iones OH está dada por $p[\text{OH}] = 14 - p[\text{H}]$. [72]

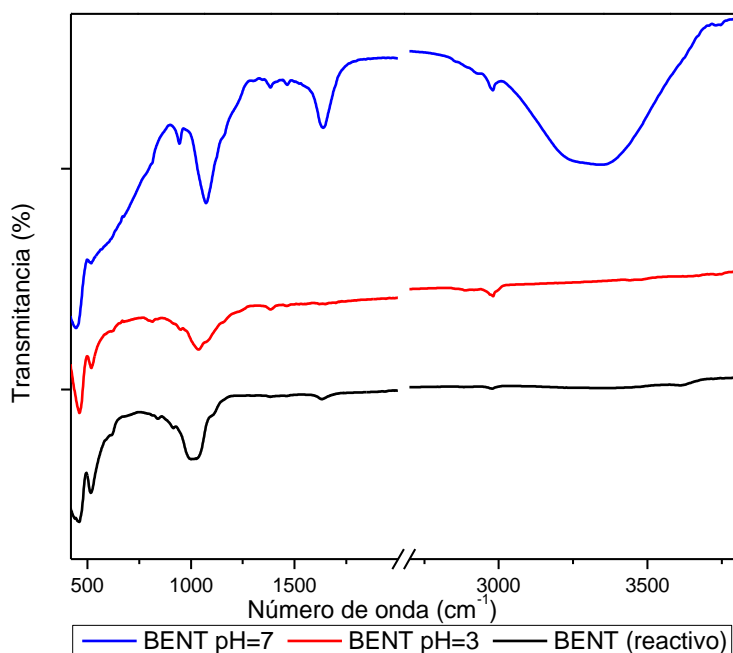


Figura 37. Espectros FTIR-ATR de Bentonita sin activar y activada a distinto pH

La figura 38 muestra los mismos espectros analizados anteriormente, centrándose en el área de $400\text{--}1800\text{ cm}^{-1}$, en donde se señalan con líneas punteadas las bandas anteriormente identificadas.

Como se observa, la banda situada en 443 cm^{-1} (Si-O-Al) presenta corrimiento hacia la derecha y la banda 523 cm^{-1} (Si-O-Si) desaparece prácticamente cuando la bentonita es activada y su pH se ve aumentado. Además, las bandas 930 y 1040 cm^{-1} (Si amorfo), presentan un corrimiento hacia la derecha y se vuelven más intensas al llevarse a cabo el proceso de activación y verse aumentado su pH. Estas bandas son señaladas con una línea punteada en el espectro correspondiente a la bentonita en su modo reactivo (línea negra), haciendo más evidente los corrimientos y aumento de intensidades mencionados.

Cabe señalar que aparece una banda en 1650 cm^{-1} (Al-Al-OH) solamente en la muestra de BENT activ con un $\text{pH}=7$.

Lo anteriormente mencionado se sugiere que es debido a que, durante el proceso de modificación, los protones penetran en las capas de bentonita para atacar los grupos OH, lo que provocaría la alteración de la vibración de OH y los cationes octaédricos. La deshidroxilación resultante está relacionada con la liberación sucesiva de los átomos centrales de la superficie octaédrica y la eliminación de Al^{3+} de las láminas tetraédricas. Mientras tanto, se produce una transformación gradual de la lámina tetraédrica estratificada a una estructura tridimensional, donde se pueden observar cambios en las características de los grupos hidroxilo y los aniones silicato, detectados por la alteración de las bandas FTIR. Estas transformaciones ayudada a la formación de sílice amorfa proporcionando varios sitios de unión a la superficie para el proceso de adsorción.[69][31]

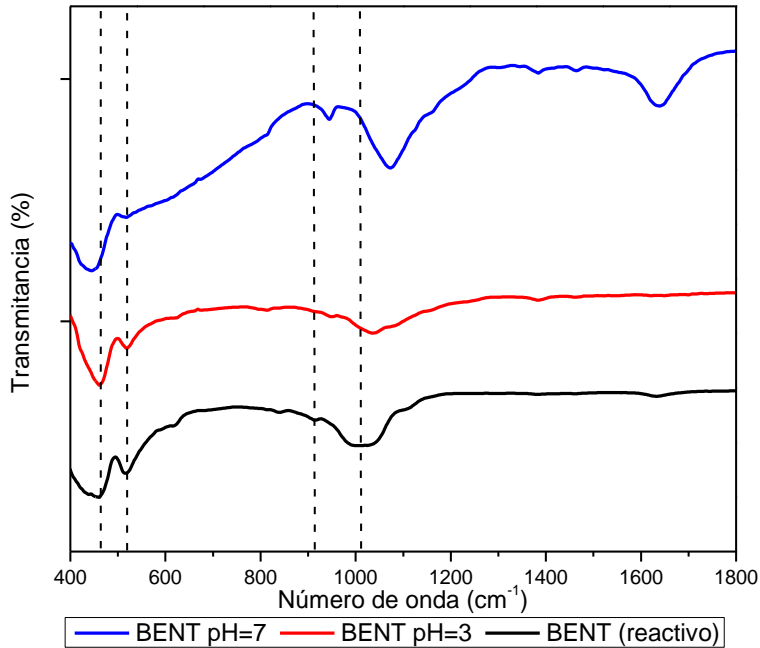


Figura 38. Espectros FTIR-ATR de Bentonita sin activar y activada a distintos pH centrándose en el área de mayor interés (400-1800 cm^{-1})

7.3 Síntesis y caracterización de hidrogel con nanotubos de carbono multicapa y gentamicina para el diseño de prótesis de menisco mediante impresión 3-D

7.3.1 Cinética de formación de hidrogel propuesta.

El mecanismo propuesto de formación de hidrogel por medio de polimerización de radicales libres se ilustra en la figura 39.

Se sabe que, al introducir el CS en estado sólido en una solución ácida se ionizan sus grupos amino con los iones H_3O^+ disponibles en la solución, produciéndose así un poli-ion positivo, debido a que son ionizadas las aminas procedentes de CS.[27] Es una de las razones por las cuales es agregado AA (1%), pues esto permite que CS interaccione con BENT activada debido a la presencia de los grupos amina ionizados procedentes de CS y el proceso previo de activación acida de la bentonita. Además, en las síntesis que son agregados tanto MWCNT como f-MWCNT, al ser disueltos y previamente sonicados en AA (1%), se espera que interactúe con CS,

esto debido a que al ser agregados a la mezcla estos ya cuentan con una carga negativa en sus paredes producto de los radicales COOH^- , COH^- y OH^- , en especial f-MWCNT, ya que estos ya cuentan con un proceso de funcionalización previamente hecho.[63][62]

Cabe señalar que debido a la activación de Bentonita (BENT activ) podría dar lugar a una interacción con MBA (*crosslinker*) este enlace se lleva a cabo por el grupo $-\text{CH}_2$ de los extremos de la cadena del reticulador. Como se sabe AMPS contiene un grupo funcional de ácido sulfónico hidrófilo (SO_2) y un grupo amida no iónico en su estructura molecular el cual se disocia completamente en el rango de pH general, es importante señalar esto debido a que una vez que se inicie el proceso de fotopolimerización, estos grupos son puntos de unión con BENT activ. [28]

Una vez que la muestra es expuesta a luz UV (365 nm), debido a reacciones de fotopolimerización, I2959 (fotoiniciador) produce radicales libres como benzoilo y alquilo, los cuales comienzan el proceso de fotopolimerización, es decir, se rompen enlaces dobles de carbono del *crosslinker* ($\text{C}=\text{C}$) para formar las cadenas poliméricas con CS y AMPS, dando origen a una red dual debido a la presencia de ambos monómeros CS y AMPS.

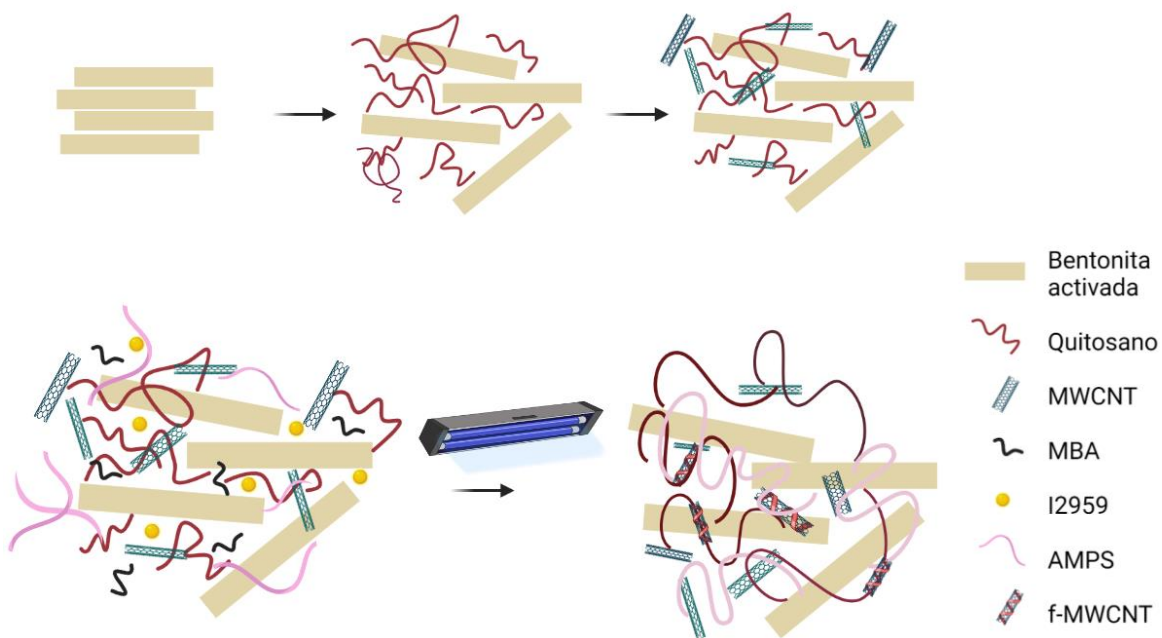


Figura 39. Proceso de síntesis de hidrogel CS/AMPS. (Creado con BioRender.com)

7.3.2 Espectroscopía Raman

La figura 40 muestra los espectros Raman correspondientes a hidrogel que contienen MWCNT (80 gr/cm^2) con concentración 5:1 (CS:BENT activ) en donde se

varió el tiempo de polimerización de entre 0 (línea negra) ,24 (línea roja) y 48 horas (línea azul). Como se observa en la gráfica se señalan los modos vibracionales correspondientes a las bandas D y G de f-MWCNT.[21][73]

Modos de vibración característicos de BENT fueron encontrados en 537, 768, 920,1040 y 1105 cm^{-1} correspondientes a la deformación de Si-O-Al, estiramiento Al-O-Si, deformación de Al-OH y estiramiento de Si-O los cuales fueron marcados con asteriscos rosas (*). De manera similar, con cruces negros (+) se señalan modos vibracionales correspondientes a CS los cuales corresponden a 351 cm^{-1} $\gamma(\text{OH}) + \gamma(\phi)$, 1409 cm^{-1} $\delta(\text{CH}_3) + \delta(\text{CH})$ y 1454 cm^{-1} $\delta(\text{CH}) + \omega(\text{CH}_2) + \delta(\text{OH})$. Además, se identificó el modo de flexión del enlace vinilo C-H a 1254 cm^{-1} correspondiente a MBA que es señalada con una línea verde punteada.[74][75][26]

En la gráfica 6 se observan dos bandas distintivas a 1636 y 1628 cm^{-1} señaladas con líneas rojas punteadas en las gráficas, y se atribuyen a los modos vibracionales de C=C. Tras la polimerización, los enlaces C=C se desdoblán o rompen y se convierten en enlaces C—C. Por tanto, como consecuencia de la concentración disminuida de los enlaces C=C, la intensidad de los modos se reduce durante la polimerización. Modos de intensidad del enlace doble C=C, el modo de flexión del vinilo C-H correspondiente a la acrilamida y el modo de intensidad correspondiente al doble enlace C = C de bisacrilamida a 1628 cm^{-1} disminuyó al mismo tiempo. [74]

Por lo anteriormente mencionado, se muestra en la figura 40 el intervalo de 1550-1700 cm^{-1} haciendo énfasis en las bandas asociadas al proceso de fotopolimerización. En donde es más evidente como los modos vibracionales correspondientes a enlaces C=C, disminuyen su intensidad dependiendo del tiempo en el cual fueron expuestos a luz UV, sugiriendo que se lleva a cabo el proceso de fotopolimerización.

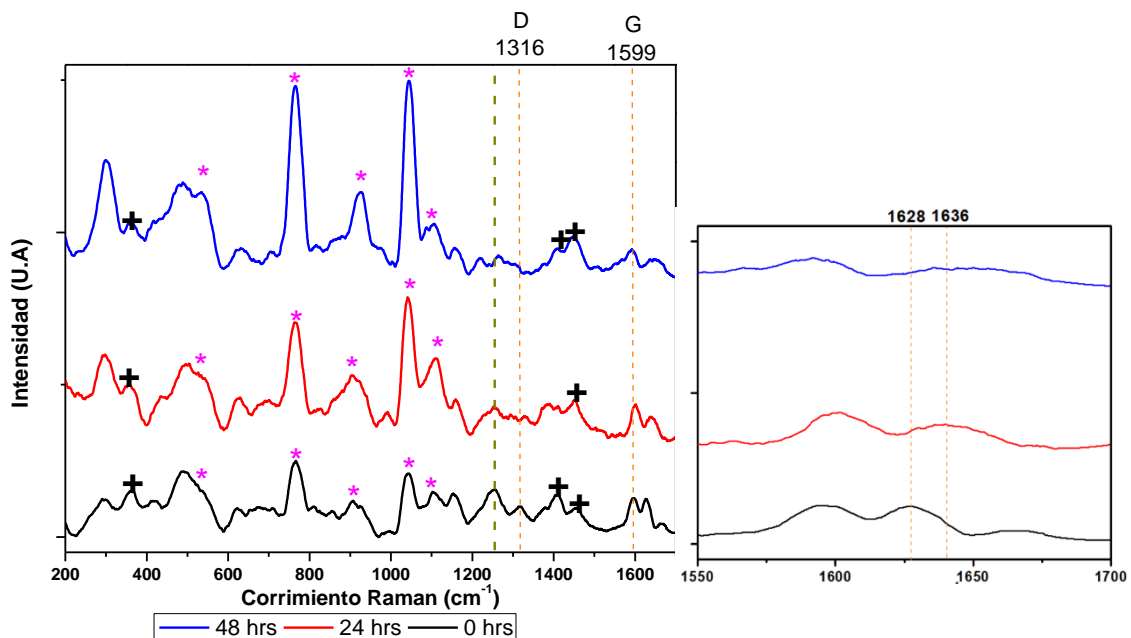


Figura 40. A) espectros Raman correspondientes a Hidrogel con MWCNT (80 gr/cm²) con concentración 5:1 (CS:BENT activ) a distintos tiempos de polimerización B) Acercamiento correspondiente a bandas asociadas al proceso de fotopolimerización.

