



UNIVERSIDAD  
DE ANTIOQUIA  
1803

# Memorias II Congreso Nacional de Biomateriales 2021

ISSN 2954-7210 (En línea)



GITTC

**BioMat**  
Grupo de investigación en Biomateriales

68 p.

ISSN:

Universidad de Antioquia – Año 1, 2021

Publicación bianual editada por el Grupo de Investigación en Biomateriales - Programa de Bioingeniería – Universidad de Antioquia y el Grupo de Ingeniería de Tejidos y Terapias Celulares – Facultad de Medicina – Universidad de Antioquia

### **Comité científico**

**Ana María Torres López** – Universidad de Antioquia

**Claudia Patricia García García** – Universidad de Antioquia

**Claudia Patricia Ossa Orozco** – Universidad de Antioquia

**Dario Yesid Peña Ballesteros** – Universidad Industrial de Santander

**Diana Marcela Escobar Sierra** – Universidad de Antioquia

**Francisco José Campuzano Cardona** – Universidad de Antioquia

**Jazmín González Ocampo** – Universidad de Antioquia

**Laura Sofía Osorio Vélez** – Universidad de Antioquia

**Liliana María Arroyave Muñoz** – Universidad de Antioquia

**Luz Marina Restrepo Múnera** – Universidad de Antioquia

**María Esperanza López Gómez** – Universidad de Antioquia

**Marta Elena Londoño López** - Universidad EIA

**Mateo Escobar Jaramillo** – Universidad de Antioquia

**Miguel Bernal Restrepo** – Verasonics Colombia

**Sergio Estrada Mira** – Universidad de Antioquia

Nota legal: Los resúmenes que hacen parte de esta publicación son autoría de los conferencistas del II Congreso Nacional de Biomateriales – 2021.

2021© (copyright), Medellín, Colombia



## TABLA DE CONTENIDO

PRESENTACIÓN.....	4
PROPIEDADES MECÁNICAS DEL PVA UTILIZANDO ELASTOGRAFÍA DE ONDA DE CIZALLA .....	5
EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTITROMBOGENICA DE PELICULAS DE FIBROÍNA/PVA PARA SU POTENCIAL USO EN APLICACIONES CARDIOVASCULARES .....	8
OPTIMIZACIÓN POR METODOLOGÍA DE SUPERFICIE DE RESPUESTA DE LAS CONDICIONES DE BLANQUEAMIENTO DE CASCARILLA DE COFFEA ARABICA VARIEDAD CASTILLO®.....	13
PROCESOS DE EXTRACCIÓN APLICADOS A LA OBTENCIÓN DE POLIHIDROXIALCANOHATOS - PHAs .....	17
DEVELOPMENT OF A DRUG DELIVERY SYSTEM FOR CURMUMIN USING BACTERIAL NANOCELLULOSE FOR THE CHEMOPREVENTION OF STOMACH CANCER.....	21
INMOVILIZACIÓN DE NANOPARTÍCULAS DE PLATA SOBRE POLIVINILCLORURO PARA FABRICACIÓN DE DISPOSITIVOS MÉDICOS .....	27
MATERIAL COMPUESTO DE SILICONA CON NANOPARTÍCULAS DE PLATA PARA SU USO EN LA FABRICACIÓN DE DISPOSITIVOS MÉDICOS RESPIRATORIOS.....	33
MODIFICACIÓN BIOMIMÉTICA DE SOPORTES MICROPOROSOS DE NANOCELULOSA BACTERIANA PARA REGENERACIÓN ÓSEA .....	38
BIOCOMPATIBILIDAD DE UN CONSTRUCTO TRIDIMENSIONAL DE PLA, PARA SU USO EN INGENIERÍA DE TEJIDOS .....	44
NANOPARTÍCULAS DE MAGNETITA PARA LA PURIFICACIÓN DE UNA PROTEÍNA RECOMBINANTE .....	49
SÍNTESIS DE NANOPARTÍCULAS DE PERÓXIDO DE ZINC POR MÉTODO ASISTIDO CON ULTRASONIDO PARA LA INTERACCIÓN CON UNA PROTEÍNA RECOMBINANTE .....	54
USO DE LISADOS TUMORALES EN LA SÍNTESIS DE NANOPARTÍCULAS DE ORO Y SU POSIBLE APLICACIÓN TERAPÉUTICA EN CÁNCER.....	58
FABRICACIÓN DE NANOPARTÍCULAS DE FIBROÍNA PARA SU POTENCIAL USO EN TRANSPORTE DE MEDICAMENTOS .....	64

## PRESENTACIÓN

Los biomateriales son un campo científico multidisciplinario, en el cual se aplican los principios de la ingeniería y de las ciencias de la vida con el objetivo de desarrollar sustitutos para restaurar, mantener o mejorar el funcionamiento de un tejido. En Colombia los biomateriales están teniendo especial atención ya que es un campo de suma importancia en el medio científico y de la salud, por tanto, es relevante divulgar a la comunidad científica los diversos avances que se están llevando a cabo localmente, para así generar más ciencia y posibles alianzas estratégicas empresa-universidad.

Es así como en estas memorias se han recogido 13 trabajos de diversas partes del país y de América Latina, los cuales corresponden a algunos de los presentados en el II Congreso Nacional de Biomateriales. El evento fue organizado por el Grupo de Investigación en Biomateriales del Programa de Bioingeniería de la Facultad de Ingeniería y el Grupo de Investigación en Terapia Celular y Medicina Regenerativa de la Facultad de Medicina, con apoyo de los estudiantes de posgrado del Grupo de Investigación en Biomateriales. En este se contó también con un comité científico conformado por profesores de diferentes instituciones: Universidad de Antioquia, Universidad Nacional sede Medellín, Universidad Industrial de Santander y la Universidad EIA.

Se espera que estos trabajos brinden la oportunidad de aprender sobre los biomateriales y que sea un espacio para visibilizar los desarrollos realizados a la fecha por los investigadores del área en el país y América Latina.

# PROPIEDADES MECÁNICAS DEL PVA UTILIZANDO ELASTOGRAFÍA DE ONDA DE CIZALLA

L. Arroyave Muñoz<sup>1</sup>, S Estrada Mira<sup>2</sup>, L M Restrepo Munera<sup>3</sup>, CP Ossa Orozco<sup>4</sup>, M Bernal Restrepo<sup>5</sup>

<sup>1</sup> MSc Estudiante de Doctorado en Ingeniería de Materiales, Facultad de Ingeniería, Grupo de Investigación en Biomateriales Universidad de Antioquia. [liliana.arroyave@udea.edu.co](mailto:liliana.arroyave@udea.edu.co), Medellín, Colombia.

<sup>2</sup> PhD. Profesor Facultad de Medicina, Grupo de investigación en terapia celular y medicina regenerativa Universidad de Antioquia. [sergio.estrada@udea.edu.co](mailto:sergio.estrada@udea.edu.co), Medellín, Colombia.

<sup>3</sup> PhD. Profesora Facultad de Medicina, Grupo de investigación en terapia celular y medicina regenerativa Universidad de Antioquia. [gruopoingenieriadetajidos@udea.edu.co](mailto:gruopoingenieriadetajidos@udea.edu.co), Medellín, Colombia.

<sup>4</sup> PhD. Profesora Facultad de Ingeniería, Grupo de Investigación en Biomateriales Universidad de Antioquia. [claudia.ossa@udea.edu.co](mailto:claudia.ossa@udea.edu.co), Medellín, Colombia.

<sup>5</sup> PhD. Verasonics, [miguelbernalrpo@gmail.com](mailto:miguelbernalrpo@gmail.com), Medellín, Colombia.

## Introducción

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), las Enfermedades Cardiovasculares (ECV) constituyen la principal causa de muerte en el mundo (World Health Organization, 2020). Las personas que sufren una ECV de manera crónica, suelen requerir implantes vasculares para tratar su enfermedad. Los implantes autólogos son los más utilizados debido a que conservan más eficientemente la permeabilidad del vaso (Athanasios, 2011. Masden, 2012) pero son escasos y suelen tener mala calidad (Gutowski, 2020). En respuesta, se puede emplear implantes vasculares sintéticos para tratar las ECV, el polivinil alcohol (PVA) por ejemplo, es un polímero sintético investigado como un material prometedor en el reemplazo de implantes vasculares debido a sus propiedades mecánicas (Baker, 2012).

Sin embargo, tras experimentaciones previas se comprobó que el hidrogel de PVA no permite la adhesión celular en su superficie, por lo que se hace necesario implementar un proceso de funcionalización que modifique las características superficiales de este hidrogel. Es así como en este trabajo se utilizaron tres macromoléculas (colágeno hidrolizado, gelatina comercial y fibroína de seda) con el objetivo de mejorar la interfaz entre el hidrogel y las células. En el presente artículo se exponen los resultados del comportamiento mecánico de dichos hidrogeles empleando la técnica de elastografía de onda de cizalla.

## Materiales y métodos

### Fabricación de los hidrogeles de PVA

Se fabricaron hidrogeles de PVA con forma tubular y en bloque, disolviendo 9 % p/v de PVA (89-98 KDa) en agua destilada a  $86 \pm 2$  °C por 20 min seguido de un periodo a  $50 \pm 2$  °C por 1 h.

Para agregar las macromoléculas a la solución se realizó el siguiente procedimiento: para los hidrogeles de PVA con gelatina o colágeno, se agregó 1 % de una de estas macromoléculas en la solución de PVA a temperatura ambiente y se agitó por 1 h. Luego se agregaron agentes entrecruzantes y cada solución se agitó por 15 minutos más, los entrecruzantes fueron glutaraldehído o ácido clorhídrico para la gelatina y glutaraldehído o ácido acético para el colágeno.

Para los hidrogeles con fibroína, se utilizó una solución de fibroína al 2 % p/v y se mezcló 1:1 con una solución de PVA al 18 % p/v y se agitó por 1 h. Luego se agregó glicerol como agente estabilizador y se agitó por 15 min.

Como controles, se fabricaron hidrogeles de PVA con cada macromolécula sin entrecruzantes o estabilizadores, además de un hidrogel de PVA al 10 % p/v.

Finalmente se añadió 1 % de celulosa microcristalina a todas las soluciones para mejorar la transmisión de la onda de cizalla y por consiguiente, la adquisición de datos.

Las soluciones se depositaron en moldes cilíndricos (diámetro interno: 9,52 mm, espesor: 1,44 mm y longitud: 90 mm) o rectangulares (70 x 50 x 50 mm) y se sometieron a 7 ciclos de congelación.

### Adquisición de datos

Para medir las propiedades mecánicas de los hidrogeles de PVA, se utilizó un método novedoso basado en ultrasonido. Se implementó la técnica de elastografía de ondas de cizalla en un equipo Vantage 256 system y un transductor L7-4 de 128 elementos. La onda de cizalla fue generada con una ráfaga de tono de 192  $\mu$ s centrada en el elemento 26. Se utilizó una adquisición ultrarrápida que consistió en 50 imágenes con combinación de tres ángulos para rastrear la propagación de la onda a una velocidad de cuadro de 3,3 kHz.

### Procesamiento de datos

Para determinar la velocidad del grupo de ondas adquiridas, se implementó un algoritmo time-to-peak. El módulo de Young (E) se calculó según la ecuación 1, donde c es la velocidad de la onda de cizalla y  $\rho$  la densidad del hidrogel. Cada muestra se evaluó tres veces en diferentes puntos y los resultados se presentan con la desviación estándar de estos. Para los tubos, solo es posible reportar el valor de velocidad de las ondas de cizalla ya que experimenta un fenómeno de dispersión geométrica debido al espesor del tubo.

$$E = 3c^2\rho \quad [1]$$

### Diseño experimental

Se fabricó una muestra por cada tratamiento, tanto para los bloques como para los tubos de PVA. La adquisición de datos se realizó en tres puntos diferentes de las muestras y se determinó la desviación estándar de los resultados, la cual

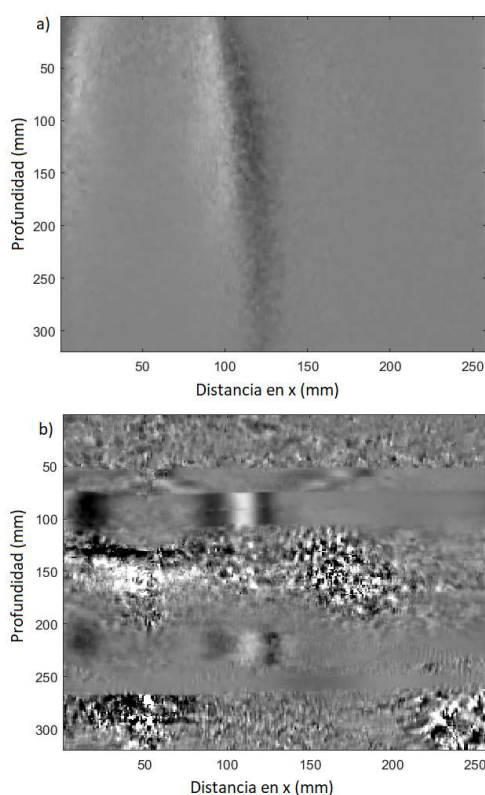
está representada en las barras de error de las Figuras 2, 3 y 4.

## Resultados y discusión

### Propagación de la onda de cizalla

La Figura 1. muestra la imagen ecográfica obtenida para un bloque de PVA-celulosa (izquierda) y un tubo de PVA-celulosa (derecha), correspondientes a las imágenes 3 y 9 de 50 respectivamente de la adquisición de los datos, donde se puede observar la onda en tonos de grises claros.

Para seleccionar los datos a procesar, se definen unos límites donde la onda sea homogénea e ininterrumpida, estos límites son propios de cada adquisición, para el caso de la Figura 1 se eligieron 100 a 250 mm de profundidad para los bloques y 75 a 105 mm para los tubos.



**Figura 1.** Imágenes ecográficas de a) un bloque y b) un tubo del hidrogel PVA-celulosa.

Finalmente se determinó la velocidad de las ondas de cizalla calculando el tiempo transcurrido entre las imágenes y el desplazamiento de la onda entre las mismas.

En estudios previos no presentados en el presente artículo, se realizaron los mismos tratamientos sin la incorporación de celulosa, los resultados obtenidos de velocidad y módulo de Young sin esta molécula no difieren de los resultados presentados en este trabajo, sin embargo, en el procesamiento de los datos, las ondas de cizalla se desplazaron más homogéneamente en presencia de la celulosa, facilitando el procesamiento de los datos. Esto parece indicar que las moléculas de celulosa se alojan en los espacios pobres de polímero dentro de la estructura del hidrogel, permitiendo una

superficie más homogénea para el desplazamiento de la onda de cizalla sin interferir en la velocidad de esta.

### Velocidad de grupo de ondas de cizalla para bloques y tubos

La rigidez del hidrogel determina la velocidad en que las ondas de cizalla pueden atravesarlo, así, si se conoce esta velocidad es posible calcular el módulo de Young del material.

En la Figura 2. se evidencia que los agentes entrecruzantes y el estabilizador no incrementan la rigidez del hidrogel, de hecho, en la mayoría de los casos estos agentes disminuyen esta característica, por lo tanto, no contribuyen a las propiedades mecánicas del hidrogel y pueden ser descartados.

Este comportamiento puede responder a que los agentes entrecruzantes no están realizando esta función, de hecho, según la literatura, algunas de estas macromoléculas pueden disminuir las propiedades mecánicas y esto es observado en algunos de los resultados presentados. El agente entrecruzante que más tiende a incrementar la resistencia mecánica en comparación con los demás agentes es el glutaraldehído y esto puede deberse a que este también tiene la capacidad de entrecruzar las cadenas poliméricas del PVA.

Las macromoléculas de fibroína y gelatina incrementan la rigidez del hidrogel. La fibroína es una proteína con una alta afinidad por formar fibras, así que su efecto en las propiedades mecánicas es esperado. En el caso de la gelatina, según la literatura, esta incrementa el componente disipativo del hidrogel disminuyendo su rigidez (Marella, 2018) sin embargo, en los resultados de este trabajo no se observa esto, la gelatina parece no modificar de manera significativa la rigidez del hidrogel, esto puede deberse a que la gelatina no se disolvió apropiadamente en la solución de PVA, ya que se observó un cambio de coloración a lo largo del bloque de PVA, lo cual puede indicar que las moléculas de gelatina se precipitaron durante el primer ciclo de congelación.

El comportamiento mecánico de los bloques y los tubos difiere entre sí, como se puede observar en las Figuras 2 y 3. Esta diferencia se debe a que la propagación de las ondas en los tubos sufre una dispersión geométrica debido al espesor de los cilindros, ya que el modelo utilizado asume que el medio de propagación de la onda es infinito. Para solucionar este problema se debe trabajar con un modelo alternativo como el modelo de onda Lamb, que se encuentra actualmente en estudio.

### Módulo de Young de los bloques

En la Figura 4, se observa claramente el efecto de las macromoléculas en el módulo de Young de los hidrogeles, donde la fibroína exhibe el módulo elástico más alto, cercano a 90 kPa, seguido de la gelatina. Estos valores son adecuados para la aplicación del hidrogel como implante vascular, ya que el módulo de Young de los vasos nativos oscila entre 100 y 600 kPa.

En el caso de las macromoléculas de colágeno y gelatina, se espera que exista una disminución en la rigidez del material, ya que estas macromoléculas incrementan la disipación de energía dentro de la estructura del hidrogel, si bien, esta disminución no es clara en todos los casos, es apreciable que existe esta tendencia. Caso contrario ocurre con la fibroína, donde se aprecia un incremento de la rigidez del material que

concuera con la tendencia de esta a formar fibras y por tanto a ofrecer una estructura entrecruzada que incrementa la resistencia mecánica del material.

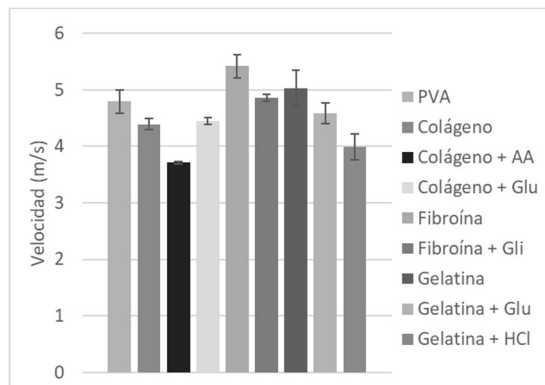


Figura 2. Gráfico de velocidad de ondas de cizalla en bloques de PVA con las macromoléculas, agentes entrecruzantes y agente estabilizador

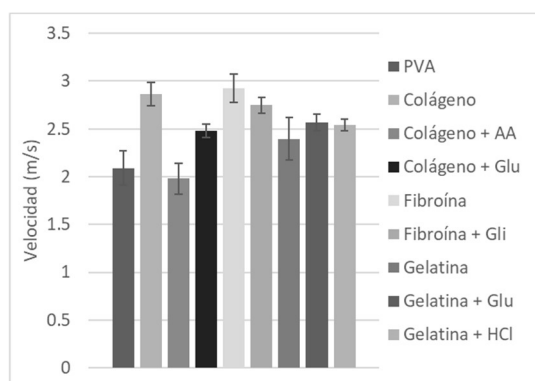


Figura 3. Gráfico de velocidad de ondas de cizalla en tubos de PVA con las macromoléculas, agentes entrecruzantes y agente estabilizador.

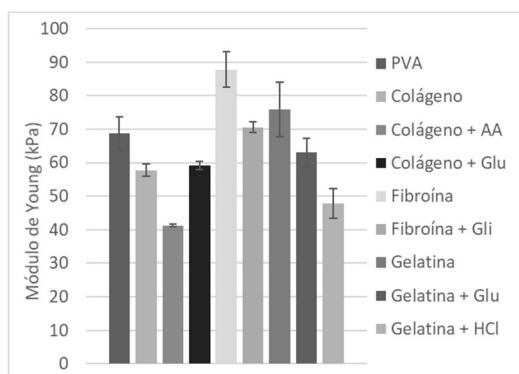


Figura 4. Módulo de Young en los bloques de PVA.

## Conclusiones

Se demostró que las macromoléculas utilizadas permiten la modulación de las propiedades mecánicas de los hidrogeles

de PVA, además el uso de entrecruzantes o estabilizantes no son necesarios para aumentar la rigidez del hidrogel.

Se evidenció que la velocidad de propagación de las ondas en los tubos fue más menor que en los bloques debido a la dispersión geométrica reportada en la literatura.

También se comprobó que la elastografía de onda de cizalla es un método no destructivo que permite estudiar el efecto mecánico de la inclusión de las macromoléculas en los hidrogeles de PVA.

## Agradecimientos

Los autores agradecen a Minciencias por la financiación del proyecto.

## Referencias

Athanasiou, T. et al., (2011) "Radial artery versus saphenous vein conduits for coronary artery bypass surgery: Forty years of competition - which conduit offers better patency? A systematic review and meta-analysis," *Eur. J. Cardio-thoracic Surg.*, Vol. 40, No. 1, pp. 208–220.

Baker, M. I., Walsh, S. P., Schwartz, Z. y Boyan, B. D. (2012) "A review of polyvinyl alcohol and its uses in cartilage and orthopedic applications," *J. Biomed. Mater. Res. - Part B Appl. Biomater.*, Vol. 100 B, No. 5, pp. 1451–1457.

Gutowski, P. et al. (2020) "Arterial reconstruction with human bioengineered acellular blood vessels in patients with peripheral arterial disease," *Journal of Vascular Surgery*, Vol. 72, No. 4, pp. 1247-1258

Marella, A. et al. (2018). "3D Porous Gelatin/PVA Hydrogel as Meniscus Substitute Using Alginate Micro-Particles as Porogens," *Polymers*, Vol. 10, No. 380, pp. 1-16.

Masden, D. L., Seruya, M. y Higgins, J. P. (2012) "A systematic review of the outcomes of distal upper extremity bypass surgery with arterial and venous conduits," *J. Hand Surg. Am.*, Vol. 37, No. 11, pp. 2362–2367.

World Health Organization. (2020) "The top 10 causes of death". Disponible en la URL: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death>

# EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTITROMBOGENICA DE PELICULAS DE FIBROÍNA/PVA PARA SU POTENCIAL USO EN APLICACIONES CARDIOVASCULARES

CA Murillo Usuga<sup>1</sup>, D M Escobar Sierra<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Químico. Estudiante de maestría, Grupo de Investigación en Biomateriales, Facultad de Ingeniería, Universidad de Antioquia. carlos.murillo@udea.edu.co. Medellín, Colombia

<sup>2</sup>PhD, Profesora, Grupo de Investigación en Biomateriales, Facultad de Ingeniería, Universidad de Antioquia. marcela.escobar@udea.edu.co. Medellín, Colombia

## Introducción

Las enfermedades cardiovasculares son la principal causa de muerte en el mundo de acuerdo a las estadísticas presentadas por Organización Mundial de la Salud (WHO, 2016), sumando estas causas de muerte aproximadamente un 20% en Colombia (DANE, 2019), y siendo la trombosis la principal patología presentada entre dichas enfermedades (Raskob *et al.*, 2014).

Dependiendo del tipo de patología, los tratamientos aplicados en los pacientes que presentan obstrucciones de conductos vasculares pueden incluir dosis periódicas de algún anticoagulante como heparina o Warfarina, sin embargo, en el caso de que la obstrucción sea crónica, el paciente necesitará un reemplazo del conducto vascular afectado, para lo cual, los tratamientos actuales permiten implantar un injerto autólogo o un injerto artificial, siendo las alternativas más comunes para estos últimos el uso de polímeros biocompatibles como politetrafluoroetileno expandido (ePTFE) (Zhang *et al.*, 2017), polietilentereftalato (PET) (Pezzoli *et al.*, 2017), polivinil-alcohol (PVA) (Atlan *et al.*, 2018), ácido poliláctico (Li *et al.*, 2017) y poliuretanos de diferentes naturalezas (Zia *et al.*, 2016), además de biopolímeros como la fibroína (Wang, Liu and Fan, 2017), una proteína que permite la inmovilización de heparina a través de sus grupos amino terminales, y con la cual se pueden fabricar injertos vasculares que permitan el crecimiento de células endoteliales (Fazley Elahi, Guan and Wang, 2014).

El PVA es un polímero biocompatible ampliamente utilizado en la fabricación de biomateriales como membranas electrohiladas (Truong *et al.*, 2017), liberadores de fármacos (Wang *et al.*, 2010) o dispositivos para aplicaciones cardiovasculares (Atlan *et al.*, 2018; Rizwan *et al.*, 2020).

Por su parte, la fibroína es una proteína que se puede extraer del capullo del gusano de seda *Bombyx mori*, y que se caracteriza por la repetición de la secuencia de aminoácidos glicina-alanina-glicina-alanina-glicina-serina (Gly-Ala-Gly-Ala-Gly-Ser) en su estructura molecular (Murphy and Kaplan, 2009), teniendo una diversidad amplia de aplicaciones como la fabricación de implantes cardiovasculares (Koh *et al.*, 2015; Enis, Sezgin and Sadikoglu, 2017; Wang, Liu and Fan, 2017; Zhang *et al.*, 2017), construcción de plataformas de crecimiento celular (Gupta *et al.*, 2007; Soffer *et al.*, 2008; Liu *et al.*, 2013; Du *et al.*, 2014; Sagnella *et al.*, 2016; Wang *et al.*, 2017), liberadores de medicamentos (Liu *et al.*, 2009; Yang *et al.*, 2011) y materiales para el contacto con la sangre (Xue and Greisler, 2003; Lovett *et al.*, 2007; Lu *et al.*, 2007), sin embargo, su resistencia mecánica se ve comprometida

cuando se solubiliza en sistemas ternarios del tipo H<sub>2</sub>O:C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH:CaCl<sub>2</sub>, razón por la cual, esta proteína suele ser utilizada en materiales compuestos con diferentes polímeros como poli-éster-uretano (Du *et al.*, 2018), quitosano (Wang *et al.*, 2011) y poli-vinil alcohol (PVA) (Zhou *et al.*, 2013). A pesar de lo anterior, cualquier material que se utilice en la fabricación de injertos vasculares presentará la limitación de producir coágulos sobre su superficie dado que éstos activarán la cascada de coagulación a través de la vía intrínseca por activación de los factores IX, XI y XII (Betts *et al.*, 2017), por lo tanto, evitar dicha problemática es tema de interés en diversos estudios, para lo cual, la fibroína puede servir como molécula de anclaje de un anticoagulante como la heparina dado que la estructura molecular de esta proteína permite la inmovilización de heparina a través de sus grupos amino terminales utilizando la ruta de la carbodiimida (Linhardt, Murugesan and Xie, 2008; Seib *et al.*, 2014).

El objetivo del presente trabajo fue inmovilizar heparina sobre un material a base de fibroína y PVA parcialmente entrecruzado mediante dos técnicas diferentes (por acople de carbodiimida y por aprovechamiento de interacciones electrostáticas), posterior a esto, se evaluó la capacidad antitrombogénica del material utilizando la prueba de recalcificación de sangre.

## Materiales y métodos

### Materiales

Los capullos del gusano de seda *Bombyx Mory* fueron adquiridos en la Corporación Para el Desarrollo de la Sericultura del Cauca (CORSEDA), el poli vinil alcohol (PVA, 130 kDa, 99 % hidrolizado), la solución de glutaraldehído (Glu, 25 % m/v), el alcohol etílico (99% v/v), y el CaCl<sub>2</sub>, fueron adquiridos en SIGMA Aldrich, mientras que el glicerol fue adquirido en Químicos JM.

### Preparación de las soluciones base

La solución de fibroína fue preparada tomando fragmentos de esta proteína en forma de seda, la cual fue previamente extraída de los capullos, los cuales fueron inmersos en una solución ternaria de CaCl<sub>2</sub>:H<sub>2</sub>O:C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH con relación molar 1:2:8 a 60°C y puestos en agitación magnética durante dos horas. Posterior a esto, la solución resultante fue puesta en diálisis contra agua destilada durante cuatro días empleando membranas de acetato de celulosa. Una vez terminado este proceso, se determinó la concentración final de la solución de fibroína por gravimetría.



## II CONGRESO NACIONAL DE BIOMATERIALES

La solución de PVA fue preparada adicionando este polímero lentamente en agua a 80°C durante aproximadamente 2 horas hasta llegar a una concentración del 8% (m/v), luego se dejó la solución a temperatura ambiente.

### Inmovilización de heparina sobre la fibroína

La fibroína solubilizada fue funcionalizada por dos metodologías; por acople de carbodiimida y por aprovechamiento de interacciones electrostáticas.

Para el acople por carbodiimida, se diluyó la heparina (5000 U.I/ml, Blau Farmacéutica Colombia S.A.S) en solución amortiguadora de ácido 2-etanosulfónico (MES) a pH= 6.0, luego, la heparina se activó haciéndola reaccionar con N-hidroxisuccinimida (NHS, peso molecular 115.09g/mol, Sigma-Aldrich) durante 10 minutos, una vez activa la heparina, ésta se hizo reaccionar con hidrocloreto de N-(3-dimetilaminopropil)-N\*-etilcarbodiimida (EDC, peso molecular 190.70g/mol, Sigma-Aldrich) y fibroína en solución a pH= 6.0 durante 6 horas a temperatura ambiente. Una vez finalizada la reacción, la fibroína funcionalizada fue puesta en diálisis contra una solución de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.1 M a pH= 6.0 durante 2 horas para eliminar la heparina que no reaccionó, posteriormente fue puesta 3 veces en diálisis contra una solución de NaCl 2M a pH= 6.0 durante 24 horas para remover el exceso de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, y finalmente, puesta 3 veces en diálisis contra agua destilada durante 24 horas para eliminar el NaCl. Una vez terminados todos los procesos de diálisis, se calculó la concentración final de la fibroína funcionalizada por gravimetría.

Por su parte, la funcionalización de las muestras por aprovechamiento de interacciones electrostáticas se realizó mezclando las soluciones de fibroína y heparina a pH 6.0 durante 6 horas con el fin de mantener las condiciones similares a la funcionalización por acople de carbodiimida, luego de esto, se calculó la concentración de la solución de fibroína por gravimetría.

### Preparación de las muestras

Las muestras a evaluar consistieron en películas delgadas de aproximadamente 1 cm<sup>2</sup>, y para su preparación el procedimiento experimental comenzó poniendo a reaccionar la solución de PVA con glutaraldehído en proporción 100:0.8 en masa (PVA:Glu) durante 10 minutos bajo agitación magnética, posterior a esto, se agregó la solución de fibroína para que la mezcla tuviera una composición en masa de 70/30 (Fibroína/PVA), inmediatamente se agregó el glicerol manteniendo una proporción Fibroína:glicerol de 3:2 (g:g), y se le permitió al sistema evolucionar durante una hora, luego de pasar este tiempo, se tomaron 10 ml de la formulación y se depositaron en moldes antiadherentes y se llevaron a secado en estufa a 30°C durante 96 horas, finalmente, las películas fueron retiradas y almacenadas para los análisis posteriores.

El material funcionalizado se preparó utilizando este mismo procedimiento, pero usando la fibroína funcionalizada con las metodologías descritas anteriormente.

La nomenclatura de las muestras se puede observar en la Tabla 1.

Tabla 1. Nomenclatura de las muestras a evaluar

Muestra	Tipo de funcionalización
Control	Ninguno
AC	Acople de carbodiimida
AIE	Electrostático

### Evaluación del contacto entre el material y coágulos de sangre

Las muestras mencionadas anteriormente se analizaron por la prueba de recalcificación de sangre, para ello, primero se extrajo sangre de tres voluntarios según el protocolo de extracción a través de un catéter venoso [18], y siguiendo los protocolos del comité de ética de la universidad de Antioquia. La sangre fue depositada en tubos especiales con citrato de sodio para desactivar la cascada de coagulación, posterior a esto, en un tubo que contenía un fragmento de aproximadamente 1.0 cm<sup>2</sup> del material a evaluar se depositaron 400 µl de la sangre extraída, luego a este sistema se le agregaron 40 µl de solución de Cloruro de calcio (CaCl<sub>2</sub>) 0.1 M para reactivar la cascada de coagulación en la sangre; finalmente, se realizaron retiros del material evaluado cada 10 minutos durante 60 minutos y se midió la masa total de coágulos adheridos a la superficie haciendo uso de una balanza analítica de precisión.

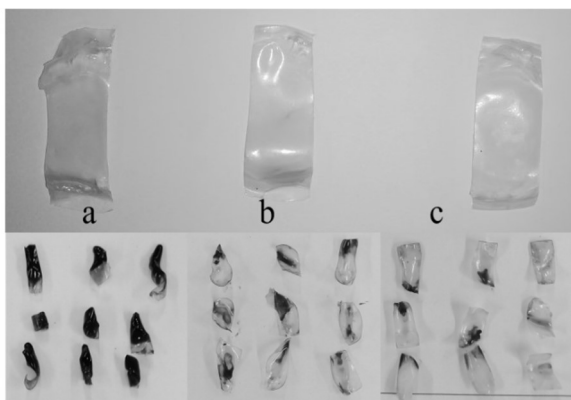
Como tiempo infinito, las muestras se dejaron en contacto con la sangre durante 6 horas y se midió la masa de coágulos adheridos en las muestras luego de este tiempo. Todas las mediciones anteriores se realizaron por triplicado para cada material con la sangre de cada voluntario, teniendo así un total de 9 réplicas por material.

### Resultados y discusión

En la Figura 1 se muestran las fotografías de las muestras evaluadas por la prueba de recalcificación de sangre.

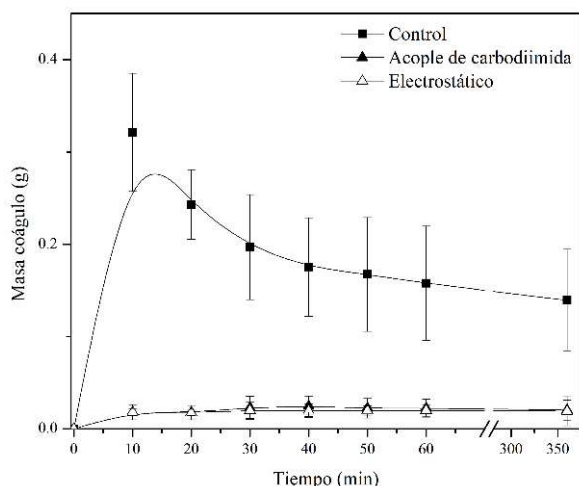
En la parte superior de la Figura 1 se presenta la fotografía de las muestras previo a la prueba de recalcificación de sangre, y en la parte inferior las muestras luego de 6 horas de análisis. En la figura se observan las muestras de control (a), las muestras funcionalizadas por acople de carbodiimida (AC) (b), y funcionalizadas por aprovechamiento de interacciones electrostáticas (AIE) (c).

Se pudo observar que las muestras funcionalizadas por ambos métodos permanecen relativamente libres de coágulos adheridos a su superficie comparadas con la muestra de control, la cual tiene casi toda su superficie cubierta con coágulos, sugiriendo que la inmovilización de heparina en el material logra que éste evite la agregación plaquetaria superficial.



**Figura 1.** Fotografías de las muestras de control (a), funcionalizada por acople de carbodiimida (b) y funcionalizada por aprovechamiento de interacciones electrostáticas (c).

La Figura 2 presenta la curva de cuantificación de coágulos de sangre sobre la superficie de los materiales de control y los materiales funcionalizados por las dos técnicas empleadas.



**Figura 2.** Cuantificación de coágulos de sangre sobre la superficie de las muestras de control, las muestras funcionalizadas por acople de carbodiimida, y funcionalizadas por aprovechamiento de interacciones electrostáticas

En la figura 2 se puede observar que las muestras de control adquieren un máximo de masa de coágulos adheridos de aproximadamente 0.32 g en los primeros 10 minutos de análisis, disminuyendo gradualmente hasta finalmente estabilizarse luego de 6 horas en aproximadamente 0.14 g, lo que se explica debido a que estas muestras de control, al no estar funcionalizadas con heparina, permiten que los coágulos formados por recalcificación se adhieran a su superficie dado que cuando la sangre entra en contacto con dicho material, la respuesta inmunológica activará la cascada de coagulación a través de la vía intrínseca, lo que estimulará la producción de fibrina y formará el coágulo que se adherirá a la superficie del material.

Por otra parte, las muestras funcionalizadas por ambos métodos muestran un comportamiento completamente diferente a cuando no están funcionalizadas, alcanzando un máximo de masa de aproximadamente 0.020g y 0.019 g para la muestra AC y AIE respectivamente, destacando que estos valores permanecieron prácticamente iguales durante todo el tiempo de análisis, lo que se da ya que, al momento de tener

contacto la sangre y el material funcionalizado, la heparina disponible en la superficie formará un complejo con la antitrombina III (ATII), proteína encargada de evitar la coagulación de la sangre por medio de su enlace a serina proteasas (Conrad, 2001), y catalizará su acción y evitando que la sangre se coagule cuando entra en contacto con la superficie del material (Rogers., 2011; Suuronen and Ruel, 2015; Betts *et al.*, 2017), por lo tanto, en una primera aproximación, estos materiales pueden ser usados como base para construir dispositivos para el contacto con la sangre que sean candidatos a aplicaciones cardiovasculares.

## Conclusiones

Una característica que deben cumplir los materiales que se van a usar en la construcción de injertos vasculares artificiales, es que dichos materiales no favorezcan el mecanismo de la cascada de coagulación a través de la ruta intrínseca, de este modo, se concluye que los materiales funcionalizados con heparina por los dos métodos empleados cumplen con este propósito.

La estructura molecular de la fibroína permite que se pueda inmovilizar heparina sobre su estructura molecular, y teniendo en cuenta que el material en cuestión contiene un 70% en masa de fibroína funcionalizada, se podría pensar en una primera aproximación que su actividad se sostendrá un tiempo adecuado.

## Agradecimientos

Los autores desean expresar sus agradecimientos al Grupo de Investigación en Biomateriales de la Universidad de Antioquia por la financiación del proyecto que dio origen a este trabajo.

## Referencias

- Atlan, M. et al.** (2018) 'Design, characterization and in vivo performance of synthetic 2 mm-diameter vessel grafts made of PVA-gelatin blends', *Scientific Reports*, 8(1), pp. 1–12. doi:10.1038/s41598-018-25703-2.
- Betts, J.G. et al.** (2017) *Anatomy and Physiology*. Available at: <https://openstax.org/details/books/anatomy-and-physiology>.
- Conrad, H.E.** (2001) *Heparin Binding Proteins*.
- DANE** (2019) 'Estadísticas vitales año 2018', 2018, p. 48. Available at: <https://www.dane.gov.co/files/investigaciones/poblacion/cifras-definitivas-2018.pdf>.
- Du, J. et al.** (2018) 'Potential applications of three-dimensional structure of silk fibroin/poly(ester-urethane) urea nanofibrous scaffold in heart valve tissue engineering', *Applied Surface Science*, 447, pp. 269–278. doi:10.1016/j.apsusc.2018.03.077.
- Du, X. et al.** (2014) 'Guiding the behaviors of human umbilical vein endothelial cells with patterned silk fibroin films', *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 122, pp. 79–84. doi:10.1016/j.colsurfb.2014.06.049.
- Enis, I.Y., Sezgin, H. and Sadikoglu, T.G.** (2017) 'Full

## II CONGRESO NACIONAL DE BIOMATERIALES

- factorial experimental design for mechanical properties of electrospun vascular grafts', *Journal of Industrial Textiles*, (65), p. 152808371769061. doi:10.1177/1528083717690614.
- Fazley Elahi, M., Guan, G. and Wang, L.** (2014) 'Hemocompatibility of surface modified silk fibroin materials: A review', *Reviews on Advanced Materials Science*, 38(2), pp. 148–159.
- Gupta, M.K. et al.** (2007) 'Patterned silk films cast from ionic liquid solubilized fibroin as scaffolds for cell growth', *Langmuir*, 23(3), pp. 1315–1319. doi:10.1021/la062047p.
- Koh, L.D. et al.** (2015) 'Structures, mechanical properties and applications of silk fibroin materials', *Progress in Polymer Science*, 46, pp. 86–110. doi:10.1016/j.progpolymsci.2015.02.001.
- Li, C. et al.** (2017) 'Comprehensive mechanical characterization of PLA fabric combined with PCL to form a composite structure vascular graft', *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, 69, pp. 39–49. doi:10.1016/j.jmbbm.2016.11.005.
- Linhardt, R., Murugesan, S. and Xie, J.** (2008) 'Immobilization of Heparin: Approaches and Applications', *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 8(2), pp. 80–100. doi:10.2174/156802608783378891.
- Liu, H. et al.** (2013) 'In vitro evaluation of combined sulfated silk fibroin scaffolds for vascular cell growth', *Macromolecular Bioscience*, 13(6), pp. 755–766. doi:10.1002/mabi.201200470.
- Liu, X.Y. et al.** (2009) 'Controlled release of heparin from blended polyurethane and silk fibroin film', *Materials Letters*, 63(2), pp. 263–265. doi:10.1016/j.matlet.2008.10.006.
- Lovett, M. et al.** (2007) 'Silk fibroin microtubes for blood vessel engineering', *Biomaterials*, 28(35), pp. 5271–5279. doi:10.1016/j.biomaterials.2007.08.008.
- Lu, Q. et al.** (2007) 'Cytocompatibility and blood compatibility of multifunctional fibroin/collagen/heparin scaffolds', *Biomaterials*, 28(14), pp. 2306–2313. doi:10.1016/j.biomaterials.2007.01.031.
- Murphy, A.R. and Kaplan, D.L.** (2009) 'Biomedical applications of chemically-modified silk fibroin', *Journal of Materials Chemistry*, 19(36), pp. 6443–6450. doi:10.1039/b905802h.
- Pezzoli, D. et al.** (2017) 'Biomimetic coating of cross-linked gelatin to improve mechanical and biological properties of electrospun PET: A promising approach for small caliber vascular graft applications', *Journal of Biomedical Materials Research - Part A*, 105(9), pp. 2405–2415. doi:10.1002/jbm.a.36098.
- Raskob, G.E. et al.** (2014) 'Thrombosis: A major contributor to global disease burden', *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 34(11), pp. 2363–2371. doi:10.1111/jth.12698.
- Rizwan, M. et al.** (2020) 'One-Pot Covalent Grafting of Gelatin on Poly(Vinyl Alcohol) Hydrogel to Enhance Endothelialization and Hemocompatibility for Synthetic Vascular Graft Applications', *ACS Applied Bio Materials*, 3(1), pp. 693–703. doi:10.1021/acsabm.9b01026.
- Rogers, K.** (2011) 'The Human Body: The Cardiovascular System', *Britannica Educational Publishing* [Preprint].
- Sagnella, A. et al.** (2016) 'Effect of different fabrication methods on the chemo-physical properties of silk fibroin films and on their interaction with neural cells', *RSC Advances*, 6(11), pp. 9304–9314. doi:10.1039/c5ra20684g.
- Seib, F.P. et al.** (2014) 'Multifunctional silk-heparin biomaterials for vascular tissue engineering applications', *Biomaterials*, 35(1), pp. 83–91. doi:10.1016/j.biomaterials.2013.09.053.
- Soffer, L. et al.** (2008) 'In vitro evaluation of electrospun silk fibroin scaffolds for vascular cell growth', *Biomaterials*, 19(5), pp. 2217–2227. doi:10.1163/156856208784089607.
- Suuronen, E.J. and Ruel, M.** (2015) *Biomaterials for cardiac regeneration, Biomaterials for Cardiac Regeneration*. doi:10.1007/978-3-319-10972-5.
- Truong, Y.B. et al.** (2017) 'Functional Cross-Linked Electrospun Polyvinyl Alcohol Membranes and Their Potential Applications', *Macromolecular Materials and Engineering*, 302(8), pp. 1–9. doi:10.1002/mame.201700024.
- Wang, D., Liu, H. and Fan, Y.** (2017) 'Silk fibroin for vascular regeneration', *Microscopy Research and Technique*, 80(3), pp. 280–290. doi:10.1002/jemt.22532.
- Wang, J. et al.** (2011) 'Dual-functional composite with anticoagulant and antibacterial properties based on heparinized silk fibroin and chitosan', *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 85(2), pp. 241–247. doi:10.1016/j.colsurfb.2011.02.035.
- Wang, Q. et al.** (2017) 'The effect of hirudin modification of silk fibroin on cell growth and antithrombogenicity', *Materials Science and Engineering C*, 75, pp. 237–246. doi:10.1016/j.msec.2017.02.035.
- Wang, X. et al.** (2010) 'Silk nanospheres and microspheres from silk/pva blend films for drug delivery', *Biomaterials*, 31(6), pp. 1025–1035. doi:10.1016/j.biomaterials.2009.11.002.
- WHO** (2016) 'WHO methods and data sources for country-level causes of death', *Top 10 Causes of Death* [Preprint], (December). Available at: [http://www.who.int/gho/mortality\\_burden\\_disease/causes\\_death/top\\_10/en/](http://www.who.int/gho/mortality_burden_disease/causes_death/top_10/en/).
- Xue, L. and Greisler, H.P.** (2003) 'Biomaterials in the development and future of vascular grafts', *Journal of Vascular Surgery*, 37(2), pp. 472–480. doi:10.1067/mva.2003.88.
- Yang, H. et al.** (2011) 'A novel heparin release system based on blends of biomedical polyurethane and native silk fibroin powder', *Journal of Controlled Release*, 152, pp. e106–e108. doi:10.1016/j.jconrel.2011.08.155.
- Zhang, J. et al.** (2017) 'In vivo biocompatibility and

## II CONGRESO NACIONAL DE BIOMATERIALES

hemocompatibility of a polytetrafluoroethylene small diameter vascular graft modified with sulfonated silk fibroin', *American Journal of Surgery*, 213(1), pp. 87–93. doi:10.1016/j.amjsurg.2016.04.005.

