

**Evaluación de nanotubos de carbono multipared funcionalizados y su aplicación en recubrimientos poliméricos PCL-Quitosano para uso en dispositivos biomédicos**

**Juan Daniel Medina Fonseca**

**Trabajo de grado para optar el título de Ingeniero Químico**

**Director**

**Darío Yesid Peña Ballesteros**

**Ph.D. en corrosión**

**Codirector**

**Nerly Deyanira Montañez Supelano**

**M.sc. en Ingeniería de materiales**

**Universidad Industrial de Santander**

**Facultad de Ingenierías Físicoquímicas**

**Escuela de Ingeniería Química**

**Bucaramanga**

**2018**

### Dedicatoria

*A Dios, quien ha estado en cada paso y cada decisión que tomé a lo largo de esta gran trayectoria, porque sin él nada de esto hubiese sido posible.*

*A mi papá, quien en los momentos en que más necesite su apoyo siempre estuvo ahí, mi ejemplo para poder seguir en esta carrera y nunca dejarme vencer por las adversidades que se me presentaron, enseñándome a ser más fuerte cada día con cuatro sencillas palabras “Hágale que usted puede”.*

*A mi mamá, quien cada día con su voz, su risa, su positivismo ante cualquier situación y a la sonrisa que tuvo en el momento en el que le dije que iba a ser abuela, eso me motivo más a seguir adelante, Te amo mamá.*

*A mis hermanas, ejemplo a seguir, siempre fueron mi meta a alcanzar por todo lo que hicieron por mí, mostrándome todo su apoyo y haciéndome sentir en cada momento que podemos superar lo que nos pongan en frente.... Las quiero mucho*

*A mi hija, llegaste justo para darme una lección de vida, para enseñarme la carrera más linda de ser padre, has sido mi más grande triunfo en esta etapa de mi vida, has estado y estarás siempre presente en cada una de las etapas que nos faltan por cumplir, esto es para ti hija, eres lo más grande que Dios me ha dado, te amo demasiado.*

*A mi esposa, quien me ha acompañado a lo largo de la carrera, por ser paciente y comprender todos y cada uno de los sacrificios que tuvimos que tomar para llegar al final de este gran triunfo que hoy no es mío, es nuestro, gracias por haber llegado a mi vida mi bonita....hoy podemos decir lo logramos...*

*Y por último pero no menos importantes, mis amigos, Víctor, Gordo, Sergio, Andrés, Calderón, Carlos Beltrán, Chore, Poke y demás, quienes se convirtieron en mi segunda familia y pasamos momentos que ojalá nunca se borren.*

**Juan Daniel Medina Fonseca**

## Agradecimientos

*Al Ph.D. Dario Yesid Peña Ballesteros, por brindarme todo el apoyo para realizar este proyecto bajo su dirección y siempre estar presente con el acompañamiento y orientación.*

*A la ingeniera química M.Sc Nerly Deyanira Montañez Supelano, por depositar toda su confianza y conocimiento para la realización de este proyecto, sin usted no hubiese sido posible, infinitas gracias.*

*Al físico M.Sc Anderson Sandoval Amador, por compartir conocimientos, dedicar tiempo y siempre ser esa voz de apoyo dentro del grupo de investigación GIC para culminar el proyecto de la mejor manera.*

*Al profesor Crisóstomo Barajas Ferreira, profesor escuela de Ingeniería Química por darme el voto de confianza y ser un ejemplo a seguir, por sus palabras que me dieron fortaleza para nunca decaer.*

*A Joaquín Orozco, profesional de laboratorios de la escuela de Ingeniería Química, por la forma de compartir su conocimiento para entender de la mejor manera las técnicas implementadas en este proyecto.*

*A la escuela de Ingeniería Química, su personal de apoyo y docentes que, mediante sus enseñanzas y conocimientos me formaron para una futura vida profesional.*

*A los grupos de investigación GIC, CINTROP, LEAM Y GIMBA, a los laboratorios de la Universidad Industrial de Santander y a la Universidad Nacional de Medellín por permitir el uso de sus instalaciones y equipos.*

*A nuestra alma mater de la Universidad de Santander, por la formación brindada y las diferentes experiencias de vida que nos permitió compartir.*

**Contenido**

	<b>Pág.</b>
Introducción .....	14
1. Metodología .....	18
1.1 Caracterización de NTC prístinos, PCL y quitosano. ....	19
1.2 Purificación y funcionalización de nanotubos de carbono multipared (MWCNTS). ....	20
1.3 Caracterización de los nanotubos funcionalizados. ....	21
1.4 Preparación superficial del $\text{Ti6Al4V}$ . ....	21
1.5 Funcionalización de policaprolactona/quitosano 50:50 con MWNTCS. ....	22
1.6 Recubrimiento de aleación $\text{Ti6Al4V}$ CON PCL-Quitosano-MWCNTS funcionalizados. ...	23
1.7 Caracterización morfológica de policaprolactona/quitosano con MWCNTS funcionalizados. ....	24
1.8 Evaluación de citotoxicidad mediante reducción MTT. ....	24
2. Resultados y análisis .....	24
2.1 Caracterización de NTC prístinos. ....	24
2.2 Caracterización de PCL y Quitosano. ....	26
2.3 Purificación y funcionalización de MWCNTS. ....	29
2.4 Caracterización de nanotubos funcionalizados. ....	30
2.5 Caracterización por espectroscopía raman. ....	30
2.6 Caracterización SEM-EDS de MWCNTS. ....	32
2.7 Caracterización por medio de Termogravimetría (TGA). ....	34

---

2.8 Análisis de la superficie de la aleación  $\text{Ti6Al4V}$  ..... 36

2.9 Caracterización de los recubrimientos PCL, quitosano, PCL- quitosano y pcl- quitosano-  
MWCNTS. .... 37

2.10 Análisis de citotoxicidad mediante reducción MTT ..... 41

3. Conclusiones ..... 42

4. Recomendaciones ..... 43

Referencias Bibliográficas ..... 44

Apéndices ..... 48

**Lista de Tablas**

	<b>Pág.</b>
Tabla 1. <i>Principales enlaces en un espectro FTIR del PCL</i> .....	27
Tabla 2. <i>Asignaciones de banda para PCL</i> .....	29
Tabla 3. <i>Áreas y relación de áreas de MWCNT prístinos y funcionalizados</i> .....	32

## Lista de Figuras

	<b>Pág.</b>
<i>Figura 1.</i> Diagrama de flujo del desarrollo experimental.....	19
<i>Figura 2.</i> Espectro Raman de MWCNTs prístinos.....	25
<i>Figura 3.</i> Micrografía SEM MWCNT prístinos.....	26
<i>Figura 4.</i> Espectro Quitosano.....	27
<i>Figura 5.</i> Espectro de PCL.....	28
<i>Figura 6.</i> Espectro Raman de MWCNT y MCNTs con cada uno de los tres tratamientos.....	31
<i>Figura 7.</i> Micrografías de MWCNTs a) tratamiento 1, b) tratamiento 2, c) tratamiento 3.....	33
<i>Figura 8.</i> TGA obtenidos para MWCNT prístinos y funcionalizados. ....	35
<i>Figura 9.</i> Micrografía SEM-EDS de Ti6Al4V después de decapado.....	36
<i>Figura 10.</i> Micrografías SEM tomadas a 50X, a) PCL b) Quitosano c) PCL- Quitosano. ....	38
<i>Figura 11.</i> Micrografías tomadas a 5000X de recubrimientos obtenidos a concentraciones de MWCNTs de a) 0,5 mg/ml, b) 1 mg/ml, c) 1,5 mg/ ml.....	40
<i>Figura 12.</i> ANOVA de dos vías con $p < 0.05$ y análisis de Tukey para recubrimientos sobre Ti6Al4V a diferentes proporciones de MWCNT-f.....	41

**Lista de Apéndices**

	<b>Pág.</b>
Apéndice A. Espectros RAMAN para los polímeros PCL y quitosano. ....	48
Apéndice B. Espectros Raman para los tratamientos ácidos. ....	49
Apéndice C. Análisis EDS a MWCNTs. ....	51
Apéndice D. Micrografías SEM tomadas a 500X, PCL a), Quitosano b), PCL- Quitosano c). ...	53
Apéndice E.. Micrografías SEM tomadas a 20 K, PCL a), recubrimiento 0,5 mg/ml b), recubrimiento 1 mg/ml c) recubrimiento 1,5 mg/ml.....	54
Apéndice F. ANOVA de dos vías con $p < 0.05$ y análisis de tukey para recubrimiento PCL- quitosano- 0.5 mg/ml MWCNT-f .....	55
Apéndice G. ANOVA de dos vías con $p < 0.05$ y análisis de tukey para recubrimiento PCL- quitosano- 1 mg/ml MWCNT-f . ....	56
Apéndice H. ANOVA de dos vías con $p < 0.05$ y análisis de tukey para recubrimiento PCL- quitosano- 1,5 mg/ml MWCNT-f . ....	57
Apéndice I. ANOVA de dos vías con $p < 0.05$ y análisis de tukey para recubrimiento PCL .....	58
Apéndice J. ANOVA de dos vías con $p < 0.05$ y análisis de tukey para recubrimiento PCL .....	59

### Abreviaturas

NTC	Nanotubos de carbono
NTC-f	Nanotubos de carbono funcionalizados
MWCNTs	Nanotubos de carbono multipared
MWCNT-f	Nanotubos de carbono multipared funcionalizados
PCL	Policaprolactona
FTIR	Espectroscopia de infrarrojo por transformada de Fourier
RAMAN	Espectroscopia Raman
SEM	Microscopía electrónica de barrido
TGA	Termogravimetría

## Resumen

**TÍTULO:** EVALUACIÓN DE NANOTUBOS DE CARBONO MULTIPARED FUNCIONALIZADOS Y SU APLICACIÓN EN RECUBRIMIENTOS POLIMÉRICOS PCL-QUITOSANO PARA USO EN DISPOSITIVOS BIOMÉDICOS\*.

**AUTOR:** MEDINA FONSECA, JUAN DANIEL\*\*.

**PALABRAS CLAVE:** POLICAPROLACTONA, SPIN COATING, NANOTUBOS DE CARBONO, MWCNTs, MWCNT-f.

**DESCRIPCIÓN:** En este estudio se realizó la funcionalización de nanotubos de carbono multipared (MWCNTs) por el método de carboxilación, utilizando tres tratamientos diferentes mediante la oxidación en medios ácidos y su posterior caracterización mediante técnicas de microscopía electrónica de barrido (SEM), espectroscopia RAMAN y termogravimetría TGA. A partir de estos resultados experimentales se encontró que para uno de los tratamientos la estructura de los nanotubos se vio afectada rompiendo las paredes de los mismos. Solo uno de los tratamientos no mostró cambios importantes sobre las paredes de la estructura de carbono y la eliminación de metales presentes en los NTC fue la más efectiva. Adicionalmente se buscó obtener recubrimientos de policaprolactona-quitosano al 50/50 p/p y el 77 % v/v de ácido acético con diferentes proporciones de MWCNT-f sobre la aleación de Ti6Al4V mediante la técnica de Spin Coating, realizando 5 capas con un secado de 10 minutos entre ellas, obteniendo para una de las concentraciones una mejor dispersión del recubrimiento con menos presencia de aglomerados. Así mismo, se evaluó el efecto de citotoxicidad de estos, mediante ensayos de reducción del (MTT), presentando su viabilidad celular mayor al 70% en cada uno de los recubrimientos, indicando que el material no es citotóxico. Estos resultados sugieren que lo recubrimientos poseen características sobresalientes para su uso potencial en aplicaciones biomédicas.

---

\* Proyecto de grado. Modalidad: Proyecto de investigación.

\*\* Facultad de Ingeniería Físicoquímica. Escuela de Ingeniería Química. Director: Ph.D. Dario Yesid Peña Ballesteros. Codirector: M.sc Nerly Deyanira Montañez Supelano.

### Abstract

**TITLE: EVALUATION OF FUNCTIONALIZED MULTI-WALL CARBON NANOTUBES AND THEIR APPLICATION IN PCL-CHITOSAN POLYMERIC COATINGS FOR USE IN BIOMEDICAL DEVICES.**

**AUTHOR: MEDINA FONSECA, JUAN DANIEL \*\*.**

**KEYWORDS: POLYCAPROLACTONE, SPIN COATING, CARBON NANOTUBES, MWCNTS, MWCNT-f.**

**DESCRIPTION:** In this study performed the functionalization of multiwall carbon nanotubes (MWCNTs) by the carboxylation method, using three different treatments by oxidation in acid media and its subsequent characterization by scanning electron microscopy (SEM) techniques, RAMAN spectroscopy and thermogravimetry TGA. From these experimental results it was found that for one of the treatments the structure of the nanotubes was affected by breaking the walls of the same. Only one of the treatments didn't show significant changes on the walls of the carbon structure and the elimination of metals present in the NTC was the most effective. Additionally, the study sought to obtain coatings at polycaprolactone-chitosan 50/50 and 77% v/v of acetic acid with different proportions of MWCNT-f on the alloy of Ti6Al4V using the Spin Coating technique, performing 5 layers with a drying 10% of 10 minutes between them, obtaining for one of the concentrations a better dispersion of the coating with less presence of agglomerates. Likewise, the effect of toxicity of these was evaluated, by means of assays of reduction of the (MTT), presenting its cellular viability greater than 70% in each one of the coatings, indicating that the material is not cytotoxic. These results suggest that the coatings have outstanding characteristics for their potential use in biomedical applications.

---

\*\* Facultad de Ingeniería Físicoquímica. Escuela de Ingeniería Química. Director: Ph.D. Dario Yesid Peña Ballesteros. Codirector: M.sc Nerly Deyanira Montañez Supelano.

## Introducción

En un mundo de constante cambio se hace necesario mejorar el tipo de vida del ser humano, el cual a través del tiempo experimenta nuevas tecnologías hechas para mejorar la calidad de vida. Los materiales han tenido una gran participación, tanto así que han sido usados en la medicina para poder restaurar funciones de tejidos dañados, estos fueron utilizados desde el antiguo Egipto y las civilizaciones clásicas Griega y Romana. La historia se remonta a mediados del siglo XVI, donde en Europa se utilizaron tres tipos de materiales para dos ramas de la medicina, el oro y la plata para reparaciones dentales y el hierro para la inmovilización de estructuras óseas. El estudio de encontrar un material que fuera completamente adaptable al ser humano se intensificó después de la segunda guerra mundial, debido a la necesidad de rehabilitar a los afectados por la guerra. En la década de los 60 se hicieron públicos los primeros estudios sobre las repercusiones en la presencia de un implante y las lesiones provocadas en el cuerpo humano (Lizarbe, 2007). La primera prótesis articular fue de cadera por Charnley en 1962, pero estas, tenían pares de fricción metal-metal lo que ocasionaba un depósito de partículas metálicas en la articulación. Estas partículas metálicas liberadas por el desgaste y la corrosión no pasa al organismo tal cual, ellas son fagocitadas por las células para su posterior distribución por los fluidos corporales (Abujeta García, de Larramendi Martínez, Muñoz Lejarazu, Lasarte Gastaminza, & Lejarazu Muñoz, 2004).