7.3.3 Espectroscopía FTIR-ATR

La figura 41 muestra los espectros FTIR-ATR de hidrogeles tanto polimerizados como sin polimerizar, los materiales sin polimerizar fueron secados previamente a una temperatura de 80 °C durante 15 min, esto con el fin de evitar señales que opaquen bandas que realmente son de interés.

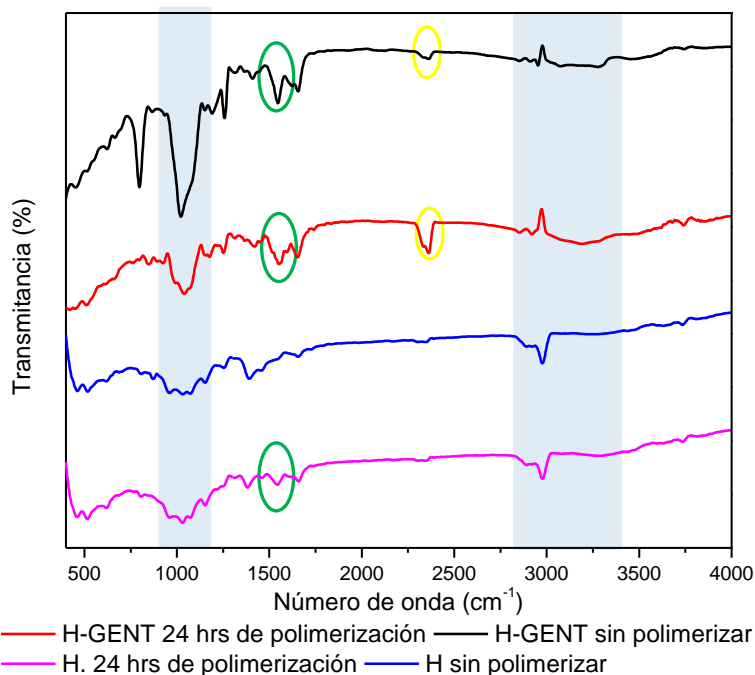


Figura 41. Espectros FTIR-ATR de hidrogeles polimerizados y sin polimerizar

Lo anteriormente mencionado fue hecho con el fin de observar interacciones entre los componentes de las muestras, como es el caso de GENT, en donde se observan bandas características de su interacción con CS previamente reportadas.[8][9]

Los espectros que contienen GENT denotan varias bandas características, evidenciando la presencia de GENT como lo es en 1058 cm^{-1} (deformación -OH), 1637 cm^{-1} (amida I, amidas formadas por el estiramiento C=O) y 2352 cm^{-1} (señalada con un ovalo amarillo) [77][76]

En 3267 cm^{-1} se encuentra un pico que evidencia la interacción entre CS y GENT correspondiente al estiramiento OH, es por ello que el área de $2800\text{-}3400\text{ cm}^{-1}$ se encuentra sombreada, evidenciando esta banda.

De igual manera se encontraron bandas correspondientes a BENT activ. 446 cm^{-1} (Si-O-Al), 523 cm^{-1} (Si-O-Si), 796 cm^{-1} (estiramiento de (Al,Mg)-OH) y 1040 cm^{-1} (Si amorfo), además, en 1554 cm^{-1} se encuentra la vibración de flexión N-H señalado con óvalos verdes en el espectro, proveniente de la posible unión entre CS y BENT activ. o MBA y BENT activ. así como a las amidas II provenientes de GENT. Los picos de absorción en las regiones de 3100 y 3500 cm^{-1} están relacionados con las bandas N-H que interfieren con las bandas de estiramiento de los grupos OH y el grupo NH_2 . [69][71] [31][76][77] [78][79]

En la figura 42 se muestran los espectros en un intervalo más corto (400-1750 cm^{-1}), en la región de $\sim 900\text{-}1150 \text{ cm}^{-1}$ existen una variedad de bandas características relacionados a materiales existentes en la muestra los cuales se muestran en la tabla 7.

Tabla 7. Bandas relacionadas a materiales existentes en hidrogeles

No. de onda (cm^{-1})	Asignación
894	GENT, deformación -OH [76]
930	BENT, Si amorfo [69]
948	AMPS [28]
1040	BENT, Si amorfo [69]
1042	AMPS, estiramiento simétrico del grupo S = O [28]
1058	GENT deformación -OH [76]
1077	AMPS [78]
1150	GENT, deformación -OH [76]

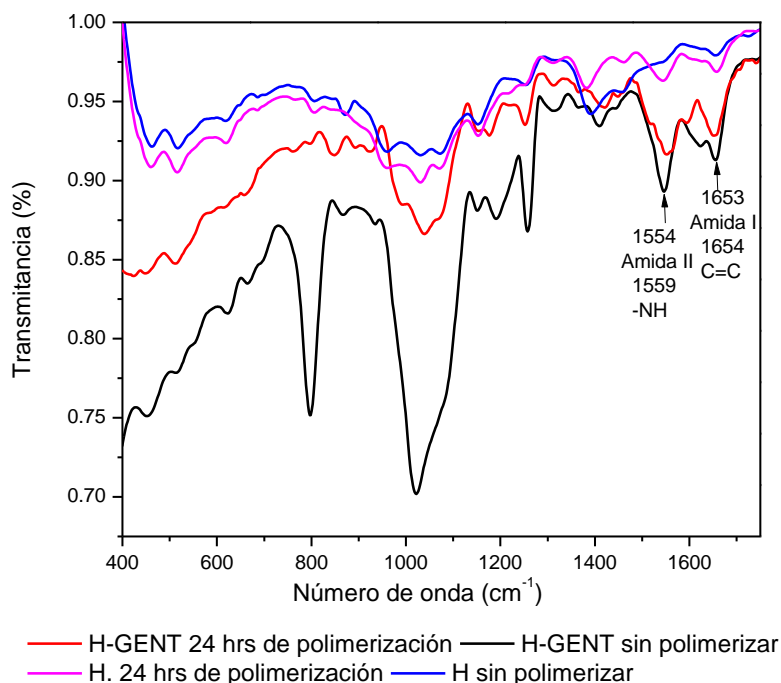


Figura 42. Espectros FTIR-ATR de hidrogeles polimerizados y sin polimerizar en el intervalo de 400-1750

Además, se señalan con una flecha en 1559 y 1654 cm^{-1} bandas relacionadas al proceso de fotopolimerización. En donde los espectros de muestras sin polimerizar (rosa y azul) denotan un cambio considerable en comparación con los espectros que cuentan con 24 horas de polimerización (negro y rojo), esto evidencia que se está llevando a cabo el proceso de fotopolimerización.

7.3.4 Hinchamiento (swelling)

A continuación, se muestran las gráficas correspondientes a las distintas síntesis realizadas, en general se puede dividir las síntesis en dos tipos:

1. Síntesis con concentraciones 1:1 (Quitosano: Bent. activ.)
2. Síntesis con concentraciones 5:1 (Quitosano: Bent activ.)

Todos los materiales sintetizados presentan porcentajes de hinchamiento que sobrepasan el 10% característico de un material del tipo hidrogel. La mayoría de las síntesis con una concentración 1:1 (Figura 43), el mayor porcentaje de *swelling* se presenta cuando las muestras cuentan con 48 horas de ser hidratadas y este se mantiene prácticamente constante. Sin embargo, como se puede observar las síntesis que cuentan con 24 hrs de polimerización presentan un mayor % de *swelling*, lo cual podría ser debido a que en 48 hrs de polimerización, el grado de reticulación es mayor, por lo cual su red es más densa y por tanto su *swelling* es menor.

En el caso de las síntesis con una concentración 5:1 (Figura 44), las muestras correspondientes a 24 y 48 hrs de polimerización de manera general presentan un mayor % de *swelling* en comparación con los mostrados anteriormente (Figura 43), esto es atribuido a la elevada concentración de CS. Cabe mencionar que, a las 24 hrs de polimerización presentan un mayor % de *swelling* en comparación con las muestras que tienen 48 hrs de polimerización.

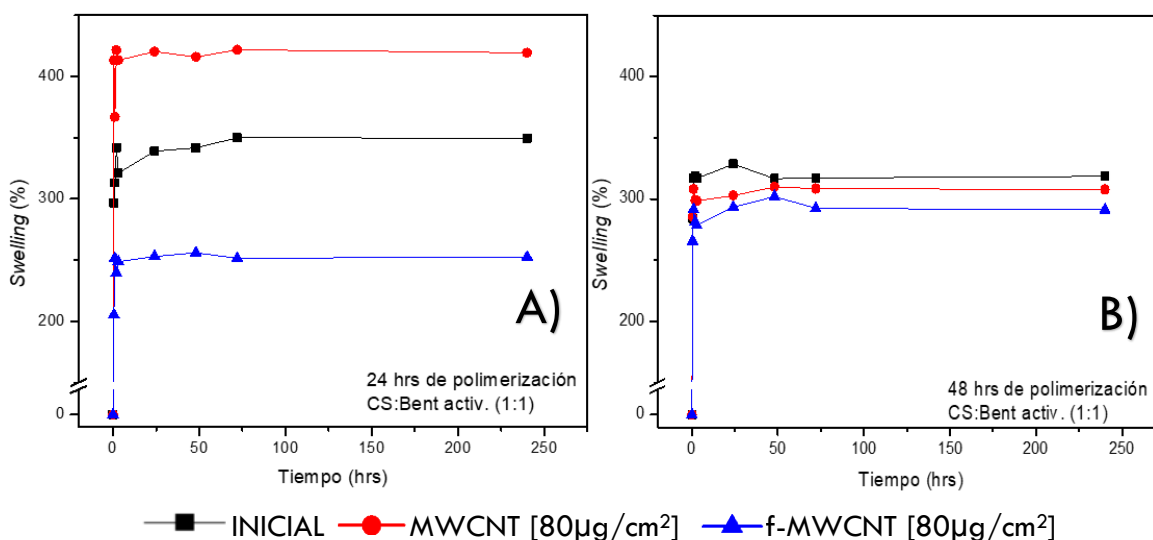


Figura 43. Hinchamiento de hidrogeles a distintos periodos de tiempo. A) Síntesis con concentración 1:1 (CS/BENT activada) a 24 hrs de polimerización y B) Síntesis con concentración 1:1 (CS/BENT activada) a 48 hrs de polimerización.

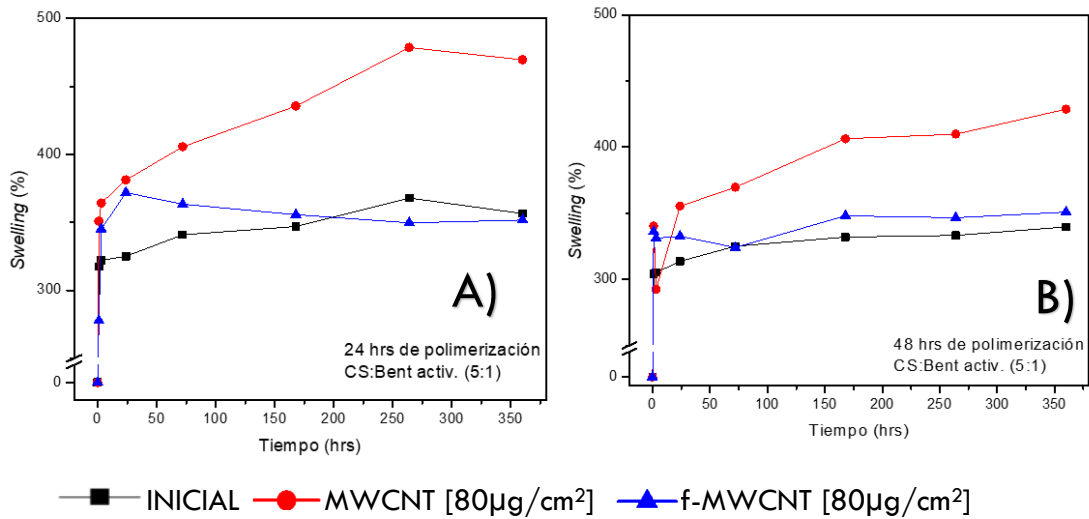


Figura 44. Hinchamiento de hidrogeles a distintos periodos de tiempo. A) Síntesis con concentración 5:1 (CS/BENT activada) a 24 hrs de polimerización y B) Síntesis con concentración 5:1 (CS/BENT activada) a 48 hrs de polimerización

La muestra que mayor % *swelling* presentó fue la correspondiente a la síntesis MWCNT [80 µg/cm²] con una concentración 5:1 con 429% en un tiempo de 15 días, y la muestra f-MWCNT [80 µg/cm²] con una concentración 1:1 presentó el menor % de *swelling* teniendo 244% en un periodo de 10 días.

7.3.4.1 *Swelling* en hidrogeles con gentamicina.

De acuerdo con los resultados obtenidos en los ensayos de resazurina, se eligieron solamente tres síntesis para añadir GENT a una concentración de 5 µg/mL.

A continuación, se muestran las figuras 45 y 46 en donde podemos observar, los hidrogeles con mayor concentración de CS (5:1) presentan mejores rendimientos de *swelling*. De manera general, hidrogeles sin MWCNT o f-MWCNT (color negro) presentan mejor rendimiento en el caso de hidrogeles con concentraciones 5:1 (CS/BENT activ) ya sea a 24 o 48 hrs de polimerización, seguido de hidrogeles con MWCNT (color azul) y finalmente con menor rendimiento f-MWCNT (color rojo).

