



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIA E INGENIERÍA DE MATERIALES

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN MATERIALES

***“SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE HIDROGELES HÍBRIDOS
NANOCOMPUESTOS”***

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

DOCTORA EN CIENCIA E INGENIERÍA DE MATERIALES

PRESENTA:

M.C.I. ITZEL MARISOL GARNICA PALAFOX

TUTOR PRINCIPAL:

DR. FRANCISCO MANUEL SÁNCHEZ ARÉVALO
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN MATERIALES (IIM, UNAM)

COMITÉ TUTOR:

DRA. LAURA OROPEZA RAMOS
FACULTAD DE INGENIERÍA, UNAM

DR. JUAN A. HERNÁNDEZ CORDERO
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN MATERIALES (IIM, UNAM)

CIUDAD UNIVERSITARIA, CDMX., AGOSTO DE 2019



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

*“Cal no abandonar mai
ní la tasca ní l’esperança”*

Pompeu Fabra

JURADO ASIGNADO

Presidente: Dr. Mathieu Christian Anne Hautefeuille
(Facultad de Ciencias, UNAM)

Secretario: Dr. Genaro Vázquez Victorio
(Facultad de Ciencias, UNAM)

1^{er} Vocal: Dr. Francisco Manuel Sánchez Arévalo
(Instituto de Investigaciones en Materiales, UNAM)

2^{do} Vocal: Dr. Filiberto Rivera Torres
(Facultad de Química, UNAM)

3^{er} Vocal: Dr. Agileo Hernández Gordillo
(Instituto de Investigaciones en Materiales, UNAM)

Lugar o lugares en donde se realizó la tesis:

Instituto de Investigaciones en Materiales (IIM, UNAM)

Laboratorio de Inmunoterapia e Ingeniería de Tejidos (Fac. de Medicina, UNAM)

DIRECTOR DE TESIS

Dr. Francisco Manuel Sánchez Arévalo

A mi familia, por buscar siempre lo mejor para mí y estar a mi lado en cada decisión y proyecto que he decidido emprender.

Gracias, por impulsarme a cumplir todos mis sueños, por enseñarme que no existen límites y que todo es posible.

Sin su amor, confianza y apoyo incondicional hubiera sido sumamente difícil cumplir este sueño.

Los amo.

RESUMEN

La presente tesis doctoral presenta aportaciones al conocimiento de frontera en tres diferentes áreas. La primera consistió en la obtención de hidrogeles híbridos de quitosano y poli(alcohol vinílico) (CS/PVA) entrecruzados con agentes químicos naturales y sintéticos (genipin y glutaraldehído, respectivamente) y sus nanocompuestos con nanotubos de carbono de pared múltiple (MWCNTs). En este sentido, se logró identificar la influencia que los agentes químicos entrecruzantes y los MWCNTs ejercen sobre las propiedades fisicoquímicas y biológicas de los hidrogeles híbridos. Estos materiales y las propiedades que exhiben son candidatos a satisfacer diversas aplicaciones en áreas tales como la biomedicina, ingeniería de tejidos y remediación ambiental, entre otras.

La segunda contribución consistió en el diseño, la manufactura, la instrumentación, el control y la validación de un probador mecánico para ensayos de tracción biaxial por indentación esférica. Este dispositivo es capaz de registrar datos de tiempo, fuerza y desplazamiento, así como imágenes digitales (desde tres cámaras) de manera simultánea. El conjunto de información recabada se utiliza para evaluar, de una manera precisa, la respuesta macro y micromecánica de membranas elastoméricas sujetas a un estado de esfuerzos de tracción biaxial inducido por indentación esférica. Es importante resaltar que dicho dispositivo junto con el modelo matemático desarrollado, se han convertido en un valioso y robusto instrumento de caracterización mecánica, que anteriormente no existía, para este tipo de materiales en particular. La tercera contribución se centra concretamente en una aplicación biológica de los hidrogeles híbridos y sus nanocompuestos. Se llevaron a cabo los primeros estudios entorno al posible uso de estos hidrogeles como andamios celulares, obteniéndose resultados alentadores que impulsan a seguir explorando la viabilidad de estos materiales en el área de la ingeniería de tejidos.

Los logros obtenidos a lo largo de este trabajo van incluso más allá de las contribuciones mencionadas, pues además, en este trabajo, se vislumbran nuevas ideas que constituyen ya, el punto de partida hacia nuevas líneas de investigación que podrán desarrollarse a partir de los resultados aquí presentados. Todo el esfuerzo y dedicación invertidos en esta tesis resultarán en muchos más frutos científicos y tecnológicos que indudablemente beneficiarán a la UNAM y a nuestro país.

ABSTRACT

This doctoral dissertation contributes to frontier knowledge in three different areas. The first contribution consists on the preparation of hybrid hydrogels made of chitosan and poly (vinyl alcohol) (CS/PVA) chemically cross-linked with natural or synthetic reagents (genipin or glutaraldehyde, respectively), and their nanocomposites filled with multiple-walled carbon nanotubes (MWCNTs). This made possible to identify the influence of the cross-linking reagents and MWCNTs generate on the physicochemical and biological properties of hybrid hydrogels. Such materials and the properties that they exhibited, locate them as candidates to be used for several applications in areas such as biomedicine, tissue engineering and environmental remediation, among others.

The second contribution consists in the design, manufacturing, instrumentation, control and validation of a mechanical tester for biaxial tensile tests by means of a spherical indentation. This device is capable of register data of time, force and displacement as well as digital images (from three camera system) simultaneously. Thus, this collection of information can be used to evaluate, in an accurate way, the macro and micromechanical behavior of free-standing elastomeric membranes under biaxial tension by spherical indentation. It is important to remark that such device along with a mathematical model developed, has become in a valuable and robust mechanical characterization instrument, which did not exist before for this type of materials. The third contribution focuses specifically on a biological application for these hybrid hydrogels and their nanocomposites. The first studies were addressed to use these hydrogels as cellular scaffolds, achieving interesting results that encourage to further exploration of the viability of these materials in the field of tissue engineering.

The achievements accomplished go even beyond of the above contributions; in this work, new ideas were glimpsed and they become in the starting point towards novel research based on the results presented here. All the effort and dedication invested in this work will undoubtedly yield numerous scientific and technological outcomes that will be in the benefit of UNAM and our country.

ÍNDICE GENERAL

JURADO ASIGNADO.....	I
DEDICATORIA.....	II
RESUMEN.....	III
ABSTRACT.....	IV
ÍNDICE DE FIGURAS.....	IX
ÍNDICE DE TABLAS.....	XIV
LISTADO DE SIGLAS Y ACRÓNIMOS.....	XV
LISTADO DE SÍMBOLOS.....	XVII
LETRAS ROMANAS.....	XVII
LETRAS GRIEGAS.....	XVIII
AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES.....	XX
AGRADECIMIENTOS PERSONALES.....	XXII
INTRODUCCIÓN.....	XXV
1 MARCO TEÓRICO Y ESTADO DEL ARTE.....	1
1.1 HIDROGELES.....	1
1.1.1 Clasificación.....	1
1.1.1.1 Por el tipo de entrecruzamiento.....	2
1.1.1.2 Por la naturaleza de los polímeros que conforman la red polimérica.....	3
1.1.1.3 Por el tipo de partículas embebidas en su red polimérica.....	4
1.2 QUITOSANO.....	6
1.3 POLI(ALCOHOL VINÍLICO).....	7
1.4 GLUTARALDEHÍDO.....	9
1.5 GENIPIN.....	10

1.6	NANOTUBOS DE CARBONO	11
1.6.1	Tipos de CNTs	12
1.7	ESTADO DEL ARTE	13
1.7.1	Mezcla CS/PVA	14
1.7.2	Hidrogeles de CS/PVA químicamente entrecruzados.....	16
1.7.3	Hidrogeles de CS/PVA nanocompuestos con MWCNTs	20
1.7.3.1	Efecto opto-mecánico	23
1.8	HIPÓTESIS	25
1.9	OBJETIVOS	25
1.9.1	Objetivo General	25
1.9.2	Objetivos Particulares.....	25
2	METODOLOGÍA Y TÉCNICAS EXPERIMENTALES	27
2.1	SÍNTESIS DE LOS HIDROGELES.....	27
2.1.1	Hidrogeles control (CS/PVA).....	28
2.1.2	Hidrogeles químicamente entrecruzados (CS/PVA/GEN y CS/PVA/GA).....	29
2.1.3	Hidrogeles nanocompuestos (CS/PVA/MWCNTs y CS/PVA/GEN/MWCNTs)	29
2.2	CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA	31
2.2.1	Espectroscopía Infrarroja por Transformada de Fourier (FT-IR).....	32
2.2.2	Difracción de Rayos X (XRD)	32
2.2.3	Análisis térmico	34
2.2.3.1	Análisis Termogravimétrico (TGA)	34
2.2.3.2	Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC)	35
2.2.4	Microscopía de Fuerza Atómica (AFM)	36
2.2.5	Cinética de hinchamiento e hidrofiliidad de superficie	38
2.2.5.1	Pruebas de hinchamiento.....	39
2.2.5.2	Ángulo de Contacto (CA).....	40
2.3	CARACTERIZACIÓN MECÁNICA Y ESTRUCTURAL	42
2.3.1	Tracción uniaxial.....	42
2.3.1.1	Diseño e instrumentación del probador mecánico de tracción uniaxial	43
2.3.1.2	Preparación de las muestras y pruebas de tracción uniaxial.....	44
2.3.2	Tracción biaxial por indentación esférica	46
2.3.2.1	Diseño e instrumentación del probador mecánico	47

2.3.2.2	Preparación de las muestras y pruebas de indentación	47
2.3.3	Parámetros estructurales de la red polimérica	49
2.3.4	Caracterización opto-mecánica	50
2.4	CARACTERIZACIÓN BIOLÓGICA.....	52
2.4.1	Aislamiento y cultivo <i>in vitro</i> de fibroblastos dérmicos humanos.....	52
2.4.2	Formación de constructos	53
2.4.3	Prueba de viabilidad celular	54
2.4.4	Análisis morfológico y conteo celular.....	55
3	SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA.....	58
3.1	SÍNTESIS DE LOS HIDROGELES.....	58
3.2	ESTRUCTURA QUÍMICA DE LA RED POLIMÉRICA.....	59
3.3	ESPECTROSCOPÍA INFRARROJA POR TRANSFORMADA DE FOURIER (FT-IR)	63
3.4	DIFRACCIÓN DE RAYOS X (XRD)	66
3.5	TEMPERATURAS CRÍTICAS Y ESTABILIDAD TÉRMICA	70
3.5.1	Estabilidad Térmica	70
3.5.2	Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC)	73
3.6	HIDROFILICIDAD DE VOLUMEN Y DE SUPERFICIE.....	76
3.6.1	Cinética de Hinchamiento	76
3.6.2	Ángulo de Contacto (CA)	79
3.7	TOPOGRAFÍA Y RUGOSIDAD DE SUPERFICIE	82
4	PROBADOR MECÁNICO PARA ENSAYOS DE TRACCIÓN BIAJAL POR INDENTACIÓN ESFÉRICA	88
4.1	TRACCIÓN BIAJAL POR INDENTACIÓN ESFÉRICA.....	88
4.2	DISEÑO E INSTRUMENTACIÓN DEL PROBADOR MECÁNICO.....	89
4.2.1	Módulo de indentación	91
4.2.2	Módulo de visión	94
4.2.2.1	Módulo de visión estereoscópica	94
4.2.2.2	Módulo de visión lateral o 2D.....	96
4.2.3	Instrumento virtual (VI).....	97
4.3	METODOLOGÍA PARA LA VALIDACIÓN DEL PROBADOR MECÁNICO.....	98
4.3.1	Preparación de las membranas de látex natural.....	98
4.3.2	Caracterización mecánica	99

4.3.2.1	Prueba de tracción uniaxial	99
4.3.2.2	Prueba de tracción biaxial por indentación esférica.....	100
4.4	VALIDACIÓN DEL PROBADOR MECÁNICO PARA ENSAYOS DE TRACCIÓN BIAxIAL Y DESARROLLO DE LA METODOLOGÍA PARA EVALUAR PROPIEDADES MECÁNICAS DE MEMBRANAS.....	101
4.4.1	Respuesta mecánica del NR bajo tracción uniaxial	101
4.4.2	Respuesta macromecánica del NR y desarrollo de las metodologías para evaluar el módulo elástico de las membranas	102
4.4.2.1	Metodología para estimar el módulo elástico mediante el archivo de datos	102
4.4.2.2	Metodología para estimar el módulo elástico a través de la imagen lateral.....	112
4.4.3	Respuesta micromecánica bajo tracción biaxial por indentación esférica.....	116
5	COMPORTAMIENTO MECÁNICO DE LOS HIDROGELES.....	122
5.1	PROPIEDADES MECÁNICAS BAJO TRACCIÓN UNIAXIAL	122
5.2	ESTRUCTURA FÍSICA DE LA RED POLIMÉRICA	127
5.3	PROPIEDADES MECÁNICAS BAJO TRACCIÓN BIAxIAL POR INDENTACIÓN ESFÉRICA	130
5.3.1	Comportamiento macromecánico de los hidrogeles	131
5.3.2	Comportamiento micromecánico de los hidrogeles	134
5.4	COMPORTAMIENTO OPTO-MECÁNICO	136
6	CARACTERIZACIÓN BIOLÓGICA	140
6.1	VIABILIDAD CELULAR	140
6.2	CONTEO CELULAR.....	143
6.3	ANÁLISIS MORFOLÓGICO Y DIMENSIONAL.....	146
6.3.1	Evaluación del tamaño de los fibroblastos	146
6.3.2	Evaluación de la morfología de los fibroblastos	149
7	CONCLUSIONES.....	153
	REFERENCIAS	159
	APÉNDICE A: ARTÍCULOS DERIVADOS DE LA INVESTIGACIÓN	172

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1.1 REPRESENTACIÓN ESQUEMÁTICA DE LA RED POLIMÉRICA DE UN HIDROGEL: A) FÍSICAMENTE ENTRECRUZADO, B) QUÍMICAMENTE ENTRECRUZADO'	2
FIGURA 1.2 REPRESENTACIÓN ESQUEMÁTICA DE LA RED POLIMÉRICA DE UN HIDROGEL NANOCOMPUESTO.	4
FIGURA 1.3 ESTRUCTURA QUÍMICA DEL QUITOSANO PARCIALMENTE DESACETILADO. A LA IZQUIERDA SE ENCUENTRA LA UNIDAD N-ACETIL GLUCOSAMINA Y A LA DERECHA LA UNIDAD N-GLUCOSAMINA. ESTA ÚLTIMA SE PRESENTA EN MAYOR PROPORCIÓN QUE LA UNIDAD ACETILADA Y SU CONCENTRACIÓN DEPENDERÁ DEL GRADO DE DESACETILACIÓN DEL CS...6	6
FIGURA 1.4 ESTRUCTURA QUÍMICA DE LA UNIDAD REPETIDA DEL POLI(ALCOHOL VINÍLICO).....	8
FIGURA 1.5 ESTRUCTURA QUÍMICA DE LA MOLÉCULA DE GLUTARALDEHÍDO.	9
FIGURA 1.6 ESTRUCTURA QUÍMICA DE LA MOLÉCULA DE GENIPIN.....	10
FIGURA 1.7 ESQUEMA REPRESENTATIVO DE LA ESTRUCTURA FÍSICA QUE PRESENTAN LOS NANOTUBOS DE CARBONO (CNTS). A) NANOTUBO DE CARBONO DE PARED SENCILLA (SWCNTS), B) NANOTUBO DE CARBONO DE PARED MÚLTIPLE (MWCNTS).	11
FIGURA 2.1 PROCESO DE PREPARACIÓN DE LOS HIDROGELES HÍBRIDOS CONTROL (CS/PVA), LOS HIDROGELES ENTRECRUZADOS (CS/PVA/GEN Y CS/PVA/GA) Y LOS HIDROGELES NANOCOMPUESTOS (CS/PVA/MWCNTS Y CS/PVA/GEN/MWCNTS).	31
FIGURA 2.2 ESQUEMA DESCRIPTIVO DEL FENÓMENO DE DIFRACCIÓN DE RAYOS X.	33
FIGURA 2.3 EJEMPLO DE UN TERMOGRAMA DE DSC EN EL QUE SE SEÑALAN LAS TRANSICIONES TÉRMICAS PROPIAS DE LOS MATERIALES POLIMÉRICOS.	35
FIGURA 2.4 DIAGRAMA DEL FUNCIONAMIENTO DEL MICROSCOPIO DE FUERZA ATÓMICA.	36
FIGURA 2.5 CAPTURA DE PANTALLA DEL SOFTWARE WINSPM DURANTE EL PROCESAMIENTO DE DATOS. EN LA IMAGEN SE INDICAN LAS ZONAS A LO LARGO DE LAS CUALES ES CALCULADA LA R_{rms} , EN TODAS LAS MUESTRAS.	38
FIGURA 2.6 REPRESENTACIÓN ESQUEMÁTICA DEL ÁNGULO DE CONTACTO (θ) Y LAS TENSIONES INTERFACIALES (γ_{Lv} , γ_{sv} Y γ_{sL}) QUE SE GENERAN AL DEPOSITAR UNA GOTA DE LÍQUIDO SOBRE LA SUPERFICIE DE UN SÓLIDO.	40
FIGURA 2.7 EQUIPO DE ÁNGULO DE CONTACTO UTILIZADO EN LAS PRUEBAS DE ÁNGULO DE CONTACTO..	41
FIGURA 2.8 PROBADOR DE TRACCIÓN UNIAXIAL Y DIAGRAMA DEL MISMO SEÑALANDO CADA UNO DE SUS COMPONENTES. DICHO PROBADOR FUE DISEÑADO E INSTRUMENTADO EN EL LABORATORIO DE MECÁNICA Y MICROMECAÁNICA DE MATERIALES DEL IIM.	44
FIGURA 2.9 SUAJE CON GEOMETRÍA DE "MANCUERNA" UTILIZADO PARA CORTAR LAS PROBETAS DE LOS HIDROGELES, DIMENSIONES DE ESTAS E IMAGEN DE UNA PROBETA DE UN HIDROGEL DE CS/PVA/GEN EN ESTADO HIDRATADO.	45

FIGURA 2.10 PROBETAS PARA ENSAYOS DE TRACCIÓN BIAIXIAL POR INDENTACIÓN. A) PROBETA DE CS/PVA/GEN EN ESTADO DE HIDRATACIÓN AL EQUILIBRIO. B) PROBETA DE CS/PVA/GEN HIDRATADA AL EQUILIBRIO Y PREPARADA CON EL MAQUILLAJE ARTÍSTICO BLANCO (BASE) Y EL POLVO DE GIS NEGRO, A FIN DE CREAR EL PATRÓN ESTOCÁSTICO REQUERIDO PARA EL ANÁLISIS POR DIC.47

FIGURA 2.11 REPRESENTACIÓN ESQUEMÁTICA DE LOS PARÁMETROS ESTRUCTURALES DE LA RED POLIMÉRICA DE LOS HIDROGELES.49

FIGURA 2.12 DIAGRAMA DEL PROBADOR DE TRACCIÓN UNIAIXIAL ACOPLADO CON EL LÁSER DE DIODOS, EL LÁSER HE-NE Y LA CÁMARA CCD PARA EL DESARROLLO DE LAS PRUEBAS OPTO-MECÁNICAS.52

FIGURA 2.13 INTERFAZ DE USUARIO DEL SOFTWARE CELLPROFILER Y ESQUEMA DE LA SECUENCIA DE COMANDOS UTILIZADA PARA DETERMINAR EL TAMAÑO DE LAS CÉLULAS, SU FORMA, NÚMERO Y PORCENTAJE DE ÁREA CUBIERTO.56

FIGURA 2.14 DIAGRAMAS DESCRIPTIVOS DE LOS PARÁMETROS UTILIZADOS PARA MEDIR EL TAMAÑO Y DETERMINAR LA FORMA DE PARTÍCULAS IRREGULARES EN MICROSCOPIA. A) DIÁMETRO DE FERET Y B) FACTOR DE EXCENTRICIDAD.57

FIGURA 3.1 ESTRUCTURA QUÍMICA DE LAS REDES POLIMÉRICAS DE LOS HIDROGELES HÍBRIDOS DE CS/PVA ENTRECruzADOS Y/O NANOCOMPUESTOS. A) HIDROGELES CONTROL DE CS/PVA, B) HIDROGELES ENTRECruzADOS DE CS/PVA/GA, C) HIDROGELES ENTRECruzADOS DE CS/PVA/GEN, D) HIDROGELES DE CS/PVA/MWCNTs Y E) HIDROGELES DE CS/PVA/GEN/MWCNTs. LOS PEQUEÑOS CILINDROS EN LAS FIGURAS D Y E REPRESENTAN LOS MWCNTs EMBEBIDOS EN LA RED POLIMÉRICA.60

FIGURA 3.2 ESPECTROS DE INFRARROJO DE LOS HIDROGELES HÍBRIDOS DE CS/PVA, CS/PVA/GA, CS/PVA/GEN, CS/PVA/MWCNTs Y CS/PVA/GEN/MWCNTs. A) ESPECTROS DE FT-IR EN LA REGIÓN $4000\text{ cm}^{-1} - 400\text{ cm}^{-1}$, B) AMPLIACIÓN DE LA REGIÓN ENTRE $1700\text{ cm}^{-1} - 600\text{ cm}^{-1}$ DE LOS MISMOS ESPECTROS.63

FIGURA 3.3 DIFRACTOGRAMAS DE RAYOS X CORRESPONDIENTES A: A) LOS HIDROGELES DE CS Y PVA PUROS, B) LOS HIDROGELES CONTROL (CS/PVA), ENTRECruzADOS (CS/PVA/GA Y CS/PVA/GEN) Y NANOCOMPUESTOS (CS/PVA/MWCNTs Y CS/PVA/GEN/MWCNTs)..66

FIGURA 3.4 TERMOGRAMAS DE PÉRDIDA DE PESO (TG) DE LOS HIDROGELES HÍBRIDOS DE CS/PVA, ASÍ COMO DE LA MEZCLA ENTRECruzADA Y/O NANOCOMPUESTA. EN EL RECUADRO INTERNO SE MUESTRAN LOS TERMOGRAMAS DIFERENCIALES (DTG) DE ESTOS MISMOS MATERIALES, SEÑALANDO LAS DIFERENTES ETAPAS DE DEGRADACIÓN TÉRMICA QUE PRESENTAN.70

FIGURA 3.5 TERMOGRAMAS DE DSC CORRESPONDIENTES AL SEGUNDO CICLO DE CALENTAMIENTO AL QUE FUERON SOMETIDOS LOS HIDROGELES HÍBRIDOS DE CS/PVA, ENTRECruzADOS Y/O NANOCOMPUESTOS. EN LA GRÁFICA SE SEÑALAN LAS ZONAS DE LAS TRANSICIONES TÉRMICAS: T_g , T_x Y T_m , PROPIAS DE CADA MEZCLA.73

FIGURA 3.6 CINÉTICA DE HINCHAMIENTO DE LOS HIDROGELES HÍBRIDOS DE CS/PVA, ENTRECruzADOS Y/O NANOCOMPUESTOS, DURANTE LAS PRIMERAS 180 HORAS. EN EL RECUADRO INTERNO SE MUESTRA EL HINCHAMIENTO DE LOS HIDROGELES

DURANTE LOS PRIMEROS 30 MINUTOS DE LA PRUEBA, EN DONDE SE APRECIA CLARAMENTE EL FENÓMENO DE OVERSHOOTING QUE EXPERIMENTAN LOS HIDROGELES DE CS/PVA Y CS/PVA/MWCNTs. 77

FIGURA 3.7 ÁNGULOS DE CONTACTO FORMADOS POR LAS GOTAS SÉILES DE AGUA DESIONIZADA (0.5 μ L) DEPOSITADAS SOBRE LA SUPERFICIE DE LOS HIDROGELES DE CS/PVA, ENTRECruzADOS Y/O NANOCOMPUESTOS. EN EL RECUADRO INTERNO DE LA FIGURA SE MUESTRA LA VARIACIÓN DEL ÁNGULO DE CONTACTO COMO FUNCIÓN DEL HINCHAMIENTO AL EQUILIBRIO DE ESTOS HIDROGELES. 80

FIGURA 3.8 IMÁGENES TOPOGRÁFICAS DE LAS SUPERFICIES DE LOS HIDROGELES DE CS/PVA, CS/PVA/GA, CS/PVA/GEN, CS/PVA/MWCNTs, Y CS/PVA/GEN/MWCNTs OBTENIDAS MEDIANTE MICROSCOPIA DE FUERZA ATÓMICA. 83

FIGURA 3.9 VISTA SUPERIOR DE LA SUPERFICIE DE LOS HIDROGELES DE A) CS/PVA/GA Y B) CS/PVA/GEN, OBTENIDAS MEDIANTE AFM. LAS FLECHAS SEÑALAN LAS ESTRUCTURAS FIBRILARES DETECTADAS EN LA SUPERFICIE DEL HIDROGEL QUÍMICAMENTE ENTRECruzADO CON GA; MIENTRAS QUE, LA REGIÓN PUNTEADA MARCA LA ZONA QUE PRESENTA UNA ALINEACIÓN PREFERENCIAL EN LOS HIDROGELES ENTRECruzADOS CON GEN. 85

FIGURA 4.1 PROBADOR MECÁNICO DE TRACCIÓN BIAxIAL MEDIANTE INDENTACIÓN ESfÉRICA. A) IMAGEN REAL DEL PROBADOR MECÁNICO. B) DIAGRAMA DEL PROBADOR EN EL QUE SE SEÑALAN CADA UNO DE LOS MÓDULOS Y COMPONENTES QUE LO INTEGRAN. 90

FIGURA 4.2 MÓDULO DE INDENTACIÓN. A) COMPONENTES DEL SISTEMA DE INDENTACIÓN, B) DIAGRAMA DEL PORTA-MUESTRAS. 91

FIGURA 4.3 RESULTADOS DE LA CALIBRACIÓN DE SENSORES Y ACTUADORES. A) PLATINA MOTORIZADA MTS50-Z8, B) CELDA DE CARGA HONEYWELL, C) MEDIDA DEL DESPLAZAMIENTO FUERA DEL PLANO UTILIZANDO 3D-DIC Y D) DETERMINACIÓN DEL TAMAÑO DE PIXEL DE LA CÁMARA LATERAL. 93

FIGURA 4.4 DIAGRAMA DE LA POSICIÓN DE LAS CÁMARAS Y SUS RESPECTIVOS PLANOS DE VISIÓN. 95

FIGURA 4.5 ESQUEMA ILUSTRATIVO DEL MÉTODO DE CORRELACIÓN DE IMÁGENES DIGITALES. 96

FIGURA 4.6 INTERFAZ GRÁFICA DEL VI PROGRAMADO EN LABVIEW PARA EL CONTROL Y LA ADQUISICIÓN DE DATOS DEL PROBADOR MECÁNICO DE TRACCIÓN BIAxIAL POR INDENTACIÓN. 98

FIGURA 4.7 COMPORTAMIENTO MECÁNICO DE LAS MEMBRANAS DE LÁTEX NATURAL BAJO UN SISTEMA UNIAxIAL DE ESFUERZOS. 102

FIGURA 4.8 ESQUEMA DESCRIPTIVO DE LA DEFORMACIÓN DE LA MEMBRANA BAJO TRACCIÓN BIAxIAL. EN EL ESQUEMA R SE REFIERE AL RADIO DEL INDENTADOR, α ES EL RADIO DE LA REGIÓN DE PRUEBA, h ES EL ESPESOR DE LA MEMBRANA, w LA CARGA APLICADA Y δ HACE REFERENCIA AL DESPLAZAMIENTO/DEFLEXIÓN/INDENTACIÓN DE LA MEMBRANA. 103

FIGURA 4.9 COMPORTAMIENTO MECÁNICO DE LAS MEMBRANAS DE LÁTEX NATURAL BAJO UN SISTEMA BIAxIAL DE ESFUERZOS IMPUESTO MEDIANTE INDENTACIÓN ESfÉRICA. LOS DATOS EXPERIMENTALES (PUNTOS) FUERON AJUSTADOS CONFORME AL MODELO REPORTADO POR BEGLEY-MACKIN (LÍNEA DISCONTINUA). 106

FIGURA 4.10 CURVA CARGA VS. DEFLEXIÓN PARA LAS MEMBRANAS DE NR DE LA FORMA PRESENTADA POR YANG Y HSU [36]. LOS E OBTENIDOS MEDIANTE EL MODELO DE BEGLEY FUERON UTILIZADOS PARA GRAFICAR LOS DATOS.109

FIGURA 4.11 GRÁFICA FUERZA APLICADA VS. DESPLAZAMIENTO OBTENIDA MEDIANTE LA NUEVA METODOLOGÍA. LA PENDIENTE DEL AJUSTE LINEAL DE LOS DATOS CORRESPONDE AL MÓDULO ELÁSTICO; EL CUAL EN EL CASO DE MEMBRANAS DE NR ES DE 0.8 MPA.110

FIGURA 4.12 IMAGEN DEL PERFIL DEFORMADO DE LA MEMBRANA LA NR CAPTURADO POR EL MÓDULO DE VISIÓN DE 2D. EN LA IMAGEN SE SEÑALAN LOS PARÁMETROS NECESARIOS PARA DETERMINAR ρc A TRAVÉS DEL MÉTODO ÓPTICO.....113

FIGURA 4.13 CURVA DE LA MITAD DEL PERFIL DEFORMADO DE LA MEMBRANA DE NR. A) CURVA EXPERIMENTAL DEL PERFIL INDENTADO CON LOS MODELOS MATEMÁTICOS QUE DESCRIBEN LA REGIÓN DE CONTACTO Y NO CONTACTO A $\delta = 8$ MM; EL RECUADRO EN LA GRÁFICA MUESTRA LA IMAGEN CAPTURADA POR EL MÓDULO DE VISIÓN 2D CORRESPONDIENTE A DICHA CURVA. B) COMPARACIÓN DE DIFERENTES PERFILES TEÓRICO Y EXPERIMENTALES A DIFERENTES INDENTACIONES; EN EL RECUADRO DE LA GRÁFICA SE MUESTRAN LAS SIMULACIONES NUMÉRICAS REPORTADAS POR YANG Y HSU.115

FIGURA 4.14 RESPUESTA MICROMECAÁNICA EXHIBIDA POR LAS MEMBRANAS DE NR. A) CAMPO DE DESPLAZAMIENTOS FUERA DEL PLANO A $\delta=8$ MM. B) DESPLAZAMIENTO EXPERIMENTADO POR LA MEMBRANA A LO LARGO DE LA SECCIÓN MARCADA EN LA IMAGEN A, A DISTINTAS δ . C) CAMPO DE DEFORMACIONES PRINCIPALES A $\delta=8$ MM. D) DEFORMACIONES PRINCIPALES EXPERIMENTADAS POR LA MEMBRANA A LO LARGO DE LA SECCIÓN MARCADA EN LA FIGURA C, A DISTINTAS δ117

FIGURA 4.15 COMPARATIVA DE LAS RAZONES DE DEFORMACIÓN A LO LARGO DE LA REGIÓN DE CONTACTO (λ_o) DETERMINADAS EXPERIMENTALMENTE MEDIANTE ARAMIS 3D-DIC (CÍRCULOS AZULES) Y UTILIZANDO LAS SIMULACIONES NUMÉRICAS REPORTADAS POR YANG-HSU (DIAMANTES ROSAS).....119

FIGURA 5.1 RESPUESTA MECÁNICA BAJO TRACCIÓN UNIAxIAL DE LOS HIDROGELES HÍBRIDOS DE CS/PVA, CS/PVA/GA, CS/PVA/GEN, CS/PVA/MWCNTs Y CS/PVA/GEN/MWCNTs.....123

FIGURA 5.2 GRÁFICA COMPARATIVA DEL MÓDULO ELÁSTICO OBTENIDO A TRAVÉS DEL MODELO DE OGDEN Y LA RELACIÓN $E = 3\mu$ PARA LOS HIDROGELES HÍBRIDOS DE CS/PVA, ENTRECruzADOS Y/O NANOCOMPUESTOS.125

FIGURA 5.3 M_{CRL} COMO FUNCIÓN DE D_N PARA LOS HIDROGELES DE ENTRECruzADOS DE CS/PVA. LOS CUADROS REPRESENTAN A LAS MUESTRAS DE CS/PVA/GA, LOS CÍRCULOS A LAS DE CS/PVA/GEN Y LOS TRIÁNGULOS A LAS DE CS/PVA/GEN/MWCNTs.128

FIGURA 5.4 RELACIÓN DEL MÓDULO ELÁSTICO CON LOS PARÁMETROS ESTRUCTURALES DE LA RED POLIMÉRICA EN LOS HIDROGELES ENTRECruzADOS. A) RELACIÓN ENTRE EL MÓDULO ELÁSTICO Y EL PESO MOLECULAR ENTRE PUNTOS DE ENTRECruzAMIENTO. B) RELACIÓN ENTRE EL MÓDULO ELÁSTICO Y EL TAMAÑO DE PORO.130

FIGURA 5.5 CARACTERIZACIÓN MACROMECAÁNICA DE LOS HIDROGELES HÍBRIDOS DE CS/PVA ENTRECruzADOS Y NANOCOMPUESTOS MEDIANTE INDENTACIÓN ESFÉRICA. A) CURVAS DE FUERZA VS. DESPLAZAMIENTO Y AJUSTE DE BEGLEY. B) CURVAS OBTENIDAS MEDIANTE LA METODOLOGÍA Y EXPRESIÓN GENERAL DESARROLLADAS EN ESTE TRABAJO DE INVESTIGACIÓN.