Para la solución de este problema,(Abujeta García et al., 2004) años después se introduce el término de biocompatibilidad, que se define como la habilidad de un material para actuar con una adecuada respuesta al huésped (Martínez & Moreno, 1987). Este tipo de material se conoce como

biomaterial el cual se define como sustancia natural o sintética cuya misión es reemplazar una parte o alguna función de nuestro organismo, de forma segura y fisiológicamente aceptable (Haduch & Hernández, 2007).

Los más comunes son las aleaciones con base en titanio. La aleación Ti6Al4V es la más utilizada entre todas las aleaciones de titanio para aplicaciones biomédicas, ya que presenta excelentes propiedades mecánicas, resistencia a la corrosión y biocompatibilidad. Siendo la de mayor utilización para prótesis articulares, mejorándose sus propiedades tribológicas por medio de diferentes procesos de endurecimiento, no obstante se hace necesario mejorar la superficie de dicha aleación por medio de recubrimientos poliméricos lo cual genera condiciones adecuadas para garantizar el proceso de osteointegración (Gómez Rodríguez, Quintero Jaime, Peña Ballesteros, & Estupiñan Durán, 2014; Liu, Chu, & Ding, 2010). Sin embargo, su resistencia a la corrosión le confiere una inercia química al titanio afectando su interacción con el medio biológico, lo que dificulta el proceso de osteointegración, pudiendo presentar desgaste incluso en el rozamiento con tejidos blandos (Bronzino, 1999; García Rueda, Peña Ballesteros, & Estupiñan Durán, 2017).

Se han llevado a cabo una serie de investigaciones las cuales buscan modificar la superficie de Ti6Al4V para mejorar la interface formada entre la superficie del implante y el medio biológico, por medio de recubrimientos cerámicos o poliméricos biodegradables, como el uso de ácido poliláctico (PLA), ácido poliglicólico (PGA), policaprolactona (PCL), colágeno y Quitosano (Liu et al., 2010; Quintero Jaime, Peña Ballesteros, & Estupinan Duran, 2013).

Los dos polímeros de interés en este estudio son la PCL y el Quitosano utilizados para mejorar propiedades de la aleación, la policaprolactona, es un polímero biodegradable debido a sus propiedades fisicoquímicas lo que lo hace un atractivo para su uso en la medicina, adicional cuenta

con una óptima compatibilidad de mezcla y el quitosano siendo un derivado de la quitina, la cual proviene de forma natural, lo convierte en el polímero natural más abundante después de la celulosa.

Estudios realizados por Sarasam *et al* obtuvieron mezclas 50:50 de PCL y quitosano. Éstos cuando se procesan, muestran una mejora significativa en las propiedades mecánicas, así como un soporte para la actividad celular con respecto al quitosano (Sarasam & Madihally, 2005). Dado esto, se estudia una mezcla de estos dos polímeros, PCL y quitosano, para mejorar la superficie de la aleación de Ti6Al4V. En el 2011, Neves *et al*, estudiaron soluciones poliméricas de PCL- quitosano 50:50 entre ellas, utilizando como disolvente ácido fórmico, obteniendo una buena dispersión a lo largo de la fase de quitosano, siendo estas analizadas por calorimetría de barrido diferencial y espectroscopia infrarroja transformada de Fourier (FTIR) (Neves et al., 2011).

Estudios recientes lograron obtener recubrimientos biopoliméricos de PCL- quitosano a diferentes relaciones, con diferente contenido de PCL. Observaron que la cantidad de PCL en la película tiene un efecto en la retención del quitosano en la superficie, así como en las características morfológicas de los recubrimientos, concluyendo que la existencia de una matriz porosa de quitosano en las películas con relación 50/50, facilitan una mayor precipitación de calcio en dichos recubrimientos, mostrando un mejor carácter bioactivo (Quintero Jaime et al., 2013).

Además, otros estudios muestran que la mezcla de polímeros con nanotubos de carbono (NTC), pueden mejorar su biocompatibilidad debido a extraordinarias propiedades eléctricas y mecánicas, que ayudan a mejorar la superficie del biomaterial, dando como resultado una mayor adhesión celular (Sinnott & Andrews, 2001).

Existen dos tipos de NTC, los nanotubos de carbono de pared simple (SWCNT) y los nanotubos de carbono multipared (MWCNTs), los cuales se diferencian según las capas de grafito que los

forman. Al adicionar MWCNTs a una mezcla polimérica, se observa una mejora a la resistencia del choque térmico y reduce las temperaturas de funcionamiento en el material, gracias a su alta conductividad térmica (Andrade Guel, López López, & Sáenz Galindo, 2012). Sin embargo, los NTC presentan un alto grado de toxicidad, cuando las partículas se encuentran en contacto por largo tiempo con células y tejidos, estas pueden inducir un mayor efecto tóxico en comparación con aquellas que tienen un corto tiempo de retención. Este factor incorpora el concepto de biopersistencia, que es la capacidad de cualquier partícula de permanecer en un organismo vivo al acumularse en órganos y/o tejidos (Firme & Bandaru, 2010).

La funcionalización de nanotubos de carbono (NTC-f) ayuda a mejorar la biocompatibilidad y su estabilidad en el entorno biológico, dicha funcionalización puede ser de dos tipos, a través de interacciones no covalentes (sistemas que interactúan débilmente con los nanotubos) y covalentes (sistemas que interactúan fuertemente con los nanotubos de carbono, causando cambios drásticos en sus propiedades). En posteriores investigaciones, reportaron que cuando los NTC son funcionalizados, muchas de sus propiedades fisicoquímicas se pueden ver modificadas, como por ejemplo la solubilidad, dependiendo del compuesto químico unido. Cuando éste último resulta ser un compuesto químicamente inestable o tóxico, al aumentar el grado de funcionalización, disminuye su toxicidad (Montes Fonseca, Orrantia Borunda, & Sánchez Ramírez, 2014).

Sin embargo, aún no se han reportado estudios en la utilización de la mezcla polimérica PCL-kitosano con nanotubos de carbono multipared funcionalizados (MWCNTs) en recubrimientos sobre la aleación de Ti6Al4V para su posterior uso en dispositivos biomédicos, demostrando ser, la biomedicina, un área de aplicación en crecimiento, ya que según un estudio de la fundación OPTI se estima que en un futuro próximo, una de cada dos mujeres y uno de cada cinco hombres

mayores de 65 años sufrirán algún tipo de fractura y esto, conlleva a que el mercado crezca entre un 5 y un 10 por ciento en las próximas décadas (OPTI & Fenin, 2004).

Debido a la necesidad de las empresas Quirúrgicos Especializados S.A y Jaime Rueda & CIA, de crear productor innovadores y competir por una parte de este nuevo mercado, se crea un macro proyecto denominado “Obtención y caracterización de superficies biomiméticas nanoestructuradas sobre materiales de osteosíntesis para generación de nuevos productos de innovación de la empresa Quirúrgicos especializados S.A y Jaime Rueda & CIA.”, del cual se deriva este proyecto, en el cual se va a realizar un proceso de funcionalización de nanotubos de carbono multipared (MWCNTs), para luego ser caracterizados mediante microscopía electrónica de barrido (SEM), espectroscopia RAMAN y termogravimetría TGA. Adicionalmente se buscará obtener recubrimientos de policaprolactona-quitosano con diferentes proporciones de MWCNTs sobre la aleación de Ti6Al4V y evaluar el efecto de toxicidad de estos, mediante ensayos de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT).

## **1. Metodología**

En esta sección, se describe la metodología empleada para el desarrollo del proyecto, en el cual se utilizó un sustrato de Ti6Al4V en el que se realizaron los recubrimientos a las diferentes proporciones de MWCNTs, con una mezcla polimérica de PCL- quitosano. Finalmente, se describe la metodología y las condiciones de operación empleadas para la evaluación de toxicidad.

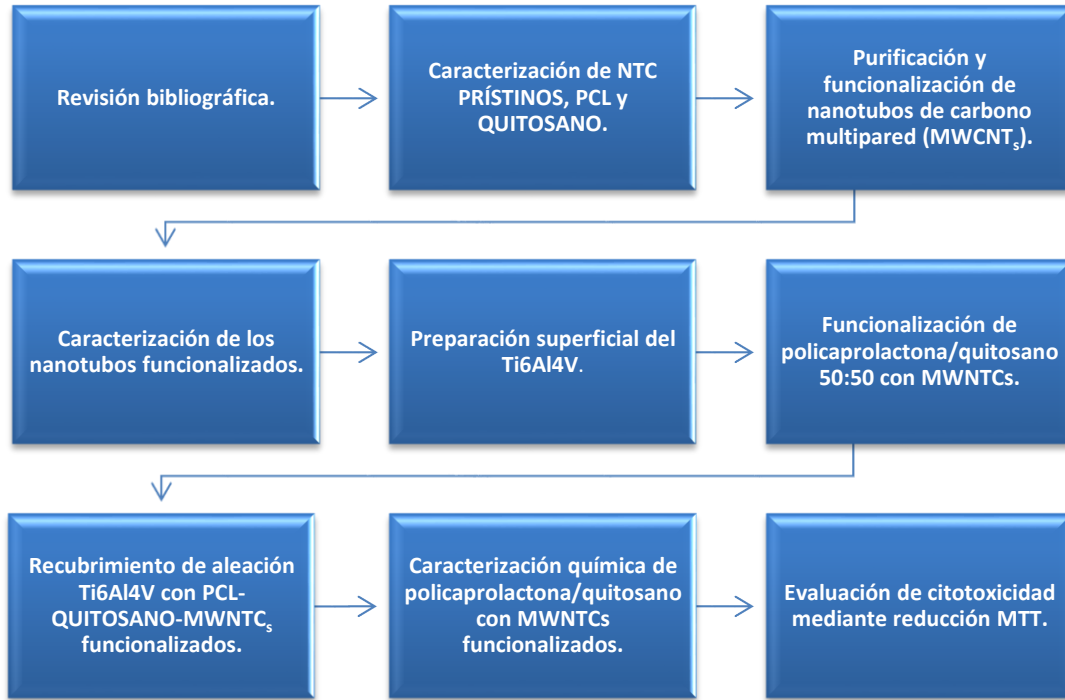


Figura 1. Diagrama de flujo del desarrollo experimental

### 1.1 Caracterización de NTC prístinos, PCL y quitosano.

Se caracterizaron los nanotubos de carbono prístinos por medio de la técnica de microscopía electrónica de barrido (SEM) para evaluar información acerca de textura, tamaño y morfología, mediante un microscopio electrónico de barrido FEI Quanta 650. Seguidamente, espectroscopia Raman en un equipo de marca HORIBA Scientific Xplora Plus el cual proporciona información sobre su estructura atómica, sus condiciones del método de tratamiento de las muestras fue de: Laser de 638 nm, agujero 500, rejilla 600 (750 nm), tiempo de adquisición de 15 y filtro de 10%.

PCL de marca SIGMA-ALDRICH y quitosano de igual marca derivado de conchas de camarón, se caracterizaron mediante espectroscopia infrarroja con Transformada de Fourier (FTIR) y

espectroscopía Raman para su identificación y verificación de espectros característicos, con la posibilidad de identificar los cambios estructurales después del recubrimiento.

## **1.2 Purificación y funcionalización de nanotubos de carbono multipared (MWCNTS).**

Los nanotubos de carbono multipared utilizados fueron de marca SIGMA-ALDRICH con diámetro 6-13 nm y de longitud 2.5-20  $\mu\text{m}$ . Los nanotubos obtenidos por métodos convencionales generalmente contienen impurezas como metales o carbón amorfo (hollín), las cuales deben removerse para obtener un material puro (Sajid et al., 2016). Se aplicaron 3 tratamientos para llevar a cabo su purificación y funcionalización que son los siguientes;

### Tratamiento 1

Se hizo un tratamiento inicial durante 3 horas con  $\text{HNO}_3$  9M a  $110^\circ\text{C}$  y filtrado al vacío y ajuste de pH a 7. Luego se neutraliza con NaOH 1M durante 1 hora a temperatura ambiente se filtra al vacío y se lava con agua desionizada. Después se adiciona una solución de HCl durante 6 horas 5M a una temperatura de  $110^\circ\text{C}$ , se vuelve a llevar a pH 7 con agua desionizada con filtrado al vacío. Posteriormente se inicia el proceso de secado durante 8 horas a  $80^\circ\text{C}$  (Montañez Supelano, 2017).

### Tratamiento 2

En una mezcla de ácidos de  $\text{H}_2\text{SO}_4$ - $\text{HNO}_3$  relación 3:1 a temperatura ambiente se sumergen los CNT al 0.25 % w/v. Luego se tratan en un baño de ultrasonido durante 2h y se mantienen durante 15h en la solución. Seguido se añade ácido clorhídrico a la solución y posteriormente se neutraliza con hidróxido de amonio para finalmente filtrar con agua desionizada hasta llevar pH 6 (Osorio, Silveira, Bueno, & Bergmann, 2008).

### Tratamiento 3

En una solución de 50 ml con un 40% w/w de NaOH y 0.25 w/v de NTC, se agita magnéticamente durante 2 horas se filtra y se neutraliza con agua desionizada. Luego se adiciona 50 ml de HCl, se agita durante 2 horas para posteriormente neutralizar con agua desionizada y se lleva a pH neutro, se seca durante 8 horas a 80°C. Luego se prepara una solución 1 M de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> de 50 ml a la cual se le adicionan los nanotubos previamente seca, se agitan durante 30 minutos y se adiciona en agitación magnética continua gota a gota una solución de KMNO<sub>4</sub> 0.1M de 50 ml, se seca durante 8 horas a 80°C (Kathyayini, Willems, Fonseca, Nagy, & Nagaraju, 2006; Smajda, Kukovecz, Kónya, & Kiricsi, 2007).

### 1.3 Caracterización de los nanotubos funcionalizados.

Se realizó SEM-EDS para ver la morfología de los MWCNTs, el tamaño y los componentes después de realizada la funcionalización. La espectroscopia Raman de nanotubos funcionalizados muestra las bandas espectrales y características de este alótropo del carbono para evaluar qué tratamiento fúe el mejor, de los tres mencionados anteriormente. Adicionalmente se utilizó la técnica de análisis termogravimétrico TGA para medir la cantidad y rapidez del cambio en peso de la muestra en función de la temperatura.