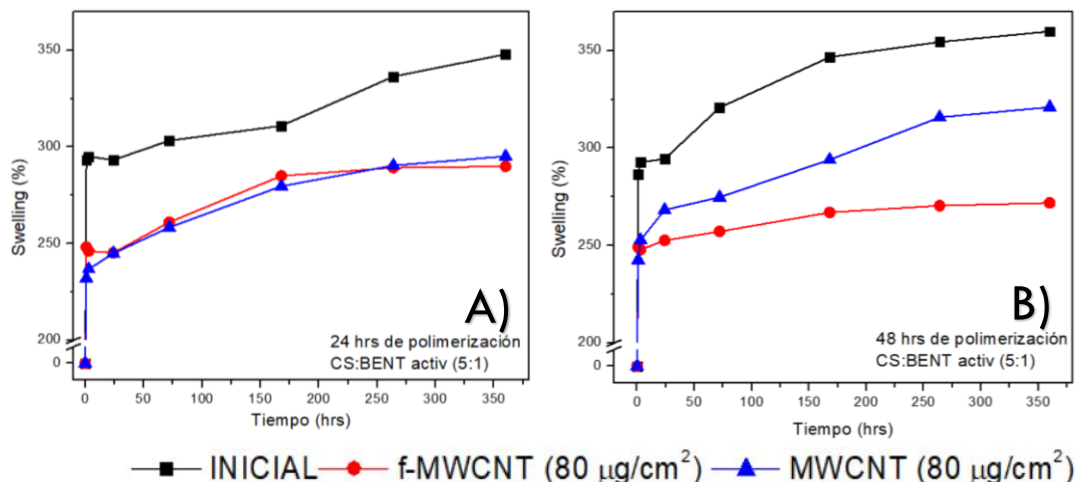


Figura 45. Hinchamiento de hidrogeles añadiendo Gentamicina a distintos periodos de tiempo. A) Síntesis con concentración 5:1 (CS/BENT activada) a 24 hrs de polimerización y B) Síntesis con concentración 5:1 (CS/BENT activada) a 48 hrs de polimerización.

En hidrogeles con concentración 1:1 (CS/BENT activ), este comportamiento no es observado, pues los hidrogeles presentan un desempeño similar. Sin embargo, la muestra que de manera general mejor desempeño mostró fue la muestra INICIAL (48 hrs de polimerización, concentración 5:1) con 360% en un periodo de 15 días, seguido de las muestras INICIAL y f-MWCNT (48 hrs de polimerización, concentración 5:1) con 341 y 342% respectivamente.

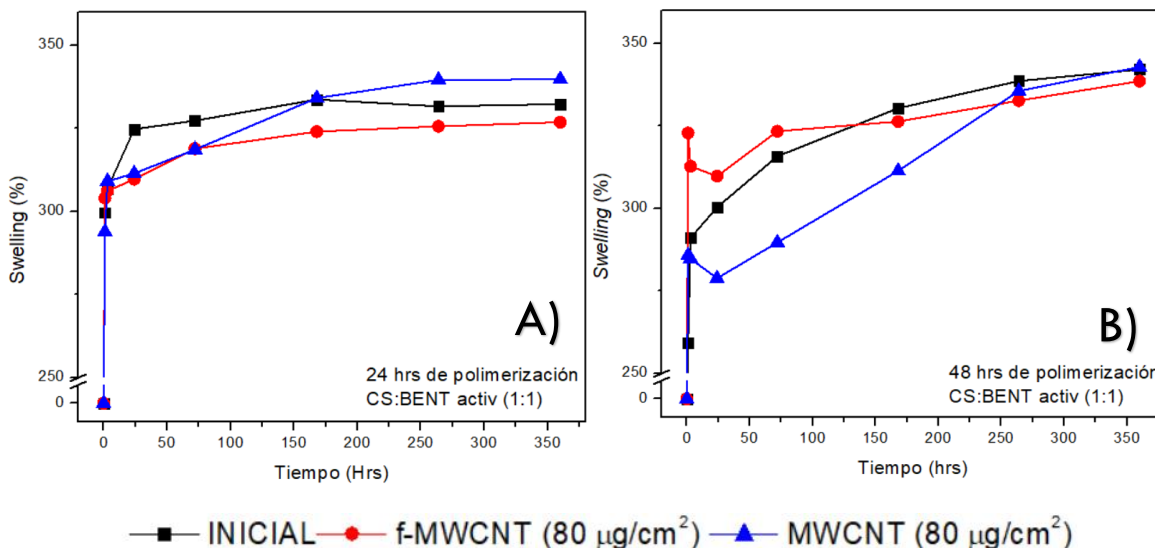


Figura 46. Hinchamiento de hidrogeles añadiendo Gentamicina a distintos periodos de tiempo. A) Síntesis con concentración 5:1 (CS/BENT activada) a 24 hrs de polimerización y B) Síntesis con concentración 5:1 (CS/BENT activada) a 48 hrs de polimerización

7.3.5 Reología

7.3.5.1 Viscosidad

Como se observa en las figuras 47 y 48, las síntesis presentan el mismo comportamiento, a bajas tasas de corte <1 , su viscosidad es alta, sin embargo, al aumentar su tasa de corte, su viscosidad se ve disminuida.

Cabe resaltar que las síntesis con concentraciones de CS (1:1) tienden a tener valores de viscosidad más elevados llegando a rebasar 7 KPa*s en comparación con las síntesis con concentraciones 5:1 en donde el valor más alto fue de 2.6 KPa*s como se muestra en la tabla 8. Esto podría darse debido al contenido de CS.

Tabla 8. Viscosidades de hidrogeles a una tasa de corte de 0.1

Hidrogeles con concentración 5:1 (CS:BENT activ.)		
Muestra	Tasa de corte	Viscosidad (Pa*s)
MWCNT (10)	0.1	2350
MWCNT (50)	0.1	2050
MWCNT (80)	0.1	1080
f-MWCNT (10)	0.1	1450
f-MWCNT (50)	0.1	2650
f-MWCNT (80)	0.1	1720
Hidrogeles con concentración 1:1 (CS:BENT activ.)		
INICIAL	0.1	2480
MWCNT (10)	0.1	6490
MWCNT (50)	0.1	3460
MWCNT (80)	0.1	3920
f-MWCNT (10)	0.1	7310
f-MWCNT (50)	0.1	6470
f-MWCNT (80)	0.1	3470
Hidrogeles con concentración 1:1 (CS:BENT activ.) GENTAMICINA		
INICIAL	0.1	683
f-MWCNT (80)	0.1	3820
MWCNT (80)	0.1	693
Hidrogeles con concentración 5:1 (CS:BENT activ.) GENTAMICINA		
INICIAL	0.1	1790
f-MWCNT (80)	0.1	2080
MWCNT (80)	0.1	3670

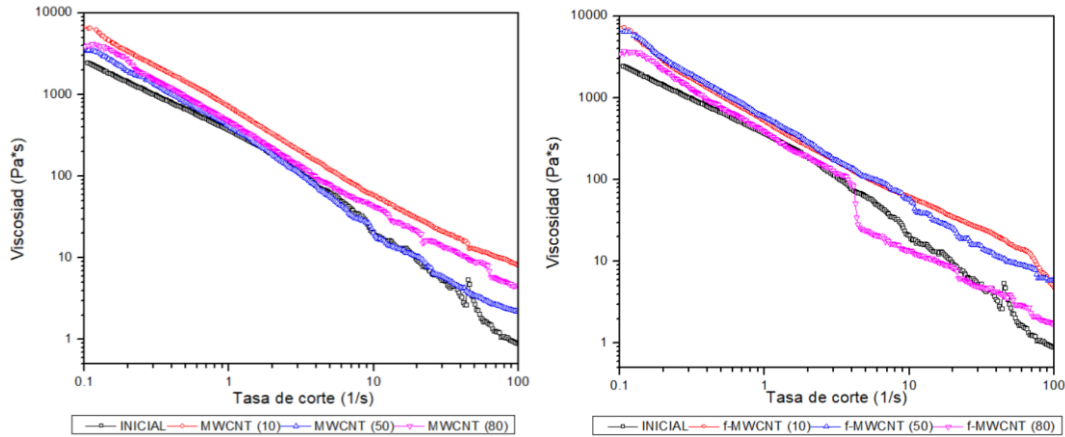


Figura 47. Viscosidad de hidrogeles con concentración 1:1 (CS:BENT activ).

Por otro lado, los hidrogeles con concentraciones 5:1 presentan viscosidades sin irregularidades, es decir, sin puntos que marquen ascensos o descensos indicando cambios drásticos, como lo es en los hidrogeles con concentraciones 1:1. Estos cambios dan indicio de puntos de ruptura del material, lo cual quiere decir que, al aplicar altas tasas de corte, supera las fuerzas de adhesión internas del hidrogel ocasionando pequeñas rupturas en su estructura.

Una vez dicho lo anterior los hidrogeles con mejor comportamiento son f-MWCNT (50) y MWCNT (10) con concentraciones de 5:1 obteniendo viscosidades por encima de los 2 kPa sin puntos de ruptura. Hidrogeles con f-MWCNT y concentración 5:1 no presentaron puntos de ruptura.

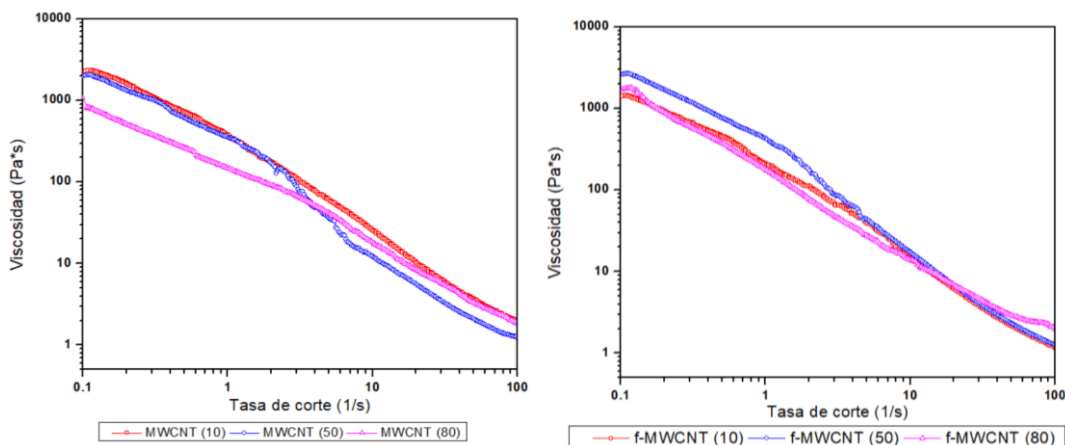


Figura 48. Viscosidad de hidrogeles con concentración 5:1 (CS:BENT activ)

Al añadir Gentamicina se observan cambios notables (figuras 49), que dan pie a inferir que el fármaco no solamente se aloja en el hidrogel, si no que interactúa con

los componentes que lo integran, lo cual concuerda con los resultados obtenidos en FTIR-ATR. De manera general, los hidrogeles presentan buen comportamiento a bajas tasas de corte, sin embargo, a altas tasas de corte (< 5 1/s) se observan puntos de ruptura. Hidrogeles con mejor comportamiento son f-MWCNT (80) (1:1) y MWCNT (80) (5:1) (puntos rojos en las figuras).

Finalmente, todas las síntesis muestran buen comportamiento a bajas tasas de corte (sin irregularidades drásticas y/o puntos de quiebre), con ello, se puede hacer uso del material como biotinta, puesto que, para ser impreso el material no es sometido a altas tasas de corte, sino todo lo contrario y además este valor se encuentra entre lo deseado para poder llevar a cabo la impresión del material. [52]

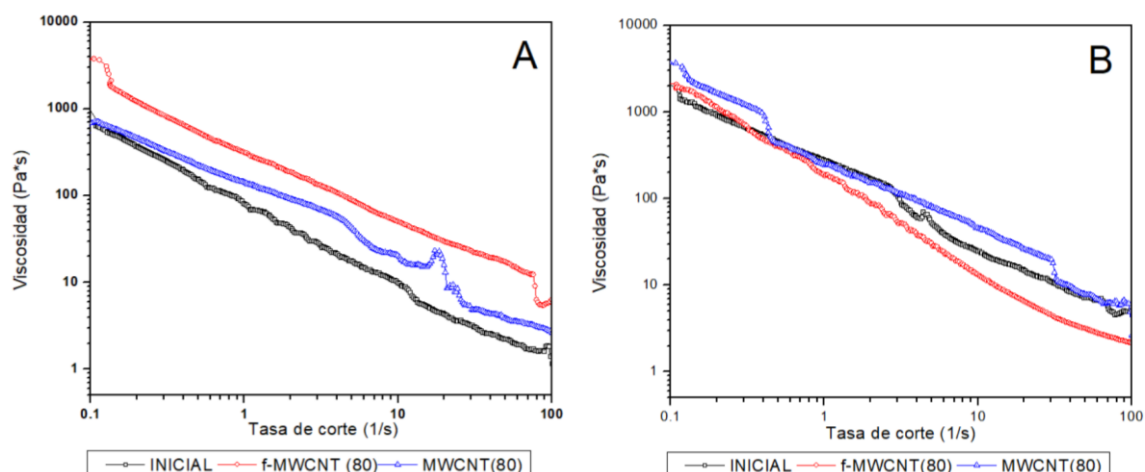


Figura 49. Viscosidad de hidrogeles con Gentamicina, A) Concentración 1:1 (CS:BENT activ.) y B) Concentración 5:1 (CS:BENT activ.)

7.3.5.2 Módulo de pérdida, módulo de carga y damping factor

Las figuras 50 y 51 muestran un promedio de las medidas tomadas, ya que presentan un comportamiento constante. De manera general, G' es mayor a G'' , lo cual indica que la muestra medida es un hidrogel.