**Zhou, Y. et al.** (2013) 'Electrospinning of carboxyethyl chitosan/poly(vinyl alcohol)/silk fibroin nanoparticles for wound dressings', *International Journal of Biological Macromolecules*, 53, pp. 88–92. doi:10.1016/j.ijbiomac.2012.11.013.

**Zia, F. et al.** (2016) 'International Journal of Biological Macromolecules Heparin based polyurethanes : A state-of-the-art review', 84, pp. 101–111.

# OPTIMIZACIÓN POR METODOLOGÍA DE SUPERFICIE DE RESPUESTA DE LAS CONDICIONES DE BLANQUEAMIENTO DE CASCARILLA DE COFFEA ARABICA VARIEDAD CASTILLO®

F J Campuzano Cardona<sup>1</sup>, D M Escobar Sierra<sup>2</sup>, A M Torres López<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Est. MSc. Grupo de Investigación en Biomateriales, Facultad de Ingeniería, Universidad de Antioquia. *fjose.campuzano@udea.edu.co*, Medellín, Colombia

<sup>2</sup>PhD. Profesora Facultad de Ingeniería, Grupo de Investigación en Biomateriales Universidad de Antioquia. *marcela.escobar@udea.edu.co*, Medellín, Colombia.

<sup>3</sup>PhD. Profesora Facultad de Ingeniería, Grupo de Investigación en Biomateriales, Universidad de Antioquia. *maria.torres@udea.edu.co*, Medellín, Colombia.

## Introducción

El procesamiento del café por ruta húmeda deja en cada etapa diferentes residuos. La cascarilla de café se obtiene luego del trillado de los granos secos y resulta ser uno de los residuos más abundantes (Alves et al., 2017). Actualmente, los usos que se da a este residuo están relacionados principalmente con producción de energía, compostaje, o como aditivo en forrajes, ninguno de los cuales representa un uso con valor agregado que sugiera un aprovechamiento más adecuado del material (Franca et al., 2009; Limousy et al., 2017; Rodríguez Valencia & Zambrano Franco, 2010). Se ha reportado que este material presenta una composición rica en celulosa con un 40 – 49 % en peso del material (Bekalo & Reinhardt, 2010), lo que resulta de interés ya que la celulosa ha sido ampliamente estudiada en diferentes campos, incluyendo el biomédico y de Ingeniería de Tejidos, debido a sus propiedades mecánicas, morfológicas, químicas, y biológicas (Abdul Khalil et al., 2015; George & Sabapathi, 2015).

La celulosa nanométrica ha mostrado las mejores propiedades para aplicaciones en Ingeniería de Tejidos emergiendo con esto, estudios alrededor de la aplicación de celulosa nanométrica para fabricación de matrices de crecimiento celular que propicien la proliferación de diferentes tejidos (Moohan et al., 2020). Este tipo de celulosa ha sido obtenida a partir de diferentes materiales vegetales (Csiszar et al., 2016; Kouadri & Satha, 2018; Nasri-Nasrabadi et al., 2014; Novo et al., 2016; Ventura-Cruz & Tecante, 2019), sin embargo no se ha explorado su obtención a partir de cascarilla de café.

Sin embargo, como primer paso en la obtención de celulosa nanométrica vegetal se debe remover la lignina y la hemicelulosa, lo que se logra en un proceso que comúnmente se denomina blanqueamiento, dado que la lignina tiene un color café oscuro, y una vez removida, el material se torna blanco, siendo el color un indicador cualitativo del proceso de remoción. Este proceso se lleva a cabo con tratamientos con clorito de sodio, hipoclorito de sodio o peróxido de hidrógeno, que degradan la lignina (Kouadri & Satha, 2018; Nasri-Nasrabadi et al., 2014; Zhang et al., 2016).

Dado que el color es un indicativo del proceso de remoción de lignina se puede establecer un índice de blancura (IB) que proporciona una medida cuantificable que da cuenta indirecta del proceso de remoción de lignina. Este índice es principalmente utilizado para determinar el desempeño de

blanqueamiento de textiles de algodón (Haque et al., 2018; Yeo & Lau, 2021) así como en blanqueamientos dentales (Gerlach et al., 2002; Pérez et al., 2016); sin embargo, también se ha demostrado su empleabilidad para determinar el desempeño de remoción de lignina en residuos lignocelulósicos (Wang & Zhao, 2021).

El índice de blancura puede ser calculado a partir de mediciones de color en el espacio CIELAB que es un sistema coordinado cartesiano definido por tres coordenadas colorimétricas: L, a, y b, utilizando la ecuación [1] (Wang & Zhao, 2021).

$$IB \% = 100 - \sqrt{(100 - L)^2 + a^2 + b^2} \quad [1]$$

Donde IB % es el índice de blancura, L la iluminación, a el contenido de rojo, y b el contenido de amarillo.

Así, el propósito de este trabajo fue optimizar el índice de blancura en el proceso de blanqueamiento alcalino de la cascarilla de café empleando peróxido de hidrógeno, de modo que se determinó la granulometría y las concentraciones de las soluciones de hidróxido de sodio (NaOH) y de peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) necesarias para obtener un índice de blancura óptimo.

## Materiales y métodos

Se realizó un diseño experimental central compuesto con puntos de estrella con los factores y niveles especificados en la Tabla 1. La variable respuesta fue el índice de blancura. Los puntos experimentales se realizaron por triplicado.

Al material crudo se le realizó previamente una extracción con etanol (95%) para remover la mayor cantidad de extractivos presentes, en una proporción 1:10 (gramos de material: mL de etanol), se llevó a ebullición por 15 minutos con agitación frecuente, luego se decantó y finalmente se llevó a secado en estufa a 50°C.

Para cada uno de los puntos experimentales se pesaron 5 g del material extraído y se agregaron 50 mL de solución de NaOH, se llevó a agitación continua y se gotearon 25 mL de solución de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. El proceso se dejó por 3 horas, y luego se filtró las granulometrías gruesas con membrana de poliéster y las finas con membrana de celulosa. Seguidamente se adicionaron 50 mL de solución de NaOH y en agitación continua se gotearon 25 mL de solución de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y se dejó el proceso nuevamente por 3 horas, para luego filtrarlo de la

## II CONGRESO NACIONAL DE BIOMATERIALES

misma manera que antes y finalmente llevar las muestras a secado por 24 horas a 50 °C.

**Tabla 2:** Factores y niveles del diseño usado para la optimización del índice de blancura.

Factor	Nivel alto	Nivel bajo	Punto central	Puntos de estrella
Concentración de NaOH (%)	7.00	2.00	4.50	0.29 8.70
Concentración de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (%)	15.00	5.00	10.00	1.59 18.41
Diámetro medio (µm)	1000	332	625	104 1295

Luego de esto a las muestras se les realizó molienda para obtener un material con un diámetro medio menor a 250 µm, el cual se llevó a una caja adaptada a una cámara fotográfica digital con sensor Sony IMX486 de 12 megapíxeles. Se controló la iluminación, la distancia focal, la velocidad de captura, y el balance de blancos, y a cada muestra se le realizaron 3 tomas fotográficas. Las fotografías fueron procesadas con el software MATLAB para convertirlas del espacio RGB a CIELAB. Se realizó un promedio de los valores de *L*, *a* y *b* en toda la imagen y con estos se determinó el índice de blancura haciendo uso de la ecuación [1]. Los datos del diseño experimental fueron analizados en el software STATGRAPHICS 19.

### Resultados y discusión

Se realizó un análisis exploratorio de los datos obtenidos, mostrando normalidad en la variable respuesta para una prueba de bondad de ajuste de Kolmogórov-Smirnov. Se aplicó un modelo lineal general para el ajuste de la variable respuesta en términos de los factores evaluados, se evaluó la significancia estadística de las interacciones triples, términos cúbicos, cuadráticos y simples, y luego de retirar los términos no significativos se logró llegar al modelo de la ecuación [2].

$$IB = 57.5603 + 3.52353 * A + 4.36955 * B + 2.75561 * C - 0.975333 * A^2 - 0.350051 * B^2 + 0.0651155 * A^3 + 0.00945305 * B^3 \quad [2]$$

Donde:

*IB* es el índice de blancura,

*A* es la concentración de NaOH en %,

*B* es la concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en %

*C* es el diámetro medio de la partícula del material en mm.

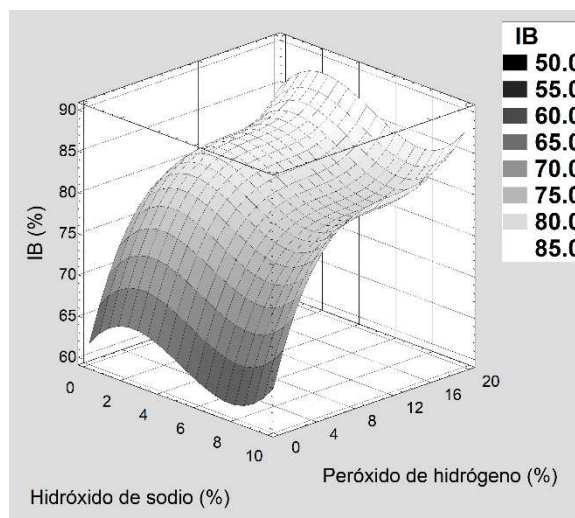
Este modelo permitió determinar las condiciones óptimas de blanqueamiento presentadas en la Tabla 2.

Es de anotar que el índice de blancura óptimo se determinó experimentalmente realizando blanqueamientos sucesivos al material hasta no observar cambios de coloración; este valor se estableció en 87 %, de aquí que las condiciones óptimas se eligen para un valor cercano a este y no para 100 %, ya que el modelo puede predecir valores de *IB* mayores a 87% a una concentración de peróxido de hidrógeno superior, pero esto realmente no ocurre.

**Tabla 3.** Condiciones óptimas para el blanqueamiento predichas por el modelo estadístico encontrado

IB%	Concentración de NaOH (%)	Concentración de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (%)	Diámetro medio (mm)
88.42	2.4	20	1.5

En la Figura 1 se observa la superficie de respuesta en términos de la concentración de NaOH y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> para un diámetro medio de partícula de 1.5 mm. Se aprecia que a una concentración de NaOH de 10 % también se obtienen valores altos de *IB*; sin embargo, se sabe que las condiciones de blanqueamiento son mejores cuando el pH del proceso está alrededor de 12 (Renard et al., 1997), el cual no se lograría con concentraciones de NaOH tan altas, de este modo, estos puntos de la superficie no son tenidos en cuenta como máximos reales.

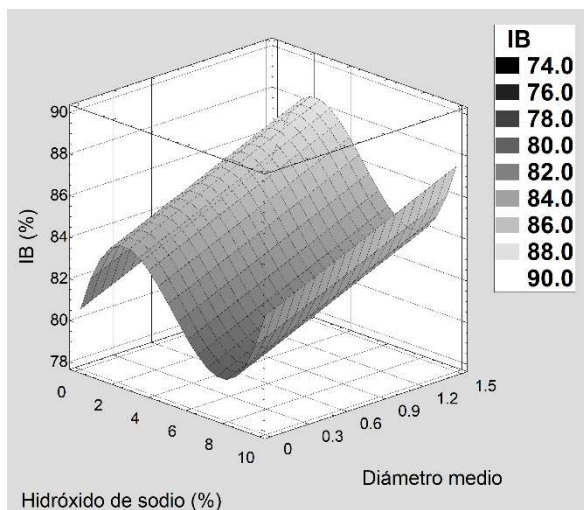


**Figura 3:** Superficie de respuesta para *IB* en términos de la concentración de NaOH y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, para un diámetro medio de 1.5 mm

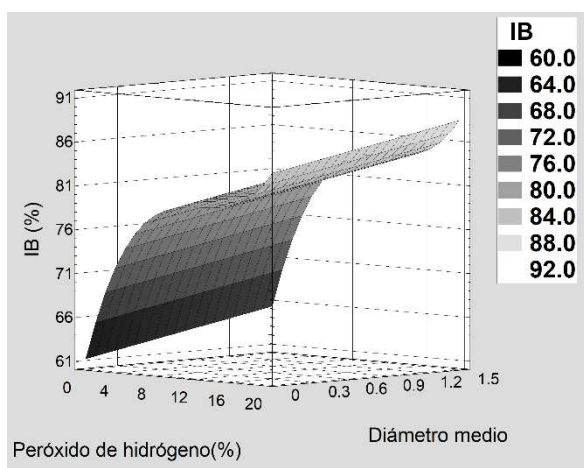
Por otra parte, si bien el efecto del diámetro medio fue estadísticamente significativo, al observar la Figura 2 y Figura 3, se puede ver que el comportamiento del *IB* respecto de esta variable es lineal, como lo predice el modelo, pero se observa, además, que en los valores óptimos de concentración de NaOH y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> se logran valores de *IB* bastante altos, mayores a 84.

Este resultado es interesante dado que significa que no es necesario un ajuste de tamaño para el material crudo, y por el contrario puede usarse el material con su distribución granulométrica original y obtener aún valores de *IB* aceptables.

Adicionalmente, en la Figura 2 y Figura 3 se observa que el efecto del diámetro medio es creciente, es decir, que a mayor diámetro, mayor *IB*, lo cual es contrario a lo esperado, ya que el tamaño del material suele ser muy preponderante en los procesos de extracción, en tanto un menor tamaño supone una mayor área de contacto con el medio (Mosier et al., 2005). Pese a lo contradictorio de este resultado, se comprobó experimentalmente que en efecto se logran mejores *IB* cuando el tamaño de material es grande, comparado con la fracción de finos del mismo.



**Figura 4.** Superficie de respuesta para IB en términos de la concentración de NaOH y diámetro medio, para una concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> de 20%.



**Figura 5.** Superficie de respuesta para IB en términos de la concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y diámetro medio, para una concentración de NaOH 2,4 %.

Este resultado podría estar relacionado con el espesor del material. La cascarilla de café es un material con un espesor pequeño, lo cual favorece los procesos de difusión al interior del material y por tanto el proceso de blanqueamiento, al permitir con mayor facilidad que el medio de blanqueamiento penetre el interior de este. Así, con este resultado es posible plantear la necesidad de remover la fracción de finos del material crudo para mejorar el IB en el proceso.

El modelo fue corroborado experimentalmente empleando las condiciones óptimas predichas obteniendo un índice de blancura de 84%, el cual si bien no es el valor predicho, sí se encuentra por encima de todos los valores obtenidos en los puntos experimentales lo cual implica una mejoría en las condiciones usadas y no representa una variación mayor al 5% respecto de lo predicho, lo cual hace al modelo adecuado. Finalmente, el modelo establecido es de importancia debido a que como se dijo antes, el proceso de blanqueamiento es un paso esencial para la obtención de celulosa nanométrica. Con este modelo se logró determinar las mejores condiciones de blanqueamiento para así tener un material de partida apropiado para la obtención de celulosa nanométrica que podría ser de interés en el área de biomateriales por sus múltiples aplicaciones en la Ingeniería de Tejidos gracias a

sus propiedades (Abdul Khalil et al., 2015; George & Sabapathi, 2015; Moohan et al., 2020).

## Conclusiones

Se logró determinar un modelo que describe el comportamiento del blanqueamiento de la cascarilla de café en términos del diámetro medio y la concentración de NaOH y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, arrojando como valores óptimos una concentración de 2.4% de NaOH, 20% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y un diámetro medio de 1.5 mm.

Se determinó que, si bien el diámetro medio es estadísticamente significativo, puede ignorarse y aun así tener valores de IB satisfactorios.

## Agradecimientos

Los autores desean expresar sus agradecimientos al Grupo de Investigación en Biomateriales de la Facultad de Ingeniería de la Universidad de Antioquia por la financiación del proyecto que dio origen al trabajo presentado.

## Referencias

- Abdul Khalil, H. P. S., Bhat, A. H., Abu Bakar, A., Tahir, P. M., Zaidul, I. S. M., & Jawaid, M.** (2015). Cellulosic Nanocomposites from Natural Fibers for Medical Applications: A Review. In *Handbook of Polymer Nanocomposites. Processing, Performance and Application* (pp. 475–511). Springer Berlin Heidelberg. [https://doi.org/10.1007/978-3-642-45232-1\\_72](https://doi.org/10.1007/978-3-642-45232-1_72)
- Alves, R. C., Rodrigues, F., Antónia Nunes, M., Vinha, A. F., & Oliveira, M. B. P. P.** (2017). State of the art in coffee processing by-products. In *Handbook of Coffee Processing By-Products: Sustainable Applications* (First, pp. 1–26). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811290-8.00001-3>
- Bekalo, S. A., & Reinhardt, H. W.** (2010). Fibers of coffee husk and hulls for the production of particleboard. *Materials and Structures/Materiaux et Constructions*, 43(8), 1049–1060. <https://doi.org/10.1617/s11527-009-9565-0>
- Csizar, E., Kalic, P., Kobol, A., & Ferreira, E. D. P.** (2016). The effect of low frequency ultrasound on the production and properties of nanocrystalline cellulose suspensions and films. *Ultrasonics Sonochemistry*, 31, 473–480. <https://doi.org/10.1016/j.ulsonch.2016.01.028>
- Franca, A., Oliveira, L., & Franca, A.** (2009). Coffee processing solid wastes: current uses and future perspectives. In *Agricultural wastes*, Nova Publishers, New York (Issue January 2009).
- George, J., & Sabapathi, S. N.** (2015). Cellulose nanocrystals: synthesis, functional properties, and applications. *Nanotechnology, Science and Applications*, 8, 45–54. <https://doi.org/10.2147/NSA.S64386>
- Gerlach, R. W., Zhou, X., & Mcclanahan, S. F.** (2002). Comparative response of whitening strips to a low peroxide and potassium nitrate bleaching gel. *American Journal of Dentistry*, 15(SPEC. ISS. 1), 19A-23A. <https://europepmc.org/article/med/12512987>

- Haque, A. N. M. A., Smriti, S. A., Hussain, M., Farzana, N., Siddiqa, F., & Islam, M. A.** (2018). Prediction of whiteness index of cotton using bleaching process variables by fuzzy inference system. *Fashion and Textiles*, 5(1). <https://doi.org/10.1186/s40691-017-0118-9>
- Kouadri, I., & Satha, H.** (2018). Extraction and characterization of cellulose and cellulose nanofibers from *Citrullus colocynthis* seeds. *Industrial Crops and Products*, 124(August), 787–796. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.08.051>
- Limousy, L., Jeguirim, M., & Labaki, M.** (2017). Energy applications of coffee processing by-products. In *Handbook of Coffee Processing By-Products: Sustainable Applications*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811290-8.00011-6>
- Moohan, J., Stewart, S. A., Espinosa, E., Rosal, A., Rodríguez, A., Larrañeta, E., Donnelly, R. F., & Domínguez-Robles, J.** (2020). Cellulose nanofibers and other biopolymers for biomedical applications. A review. *Applied Sciences* (Switzerland), 10(1). <https://doi.org/10.3390/app10010065>
- Mosier, N., Wyman, C., Dale, B., Elander, R., Lee, Y. Y., Holtzapple, M., & Ladisch, M.** (2005). Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology*, 96(6), 673–686. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2004.06.025>
- Nasri-Nasrabadi, B., Behzad, T., & Bagheri, R.** (2014). Extraction and characterization of rice straw cellulose nanofibers by an optimized chemomechanical method. *Journal of Applied Polymer Science*, 131(7), 1–7. <https://doi.org/10.1002/app.40063>
- Novo, L. P., Bras, J., García, A., Belgacem, N., & Curvelo, A. A. da S.** (2016). A study of the production of cellulose nanocrystals through subcritical water hydrolysis. *Industrial Crops and Products*, 93, 88–95. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2016.01.012>
- Pérez, M. D. M., Ghinea, R., Rivas, M. J., Yebra, A., Ionescu, A. M., Paravina, R. D., & Herrera, L. J.** (2016). Development of a customized whiteness index for dentistry based on CIELAB color space. *Dental Materials*, 32(3), 461–467. <https://doi.org/10.1016/j.dental.2015.12.008>
- Renard, C. M. G. C., Rohou, Y., Hubert, C., Della Valle, G., Thibault, J. F., & Savina, J. P.** (1997). Bleaching of apple pomace by hydrogen peroxide in alkaline conditions: Optimisation and characterisation of the products. *LWT - Food Science and Technology*, 30(4), 398–405. <https://doi.org/10.1006/fstl.1996.0195>
- Rodríguez Valencia, N., & Zambrano Franco, D.** (2010). Los subproductos del café: fuente de energía renovable. In *Avances Técnicos Cenicafé* (Issue 3). <https://doi.org/ISSN-0120-0178>
- Wang, T., & Zhao, Y.** (2021). Optimization of bleaching process for cellulose extraction from apple and kale pomace and evaluation of their potentials as film forming materials. *Carbohydrate Polymers*, 253(August 2020), 117225. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2020.117225>
- Yeo, W. S., & Lau, W. J.** (2021). Predicting the whiteness index of cotton fabric with a least squares model. *Cellulose*, 28(13), 8841–8854. <https://doi.org/10.1007/s10570-021-04096-y>
- Zhang, K., Sun, P., Liu, H., Shang, S., Song, J., & Wang, D.** (2016). Extraction and comparison of carboxylated cellulose nanocrystals from bleached sugarcane bagasse pulp using two different oxidation methods. *Carbohydrate Polymers*, 138, 237–243. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.11.038>



# PROCESOS DE EXTRACCIÓN APLICADOS A LA OBTENCIÓN DE POLIHIDROXIALCANOHATOS - PHAS

DC Arcila Echavarría<sup>1</sup>, NA Gómez Vanegas<sup>2</sup>, CP Ossa Orozco<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Estudiante de doctorado, Grupo Bioprocesos Universidad de Antioquia. catalina.arcila@udea.edu.co, Medellín, Colombia

<sup>2</sup> PhD. Profesora Facultad de Ingeniería, Grupo Bioprocesos Universidad de Antioquia. andrea.gomez@udea.edu.co, Medellín, Colombia.

<sup>3</sup> PhD. Profesora Facultad de Ingeniería, Grupo de Investigación en Biomateriales Universidad de Antioquia. claudia.ossa@udea.edu.co, Medellín, Colombia.

## Introducción

Los polihidroxicanoatos son plásticos biodegradables con propiedades térmicas, fisicoquímicas y mecánicas similares a los polímeros de origen petroquímico. También cuentan con propiedades inherentes a su estructura molecular y proceso de obtención como son: biocompatibilidad, no toxicidad y ser amigable con el ambiente. Todo esto lo convierte en un material promisorio para uso en diferentes aplicaciones, incluso médicas (Anjum et al., 2016).

Para la extracción de PHAs se han utilizado diferentes métodos, entre ellos: extracción con solventes, digestión química, digestión enzimática, entre otros. Cada uno de estos métodos presenta ventajas y desventajas en su aplicación industrial, permitiendo en algunos casos procesos más amigables con el ambiente y a su vez viables desde un punto de vista económico (Koller et al., 2013; Rodríguez-Perez et al., 2018).

La técnica de extracción con solventes es una de las más ampliamente usadas en el laboratorio para la recuperación de PHAs desde biomasa rica en este compuesto, ya que su aplicación a gran escala, por el uso de solventes, se identifica como un método que no es amigable con el ambiente, además de requerir altos costos operacionales y de capital. Sin embargo, con este método es posible obtener PHA muy puro, con alto peso molecular y una degradación despreciable del mismo. Este método consiste en dos etapas: la primera es la modificación de la permeabilidad de la membrana celular, de tal manera que permita la liberación del PHA y su posterior solubilización; la segunda, es la precipitación del mismo usando un no-solvente (Kunasundari et al., 2011).

También la extracción con fluidos supercríticos constituye una técnica de interés para producir PHA de grado médico. Se reportó que el dióxido de carbono supercrítico (sCO<sub>2</sub>) puro es altamente eficiente para extraer contaminantes lipofílicos de las células ricas en PHA. Posteriormente, mezclas supercríticas de CO<sub>2</sub> y "solventes convencionales" pueden ser aplicadas para la extracción de alto rendimiento de PHA extremadamente limpio. Especialmente los (medium chain length) mcl-PHA muestran una excelente solubilidad en las mezclas supercríticas; por ejemplo, el Polihidroxiocetoato (PHO) extraído de manera supercrítica en un solo paso de extracción alcanzó un nivel de pureza del 100% y contenía 25-150 veces menos material residual de biomasa, que el mismo tipo de PHA aislado por extracción y precipitación convencionales (Koller et al., 2013).

Otras técnicas que se han reportado para la extracción de PHA son: digestión química, método que se basa en la solubilización de la masa celular, diferente a PHA. Se han usado como precursores hipoclorito de sodio y surfactantes

como el dodecil sulfato de sodio (SDS), Triton X-100 y betaina. La calidad del PHA obtenido usando surfactantes o hipoclorito de sodio de manera independiente no ha sido buena, por lo cual se han realizado estudios en los cuales combinan el uso de ambas sustancias (Kunasundari et al., 2011). Además, algunos investigadores aclaran que el uso de hipoclorito de sodio para la recuperación de PHA representa un riesgo de formación de compuestos halogenados tóxicos, por lo cual no lo consideran como una técnica promisoriosa para ser aplicada a gran escala (Koller et al., 2013).

Por otro lado, la digestión enzimática, busca la solubilización de la masa celular que no es PHA a partir de un tratamiento con calor, una hidrólisis enzimática y un lavado con agua. Especialmente se han usado las proteasas para este fin. Esta técnica es atractiva por tener condiciones operacionales moderadas y por la especificidad de las enzimas, lo que permite recuperar un PHA con una buena calidad. Sin embargo, su alto costo es una de las desventajas de este proceso (Kunasundari et al., 2011).

Acorde a lo anterior, la selección del proceso de extracción a usar en la obtención de PHAs es muy importante, ya que este afecta de manera directa el costo del producto y sus características finales, las cuales son decisivas para definir la aplicación en la cual puede ser usado el material obtenido.

En este sentido, este trabajo buscó comparar dos métodos para la extracción de PHA a partir de biomasa de *Halomonas boliviensis* rica en dicho polímero, mediante la caracterización del material obtenido para identificar cual método puede ser el más apropiado.

## Materiales y métodos

La biomasa rica en PHA se obtuvo a partir de *Halomonas boliviensis*, en fermentación a escala de bioreactor de 3 L y usando como fuente de carbono hidrolizado de raquis de palma y como fuente de nitrógeno hidrolizado de gluten; ambas, fuentes no convencionales.

### Extracción de PHA con fluido supercrítico

Se definieron las condiciones reportadas por Koller et al. (2013) (Koller et al., 2013) así: fluido CO<sub>2</sub>, presión 200 atm, temperatura 40 °C y un tiempo de 100 min. Esta extracción se realizó en el equipo *Applied separations, modelo Spe-ed SFE-2 Supercritical System*. El recipiente de almacenamiento de muestra de este equipo tiene una capacidad de 100 ml y debe llenarse mínimo en un 70 %, por tanto, para cumplir esta condición se usaron perlas de ebullición, ya que la muestra de biomasa no fue suficiente. Se usó una muestra de biomasa liofilizada con un peso de

5.648 g. Para conocer la cinética de extracción se realizó seguimiento al peso del material extraído cada 12 min.

### Extracción de PHA con solvente (cloroformo)

En este caso, la extracción de PHA de las células se realizó con la metodología empleada por Z. Ujang et al., (2009) (Z. Ujang et al., 2009) que consiste en mezclar cloroformo e hipoclorito al 5 % (m/v) en una relación 1:2 con las células. Luego se someten a 40 °C y 200 rpm por un tiempo de 180 min. Después se toma la mezcla y centrifuga a 15000 rpm durante 10 minutos de donde se obtiene una mezcla de tres fases. Posteriormente se hacen tres lavados con etanol a la parte sólida obtenida con el procedimiento anterior y se finaliza lavando con agua destilada. Se deja secar a temperatura ambiente.

La figura 1 muestra el flujo de proceso de extracción de la muestra por ambas técnicas.

### Caracterización del PHA

La caracterización del PHA se realizó por Espectroscopía Infrarroja con Transformada de Fourier (FTIR) en un equipo marca Thermo Scientific, referencia Nicolet iS10, con detector Smart iTR. Fue llevada a cabo por comparación con un estándar de PHB marca Aldrich, ya que por referencias bibliográficas éste era el tipo de PHA que se esperaba obtener.

También se realizó análisis térmico diferencial DSC, en un rango de temperatura desde -20 °C hasta 200 °C aumentando 10 °C/min, con un enfriamiento posterior hasta -50 °C con un decremento de 20 °C/min, en una atmósfera de nitrógeno.

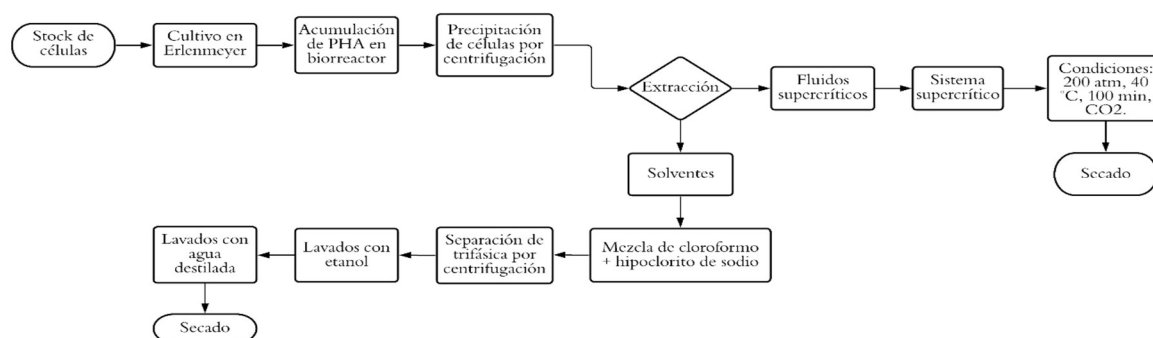


Figura 1. Representación esquemática de las técnicas de extracción de PHA evaluadas en este estudio. Elaborado por el autor.

## Resultados y discusión

### Extracción con fluido supercrítico

En la tabla 1 se presenta la cinética de extracción del PHA, mostrando el progreso en la extracción con CO<sub>2</sub> supercrítico, validando así el tiempo definido para el procedimiento.

Tabla 1. Cinética de extracción de PHA con CO<sub>2</sub> supercrítico

Tiempo (min)	Peso (g/L)*
0	0
12	0,0759
24	0,0916
36	0,1103
48	0,1151
60	0,1232
72	0,1245
84	0,1253
96	0,1333

La cantidad final extraída de biopolímero fue de 0.1333 g, lo que representó un porcentaje de extracción del 2.4 %. El porcentaje de recuperación obtenido por Koller et al., (2013), con las condiciones usadas en este ensayo fue del 89 %, lo que muestra que es una técnica con potencial. La diferencia dada en el porcentaje de extracción de este ensayo con respecto al reportado por Koller et al., (2013), se puede deber a la presencia de las perlas de ebullición en la muestra adicionada en el recipiente de almacenamiento del equipo para realizar la extracción, ya que, al tener una proporción tan alta de ellas, se puede ver reducida el área de contacto de la biomasa con el fluido de extracción necesario para la transferencia de masa. Así como a la baja relación de biomasa rica en PHA, con respecto a las perlas de ebullición adicionadas para cumplir con las indicaciones del equipo

ocupar al menos el 70 % del volumen del recipiente de almacenamiento para realizar la extracción, lo cual muestra que es necesario revisar la importancia de la cantidad de muestra de biomasa utilizada para realizar la extracción por esta técnica.

### Extracción con solvente

Al usar la técnica convencional de extracción con solventes, usando el cloroformo, se logró un 70.8 % de recuperación, lo cual representa una diferencia significativa entre las dos técnicas. Sin embargo, cabe aclarar, que la técnica de fluidos supercríticos se ve bastante afectada por la cantidad de muestra que se tiene para realizar la extracción, ya que este proceso puede ser usado para escala piloto y/o industrial sin problema. Además, permite un proceso más amigable con el ambiente y obtener un material libre de solventes que pueden ser contaminantes y por tanto limitar las posibilidades de aplicaciones para el material obtenido (Koller et al., 2013).

### Caracterización del PHA

#### Análisis de Espectroscopia Infrarroja con Transformada de Fourier (FTIR)

En la Figura 2 se presenta el espectro infrarrojo de las muestras extraídas por los dos métodos usados en este estudio. En comparación con el espectro del estándar (Figura 2a), la muestra extraída por los solventes cloroformo e hipoclorito de sodio (Figura 2b) presenta la banda característica a los 1725 cm<sup>-1</sup> que representa a la vibración del enlace éster (RC=O) (Porras et al., 2014). La intensidad de banda alrededor de los 2950 cm<sup>-1</sup> indica la presencia de los grupos alifáticos CH<sub>3</sub> y CH<sub>2</sub> cuya intensidad se debe al desorden conformacional obtenido en el proceso de cristalización, específicamente la banda de absorción en 2955

$\text{cm}^{-1}$  es asignada al grupo metilo asimétrico, la banda en  $2925 \text{ cm}^{-1}$  al  $\text{CH}_2$  asimétrico de las cadenas monoméricas laterales y la absorción a  $2855 \text{ cm}^{-1}$  al grupo metilo simétrico (Gumel et al., 2014). La muestra extraída por medio del fluido supercrítico  $\text{CO}_2$  presenta ambas bandas características a los  $1725 \text{ cm}^{-1}$  y  $2950 \text{ cm}^{-1}$  (Figura 2c), con lo cual se puede validar que el material obtenido por la extracción supercrítica presenta características más similares a la de la muestra comercial PHB, por lo tanto, se puede sugerir que el biopolímero podría ser polihidroxibutirato (PHB).

Comparando estos resultados con los presentados por Narayanan et al., (2021), en ambos espectros, se identifican adicionalmente, bandas residuales en el rango de los  $1000$  y  $1300 \text{ cm}^{-1}$  que corresponden al estiramiento del enlace C-O del grupo éster, así como la banda que se presenta a los  $1380 \text{ cm}^{-1}$  que representa el estiramiento de  $\text{CH}_3$ ; los cuales apoyan la idea de la similitud del material obtenido con el PHB, teniendo en cuenta que en dicho estudio validaron por análisis de resonancia magnética nuclear NMR que el material obtenido fue PHB.

Es importante tener en cuenta que la aplicabilidad del método de extracción depende de diversos factores, de acuerdo con lo mencionado por Koller et al. (2013), uno de ellos es la

fragilidad de la pared celular que dependerá de la especie que se esté utilizando. En este caso *Halomonas boliviensis* es una bacteria Gram-negativa, es decir, que posee adicionalmente una membrana externa compuesta principalmente por proteínas y lipopolisacáridos, a diferencias de las bacterias Gram-positivas; por lo que es posible que el proceso de recuperación del PHB requiera de un proceso más riguroso de ruptura celular y que contemple una buena remoción de restos celulares. Además, es vital la selección de un solvente adecuado que sea capaz de atravesar la membrana celular y también remueva la capa de proteínas que envuelven los gránulos de PHB, de tal manera que no se impacte la masa molecular y las propiedades del PHB obtenido (Mannina, et al., 2020). Complementariamente, como se esquematizó en la Figura 1, el método de extracción por solventes requiere una serie de pasos que se deben realizar con especial cuidado y rigurosidad, cualquier dificultad técnica en la ejecución de la purificación del material también podría arrojar resultados no esperados.

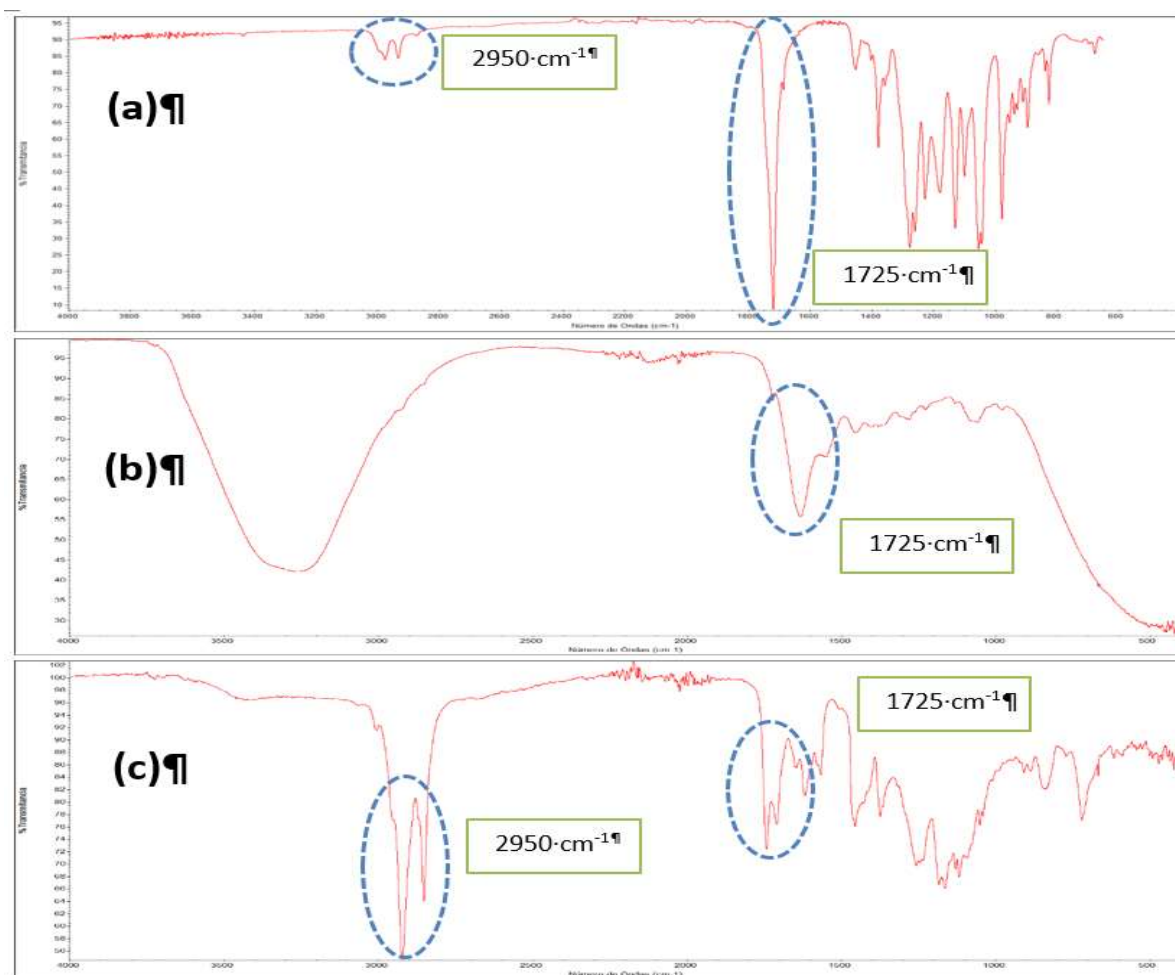


Figura 2. Espectros obtenidos con las pruebas FTIR, (a) Estándar de PHB de Sigma Aldrich, (b) muestra de biopolímero extraído por solventes cloroformo e hipoclorito, (c) muestra de biopolímero extraído por  $\text{CO}_2$  supercrítico.

**Análisis térmico diferencial (DSC)**

Las propiedades térmicas del biopolímero extraído bajo la técnica con solventes se presentan en la Tabla 2, en comparación con un estándar de PHB. No se presentan propiedades térmicas del material obtenido por fluidos supercríticos ya que la muestra no fue suficiente para realizar en este análisis. En ella se puede observar que el material extraído por la técnica con solventes presentó una temperatura de fusión y de transición vítrea cercanas a la del PHB estándar, mientras para la temperatura de cristalización presenta una desviación del 35,4%. Estas características permiten sugerir que el material obtenido por la técnica de solventes también es PHB.

Tabla 2. Propiedades térmicas del PHB

Polímero	T <sub>m</sub> (°C)	T <sub>g</sub> (°C)	T <sub>cc</sub> (°C)
PHB extracción con solventes	167	1	31
PHB comercial, reportado por Tanadchangsang & Yu, 2012)	175,4	3,5	48

**Conclusiones**

Con ambas técnicas se pudo obtener el biopolímero a partir de biomasa rica en PHA. Sin embargo, la técnica de extracción con solventes permitió lograr un mayor porcentaje de recuperación al obtenido con la técnica de fluidos supercríticos. Adicionalmente, desde la caracterización por FTIR se puede inferir que se obtuvo un PHB con mayor grado de pureza con la técnica de fluidos supercríticos en comparación con el obtenido por extracción con solventes.

Se puede sugerir, a partir de la caracterización por FTIR, que el biopolímero extraído por el método de extracción de fluidos supercríticos, podría ser polihidroxibutirato (PHB), ya que presenta características similares a las de la muestra comercial de este material.

Se puede sugerir, a partir de la caracterización térmica con DSC, que el biopolímero extraído por el método de extracción con solventes, podría ser polihidroxibutirato (PHB).

A partir de la caracterización realizada, se identifica que el PHB obtenido con CO<sub>2</sub> supercrítico presenta mayor grado de pureza con respecto al obtenido por la técnica de solventes usando cloroformo.

**Referencias**

Anjum, A., Zuber, M., Zia, K. M., Noreen, A., Anjum, M. N., & Tabasum, S. (2016). Microbial production of polyhydroxyalkanoates ( PHAs ) and its copolymers: A review of recent advancements. *International Journal of Biological Macromolecules*, 89, 161–174. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.04.069>

Gumel, A. M., Annuar, M. S. M., & Heidelberg, T. (2014). Growth kinetics , effect of carbon substrate in biosynthesis of mcl-PHA by *Pseudomonas putida* Bet001. *Brazilian Journal of Microbiology*, 45(February), 427–438.

Koller, M., Niebelschütz, H., & BrauneGG, G. (2013). Strategies for recovery and purification of poly [(R)-3-hydroxyalkanoates ] ( PHA ) biopolyesters from surrounding

biomass. *Engineering in Life Sciences*, 13, 549–562. <https://doi.org/10.1002/elsc.201300021>

Kunasundari, B., & Sudesh, K. (2011). Isolation and recovery of microbial polyhydroxyalkanoates. *Express Polymer Letters*, 5(7), 620–634. <https://doi.org/10.3144/expresspolymlett.2011.60>

Mannina, G., Presti, D., Montiel-Jarillo, G., Carrera, J., & Suárez-Ojeda, M. E. (2020). Recovery of polyhydroxyalkanoates (PHAs) from wastewater: A review. *Bioresource Technology*, 297(October 2019), 122478. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.122478>

Narayanan, M., Kandasamy, G., Murali, P., Kandasamy, S., Ashokkumar, V., Nasif, O., & Pugazhendhi, A. (2021). Optimization and production of polyhydroxybutyrate from sludge by *Bacillus cereus* categorized through FT-IR and NMR analyses. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 9(1). <https://doi.org/10.1016/j.jece.2020.104908>

Porras, M. A., Cubitto, M. A., & Villar, M. A. (2014). Quantitative Determination of intracellular PHA in *Bacillus megaterium* BBST4 strain Using Mid FTIR Spectroscopy. In *XIV Latin American Symposium on Polymers / XII Ibero American Congress on Polymers* (pp. 1–4). Porto de Galinhas. <https://doi.org/10.13140/RG.2.1.3920.2407>

Rodriguez-Perez, S., Serrano, A., Panti6n, A. A., Alonso-Fari6as, B., Biology, M., Olavide, U. P. De, ... Alonso-Fari6as, B. (2018). Challenges of scaling-up PHA production from waste streams. A review Bernab e. *Journal of Environmental Management*, 205, 215–230. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2017.09.083>

Z. Ujang, S., Salim, M. R., & Olsson, G. (2009). Recovery of Polyhydroxyalkanoates (PHAs) from Mixed Microbial Cultures by Simple Digestion and Saponification. In *Proceedings of the 3rd International Water Association (IWA)-ASPIRE* (pp. 8–15).