### 1.4 Preparación superficial del Ti6Al4V.

Para este proceso se hizo un desbaste de las probetas de Ti6Al4V que tienen 14 mm de diámetro y 3 mm de espesor con papel de carburo de silicio de tamaño (180, 280, 360, 400, 600) en medio

seco, con el fin de mejorar la adhesión del recubrimiento al quitar partes del maquinado que se obtienen en la obtención de las mismas (García Rueda et al., 2017). Seguido se hizo un baño ultrasónico en etanol al 96% durante 10 minutos para eliminar impurezas. Se preparó una solución de decapado que tiene la función de eliminar impurezas de la superficie del biomaterial asegurando un recubrimiento libre de trazas obtenidas durante el desbaste.

La solución se preparó con 30 ml de HNO<sub>3</sub>; 10 ml de HF; 50 ml H<sub>2</sub>O. Luego de tener la solución, fueron sumergidas las probetas previamente lijadas, por un tiempo de 20 segundos, posteriormente se lavaron con agua desionizada por 10 minutos en baño ultrasónico.

### **1.5 Funcionalización de policaprolactona/quitosano 50:50 con MWNTCS.**

Se preparó una mezcla de policaprolactona-quitosano al 50/50 p/p y el 77 % v/v de ácido acético. Se tomó como referencia la preparación de la mezcla polimérica de García Rueda *et al*, donde inicialmente se preparó la solución de quitosano, en una solución de ácido acético al 0.5 M, luego se disuelve quitosano al 1% p/v y se agita durante 1800 s a 83.78 rad/s y 1800 s a 20.94 rad/s (García Rueda et al., 2017). Luego se preparó la solución de policaprolactona, en una solución de ácido acético al 100%, se disolvió policaprolactona al 0.3% p/v y se agita durante 7200 s a 136 rad/s. Después de tener las dos soluciones se mezclan en relación 10:3 v/v lo que equivale a una solución PCL- quitosano 50/50 p/p y 77% v/v de ácido acético y se agitó durante 3600 s a 41.89 rad/s. Posteriormente se agregaron MWCNTs a la mezcla de PCL- quitosano en diferentes composiciones (0.5, 1 y 1.5) mg/ml. Con el fin de mejorar la dispersión y la adhesión interfacial de los MWCNTs, las mezclas fueron puestas en un procesador ultrasónico marca SONICS VCX

750 en un tiempo de 30 minutos, un pulso de 2:1 y una amplitud de 45% hasta llevar a soluciones estables, teniendo un tiempo total de sonicación de 45 minutos.

Finalmente, las soluciones fueron sometidas a agitación mecánica a una velocidad de 300 rpm y temperatura ambiente durante 30 minutos, para posteriormente ser llevadas al baño ultrasónico durante el mismo periodo de tiempo.

### **1.6 Recubrimiento de aleación TI6AL4V CON PCL-Quitosano-MWCNTS funcionalizados.**

Los recubrimientos se obtuvieron mediante la técnica de Spin Coating utilizando un equipo de marca Laurell WS-650HZB-23NPPB para cada mezcla polimérica, esta técnica consiste en la fabricación de películas finas de espesor uniforme mediante la utilización de la fuerza centrífuga durante el proceso de deposición sobre un sustrato de una disolución polimérica (Ladeiro, Coterillo Casado, & Téllez Ariso, 2011).

El recubrimiento se llevó a cabo mediante la deposición de 5 capas cada una con un volumen de 30  $\mu$ l para obtener un recubrimiento homogéneo. Antes de iniciar el recubrimiento el sustrato tuvo un precalentamiento de 10 minutos a 50 °C en la estufa, el secado entre capas a las mismas condiciones incluyendo la etapa final. La primera capa se ejecutó a 3000 rpm y las siguientes cuatro capas a una velocidad de 4000 rpm con un intervalo de paso de 1:2 por un tiempo de 60 segundos en los dos pasos. Las condiciones anteriores se encontraron por medio de pruebas preliminares.

### **1.7 Caracterización morfológica de policaprolactona/quitosano con MWCNTS funcionalizados.**

La mezcla de PCL- quitosano y MWCNTs se caracterizó mediante microscopia SEM.

### **1.8 Evaluación de citotoxicidad mediante reducción MTT.**

Cada una de las muestras (problema y control) fueron colocadas en medio de cultivo RPMI-1640 al 10% de SFBi (suero fetal bovino inactivado) e incubadas a  $37^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ , durante 30 días. Para evaluar la toxicidad, las células HOS (osteosarcoma humano) fueron incubadas con diluciones seriadas por triplicado de cada uno de los sobrenadantes. Como control las células fueron dejadas sin tratamiento. Después de 72 h la viabilidad celular será medida mediante la prueba colorimétrica de reducción del MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio). La medida de la densidad óptica es realizada a 570 nm en un lector de microplacas (Montañez Supelano, 2017).

## **2. Resultados y análisis**

### **2.1 Caracterización de NTC prístinos.**

En la caracterización de NTC, se pudo evidenciar que en el espectro Raman presentan los espectros característicos con la denominadas banda D y G, con una longitud de onda de  $1331\text{ cm}^{-1}$

<sup>1</sup> y  $1595\text{ cm}^{-1}$  respectivamente. La banda G señala la banda del grafito y la banda D, el trastorno de defectos en la estructura (Flahaut, Laurent, & Peigney, 2005). En la Figura 2 se presenta el espectro Raman que muestra la intensidad vs el número de onda. A la gráfica se le aplicó tratamiento de deconvolución para calcular el área bajo cada pico con respecto a su intensidad para cada una de las banda D, G, D' y G' de NTCs obtenido comercialmente.

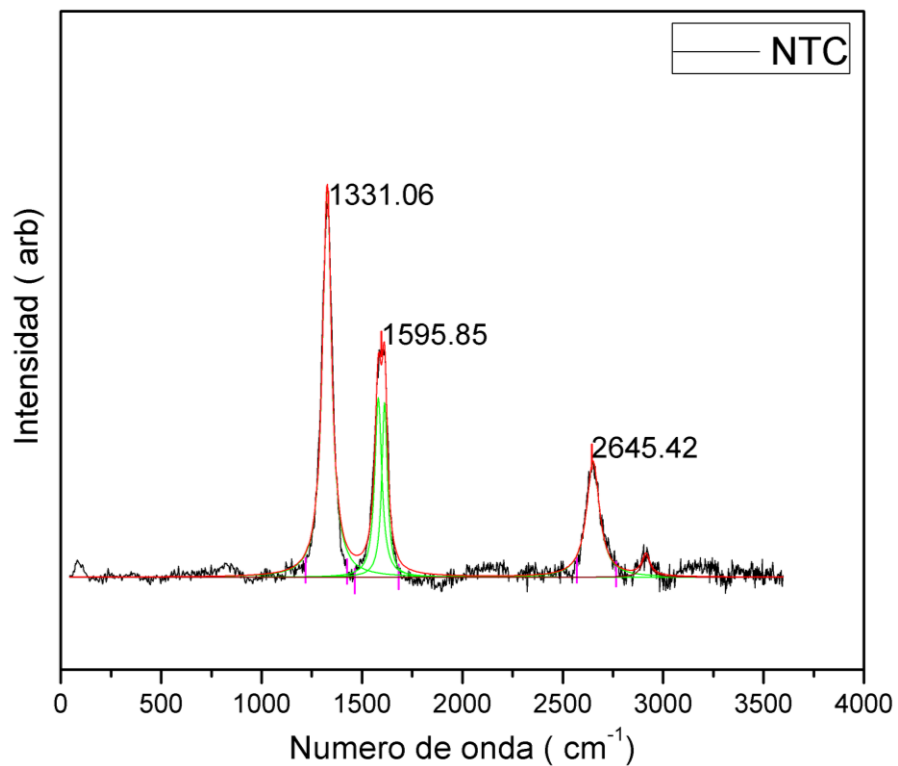


Figura 2. Espectro Raman de MWCNTs prístinos

Las micrográficas SEM muestran nanotubos en aglomeraciones, los cuales presentan fuerzas de atracción tipo Van Der Waals que hacen que se mantengan unidos unos a los otros. Así mismo, se evidencia concentraciones de NTC, mostrados en círculos, que actúan como agentes que minimizan la posibilidad de dispersarlos en materiales poliméricos como se muestra en la Figura 3a (Fernández & Hernández Sánchez, 2011). Los MWCNTs cumplen con las características

requeridas, teniendo en cuenta que los tubos no se encuentran cortados y que su diámetro de partícula es de 13 a 30 nm, lo cual corresponde de acuerdo a la literatura como se observa en la Figura 3b.

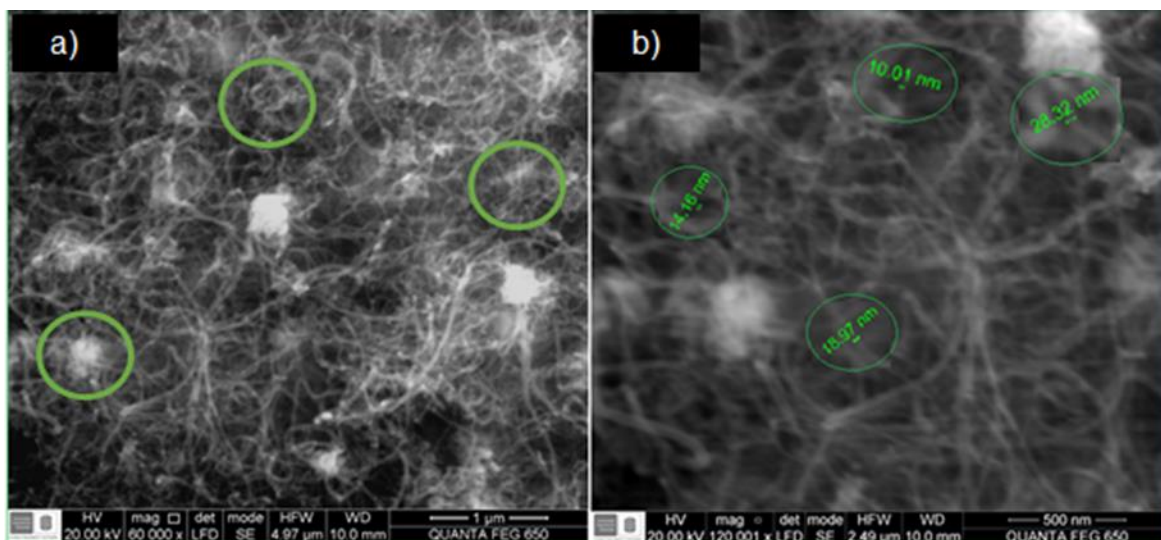


Figura 3. Micrografía SEM MWCNT prístinos

## 2.2 Caracterización de PCL y Quitosano.

El espectro FTIR de la PCL se muestra en la Figura 4. Una banda a  $1717\text{ cm}^{-1}$  es asignada a la vibración en tensión del enlace carbonilo  $\text{C=O}$  presente en la unión del éster, de igual manera se observan dos picos a  $2941$  y  $2861\text{ cm}^{-1}$  que se relacionan con la vibración en tensión de enlaces  $\text{C-H}$ . Vale la pena resaltar que se ve una pequeña señal marcada con un número de onda en  $3439,38\text{ cm}^{-1}$  a la que se le puede asignar el estiramiento de grupos hidroxilo  $\text{OH}$ , aunque esto se puede dar debido a la humedad absorbida por el material polimérico. El espectro se compara con los principales espectros reportados por Cárdenas *et al* en la tabla 1, dando como resultado una buena aproximación (Cárdenas, HERNÁNDEZ, & PEREA, 2011).

Tabla 1.

Principales enlaces en un espectro FTIR del PCL.

Banda [cm <sup>-1</sup> ]	Enlace Correspondiente (Grupo Funcional)
3439,92	Humedad remanente en la superficie
2944,2	Estiramiento Metileno C-H del (-CH <sub>2</sub> -)
2865,26	Estiramiento Simétrico Metileno -CH <sub>2</sub> -
1720,67	Éster O R - C - O - H
1471,07	Flexión Metileno C-H del (-CH <sub>2</sub> -)
1436,67	Flexión Simétrico C-H del (-CH <sub>3</sub> -)

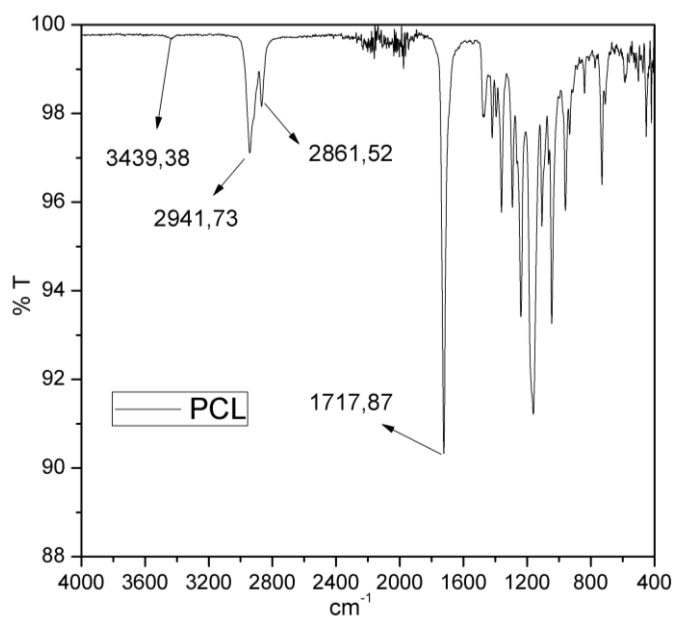


Figura 4. Espectro Quitosano

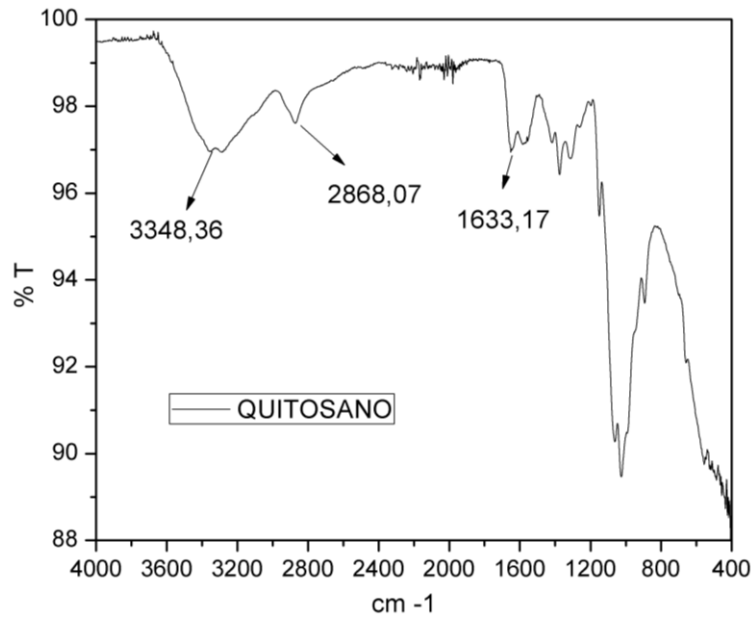


Figura 5. Espectro de PCL

La Figura 5 muestra el espectro de quitosano proveniente de forma comercial. Donde se revela la presencia de grupos carboxilos que pertenecen a una banda ubicada en  $3348 \text{ cm}^{-1}$ , acorde con lo reportado en la literatura. La banda a  $2868 \text{ cm}^{-1}$  corresponde a una vibración tensión del enlace C-H, mientras que la banda a  $1633 \text{ cm}^{-1}$  se aprecia una banda de amida I, acorde con los aportes hechos por Cárdenas *et al* (Cárdenas Otero, Mina Hernandez, & Toro Perea, 2011).