LA PENDIENTE DE LAS RECTAS CORRESPONDE AL MÓDULO ELÁSTICO DE LAS MEMBRANAS. *TODOS LOS AJUSTES PRESENTARON UN COEFICIENTE DE DETERMINACIÓN $R^2=0.99$	132
FIGURA 5.6 COMPARACIÓN DEL MÓDULO ELÁSTICO BAJO TRACCIÓN UNIAxIAL Y BIAxIAL DE LOS HIDROGELES DE CS/PVA, CS/PVA/GA, CS/PVA/GEN, CS/PVA/MWCNTs Y CS/PVA/GEN/MWCNTs.	133
FIGURA 5.7 RESPUESTA MICROMECAÁNICA DE LOS HIDROGELES HÍBRIDOS MEDIANTE CORRELACIÓN DE IMÁGENES DIGITALES EN 3D. LA COLUMNA DE LA IZQUIERDA REPRESENTA EL CAMPO DE MICRODEFORMACIONES EXHIBIDO POR LAS MEMBRANAS AL SER INDENTADAS 8.5 MM; MIENTRAS QUE, LA COLUMNA DE LA DERECHA MUESTRA LOS PERFILES DE DEFORMACIÓN A DISTINTAS DEFLEXIONES (2 MM, 4 MM, 6 MM Y 8.5 MM) PARA UNA SECCIÓN LONGITUDINAL QUE PASA POR EL CENTRO DE LA MEMBRANA (ALINEADA CON EL EJE Y).	135
FIGURA 5.8 COMPORTAMIENTO OPTO-MECAÁNICO DE LOS HIDROGELES HÍBRIDOS NANOCOMPUESTOS. A Y B) RESPUESTA OPTO-MECAÁNICA DE LOS HIDROGELES DE CS/PVA/MWCNTs Y CS/PVA/GEN/MWCNTs HIDRATADOS AL EQUILIBRIO, RESPECTIVAMENTE. C Y D) RESPUESTA OPTO-MECAÁNICA DE LOS HIDROGELES DE CS/PVA/MWCNTs Y CS/PVA/GEN/MWCNTs SECOS, RESPECTIVAMENTE.	138
FIGURA 6.1. MICROGRAFÍAS DE FLUORESCENCIA (10X) DEL CULTIVO CONTROL Y DE LOS CONSTRUCTOS SOMETIDOS A LA PRUEBA DE VIABILIDAD CELULAR MEDIANTE CALCEÍNA-AM Y HOMODÍMERO DE ETÍDIO TRAS 21 DÍAS DE CULTIVO IN VITRO. EN COLOR VERDE SE OBSERVAN LOS FIBROBLASTOS VIVOS Y LOS MUERTOS EN ROJO. EL PORCENTAJE DE VIABILIDAD DE LOS HIDROGELES FUE DEL 95%-99%.....	141
FIGURA 6.2 GRÁFICA DE CONTEO CELULAR DE LOS CONSTRUCTOS ENSAYADOS.	144
FIGURA 6.3 EVALUACIÓN DE LA LONGITUD MÁXIMA (DIÁMETRO DE FERET) DE LOS FIBROBLASTOS A LOS 3, 7 Y 21 DÍAS DE CULTIVO IN VITRO. EN LA PRIMERA COLUMNA SE MUESTRA LA DISTRIBUCIÓN DEL TAMAÑO PRESENTADO POR LAS CÉLULAS Y EN LAS COLUMNAS RESTANTES SE APRECIAN LAS MICROGRAFÍAS (4X) TRAS EL ANÁLISIS DE IMAGEN QUE SE LLEVÓ A CABO. LA BARRA DE COLOR INDICA EL TAMAÑO DE LAS CÉLULAS.	148
FIGURA 6.4 EVOLUCIÓN DE LA MORFOLOGÍA EXHIBIDA POR LOS FIBROBLASTOS A LOS 3, 7 Y 21 DÍAS DE CULTIVO IN VITRO. VALORES DE EXCENTRICIDAD DE 0 HACEN ALUSIÓN A CÉLULAS REDONDAS, MIENTRAS QUE UN VALOR CERCANO A 1 ES INDICATIVO DE CÉLULAS CON FORMA ALARGADA. EN LA 1ER COLUMNA SE MUESTRA LA DISTRIBUCIÓN DE PROBABILIDAD DE LA EXCENTRICIDAD DE LOS FIBROBLASTOS Y EN LAS COLUMNAS RESTANTES SE APRECIAN LAS MICROGRAFÍAS (4X) TRAS EL ANÁLISIS DE IMAGEN QUE SE LLEVÓ A CABO.....	151

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA I. HIDROGELES HÍBRIDOS A BASE DE CS/PVA SINTETIZADOS EN FORMA DE MEMBRANA.....	58
TABLA II. PORCENTAJES DE CRISTALINIDAD OBTENIDOS MEDIANTE ANÁLISIS DE XRD PARA LOS HIDROGELES HÍBRIDOS CONTROL, ENTRECruzADOS Y/O NANOCOMPUESTOS	69
TABLA III. TEMPERATURAS DE DEGRADACIÓN Y PORCENTAJE DE PESO PERDIDO EN CADA ETAPA DE DEGRADACIÓN.....	72
TABLA IV. TEMPERATURAS CRÍTICAS DE LA MEZCLA CS/PVA Y SUS MEZCLAS ENTRECruzADAS Y/O CARGADAS CON MWCNTs.....	74
TABLA V. COMPARATIVA DE LOS MÓDULOS ELÁSTICOS (E) DE LAS MEMBRANAS DE NR OBTENIDOS A TRAVÉS DE LOS DISTINTOS MODELOS ESTÁNDAR REPORTADOS EN LA LITERATURA Y MEDIANTE LA NUEVA EXPRESIÓN GENERAL Y METODOLOGÍA DESARROLLADA.	120
TABLA VI. RELACIÓN ENTRE LAS PROPIEDADES MECÁNICAS Y EL ÍNDICE DE HINCHAMIENTO AL EQUILIBRIO DE LAS MEMBRANAS.....	124
TABLA VII. PROPIEDADES ESTRUCTURALES DE LOS HIDROGELES DE CS/PVA ENTRECruzADOS Y NANOCOMPUESTOS.	127

LISTADO DE SIGLAS Y ACRÓNIMOS

AFM	Microscopía de Fuerza Atómica
CNTs	Nanotubos de Carbono
CS	Quitosano
CS/PVA	Hidrogel híbrido de quitosano y poli(alcohol vinílico)
CS/PVA/GA	Hidrogel híbrido de quitosano y poli(alcohol vinílico) químicamente entrecruzado con glutaraldehído
CS/PVA/GEN	Hidrogel híbrido de quitosano y poli(alcohol vinílico) químicamente entrecruzado con genipin
CS/PVA/GEN/MWCNTs	Hidrogel híbrido de quitosano y poli(alcohol vinílico) nanocompuesto con nanotubos de carbono de pared múltiple y químicamente entrecruzado con genipin
CS/PVA/MWCNTs	Hidrogel híbrido de quitosano y poli(alcohol vinílico) nanocompuesto con nanotubos de carbono de pared múltiple
DA	Unidad monomérica desacetilada del quitosano
DIC	Correlación de Imágenes Digitales
DSC	Calorimetría Diferencial de Barrido
DTG	Termograma Diferencial
FT-IR	Espectroscopía Infrarroja por Transformada de Fourier por reflectancia total atenuada
GA	Glutaraldehído
GAGs	Glicosaminoglicanos
GEN	Genipin
LOG	Fase de crecimiento logarítmico
MEC	Matriz extracelular
MPa	Megapascal ($1\text{mpa} = 1 \times 10^6 \text{ kg m}^{-1} \text{ s}^{-2}$)
MWCNTs	Nanotubos de Carbono de Pared Múltiple
NR	Látex natural
PBS	Búfer fosfato salino, ph 7.4
PMMA	Polimetilmetacrilato
PVA	Poli(alcohol vinílico)
SWCNTs	Nanotubos de Carbono de Pared Sencilla

SBF	Suero Bovino Fetal
TGA	Análisis termogravimétrico
UTS	Resistencia a la tracción última
UV	Radiación ultravioleta
VI	Instrumento virtual programado en <i>LabVIEW</i>
XRD	Difracción de rayos X
3D-DIC	Correlación de imágenes digitales en tres dimensiones

LISTADO DE SÍMBOLOS**LETRAS ROMANAS**

a	Radio del bastidor (25 mm)
\bar{a}	Radio del bastidor normalizado por el radio del indentador esférico (i.e. $\bar{a} = \frac{a}{R}$)
A	Número de Avogadro ($6.023 \times 10^{23} \text{ mol}^{-1}$), Energía libre de Helmholtz
A_a	Área bajo la curva de la zona amorfa
A_c	Área bajo la curva de los picos cristalinos
A_T	Área transversal de la probeta de tracción uniaxial
c	Concentración del polímero en la disolución (g/m^3)
C_r	Porcentaje de cristalinidad del hidrogel
C_1	Constante material; $C_1 = \frac{1}{6}E$
D_N	Tamaño de poro o malla
E	Módulo elástico o módulo de Young
f	Fuerza de tracción uniaxial (N)
$f(\bar{\rho})$	Función matemática que describe el perfil indentado de la membrana
$f_c(\bar{\rho})$	Función matemática que describe la región de contacto de la membrana deformada (función cuadrática)
$f_f(\bar{\rho})$	Función matemática que describe la región libre o de no contacto de la membrana deformada (función cúbica)
h	Espesor de las probetas ensayadas en tracción biaxial (mm)
l	Longitud
l_o	Distancia inicial de la zona calibrada en la prueba de tracción
M_{crl}	Peso molecular entre puntos de entrecruzamiento
$\overline{M_w}$	Peso molecular promedio peso
n	Número de cadenas que conforman la red elastomérica
N	Número de cadenas por unidad de volumen
Q	Porcentaje de hinchamiento
Q_e	Porcentaje de hinchamiento al equilibrio

Q_m	Porcentaje de hinchamiento máximo
R	1. Constante universal de los gases ($8.3145 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$) 2. Radio del indentador esférico (5 mm)
R_{rms}	Rugosidad media cuadrática
T	Temperatura
t	Tiempo
T_c	Temperatura de cristalización
T_g	Temperatura de transición vítrea
T_m	Temperatura de fusión
T_{max}	Temperatura de degradación máxima
T_x	Temperatura de fusión de las regiones cristalinas formadas durante el primer ciclo de enfriamiento
w	Fuerza aplicada en tracción biaxial (N)
w_f	Peso de la muestra de hidrogel hidratada
w_o	Peso de la muestra de hidrogel seca
$y(\delta/R)$	Función que relaciona la carga aplicada y la deflexión de la membrana indentada

LETRAS GRIEGAS

α	Parámetro relacionado con los invariantes de deformación en materiales incompresibles, indicativo de la velocidad a la que se desenredan las cadenas poliméricas
γ_{sl}	Energía superficial de la interfase sólido-líquido
γ_{sv}	Energía superficial de la interfase sólido-vapor
γ_{lv}	Energía superficial de la interfase líquido-vapor
δ	Deflexión/desplazamiento/indentación de la membrana
δ_o	Deflexión central de la membrana
ε	Deformación longitudinal
ε_o	Predeformación de la membrana sometida a tracción biaxial
θ	Ángulo de contacto
λ	Razón de elongación bajo tracción uniaxial ($\lambda = \varepsilon + 1$)

λ_o	Razón de deformación en el polo
λ_s	Parámetro adimensional para definir el comportamiento mecánico que presenta la membrana al ser sometida a indentación esférica axisimétrica (placa - membrana no lineal)
μ	Módulo de corte
ν	Coefficiente de Poisson
ν_s	Fracción volumétrica del polímero hidratado hasta su equilibrio
ρ	Distancia radial de un punto sobre el perfil deformado de la membrana al borde del porta-muestras
$\bar{\rho}$	Distancia radial de un punto sobre el perfil deformado de la membrana al borde del porta-muestras, normalizado por el radio del indentador (i.e. $\bar{\rho} = \frac{\rho}{R}$)
ρ_c	Región de contacto entre la membrana y el indentador esférico
$\bar{\rho}_c$	Región de contacto entre la membrana y el indentador esférico, normalizado por el radio del indentador (i.e. $\bar{\rho}_c = \frac{\rho_c}{R}$)
σ	Esfuerzo
$\sigma_{laserOff}$	Esfuerzo registrado al apagar el láser
$\sigma_{laserOn}$	Esfuerzo registrado al encender el láser
$\Delta\sigma_{light}$	Esfuerzo debido a las microdeformaciones inducidas por la irradiación infrarroja
φ_c	Densidad de entrecruzamiento teórica
ΔH	Entalpía de fusión

AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES

A la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) por abrirme sus puertas y brindarme acceso a una educación integral, de calidad y excelencia internacional; por apoyarme para participar en programas de emprendimiento científico y tecnológico, por darme la oportunidad de aprender otros idiomas y acercarme a sus culturas, y por hacerme parte de una comunidad universitaria sin igual dentro de la cual conocí a personas excepcionales.

Al Instituto de Investigaciones en Materiales (IIM, UNAM) por permitirme continuar con mi formación científica y académica dentro de sus aulas y laboratorios.

De manera muy especial a mi asesor, el *Dr. Francisco M. Sánchez Arévalo*, quien desde el primer momento en que nos conocimos me ha brindado sus conocimientos, apoyo, confianza y guía, impulsándome en todo momento para lograr este objetivo. ¡Mil gracias por creer en mí en todo momento y por apoyarme en todos los proyectos, científicos y de emprendimiento, que fueron surgiendo a lo largo de estos ocho años!

Al *Dr. Juan Hernández Cordero*, miembro de mi comité tutor, por su tiempo, conocimientos, aportaciones y consejos para llevar a buen término este proyecto, así como por la gran confianza que siempre tuvo en mi persona y en mi trabajo.

A la *Dra. Laura Oropeza*, miembro de mi comité tutor, porque sin pensarlo y a pesar de la premura, aceptó unirse a esta travesía prácticamente en la recta final, brindándome en todo momento consejos y aportaciones que fueron de gran ayuda para concluir el proyecto.

Al *Dr. Antonmaria Minzoni Alessio[†]*, miembro de mi comité tutor, quien por desgracia no pudo acompañarnos hasta el final. Sin su valioso apoyo y conocimientos hubiera sido muchísimo más complejo entender el problema de indentación biaxial, el cual poco a poco fuimos esclareciendo entre los cafés y las historias sobre “conejos” que compartíamos por las mañanas.

A mis sinodales: el *Dr. Mathieu Hautefeuille*, el *Dr. Genaro Vázquez*, el *Dr. Filiberto Rivera*, el *Dr. Agileo Hernández* y el *Dr. Francisco M. Sánchez*, por su comprensión, tiempo, paciencia, observaciones y consejos para mejorar este trabajo.

Al *Dr. Andrés Castell Rodríguez* por abrirme las puertas del laboratorio de Inmunoterapia e Ingeniería de Tejidos (Facultad de Medicina, UNAM) y poner a mi alcance, siempre con una sonrisa, todo el equipo y material que necesité para llevar a cabo los cultivos celulares y demás pruebas biológicas. Asimismo, agradezco a la *Dra. Katia Yarkin* y a la *Biol. Beatriz* por las facilidades prestadas para la lectura en absorbancia del PrestoBlue y el uso del microscopio de fluorescencia, respectivamente.

A la *Dra. Michelin Álvarez Camacho* por brindarme acceso al equipo para análisis de movimiento y deformación, ARAMIS. Gracias por el apoyo, el tiempo, los consejos, las observaciones y la excelente disposición para obtener los resultados que nos permitieron caracterizar los hidrogeles y validar el probador de tracción biaxial por indentación desarrollado en este trabajo de tesis.

A los técnicos del Instituto de Investigaciones en Materiales que participaron con la operación de equipo para el análisis y caracterización de muestras: a las *Q.F.B. Damaris Cabrero Palomino* y *Karla Eriseth Morales* por los estudios de análisis térmico, a la *M. en C. Adriana Tejada Cruz* por los estudios de difracción de rayos X, al *Ing. Carlos Flores* por los estudios de AFM y finalmente al *Químico Miguel Ángel Canseco* por los estudios de FTIR-ATR.

Al *Ing. Fernando Molina* y al *Sr. Miguel Díaz* del taller del IIM por su apoyo en el maquinado de piezas en control numérico.

A la *Lic. Tere Vázquez* y la *Lic. Oralia L. Jiménez* de la biblioteca del IIM por su apoyo en la búsqueda bibliográfica.

A *CONACYT* y la *DGEP* por las becas y apoyos otorgados durante mis estudios de doctorado. A la *DGAPA-UNAM* por el financiamiento brindado para la realización de este trabajo a través de los proyectos PAPIIT IN104118, IN218315 e IN108116.

AGRADECIMIENTOS PERSONALES

*“Les coses importants són les que no ho semblen”
(Mercè Rodoreda)*

En primer lugar me gustaría expresar mi más grande y profundo agradecimiento a la persona más importante en mi vida, mi mami, *Ma. Asunción Palafox*. Gracias por tu amor incondicional, por los consejos y regaños, por hacer de mí una persona íntegra, por ser mi más grande apoyo y por estar a mi lado en todo momento (incluso en aquellos en los que ni yo misma me aguantaba). Sin duda, eres la principal promotora de mis sueños, gracias por alimentarlos y por siempre impulsarme a seguirlos. ¡Este logro también es tuyo! <3

A mi papá, *José Garnica*, por todo su apoyo, por inculcarme hábitos y siempre guiarme bajo la premisa de que toda disciplina tiene su recompensa.

A mis hermanos, *Diego y Alberto*, por cuidar de mí desde que éramos pequeños, por ser mis cómplices, por compartir conmigo sus logros y alegrías, pero sobre todo, por enseñarme a ser paciente... cualidad que, sin lugar a duda, me ha sido sumamente útil a lo largo de estos años.

A mis abuelitos, *Elvira Murguía y Rubén Palafox^t*, por el gran amor que desde siempre me han mostrado y por ser mi más grande ejemplo de honestidad y generosidad. Gracias por cada uno de sus consejos y palabras de aliento.

A mis tíos, *Xochitl y Rubén Palafox*, por cuidar de mí y de mis hermanos desde el primer día; por tomarse el tiempo para enseñarnos cosas tan vitales como a andar en bici, a patinar, a jugar dominó, ajedrez o cartas; porque a la vez nos enseñaban a no rendirnos y a luchar por todo aquello que nos propusiéramos. Gracias por el amor recibido, la dedicación y la paciencia.

A mi tía *Guadalupe*, a mis tíos *José, Paulino, Gregorio y David*, por su cariño, sus consejos y palabras de aliento. Me es muy gratificante ver el interés que siempre han mostrado por mi investigación, gracias por creer en mí y en que puedo lograr cosas importantes.

A la *Dra. Nadia Vázquez Torres* por su infinita amistad, confianza y gran disposición para trabajar conmigo en toda clase de proyectos a lo largo estos años. Gracias por los ánimos, por tu

tiempo, conocimientos, consejos y siempre buena cara y actitud para sacar adelante los cultivos y las pruebas biológicas, estoy segurísima que sin tu ayuda hubiera difícilmente hubiera lograrlo esos resultados. De corazón, ¡muchísimas gracias, Nadia! ;D

A los *Dres. Alfredo Maciel y Ricardo Vera* del IIM por abrirme las puertas de su laboratorio y facilitarme, en todo momento, los materiales y equipos que necesité para llevar a cabo los primeros intentos de síntesis de los hidrogeles.

A la *Dra. Monserrat Bizarro Sordo* por brindarnos acceso a su equipo de UV-VIS y ser mi salvadora cuando me hacía falta algún vial, agitador o agua Mili-Q. ¡Mil gracias!

A las secretarias del posgrado en Ciencia e Ingeniería de Materiales: *Esther, Isabel y Diana*, por su gran colaboración y empeño para que todos los trámites que requerí (ayudas para congresos y cursos, compra de material, beca CONACYT, inscripciones, revisiones de estudios, etc.) estuvieran listos siempre a tiempo, haciendo un esfuerzo extra para ello en diversas ocasiones.

A mis amigos del IIM: Héctor Estrella, Alejandro Rodríguez, Celso Briones, Josué Gutiérrez, Xavier Dueñas, Alida Ospina, Nadia Vázquez, Ulises Espinoza, Mildred Cano, Sandra Escobar, Reinher Pimentel, Amado Velázquez, Jorge Benítez y David López. Mil gracias por la confianza que siempre me tuvieron, por hacer muchísimo más llevadera la frustración que se generaba cuando algo no funcionaba... o dejaba de hacerlo, por disipar mis dudas, por apoyarme en todos los proyectos que se me ocurrían y por hacer más amenas las horas de trabajo.

De igual forma quiero expresar mi agradecimiento a *Laura Creixell* y a “*La Colla de Tercer*” (Paulina, Rocío, Luisa, Claudia, Nayeli, Wendy, Irma, Amanda, Fraterna, Iñaki, Rodrigo, Manuel y Alfonso). Nois, ustedes fueron una verdadera bocanada de aire fresco durante mi último año de doctorado (sin duda, el más complicado). Gracias por su amistad, por las risas y las sonrisas, por la complicidad, el desgavell y la dolentia; pero sobre todo, mil gracias por los ánimos y el apoyo sincero e incondicional que me mostraron en los momentos más críticos y difíciles durante la escritura de esta tesis... Sí, cuando se descompuso mi compu y casi lo pierdo todo. Asistir a catalán pronto se convirtió en una de mis prioridades debido a ustedes. Us estimo MASSA!!
#CatalàChallenge

Finalmente, un reconocimiento a todas y cada una de las personas con las que me fui encontrando a lo largo de este camino, porque cada una de ellas, de una u otra forma, aportó algo para que pudiera llegar a este punto. Gracias por las risas, los chistes, consejos, inquietudes, aprendizajes y sueños que en algún punto compartimos... Andrea Fuentes y Mauricio Céspedes, con ustedes literalmente compartí un pedazo de camino, gracias por todo lo que me enseñaron. ¡EnergyMAM! :D

¡Buen camino! ;)

INTRODUCCIÓN

En la última década, los hidrogeles híbridos basados en quitosano (CS) y poli(alcohol vinílico) (PVA), se han perfilado como una excelente alternativa para satisfacer distintas necesidades en diversas áreas; entre ellas destacan la medicina, la agricultura, el medio ambiente y la industria alimentaria [1]. Lo anterior se debe a su fácil preparación, su alta procesabilidad, a su buena miscibilidad y a las excelentes propiedades fisicoquímicas que presentan los hidrogeles de CS y de PVA tanto por separado, como los hidrogeles híbridos formados a partir de su mezcla (i.e. CS/PVA). Actualmente se ha demostrado que los hidrogeles de CS/PVA son útiles en diversas ramas de la ciencia y la tecnología, por lo que frecuentemente son utilizados como agentes liberadores de fármacos [2], como andamios celulares para la regeneración de tejidos biológicos [3-5] o incluso como membranas para el tratamiento de aguas residuales de origen industrial [6, 7]. La mayoría de estas aplicaciones requieren de materiales con una alta estabilidad mecánica y estructural a largo plazo, lo cual se vuelve una desventaja cuando dichos hidrogeles se encuentran en medios acuosos por periodos de tiempo prolongados.

A fin de conformar redes poliméricas tridimensionales que ofrezcan una mayor estabilidad mecánica y estructural, se han utilizado diversos tipos de agentes entrecruzantes: físicos [8], químicos [4, 5, 9, 10] e incluso iónicos [11]. Hasta ahora, esto ha permitido optimizar las propiedades fisicoquímicas de los hidrogeles híbridos de CS/PVA, siendo el glutaraldehído (GA) el entrecruzante químico por excelencia de dicha mezcla [2, 10, 12, 13]. Es importante resaltar que, a diferencia de otros agentes entrecruzantes como la epiclorhidrina o el formaldehído, el GA es capaz de generar redes poliméricas mecánica y estructuralmente más estables, ya que forman enlaces covalentes tanto con los grupos amino ($-NH_2$) del CS, como con los grupos hidroxilo ($-OH$) del PVA [14]. No obstante, al tratarse de un producto químico sintético, altamente citotóxico y mutágeno, la biocompatibilidad de los hidrogeles resultantes podría verse comprometida al quedar trazas libres de GA en el interior de la red polimérica. Debido a lo anterior, la comunidad científica y tecnológica se ha enfocado en la búsqueda de nuevas metodologías y agentes entrecruzantes químicos con alta efectividad y muy poca o nula citotoxicidad. Como ejemplo de ello, Marin et al. presentaron un nuevo enfoque para la preparación de hidrogeles de CS utilizando citral, un monoaldehído alifático presente en el aceite de algunas plantas, este entrecruzante mostró ser biocompatible a través de pruebas *in vivo* en ratones y fue capaz de mejorar, en cuatro órdenes de magnitud, el módulo de corte de hidrogeles de CS [15]. Otro entrecruzante que resulta sumamente atractivo para la mezcla CS/PVA es el genipin (GEN), un compuesto natural que ha

demostrado ser mucho menos citotóxico que el GA (5 000-10 000 veces) [16]. Además, los materiales y tejidos biológicos entrecruzados con él, han presentado una resistencia mecánica comparable a la de aquellos reticulados mediante GA [16-18]. Aunque el GEN ha demostrado ser un agente entrecruzante útil para las mezclas de CS, existe una falta de conocimiento sobre su influencia en las propiedades fisicoquímicas de la mezcla CS/PVA. Así, uno de los objetivos de este trabajo de investigación consistió en utilizar al GEN como un entrecruzante de dicho sistema y evaluar los cambios producidos en la estructura de la red polimérica y en las propiedades fisicoquímicas de los hidrogeles híbridos resultantes, comparando su efectividad con la del GA.

Más allá del uso de diversos agentes entrecruzantes o nuevos métodos de síntesis que permitan modificar el comportamiento de los hidrogeles, las necesidades cada vez más exigentes de aplicaciones enfocadas al área biomédica han hecho que la ciencia de los materiales vaya un paso más adelante. De manera que, los hidrogeles híbridos han sido cargados con diferentes tipos de nanopartículas (i.e. oro, plata, cobalto, níquel, grafito, carbono y óxidos de hierro, entre otras), las cuales les confieren propiedades adicionales que dependen del tipo de nanopartículas utilizadas y de su concentración, convirtiendo así a los hidrogeles convencionales en hidrogeles nanocompuestos [19, 20]. Debido a sus excelentes propiedades, los nanotubos de carbono (CNTs) se posicionan como una de las nanopartículas más prometedoras para formar hidrogeles nanocompuestos capaces de responder a estímulos externos (mecánicos, ópticos, térmicos, eléctricos o magnéticos) [19, 21]. Recientemente se ha reportado que algunas matrices poliméricas, como el PDMS o poli(p-feniletileno), presentan efectos térmicos y mecánicos localizados cuando son cargadas con ellos y se exponen a longitudes de onda en el intervalo del infrarrojo [22-25]. Curiosamente, dicho fenómeno aún no ha sido estudiado en hidrogeles y se desconoce si estos materiales también podrían presentarlo, por lo que el estudio de esta variante presenta una nueva línea de investigación emergente en la cual se busque explotar el posible efecto opto-mecánico conferido por los CNTs para el desarrollo de nuevos sistemas para la liberación controlada de fármacos, sensores o actuadores que funcionen a través de estímulos externos y métodos no invasivos.

El sistema CS/PVA ha sido impurificado con CNTs principalmente para su uso como membranas de separación y adsorción de metales pesados [26-29]. En cuanto a aplicaciones en el área biomédica, los hidrogeles nanocompuestos de CS/PVA/CNTs no han sido estudiados con la misma insistencia, pues hasta el momento únicamente se conocen un par de trabajos en los cuales se estudian fibras de CS/PVA/CNTs entrecruzadas con GA para su posible uso como andamios celulares [30, 31]. Mientras que no se ha encontrado reporte de hidrogeles de CS/PVA/GEN cargados con CNTs. Es así que, otro de los objetivos de este trabajo consistió en dilucidar la influencia que los CNTs tienen sobre los parámetros estructurales de la red polimérica,

la estabilidad térmica, el porcentaje de cristalinidad, la humectabilidad, la cinética de hinchamiento, el comportamiento biológico y mecánico de los hidrogeles híbridos de CS/PVA y CS/PVA/GEN; los cuales podrían tener una podrían ser utilizados como andamios celulares en ingeniería de tejidos, como agentes liberadores de fármacos, o bien como membranas de adsorción para la captura de colorantes.

Como se ha mencionado anteriormente, en este tipo de aplicaciones, la estabilidad y las propiedades mecánicas de los hidrogeles juegan un papel muy importante en su desempeño y durabilidad, llegando incluso a ser un factor determinante para su elección. La caracterización mecánica de los hidrogeles en estado hidratado constituye uno de los principales retos en el estudio de estos materiales, si bien los ensayos de tracción uniaxial son frecuentemente utilizados para evaluar la respuesta mecánica de gran parte de los materiales poliméricos, estas pruebas no son muy útiles en el caso de hidrogeles y membranas delgadas. Por un lado, debido a su espesor y constitución, en ocasiones resulta sumamente complicado colocar las muestras en las mordazas y sujetarlas a fin de evitar su deslizamiento durante la prueba, lo cual podría producir daños en las probetas y la obtención de resultados erróneos [32]. Por otro lado, este tipo de ensayos no brinda información suficiente cuando se trata de membranas delgadas, tejidos biológicos suaves o hidrogeles, ya que estos difícilmente se encuentran expuestos a sollicitaciones uniaxiales en su entorno o campo de aplicación, por lo que caracterizarlos bajo esfuerzos biaxiales, esfuerzos aún más cercanos a los presentes en el mundo real, resulta de vital importancia. La forma más común de imponer dicho estado de esfuerzos consiste en someterlos a grandes deformaciones a través de una presión impuesta por un líquido/gas (prueba de inflamiento), o bien mediante cargas puntuales (prueba de indentación) para posteriormente determinar el desplazamiento central que experimentan en función de la presión/fuerza aplicada, a fin de estimar sus propiedades mecánicas [33].

Es así que, durante las últimas siete décadas, el problema de grandes deformaciones en membranas delgadas ha sido de gran interés para los investigadores en áreas como la mecánica, la física de sólidos e incluso, recientemente, en disciplinas como la medicina y la biomedicina. Buscando resolver dicho problema, se han desarrollado diversas aproximaciones (analíticas, numéricas y experimentales) considerando los modelos de placa de von Karman y Föppl-Hecky, para elasticidad lineal [34, 35], o bien los modelos de membrana no lineal desarrollados por Yang-Hsu [36], Liu [37] o Begley [38] para grandes deformaciones. Estos modelos han sido ampliamente utilizados como estándares para determinar el módulo elástico de membranas delgadas sometidas a esfuerzos biaxiales mediante indentación axisimétrica [33, 39, 40]; sin embargo, aún presentan algunos inconvenientes y no siempre son válidos, por lo que a fin de obtener resultados certeros se deben hacer algunas consideraciones especiales.

A pesar de que se han diseñado y desarrollado diversos arreglos experimentales para evaluar la respuesta mecánica bajo indentación esférica de hidrogeles y membranas delgadas [33, 34, 37], ninguno de ellos es útil para estudiar el comportamiento micromecánico de estos materiales. Es así que una de las principales contribuciones de este trabajo de investigación, al campo de la caracterización mecánica de materiales, consistió en el diseño, la construcción, la instrumentación, el control y la validación de un probador mecánico con la capacidad de evaluar, simultáneamente, el comportamiento macro y micromecánico de hidrogeles, membranas elastoméricas e incluso tejidos biológicos suaves, a través de técnicas ópticas no intrusivas (equipo que en su conjunto no existía a nivel científico ni comercial). Asimismo, se desarrolló una nueva metodología experimental y un modelo mecánico para determinar de forma sencilla y certera el módulo elástico de hidrogeles y membranas delgadas.

De esta forma, el objetivo principal de este trabajo de investigación consistió en estudiar la influencia de los agentes entrecruzantes (naturales/genipin y sintéticos/glutaraldehído) y/o de los nanotubos de carbono sobre las propiedades mecánicas, químicas, térmicas, estructurales y biológicas de los hidrogeles híbridos de CS/PVA. Lo anterior con la finalidad de tener un mejor entendimiento de la correlación que existe entre estos elementos (macromoléculas, entrecruzantes y nanopartículas) para así poder producir materiales con propiedades mecánicas y fisicoquímicas específicas que logren satisfacer los requerimientos de una determinada aplicación (biomedicina, ingeniería de tejidos, remediación ambiental, entre otras), contribuyendo así al conocimiento de frontera.

CAPÍTULO 1

MARCO TEÓRICO Y ESTADO DEL ARTE

En este capítulo se exponen de manera detallada algunos conceptos clave, necesarios para la mejor comprensión del presente trabajo de investigación. Asimismo, se lleva a cabo una revisión y un análisis de los trabajos realizados por otros investigadores, a fin de determinar el estado actual del conocimiento, las aplicaciones, los aportes y los avances más relevantes en el campo de los hidrogeles híbridos nanocompuestos de CS/PVA y MWCNTs.

1.1 HIDROGELES

Los hidrogeles son redes macromoleculares, reticuladas o entrecruzadas, capaces de absorber grandes cantidades de líquido sin disolverse, son permeables al oxígeno, poseen una estructura suave y elástica, y presentan una baja tensión interfacial con el agua o fluidos biológicos [41, 42]. Están compuestos por cadenas poliméricas con grupos hidrófilos (principalmente grupos: hidroxilo -OH, amidas -CONH₂, ácidos carboxílicos -COOH y ácidos sulfónicos -SO₃H), las cuales forman una red tridimensional al unirse entre ellas a través de enlaces covalentes, interacciones secundarias débiles o, simplemente, mediante su enredo [43].

Durante los últimos años, el uso de hidrogeles en diversas áreas de la industria y la ciencia ha ido ganando gran popularidad debido a las propiedades únicas que presentan. Su uso se extiende desde pañales y aplicaciones en agricultura, hasta andamios celulares para la regeneración de tejidos biológicos [1].

1.1.1 Clasificación

Los hidrogeles pueden ser clasificados tomando como base diferentes factores, tales como: el método de preparación, su estructura física, su biodegradabilidad, las cargas iónicas de las macromoléculas, la presencia de partículas al interior de la red polimérica, el tipo de entrecruzamiento y la naturaleza de los polímeros que los conforman, entre otras. No obstante, para este trabajo de investigación son de mayor relevancia las tres últimas: el tipo de entrecruzamiento de la red polimérica, la presencia de partículas en su matriz y la naturaleza de los polímeros que conforman el hidrogel.

1.1.1.1 Por el tipo de entrecruzamiento

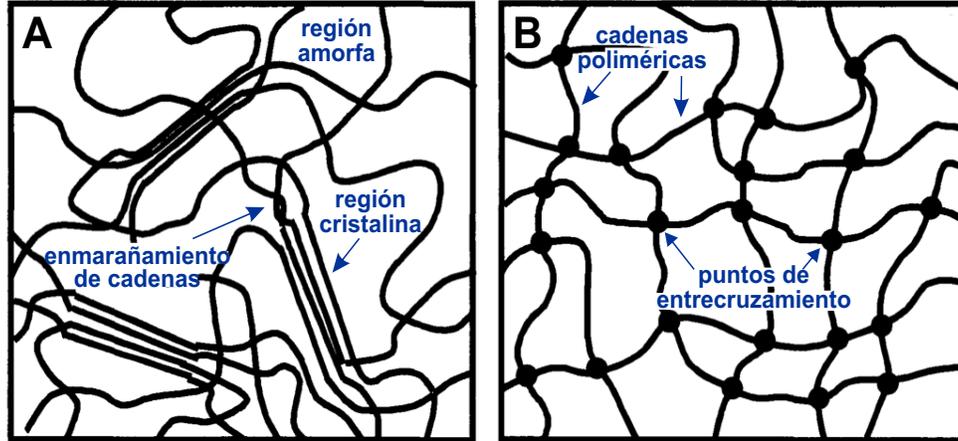


Figura 1.1 Representación esquemática de la red polimérica de un hidrogel: A) Físicamente entrecruzado, B) Químicamente entrecruzado. (Imagen modificada de [44])

En los hidrogeles, la reticulación o entrecruzamiento de la red polimérica constituye una forma de mejorar las propiedades fisicoquímicas del material, brindándole una mayor estabilidad y evitando que se disuelva al ser sometido a condiciones húmedas por prolongados periodos de tiempo. Así, el entrecruzamiento puede llevarse cabo a través de procesos químicos o físicos; de manera que, dependiendo del método utilizado, los hidrogeles se pueden clasificar en hidrogeles químicos o irreversibles, o bien en hidrogeles físicos o reversibles [44].

En los hidrogeles físicos o reversibles (Figura 1.1 A), la unión entre cadenas se logra a través de procesos físicos, tales como: cambios de temperatura, aplicación de esfuerzos mecánicos o exposición a radiaciones electromagnéticas (ultravioleta o gamma). Así, en este tipo de hidrogeles la red polimérica está conformada por enlaces secundarios débiles que no son completamente estables (i.e. fuerzas de van der Waals, puentes de hidrógeno, interacciones electrostáticas, enmarañamiento físico entre cadenas, formación de regiones cristalinas, entre otras), y por ende pueden ser fácilmente disueltos si se altera la temperatura, el pH y/o la fuerza iónica del medio en el que se encuentren inmersos [41, 43-45].

Por el contrario, en los hidrogeles químicos o irreversibles (Figura 1.1 B) el entrecruzamiento de las cadenas poliméricas se debe a la acción de moléculas bifuncionales o multifuncionales de bajo peso molecular, las cuales son capaces de reaccionar químicamente con los grupos funcionales presentes en las cadenas poliméricas, formando enlaces covalentes entre ellas [43]. De esta manera, los hidrogeles químicos poseen una estructura mucho más estable y no pueden ser disueltos en agua u otros disolventes a menos que los enlaces covalentes sean rotos. Entre los entrecruzantes químicos más utilizados para la síntesis de este tipo hidrogeles se encuentran el formaldehído, la epíclorhidrina, el borato de sodio y el glutaraldehído [46].

1.1.1.2 Por la naturaleza de los polímeros que conforman la red polimérica

Asimismo, de acuerdo con la naturaleza de las macromoléculas que conforman su red polimérica, los hidrogeles pueden clasificarse en hidrogeles naturales, hidrogeles sintéticos o hidrogeles híbridos.

Por un lado, los polímeros sintéticos son atractivos para su uso en diversas áreas debido a que sus propiedades mecánicas, estructurales y fisicoquímicas son fácilmente controlables y reproducibles en el laboratorio a través de la modificación de la estructura química del polímero precursor (i.e. peso molecular, sustituyentes de la cadena principal, arreglo estereoquímico de la molécula, quiralidad, entre otros) [47]. Además, estos polímeros poseen una mejor estabilidad térmica y mayores propiedades mecánicas (deformaciones >250% y módulos elásticos del orden de 1×10^9 Pa) en comparación con algunos polímeros naturales. No obstante, la mayoría de ellos no promueven la adhesión celular, no se degradan bajo condiciones fisiológicas y pueden incluir residuos de iniciadores u otros componentes o impurezas capaces de alterar y comprometer el crecimiento celular [48]. Entre los polímeros sintéticos más usados en la formación de hidrogeles sintéticos se encuentran: la poliacrilamida, el polietilenglicol, el poli(óxido de etileno), los polifosfacenos, el poli(fumarato de propileno) y el poli(alcohol vinílico) (PAM, PEG, PEO, PPZ, PPF y PVA, por sus acrónimos en inglés respectivamente) [47, 49].

Por otro lado, a diferencia de los polímeros sintéticos, los polímeros de origen natural se han utilizado con mayor frecuencia como andamios celulares debido a que algunos de ellos forman parte de la matriz extracelular, o bien poseen estructuras químicas similares a las de algunos de sus componentes; además, la gran mayoría de estos polímeros son biocompatibles, degradan bajo condiciones fisiológicas y promueven la interacción celular [47]. Sin embargo, la principal desventaja que presentan es que, generalmente, sus propiedades mecánicas (i.e. deformaciones <100% y módulos elásticos del orden de 1×10^3 Pa) resultan insuficientes para ciertas aplicaciones (i.e. andamios para la regeneración de piel, ligamento o cartílago; membranas de adsorción, etc.), aunado a que sus propiedades químicas y físicas suelen exhibir variaciones de un lote a otro. Algunos de los polímeros naturales más utilizados en la formación de hidrogeles incluyen proteínas como la colágena y la gelatina; glicosaminoglicanos como el ácido hialurónico y el sulfato de condroitina; o bien, polisacáridos como la celulosa, el alginato, la agarosa y el quitosano (CS) [49].