Tanadchangsang, N., & Yu, J. (2012). Microbial synthesis of polyhydroxybutyrate from glycerol: gluconeogenesis, molecular weight and material properties of biopolyester. *Biotechnology and Bioengineering*, 109(11), 2808–18. <http://doi.org/10.1002/bit.24546>

# DEVELOPMENT OF A DRUG DELIVERY SYSTEM FOR CURMUMIN USING BACTERIAL NANOCELLULOSE FOR THE CHEMOPREVENTION OF STOMACH CANCER

M. Silva<sup>1</sup>, C. Castro<sup>2</sup>, M. Osorio<sup>3</sup>

<sup>1,2,3</sup> *Ingeniería en Nanotecnología, Universidad Pontificia Bolivariana, Medellín-Colombia.*

<sup>1</sup> *marcela.silvam@upb.edu.co*, <sup>2</sup> *cristina.castro@upb.edu.co*, <sup>3</sup> *marlonandres.osorio@upb.edu.co*

## Introduction

Stomach cancer is a major health problem in many countries (American Cancer Society, 2020). This is caused by abnormal cell growth that begins in the stomach (American Cancer Society, 2021); is the fourth most common and the second most common cancer deaths worldwide (Mayo Clinic, 2020). In 2017, more than 1.22 million incident cases of stomach cancer occurred worldwide, and almost 865,000 people died of stomach cancer (Etemadi, 2019). Early detection is important to improve the patient's prognosis and may lead to effective initial treatment that reduces cancer development (American Cancer Society, 2021). A Chemopreventive treatment should be focused at the initial stage of cancer; to treat the first part of the mucosa, which the first part of the stomach of being altered by cancer cells in order to treat stomach cancer (Patra, 2018), one of the non-invasive treatment options is a drug delivery systems (DDS), these treatments doesn't affect other body parts, so its toxicity and side effects are greatly reduced (Chong Li, 2019). To provide a therapeutic effect using DDS, a carrier is needed to transport the drug. Therefore, natural polymers as Bacterial Nanocellulose (BNC) are of great interest, a polymeric structure that encapsulates the drug may have advantages, such as improving the amount of drug that reaches the site of interest, improving circulation in the body, improving the kinetics and stability of the drug (Lakshmana, 2017). As drugs for cancer chemoprevention, there has been a great interest in natural phytochemicals (Tiwari, 2012), since they have unique advantages, such as lower toxicity or almost zero side effects, low price, and good therapeutic potential (Wang, 2012). One phytochemical, which has been shown to have anticancer properties, is curcumin (Zielińska, 2020). Studies have shown that curcumin has potential beneficial properties, such as anti-inflammatory, antiproliferative, antimetastatic, anticancer, analgesic, and immunomodulatory properties, among many other effects due to its antioxidant activity (Hassanalilou, 2019). Nevertheless, there is a great amount of literature to encapsulate curcumin, there is no literature that treats with the adsorption and desorption thermodynamics of curcumin encapsulated in biopolymers, such as BNC, and specially, related to stomach cancer treatment. This study aims to find thermodynamic parameters that allow to control the time of drug release while keeping the dose within the expected delivery window. This supports the biological effects of the drug over time and allows the design of drug release, from the carrier by controlling, the amount of drug loaded. It is essential to find the relationship between the amount of drug adsorbed and the time of release, in order to adjust drug administration within the effective therapeutic window.

## Materials and methods

The methodology used to produce BNC membranes was described by (Molina, 2017), the materials used were: glucose, peptone, yeast, Monosodium phosphate  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , Monopotassium phosphate heptahydrate  $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , and Magnesium sulphate  $\text{MgSO}_4$ ; these reagents were analytical grade obtained from Merck. To produce BNC, the bacterial strain used was *Komagataeibacter medellinesis*. Unrefined cane sugar (obtained from a local market) was used to make the culture medium. To adjust the pH of the culture medium, citric acid purchased from Merck with analytical grade was used. Once the membranes were obtained, they were washed with 90% technical grade KOH flakes. The curcumin used in the experiments, was food grade, the reagent was donated by Colorquímica (Medellín, Colombia). Using the high-performance liquid chromatography (HPLC) technique, the amount of curcuminoids present in the solution donated by Colorquímica were  $32.153 \pm 0.857$  mg/ml.

## Adsorption experiments

For the isotherm experiments a stock solution of curcumin with a concentration of 11.36 mg/ml and a BNC stock dispersion with a concentration of 11 mg/ml were mixed in sterile 15 ml falcon tubes to do the adsorption experiments (Stohs, 2020). These were made under four different temperatures: 6 °C, 10 °C, 20 °C and 40 °C, to identify the most efficient adsorption temperature, also the pH of the medium and the agitation of the samples at 100 rpm remained constant for each temperature. Once the solutions were prepared, they were left under stirring and constant temperature for 24 h. Subsequently, the samples were filtered with a vacuum pump system, to obtain the supernatant and then it was analyzed spectrophotometrically at 424 nm, to find the adsorbed concentration of curcumin on BNC. Finally, the equilibrium pigment concentration ( $C_e$ ) from the slope of the curcumin calibration curve coupled to Lambert's Beer law ( $R^2 > 0.999$ ). The process described above, was repeated three times for each temperature. Then, the amount of curcumin adsorbed by the BNC at equilibrium ( $q_e$ ) was calculated, from the mass balance equation, the initial curcumin concentration ( $C_i$ ) and  $C_e$ .

The procedure to carry out the adsorption kinetics experiment was like the described above, but aliquots were taken at 5 min, 10 min, 20 min, 30 min, 1 h, 2 h, 3 h, and 4 h. In addition, for this experiment, a curcumin concentration of 6 mg/ml was chosen, as well as for encapsulation, since it was determined with the data obtained from the isotherms, that it was the most suitable for the adsorption phenomenon. Also, the data obtained are plotted and from this graph the value  $q_m$  is obtained, this variable is related to  $q_t$  of the adsorption kinetic models, since when  $q_t$  tends to infinity it is equal to be  $q_m$ . Using the Excel solver tool, it was possible to solve the non-linear equations of each kinetic and isotherm models.

**Transmission electron microscopy (TEM)**

To observe how was the curcumin adsorbed on the BNC fibers, drops were taken from the samples obtained from the supernatant after the adsorption kinetic experiments (the concentration to assure the equilibrium monolayer) and they were deposited onto glow-discharged carbon-coated electron microscopy grids and negatively stained with 2wt% uranyl acetates. All samples were observed using a Tecnai microscope operating at an acceleration voltage of 20 kV and 15000 magnifications.

**Scanning electron microscopy (SEM)**

SEM was used to analyze the curcumin previously encapsulated in BNC fibers, by having stirred a solution such as those formulated for adsorption kinetics and subsequently filtered to remove excess curcumin. This to determine their surface characteristics. Samples were prepared by placing dry particles onto carbon tapes followed by a coating with gold for 90 s using a plasma coater. Images were captured using a Jeol JCM 6000 plus microscope operating at an acceleration voltage 15 kV voltage acceleration and 1000X.

**Attenuated total reflection Fourier transform infrared spectroscopy (ATR-FT-IR)**

A thin film of 1 mm<sup>2</sup> of curcumin encapsulated in BNC was placed in a Nicolet 6700 series spectrometer equipped with a single reflection attenuated total reflectance (ATR) and a

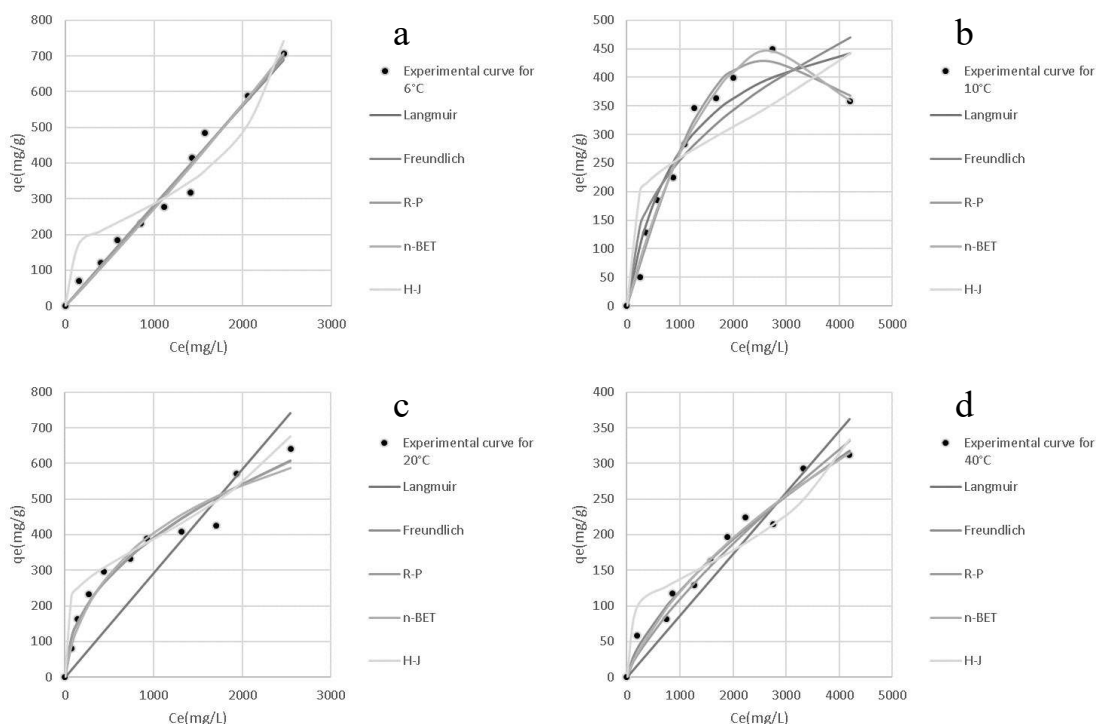
type IIA diamond mounted tungsten carbide. The diamond ATR had an approximate sampling area of 0.5 mm<sup>2</sup> and applied a consistent, reproducible pressure to every sample. The infrared spectra were collected with a 4 cm<sup>-1</sup> resolution over 64 scans. This analysis was carried out to investigate the presence of different organic functional groups and to probe the interactions between the adsorbed curcumin and the BNC.

**Thermogravimetric analysis**

Thermogravimetric analyses were performed show the thermal stability of encapsulated curcumin. The experiment was carried out using a Mettler Toledo TGA/SDTA 851e instrument in a nitrogen atmosphere at 40 ml.min<sup>-1</sup> and a heating rate of 10 °C min<sup>-1</sup>. The samples were heated from 30 °C to 800 °C.

**Results and discussion**

The data from the experimental adsorption of curcumin on BNC is seen in figure 1. This data was modeled with different isotherms for each temperature. In these models, their respective constants and variables were found (see table 1). After having calculated the concentration of the pigment at equilibrium (C<sub>e</sub>) and the amount of the curcumin adsorbed on the BNC at equilibrium (q<sub>e</sub>).



**Figure 1.** Isotherm model curves that best fit curcumin adsorption on BNC fibers: (a) 6°C, (b) 10°C, (c) 20°C and (d) 40°C.

**Table 1.** Isotherm model parameters that best fit curcumin adsorption on BNC fibers.

Model	Parameters	6°C	10°C	20°C	40°C
Langmuir	k <sub>L</sub> (L/mg)	5.179E-06	0.001	1.923E-06	8.885E-07
	q <sub>m</sub> (mg/g)	5.467E+04	550.925	1.522E+04	9.752E+04
	R <sub>L</sub> (L/mg)	0.985	0.323	0.995	0.998
	R <sup>2</sup>	0.977	0.923	0.708	0.895

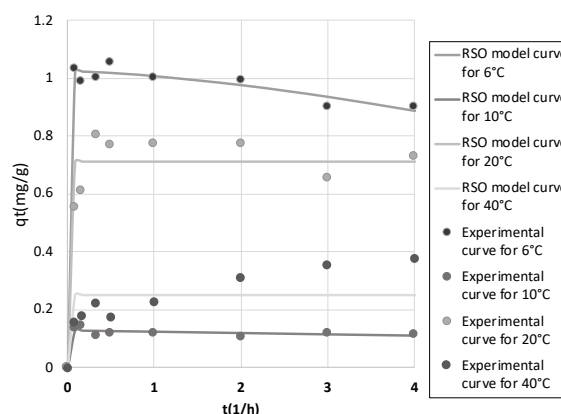
## II CONGRESO NACIONAL DE BIOMATERIALES

	$k_f(\text{mg}^{-1-1/n}\text{L}^{1/n}/\text{g})$	0.212	13.634	14.833	1.189
Freundlich	$n_f$	0.964	2.357	2.112	1.493
	$1/n_f$	1.037	0.424	0.473	0.670
	$R^2$	0.978	0.843	0.968	0.976
	$k_R$	0.281	0.298	11.834	1273.498
Rendlich-Petersom (R-P)	$b_R(\text{L}/\text{mg})$	0	2.265	0.550	0.230
	$a_R(\text{L}/\text{g})$	3.172E-04	1.490E-08	0.651	2365.073
	$R^2$	0.977	0.985	0.968	0.967
	$q_{\text{mBET}}(\text{mg}/\text{g})$	31698.732	41603.098	156095.344	41828.526
	$C_{\text{BET}}$	0.363	0.736	0.404	0.992
n-BET	$C_s$	44003.664	84418.425	2598.082	46585.378
	$n_{\text{BET}}$	4.445	3.313	0.019	0.048
	$R^2$	0.978	0.987	0.960	0.974
	BHJ	87051.897	147919.604	210277.386	32842.229
Harkins-Jura(H-J)	AHJ	4.925	6.106	6.116	6.772
	$C_s$	20.963	19.940	8.895	6.452
	$R^2$	0.907	0.704	0.899	0.912

For the Langmuir model, the low values obtained for the Langmuir's constant ( $K_L$ ) indicate that the energy for the adsorption is very low. The value very close 1 of the equilibrium parameters ( $R_L$ ) for the temperature of 10°C, indicates that the adsorption phenomenon is linear; for the other temperatures that have values near 1,  $R_L$  indicates a correct adsorption of the active compound occurs (Saadi, 2015). For the Freundlich model, as the values of Freundlich's exponent ( $n_f$ ) and constant ( $k_f$ ) are greater than 0, the data show favorable results for the adsorption (Liu, 2013). However, at 6 °C,  $k_f$  and  $n_f$  are closer to 0 than at other temperatures, which indicates that this temperature isn't the most suitable for the adsorption process.  $1/n_f$  indicates the adsorption intensity of adsorbate onto the adsorbent or surface heterogeneity (Kumara, 2014). The values between 0 and 1 indicates favorable adsorption isotherm and values of  $1/n_f$  above 1 are indicative of unfavorable adsorption, which is corresponding to the temperature of 6°C (Saadi, 2015). The Rendlich-Peterson model has three parameters: the R-P adsorption capacity constant ( $k_R$ ), the R-P isotherm constant ( $a_R$ ) and the exponent ( $b_R$ ) that is between 0 and 1. For experiments carried out at 6°C, 20°C and 40°C, the R-P equation is closer to becoming the Freundlich isotherm equation, since  $b_R$  is equal to or close to 0 (Kumara, 2014). The n-Brunauer-Emmett-Teller (BET) isotherm model is a theoretical model that extends the concept of the Langmuir isotherm to a multilayer adsorption system, where there is a maximum of n layers that can be adsorbed on the inner surface. The n-layers limit the adsorption, when the adsorption space is finite. The Harkins-Jura isotherm model describes a multilayer system, especially for a type II isotherm. At high concentrations, the Harkins-Jura model resembles the Halsey model to fit the experimental adsorption data, which may be due to the existence of a heterogeneous pore distribution. Of the three-parameter multilayer isotherms, the Harkins-Jura model is the best to fit the equilibrium experimental data (Saadi, 2015). Modelling the experimental data using n-BET models, where the constant  $n_{\text{BET}}$  says that the temperature of 6°C and 10°C are

a multilayer model ( $n_{\text{BET}} > 1.0$ ) and the temperatures of 20°C and 40°C are monolayer models.

The experimental data of the adsorption of curcumin on BNC fibers through time was modeled using pseudo N order (PNO) (see figure 2 and table 2).



**Figure 2.** Kinetic model curves that best fit curcumin adsorption on BNC fibers: (a) 6°C, (b) 10°C, (c) 20°C and (d) 40°C.

**Table 2.** Kinetic model parameters that best fit curcumin adsorption on BNC fibers

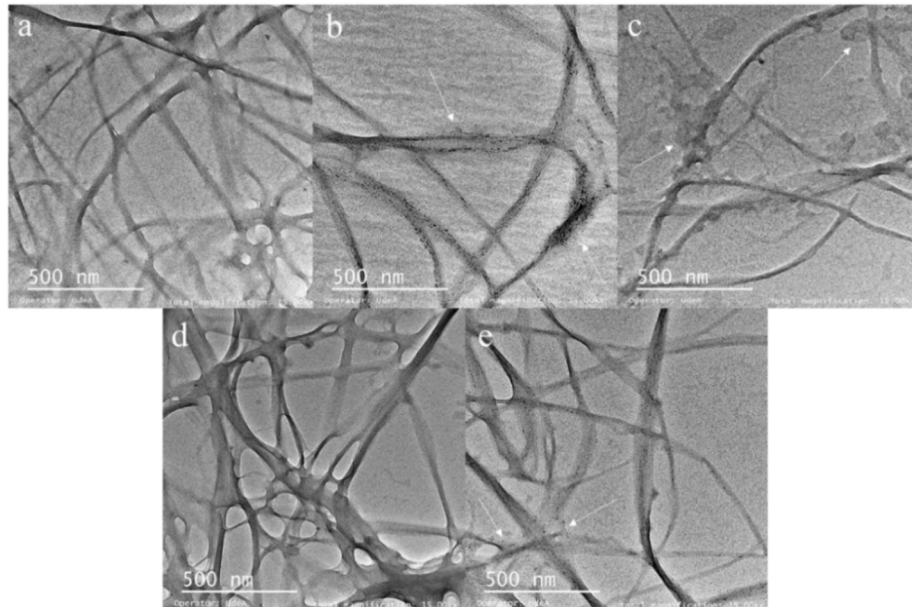
Model Parameters	6°C	10°C	20°C	40°C
$q_e(\text{mg}/\text{g})$	1.023	0.129	0.711	0.251
n	0.337	2.00E-5	0.440	0.213
$k_n(1/\text{s})$	182.614	223883.892	665594.696	438987.616
$R^2$	0.995	0.938	0.885	0.527

The pseudo N order (PNO) is used to measure the initial charge of particles on the surface to which they are adsorbed and their permanence on it as time passes. The value of the amount of pigment adsorbed in the equilibrium  $q_e$ , showed a

## II CONGRESO NACIONAL DE BIOMATERIALES

positive initial adsorption, although it is not exactly the value of  $q_t$  in the final time, which indicates that the equilibrium can occur in a time prior to that proposed for kinetics (Liu, 2014). According to the table at 20 °C the adsorption constant is the fastest compared to the others evaluated temperatures.

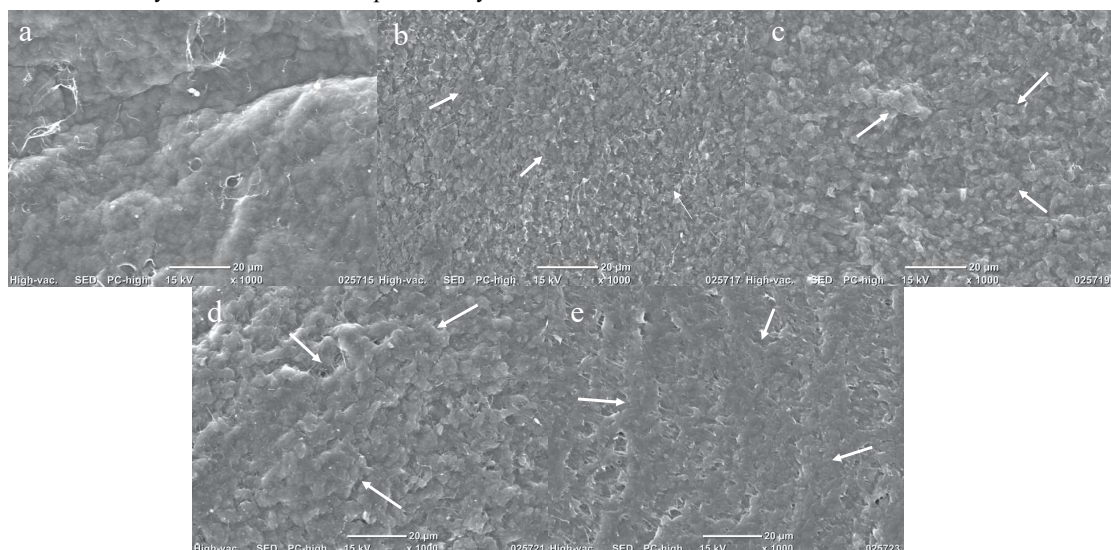
A characterization by transmission electron microscopy (TEM) was performed for each temperature to observe how the adsorption was carried out, as seen in figure 3.



**Figure 3.** TEM micrographs of (a) BNC fibers without curcumin and adsorbed curcumin on BNC fibers: (b) 6°C, (c) 10°C, (d) 20°C and (e) 40°C.

The figure 3 shows curcumin crystals settle on BNC fibers for 6 °C and 10 °C (see arrows). In the figure 3d and d it was possible to observe a uniform layer of curcumin on the BNC fibers for 20°C and 40°C, as predicted by Toth adsorption and n-BET models. A characterization by scanning electron microscopy (SEM) at low magnification to observe the morphology of the BNC curcumin drug delivery system (see figure 4). According to figure 4, the curcumin was properly encapsulated by being adhered to the surface of BNC (Figure 4 b-e.) fibers, without having generated agglomerations, with a homogeneous surface and without apparent disaggregation at micrometric scale. BNC fibers with encapsulated curcumin are less compacted and hornified than BNC alone (Fig. 4 a.). Phenomenon more apparent for 20 °C and 40 °C as shown in the grains indicated by the arrows. This encapsulation system

is ideal for a drug delivery system, since as soon as the pH of the medium changes, for example when it reaches the stomach or colon, the nanofibres open and allow the curcumin desorption while floating in the gastric conditions.



**Figure 4.** SEM micrographs of (a) BNC fibers without curcumin and adsorbed curcumin on BNC fibers: (b) 6°C, (c) 10°C, (d) 20°C and (e) 40°C.



Figure 5a show the FTIR spectra for the adsorbed curcumin at 6 °C, 10 °C, 20 °C and 40 °C on BNC.

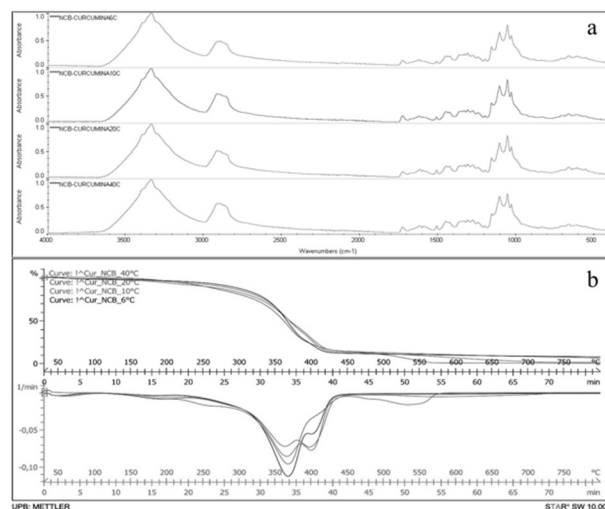


Figure 5. Chemical and thermal characterization (a) FT-IR and (b) TGA of adsorbed curcumin on BNC fibers

The IR spectrum of curcumin demonstrated stretching vibrations due to phenolic hydroxyl groups (-OH) at 3200-3500  $\text{cm}^{-1}$ , peaks at 2950 and 2900  $\text{cm}^{-1}$  originated from stretching vibrations of methyl ( $\text{CH}_3$ ) and methylene ( $\text{CH}_2$ ) groups, respectively (Siregar, 2018). At 1725  $\text{cm}^{-1}$  attributed to the vibration of the carbonyl bond ( $\text{C}=\text{O}$ ) accompanied by a small shoulder at 1762  $\text{cm}^{-1}$  due to Keto-enol tautomerism of curcumin compound (Zebib, 2010). Stretching vibration at 1490  $\text{cm}^{-1}$  associated with the aromatic  $\text{C}=\text{C}$  bond and a bending vibration at 1246  $\text{cm}^{-1}$  attributed to the phenolic  $\text{C}-\text{O}$  group (Ismail, 2014). The bending vibrations of  $\text{CH}_3$  and  $\text{CH}_2$  were also observed at 1339 and 1423  $\text{cm}^{-1}$ , respectively. Conjugated carbonyl group was observed at 1655  $\text{cm}^{-1}$ , lower than in unconjugated carbonyl and three bands at 1406, 1332, 1320  $\text{cm}^{-1}$  attributed to vibrational mode of  $\text{C}-\text{O}$  elongation of alcohol and phenol groups.

Compared with the reference spectrum of curcumin, all complexes show a great decrease in the intensity of the band c.a. 1725  $\text{cm}^{-1}$  ( $\text{C}=\text{O}$ ), as reported in the literature for similar systems, indicating an interaction between curcumin and BNC (Zebib, 2010).

Finally, TGA analysis (see figure 5.b.) The curcumin is thermally stable up to 160°C, decomposition is related to the deshydroxylation of OH groups by elimination of two water molecules (Zebib, 2010). With the encapsulation in of curcumin BNC, the degradation of the BNC-CUR system begins around 270°C, which implies that curcumin is protected against environmental conditions and is probably more stable. This DDS is of great interest due to the remarkable chemical, mechanical, structural, and biological properties, as well as their high degree of biocompatibility, biodegradability and bioavailability of the BNC, and the enhanced properties of curcumin such as stability.

## Conclusions

It was possible to model the system BNC-CUR by monolayer and multilayer mathematical models. In addition, it was found that the adsorption at 6°C and 10°C relates to a multilayer, and it depends on the temperature, while for the

temperature of 20°C and 40°C the adsorption relates to a monolayer model. From the three temperatures, the ideal the adsorption was reached at 20°C as shown by the TEM images and the parameters found in the adsorption kinetics.

Finally, thin layer drug delivery systems were developed with a homogeneous surface at low magnifications and high magnifications. The chemical analysis showed the presence of curcumin and BNC. Moreover, BNC improves the thermal stability of curcumin, going from 160°C to 270°C, thanks to the interactions between the two components of the controlled release system. With all of the above, BNC is a biomaterial with great potential for the development of curcumin drug delivery system for the chemoprevention of stomach cancer.

## Acknowledgments

The work has been funded by MINCIENCIAS, MINEDUCACIÓN, MINCIT and ICETEX, through the Program scientific ecosystem Cod. FP44842-211-2018 Project numbers 58674 and APSC 854-2020.

## References

- American Cancer Society** (2021). Key Statistics About Stomach Cancer. Available at: <https://www.cancer.org/cancer/stomach-cancer/about/key-statistics.html>
- American Cancer Society** (2021). Stomach Cancer Stages. Available at: <https://www.cancer.org/cancer/stomach-cancer/detection-diagnosis-staging/staging.html>
- American Cancer Society** (2020). Questions People Ask About Cancer. Available at: <https://www.cancer.org/cancer/basics/questions-people-ask-about-cancer.html>
- Chong Li, Jiancheng Wang, Yiguang Wang, Huile Gao, Gang Wei, Yongzhuo Huang, Haijun Yu, Yong Gan, Yongjun Wang, Lin Mei, Huabing Chen, Haiyan Hu, Zhiping Zhang, Yiguang Jin** (2019). "Recent progress in drug delivery system", *Acta Pharmaceutica Sinica B, Volume 9, Issue 6, Pages 1145-1162*, doi.org/10.1016/j.apsb.2019.08.003.
- Etemadi, A., Safiri, S., Sepanlou, S. G., Ikuta, K., Bisignano, C., Shakeri, R., Abbasi, N.** (2019). "The global, regional, and national burden of stomach cancer in 195 countries, 1990–2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease study 2017". *The Lancet Gastroenterology & Hepatology*. doi:10.1016/s2468-1253(19)30328-0
- Hassanalilou, T., Ghavamzadeh, S., & Khalili, L.** (2019). "Curcumin and Gastric Cancer: a Review on Mechanisms of Action". *Journal of Gastrointestinal Cancer*. doi:10.1007/s12029-018-00186-6
- Ismail, E. H., Sabry, D. Y., Mahdy, H., & Khalil, M. M. H.** (2014). "Synthesis and Characterization of some Ternary Metal Complexes of Curcumin with 1,10-phenanthroline and

## II CONGRESO NACIONAL DE BIOMATERIALES

- their Anticancer Applications”. *Journal of Scientific Research*, 6(3). doi:10.3329/jsr.v6i3.18750
- Kumara, N. T. R. N., Hamdan, N., Petra, M. I., Tennakoon, K. U., & Ekanayake, P.** (2014). “Equilibrium Isotherm Studies of Adsorption of Pigments Extracted from Kuduk-kuduk (*Melastoma malabathricum*L.) Pulp onto TiO<sub>2</sub> Nanoparticles”. *Journal of Chemistry*, 2014, 1–6. doi:10.1155/2014/468975
- Lakshmana PS & Suriyaprakash T** (2017). “Role of Natural Polymers in Drug Delivery Systems as Challenging Ailments”. *Juniper publishers. Volume 3 Issue 1. Novel approaches in drug designing and development*. ISSN: 2575-8942
- Liu, J., & Wang, X.** (2013). “Novel Silica-Based Hybrid Adsorbents: Lead(II) Adsorption Isotherms “. *The Scientific World Journal*, 2013, 1–6. doi:10.1155/2013/897159
- Liu, Junsheng & Wu, Linlin & Chen, Xinghua.** (2014). “Kinetic model investigation on lead(II) adsorption using silica-based hybrid membranes”. *Desalination and Water Treatment*. 54. 1-7. doi:10.1080/19443994.2014.898000.
- Mayo Clinic** (2020). Stomach cancer. Available at: <https://www.mayoclinic.org/diseases-conditions/stomach-cancer/symptoms-causes/syc-20352438>
- Molina-Ramírez, C., Enciso, C., Torres-Taborda, M., Zuluaga, R., Gañán, P., Rojas, O. J., & Castro, C.** (2018). “Effects of alternative energy sources on bacterial cellulose characteristics produced by *Komagataeibacter medellinensis*”. *International Journal of Biological Macromolecules*, 117, 735–741. doi:10.1016/j.ijbiomac.2018.05.195
- Patra, J. K., Das, G., Fraceto, L. F., Campos, E. V. R., Rodriguez-Torres, M. del P., Acosta-Torres, L. S., Shin, H.-S.** (2018). “Nano based drug delivery systems: recent developments and future prospects”. *Journal of Nanobiotechnology*, 16(1). doi:10.1186/s12951-018-0392-8
- Saadi, R., Saadi, Z., Fazaeli, R., & Fard, N. E.** (2015). “Monolayer and multilayer adsorption isotherm models for sorption from aqueous media”. *Korean Journal of Chemical Engineering*, 32(5), 787–799. doi:10.1007/s11814-015-0053-7
- Siregar, C., Martono<sup>1</sup>, S & Rohman<sup>1</sup>, A.** (2018). “Application of Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy coupled with multivariate calibration for quantitative analysis of curcuminoid in tablet dosage form”. *Journal of Applied Pharmaceutical Science Vol. 8(08), pp 151-156*. DOI: 10.7324/JAPS.2018.8821
- Stohs, S. J., Chen, O., Ray, S. D., Ji, J., Bucci, L. R., & Preuss, H. G.** (2020). “Highly Bioavailable Forms of Curcumin and Promising Avenues for Curcumin-Based Research and Application: A Review”. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 25(6), 1397. <https://doi.org/10.3390/molecules25061397>
- Tiwari, G., Tiwari, R., Bannerjee, S., Bhati, L., Pandey, S., Pandey, P., & Sriwastawa, B.** (2012). “Drug delivery systems: An updated review”. *International Journal of Pharmaceutical Investigation*, 2(1), 2. doi:10.4103/2230-973x.96920
- Wang, H., Khor, T. O., Shu, L., Su, Z. Y., Fuentes, F., Lee, J. H., & Kong, A. N.** (2012). “Plants vs. cancer: a review on natural phytochemicals in preventing and treating cancers and their druggability”. *Anti-cancer agents in medicinal chemistry*, 12(10), 1281–1305. <https://doi.org/10.2174/187152012803833026>
- Zebib, B., Mouloungui, Z., & Noirot, V.** (2010). “Stabilization of Curcumin by Complexation with Divalent Cations in Glycerol/Water System”. *Bioinorganic Chemistry and Applications*, 2010, 1–8. doi:10.1155/2010/292760
- Zielińska, A., Alves, H., Marques, V., Durazzo, A., Lucarini, M., Alves, T. F., ... Souto, E. B.** (2020). “Properties, Extraction Methods, and Delivery Systems for Curcumin as a Natural Source of Beneficial Health Effects”. *Medicina*, 56(7), 336. doi:10.3390/medicina56070336.

# INMOVILIZACIÓN DE NANOPARTÍCULAS DE PLATA SOBRE POLIVINILCLORURO PARA FABRICACIÓN DE DISPOSITIVOS MÉDICOS

YA Murillo Arias<sup>1</sup>, GA Cuervo Osorio<sup>2</sup>, N Marín Pareja<sup>3</sup>, CP Ossa Orozco<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Estudiante de Bioingeniería, Grupo de Investigación en Biomateriales, Universidad de Antioquia, yesenia.murillo@udea.edu.co, Medellín, Colombia.

<sup>2</sup>MSc. Profesor de Bioingeniería, Grupo de Investigación en Biomateriales, Universidad de Antioquia, giovanni.cuervo@udea.edu.co, Medellín, Colombia.

<sup>3</sup>PhD. Experta proyectos Tecnoparque Medellín SENA Grupo de Investigación en Gestión y Aplicación de la Ciencia y la Tecnología - GIGAT, nmarinp@sena.edu.co, Medellín, Colombia.

<sup>4</sup>PhD. Profesora Facultad de Ingeniería, Grupo de Investigación en Biomateriales Universidad de Antioquia. claudia.ossa@udea.edu.co, Medellín, Colombia.

## Introducción

El tubo orotraqueal es un dispositivo médico empleado para la aplicación de ventilación mecánica invasiva en pacientes que presentan fallas respiratorias. La neumonía asociada a la ventilación mecánica (NAV), se desarrolla después de la intubación orotraqueal y el inicio de la ventilación mecánica. Esta infección presenta alta incidencia en la Unidad de Cuidados Intensivos (UCI), y comúnmente se asocia con aumentos significativos en la duración de la estancia hospitalaria, con una prevalencia que oscila entre el 8 y el 28% de todas las infecciones adquiridas en los hospitales (Daengngam et al., 2019).

Una de las principales causas de morbilidad debido a la NAV, son las infecciones asociadas a los microorganismos que se localizan en las vías aéreas de los pacientes que requieren de ventilación mecánica, estos microorganismos representan un grave problema, debido a que colonizan la zona donde se encuentran y forman una biopelícula sobre la superficie del tubo orotraqueal, siendo capaces de resistir los mecanismos de defensa del huésped y el tratamiento con antibióticos, aumentando así el riesgo de complicaciones durante la estancia hospitalaria, debido a que contribuyen al deterioro en la salud del paciente e incluso causan la muerte (Daengngam et al., 2019).

Esta problemática ha sido estudiada a nivel mundial, sin embargo, las estrategias preventivas contra la adhesión bacteriana y la formación de la biopelícula no han evitado por completo el desplazamiento de estos microorganismos hacia los pulmones; ni han sido suficientes los estudios y modificaciones que se han realizado a estos dispositivos médicos para disminuir completamente la problemática (Bassi et al., 2015, Spapen et al., 2017, Jaillette et al., 2017). No obstante, la modificación superficial con agentes antimicrobianos es el enfoque más prometedor en la actualidad para inhibir la colonización bacteriana en la superficie del tubo orotraqueal (Busico et al., 2013, Schilardi et al., 2020). Actualmente, los tubos orotraqueales son fabricados en materiales transparentes que permiten ver las secreciones, como el polivinilcloruro (PVC) y silicona (Serna et al., 2012, Busico et al., 2013, Ochoa Franco, 2019).

Al realizar la modificación superficial a estos materiales que están en contacto con tejidos del cuerpo para que presenten propiedades antibacterianas, es necesario que el material tenga fundamentalmente propiedades tales como baja adherencia e hidrofobicidad, esta última es debido a que las

bacterias hidrofílicas muestran una mayor adhesión a las superficies hidrofílicas, dado que tienen la capacidad de absorber el medio hídrico que le rodea, por tanto, entre más hidrofóbico sea el material, menor será la adhesión de estos microorganismos sobre la superficie (Hasan et al., 2013, Cano Melguizo et al., 2019).

Por otro lado, durante las últimas décadas se ha informado que las nanopartículas plata (AgNPs) exhiben propiedades físicoquímicas excepcionales, y actividades biológicas elevadas, lo que posibilita su utilización en múltiples campos. Estas han demostrado gran importancia debido a su amplio espectro antimicrobiano contra varios patógenos, incluidos bacterias y hongos, tales como *Salmonella*, *Staphylococcus*, *Pseudomonas*, entre otras. Por lo anterior, las AgNPs han sido empleadas para modificar las propiedades de otros materiales que por sí solos no poseen propiedades antibacterianas (Ortiz et al., 2015, Osorio Echavarría, 2020). Estudios previos reportan el efecto antibacteriano de materiales a base de PVC donde incorporan AgNPs a través de un método de colado (Braga et al., 2018, Duta et al., 2020). Por otra parte, Daengngam et al. realizó la incorporación de AgNPs en la superficie de un tubo orotraqueal de PVC, donde la adición de las nanopartículas sobre el tubo fue llevada a cabo mediante inmersiones en un medio acuoso que contenía nitrato de plata. Al evaluar la eficiencia antibacteriana, se observó una reducción significativa en el crecimiento bacteriano (Braga et al., 2018, Daengngam et al., 2019, Duta et al., 2020). Otros estudios reportan modificaciones realizadas al PVC mediante la adición de AgNPs a la superficie del polímero, usando técnicas, tales como electrohilado, recubrimiento de vapor, implantación de iones o pulverización, entre otras. No obstante, es necesario tener claro que estos métodos son costosos o requieren mayor cantidad de material para la síntesis, lo cual puede afectar la transparencia del material que está siendo modificado (Braga et al., 2018).

Teniendo en consideración lo mencionado anteriormente, este trabajo tuvo como objetivo evaluar un proceso de modificación superficial en porciones de tubos orotraqueales comerciales fabricados con un polímero biocompatible polivinilcloruro (PVC), mediante el método químico de inmovilización de nanopartículas de plata AgNPs sintetizadas químicamente. Se verificó el éxito de la modificación química de la superficie y la posterior inmovilización de las nanopartículas, con análisis de los cambios superficiales del material evaluando la mojabilidad con la medición por ángulo de contacto y los cambios

químicos superficiales mediante FTIR. Se concluye que, el material modificado tiene potencial para mejorar las características de un material para su uso en la fabricación de tubos orotraqueales.

### Materiales y métodos

Para la síntesis de nanopartículas de plata, se empleó como agente precursor el nitrato de plata ( $\text{AgNO}_3$ ) marca PanReac 100% puro y como agente reductor, citrato trisódico dihidratado marca PanReac al 99% de pureza. En el proceso de inmovilización de las nanopartículas de plata sobre los tubos orotraqueales se usaron tubos fabricados por Covidien. Los reactivos empleados para este procedimiento fueron m-fenilendiamina y cisteamina de la marca Sigma-Aldrich, trimesoilo de cloruro de la marca Alfa Aesar al 98% de pureza, hexano y etanol de la marca PanReac.

### Síntesis de nanopartículas de plata

Se sintetizaron nanopartículas de plata (AgNPs) por vía química mediante reducción. Se llevaron 100 mL de agua destilada hasta una temperatura de  $94^\circ\text{C}$  con agitación magnética a 200 rpm, luego se agregó una solución de nitrato de plata al 0.1M, manteniendo la solución en agitación por 10 min. Una vez culminado este tiempo, se procedió a gotear una solución de citrato trisódico al 1% con bureta, sobre la solución preparada previamente. El volumen final de citrato trisódico agregado fue de 12.5 mL y esta fue preparada con agitación magnética por 5 minutos y sin temperatura. Cuando se terminó el goteo del citrato trisódico sobre la solución de nitrato de plata y agua, la solución presentó un viraje amarillo al punto final. Después de finalizar el goteo, la solución se dejó 3 minutos en agitación magnética y finalmente la solución se introdujo en un baño maría inverso, con el objetivo de detener la reacción.

### Caracterización de las nanopartículas de plata

Para analizar las nanopartículas de plata obtenidas, se emplearon las técnicas de espectroscopia de absorción de luz ultravioleta-visible (UV-Vis) en el equipo de UV-VIS MAPADA 3200 PC y microscopía electrónica de transmisión (TEM) en el equipo Tecnai F20 Super Twin TMP de FEI. Con las imágenes obtenidas mediante TEM, se hizo la medición de tamaño de partícula a 60 partículas que fueron seleccionadas empleando el software Image J.

### Inmovilización de nanopartículas de plata sobre polivinilcloruro (PVC)

Inicialmente se tomaron porciones de 1 cm de largo de tubos orotraqueales comerciales de PVC, los cuales fueron sumergidos en una solución de 2g de m-fenilendiamina (MPD) y 98 mL de agua destilada durante 3 minutos. Luego fueron inmersos en una solución de 0.1 mL de trimesoilo de cloruro (TMC) y 152 mL de hexano puro durante 30 segundos para formar una película delgada de poliamida (PA) en la superficie de PVC. El material fue lavado con hexano y etanol puros para eliminar excedentes y posteriormente se sumergió en una solución acuosa de 77.15 mg de cisteamina y 50 mL de agua destilada por 4 h para obtener el grupo tiol (SH) en la superficie del material. Para concluir las muestras fueron inmersas en 50 mL de solución madre de nanopartículas de plata (AgNPs) durante 24 h, con el objetivo de que las nanopartículas formarán enlaces

covalentemente unidos a los grupos tiol presentes en la superficie del PVC (Yin et al., 2013, Maharubin et al., 2019).

### Caracterización del polivinilcloruro (PVC) modificado superficialmente

La modificación superficial de las muestras de PVC fue verificada evaluando la mojabilidad con la medición por triplicado del ángulo de contacto, usando el equipo marca Dataphysics OCA 15EC con un tamaño de gota de 0.5  $\mu\text{L}$  de agua destilada. Los cambios químicos superficiales fueron analizados por espectroscopia de infrarrojo por transformada de Fourier FTIR empleando el equipo SHIMATZU IR-TRACER 100 en un rango de barrido entre 400 y  $4000\text{ cm}^{-1}$  y un número de ciclos de 24.

### Resultados y discusión

#### Síntesis de nanopartículas de plata

En la Figura 1 se presenta la imagen de la solución de AgNPs obtenida después del proceso de síntesis, en donde se evidencia la coloración amarilla típica de este tipo de nanopartículas (Cuervo et al., 2020). Se resalta que, al emplear la metodología desarrollada se observó gran reproducibilidad en los resultados.



Figura 1. Coloración de la solución que contiene AgNPs.