Igualmente se usó la técnica de caracterización por espectrometría Raman, en la que se pudo evidenciar los espectros característicos de cada polímero, en las Tablas 2 se resume la asignación de bandas de PCL y para el quitosano genera la mismas señales de los grupos funcionales y en la misma zona del espectro, sus graficas correspondientes se encuentran en el Anexo A.

Tabla 2.

*Asignaciones de banda para PCL.*

ASIGNACIÓN DE BANDAS		
Número de onda (cm <sup>-1</sup> )	Grupo funcional	Referencia
916	CH <sub>3</sub>	(Speight, 1999)
1068	C – O (CH <sub>2</sub> -OH, alcohol primario)	(Speight, 1999)
1119	CH <sub>3</sub>	(Speight, 1999)
1285, 1307	CH <sub>2</sub>	(Speight, 1999)
1434	CH <sub>3</sub>	(Speight, 1999)
1727	C = O	(Speight, 1999)
2917	CH <sub>2</sub> , CH <sub>3</sub>	(Speight, 1999)

### 2.3 Purificación y funcionalización de MWCNTS.

Los NTC usualmente se encuentran contaminados con catalizadores metálicos, carbonos amorfos y nanopartículas de grafito que pueden influir en sus propiedades, lo cual puede introducir defectos en las paredes laterales de los NTC causando un acortamiento de los tubos para su posterior su aplicación biomédica. En la actualidad, los MWCNTs purificados cuestan alrededor de US\$ 3000 por gramo, que es 10 veces mayor que los CNT no purificados disponibles comercialmente (De Volder, Tawfick, Baughman, & Hart, 2013).

La funcionalización consiste en la modificación de las propiedades por la adsorción de átomos o moléculas en las paredes exteriores de los NTC. Por medio de oxidación química se buscó obtener grupos funcionales como ácidos carboxílicos para así obtener cambios en las propiedades físicas de las superficies, tales como solubilidad y dispersión. Se aplicaron tres metodologías de

oxidación, descritas en la sección 1.2 (Kathyayini et al., 2006; Montañez Supelano, 2017; Osorio et al., 2008).

#### **2.4 Caracterización de nanotubos funcionalizados.**

La caracterización se llevó a cabo mediante espectroscopia Raman y microscopia electrónica de barrido SEM para los tratamientos utilizados, y así, poder evaluar el mejor método de funcionalización.

#### **2.5 Caracterización por espectroscopía raman.**

En esta técnica, se realizó la comparación de los espectros obtenidos de los MWCNTs prístinos y los MWCNT-f lo cual es una técnica frecuente que proporciona diferentes espectros característicos para  $sp^3$ ,  $sp^2$  y carbonos  $sp$ .

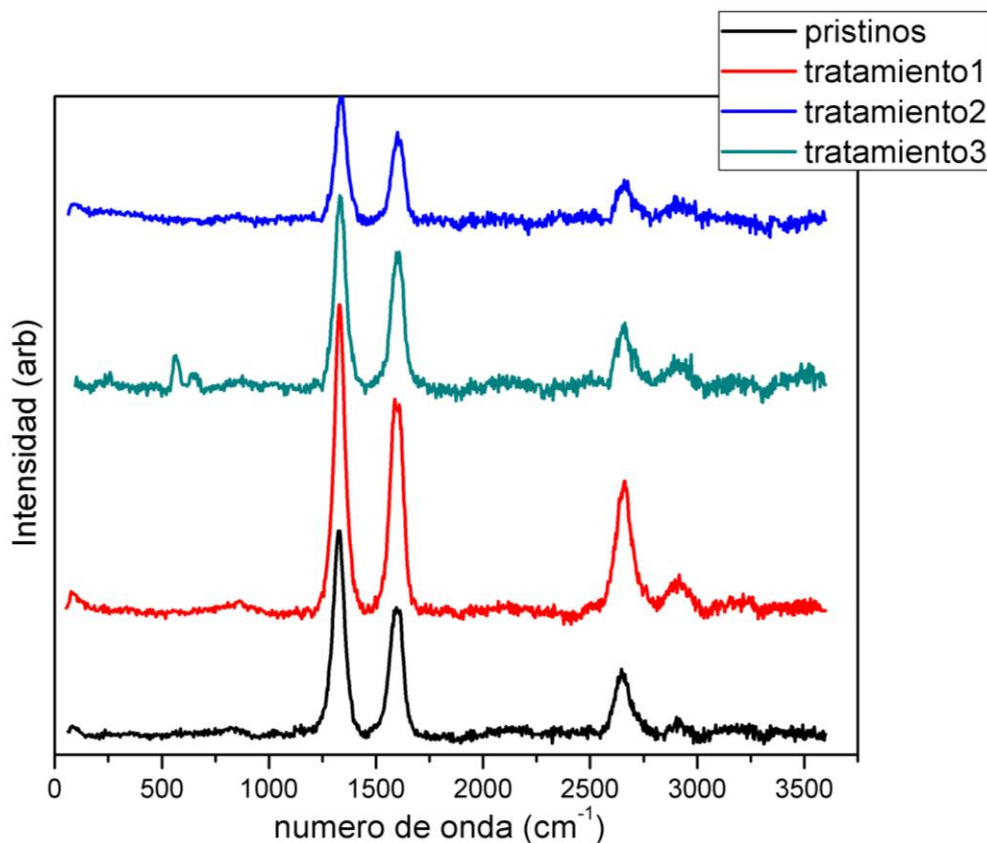


Figura 6. Espectro Raman de MWCNT y MCNTs con cada uno de los tres tratamientos.

Como se observa en el espectro, se identifican los mismos espectros característicos de los MWCNT prístinos, de lo que se puede concluir que los MWCNTs no sufrieron ningún daño estructural con los tratamientos ácidos, a excepción del tratamiento 3, que presenta un pico no característico en la longitud de onda de  $576 \text{ cm}^{-1}$ , el cual se puede atribuir a un daño estructural en las paredes de los MWCNTs (Osorio et al., 2008).

Se ha reportado que el uso de la relación de la intensidad de las bandas D y G, denotada como  $I_G/I_D$  (área bajo la banda), se usa para la caracterización del grado de desorden estructural que presentan los MWCNT, describiendo que a mayor relación se le atribuye un mayor grado de funcionalización (Boyer, C.Albano, & Navarro, 2010). Las relaciones de áreas de estas bandas, así como el área de cada una de estas bandas se presentan en la tabla 3.

Tabla 3.

*Áreas y relación de áreas de MWCNT prístinos y funcionalizados.*

	área del pico		IG/ID
	Banda D	Banda G	
<b>MWCNT prístinos</b>	88415,66522	31278,22376	0,35376337
<b>Tratamiento 1</b>	123180,5518	49826,23499	0,40449758
<b>Tratamiento 2</b>	51860,18775	19815,69851	0,38209847
<b>Tratamiento 3</b>	7831124142	2634096159	0,33636246

Se evidencia un aumento del valor de la relación de áreas bajo la curva de los espectros obtenidos por medio del método de deconvolución, realizado en el software OriginPro 8, identificado como IG/ID. Obteniendo que el tratamiento 1 tiene una relación mayor, en comparación con los dos tratamientos consecuentes con una relación de 0,4 en comparación a los MWCNT prístinos que presentan una relación de 0,35. Los dos primeros tratamientos presentaron un aumento en su relación de área como se esperaba después de su funcionalización por medio ácido, en cambio, el tratamiento 3, presentó una disminución con respecto a los nanotubos prístinos demostrando con el espectro RAMAN que tuvo un cambio estructural y su grado de funcionalización se le puede atribuir que fue menor. Cada uno de los espectros junto con su relación de área para los tres tratamientos se presenta en el Anexo B.

## 2.6 Caracterización SEM-EDS de MWCNTS.

En la figura 7 se presenta la microestructura morfológica de los MWCNTs obteniendo información sobre su morfología y los elementos presentes en las diferentes muestras se evaluaron por SEM-EDS.

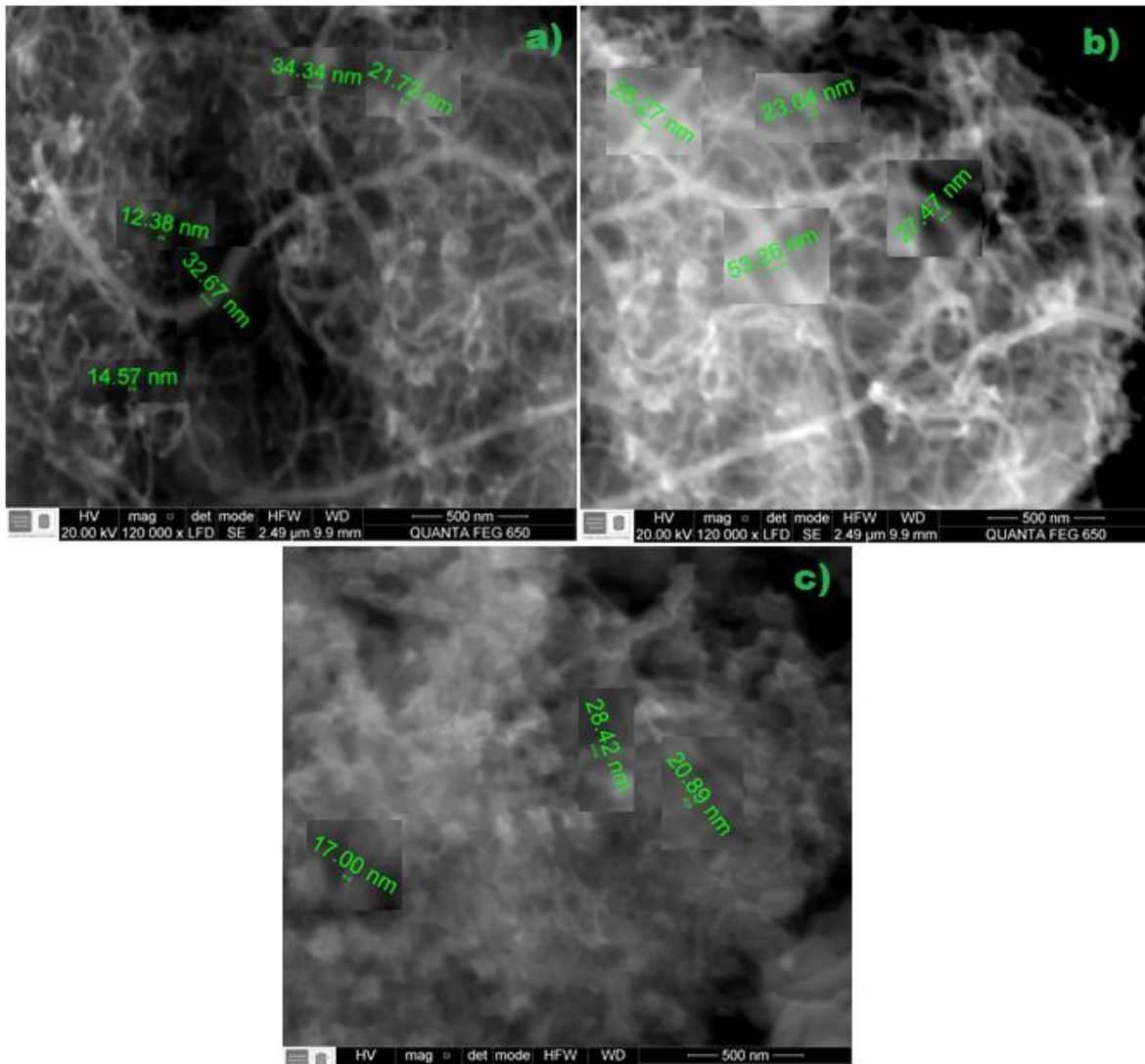


Figura 7. Micrografías de MWCNTs a) tratamiento 1, b) tratamiento 2, c) tratamiento 3.

Las micrografías de los tres tratamientos evidencian que no hubo daños a las paredes de los MWCNTs, ya que se mantuvo el diámetro en cada uno, en un rango entre 13 y 30 nm. Sin embargo, en el tratamiento 3 (ver figura 7c) se puede observar que los nanotubos se aglomeraron tomando una forma esponjosa y produciendo formaciones de clúster lo que puede afectar su dispersión en las soluciones poliméricas a tratar. Adicionalmente los nanotubos en este tratamiento no presentan

una estructura definida en comparación con los otros dos, que a su vez, presentan cadenas de nanotubos enrolladas más definidas.

En el tratamiento 1, se evidencia un mayor diámetro de nanotubos, puede ser debido a la inclusión de grupos funcionales a sus paredes, adicionalmente, una cadena de nanotubos más definida en comparación a los otros dos tratamientos ácidos realizados, haciendo que éste, se visualice mejor a una misma resolución.

Las gráficas correspondientes al análisis EDS en el que se reportan el porcentaje en peso de los compuestos de MWCNTs en cada uno de sus tratamientos se observan en el Anexo C. En los que se evidencia un mayor porcentaje en peso de carbono y oxígeno en el tratamiento 1 en comparación a los tratamientos 1 y 2, siendo en este ultimo la aparición de compuestos tales como Al, Si, K, Mn, Fe, que corresponde a elementos no deseados que están presentes en este tratamiento, esto puede ser debido a contaminación de la muestra.