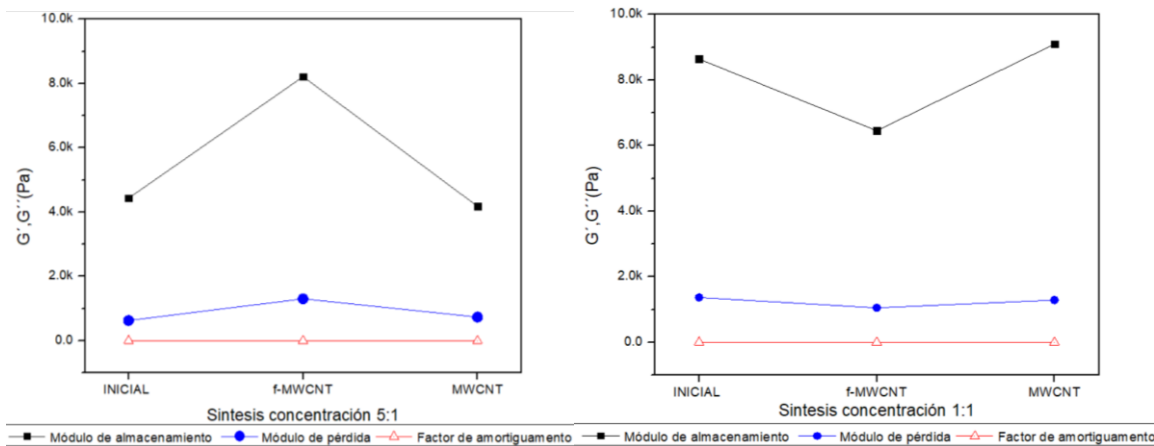


Figura 50. Módulo de pérdida, módulo de almacenamiento y factor de amortiguamiento correspondiente a hidrogeles sin polimerizar

Inicialmente, las muestras que contienen una concentración 1:1 (igual cantidad de CS que BENT activ.) presentan módulos de almacenamiento (G') más elevados respecto a las muestras que contienen concentraciones 5:1 (mayor cantidad de CS que BENT activ.). Esto es atribuido al contenido de BENT activ. que hay en ellas, pues como sabemos, BENT activ. es una nanoarcilla la cual al ser activada se mejoran sus capacidades de hinchamiento, superficie específica, plasticidad, etc.

Como se observa, las muestras en las cuales fueron incluidos MWCNT sin funcionalizar, presentan un comportamiento similar a las muestras en las cuales no fue agregado, denotando que posiblemente no haya interacción entre MWCNT-BENT activ.

Sin embargo, al agregar f-MWCNT su módulo de almacenamiento (G') se ve afectado. Al tener poco contenido de BENT activ y mayor contenido de CS (5:1), G' se ve elevada respecto al resto de las muestras, posiblemente debido a la interacción de f-MWCNT con los materiales que constituyen la muestra, siendo más específico a su interacción con CS. Sin embargo, en muestras con concentraciones 1:1, G' disminuye debido a un posible exceso de BENT activ.

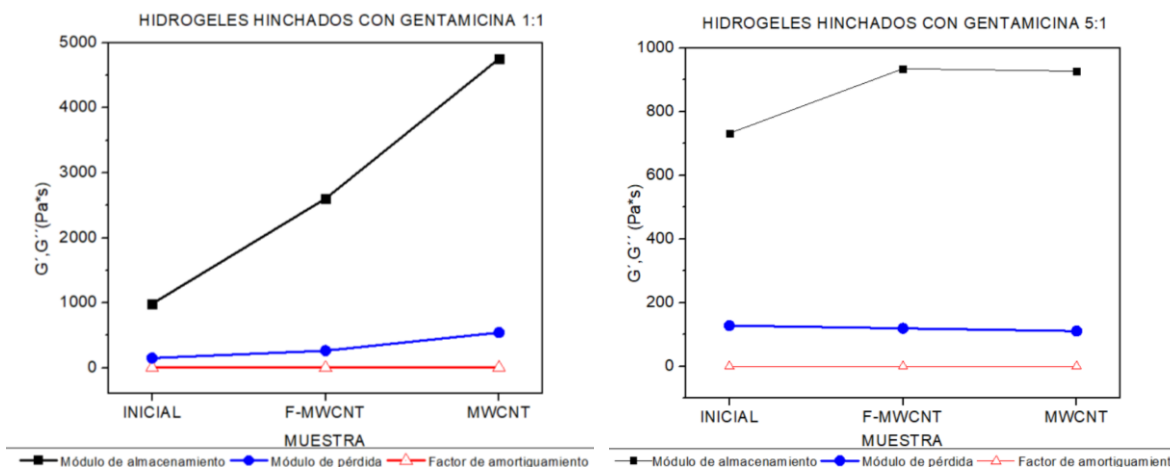


Figura 51. Módulo de pérdida, módulo de carga y damping factor correspondiente a hidrogeles polimerizados durante 48 hrs y 24 hrs de swelling.

La figura 51 muestra los resultados obtenidos de hidrogeles con un proceso previo de 48 horas de polimerización y 24 horas de *swelling*, en donde en comparación con las gráficas anteriores, los hidrogeles con una adición de MWCNT y f-MWCNT presentan cambios significativos en comparación con los hidrogeles que no los contienen (INICIAL), esto podría deberse a que al ser polimerizados los materiales se forman cadenas poliméricas dando como resultado una red doble, debido a la presencia de CS y AMPS, además, MWCNT y f-MWCNT interactúan en la red, dando como resultado un notable aumento en su módulo de carga en comparación con la inicial, cumpliendo con su papel de fibra de refuerzo.

La concentración de BENT activ. contribuye a elevados valores de G' como se observa en concentraciones 1:1 respecto a 5:1. Los hidrogeles que mayor valor obtuvieron fueron los hidrogeles con MWCNT a una concentración 1:1, lo cual concuerda con el mecanismo propuesto de formación de hidrogel, ya que como se observa en la figura 50 en donde no hubo un proceso de polimerización previo, no se hace notar la presencia de MWCNT, sin embargo, al haber dicho proceso (figura 51), G' es aumentada.

Al disminuir la cantidad de BENT activ. y tener una mayor cantidad de CS presente (5:1), no existe una gran diferencia entre las muestras f-MWCNT y MWCNT, sin embargo, a pesar de esto, existe una notable diferencia respecto al hidrogel "INICIAL".

7.3.6 Actividad metabólica celular: ensayo de resazurina

A continuación, se muestran los resultados de los experimentos realizados:

Tabla 9. Hidrogeles a una concentración 1:1 (CS:Bent activ)

CONDICIÓN	MEDIA	DESV. ESTÁNDAR
A CONTROL NEGATIVO DE MUERTE (CNM)	100	0
B (AMPS/CS)/BENT ACTIV/ f-MWCNT (INICIAL)	39.0	11.1
C (AMPS/CS)/BENT ACTIV/ f-MWCNT (10µg/cm ²)	53.9	4.5
D (AMPS/CS)/BENT ACTIV/ f-MWCNT (50µg/cm ²)	48.0	4.6
E (AMPS/CS)/BENT ACTIV/ f-MWCNT (80µg/cm ²)	67.7	9.1
F (AMPS/CS)/BENT ACTIV/ MWCNT (10µg/cm ²)	43.9	10.2
G (AMPS/CS)/BENT ACTIV/ MWCNT (50µg/cm ²)	33.4	3.0
H (AMPS/CS)/BENT ACTIV/ MWCNT (80µg/cm ²)	49.5	5.3
I CONTROL POSITIVO DE MUERTE	19.4	5.6

Como se observa en la figura 52, los hidrogeles presentan porcentajes debajo del 80% de manera general, sin embargo, se puede observar que tanto en hidrogeles en donde fueron añadidos f-MWCNT y MWCNT cuando se tiene una mayor concentración de estos (80 µg/cm²) se obtiene una mayor actividad metabólica. Es por ello que, se prosiguió a disminuir la concentración de BENT activ pasando de una concentración igual a CS, es decir de 1:1 (0.06 gr/mL : 0.06 gr/mL) a una concentración 5:1 (0.07 gr/mL : 0.014 gr/mL) en donde hay mayor cantidad de CS que BENT activ. Esto debido a que como sabemos, CS es un polímero natural viable.[27]

Al hacer el análisis estadístico Kruskal-Wallis mediante el programa statistica se obtuvo un valor de $H(8, N=54) = 27.71$ y $p=0.0005$, por lo cual se prosiguió a realizar el test U de Mann-Whitney en donde se comparó cada una de las muestras con el control negativo de muerte, su tasa de error familiar fue reducida de 33.65% a 4.89% debido a la corrección de Bonferroni realizada.

Como se puede verificar, el valor de p en la mayoría de los casos es significativo, excepto en la concentración f-MWCNT 80 µg/cm². Además, como se mencionó anteriormente, el experimento es hecho con un número de repeticiones de N=6 (tres transferencias distintas, dos repeticiones de experimento), es por ello que posiblemente el valor de p no sea significativo para esta muestra pesar de su bajo porcentaje de actividad metabólica.

A continuación, en la tabla 10 se muestran los resultados obtenidos a partir de hidrogeles con concentraciones 5:1 expuestos a células HEK293T:

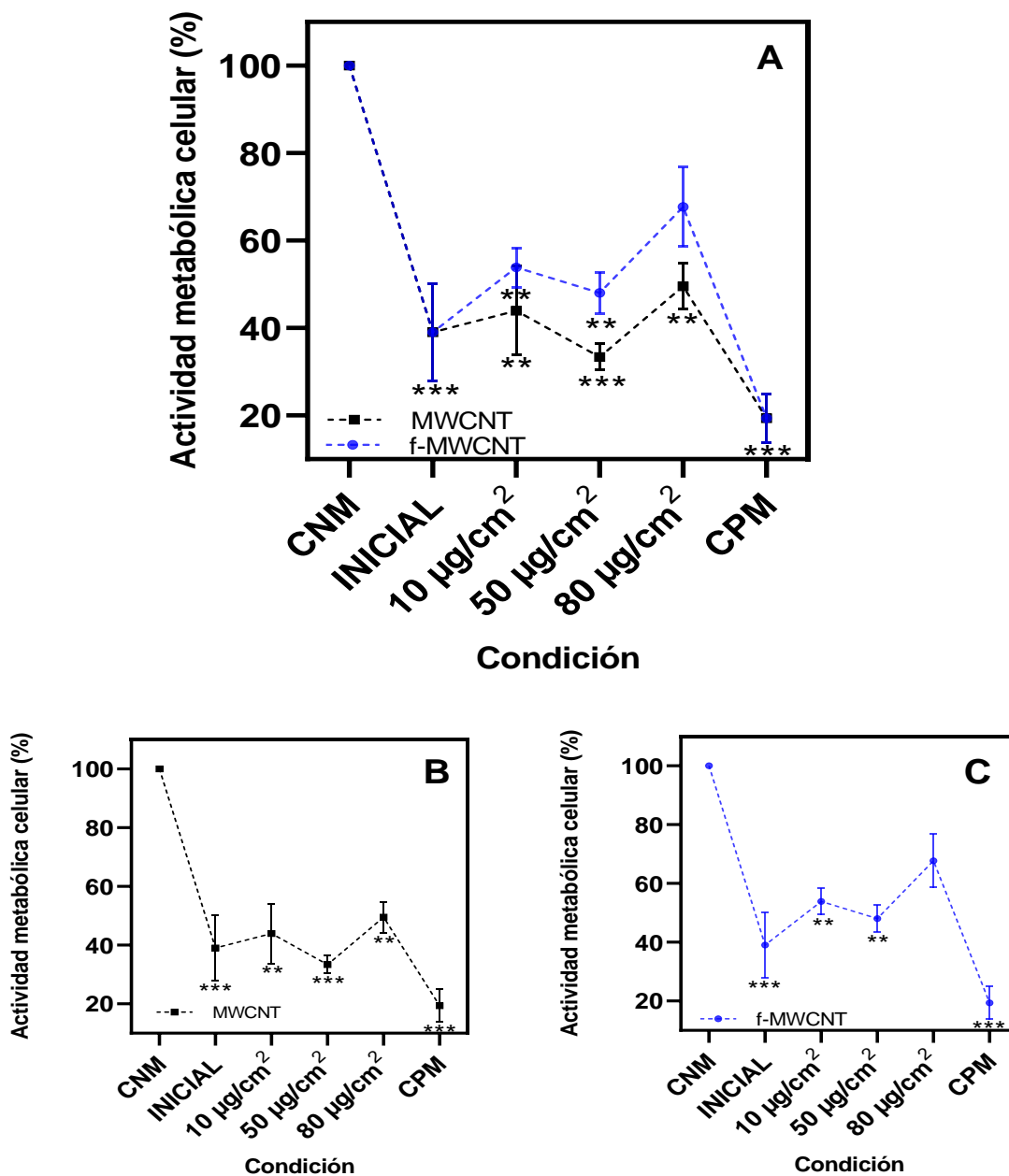


Figura 52. Resultados de actividad metabólica celular obtenidos a partir de ensayo de resazurina en hidrogeles con concentración 1:1 (CS: BENT activ) haciendo uso de células HEK293T. Se muestra la media \pm DE. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ en comparación con las células de control positivo CNM (solo medio de cultivo) y negativo CPM (agregando H₂O₂).

Tabla 10. Hidrogeles a una concentración 5:1 (CS:Bent activ)

CONDICIÓN	MEDIA	DESV. ESTÁNDAR (DE)	
A	CONTROL NEGATIVO DE MUERTE (CNM)	100	0
B	(AMPS/CS)/BENT ACTIV/ f-MWCNT (INICIAL)	63.7	3.5
C	(AMPS/CS)/BENT ACTIV/ f-MWCNT (10µg/cm ²)	63.3	3.6
D	(AMPS/CS)/BENT ACTIV/ f-MWCNT (50µg/cm ²)	66.3	1.1
E	(AMPS/CS)/BENT ACTIV/ f-MWCNT (80µg/cm ²)	77.3	2.8
F	(AMPS/CS)/BENT ACTIV/ MWCNT (10µg/cm ²)	64.1	11.6
G	(AMPS/CS)/BENT ACTIV/ MWCNT (50µg/cm ²)	68.7	1.0
H	(AMPS/CS)/BENT ACTIV/ MWCNT (80µg/cm ²)	69.9	6.2
I	CONTROL POSITIVO DE MUERTE	9.1	6.3

De manera general, como se había propuesto anteriormente la actividad celular se vio incrementada al ser reducida la concentración de BENT activ. y aumentar la concentración de CS (figura 53)

El análisis estadístico Kruskal-Wallis obtuvo un valor de $H(8, N=54) = 19.77$ y $p=0.0112$, por lo cual se prosiguió a realizar el test U de Mann-Whitney en donde se comparó cada una de las muestras con el control negativo de muerte, debido a que el número de grupos es el mismo que en el experimento anterior (8), la corrección de Bonferroni redujo de igual manera la tasa de error, la cual fue de 4.89%.