#### Caracterización de nanopartículas de plata

##### Espectroscopia ultravioleta visible (UV-Vis)

En la Figura 2 se presenta el espectro obtenido para el análisis UV-Vis, en donde es posible evidenciar que en el rango de los 420-450 nm se da la formación del típico pico de la resonancia del plasmón superficial, el cual indica la formación de las AgNPs, según lo reportado por la literatura (Sánchez, 2017, Cuervo et al., 2020).

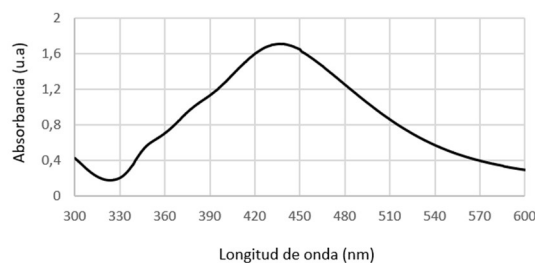


Figura 2. Espectroscopia UV-Vis nanopartículas de plata.

##### Microscopía electrónica de transmisión (TEM)

De las micrografías TEM presentadas en la Figura 3 es posible evidenciar que las nanopartículas presentan una geometría cuasi esférica. Además, es posible observar las

nanopartículas de manera individual permitiendo así realizar un conteo de una población de nanopartículas y la determinación estadística de su tamaño promedio. Es necesario aclarar que de las micrografías se tiene un tamaño promedio para las partículas, pero también existen partículas de un tamaño menor al promedio como se observa en la Figura 3.b, donde se ven partículas mucho más pequeñas.

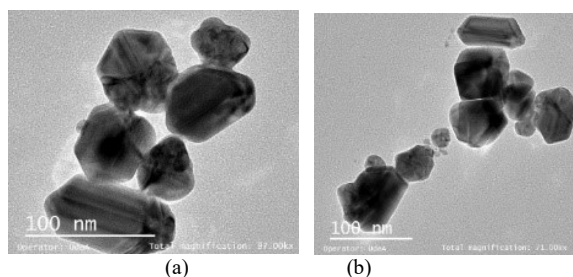


Figura 3. Micrografías TEM de las nanopartículas de plata sintetizadas.

En la Figura 4 se muestra el histograma de frecuencia del tamaño de partícula para las 60 mediciones realizadas con el software Image J, donde la mayoría de las partículas se encuentran entre un tamaño de 59,29 y 70,71 nm; con un tamaño promedio de 59,67 nm.

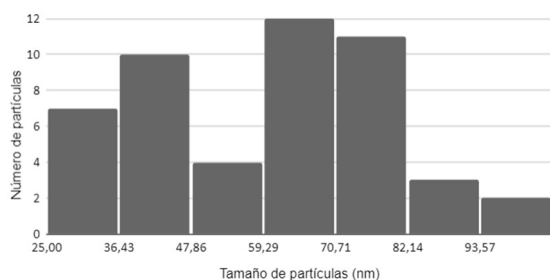


Figura 4. Histograma para 60 mediciones realizadas a la muestra AgNPs.

De los resultados obtenidos en esta sección, resulta posible la utilización de las partículas de plata para la inmovilización sobre PVC, debido a que en la literatura se reporta un nanomaterial como un material que contiene partículas sueltas o formando un agregado en el que el 50% o más de las partículas presente una o más dimensiones externas en el intervalo de tamaños comprendido entre 1 y 100 nm (Camacho et al., 2016). Además, estudios previos en los cuales se llevó a cabo modificaciones de materiales poliméricos con nanopartículas de plata reportan tamaños de partículas comprendidos entre este rango (Oliveira et al., 2014, Daengngam et al., 2019, Duta et al., 2020).

### Inmovilización de nanopartículas de plata sobre polivinilcloruro (PVC)

En la Figura 5 se presenta la imagen de las fracciones de los tubos de PVC comerciales, luego de realizar la modificación química de la superficie y la posterior inmovilización de AgNPs sobre la superficie.



Figura 5. Porciones de tubos de PVC con AgNPs inmovilizadas.

La modificación superficial realizada revela que las porciones de tubos originalmente transparentes presentan una apariencia translúcida con el tono marrón amarillento, el cual es característico de AgNPs e indica la correcta inmovilización de AgNPs en la superficie de la muestra (Yin et al., 2013, Daengngam et al., 2019).

### Caracterización del polivinilcloruro (PVC) modificado superficialmente

#### Ángulo de contacto

En la Figura 6 se presenta el valor de los ángulos de contacto de las superficies de PVC. De los resultados obtenidos, es posible confirmar que las porciones de tubo de PVC son hidrofóbicas puesto que el ángulo obtenido es muy cercano a 90°. Lo anterior, coincide con los resultados obtenidos en un estudio previo que se realizó sobre la superficie de tubos de PVC de grado médico (Daengngam et al., 2019).

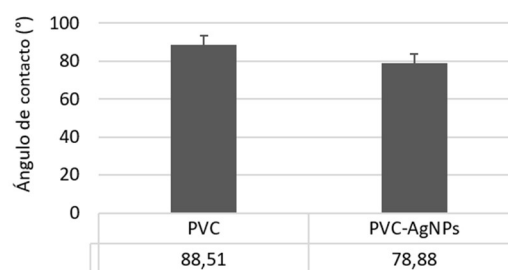


Figura 6. Comparación en el ángulo de contacto para muestras de PVC y PVC-AgNPs.

Adicionalmente, en la Figura 6 es posible evidenciar los valores para los ángulos de contacto obtenidos después de realizar la inmovilización de las AgNPs sobre la superficie de PVC. Tras la modificación con AgNPs, los valores de ángulo de contacto se redujeron, sin embargo, el cambio generado no es significativo, debido a que la diferencia en los ángulos de contacto es de aproximadamente 10.88%. Lo anterior se atribuye a la presencia de AgNPs sobre la superficie del material, que generan un incremento en la polaridad de la superficie, convirtiéndola en hidrofílica, por tanto, el ángulo disminuye. Estos resultados son consistentes con los informes en la literatura debido a que las AgNPs se acumulan en la superficie, lo que implica un efecto más directo sobre la hidrofobicidad de la superficie. (Esteban Tejeda, L., 2012, Yin et al., 2013, Jiménez, 2018).

### Espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FTIR)

En la figura 7 se muestran los resultados del análisis FTIR realizado a las superficies de PVC sin tratamiento. De los resultados obtenidos, es posible verificar que el material posee hidrocarburos clorados correspondientes a los picos característicos distintivos de C-Cl observados entre 600 y 650  $\text{cm}^{-1}$ , de igual manera se observaron picos entre 1000 y 1100  $\text{cm}^{-1}$  característicos del enlace C-C, así como la terminal  $\text{CH}_3$  entre 1400 y 1425  $\text{cm}^{-1}$ . Además, los picos entre y 2910 y 2970  $\text{cm}^{-1}$  se atribuyen al modo de vibración de estiramiento asimétrico de la terminal  $\text{CH}_2$ . Estos resultados se encuentran dentro del rango reportado por la literatura para el PVC (Daengngam et al., 2019, Pandey et al., 2016). Adicionalmente, se presenta el espectro obtenido para

el análisis de la composición química de las superficies de los tubos de PVC comerciales en cada etapa del proceso de modificación química de la superficie y posterior inmovilización de AgNPs. De los espectros obtenidos es posible evidenciar la presencia de picos adicionales después de la formación de la película de poliamida (Espectro PVC-PA) entre 1450 y 1650  $\text{cm}^{-1}$ , entre los cuales destacan el pico alrededor de 1650  $\text{cm}^{-1}$  generado por una amida I, donde las vibraciones de estiramiento del enlace C=O es característico de la amida, el pico a 1610  $\text{cm}^{-1}$  es característico del estiramiento del enlace N-H y el pico a 1547  $\text{cm}^{-1}$  para una amida II, donde se da las vibraciones de flexión del enlace N-H en el plano y el estiramiento del enlace C-N. Finalmente, alrededor de 1450  $\text{cm}^{-1}$  se da el estiramiento C=O y la flexión O-H del ácido carboxílico (Poletto et al., 2012, Yin et al., 2013, Ndesendo et al., 2015, Munje et al., 2017). Lo anterior confirma la formación de la película de PA sobre la superficie de PVC.

Por otra parte, en el espectro PVC-SH donde se debía identificar la formación del grupo tiol, que debería mostrar una banda entre 2540-2560  $\text{cm}^{-1}$ , no se evidencia, no presentando diferencias con respecto a la etapa anterior. Esto puede ser debido a la baja sensibilidad del grupo tiol en FTIR

debido a la alta polarización del azufre o debido a que la cantidad de grupos funcionales generados sobre la superficie fueron pocos, estos resultados coinciden con lo reportado en la literatura (Yin et al., 2013).

Finalmente, se observó un cambio apreciable entre 3200 y 3600  $\text{cm}^{-1}$  después de la formación de PA y al agregar las AgNPs, esta región corresponde a las frecuencias de vibración molecular de estiramiento del grupo amida (N-H) (Poletto et al., 2012, Ndesendo et al., 2015, Munje et al., 2017). Lo anterior debido a que al sumergir las muestras en cisteamina que presenta en su estructura los grupos funcionales aminas (N-H) y tiol (SH), va a presentar picos debidos al grupo amina, sin embargo, al agregar las AgNPs recién sintetizadas, estas se van a unir a la superficie de la muestra a través del enlace químico Ag-S (Yin et al., 2013). Por otra parte, para el caso de las AgNPs, los grupos funcionales C=O y N-H característicos de las amidas pueden ser responsables de evitar la aglomeración de las partículas y estabilizarlas en el medio, además de generar un recubrimiento en las nanopartículas, esto debido a que puede existir una interacción entre estos grupos funcionales con los iones de plata (Narasimha et al., 2013, Akintola et al., 2020).

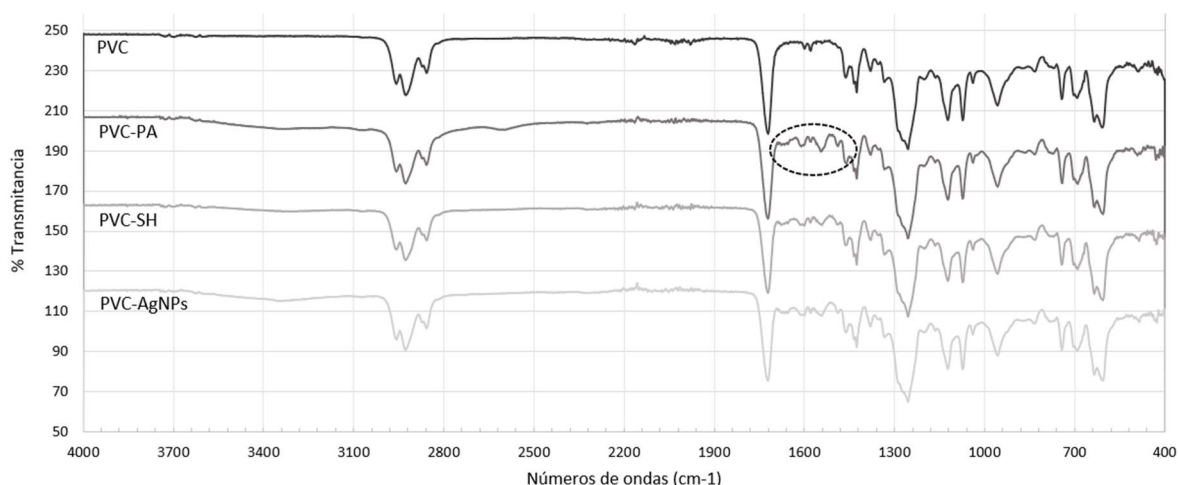


Figura 7. Espectros FTIR durante el proceso de la inmovilización de AgNPs sobre PVC.

## Conclusiones

El proceso de síntesis química de nanopartículas de plata concluyó con la síntesis de un tipo de partículas con tamaño promedio de 59,67 nm, y con características de tamaño óptimas para su potencial uso en modificaciones superficiales.

Es posible concluir que el PVC con el cual está fabricado el tubo orotraqueal comercial, es hidrofóbico, además, la disminución en el ángulo de contacto después de la modificación superficial se atribuye a la inmovilización de AgNPs, debido a que generan un cambio en la polaridad de la muestra.

En las porciones de tubos de PVC, fue posible evidenciar de manera visual la presencia de AgNPs en la superficie. Lo anterior, fue corroborado con los resultados obtenidos por FTIR, debido a que los grupos funcionales presentes después de la inmovilización de las AgNPs, los cuales tienen la capacidad de unirse al ion plata de modo que actúan como

agentes de recubrimiento, para prevenir la aglomeración de las partículas y estabilizarlas en la superficie del material.

## Agradecimientos

Los autores desean agradecer al proyecto P06 de la convocatoria G8-2020 por la financiación. Además, un agradecimiento al Grupo de Investigación en Biomateriales de la Universidad de Antioquia y al Tecnoparque SENA nodo Medellín.

## Referencias

- Akintola, A. O., Kehinde, B. D., Ayoola, P. B., Adewoyin, A. G., Adedosu, O. T., Ajayi, J. F., & Ogunsona, S. B. (2020, March). Antioxidant properties of silver nanoparticles biosynthesized from methanolic leaf extract of *Blighia sapida*. In *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering* (Vol. 805, No. 1, p. 012004). IOP Publishing.
- Bassi, G. L., Luque, N., Martí, J. D., Xiol, E. A., Di Pasquale, M., Giunta, V., ... & Torres, A. (2015). Endotracheal tubes for critically ill patients: An in vivo

- analysis of associated tracheal injury, mucociliary clearance, and sealing efficiency. *Chest*, 147(5), 1327-1335.
- Braga, L. R., Rangel, E. T., Suarez, P. A. Z., & Machado, F.** (2018). Simple synthesis of active films based on PVC incorporated with silver nanoparticles: Evaluation of the thermal, structural and antimicrobial properties. *Food Packaging and Shelf Life*, 15, 122–129. <https://doi.org/10.1016/J.FPSL.2017.12.005>
- Busico, M., Vega, L., Plotnikow, G., & Tiribelli, N.** (2013). Tubos endotraqueales: revisión | Revista Argentina de Terapia Intensiva. *Revista Argentina de Terapia Intensiva*. <https://revista.sati.org.ar/index.php/MI/article/view/341>
- Camacho, Á., Duarte, A., Dubay, D., Forero, E., González, E., Jaramillo, F., ... & Urquijo, W.** (2016). Definition of Nanomaterials for Colombia. *Revista Colombiana de Química*, 45(1), 15-20.
- Cano Melguizo, A., Castro Floréz, S. A.,** (2019). Evaluación de la adhesión bacteriana a la superficie de arcos de acero inoxidable de uso ortodóncico modificados siguiendo un enfoque biomimético.
- Bahije L, Benyahia H, El Hamzaoui S, Ebn Touhami M, Bengueddour R, Rerhrhaye W, et al.** Behavior of NiTi in the Presence of Oral Bacteria: Corrosion by Streptococcus Mutans. *Int Orthod*. 2011;9(1):110–9. <https://repository.ucc.edu.co/handle/20.500.12494/7652>
- Cuervo-Osorio, G. A., Escobar-Jaramillo, M., & Ossa-Orozco, C. P.** (2020). Diseño factorial 2k para la optimización de la síntesis de nanopartículas de plata para su aplicación en biomateriales. *Revista Ion*, 33(1), 17-32.
- Daengngam, C., Lethongkam, S., Srisamran, P., Paosen, S., Wintachai, P., Anantravanit, B., Vattanavanit, V., & Voravuthikunchai, S.** (2019). Green fabrication of antibacterial biofilm layer on endotracheal tubing using silver nanoparticles embedded in polyelectrolyte multilayered film. *Materials Science and Engineering: C*, 101, 53–63. <https://doi.org/10.1016/J.MSEC.2019.03.061>
- Duta, O., Ficai, A., & FICAI, D.** (2020). PVC modification by incorporating silver nanoparticles on the surface. *U.P.B. Sci. Bull., Series B*, 82(3), 2020. [https://www.scientificbulletin.upb.ro/rev\\_docs\\_arhiva/full2\\_4f\\_173087.pdf](https://www.scientificbulletin.upb.ro/rev_docs_arhiva/full2_4f_173087.pdf)
- Esteban Tejada, L.** (2012). Actividad biocida de vidrios sodocálcicos conteniendo nanopartículas de plata o cobre.
- Hasan, J., Crawford, R. J., & Ivanova, E. P.** (2013). Antibacterial surfaces: the quest for a new generation of biomaterials. *Trends in Biotechnology*, 31(5), 295–304. <https://doi.org/10.1016/J.TIBTECH.2013.01.017>
- Jaillette, E., Girault, C., Brunin, G., Zerimech, F., Behal, H., Chiche, A., ... & Nseir, S.** (2017). Impact of tapered-cuff tracheal tube on microaspiration of gastric contents in intubated critically ill patients: a multicenter cluster-randomized cross-over controlled trial. *Intensive care medicine*, 43(11), 1562-1571.
- Jiménez, L. M.** (2018). Estudio del efecto de la incorporación superficial de nanopartículas de plata sobre las propiedades físicas y antimicrobianas de películas multicapa y oxo-degradables.
- Maharubin, S., Nayak, C., Phatak, O., Kurhade, A., Singh, M., Zhou, Y., & Tan, G.** (2019). Polyvinylchloride coated with silver nanoparticles and zinc oxide nanowires for antimicrobial applications. *Materials Letters*, 249, 108-111.
- Munje, R. D., Muthukumar, S., Jagannath, B., & Prasad, S.** (2017). A new paradigm in sweat based wearable diagnostics biosensors using Room Temperature Ionic Liquids (RTILs). *Scientific reports*, 7(1), 1-12.
- Narasimha, G., Alzohairy, M., Khadri, H., & Mallikarjuna, K.** (2013). Extracellular synthesis, characterization and antibacterial activity of Silver nanoparticles by Actinomycetes isolate.
- Ndesendo, V. M., Choonara, Y. E., Meyer, L. C., Kumar, P., Tomar, L. K., Tyagi, C., ... & Pillay, V.** (2015). In vivo evaluation of a mucoadhesive polymeric caplet for intravaginal anti-HIV-1 delivery and development of a molecular mechanistic model for thermochemical characterization. *Drug development and industrial pharmacy*, 41(8), 1274-1287.
- Ochoa Franco, M. F.** (2019). Neumotaponador de tubo endotraqueal con inflado controlado a partir de una variable diferente a su presión interna.
- Oliveira, R. N., Rouzé, R., Quilty, B., Alves, G. G., Soares, G. D. A., Thiré, R. M. S. M., & McGuinness, G. B.** (2014). Mechanical properties and in vitro characterization of polyvinyl alcohol-nano-silver hydrogel wound dressings. *Interface focus*, 4(1), 20130049.
- Ortiz, G., Dueñas, C., & Garay, M.** (2015). Neumonía asociada a la ventilación mecánica: prevención, diagnóstico y tratamiento. *Acta Colombiana de Cuidado Intensivo*, 15(4), 312–321. <https://doi.org/10.1016/J.ACCL.2015.09.006>
- Osorio Echavarría, J.** (2020). Mejoramiento de la síntesis de nanopartículas de plata a partir del hongo ligninolítico anamorfo *rl de bjerkandera sp* y su evaluación para aplicación en apósitos. [http://bibliotecadigital.udea.edu.co/bitstream/10495/15557/2/OsorioJeronimo\\_2020\\_NanopartículasPlataHongo.pdf](http://bibliotecadigital.udea.edu.co/bitstream/10495/15557/2/OsorioJeronimo_2020_NanopartículasPlataHongo.pdf)
- Pandey, M., Joshi, G. M., Mukherjee, A., & Thomas, P.** (2016). Electrical properties and thermal degradation of poly(vinyl chloride)/polyvinylidene fluoride/ZnO polymer nanocomposites. *Polymer International*, 65(9), 1098-1106.
- Poletto, P., Duarte, J., Lunkes, M. S., Santos, V. D., Zeni, M., Meireles, C. S., ... & Bottino, A.** (2012). Evaluation of transport characteristics in polyamide 66 membranes prepared with different solvents. *Polímeros*, 22(3), 273-277.
- Sánchez, M.** (2017). Nanopartículas de plata: preparación, caracterización y propiedades con aplicación en inocuidad de los alimentos.
- Schilardi, P. L., & Pissinis, D. E.** (2020). Tratamiento de la Neumonía Asociada a la Ventilación Mecánica: cofactor de mortalidad en pacientes COVID-19 positivos. *Innovación y Desarrollo Tecnológico y Social (IDTS)*, 2.

## II CONGRESO NACIONAL DE BIOMATERIALES

**Serna, M. B., Paz, D., & Mariscal, M. L.** (2012). Descripción de los Tubos Endotraqueales. Anestesia.Org. <https://anestesiario.org/2012/descripcion-de-los-tubos-endotraqueales/>

**Spapen, H. D., Suys, E., Diltor, M., Stiers, W., Desmet, G., & Honoré, P. M.** (2017). A newly developed tracheal tube offering 'pressurised sealing' outperforms currently available tubes in preventing cuff leakage: a benchtop study. *European Journal of Anaesthesiology (EJA)*, 34(7), 411-416.

**Yin, J., Yang, Y., Hu, Z., & Deng, B.** (2013). Attachment of silver nanoparticles (AgNPs) onto thin-film composite (TFC) membranes through covalent bonding to reduce membrane biofouling. *Journal of membrane science*, 441, 73-82.



# MATERIAL COMPUESTO DE SILICONA CON NANOPARTÍCULAS DE PLATA PARA SU USO EN LA FABRICACIÓN DE DISPOSITIVOS MÉDICOS RESPIRATORIOS

L Urrea Vélez<sup>1</sup>, GA Cuervo Osorio<sup>2</sup>, D Correa Castaño<sup>3</sup>, N Marín Pareja<sup>4</sup>, CP Ossa Orozco<sup>5</sup>

<sup>1</sup>Estudiante de Bioingeniería, Grupo de Investigación en Biomateriales, Universidad de Antioquia, laura.urrea@udea.edu.co, Medellín, Colombia.

<sup>2</sup>MSc. Profesor de Bioingeniería, Grupo de Investigación en Biomateriales, Universidad de Antioquia, giovanni.cuervo@udea.edu.co, Medellín, Colombia.

<sup>3</sup>Gerente Empresa MasCapacidad, Medellín, Colombia

<sup>4</sup>PhD. Experta proyectos Tecnoparque Medellín SENA Grupo de Investigación en Gestión y Aplicación de la Ciencia y la Tecnología - GIGAT, nmarinp@sena.edu.co, Medellín, Colombia.

<sup>5</sup>PhD. Profesora Facultad de Ingeniería, Grupo de Investigación en Biomateriales Universidad de Antioquia. claudia.ossa@udea.edu.co, Medellín, Colombia.

## Introducción

Las Unidades de Cuidados Intensivos (UCI) son las áreas de mayor importancia en un hospital debido a los múltiples procedimientos invasivos o no invasivos a los que son sometidos los pacientes que ingresan a ella (Cifuentes, Y., et al., 2008). Aproximadamente del 65% de estos pacientes necesitan un recurso terapéutico de soporte vital como lo es la ventilación mecánica (VM) (Moreira, H. E., 2017).

La neumonía asociada a la ventilación mecánica (NAV), es un grave problema de salud a nivel nacional e internacional en pacientes críticamente enfermos dentro de las UCI, debido a que presentan una morbimortalidad de alrededor del 33,33%, registrando muertes diariamente del 1% en pacientes intubados durante el primer mes de ventilación mecánica (Chastre, J., et al., 1984)( Jenkins Lonidier, L., 2021).

En muchos de los pacientes con neumonía que son sometidos a VM a través de un tubo orotraqueal (TOT) y que perduran intubados por más de 48 horas, la incidencia de neumonía es 3 veces mayor, respecto a los pacientes con ventilación no invasiva (Hunter, J. D., 2012) (Calzada Palacio, L., 2012). Cuando la neumonía relacionada con el TOT se prolonga, las bacterias colonizan la orofaringe provocando modificaciones en su adherencia de las superficies mucosas. Estas secreciones se comienzan a fijar lentamente sobre la superficie del neumataponador, el cual hace parte del tubo orotraqueal, y penetran lentamente en el interior de la vía aérea y finalmente llegan al alvéolo pulmonar ocasionando una infección respiratoria (Hunter, J. D., 2012).

Los TOT constan de dos partes: una es la conexión que se conecta al ventilador mecánico, y la otra es el cuerpo en el cual se encuentra un neumataponador que tiene como función inflarse para sellar la tráquea y mantener una ventilación con presión positiva, reduciendo así la aspiración del contenido gástrico al momento de que haya una intubación en un paciente. Cuando el neumataponador alcanza presiones superiores a 30 mmHg altera la perfusión capilar de la mucosa y produce isquemia y daño celular, y con esto se produce la NAV (Ávalos A., et al., 2013).

Arthur Guedel y Ralph Waters en 1928 diseñaron y desarrollaron el primer TOT integrado con un neumataponador. El material del TOT y del neumataponador

era caucho; y el neumataponador era clasificado como de alta presión y bajo volumen, además tenía forma cónica, lo que ocasiona una deformación en el contorno normal de la tráquea (Delgado Gómez, F., et al, 2017). Muchos de esos neumataponadores causaron lesiones de la mucosa traqueal y por ello surgió la idea de fabricar neumataponadores de baja presión y alto volumen con un área superficial de contacto mayor que reduce la lesión de la mucosa traqueal. En la actualidad, los neumataponadores están siendo fabricados en siliconas biocompatibles, los cuales son más suaves, de forma cilíndrica, y generan menos costos de fabricación y mejor protección contra la aspiración de su contenido gástrico (Busico, M., et al., 2013).

Aunque se han realizado mejoras en el material, aún persiste el problema de la adhesión de microorganismos. La opción de adicionar agentes antimicrobianos, como las nanopartículas de plata (AgNPs), posibilita tener un material para la fabricación de neumataponadores con un mejor desempeño. En estudios para el desarrollo de otras aplicaciones, Chong, W. X., et al. (2021) evaluaron el efecto antimicrobiano de AgNPs en silicona maxilofacial contra *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans* y biofilms de especies mixtas, donde las AgNPs proporcionaron eficacia contra ambas cepas antimicrobianas, la lixiviación de iones de plata y la internalización celular. Meran et. al (2018), utilizaron silicona comercial cubierta con nanopartículas de plata para desarrollar una prótesis facial y evaluar la biocompatibilidad con los fibroblastos dérmicos humanos y la eficacia antifúngica contra *Candida albicans*, encontrando biocompatibilidad con las células *in vitro* y propiedades antifúngicas.

Es así, como en este trabajo se propone el desarrollo de un material compuesto de silicona con nanopartículas de plata para la potencial fabricación de dispositivos médicos como los neumataponadores y la evaluación de sus propiedades morfológicas y superficiales.

## Materiales y métodos

### Síntesis de nanopartículas de plata

Se sintetizaron nanopartículas de plata siguiendo un protocolo modificado de Cuervo et al (Cuervo Osorio, G. et

## II CONGRESO NACIONAL DE BIOMATERIALES

al., 2020) mediante reducción química con nitrato de plata como precursor en solución al 0.1 M y como agente reductor citrato trisódico dihidratado en una solución al 1%, ambos reactivos químicos de grado analítico de la marca PanReac applichem. Se inició con 100 mL de agua destilada a 100 °C con 200 rpm de agitación magnética constante; posteriormente, se adicionó el nitrato de plata y luego de 10 minutos de agitación, se agregó el citrato trisódico mediante un goteo lento con bureta. Después de finalizado el goteo, la solución se dejó por 3 minutos más a una temperatura de 100 °C y a 200 rpm de agitación, hasta obtener una solución de un color amarillo. Finalmente se hizo un choque térmico en un baño maría inverso para detener la reacción y la solución se almacenó a 4°C en un recipiente donde no ingresara luz.

### Caracterización de las nanopartículas de plata

Las nanopartículas obtenidas fueron analizadas mediante espectrofotometría UV-VIS en el equipo MAPADA 3200 PC haciendo un barrido entre una longitud de onda de 300 y 600 nm, verificando el pico característico de plasmón superficial de este tipo de nanopartículas, entre 400 – 450 nm, el cual indica la formación de las nanopartículas de plata. Por otro lado, se verificó el tamaño de las nanopartículas usando el microscopio electrónico de transmisión (TEM) en el equipo Tecnai F20 Super Twin TMP del FEI. Las imágenes obtenidas fueron analizadas utilizando el software Imagen J, siendo medidas 100 nanopartículas de plata, para obtener un valor promedio del tamaño.

### Fabricación del material compuesto silicona-AgNPs

Para garantizar una buena mezcla de las nanopartículas de plata con la silicona, polímero que es inmiscible en soluciones acuosas, la solución de nanopartículas de plata debió ser previamente secada; para tal objetivo se evaluaron dos técnicas: concentración al vacío y liofilización (Ali, M., et al., 2016).

Para la técnica de concentración al vacío se utilizó el equipo SpeedVac® Concentrator Savant SPD111V, Thermo Scientific, el cual se caracteriza por realizar un proceso conjunto de concentración y secado de pequeños volúmenes. Se hizo un centrifugado a una velocidad de 15000 rpm, y a su vez se calentó la solución de nanopartículas de plata a una temperatura de 80 °C, durante el tiempo que fue necesario hasta obtener una separación y evaporación total del agua. Por su parte, la liofilización consistió en someter la solución de nanopartículas de plata previamente congelada a -20 °C, a un vacío de -180 milibar a -87 °C en el equipo Labconco 2.5L; para lograr la sublimación del agua y separarla de las nanopartículas de plata.

Por último, la elaboración del material se realizó utilizando un material compuesto de silicona comercial VST-HD 50 con 1% en peso de nanopartículas de plata secas, mezclado manualmente durante 2 minutos. Para eliminar las burbujas generadas por la mezcla se utilizó una bomba de vacío y finalmente se dejó secar a temperatura ambiente por 8 horas.

### Caracterización del material compuesto silicona-AgNPs

Se observó la distribución y forma de las nanopartículas de plata inmersa en la silicona mediante un estereoscopio de

marca Zeiss Jena a un aumento de 16X para la muestra liofilizada, la obtenida por secado al vacío y para la silicona sola. Un proceso similar se realizó con un microscopio óptico invertido de marca Motic AE2000, para un mismo aumento de 4X, los análisis fueron realizados por triplicado.

La mojabilidad de la silicona con las AgNPs y de la silicona sola, fue analizada mediante el equipo de ángulo de contacto DataPhysics OCA 15EC, con un tamaño de gota de agua destilada de aproximadamente 0.5 µL. Esta prueba se realizó por triplicado.

Con la finalidad de determinar los grupos funcionales y componentes principales de la silicona con y sin nanopartículas, se procedió a realizar un análisis infrarrojo de una porción de cada muestra mediante ATR usando un equipo PerkinElmer Spectrum FT-IR en un rango de barrido entre 400 y 4000 cm<sup>-1</sup>.

## Resultados y discusión

### Síntesis de nanopartículas de plata

En la figura 1 se observa la solución de nanopartículas de plata obtenida con ayuda del protocolo anteriormente descrito, la cual está caracterizada por tener un color amarillo típico de este tipo de síntesis (Cuervo-Osorio, G. et al., 2020).

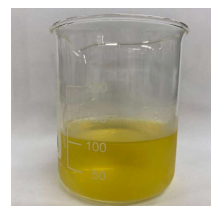


Figura 1. Muestra obtenida por reducción química de nanopartículas de plata.

### Caracterización de las nanopartículas de plata

En la Figura 2, se encuentran el espectro del análisis de espectrofotometría UV-VIS. Se observa un máximo de absorción a una longitud de onda de 432 nm, resultado que concuerda con lo reportado en la literatura donde se atribuye la aparición de un pico dentro del rango de 400 a 450 nm como indicativo de la presencia de AgNPs (J. Morales, et al., 2009).

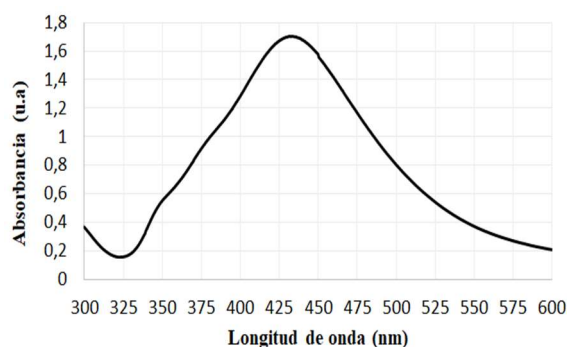


Figura 2. Espectro UV-VIS de las nanopartículas de plata.

En la Figura 3 se presenta la micrografía TEM, en la que se observa que las AgNPs sintetizadas tienen una morfología casi esférica. Luego del análisis de aproximadamente 100

nanopartículas de plata se obtuvo un diámetro promedio de 70.53 nm.

El tamaño encontrado está reportado como adecuado para entrar en el interior de las bacterias y combatirla, debido a su forma de clústeres de átomos de plata (González Jiménez, A. et al, 2020). Sin embargo, también puede penetrar en el interior de células, por lo que se recomienda tener en cuenta la evaluación futura de su toxicidad (González Jiménez, A. et al, 2020).

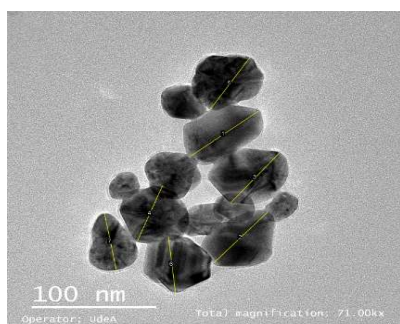


Figura 3. Micrografía TEM de nanopartículas de plata.

### Secado de las nanopartículas de plata

En la Figura 4 se muestran las nanopartículas de plata en solución y secas (polvo negro), por concentración al vacío.

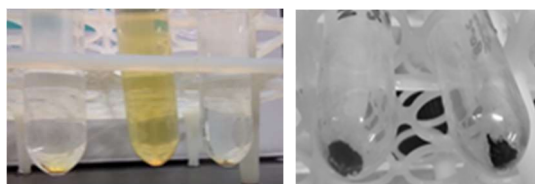


Figura 4. Solución de AgNPs y nanopartículas secas obtenidas por concentración al vacío.

En la Figura 5 se observa la solución de AgNPs antes y las nanopartículas secas después del proceso de liofilización.

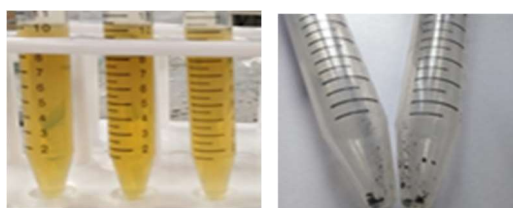


Figura 5. Solución de AgNPs y nanopartículas secas obtenidas por liofilización.

Utilizando la técnica de concentración al vacío se extrajo 0.1 g de AgNPs de 100 mL de la solución acuosa de nanopartículas de plata y se obtuvo partículas de menor tamaño y que no formaban aglomerados, debido a que no se humidificaba fácilmente. Por otro lado, cuando se realizó el secado por el método de liofilización, las nanopartículas se aglomeraron formando agregados de gran tamaño a causa de la humidificación adquirida; aunque esta técnica generara aproximadamente 1,3 g de AgNPs secas, se observó que se humidificaban fácilmente posteriormente al sacado en el liofilizador; por tal motivo se decidió almacenar las muestras en un recipiente desecante con sílica gel para tratar de disminuir la humedad.

### Caracterización del material compuesto silicona-Ag

Al mezclar las AgNPs con la silicona VST-HD 50, se obtuvo una mezcla homogénea y con una aparentemente buena distribución de las AgNPs. En la Figura 6 y 7 se observan las imágenes de los compuestos mediante el estereoscopio y el microscopio óptico invertido, respectivamente. En la Figura 6-a y 7-a es la silicona sola, la Figura 6-b y 7-b es la mezcla de silicona y AgNPs por concentración al vacío y la Figura 6-c y 7-c es mezcla de silicona AgNPs por el método de liofilización, todas estas observadas mediante el estereoscopio.

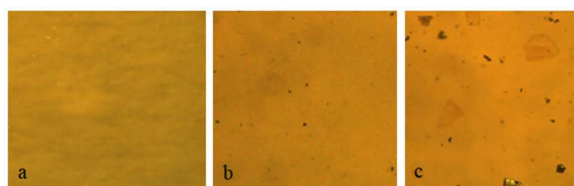


Figura 6. Distribución y forma de las nanopartículas de plata observadas mediante el estereoscopio con un aumento de 16X.

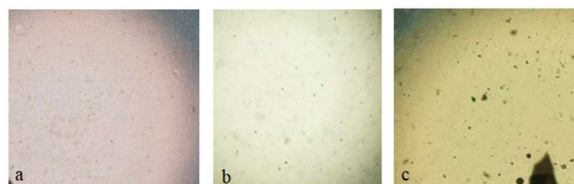


Figura 7. Distribución y forma de las nanopartículas de plata observadas mediante el microscopio óptico invertido con un aumento de 4X.

En las Figuras 6 y 7, se observan puntos negros, los cuales se pueden atribuir a la presencia de las nanopartículas de plata en la silicona. También se puede observar que esos puntos negros se ven de mayor tamaño en la mezcla por el método de liofilización y de una forma poco homogénea, en comparación con la mezcla por concentración al vacío, donde esos puntos negros son de menor tamaño. Con los resultados obtenidos, se decidió seguir utilizando la técnica de concentración al vacío, ya que es más efectivo para generar partículas de tamaño nanométrico y poder generar un material al combinarse con la silicona que puedan combatir las bacterias al tener AgNPs (González Jiménez, A. et al, 2020).

En la Figura 8 se muestra el análisis de mojabilidad mediante ángulo de contacto. Se puede observar que la silicona se comporta de manera hidrofóbica cuando se adiciona la gota de agua en su superficie, ya que se genera un ángulo mayor a 90°.

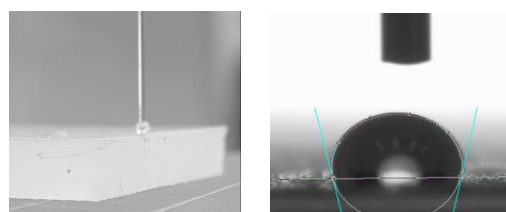
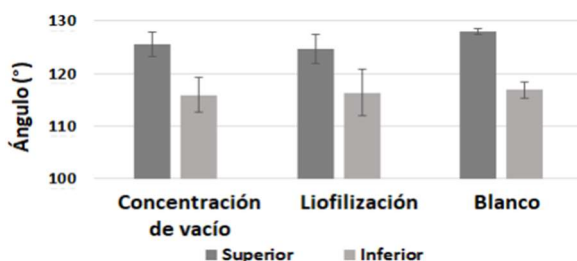


Figura 8. Prueba de mojabilidad de la silicona.

Luego de analizar cada superficie de la silicona, superior e inferior, siendo la superior la parte que quedó expuesta al

## II CONGRESO NACIONAL DE BIOMATERIALES

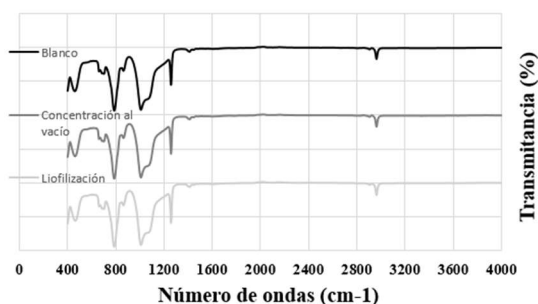
ambiente y la parte inferior la que estaba en contacto con el molde, se realizó un promedio de los respectivos ángulos y se encontró que la silicona fue la que obtuvo mayor ángulo de contacto con relación a las mezclas, siendo esta, una superficie ligeramente más hidrofóbica y esto se analiza con la gráfica de barra presentada en la Figura 9.



**Figura 9.** Ángulos de contactos para las mezclas de silicona con nanopartículas de plata y de la silicona (blanco).

Estadísticamente, el ángulo de contacto obtenido tanto para la mezcla de silicona con nanopartículas de plata por la técnica de liofilización y por concentración al vacío no tuvo diferencia, sin embargo, sí hubo una mayor mojabilidad para estos, debido a la presencia de nanopartículas de plata (Espejo Espada, B, 2015) (Esteban Tejada. L, 2012) (Villamizar Pazmiño, C., 2017).

La Figura 10 muestra el espectro FTIR de la silicona y la mezcla de la silicona con las AgNPs obtenidas por concentración al vacío y liofilización. En los tres espectros se puede evidenciar cuatro bandas características de la silicona. En la región de  $1258\text{ cm}^{-1}$  aparecen las deformaciones simétricas del dimetilo y trimetilo; entre  $1000\text{--}1100\text{ cm}^{-1}$  hay casi una doble banda que corresponde al estiramiento del enlace Si-O-Si y aproximadamente en  $862\text{ cm}^{-1}$  se observan cambios en la distancia del enlace Si-C. Por otra parte, otro punto característico que tienen las tres muestras es el estiramiento amplio que se produce en el rango de  $3400\text{--}2400\text{ cm}^{-1}$ , centrado en  $2905\text{ cm}^{-1}$ , el cual puede deberse a las vibraciones de estiramiento del N-H de las aminas, las sales de amina, las sulfonamidas, el C-H de los alquenos y los alcanos, y el C=O de los ácidos carboxílicos (Martínez-Orozco, R. D. et al., 2013) (Gutiérrez Bouzán, M.C, et al., 2010).



**Figura 10.** Espectros FTIR para las mezclas de silicona con nanopartículas de plata y de la silicona blanco.

La igualdad de los tres espectros se debe a la gran proporción de silicona en comparación con la mezcla de nanopartículas, generando que las nanopartículas se enmascaren por la presencia de la silicona, polímero que las embebe. Es necesario realizar otros análisis como degradación y análisis en agares en cultivos de bacterias para determinar la interacción de las nanopartículas con fluidos fisiológicos y

verificar su poder antimicrobiano, característica fundamental en este material.

### Conclusiones

Se confirmó que la interacción del nitrato de plata y el citrato trisódico, con la acción de la temperatura y el tiempo propició la reducción de AgNPs en la solución. Con el protocolo de síntesis utilizado se obtuvieron nanopartículas de tamaño muy similar.

Las dos técnicas de secado realizadas liofilización y concentración de vacío permitieron establecer cuál de los dos genera una mejor opción para su posterior mezcla con la silicona. La técnica de concentración en vacío fue más efectiva debido a que se obtuvieron nanopartículas de menor tamaño y una mezcla más homogénea.

Al analizar la mojabilidad del material compuesto se encontró que las mezclas generan hidrofobicidad, lo cual es beneficioso para evitar la adhesión de bacterias, y genera así gran potencial para la fabricación de los neumatoponadores de tubos orotraqueales, con potenciales propiedades antibacteriales.

### Agradecimientos

Los autores desean agradecer al proyecto P06 de la convocatoria G8-2020 por la financiación. Asimismo, un agradecimiento al Grupo de Investigación en Biomateriales de la Universidad de Antioquia, al Tecnoparque SENA nodo Medellín y a la empresa MasCapacidad.