## **2.7 Caracterización por medio de Termogravimetría (TGA).**

Como se muestra en la Figura 8, los MWCNTs funcionalizados en los tratamientos 1 y 2 y nanotubos prístinos, tienen una pérdida inicial de peso a 200 °C, la cual es atribuida a la remoción del agua fisisorbida. La segunda pérdida del 4% para los tratamientos 1 y 2 y del 14% para los prístinos se observa hasta los 500 °C, lo cual puede ser atribuido a la oxidación del carbono amorfo conteniendo nanotubos con defectos en su estructura (Misra, Tyagi, Singh, & Misra, 2006). Esta pérdida es pequeña sugiriendo que la cantidad con estructuras desordenadas es relativamente baja. Se puede observar que la funcionalización en el tercer tratamiento comenzó a descomponerse más

temprano que las otras dos metodologías utilizadas para oxidar nanotubos, esto puede indicar cierta ineficiencia en la adsorción de grupos químicos en los MWCNTs.

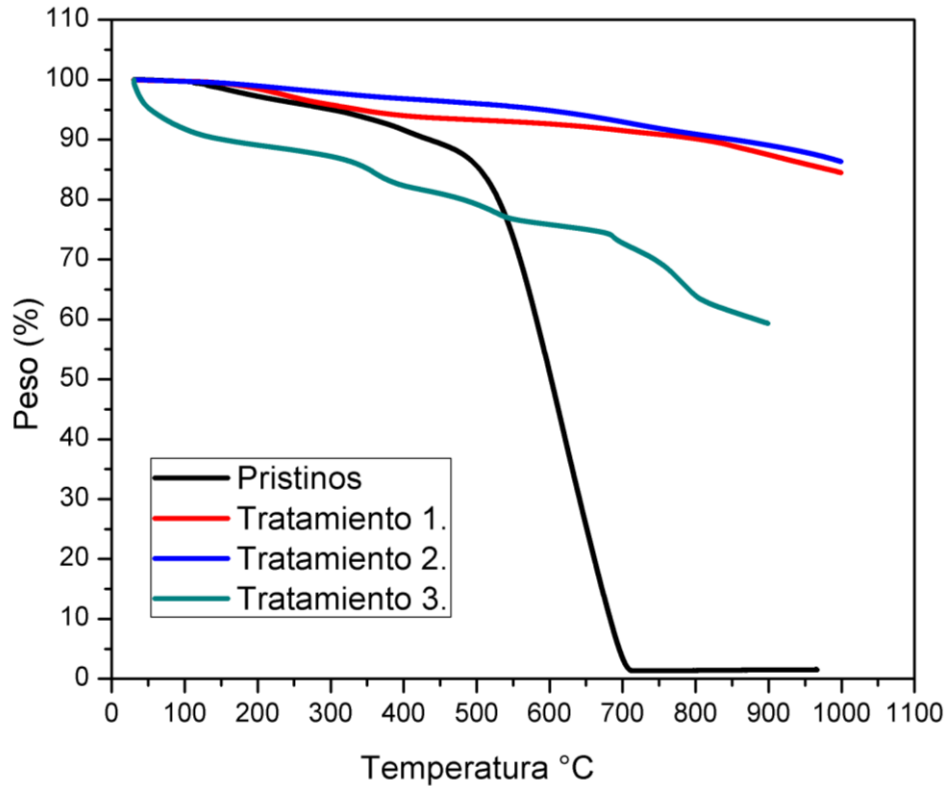


Figura 8. TGA obtenidos para MWCNT prístinos y funcionalizados.

Se concluye que el tratamiento 1, luego de la caracterización por medio de las técnicas de SEM, TGA y FTIR, fue el método más efectivo presentando cambios estructurales, atribuidos a la inclusión de un grupo funcional a las paredes de MWCNTs sin causar una ruptura en ellas, para así, ser utilizado en la mezcla polimérica.

## 2.8 Análisis de la superficie de la aleación ti6al4v.

La probeta utilizada como sustrato para los recubrimientos por medio de la técnica de Spin coating, tuvo que ser tratada por medio de la solución de decapado con el fin de eliminar impurezas adquiridas luego del lijado mecánico y posiblemente en su proceso de corte y transporte.

En la Figura 9 se observa la micrografía SEM-EDS, de la probeta después de ser decapada, en la que se evidencia las fases presentes en la aleación de Ti6Al4V siendo estas, la fase alfa  $\alpha$  y la fase  $\beta$ . El aluminio tiende a estabilizar la fase  $\alpha$ , que es el aumento en la temperatura de transformación de la fase  $\alpha$ - $\beta$  y el vanadio estabiliza la fase  $\beta$  bajando la temperatura de la transformación de  $\alpha$  a  $\beta$ . Se puede apreciar que la aleación de Ti6Al4V posee una matriz  $\beta$  contenida en  $\alpha$ , donde las partes oscuras pertenecen a la estructura  $\beta$  y las partes claras a la estructura  $\alpha$ . Igualmente se observa los granos con forma alargada, debido al ataque con la solución de decapado. En el análisis EDS se obtuvo los porcentajes en peso de la aleación comprobando sus valores por medio de la norma ASTM F- 136 (Centres., 2017).

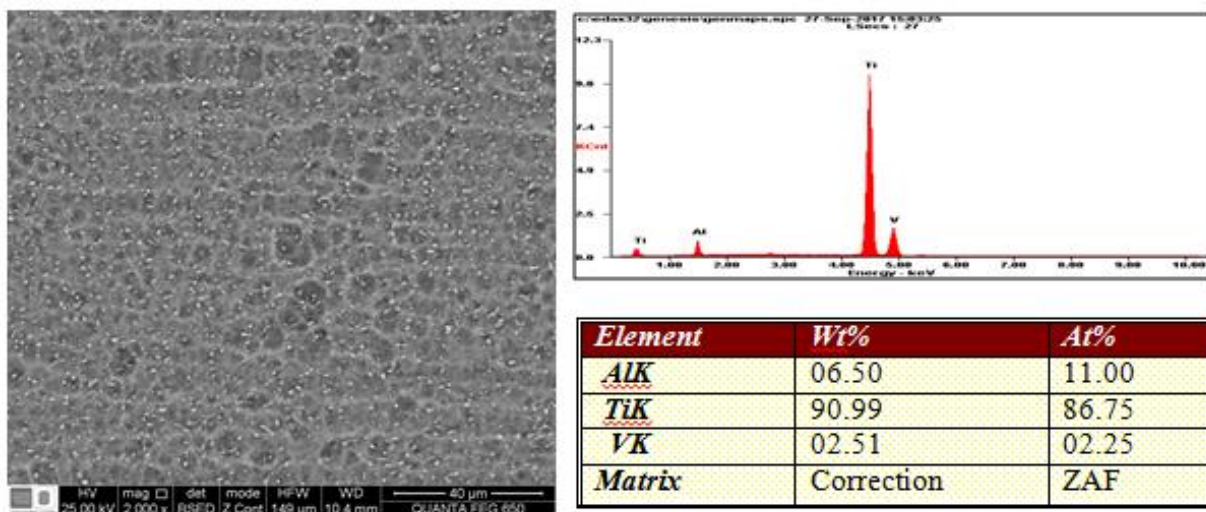


Figura 9. Micrografía SEM-EDS de Ti6Al4V después de decapado

## 2.9 Caracterización de los recubrimientos PCL, quitosano, PCL- quitosano y pcl- quitosano-MWCNTS.

Cada una de las morfologías superficiales de los recubrimientos de PCL, quitosano y PCL-quitosano, fueron estudiadas por medio de la técnica SEM. En las imágenes de menor aumento (Figura 10a, Figura 10b y Figura 10c) se puede observar que los recubrimientos realizados logran cubrir la totalidad de la superficie de la aleación en los tres casos a las mismas condiciones.

No obstante, el recubrimiento realizado con PCL al 0,3 %p/v sobre la aleación de Ti6Al4V, presentó un grosor de recubrimiento inferior al de quitosano, evidenciando las raspaduras originadas por el desbaste mecánico al que fue sometida la superficie de la aleación, adicionalmente presentó puntos en el recubrimiento atribuido a imperfecciones en la superficie, lo que afirma un recubrimiento delgado a esta concentración de PCL, sin embargo, en comparación a lo realizado por Herrera Paola *et al*, quienes reportaron recubrimientos de PCL al 2,5 %p/v, consiguieron una película polimérica completamente homogénea, aunque, a pesar de obtener homogeneidad en el recubrimiento se presentaron defectos en el pulido de la misma manera que al 0,3 %p/v pero utilizando una mayor concentración (Herrera Ardila, López Lozada, Peña Ballesteros, & Montañez Supelano, 2018). Se puede deducir que la utilización de este polímero para recubrimientos tendría que ser en un mayor porcentaje para tener una capa homogénea y más gruesa.

En la Figura 10b, se observa el recubrimiento de quitosano al 1 %p/v de forma más homogénea y gruesa, ya que se refleja de manera tenue el pulido mecánico a diferencia del recubrimiento de PCL. Esto, se puede deber a que la solución del quitosano es más densa que la de la de la PCL. En la figura 10c el recubrimiento de PCL- quitosano, es más uniforme que los dos anteriores, sin

presentar líneas del desbaste, infiriendo que el recubrimiento es más grueso y que la mezcla de estos dos polímeros crea una solución homogénea, formando capas homogéneas y poco porosas que siguen la morfología del sustrato, actuando como inhibidores de la corrosión (Quintero Jaime et al., 2013).

Lo anterior se afirma con micrografías a mayor aumento (ver Anexo D) las cuales indican la homogeneidad del recubrimiento por parte de la solución de quitosano y PCL- quitosano, donde se evidencias pequeñas rugosidades que son atribuidos a partículas de quitosano que no se disolvieron en la solución.

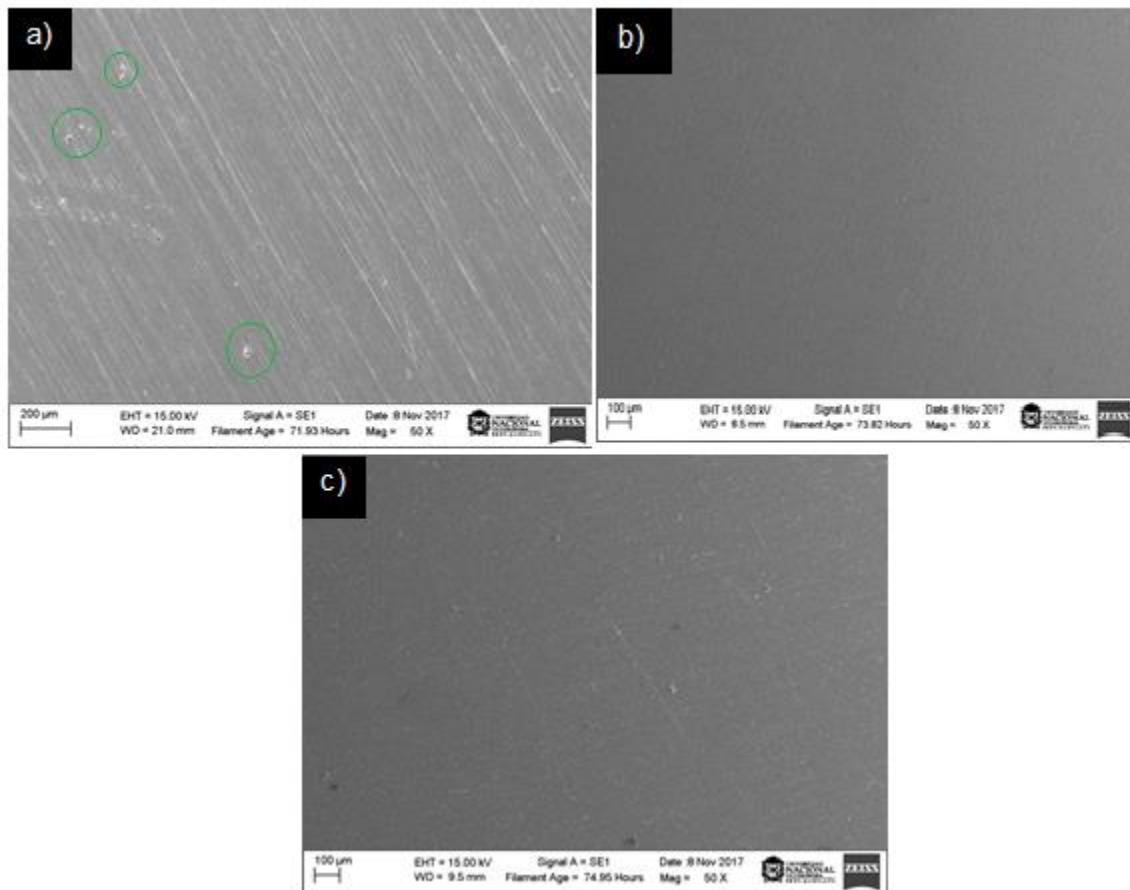


Figura 10. Micrografías SEM tomadas a 50X, a) PCL b) Quitosano c) PCL- Quitosano.

Las imágenes de las micrografías a un aumento de 5000X de los recubrimientos se presentan en las Figuras 11 a), b) y c) para las tres concentraciones de MWCNTs (0,5, 1 y 1,5) mg/ml respectivamente. En la Figura 11a se observa la micrografía de la mezcla de PCL- quitosano-MWCNTs, en la que se puede observar nanotubos de carbono sobre la superficie del sustrato de manera no uniforme, formándose aglomerados de nanotubos en algunas regiones de la aleación de Ti6Al4V inmersos en la matriz polimérica. Esto se puede presentar por la falta de funcionalización de MWCNTs, ya que esto contribuye a su dispersión en la solución o a la falta de MWCNTs presentes en la solución polimérica. En las regiones en las que quedaron depositados se puede observar una mejora en el recubrimiento del biomaterial. En las regiones donde no se presentan nanotubos de carbono se afirma la homogeneidad del recubrimiento polimérico.

En la figura 11b se observa que el recubrimiento permite consolidar una capa continua de polímeros y MWCNTs, densa y homogénea sobre el sustrato, mejorando la biocompatibilidad y su estabilidad en el entorno biológico como lo reporta la literatura. Se observa que en la matriz polimérica se encuentra una cantidad importante de MWCNTs cubriendo gran parte del sustrato, obteniéndose así un porcentaje ideal de MWCNTs en la solución polimérica, en comparación a una distribución uniforme de poliestireno (PS) o polimetilmetacrilato (PMMA), el porcentaje en peso de NTC debe ser inferior al 1%, ya que al aumentar este porcentaje incrementa el número de inconvenientes con respecto a sus ventajas (Corrales, Catalina, & Peinado C, 2002).