Se muestra un comportamiento similar al experimento anterior, en donde los hidrogeles con mayor concentración de f-MWCN y MWCNT (80 µg/cm²) presentan los mejores porcentajes, sin embargo, los resultados obtenidos por la prueba de U de Mann-Whitney corroboran que la muestra f-MWCNT 80 µg/cm² es la única muestra que presenta un valor de p que no es significativa.

Es por esta razón que ahora se prosigue a añadir GENT a una concentración de 5 µg/mL a las muestras que mejores resultados mostraron en ambas concentraciones (1:1 (0.06 gr/mL : 0.06 gr/mL) y 5:1 (0.07 gr/mL : 0.014 gr/mL)), los resultados se muestran a continuación en la tabla 11:

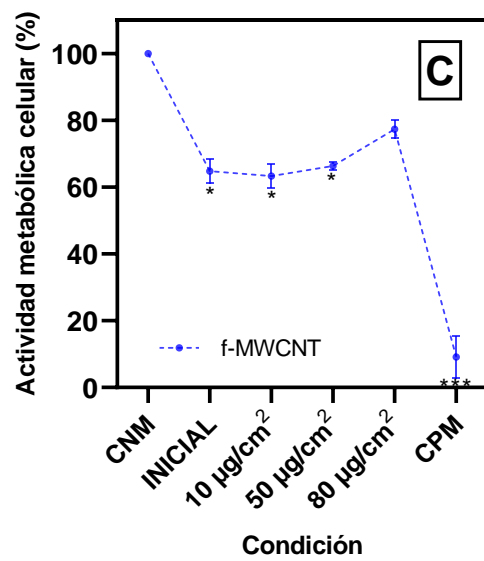
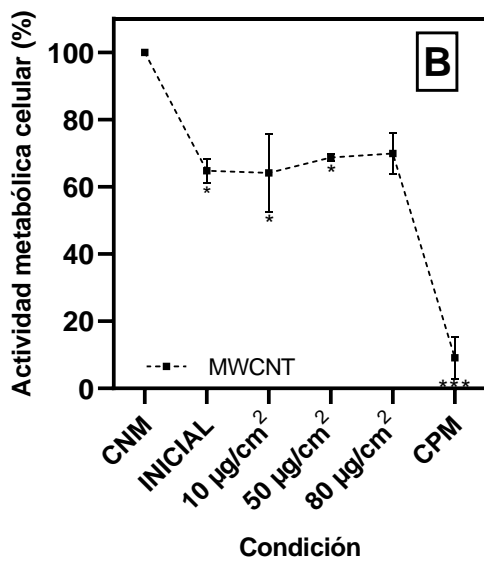
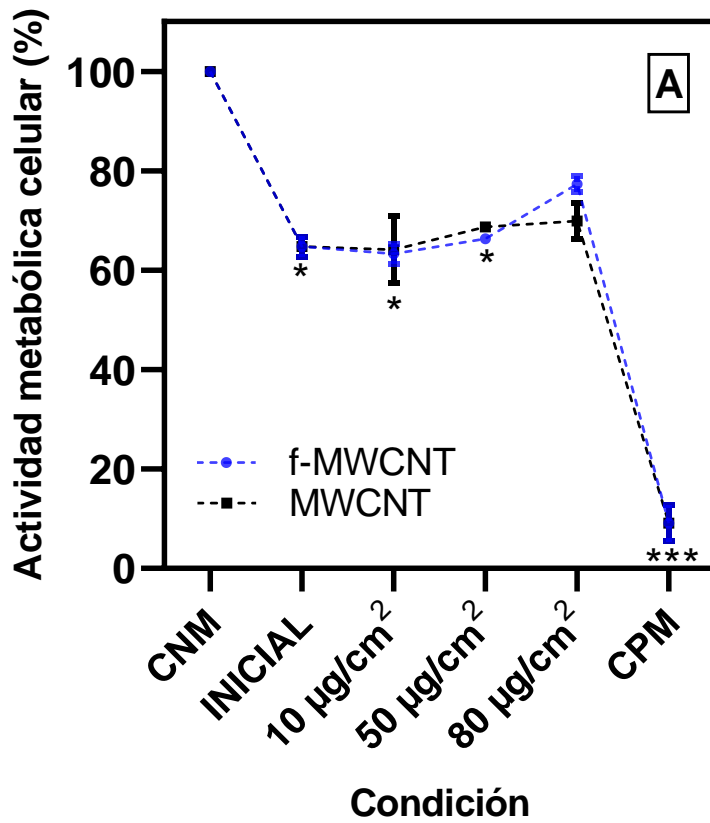


Figura 53. Actividad metabólica celular obtenidos a partir de ensayo de resazurina en hidrogeles con concentración 5:1 (CS: BENT activ) haciendo uso de células HEK293T. Se muestra la media \pm DE. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ en comparación con las células de control positivo CNM (solo medio de cultivo) y negativo CPM (agregando H₂O₂).

Tabla 11. Hidrogeles con Gentamicina

CONDICIÓN		MEDIA	DESV. ESTÁNDAR (DE)
A	CONTROL POSITIVO DE MUERTE (CPM)	18.7	3.2
B	CONTROL NEGATIVO DE MUERTE (CNM)	100	0
C	1:1 INICIAL	81.6	2.5
D	1:1 f-MWCNT (80µg/cm ²)	81.7	2.0
E	1:1 MWCNT (80µg/cm ²)	66.7	9.9
F	5:1 INICIAL	84.2	2.0
G	5:1 f-MWCNT (80µg/cm ²)	83.6	5.9
H	5:1 MWCNT (80µg/cm ²)	79.9	10.7

Los hidrogeles que son llamados INICIAL son hidrogeles CS/AMPS/BENT activ., es decir, sin agregar ya sea f-MWCNT ó MWCNT.

Agregar GENT a los hidrogeles favoreció su actividad metabólica celular, obteniendo en algunos casos valores por encima del 80% de viabilidad, lo cual es lo deseable para ser usado como biotinta en impresión 3D. Las muestras que mejores resultados mostraron fueron los hidrogeles con concentraciones bajas de BENT activ (5:1). Sin embargo, se observa de manera general que hidrogeles “INICIAL” e hidrogeles f-MWCNT presentaron resultados por encima del 80% de viabilidad independientemente de la concentración de BEN activ, los hidrogeles que contienen MWCNT sin funcionalizar presentan valores por debajo del 80% viabilidad.

El test Kruskal-Wallis realizado arrojó un valor de $H(7, N=48)=22.5$ y $p=0.0021$, por lo cual se realizó el test U de Mann-Whitney en donde se comparó cada una de las muestras con el control negativo de muerte, su tasa de error familiar fue reducida de 30.16% a 4.89% debido a la corrección de Bonferroni realizada.

De manera general observamos que solo las muestras correspondientes a el control positivo de muerte y MWCNT 80 µg/cm² presentan valores de p significativos ($p < 0.05$) rechazando la hipótesis nula (H_0) que nos dice que no hay cambio significativo. Por esta razón es que se puede hacer uso de los hidrogeles que resultaron con valores arriba del 80% de actividad metabólica celular y además no mostraron diferencia significativa con el control negativo de muerte.

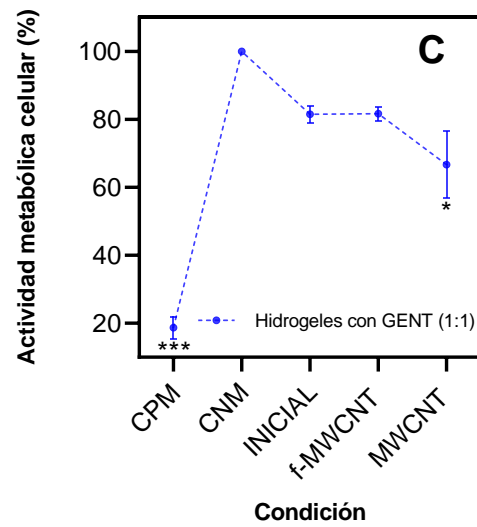
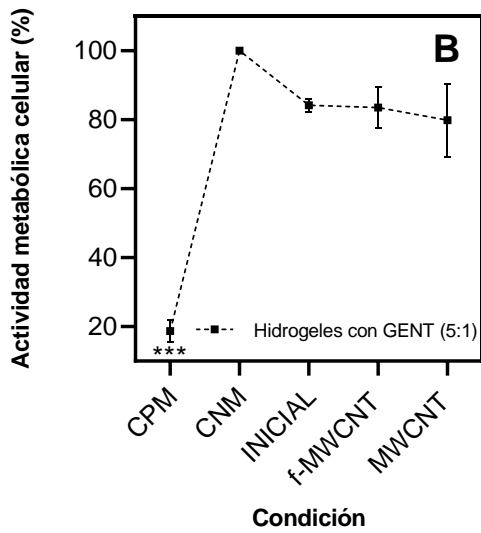
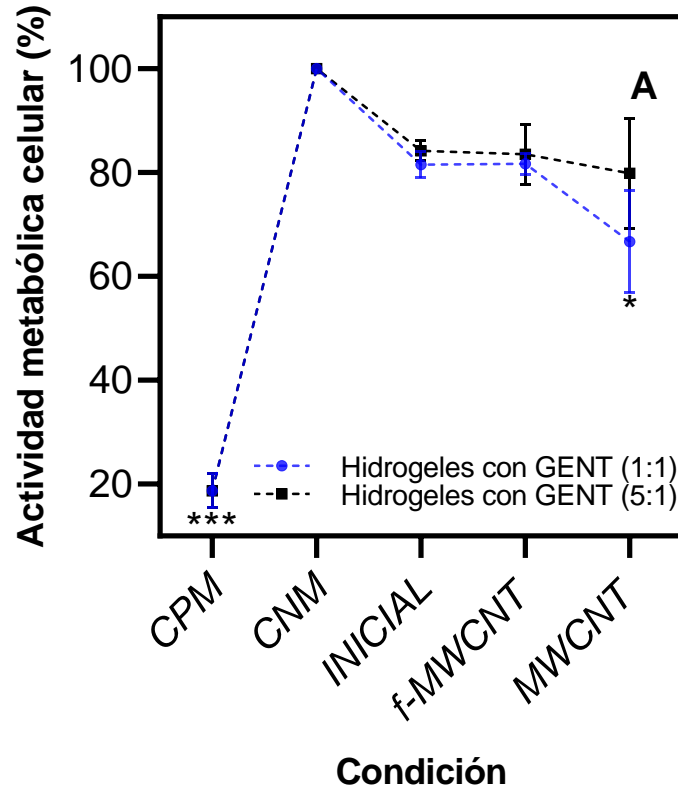


Figura 54. Resultados de actividad metabólica celular obtenidos a partir de ensayo de resazurina en hidrogeles con gentamicina a una concentración 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ a partir de dos distintas concentraciones 1:1 y 5:1 (CS: BENT activ) haciendo uso de células HEK293T. Se muestra la media \pm DE. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ en comparación con las células de control positivo CNM (solo medio de cultivo) y negativo CPM (agregando H_2O_2).

7.4 Microscopia electrónica de barrido.

A continuación, se muestran las micrografías SEM correspondientes a los hidrogeles que contienen GENT con concentraciones 5:1, ya que, de manera general, fueron los hidrogeles con mejores resultados en pruebas de actividad metabólica celular.

Primeramente, la figura 53 muestra el hidrogel "INICIAL" (sin contenido de MWCNT o f-MWCNT), la imagen A, muestra al hidrogel desde una perspectiva general (a una escala de 500 μm), en donde podemos observar una amplia red de CS en la cual se encuentra embebida Bent activ., formando agregados. Esto es más notorio en la imagen B y C, en donde se observa como la bentonita interactúa con CS. Este tipo de morfologías ha sido observado por otros autores. [69][80][81]

Al agregar MWCNT (figura 56) aparentemente no existe gran diferencia al ser observado a una escala de 500 μm , sin embargo, al hacer un acercamiento, se pueden apreciar notorias diferencias, en donde aparentemente es observada la formación de fibras producto del proceso de polimerización previamente hecho y la presencia de MWCNT, esta morfología observada apoya los resultados obtenidos en reología, ya que hidrogeles con MWCNT obtuvieron valores de módulo de almacenamiento mayores en comparación con otros hidrogeles.