### Referencias

- Ali, M., Kim, B., Belfield, K. D., Norman, D., Brennan, M., & Ali, G. S. (2016). Green synthesis and characterization of silver nanoparticles using Artemisia absinthium aqueous extract — A comprehensive study. *Materials Science and Engineering: C*, 58, 359–365. <https://doi.org/10.1016/J.MSEC.2015.08.045>
- Ávalos, A., Haza, A., & Morales, P. (2013). Nanopartículas de plata: aplicaciones y riesgos tóxicos para la salud humana y el medio ambiente. *Revista Complutense de Ciencias Veterinarias*, 7(2). [https://doi.org/10.5209/rev\\_rccv.2013.v7.n2.43408](https://doi.org/10.5209/rev_rccv.2013.v7.n2.43408)
- Busico, M., Vega, L., Plotnikow, G., & Tiribelli, N. (2013). Tubos Endotraqueales: Revisión. *Revista Argentina De Terapia Intensiva*, 30(1). Recuperado a partir de [//revista.sati.org.ar/index.php/MI/article/view/341](http://revista.sati.org.ar/index.php/MI/article/view/341)
- Calzada Palacio, L., (2012). Neumonía asociada a ventilación mecánica. Retrieved October 4, 2020, from [https://gruposdetrabajo.sefh.es/gps/images/stories/publicaciones/neumonía\\_ventilación\\_OKOK\\_2012.pdf](https://gruposdetrabajo.sefh.es/gps/images/stories/publicaciones/neumonía_ventilación_OKOK_2012.pdf)
- Cifuentes, Y., Cifuentes, Y., Robayo, C. J., Ostos, O. L., Molina, L. M., & Barbosa, R. H. (2008). Neumonía asociada a la ventilación mecánica: un problema de salud pública. *Revista Colombiana de Ciencias Químico-Farmacéuticas*, 37(2). <https://revistas.unal.edu.co/index.php/rccquifa/article/view/15244>

## II CONGRESO NACIONAL DE BIOMATERIALES

- Cuervo-Osorio, G., Escobar Jaramillo, M., Ossa Orozco, C. P.,** (2020) 'Diseño factorial 2k para la optimización de la síntesis de nanopartículas de plata para su aplicación en biomateriales', *Revista ION*, 33(1), pp. 17–32. <https://revistas.uis.edu.co/index.php/revistaion/article/view/11024>
- Chastre, J., Viau, F., Brun, P., Pierre, J., Dauge, M. C., Bouchama, A., Akesbi, A., & Gibert, C.** (1984). Prospective evaluation of the protected specimen brush for the diagnosis of pulmonary infections in ventilated patients. *American Review of Respiratory Disease*, 130(5), 924–929. <https://doi.org/10.1164/arrd.1984.130.5.924>
- Chong, W. X., Lai, Y. X., Choudhury, M., & Amalraj, F. D.** (2021). Efficacy of incorporating silver nanoparticles into maxillofacial silicone against *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans*, and polymicrobial biofilms. *The Journal of Prosthetic Dentistry*. <https://doi.org/10.1016/J.PROSDENT.2021.01.010>
- Delgado Gómez, F. M., Athié García, J. M., Díaz Castillo, C.,** (2017). Evaluación de la presión del globo traqueal insuflado por técnica de escape mínimo en el Hospital Ángeles Mocol. Retrieved July 26, 2021, from [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1870-72032017000100008](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1870-72032017000100008)
- Espejo Espada, B.,** (2015). Universidad Carlos III Madrid Escuela Politécnica Superior trabajo fin de grado Determinación de la tensión superficial de adhesivos antes y después del curado. Retrieved February 17, 2021, from [https://e-archivo.uc3m.es/bitstream/handle/10016/23733/TFG\\_Belen\\_Espejo\\_Espada.pdf?sequence=1&isAllowed=y](https://e-archivo.uc3m.es/bitstream/handle/10016/23733/TFG_Belen_Espejo_Espada.pdf?sequence=1&isAllowed=y)
- González Jiménez, A., García, A.,** (2020) 'Nanopartículas de plata como agente antibacteriano en infecciones óseas' ISSN electrónico: 2445- 1355.
- Gutierrez Bouzán, M.C., Rodríguez Urioz, R.,** (2010) 'Detección de siliconas en tejidos defectuosos mediante espectrofotometría de FTIR'. Retrieved October 21, 2021, from <https://upcommons.upc.edu/bitstream/handle/2117/80147/Gutierrez%20Bouzan,%20M.C.%20Detecci%C3%B3n%20de%20siliconas%20en%20tejidos%20defectuosos%20mediante%20espectrofotometria%20de%20FTIR.pdf>
- Esteban Tejada, L.** (2012) 'Actividad biocida de vidrios sodocálcicos conteniendo nanopartículas de plata o cobre' doctorado en ciencias químicas, pp. 190. Retrieved October 4, 2020, from <http://hdl.handle.net/10261/73634>
- Hunter, J. D.** (2012). Neumonía asociada a la ventilación mecánica - Artículos - IntraMed. Retrieved October 4, 2020, from <https://www.intramed.net/contenidover.asp?contenido=76212>
- Jenkins-Lonidier, L.** (2021). Pulmonary Infections, Including Ventilator-Associated Pneumonia. *Critical Care Nursing Clinics of North America*, 33(4), 381–393. <https://doi.org/10.1016/J.CNC.2021.08.002>
- Martínez-Orozco, R. D., Rosu, H. C., Lee, S. W., & Rodríguez-González, V.** (2013). Understanding the adsorptive and photoactivity properties of Ag-graphene oxide nanocomposites. *Journal of Hazardous Materials*, 263, 52–60. <https://doi.org/10.1016/J.JHAZMAT.2013.07.056>
- Meran, Z., Besinis, A., De Peralta, T., D Handy, R.,** (2018). Antifungal properties and biocompatibility of silver nanoparticle coatings on silicone maxillofacial prostheses in vitro. *Journal of Biomedical Materials Research. Part B, Applied Biomaterials*, 106(3), 1038–1051. <https://doi.org/10.1002/JBM.B.33917>
- Morales, J., Morán, J., Quintana, M. and Estrada, W.,** (2009) 'Síntesis y caracterización de nanopartículas de plata por la ruta sol-gel a partir de nitrato de plata' *Rev. Soc. Quím. Perú*, vol. 75, no. 2, pp. 177–184, 2009.
- Moreira, H. E., Verga, F., Barbato, M., & Burghi, G.** (2017). *Rev Bras Ter Intensiva*. 29(1), 63–69. <https://doi.org/10.5935/0103-507X.20170010>
- Villamizar-Pazmiño, C.,** (2017) 'Estudio comparativo in vitro sobre hidrocompatibilidad de siliconas de adición de consistencia liviana en prótesis parcial fija', Retrieved October 4, 2020, from <http://www.dspace.uce.edu.ec/bitstream/25000/9247/1/T-UC-0015-537.pdf>

# MODIFICACIÓN BIOMIMÉTICA DE SOPORTES MICROPOROSOS DE NANOCELULOSA BACTERIANA PARA REGENERACIÓN ÓSEA

A Cañas-Gutiérrez<sup>1</sup>, D Arboleda-Toro<sup>2</sup>, L Toro<sup>3,4</sup>, C Castro-Herazo<sup>5</sup>

<sup>1</sup> Grupo de Investigación Sobre Nuevos Materiales, Escuela de Ingeniería, Universidad Pontificia Bolivariana, Medellín, Colombia. [ana.canas@upb.edu.co](mailto:ana.canas@upb.edu.co),

<sup>2</sup> Grupo de Investigación Estudios BioSociales del Cuerpo, Escuela de Odontología, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia, [german.arboleda@udea.edu.co](mailto:german.arboleda@udea.edu.co),

<sup>3</sup> Department of Molecular Oncology, Cancer Research Institute, Biomedical Research Center of the Slovak, Bratislava, Slovakia. [lenka.toro@eia.edu.co](mailto:lenka.toro@eia.edu.co)

<sup>4</sup> Universidad EIA, Envigado, Colombia

<sup>5</sup> Grupo de Investigación Sobre Nuevos Materiales, Escuela de Ingeniería, Universidad Pontificia Bolivariana, Medellín, Colombia. [cristina.castro@upb.edu.co](mailto:cristina.castro@upb.edu.co),

## Introducción

La biomimética es una estrategia que emplea la ingeniería de tejidos con el fin de desarrollar soportes que imiten la matriz extracelular natural (MEC), para favorecer la adhesión, proliferación y diferenciación celular (Teeri et al. 2007). Cuando se habla de imitar la MEC del tejido óseo, es importante tener en cuenta que este tejido está compuesto por una fase orgánica y otra inorgánica, cada una con una función específica dentro del tejido. Por ejemplo, la fase orgánica compuesta por colágeno tipo I y otras proteínas le imparten flexibilidad al tejido, mientras que la fase inorgánica compuesta por fosfatos de calcio le proporciona rigidez (Goharian et al. 2017). Desde el punto de vista de las características composicionales y biológicas del hueso, es importante tener presente que este es un tejido altamente dinámico, que varía considerablemente durante el proceso de maduración ósea y constantemente durante el proceso de remodelación ósea (Legros et al. 1987; Boskey and Mendelsohn 2005). Por esto, el material ideal para el reemplazo óseo debe permitir la formación de nuevo hueso a través de la osteogénesis, la osteoconducción y la osteoinducción (Sharif et al. 2016).

Una de las características más atractivas de la nanocelulosa bacteriana (NCB), es su estructura nanofibrilar única que imita la estructura de la matriz extracelular nativa (MEC), lo que permite una rápida cicatrización y regeneración del tejido, libre de cualquier infección cruzada asociada a biomateriales de origen natural como el colágeno (Wan et al. 2007). En ingeniería de tejidos óseos, la NCB se ha evaluado como soporte tridimensional poroso para la regeneración de huesos (Zaborowska et al. 2010) y como soporte para inducir la diferenciación de células madre mesenquimales de médula ósea en osteoblastos (Favi et al. 2013). Pero la NCB por sí sola, posee una baja habilidad para unirse directamente al hueso. Su versatilidad le permite que pueda ser modificada con otros materiales tales como la hidroxiapatita (HA), variantes de fosfato de calcio (CaP) o vidrios bioactivos, para aumentar su bioactividad. Los resultados de algunas investigaciones han manifestado que la NCB tiene un gran potencial como injerto en óseo la regeneración de tejidos duros (Hong et al. 2006; Wan et al. 2006; Grande et al. 2009; Tazi et al. 2012; Fan et al. 2013; Park et al. 2015). Pero aún,

hay que seguir investigando en el diseño de soportes 3D microporosos que permitan la migración y proliferación celular, y, además, se deben buscar alternativas de como incrementar la bioactividad de este biomaterial, sin afectar la morfología de los poros y su interconexión.

Por lo anterior, el objetivo de esta investigación fue diseñar soportes 3D microporosos basados en nanocelulosa bacteriana (NCB) utilizando la cepa nativa *Komagataeibacter medellinensis*, teniendo en cuenta las características estructurales y químicas del tejido óseo. Se evaluaron 2 métodos de biomineralización en los soportes, tratando de imitar el proceso de mineralización natural de los huesos, teniendo en cuenta el contenido iónico, el pH y la temperatura corporal.

## Materiales y métodos

Los soportes de nanocelulosa bacteriana (NCB) fueron obtenidos a través de la fermentación de la bacteria *Komagataeibacter medellinensis* NBRC 3288 (Yamada 2014). Esta cepa fue aislada en la Central Minorista de Medellín y fue identificada en la Universidad Pontificia Bolivariana (Castro et al. 2013). A partir de la fermentación de este microorganismo en cultivos estáticos se prepararon los soportes 3D. Se utilizó como agente porogénico partículas de parafina. Los soportes fueron preparados teniendo en cuenta el protocolo descrito por Cañas-Gutiérrez et al (Cañas-Gutiérrez et al. 2020).

Para mejorar la bioactividad de la nanocelulosa bacteriana, los soportes fueron tratados con 2 métodos de biomineralización. Primero se realizó un pretratamiento con una solución supersaturada de cloruro de calcio (CaCl<sub>2</sub>) a un pH=7. En el método 1, después del pretratamiento con CaCl<sub>2</sub>, los soportes fueron tratados con soluciones fosfato disódico (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) en 3 ciclos consecutivos, cada uno de 48 horas (NCB CaP). En el método 2 los soportes fueron inmersos en 1.0X de fluido fisiológico simulado (SBF), por 14 días, renovando la solución cada 24 horas (NCB Ca-SBF).

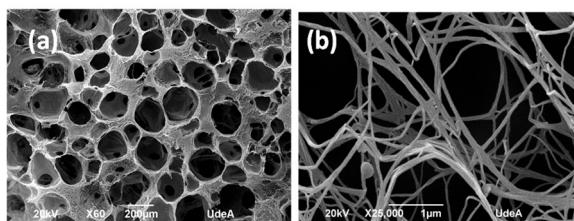
La morfología y la microestructura de los soportes 3D microporosos de NCB, se estudiaron mediante microscopía electrónica de barrido (SEM). La composición química de los

soportes, se analizaron mediante espectroscopía de rayos X de dispersión de energía (EDS) y mediante fluorescencia de rayos X (XRF) en la superficie de cada soporte liofilizado. En los análisis de EDS, las composiciones químicas se analizaron utilizando mapas elementales de rayos X en el modo de exploración. Para determinar las fases minerales y orgánicas presentes en los soportes biomnneralizados, se utilizó la espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR) en el modo de reflexión total atenuada (ATR). Por medio de difracción de rayos X (DRX) se determinó las fases cristalinas de los soportes. Para los soportes biomnneralizados, los resultados de DRX se analizaron usando el software HighScore Plus Release: Versión 3.0d para determinar las fases cristalinas presentes en cada soporte modificado, utilizando la función Search and Match (Aguiar et al. 2018). Los ensayos biológicos *in vitro* se realizaron con células madre mesenquimales de médula ósea humana (CMM-MO) ATCC PCS-500-012. Los soportes de NCB fueron esterilizados en una autoclave LabTech por 20 minutos a 121 °C. La cantidad de células viables en contacto directo con los soportes se determinó mediante la formación de un compuesto coloreado, con el bromuro de 3- (4, 5-dimetiltiazol-2-il) -2, 5-difenil-2H-tetrazol-3-io (MTT), siguiendo el estándar internacional ISO 10993-5 2009. La actividad de la secreción de la enzima fosfatasa alcalina (FA) se determinó usando el kit de ensayo Alkaline Phosphatase Detection kit, fluorescence (APF – 1KT) marca Sigma-Aldrich. La expresión de las proteínas osteopontina (OP) y osteocalcina (OC) se identificó a través de la técnica de Western Blot.

Los datos obtenidos en cada ensayo (réplicas), se sometieron a pruebas de normalidad W (Shapiro-Wilk) y homocedasticidad (Bartlet), para realizar una prueba estadística paramétrica o no paramétrica.

## Resultados y discusión

En la figura 1-a se observa que se obtuvieron soportes altamente porosos, con una distribución de poros homogénea y una alta interconexión entre los poros. La distribución del tamaño de los poros fue entre 70 y 350 µm. Según algunos estudios, esta distribución del tamaño de poro permite la migración y la proliferación celular (Bodin et al. 2007; Zaborowska et al. 2010). En la figura 2-b se puede observar la nanoestructura de las fibras de la celulosa que imita la matriz orgánica de colágeno permitiendo la precipitación de los fosfatos de calcio (Arkharova et al. 2016).



**Figura 1.** Micrografías electrónicas tomadas por SEM: a) soporte 3D microporoso de nanocelulosa bacteriana a 60x; y b) nanoestructura de las *fibrillas* de celulosa a 25000x.

Como se reportó en estudios anteriores (Cañas-Gutiérrez et al. 2020), en la figura 5-i y 5-j, se puede observar los soportes 3D microporosos de NCB luego de los 3 ciclos de biomineralización (NCB CaP). En las micrografías de 5000x, se puede observar que los cristales se forman sobre las fibrillas de celulosa, a lo largo de toda la superficie de los

poros de la NCB, pero aún se conserva la interconectividad entre los poros. En las micrografías de 25.000 X se observa que el crecimiento de los cristales alrededor de las nanofibras de celulosa, tienen forma de barras o agujas de lo reportan otros autores (Hutchens et al. 2006; Saska et al. 2011). Los mapas elementales tomados con el EDS, mostraron que la distribución de los iones de calcio y fosfato a lo largo de la superficie de la NCB es homogénea y sin aglomeraciones (resultados en proceso de publicación). Esto sugiere que los tratamientos cíclicos con soluciones saturadas de CaCl<sub>2</sub> seguidas de soluciones de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, en condiciones dinámicas permiten simular las condiciones de mineralización de los tejidos óseos. Al igual que como lo reportan Zimmermann, et al. (2011), con este método en particular, se demostró que el pretratamiento con calcio permitió crear un sitio de nucleación para el crecimiento del cristal de fosfato de calcio (Zimmermann et al. 2011).

En la figura 5-e y 5-f de este mismo estudio realizado (Cañas-Gutiérrez et al. 2020), se puede observar los soportes luego del método de biomineralización realizado con SBF (NCB Ca-SBF). La forma de los cristales obtenidas por este método es mucho más esférica y no crece en forma de barras o agujas como se observó por el método 1. Esta formación de cristales con forma globular concuerda con los estudios realizados por Nge et al. (Nge and Sugiyama 2006). La fina estructura de cada glóbulo está compuesta por pequeños cristales finos en forma de placa se unen directamente a la superficie de las microfibrillas. Al igual que en los soportes biomnneralizados por el método 1, en el método 2 también se observa una distribución de Ca y P de manera homogénea a lo largo de la superficie, pero adicionalmente, también se observó una gran cantidad de iones Mg y K (resultados en proceso de publicación). La presencia de estos iones en los tratamientos con SBF podría ser ventajoso en términos de composición iónica y desempeñar un papel de apoyo en el proceso de regeneración, porque según varios estudios, estos iones juegan un papel vital en las reacciones biológicas asociadas con el metabolismo óseo (Figueiredo et al. 2010; Wu, S., Liu and Yeung, K. W. K. Liu, C., Yang 2014).

En la tabla 1 se encuentran reportados los resultados obtenidos por FRX. Allí se observa que después de los ciclos de biomineralización los elementos Ca y P son los que se encontraron en mayor porcentaje sobre la superficie de la NCB, seguidos del elemento Na. El calcio es el elemento con mayor concentración en todos los soportes, debido a que el grupo hidroxilo del carbono 6 de la celulosa, creó una superficie cargada negativamente a pH ~ 7.0, lo que permite la interacción de iones calcio entre los grupos funcionales por interacción electrostática. Por lo tanto, hay interacción débil ion-dipolo entre el ion calcio y un grupo hidroxilo. Además, todos los grupos hidroxilo de la celulosa tienen dipolos negativos fuertes que podrían quelar los iones de calcio (Ca<sup>2+</sup>) en solución y formar un enlace coordinado (Cañas-Gutiérrez et al. 2020). La relación Ca/P obtenida en ambos métodos de biomineralización fue menor que la de la hidroxiapatita comercial utilizada como referencia.

**Tabla 1.** Resultados del análisis elemental por FRX

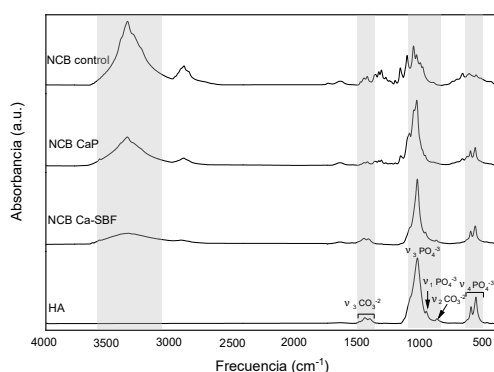
Sample	Contenido iónico (% en masa)						Ca/P**
	Ca	P	Na	Mg	K	Cl	
NCB CaP	20,7	12,9	0,7	-	-	0,1	1,24
NCB Ca-SBF	19,7	12,7	2,3	0,6	0,1	0,1	1,20
HA	39,9	19,1	-	0,2	-	-	1,64

\*El contenido de elementos se determinó mediante relaciones estequiométricas de los compuestos oxidados encontrados por XRF

\*\* Relación molar de Ca/P

En la figura 2, se observa en los espectros de los infrarrojos que en ambos tratamientos de biomineralización desaparece la banda  $\sim 3350\text{ cm}^{-1}$ , atribuida a la NCB (Nge and Sugiyama 2006; Wan et al. 2007) y aparece más definida y con mayor intensidad la banda  $\nu_3\text{ PO}_4^{3-}$  en  $\sim 1200\text{-}900\text{ cm}^{-1}$ , la cual se asocia a los fosfatos de calcio (Nge et al. 2010; Mamede et al. 2018). La amplitud de esta banda está asociada a la cristalinidad de los fosfatos de calcio (Wan et al. 2007; Querido et al. 2013); es decir, que en ambos métodos de biomineralización se está formando una o varias fases de fosfatos de calcio. En ambos métodos de biomineralización, se observa que aparecen las otras bandas características  $\nu_4\text{ PO}_4^{3-}$  asociadas a los iones fosfato resuelven en dos picos alrededor  $650\text{-}500\text{ cm}^{-1}$  (Alvarez-Lloret et al. 2006; Querido et al. 2013).

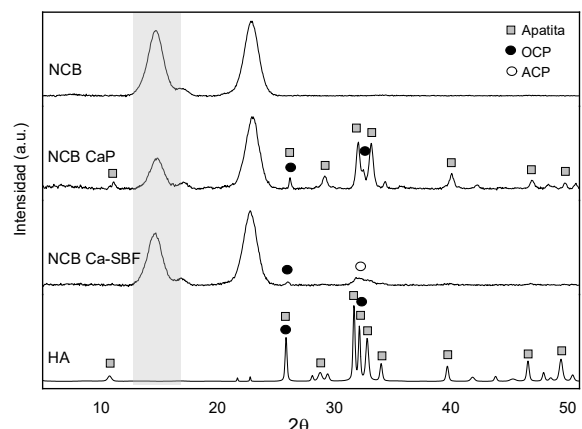
En los espectros del soporte NCB Ca-SBF, se observaron los picos característicos para los iones carbonato que aparecen como una doble banda en  $\sim 1410\text{-}1445\text{ cm}^{-1}$  ( $\nu_3\text{ CO}_3^{2-}$ ) y en  $\sim 870\text{ cm}^{-1}$  ( $\nu_2\text{ CO}_3^{2-}$ ). Estos se denominan como carbonatos "tipo B", que sustituyen a los iones  $\text{PO}_4^{3-}$  en la fase mineral ósea (Figueiredo et al. 2010). La existencia de estos dos picos indicó que los sitios  $\text{PO}_4^{3-}$  de la fase mineral depositada sobre el soporte están parcialmente sustituidos por iones carbonato, y es similar a la HA comercial (Wan et al. 2007). Esto se puede explicar porque el pretratamiento con Ca, crea los núcleos iniciales sobre la superficie de la NCB, permitiendo no solo la unión de los iones fosfato, sino también la unión de los iones de carbonato que se encuentran en el SBF (Shi et al. 2008).



**Figura 2.** Análisis de los espectros obtenidos por FTIR-ATR de los soportes 3D microporosos de NCB preparados por los métodos de biomineralización.

En la figura 3 se presentan los difractogramas obtenidos de los soportes 3D microporosos de NCB biomineralizados. Todos los soportes mostraron los tres picos característicos de la celulosa asignados a los planos cristalográficos (1 0 0), (0 1 0), y (1 1 0), que corresponden a los ángulos de difracción de  $14,6^\circ$ ,  $16,8^\circ$  y  $22,8^\circ$ , respectivamente. En la figura 4 se observa que a medida que aumenta la cantidad de minerales depositados sobre la superficie de los soportes disminuye la intensidad de los picos de la NCB (región gris). La disminución en la intensidad de estos picos, demuestran que a medida que se modifican los soportes con el tratamiento de biomineralización, las fases minerales se van convirtiendo en el componente dominante del soporte por el aumento de la cantidad de fosfatos de calcio, como también lo afirman estudios realizados por Hutchens et al. (2006) y Yin et al. (2011b) (Hutchens et al. 2006; Yin et al. 2011).

Para el análisis de fases semi-cuantitativo a través del software HighScore, se utilizó como restricciones establecidas los elementos minerales encontrados por FRX y se eliminaron los picos característicos de la celulosa. En el análisis de fases de los soportes, se encontró que en el método 1 se presentan fases de octacalcio di-hidrógeno fosfato pentahidratado (OCP) y apatita (CaOH) y en el método 2 se encontró una fase de apatita amorfa (ACP) entre los ángulos de difracción  $30^\circ$  y  $35^\circ$  y otra de OCP a  $27^\circ$ , (Drouet 2013). Los principales picos difractados de la fase de apatita sobre los soportes son  $25.86^\circ$ ,  $28.73^\circ$ ,  $31.7^\circ$ ,  $32.14^\circ$ ,  $32.8^\circ$ ,  $34.01^\circ$ ,  $39.67^\circ$ ,  $46.57^\circ$  y  $49.41^\circ$ , que corresponden respectivamente a los planos de difracción (0 0 2), (1 0 2), (2 1 1), (1 1 2), (3 0 0), (2 0 2), (3 1 0), (2 2 2) y (2 1 3) (Aguilar et al. 2018). Los picos difractados para la fase OCP sobre los soportes se encontraron en  $26,37^\circ$  y  $32,56^\circ$  que corresponden a los planos de difracción (0 0 2) y (7 0 0), respectivamente (Iijima et al. 1996). Estas fases minerales corresponden a las relaciones Ca/P encontradas en los materiales por FRX, las cuales se encuentran entre 1,19 y 1,60. Estas dos fases de fosfatos de calcio son predominantes en los huesos humanos, lo que nos demuestra que este método de biomineralización permite diseñar materiales con gran similitud a las fases minerales obtenidas durante la mineralización ósea *in vivo*, es decir, que podemos diseñar un biomaterial biomimético del hueso. Adicionalmente, en el método 2 se encontró se una fase de fosfato de calcio amorfo (ACP). La ACP es una fase mineral que puede transformarse en un fosfato tricálcico, que posteriormente se transforma en un OCP y finalmente en una HA (Luo et al. 2015).

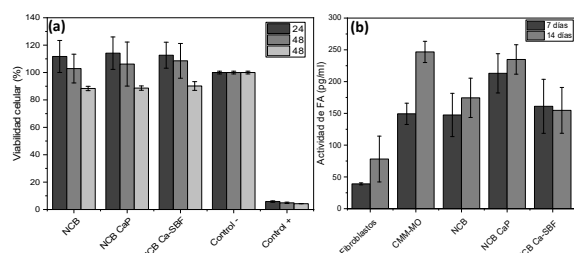


**Figura 3.** Análisis de los difractogramas obtenidos por DRX de los soportes 3D microporosos de NCB preparados por los métodos de biomineralización.

En la figura 4-a se muestran los resultados obtenidos a través del ensayo de MTT después de 24, 48 y 72 horas de cultivo con las células CMM-MO. Durante las primeras 24 y 48 horas, la viabilidad celular se mantuvo por encima del 100 % y no se observaron diferencias estadísticamente significativas ( $P > 0,05$ ), entre los diferentes soportes de NCB diseñados y la NCB sin modificar utilizada como control. Después de 72 horas de cultivo, todos los soportes diseñados presentaron una diferencia estadísticamente significativa ( $P < 0.05$ ), en el porcentaje de viabilidad celular, con respecto al cultivo después de 24 horas; sin embargo, la viabilidad celular se mantuvo por encima del 90 % para todos los soportes. La disminución del porcentaje de viabilidad celular, se podría explicar por el aumento de las concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$  en el medio de cultivo, liberados por los soportes que fueron tratados inicialmente con soluciones súper saturadas de calcio (Lee et al. 2018). En la figura 4-b se encuentra



reportada la expresión de la fosfatasa alcalina (FA) después de 7 y 14 días para cada uno de los soportes, incluyendo la NCB sin modificar y los controles. La FA juega un papel importante en el proceso de mineralización ósea y se utiliza como un marcador temprano en la diferenciación de CMM hacia osteoblastos (Sharma et al. 2014). Después de 7 días de cultivo, se observa claramente que todos los soportes de NCB expresan un nivel superior de FA, comparado con las CMM-MO que no están en contacto con ningún soporte de NCB. La expresión de FA no mostró diferencias estadísticamente significativas ( $P > 0,05$ ), entre las CMM-MO cultivadas en el plato, con respecto a las CMM-MO cultivadas sobre los soportes NCB sin ningún tratamiento de biomineralización. Como lo reportan Shi et al. (2012), la NCB por sí sola no favorece la expresión de la FA en cantidades comparables al nivel basal de las CMM-MO (Shi et al. 2012). Después de 14 días de cultivo se obtuvo una mayor expresión de la actividad de la FA sólo en los soportes NCB CaP comparadas con el nivel basal de las CMM-MO. En los otros soportes de NCB se observa una disminución de la FA. Una explicación para la disminución de la FA, se basa en que el aumento de esta enzima durante los primeros 7 días, es un indicador de que hay un proceso de diferenciación activo de las CMM-MO hacia pre-osteoblastos (Nardi and da Silva Meirelles 2008; Miron and Zhang 2012). (Resultados en proceso de publicación)

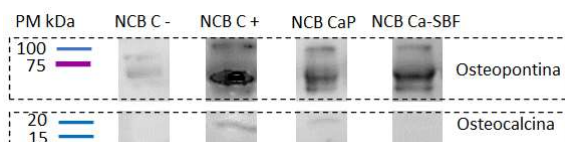


**Figura 4.** Viabilidad celular y expresión de la FA de las CMM-MO cultivadas en los soportes microporosos de NCB biomineralizados durante 7 y 14 días. Como control negativo se utilizó un cultivo de fibroblastos, los cuales son células que no expresan FA y como control positivo células CMM-MO para determinar el nivel basal de FA.

La expresión de osteopontina (OP) y osteocalcina (OC), se determinó con el fin de seguir los diferentes estadios en el proceso de diferenciación celular de las CMM-MO hacia los osteoblastos. En la figura 5 se muestran los resultados obtenidos por Western blot de la expresión de la OP y de la OC de las CMM-MO cultivadas en los soportes después de 21 días de cultivo (Resultados en proceso de publicación). En todos los soportes se observa que existe una expresión de OP con tres bandas, donde la banda más gruesa e intensa se encuentra alrededor de los 60 kDa (peso molecular asociado a las características del anticuerpo primario utilizado). El soporte de NCB sin ningún proceso de biomineralización, muestra una expresión de OP con una intensidad muy baja comparada con los soportes de NCB biomineralizados. En general, la expresión de OP en todos los soportes de NCB biomineralizados, indican que hay un proceso de maduración de los pre-osteoblastos hacia osteoblastos (Lee et al. 2018), comparado con el control positivo y el control negativo. Este resultado, también sugiere que los soportes diseñados tienen un potencial osteoinductivo alto (McKee et al. 2011).

Por otra parte, en la figura 5 también se observa que después de 21 días de cultivo, la proteína OC se expresa alrededor de 22 kDa sólo en los soportes NCB CaP. La OC es una proteína específica en los huesos que es sintetizada solo por

osteoblastos maduros y que está involucrada con la unión del calcio y la hidroxiapatita (Miron and Zhang 2012; Oldknow et al. 2015). Por lo tanto, la presencia de esta proteína en los cultivos de las CMM-MO en los soportes anteriormente mencionados, sugiere que estos materiales favorecieron la diferenciación osteoblástica (Ferreira et al. 2012; Sun et al. 2012) después de los 21 días de cultivo.



**Figura 5.** Expresión de osteopontina y osteocalcina de las CMM-MO cultivadas en los soportes microporosos de NCB biomineralizados después de 21 días de cultivo.

## Conclusiones

Los métodos de biomineralización permitieron precipitar fosfatos de calcio sobre la NCB, con características equivalentes a las fases minerales óseas como fosfatos de calcio amorfo, fosfatos octa-cálcicos y apatita. Además, con composiciones químicas y relaciones molares Ca/P similares a las del hueso inmaduro. Estos procesos de biomineralización no afectaron la interconexión de los poros. Los resultados *in vitro* demostraron a través de la detección de diferentes marcadores celulares específicos, que los soportes de NCB biomineralizados, favorecen en general los diferentes estadios de diferenciación de las células madre mesenquimales hacia los osteoblastos.

## Referencias

- Aguiar H, Chiussi S, López-Álvarez M, et al (2018) Structural characterization of bioceramics and mineralized tissues based on Raman and XRD techniques. *Ceram Int* 44:495–504. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.ceramint.2017.09.203>
- Alvarez-Lloret P, Rodriguez-Navarro a. B, Romanek CS, et al (2006) Quantitative Analysis of Bone Mineral Using Ftir. *Macla* 6:45–47
- Arkharova NA, Suvorova EI, Severin A V., et al (2016) SEM and TEM for structure and properties characterization of bacterial cellulose/hydroxyapatite composites. *Scanning* 9999:1–9. <https://doi.org/10.1002/sca.21325>
- Bodin A, Concaro S, Brittberg M, Gatenholm P (2007) Bacterial cellulose as a potential meniscus implant. *J Tissue Eng Regen Med* 1:406–408. <https://doi.org/10.1002/term>
- Boskey A, Mendelsohn R (2005) Infrared analysis of bone in health and disease. *J Biomed Opt* 10:031102. <https://doi.org/10.1117/1.1922927>
- Cañas-Gutiérrez A, Martínez-Correa E, Suárez-Avenidaño D, et al (2020) Influence of bacterial nanocellulose surface modification on calcium phosphates precipitation for bone tissue engineering. *Cellulose* 27:10747–10763. <https://doi.org/10.1007/s10570-020-03470-6>
- Castro C, Cleenwerck I, Trček J, et al (2013)

- Gluconacetobacter medellinensis sp. nov., cellulose- and non-cellulose-producing acetic acid bacteria isolated from vinegar. *Int J Syst Evol Microbiol* 63:1119–1125. <https://doi.org/10.1099/ij.s.0.043414-0>
- Drouet C** (2013) Apatite formation: why it may not work as planned, and how to conclusively identify apatite compounds. *Biomed Res Int* 2013:12 pages
- Fan X, Zhang T, Zhao Z, et al** (2013) Preparation and characterization of bacterial cellulose microfiber/goat bone apatite composites for bone repair. *J Appl Polym Sci* 129:595–603. <https://doi.org/10.1002/app.38702>
- Favi PM, Benson RS, Neilsen NR, et al** (2013) Cell proliferation, viability, and in vitro differentiation of equine mesenchymal stem cells seeded on bacterial cellulose hydrogel scaffolds. *Mater Sci Eng C* 33:1935–1944. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2012.12.100>
- Ferreira AM, Gentile P, Chiono V, Ciardelli G** (2012) Collagen for bone tissue regeneration. *Acta Biomater* 8:3191–3200. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2012.06.014>
- Figueiredo M, Fernando A, Martins G, et al** (2010) Effect of the calcination temperature on the composition and microstructure of hydroxyapatite derived from human and animal bone. *Ceram Int* 36:2383–2393. <https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2010.07.016>
- Goharian A, Kadir M, Abdullah M** (2017) Trauma Plating Systems: Biomechanical, Material, Biological, and Clinical Aspects. Amsterdam
- Grande CJ, Torres FG, Gomez CM, Carmen Bañó M** (2009) Nanocomposites of bacterial cellulose/hydroxyapatite for biomedical applications. *Acta Biomater* 5:1605–1615. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2009.01.022>
- Hong L, Wang YL, Jia SR, et al** (2006) Hydroxyapatite/bacterial cellulose composites synthesized via a biomimetic route. *Mater Lett* 60:1710–1713. <https://doi.org/10.1016/j.matlet.2005.12.004>
- Hutchens SA, Benson RS, Evans BR, et al (2006) Biomimetic synthesis of calcium-deficient hydroxyapatite in a natural hydrogel. *Biomaterials* 27:4661–4670. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2006.04.032>
- Iijima M, Nelson DGA, Pan Y, et al** (1996) Fluoride analysis of apatite crystals with a central planar OCP inclusion: Concerning the role of F<sup>-</sup> ions on apatite/OCP/apatite structure formation. *Calcif Tissue Int* 59:377–384. <https://doi.org/10.1007/s002239900143>
- Lee MN, Hwang HS, Oh SH, et al** (2018) Elevated extracellular calcium ions promote proliferation and migration of mesenchymal stem cells via increasing osteopontin expression. *Exp Mol Med* 50:. <https://doi.org/10.1038/s12276-018-0170-6>
- Legros R, Balmain N, Bonel G** (1987) Age-related changes in mineral of rat and bovine cortical bone. *Calcif Tissue Int* 41:137–144. <https://doi.org/10.1007/BF02563793>
- Luo H, Xiong G, Zhang C, et al** (2015) Surface controlled calcium phosphate formation on three-dimensional bacterial cellulose-based nano fibers. *Mater Sci Eng C* 49:526–533. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2015.01.053>
- Mamede AP, Vassalo AR, Cunha E, et al** (2018) Biomaterials from human bone-probing organic fraction removal by chemical and enzymatic methods. *RSC Adv* 8:27260–27267. <https://doi.org/10.1039/c8ra05660a>
- McKee MD, Pedraza CE, Kaartinen MT** (2011) Osteopontin and wound healing in bone. *Cells Tissues Organs* 194:313–319. <https://doi.org/10.1159/000324244>
- Miron RJ, Zhang YF** (2012) Osteoinduction: A review of old concepts with new standards. *J Dent Res* 91:736–744. <https://doi.org/10.1177/0022034511435260>
- Nardi NB, da Silva Meirelles L** (2008) Mesenchymal Stem Cells: Isolation, In Vitro Expansion and Characterization. 249–282. [https://doi.org/10.1007/978-3-540-77855-4\\_11](https://doi.org/10.1007/978-3-540-77855-4_11)
- Nge TT, Nogi M, Yano H, Sugiyama J** (2010) Microstructure and mechanical properties of bacterial cellulose/chitosan porous scaffold. *Cellulose* 17:349–363. <https://doi.org/10.1007/s10570-009-9394-x>
- Nge TT, Sugiyama J** (2006) Surface functional group dependent apatite formation on bacterial cellulose microfibrils network in a simulated body fluid. *J Biomed Mater Res Part A* 33:97–103. <https://doi.org/10.1002/jbm.a>
- Oldknow KJ, MacRae VE, Farquharson C** (2015) Endocrine role of bone: Recent and emerging perspectives beyond osteocalcin. *J Endocrinol* 225:R1–R19. <https://doi.org/10.1530/JOE-14-0584>
- Park M, Lee D, Shin S, Hyun J** (2015) Effect of negatively charged cellulose nanofibers on the dispersion of hydroxyapatite nanoparticles for scaffolds in bone tissue engineering. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* 130:222–228. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2015.04.014>
- Querido W, Rossi AL, Campos APC, et al** (2013) Does crystallinity of extracted bone mineral increase over storage time? *Mater Res* 16:970–974. <https://doi.org/10.1590/s1516-14392013005000096>
- Saska S, Barud HS, Gaspar AMM, et al** (2011) Bacterial cellulose-hydroxyapatite nanocomposites for bone regeneration. *Int J Biomater* 2011:1–8. <https://doi.org/10.1155/2011/175362>
- Sharif F, Ur Rehman I, Muhammad N, MacNeil S** (2016) Dental materials for cleft palate repair. *Mater Sci Eng C* 61:1018–1028. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2015.12.019>
- Sharma U, Pal D, Prasad R (2014) Alkaline phosphatase: An overview. *Indian J Clin Biochem* 29:269–278. <https://doi.org/10.1007/s12291-013-0408-y>
- Shi Q, Li Y, Sun J, et al** (2012) The osteogenesis of bacterial cellulose scaffold loaded with bone morphogenetic protein-2. *Biomaterials* 33:6644–6649. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2012.05.071>
- Shi S, Chen S, Zhang X, et al** (2008) Biomimetic mineralization synthesis of calcium-deficient carbonate-containing hydroxyapatite in a three-dimensional network of bacterial cellulose. *J Chem Technol Biotechnol* 84:285–290.

<https://doi.org/10.1002/jctb.2037>

**Sun J, Zhou H, Deng Y, et al** (2012) Conditioned medium from bone marrow mesenchymal stem cells transiently retards osteoblast differentiation by downregulating Runx2. *Cells Tissues Organs* 196:510–522. <https://doi.org/10.1159/000339245>

**Tazi N, Zhang Z, Messaddeq Y, et al** (2012) Hydroxyapatite bioactivated bacterial cellulose promotes osteoblast growth and the formation of bone nodules. *AMB Express* 2:61–71. <https://doi.org/10.1186/2191-0855-2-61>

**Teeri TT, Brumer H, Daniel G, Gatenholm P** (2007) Biomimetic engineering of cellulose-based materials. *Trends Biotechnol* 25:299–306. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2007.05.002>

Wan Y, Hong L, Jia S, et al (2006) Synthesis and characterization of hydroxyapatite–bacterial cellulose nanocomposites. *Compos Sci Technol* 66:1825–1832. <https://doi.org/10.1016/j.compscitech.2005.11.027>

**Wan YZ, Huang Y, Yuan CD, et al** (2007) Biomimetic synthesis of hydroxyapatite/bacterial cellulose nanocomposites for biomedical applications. *Mater Sci Eng C* 27:855–864. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2006.10.002>

**Wu, S., Liu X, Yeung, K. W. K. Liu, C., Yang X** (2014) Biomimetic porous scaffolds for bone tissue engineering. *Mater Sci Eng R* 80:1–36. <https://doi.org/10.1016/j.mser.2014.04.001>

**Yamada Y** (2014) Transfer of *Gluconacetobacter kakaiceti*, *Gluconacetobacter medellinensis* and *Gluconacetobacter maltaceti* to the genus *Komagataeibacter* as *Komagataeibacter kakaiceti* comb. nov., *Komagataeibacter medellinensis* comb. nov. and *Komagataeibacter maltaceti* comb. *Int J Syst Evol Microbiol* 64:1670–1672. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.054494-0>

**Yin N, Chen SY, Ouyang Y, et al** (2011) Biomimetic mineralization synthesis of hydroxyapatite bacterial cellulose nanocomposites. *Prog Nat Sci Mater Int* 21:472–477. [https://doi.org/10.1016/S1002-0071\(12\)60085-9](https://doi.org/10.1016/S1002-0071(12)60085-9)

**Zaborowska M, Bodin A, Bäckdahl H, et al** (2010) Microporous bacterial cellulose as a potential scaffold for bone regeneration. *Acta Biomater* 6:2540–2547. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2010.01.004>

**Zimmermann K a., Leblanc JM, Sheets KT, et al** (2011) Biomimetic design of a bacterial cellulose/hydroxyapatite nanocomposite for bone healing applications. *Mater Sci Eng C* 31:43–49. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2009.10.007>

## BIOCOMPATIBILIDAD DE UN CONSTRUCTO TRIDIMENSIONAL DE PLA, PARA SU USO EN INGENIERÍA DE TEJIDOS

I Arreola Esquivel<sup>1</sup>, CG Trejo Iriarte<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Facultad de Estudios Superiores Iztacala (UNAM), itzelae@live.com, Estado de México, México.

<sup>2</sup> Grupo de Investigación en Células Troncales e Ingeniería de Tejidos (GICTIT), Laboratorio de Investigación en Odontología Almaraz, FES-Iztacala, Universidad Nacional Autónoma de México, cynthia.trejo@iztacala.unam.mx, Estado de México, México.

### Introducción

La Ingeniería de Tejidos (IT) tiene como objetivo diseñar constructos tridimensionales que actúen como una matriz extracelular, que permite rellenar el espacio que dejó el tejido dañado o perdido hasta que este sea regenerado por completo, teniendo como principal función servir como guía para el crecimiento de nuevos tejidos para devolverles su forma y función, además, los constructos han demostrado ser una alternativa, eficaz para el trasplante de órganos (Melek, 2015), (Shen, 2016).

Para el diseño de los constructos tridimensionales se utilizan materiales que pueden estar en contacto con fluidos y tejidos biológicos y ser tolerados adecuadamente y al mismo tiempo proveen a los tejidos la estructura ideal para dar alojamiento a nuevas células implantadas y residentes, y así contribuir a la formación de tejido nuevo, estos materiales deben ser biocompatibles, es decir, tener la cualidad de no inducir efectos citotóxicos al organismo (Estrada, 2020).

En cuanto a los andamios funcionan de soporte a las células para que proliferen y se diferencien, por lo tanto, su diseño y desarrollo debe considerar diferentes factores biológicos, químicos y físicos. La arquitectura de los andamios requiere de un diseño que les permita a las células realizar el proceso de regeneración tisular.

La principal característica de un andamio es que debe ser biocompatible; es decir, debe promover la adhesión celular, la vascularización, el suministro de nutrientes y oxígeno a las células, y también apoyar la actividad celular normal, incluidos los sistemas de señalización molecular. Después de la implantación, el andamio no debe provocar respuestas locales o sistémicas indeseables como: citotoxicidad (propiedad de ciertas sustancias o células de dañar a otras células), genotoxicidad (capacidad relativa de un agente de ocasionar daño en el material genético, originando efectos biológicos adversos), inmunogenicidad (capacidad que tiene un antígeno de activar el sistema inmunitario e inducir una respuesta inmune), mutagenicidad (alteraciones del material genético celular), siendo algunos de los efectos que pueden ocasionar inflamación crónica y causar un rechazo por parte de un cuerpo extraño (Monroy, C.M., 2005).