La combinación de polímeros naturales y sintéticos ha dado lugar a una nueva clase de hidrogeles denominados híbridos, los cuales integran las virtudes de cada uno de sus componentes, cuando estos se mezclan en la proporción adecuada [48]. Así, los hidrogeles híbridos presentan propiedades físicas, químicas y biológicas más adecuadas para su uso en un

mayor número de aplicaciones biomédicas (i.e. sustitutos de piel, andamios celulares para la regeneración de tejido conjuntivo, biosensores, transportadores de fármacos, entre otros), que sus componentes individuales [1]. De esta manera, durante los últimos años, la mezcla de CS con PVA ha sido una de las más estudiadas en la formación de hidrogeles híbridos, esto debido a la amplia disponibilidad de ambos polímeros, bajo precio, buena procesabilidad y a la excelente sinergia de propiedades que se obtiene al mezclarlos en diferentes proporciones.

1.1.1.3 Por el tipo de partículas embebidas en su red polimérica

Tanto el entrecruzamiento de la red polimérica, como la mezcla de polímeros naturales con polímeros sintéticos son dos de los métodos frecuentemente utilizados para lograr la estabilidad de los hidrogeles en ambientes húmedos e incrementar sus propiedades térmicas y mecánicas; no obstante, para ciertas aplicaciones, esto aún resulta insuficiente. Debido a ello, durante las últimas décadas, científicos e investigadores han llevado a cabo una gran cantidad de estudios buscando rediseñar y desarrollar nuevos hidrogeles con propiedades únicas a través del uso de nanopartículas, dando lugar así a los denominados hidrogeles nanocompuestos [50].

Los hidrogeles nanocompuestos son matrices poliméricas, reticuladas o entrecruzadas, que alojan en su interior partículas o estructuras, orgánicas o inorgánicas, de dimensiones nanométricas (<100 nm) [51]. Debido a su tamaño, las nanopartículas poseen una mayor área superficial por unidad de volumen, lo cual genera una enorme área interfacial con el hidrogel y permite la transmisión efectiva de esfuerzos entre las fases, incrementando significativamente las propiedades térmicas y mecánicas del material.

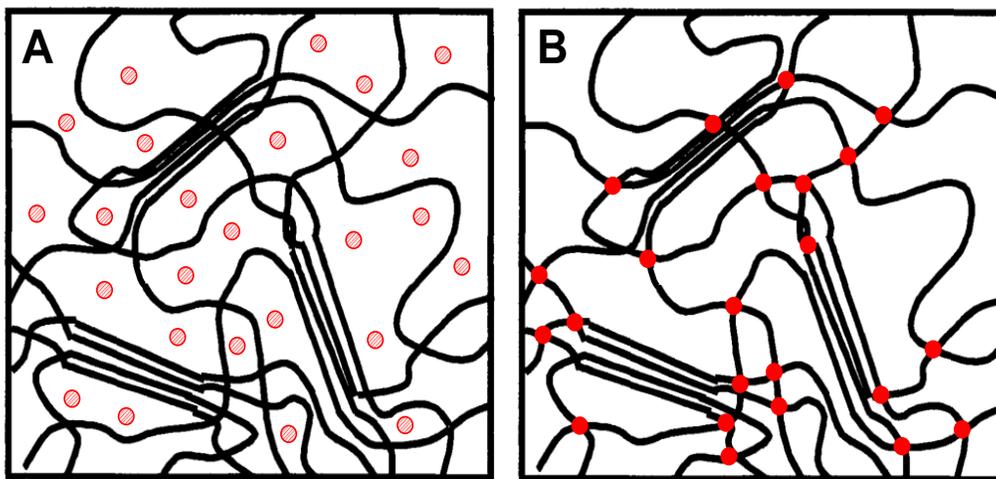


Figura 1.2 Representación esquemática de la red polimérica de un hidrogel nanocompuesto. A) Las nanopartículas se encuentran dispersas en la matriz polimérica, a fin de conferir propiedades adicionales (mecánicas, químicas, eléctricas, biológicas u ópticas) al hidrogel. B) Las nanopartículas, al estar funcionalizadas, actúan como agentes entrecruzantes y generan una red macromolecular a través de la unión de dos o más cadenas.^(Imagen modificada de [44])

Asimismo, las nanopartículas también pueden ser utilizadas para conferir propiedades adicionales (químicas, eléctricas, ópticas o magnéticas) al hidrogel (Figura 1.2 A); para integrar otras macromoléculas a la matriz polimérica; o bien, si se encuentran funcionalizadas, pueden actuar como agentes entrecruzantes y formar enlaces covalentes entre las cadenas, generando una red polimérica tridimensional (Figura 1.2 B) [19]. Así, para que los hidrogeles sean estables y efectivamente sus propiedades se potencien, es necesario que las nanopartículas se encuentren dispersas de forma homogénea en la matriz polimérica.

Generalmente, los hidrogeles nanocompuestos son cargados con nanopartículas inorgánicas (i.e. plata, oro, níquel, sílice, óxidos de hierro, yoduro de bismuto y cobalto, entre otras) y su uso, comúnmente, es como biosensores, transportadores de fármacos, filtros electroquímicos, actuadores en microfluídica, dispositivos de separación y como agentes con propiedades antibacterianas [19]. No obstante, en la mayoría de los casos, se requieren altas concentraciones de dichas nanopartículas para lograr las propiedades deseadas, lo cual incrementa el costo del material y hace difícil su procesabilidad. Así, con la finalidad de solventar dicho problema y otorgar propiedades mecánicas, químicas, ópticas y/o eléctricas adicionales a los hidrogeles, utilizando bajas concentraciones de partículas, durante los últimos años, el uso de nanotubos de carbono (CNTs) ha ido ganando gran interés [26, 52].

Actualmente, dos de los polímeros más utilizados en la formación de hidrogeles híbridos debido a sus excelentes propiedades, amplia disponibilidad, bajo precio y buena procesabilidad son el quitosano (CS) y el poli(alcohol vinílico) (PVA). Frecuentemente, los hidrogeles híbridos de CS/PVA son propuestos para su uso como liberadores de fármacos (5-fluorouracilo¹, nano insulina, dexametasona²) [2, 53, 54], como andamios celulares para la regeneración de: piel, hígado, cartílago y vasos sanguíneos [5, 55-58], como marcadores fluorescentes en radiomedicina [13], o incluso como membranas de adsorción [59]. De manera que, algunas de estas aplicaciones requieren que el hidrogel mantenga su estabilidad mecánica y estructural por prolongados periodos de tiempo una vez que es hidratado; razón por la cual, generalmente, son químicamente entrecruzados con glutaraldehído, o como se propone en este trabajo de investigación, mediante el uso de genipin. Asimismo, se ha visto que la incorporación de CNTs en su matriz polimérica permite optimizar su estabilidad térmica y su módulo elástico [29, 60]. Dado que estos hidrogeles constituyen el eje central del presente trabajo de investigación, en las siguientes secciones se detallan las características y propiedades de cada uno de los componentes que los conforman (i.e. polímeros, agentes entrecruzantes y nanopartículas).

¹ Antimetabolito usado en el tratamiento de cáncer de piel.

² Inmunosupresor y antiinflamatorio.

1.2 QUITOSANO

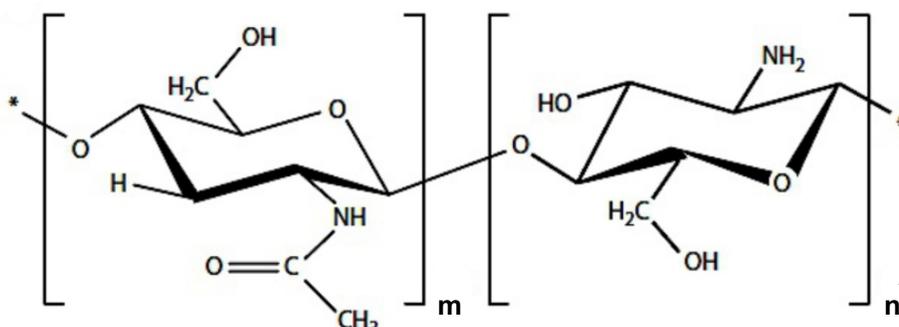


Figura 1.3 Estructura química del quitosano parcialmente desacetilado. A la izquierda se encuentra la unidad N-acetil glucosamina y a la derecha la unidad N-glucosamina. Esta última se presenta en mayor proporción que la unidad acetilada y su concentración dependerá del grado de desacetilación del CS.

El quitosano (CS, por su acrónimo en inglés *chitosan*) es un polímero natural, lineal, semicristalino, constituido por unidades repetidas de N-acetil-2-amino-2-desoxi-D-glucosa (unidades N-acetil glucosaminas) y 2-amino-2-deoxi-D-glucosa (unidades N-glucosaminas), unidas mediante enlaces glucosídicos β-(1,4) (Figura 1.3) [61]. Se obtiene a partir de la desacetilación parcial de la quitina, la cual se encuentra presente en el exoesqueleto de los artrópodos e insectos y en la mayoría de los hongos y algas, constituyéndose así como el segundo polisacárido más abundante en la naturaleza después de la celulosa [49, 61].

La relación molecular entre las unidades N-glucosaminas / N-acetil glucosaminas se define como el grado de desacetilación (DA) del CS y se expresa en forma de porcentaje, siendo este un indicador de la cantidad de grupos amino libres capaces de protonarse ($-NH_2 \rightarrow -NH_3^+$) e interactuar con moléculas o estructuras cargadas negativamente (i.e. iones metálicos, lípidos, proteínas, ácidos nucleicos, glicosaminoglicanos aniónicos³ (GAGs) o membranas celulares) [62]. De igual modo, el grado de DA influye en las propiedades fisicoquímicas del CS como la solubilidad, cristalinidad, viscosidad, floculabilidad, capacidad de intercambio iónico, reactividad y respuesta celular, entre otras [61-63]. De acuerdo con lo reportado en la literatura, dado que el 100% de la desacetilación de la quitina nunca se logra, el CS debe poseer un grado de DA entre el 56% y el 99% para ser considerado como tal [64, 65].

El CS es un polímero natural, biocompatible y biodegradable con propiedades antibacterianas, floculantes, bioadhesivas, cicatrizantes y antitumorales [61]; contiene una alta densidad de cargas y estructuralmente es similar a los GAGs presentes en la matriz

³ Biomoléculas estructurales presentes en el tejido conectivo, epitelial y óseo, así como en la matriz extracelular. Presentan una elevada densidad de carga eléctrica negativa y están compuestas por polisacáridos lineales, no ramificados [66].

extracelular (MEC) [49, 61]. La ventaja del CS sobre otros polisacáridos como la celulosa, el almidón o el agar se atribuye no sólo a sus excepcionales características, sino también a su estructura química, la cual, permite realizar modificaciones específicas sin grandes dificultades gracias al grupo amino (-NH₂) presente en el carbono dos de las unidades N-glucosaminas [62].

Debido a todas estas magníficas propiedades, durante la última década la comunidad científica ha puesto especial interés en el estudio del CS para su uso en distintas aplicaciones biomédicas, cosméticas, ecológicas e industriales. Así, en el área industrial y ecológica, el CS se ha usado en el tratamiento de aguas residuales como floculante de iones metálicos y diversos colorantes [6, 7], como electrodo en diversos tipos de celdas de energía [66] e incluso como empaque de alimentos y recubrimiento de semillas [67, 68]. De igual forma el CS es ampliamente utilizado en diversas aplicaciones biomédicas debido a su capacidad para ser degradado por las enzimas lisosomales presentes en el cuerpo; de manera que, entre dichas aplicaciones destacan: su uso como recubrimiento en la fabricación de suturas [61], sustitutos dérmicos [48], regeneración de hueso [48], cartílago [62], nervios y vasos sanguíneos [48]; agente liberador de fármacos para el tratamiento de enfermedades cardiovasculares [69], diabetes [70] y cáncer [61].

Los hidrogeles de CS pueden ser fácilmente elaborados en forma de membranas, esponjas, microesferas, nanoesferas y fibras [68]. Se ha reportado que el entrecruzamiento químico del CS mediante diisocianatos, dialdehídos, epíclorhidrina, glutaraldehído o genipin, permite la formación de hidrogeles estables, insolubles y cristalinos [71-74]. No obstante, estos hidrogeles aún continúan siendo frágiles para su uso en ciertas aplicaciones, por lo que mezclar el CS con polímeros sintéticos, entre los que destaca el PVA, ha sido una forma interesante de optimizar sus propiedades mecánicas (i.e. porcentaje de deformación y esfuerzo a la tracción) y ampliar su campo de aplicaciones.

1.3 POLI(ALCOHOL VINÍLICO)

El poli(alcohol vinílico) o PVA por su acrónimo en inglés (Figura 1.4), es un polímero sintético, lineal, semicristalino, biocompatible y biodegradable, obtenido mediante la hidrólisis total o parcial del poli(acetato de vinilo), un polímero de origen sintético utilizado para producir adhesivos, pinturas o recubrimientos para alimentos [75]. El PVA es reconocido por ser un polímero altamente hidrófilo con excelentes propiedades físicas y químicas, las cuales dependen principalmente de su peso molecular y porcentaje de hidrólisis. Es soluble en disolventes polares tales como agua, dimetilsulfóxido, acetamida, glicol y dimetilformamida; su solubilidad en agua

depende del contenido residual de grupos acetilo ($-\text{COCH}_3$), de tal forma que el PVA completamente hidrolizado únicamente se disuelve en agua caliente ($>75\text{ }^\circ\text{C}$), mientras que el PVA con un 70% y 80% de hidrólisis puede disolverse en agua a temperatura ambiente [76]. Sus principales usos en la industria se encuentran en la producción de adhesivos, bolsas, fertilizantes, emulsificantes para cosméticos y lentes de contacto.

La alta hidrofiliidad y versatilidad del PVA se debe al grupo hidroxilo ($-\text{OH}$) presente en su unidad de repetición (Figura 1.4), el cual permite el injerto de otras cadenas de PVA, o bien de otros polímeros. Asimismo, el PVA puede formar hidrogeles al entrecruzar sus grupos hidroxilo con moléculas de diisocianato de difenilmetano, glicoxal, ácido dicarboxílico, epíclorhidrina o glutaraldehído [47, 49, 75, 77]. Dependiendo del entrecruzante utilizado y de su concentración, se formarán hidrogeles con distintas propiedades físicas y químicas. Sin embargo, el principal inconveniente en el uso de tales agentes entrecruzantes es su toxicidad, ya que la biocompatibilidad de los hidrogeles se ve comprometida debido a la posible liberación de moléculas remanentes de entrecruzante tras la gelificación [75].

Debido a su baja citotoxicidad, buena elasticidad y alta hidrofiliidad, los hidrogeles de PVA se han utilizado en ingeniería de tejidos para la regeneración de cartílago articular, páncreas y formación de hueso [49, 75, 78]. Dado que, se ha reportado que los hidrogeles de PVA no promueven la adhesión celular y no se degradan bajo la mayoría de las condiciones fisiológicas, cuando su aplicación está encaminada a la regeneración de tejidos, el PVA comúnmente es utilizado junto a otros polímeros de origen natural [68, 75].

Debido a ello, actualmente, diversos grupos de investigación alrededor del mundo se encuentran trabajando en la optimización de este tipo materiales. Así, como ya se ha mencionado anteriormente, una de las formas más factibles de obtener hidrogeles híbridos de CS/PVA estables, insolubles y resistentes a una combinación de esfuerzos mecánicos implica el uso de agentes químicos entrecruzantes como lo son el glutaraldehído o el genipin, o bien de nanopartículas como los nanotubos de carbono.

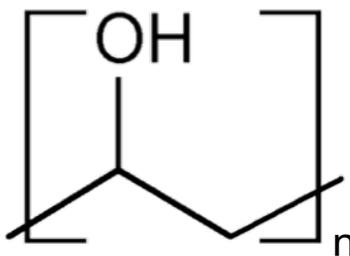


Figura 1.4 Estructura química de la unidad repetida del poli(alcohol vinílico).

1.4 GLUTARALDEHÍDO

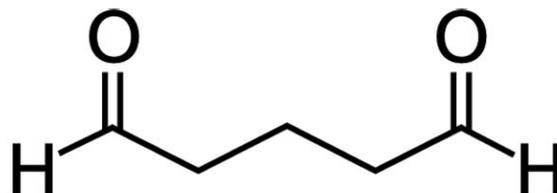


Figura 1.5 Estructura química de la molécula de glutaraldehído.

El glutaraldehído (GA, por su acrónimo en inglés *glutaraldehyde*), Figura 1.5, es un dialdehído alifático de apariencia oleosa y bajo peso molecular, miscible en agua, alcohol y solventes orgánicos [14]. Debido a su amplio espectro de actividad, rápida acción y nula corrosión sobre metales, elastómeros y plásticos, es usado como desinfectante y esterilizante químico de equipo médico e instrumental odontológico y de laboratorio; como agente fijador de tejidos biológicos en histología y microscopía; y como preservante químico en el tratamiento de aguas [79].

Asimismo, el GA es ampliamente utilizado como agente entrecruzante en la fabricación de válvulas cardiacas elaboradas a partir de pericardio bovino, así como en la síntesis de hidrogeles. Los grupos aldehído (-CH=O) presentes en su molécula son altamente reactivos y pueden formar enlaces covalentes con otras sustancias o grupos funcionales como las aminas primarias (-NH₂), los péptidos, las guanidinas, las aminas secundarias (-NH) o los hidróxilos (-OH); siendo este el orden de preferencia [80]. Así, en la mezcla polimérica CS/PVA, el GA es capaz de reaccionar tanto con los grupos funcionales del CS (-NH₂ y -OH) como con los del PVA (-OH), buscando reaccionar en primera instancia con las aminas primarias libres y posteriormente con los hidróxilos para generar una red tridimensional completamente estable.

A diferencia de otros aldehídos comúnmente utilizados en la síntesis de hidrogeles (i.e formaldehído y paraformaldehído), el GA es el agente de reticulación utilizado por excelencia debido a su gran efectividad y a su capacidad de formar enlaces más estables tanto química, como física y térmicamente. Además, reacciona relativamente rápido, es económico y de fácil acceso [14]. No obstante, una vez formados los hidrogeles, se debe tener la certeza de la ausencia de trazas de GA en el material, pues se ha reportado que a largo plazo el GA induce la calcificación de los implantes, inhibe la proliferación celular, promueve la muerte celular endotelial y produce una respuesta inflamatoria severa [14, 80]. Debido a estas y otras razones, actualmente existe una creciente demanda de agentes entrecruzantes que sean capaces de formar hidrogeles fisicoquímicamente estables por prolongados periodos de tiempo, biocompatibles y que presenten muy poca o nula citotoxicidad.

1.5 GENIPIN

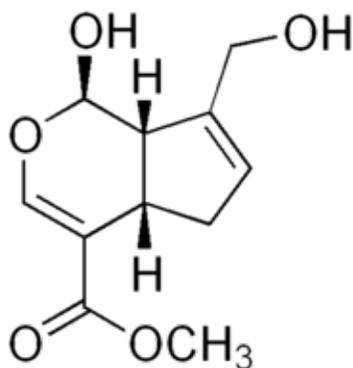


Figura 1.6 Estructura química de la molécula de genipin.

El genipin (GEN, por su acrónimo en inglés *genipin*), Figura 1.6, es una aglicona obtenida a través de la hidrólisis enzimática de la geniposida, un glicósido iridoide presente en los frutos de la *Gardenia Jasminoides Ellis* o de la *Genipa Americana* [80, 81].

Es un compuesto biodegradable, soluble en agua, metanol, etanol o acetona [81]. En la industria alimentaria, es usado como espesante y colorante (azul de Huito); mientras que, en la medicina tradicional china, se emplea en el tratamiento de la diabetes y trastornos hepáticos; además, se le atribuyen propiedades antiinflamatorias, antidepresivas, antitrombóticas, anticancerígenas, diuréticas, antibacterianas y neuroprotectoras [18, 82, 83]. Asimismo, el genipin puede actuar como un entrecruzante bifuncional, siendo capaz de reaccionar espontáneamente con las aminas primarias ($-NH_2$) de péptidos, aminoácidos, proteínas o polisacáridos como la gelatina y el CS [81, 82]. Los materiales entrecruzados con este agente natural exhiben una coloración azul, indicando que la reacción de entrecruzamiento se llevó a cabo.

Estudios recientes en el uso del genipin como agente entrecruzante del CS han demostrado que estos materiales presentan un módulo elástico y una resistencia a la tracción última comparable con la de aquellos hidrogeles entrecruzados mediante GA, una citotoxicidad menor a la de los hidrogeles entrecruzados utilizando compuestos epóxidos o aldehídos (i.e. formaldehído y glutaraldehído), una rapidez de degradación *in vivo* más lenta y una menor respuesta inflamatoria [16-18, 80, 81, 84]. Así, la toxicidad del GEN es menor a la de otros agentes entrecruzantes comúnmente utilizados, llegando a ser entre 5,000 – 10,000 veces menos citotóxico que el GA [85]. De esta manera, el genipin se perfila como el agente entrecruzante ideal para la formación de hidrogeles de CS/PVA con aplicaciones potenciales en ingeniería de tejidos, liberación controlada de fármacos o para su uso en biosensores.

Además de tratar de optimizar las propiedades fisicoquímicas de los hidrogeles híbridos sin comprometer su biocompatibilidad, también se está buscando añadir funcionalidades adicionales a este tipo de materiales a través de la incorporación de distintos tipos de nanopartículas a su red polimérica. De modo que, como se ha comentado anteriormente, en este trabajo existe un interés particular en los nanotubos de carbono.

1.6 NANOTUBOS DE CARBONO

Los nanotubos de carbono (CNTs, por su acrónimo en inglés *carbon nanotubes*) son estructuras cilíndricas, hidrófobas, de dimensiones nanométricas, cuyas paredes están conformadas por átomos de carbono enlazados entre sí covalentemente y organizados en un patrón regular hexagonal (Figura 1.7) [50, 52]. Al igual que el diamante, el grafeno o los fullerenos, los CNTs son formas alotrópicas del carbono y su estructura puede proceder de una o varias láminas de grafeno enrolladas sobre sí mismas.

En los últimos años, los CNTs han captado la atención de los investigadores y de la industria debido a las excepcionales propiedades ópticas, eléctricas, térmicas (estabilidad térmica $>700\text{ }^{\circ}\text{C}$), químicas y mecánicas (módulos elásticos del orden de TPa y resistencia a la tracción última $50 - 500\text{ GPa}$) que presentan [86]. Se han aplicado en vehículos aeroespaciales, uniformes militares, huesos y músculos artificiales, así como en dispositivos biomédicos [87].

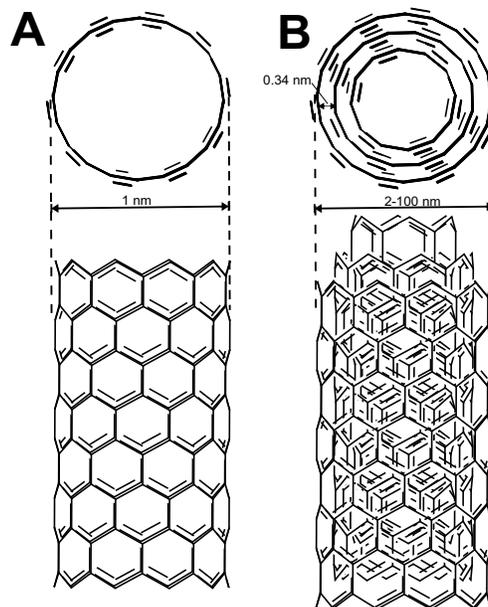


Figura 1.7 Esquema representativo de la estructura física que presentan los nanotubos de carbono (CNTs). A) Nanotubo de carbono de pared sencilla (SWCNTs), B) Nanotubo de carbono de pared múltiple (MWCNTs).

1.6.1 Tipos de CNTs

Existen diferentes tipos de CNTs en función de las capas de grafeno que los conforman. Así, estos pueden ser nanotubos de carbono de pared sencilla (SWCNTs, por su acrónimo en inglés de *single-walled carbon nanotubes*), o bien en nanotubos de carbono de pared múltiple (MWCNTs, por su acrónimo en inglés de *Multi-Walled Carbon Nanotubes*).

Los SWCNTs (Figura 1.7 A) presentan una sola estructura cilíndrica flexible con diámetro de 1 nm y longitudes del orden de centímetros. Poseen propiedades mecánicas y eléctricas superiores a las de los MWCNTs; no obstante, uno de los mayores inconvenientes que presentan es que difícilmente pueden ser distribuidos de forma homogénea en las matrices poliméricas, lo cual dificulta su uso en ciertas aplicaciones, en especial las biológicas [52, 68].

Por otro lado, los MWCNTs pueden aparecer como un conjunto coaxial de SWCNTs, o como una sola hoja de grafito plegada sobre sí misma en forma de rollo (Figura 1.7 B). Los MWCNTs son más pequeños y rígidos que los SWCNTs, sus cilindros están separados entre sí ~ 0.34 nm y su diámetro varía entre los 2 nm y los 100 nm, mientras que su longitud puede llegar a ser de varias decenas de μm [68]. Se ha reportado que, en comparación con los SWCNTs, los MWCNTs son más fáciles de producir, presentan una menor toxicidad y se dispersan más fácilmente en disoluciones acuosas [52]. No obstante, la estructura exacta de todos los MWCNTs presentes en un sistema puede llegar a ser desconocida debido a su mayor complejidad y variedad.

De esta manera, los CNTs pueden ser la base para la formación de nuevos materiales, lo cual se puede lograr mediante dos técnicas: o bien agrupándolos para crear fibras con diámetro nanoscópico, o bien mezclándolos con otros materiales para formar nanocompuestos. Así, al combinar las excepcionales propiedades de los CNTs con las propiedades de los hidrogeles, es posible desarrollar polímeros nanocompuestos con: excelentes propiedades térmicas, alta conductividad, alta estabilidad electroquímica, baja densidad de masa, alta resistencia mecánica, flexibles y elásticos, los cuales pueden ser usados en una amplia gama de aplicaciones [50]. Respecto a la influencia que los CNTs tienen sobre la capacidad de adhesión y proliferación de las células, cuando este tipo de hidrogeles son usados como andamios celulares, existen diversos resultados; por un lado, algunos trabajos señalan que dichas nanopartículas contribuyen a la adhesión celular, mientras que otros apuntan que los CNTs actúan en su detrimento y promueven la muerte celular debido a que promueven la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS, por su acrónimo en inglés) y la lipoxidación de la membrana con su posterior daño [50, 52].

El uso de CNTs como elementos/agentes de refuerzo es un método frecuentemente utilizados para optimizar las propiedades mecánicas, eléctricas y térmicas de los hidrogeles. A fin de lograr dicho objetivo, es necesario que los CNTs se encuentren dispersos de manera

homogénea a lo largo de la matriz polimérica, de forma que se halle en contacto con toda la superficie de los CNTs, formando una fuerte interfase a través de la cual se puedan transmitir de manera efectiva los esfuerzos mecánicos y térmicos [51]. Asimismo, se ha encontrado que, además de mejorar las propiedades mecánicas (i.e. módulo elástico y resistencia a la tracción), los CNTs pueden conferirle a los hidrogeles otras propiedades adicionales, tal como su respuesta ante estímulos externos (i.e. ópticos, térmicos, eléctricos o magnéticos, entre otros) [19]. Tomando en consideración todo esto, así como las ventajas que los MWCNTs presentan frente a los SWCNTs, en este trabajo de investigación, los MWCNTs fueron elegidos como elementos de refuerzo de las matrices de CS/PVA, buscando además conferirles nuevas propiedades físicas que permitan ampliar el abanico de aplicaciones de dichos hidrogeles híbridos.

1.7 ESTADO DEL ARTE

En esta sección se lleva a cabo una revisión de los artículos y trabajos más relevantes entorno al estudio de los hidrogeles híbridos de CS/PVA químicamente entrecruzados y/o nanocompuestos, mediante el uso de MWCNTs. Dicha revisión permitirá plantear un panorama general del estado actual del conocimiento con el objetivo de vislumbrar las necesidades y los retos aún presentes en el área de estudio de dichos materiales; lo cual, permitirá evidenciar de manera contundente la relevancia de los aportes científicos y tecnológicos del presente trabajo de investigación.

Para su mejor comprensión, las investigaciones y trabajos examinados se han dividido en tres grupos:

- *Mezcla CS/PVA.* En donde se lleva a cabo una revisión de la proporción a la cual se deben de mezclar cada uno de los homopolímeros, a fin de garantizar su miscibilidad.
- *Hidrogeles de CS/PVA químicamente entrecruzados.* Aquí se hace un esbozo de los entrecruzantes y concentraciones frecuentemente utilizados en la mezcla CS/PVA.
- *Hidrogeles de CS/PVA cargados con MWCNTs.* En donde se examinan las principales aplicaciones de estos hidrogeles y se hace un acercamiento al efecto opto-mecánico que han presentado otras matrices poliméricas.

1.7.1 Mezcla CS/PVA

Actualmente, la modificación de las propiedades fisicoquímicas de los hidrogeles mediante la mezcla de dos o más polímeros, a fin de obtener materiales con propiedades más idóneas para una determinada aplicación, es una práctica común. Así, las mezclas entre polímeros naturales y sintéticos son extensivamente investigadas porque exhiben propiedades superiores a las de sus homopolímeros y, en la mayoría de los casos, pueden ser utilizados como biomateriales biodegradables. Debido a su fácil preparación y a las excelentes propiedades del CS y el PVA, la mezcla CS/PVA es uno de los hidrogeles híbridos más utilizados como agente liberador de fármacos, andamio celular, e incluso como membrana para el tratamiento industrial de aguas residuales a través de la remoción de colorantes o metales pesados [59, 88-90]. Esta mezcla se beneficia del alto porcentaje de deformación alcanzado por el PVA y de la buena resistencia y biocompatibilidad del CS; además, usando las proporciones adecuadas tanto del componente natural como del sintético, la mezcla resultante puede presentar propiedades mecánicas similares a las de algunos tejidos humanos. No obstante, se ha reportado que para que la combinación de ambos polímeros sea particularmente útil, y sus propiedades se potencien, los polímeros deben ser miscibles entre ellos [91].

Tomando en consideración lo anterior, en 2007, Nakano et al. [92] llevaron a cabo uno de los primeros estudios para determinar las interacciones inter e intramoleculares que se producían entre el PVA y el CS al variar la concentración de este último en la mezcla CS/PVA. Ellos reportan que la miscibilidad del CS y el PVA se puede asegurar si los segmentos amorfos de sus cadenas se enredan entre sí produciendo membranas con fuertes interacciones intermoleculares, lo cual se logra una vez que el contenido de PVA en la mezcla es mayor al 50%.

Ese mismo año, Jayaraju et al. [93] estudiaron la miscibilidad entre el CS y el PVA, determinando que ambos polímeros son miscibles cuando la proporción de CS en la mezcla es mayor al 60%, permitiendo así la formación de una red semi-interpenetrada.

Rodrigues et al. [94] observaron que un alto contenido de CS en la red polimérica disminuye la cristalinidad del PVA, mientras que el incrementar la proporción de éste mejora el índice de hinchamiento de los hidrogeles.

Por su parte, El-Hefian et al. (2010) [95] y Kumar et al. (2010) [91] analizaron la mezcla de CS/PVA variando la proporción de este último. Ellos reportan la formación de membranas no porosas y homogéneas, en las cuales a medida que se incrementa el contenido de PVA, el porcentaje de hinchamiento, la flexibilidad y la elasticidad del hidrogel aumentan; obteniéndose las mejores propiedades físicas, químicas y térmicas cuando la concentración de CS en la mezcla polimérica es del 80% volumen/volumen.

Resultados similares a los encontrados por Kumar et al. [91] y El-Hefian [95] et al. fueron reportados por Zhuang et al. [88] en 2012. Estos últimos estudiaron la mezcla de CS/PVA para su posible uso en la regeneración tisular guiada, la cual consiste en reconstruir tejidos mediante el uso de una membrana que actúa como barrera para prevenir la invasión de otros tejidos. En su investigación modificaron las proporciones de CS en la mezcla y determinaron que a cualquier proporción el CS y el PVA eran miscibles, siendo la proporción 3/1 volumen/volumen (CS/PVA) la que mejores propiedades mecánicas presentaba y la que promovía mayor crecimiento celular.

En 2012, Fajardo et al. [59] desarrollaron membranas de CS/PVA para la absorción de plomo (Pb (II)). En su estudio variaron la proporción de CS y PVA (100/0, 70/30, 50/50 y 30/70, CS/PVA masa/masa respectivamente), demostrando, al igual que Zhuang et al. [88], que a cualquiera de esas proporciones es posible obtener una red amorfa con fuertes interacciones intermoleculares entre el CS y el PVA. Por otra parte, las proporciones 70/30 masa/masa y 50/50 masa/masa presentaron un comportamiento similar en su capacidad de hinchamiento, mostraron un comportamiento más deseable para la captura de Pb (II) (>50%) y preservaron sus propiedades físicas y mecánicas tras varios ciclos de uso.

Ke et al. (2017) [89], sintetizaron membranas delgadas de CS/PVA, variando la concentración de CS, a fin de evaluar la miscibilidad entre el CS y el PVA. Los resultados obtenidos muestran que, independientemente de la proporción a la que se mezclen los componentes, existe una buena miscibilidad entre ambos y no se observa una separación de fases; ello debido a la presencia de fuertes interacciones mediante puentes de hidrógeno entre las cadenas de CS y PVA. Asimismo, las membranas con concentraciones (CS/PVA) 50/50 masa/masa y 70/30 masa/masa mostraron una superficie más compacta, homogénea y transparente; lo cual, de acuerdo con lo reportado por los autores, es signo de una mayor miscibilidad entre sus componentes.

Recientemente, en 2018, Figueroa-Pizano et al. [90] prepararon hidrogeles de CS/PVA, a diferentes concentraciones, para liberar fármacos. Ellos encontraron que tanto el índice de hinchamiento como el tamaño de poro de los andamios se ve afectado por el contenido de CS, de tal manera que el CS mejora la capacidad de hinchamiento e incrementa el diámetro de los poros, pero afecta la estabilidad térmica y la capacidad de deformación de los hidrogeles. Así, de acuerdo con sus resultados, el mejor balance entre propiedades mecánicas, tamaño de poro, índice de hinchamiento y velocidad de liberación, se obtiene para los hidrogeles preparados a una concentración 75/25 masa/masa (CS/PVA).

Es evidente que, a pesar de que se ha reportado que el CS y el PVA son miscibles prácticamente a cualquier concentración, una mayor sinergia entre sus propiedades individuales se presenta cuando la proporción de CS es mayor. Así, tomando en consideración todos estos

trabajos y buscando asegurar la formación de una red polimérica con fuertes interacciones intermoleculares que permita la formación de membranas delgadas, con óptimas propiedades físicas, químicas y biológicas, en este trabajo de investigación se decidió trabajar con la mezcla CS/PVA en una proporción 3/1 masa/masa.

1.7.2 Hidrogeles de CS/PVA químicamente entrecruzados

A pesar de la sinergia en las propiedades químicas, térmicas, mecánicas y biológicas que se consigue al mezclar el CS con PVA, los hidrogeles que se obtienen aún son físicamente inestables (i.e. se disuelven) cuando permanecen en condiciones húmedas por prolongados periodos de tiempo; lo cual limita su aplicación en ciertas áreas como la limpieza de aguas residuales o la ingeniería de tejidos. Como se ha detallado anteriormente, una manera de solventar este problema consiste en formar enlaces covalentes entre las cadenas poliméricas a través de la acción de un agente químico entrecruzante, dando lugar así a una red tridimensional que difícilmente será disgregada por las moléculas de líquido atrapadas en ella.

Así, el entrecruzamiento químico de la mezcla CS/PVA ha sido reportado a través de diversos agentes químicos como: la epiclorhidrina [96], el tetraetil ortosilicato [97], los diisocianatos [75], o bien, de manera mucho más frecuente, mediante el uso de glutaraldehído (GA) [2, 10, 12, 13]. A diferencia de otros agentes entrecruzantes, el GA es el entrecruzante por excelencia de la mezcla CS/PVA debido a su bajo costo, gran disponibilidad y alta efectividad para formar enlaces covalentes química y térmicamente más estables, cuando reacciona con proteínas y polisacáridos, [14].

Bahrami et al. [64], en 2003, llevaron a cabo uno de los primeros trabajos en donde se evalúa la influencia del GA sobre las propiedades físicoquímicas y mecánicas de membranas delgadas de CS/PVA al variar la proporción de cada uno de los componentes en la mezcla (i.e. CS, PVA y GA). En su estudio se reporta que el CS puro es más frágil en comparación con el PVA y que a medida que la proporción de PVA se incrementa, las propiedades físicas (i.e. estabilidad térmica, porcentaje de hinchamiento e hidrofiliidad) y mecánicas (i.e. porcentaje de deformación y módulo elástico) del hidrogel se optimizan. Asimismo, reportaron que el GA mejora las propiedades mecánicas del hidrogel, pero modifica su mojabilidad y disminuye la cantidad de agua que es capaz de absorber, dando lugar a un hidrogel menos hidrófilo.