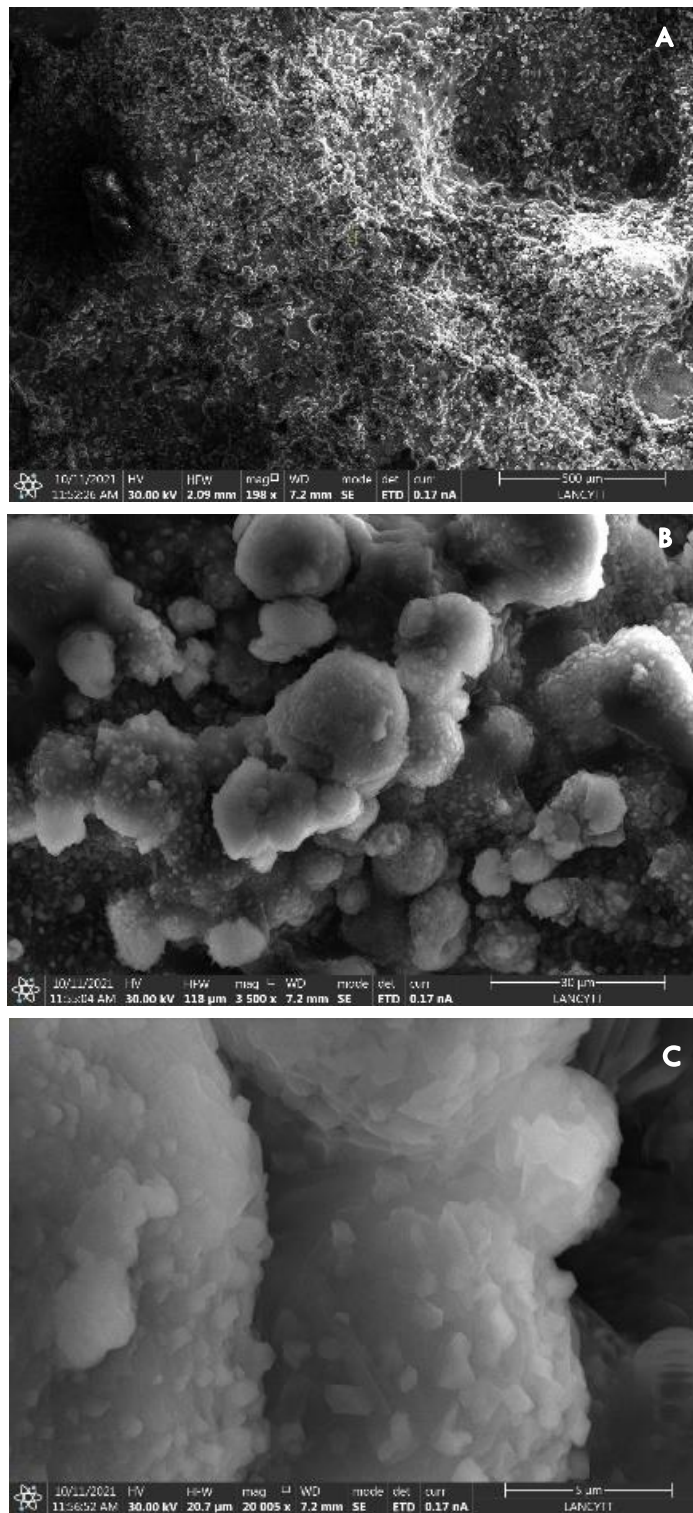


Figura 55. Microscopías SEM de hidrogel "INICIAL" con GENT con concentración 5:1 a distintas escalas A. 500 μm B.30 μm y C. 5 μm.

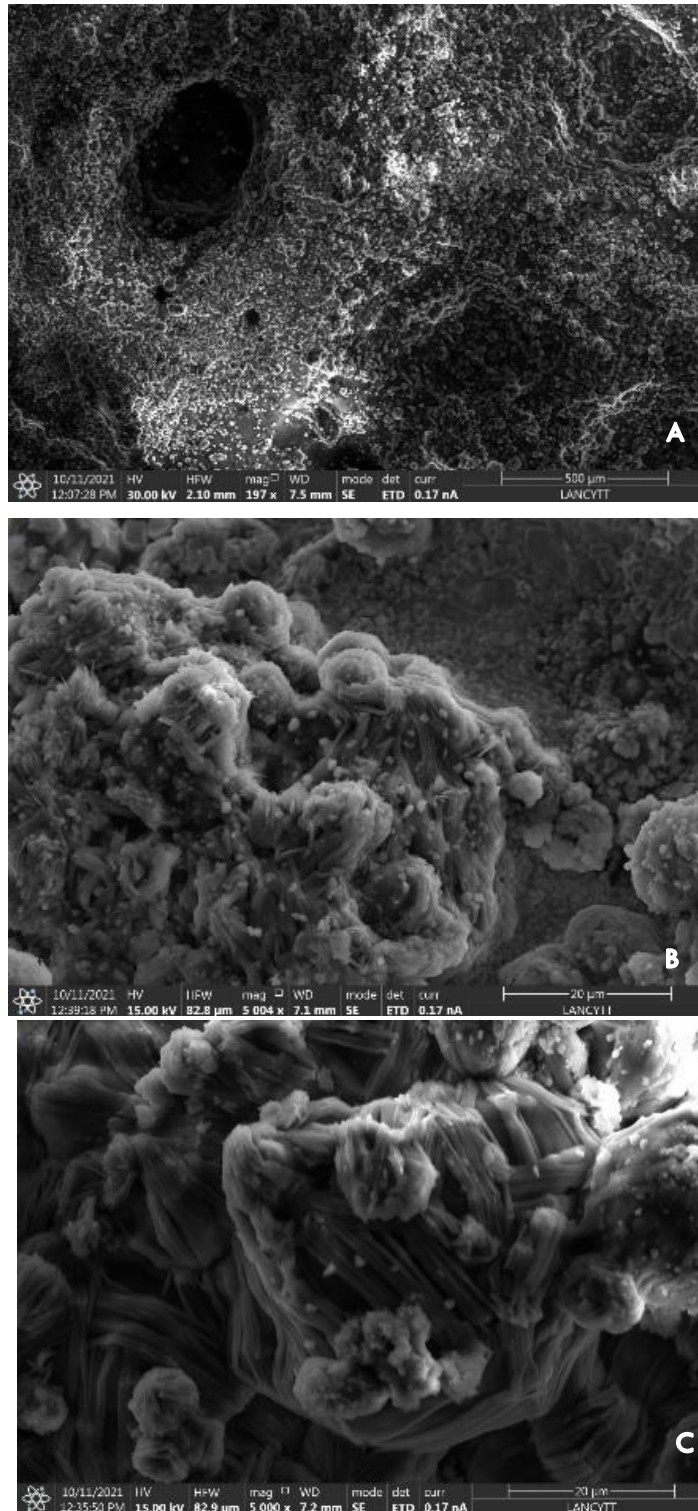


Figura 56. Microscopías SEM de hidrogel MWCNT (80μg/cm²) con GENT con concentración 5:1 a distintas escalas A. 500 μm B y C

Finalmente, las micrografías obtenidas de hidrogeles con contenido de f-MWCNT (figura 57) muestran una morfología distinta a las anteriores. La imagen A da a conocer un panorama general del hidrogel (a una escala de 500 μm), sin embargo, la imagen B y C sugieren la presencia de f-MWCNT, esto no podría ser asegurado, pues la magnitud de los posibles f-MWCNT no concuerda con lo observado, aunque no podría ser descartado, ya que como se mencionó anteriormente al ser funcionalizados MWCNT presenta una mayor facilidad para interactuar con los componentes del hidrogel, siendo más específicos con CS y GENT, en donde estos compuestos “envuelven” al tubo, pudiendo dar como resultado lo observado en la imagen B y C. Otra posibilidad es que sea poly(AMPS) interaccionando con f-MWCNT y MBA en el hidrogel, este tipo de morfología es similar a la observada por otros autores.[82][83][84]

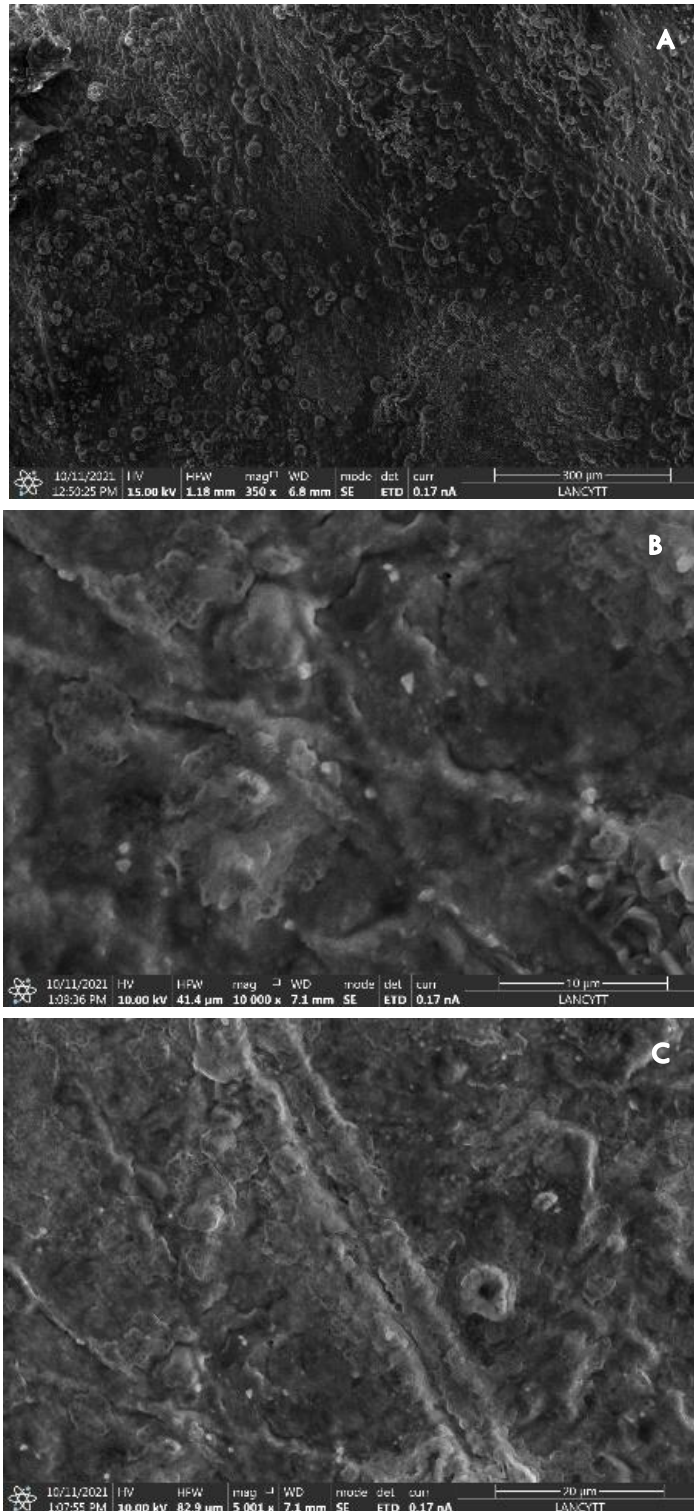


Figura 57. Microscopías SEM de hidrogel MWCNT (80µg/cm²) con GENT con concentración 5:1 a distintas escalas A. 500 µm B 20 µm y C 10 µm.

7.5 Impresión 3D

Se llevó a cabo la impresión 3D de meniscos lateral y medial obtenidos por medio de la segmentación, mediante el uso de un archivo de resonancia magnética (figuras 25,26 y 27).

La impresión 3D se llevó a cabo con el hidrogel con f-MWCNT ($80\mu\text{g}/\text{cm}^2$) con concentración 5:1 al cual fue añadido GENT ($5\mu\text{g}/\text{mL}$). Esto debido a que es el hidrogel con f-MWCNT que mejor actividad metabólica celular obtuvo (83.6 %).



Figura 58. Meniscos lateral y medial obtenidos a partir de impresión 3D.

Las piezas finales son mostradas en la figura 58 correspondientes a un par de meniscos, estas piezas fueron polimerizadas por 48 hrs, que según los resultados obtenidos por Raman y *swelling*, sería el mejor intervalo de tiempo a usar (figura 59). Finalmente, las piezas fueron sumergidas en PBS a una temperatura controlada a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, la figura 60 fue tomada cuando los meniscos tenían 30 días en PBS.



Figura 59. Meniscos medial y lateral obtenidos por impresión 3D al ser polimerizados durante 48 horas.

La mayor problemática que se tiene es que la impresión 3D del material debe de ser hecha el mismo día en que fue fabricado al hidrogel, debido a que con el paso de los días su viscosidad se ve afectada, dificultando así su impresión, además, como se observa al ser impresa la prótesis, la especificidad lograda es baja, por lo cual una vez que se realiza el proceso de polimerización, se ve afectada la forma específica de la prótesis.



Figura 60. Meniscos obtenidos por impresión 3D, con 30 días de ser sumergidos en PBS.

8 CONCLUSIONES.

El añadir un monómero natural (CS) a un monómero sintético (AMPS), contribuyó en la mejora de las propiedades mecánicas debido a los enlaces formados entre las dos redes y, además, en la mejora de las propiedades de actividad metabólica celular.

Se sintetizaron tres configuraciones de hidrogeles de red dual o semi-interpenetrada debido a la presencia de AMPS y CS: Poli(AMPS)/Quitosano, Poli(AMPS/Quitosano)/MWCNT y Poli(AMPS/Quitosano)/f-MWCNT, en donde se varió la concentración de Bentonita activada y Quitosano (CS).

Se llevó a cabo un proceso de activación ácida de bentonita mejoran sus capacidades de hinchamiento, superficie específica, plasticidad, etc.

El proceso de funcionalización de MWCNT se llevó a cabo con el polímero CS, obteniendo f-MWCNT. Este proceso de funcionalización favoreció la interacción de f-MWCNT con los componentes del hidrogel, como CS y GENT, esto debido a los grupos amina presentes en CS.

Mediante espectroscopia Raman se comprobó la decoración de MWCNT, siendo observadas las bandas D y G ubicadas en 1337 y 1564 cm^{-1} respectivamente. Presentando un incremento la relación $I_{D/G}$ para f-MWCNT en comparación con MWCNT, de 0.18 (MWCNT) a 0.37 (f-MWCNT).

Por otro lado, por espectrofotometría UV-VIS se encontró una banda absorción en ~ 293 nm la cual presenta un corrimiento negativo en la muestra f-MWCNT, que de igual manera podría atribuirse a procesos de oxidación a causa de la funcionalización de MWCNT. Estos resultados fueron confirmados por su morfología observada en STEM.

El proceso de funcionalización de MWCNT aumentó la actividad metabólica celular de células HEK293T.

Bent activ. mejoró la interacción entre los componentes del hidrogel, denotado directamente en sus propiedades. Influye notoriamente en la viscosidad de los hidrogeles, ya que síntesis con concentraciones de 5:1 tienden a tener valores de viscosidad más elevados llegando a rebasar 7 $\text{KPa}\cdot\text{s}$ en comparación con las síntesis con concentraciones 1:1 en donde el valor más alto fue de 2.6 $\text{KPa}\cdot\text{s}$.

Mediante luz UV se llevó a cabo el proceso de fotopolimerización, seguido mediante espectroscopía Raman. Modos de intensidad del enlace doble $\text{C}=\text{C}$ (1636 y 1628 cm^{-1}), el modo de intensidad correspondiente al doble enlace $\text{C}=\text{C}$ de bisacrilamida a 1628 cm^{-1} disminuyeron al mismo tiempo, denotando el proceso de polimerización.