El ritmo de degradación debe calcularse de tal manera que proporcione soporte estructural necesario y también que permita que las células logren infiltrarlo logrando su degradación de forma gradual, y que sus desechos no sean tóxicos ni alteren a los tejidos.

La Sociedad Internacional de Terapia Celular ha propuesto tres criterios para la caracterización “*in vitro*” de las Células

Troncales Mesenquimales (CSM), estos son (Rodríguez, 2010):

- Demostrar el aislamiento de células con morfología fibroblastoide de tipo adherente “*in vitro*”.
- Determinar la expresión de los antígenos: CD105, CD73 y CD90, y la ausencia de marcadores hematopoyéticos: CD45, CD34, CD14 o CD11b, CD79 o CD19 y HLA-DR.
- Inducir la diferenciación “*in vitro*” de las CSM en osteoblastos, adipoblastos y condroblastos.

Las células troncales tienen la capacidad de inhibir la respuesta inmune, suprimiendo la proliferación de linfocitos T, alterando la capacidad de presentación antigénica (Rodríguez, 2014).

Se ha demostrado que las MSC secretan una gran cantidad de factores de crecimiento, citocinas y quimiocinas, que permiten su migración y expansión, ejercen actividades inmunomoduladoras, modulan la angiogénesis y la apoptosis (Gebler, 2012).

Las MSC son células capaces de autorrenovarse y diferenciarse a linajes como: osteogénico, condrogénico, adipogénico, etc (Linero, 2014)

Las células troncales mesenquimales adultas de tejido adiposo (Adipose tissue-derived stem cells (ADSCs)), se caracterizan por su habilidad para auto-renovarse y diferenciarse en múltiples linajes celulares, pluripotencialidad (capacidad de diferenciación) y alta tasa de proliferación, inmunomoduladoras y plasticidad (Meruane, 2011).

Martínez y cols, probaron que estas MSCat tienen características de células mesenquimales, además de su capacidad para diferenciarse en hueso, cartílago, y tejido adiposo, encontrando resultados positivos cuando se utilizan en combinación con injertos, andamios y factores que inducen su diferenciación. (Martínez, 2018).

Las MSCat inducidas al linaje osteogénico durante 14 días expresan genes y proteínas asociadas con el fenotipo óseo como: fosfatasa alcalina (ALP), colágeno tipo I (Col 1), Osteopontina (Op), Osteonectina (On), Osteocalcina (Oc), Runx2, Osterix(Osx), Proteína morfogénica ósea 2 (BMP-2), BMP-4 y receptores BMP I y II. (Hu, 2018).

El ácido poliláctico PLA, que fue aprobado por la Food and Drugs Administration (FDA) en 1970, ha demostrado ser biodegradable, no tóxico, no cancerígeno para el cuerpo humano y producido a partir de recursos renovables (Tsou, 2015).

## II CONGRESO NACIONAL DE BIOMATERIALES

La degradación del PLA se produce principalmente por hidrólisis y puede degradarse entre 10 meses a 4 años dependiendo de los factores del microambiente que lo rodee (Granados, 2017) El PLA debe de cumplir con ciertas características como:

1. Ser biocompatible y bioabsorbible.
2. Tridimensional y poroso en su estructura para el crecimiento celular
3. Superficie químicamente adecuada para para fijación celular y diferenciación.
4. Propiedades mecánicas adecuadas que coincidan con las de los tejidos del sitio de la implantación.
- 5.

Por todo lo anterior, en el presente estudio, nos planteamos como objetivo principal: evaluar la biocompatibilidad de un constructo tridimensional de PLA sembrado con MSCat diferenciadas al linaje osteogénico.

### Materiales y métodos

Para este estudio se emplearon 20 ratas de ambos sexos de la cepa Wistar de un peso de entre 200+/-50 g. Durante la realización de este estudio los especímenes tuvieron acceso a agua y comida *ad libitum* durante todos los procedimientos y con ciclos 12:12 de luz/oscuridad. Su cuidado se realizó en el Bioterio CICUAE de la FES Cuautitlán en donde se tuvo un estricto trato y cuidado de acuerdo a la "NORMA Oficial Mexicana NOM-062- ZOO-1999" (folio Comisión de ética CE/FESI/112019/1333 y bioseguridad #105).

Los animales empleados fueron anestesiados con Pentobarbital sódico (43 mg/kg) y Xilazina (7 mg/kg). La eutanasia se realizó por sobre exposición de CO<sup>2</sup> a fin de evitar el dolor innecesario.

Los especímenes fueron pesados y anestesiados vía intraperitoneal con: Sedalphorte® (Pentobarbital sódico, 43 mg/kg) y relajante muscular de PROCIN® (Xilazina, 7 mg/kg).

El área quirúrgica fue rasurada y se realizó antisepsia con solución Antibenzil®, posteriormente, se realizó una incisión cutánea en la zona abdominal del espécimen en una sola incisión de 2.5 cm de longitud aproximadamente, con el fin de exponer el tejido adiposo subcutáneo abdominal extrayendo la mayor cantidad posible de tejido adiposo (en promedio se obtuvo, en todos los casos, aproximadamente 3 gramos), sin dañar otras estructuras.

El tejido adiposo obtenido se colocó en un tubo con solución HBSS 1x Biowest® adicionado con antibiótico/antimicótico al 2 % Biowest® para su transporte e inmediato procesamiento.

La herida se suturó y se limpió la herida con antiséptico (Antibenzil®). Los especímenes fueron medicados con antibiótico ENROXIL 5 % (Enrofloxacin, 5 mg/kg de peso) y analgésico TRAMADOL JET® (Tramadol 5 mg/kg de peso) después de la cirugía y cada 24 horas durante 3 días. Se realizó la extracción de las MSCat. Se realizaron 3 lavados del tejido con solución (HBSS1x BIOWEST®, USA) adicionado con 1 % de antibiótico/antimicótico (BIOWEST®, USA). Cada lavado tuvo una duración de 5 minutos al finalizar las muestras se colocaron en cajas Petri de cristal, donde se realizó la disgregación de tejidos de forma mecánica para facilitar la digestión enzimática, con

Colagenasa tipo I al 0.01 % (GIBCO®, USA) a 37 °C durante 45 minutos, con agitación manual cada 5 minutos.

Después, se filtró la muestra con un filtro de poro 100 µm y la solución obtenida se centrifugó a 1040 rpm a temperatura ambiente durante 10 min. Al terminar, se eliminó el sobrenadante, para quedarse con el botón celular, que fue sembrado en D/MEM suplementado (BIOWEST®, USA) a 37 °C con 5 % de CO<sup>2</sup> con humedad relativa. Después de 48 horas se observó la presencia de células adheridas. Se cambió de medio cada 48 horas.

Al llegar a la confluencia (80 % de células en la superficie del frasco de cultivo), se realizaron los subcultivos para poder cuantificar y sembrar en el tercer pase.

Para la diferenciación celular de los grupos de estudio a los que se les aplicó una terapia con células troncales mesenquimales de tejido adiposo (MSCat), cabe mencionar que las células han sido probadas como células troncales bajo los criterios establecidos por la ISCT en nuestro laboratorio. Al ser diferenciadas al linaje osteogénico (MSCost), se cultivaron en D/MEM suplementado con FBS al 1 0%, antibiótico/antimicótico al 2 %, Dexametasona 0.1 mM, beta-glicerol-fosfato 10 mM y ascorbato-2-fosfato 10 mM. A partir de los 14 días se observó la diferenciación celular al linaje osteogénico, evidencia previa con tinciones e inmunohistoquímicas realizadas por Yudho y cols (Yudho Z.R. 2007) (Figura 1).



**Figura 1.** a) Células MSCat en el tercer subcultivo, b) Células MSCost (diferenciación durante 15 días), tomando una morfología romboideal, Fotografía tomada con microscopio invertido ZEISS a 20X

El PLA fue donado por el laboratorio de Ingeniería de Tejidos del Dr. Alvarez-Pérez de la Facultad de Odontología de la UNAM (Álvarez, 2009), (Granados, 2018), ya hecho en láminas por medio de electrohilado al 10%, este se procesó para poder realizar su implantación subdérmica en los grupos de estudios correspondientes. Fue cortado de forma circular con 8mm de diámetro; se colocaron en placas multipocillos de 24 y de acuerdo al grupo de estudio, se les agregó D/MEM suplementado para los grupos de estudio PLA + MSCat, y se incubaron a 37 °C con 5 % CO<sup>2</sup> por 7 días para que el material absorbiera el medio necesario para que las células, posteriormente, pudieran penetrar en los andamios. Para el grupo de estudio PLA sin células, se agregó al andamio D/MEM suplementado, y se incubaron a 37 °C con 5 % CO<sup>2</sup> por 7 días antes de su implantación; para el grupo de PLA + MSCost, se les agregó Medio Osteogénico, y se incubaron a 37 °C con 5 % CO<sup>2</sup> por 14 días antes de la cirugía de implantación subdérmica.

Después de haber procesado los andamios de PLA y haberles adicionado D/MEM o medio osteogénico de acuerdo al grupo de estudio durante 7 días, se procedió al sembrado con

## II CONGRESO NACIONAL DE BIOMATERIALES

MSCat y MSCost en dichos andamios, y así obtener los constructos necesarios para su implantación subdérmica.

En cada andamio de PLA se implantaron 50,000 células/mm<sup>2</sup>, y se incubaron a 37 °C con 5 % CO<sub>2</sub> por 7 días antes de su implantación subdérmica.

Los especímenes fueron anestesiados con Sedalphorte y PROCIN. Se rasuró la parte del lomo de los especímenes, se desinfectó la zona con solución ANTIBENZIL y se cubrió la zona con un campo estéril hendido. El acceso quirúrgico fue a partir de la epidermis en el lomo de la rata Wistar tomando como referencia anatómica se marcó un punto medio entre los omóplatos bajando aprox. 2.5 cm para realizar la incisión dorsal (Figura 2).

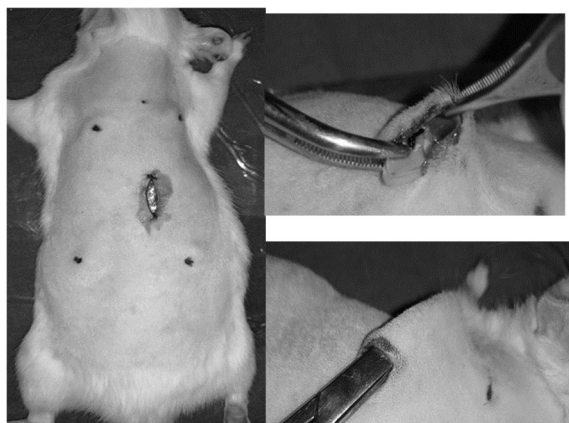


Figura 2. Diseño quirúrgico de implantación subdérmica de biomaterial.

Se realizó una incisión dorsal a la altura de los omóplatos en la línea media, siguiendo los principios de la cirugía, aproximadamente entre 2 a 3 centímetros de longitud; de una sola intención que solo involucró la dermis.

Se utilizaron pinzas mosco para realizar la disección roma y posteriormente se implantaron los constructos PLA (derecho inferior), PLA + MSCat (izquierdo superior), PLA + MSCost (derecho superior), Gelfoam como control (izquierdo inferior). Finalmente se suturó con la técnica de puntos simples y los especímenes fueron medicados con antibiótico ENROXIL 5 % y TRAMADOL (5 mg/kg de peso).

Se monitorearon los especímenes vivos para observar el grado de inflamación en la zona receptora del constructo, hasta terminar el tiempo de estudio (60 días), posteriormente, se sacrificaron por sobre exposición de CO<sub>2</sub> en una cámara de gas.

Las muestras del tejido junto con los constructos fueron retirados y fijados con paraformaldehído al 4 % para su procesamiento por medio de técnica histológica de rutina (Isauro, 2003), las muestras se tiñeron con Hematoxilina & Eosina.

### Resultados y discusión

Se realizó un control de inflamación donde no se observó rechazo del biomaterial o inflamación severa. En los resultados histológicos, en los cortes teñidos con Hematoxilina & Eosina, observamos: (Figura 3.)

Gealfoam (control): a los 21 días se observó degradación, ya que el biomaterial ya no fue visible histológicamente, no se observaron células inflamatorias ni cápsula alrededor del biomaterial. A los 60 días se absorbió por completo.

PLA: a los 21 días se integró sin cápsula de tejido conectivo, se observaron células a su alrededor tipo fibroblasto y no se degradó, se observan las tres capas. A los 60 días las células del tejido conectivo han invadido el biomaterial en sus tres capas y no se observan definidas.

PLA+MSCat: a los 21 días se integró al tejido, sin cápsula, con células entre las tres capas, no hay degradación. A los 60 días se degradó desde el centro hacia afuera y se observan células dentro y alrededor del constructo

PLA+MSCost: a los 21 días se observan entre cada capa, hay tejido conectivo denso con fibroblastos, se observa degradación. A los 60 días, las tres capas están integradas al tejido, hay gran cantidad de células en todo el biomaterial y las capas ya no son visibles.

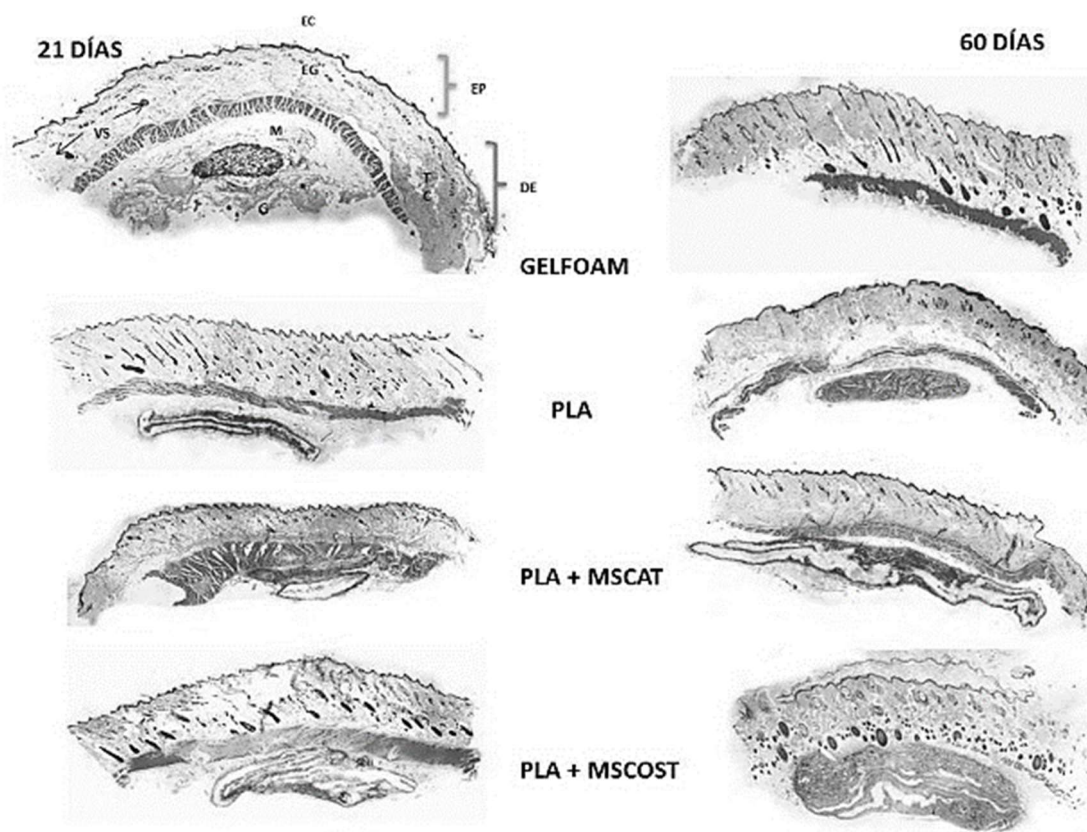
El biomaterial que empleamos de PLA como lo dice Estrada (Estrada, 2020), demostró ser compatible con los tejidos en los que no se observó daño, de hecho, histológicamente observamos la proliferación de las células entre las capas del biomaterial, que se integró al tejido.

Como lo mencionan Tajbakhsh y Shen y colaboradores (Tajbakhsh, 2017), (Shen, 2016). Nuestro material demostró poseer las 4 características fundamentales para contribuir a la regeneración tisular:

Su estructura tridimensional permitió la sobrevivencia y proliferación de las MSCats; se observó compatibilidad con los tejidos de nuestras ratas vivas y demostró que se reabsorbe, si bien no completamente a los 60 días, si hay un porcentaje de más del 60% que se reabsorbió, que depende de la utilidad que se le quiera dar puede permitir controlar la regeneración, en el caso de querer generar tejido óseo, resulta muy útil poder tener un biomaterial que no se reabsorbe por completo en 60 días; y por último, demostró poseer propiedades mecánicas adecuadas para poder ser usado como relleno y como andamio en el constructo tisular.

Por su parte, las MSCats con células (Gebler, 2012), que han demostrado ser altamente regeneradoras por la cantidad de citoquinas que participan en ellas, que les aportan capacidades inmunomoduladoras, así como de angiogénesis, y que esto se observa en las muestras histológicas en las que hay formación de micro vasos sanguíneos alrededor, a los 21 días, y dentro del biomaterial, a los 60 días.

La unión del PLA con células de tipo mesenquimal ya ha sido previamente estudiado (Alvarez, 2009) y quedó demostrado que al igual que otros autores, la unión de nuestras células de tipo mesenquimal, las MSCats, son excelente opción para ser sembradas diferenciadas o no diferenciadas dentro del biomaterial, en nuestros hallazgos histológicos se observó que las células no solo sobreviven dentro del biomaterial, sino que proliferan y contribuyen a que los tejidos circundantes toleren la presencia del constructo.



**Figura 3.** Imágenes microscópicas a 5X teñidas con H&E 21 y 60 días. EP (Epidermis), DE (Dermis), EC (Estrato Corneo), EG (Estrato Granuloso), VS (Vaso Sanguíneo), M (Músculo), TC (Tejido Conectivo).

### Conclusiones

De acuerdo con nuestras observaciones histológicas el constructo tridimensional de PLA sembrado con MSCat diferenciadas al linaje osteogénico resultó ser biocompatible.

### Referencias

**Estrada Hernández, Mónica Gabriela** (2020), sustentante Evaluación de un constructo hecho mediante ingeniería de tejidos en un modelo de osteoporosis, UNAM, México.

**Gebler, A., Zabel, O., & Seliger, B.** (2012). The immunomodulatory capacity of mesenchymal stem cells. *Trends in molecular medicine*, 18(2), 128-134. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2011.10.004>

**Granados, M. V., Montesinos-Montesinos, J. J., & Álvarez-Pérez, M. A.** (2017). Adhesión y proliferación de las células troncales mesenquimales de médula ósea en andamios fibrilares de poli (ácido L-láctico)(PLA). *Revista mexicana de ingeniería biomédica*, 38(1), 288-296.

**Granados-Hernández, M. V., Serrano-Bello, J., Montesinos, J. J., Alvarez-Gayosso, C., Medina-Velázquez, L. A., Alvarez-Fregoso, O., & Alvarez-Perez, M. A.** (2018). In vitro and in vivo biological characterization of poly (lactic acid) fiber scaffolds synthesized by air jet spinning. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, 106(6), 2435-2446.

**Hu, L. Y.** (2018). Mesenchymal Stem Cells: Cell Fate Decision to Osteoblast or Adipocyte and Application in Osteoporosis Treatment. *International journal of molecular sciences*, 19 (2),360.

**Isauro, G. F.** (2003). *Procedimientos Básicos para el Laboratorio de Apoyo y Diagnóstico*, México:UNAM.

**Linero 2014, Linero, Itali M, Doncel, Adriana, & Chaparro, Orlando.** (2014). Proliferación y diferenciación osteogénica de células madre mesenquimales en hidrogeles de plasma sanguíneo humano. *Biomédica*, 34(1), 67-78. <https://doi.org/10.7705/biomedica.v34i1.1465>.

**Martínez Álvarez, O, Barone, A, Covani, U, Fernández Ruíz, A, Jiménez Guerra, A, Monsalve Guil, L, & Velasco Ortega, E.** (2018). Injertos óseos y biomateriales en implantología oral. *Avances en Odontostomatología*, 34(3), 111-119.

**Melek, L. N.** (2015). Tissue engineering in oral and maxillofacial reconstruction. *Tanta DentaJournal*, 12(3), 211-223.

**Meruane N, Manuel, & Rojas R, Mariana** (2011). Células troncales derivadas deltejido adiposo: Técnica de obtención y utilidad en cirugía. *Revista chilena de cirugía*, 63(2), 223-228. <https://dx.doi.org/10.4067/S0718-40262011000200017>.

**Monroy, C. M., Cortés, A. C., Sicard, D. M., & de Restrepo, H. G.** (2005). Citotoxicidad y genotoxicidad en

## II CONGRESO NACIONAL DE BIOMATERIALES

células humanas expuestas in vitro a glifosato. *Biomédica*, 25(3), 335-45. <https://doi.org/10.7705/biomedica.v25i3.1358>.

**Rodríguez Pardo, Viviana Marcela, Fuentes-Lacouture, Maria Fernanda, Aristizabal-Castellanos, Jose Alejandro, & Vernet Hernandez, Jean Paul.** (2010). Aislamiento y caracterización de células "stem" mesenquimales de médula ósea humana según criterios de la Sociedad Internacional de Terapia Celular. *Universitas Scientiarum*, 15(3), 224-239. Retrieved July 30, 2021, from [http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0122-74832010000300004&lng=en&tlng=es](http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0122-74832010000300004&lng=en&tlng=es).

**Rodríguez, A.Miranda, Galván Cabrera, J., & de León Delgado, J.** (2014). Propiedades inmunomoduladoras de las células madre mesenquimales. *Revista Cubana de Hematología, Inmunología y Hemoterapia*, 31(1). Recuperado de: <http://www.revhematologia.sld.cu/index.php/hih/article/view/221/155>.

**Shen, X., Zhang, Y., Gu, Y., Xu, Y., Liu, Y., Li, B., & Chen, L.** (2016). Sequential and sustained release of SDF-1 and BMP-2 from silk fibroin-nanohydroxyapatite scaffold for the enhancement of bone regeneration. *Biomaterials*, 106, 205–216. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2016.08.023>.

**Tajbakhsh, S., & Hajiali, F.** (2017). A comprehensive study on the fabrication and properties of biocomposites of poly(lactic acid)/ceramics for bone tissue engineering. *Materials science & engineering. C, Materials for biological applications*, 70(Pt 1), 897–912. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2016.09.008>.

**Tsou, C. H.** (2015). Biocompatibility and characterization of polylactic acid/styrene-ethylene-butylene-styrene composites. *Bio-medical materials and engineering*, 26(1), S147-S154.

**Xiao, L. W.** (2012). Poly(Lactic Acid)-Based Biomaterials: Synthesis, Modification and Applications. *Biomedical Science, Engineering and Technology*, 24-282. doi:10.5772/23927.



# NANOPARTÍCULAS DE MAGNETITA PARA LA PURIFICACIÓN DE UNA PROTEÍNA RECOMBINANTE

VA Reyes Villegas<sup>1</sup>, J I de León Ramirez<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Facultad de Ciencias de la Salud de la Universidad Autónoma de Baja California, Tijuana, México, victor.alfredo.reyes.villegas@uabc.edu.mx, jesus.deleon@uabc.edu.mx

## Introducción

Las nanopartículas de ferrita tienen una gran área superficial y presencia de fuerzas no balanceadas en la superficie ideal para la adsorción (Kaur et al., 2016). Recientemente, las nanopartículas de óxido de hierro, particularmente nanopartículas de magnetita (MNP) con la fórmula FeO-Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> o Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>, han emergido como adsorbentes nuevos en la nanotecnología para el tratamiento de aguas residuales y muchas otras aplicaciones como biomedicina, ciencia de materiales y ciencias biológicas (Ul-Ain et al., 2019). La magnetita o ferrita de hierro ha sido usada para separar una variedad de sustancias como por ejemplo para la purificación de biomoléculas (Hu et al., 2007).

Las partículas magnéticas de tamaño nano pueden ser producidas con grandes áreas superficiales presentando una alta capacidad de adsorción para proteínas. Por lo tanto, puede ser útil sintetizar partículas magnéticas en el tamaño nano con áreas superficiales grandes y utilizarlas como portadores adecuados para la adsorción/ desorción de proteínas (Peng et al., 2004).

Para el procesamiento posterior en la biotecnología, biomoléculas (tales como proteínas) conteniendo secuencias de péptidos, con una afinidad de unión específica al adsorbente (nanopartículas magnéticas), tal como la etiqueta His pueden ser usados para la separación de la molécula blanco de una suspensión compleja. En el caso de la etiqueta His, el acoplamiento reversible covalente de múltiples moléculas de histidina a iones divalentes como Ni<sup>2+</sup> es usado como mecanismo de unión (Schwaminger et al., 2017). Ambos mecanismos de adsorción y elución son gobernados por las propiedades superficiales tales como electrostáticas, hidrofóbicas y enlace-H entre MNP y biomoléculas. Para la adsorción, estas interacciones pueden resultar en fuerzas atractivas, mientras que, en la elución, las fuerzas repulsivas son activadas (Fatima & Kim, 2017).

Entre las varias técnicas de purificación, la cromatografía de afinidad de metal inmovilizado (IMAC) y la cromatografía de afinidad de óxido de metal han sido utilizadas para selectividad y confiable separación de proteínas con etiqueta de histidina basado en la interacción de metal de coordinación entre histidina y iones de metales de transición. En el caso de los sorbentes IMAC, el ion de metal divalente (Ni<sup>2+</sup>, Co<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup> o Zn<sup>2+</sup>) tiene constantes de afinidad modestas y mayor estabilidad de ligando comparado con ligandos de afinidad bioespecíficos (Salimi et al., 2017). La cromatografía de metal inmovilizado ha sido considerada como uno de los acercamientos más efectivos para la separación de proteínas etiquetadas con His (Li et al., 2016). Cuando se usan nanopartículas, el proceso adsorptivo puede ser realizado en una suspensión en agitación en vez del

empaquetamiento convencional ya que las nanopartículas presentan una disminución de alta presión. Comparado con

los aislamientos convencionales, las ventajas de la separación magnética son atribuidas a su velocidad, precisión, y simplicidad. En adición, las MNP pueden ser fácilmente recuperadas y regeneradas. Los problemas de aborraje de membrana en la microfiltración y los cambios de presión en cromatografías pueden ser reducidos al usar separaciones magnéticas (Liu et al., 2017).

En este trabajo se utilizan un nanomateriales magnéticos a base de magnetita para la purificación de una proteína recombinante. Ya que esta comprobado que las proteínas pueden tener afinidad por las nanopartículas (efecto corona) en ciertas condiciones, haciendo este método viable. Debido a las propiedades magnéticas de las nanopartículas, estas pueden ser aprovechadas para reducir considerablemente el tiempo de purificación una vez que se conozcan las características y condiciones óptimas para la interacción nanopartícula-proteína. La proteína por purificar en este estudio es una proteína tipo Fur (afinidad por hierro) recombinante con etiqueta de 6xHis. Una novedad de esta purificación empleada es que las nanopartícula de hierro sintetizadas, que se conoce que son magnéticas (bioseparación magnética) no contienen ningún agente de afinidad, se observó una interacción MNP-proteína y la separación del complejo formado (MNP-proteína) se realizó en menos 1 min decantando el resto por decantación magnética.

## Materiales y métodos

La interacción de histidina con las MNP fue caracterizada por espectroscopia UV-Vis y ATR FT-IR. Se realizaron tres series a pH 3 (Glicina-HCl 0.1 M), 7.4 (Buffer PBS) y 11 (NH<sub>3</sub> 0.1 M) de cinco soluciones de 10 mL a 60, 50, 25, 10 y 5 ppm de L-histidina y 10 mg de MNP (Pan et al., 2017). Posteriormente, se realizaron dos series a pH 7.4 (Buffer PBS) y 11 (NH<sub>3</sub> 0.1 M) de cinco soluciones de 10 mL a 5 ppm de L-histidina y 0.5, 1, 2.5, 5 y 10 mg de MNP (Joshi et al., 2012). Todas las soluciones se incubaron en agitación por 24 horas a 37 °C, se leyeron sobrenadantes en un barrido de UV-Vis de 190 a 900 nm.

La caracterización del sitio de interacción se analizó por ATR FT-IR. Se midieron dos soluciones de MNP (10 mg) con el aminoácido L-his a 5,000 ppm a pH 7.4 (Buffer PBS) y 11 (NH<sub>3</sub> 0.1 M). Las soluciones se incubaron en agitación por 24 horas a 37 °C, se removió la parte sólida (MNP-His pH 7 (S) y/o MNP-His pH 11 (S)), por decantación magnética. Se realizó un secado a 3 horas en una estufa a 37 °C y se obtuvo un barrido de 4,000 a 400 cm<sup>-1</sup> de las siguientes muestras: MNP-His pH 7(S), MNP-His pH 11(S), sobrenadantes (MNP-His pH 7(L) y MNP-His pH 11(L)) y la solución de

L-his sin contacto con nanopartículas (His pH 7(L), His pH 11(L)) (Schwaminger et al., 2015).

### Obtención de MAP3773c purificada

Se indujo una cepa de *Escherichia coli* BL21 (DE3) - pRSET-MAP3773c en LB broth usando IPTG (1 mM) como inductor, hasta una densidad óptica de 0.6-0.7, el cultivo se centrifuga y se lisan los pellets por sonicación en BN Lysis Buffer (Swamy et al., 2006). El lisado se centrifuga a 4 ° C hasta obtener un sobrenadante claro. Para la confirmación de la expresión, se precipitan las proteínas con ácido tricloroacético al 10 %, se incuba en hielo (20 min.), se centrifugan (6000 rpm por 30 min. a 4 ° C ) y se lavan con etanol frío. Se dejan secar a temperatura ambiente, se resuspenden en 15 µL de agua destilada y se realiza electroforesis SDS-PAGE (Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio) en gel al 17%. Para la purificación se equilibran las nanopartículas con 10 volúmenes de buffer de equilibrio del IMAC Buffer Kit Profinia™ (300 mM KCl, 50 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 5 mM Imidazol pH 8) o 50 mM Tris buffer pH 8 (TB8) y se incuba con 0.1 mL de extracto por 1 hora bajo agitación vigorosa. Enseguida se lava (L1 y L2) con por duplicado con soluciones del IMAC Buffer Kit Profinia™, wash buffer 1 (WB1) (300 mM KCl, 50 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 5 mM Imidazol pH 8) y wash buffer 2 (WB2) (300 mM KCl, 50 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10 mM Imidazol pH 8) o con TB8 tanto L1 como L2. Finalmente, se eluye (E1) con 0.2 mL durante 24 h con buffer de elución del IMAC Buffer Kit Profinia™ (300 mM KCl, 50 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 250 mM Imidazol pH8) o IMAC Buffer (50 mM imidazol, 500 mM NaCl, 50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O pH 7.5) (Schwaminger, Fraga-garcía, et al., 2019). Las muestras obtenidas se analizaron por medio de una electroforesis SDS-PAGE.

### Resultados y discusión

Los espectros de UV-Vis de la curva de calibración de L-histidina a pH 3, 7 y 11 se compararon con las soluciones que tuvieron contacto con 10 mg de MNP a distintos pHs (3, 7 y 11). A un pH= 3 no se observó ningún cambio en la absorbancia, mientras que a los pHs de 7 y 11 se detectó un aumento de absorbancia en la señal de histidina al haber tenido contacto con las MNP.

El efecto hipercrómico observado es atribuido a una interacción entre las MNP y L-His, que probablemente esta interacción ayude a suspender las nanopartículas en solución. Ya que en el pH= 3 no se presentó un incremento de absorbancia. En teoría, no existe interacción electrostática entre las MNP y L-His, debido a que ambos tienen carga positiva a este pH. Por lo tanto, el recubrimiento de partículas con capas de adsorción provee una mejora en la resistencia contra la agregación de partículas y en medios acuosos, capas de estabilización electrostáticas, estéricas o combinadas se pueden desarrollar para mejorar la estabilidad química y coloidal (Tombácz et al., 2013).

En adición se observan, una (280 nm) y dos (260 y 320 nm) señales en los espectros de L-His obtenidos a pH= 7 (Fig. 1) y pH= 11 (Fig. 2) respectivamente tras haber tenido contacto con MNP. Estas señales no se presentaron en los espectros de la curva de calibración. Por lo cual, este resultado es atribuido a un efecto hipercrómico y/o un desplazamiento batocrómico. Ya que, una banda de absorción débil en la región de 280 a 290 nm que se desplaza hacia longitudes de onda más cortas cuando aumenta la polaridad del solvente,

indica la presencia de un grupo carbonilo y una banda de absorción débil próxima a 260 nm constituye una evidencia de la existencia de un anillo aromático (Skoog, 2008). Las interacciones propuestas han sido a través de los nitrógenos de las aminas (N<sub>am</sub>), los nitrógenos del imidazol (N<sub>im</sub>) y los oxígenos de carboxilos (O<sub>c</sub>).

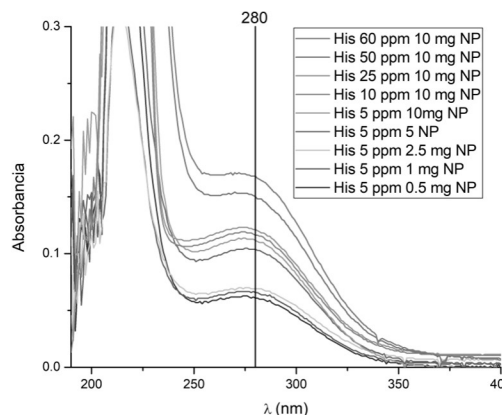


Figura 1. Espectro de L-his a pH 7 con previo contacto con MNP.

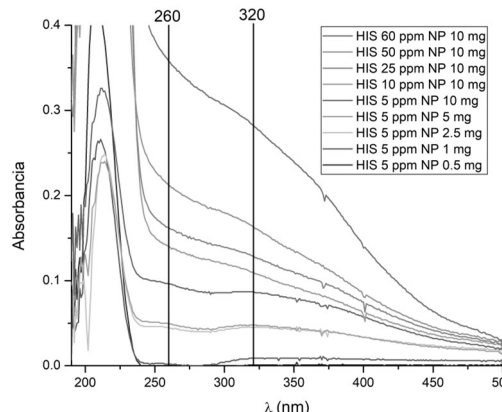
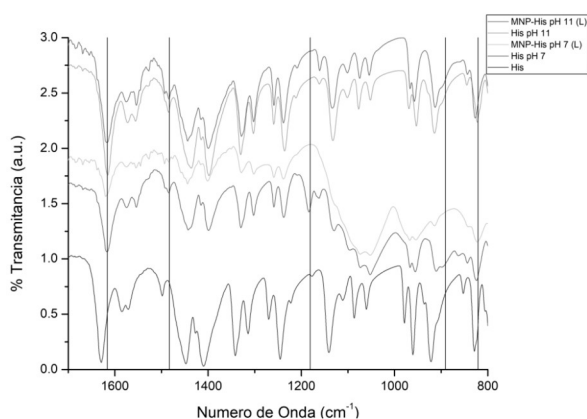


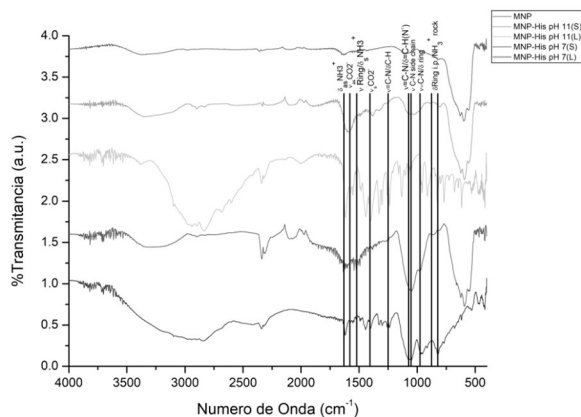
Figura 2. Espectro de L-his a pH 11 con previo contacto con MNP.

En la figura 3 se comparan los espectros de IR de L-his en polvo y las soluciones deshidratadas de L-his a 5,000 ppm con previo contacto con MNP a pH 7 y 11. Los cambios detectados fueron modificaciones ligeras y se observaron a una escala entre 800-1700 cm<sup>-1</sup>. Todas las soluciones deshidratadas tuvieron un corrimiento hacia el azul con respecto al espectro L-his en polvo. Ya que, un cambio en la constante dieléctrica de una solución como resultado de cambiar el pH o concentración de buffer puede causar cambios de frecuencias. De igual forma, la posición de una banda de IR sugiere una correlación con la forma iónica y estas bandas pueden ser utilizadas como marcadores para determinar el estado de protonación o el tipo de unión metal ion (Mesu et al., 2005). Así mismo, en la figura 3 se distinguen diferencias entre las soluciones deshidratadas que no tuvieron contacto con MNP con respecto a las que sí tuvieron. Estas diferencias pudieran apoyar el origen de los efectos hipercrómicos y batocrómicos discutidos en los espectros de UV-Vis. Sin embargo, se requieren de más pruebas para asegurar la presencia de MNP en estas soluciones.



**Figura 3.** Espectros de IR de 800- 1700 cm-1 de L-his deshidratadas a distintos pHs y las fases liquidas de L-his con previa interacción de 24 h con nanoparticulas de Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> separadas por decantación magnética.

En la Fig. 4 se muestran los espectros de IR para las MNP y MNP que estuvieron en contacto con L-his a pH de 7 y 11 así como también sus respectivos sobrenadantes. Para las MNP-his pH 7(S) se observa un aumento, ensanchamiento y desplazamiento de las señales correspondientes a vibraciones del anillo de imidazol y una ligera presencia, pero, ensanchamiento de la señal del grupo carbonilo. Para las MNP-his pH 11 (S) se observa una ligera presencia y ensanchamiento de las mismas señales que al pH 7 con diferencia en las intensidades. Esto corrobora la adsorción de L-his a las MNP a pH 11 ( $O_c$  y/o  $N_{am}$  y  $N_{im}$ ) y a pH 7 con una interacción mucho mayor a  $N_{im}$  que a  $N_{am}$  y/o  $O_c$  (Kumar et al., 2010; Mesu et al., 2005).

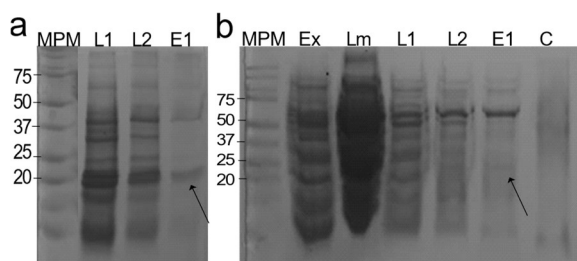


**Figura 4.** Espectros de IR de 400- 4000 cm-1 de MNP y MNP que estuvieron en contacto con L-his a pH de 7 y 11 así como también sus respectivos sobrenadantes.

Schwaminger et. al. (2015) observo la interacción de L-his con nanoparticulas de magnetita (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>) en un sistema coloidal a un pH de 6. Donde investigo la influencia de la cadena lateral en la adsorción en una interfase de magnetita-agua con experimentos de incubación. El espectro de IR indico una participación del anillo de imidazol en el enlace con las MNP corroborado por XPS y de igual forma asumen una adsorción a través del grupo carboxilo (Schwaminger et al., 2015).

En figura 5a se muestra la purificación realizada con los buffers del IMAC Buffer Kit Profinia™. En los lavados (L1 y L2) se muestra como la mayoría de las proteínas se desorben de las nanoparticulas incluyendo la proteína de

interés. Una de las estrategias de la cromatografía IMAC es remplazar los enlaces de coordinación de las subunidades de histidina a los iones de hierro por moléculas de imidazol (Schwaminger, Fraga-garcia, et al., 2019). Por lo cual los lavados contienen una baja cantidad de imidazol (en comparación con el buffer de elución), esta razón pudiera ser una de las razones principales de la desorción de la mayoría de las proteínas en los pasos de lavado. De igual forma los buffers son a base de fosfato, los iones de fosfato tienen alta afinidad hacia los óxidos de hierro lo cual genera enlaces de complejos fuertes (Schwaminger, Blank-shim, et al., 2019).

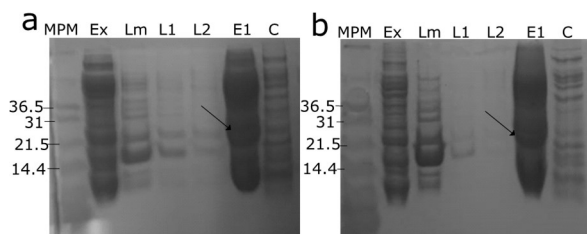


**Figura 5.** a) Electroforesis en gel de SDS-PAGE de purificación de MAP3773c por medio de NPM a partir de un extracto celular utilizando las soluciones del IMAC buffer Kit Profinia™. b) Duplicado. MPM (Marcador de peso molecular), Ex (Extracto), Lm (Lavado muerto), L1 y L2 (Lavado 1 y 2), E1 (Elucion1) y C (corona presente después de la elución)

En el carril E1 de la figura 6a se muestra una proteína cercana al peso de 25 KDa que podría ser MAP3773c recombinante la cual pesa 20.6 KDa. La corona proteica dura consiste en una o varias capas proteicas las cuales se unen de manera dinámica en la superficie de la nanopartícula. Encima de esta corona dura, puede existir una corona suave, la cual consiste en una capa proteica que tiene intercambio rápido ya que están asociadas de manera muy débil (Docter et al., 2014). La corona dura contiene proteínas de alta afinidad en la superficie de las MNP (Nguyen & Lee, 2017). Por lo cual este carril nos sugiere que las MNP bajo las condiciones utilizadas puede generar una adecuada purificación, ya que en la corona dura se encuentra la proteína de interés unidad con alta afinidad. Sin embargo, en la figura 6b se observa un duplicado en donde la proteína cercana a los 25 KDa se observa muy tenue indicada por una flecha, al igual que muchos contaminantes. Esto nos da información de que el periodo de incubación pudiera ser demasiado generando una corona dura más densa que la suave ya que la remoción de una proteína implica el movimiento de muchas otras (Casals et al., 2010), agregándole a esto la temperatura de incubación no fue controlada. Lo cual nos indica que en este sistema la temperatura influye en la formación de la corona por efectos de movilidad, posiblemente por efectos similares a los de Vroman, lo cual consiste en adsorividad competitiva donde proteínas con alta movilidad arriban primero y son desplazadas después con proteínas con menos movilidad que tienen más afinidad por la superficie (Casals et al., 2011). Lo cual nos dice que el sistema utilizado a cierta temperatura genera una corona suave la cual puede ser separada por lavados dejando como corona dura la proteína de interés a un tiempo suficiente de 1 hora de incubación.

Cambiando las condiciones del buffer juegan un gran papel en la fuerza de interacción con las nanoparticulas y el péptido 6xHis. Blank-Shim et al. (2017) demostró que la adsorción de homo-hexameros de his (6xHis) a nanoparticulas magnéticas de Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> muestra una gran influencia en el ambiente (sistema de amortiguación) principalmente en las características electroestáticas de la superficie de la MNP.

Por lo cual las condiciones del buffer nos permiten afinar la interacción entre el péptido con las MNP (Blank-Shim et al., 2017). El pH se decidió en base al estudio de Schwaminger et al. (2019) donde en el buffer Tris a pH 7 sus NPM adquieren una carga negativa, y en base al IEP de nuestras NPM a pH 8 se asegura una carga superficial negativa.