En la Figura 11c, se observa la no uniformidad de MWCNTs sobre la superficie del sustrato, debido a que como los MWCNTs presentan aglomerados como se representa en los círculos, lo cual es un reto lograr una dispersión eficaz en cuanto se aumenta su concentración. Esto se debe a que la transferencia de carga de la matriz polimérica a los MWCNT-f está condicionada por la

unión interfacial, por la estructura molecular del polímero y su capacidad de formar hélices ordenadas alrededor del nanotubo individual (Pascual Bolufer, 2009).

En el Anexo E, se encuentran la micrografías a mayor aumento a las distintas concentraciones de MWCNTs (0,5, 1 y 1,5) mg/ml respectivamente, que demuestran la formación de aglomerados sobre la superficie del sustrato, describiendo una dispersión no uniforme de MWCNTs a diferencia de la concentración de 1 %p/v, que presenta mayor dispersión dicho anteriormente, aunque se puede notar aglomerados de menor tamaño con respecto a las dos concentraciones anteriores.

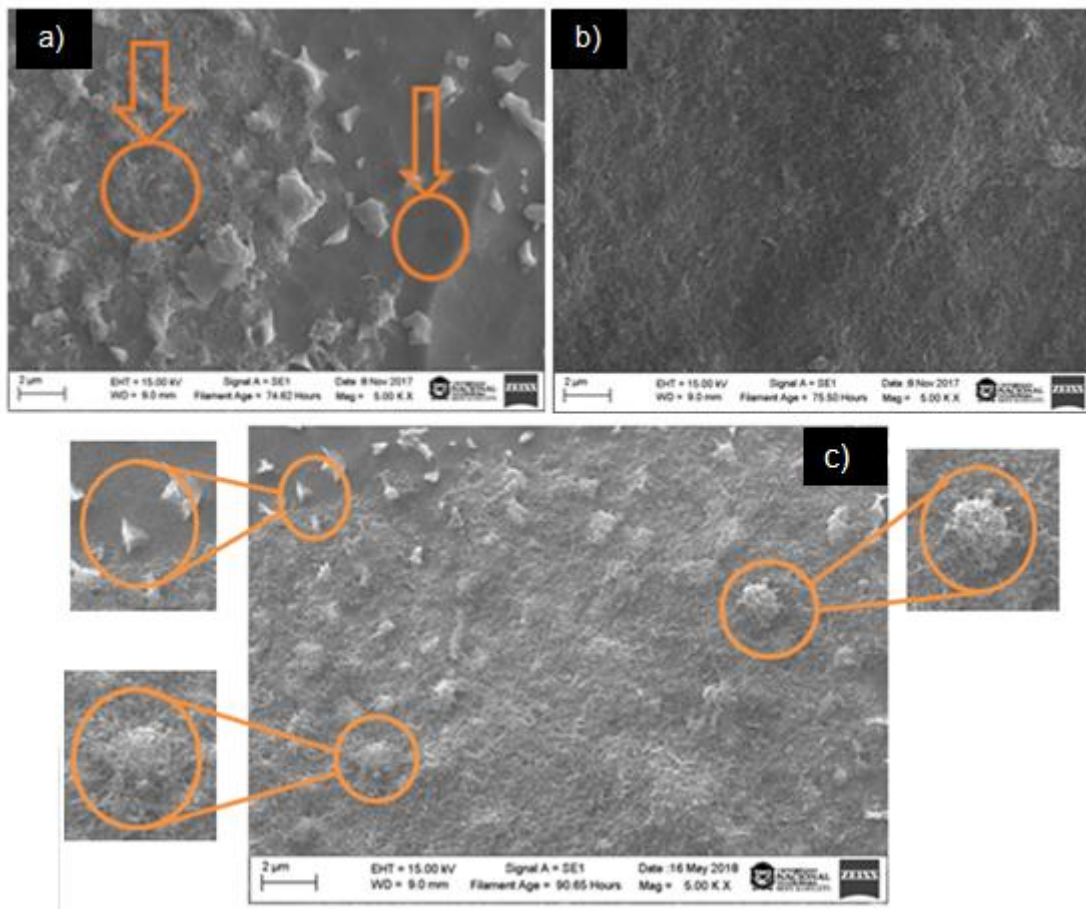


Figura 11. Micrografías tomadas a 5000X de recubrimientos obtenidos a concentraciones de MWCNTs de a) 0,5 mg/ml, b) 1 mg/ml, c) 1,5 mg/ml.

## 2.10 Análisis de citotoxicidad mediante reducción MTT.

Con el fin de evaluar la citotoxicidad de los recubrimientos de PCL, quitosano y MWCNT-f -PCL-quitosano, se evaluaron muestras por triplicado de cada uno de los polímeros y para cada una de las diferentes proporciones de MWCNT-f sobre la probeta de Ti6Al4V igualmente por triplicado. El estudio se realizó de acuerdo a la norma ISO 10993-5 (Estudio de citotoxicidad en materiales de uso biomédico), la cual establece que un material no es citotóxico siempre que su viabilidad celular sea mayor al 70%. Para el análisis de estos datos se utilizó la herramienta R project versión 3.4.2 el cual ayudó a realizar un análisis de varianza ANOVA con  $p < 0,05$  y análisis Tukey, el cual corrige la tasa de error del experimento empleando una distribución llamada *studentized range distribution* en lugar de la distribución-t (Team, 2017). En la Figura 12 se muestran los recubrimientos aplicados sobre la aleación de Ti6Al4V los cuales no presentaron diferencia significativa en ninguno de los recubrimientos obtenidos.

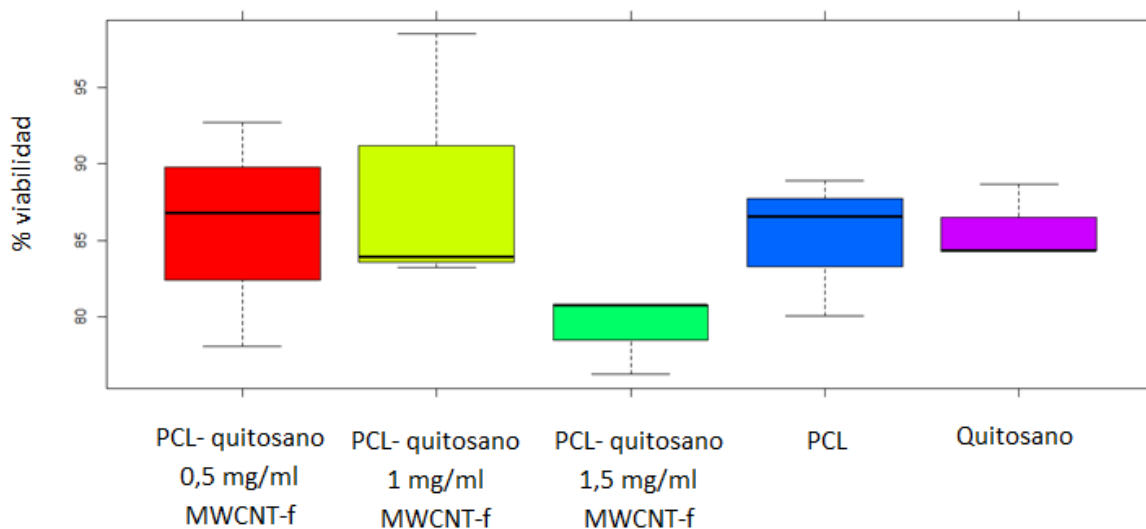


Figura 12. ANOVA de dos vías con  $p < 0,05$  y análisis de Tukey para recubrimientos sobre Ti6Al4V a diferentes proporciones de MWCNT-f

La viabilidad de los recubrimientos fue mayor al 70%, por lo que se puede decir que el biomaterial con los recubrimientos poliméricos y reforzado con MWCNT-f no es citotóxico. Se evidencia que el recubrimiento de PCL-quitosano-MWCNTs con concentración 1mg/ml reporta un mayor porcentaje de viabilidad celular del 98% haciendo este recubrimiento el más atractivo para su aplicación y reafirmado por las pruebas SEM y Raman. En los Anexos F-J se presentan las comparaciones de los recubrimientos con cada una de las tres diluciones utilizadas, obteniendo una viabilidad celular por encima del 70% en cada una de estas diluciones para cada recubrimiento indicando que no presenta citotoxicidad cada recubrimiento de PCL, quitosano y PCL-quitosano-MWCNT-f con cada una de las concentraciones de MWCNT-f.

### **3. Conclusiones**

Se evaluaron tres tratamientos ácidos a distintas condiciones de temperatura y concentración, sobre nanotubos de carbono multipared, identificando los cambios en las intensidades de las bandas, las temperaturas de degradación y su morfología. El tratamiento 1 fue el de mayor grado de funcionalización y el que menor daño estructural tuvo, ratificado por los tres análisis, espectroscopia (Raman), microscopía (SEM) y termogravimetría (TGA).

La presencia de MWCNT-f con concentración de 1 mg/ml presentó mayor dispersión en la solución polimérica formando aglomeraciones de menor tamaño con respecto a las concentraciones de 0,5 y 1,5 mg/ml, infiriendo que a esta concentración se obtiene una mejora

significativa de la superficie del material ya que mejora las propiedades eléctricas y mecánicas del biomaterial, dando como resultado una mayor adhesión celular.

La respuesta de la técnica de reducción del MTT indica que los recubrimientos a las diferentes concentraciones de MWCNT-f no presentan citotoxicidad aparente, obteniendo que el recubrimiento de PCL-quitosano-MWCNT-f de concentración 1mg/ml fue el mejor dado posiblemente por la dispersión de MWCNTs en el refuerzo de la matriz polimérica, indicando que los recubrimientos poseen características sobresalientes para su uso potencial en aplicaciones biomédicas.

#### **4. Recomendaciones**

Emplear más tratamientos oxidación química con el fin de minimizar tiempo y mejorar el grado de funcionalización con el fin de obtener mayor cantidad de grupos funcionales a las paredes de los MWCNTs como por ejemplo el uso de peróxido de hidrogeno.

Incrementar el número de capas en los recubrimientos con un mayor tiempo de secado entre capas para lograr obtener un recubrimiento con una capa más gruesa y así garantizar una mejora en la superficie del material.

Evaluar en las mismas condiciones del presente trabajo pruebas de adherencia y compararlas con las recomendaciones anteriormente mencionadas.

### Referencias Bibliográficas

- Abujeta García, J. L., de Larramendi Martínez, H. C., Muñoz Lejarazu, D., Lasarte Gastaminza, G., & Lejarazu Muñoz, D. (2004). Reacciones alérgicas/inmunológicas a materiales empleados en Cirugía Ortopédica y Traumatología. I. Materiales internos. *Cirugía Ortopédica Y Traumatología. I. Materiales Internos Patología Del Aparato Locomotor*, 2(22), 114–125.
- Andrade Guel, M. L., López López, L. I., & Sáenz Galindo, A. (2012). Nanotubos de carbono: Funcionalización y aplicaciones biológicas. *Revista Mexicana de Ciencias Farmaceuticas*, 43(3), 9–18.
- Boyer, I., C.Albano, & Navarro, C. (2010). Caracterizacion De Nanotubos De Carbonorecubiertos Con Nanohidroxiapatita. *Acta Microscopica*, 19(2), 3–4.
- Bronzino, J. (1999). Biomedical engineering handbook.
- Cárdenas, S. A. O., HERNÁNDEZ, J. H. M., & PEREA, E. F. T. (2011). *PREPARACIÓN Y CARACTERIZACIÓN FÍSICO-QUÍMICA Y TÉRMICA DE MEZCLAS BINARIAS DE POLICAPROLACTONA (PCL) Y RESINA DE MOPA-MOPA (elaeagia pastoensis mora)*.
- Cárdenas Otero, A. S., Mina Hernandez, J. H., & Toro Perea, E. F. (2011). *PREPARACIÓN Y CARACTERIZACIÓN FÍSICO-QUÍMICA Y TÉRMICA DE MEZCLAS BINARIAS DE POLICAPROLACTONA (PCL) Y RESINA DE MOPA-MOPA (elaeagia pastoensis mora)*. universidad del valle. Retrieved from <http://bibliotecadigital.univalle.edu.co/bitstream/10893/4130/4/CB-0441162.pdf>
- Centres., S. M. (2017). *Ti-6Al-4V (Grade 5) Technical datasheet*. Retrieved from <https://www.smithmetal.com/pdf/titanium/ti-6al-4v-grade-5.pdf>
- Corrales, T., Catalina, F., & Peinado C. (2002). Aditivos basados en nanopartículas. *Revista de Plásticos Modernos*, 84, 269–278. Retrieved from <http://europa.sim.ucm.es/compludoc/AA?articuloId=178751>

- De Volder, M. F. L., Tawfick, S. H., Baughman, R. H., & Hart, A. J. (2013). Carbon nanotubes: Present and future commercial applications. *Science*, 339(6119), 535–539. <https://doi.org/10.1126/science.1222453>
- Fernández, A. O., & Hernández Sánchez, F. (2011). *Obtención y Caracterización de Andamios Porosos Nanoreforzados, para su posible uso en la Regeneración de Tejido Óseo*. Yucatan.
- Firme, C. P., & Bandaru, P. R. (2010). Toxicity issues in the application of carbon nanotubes to biological systems. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, 6(2), 245–256. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2009.07.003>
- Flahaut, E., Laurent, C., & Peigney, A. (2005). Catalytic CVD synthesis of double and triple-walled carbon nanotubes by the control of the catalyst preparation. *Carbon*, 43(2), 375–383. <https://doi.org/10.1016/j.carbon.2004.09.021>
- García Rueda, F. C., Peña Ballesteros, D. Y., & Estupiñán Durán, H. A. (2017). Comportamiento morfológico y electroquímico de un recubrimiento Dip Coating policaprolactona-quitosano-colágeno sobre Ti6Al4V. *Revista Mexicana de Ingeniería Biomedica*, 38(1), 54–75. <https://doi.org/10.17488/RMIB.38.1.4>
- Gómez Rodríguez, L. S., Quintero Jaime, A. F., Peña Ballesteros, D. Y., & Estupiñán Durán, H. A. (2014). Obtención, caracterización y evaluación in vitro de recubrimientos de policaprolactona-quitosano sobre la aleación Ti6Al4V tratada químicamente. *Revista de Metalurgia*, 50(3), e021. <https://doi.org/10.3989/revmetalm.021>
- Haduch, Z., & Hernández, M. (2007). *BIOMATERIALES: Características y aplicaciones – Biomedica y Clínica*.
- Herrera Ardila, P. A., López Lozada, M. J., Peña Ballesteros, D. Y., & Montañez Supelano, N. D. (2018). *OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE RECUBRIMIENTOS DE POLICAPROLACTONA FUNCIONALIZADA CON NANOTUBOS DE CARBONO MULTIPARED PARA APLICACIONES BIOMÉDICAS*.
- Kathyayini, H., Willems, I., Fonseca, A., Nagy, J. B., & Nagaraju, N. (2006). Catalytic materials based on aluminium hydroxide, for the large scale production of bundles of multi-walled (MWNT) carbon nanotubes. *Catalysis Communications*, 7(3), 140–147. <https://doi.org/10.1016/j.catcom.2005.05.010>

Ladeiro, A. D., Coterillo Casado, C., & Téllez Ariso, C. (2011). SÍNTESIS DE MEMBRANAS POLIMÉRICAS CON SPIN COATER RESUMEN, 37.