Posteriormente, en 2009, Costa-Junior et al. [5] también estudiaron la mezcla CS/PVA entrecruzada al 1% masa/masa y 5% masa/masa con GA. Sin embargo, a diferencia de Bahrami et al. [64], en su estudio no solo caracterizaron las propiedades mecánicas y estructurales de los hidrogeles, sino que además, los sembraron con la línea celular VERO a fin

de evaluar su biocompatibilidad y citotoxicidad. Ellos encontraron que, a una proporción 1/1 volumen/volumen (CS/PVA) se forma una estructura rígida entre las cadenas de CS/PVA como resultado del balance entre los grupos funcionales amino (-NH₂) e hidroxilo (-OH), y que, a medida que se incrementa la proporción de CS en la mezcla, el entrecruzamiento es mayor debido a la preferencia del GA por los grupos -NH₂ del CS sobre los -OH del PVA o CS. Además, de acuerdo con los resultados de las pruebas de MTT, de secreción de óxido nítrico y los estudios de SEM, todos hidrogeles presentaron buena viabilidad celular y biocompatibilidad independientemente de la concentración de GA utilizada. No obstante, los autores destacan el hecho de que es sumamente necesario neutralizar cualquier traza de GA que pudiese haber quedado atrapada en el hidrogel, a fin de evitar efectos citotóxicos.

He Z. y Xiong L. [10] sintetizaron, en 2012, una serie de hidrogeles de CS/PVA en forma de membranas delgadas variando la proporción de ambos polímeros y entrecruzándolos al 1% masa/masa con GA. Ellos determinaron que estos hidrogeles pueden ser considerados como materiales con aplicaciones potenciales en ingeniería de tejidos debido a su alta hidrofiliidad, nula citotoxicidad, a su compatibilidad con la sangre y a su capacidad de mantener el linaje de las células sembradas sobre ellos (fibroblastos dérmicos de rata), siendo la proporción 3/2 masa/masa (PVA/CS) la más prometedora para ello.

También en 2012, Zu et al. [2] sintetizaron hidrogeles de CS/PVA entrecruzados al 3.6% masa/masa con GA para liberar nano-insulina de manera transdérmica. Los resultados de su estudio demuestran que estos hidrogeles son un sistema prometedor para el tratamiento no invasivo de la diabetes, ya que las membranas obtenidas muestran ser resistentes, presentan una estructura altamente porosa (tamaño de poro: ~5 μm), son térmicamente estables y la cinética de liberación del fármaco resulta aceptable (4.421 μg/(cm² h)).

Islam et al. [97], en 2013, sintetizaron hidrogeles de CS/PVA entrecruzados con tetraetil ortosilicato (TEOS) para ser utilizados como liberadores de progesterona. En sus estudios encontraron que la cristalinidad del hidrogel aumenta a medida que la proporción de TEOS en la mezcla se incrementa, hasta llegar a un contenido máximo de TEOS (6% masa/masa) a partir del cual la cristalinidad decrece; de acuerdo con los autores, esto se debe a la disminución en el grado de libertad de las cadenas poliméricas para plegarse sobre sí mismas y formar regiones cristalinas. Los hidrogeles de CS/PVA/TEOS no mostraron ser citotóxicos, ya que los fibroblastos humanos sembrados sobre ellos fueron capaces de proliferar. Por otro lado, Islam et al. observaron que la velocidad de liberación de la progesterona dependía del pH del medio en el que se encontraran los hidrogeles (siendo mayor en un pH ácido), de modo que este fenómeno podía ser utilizado para controlar la liberación del fármaco.

En 2014, nuestro grupo de investigación trabajó con la mezcla CS/PVA entrecruzada químicamente con epíclorhidrina, a fin de obtener hidrogeles híbridos en forma de membranas delgadas para su uso como andamios celulares en la regeneración de cartílago elástico. Los hidrogeles obtenidos presentaron un módulo elástico de $9 \text{ MPa} \pm 1 \text{ MPa}$, similar al cartílago elástico humano. Una vez que se corroboró la ausencia de trazas de epíclorhidrina en las muestras, las membranas fueron sometidas a pruebas de viabilidad y citotoxicidad, demostrándose que los condrocitos auriculares eran capaces de adherirse y proliferar sobre el hidrogel, perfilándose así como un material prometedor para la formación de estructuras auriculares mediante ingeniería de tejidos [4].

Jiang et al. [98], en 2016, sintetizaron un hidrogel termo-sensitivo de CS/PVA (1/1 mol/mol) entrecruzado con GA para la liberación intratumoral de paclitaxel, un fármaco utilizado en el tratamiento de cáncer de mama, de ovario, de próstata, de pulmón y de esófago, entre otros. Debido al entrecruzamiento con GA, estos materiales formaron una estructura compacta con poros de $\sim 5 \mu\text{m}$, que permitieron mantener la liberación del fármaco por hasta 13 días; exhibieron una actividad antitumoral 3.7 veces mayor a la de los métodos comunes y presentaron una resistencia mecánica 7 veces mayor a la mostrada por hidrogeles de CS puro. De manera que, de acuerdo con estos resultados, los hidrogeles de CS/PVA/GA podrían ser utilizados para la liberación intratumoral de fármacos.

Recientemente, Kocemba y Mucha (2017) [99] también desarrollaron membranas de CS/PVA entrecruzadas con GA para liberar fármacos. En su trabajo variaron la concentración del entrecruzante (0.09 masa/masa - 0.27 masa/masa) y concluyeron que, a medida que la concentración de GA se incrementaba, las membranas se volvían más hidrófobas y el tamaño de poro disminuía; de tal forma que la eficiencia y velocidad de liberación del fármaco dependía del contenido de GA.

A pesar de los buenos resultados mostrados en todas estas investigaciones, la mayoría de los autores señala que, por sí solos, estos agentes químicos utilizados como entrecruzantes son productos citotóxicos (incluso algunos son considerados agentes carcinógenos y mutágenos), por lo que la presencia de trazas en el material podría tener efectos tóxicos directos o reaccionar con otros compuestos para formar derivados tóxicos, comprometiendo así la viabilidad y biocompatibilidad de los hidrogeles de CS/PVA [4, 5, 10, 98-100]. En el caso de polímeros e implantes entrecruzados con GA, se ha reportado que estos inhiben la proliferación celular, inducen la muerte celular endotelial, producen una respuesta inflamatoria severa cuando el GA se encuentra en concentraciones entre 0.01% y 1%, y están implicados en la calcificación de los tejidos circundantes [14, 80]. A pesar de que el papel específico del GA en dicho proceso aún se mantiene incierto, se cree que los grupos aldehído ($-\text{CH}=\text{O}$) del GA que permanecen sin

reaccionar son susceptibles de oxidarse y formar ácido carboxi gamma glutámico, el cual favorece la calcificación [101, 102]

Debido a ello, resulta necesario proporcionar un agente entrecruzante no tóxico, capaz de formar hidrogeles de CS/PVA, estables y biocompatibles, que puedan ser utilizados en una amplia gama de aplicaciones biomédicas, farmacológicas, industriales y ecológicas. Es así que, en este proyecto de investigación, se propone el uso de genipin (GEN) como agente entrecruzante de los hidrogeles híbridos de CS/PVA. De acuerdo con investigaciones previas, concentraciones de genipin entre 0.025% y 1% masa/volumen permiten el entrecruzamiento efectivo del CS sin efectos adversos aparentes [72].

Hasta el momento, el uso de genipin en la mezcla CS/PVA ha sido muy poco explorado y únicamente se conocen un par de trabajos al respecto; en los cuales el estudio y la caracterización de los hidrogeles obtenidos son precarios.

Por un lado, en 2006, Khurma et al. [17] se limitaron a estudiar la cinética de hinchamiento de los hidrogeles de CS/PVA/GEN entrecruzados al 2% mol/mol. Ellos variaron la temperatura y el pH de la disolución en la que se hidratarían las membranas, encontrando que el porcentaje de hinchamiento de los hidrogeles se incrementaba a medida que el pH de la disolución disminuía y la temperatura aumentaba; esto debido a la repulsión y disociación de interacciones secundarias entre las cadenas poliméricas.

Luego en 2010, Bispo et al. [73] estudiaron el sistema CS/PVA usando genipin como agente entrecruzante en una proporción de 0.5% masa/masa y 1%. masa/masa. Ellos caracterizaron los hidrogeles obtenidos únicamente mediante espectroscopía de infrarrojo, cinética de hinchamiento y viabilidad celular. Encontraron que el GEN generaba enlaces covalentes entre los grupos amino del CS y que mostraban una reducción en el hinchamiento a medida que la proporción de CS y GEN se incrementaba, generando una red más rígida y compacta. Además, no hallaron diferencias significativas en la proliferación celular sobre los hidrogeles entrecruzados y sin entrecruzar, o bien entre los entrecruzados al 0.5% y 1%; comprobando la biocompatibilidad y no citotoxicidad de los hidrogeles de CS/PVA/GEN.

Tomando en consideración estos trabajos, es posible vislumbrar que aún hace falta una caracterización más profunda y detallada acerca de la influencia del genipin como agente entrecruzante sobre los parámetros estructurales, comportamiento mecánico, estabilidad térmica, cristalinidad, humectabilidad, cinética de hinchamiento y microestructura de la red polimérica de los hidrogeles híbridos de CS/PVA/GEN, cuya aplicación potencial podría orientarse a la regeneración de tejidos biológicos, liberación controlada de fármacos o bien en la limpieza de aguas. Es por ello que uno de los objetivos que se plantea en este trabajo de investigación consiste en llevar a cabo una caracterización más completa a través de técnicas

espectroscópicas, análisis térmico, pruebas mecánicas de tracción uniaxial e, incluso, mediante el uso de tracción biaxial y técnicas ópticas no intrusivas a fin de evaluar y correlacionar la influencia del GEN sobre el comportamiento macro y micromecánico de los hidrogeles y demás propiedades fisicoquímicas. Así, una buena comprensión de dicha relación permitiría el desarrollo de materiales con propiedades mecánicas y fisicoquímicas específicas que logren satisfacer eficientemente las necesidades de una aplicación particular.

Es importante destacar que hasta el momento tampoco se ha encontrado reporte alguno en el que se estudie de manera simultánea el comportamiento macro y micromecánico bajo tracción biaxial de hidrogeles, membranas delgadas y/o tejidos biológicos.

1.7.3 Hidrogeles de CS/PVA nanocompuestos con MWCNTs

Como se ha comentado anteriormente, la mezcla de diferentes clases de polímeros y el entrecruzamiento de la red polimérica son dos técnicas utilizadas para generar nuevos materiales con características únicas; sin embargo, estas técnicas solamente permiten ligeras mejoras en sus propiedades físicas, lo cual aún resulta insuficiente para ciertas aplicaciones. Buscando mejorar la resistencia y rigidez de los hidrogeles, estos se han impurificado con diferentes tipos de fibras o partículas. La incorporación de CNTs en las matrices poliméricas, incluso a muy bajas concentraciones, permite el mejoramiento análogo de los compuestos; de manera que, se ha reportado que concentraciones entre el 0.1% masa/masa y 2% masa/masa de CNTs, contribuyen a la mejora de sus propiedades mecánicas y eléctricas [21].

Se ha reportado que, a diferencia de otros polímeros, el PVA exhibe fuertes interacciones físicas con los CNTs, de manera que estos son capaces de actuar como agentes nucleantes para formar cristales [103, 104]. Así, de acuerdo con algunos reportes, los hidrogeles nanocompuestos de PVA/CNTs incrementan linealmente su cristalinidad conforme se aumenta la fracción de CNTs en la matriz; de tal forma que, mediante técnicas ópticas se ha encontrado que las cadenas de PVA se alinean de forma paralela a la superficie de los CNTs [104-106]. Dicho fenómeno ha tratado de ser replicado utilizando otras matrices poliméricas, sin obtenerse los mismos resultados. Adicionalmente se ha determinado que, en el PVA, el uso de MWCNTs sin funcionalizar y sin la adición de surfactantes genera un mayor incremento del módulo elástico (~5 veces) [106].

Los hidrogeles híbridos de CS/PVA han sido cargados con CNTs y sintetizados en forma de membrana delgada para su uso, principalmente, como membranas de separación y adsorción de metales pesados u otras sustancias químicas (acetona, benceno, colorantes, enzimas, etc.).

Peng et al. (2007) [26], fueron los primeros en sintetizar membranas de CS/PVA cargados con CNTs. En su estudio, primero recubrieron los MWCNTs con cadenas de CS, de manera que estas se enrollaran a lo largo del eje de los CNTs; posteriormente, los mezclaron con PVA y entrecruzaron la disolución con GA para formar membranas de pervaporación que servirían para separar benceno y ciclohexano de disoluciones acuosas. Peng y colaboradores encontraron que los MWCNTs mejoraban la difusión selectiva de las sustancias, siendo el 2% masa/masa de MWCNTs la concentración óptima de nanopartículas.

Posteriormente, en 2013, Salehi et al. [27, 28] usaron MWCNTs funcionalizados con grupos amino (MWCNTs-NH₂) en membranas de CS/PVA para remover iones de cobre del agua. Ellos reportan que los nanotubos funcionalizados con los grupos amino mejoran la cinética de adsorción de las membranas debido a su afinidad por iones metálicos pesados, siendo la concentración óptima del 1% masa/masa. Adicionalmente, encontraron que el hinchamiento de los hidrogeles se incrementaba al aumentar la concentración de MWCNTs-NH₂.

Yeang et al. [29], por otro lado, estudiaron MWCNTs funcionalizados con PVA (MWCNTs-PVA) para mejorar su dispersión en CS y formar membranas de pervaporación para remover acetona del agua. A medida que la concentración de MWCNTs-PVA se incrementó de igual manera lo hicieron las propiedades mecánicas de las membranas, mejorando su módulo elástico hasta en un 38.9% únicamente con el 0.06% masa/masa de nanopartículas. De la misma manera, la permeabilidad al agua de las membranas mejoró, renunciando ligeramente a su selectividad.

Xu et al. (2015) [107], trabajaron con fibras de CS/PVA/MWCNTs para su uso en la retención de enzimas lacasas; encontrando que los MWCNTs brindan estabilidad a las membranas, remueven eficientemente las enzimas de disoluciones acuosas y generan membranas que pueden reutilizarse en numerosas ocasiones.

En 2017, Mallakpour y Ezhieh [60] sintetizaron membranas nanocompuestas de CS/PVA usando MWCNTs funcionalizados con valina y almidón (MWCNTs-ValS), esto a fin de evitar la formación de conglomerados de CNTs. Sus resultados muestran que la incorporación de MWCNTs-ValS en concentraciones de 1% masa/masa, generan membranas con una dispersión homogénea de nanopartículas, lo cual se traduce en la mejora de su estabilidad térmica. Asimismo, los MWCNTs-ValS mejoraron hasta en un 20% la capacidad de absorción de iones Cd(II) en disoluciones acuosas, respecto a los hidrogeles de CS/PVA sin CNTs.

Recientemente, Abdolrahimi et al. (2018) [108] estudiaron el efecto del ácido acético (utilizado en la disolución del CS) sobre las propiedades de los hidrogeles nanocompuestos de CS/PVA/MWCNTs. Durante el proceso de síntesis fijaron la concentración de MWCNTs (0.7% masa/masa) y variaron la concentración de ácido acético

(1% volumen/volumen - 20% volumen/volumen). Abdolrahimi y colaboradores encontraron que, a medida que la concentración de ácido se incrementaba, los MWCNTs se dispersaban mejor en la matriz polimérica; sin embargo, el hidrogel se volvía mucho más rígido y frágil debido al incremento en la cristalinidad por el exceso de grupos -OH presentes. Así, definieron que la concentración de ácido acético a la cual se presenta el mejor balance entre dispersión e incremento de propiedades ópticas y mecánicas se da al 1% volumen/volumen y 2% volumen/volumen, la cual es la concentración comúnmente utilizada para disolver el CS.

En cuanto a aplicaciones en el área biomédica, los hidrogeles nanocompuestos de CS/PVA/CNTs no han sido estudiados con la misma frecuencia, pues hasta el momento únicamente se tiene conocimiento de dos trabajos al respecto, uno utilizando SWCNTs [31] y otro con MWCNTs [30].

Liao et al. [30], en 2011, electrohilieron andamios de CS/PVA/MWCNTs entrecruzados con GA, usando 1% masa/masa de MWCNT. Ellos reportan que los MWCNTs incrementan la adsorción de proteínas, mejoran significativamente la adhesión y proliferación celular y aumentan considerablemente las propiedades mecánicas de las fibras de CS/PVA; de tal forma que la toxicidad, comúnmente, asociada al uso de CNTs queda en entredicho con sus resultados.

Asimismo en 2011, Shokrgozar et al. [31] electrohilieron membranas de CS/PVA reforzadas con SWCNTs para su uso como andamios celulares en la regeneración de tejido neural. Los SWCNTs se incorporaron a la mezcla en concentraciones de 7% masa/masa, 12% masa/masa y 17% masa/masa, y se dispersaron mediante ultrasonificación. Así, se encontró que la ultrasonificación dispersaba de forma efectiva los CNTs y que, a medida que la concentración de estos se incrementaba, las fibras se volvían más homogéneas, dando lugar a una membrana más porosa y resistente. Asimismo, Shokrgozar et al. reportaron que, tras 7 días de cultivo *in vitro* (utilizando la línea celular U373-MG), los resultados de las pruebas de MTT no mostraron diferencias significativas en la viabilidad y la proliferación de las células sembradas sobre las membranas de CS/PVA y CS/PVA/SWCNTs, por lo que los hidrogeles nanocompuestos eran no tóxicos y biocompatibles.

Es claro que hasta ahora existe una carencia de investigaciones enfocadas al estudio de hidrogeles nanocompuestos de CS/PVA/CNTs para aplicaciones enfocadas al área biomédica. Por lo que uno de los principales objetivos de este trabajo consiste en dilucidar la influencia de los MWCNTs sobre las propiedades físicas, químicas, térmicas, mecánicas y biológicas de los hidrogeles híbridos de CS/PVA y CS/PVA/GEN, permitiendo tener así una comprensión más profunda sobre el comportamiento de este tipo de materiales.

1.7.3.1 Efecto opto-mecánico

Se ha encontrado que, además del incremento de las propiedades mecánicas de la matriz polimérica, las nanopartículas pueden dotar a los hidrogeles con otras propiedades físicas únicas, tales como su respuesta ante estímulos externos (ópticos, térmicos, eléctricos o magnéticos) [19]. Así, mientras la mayoría de los esfuerzos en el campo de los hidrogeles nanocompuestos con CNTs se han enfocado en mejorar sus propiedades pasivas (mecánicas, eléctricas y térmicas), hay un creciente interés en utilizar materiales que, a través de estímulos externos y métodos no invasivos, funcionen como sensores, actuadores o agentes especializados en la liberación controlada de calor o fármacos [109].

Algunos trabajos reportan que ciertos polímeros cargados con CNTs o partículas de carbono, como el polidimetilsiloxano (PDMS), presentan efectos térmicos y mecánicos localizados cuando son expuestos a longitudes de onda en el intervalo del infrarrojo. Esto debido a que, al estar uniformemente distribuido en la matriz polimérica, los CNTs podrían estar absorbiendo y transformando la radiación infrarroja en energía térmica, actuando como numerosos calentadores a nanoescala, capaces de inducir la deformación del material (expansión o contracción) [22-25].

Así, Ahir et al. [25] estudiaron este novedoso fenómeno de acción opto-mecánico en compuestos elastoméricos de PDMS/MWCNTs y observaron que, al ser expuestas a radiación infrarroja, las membranas nanocompuestas se contraían o se expandían dependiendo de la predeformación aplicada al material. De manera que, al aplicar una predeformación mayor al 10% las membranas se expandían, pero si la predeformación era menor al 10% estas se contraían.

Por su parte, Pimentel-Domínguez et al. [22] estudiaron el mismo fenómeno en membranas de PDMS cargadas con nano polvo de carbón. Ellos demostraron que, a través de efectos térmicos y mecánicos localizados, es posible producir microdeformaciones en las matrices de PDMS cuando son irradiadas con un láser, de modo que la amplitud del efecto depende de la potencia del láser utilizado. De acuerdo con sus resultados, la inclusión de nanopolvo de carbono en las membranas de PDMS produce un aumento importante de la temperatura en la zona de irradiación (~150 °C), lo que a su vez ocasiona cambios en el índice de refracción y la expansión térmica volumétrica del material (3% - 5%), la cual fue evidenciada al evaluar la respuesta micromecánica del material a través de la técnica de correlación de imágenes digitales.

Un fenómeno similar ha sido observado en matrices poliméricas de elastómeros de cristal líquido [110] y poli(p-feniletileno) [87], sugiriendo que los CNTs son los responsables de tal efecto. Por un lado, Marshall et al. [110] encontraron que, para obtener la respuesta a la radiación infrarroja en elastómeros de cristal líquido con benzopireno, son necesarias pequeñas cantidades de MWCNTs (0.1% masa/masa). Además, reportaron que la respuesta mecánica inducida por

radiación infrarroja es más rápida que la generada mediante el calentamiento del material. Por otra parte, Chen et al. [87] observaron que membranas de poli(p-feniletileno) cargadas con 0.1% masa/masa y 0.2% masa/masa de SWCNTs presentaban deformaciones reversibles, inducidas por radiación infrarroja, de hasta el 30%. Encontraron que, si la radiación infrarroja era suficiente entonces se inducía una transición de fase que permitía el cambio de forma, el cual, se manifestaba con la expansión del material.

Aunque todas estas investigaciones demuestran como los CNTs confieren propiedades adicionales a materiales pasivos, todavía no se ha entendido perfectamente el efecto opto-mecánico que los CNTs generan sobre la matriz polimérica. Una posible explicación los considera como captadores de fotones capaces de absorber y transformar de manera eficiente la radiación infrarroja en energía térmica, causando así la contracción o expansión de las cadenas poliméricas cercanas a la superficie de los CNTs [87].

Es importante destacar que este fenómeno aún no ha sido estudiado en hidrogeles, por lo que esta variante daría paso a nuevas investigaciones en donde se busque explotar el efecto opto-mecánico conferido por los CNTs sobre las propiedades físicas, químicas y biológicas de los hidrogeles híbridos. De esta forma, además de estudiar el efecto del genipin sobre la red polimérica, otro de los objetivos de esta investigación consistió en cargar los hidrogeles híbridos de CS/PVA y CS/PVA/GEN con MWCNTs a fin de determinar si en ellos también se presenta el efecto opto-mecánico; generando así un hidrogel que podría ser utilizado en la fabricación de bombas y válvulas en microfluídica, músculos artificiales, sistemas de mecanotransducción para la regeneración de tejidos biológicos o en la liberación controlada de fármacos.

Una vez expuesto el estado actual del conocimiento, las aplicaciones y los avances más relevantes en el estudio de los hidrogeles híbridos de CS/PVA, entrecruzados y/o nanocompuestos, fue posible detectar las carencias y necesidades existentes entorno a dicha área del conocimiento. En este sentido, el presente trabajo de investigación busca solventar dichos problemas mediante aportaciones en tres diferentes áreas: la caracterización fisicoquímica de los hidrogeles, su caracterización mecánica bajo un sistema de esfuerzos más cercano al presente en el entorno de aplicación de estos materiales y, finalmente, explorando su posible aplicación como andamios celulares en ingeniería de tejidos.

1.8 HIPÓTESIS

Los hidrogeles de CS/PVA/GEN presentarán propiedades fisicoquímicas (módulo elástico, UTS, cristalinidad, estabilidad térmica, temperatura de transición vítrea y de fusión, rugosidad) similares a las de aquellos entrecruzados con GA (CS/PVA/GA), así como: una mayor hidrofiliidad, un mayor hinchamiento, un tamaño de poro más grande y una menor citotoxicidad. Además, en los hidrogeles nanocompuestos, los MWCNTs conferirán propiedades opto-mecánicas a las matrices poliméricas híbridas (CS/PVA y CS/PVA/GEN) y actuarán como refuerzos, brindándoles mayor estabilidad térmica y mecánica respecto a sus símiles sin nanopartículas.

1.9 OBJETIVOS

1.9.1 Objetivo General

Estudiar la influencia de los agentes entrecruzantes (naturales/genipin y sintéticos/glutaraldehído) y las nanopartículas (MWCNTs) sobre las propiedades físicas, químicas, térmicas, mecánicas, estructurales y biológicas de los hidrogeles híbridos formados a base de CS y PVA.

1.9.2 Objetivos Particulares

1. Obtener hidrogeles híbridos de CS/PVA entrecruzados químicamente con genipin (CS/PVA/GEN) o glutaraldehído (CS/PVA/GA), mediante la técnica de *solvent casting*.
2. Obtener hidrogeles de CS/PVA y CS/PVA/GEN, cargados con nanotubos de carbono de pared múltiple (MWCNTs) buscando no solo modificar sus propiedades térmicas y mecánicas, sino también conferirles la capacidad de responder a estímulos externos como la irradiación infrarroja (efecto opto-mecánico).
3. Evaluar el efecto de los agentes entrecruzantes (GEN o GA) y/o de los MWCNTs sobre las propiedades físicas, químicas térmicas y estructurales de las membranas híbridas a través de técnicas convencionales como difracción de rayos X (XRD), calorimetría diferencial de barrido (DSC), análisis termogravimétrico (TGA), espectroscopía infrarroja

por transformada de Fourier (FT-IR), ángulo de contacto, cinética de hinchamiento, microscopía de fuerza atómica (AFM) y análisis de los parámetros estructurales de la red polimérica.

4. Estudiar el comportamiento micro y macromecánico de los hidrogeles híbridos de CS/PVA, CS/PVA/GA, CS/PVA/GEN, CS/PVA/MWCNTs y CS/PVA/GEN/MWCNTs a través de ensayos de tracción uniaxial y biaxial.
 - Desarrollar un probador mecánico para ensayos de tracción biaxial por indentación esférica, acoplado a técnicas ópticas no intrusivas, así como una metodología para evaluar el comportamiento macromecánico de hidrogeles, membranas delgadas y materiales elastomérico.
5. Evaluar las propiedades biológicas de los hidrogeles híbridos de CS/PVA, entrecruzados y/o nanocompuestos a través de pruebas in vitro (citocompatibilidad) y el análisis morfológico de las células adheridas a la superficie de los hidrogeles

CAPÍTULO 2

METODOLOGÍA Y TÉCNICAS EXPERIMENTALES

En este capítulo se presentan los detalles particulares sobre la preparación de los hidrogeles de CS/PVA. Asimismo, se describe la metodología y las técnicas de caracterización utilizadas para evaluar la influencia de los agentes entrecruzantes, y/o de las nanopartículas sobre la estructura y propiedades (físicas, químicas, térmicas, mecánicas y biológicas) de dichos materiales. Cabe señalar que, la síntesis y caracterización fisicoquímica, estructural y mecánica fue realizada en el Instituto de Investigaciones en Materiales (IIM, UNAM), mientras que la caracterización biológica de los hidrogeles se llevó a cabo en el Laboratorio de Inmunoterapia e Ingeniería de Tejidos de la Facultad de Medicina de la UNAM.

2.1 SÍNTESIS DE LOS HIDROGELES

En este trabajo de investigación se estudiaron 5 hidrogeles híbridos formados a base de un polímero natural, quitosano (CS), y un polímero sintético, poli(alcohol vinílico) (PVA). Dichos hidrogeles fueron divididos en tres grupos:

- *Hidrogeles control.* Hidrogeles híbridos de CS/PVA obtenidos, únicamente, a través de la mezcla física de quitosano y poli(alcohol vinílico).
- *Hidrogeles químicamente entrecruzados.* Conformado por los hidrogeles híbridos de CS/PVA/GEN y CS/PVA/GA, los cuales fueron entrecruzados con genipin y glutaraldehído, respectivamente.
- *Hidrogeles nanocompuestos.* En el que se agrupan los hidrogeles de CS/PVA/MWCNTs y CS/PVA/GEN/MWCNTs, los cuales fueron cargados con nanotubos de carbono de pared múltiple.

Dependiendo de la técnica de preparación (i.e. evaporación de los disolventes, electrohilado, ciclos de congelamiento/descongelamiento, espumado con gas, extrusión, estereolitografía, entre otras), los hidrogeles pueden ser sintetizados en forma de: fibras, esferas, estructuras tridimensionales o membranas delgadas; de manera que, la técnica elegida no sólo determinará la geometría de los hidrogeles obtenidos, sino que también influirá en su tamaño de poro,

cristalinidad, velocidad de degradación, estabilidad física, etc. [111]. Así, debido a la sencillez del método, a que no se requiere de equipo especializados y tomando en consideración: los polímeros en cuestión, las posibles aplicaciones, la estabilidad estructural de los materiales que se obtienen y el control que se puede tener sobre su cristalinidad; en este trabajo de investigación, todos los hidrogeles fueron sintetizados en forma de membranas delgadas mediante la evaporación de los disolventes utilizados, técnica conocida en inglés como *solvent casting*.

Para la síntesis de los hidrogeles se utilizó CS con un peso molecular promedio peso (\overline{M}_w) de 350,000 Da y una desacetilación del 75% – 85% (Lote #MKBJ9698V, Sigma-Aldrich, EUA); PVA con $\overline{M}_w = 89,000$ Da y 99% de hidrólisis (Lote #MKBL0281V, Fluka, Suiza); GEN en polvo, grado HPLC (Lote #051M4746V, Sigma-Aldrich, EUA); GA en disolución acuosa al 50% masa/masa (Lote #SHBB3568V, Sigma-Aldrich, EUA); MWCNTs con un porcentaje mayor al 95% de carbono, un diámetro de entre 6 nm y 9 nm, y una longitud de 5 μm (Lote #MKBD4153V, Sigma-Aldrich, EUA); ácido acético glacial grado HPLC (J.T.Baker, EUA) y agua desionizada. Todos los polímeros y reactivos fueron usados tal como se recibieron.

En las siguientes subsecciones se detalla el procedimiento utilizado en la preparación de las disoluciones poliméricas que dan lugar a cada uno de estos materiales.

2.1.1 Hidrogeles control (CS/PVA)

Para llevar a cabo la síntesis de los hidrogeles control de CS/PVA fue necesario preparar dos disoluciones, una de CS al 2.5% masa/volumen y otra de PVA al 10% masa/volumen. Cabe destacar que, tras probar distintas concentraciones, las disoluciones de CS y PVA se prepararon a dichas concentraciones debido a que con ellas se tenía la mayor cantidad de soluto sin que su viscosidad fuera un problema durante la fase de agitación y mezcla.

Por un lado, la disolución de CS al 2.5% masa/volumen se preparó a temperatura ambiente ($22\text{ }^\circ\text{C} \pm 1\text{ }^\circ\text{C}$) disolviendo el CS en polvo en ácido acético glacial al 1% volumen/volumen. Dicha disolución se mantuvo bajo agitación magnética por 24 horas a fin de disolver el CS y obtener una suspensión homogénea ligeramente amarilla. Por otro lado, para la disolución de PVA al 10% masa/volumen se utilizó agua desionizada a $80\text{ }^\circ\text{C}$ como disolvente; así, una vez que el agua alcanzó la temperatura requerida, el PVA en polvo se vertió en ella y la mezcla se mantuvo bajo agitación magnética por 2 horas para obtener una disolución homogénea e incolora.

Una vez que ambas disoluciones estuvieron preparadas fueron mezcladas cuidadosamente a temperatura ambiente en una proporción volumétrica 3:1 (CS:PVA); posteriormente, la mezcla obtenida (“mezcla base”) se agitó magnéticamente durante 2 horas a fin de incorporar ambas fases. De acuerdo con lo estipulado en el estado del arte, dicha proporción volumétrica garantiza

la miscibilidad de ambos componentes a través de fuerzas de van der Waals y puentes de hidrógeno, dando lugar a una red tridimensional [10, 88, 90, 91, 95].

Finalmente, la mezcla CS/PVA fue depositada sobre cajas Petri de poliestireno de 90 mm de diámetro (13 g/caja, es decir 0.204 g/cm^2), las cuales fueron colocadas sobre una superficie nivelada en espera de que los disolventes utilizados se evaporaran a temperatura ambiente y las membranas control de CS/PVA se formaran (i.e. 48 horas, aproximadamente).

2.1.2 Hidrogeles químicamente entrecruzados (CS/PVA/GEN y CS/PVA/GA)

El grupo de hidrogeles entrecruzados se sintetizó a partir de una mezcla base de CS/PVA, la cual fue preparada siguiendo el método previamente descrito. La mezcla resultante se dividió en dos porciones, una para ser entrecruzada químicamente con GEN y la otra mediante GA.

Así, 1.4 mL de una disolución de genipin al 0.5% masa/volumen en agua fueron lentamente añadidos a la primera porción de la mezcla base por cada 10 mL de CS presentes, de modo que la concentración final de genipin en la mezcla CS/PVA/GEN fue de 0.05% masa/volumen y de ~1% masa/masa respecto a los solutos. De acuerdo con investigaciones previas, concentraciones de genipin entre 0.025% - 1% masa/volumen permiten un entrecruzamiento efectivo del CS [72].

La segunda porción de la mezcla de CS/PVA fue entrecruzada con una disolución de GA al 0.5% masa/volumen en agua. A fin de poder llevar a cabo un análisis comparativo, el volumen de GA que se le añadió fue similar al utilizado en los hidrogeles entrecruzados con GEN. De esta forma, la concentración final de GA en la mezcla CS/PVA/GA también fue de 0.05% masa/volumen y de ~1% masa/masa respecto a los solutos.

Ambas mezclas (CS/PVA/GEN y CS/PVA/GA) se mantuvieron bajo agitación magnética a temperatura ambiente durante 1 hora, a fin de permitir la incorporación de todos los componentes. Transcurrido ese tiempo, 13 g (0.204 g/cm^2) de una u otra mezcla fueron depositados en cajas Petri de poliestireno (90 mm de diámetro), las cuales se colocaron sobre una superficie nivelada y se dejaron a temperatura ambiente hasta que los disolventes se evaporaron y las membranas se formaron (i.e. 72-96 horas).

2.1.3 Hidrogeles nanocompuestos (CS/PVA/MWCNTs y CS/PVA/GEN/MWCNTs)

Con la finalidad de sintetizar el grupo de hidrogeles nanocompuestos, fue necesario preparar una disolución de CS al 2.5% masa/volumen y otra de PVA al 10% masa/volumen, siguiendo la metodología descrita en la sección 2.1.1. Así, una vez que ambas disoluciones estuvieron preparadas, a la disolución de CS le fueron lentamente añadidos los MWCNTs, de manera que

la concentración de los nanotubos respecto a la mezcla final de CS/PVA fuera de 0.01% masa/volumen y de ~0.2% masa/masa respecto a los solutos. Posteriormente, dicha disolución de CS/MWCNTs fue sonicada durante 3 minutos a fin de deshacer los clústeres de MWCNTs que se formaron y, a continuación, se dejó bajo agitación magnética a temperatura ambiente con el propósito de dispersar las nanopartículas en la mezcla polimérica. Tras 24 horas de agitación, la disolución de CS/MWCNTs se mezcló con la disolución de PVA al 10% masa/volumen en una proporción 3:1 volumen/volumen (CS:PVA) y la mezcla resultante (CS/PVA/MWCNTs) se agitó por otras 2 horas con el objetivo de incorporar todos los componentes y obtener una mezcla homogénea de color negro.

Finalmente, la mezcla CS/PVA/MWCNTs fue dividida en dos porciones, una de ellas se entrecruzó químicamente con una disolución de genipin al 0.5% masa/volumen siguiendo el método descrito en la sección 2.1.2, mientras que la otra se mantuvo sin cambios. Así, una vez que ambas mezclas estuvieron preparadas (CS/PVA/GEN/MWCNTs y CS/PVA/MWCNTs, respectivamente), fueron depositadas sobre cajas Petri de poliestireno (0.204 g/cm^2), las cuales se colocaron sobre una superficie nivelada a temperatura ambiente a fin de que los disolventes utilizados se evaporaran y las respectivas membranas nanocompuestas se formaran.

De acuerdo con síntesis previas realizadas en nuestro laboratorio, la concentración utilizada de MWCNTs (i.e. 0.2% masa/masa) permite una buena dispersión de los nanotubos y la obtención de membranas traslúcidas, lo cual es imprescindible para su posterior caracterización mediante técnicas ópticas no intrusivas. Asimismo, se ha reportado que pequeñas concentraciones de nanotubos (<2% masa/masa) tienden a incrementar las propiedades mecánicas, brindan mayor estabilidad térmica y mejoran la conductividad eléctrica de las matrices poliméricas que los contienen [21].

Una vez que todas las membranas estuvieron formadas (i.e. CS/PVA, CS/PVA/GEN, CS/PVA/GA, CS/PVA/MWCNT y CS/PVA/GEN/MWCNT) se colocaron en un horno de calentamiento a vacío a $60 \text{ }^\circ\text{C}$ y -575.7 mbar (i.e. -17 inHg) durante 48 horas, con el objetivo de extraer las partículas de agua y/o disolvente que pudieran haber quedado atrapadas en la red polimérica tras la síntesis. Finalmente, el espesor de las membranas se midió en diferentes puntos con un micrómetro digital *Mitutoyo* y se almacenaron en un desecador hasta su uso. En la Figura 2.1 se resume el proceso de síntesis de los tres grupos de hidrogeles híbridos estudiados en este trabajo de investigación.