**Figura 6.** a) Electroforesis en gel de SDS-PAGE de purificación de MAP3773c por medio de NPM a partir de un extracto celular utilizando como equilibrio y lavados la solución tris buffer pH 8 y como elución IMAC Buffer (50 mM imidazol, 500 mM NaCl, 50 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  pH 7.5). b) Duplicado. MPM (Marcador de peso molecular), Ex (Extracto), Lm (Lavado muerto), L1 y L2 (Lavado 1 y 2), E1 (Elución1) y C (corona presente después de la elución)

En la figura 6 se muestra una purificación realizada con TB8 como buffer de equilibrio, L1 y L2 e IB7.5 como elución. Comparando el Ex con el Lm se observa que la mayoría de las proteínas se adsorben a las NPM. La falta de especificidad de la adsorción de únicamente la proteína de interés pudiera ser debido a la falta de abundancia de esta, ya que las proteínas en mayor cantidad son las primeras en interaccionar con la superficie de las MNP (Nguyen & Lee, 2017). Indicando que se requiere tener la proteína de interés en mayor cantidad para purificarla de manera más eficiente. Sin embargo, en los lavados se desorben ciertas proteínas dentro de las cuales se puede considerar la MAP3773c. La corona suave está formada por proteínas con baja afinidad las cuales pueden ser despegadas por lavados (Nguyen & Lee, 2017). Sin embargo, al lavar con soluciones libres de proteínas se pierde el equilibrio generado de las proteínas con mayor afinidad obligando a un reequilibrio y subsecuente disociación y difusión al medio. Esto como consecuencia directa de la ley de acción de masa, generando un desprendimiento de proteínas adheridas como corona (Pino et al., 2014). Esto explicando la disociación de la proteína de interés en los lavados (los cuales no contienen imidazol), aunque esta pueda ser eluida con los buffers de IMAC Buffer Kit Profinia™ que sí contenían imidazol.

La elución muestra cómo se desorbe una gran cantidad de proteínas, a pesar de ello, en las nanopartículas aún existe una corona después de la elución. Esta afinidad por una gran variedad de proteínas puede ser debido a que, la molécula tris contiene un grupo amina el cual puede cargarse positivamente y por lo tanto interactuar con cargas negativas (Schwaminger et al., 2017). De esta forma favoreciendo a la adsorción de tris en la superficie negativa de las NPM y causando adsorción de otras proteínas contaminantes. Ya que se ha observado que distintos aminoácidos se adsorben a la superficie de MNP y esta adsorción depende fuertemente de las características electrostáticas que pueden ser manipuladas por las condiciones del buffer (Blank-Shim et al., 2017). Dada la adsorción observada de gran cantidad de proteínas bajo las condiciones probadas en el buffer a base de Tris se pudiera realizar una purificación donde la proteína de interés se localice en la corona suave y la cantidad de pasos a realizar pudieran ser disminuidos. En adición, la corona

proteica de las nanopartículas se ve afectada por las condiciones dinámicas del fluido ya que se ha observado una diferencia en las coronas formadas en incubaciones en condiciones estáticas (Nguyen & Lee, 2017). Las condiciones que se deben afinar en los pasos de purificación realizados sin cambiar las soluciones utilizadas basándonos en lo visto previamente son: la movilidad del fluido (dinámica de incubación), temperatura, concentración de proteína de interés y la cantidad de lavados. Ya que se ha demostrado que a pH 8 las MNP pueden adsorben la proteína de interés en la corona dura y eluirla en el paso de elución.

## Conclusiones

En este trabajo, las nanopartículas de magnetita sintetizadas por el método de US-RP con un tamaño de cristal de ~15 nm, y un comportamiento superparamagnético se utilizaron como agentes de purificación para un la proteína MAP3773c con 6xHis y mostraron un potencial para ser utilizadas como una herramienta eficiente y efectiva para la purificación de una proteína recombinante con etiqueta 6xHis. Ya que se comprobó la adsorción del aminoácido a las MNP y de proteínas dentro de un extracto celular. De igual forma la elución de MAP3773c con 6xHis en mayor cantidad que otras proteínas en solución.

## Referencias

- Blank-Shim, S. A., Schwaminger, S. P., Borkowska-Panek, M., Anand, P., Yamin, P., Fraga-García, P., Fink, K., Wenzel, W., & Berensmeier, S. (2017). "Binding patterns of homo-peptides on bare magnetic nanoparticles: Insights into environmental dependence." *Scientific Reports*, Vol. 7, No.1, pp. 1–11.
- Casals, E., Pfaller, T., Duschl, A., Oostingh, G. J., & Puentes, V. (2010). "Time evolution of the nanoparticle protein corona." *ACS Nano*, Vol. 4, No.7, pp. 3623–3632.
- Casals, E., Pfaller, T., Duschl, A., Oostingh, G. J., & Puentes, V. F. (2011). "Hardening of the nanoparticle-protein corona in metal (Au, Ag) and oxide (Fe 3O 4, CoO, and CeO 2) nanoparticles." *Small*, Vol. 7, No.24, pp. 3479–3486.
- Docter, D., Distler, U., Storck, W., Kuharev, J., Wünsch, D., Hahlbrock, A., Knauer, S. K., Tenzer, S., & Stauber, R. H. (2014). "Quantitative profiling of the protein coronas that form around nanoparticles." *Nature Protocols*, Vol. 9, No.9, pp. 2030–2044.
- Fatima, H., & Kim, K. S. (2017). "Magnetic nanoparticles for bioseparation." *Korean Journal of Chemical Engineering*, Vol. 34, No.3, pp. 589–599.
- Hu, J., Lo, I. M. C., & Chen, G. (2007). "Comparative study of various magnetic nanoparticles for Cr(VI) removal." *Separation and Purification Technology*, Vol. 56, No.3, pp. 249–256.
- Joshi, S., Ghosh, I., Pokhrel, S., Mädler, L., & Nau, W. M. (2012). "Interactions of amino acids and polypeptides with metal oxide nanoparticles probed by fluorescent indicator adsorption and displacement." *ACS Nano*, Vol. 6, No.6, pp. 5668–5679.
- Kaur, M., Kaur, N., & Vibha. (2016). "Ferrites: Synthesis and Applications for Environmental Remediation." *ACS*

## II CONGRESO NACIONAL DE BIOMATERIALES

*Symposium Series*, Vol. 1238, pp. 113–136.

**Kumar, S., Kumar Rai, A., B Rai, S., & K Rai, D.** (2010). “Infrared and Raman spectra of Histidine : an ab initio DFT calculations of Histidine molecule and its different protonated forms.” *Indian Journal of Physics*, Vol. 84, No.5, pp. 563–573.

**Li, P., Li, L., Zhao, Y., Sun, L., & Zhang, Y.** (2016). “Selective binding and magnetic separation of histidine-tagged proteins using Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/Cu-apatite nanoparticles.” *Journal of Inorganic Biochemistry*, Vol. 156, No.3, pp. 49–54.

**Liu, C. H., Lai, H. Y., & Wu, W. C.** (2017). “Facile synthesis of magnetic iron oxide nanoparticles for nattokinase isolation.” *Food and Bioproducts Processing*, Vol. 102, pp. 260–267.

**Mesu, J. G., Visser, T., Soulimani, F., & Weckhuysen, B. M.** (2005). “Infrared and Raman spectroscopic study of pH-induced structural changes of L-histidine in aqueous environment.” *Vibrational Spectroscopy*, Vol. 39, No.1, pp. 114–125.

**Nguyen, V. H., & Lee, B. J.** (2017). “Protein corona: A new approach for nanomedicine design.” *International Journal of Nanomedicine*, Vol. 12, pp. 3137–3151.

**Pan, X., Xu, Z., Zheng, Y., Huang, T., Li, L., Chen, Z., Rao, W., Chen, S., Hong, X., & Guan, X.** (2017). “The adsorption features between insecticidal crystal protein and nano-Mg(OH)<sub>2</sub>.” *Royal Society Open Science*, Vol. 4, No.12,.

**Peng, Z. G., Hidajat, K., & Uddin, M. S.** (2004). “Adsorption of bovine serum albumin on nanosized magnetic particles.” *Journal of Colloid and Interface Science*, Vol. 271, No.2, pp. 277–283.

**Pino, P. Del, Pelaz, B., Zhang, Q., Maffre, P., Nienhaus, G. U., & Parak, W. J.** (2014). “Protein corona formation around nanoparticles - From the past to the future.” *Materials Horizons*, Vol. 1, No.3, pp. 301–313.

**Salimi, K., Usta, D. D., Koçer, İ., Çelik, E., & Tuncel, A.** (2017). “Highly selective magnetic affinity purification of histidine-tagged proteins by Ni<sup>2+</sup> carrying monodisperse composite microspheres.” *RSC Advances*, Vol. 7, No.14, pp.

8718–8726.

**Schwaminger, S. P., Blank-Shim, S. A., Scheifele, I., Fraga-García, P., & Berensmeier, S.** (2017). “Peptide binding to metal oxide nanoparticles.” *Faraday Discussions*, Vol. 204, pp. 233–250.

**Schwaminger, S. P., Blank-shim, S. A., Scheifele, I., Pipich, V., Fraga-garcía, P., & Berensmeier, S.** (2019). “Design of interactions between nanomaterials and proteins: A highly affine peptide tag to bare iron oxide nanoparticles for magnetic protein separation.” *Biotechnology Journal*, Vol. 14, No.3, pp. 1–22.

**Schwaminger, S. P., Fraga-garcía, P., Blank-shim, S. A., Straub, T., Haslbeck, M., Muraca, F., Dawson, K. A., & Berensmeier, S.** (2019). “Magnetic One-Step Purification of His-Tagged Protein by Bare Iron Oxide Nanoparticles.” *ACS Omega*, Vol. 4, No.2, pp. 3790–3799.

**Schwaminger, S. P., García, P. F., Merck, G. K., Bodensteiner, F. A., Heissler, S., Günther, S., & Berensmeier, S.** (2015). “Nature of Interactions of Amino Acids with Bare Magnetite Nanoparticles.” *Journal of Physical Chemistry C*, Vol. 119, No.40, pp. 23032–23041.

**Skoog, D.** (2008). *Principles of instrumental analysis*. In *Cengage Learning*.

**Swamy, M., Siegers, G. M., Minguet, S., Wollscheid, B., & Schamel, W. W. A.** (2006). “Blue native polyacrylamide gel electrophoresis (BN-PAGE) for the identification and analysis of multiprotein complexes.” *Science's STKE : Signal Transduction Knowledge Environment*, Vol. 2006, No.345, pp. 1–18.

**Tombácz, E., Tóth, I. Y., Nesztor, D., Illés, E., Hajdú, A., Szekeres, M., & Vékás, L.** (2013). “Adsorption of organic acids on magnetite nanoparticles, pH-dependent colloidal stability and salt tolerance.” *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, pp. 1–6.

**Ul-Ain, Q., Khatoon, J., Raza Shah, M., Imran Malik, M., Tawab Khan, I. A., Khurshid, S., & Naz, R.** (2019). “Convenient pH-responsive removal of Acid Black 1 by green L -histidine / iron oxide magnetic nanoadsorbent from water: performance and mechanistic studies †.” *RSC Advances*, Vol. 9, No.6, pp. 2978–2996.

# SÍNTESIS DE NANOPARTÍCULAS DE PERÓXIDO DE ZINC POR MÉTODO ASISTIDO CON ULTRASONIDO PARA LA INTERACCIÓN CON UNA PROTEÍNA RECOMBINANTE

J I De León Ramírez<sup>1\*</sup>, V A Reyes Villegas<sup>1</sup>, I O Acosta<sup>1</sup>, B L Sánchez<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Universidad Autónoma de Baja California, Facultad de Ciencias Químicas e Ingeniería, Calzada Tecnológico 14418, Mesa de Otay, Tijuana, B. C. 22390, México

\*jesus.deleon@ens.cnyn.unam.mx

## Introducción

Una proteína recombinante es aquella proteína cuya síntesis se realiza en un organismo distinto al organismo nativo, estas son herramientas esenciales que se utilizan en una multitud de aplicaciones. Su producción con fines de investigación se debe principalmente a la rentabilidad, simplicidad y velocidad del proceso junto con los rendimientos adecuados del producto Geisse, S (2009).

La elección de los métodos de purificación está influenciada por distintos factores, como: la forma en que se utilizará la proteína purificada en los estudios, cantidad, costo de los materiales y reactivos utilizados en la purificación.

La adsorción de moléculas biológicas como las proteínas sobre superficies sólidas resulta ser un tema interesante para diversas áreas científicas y tecnológicas. La creación de una capa orgánica controlada, ordenada y funcional en una superficie se ha convertido en un campo de investigación desafiante para la biocatálisis, los biosensores, la biocompatibilidad de implantes artificiales en sistemas vivos, las tecnologías de membrana, entre otros. Esto por medio de, la creación de sistemas inmovilizados bien definidos, dicho de otra forma, mediante el control de la interacción química y molecular de los sistemas biológicos sobre una superficie Van Hong (2017).

Existen varios métodos químicos para la síntesis de NPs, entre los que se encuentran el hidrotermal, electroquímico, fotoquímico, biológico, sol-gel, reducción química, microondas, sonoquímico e híbridos. En estos últimos, existe una combinación de los métodos antes mencionados.

Un gran método de elección sería un método que emplee el uso de energía ultrasónica, ya que se sabe que podría conducir a una nucleación homogénea y a una distribución uniforme de la energía térmica. Lo que daría lugar a un menor tiempo de reacción siendo esta una reacción más óptima y una posible obtención de partículas más homogénea Behin, J (2016).

## Métodos

Las nanopartículas de ZnO<sub>2</sub> se sintetizaron por una ruta sol-gel asistido por sonoquímica; para este propósito, se preparó una solución precursora de 50 ml utilizando 5 ml de peróxido al 30% con agua de grado HPLC de J.T Baker, la solución se trató con ultrasonidos (TPC Advance Technology UC-450 Model) durante un período de 2 minutos. Luego, se disolvió 1 g de acetato de zinc (99.9%) de reactivos de TSA en la solución precursora se colocó en ultrasonido durante un período de 5 minutos hasta que se obtuvo una solución homogénea. Posteriormente se colocó en ultrasonido durante media hora a

una temperatura de 60 °C ± 5 °C. Una vez transcurrido el tiempo, se obtuvo una solución blanca. Esa solución se colocó en una caja Petri y se dejó secar a 36 °C por 24 horas. Se obtuvo un polvo blanco que se lavó 2 veces con agua destilada. De León Ramírez (2020).

Para la caracterización de las nanopartículas se realizaron análisis fisicoquímicos que se describen a continuación:

Para evaluar las propiedades ópticas de las nanopartículas y tratar de comprender la estructura electrónica que pudieran tener las nanopartículas se utilizó un análisis UV-Vis el espectrofotómetro utilizado fue UV-VIS DR 6000 marca HACH. Se utilizó una solución de 30 ppm de nanopartículas ZnO<sub>2</sub> utilizando como disolvente agua destilada, las lecturas se efectuaron en un rango de barrido de 700 a 190 nm y se utilizaron celdas de cuarzo de 1 cm.

Para estudiar las vibraciones de enlace de ZnO<sub>2</sub> se llevó a cabo un análisis de FT-IR se utilizó el equipo Nicolet IS10 Thermo Scientific FT-IR, con el método de ATR realizando un barrido de los 500 cm<sup>-1</sup> a 4000 cm<sup>-1</sup> (se realizaron 100 barridos por lectura y se llevaron a cabo 3 lecturas) para ello se utilizó aproximadamente 100 mg de muestra.

El espectro Raman fue analizado con ayuda de un equipo Raman WITec Con focal Raman Microscope System (alpha300R) utilizando un láser Nd: YVO4 con una longitud de onda de excitación de 532 nm. La resolución típica utilizada se logró utilizando un objetivo de 100x. Con una rejilla de 672 líneas/mm (4cm<sup>-1</sup>) y Rejilla 1800 líneas/mm (1 cm<sup>-1</sup>). La velocidad de adquisición de espectros puntuales fue ≤ 10μs, utilizando una potencia de lámpara de 14.4 mW (para la znsio 118um, znsio) teniendo en cuenta los efectos de la temperatura del láser sobre la muestra. Los espectros se corrigieron utilizando una función lineal.

Los experimentos de difracción de rayos X del polvo se realizaron en un Difractómetro de Bruker D8 Advance diffractometer (Bruker Co., Billerica, MA, USA) con una velocidad de escaneo de 0.02 ° / 1.2004 s de dos pasos el tubo de radiación CuKα 1.5406 Å se hizo funcionar a 30 kV y 30 mA. Las difracciones de rayos X en polvo (XRPD) se tomaron en el rango de 15–75 ° (2θ) en tamaños de paso de 0.02 °.

Para la evaluación de las propiedades ópticas la muestra se analizó con un recubrimiento de oro para mejorar la resolución de la imagen, para el recubrimiento se siguió el método de pulverización catódica (JFC-110 ion sputter, JEOL). Las imágenes de las muestras se obtuvieron en un microscopio electrónico de barrido (JEOL JSM7600F Tokio, Japón) con un

voltaje de aceleración de 5 Kev. La distribución del tamaño y el tamaño del diámetro promedio de grano y cristal se determinaron contando los granos y los cristales con un software de procesamiento y análisis de imágenes ImagenJ. Para elaborar los histogramas de distribución de tamaño se utilizó un software para gráficos y análisis de datos origin pro-8. El diámetro promedio de cada partícula y cristal se determinó mediante la medición de al menos 180-200 partículas o cristales por imagen a partir de 5 imágenes. Además, se realizó un análisis de espectroscopia de dispersión de energía (EDS) para la composición química del material utilizando el mismo microscopio electrónico (JEOL JSM7600F) con un rango de voltaje de operación de 0-12 keV.

Las mediciones de dispersión dinámica de la luz (DLS) para obtener el diámetro hidrodinámico ( $D_h$ ) se llevaron a cabo a temperatura ambiente (25 °C) utilizando un Zetasizer nano-ZS de Malvern Instruments (ZEN3500). El mismo equipo también se usó para medir la potencial zeta ( $\zeta$ ) de las soluciones de nanopartículas a diferentes valores de pH ajustados con HCl y NaOH. El  $D_h$  y  $\zeta$  se evaluaron a temperatura ambiente con una solución de 300 ppm.

Antes de evaluar la interacción nanopartícula- proteína se decide medir la interacción nanopartícula-histidina. Las soluciones tampón de enlace fueron preparadas. Antes de cada experimento, las nanopartículas, se colocaron en la solución tampón adecuado. Después de una reacción de unión durante 18 h a 25 °C en un baño de agitación, se aísla. Luego se recogieron los sobrenadantes, y se analizaron por absorbancia UV. Para estimar indirectamente la cantidad de histidina adherida y así determinar el tampón óptimo y pH además se lleva a cabo un análisis FT-IR donde se utilizó el equipo Nicolet IS10 Thermo Scientific FT-IR, con el método de ATR realizando un barrido de los 400  $cm^{-1}$  a 4000  $cm^{-1}$ .

Posteriormente se evalúa la interacción nanopartícula-proteína. Se seleccionaron las siguientes condiciones de inducción para la sobreexpresión de la proteína MAP3773c con la cepa Escherichia coli BL21 (DE3) – pRSET-MAP3773c: 16 horas de incubación a 30°C con una concentración final del inductor IPTG a 1 mM en el intervalo de 0.6-0.7 de densidad óptica a 600 nm; enseguida se procedió a sobre expresar la proteína MAP3773c a partir de 10 L de caldo LB estéril. Al finalizar la inducción, el cultivo se centrifugó a 10,000 rpm por 30 minutos a 4 °C, se recolectó el sobrenadante y las células recolectadas se lavaron con una solución de NaCl 0.15 M, la biomasa celular se congeló a -20 °C.

**Resultados y discusión**

El método utilizado (Sol-gel asistido por ultrasonido) genero nanopartículas de ZnO<sub>2</sub> de 100 nm, compuesta de nano cristales de ~7 nm.

El tamaño de los cristales fue calculado por la ecuación de Scherrer y se obtuvo un tamaño de cristal de aproximadamente 8 nm. En la Figura 1 C podemos observar una micrografía de una nanopartícula de ZnO<sub>2</sub>, en la que se puede ver que la partícula está hecha de pequeños cristales que se midieron en aproximadamente 6 nm. Conjuntamente en la figura 1 podemos observar la composición química de las nanopartículas comprobando que están compuestas por peróxido y zinc.

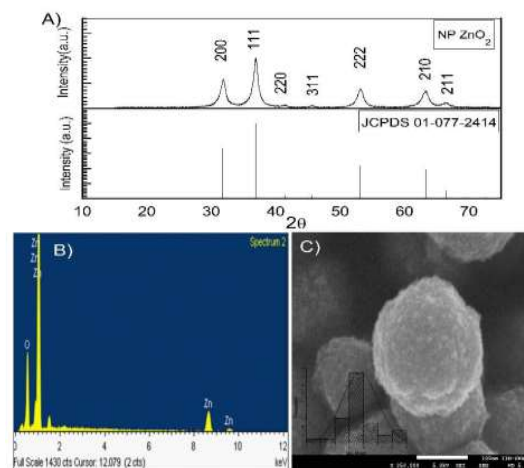


Figura 1. Las imágenes (A) XRD, (B) EDX and (C) SEM corresponden a nanopartículas de ZnO<sub>2</sub>.

Por otro lado, la Figura 2 A muestra la medición del diámetro de partículas promedio de aproximadamente 100 nm con una distribución normal. Esto confirma el análisis DLS de la figura 2 B en el cual se midió un  $D_h$  de ~ 100 nm. Por lo tanto, las nanopartículas de aproximadamente 100 nm, con una distribución normal están compuestas de pequeños cristales de aproximadamente de 7 nm.

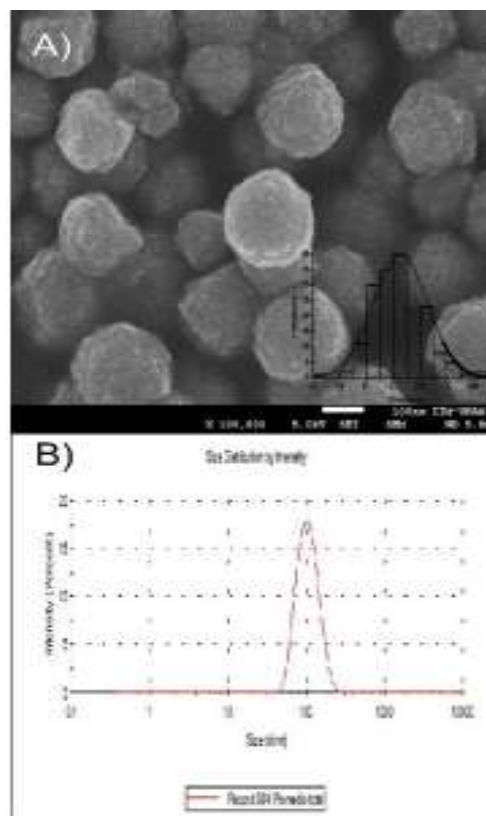
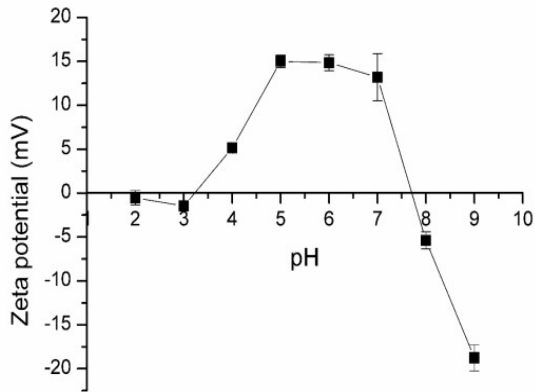


Figura 2. (A) imagen SEM con un recubrimiento de oro y (B) distribución del diámetro hidrodinámico ( $D_h$ )

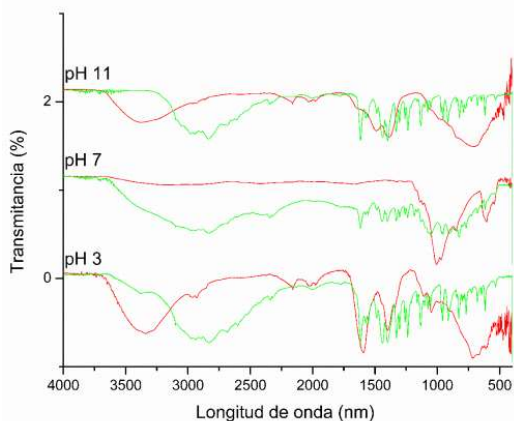
La Figura 3 presenta el perfil del potencial zeta medido a un pH variable de las suspensiones de ZnO<sub>2</sub>, calculado entre pH 3 y 9, el pH inicial de las soluciones fue a pH 6.3 con un potencial zeta promedio de +15 mV. A medida que aumentó el pH, se observó que la potencial zeta disminuía gradualmente, el punto de carga cero (PZC) se midió entre pH 7,5 y 8,0, después de

este punto, la solución mostró una aglomeración en el pH 9, las nanopartículas tienen una carga de  $-18 \text{ mV} \pm 2$ . A un pH más alto, las especies dominantes son  $\text{Zn}(\text{OH})_2(\text{ac})$  que podrían precipitar dando una nueva fase sólida,  $\text{Zn}(\text{OH})_2(\text{s})$ . Se observó un punto isoeléctrico (IEP) a pH 3.2 la figura 3 se observan dos puntos, un IEP (punto isoeléctrico) a pH ácido y otro PZC (Punto de carga cero) a pH alcalino.



**Figura 3.** Efecto del pH en la medición del potencial zeta para nanopartículas de  $\text{ZnO}_2$ .

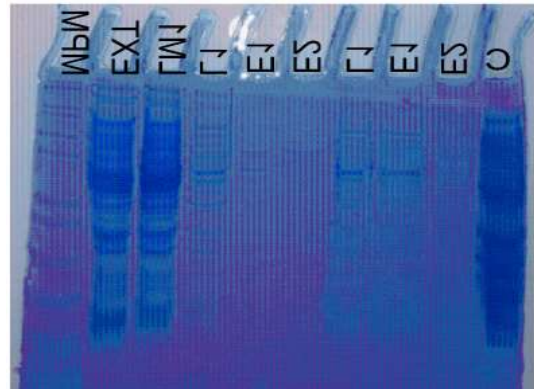
En la Figura 4 se puede observar el espectro infrarrojo de la histidina a pH 11 (línea verde) y el espectro de las nanopartículas -Histidina (Np-His) (Línea Roja) donde se observan bandas asociadas a nanopartículas de  $\text{ZnO}_2$  con un desplazamiento de los picos de la nanopartícula 1405 y 1535 hacia el rango de mayor energía y en donde se encuentra las vibraciones características de enlace asociadas a  $\text{CH}_2$  Mesu, J. G. (2005) que se le atribuyen a la histidina. En base al desplazamiento observado generalmente apunta a un mecanismo de unión bidentado. Sin embargo, se puede observar la desaparición de banda de ciertos modos de vibración de la histidina el modo de vibración cercano a  $3000 \text{ cm}^{-1}$  puede desaparecer debido a que está muy cerca de la banda de estiramiento de O-H. La desaparición de la banda  $1590 \text{ cm}^{-1}$  asociada a  $\text{COO}^-$  así como una banda asociada a C-N lo cual sugiere un sitio de unión Np-His. Torreggiani, A. (2000).



**Figura 4.** Muestra la comparación de los espectros de histidina (línea verde) y el complejo Nanopartícula histidina (línea roja)

En la figura 5 se muestra un gel de electroforesis SDS-PAGE donde se muestra en el carril 9 pudieran ser las proteínas formadas por la corona dura ya que estas son las proteínas que tienen más afinidad y las que tienen mayor grado de

complejidad de deshacer la interacción Mao, H (2013) ya que esta elución se obtuvo mediante condiciones extremas de separación, es por eso por lo que conforman las proteínas con mayor afinidad hacia la nanopartícula. Sin embargo, en la corona se observa que está formada por proteínas de varios pesos moleculares, por lo que se pretende mejorar los lavados y las eluciones agregando agentes con mayor afinidad hacia la nanopartícula.



**Figura 5.** Análisis SDS-PAGE de muestras de proteínas fluidas con dos concentraciones de sal. El carril 1 es un marcador de bajo peso molecular (MARK 12), el carril 2 representa extracto crudo; los carriles 3 (L1) representan un lavado con Tris Buffer pH 8 el carril 4 y 5 representan (E1 Y E2) representan eluciones a diferentes tiempos con Tris buffer pH 8 500 mM Imidazol los carriles 6, 7 y 8 representan el lavado y las eluciones que se sometieron a un proceso de precipitación mientras que el carril 9 representan la formación de la corona.

En la Figura 6 se observa que en las eluciones se detecta la proteína de interés, sin embargo, podemos observar contaminantes (proteínas de diferentes pesos) esto debido a que puede ser la misma proteína, con diferente conformación. Este fenómeno puede darse gracias a el tiempo de exposición de la proteína con la nanopartícula Kim, J. S., (2007). En los carriles de los lavados no se observan bandas, por lo cual se puede inferir que la metodología y los buffers de elución propuestos tienen el potencial de ser optimizados para mejorar los lavados y lograr la elución de proteínas no específicas.



**Figura 6.** SDS-page proteína recombinante purificada

### Conclusiones

Estas características sugieren una posible aplicación de una purificación, las nanopartículas a pH 3, 7 y 11 pueden adsorber histidina, siendo totalmente recubiertas a pH 7. Las nanopartículas tienen potencial como agente de purificación



para proteínas con etiqueta 6His y/o alto porcentaje de histidina con oportunidad de mejorar las condiciones de purificación.

### Referencias

**Geisse, S., & Fux, C.** (2009). Academic Press 463, 223-238

**Van Hong Nguyen, B. J. L.** (2017). International journal of nanomedicine, 12, 3137.

**Behin, J., Shahryarif, A., & Kazemian, H.** (2016). Ultrasound-Assisted Synthesis of Cu and Cu/Ni Nanoparticles on NaP Zeolite Support as Antibacterial Agents. *Chemical Engineering & Technology*, 39(12), 2389-2403.

**De Leon Ramirez, Jesus & Villegas, Victor & Sicairos, Sergio & Guevara, Esteban & Sánchez, Bertha.** (2020). 0.3390/catal10091041. <https://doi.org/10.3390/catal10091041>

**Mesu, J. G., Visser, T., Soulimani, F., & Weckhuysen, B. M.** (2005). Infrared and Raman spectroscopic study of pH-induced structural changes of L-histidine in aqueous environment. *Vibrational spectroscopy*, 39(1), 114-125.

**Torreggiani, A., Bonora, S., & Fini, G.** (two thousand). Raman and IR spectroscopic investigation of zinc (II)-carnosine complexes. *Biopolymers: Original Research on Biomolecules*, 57(6), 352-364.

**Mao, H., Chen, W., Laurent, S., Thirifays, C., Burtea, C., Rezaee, F., & Mahmoudi, M.** (2013). Hard corona composition and cellular toxicities of the graphene sheets. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 109, 212-218.

**Kim, J. S., Valencia, C. A., Liu, R., & Lin, W.** (2007). Highly efficient purification of native polyhistidine-tagged proteins by multivalent NTA-modified magnetic nanoparticles. *Bioconjugate chemistry*, 18(2), 333-341

# USO DE LISADOS TUMORALES EN LA SÍNTESIS DE NANOPARTÍCULAS DE ORO Y SU POSIBLE APLICACIÓN TERAPÉUTICA EN CÁNCER

R Rangel López<sup>1</sup>, DG Zárate Triviño<sup>2</sup>, MA Franco Molina<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Universidad Autónoma de Nuevo León, jrangelraul95@gmail.com, Nuevo León, México.

<sup>2</sup> PhD. Universidad Autónoma de Nuevo León, dianazt@gmail.com, Nuevo León, México.

<sup>3</sup> PhD. Universidad Autónoma de Nuevo León, moises.francoml@uanl.edu.mx Nuevo León, México.

## Introducción

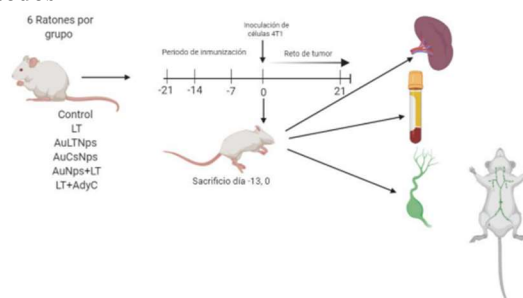
En los últimos años la síntesis de nanomateriales destinada al área biomédica ha ido en aumento. Las terapias contra el cáncer en donde se utilizan materiales como nanopartículas de oro para controlar o eliminar el crecimiento tumoral ha presentado avances prometedores en pruebas *in vitro*, *in vivo* y pruebas preclínicas, posicionando a la síntesis de nanobiomateriales como una alternativa para la generación de nuevos tratamientos. Acoplado esto último a la obtención de nanopartículas de oro por síntesis verde, con la finalidad de bajar los efectos citotóxicos que presentan estas partículas en tejido sano, buscando ser específicos. Aunque existe una gran cantidad de trabajos que incursionan en nuevas alternativas terapéuticas contra el cáncer muy pocos estudios se enfocan en la recidiva tumoral. La recidiva o regresión tumorales es el proceso en el cual un tumor después de ser removido quirúrgica o químicamente vuelva a aparecer, más agresivo y resistente a las terapias convencionales. Por esta razón en este trabajo proponemos la síntesis de nanopartículas de oro usando lisado de células tumorales como agente reductor, con la finalidad de proteger a los pacientes que han pasado por una remoción tumoral, activando su sistema inmune en contra de las células tumorales que se utilizaron para generar el lisado y la síntesis.

Se utilizó un modelo de cáncer de mama murino triple negativo (4T1), a partir de estas células en cultivo se sintetizaron nanopartículas de oro, las cuales se caracterizaron por espectroscopia UV-VIS para identificar el plasmon de resonancia superficial (PRS), dispersión de luz dinámica (DLS) para analizar el tamaño y potencial Z, además de microscopía electrónica para determinar la forma de las partículas. Como adicional se cuantificó la cantidad de proteína en la solución de nanopartículas a diferentes días como parámetro de estabilidad. Posteriormente se comprobó la captación de las partículas por macrófagos murinos, proceso fundamental para el funcionamiento de la terapia, haciendo uso de microscopía confocal. Otro de los aspectos que fueron analizados fue el efecto de un cronograma de inmunización con las nanopartículas de oro sintetizadas a partir de lisado tumoral de células 4T1 (AuLtNps) en un modelo murino, después de inmunizar a los ratones por vía subcutánea se analizaron marcadores celulares de maduración para células presentadoras de antígenos y la proporción de linfocitos B y T activados. Por último, se comprobó si al inmunizar a un grupo de ratones con las AuLtNps se prevenía el establecimiento tumoral usando las células 4T1 viables (Figura 1). Con este trabajo se incursiona en una nueva rama de la nanotecnología denominada como nanoimmunobiología, que se encarga de estudiar los efectos de los nanomateriales sobre el sistema inmune.

## Materiales

Se utilizó medio de cultivo IMDM y DMEM (Gibco®), Cloruro de oro (III) hidratado (Sigma®), MTT (Methylthiazolazolo Tetrazolium), anticuerpos anti, CD3-FITC, CD8-PE, CD8-APC, HLA-APC, CD14-FITC, CD80-FITC, CD86-PE, CD11b-FITC, CD11c-PE y MHC II. Se utilizó la línea celular 4T1(ATCC®) (Cáncer de mama murino). Mientras que para los análisis *in vivo* se dividieron en 6 grupos de ratones de entre 6 y 8 semanas de vida.

## Métodos



**Figura 1.** Diseño experimental general, en el cual se muestran los grupos experimentales, el periodo de inmunización y los tipos de muestras que fueron colectados

## Síntesis de nanopartículas de oro reducidas por citrato de sodio

El primer tipo fue reducido a partir de citrato de sodio, preparando una solución de HAuCl<sub>4</sub> al 2mM, además de una solución de citrato de sodio al 1 %, que se colocó en un vaso de precipitado de 25 mL. Un volumen de 9 mL de HAuCl<sub>4</sub> al 2 mM y 1mL de citrato de sodio al 1%, se mezcló vigorosamente y se expuso a luz UV en un Crosslinker Ultravioleta a una intensidad de 6000µj/cm<sup>2</sup>, por 30 minutos, se dejó reposar por 24 horas a temperatura ambiente y se refrigeró para su posterior uso, estas partículas fueron utilizadas como un control experimental.

## Síntesis de nanopartículas de oro reducidas por lisado tumoral

Las nanopartículas de oro reducidas a partir de un lisado de células tumorales (4T1), fueron obtenidas a partir de un cierto número de células viables las cuales fueron lisadas por sonicación expuestas a 3 rondas de 10 minutos, el resultante se mezcló con una solución de HAuCl<sub>4</sub> a una concentración de 2 mM, se agitó vigorosamente por 2 minutos y se expuso la solución resultante a luz UV utilizando un Crosslinker Ultravioleta a una intensidad de 6000µj/cm<sup>2</sup> por 30 minutos,

se dejó reposar en refrigeración y se almacenó como mínimo una semana.

### **Caracterización de nanopartículas de oro reducidas a partir de lisado tumoral AuLtNps**

Plasmón de Resonancia Superficial (PRS) por espectroscopia UV-Vis. Para obtener el PRS se utilizó un Nanodrop 200c se tomó una gota de la muestra y se colocó en el pedestal del equipo, en principio, el equipo realizara un barrido del espectro visible (200-750nm), al poseer las partículas metálicas en tamaños nanométricos un plasmón característico en el caso del oro abarca de 510 a 550 nm, es posible identificar la existencia de partículas de oro en estado nanométrico.

Análisis de tamaño por Dispersión de luz dinámica (DLS) y potencial Z. Para este ensayo se realizaron tres diluciones seriadas de una muestra concentrada de AuLtNps, se colocaron en celdas para espectroscopia y se introdujo en el equipo Z sizer (Zetasizer Nano) se realizaron tres corridas de cada muestra y se obtuvo la medición promedio, esto se repitió al día 1, 5, 12, 15, 24 y 30. Por otro lado, el mismo equipo tiene la opción de medir la carga superficial neta de las partículas a partir del potencial Z, para este ensayo se utilizó la muestra con la mejor estabilidad de partículas y menor PDI.

Análisis de tamaño y morfología por Microscopia electrónica de barrido SEM. Para corroborar el tamaño de partícula y visualizar la forma y acomodo atómico de los elementos se colocó una muestra de las AuLtNps sobre una porta muestra para SEM y se llevó a analizar al microscopio electrónico de barrido, el archivo arrojado fue analizado utilizando el software Gwyddion, para obtener los histogramas de tamaño correspondientes.

### **Curva de cuantificación de proteína respecto al tiempo**

Para cuantificar la cantidad de proteína que contienen las AuLtNps se utilizó un kit de BCA por espectroscopia UV-VIS, se tomaron 25  $\mu$ L de las AuLtNps y se mezclaron con 200  $\mu$ L de la solución del kit y se incubaron a 37°C por 30 minutos para después analizar la absorbancia por espectroscopia UV-VIS mediante la opción de análisis por BCA en el cual se observa la absorbancia máxima de las muestras a 563 nm y se cuantifica a partir de dicha intensidad la concentración de proteína, para este ensayo se midió cada tercer día durante un mes, además en cada medición se utilizaron tres muestras.

### **Cronograma de inmunización del modelo animal**

Se utilizaron 6 grupos experimentales, control (PBS), Lisado tumoral (LT), Nps de citrato de sodio/comerciales (AuCsNps), Nps de Lisado tumoral (AuLtNps), AuCsNps+LT. Los culés estaban conformados de 6 ratones hembra Balb/C de entre 6 a 12 semanas de edad, siguiendo el periodo de inmunización descrito por Shi y colaboradores en el 2017 (Shi, et al., 2017), inyectando a los ratones una vez por semana durante tres semanas con una semana de descanso antes de las pruebas posteriores, en cada caso se inmunizó sin sobrepasar un volumen máximo de 100  $\mu$ L por ratón.

### **Reto de tumor**

Después de una semana de la última inmunización se inoculó de manera subcutánea en la glándula mamaria de manera gentil utilizando una jeringa de 1 mL y una aguja de 27-G, tomando en cuenta que el bisel de la aguja debe estar hacia arriba, inoculando

una cantidad de 500,000 células viables 4T1 resuspendidas en 50  $\mu$ L de medio de cultivo IMDM suplementado con SFB (Pulaski & Ostrand., 2000), se dio seguimiento a la implantación del tumor así como su crecimiento y desarrollo, se realizaron mediciones cada 3 días del peso y volumen tumoral, se estableció como máximo 21 días de seguimiento previo a la inoculación del tumor, si alguno de los ratones mostró dolor excesivo o incapacidad para alimentarse o moverse este fue sacrificado de acuerdo a las normas pertinentes.

### **Ensayo de captación de antígeno por macrófagos peritoneales**

Para este ensayo se utilizó medio DMEM sin suplementar a una temperatura de 4°C, una jeringa de 10 mL, un mechero y utensilios quirúrgicos como tijeras pinzas y bisturí, se realizó un corte en la parte de la piel que cubre el vientre el ratón y se retiró la piel de la periferia que cubre el peritoneo con cuidado de no romper o pinchar dicha membrana, utilizando la jeringa se cargó un volumen total de 7 mL de medio en el interior del peritoneo, se agitó suavemente y se retiró el contenido intraperitoneal del ratón en un tubo de 14 mL el cual es centrifugado a 1350 RPM por 10 minutos, se realizó un conteo de las células obtenidas y se colocaron en una placa de 6 pozos alrededor de 100,000 células, estas se mantuvieron en incubación estándar por 4 días con medio DMEM suplementado, pasado el tiempo se colocaron las AuLtNps, LT, PBS, AuCsNps, estos conjugados a FTIC. Se mantuvieron por 24 horas y fueron analizados por microscopia confocal.

### **Determinación de la presencia de citocinas proinflamatorias**

Después de extraída la sangre por punción cardiaca fue centrifugada para separar el suero y fue analizado por citometría de flujo utilizando un kit de citocinas proinflamatorias CBA de la marca BD, por citometría de flujo.

### **Evaluación de marcadores celulares en bazo de ratones inmunizados**

Después de la extracción del bazo se perfundieron utilizando PBS para obtener las células linfoides del tejido, las células se colocaron en tubos de 2 mL los cuales se incubaron con los marcadores de membrana, CD4, CD3, CD8, CD22 y CD34 a una concentración de 1 $\mu$ g/mL para su evaluación por citometría de flujo.

### **Identificación del perfil de diferenciación de macrófagos en ganglios linfáticos de ratones inmunizados**

Al día 0 de inmunización en todos los grupos experimentales y después del sacrificio se extrajeron los ganglios periféricos correspondientes a la región axilar y al inguinal, se realizaron perfusiones con PBS por lo menos se pasaron 5mL, en cada ganglio hasta obtener una solución turbia, después se realizó un conteo y se colocaron un mínimo de 100,000 células por ensayo, utilizando los marcadores de membrana CD14, CD11c, CD11b, CD80, CD86 y MHCII a una concentración de 1 $\mu$ g/mL para su posterior análisis por citometría de flujo.

### **Efecto antitumoral de AuLtNps en ratones Balb/C previamente inmunizados**

De los grupos previamente inmunizados Control (1), LT (2), AuCsNps (3), AuLtNps (4), AuCsNps+LT (5), LT+Adyuvante (6), después del periodo de recuperación de una semana de la última inmunización fueron inoculados con  $5 \times 10^5$  células 4T1 viables de manera subcutánea en la glándula mamaria, para posteriormente observar la aparición del tumor, para establecer la curva de supervivencia, de implantación y desarrollo tumoral.

## Resultados y discusión

### Síntesis y caracterización

Para identificar la formación de Nps metálicas se utilizó espectroscopia UV-VIS para determinar el plasmón de resonancia superficial característico de las Nps de oro, al analizar la muestra al día 1, 26 y 31 se comprobó la estabilidad al presentar una absorbancia máxima a los 537 nm la cual se mantuvo constante desde el día uno con una intensidad de 0.6 UR (unidades relativas), hasta alcanzar 1.2 UR al día 31 (Figura 1a). ya identificado el PRS lo siguiente fue determinar el tamaño de partícula, mediante dispersión de luz dinámica o DLS, de este modo se determinó que las AuLtNps comienzan en el día 1 de síntesis con un tamaño de 20 nm, pasando a 36.72 nm para el día 7, el cual se mantuvo para el día 18 y para el día 31 alcanzaron un tamaño de 77.39 nm, lo cual indica que el aumento de tamaño es dependiente del tiempo. Además, el análisis de potencial Z indicó que presentaban una carga neta de -18.9 mV para el día 1, -20.1 mV para el día 7, -21.4 para el día 18 hasta llegar a -27.6 para el día 31, por último, se determinó la concentración de proteína que presentaban en diversos días, observando que al día 1 presentaban una concentración de 0.6 mg/mL y para el día 31 llegaron hasta 0.9 mg/mL (Tabla 1).