Liu, X., Chu, P. K., & Ding, C. (2010). Surface nano-functionalization of biomaterials. In *Materials Science and Engineering R: Reports* (Vol. 70, pp. 275–302). <https://doi.org/10.1016/j.mser.2010.06.013>

Lizarbe, M. A. (2007). Sustitutivos De Tejidos: De Los Biomateriales a La Ingeniería Tisular. *Cienc.Exact.Fís.Nat. (Esp)*, 101(1), 227–249.

Martínez, C. H., & Moreno, F. (1987). Fundamentos en Biomateriales de uso Odontológico aplicaciones en Estética y Cosmética Dental: Biocompatibilidad. *Acta Odontologica Venezolana*, 49, 1–5.

Misra, A., Tyagi, P. K., Singh, M. K., & Misra, D. S. (2006). FTIR studies of nitrogen doped carbon nanotubes. *Diamond and Related Materials*, 15(2–3), 385–388. <https://doi.org/10.1016/j.diamond.2005.08.013>

Montañez Supelano, N. D. (2017). *Propuesta de tesis doctoral. Escuela de ingeniería metalúrgica y ciencia de los materiales.*

Montes Fonseca, S. L., Orrantia Borunda, E., & Sánchez Ramírez, B. E. (2014). Citotoxicidad de Nanotubos de Carbono Funcionalizados con Proteínas de Superficie de Entamoeba histolytica. *Cimav.repositorioinstitucional.mx*, 70.

Neves, S. C., Moreira Teixeira, L. S., Moroni, L., Reis, R. L., Van Blitterswijk, C. A., Alves, N. M., ... Mano, J. F. (2011). Chitosan/Poly( $\epsilon$ -caprolactone) blend scaffolds for cartilage repair. *Biomaterials*, 32(4), 1068–1079. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2010.09.073>

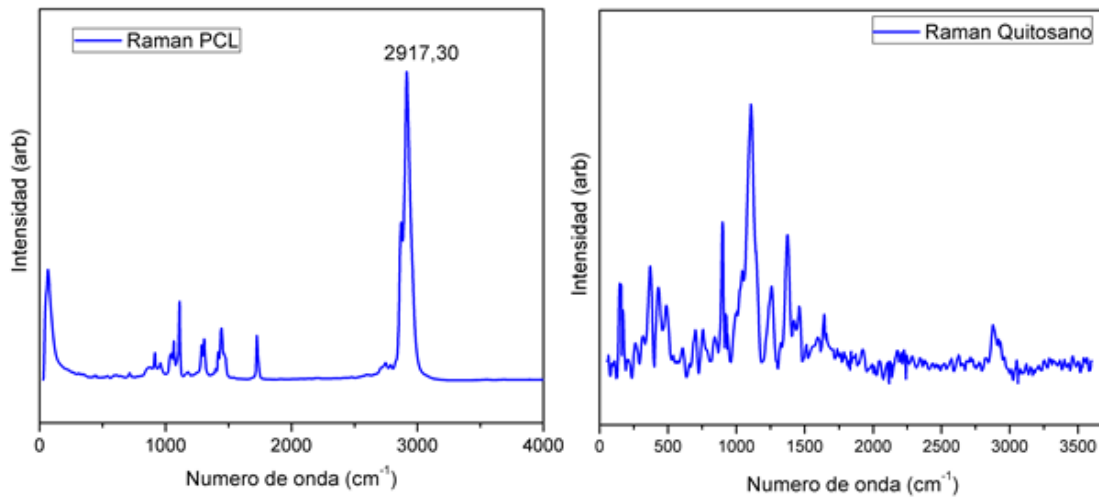
OPTI, F., & Fenin. (2004). El futuro de los biomateriales en el sector sanitario en los próximos 15 años. *OPTI*, 1–3.

Osorio, A. G., Silveira, I. C. L., Bueno, V. L., & Bergmann, C. P. (2008). H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/HNO<sub>3</sub>/HCl-Functionalization and its effect on dispersion of carbon nanotubes in aqueous media. *Applied Surface Science*, 255(5 PART 1), 2485–2489. <https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2008.07.144>

- Pascual Bolufer. (2009). Polímeros con nanotubos. Retrieved May 1, 2018, from <https://www.interempresas.net/Plastico/Articulos/32526-Polimeros-con-nanotubos.html>
- Quintero Jaime, A. F., Peña Ballesteros, D. Y., & Estupinan Duran, H. A. (2013). *OBTENCIÓN Y EVALUACIÓN DE SUPERFICIES DE POLICAPROLACTONA- QUITOSANO PATRONADAS POR ABLACIÓN LÁSER*.
- Sajid, M. I., Jamshaid, U., Jamshaid, T., Zafar, N., Fessi, H., & Elaissari, A. (2016). Carbon nanotubes from synthesis to in vivo biomedical applications. *International Journal of Pharmaceutics*, 501(1–2), 278–299. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2016.01.064>
- Sarasam, A., & Madihally, S. V. (2005). Characterization of chitosan-polycaprolactone blends for tissue engineering applications. *Biomaterials*, 26(27), 5500–5508. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2005.01.071>
- Sinnott, S. B., & Andrews, R. (2001). Carbon Nanotubes: Synthesis, Properties, and Applications. *Critical Reviews in Solid State and Materials Sciences*, 26(3), 145–249. <https://doi.org/10.1080/20014091104189>
- Smajda, R., Kukovecz, Á., Kónya, Z., & Kiricsi, I. (2007). Structure and gas permeability of multi-wall carbon nanotube buckypapers. *Carbon*, 45(6), 1176–1184. <https://doi.org/10.1016/j.carbon.2007.02.022>
- Speight, J. G. (1999). Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry. *Petroleum Science and Technology*, 17(3–4), 445–445. <https://doi.org/10.1080/10916469908949727>
- Team, R. C. (2017). R: A Language and Environment for Statistical Computing. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing. Retrieved from <https://www.r-project.org>

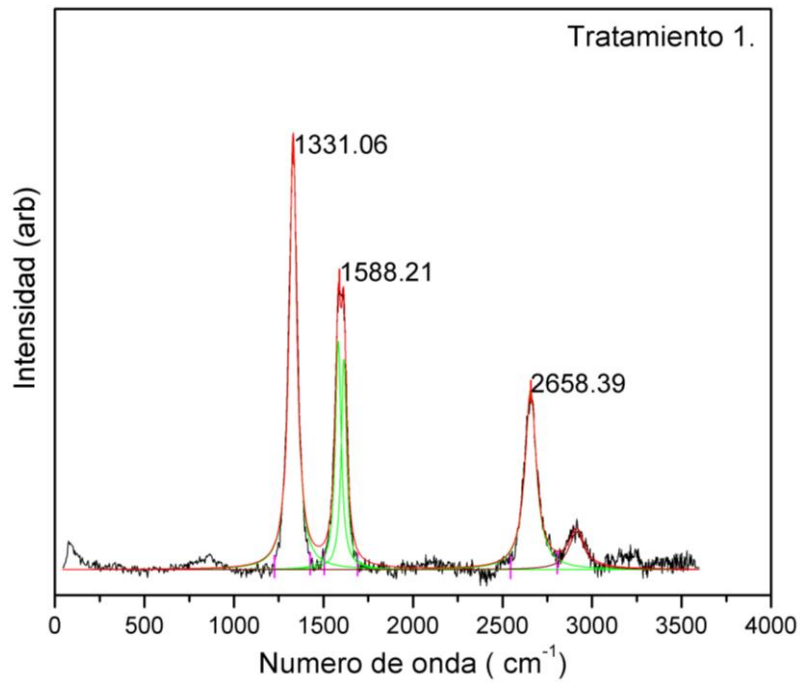
## Apéndices

### Apéndice A. Espectros RAMAN para los polímeros PCL y quitosano.

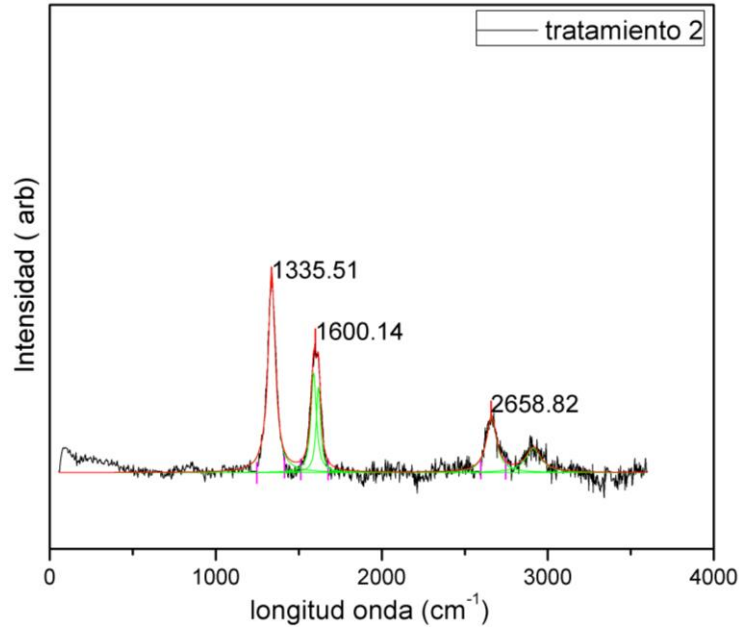


**Apéndice B. Espectros Raman para los tratamientos ácidos.**

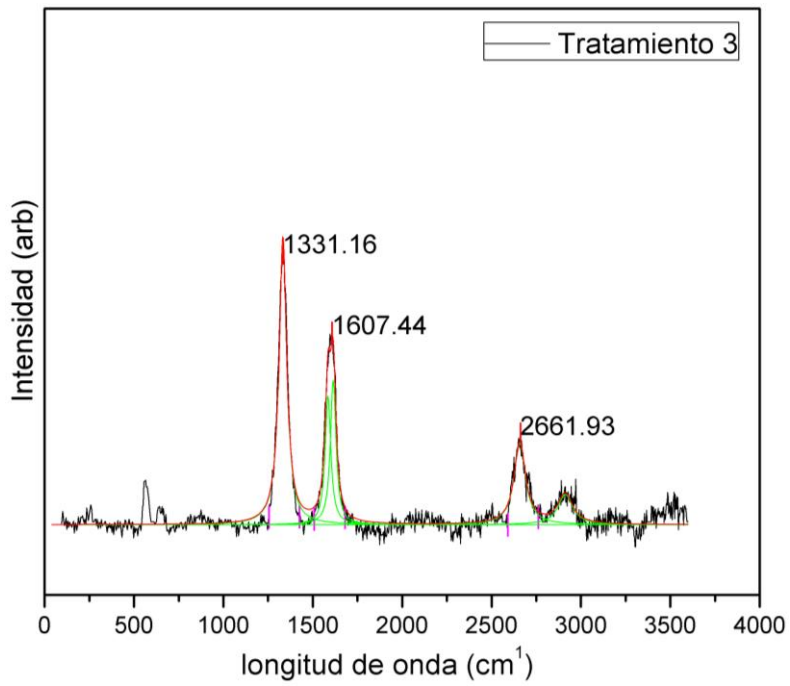
B1. Espectro Raman tratamiento 1 MWCNTs.



B2. Espectro Raman para tratamiento 2 de MWCNTs.

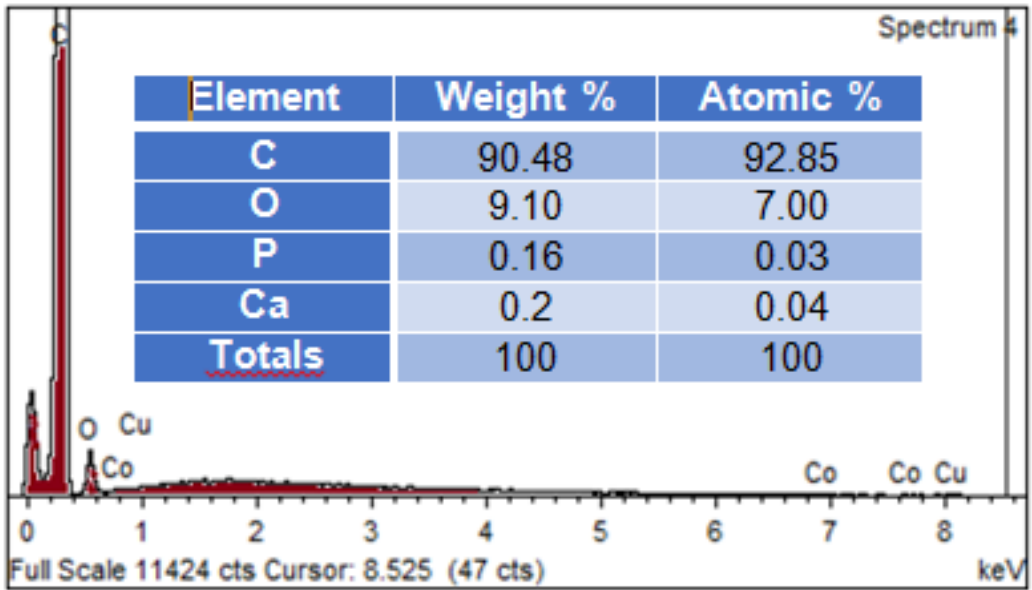


B3. Espectro Raman para el tratamiento 3 de MWCNTs.