En una solución de PBS a una temperatura de 37 °C, fueron sumergidos e hinchados (*swelling*) los hidrogeles. De manera general, los hidrogeles presentaron porcentajes de hasta 460% de *swelling* cuando estos tienen 24 hrs de

polimerización, lo cual fue atribuido a su grado de reticulación en comparación con los que fueron expuestos 48 hrs a luz UV, en donde la red polimérica es más densa y el mejor valor obtenido fue de 415%. Asimismo, hidrogeles con concentraciones 5:1 (CS:Bent activ.) presentan mejores % de *swelling* en comparación con hidrogeles con concentraciones 1:1.

GENT no solo se alojó en el hidrogel, si no que interactuó con los componentes de ellos, haciendo especial énfasis en el monómero CS, lo cual se comprobó mediante FTIR-ATR, *swelling* y mediciones reológicas y de viscosidad.

Hidrogeles que contenían GENT denotaron varias bandas características, evidenciando tanto su presencia como su interacción con CS. Estas bandas en su mayoría se deben a la deformación o estiramiento de -OH y amidas formadas por el estiramiento de C=O. Además, en 1555 cm^{-1} se encontró la banda correspondiente a vibración de flexión N-H proveniente de la posible unión entre CS y BENT activ. ó bien MBA y BENT activ. así como a las amidas II provenientes de GENT.

Hidrogeles sin GENT sobrepasaron factores de hinchamiento de 400%, sin embargo, en hidrogeles con GENT la muestra que mejor desempeño mostró fue la muestra INICIAL (48 hrs de polimerización, concentración 5:1) con 360% en un periodo de 15 días.

De manera general, los hidrogeles presentaron buen comportamiento a bajas tasas de corte, sin embargo, a altas tasas de corte ($< 5\text{ 1/s}$) se observaron puntos de ruptura. Sin embargo, para ser llevada a cabo la impresión del hidrogel, no se necesitaron tasas de corte elevadas, es por ello por lo que este factor no afectó el proceso de impresión 3D.

El proceso de funcionalización favoreció la interacción entre los componentes, pues, previo a ser polimerizados los hidrogeles con mayor contenido de CS (5:1), G' se elevó respecto al resto de las muestras, llegando a sobrepasar los 8 kPa, sin embargo, en muestras con concentraciones 1:1, G' disminuye debido a un exceso de BENT activ. llegando a 6 kPa.

Por otra parte, cuando se llevó a cabo un proceso de polimerización de 48 hrs y un *swelling* de 24 hrs, los hidrogeles con MWCNT y f-MWCNT presentaron mejor desempeño tanto en concentraciones 1:1 como en 5:1. En este caso, el hidrogel con mejor desempeño fue MWCNT a una concentración 1:1 con $G' = 4.9\text{ KPa}$.

Finalmente, hidrogeles con concentraciones 5:1 presentaron mejores porcentajes de actividad metabólica celular. De cada una de las síntesis (1:1 y 5:1) se eligieron las muestras INICIAL (sin añadidura de MWCNT), MWCNT ($80\text{ }\mu\text{g/cm}^2$) y f-MWCNT ($80\text{ }\mu\text{g/cm}^2$) para ser añadido GENT, ya que fueron las síntesis con mejores resultados en distintas caracterizaciones.

GENT aumentó la actividad metabólica de células HEK293T al ser expuestas a los hidrogeles, siendo así que la mayoría de las síntesis sobrepasó el 80 % de actividad metabólica celular. La muestra que con mayor % fue la síntesis inicial a una

concentración 5:1 con un 84.2 % de actividad metabólica celular, seguido de f-MWCNT con un 83.6%.

Como producto final, se llevó a cabo la impresión de meniscos lateral y medial, a través de segmentación de imágenes haciendo uso de imágenes de resonancia magnética y el programa 3D slicer. El hidrogel impreso fue "f-MWCNT" (80µg/cm²) con concentración 5:1 (CS:Bent activ), debido a su % de actividad metabólica celular.

Los hidrogeles sintetizados pueden ser utilizados como biotintas para impresión 3D de prótesis, sin embargo, aún no se consideran a estos hidrogeles para dar inicio a experimentos in-vivo, Debido a la falta de pruebas como lo es liberación de fármaco, pruebas antiinflamatorias, actividad celular metabólica haciendo uso de células como osteoblastos o bien condrocitos, biodegradación, etc.

Hidrogeles sintetizados representan un punto de partida para ser utilizados como biotinta, ya que ahora se conoce cómo es la sinergia entre los materiales utilizados y como son afectadas sus propiedades de hinchamiento, reológicas, actividad metabólica celular, etc, bajo diferentes condiciones.

8.1 Trabajo a futuro

Como se menciona, los hidrogeles sintetizados se ven afectados por su concentración de Bent activ., comprometiendo su actividad metabólica celular, así como sus propiedades reológicas. Por ello, se propone hacer un cambio en la concentración de Bent activ. sin comprometer sus propiedades reológicas y de actividad metabólica celular.

Por otra parte, GENT favoreció la actividad metabólica de los hidrogeles, sin embargo, la cantidad en la que fue añadida es la cantidad mínima recomendada. Consiguiente a ello, se recomienda añadir en mayor concentración, esperando un aumento en su actividad metabólica celular.

Hacer pruebas de liberación de fármaco, ya que como se sabe, los aminoglucósidos son antibióticos neurotóxicos y nefrotóxicos que se absorben en cantidades importantes en las superficies corporales después de la irrigación o la aplicación local.

Las células HEK293T es una línea celular proveniente de riñón embrionario humano, se propone hacer uso de células que asimilen mejor el ambiente en el que se encontraría la prótesis de menisco, es decir, células de osteoblastos o fibroblastos.

Cuantificar errores anatómicos en la construcción de prótesis.

9 BIBLIOGRAFÍA

- [1] J. P. Rodríguez and E. C. R. Merchán, “Anatomía-Biomecánica y vascularización de meniscos,” vol. 15, no. 2, pp. 35–41, 2008.
- [2] Z. Z. Zhang *et al.*, “3D-Printed Poly(ϵ -caprolactone) Scaffold Augmented with Mesenchymal Stem Cells for Total Meniscal Substitution: A 12- and 24-Week Animal Study in a Rabbit Model,” *Am. J. Sports Med.*, vol. 45, no. 7, pp. 1497–1511, 2017, doi: 10.1177/0363546517691513.
- [3] J. R. Hernández and H. Reinecke, “Aplicaciones biomédicas actuales de la impresión 3D y fabricación aditiva,” *Rev. plásticos Mod. Cienc. y Tecnol. polímeros*, vol. 119, no. 754, p. 4, 2020.
- [4] A. A. Adewunmi, S. Ismail, and A. S. Sultan, “Carbon Nanotubes (CNTs) Nanocomposite Hydrogels Developed for Various Applications: A Critical Review,” *J. Inorg. Organomet. Polym. Mater.*, no. March 2018, 2016, doi: 10.1007/s10904-016-0379-6.
- [5] M. L. Andrade Guel, L. I. López López, and A. Sáenz Galindo, “Nanotubos de carbono: Funcionalización y aplicaciones biológicas,” *Rev. Mex. Ciencias Farm.*, vol. 43, no. 3, pp. 9–18, 2012.
- [6] Y. Lin *et al.*, “Advances toward bioapplications of carbon nanotubes,” *J. Mater. Chem.*, pp. 527–541, 2004, doi: 10.1039/b314481j.
- [7] B. E. Rosenkrantz, J. R. Greco, J. G. Hoogerheide, and E. M. Oden, *Gentamicin Sulfate*, vol. 9, no. C. 1981.
- [8] A. Lohani, G. Singh, S. S. Bhattacharya, and A. Verma, “Interpenetrating Polymer Networks as Innovative Drug Delivery Systems,” *J. Drug Deliv.*, vol. 2014, no. Figure 1, pp. 1–11, 2014, doi: 10.1155/2014/583612.
- [9] I. Sumio, “Helical microtubules of graphitic carbon,” *Nat. Publ. Gr.*, vol. 354, pp. 56–58, 1991.
- [10] J. C. García, “viscoelasticidad,” pp. 1–33, 2008, [Online]. Available: <http://hdl.handle.net/10045/3624>.
- [11] O. Rojas, “Fundamentos de reología,” *Cuad. FIRP S521-C Módulo enseñanza en Fenom. interfaciales*, pp. 40–43, 2012.
- [12] K. Präbst, H. Engelhardt, S. Ringgeler, and H. Hübner, “Cell Viability Assays,” *Basic Color. Prolif. Assays MTT, WST, Resazurin*, vol. 1601, pp. 1–17, 2017, doi: 10.1007/978-1-4939-6960-9.
- [13] R. Govindaraju *et al.*, “Cuadernos Artroscopia,” *Revista de la asociación española de la artroscopia (A.E.A.)*, vol. 30, no. 22 Jan, pp. 588–595, 2007.
- [14] A. J. S. Fox, F. Wanivenhaus, A. J. Burge, R. F. Warren, and S. A. Rodeo, “The human meniscus: A review of anatomy, function, injury, and advances in

- treatment,” *Clin. Anat.*, vol. 28, no. 2, pp. 269–287, 2015, doi: 10.1002/ca.22456.
- [15] M. Bahram, N. Mohseni, and M. Moghtader, “An Introduction to Hydrogels and Some Recent Applications,” *Emerg. Concepts Anal. Appl. Hydrogels*, no. August, 2016, doi: 10.5772/64301.
- [16] Á. A. César-Juárez *et al.*, “Uso y aplicación de la tecnología de impresión y bioimpresión 3D en medicina,” *Rev. la Fac. Med.*, vol. 61, no. 6, pp. 43–51, 2018, [Online]. Available: http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0026-17422018000600043&lng=es&nrm=iso&tlng=es.
- [17] S. V. Murphy, A. Skardal, and A. Atala, “Evaluation of hydrogels for bio-printing applications,” *J. Biomed. Mater. Res. - Part A*, vol. 101 A, no. 1, pp. 272–284, 2013, doi: 10.1002/jbm.a.34326.
- [18] J. J. Rongen, T. G. van Tienen, B. van Bochove, D. W. Grijpma, and P. Buma, “Biomaterials in search of a meniscus substitute,” *Biomaterials*, vol. 35, no. 11, pp. 3527–3540, 2014, doi: 10.1016/j.biomaterials.2014.01.017.
- [19] P. Ripoll, J. Vaquero, and F. Forriol, “Sustitutos meniscales (Trasplante de menisco y plantillas de colágeno),” vol. 5, no. 4, pp. 339–353, 2009.
- [20] J. J. Elsner, S. Portnoy, G. Zur, F. Guilak, A. Shterling, and E. Linder-Ganz, “Design of a free-floating polycarbonate-urethane meniscal implant using finite element modeling and experimental validation,” *J. Biomech. Eng.*, vol. 132, no. 9, 2010, doi: 10.1115/1.4001892.
- [21] C. León, J. Jairo, L. Viviana, M. Ortega, and E. Rivero, “Nanotubo de carbonocitosan en células HOS y THP-1 Carbon nanotubes-chitosan in HOS and THP-1 cells,” *Rev. la Univ. Ind. Santander. Salud*, vol. 43, no. 1, pp. 21–26, 2011.
- [22] E. N. Biomedicina and Y. E. N. Biotecnología, “ESTRUCTURAS TRIDIMENSIONALES POROSAS DE MWCNTs CON APLICACIONES EN BIOMEDICINA Y EN BIOTECNOLOGÍA,” *Control*, 2009.
- [23] Y. Gogotsi, *Nanomaterials Handbook*. 2006.
- [24] M. Assali, “Nanotubos de carbono biocompatibles: síntesis y aplicaciones en biomedicina,” p. 409, 2012, [Online]. Available: <https://idus.us.es/handle/11441/46744#.XqiQeloTK5k.mendeley%0Ahttps://dialnet.unirioja.es/servlet/tesis?codigo=26515>.
- [25] C. I. Santana Méndez, “Funcionalización de Nanotubos de Carbono para Aplicaciones Médicas,” *Cent. Investig. Mater. Av.*, p. 158, 2013.
- [26] H. J. Zajac A., W. M., and D. L., “Determination of N-acetylation degree in chitosan using Raman spectroscopy,” *Spectrochim. Acta Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* 134, vol. 134, pp. 114–120, 2015, doi: 10.1016/j.saa.2014.06.071.

- [27] J. Giraldo, "Propiedades, obtención, caracterización y aplicaciones del quitosano," *Univ. Concepc.*, no. MAY, 2015, doi: 10.13140/RG.2.1.3350.9287.
- [28] A. Nesic *et al.*, "Physical-chemical behavior of novel copolymers composed of methacrylic acid and 2-acrylamido-2-methylpropane sulfonic acid," *Mater. Chem. Phys.*, vol. 174, pp. 156–163, 2016, doi: 10.1016/j.matchemphys.2016.02.063.
- [29] C. Cifuentes Villegas and D. A. Acosta Maya, "Procesos para obtener arcillas activadas." 2017.
- [30] R. Moreira, "Propiedades de una bentonita industrial nacional y su caracterización estructural basada en absorción y difracción de rayos X (XANES y DRX)," no. 710, pp. 1–119, 2016, [Online]. Available: http://sergioguillen.com/wp-content/uploads/2015/05/Guillen_Cavero_TFG_vFinal.pdf.
- [31] H. El-Sherif and M. El-Masry, "Superabsorbent nanocomposite hydrogels based on intercalation of chitosan into activated bentonite," *Polym. Bull.*, vol. 66, no. 6, pp. 721–734, 2011, doi: 10.1007/s00289-010-0301-2.
- [32] V. Aprile, Carmela; Carbonell Llopis, Esther; Corma Canos, Avelino; García Gómez, Hermenegildo y Pastor Rubio, "Composición que comprende un compuesto fotoactivo y un co iniciador y su uso como fotoiniciador.," *Of. ESPAÑOLA Pat. Y MARCAS*, 2008.
- [33] J. H. Ward and N. A. Peppas, "Preparation of controlled release systems by free-radical UV polymerizations in the presence of a drug," *J. Control. Release*, vol. 71, no. 2, pp. 183–192, 2001, doi: 10.1016/S0168-3659(01)00213-9.
- [34] W. Tomal and J. Ortyl, "Water-soluble photoinitiators in biomedical applications," *Polymers (Basel)*, vol. 12, no. 5, 2020, doi: 10.3390/POLYM12051073.
- [35] C. G. Williams, A. N. Malik, T. Kyun, P. N. Manson, and J. H. Elisseeff, "Variable cytocompatibility of six cell lines with photoinitiators used for polymerizing hydrogels and cell encapsulation," vol. 26, pp. 1211–1218, 2005, doi: 10.1016/j.biomaterials.2004.04.024.
- [36] H. Holback, Y. Yeo, and K. Park, *Hydrogel swelling behavior and its biomedical applications*. Woodhead Publishing Limited.
- [37] S. Durmaz and O. Okay, "Acrylamide/2-acrylamido-2-methylpropane sulfonic acid sodium salt-based hydrogels: Synthesis and characterization," *Polymer (Guildf)*, vol. 41, no. 10, pp. 3693–3704, 2000, doi: 10.1016/S0032-3861(99)00558-3.
- [38] G. Muñoz and Z. Fabio, "Síntesis De Hidrogeles a Partir De Acrilamida Y Ácido Alilmalónico," *Rev. Acad. Colomb. Cienc*, vol. XXXIII, pp. 539–548.
- [39] R. H. Pelton and P. Chibante, "Preparation of aqueous latices with N-isopropylacrylamide," *Colloids and Surfaces*, vol. 20, no. 3, pp. 247–256,

1986, doi: 10.1016/0166-6622(86)80274-8.