**Tabla 4.** Caracterización de AuLtNps dependiente del tiempo

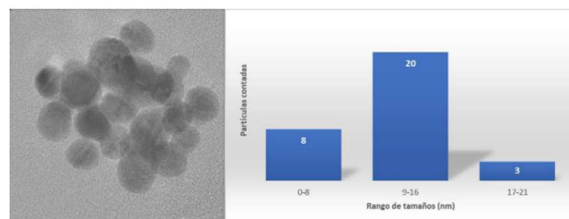
Día	PRS	Tamaño nm	Pot. Z mV	C. proteína mg/mL
1	0.63	20	-18.9	0.6
31	1.2	77.39	-27.6	0.9

Al estandarizar y caracterizar la síntesis de las nanopartículas de oro a partir de lisado tumoral se observaron varios fenómenos interesantes, como el aumento en PRS, tamaño y potencial Z también coincidían con el aumento en la concentración de proteína, lo cual podría indicar la formación de una corona de proteínas, en este fenómeno la carga neta de la partícula atrae proteínas de la solución con carga opuesta, esta interacción forma la capa dura, después las proteínas más externas de las Nps interaccionan con otras proteínas lo cual forma la capa blanda, aunque estas interacciones no son permanentes las cargas presentes en la partícula indican que es suficiente para mantener la solución en condiciones estables mientras se mantengan las condiciones iniciales, esto explica el incremento de la concentración de proteína conforme pasa el tiempo aunque no se agregue más proteína a la muestra (Lundqvist et al., 2011; Pino et al., 2014), un fenómeno similar fue observado en la concentración de ADN o RNA por un polímero catiónico (Günel et al., 2018; Kondinskaia & Gurtovenko, 2018). Aunque esto podría resultar inconveniente para un sistema de liberación controlado en nuestro caso es óptimo, ya que permite una mejor interacción con células presentadoras de antígeno, lo cual fue observado al exponer las AuLtNps con macrófagos intraperitoneales de ratón, a diferencia de usar el lisado por sí solo.

Para poder observar la morfología de las AuLtNps se utilizó Microscopía electrónica de barrido (SEM), de esta forma fue posible determinar la morfología y tamaño de las Nps al día 1 de síntesis. Se observó una morfología esférica y característica de partículas con

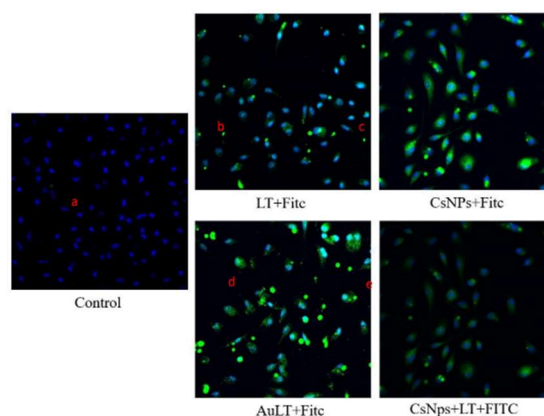
núcleo metálico y recubiertas (Figura 2). Utilizando la imagen de microscopía se realizó un análisis de tamaño de partícula (figura 2b) identificando que la mayoría de las partículas se encuentran entre 9 y 16 nm al día 1.

### Determinación de la captación de AuLtNps en macrófagos intraperitoneales de ratón



**Figura 2.** Microscopía electrónica de barrido de AuLtNps, en donde se aprecia la formación de cúmulos y un tamaño promedio cercano a los 20 nm

Se identificó que los macrófagos captaron con mayor eficiencia las AuLtNps en comparación al LT, al observar el traslape de los campos visuales se puede apreciar la fluorescencia del interior de la célula (AuLtNps) o que recubre por completo a los macrófagos peritoneales (CsNps+FITC) lo cual indica que existe una captación (Figura 3).



**Figura 7.** Microscopía confocal de macrófagos intraperitoneales expuestos a 24 horas de los distintos tratamientos, el color verde indica la presencia del tratamiento marcado en las células, mientras que el azul representa los núcleos celulares.

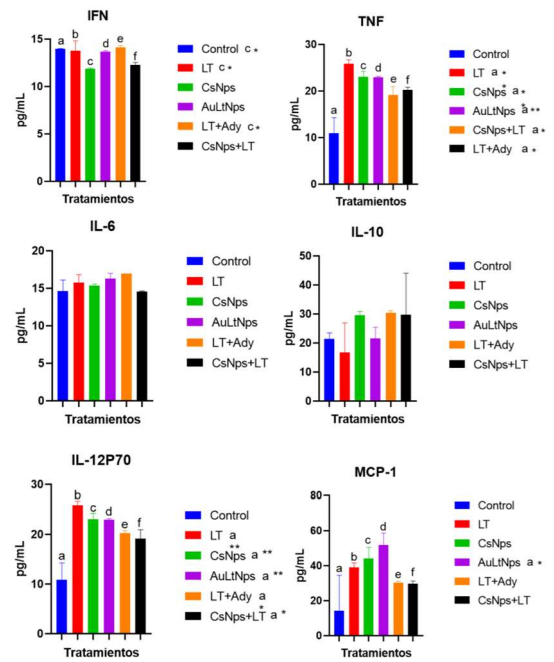
### Presencia de citocinas proinflamatorias en suero de ratones 24 horas después de la segunda inmunización (día -13) y una semana después de la última inmunización (0)

Al analizar la secreción de citocinas en sueros de ratones después de 24 horas posteriores a la segunda inmunización (día -13) con los diferentes tratamientos, se observó que los ratones inmunizados con AuLtNps y LT+Ady presentaron una secreción mayor de citocinas proinflamatorias (IFN. TNF, IL-6, IL-10 e IL-12p70) mientras que para MCP-1 se vio una alta secreción en el grupo tratado únicamente con AuLtNps (Figura 4). Para determinar si la exposición prolongada a los diferentes tratamientos no provocaba un efecto inflamatorio crónico, se analizaron los sueros una semana después a la última inmunización (día 0), determinando que la secreción de IL-6, IL-10 e IFN no presentaban variación respecto al control, mientras que la secreción de TNF, IL-12p70 y MCP-1 presentó variaciones

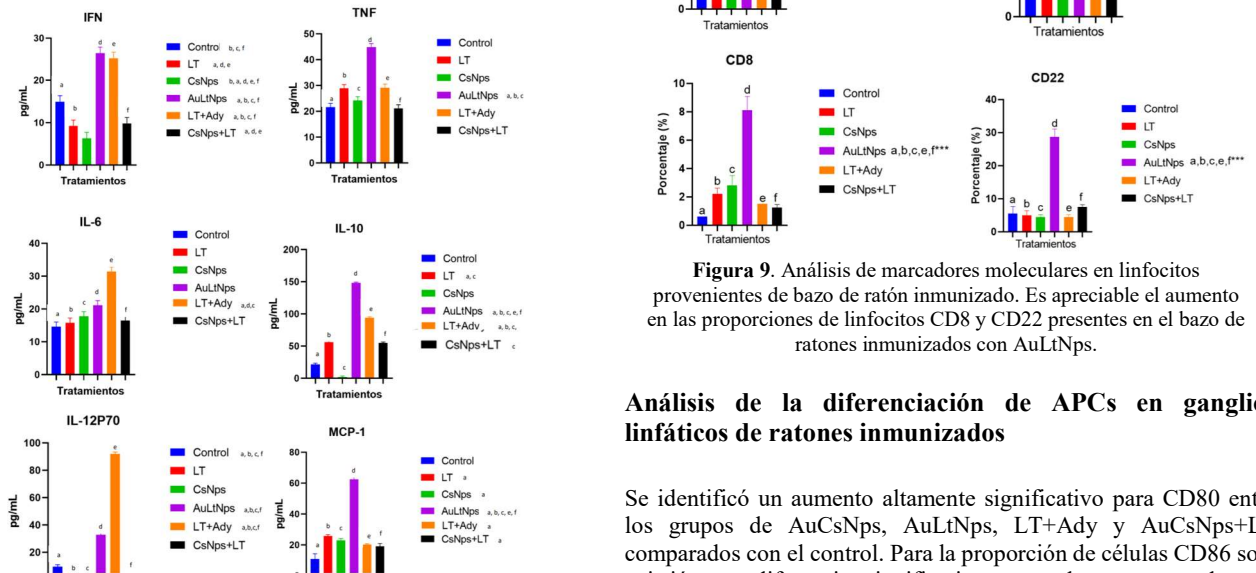
respecto al control, sin embargo, la secreción de citocinas a b c d e disminuyó respecto al día -13. Además, fue notorio un aumento en la secreción de IL12p70 en todos los tratamientos a excepción del grupo control (Figura 5).

**Evaluación de marcadores celulares en bazo de ratones inmunizados una semana después de la última inmunización (día 0)**

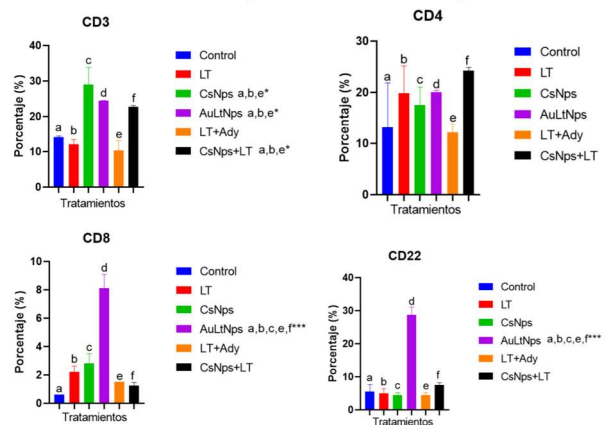
Una semana después de la última inmunización (día 0) se sacrificaron 2 ratones por grupo a los cuales se les extrajo el bazo. Las células fueron disgregadas para posteriormente ser marcadas con anti-CD3, CD4, CD8 y CD22 con la finalidad de observar si se llevó a cabo una activación del linaje linfocitario después de las inmunizaciones y si esa respuesta perduraba. Se presentó un aumento en la proporción de células CD3, CD8, y CD22, en el caso de la proporción de células CD3+ se observó un aumento significativo para todos los tratamientos a excepción del grupo con LT comparado con el control. La proporción de células CD8+ mostró una diferencia altamente significativa entre el tratamiento con AuLTNps en contra de todos los grupos, esto mismo pasó en el caso del marcador CD22+ en el cual la proporción de células positivas para este marcador se vio incrementado hasta 3 veces más en comparación con los otros tratamientos (Figura 6). Al observar la secreción de citocinas al día -13 es notorio el aumento en las citocinas relacionadas con el procesamiento antigénico como, TNF, IFN, IL-10 y MCP1, lo cual se ve reflejado en las proporciones al alza de células presentadoras de antígeno en ganglios linfáticos (Brown et al., 2007). De igual manera se ve reflejado en el aumento de linfocitos T y B presentes en bazo, al apreciar como aumenta la proporción de linfocitos CD8 + y linfocitos B CD22+. Todo esto indicaría un correcto procesamiento antigénico, lo cual fue demostrado al realizar el reto de tumor.



**Figura 5.** Secreción de citocinas una semana después de la última inmunización (día 0). En la cual se muestran niveles de secreciones normales a excepción de MCP-1 e IL-21p70.



**Figura 8.** Secreción de citocinas 24 después de la segunda inmunización (día -13). Se observa un considerable aumento en la secreción de citocinas como IFN, TNF, IL-10, IL-12p70 y MCP1 para el grupo de ratones inmunizados con AuLTNps. Cada tratamiento está representado por una letra, al presentar esta letra de un otro tratamiento significa que presenta diferencia significativa contra ese tratamiento.



**Figura 9.** Análisis de marcadores moleculares en linfocitos provenientes de bazo de ratón inmunizado. Es apreciable el aumento en las proporciones de linfocitos CD8 y CD22 presentes en el bazo de ratones inmunizados con AuLTNps.

**Análisis de la diferenciación de APCs en ganglios linfáticos de ratones inmunizados**

Se identificó un aumento altamente significativo para CD80 entre los grupos de AuCsNps, AuLTNps, LT+Ady y AuCsNps+LT comparados con el control. Para la proporción de células CD86 solo existió una diferencia significativa para el grupo tratado con AuLTNps en relación al control. En el caso de la proporción de células CD11c+ y CD11b+ no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos, aunque si existió una variación entre todos. Las células con marcaje positivo para MHC II presentaron un aumento significativo en el grupo de AuLTNps comparados con el control y por último 45 para el caso de las proporciones de células CD14+ se observó un aumento significativo en el grupo de AuLTNps comparado con el control en contraste con las células tratadas con AuCsNps, las cuales mostraron una disminución notable (Figura 7).

**Efectividad antitumoral de AuLtNps en ratones Balb/C previamente inmunizados**

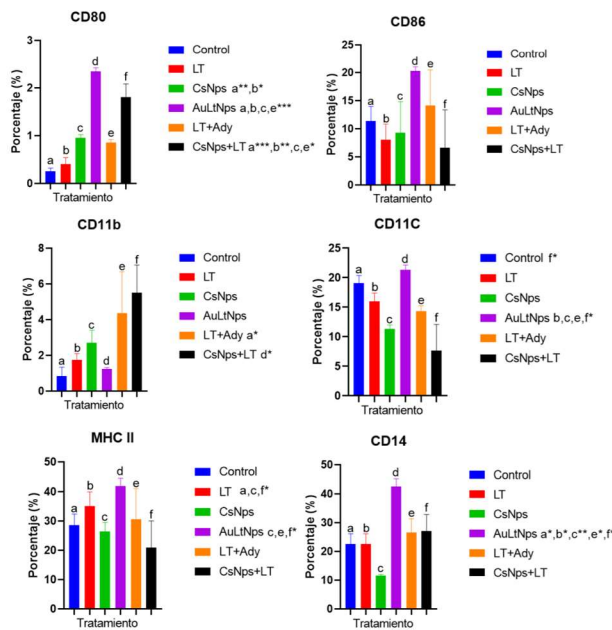
Se registró como día de implantación tumoral el día en el cual el tumor fue palpable en la zona inoculada, para el grupo control la implantación se registró al día 7 en todos los ratones, para el grupo de LT el tumor se implanto al día 7 para 3 ratones y al 10 para 1, para el grupo de CsNps y LT+Ady se registró la implantación al día 6, mientras que para el grupo de CsNps+LT la implantación se observó hasta el día 10, para el grupo de 50 AuLtNps no se registró una implantación (tabla 6). Todos los individuos del grupo control al día 21 se sacrificaron, de igual manera sucedió con el grupo de LT los cuales fueron sacrificados ya que presentaron metástasis. Para el grupo de CsNps un ratón murió al día 16 y los 3 restantes fueron sacrificados al día 28, en el caso de los ratones del grupo LT+Ady solo 2 ratones llegaron a los 27 días de vida mientras que 1 murió al día 5 y otro al 11. El grupo de CsNps+LT se sacrificó al día 18 debido al deterioro general que presentaban, Los 4 individuos tratados con AuLtNps sobrepasaron los 90 días sin presentar manifestaciones de aparición tumoral o metástasis (tabla 7. figura 11). Fue evidente que los ratones inmunizados con AuLtNps no presentaron implantación tumoral, posiblemente al rápido accionar del sistema inmune sobre las células tumorales, como se observó con el grupo de los ratones tratados con nanopartículas de oro y LT de manera individual, en donde el tiempo de vida se extendió hasta los 28 días superior a sus contrapartes individuales. Colocando a las AuLtNps como el mejor candidato para una inmunoterapia autóloga.

**Tabla 6.** Análisis de supervivencia de los 6 grupos experimentales representados en días

Grupo experimental	Supervivencia (Días/%)
Control	21(100%)
Lisado tumoral	21(100%)
CsNps	18 (100%)
AuLtNps	90(100%)
CsNps+LT	16(75%), 28(25%)
LT+Ady	11(25%), 5(25%), 27(50%)

**Conclusiones**

Se lograron sintetizar nanopartículas de oro reducidas a partir de lisado tumoral, llegando a presentar un tamaño de hasta 73 nm, un PRS a 538 nm y potencial Z de - 27 mV demostrando así la estabilidad obtenida. Se identificó que la concentración de proteína en solución aumenta a la par del tiempo de síntesis confirmando que el crecimiento de las Nps se debe a la carga de proteínas en su superficie. Se corroboró la captación de las AuLtNps por parte de macrófagos intraperitoneales de ratón, la cual es mayor a la presentada por el LT libre. Se identificó la presencia de citocinas proinflamatorias en sueros de ratón inmunizados con AuLtNps, AuCsNps+LT y LT+Ady lo cual indica una correcta estimulación después del periodo de inmunización, además los datos correlacionan con altos porcentajes de linfocitos CD3, CD4, y CD34+, mientras que para el grupo de ratones tratados con AuLtNps se presentó un alza en linfocitos CD8+ y CD22+ esto en esplenocitos extraídos de bazo. una confirmación de la correcta estimulación a partir del periodo de inmunización fue el incremento en APCs CD14, CD80, CD86 y MHC II +, las cuales se encargan del procesamiento antigénico y la presentación de este a los linfocitos T. Al evaluar el efecto antitumoral de las AuLtNps fue contrastante la nula implantación tumoral en un modelo murino previamente inmunizado y posteriormente inoculado con células 4T1 viables. Por lo cual las nanopartículas de oro reducidas a partir de lisado tumoral potencian la presentación de antígenos y maximizan la respuesta producida por el sistema inmune innato y adaptativo previniendo la implantación tumoral.



**Figura 10.** Análisis de marcadores moleculares en ganglios linfáticos provenientes de ratones inmunizados.

**Tabla 5.** Implantación tumoral posterior al día experimental dividido por grupo experimental

Grupo experimental	Día de implantación post-inoculación	%
Control	7	100
Lisado tumoral	7, 10	75,25
CsNps	6	100
AuLtNps	0	100
CsNps+LT	9	100
LT+Ady	6	100

**Referencias bibliográficas**

Brown, C. E., Vishwanath, R. P., Aguilar, B., Starr, R., Najbauer, J., Aboody, K. S., & Jensen, M. C. (2007). Tumor-Derived Chemokine MCP-1/CCL2 Is Sufficient for Mediating Tumor Tropism of Adoptively Transferred T Cells. *The Journal of Immunology*, 179(5), 3332–3341. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.179.5.3332>

Günel, G., Kip, Ç., Eda Ögüt, S., İlhan, H., Kibar, G., & Tuncel, A. (2018). Comparative DNA isolation behaviours of silica and polymer based sorbents in batch fashion: monodisperse silica microspheres with bimodal pore size distribution as a new sorbent for DNA isolation. *Artificial Cells, Nanomedicine and Biotechnology*, 46(1), 178–184. <https://doi.org/10.1080/21691401.2017.1304404>.

Kondinskaia, D. A., & Gurtovenko, A. A. (2018). Supramolecular complexes of DNA with cationic polymers: The effect of polymer concentration. *Polymer*, 142, 277–284. <https://doi.org/10.1016/j.polymer.2018.03.048>.

**Lundqvist, M., Stigler, J., Cedervall, T., Berggård, T., Flanagan, M. B., Lynch, I., ... Dawson, K.** (2011). The evolution of the protein corona around nanoparticles: A test study. *ACS Nano*, 5(9), 7503–7509.

**Shi, G., Zhang, C., Xu, R., Niu, J., Song, H., Zhang, X., ... Wei, X.** (2017). Biomaterials Enhanced antitumor immunity by targeting dendritic cells with tumor cell lysate-loaded chitosan nanoparticles vaccine.

# FABRICACIÓN DE NANOPARTÍCULAS DE FIBROÍNA PARA SU PONTENCIAL USO EN TRANSPORTE DE MEDICAMENTOS

Diego Nicolás Rincon<sup>1</sup>, Calos Augusto Murillo<sup>2</sup>, Diana Marcela Escobar<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Bioingeniero. Grupo de Investigación en Biomateriales, Facultad de Ingeniería, Universidad de Antioquia; UdeA. Calle 70 No. 52-21, Medellín, nicolas.rincon@udea.edu.co o.

<sup>2</sup>Químico. Grupo de Investigación en Biomateriales, Facultad de Ingeniería, Universidad de Antioquia; UdeA. Calle 70 No. 52-21, Medellín. carlos.murillo@udea.edu.co.

<sup>3</sup>Profesora Grupo de Investigación en Biomateriales Facultad de Ingeniería, Universidad de Antioquia; UdeA. Calle 70 No. 52-21, Medellín, Colombia. marcela.escobar@udea.edu.co.

## Introducción

La eficacia de los fármacos utilizados actualmente para el tratamiento del cáncer se ve alterada por la falta de distribución específica a las células y por la resistencia a los fármacos. También algunos fármacos se ven limitados por su tiempo corto de distribución dentro de la circulación sanguínea y que estos son metabolizados rápidamente (Tian et al., 2014). Para superar estas limitaciones, se han desarrollado nanoportadores los cuales fueron reportados por primera vez alrededor de la década de 1970 por Birrenbach & Speiser en 1976. Inicialmente eran sistemas de partículas coloidales con tamaños que iban desde 1 nm hasta 1000 nm, demostrando características únicas debido a su tamaño.

Estos sistemas son de gran interés por su capacidad para usarse como un vehículo para promover la eficacia de los fármacos, mejorando su distribución a ubicaciones específicas, además, tienen ventajas como la capacidad de focalización, reducción de resistencia al fármaco gracias a la administración intracelular, liberación controlada y sostenida que mejora la biodisponibilidad, el tiempo de retención y reducción de los riesgos de toxicidad (Zhao et al., 2015).

Durante las últimas décadas, se han desarrollado muchos sistemas eficaces de administración de fármacos por nanopartículas, para los cuales, uno de los materiales más usadas es la fibroína de seda, que es una biomacromolécula utilizada por su biodegradabilidad, excelente biocompatibilidad, mejora de la adhesión y proliferación celular, potencial de modificación química y posibilidad de reticulación, cualidades que la hacen un biomaterial prometedor para la administración de fármacos (Zhao et al., 2015).

Existen varios métodos disponibles para la fabricación de nanopartículas a base de fibroína, como precipitación salina, congelación, desolvatación, trituración mecánica, electropulverización, etc. El objetivo de este artículo es evaluar dos técnicas para la obtención de nanopartículas, la primera es la precipitación salina, la cual utiliza el aumento de la concentración de sal para atraer algunas moléculas de agua a los iones de sal, lo que resulta en la eliminación de la barrera de agua entre las moléculas de proteína y en el aumento de las interacciones proteína-proteína, por lo tanto, las moléculas de fibroína se agregan formando interacciones hidrofóbicas entre sí y precipitando de la solución (Zhao et al., 2015); el segundo método es la congelación, el cual es un

proceso sencillo y económico que utiliza etanol como aditivo para la formación de las nanopartículas (Chen et al., 2012).

## Materiales y métodos

### Extracción y obtención de la fibroína

Para la extracción de fibroína a partir del capullo del gusano de seda, se siguió el protocolo desarrollado por el Grupo de Investigación en Biomateriales (BioMat). Para lo cual, se partió de capullos adquiridos en la Corporación para el Desarrollo la Sericultura del Cauca (CORSEDA), posteriormente éstos se cortaron y pesaron en pequeños fragmentos de aproximadamente 0.5 cm, luego se preparó una solución de carbonato de sodio 0.01M de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (ac) (Carlo Erba, Anhidro) en relación 2/5 del peso de los capullos, y esta solución fue llevada a 80°C, posteriormente se agregaron los fragmentos de capullo manteniendo la temperatura en agitación constante durante 4.5 horas, al terminar este tiempo la fibroína obtenida se secó a 30°C durante 24 horas.

Para solubilizar la fibroína extraída, ésta se llevó a una solución ternaria de cloruro de calcio:etanol:agua (CaCl<sub>2</sub>:EtOH:H<sub>2</sub>O) en relación molar (1:2:8) bajo agitación constante a 60°C, por último, para eliminar el exceso de sales se realizó diálisis contra agua destilada por un tiempo de tres días. Todos los reactivos usados fueron de grado analítico.

### Fabricación de las nanopartículas de fibroína

Se plantearon dos protocolos basados en los métodos de fabricación planteados por (Lammel et al., 2010) y (Chen et al., 2012) con modificaciones.

### Técnica de precipitación salina

En esta técnica se utilizó fosfato ácido de potasio (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) como electrolito para inducir la separación de fases entre la fibroína y el agua, para ello se prepararon 100ml de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.25 M a pH 8, esta solución se mezcló con fibroína en solución variando las proporciones volumétricas desde 1:1 hasta 1:5; posteriormente, las partículas resultantes se almacenaron en el refrigerador durante 2 horas (3 °C); seguido de esto, se llevaron a centrifugación a 2000 rpm por 15 minutos, y finalmente se llevaron a diálisis contra agua destilada para eliminar el exceso de sales.

Para el procedimiento utilizaron dos concentraciones de fibroína: 0.15 mg/ml y 1.5 mg/ml y cada ensayo se realizó por triplicado.

### Técnica de congelación

Bajo esta técnica, se adicionó etanol a la solución de fibroína en relaciones 8:20 (v/v) y 4:20 (v/v) y se llevaron a agitación



constante durante 2 minutos, seguido de esto, la mezcla se llevó a congelación a  $-15^{\circ}\text{C}$  y  $-80^{\circ}\text{C}$  durante 24 horas, posteriormente se descongelaron a temperatura ambiente y las nanopartículas se recolectaron por centrifugación a 5000 rpm por 30 minutos.

Para este método se utilizaron tres concentraciones de fibroína: 0.15 mg/ml, 1.5 mg/ml y 9 mg/ml y cada ensayo se realizó por triplicado.

### Caracterización de las nanopartículas de fibroína obtenidas

La primera caracterización constó de la evaluación de distribución de tamaño de partícula, la cual se llevó a cabo mediante dispersión de luz dinámica (DLS), obteniendo como variables de respuesta de interés la media de la población predominante y el índice de polidispersidad que describe la cantidad de material que hay presente en las distribuciones de diferentes tamaños, para esto se utilizó el equipo Zetasizer Lab seleccionando un índice de refracción de 1.45 para la fibroína y de 1.33 para el dispersante, cada medida se realizó por triplicado, y el resultado se expresó como el promedio de dichas replicas junto a su desviación estándar.

Para observar la morfología de las nanopartículas se utilizó un equipo de microscopía electrónica de barrido SEM JEOL JSM-6490LV y se tomaron 2 micrografías de cada muestra a 8000X, 10000X, 15000X, 20000X y 40000X para las muestras preparadas por precipitación salina con relación SF/ $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1:3, empleando concentraciones de fibroína de 0.15 mg/ml y 1.5 mg/ml.

### Prueba de liberación de medicamento

Para evaluar el potencial uso de transporte de medicamentos se embebieron las nanopartículas con solución de ácido fólico, empleando inmovilización del mismo por ruta de Carbodiimida según lo planteado por Rincon et al., 2021. Una vez terminado el proceso se dializó y se realizó el perfil de liberación del folato en PBS a pH 7.4.

### Resultados y discusión

La formación de nanopartículas de fibroína con fosfato diácido de potasio 1,25 M a pH 8, reveló partículas con tamaños entre 132 nm y 302 nm para concentración de fibroína de 0.15

mg/ml, y entre 214 nm y 407 nm para concentración de 1.5 mg/ml como se muestra en la Figura 6.

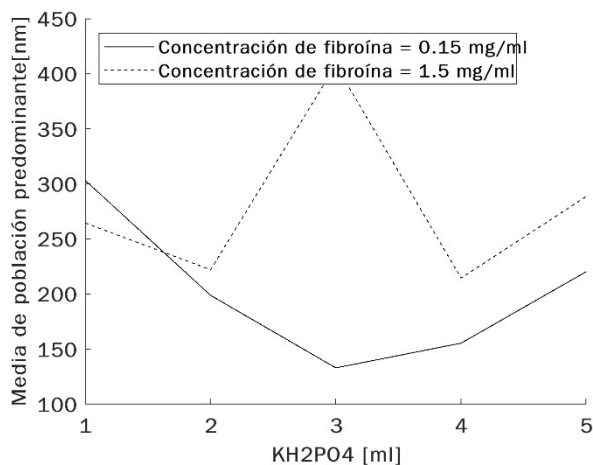


Figura 6. Gráfica de Media de población predominante vs relación SF/ $\text{KH}_2\text{PO}_4$  para concentraciones de fibroína de 0.15 mg/ml y 1.5 mg/ml, obtenida por el método de precipitación salina.

Estos resultados de tamaño de partícula obtenida son menores a los reportados por Lammel et al., 2010 y Niu et al., 2020 donde obtuvieron para el mismo método tamaños entre 486 nm - 1200 nm y  $2.7\ \mu\text{m}$ , respectivamente. En cuanto al índice de polidispersidad que se puede observar en la Figura 7, las muestras con concentración de 0.15mg/ml y relación Fibroína/ $\text{KH}_2\text{PO}_4$  de 1:4 y 1:5 muestran valores por debajo de 0.4, es decir, una polidispersidad moderada, para las demás muestras este valor es superior a 0.4 por lo tanto la polidispersidad se considera amplia en concordancia con lo reportado por Nobbmann, (2014), esto indica que presentan una mayor cantidad de poblaciones.

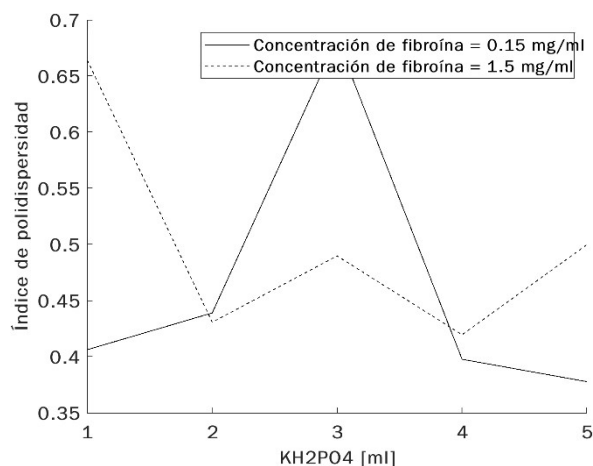
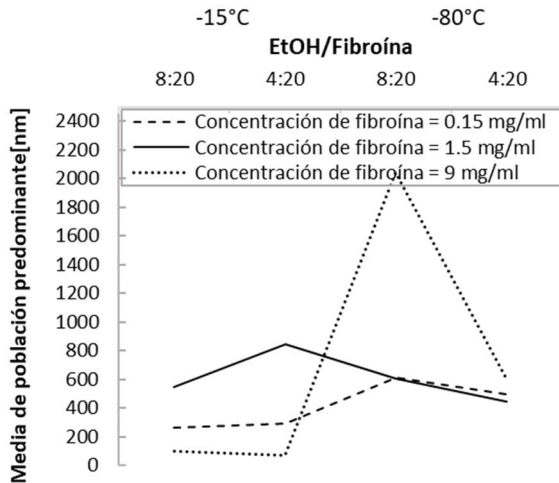


Figura 7. Gráfica de índice de polidispersidad vs relación SF/ $\text{KH}_2\text{PO}_4$  para concentraciones de fibroína de 0.15 mg/ml y 1.5 mg/ml, obtenida por el método de precipitación salina.

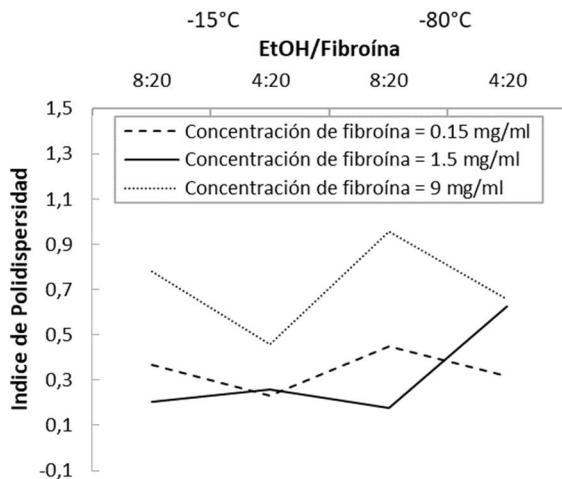
Para el método de congelación, los resultados mostrados en la Figura 8 presentan los tamaños de partícula obtenidos, donde éstos varían desde 262 nm hasta 611 nm para concentración de fibroína de 0.15 mg/ml, mientras que, para 1.5 mg/ml los tamaños varían desde 442 nm hasta 846 nm, por último, para 9 mg/ml se tiene un rango más amplio de tamaño, desde 72 nm hasta 2041 nm, con este último se logra observar un efecto contundente en la temperatura, esto debido a que para temperaturas de  $-15^{\circ}\text{C}$  se tiene un rango tamaño más estrecho

al variar la relación EtOH/Fibroína, entre 72 y 101 nm, siendo los más pequeños para este método, pero por otro lado, al disminuir la temperatura a -80°C se observa un efecto en el cambio de la relación EtOH/Fibroína con tamaños para la relación 8:20 de 2041 nm y de 592 nm para la relación 4:20.



**Figura 8.** Gráfica de Media de población predominante vs relación EtOH/SF para concentraciones de fibroína de 0.15 mg/ml y 1.5 mg/ml y temperaturas de -15°C y -80°C, obtenida por el método de congelación.

En cuanto al índice de polidispersidad mostrado en la Figura 9, para la mayor concentración empleada de fibroína (9 mg/ml) se tienen valores más elevados y con polidispersidad amplia, al igual que 2 muestras obtenidas a -80°C, una con concentración de 0.15 mg/ml y relación EtOH 8:20 y la otra con concentración 1.5 mg/ml y relación EtOH 4:20, para el resto de las muestras este índice muestra una polidispersidad moderada al ser menores a 0.4, valores que se encuentran dentro de los rangos obtenidos por (Cao et al., 2007) donde reportaron valores que van desde 0.1 hasta 0.9.



**Figura 9.** Gráfica de índice de polidispersidad vs relación EtOH/SF para concentraciones de fibroína de 0.15 mg/ml y 1.5 mg/ml y temperaturas de -15°C y -80°C, obtenida por el método de congelación.

Para las partículas formadas por precipitación salina se observa una tendencia a tamaños más pequeños con concentraciones más pequeñas, esta variedad de tamaños se

puede dar debido a que la diferencia de concentraciones es alta y esto puede conducir a la formación de aglomeraciones para concentraciones mayores, lo que el equipo toma como una partícula más grande, esta formación de partículas se basa en el efecto de sales kosmotrópicas como el fosfato de potasio.

En un primer paso, las cadenas de proteínas forman estructuras similares a micelas debido al aumento de las interacciones hidrofóbicas y dependiendo de la conformación estructural de la fibroína de seda predeterminada por el pH se forman diferentes estructuras micelares con diferentes densidades de empaquetamiento, en un segundo paso, las micelas forman glóbulos particulados por interacciones hidrófobas adicionales, tal como lo ha reportado Lammel et al., (2010).

Las micelas formadas a pH 8 tienen un empaquetamiento menos denso que las producidas a pH ácido esto se da porque todas las cadenas laterales de aminoácidos cargados, excepto el extremo C-terminal, están cargadas negativamente, lo que da como resultado una conformación molecular bastante alargada en solución debido a las interacciones carga-carga repulsivas a lo largo de la cadena principal del biopolímero, por lo tanto, es posible un empaquetamiento más apretado de las micelas en las partículas debido a interacciones hidrófobas adicionales, que podrían conducir a la mayor estabilidad química, tal y como lo ha reportado (Terry et al., 2004).

Las nanopartículas obtenidas por congelación presentan un comportamiento similar al descrito anteriormente en precipitación salina para las concentraciones de 1.5 mg/ml y 0.15 mg/ml, pero para mayores concentraciones (9 mg/ml) hay un comportamiento diferente para aquellas formadas a -15°C donde las partículas presentaron un tamaño aún más pequeño, esto puede darse porque al terminar el proceso de congelación la mayor parte de la proteína formó coágulos, los cuales se descartaron luego de centrifugación, quedando menor cantidad de proteína en suspensión y pudo inducir a una menor aglomeración de partículas, lo que se vio reflejado en tamaños más pequeños.

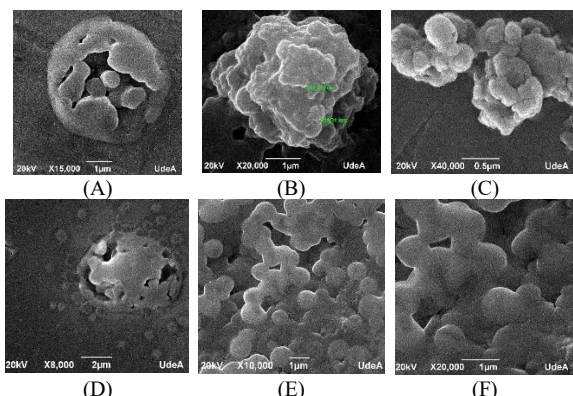
La formación de partículas por este método se da gracias a que en la solución de fibroína los segmentos hidrófobos y los segmentos hidrófilos se dispersan al azar, por lo tanto, las moléculas de fibroína son fáciles de agregar por estímulos físicos o químicos, como vibración, agitación y adición de disolventes orgánicos. Teniendo en cuenta lo anterior, es bien sabido que el etanol es miscible con agua en cualquier proporción, pero es un mal solvente para la fibroína, por esta razón al agregar etanol a la solución de fibroína, las cadenas moleculares de fibroína pueden interactuar entre sí, formando eventualmente un gel físicamente reticulado y cuando se congela la solución, las partículas en gel se comprimen hasta formar un sólido y se evita una mayor agregación, por lo tanto, el tamaño de las microsferas se atribuye a la cinética de la cristalización de la fibroína, tal como lo reporta (Cao et al., 2007).

La Figura 10 muestra las micrografías SEM de las nanopartículas de fibroína obtenidas por precipitación salina con relación SF/KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1:3, donde se puede observar que estas poseen mayoritariamente geometría esférica como se ha reportado previamente en otros estudios por Niu et al., 2020; y también por Sun et al., 2019.

También la Figura 10A y 5D muestra que para ambas concentraciones de fibroína se logran formar micro

encapsulados de aproximadamente 4.5µm con partículas entre 650nm y 700nm respectivamente.

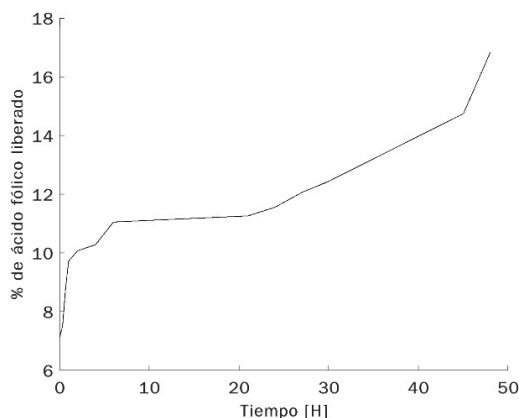
Por otro lado, la Figura 10B, 5C, 5E y 5F muestra aglomeraciones conformadas por partículas de 200nm, 250nm, 800nm y 900nm respectivamente, donde se observa que a concentraciones más altas se obtienen partículas de tamaños más grandes; y en cuanto a las aglomeraciones presentadas estas pueden ser causadas porque al secar las partículas estas pierden la estabilidad dada por la propiedad anfílica de la fibroína en ambientes acuosos en concordancia con lo reportado por Niu et al., 2020.



**Figura 10.** Imágenes SEM de nanopartículas de fibroína fabricadas por el método de precipitación salina con relación SF/KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1:3, a diferentes concentraciones: 0.15 mg/ml (A, B y C) y 1.5 mg/ml (D, E y F).

### Prueba de liberación de medicamento

En la Figura 11 se puede apreciar la liberación del ácido fólico en la solución buffer, se evidencia una rápida liberación en la primera hora, aumentando casi un 10% como evidencia de la degradación de la fibroína para seguir aumentando de manera más lenta, pero con buena eficacia hasta finalizado el ensayo como lo reporta Misra et al., 2014, logrando una liberación de casi 17%, lo que evidencia que se puede mantener una liberación prolongada en el tiempo, esto corrobora el potencial uso del biomaterial en la liberación prolongada de medicamentos para aplicaciones en el área de la salud.



**Figura 11.** Perfil de liberación en PBS del ácido fólico embebido en las nanopartículas fabricadas por precipitación salina.

### Conclusiones

- La mayor concentración de fibroína permite inducir a mayor cantidad de aglomeraciones lo que se ve reflejado en tamaños de partícula más grandes.
- El proceso de formación de partículas por la técnica de precipitación salina mostró ser un proceso efectivo para la aplicación deseada, una vez que las partículas obtenidas por este método mostraron mayor estabilidad sin la formación de grumos al valor de pH evaluado.
- En cuanto al tamaño de partícula, a pesar de obtener tamaños aparentemente más pequeños para congelación a concentración de 9 mg/ml, este proceso también induce a una pérdida más grande de material debido a la coagulación de la proteína.
- Las partículas obtenidas por precipitación salina con una relación SF/KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> de 1:3 y concentración de fibroína de 0.15 mg/ml, con tamaños inferiores a 200nm, son las ideales para prolongar su duración en circulación sanguínea.
- La cinética de liberación arrojada por la muestra evaluada en la solución buffer mostró que las nanopartículas fabricadas pueden albergar en su superficie principios activos y liberarlos paulatinamente evidenciando su potencial uso como liberadores de fármacos.

### Agradecimientos

Los autores desean expresar sus agradecimientos al Grupo de Investigación en Biomateriales de la Universidad de Antioquia por la financiación del proyecto que dio origen a este trabajo

### Referencias

- Birrenbach, G., & Speiser, P. P.** (1976). Polymerized micelles and their use as adjuvants in immunology. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 65(12), 1763–1766. <https://doi.org/10.1002/jps.2600651217>
- Cao, Z., Chen, X., Yao, J., Huang, L., & Shao, Z.** (2007). The preparation of regenerated silk fibroin microspheres. *Soft Matter*, 3(7), 910–915. <https://doi.org/10.1039/b703139d>
- Chen, M., Shao, Z., & Chen, X.** (2012). Paclitaxel-loaded silk fibroin nanospheres. *Journal of Biomedical Materials Research - Part A*, 100 A(1), 203–210. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.33265>
- Lammel, A. S., Hu, X., Park, S. H., Kaplan, D. L., & Scheibel, T. R.** (2010). Controlling silk fibroin particle features for drug delivery. *Biomaterials*, 31(16), 4583–4591. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2010.02.024>
- Misra, R., Katyal, H., & Mohanty, S.** (2014). Controlled release of folic acid through liquid-crystalline folate nanoparticles. *Materials Science and Engineering C*, 44, 352–361. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2014.08.025>
- Niu, L., Shi, M., Feng, Y., Sun, X., Wang, Y., Cheng, Z., & Li, M.** (2020). The interactions of quantum dot-labeled silk fibroin micro/nanoparticles with cells. *Materials*, 13(15), 1–17. <https://doi.org/10.3390/ma13153372>

**Nobbmann, U.** (2014). *Polydispersity – what does it mean for DLS and chromatography?* Malvern Instruments. <http://www.materials-talks.com/blog/2014/10/23/polydispersity-what-does-it-mean-for-dls-and-chromatography/>

**Rincon, D; Murillo, C; Escobar, M.** (2021). *Fabricación de nanopartículas de fibroína funcionalizadas con folato para su potencial uso en tratamientos de cáncer.* Universidad de Antioquia.

**Sun, N., Lei, R., Xu, J., Kundu, S. C., Cai, Y., Yao, J., & Ni, Q.** (2019). Fabricated porous silk fibroin particles for pH-responsive drug delivery and targeting of tumor cells. *Journal of Materials Science*, 54(4), 3319–3330. <https://doi.org/10.1007/s10853-018-3022-9>

**Terry, A. E., Knight, D. P., Porter, D., & Vollrath, F.** (2004). pH induced changes in the rheology of silk fibroin solution from the middle division of Bombyx mori silkworm. *Biomacromolecules*, 5(3), 768–772. <https://doi.org/10.1021/bm034381v>

**Tian, Y., Jiang, X., Chen, X., Shao, Z., & Yang, W.** (2014). Doxorubicin-loaded magnetic silk fibroin nanoparticles for targeted therapy of multidrug-resistant cancer. *Advanced Materials*, 26(43), 7393–7398. <https://doi.org/10.1002/adma.201403562>

**Zhao, Z., Li, Y., & Xie, M. Bin.** (2015). Silk fibroin-based nanoparticles for drug delivery. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(3), 4880–4903. <https://doi.org/10.3390/ijms16034880>