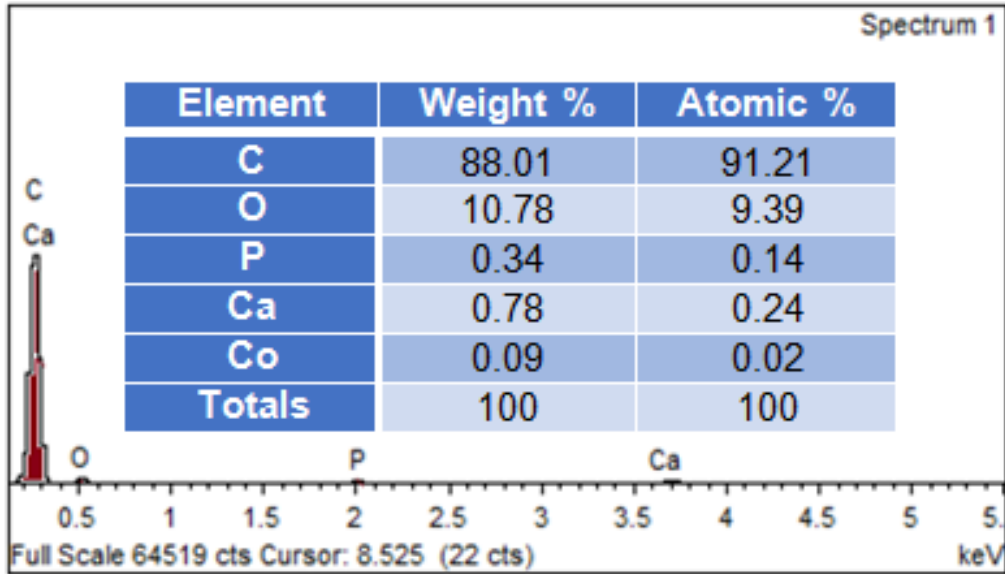


Apéndice C. Análisis EDS a MWCNTs.

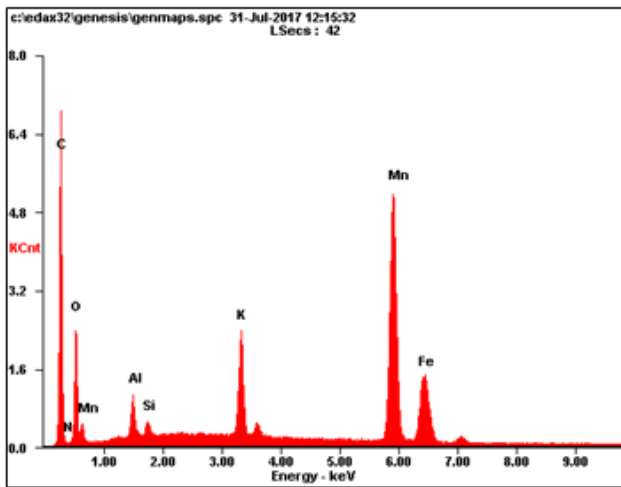
A. Tratamiento 1.



B. Tratamiento 2.

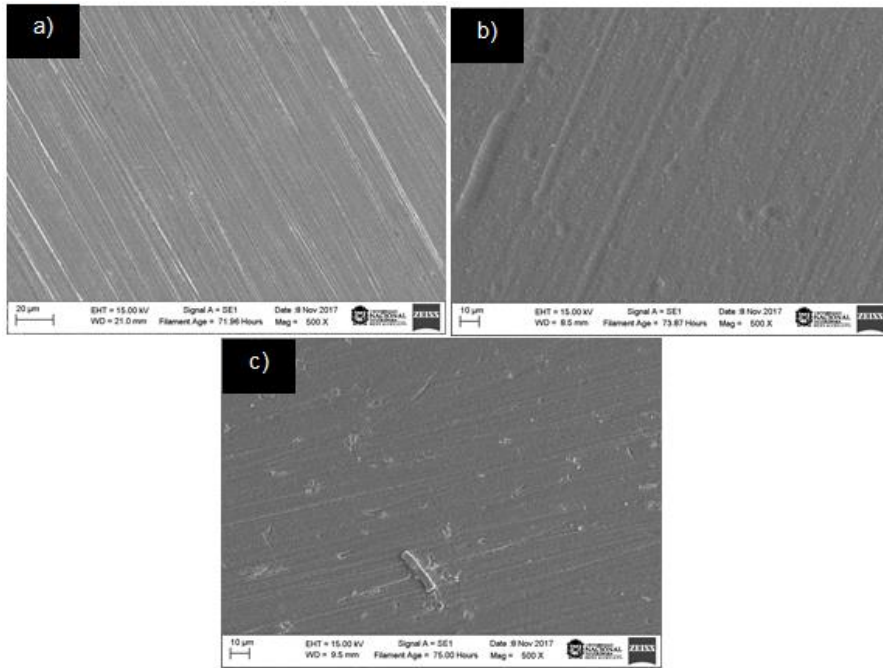


C. Tratamiento 3.

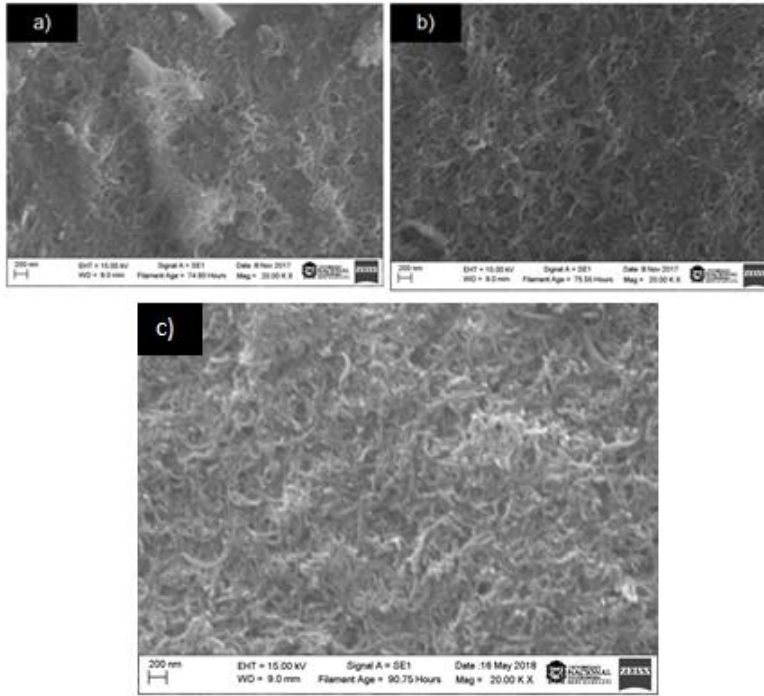


Element	Weight %	Atomic %
C	36.12	63.30
N	00.61	00.92
O	10.59	13.93
Al	01.79	01.40
Si	00.56	00.42
K	05.22	02.81
Mn	35.80	13.72
Fe	09.31	03.51
<b>Totals</b>	<b>100</b>	<b>100</b>

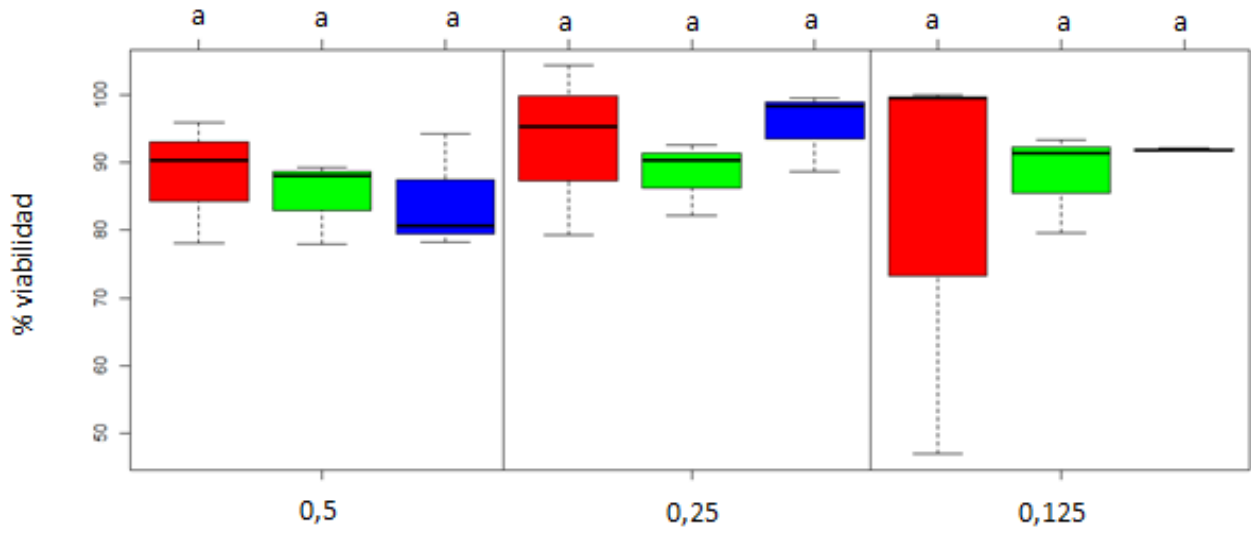
Apéndice D. Micrografías SEM tomadas a 500X, PCL a), Quitosano b), PCL- Quitosano c).



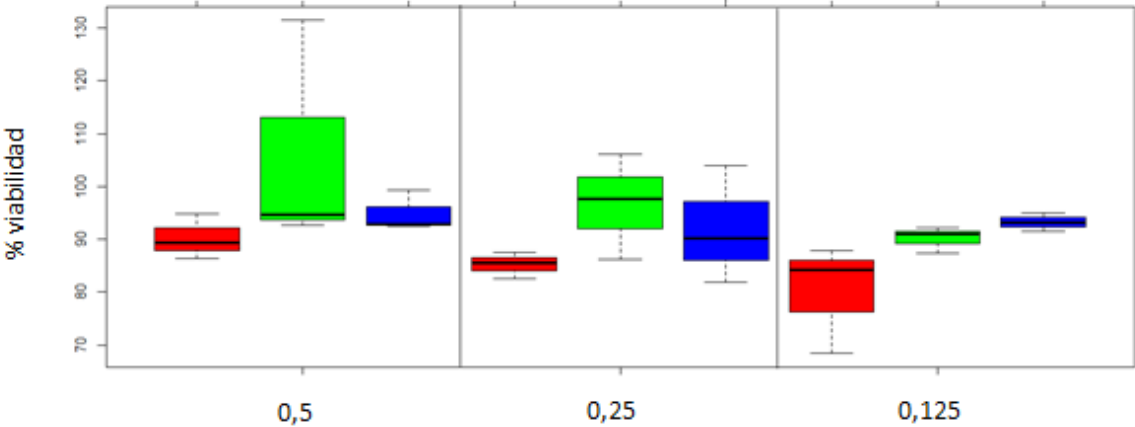
Apéndice E.. Micrograffías SEM tomadas a 20 K, PCL a), recubrimiento 0,5 mg/ml b),  
recubrimiento 1 mg/ml c) recubrimiento 1,5 mg/ml



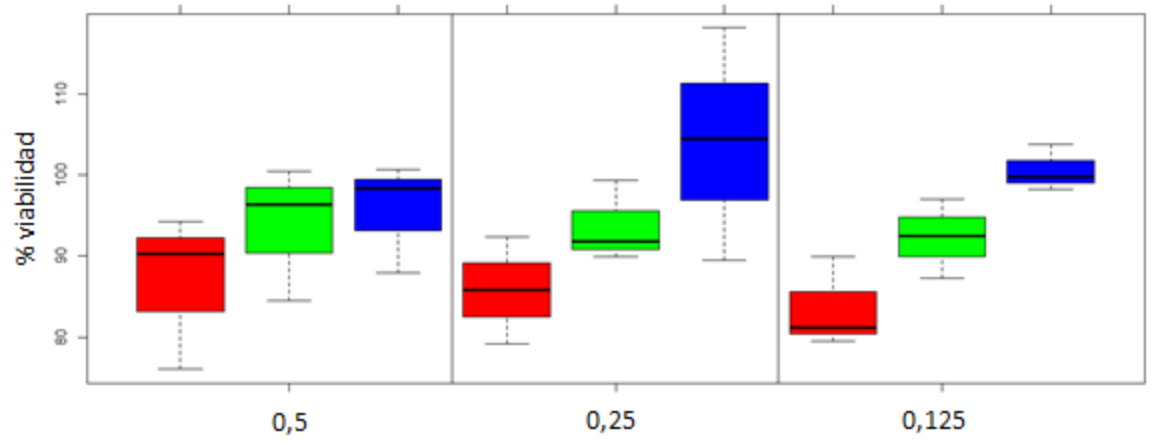
Apéndice F. ANOVA de dos vías con  $p < 0.05$  y análisis de tukey para recubrimiento PCL-  
quitosano- 0.5 mg/ml MWCNT-f



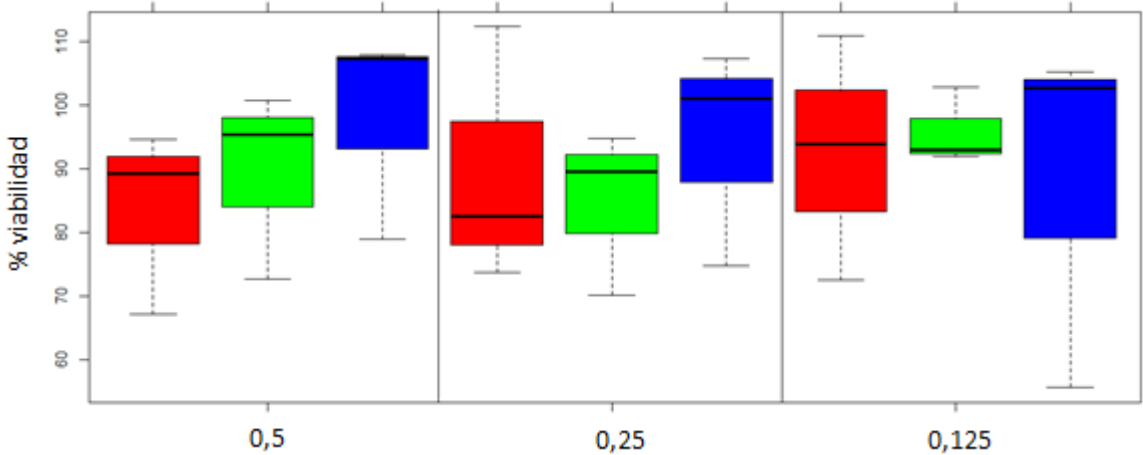
Apéndice G. ANOVA de dos vías con  $p < 0.05$  y análisis de tukey para recubrimiento PCL-  
quitosano- 1 mg/ml MWCNT-f .



Apéndice H. ANOVA de dos vías con  $p < 0.05$  y análisis de tukey para recubrimiento PCL-  
quitosano- 1,5 mg/ml MWCNT-f .



Apéndice I. ANOVA de dos vías con  $p < 0.05$  y análisis de tukey para recubrimiento PCL



Apéndice J. ANOVA de dos vías con  $p < 0.05$  y análisis de tukey para recubrimiento PCL