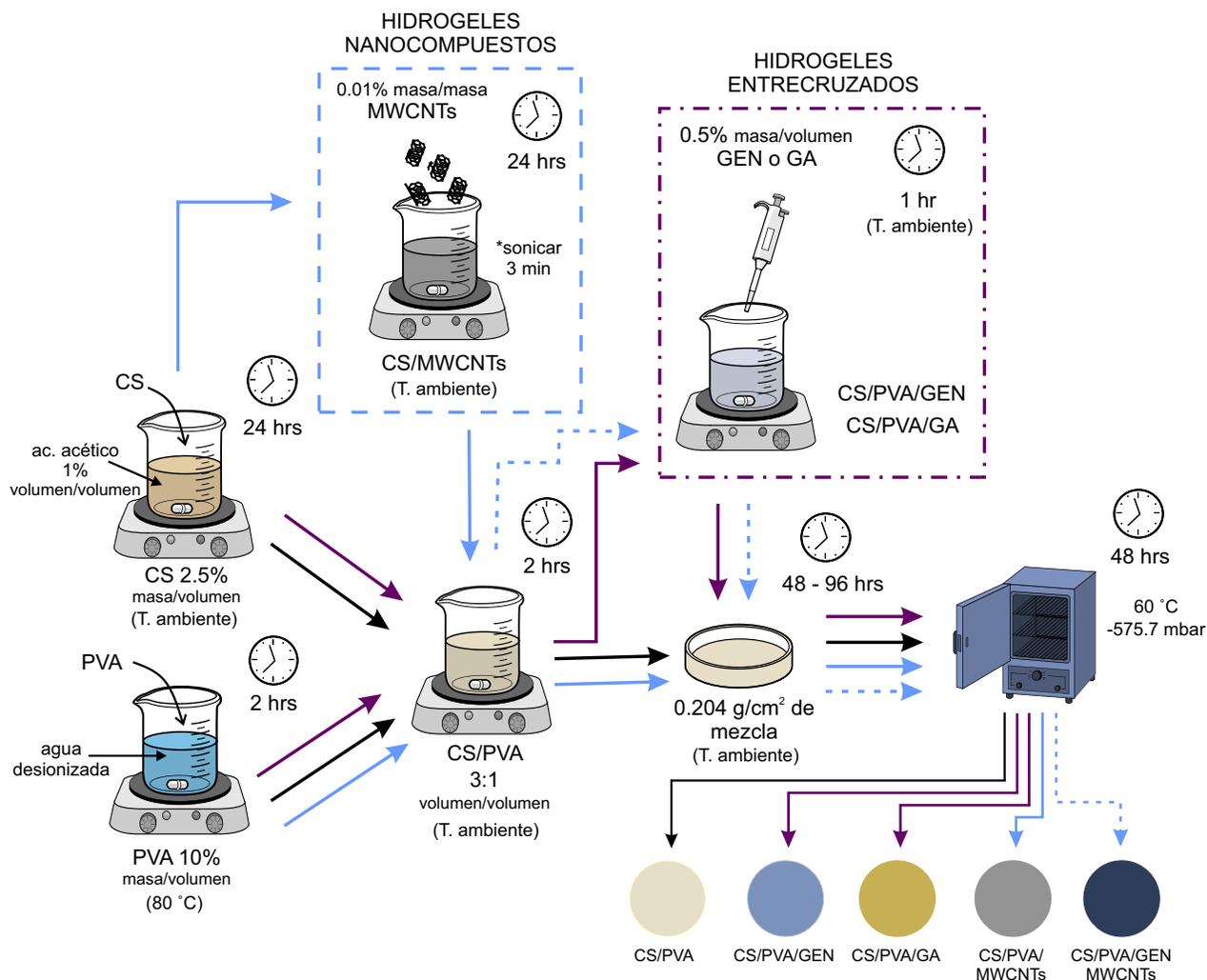


Figura 2.1 Proceso de preparación de los hidrogeles híbridos a base de CS/PVA. Las flechas negras indican la secuencia a seguir para la síntesis de los hidrogeles control (CS/PVA), las moradas para los hidrogeles entrecruzados (CS/PVA/GEN y CS/PVA/GA) y las azules para los hidrogeles nanocompuestos (CS/PVA/MWCNTs y CS/PVA/GEN/MWCNTs).

2.2 CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA

La caracterización fisicoquímica de los hidrogeles sintetizados se llevó a cabo utilizando espectroscopía de infrarrojo por transformada de Fourier, difracción de rayos X, calorimetría diferencial de barrido, análisis termogravimétrico y microscopía de fuerza atómica. Asimismo, se realizaron pruebas de hinchamiento y ángulo de contacto a fin de determinar la hidrofiliidad de volumen y de superficie.

2.2.1 Espectroscopía Infrarroja por Transformada de Fourier (FT-IR)

La espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FT-IR, por las siglas en inglés de *Fourier Transform Infrared Spectroscopy*) es ampliamente utilizada para estudiar la estructura química de materiales poliméricos, analizar los grupos químicos presentes e identificar compuestos desconocidos. Esta técnica se fundamenta en la absorción de radiación infrarroja por las moléculas de una sustancia expuesta a este tipo de radiación.

Todas las moléculas poseen un movimiento vibracional, el cual, ocurre a valores cuantizados de energía. Las frecuencias de vibración de los diferentes enlaces, dependen de la masa de los átomos involucrados y de la fuerza de unión entre ellos. Así, para que sea posible la absorción de energía infrarroja por parte de una sustancia, es necesario que dicha energía sea del mismo valor que la necesaria para que se produzca el movimiento vibracional de sus moléculas [112]. Los dispositivos de FT-IR utilizan un interferómetro que permite irradiar las muestras con todas las frecuencias del infrarrojo al mismo tiempo y medir la cantidad de energía absorbida en cada longitud de onda [112]. A partir de esto, se puede trazar un espectro de transmitancia o absorbancia, el cual, muestra las longitudes de onda a las cuales la muestra absorbe el infrarrojo, lo cual permite llevar a cabo un análisis de los grupos químicos presentes.

En este proyecto se caracterizaron mediante FT-IR los hidrogeles entrecruzados y/o nanocompuestos con la finalidad de confirmar el entrecruzamiento químico de la red polimérica y determinar si existía interacción entre los componentes de los hidrogeles (i.e. CS, PVA, GEN o GA, MWCNTs). Dicho análisis se llevó a cabo en un espectrómetro FT-IR (Nicolet 6700, Thermo Scientific), equipado con un sistema de muestreo por reflectancia total atenuada (ATR) con punta de diamante, utilizando muestras de 1 cm² y ~90 μm de espesor de los hidrogeles secos. Los espectros de FT-IR fueron tomados en el intervalo de 4000 cm⁻¹ a 400 cm⁻¹ a una resolución de 4 cm⁻¹, llevándose a cabo 32 barridos. Los espectros obtenidos fueron normalizados y las bandas de mayor vibración se identificaron y asociaron con los grupos químicos correspondientes.

2.2.2 Difracción de Rayos X (XRD)

La difracción de rayos X (XRD, por las siglas en inglés de *X-Ray Diffraction*) es una técnica que nos permite obtener resultados cuantitativos sobre la proporción amorfa y cristalina presente en los materiales poliméricos. El análisis de la fracción cristalina en los hidrogeles a menudo tiene una considerable importancia práctica, ya que un porcentaje de cristalinidad alto tiene el efecto de mejorar propiedades mecánicas tales como la resistencia a la tracción y la rigidez, e incrementar su estabilidad a largo plazo retardando así su disolución [113].

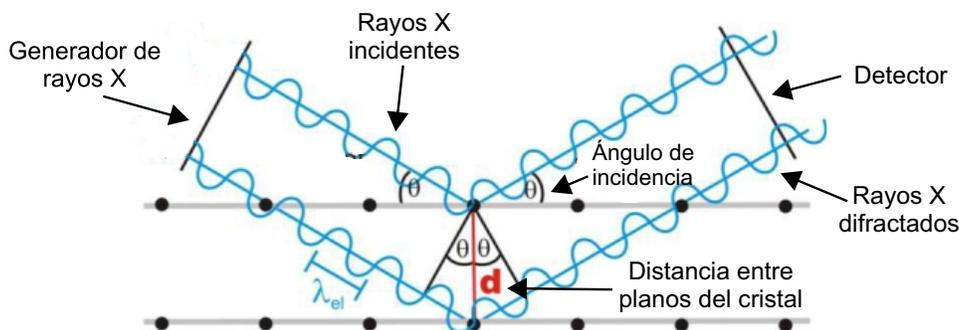


Figura 2.2 Esquema descriptivo del fenómeno de difracción de rayos X.

La difracción de rayos X consiste en emitir rayos X con una longitud de onda conocida (i.e. generalmente $\lambda=1.54056 \text{ \AA}$ cuando se emplea un ánodo de Cu o $\lambda =0.709 \text{ \AA}$ si es de Mo) hacia un material. El tipo de ánodo utilizado dependerá del material a analizar, de manera que la longitud de onda de los rayos emitidos no deberá ser más corta que el borde de absorción K de la muestra. Así, los rayos X emitidos golpearán el material y solo aquellos que cumplan con la ley de Bragg serán difractados hacia el detector (Figura 2.2). Matemáticamente la ley de Bragg se expresa conforme a la ecuación (1):

$$n\lambda = 2d \sin \theta \quad (1)$$

donde n es un número entero llamado orden de difracción y corresponde al número de longitudes de onda entre los rayos difundidos por los planos atómicos adyacentes (en este caso se considerará el primer orden de difracción debido a que los rayos X se propagan en el aire ($\therefore n=1$)); λ se refiere a la longitud de onda de los rayos X, d es la distancia entre planos del cristal y θ es el ángulo de incidencia del haz de rayos X [113, 114]. Los rayos X difractados son transformados en señales eléctricas para poder ser procesados por la computadora. Así, el análisis de los datos obtenidos genera un gráfico de la intensidad relativa en función del ángulo 2θ , el cual se conoce como difractograma.

Para nuestro estudio de XRD se utilizó un difractómetro marca Bruker AXS modelo D8 Advance equipado con un monocromador de grafito, radiación $\text{CuK}\alpha$ con $\lambda = 1.54056 \text{ \AA}$ y un filtro de níquel. Las pruebas se llevaron a cabo por triplicado y se realizaron a 35 kV en un intervalo $2\theta = 5^\circ - 70^\circ$, utilizando un paso de 0.02° y una velocidad de $0.4^\circ/\text{s}$. Esta técnica se usó para determinar el porcentaje de cristalinidad de las membranas de CS/PVA, CS/PVA/GEN, CS/PVA/GA, CS/PVA/MWCNTs y CS/PVA/GEN/MWCNTs. El porcentaje de cristalinidad (C_r) de las membranas se calculó a partir de los difractogramas obtenidos usando la ecuación (2):

$$C_r(\%) = \frac{A_c}{A_c + A_a} \times 100 \quad (2)$$

donde A_c y A_a corresponden al área bajo la curva de los picos cristalinos y las zonas amorfas, respectivamente [115]. Dichas áreas fueron determinadas y medidas con el software *Evaluation 11.0* del paquete *Diffraction Plus 2005* de Bruker. Los picos de cristalinidad obtenidos fueron confirmados e indexados de acuerdo con lo reportado en la literatura.

2.2.3 Análisis térmico

El análisis térmico comprende un conjunto de técnicas cuyo objetivo es el estudio del comportamiento de un material en función de la temperatura. En el campo de los hidrogeles las técnicas más empleadas para evaluar sus propiedades térmicas son: la calorimetría diferencial de barrido y el análisis termogravimétrico (DSC y TGA, por sus siglas en inglés *Differential Scanning Calorimetry* y *Thermogravimetric Analysis*, respectivamente). En este estudio ambas técnicas permitirán determinar las transiciones térmicas que presentan los hidrogeles híbridos de CS/PVA, así como la contribución del agente entrecruzante y/o de los MWCNTs a la estabilidad térmica de dichos materiales.

2.2.3.1 Análisis Termogravimétrico (TGA)

El TGA mide la cantidad y rapidez del cambio en peso de una muestra en función del incremento lineal de la temperatura bajo una atmósfera controlada. De manera general, permite realizar medidas para determinar la composición de los materiales y predecir su estabilidad a temperaturas de hasta 1500 °C. Esta técnica puede, por tanto, caracterizar materiales que presentan pérdida o ganancia de peso debido a la descomposición, oxidación o deshidratación. La representación de la masa o porcentaje de masa de la muestra estudiada en función de la temperatura se denomina curva de descomposición térmica [112].

En este proyecto, el análisis termogravimétrico se llevó a cabo a fin de determinar la estabilidad térmica y la velocidad de descomposición de los hidrogeles sintetizados. Para ello se utilizó una balanza termogravimétrica modelo Q5000 IR de TA Instruments en la cual se evaluaron los hidrogeles en estado seco. Las muestras fueron previamente pesadas (4.5 mg) en una balanza analítica Mettler Toledo XS105 Dual Range y posteriormente se colocaron en el equipo. Los experimentos se llevaron a cabo por triplicado, a una velocidad de calentamiento de 10 °C/min en un intervalo de temperatura de 20 °C a 600 °C, bajo un flujo constante de nitrógeno de 25 mL/min a fin de evitar reacciones de oxidación y evaluar únicamente la descomposición

térmica. Finalmente, las curvas de descomposición térmicas fueron obtenidas y analizadas con el software *TA Instrument Universal Analysis 2000*.

2.2.3.2 Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC)

La DSC es una técnica termoanalítica asociada con la entalpía del material, se basa en registrar la diferencia de flujo de calor entre la muestra y un material inerte de referencia cuando ambos son sometidos a un incremento/decremento constante de temperatura a lo largo del tiempo. La muestra y la referencia se alojan en dos celdas idénticas que se calientan mediante resistencias independientes. Cuando la muestra experimenta una transición térmica (un cambio físico o químico que da lugar a una liberación o absorción de calor), se necesitará que fluya más calor a la muestra o a la referencia con el objeto de mantener ambas a la misma temperatura; el que fluya más, o menos, calor a la muestra dependerá de si el proceso es exotérmico o endotérmico [113]. Al graficar la diferencia de flujo de calor entre la muestra y la referencia como función de la temperatura, se obtiene un termograma mediante el cual es posible identificar las transiciones térmicas del material (Figura 2.3).

En los materiales poliméricos, las transiciones térmicas más importantes son la temperatura de transición vítrea (T_g), la temperatura de fusión (T_m) y la temperatura de cristalización (T_c). La T_g es una transición térmica propia de la proporción amorfa de los polímeros e indica la temperatura a la cual se produce un movimiento cooperativo de cadenas poliméricas debido al incremento de temperatura; por otro lado, la T_m y la T_c dan información cualitativa y cuantitativa sobre la cristalinidad del polímero, de tal forma que al conocer el área bajo la curva del pico y el peso de la muestra es posible estimar el porcentaje de cristalinidad del polímero [113].

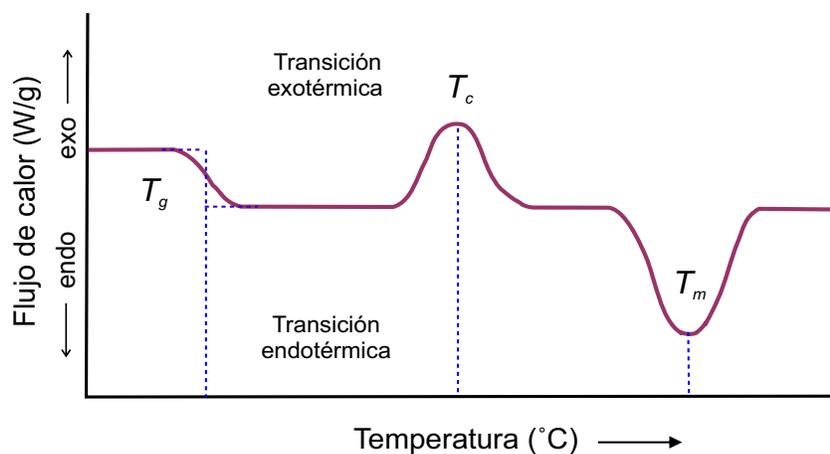


Figura 2.3 Ejemplo de un termograma de DSC en el que se señalan las transiciones térmicas propias de los materiales poliméricos.

Las transiciones térmicas de los hidrogeles de CS/PVA, así como de sus mezclas entrecruzadas y nanocompuestas, fueron estudiadas mediante esta técnica utilizando un equipo DSC-Q100 de TA Instruments. Las pruebas se llevaron a cabo por triplicado, bajo atmósfera de nitrógeno, usando 10 mg de muestra de los hidrogeles en estado seco por repetición. Las muestras fueron sometidas a dos ciclos de calentamiento. Durante el primer ciclo se calentaron de 20 °C a 150 °C, a una velocidad de 10 °C/min, se mantuvieron a 150 °C por 2 minutos y se enfriaron hasta la temperatura ambiente a la misma velocidad; todo ello con el fin de eliminar la humedad presente dentro de la red polimérica y liberar los esfuerzos internos que pudieran tener. En el segundo ciclo, las muestras fueron calentadas nuevamente a una velocidad de 10 °C/min, partiendo de 10 °C y llegando hasta los 250 °C. Los datos generados durante este ciclo fueron grabados y utilizados para determinar las transiciones térmicas de los hidrogeles mediante su análisis en el software *TA Instrument Universal Analysis 2000*.

2.2.4 Microscopía de Fuerza Atómica (AFM)

El microscopio de fuerza atómica (AFM, por las siglas en inglés de *Atomic Force Microscope*) es un instrumento mecano-óptico que forma imágenes de la superficie de un material utilizando una viga flexible en voladizo (cantilever) que tiene, en su extremo libre, una punta de dimensiones nanométricas. Cuando la punta se acerca lo suficiente a la superficie de un material comienza una interacción entre ambas debido a las fuerzas de atracción y repulsión (siendo las más comunes fuerzas de van der Waals). La fuerza de interacción entre la punta y la superficie de la muestra hace que el cantilever se doble o se flexione (Figura 2.4). Un detector mide esta flexión que ocurre conforme la punta barre la superficie línea por línea, generando una imagen de la topografía superficial de la muestra. Gracias a un escáner piezoeléctrico, la punta es capaz de recorrer un área específica con desplazamientos de 0.5 μm a 125 μm en las direcciones X - Y, y desplazamientos de algunas micras en la dirección Z [116].

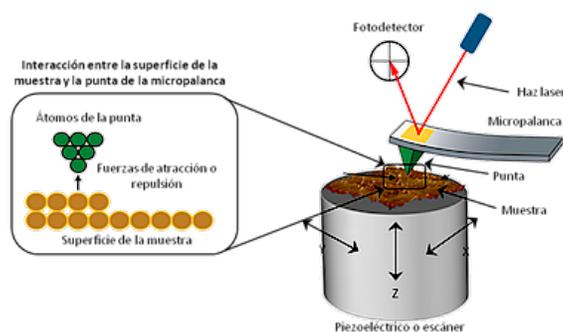


Figura 2.4 Diagrama del funcionamiento del microscopio de fuerza atómica.

En un AFM se distinguen tres modos de operación básicos que son el modo de contacto, el modo de contacto intermitente o *tapping* y el modo de no contacto.

1. En el modo de contacto la fuerza entre punta y muestra no varía en el análisis, durante el cual, la punta está en constante contacto con la muestra. Este modo se emplea principalmente para medir la topografía con resolución atómica, medir fuerza de fricción, adherencia y fuerza magnética.
2. En el modo de contacto intermitente se aplica una señal sinusoidal, haciendo oscilar a la punta a su frecuencia de resonancia. Los barridos se efectúan a una amplitud de oscilación constante, denominada amplitud de trabajo, obteniendo imágenes topográficas gracias a las diferencias en amplitud o fase de la vibración que se producen durante el barrido. Este es el principal modo de trabajo aplicado al estudio de polímeros.
3. En el modo de no contacto la punta es levemente apartada de la muestra, 10 nm - 100 nm, mientras el cantilever oscila cerca de su frecuencia de resonancia, por lo que la interacción punta-muestra varía. Este modo se utiliza para estudios de perfilometría o en el caso de muestras muy planas.

Las capacidades de la microscopía de fuerza atómica han hecho que se convierta en una técnica imprescindible en el área de los polímeros a fin de evaluar su topografía a una alta resolución, esto sobre todo en aquellos que pretenden ser usados como andamios celulares en la regeneración de tejidos, ya que es sabido que la respuesta de las células también se ve influenciada por la topografía y la rugosidad del soporte utilizado [117].

En este estudio, la topografía superficial y rugosidad de los hidrogeles en estado seco (CS/PVA, CS/PVA/GA, CS/PVA/GEN, CS/PVA/MWCNT y CS/PVA/GEN/MWCNT) fueron evaluadas utilizando un microscopio de fuerza atómica JEOL JSPM-4210, el cual utiliza el método de deflexión de haz. Dicho método consiste en hacer incidir un haz láser sobre la cara superior de la viga; así, cada vez que la punta sube o baja debido a la interacción con la superficie que se encuentra analizando, el cantilever refleja la desviación del láser a un fotodetector y es interpretada por el software generando una imagen [116]. De este modo, las imágenes topográficas de los hidrogeles fueron obtenidas con el microscopio operando en modo intermitente, a temperatura ambiente, utilizando una punta de silicio de no contacto con una constante de fuerza de 20 N/m - 40 N/m. Tanto las imágenes 3D de la superficie, como la rugosidad media cuadrática (R_{rms}) de las muestras fueron obtenidas utilizando el software de procesamiento *WinSPM* de Jeol. La R_{rms} se determinó a lo largo de cuatro regiones diferentes en un área de 5 x 5 μm , reportándose el promedio y la desviación típica muestral correspondiente.

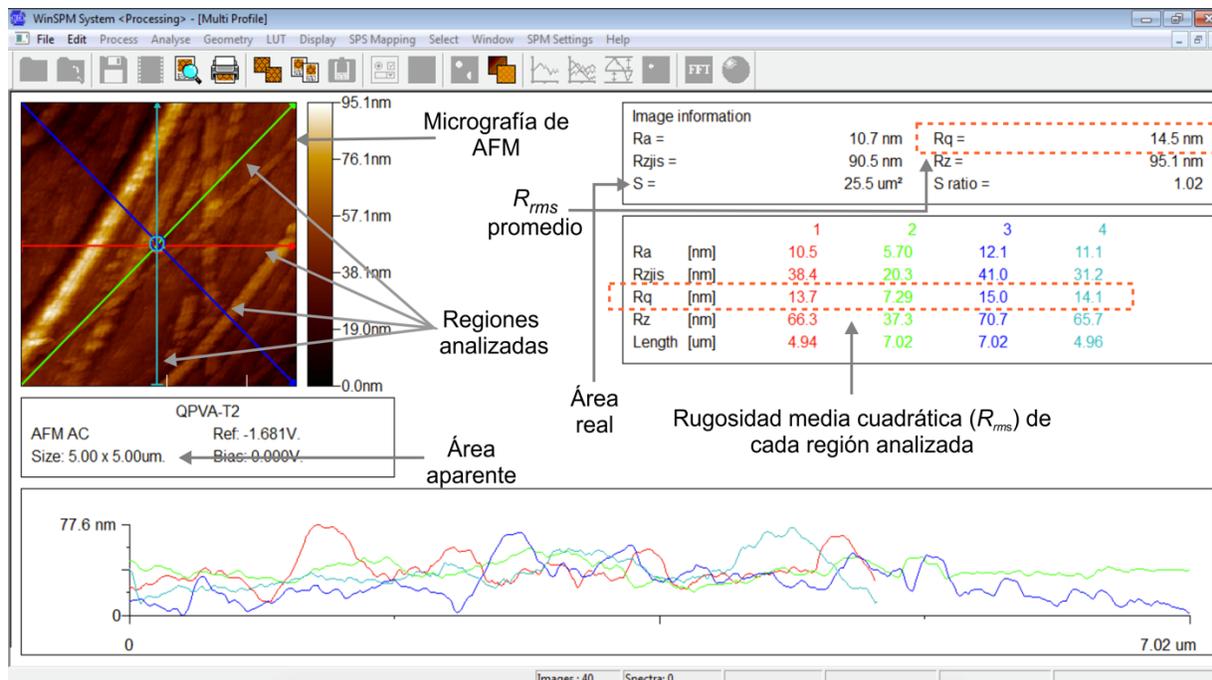


Figura 2.5 Captura de pantalla del software WinSPM durante el procesamiento de datos. En la imagen se indican las zonas a lo largo de las cuales es calculada la R_{rms} , en todas las muestras.

En la Figura 2.5, se muestra la localización de las regiones que fueron utilizadas para determinar la rugosidad de todos los materiales. Dichas regiones fueron las mismas para todas las muestras y fueron seleccionadas buscando tener datos de la rugosidad de la muestra en todas direcciones y sobre la mayor área posible.

2.2.5 Cinética de hinchamiento e hidrofiliidad de superficie

Dependiendo de las propiedades de los polímeros utilizados, así como de la naturaleza y la densidad de entrecruzamiento de la red polimérica, los hidrogeles pueden contener diversas cantidades de agua, de tal forma que sus propiedades finales, tanto mecánicas como biológicas, estarán definidas por la cantidad de líquido que sean capaces de absorber y de retener en su red polimérica [41]. Debido a ello, en este proyecto de investigación se considera de vital importancia conocer la hidrofiliidad de volumen y de superficie que presentan todos los hidrogeles híbridos sintetizados. Así, estas dos propiedades fueron caracterizadas mediante pruebas de hinchamiento y de ángulo de contacto, respectivamente. A continuación, se puntualizan los detalles experimentales de cada una de ellas.

2.2.5.1 Pruebas de hinchamiento

La absorción y retención de líquido en los hidrogeles depende de ciertos factores, como: la naturaleza de la disolución en la que se encuentran inmersos, la presencia o ausencia de poros en el hidrogel y su densidad de entrecruzamiento. Las pruebas de hinchamiento son útiles para conocer la cinética de absorción de los hidrogeles; es decir, la cantidad de líquido que pueden almacenar en su red polimérica como función del tiempo. Además de manera paralela, estas pruebas brindan un primer acercamiento para intuir la densidad de entrecruzamiento que presenta la red.

Puesto que el peso, el volumen y la transparencia del hidrogel cambian durante el proceso de hinchamiento, cualquiera de estos parámetros puede ser utilizado para determinar el índice de hinchamiento. Sin embargo, por facilidad, en este trabajo se utilizó el cambio de peso para evaluar el hinchamiento de los hidrogeles; el cual, de acuerdo con la relación (3) estará dado por:

$$Q (\%) = \frac{w_f - w_0}{w_0} \times 100 \quad (3)$$

en donde Q es el porcentaje de líquido al interior de la red, w_f es el peso de la muestra hinchada a un tiempo t y w_0 el peso en seco de la misma muestra a $t = 0$, es decir, antes de ser puesta en el líquido [118].

El índice de hinchamiento de los hidrogeles entrecruzados y nanocompuestos (CS/PVA, CS/PVA/GA, CS/PVA/GEN, CS/PVA/MWCNTs y CS/PVA/GEN/MWCNTs) se evaluó a 37 °C, empleando una disolución buffer fosfato salina (PBS, por sus siglas en inglés), pH=7.4, con el fin de simular un fluido biológico. Las pruebas se llevaron a cabo por quintuplicado, por lo que de cada grupo de hidrogeles se cortaron 5 muestras de 1 cm². Antes de ser inmersas en el PBS, cada muestra se pesó en la balanza analítica (Pioneer, OHAUS) y su peso inicial (w_0) fue registrado. Posteriormente, las muestras fueron inmersas en 10 mL de la disolución de PBS y se colocaron dentro de un baño de agua a fin de mantener una temperatura constante de 37 °C. A predeterminados intervalos de tiempo⁴, las muestras se retiraron del PBS y se pesaron nuevamente (w_f). Antes de ser pesadas, con ayuda de papel filtro, se retiró cuidadosamente el líquido de la superficie de las muestras, de tal manera que únicamente se considerara el líquido atrapado en el interior de la red polimérica y no el líquido libre superficial que en realidad no aporta un hinchamiento a la red [41]. Finalmente, las muestras se regresaron al contenedor con PBS del cual fueron retiradas, repitiendo este procedimiento durante 7 días.

⁴ Las muestras se midieron a los 2.5, 5, 7.5, 10, 15, 20, 25, 30, 45, 60, 120, 180, 240, 300 y 360 minutos después de que se inició la prueba; posteriormente, las mediciones se hicieron cada 24 horas durante 7 días [11].

Con los datos de peso registrados y la relación (3), fue posible generar un gráfico de Q vs. tiempo, a través del cual se determinó el porcentaje de hinchamiento máximo (Q_m) y el porcentaje de hinchamiento al equilibrio de los hidrogeles (Q_e), así como el tiempo en el que cada uno fue alcanzado.

2.2.5.2 Ángulo de Contacto (CA)

Mientras que la hidrofiliidad de volumen de los hidrogeles es evaluada mediante pruebas de hinchamiento; su hidrofiliidad de superficie, también conocida como humectabilidad o mojabilidad, puede ser estudiada a través de la tensión superficial de las membranas, o bien mediante pruebas de ángulo de contacto (CA, por las siglas en inglés de *contact angle*). Por un lado, la tensión superficial es una representación de las fuerzas cohesivas de las moléculas que se encuentran en la superficie de un material; no obstante, dichas fuerzas no pueden ser medidas de forma directa [119]. Por otro lado, el CA es capaz de brindar información sobre dicha energía superficial tomando como parámetro indicativo la mojabilidad de superficie del material. Tanto el CA como la tensión superficial se relacionan entre sí a través de la ecuación de Young [119]:

$$\gamma_{Lv} \cos \theta = \gamma_{sv} - \gamma_{sl} \quad (4)$$

en donde γ_{Lv} , γ_{sv} y γ_{sl} representan la energía superficial de la interfase líquido-vapor, sólido-vapor y sólido-líquido, respectivamente; mientras que el ángulo θ , corresponde al ángulo de contacto (Figura 2.6). De esta forma, el CA es definido como el ángulo formado por la intersección de la interfase sólido-líquido y la interfase líquido-vapor cuando una gota de líquido es colocada sobre la superficie lisa de un material. El CA está fuertemente relacionado con la absorción, la hidrofiliidad y la rugosidad de los polímeros [88]; por lo que su valor dependerá de la interacción química entre el líquido y el sustrato, brindando una evaluación directa de la humectabilidad de la superficie [120, 121].

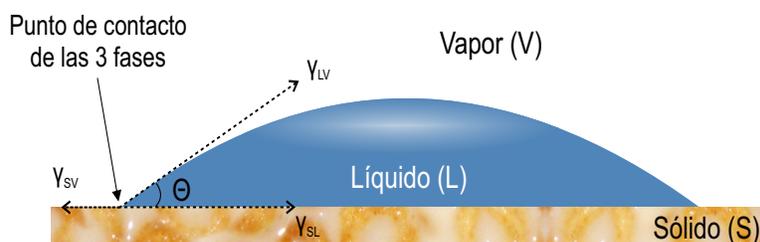


Figura 2.6 Representación esquemática del ángulo de contacto (θ) y las tensiones interfaciales (γ_{Lv} , γ_{sv} y γ_{sl}) que se generan al depositar una gota de líquido sobre la superficie de un sólido.

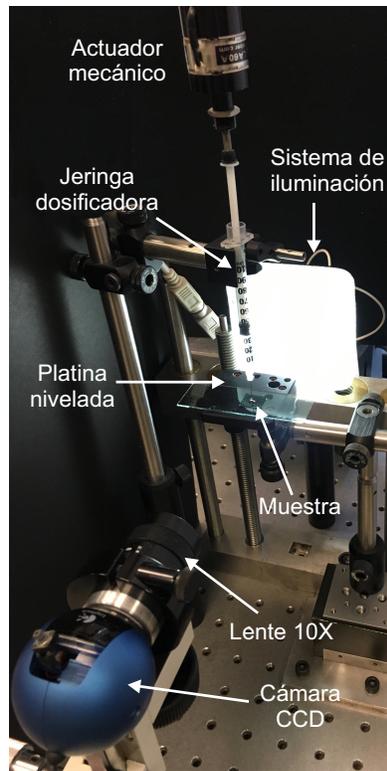


Figura 2.7 Equipo de ángulo de contacto utilizado en las pruebas de ángulo de contacto. El equipo fue diseñado e instrumentado en el Laboratorio de Mecánica y Micromecánica de Materiales del IIM.

Conocer el CA de los hidrogeles (entrecruzados y/o nanocompuestos), nos permitirá entender de mejor manera los fenómenos de interacción que presentarán las membranas con el medio en el que se encuentren inmersos dependiendo de su futura aplicación (i.e. como andamios celulares, membranas de filtración o agente liberador de fármacos, entre otras).

Las pruebas de CA se llevaron a cabo en el Laboratorio de Mecánica y Micromecánica de Sólidos del IIM utilizando el método de la gota sésil estática. En la Figura 2.7 se muestra una imagen del equipo en el que se realizaron las pruebas. Cada hidrogel (CS/PVA, CS/PVA/GA, CS/PVA/GEN, CS/PVA/MWCNTs y CS/PVA/GEN/MWCNTs) se ensayó por triplicado en estado hidratado, por lo que muestras de 1 cm^2 fueron cortadas e hidratadas en PBS hasta alcanzar el equilibrio, de acuerdo con los resultados que se obtengan durante las pruebas de hinchamiento (Sección 2.2.5.1). Posteriormente, las muestras se colocaron sobre un portaobjetos y el exceso de líquido superficial libre se retiró cuidadosamente con ayuda de un papel filtro. En seguida, el portaobjetos fue puesto sobre una platina nivelada ubicada a la distancia focal de un lente objetivo (10x), el cual se encuentra acoplado a una cámara CCD conectada a una computadora en la que se almacenan las imágenes obtenidas durante la prueba. A continuación, una gota de $0.5 \mu\text{L}$ de agua desionizada fue depositada sobre la superficie del hidrogel a través de una jeringa acoplada a un actuador mecánico (T-LA28A Zaber), el cual es controlado mediante un instrumento

virtual (VI) programado en *LabVIEW*. A través de este VI es posible especificar el volumen de la gota que se depositará sobre la superficie de la muestra e indicar el tiempo de adquisición de las imágenes, una vez que la gota es depositada sobre la muestra.

El CA que la gota formaba sobre la superficie de los hidrogeles de CS/PVA (entrecruzados y/o nanocompuestos) hidratados al equilibrio fue medido en dos ocasiones: inmediatamente después de que la gota fuera depositada sobre las muestras ($t = 0$ s) y a los 5 segundos de ser liberada ($t = 5$ s). Así, el CA fue determinado a través de un algoritmo programado en Matlab, el cual ajusta el perfil de la gota sésil de la imagen digital a un perfil teórico, midiendo de manera directa el ángulo tangente al punto de contacto trifásico. Debido a que la gota podría no ser simétrica, el CA se midió en ambos lados del perfil reportándose el valor promedio junto con su desviación típica muestral.

2.3 CARACTERIZACIÓN MECÁNICA Y ESTRUCTURAL

Los hidrogeles híbridos sintetizados en forma de membranas delgadas, se caracterizaron mecánicamente desde el punto de vista macro y micro a través de técnicas tradicionales (tracción uniaxial) y técnicas ópticas no intrusivas, como lo son, la correlación de imágenes digitales y el análisis del perfil de la membrana bajo indentación esférica. Esto con el objetivo primordial de determinar el efecto del entrecruzante y la contribución de los MWCNTs, a nivel macro y microestructural, en la resistencia mecánica de los hidrogeles híbridos de CS/PVA. Asimismo, los hidrogeles nanocompuestos fueron sometidos a una caracterización opto-mecánica a fin de establecer si dicho efecto también se presenta en estos hidrogeles. Para todo ello fue necesario el diseño, la manufactura, la instrumentación y el control de equipos capaces de llevar a cabo, de manera simultánea o por separado, las caracterizaciones anteriormente citadas. Por lo que, en las siguientes subsecciones, se especifican los detalles experimentales de cada prueba.

2.3.1 Tracción uniaxial

Una de las pruebas que se utiliza de manera frecuente para evaluar las propiedades mecánicas de materiales metálicos y poliméricos es el ensayo de tracción uniaxial. La prueba de tracción uniaxial consiste en colocar una muestra, también conocida como probeta, entre dos mordazas y tirar del material por uno de sus extremos mientras que el otro se encuentra fijo. De manera que, conociendo la fuerza aplicada, el desplazamiento que sufre el material y las

dimensiones de la probeta, es posible trazar un gráfico de esfuerzo vs. deformación (σ vs. ϵ) a través del cual se determinan propiedades mecánicas como el módulo elástico (E), el esfuerzo último a la ruptura (UTS, por las siglas en inglés de *ultimate tensile strength*), la deformación (ϵ), la tenacidad y la resiliencia. En los materiales poliméricos, el conocimiento de dichas propiedades es esencial para el diseño, el desarrollo y el éxito de nuevos dispositivos para la industria, la medicina e incluso la agricultura.