- [40] B. Acosta, "Preparación de Phosphate Buffered Saline (PBS) Procedimiento : Tabla de preparación : Notas : Referencias ;," *Fac. Med. UASLP*, pp. 9–10, 2008, [Online]. Available: http://www.genomica.uaslp.mx/Protocolos/Cell_Buffer_PBS.pdf.
- [41] Laboratorios Normon, "Gentamicina Normon 80mg/80ml Solución para perfusión EFG," http://www.aemps.gob.es/cima/pdfs/es/p/62203/P_62203.pdf, 2007.
- [42] H. Li, J. He, Y. Zhao, G. Wang, and Q. Wei, "The Effect of Carbon Nanotubes added into Bullfrog Collagen Hydrogel on Gentamicin Sulphate Release: In Vitro," *J. Inorg. Organomet. Polym. Mater.*, vol. 21, no. 4, pp. 890–892, 2011, doi: 10.1007/s10904-011-9522-6.
- [43] B. Dietzek, D. Cialla, M. Schmitt, and J. Popp, "Introduction to the fundamentals of Raman spectroscopy," *Springer Ser. Opt. Sci.*, vol. 158, pp. 21–42, 2010, doi: 10.1007/978-3-642-12522-5_2.
- [44] R. R. Jones, D. C. Hooper, L. Zhang, D. Wolverson, and V. K. Valev, "Raman Techniques: Fundamentals and Frontiers," *Nanoscale Res. Lett.*, vol. 14, no. 1, 2019, doi: 10.1186/s11671-019-3039-2.
- [45] P. J. Larkin, *Instrumentation and sampling methods*. 2018.
- [46] L. Barbeş, C. Rădulescu, and C. Stihl, "ATR-FTIR spectrometry characterisation of polymeric materials," *Rom. Reports Phys.*, vol. 66, no. 3, pp. 765–777, 2014.
- [47] J. P. N. A. Díaz, J. A. Bárcena, E. Fernández Reyes, A. Galvá, J. Jorrín and I. T. F. T. Meléndez-Vald e, "Espectrofometr a: Espectros de absorción y cuantificaci n colorim trica de biomoléculas," *SAE Tech. Pap.*, pp. 1–8, 1984, doi: 10.4271/841496.
- [48] M. Ipohorski and P. B. Bozzano, "Microscopía electrónica de barrido en la caracterización de materiales," *Cienc. Invest.*, vol. 63, no. 3, pp. 43–53, 2013.
- [49] Patrick Echlin, *Handbook of Sample Preparation for Scanning Electron Microscopy and X-Ray Microanalysis*, Cambridge. 2009.
- [50] M. Rozmus, M. Blicharski, and S. Dymek, "Scanning and transmission electron microscopy microstructure characterization of mechanically alloyed Nb-Ti-Al alloys," *J. Microsc.*, vol. 224, no. 1, pp. 58–61, 2006, doi: 10.1111/j.1365-2818.2006.01663.x.
- [51] J. R. White and E. L. Thomas, "Advances in Sem of Polymers.," *Rubber Chemistry and Technology*, vol. 57, no. 3. pp. 457–506, 1984, doi: 10.5254/1.3536017.
- [52] R. H. M. Simón González Rold n and J. P. García, "Dise o mec nico de un equipo para medida de la viscosidad en fluidos no newtonianos."

- [53] F. A. A. G. Linamaría ESCOBAR M., Augusto RIVERA, "COMPARISON OF RESAZURIN AND MTT METHODS ON STUDIES OF CITOTOXICITY IN HUMAN TUMOR CELL LINES," *Rev. LA Fac. QUÍMICA Farm.*, vol. 17, pp. 67–74, 2010.
- [54] M. Jaśkiewicz, A. Janczura, J. Nowicka, and W. Kamysz, "Methods used for the eradication of staphylococcal biofilms," *Antibiotics*, vol. 8, no. 4, 2019, doi: 10.3390/antibiotics8040174.
- [55] F. Yang, V. Tadepalli, and B. J. Wiley, "3D Printing of a Double Network Hydrogel with a Compression Strength and Elastic Modulus Greater than those of Cartilage," *ACS Biomater. Sci. Eng.*, vol. 3, no. 5, pp. 863–869, 2017, doi: 10.1021/acsbiomaterials.7b00094.
- [56] M. Allegri *et al.*, "Toxicity determinants of multi-walled carbon nanotubes: The relationship between functionalization and agglomeration," *Toxicol. Reports*, vol. 3, pp. 230–243, 2016, doi: 10.1016/j.toxrep.2016.01.011.
- [57] L. Di Cristo *et al.*, "Comparative in vitro cytotoxicity of realistic doses of benchmark multi-walled carbon nanotubes towards macrophages and airway epithelial cells," *Nanomaterials*, vol. 9, no. 7, 2019, doi: 10.3390/nano9070982.
- [58] K. Iuchi *et al.*, "Different morphologies of human embryonic kidney 293T cells in various types of culture dishes," *Cytotechnology*, vol. 72, no. 1, pp. 131–140, 2020, doi: 10.1007/s10616-019-00363-w.
- [59] E. DePoy and L. N. Gitlin, "Statistical Analysis for Experimental-Type Designs," *Introd. to Res.*, pp. 282–310, 2016, doi: 10.1016/b978-0-323-26171-5.00020-3.
- [60] P. A. Chapdelaine and S. A. Maxwell, "Analysis of data.," *J. Fam. Pract.*, vol. 36, no. 3, pp. 325–359, 1993, doi: 10.5005/jp/books/11588_6.
- [61] V. B. Silvente and R. Hurtado, "Clasificación de pruebas no paramétricas. Cómo aplicarlas en SPSS.," *REIRE Rev. d'Innovació i Recer. en Educ.*, vol. 5, no. 2, pp. 101–113, 2012, doi: 10.1344/reire2012.5.2528.
- [62] Y. Liu, J. Tang, X. Chen, and J. H. Xin, "Decoration of carbon nanotubes with chitosan," *Carbon N. Y.*, vol. 43, no. 15, pp. 3178–3180, 2005, doi: 10.1016/j.carbon.2005.06.020.
- [63] A. Aryaei, A. H. Jayatissa, and A. C. Jayasuriya, "Mechanical and biological properties of chitosan / carbon nanotube nanocomposite films," pp. 2704–2712, 2013, doi: 10.1002/jbm.a.34942.
- [64] J. Hou, W. Du, F. Meng, C. Zhao, and X. Du, "Effective dispersion of multi-walled carbon nanotubes in aqueous solution using an ionic-gemini dispersant," *J. Colloid Interface Sci.*, vol. 512, pp. 750–757, 2018, doi: 10.1016/j.jcis.2017.10.109.
- [65] T. Kavinkumar and S. Manivannan, "Synthesis, Characterization and Gas

Sensing Properties of Graphene Oxide-Multiwalled Carbon Nanotube Composite,” *J. Mater. Sci. Technol.*, vol. 32, no. 7, pp. 626–632, 2016, doi: 10.1016/j.jmst.2016.03.017.

- [66] Q. Zhang *et al.*, “Fabrication of an electrochemical platform based on the self-assembly of graphene oxide-multiwall carbon nanotube nanocomposite and horseradish peroxidase: Direct electrochemistry and electrocatalysis,” *Nanotechnology*, vol. 22, no. 49, 2011, doi: 10.1088/0957-4484/22/49/494010.
- [67] J. M. Urreaga and M. U. de la Orden, “Chemical interactions and yellowing in chitosan-treated cellulose,” *Eur. Polym. J.*, vol. 42, no. 10, pp. 2606–2616, 2006, doi: 10.1016/j.eurpolymj.2006.05.002.
- [68] H. Xu, Y. Wang, L. Wang, Y. Song, J. Luo, and X. Cai, “A label-free microelectrode array based on one-step synthesis of chitosan-multi-walled carbon nanotube-thionine for ultrasensitive detection of carcinoembryonic antigen,” *Nanomaterials*, vol. 6, no. 7, 2016, doi: 10.3390/nano6070132.
- [69] S. F. A. Shattar, N. A. Zakaria, and K. Y. Foo, “One step acid activation of bentonite derived adsorbent for the effective remediation of the new generation of industrial pesticides,” *Sci. Rep.*, vol. 10, no. 1, pp. 1–13, 2020, doi: 10.1038/s41598-020-76723-w.
- [70] N. Venkatathri, “Characterization and catalytic properties of a naturally occurring clay , Bentonite,” *Bull. Catal. Soc. India*, vol. 5, no. April, pp. 61–72, 2006.
- [71] T. Altun, “PREPARATION AND APPLICATION OF GLUTARALDEHYDE CROSS-LINKED CHITOSAN COATED BENTONITE CLAY CAPSULES: CHROMIUM(VI) REMOVAL FROM AQUEOUS SOLUTION,” *Rev. Chil Chem Soc*, vol. 65, no. 2, pp. 1–8, 2020.
- [72] A. Guzmán, “Análisis de los espectros de infrarrojo,” *Man. Lab. análisis instrumental*, pp. 54–56, 2009.
- [73] X. Dong, L. Liu, D. Zhu, H. Zhang, and X. Leng, “Transactivator of transcription (TAT) peptide– chitosan functionalized multiwalled carbon nanotubes as a potential drug delivery vehicle for cancer therapy,” *Int. J. Nanomedicine*, vol. 10, pp. 3829–3841, 2015, doi: 10.2147/IJN.S81762.
- [74] R. Jallapuram, I. Naydenova, H. J. Byrne, S. Martin, R. Howard, and V. Toal, “Raman spectroscopy for the characterization of the polymerization rate in an acrylamide-based photopolymer,” *Appl. Opt.*, vol. 47, no. 2, pp. 206–212, 2008, doi: 10.1364/AO.47.000206.
- [75] B. J. Saikia, G. Parthasarathy, R. R. Borah, and R. Borthakur, “Raman and FTIR Spectroscopic Evaluation of Clay Minerals and Estimation of Metal Contaminations in Natural Deposition of Surface Sediments from Brahmaputra River,” *Int. J. Geosci.*, vol. 07, no. 07, pp. 873–883, 2016, doi: 10.4236/ijg.2016.77064.

- [76] A. Y. Liu, H. Lv, Y. Qin, L. Deng, and Y. Wang, "Gentamicin modified chitosan film with improved antibacterial property and cell biocompatibility," *Int. J. Biol. Macromol.*, 2017, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2017.01.121.
- [77] A. Sionkowska, B. Kaczmarek, and R. Gadzala-Kopciuch, "Gentamicin release from chitosan and collagen composites," *J. Drug Deliv. Sci. Technol.*, vol. 35, no. October 2017, pp. 353–359, 2016, doi: 10.1016/j.jddst.2016.09.001.
- [78] N. Mohammad, Y. Atassi, and M. Tally, "Synthesis and swelling behavior of metal-chelating superabsorbent hydrogels based on sodium alginate-g-poly(AMPS-co-AA-co-AM) obtained under microwave irradiation," *Polym. Bull.*, vol. 74, no. 11, pp. 4453–4481, 2017, doi: 10.1007/s00289-017-1967-5.
- [79] K. Atkovska, B. Bliznakovska, G. Ruseska, S. Bogoevski, B. Boskovski, and A. Grozdanov, "Adsorption of Fe(II) and Zn(II) ions from landfill leachate by natural bentonite," *J. Chem. Technol. Metall.*, vol. 51, no. 2, pp. 215–222, 2016.
- [80] T. Yu, C. Qu, D. Fan, and R. Xu, "Effects of Bentonite Activation Methods on Chitosan Loading Capacity," vol. 13, no. 1, pp. 14–23, 2018, doi: 10.9767/bcrec.13.1.1040.14-23.
- [81] J. Vartiainen, M. Tuominen, and K. Na, "Bio-Hybrid Nanocomposite Coatings from Sonicated Chitosan and Nanoclay," 2010, doi: 10.1002/app.
- [82] M. Zhou, J. Zhao, W. Pu, X. Wang, and Y. Yang, "Synthesis and characterization of salt resistance hydrogel microspheres by inverse suspension polymerization," no. February 2016, 2012, doi: 10.1515/epoly.2012.12.1.973.
- [83] K. P. Boroujeni and F. Asadi, "Carbon nanotubes grafted with sulfonated polyacrylamide as a heterogeneous catalyst for the preparation of bis (indolyl) methanes," 2019.
- [84] S. A. Zauro, "Amphoteric gellan gum-based terpolymer – montmorillonite composite: synthesis , swelling , and dye adsorption studies," *Int. J. Ind. Chem.*, vol. 8, no. 3, pp. 345–362, 2017, doi: 10.1007/s40090-017-0126-z.