Para llevar a cabo la caracterización mecánica de los hidrogeles sintetizados, fue necesario diseñar un probador capaz de realizar, de manera precisa, pruebas de tracción uniaxial en materiales pequeños, suaves y delgados (i.e. hidrogeles, tejidos biológicos, andamios celulares, membranas poliméricas, etc.). Esto debido a que los equipos comerciales están diseñados e instrumentados para la caracterización de otro tipo de materiales (i.e. metales, concretos o cerámicas) cuyas dimensiones, morfología y resistencia distan mucho de las presentadas por los hidrogeles o tejidos biológicos.

2.3.1.1 Diseño e instrumentación del probador mecánico de tracción uniaxial

El probador de tracción uniaxial cuenta con un marco de carga conformado por dos postes de acero inoxidable, sobre los cuales se acopló el actuador mecánico con ayuda de una placa horizontal. Ahora bien, para acoplar el sensor de fuerza al actuador mecánico, se maquinó una pieza en forma de L invertida y al final de ella se colocó el sensor y las mordazas que sujetarán la probeta a ensayar. Las mordazas fueron fabricadas en acero inoxidable y diseñadas de forma que sujetaran firmemente las muestras suaves, evitando su deslizamiento durante la prueba.

Como actuador mecánico se usó una platina motorizada *MTS50-Z8* de Thorlabs, con un desplazamiento lineal máximo de 50 mm y un desplazamiento incremental mínimo de 0.05 μm . La fuerza de tracción aplicada fue registrada por una celda de carga miniatura de ± 111 N (Honeywell Sensotec, modelo 34), capaz de medir fuerzas con una precisión de ± 0.03 N. La fase de control y adquisición de datos se llevó a cabo mediante una computadora a través del software *LabVIEW*. En este software se programó un instrumento virtual (VI, por las siglas en inglés de *virtual instrument*) que controla la platina motorizada, despliega en tiempo real los datos de tiempo, fuerza y desplazamiento y los almacena en un archivo de datos para su posterior análisis.

En la Figura 2.8 se muestra una fotografía del probador de tracción uniaxial diseñado y un diagrama del mismo en el que se señalan todos los componentes que lo integran.

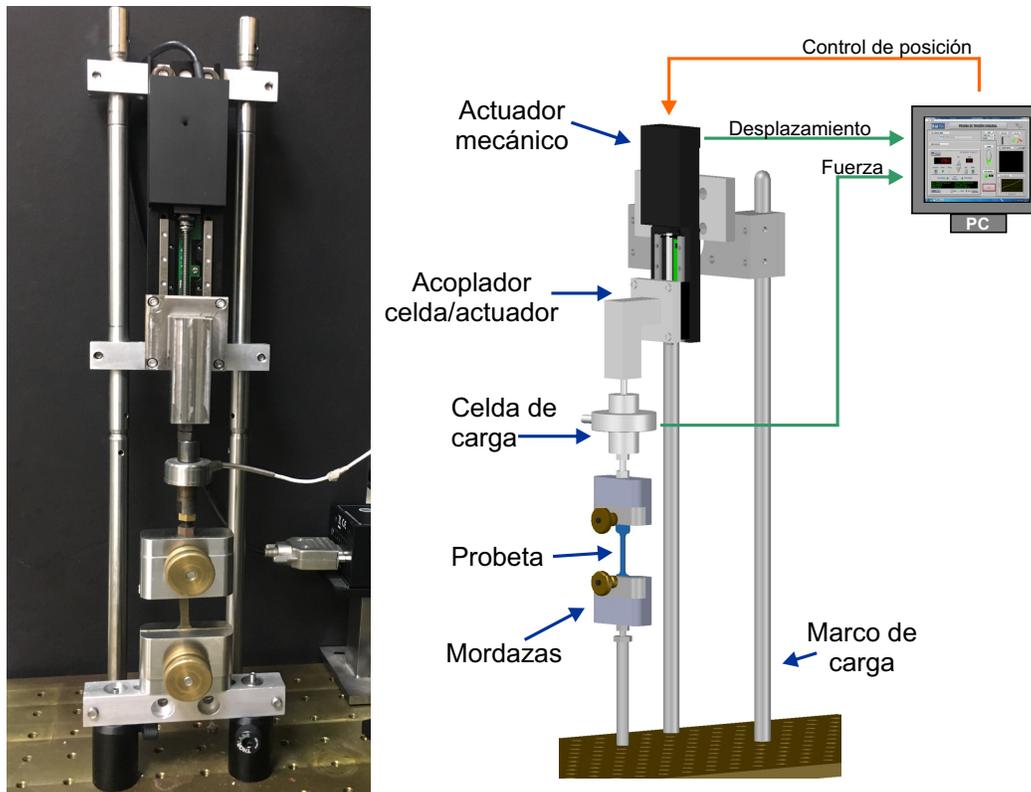


Figura 2.8 Probador de tracción uniaxial y diagrama del mismo señalando cada uno de sus componentes. Dicho probador fue diseñado e instrumentado en el Laboratorio de Mecánica y Micromecánica de Materiales del IIM.

2.3.1.2 Preparación de las muestras y pruebas de tracción uniaxial

La caracterización mecánica de los hidrogeles de CS/PVA, CS/PVA/GA, CS/PVA/GEN, CS/PVA/MWCNTs y CS/PVA/GEN/MWCNTs se llevó a cabo en estado hidratado, por lo que, de cada material sintetizado se seleccionó una membrana y se colocó en PBS hasta que su índice de hinchamiento se estabilizó (estos datos fueron obtenidos de las pruebas de cinética de hinchamiento descritas en la Sección 2.2.5.1). Posteriormente, con ayuda de un suaje con geometría de *mancuerna*⁵ y dimensiones escaladas acordes al estándar ASTM D1708 (Figura 2.9) [122], se cortaron 8 probetas de cada membrana y se midieron sus espesores en 3 puntos diferentes, con un micrómetro digital *Mitutoyo*, a fin de obtener un espesor promedio. Finalmente, las probetas se montaron cuidadosamente entre las mordazas del probador de tracción uniaxial y se deformaron a temperatura ambiente (i.e. 22 ± 1 °C), a una velocidad de 0.16 mm/s. La distancia entre mordazas fue de 22 mm, siendo esta la longitud de la región de prueba de la probeta.

⁵ La geometría de *mancuerna* permitirá la distribución de esfuerzos en la parte central de las probetas, evitando que se concentren en las zonas próximas a las mordazas.

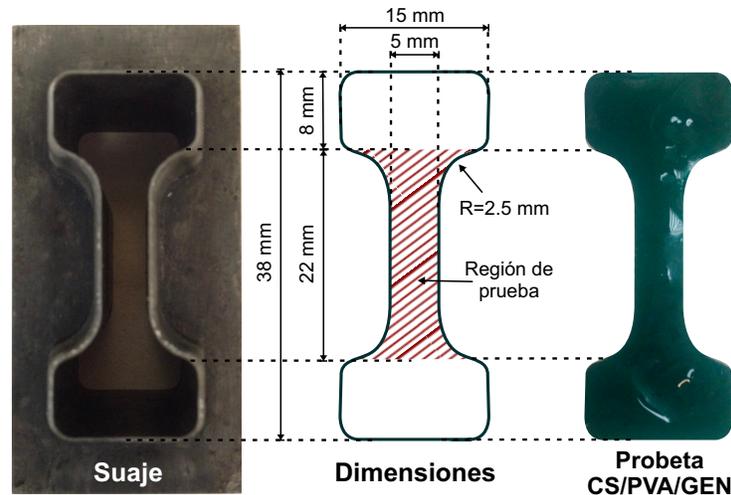


Figura 2.9 Suaje con geometría de “mancuerna” utilizado para cortar las probetas de los hidrogeles, dimensiones de estas e imagen de una probeta de un hidrogel de CS/PVA/GEN en estado hidratado.

De acuerdo con lo reportado en la literatura, en estado hidratado la mayoría de los hidrogeles se comportan como elastómeros [123]. Los elastómeros son polímeros sólidos, amorfos e isotrópicos, capaces de presentar un alto grado de deformación ante pequeños esfuerzos. Así, cuando un hidrogel se encuentra en la región del comportamiento elastomérico, sus propiedades mecánicas dependen ampliamente de la arquitectura de su red polimérica y su comportamiento esfuerzo-deformación es no lineal, por lo que no es posible aplicar la ley de Hooke ($\varepsilon = \sigma/E$) para determinar su módulo elástico [43, 123]. Lo anterior implica el uso de teorías específicas para estudiar el comportamiento mecánico de dichos materiales. Estas teorías han sido propuestas por distintos autores como Mooney, Rivlin, Treloar, Fung, y Ogden, entre otros [124-127].

El modelo de Ogden, a diferencia de otras teorías, reproduce de manera adecuada el comportamiento elastomérico de los hidrogeles en estado hidratado, cuando son expuestos tanto a pequeñas como a grandes razones de deformación (i.e. $\lambda < 2$ y $\lambda > 7$, respectivamente) [124]. El modelo de Ogden de primer orden para tracción uniaxial se presenta en la ecuación (4):

$$\sigma(\lambda) = \frac{2\mu}{\alpha} \left[\lambda^{(\alpha-1)} - \lambda^{-\left(\frac{\alpha}{2}+1\right)} \right] \quad (4)$$

en donde σ es el esfuerzo (Pa), λ es la razón de elongación ($\lambda = \varepsilon + 1$), μ es el módulo de corte y α es un parámetro relacionado con los invariantes de deformación para materiales incompresibles⁶ [125].

⁶ En los elastómeros, el cambio de volumen ante un esfuerzo de tensión es muy pequeño ($dV \approx 0$), por lo que su contribución al proceso de deformación puede ser despreciado frente a otros términos, considerándose incompresible.

El esfuerzo (σ) se podrá calcular como $\sigma = \frac{f}{A_t}$, donde f es la fuerza de tracción que se le aplica a la probeta para deformarla y A_t corresponde al área transversal de la misma, es decir, el área perpendicular a la dirección de deformación. La deformación longitudinal de la muestra (ε), se calculará como $\varepsilon = \frac{l-l_0}{l_0}$, donde l_0 es la distancia inicial de la zona calibrada de la probeta y l es el cambio en distancia. Finalmente, los parámetros μ y α pueden ser fácilmente obtenidos en *Mathematica* a través de un algoritmo que realice el ajuste no lineal de los datos σ vs. λ . Tomando en cuenta que los hidrogeles pueden ser considerados materiales isótropos e incompresibles, el módulo elástico (E) es determinado a través de la relación entre las constantes elásticas μ y E , dada por la relación (5):

$$E = 2\mu (1 + \nu) \quad (5)$$

donde ν representa el coeficiente de Poisson [96]. El coeficiente de Poisson es una constante elástica que relaciona la deformación transversal y la deformación longitudinal que experimenta un material al ser sometido a una sollicitación axial [124]. Se ha reportado que, en materiales incompresibles como los elastómeros y los hidrogeles en estado hidratado, la variación del coeficiente de Poisson es muy pequeña (i.e. 0.494 - 0.5) por lo que, generalmente, se considera que toma un valor de 0.5 en dichos casos [123, 128, 129].

2.3.2 Tracción biaxial por indentación esférica

Si bien el ensayo de tracción uniaxial es muy útil, no brinda información suficiente cuando se trata de membranas delgadas o hidrogeles, ya que éstos difícilmente se encuentran expuestos a esfuerzos uniaxiales en su campo de aplicación (andamios celulares, sustitutos de tejidos biológicos, dispositivos médicos, actuadores, entre otros), por lo que caracterizar este tipo de materiales bajo esfuerzos biaxiales, esfuerzos aún más cercanos a los presentes en el mundo real, resulta de vital importancia.

La prueba de tracción biaxial por indentación esférica consiste en sujetar firmemente una membrana delgada entre dos placas con un orificio central y aplicarle, de manera controlada, una deflexión central utilizando un indentador con geometría esférica. A lo largo de la prueba, los datos de fuerza y deflexión aplicadas son registrados y almacenados en un archivo electrónico para su posterior análisis.

2.3.2.1 Diseño e instrumentación del probador mecánico

La caracterización de los hidrogeles bajo tracción biaxial por indentación esférica implicó el desarrollo de una nueva metodología para determinar el módulo elástico de los materiales ensayados. Asimismo, como parte de este trabajo de tesis, fue necesario realizar el diseño, construcción, instrumentación, control y validación de un novedoso probador mecánico con la capacidad de evaluar simultáneamente el comportamiento macro y micromecánico bajo tracción biaxial de hidrogeles y membranas delgadas a través de la técnica de correlación de imágenes digitales en tres dimensiones y el análisis de su perfil de deformación (equipo que en su conjunto no existía a nivel científico ni comercial). Los pormenores sobre la instrumentación y validación de dicho probador, así como el desarrollo de la metodología propuesta para evaluar el módulo elástico de las membranas esféricamente indentadas, son presentados a detalle en el Capítulo 4.

2.3.2.2 Preparación de las muestras y pruebas de indentación

Las propiedades mecánicas de los hidrogeles bajo tracción biaxial fueron evaluadas en estado hidratado, por lo que cinco membranas de cada uno de los materiales sintetizados fueron colocadas en PBS hasta que su índice de hinchamiento se estabilizó (i.e. una vez que el equilibrio fue alcanzado). Posteriormente, las probetas se cortaron con ayuda de un suaje circular de 60 mm de diámetro (Figura 2.10 A) y su espesor fue medido en 12 puntos aleatorios con un micrómetro digital *Mitutoyo* a fin de obtener el espesor promedio de cada probeta a ensayar.

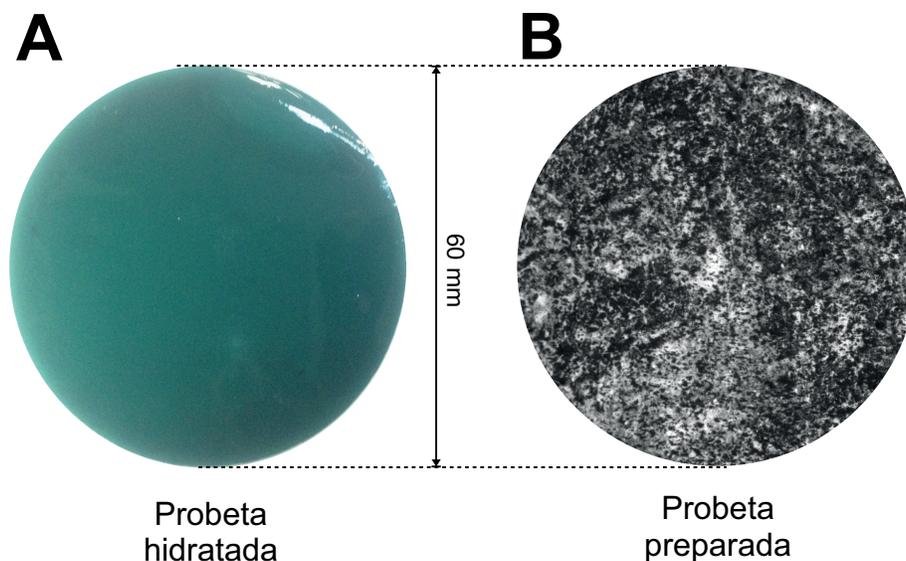


Figura 2.10 Probetas para ensayos de tracción biaxial por indentación. A) Probeta de CS/PVA/GEN en estado de hidratación al equilibrio. B) Probeta de CS/PVA/GEN hidratada al equilibrio y preparada con el maquillaje artístico blanco (base) y el polvo de gis negro, a fin de crear el patrón estocástico requerido para el análisis por DIC.

Debido a que los hidrogeles en estado hidratado presentan una superficie brillante, transparente (hidrogeles de CS/PVA y CS/PVA/MWCNTs) y homogénea; fue necesario crear un patrón estocástico blanco/negro a fin de hacer más eficiente el proceso de correlación de las imágenes digitales y obtener resultados certeros. Por lo tanto, una cara de las probetas fue cubierta con maquillaje artístico de color blanco mate y sobre ella se esparció cuidadosamente el polvo de un gis negro, creando así el patrón requerido (Figura 2.10 B). Cabe señalar que, con el objetivo de obtener un patrón estocástico que no influyera en el comportamiento mecánico de las membranas y se deformara junto con ellas, distintos métodos fueron probados (i.e. irradiar las membranas con el haz expandido de un láser de He-Ne, cubrir la superficie con talco y polvo de gis negro, o pintar la membrana con pintura base de agua o acrílica); sin embargo, algunos modificaban el comportamiento del material o con ellos no se obtenía el acabado necesario.

Las probetas con el patrón estocástico fueron colocadas entre las placas del porta-muestras y ambas placas se fijaron firmemente procurando que la muestra se mantuviera tensa y libre de pliegues o arrugas. Finalmente, las membranas fueron indentadas 8.5 mm a una velocidad constante de 0.16 mm/s, a temperatura ambiente ($22\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$). Los datos de fuerza y desplazamiento, así como las imágenes estereoscópicas y del perfil de deformación, fueron utilizados para evaluar el comportamiento macro y micromecánico de los hidrogeles.

Así, por un lado, las imágenes estereoscópicas fueron usadas para estudiar el comportamiento micromecánico mediante la técnica de correlación de imágenes digitales en tres dimensiones (3D-DIC, por las siglas en inglés de *three-dimensional digital image correlation*) utilizando el software especializado *ARAMIS v6.3* de la empresa GOM. Por otro lado, el comportamiento macromecánico fue evaluado a partir de los datos de fuerza-deflexión y de las imágenes del perfil de deformación utilizando una metodología más sencilla y con resultados mucho más certeros que algunos de los modelos reportados en la literatura; de manera que, como el espesor de la membrana (h), el radio del indentador (R), el radio del bastidor (a), la carga aplicada (w) y la deflexión central que experimenta la membrana (δ) son valores conocidos en nuestro arreglo experimental, el modulo elástico de los hidrogeles (E) pudo ser fácilmente determinado mediante la pendiente de la porción lineal de una curva carga-deflexión de la forma $6w$ vs. $0.376 hR \left(\frac{\delta}{R}\right)^3$.

Esta metodología constituye una de las contribuciones más grandes del presente trabajo de investigación al área de caracterización mecánica de hidrogeles y materiales elastoméricos, y todos los pormenores sobre su planteamiento, desarrollo y validación son presentados de manera detallada en el Capítulo 4.

2.3.3 Parámetros estructurales de la red polimérica

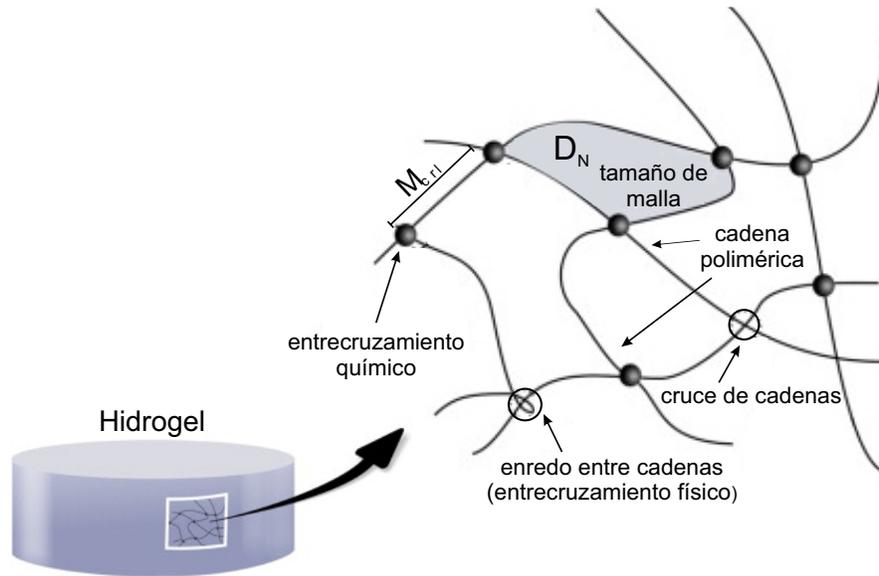


Figura 2.11 Representación esquemática de los parámetros estructurales de la red polimérica de los hidrogeles.

A través de los parámetros estructurales de la red polimérica, es posible definir y entender desde otra perspectiva el comportamiento macro y micromecánico de los hidrogeles. La estructura de la red estará definida por la eficiencia del genipin, o el glutaraldehído, como agente entrecruzante tanto en los hidrogeles entrecruzados y cargados con MWCNTs (i.e. CS/PVA/GEN/MWCNTs), como en aquellos únicamente reticulados (i.e. CS/PVA/GEN y CS/PVA/GA). Así, el peso molecular entre puntos de entrecruzamiento (M_{crl}); el tamaño de poro o malla (D_N) -también conocido como longitud de correlación- y la fracción volumétrica del hidrogel en estado de hidratación al equilibrio (v_s), determinarán en gran medida sus propiedades mecánicas [130].

El peso molecular promedio entre puntos de entrecruzamiento (M_{crl}) se define como el peso promedio de las cadenas poliméricas que conforman la red (Figura 2.11), entendiendo que una cadena es aquella sección de monómeros comprendidos entre dos puntos de entrecruzamiento. Este parámetro se calculará a través de la ecuación (6) [55].

$$M_{crl} = \frac{cRT}{\mu} \quad (6)$$

Donde R es la constante universal de los gases ($8.3145 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$), T es la temperatura en *Kelvin* a la cual se determinó el módulo de corte y c es la concentración, en g/m^3 , del CS, el PVA, el GEN y/o los MWCNTs en la disolución.

D'Errico et al. [8] demostraron que el tamaño de malla (D_N) puede ser determinado mediante el “*modelo equivalente de la red*” usando la ecuación (7) [131]. El D_N es un indicativo de la distancia promedio entre puntos de entrecruzamiento (Figura 2.11). De acuerdo con la ecuación (7), D_N puede ser fácilmente determinado si se conoce la concentración (c) y el peso molecular entre puntos de entrecruzamiento (M_{crl}):

$$D_N = \sqrt[3]{\frac{6M_{crl}}{\pi c A}} \quad (7)$$

en donde A es el número de Avogadro ($6.023 \times 10^{23} \text{ mol}^{-1}$).

Finalmente, la fracción volumétrica de polímero en estado de hidratación al equilibrio (v_s) se calculará usando los resultados de las pruebas de hinchamiento realizadas previamente (Sección 2.2.5.1). Así, la relación de hinchamiento al equilibrio (Q_e) será inversamente proporcional a la fracción volumétrica v_s , por lo que [132]:

$$v_s = Q_e^{-1} \quad (8)$$

Un factor estructural más que puede ser determinado, es la densidad de entrecruzamiento teórica (φ_c); es decir, el número de cadenas presentes por unidad de volumen. De acuerdo con Flory [131] y Treloar [124], φ_c puede ser determinada mediante la expresión (9):

$$\varphi_c = \frac{c}{M_{crl}} \quad (9)$$

en donde c es la concentración y M_{crl} es el peso molecular entre puntos de entrecruzamiento.

2.3.4 Caracterización opto-mecánica

Se ha reportado que en matrices poliméricas de polidimetilsiloxano (PDMS), las nanopartículas de carbono producen efectos térmicos y mecánicos localizados cuando dichas matrices son expuestas a irradiaciones electromagnéticas en el intervalo del infrarrojo (i.e. efecto opto-mecánico) [22, 133]. Estos efectos, podrían tener aplicaciones en sistemas de liberación de fármacos, andamios celulares, terapias localizadas y microfluídica, entre otras. Con la finalidad de determinar si el efecto opto-mecánico es propio del sistema PDMS+nanopartículas de carbono o si también se podría presentar en los hidrogeles de CS/PVA cargados con MWCNTs, estos hidrogeles fueron sometido a pruebas adicionales.

Para desarrollar dichos ensayos, al probador de tracción uniaxial (Sección 2.3.1.1) le fue adaptado un láser de diodos con fibra óptica acoplada (JDSU, 975 nm, 800 mW potencia de salida máxima), el cual irradiará a la muestra para tratar de generar un efecto mecánico en ella. Del otro lado del probador se colocó un filtro y una cámara CCD (Duncan Tech RH1100) acoplada a un microscopio óptico, esto con el fin de capturar imágenes de la superficie de la membrana y posteriormente llevar a cabo un análisis por DIC de los micromecanismos de deformación que se llegaran a presentar. Con el objetivo de generar el patrón estocástico sobre la superficie de las muestras, necesario para el análisis por DIC de las imágenes, se utilizó el haz expandido de un láser de He-Ne. Los datos de tiempo y fuerza registrados a lo largo de la prueba fueron sincronizados con su respectiva imagen mediante un instrumento virtual programado en *LabVIEW*. En la Figura 2.12 se muestra un diagrama del dispositivo experimental utilizado.

Al igual que en las pruebas de tracción uniaxial, una vez que los hidrogeles alcanzaron el equilibrio en su hinchamiento, las probetas de CS/PVA/MWCNTs y CS/PVA/GEN/MWCNTs fueron cortadas y evaluadas. Al inicio de la prueba, las probetas se colocaron entre las mordazas del probador y se estiraron 2 mm con la finalidad de evitar la curvatura de la zona de prueba y de alinear las cadenas poliméricas en dirección a la aplicación de la carga, reduciendo así la entropía del sistema. Posteriormente, la fibra óptica se posicionó en el centro de la zona de prueba, a 1 mm de separación de la superficie de la probeta, y antes de comenzar a irradiarlas con el láser de diodos se esperó a que el proceso de relajación de los hidrogeles terminara, lo cual se evidencia al obtener una lectura estable en la celda de carga. Inmediatamente después, siguiendo el procedimiento experimental reportado por Sánchez-Arévalo et al. [134] para membranas de PDMS/nanopolvo de carbón, el láser se encendió durante 20 s a una potencia de 100 mW y a continuación el hidrogel se dejó relajar por 60 s antes de encender nuevamente el láser. Este proceso se repitió 4 veces más, incrementando 100 mW la potencia del láser en cada ocasión, de modo que los hidrogeles fueron evaluados en un intervalo de potencia de 100 mW - 500 mW.

Finalmente, se trazó un gráfico de esfuerzo vs. tiempo (σ vs. t) para evidenciar el efecto de las interacciones entre los MWCNTs y la irradiación láser sobre la respuesta macromecánica de los hidrogeles. A partir de este, el incremento en esfuerzo debido a las microdeformaciones inducidas por la irradiación láser para cada potencia aplicada ($\Delta\sigma_{light}$) fue calculado utilizando la expresión (11):

$$\Delta\sigma_{light} = \sigma_{LaserOff} - \sigma_{LaserOn} \quad (11)$$

en donde $\sigma_{LaserOff}$ corresponde al esfuerzo registrado al momento de apagar el diodo láser y $\sigma_{LaserOn}$ al esfuerzo máximo registrado cuando se enciende [133].

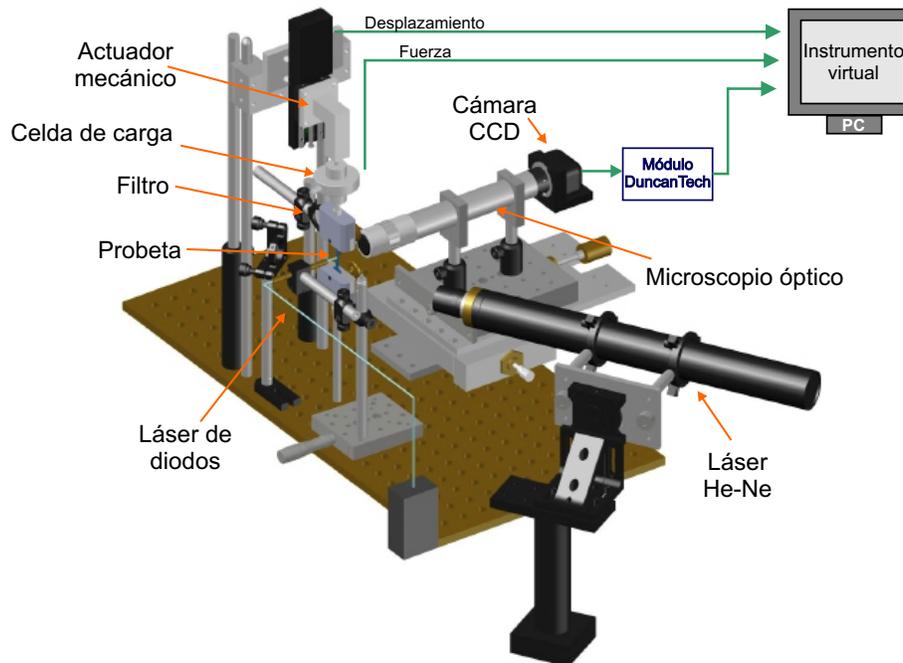


Figura 2.12 Diagrama del probador de tracción uniaxial acoplado con el láser de diodos, el láser He-Ne y la cámara CCD para el desarrollo de las pruebas opto-mecánicas.

2.4 CARACTERIZACIÓN BIOLÓGICA

En esta sección se abordan los detalles experimentales de las técnicas empleadas para evaluar la respuesta de las células al ser sembradas sobre los hidrogeles híbridos de CS/PVA, entrecruzados y/o nanocompuestos. Asimismo, se presentan los detalles sobre el aislamiento y cultivo *in vitro* de los fibroblastos dérmicos humanos utilizados para la formación de los constructos. Todas las pruebas biológicas se llevaron a cabo en el Laboratorio de Inmunoterapia e Ingeniería de Tejidos del departamento de Biología Celular y Tisular de la Facultad de Medicina de la UNAM.

2.4.1 Aislamiento y cultivo *in vitro* de fibroblastos dérmicos humanos

Los fibroblastos fueron obtenidos por donación voluntaria de muestras de piel provenientes de individuos sanos de entre 20 y 25 años de edad, previo consentimiento informado. Las muestras de piel fueron extraídas de la región interna del brazo derecho con ayuda de un punzón para biopsia dérmica estéril (4 mm de diámetro). Tras la extracción, las muestras fueron lavadas con PBS pH=7.4 (Gibco, Invitrogen, EUA) y una disolución de antibiótico/antimicótico al 10%.

Posteriormente, fueron colocadas en una disolución de dispasa (Gibco, BRL/Life Technologies, Japón) al 0.1% a fin de separar la dermis de la epidermis. A continuación, la dermis fue removida y digerida enzimáticamente⁷, durante 3 horas a 37 °C, en una disolución de colagenasa tipo I al 0.2% (Gibco, BRL/Life Technologies, NY). Para separar los fragmentos de dermis que no lograron ser digeridos, la suspensión celular resultante se filtró a través de un filtro de nylon con poros de 100 µm (Falcon, Becton Dickinson, EUA). La suspensión celular fue centrifugada a 1500 rpm durante 10 minutos a temperatura ambiente, a fin de obtener un botón de fibroblastos. El sobrenadante⁸ resultante fue aspirado y el botón de células obtenido se resuspendió en 15 mL de medio de cultivo DMEM alto en glucosa (Dulbecco's Modified Eagle Medium, No. Cat. P0103-N1L de Biowest, EUA) suplementado con 10% de suero bovino fetal (SBF, No. Cat. S16509 de Biowest, EUA) y 1% de penicilina/estreptomicina (No. Cat. L0010 de Biowest, EUA). Posteriormente, la viabilidad fue verificada mediante tinción con azul tripano en una dilución 1:2 y el conteo celular se realizó en hemocitómetro. Los fibroblastos obtenidos se sembraron en pase 1 a una densidad aproximada de 15,000 células/cm² en un área de 46 cm².

Los cultivos celulares se mantuvieron en incubación a 37 °C en atmósfera humidificada con 5% de CO₂ hasta que alcanzaron el 80% de confluencia⁹. Durante este periodo, el medio de cultivo se cambió dos veces por semana y mediante un microscopio invertido (Carl Zeiss, Alemania) se monitoreó el crecimiento celular y la ausencia de contaminación bacteriana. Las células fueron tripsinizadas¹⁰ y se volvieron a sembrar sucesivamente hasta llegar a pase 4, momento en el cual ya se contaba con el número de células necesario para formar todos los constructos.

2.4.2 Formación de constructos

Una vez que los fibroblastos cultivados de manera *in vitro* en pase 4 formaron una monocapa y alcanzaron cerca del 80% de confluencia, fueron tripsinizados con 0.05%/0.2% de tripsina/EDTA (Sigma, EUA). Las células se contaron y se sembraron sobre la superficie de pequeñas muestras de las membranas de CS/PVA, CS/PVA/GA, CS/PVA/GEN, CS/PVA/MWCNTs y CS/PVA/GEN/MWCNTs; a fin de formar constructos¹¹ biológicos.

⁷ Disgregación del tejido en células individuales utilizando enzimas.

⁸ Fase líquida superior que permanece tras la formación de un precipitado celular (pellet) después de centrifugar la muestra.

⁹ Fase en la que las células del cultivo ocupan casi toda la superficie disponible pudiendo llegar a inhibir su división debido al contacto que existe entre sí.

¹⁰ Procedimiento a través del cual, mediante una enzima (tripsina), se desprenden las células de la superficie a la que se encuentran adheridas con la finalidad de transferirlas a otras superficies.

¹¹ Un constructo es la estructura que resulta de la asociación de las células y el biomaterial utilizado como andamio en la construcción de un tejido artificial mediante ingeniería de tejidos.

Para formar los constructos, 10 muestras circulares de 8 mm de diámetro fueron cortadas de cada uno de los grupos de hidrogeles sintetizados. Estas muestras fueron lavadas dos veces con agua destilada y PBS, a fin de ajustar su pH y de eliminar cualquier resto de los reactivos y disolventes utilizados durante la síntesis. Posteriormente, todas las muestras se esterilizaron mediante radiación UV en una cámara ultravioleta UVC-500 (Hoefer Inc., EUA), durante 20 minutos (i.e. 10 minutos por cara). De acuerdo con lo reportado en literatura, este método de esterilización no produce cambios significativos en las propiedades de los hidrogeles híbridos de CS/PVA [4]. Tras su esterilización, las muestras de CS/PVA, CS/PVA/GA, CS/PVA/GEN, CS/PVA/MWCNTs y CS/PVA/GEN/MWCNTs fueron colocadas en cajas de 48 pozos (1 muestra/pozo). Luego, se hidrataron por 30 min con suero bovino fetal y 9 muestras de cada material fueron sembradas con fibroblastos a una densidad de 6×10^4 células/cm². Los constructos se mantuvieron en incubación a 37 °C en una atmósfera humidificada con 5% de CO₂ por 30 min. Posteriormente, 3 mL de medio de cultivo DMEM alto en glucosa fueron añadidos a cada pozo. Los constructos se mantuvieron bajo condiciones estándar de incubación *in vitro* durante 21 días, cambiando el medio de cultivo cada tercer día.

La muestra que no fue sembrada fungió como control durante las pruebas.

2.4.3 Prueba de viabilidad celular

La viabilidad celular de los constructos se estudió usando calceína-AM y homodímero de etidio (No. Cat. kit L-3224, VIVO/MUERTO; Molecular Probes, EUA). Esta prueba determina simultáneamente las células vivas y las células muertas midiendo dos parámetros conocidos. Si se detecta actividad de esterasas intracelulares, la calceína-AM emite fluorescencia verde (~515 nm) al excitarse a 490 nm, indicando así células viables. En cambio, si las células están muertas, habrá pérdida de la membrana plasmática y el homodímero de etidio podrá entrar en contacto con los ácidos nucleicos, emitiendo fluorescencia roja (~635 nm) al excitarse a 490 nm.

Las pruebas de viabilidad celular se llevaron a cabo a los 3, 7 y 21 días de cultivo *in vitro*, evaluándose, en cada ocasión, 3 constructos de cada material. Para ello, a cada constructo se le colocaron 0.1 µL del kit de calceína-AM y homodímero de etidio, y a continuación se incubaron a 37 °C durante 60 min. Transcurrido este tiempo, los constructos fueron sacados de la incubación y lavados con PBS para retirar residuos de los reactivos. Posteriormente, se montaron cuidadosamente sobre un portaobjetos y se observaron en el microscopio óptico de fluorescencia *NIKON-Eclipse 80i*. Usando la cámara incorporada al microscopio, se tomaron fotos de las células adheridas a la superficie del hidrogel en distintos campos y a diversas magnificaciones, por lo

que se emplearon los objetivos 4x, 10x y 20x. Finalmente, utilizando las micrografías tomadas a un aumento de 10x, el porcentaje de viabilidad de los hidrogeles fue determinado mediante la ecuación (12):

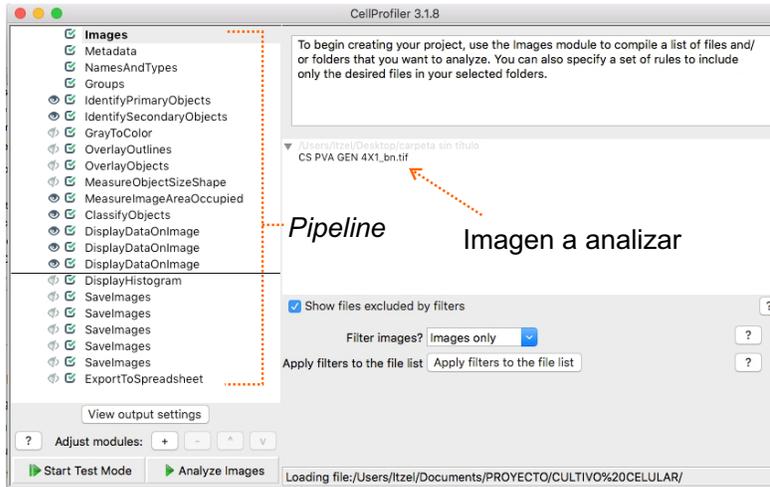
$$\text{Índice de viabilidad (\%)} = \left(\frac{\text{células vivas}}{\text{células vivas} + \text{células muertas}} \right) 100 \quad (12)$$

Así, a partir de esta expresión fue posible relacionar la cantidad de células vivas (verdes) con la cantidad de células muertas (rojas) presentes en los constructos de CS/PVA, CS/PVA/GA, CS/PVA/GEN, CS/PVA/MWCNTs y CS/PVA/GEN/MWCNTs

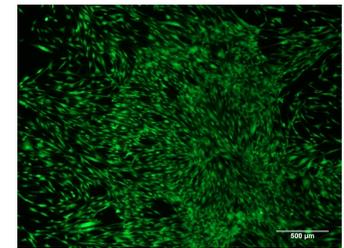
2.4.4 Análisis morfológico y conteo celular

Es bien sabido que la rigidez, la rugosidad y la hidrofiliidad de superficie del sustrato pueden influir significativamente en la morfología de las células adheridas a él, así como en las interacciones que estas desarrollen con la matriz extracelular. La forma amorfa redondeada que presentan las células en suspensión es muy diferente de la forma poligonal típicamente observada sobre sustratos bidimensionales, y más diferente aún, de la forma fusiforme frecuentemente observada en condiciones *in vivo* [135].

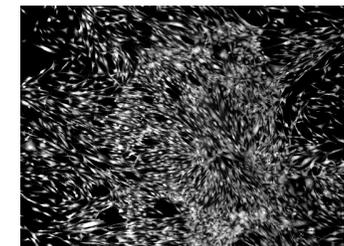
A fin de evaluar la morfología que los fibroblastos adquieren al adherirse y permanecer sobre la superficie de los hidrogeles híbridos de CS/PVA (entrecruzados y/o nanocompuestos), así como determinar su número y tamaño, las micrografías obtenidas a una magnificación 4x durante las pruebas de viabilidad celular (Sección 2.4.3), fueron procesadas mediante el software de acceso libre *CellProfiler v.3.1.5*. (Broad Institute). Dicho programa, es frecuentemente utilizado para la cuantificación de imágenes biológicas obtenidas a través de microscopía óptica. El software está diseñado a partir de módulos que permiten cuantificar el número de objetos presentes, evaluar su tamaño, forma, textura, intensidad de marcación, etcétera. Así, mediante su interfaz gráfica se generó una secuencia de comandos, “*pipeline*”, con el objetivo de identificar y cuantificar las células presentes sobre la superficie de las muestras, y el porcentaje de área que cubrían (Figura 2.13). Posteriormente, las micrografías de los constructos adquiridas a los 3, 7 y 21 días de cultivo *in vitro* fueron analizadas bajo este *pipeline* y mediante parámetros como la longitud del eje más largo y el diámetro máximo de Feret (Figura 2.14 A) fue posible determinar el tamaño de los fibroblastos adheridos a los hidrogeles; mientras que, para evaluar su forma, se utilizó el factor de excentricidad (Figura 2.14 B).



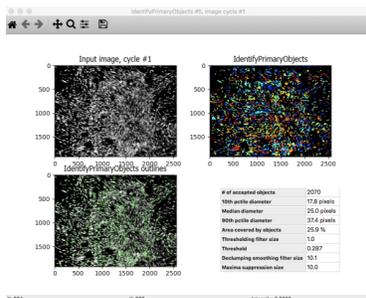
Micrografía original (4x)



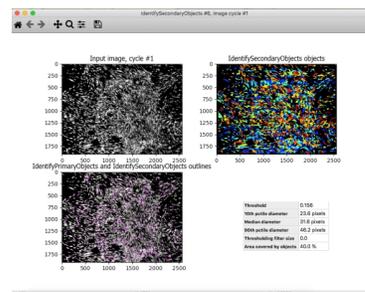
Conversión a escala de grises



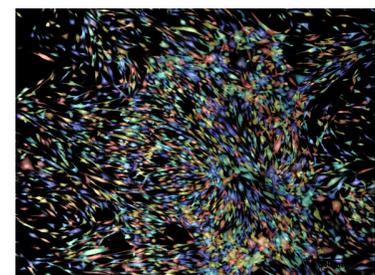
Cuantificación e identificación de objetos primarios



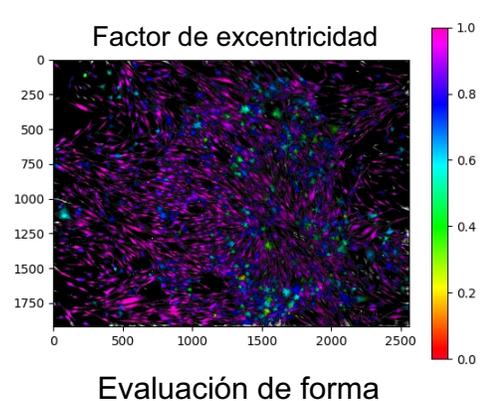
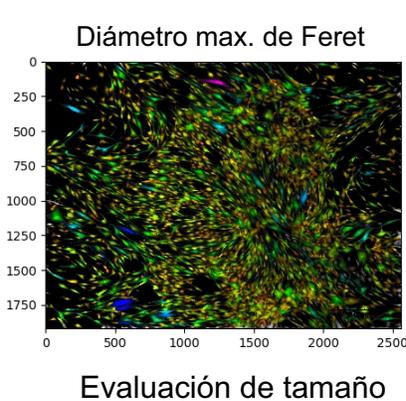
Identificación de objetos secundarios



Superposición de objetos identificados y medición de parámetros morfológicos



* Resultados generados:



Archivo .xls con las características morfológicas de cada objeto identificado.

Figura 2.13 Interfaz de usuario del software CellProfiler y esquema de la secuencia de comandos utilizada para determinar el tamaño de las células, su forma, número y porcentaje de área cubierto.

El diámetro de Feret (Figura 2.14 A) es un parámetro frecuentemente utilizado en microscopía para medir el diámetro promedio de partículas con geometría irregular, de manera que es representado como la distancia entre dos líneas paralelas tangenciales al contorno de la proyección de la partícula [136]. Dependiendo de la dirección de las líneas paralelas, se pueden obtener varios diámetros de Feret para la misma partícula, por lo que tras llevarse a cabo mediciones en distintas direcciones es posible determinar el diámetro máximo y mínimo, los cuales están asociados con la longitud y anchura de la partícula, respectivamente. Por otro lado, el factor de excentricidad es un indicativo del grado de elongación de una partícula. A fin de determinar este factor es necesario ajustar las partículas a una elipse y a través de la razón entre la longitud del eje mayor y la distancia al foco es posible obtener un valor entre 0 y 1 (Figura 2.14 B). Así, una elipse con excentricidad igual a 0 es en realidad un círculo; mientras que, una elipse cuya excentricidad es 1 corresponde a un segmento de línea [137].

Una vez que ambos datos fueron determinados, tanto la distribución teórica como los histogramas correspondientes al cambio de forma y tamaño que las células experimentaron a lo largo del periodo de cultivo *in vitro*, fueron graficados en *Mathematica* utilizando el archivo de Excel que se generó durante el análisis. A su vez, conociendo el número total de células sobre la superficie de los hidrogeles fue posible trazar una gráfica mediante la cual se evidenció si el número de células se incrementó durante el tiempo de cultivo *in vitro*, o no. Todos estos resultados constituirán una primera aproximación para valorar si los hidrogeles son capaces de promover la proliferación celular y, por ende, si serían viables para su uso como andamios celulares en ingeniería de tejidos.

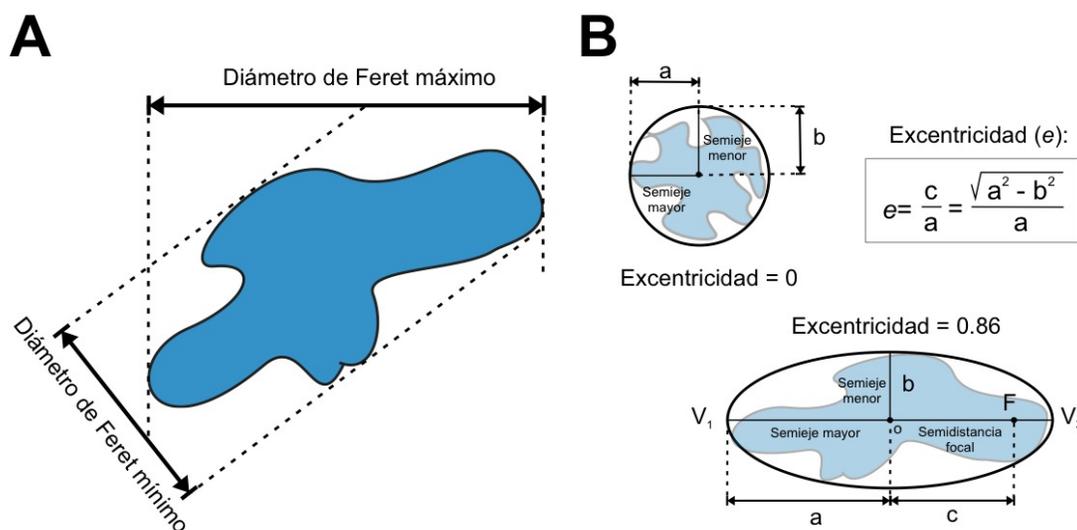


Figura 2.14 Diagramas descriptivos de los parámetros utilizados para medir el tamaño y determinar la forma de partículas irregulares en microscopía. A) Diámetro de Feret y B) Factor de excentricidad.

CAPÍTULO 3

SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA

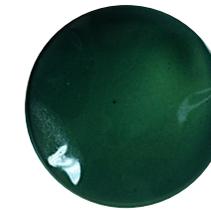
En este capítulo se presentan y se discuten de manera detallada los resultados obtenidos durante la caracterización fisicoquímica de los hidrogeles híbridos de CS/PVA entrecruzados y/o nanocompuestos. Asimismo, se plantean las estructuras moleculares que podrían tener sus respectivas redes poliméricas, con el objetivo de entender de mejor forma las propiedades fisicoquímicas, mecánicas y biológicas que cada grupo de hidrogeles pudiera llegar a presentar.

3.1 SÍNTESIS DE LOS HIDROGELES

Todos los hidrogeles híbridos a base de CS/PVA estudiados en este trabajo de investigación fueron sintetizados en forma de membranas delgadas; tanto la formación de la membrana como el entrecruzamiento, físico o químico, de la mezcla CS/PVA ocurrieron mientras la disolución se evaporaba de la caja de Petri. Así, el tiempo que las membranas tardaron en formarse fue de 48 a 96 horas dependiendo de la mezcla polimérica, siendo los hidrogeles entrecruzados con genipin (i.e. CS/PVA/GEN y CS/PVA/MWNT/GEN) los que requirieron más tiempo para su formación.

En la Tabla I se muestran imágenes de las membranas obtenidas y el espesor promedio de estas; todas ellas tuvieron un diámetro de 90 mm y, al ser observadas en el microscopio óptico, presentaron una superficie continua y libre de burbujas.

Tabla I. Hidrogeles híbridos a base de CS/PVA sintetizados en forma de membrana.

COMPOSICIÓN DE LOS HIDROGELES	CONTROL	ENTRECRUZADOS		NANOCOMPUESTOS	
	CS/PVA	CS/PVA/GEN	CS/PVA/GA	CS/PVA/MWCNTs	CS/PVA/ GEN/MWCNTs
					
Espesor (mm)	0.086±0.003	0.080±0.002	0.086 ±0.003	0.097±0.002	0.090±0.003

En la tabla se reportan los espesores promedio y su desviación típica muestral correspondiente.

Como se puede apreciar en la Tabla I, las membranas de CS/PVA y CS/PVA/MWCNTs presentaron un aspecto traslucido, mientras que las entrecruzadas con GEN y GA adquirieron una tonalidad azul y amarilla, respectivamente. En el caso del genipin, se ha reportado que dicho cambio de coloración se debe a la formación, en presencia de oxígeno, de enlaces covalentes insaturados entre el genipin y las aminas primarias del CS [138, 139]; mientras que las membranas con GA se tornan ligeramente amarillas como resultado de la formación de grupos cromóforos imina (-CH=N-), durante la reacción de entrecruzamiento entre los grupos aldehído del GA y las aminas primarias del CS [140]. De esta forma, el cambio de color que presentaron las membranas de CS/PVA/GEN, CS/PVA/GEN/MWCNTs y CS/PVA/GA es un primer indicativo de que el entrecruzamiento químico de estos hidrogeles se llevó a cabo de forma exitosa.

Por otra parte, los hidrogeles nanocompuestos (CS/PVA/MWCNTs y CS/PVA/GEN/MWCNTs) presentaron una distribución uniforme de MWCNTs sobre la superficie de las membranas; sin embargo, en algunos casos aún fue posible observar la presencia de clústeres de nanopartículas, los cuales se ubicaban regularmente en los bordes de las últimas membranas que fueron preparadas debido a que estos tendían a asentarse en la disolución.

3.2 ESTRUCTURA QUÍMICA DE LA RED POLIMÉRICA

A pesar de que el objetivo de este proyecto de investigación no consiste en profundizar en el mecanismo y la cinética de entrecruzamiento de los hidrogeles sintetizados, se considera importante el conocer la forma en la que sus componentes (i.e. macromoléculas, entrecruzantes y/o nanopartículas) interaccionan entre sí para conformar la red polimérica, ello con la finalidad de intuir la estructura química que cada grupo de hidrogeles podría presentar, logrando comprender así de mejor manera su comportamiento.

En el caso de los hidrogeles híbridos de CS/PVA formados únicamente mediante la mezcla física de ambos polímeros, es sumamente probable que la estructura química de su red polimérica esté conformada por cadenas de CS y PVA enmarañadas o enlazadas entre sí a través de puentes de hidrógeno entre sus grupos funcionales (Figura 3.1 A, recuadro azul). Estas interacciones intermoleculares son lo suficientemente fuertes para crear puntos de unión semipermanentes entre las cadenas y conformar una red con regiones cristalinas y amorfas (Figura 3.1 A, recuadro negro); sin embargo, de acuerdo con algunos estudios [88, 91, 93, 95], es muy importante garantizar la miscibilidad de ambas macromoléculas a fin de que dichas interacciones tomen lugar.

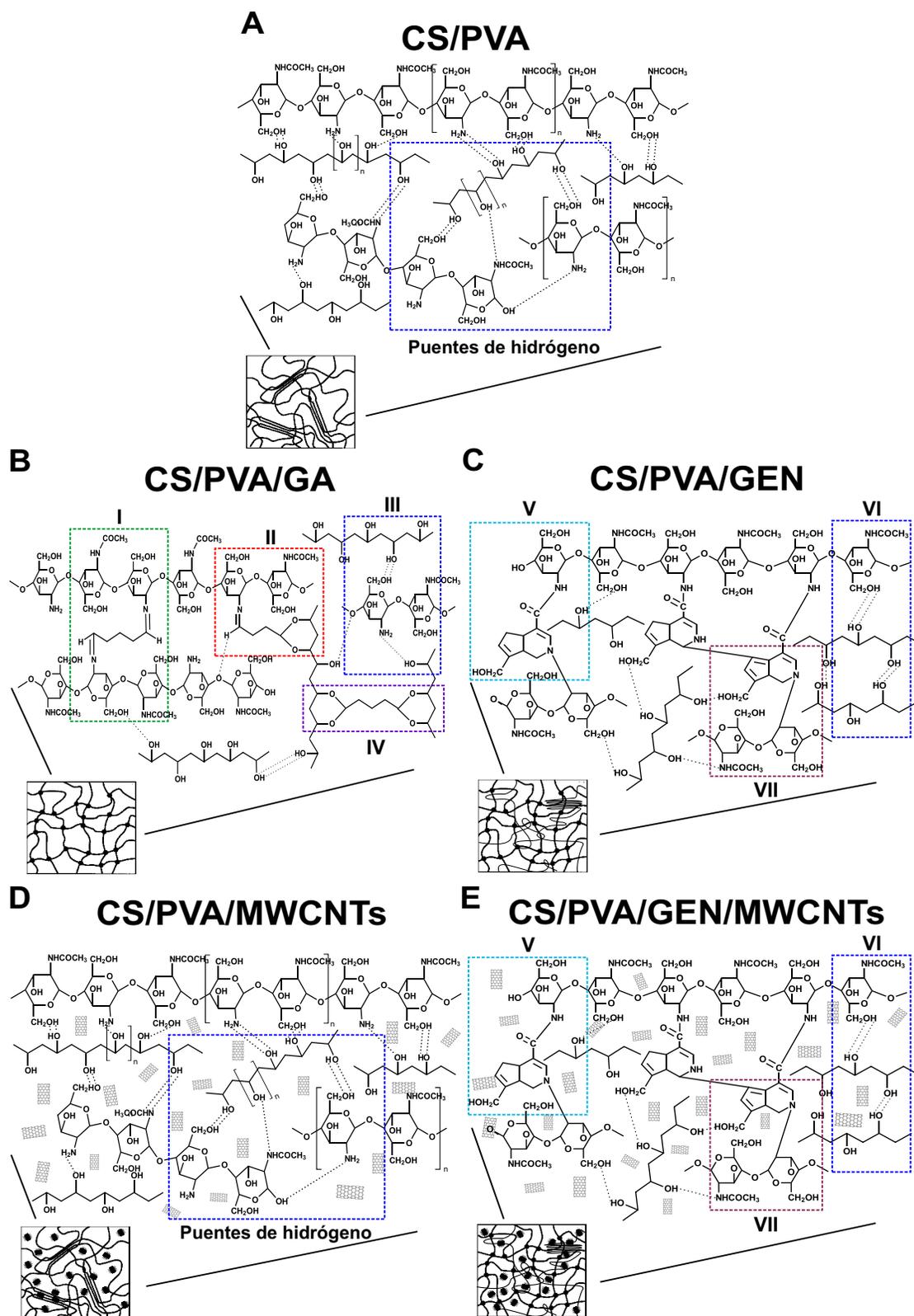


Figura 3.1 Estructura química de las redes poliméricas de los hidrogeles híbridos de CS/PVA entrecruzados y/o nanocompuestos. A) Hidrogeles control de CS/PVA, B) Hidrogeles entrecruzados de CS/PVA/GA, C) Hidrogeles entrecruzados de CS/PVA/GEN, D) Hidrogeles de CS/PVA/MWCNTs y E) Hidrogeles de CS/PVA/GEN/MWCNTs. Los pequeños cilindros en las figuras D y E representan los MWCNTs embebidos en la red polimérica.

Aunque investigaciones previas han reportado los espectros de infrarrojo de los hidrogeles de CS/PVA/GA y CS/PVA/GEN, sus estructuras moleculares aún no han sido entendidas por completo; por lo que en este trabajo se busca proponer la posible estructura química de su red polimérica. Como se planteó anteriormente, el entrecruzante frecuentemente utilizado en el sistema CS/PVA es el GA, un agente citotóxico que comprometería la viabilidad de las membranas si llegaran a quedar trazas de él en el interior de la red polimérica. De acuerdo con Jayakrishnan et al. [14], bajo condiciones ácidas el GA es capaz de reaccionar tanto con los grupos $-NH_2$ del CS, formando bases de Schiff ($R_1-CH=N-R_2$), como con los $-OH$ del PVA para formar grupos acetales ($O-CH-O$), lo cual daría lugar a una sola red polimérica entrecruzada en la que ambas macromoléculas formarían parte de ella (Figura 3.1 B, recuadro negro). En este sentido, dado que nuestra reacción de entrecruzamiento se llevó a cabo a un $pH=4$, se esperaría que dicha red estuviera conformada básicamente por [9]:

1. Cadenas de CS unidas entre sí debido a la formación de dos bases de Schiff (recuadro I en la Figura 3.1 B).
2. Cadenas de CS y PVA enlazadas por un grupo acetal y una base de Schiff. (recuadro II en la Figura 3.1 B)
3. Cadenas de PVA unidas entre sí debido a la formación de grupos acetales (recuadro IV en la Figura 3.1 B).
4. Puentes de hidrógeno inter e intramoleculares entre cadenas de CS y/o PVA (recuadro III en la Figura 3.1 B).

Debido a que el GA tiene preferencia de reacción por las $-NH_2$ del CS sobre los $-OH$ del PVA [14, 80], de estas cuatro interacciones la que se espera que esté presente en mayor proporción es la del recuadro I (Figura 3.1 B), por lo que al llevar a cabo las pruebas de FT-IR se debería de encontrar un decremento en amplitud en la banda a 3450 cm^{-1} correspondiente a los grupos $-NH_2$, acompañado por la aparición de la banda característica de las iminas ($-CH=N-$) a 1630 cm^{-1} .

Considerando que el GEN ha demostrado brindar una resistencia mecánica comparable a la de los hidrogeles entrecruzados con aldehídos [83], una rapidez de degradación *in vivo* más lenta [81], una menor respuesta inflamatoria [80] y una citotoxicidad entre 5,000 a 10,000 veces menor que el GA [85]; en este proyecto de investigación el GEN es propuesto como un potencial agente entrecruzante de la mezcla CS/PVA. Dado que en este sistema el genipin únicamente es capaz de reaccionar con los grupos $-NH_2$ del CS, los hidrogeles de CS/PVA/GEN tendrán una red semi-interpenetrada (Figura 3.1 C, recuadro negro) en la que únicamente las cadenas de CS se enlazarán covalentemente entre sí para formar una red, mientras que las cadenas lineales de PVA podrían penetrar esta red y enredarse a ella o conformar regiones cristalinas/amorfas a su

alrededor. Así, la estructura química de los hidrogeles de CS/PVA/GEN podría estar conformada por [9]:

1. Cadenas de CS unidas por amidas secundarias ($R_1-(C=O)-NH-R_2$) resultantes de la sustitución nucleófila entre el grupo éster del GEN y el grupo amino del CS (reacción V de la Figura 3.1 C).
2. Cadenas de CS unidas por aminas heterocíclicas debido a la apertura del anillo dihidropirano del GEN por el ataque nucleófilo de las aminas primarias del CS (recuadro VII de la Figura 3.1 C).
3. Cadenas de PVA enlazadas entre sí, o con cadenas de CS, a través de puentes de hidrógeno (recuadro VI en la Figura 3.1 C).

De acuerdo con Mi et al. [139], cuando la reacción de entrecruzamiento se lleva a cabo bajo condiciones ácidas ($pH < 7$), como en este caso, las uniones entre cadenas de CS a través de la formación de aminas heterocíclicas predominan sobre las amidas secundarias. Tomando esto en consideración, al analizar los espectros de FT-IR se esperaría encontrar una banda con mayor absorbancia a 1380 cm^{-1} que a 1630 cm^{-1} correspondientes a los compuestos heterocíclicos del genipin y a las amidas secundarias, respectivamente.

Por otra parte, en los hidrogeles nanocompuestos (i.e. CS/PVA/MWCNTs y CS/PVA/MWCNTs/GEN) la estructura química de la matriz polimérica no se vería alterada respecto a sus símiles sin MWCNTs, ya que estos no se encuentran funcionalizados y por ende no podrían reaccionar con las cadenas de CS o PVA para formar nuevos enlaces covalentes. Así, los hidrogeles de CS/PVA/MWCNTs podrían presentar una red polimérica conformada por cadenas de CS y/o PVA enmarañadas o enlazadas entre sí a través de puentes de hidrógeno, en donde los MWCNTs únicamente se encontrarán embebidos sin una orientación o arreglo preferencial (Figura 3.1 D). Por otro lado, tal como se puede apreciar en el recuadro negro de la Figura 3.1 E, los hidrogeles de CS/PVA/GEN/MWCNTs tendrían una red semi-interpenetrada en la cual las cadenas de CS estarían enlazadas entre sí a través de amidas secundarias (Figura 3.1 E, recuadro V) o aminas heterocíclicas (Figura 3.1 E, recuadro VII), mientras que las cadenas de PVA penetrarían dicha red formando puentes de hidrógeno (Figura 3.1 E, recuadro VI) y los MWCNTs se ubicarían entre ellas sin presentar alguna orientación preferencial.

A fin de determinar de forma precisa la estructura química y el arreglo espacial de todas estas redes poliméricas, se considera necesario llevar a cabo un estudio más profundo a través de Resonancia Magnética Nuclear de Protones y de Carbono (^1H RMN y ^{13}C RMN, respectivamente), lo cual queda fuera de los alcances de este proyecto de investigación. No obstante, se buscará comprobar la formación de algunos de estos enlaces y grupos sustituyentes mediante el análisis de los hidrogeles por FT-IR.

3.3 ESPECTROSCOPIA INFRARROJA POR TRANSFORMADA DE FOURIER (FT-IR)

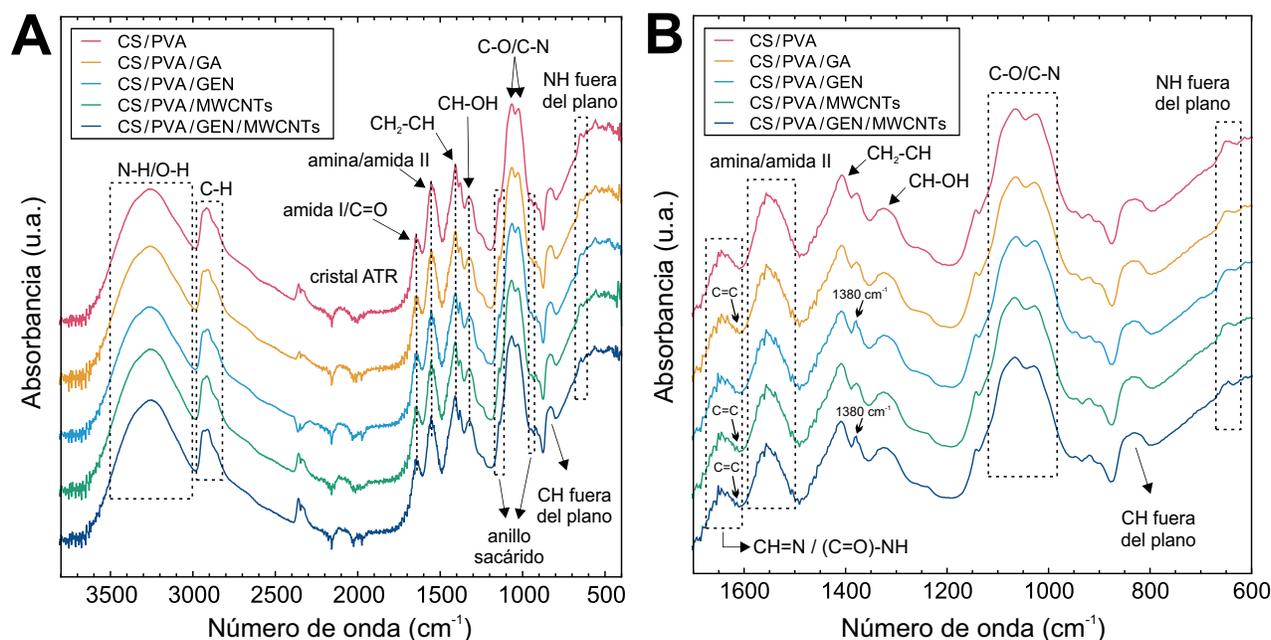


Figura 3.2 Espectros de infrarrojo de los hidrogeles híbridos de CS/PVA, CS/PVA/GA, CS/PVA/GEN, CS/PVA/MWCNTs y CS/PVA/GEN/MWCNTs. A) Espectros de FT-IR en la región $4000\text{ cm}^{-1} - 400\text{ cm}^{-1}$, B) Ampliación de la región entre $1700\text{ cm}^{-1} - 600\text{ cm}^{-1}$ de los mismos espectros.

La espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier fue utilizada para evaluar los grupos químicos presentes en los hidrogeles de CS/PVA y confirmar el entrecruzamiento químico de la red polimérica debido al GEN o al GA. Todos los espectros fueron normalizados respecto a la banda de absorción a 2900 cm^{-1} , correspondiente a la tensión C-H de los grupos alquilo presentes tanto en la estructura del CS como del PVA, dado que estos grupos no sufren modificaciones durante las reacciones de entrecruzamiento con el GEN o el GA [141, 142]. En la Figura 3.2 A se muestran los espectrogramas correspondientes al CS/PVA, CS/PVA/GA, CS/PVA/GEN, CS/PVA/MWCNTs y CS/PVA/GEN/MWCNTs en la región de $4000\text{ cm}^{-1} - 400\text{ cm}^{-1}$, mientras que una ampliación de la región de $1700\text{ cm}^{-1} - 600\text{ cm}^{-1}$ es mostrada en la Figura 3.2 B.

En el espectro de color rojo de la Figura 3.2, correspondiente a los hidrogeles control de CS/PVA, la banda de absorción entre $3500\text{ cm}^{-1} - 3000\text{ cm}^{-1}$ está asociada al modo de vibración por tensión de los enlaces O-H/N-H de los grupos hidroxilo presentes en el PVA y las aminas primarias del CS; asimismo, esta banda está relacionada con los puentes de hidrógeno inter e intramoleculares resultantes de la interacción entre el CS y el PVA, de acuerdo con lo reportado previamente por Costa-Junior et al. [5] y El-Hefian et al. [95]. Las bandas a 2930 cm^{-1} y 2900 cm^{-1} corresponden a la tensión C-H de los grupos alquilo presentes tanto en la estructura del CS como del PVA. Entre $1680\text{ cm}^{-1} - 1600\text{ cm}^{-1}$ se ubica la banda amida I, correspondiente a la vibración

por tensión de los C=O presentes en las amidas $(-\text{C}=\text{O})-\text{NH}-$ de las unidades acetiladas del CS; mientras que entre 1600 cm^{-1} - 1500 cm^{-1} se ubica la región amina/amida II, debida a la combinación de vibraciones por flexión del grupo N-H y de tensión de C-N [9, 94, 95]. Las bandas a 1410 cm^{-1} y 1320 cm^{-1} están asociadas a las vibraciones por flexión de los enlaces CH-CH₂, y CH-OH, presentes tanto en el CS como en el PVA. Las siguientes bandas a la derecha, a 1090 cm^{-1} y 1030 cm^{-1} , corresponden a la tensión C-O y C-N de los grupos presentes en el PVA y en la estructura sacárida del CS [5, 95]. Finalmente, las bandas a 1140 cm^{-1} y 940 cm^{-1} pertenecen al anillo sacárido del CS; mientras que la banda a 640 cm^{-1} está asociada a los grupos NH fuera del plano del CS [9].

El espectro de las membranas de CS/PVA entrecruzadas con GA (Figura 3.2 A y B, espectro de color amarillo) muestra algunos cambios químicos respecto a los hidrogeles control. Estos cambios, pueden ser explicados tomando en consideración la estructura química propuesta en la sección anterior (Figura 3.1 B). Como ya se ha discutido, el entrecruzamiento de la mezcla CS/PVA con GA produce bases de Schiff y grupos acetales en la nueva red a expensas del consumo de grupos $-\text{NH}_2$ y $-\text{OH}$, respectivamente; por lo que el decremento en intensidad observado en la banda ubicada entre 3500 cm^{-1} - 3000 cm^{-1} (asociada al modo de vibración por tensión de los enlaces O-H/N-H), podría ser un primer indicativo de que la reacción de entrecruzamiento se llevó a cabo. Asimismo, en el espectro de color amarillo de la Figura 3.2 B se aprecia un decremento en las bandas asociadas a las aminas primarias del CS (1600 cm^{-1} - 1500 cm^{-1} y 640 cm^{-1}) y la aparición de una pequeña banda a 1630 cm^{-1} correspondiente a las iminas $(-\text{CH}=\text{N}-)$ de las bases de Schiff [5, 9, 13], lo cual corroboraría el primer tipo de enlace esperado en la red (Figura 3.1 B, recuadro I). Además, un ligero incremento en intensidad de la banda a 1090 cm^{-1} - 1030 cm^{-1} , asociada a la tensión de enlaces C-O en grupos acetales, indicaría la formación de nuevos grupos de este tipo debido al entrecruzamiento del PVA con GA (Figura 3.1 B, recuadro IV) [9]. Finalmente, se detectó la aparición de una nueva banda a 1618 cm^{-1} (Figura 3.2 B, espectro de color amarillo), la cual corresponde a enlaces de tipo $-\text{C}=\text{C}-$; de acuerdo con Hu et al. [13], dichos enlaces son producto de la condensación de varias moléculas de GA durante el entrecruzamiento. Así, además de confirmar la estructura química propuesta, se encontró que en la red polimérica de los hidrogeles de CS/PVA/GA existen dos tipos de dobles enlaces (i.e. $\text{CH}=\text{N}$ y $\text{C}=\text{C}$), los cuales forman una estructura conjugada capaz de permitir la autofluorescencia de dichos hidrogeles [13].

Mientras tanto, el espectro de los hidrogeles de CS/PVA/GEN (Figura 3.2 A y B, espectro de color azul cielo), también mostró cambios respecto a la mezcla sin entrecruzar. Dado que en la mezcla CS/PVA el GEN únicamente es capaz de reaccionar con las aminas primarias $(-\text{NH}_2)$ del CS, los principales cambios se observan en las bandas correspondientes a dichos grupos. Por

un lado, se detectó un decremento en absorbancia de la banda ubicada entre 3500 cm^{-1} y 3000 cm^{-1} debido al consumo de grupos $-\text{NH}_2$ que se genera durante el entrecruzamiento para formar enlaces covalentes entre el GEN y el CS; sin embargo, la reducción no es tan notoria en este número de onda a causa de la compensación en absorbancia que generan los puentes de hidrógeno formados entre las cadenas de PVA [9]. No obstante, en las bandas a 1600 cm^{-1} - 1500 cm^{-1} y 640 cm^{-1} , asociadas únicamente a los grupos $-\text{NH}_2$, sí es posible apreciar una marcada disminución de intensidad (Figura 3.2 B, espectro de color azul cielo). A la par de estos decrementos también se detectó un ligero incremento de absorbancia en la banda correspondiente a las amidas secundarias (1630 cm^{-1}), indicando la formación de nuevos grupos $-(\text{C}=\text{O})-\text{NH}-$ a expensas de las aminas primarias debido al entrecruzamiento del CS con el GEN [9, 73]; lo cual confirmaría el tipo de enlace propuesto en la Figura 3.1 C, recuadro V. Por otro lado, se observó la aparición de una nueva banda asociada a la formación de aminas heterocíclicas a 1380 cm^{-1} [73]; esto sugeriría que las $-\text{NH}_2$ del CS reaccionaron con el GEN provocando la apertura su anillo dihidropirano, con lo cual el segundo tipo de enlace esperado en la red polimérica quedaría corroborado (recuadro VII de la Figura 3.1 C). Finalmente, se apreció un incremento en intensidad de la banda a 1090 cm^{-1} - 1030 cm^{-1} asociada a la tensión de los enlaces C-N, indicando la formación de un mayor número de enlaces de este tipo durante el entrecruzamiento entre el CS y el GEN [9].

Los espectros de infrarrojo de los hidrogeles nanocompuestos de CS/PVA/MWCNTs y CS/PVA/GEN/MWCNTs (Figura 3.2 espectros de color verde y azul marino, respectivamente), no mostraron cambios significativos en las bandas principales respecto a sus símiles sin cargar, esto debido a la incapacidad de los CNTs para formar enlaces covalentes al no estar funcionalizados. No obstante, en ambos espectros fue posible apreciar un incremento en la intensidad de la banda a 3500 cm^{-1} - 3300 cm^{-1} ; el cual podría deberse a la formación de un mayor número de puentes de hidrógeno entre las cadenas de PVA. De acuerdo con Cadek et al. [103], los MWCNTs son capaces de actuar como centros de nucleación cuando son embebidos en membranas de PVA; por lo que este plegamiento y acomodo de cadenas favorecería la formación de puentes de hidrógeno e incrementaría la cristalinidad de los hidrogeles. Por otro lado, la banda característica de los MWCNTs, asociada a la vibración por tensión de enlaces C=C, fue detectada a 1618 cm^{-1} [27, 108]; confirmando así la presencia de los nanotubos de carbono en las membranas nanocompuestas (Figura 3.2 B, espectros de color verde y azul marino).

Así, los resultados obtenidos por espectroscopía infrarroja demuestran que los procesos de entrecruzamiento se llevaron a cabo exitosamente y que las estructuras químicas de los hidrogeles, propuestas en la Sección 3.2, constituyen una buena aproximación de las redes poliméricas formadas. No obstante, como trabajo a futuro, se considera necesario llevar a cabo

un estudio más profundo a fin de determinar de forma precisa la estructura química y el arreglo espacial que dichas redes presenta.

3.4 DIFRACCIÓN DE RAYOS X (XRD)

Una vez que la caracterización química de los hidrogeles híbridos se llevó a cabo, la fracción cristalina y la interacción entre los componentes de las mezclas poliméricas fueron evaluadas mediante estudios de difracción de rayos X. En la Figura 3.3 se concentran los difractogramas obtenidos para los hidrogeles híbridos de CS/PVA, CS/PVA/GA, CS/PVA/GEN, CS/PVA/MWCNTs y CS/PVA/GEN/MWCNTs, así como de sus componentes puros (CS y PVA).

De acuerdo con lo reportado en la literatura, tanto el CS como el PVA presentan cuatro picos de difracción característicos. Por un lado, los picos cristalinos del CS (Figura 3.3 A, difractograma de color anaranjado) se ubican a ángulos 2θ de 10° , 20° , 21.7° y 40.5° , los cuales a su vez corresponden a los planos cristalinos (020), (200), (201) y (143), respectivamente [9, 143]; en tanto que los picos de difracción del PVA (Figura 3.3 A, difractograma de color violeta) se localizan a $2\theta = 12^\circ$, 20° , 23.4° y 41° , con planos cristalinos (100), $(10\bar{1})$, (200) y (111), respectivamente [9, 144].

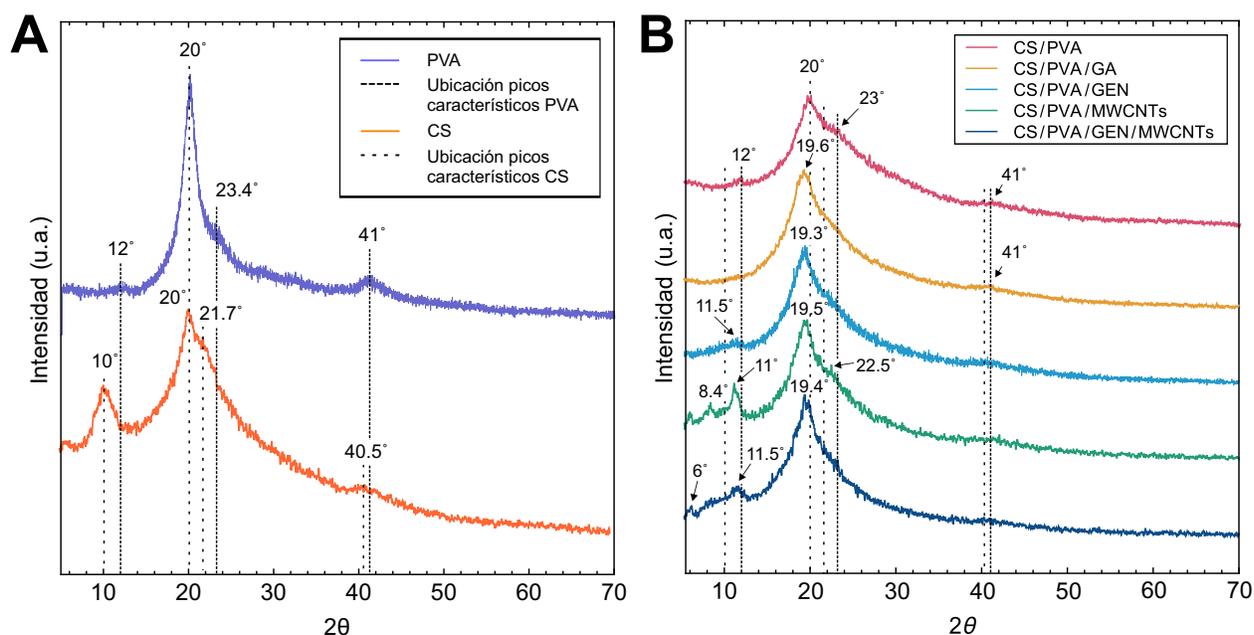


Figura 3.3 Difractogramas de rayos X correspondientes a: A) Los hidrogeles de CS y PVA puros, B) Los hidrogeles control (CS/PVA), entrecruzados (CS/PVA/GA y CS/PVA/GEN) y nanocompuestos (CS/PVA/MWCNTs y CS/PVA/GEN/MWCNTs). En ambas figuras se señala la posición de los picos característicos de CS (líneas discontinuas con mayor espaciado) y del PVA (líneas discontinuas más cerradas).

Dado que en este trabajo de investigación ambos polímeros fueron mezclados en una proporción volumétrica que favorecía su miscibilidad (i.e. 3:1, CS:PVA), algunos de estos picos no deberían de aparecer en los difractogramas de los hidrogeles híbridos estudiados; esto debido a que el arreglo regular que presenta cada una de estas macromoléculas se debería de ver alterado por los puentes de hidrógeno inter e intra moleculares que se formen entre ellas, dando lugar así a un nuevo arreglo que resulta en la modificación de sus patrones de difracción. En este sentido, el difractograma correspondiente a los hidrogeles control de CS/PVA (Figura 3.3 B, difractograma de color rojo), únicamente exhibe cuatro picos relacionados con la fase cristalina de la mezcla: uno de alta intensidad a 20° , asociado a la superposición de los picos cristalinos del CS y el PVA; otro de intensidad media a 23° , correspondiente al PVA; y dos de baja intensidad a 12° y 41° , igualmente relacionados con la fase cristalina del PVA. Puesto que los picos de difracción a 10° y 40.5° correspondientes al CS desaparecieron, es posible corroborar que, a la proporción trabajada, ambos polímeros fueron lo suficientemente miscibles para promover la interacción entre sus moléculas; resultados que concuerdan con lo también observado por Islam et al. [121] y Abdeen [145]. Una vez determinada el área bajo la curva de los picos cristalinos presentes, el porcentaje de cristalinidad de los hidrogeles control fue de $21.5\% \pm 2\%$.

En los hidrogeles entrecruzados con GA (Figura 3.3 B, difractograma de color amarillo), el pico de alta intensidad que aparecía a 20° en el difractograma de las membranas de CS/PVA, sufrió un ligero desplazamiento hacia la izquierda; mientras que los picos de difracción a 12° y 23° , correspondientes a la fracción cristalina del PVA, desaparecieron. Cabe recordar que, aunque el GA es capaz de formar enlaces covalentes tanto con el CS como con el PVA, el GA presenta una marcada preferencia por los grupos $-\text{NH}_2$ del CS [14, 80]. No obstante, la ausencia de los picos de difracción asociados al PVA es un indicativo de que la reacción de entrecruzamiento también se llevó a cabo en los grupos $-\text{OH}$ de este, dando lugar a una red polimérica más compacta que impide el plegamiento y el arreglo regular de estas cadenas. Así, los hidrogeles de CS/PVA/GA presentaron un porcentaje de cristalinidad de $17.1\% \pm 0.4\%$. Cabe destacar que, la ausencia de los picos cristalinos asociados al PVA corrobora, de manera indirecta, la formación de una red polimérica del tipo propuesto en la Sección 3.2 (Figura 3.1 B).

Por otra parte, el difractograma de los hidrogeles de CS/PVA/GEN (Figura 3.3 B, difractograma de color azul cielo) presenta dos de los picos cristalinos asociados a los hidrogeles control, pero ligeramente desplazados hacia la izquierda ($\sim 0.5^\circ$). De acuerdo con Kumar et al. [91] y Zheng et al. [115], esto es un indicativo de que existen fuertes interacciones entre los componentes de la mezcla debido a la acción del agente entrecruzante y a la formación de puentes de hidrógeno entre las cadenas de CS y/o PVA. Además, con la adición de GEN, el pico asociado a la fase cristalina del CS (i.e. $2\theta = 22.5^\circ$) sufre una atenuación respecto al presente en

la mezcla CS/PVA, lo cual sugiere que el entrecruzamiento interfiere con el ordenamiento de las cadenas de CS, incrementando la fracción amorfa de las membranas. De esta forma, el porcentaje de cristalinidad de los hidrogeles de CS/PVA/GEN fue menor al exhibido por los hidrogeles control; es decir, $16.9\% \pm 0.6\%$ y $21.5\% \pm 2\%$, respectivamente.

Estos resultados sugieren que la adición de agentes entrecruzantes (i.e. GEN o GA) a la mezcla de CS/PVA reduce el grado de libertad de las cadenas, limitando e incluso previniendo la formación de regiones cristalinas. En este sentido, a pesar de que el GA y el GEN son capaces de formar redes poliméricas con estructuras muy diferentes, ambos entrecruzantes disminuyeron significativamente la cristalinidad de los hidrogeles en una proporción similar; siendo esta reducción de aproximadamente 21%. Asimismo, este hecho podría ser un indicativo más de que el entrecruzamiento químico de las membranas se llevó a cabo de forma exitosa [5, 146]. Por otra parte, dado que tanto la temperatura de fusión (T_m) como el comportamiento mecánico de los polímeros están relacionados con su fracción cristalina, una menor cristalinidad implicaría una reducción en dicha temperatura, así como un aumento en su porcentaje de deformación y un decremento en su resistencia a la tracción última; no obstante, al tratarse de un polímero entrecruzado, la red polimérica que se forma impide el libre movimiento de las cadenas, por lo que se esperaría un incremento en la resistencia a la tracción y un decremento en su porcentaje de deformación.

Debido a la baja concentración de MWCNTs que se utilizó en este trabajo de investigación para la síntesis de los hidrogeles nanocompuestos (i.e. 0.2% masa/masa), en los difractogramas de las membranas de CS/PVA/MWCNTs y CS/PVA/GEN/MWCNTs (Figura 3.3 B, difractogramas de color verde y azul marino, respectivamente) no fue posible observar los picos característicos de dichas nanopartículas. Sin embargo, de acuerdo con lo reportado en otras investigaciones en las cuales se utilizó una concentración mayor de MWCNTs (i.e. 1% masa/masa), los picos cristalinos de estas nanopartículas están asociados a los planos cristalinos (002) y (100) de la estructura hexagonal del grafito, y se localizan a ángulos 2θ de 26° y 44° [60, 108].

Por otra parte, se observó que los MWCNTs ocasionaron un desplazamiento en 2θ en los picos cristalinos de las membranas de CS/PVA/MWCNTs y CS/PVA/GEN/MWCNTs; lo cual, de acuerdo con lo reportado en la literatura, es un indicio de que existe una buena compatibilidad entre las nanopartículas y las macromoléculas de CS y PVA [108]. A diferencia de otro tipo de nanopartículas que obstaculizan el empaquetamiento regular de las cadenas poliméricas [13, 19], se ha reportado que los MWCNTs son capaces de actuar como agentes de nucleación cuando son embebidos en matrices de PVA, facilitando la formación de cristales y provocando un incremento en la fracción cristalina de dichas membranas [103]. Debido a este fenómeno, en los difractogramas de los hidrogeles nanocompuestos (Figura 3.3, difractogramas de color verde y

azul marino) es posible apreciar un notable incremento de intensidad en uno de los picos de difracción asociados al PVA (i.e. $2\theta = \sim 11^\circ$), así como la aparición de nuevos picos cristalinos. Dado que en los hidrogeles de CS/PVA/GEN/MWCNTs el ordenamiento de las cadenas de PVA alrededor de los MWCNTs se ve obstaculizado por la red de CS que se forma durante el entrecruzamiento con genipin, el incremento en intensidad del pico cristalino a $2\theta = \sim 11^\circ$ es menor a la de su nanocompuesto sin entrecruzar. De este modo, los hidrogeles de CS/PVA/MWCNTs presentaron un porcentaje de cristalinidad de $24.9\% \pm 3\%$, mientras que la cristalinidad de los hidrogeles de CS/PVA/GEN/MWCNTs fue de $19.4\% \pm 0.5\%$. Resultados que a su vez confirman la teoría de que, en los espectrogramas de FT-IR de los hidrogeles nanocompuestos, el incremento en absorbancia de la banda a $3500\text{ cm}^{-1} - 3300\text{ cm}^{-1}$ se debía a la formación de un mayor número de puentes de hidrógeno entre las cadenas de PVA, a causa de su plegamiento entorno a los MWCNTs.

Con todo esto, es posible concluir que la adición de una pequeña cantidad de MWCNTs (0.2% masa/masa) permite incrementar la fracción cristalina de los hidrogeles nanocompuestos, respecto a sus símiles sin cargar (i.e. CS/PVA y CS/PVA/GEN), en una razón del 13%, aproximadamente. Dado que en los polímeros las zonas cristalinas contribuyen a la resistencia mecánica y térmica, es de esperarse que de igual manera los hidrogeles nanocompuestos presenten una mayor resistencia a la tracción, un menor porcentaje de deformación y una mayor temperatura de fusión (T_m) que los hidrogeles de CS/PVA y CS/PVA/GEN.

En la Tabla II se presentan los porcentajes de cristalinidad, determinados mediante difracción de rayos X, de los tres grupos de hidrogeles híbridos estudiados en el presente trabajo de investigación.

Tabla II. Porcentajes de cristalinidad obtenidos mediante análisis de XRD para los hidrogeles híbridos control, entrecruzados y/o nanocompuestos

COMPOSICIÓN DEL HIDROGEL	CRISTALINIDAD (%)
CS/PVA	21.5 ± 2.0
CS/PVA/GA	17.1 ± 0.4
CS/PVA/GEN	16.9 ± 0.6
CS/PVA/MWCNTs	24.9 ± 3.0
CS/PVA/GEN/MWCNTs	19.4 ± 0.5

Los valores mostrados en la tabla corresponden al porcentaje promedio cristalinidad junto con su correspondiente desviación típica muestral.

3.5 TEMPERATURAS CRÍTICAS Y ESTABILIDAD TÉRMICA

Una vez que la fracción cristalina de los hidrogeles híbridos de CS/PVA, entrecruzados y/o nanocompuestos, se evaluó mediante difracción de rayos X; la influencia de dicha cristalinidad, de los agentes entrecruzantes y/o de los MWCNTs, sobre la estabilidad y las transiciones térmicas de los hidrogeles híbridos fue estudiada mediante análisis termogravimétrico y calorimetría diferencial de barrido.

3.5.1 Estabilidad Térmica

El análisis termogravimétrico (TGA, por sus siglas en inglés de *Thermogravimetric Analysis*) es un método ampliamente utilizado para caracterizar la descomposición y estabilidad térmica de los polímeros. Generalmente, el entrecruzamiento químico de su red polimérica o el uso de nanopartículas inducen cambios sobre dicho comportamiento, retardando en la mayoría de los casos su descomposición térmica. Así, a fin de determinar el efecto que los distintos entrecruzantes (i.e. GEN o GA) y/o los MWCNTs generaban sobre la estabilidad térmica de los hidrogeles de CS/PVA, las membranas fueron sometidas a estudios de TGA.

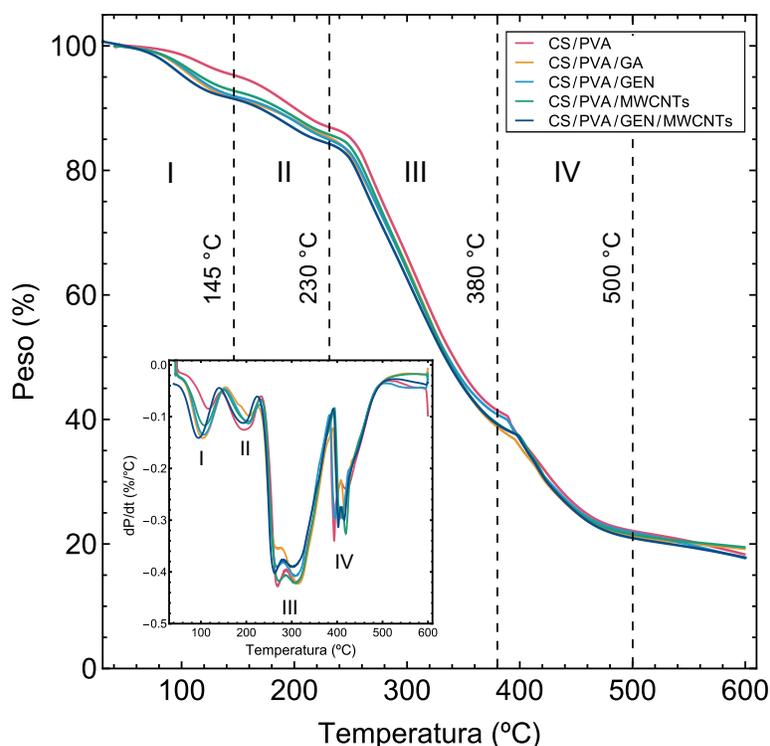


Figura 3.4 Termogramas de pérdida de peso (TG) de los hidrogeles híbridos de CS/PVA, así como de la mezcla entrecruzada y/o nanocompuesta. En el recuadro interno se muestran los termogramas diferenciales (DTG) de estos mismos materiales, señalando las diferentes etapas de degradación térmica que presentan.

En la Figura 3.4 se muestran los termogramas de pérdida de peso correspondientes a los hidrogeles de CS/PVA, CS/PVA/GA, CS/PVA/GEN, CS/PVA/MWCNTs y CS/PVA/GEN/MWCNTs, junto con sus respectivos termogramas diferenciales (DTG, por sus siglas en inglés de *Differential Thermogram*). Como se puede apreciar en los DTG (Figura 3.4, recuadro interno), todos los hidrogeles presentaron un patrón de degradación térmica en cuatro etapas; comportamiento también observado por Lewandowska [147] en hidrogeles de CS/PVA con concentraciones de CS mayores al 20% masa/volumen.

La primera etapa tuvo lugar en el intervalo de temperatura de 40 °C - 145 °C (región I, Figura 3.4); en esta fase se registró una pérdida de peso de entre 4% y 9%, la cual, de acuerdo con lo reportado en la literatura, es atribuida tanto a la evaporación de la humedad absorbida por los hidrogeles, como a la evaporación de los residuos de ácido acético atrapados en la red polimérica tras la síntesis [95, 147]. Cabe señalar que este resultado permitió determinar el intervalo de temperatura al cual se deberían de calentar las muestras para eliminar su humedad durante los estudios de DSC, de manera que el primer ciclo de calentamiento aplicado en dichas pruebas fue de 20 °C -150 °C. En la siguiente fase de descomposición, 145 °C - 230 °C (región II en la Figura 3.4), se registró una pérdida adicional de peso de entre 6% - 9%; dicha pérdida podría estar asociada a la degradación de las cadenas laterales de PVA (ruptura de grupos -OH), la cual es acompañada por la formación de productos volátiles [148]. La tercera fase de descomposición tuvo lugar entre 230 °C - 380 °C (Figura 3.4, región III), siendo en ella en la que todos los hidrogeles presentaron la mayor pérdida de peso (alrededor del 44% - 48 %). Dicha pérdida es atribuida a la ruptura y desintegración de la estructura molecular del CS, la cual conlleva la deshidratación de los anillos sacáridos y la descomposición de las unidades acetiladas y desacetiladas [147, 148]. La cuarta fase de descomposición se localizó entre 380 °C - 500 °C, en ella registró una pérdida de peso de entre 12% y 25%, atribuida a la escisión de los enlaces C-C presentes en la cadena principal del PVA. De acuerdo con lo reportado en la literatura, en esta etapa se genera carbono e hidrocarburos como productos de descomposición [147, 148]; sin embargo, esto no pudo ser corroborado debido a que el equipo en el que se realizaron las pruebas no contaba con un espectrómetro de masas o un equipo de FT-IR conectado a él. Finalmente, más allá de los 500 °C, se detectó la presencia de residuos de entre 16% - 19 % del peso inicial.

En la Tabla IV se resumen los resultados del TGA y se muestran los porcentajes de pérdida de peso que presentó cada hidrogel en cada una de las fases de descomposición térmica identificadas. Como es posible observar, no se apreció una contribución significativa de los MWCNTs. Sin embargo, diversos autores han demostrado que, bajo una atmósfera inerte de N₂ (como la aquí utilizada), los materiales cargados con partículas de carbono muestran pérdidas y

Tabla III. Temperaturas de degradación y porcentaje de peso perdido en cada etapa de degradación.

COMPOSICIÓN DEL HIDROGEL	I 40 – 145 °C	II 145 – 230 °C	III 230 – 380 °C	IV 380 – 500 °C	Residuos
CS/PVA	4 ± 0.3 %	9 ± 0.2 %	44 ± 1.9 %	12 ± 0.9 %	17 ± 1.0 %
CS/PVA/GA	9 ± 0.3 %	6 ± 0.2 %	47 ± 1.4 %	19 ± 1.1 %	19 ± 0.2 %
CS/PVA/GEN	8 ± 0.2 %	7 ± 0.1 %	44 ± 0.6 %	25 ± 2.4 %	16 ± 2.0 %
CS/PVA/MWCNTs	8 ± 0.7 %	7 ± 0.2 %	48 ± 1.1 %	18 ± 0.6 %	19 ± 1.0 %
CS/PVA/GEN/MWCNTs	9 ± 0.6 %	7 ± 0.4 %	47 ± 1.0 %	20 ± 0.5 %	18 ± 0.6 %

Todas las temperaturas reportadas corresponden a la temperatura promedio y su desviación típica muestral.

temperaturas de descomposición similares a las del polímero sin cargar; no obstante, cuando son evaluados bajo una atmósfera oxidante (O_2) es posible observar mejoras [149].

Otro factor importante a considerar en el análisis de la estabilidad térmica de los hidrogeles es la T_{max} ; es decir, la temperatura a la cual se produce la máxima pérdida de peso. Esta puede ser fácilmente identificada en las curvas de DTG (Figura 3.4, recuadro interno); de tal forma que, la temperatura a la cual se ubique el pico más grande corresponderá a la T_{max} . Así, la descomposición máxima de los hidrogeles control de CS/PVA toma lugar alrededor de los 268 °C; mientras que en los hidrogeles entrecruzados se presenta aproximadamente a los 315 °C y 310 °C para CS/PVA/GA y CS/PVA/GEN, respectivamente. Claramente este incremento, de más de 40 °C, es debido a la acción de los agentes entrecruzantes, los cuales actúan como barrera para minimizar la escisión y deshidratación de las cadenas macromoleculares presentes en la mezcla, mejorando la estabilidad térmica de las membranas de CS/PVA. Dicho comportamiento también ha sido observado por Islam y Yasin en hidrogeles de CS/PVA entrecruzados con tetraetil ortosilicato (TEOS) [54].

Por otro lado, en los hidrogeles nanocompuestos de CS/PVA/MWCNTs la T_{max} toma lugar a los 310 °C; mientras que, en los de CS/PVA/GEN/MWCNTs se presenta alrededor de los 261 °C, siendo esta última temperatura menor a la T_{max} exhibida por los hidrogeles de CS/PVA/GEN. De acuerdo con estos resultados es claro que, en la mezcla CS/PVA/GEN, los MWCNTs no optimizan su estabilidad térmica. Esto, debido por un lado a su baja concentración (i.e. 0.2% masa/masa de MWCNTs), y por el otro a la pobre interacción interfacial que se produce entre las nanopartículas y la matriz polimérica de CS/PVA/GEN, la cual se ve entorpecida por la red polimérica que se genera entre el CS y el GEN. Resultados similares han sido reportados por Mallakpour et al. [60], quienes encontraron que concentraciones por arriba del 1% masa/masa de MWCNTs propiciaban una mayor interacción interfacial y contribuían de mejor manera a la

estabilidad térmica de los hidrogeles de CS/PVA/Valina; esto debido a la restricción en el movimiento de las cadenas poliméricas que las nanopartículas de carbono generaban.

3.5.2 Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC)

El análisis por DSC fue utilizado con el fin de identificar las temperaturas a las cuales se presentan las principales transiciones térmicas, T_g y T_m , en los hidrogeles sintetizados. Además, a través de las entalpías de fusión (ΔH), también fue posible evaluar su cristalinidad, corroborando los resultados obtenidos mediante XRD. Dado que los hidrogeles tienden a absorber humedad del ambiente, todas las muestras fueron sometidas a dos ciclos de calentamiento [92, 150]. Durante el primer ciclo, las muestras se calentaron y se enfriaron (i.e. 20 °C - 150 °C y 150 °C - 0 °C, respectivamente) con el objetivo de eliminar el efecto de la humedad; mientras que, el segundo ciclo de calentamiento, 0 °C - 250 °C, fue utilizado para evaluar las transiciones térmicas correspondientes. Cabe señalar que estos intervalos de temperatura fueron determinados a partir de los resultados obtenidos en las pruebas de TGA (Sección 3.5.1).

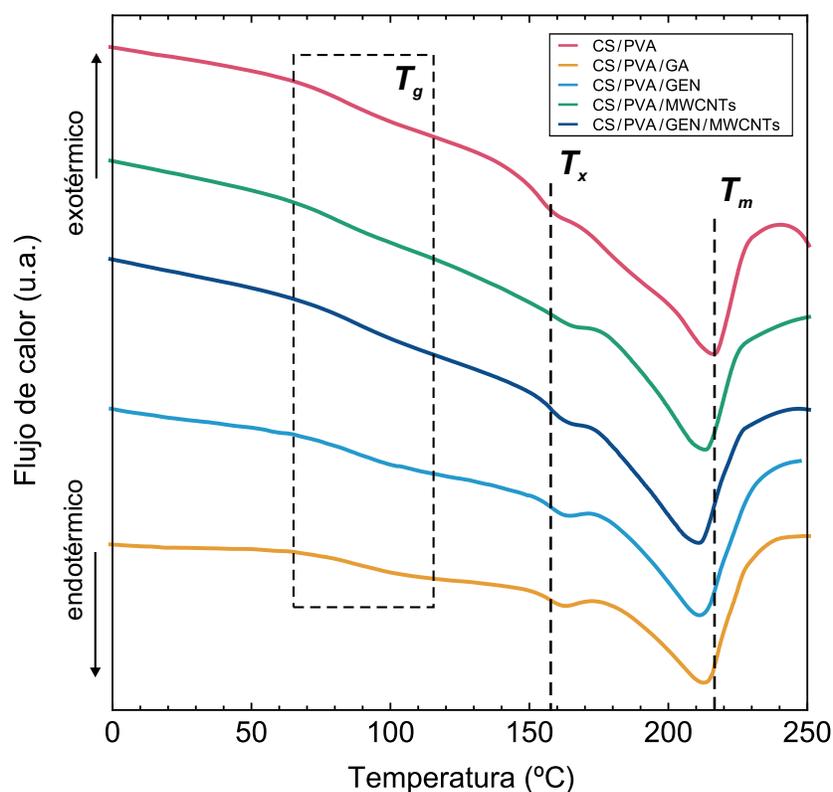


Figura 3.5 Termogramas de DSC correspondientes al segundo ciclo de calentamiento al que fueron sometidos los hidrogeles híbridos de CS/PVA, entrecruzados y/o nanocompuestos. En la gráfica se señalan las zonas de las transiciones térmicas: T_g , T_x y T_m , propias de cada mezcla.

En la Figura 3.5 se muestran las curvas de flujo de calor como función de la temperatura, correspondientes al segundo ciclo de calentamiento. Como se puede apreciar en los termogramas, todos los hidrogeles (CS/PVA, CS/PVA/GA, CS/PVA/GEN, CS/PVA/MWCNTs y CS/PVA/GEN/MWCNTs) presentaron tres regiones térmicas. La primera, correspondiente a la temperatura de transición vítrea (T_g), refleja la relajación dinámica de las cadenas macromoleculares y el aumento de volumen libre en la red polimérica. La siguiente región, un pequeño pico endotérmico, corresponde a la temperatura T_x ; es decir, la temperatura de fusión de las regiones cristalinas que se forman tras el primer ciclo de calentamiento. Esto como resultado del reordenamiento molecular que experimentan las cadenas debido a la extracción de las moléculas de agua atrapadas entre las cadenas amorfas. Dado que estas nuevas regiones cristalinas son más pequeñas y menos estables que aquellas generadas durante la formación de los hidrogeles, su temperatura de fusión es inferior (~ 160 °C); comportamiento que también fue observado por Nakano et al. [92] en hidrogeles de CS/PVA. Finalmente, la tercera región, etiquetada como T_m , corresponde al pico endotérmico asociado a la fusión de los cristales de CS y PVA generados durante la formación de los hidrogeles a temperatura ambiente.

La Tabla III resume las temperaturas a las cuales se presentan las principales transiciones térmicas en los hidrogeles híbridos de CS/PVA, entrecruzados y/o nanocompuestos. En ella se puede apreciar que, cuando la mezcla de CS/PVA es entrecruzada con GA o GEN, la T_g experimenta un incremento del 4% y 6%, respectivamente. Dicho aumento se debe a que, como

Tabla IV. Temperaturas críticas de la mezcla CS/PVA y sus mezclas entrecruzadas y/o cargadas con MWCNTs.

COMPOSICIÓN DEL HIDROGEL	^a T_g (°C)	^b T_x (°C)	^c T_m (°C)
CS/PVA	84 ± 0.5	159 ± 0.1	216 ± 0.5
CS/PVA/GA	87 ± 4.0	162 ± 1.7	214 ± 1.4
CS/PVA/GEN	89 ± 5.0	163 ± 1.0	213 ± 2.0
CS/PVA/MWCNTs	82 ± 4.0	164 ± 2.0	215 ± 1.0
CS/PVA/GEN/MWCNTs	87 ± 1.0	162 ± 1.0	210 ± 1.0

^a T_g se refiere a la temperatura de transición térmica, ^b T_x representa la temperatura de fusión de las regiones cristalinas que se formaron durante el ciclo térmico destinado a eliminar la humedad de las muestras y ^c T_m corresponde a la temperatura de fusión de los cristales de CS y PVA. Todas las temperaturas reportadas en la tabla corresponden a la temperatura promedio y su desviación típica muestral.

se ha discutido anteriormente, el entrecruzamiento químico de la mezcla genera una red polimérica mucho más rígida y estable que restringe el libre movimiento de las macromoléculas, por lo que mayores temperaturas son necesarias para inducir el movimiento colectivo de las cadenas poliméricas presentes en las regiones amorfas.

Por el contrario, la T_m de estos materiales (CS/PVA/GA y CS/PVA/GEN) mostró un decremento en temperatura de 2 °C y 3 °C, respectivamente; el cual, como se puede apreciar en la Figura 3.5 (termograma de color amarillo y azul claro, respectivamente), estuvo acompañado por el ensanchamiento de su pico endotérmico. Cabe recordar que, las variaciones en este pico permiten evaluar tanto la compatibilidad/miscibilidad entre los componentes de la mezcla, como la cristalinidad del polímero estudiado [88]. De forma que, el decremento registrado en la T_m de los hidrogeles indica la presencia de fuertes interacciones entre los agentes entrecruzantes (GA o GEN) y las macromoléculas de CS y/o PVA; lo cual a su vez conlleva modificaciones en la estructura cristalina, pues el plegamiento de las cadenas se ve limitado. A partir de este pico endotérmico se calculó la entalpía de fusión (ΔH) asociada a cada material, encontrándose valores promedio de: 39.3 ± 2.6 J/g, 31.4 ± 3.2 J/g y 32.9 ± 7.3 J/g para los hidrogeles de CS/PVA, CS/PVA/GA y CS/PVA/GEN, respectivamente. Dado que, a menor cristalinidad es necesario suministrar una menor energía para fundir los cristales, estos valores nuevamente señalan un decremento en la proporción cristalina de los hidrogeles entrecruzados; resultados que concuerdan con aquellos encontrados mediante XRD (Tabla II, Sección 3.4).

En la Tabla III es evidente que, a diferencia de los hidrogeles entrecruzados, la T_g de los hidrogeles cargados con MWCNTs (CS/PVA/MWCNTs y CS/PVA/GEN/MWCNTs) presentó una ligera disminución de 2 °C respecto a sus mezclas sin cargar (i.e. CS/PVA y CS/PVA/GEN, respectivamente), indicando la posible existencia de interacciones débiles entre las nanopartículas y la porción amorfa de la matriz polimérica. Esto debido a que, al no estar funcionalizados, los MWCNTs son incapaces de interrelacionarse con las macromoléculas para favorecer la formación de una interfase polímero-nanopartículas; provocando, por el contrario, el incremento del volumen libre entre las cadenas poliméricas. De modo que, el aumento en el volumen libre de la red polimérica ocasiona que el movimiento colectivo de las macromoléculas se origine a temperaturas más bajas [13, 144].

Por otro lado, el incremento en cristalinidad detectado en los hidrogeles nanocompuestos durante su análisis por XRD (Sección 3.4, Tabla II), es confirmado a través del aumento en la entalpía de fusión del pico endotérmico asociado a la T_m . Así, los hidrogeles de CS/PVA/MWCNTs y CS/PVA/GEN/MWCNTs presentaron una ΔH promedio de 48.8 ± 0.5 J/g y 35.4 ± 2 J/g, respectivamente; lo cual a su vez corresponde a un aumento del 24% y 8%, comparado con sus mezclas base (CS/PVA y CS/PVA/GEN, respectivamente). Ahora bien, dado que la adición de

MWCNTs incrementa la cristalinidad de los hidrogeles nanocompuestos, era de esperarse que su T_m se desplazara hacia temperaturas mayores; no obstante, como se puede observar tanto en la Figura 3.5 (termogramas de color verde y azul marino) como en la Tabla IV, ocurrió lo contrario. De acuerdo con lo reportado por Li et al. [144], esto se debe a que las nanopartículas actúan como agentes nucleantes heterogéneos; los cuales favorecen la formación de regiones cristalinas con geometría irregular. De modo que, los dominios cristalinos formados por las cadenas de PVA entorno a los MWCNTs, poseen interacciones relativamente débiles comparados con los cristales de la mezcla CS/PVA, propiciando que los primeros comiencen a fundir a una temperatura menor.

Todos estos resultados muestran que, a pesar de que no se encontraron diferencias significativas en las temperaturas de fusión y de transición vítrea de los hidrogeles híbridos de CS/PVA, el efecto de los agentes entrecruzantes sobre las transiciones térmicas fue más representativo que el generado por los MWCNTs. Los cuales, como ha sido demostrado, presentaron interacciones débiles con las cadenas poliméricas de las regiones amorfas, ocasionando un ligero decremento tanto en la T_g , como en la T_m de los hidrogeles nanocompuestos.

3.6 HIDROFILICIDAD DE VOLUMEN Y DE SUPERFICIE

Es bien sabido que, tanto la capacidad de hinchamiento como la hidrofiliidad/hidrofobicidad de superficie de los hidrogeles, son dos parámetros que se encuentran directamente relacionados con el comportamiento mecánico y la respuesta biológica que presentan este tipo de materiales [64]. Debido a ello, una vez evaluada la estabilidad térmica de los hidrogeles híbridos de CS/PVA, entrecruzados y/o nanocompuestos, sus hidrofiliidades de volumen y de superficie fueron estudiadas mediante pruebas de hinchamiento y de ángulo de contacto, respectivamente.

3.6.1 Cinética de Hinchamiento

Usualmente los hidrogeles presentan un comportamiento altamente hidrófilo, siendo esta una característica esencial de este tipo de materiales. Los estudios sobre su cinética de hinchamiento, permiten evaluar la capacidad de retención de líquido de su red polimérica, así como la velocidad de difusión de este al interior de la red; no obstante, las pruebas de hinchamiento deben considerarse como una evaluación relativa del comportamiento del hidrogel en un medio acuoso, ya que dependen de varios factores y, frecuentemente, los resultados presentan amplias variaciones [151].

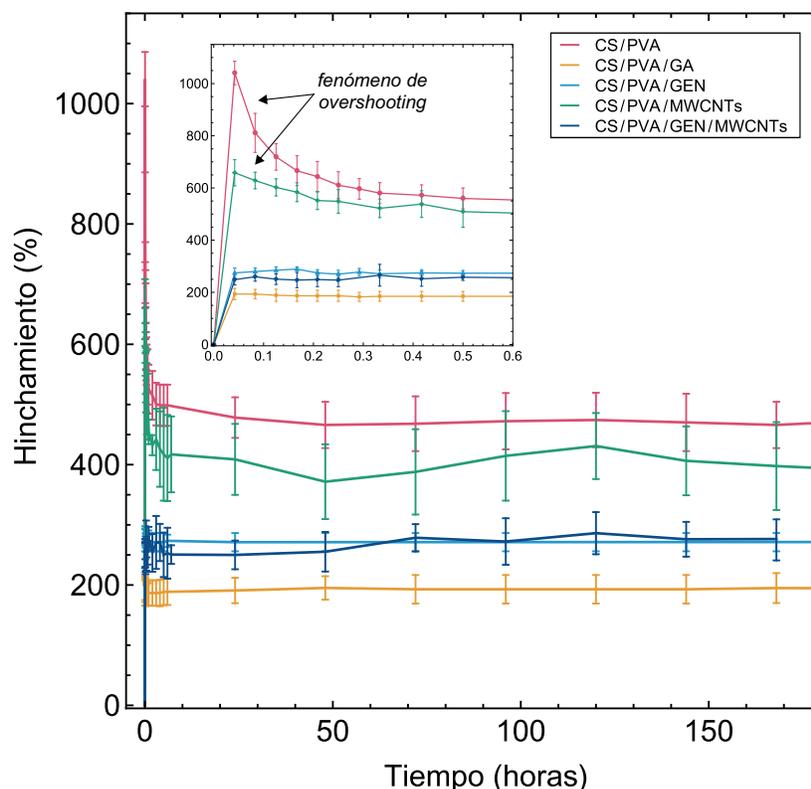


Figura 3.6 Cinética de hinchamiento de los hidrogeles híbridos de CS/PVA, entrecruzados y/o nanocompuestos, durante las primeras 180 horas. En el recuadro interno se muestra el hinchamiento de los hidrogeles durante los primeros 30 minutos de la prueba, en donde se aprecia claramente el fenómeno de overshooting que experimentan los hidrogeles de CS/PVA y CS/PVA/MWCNTs.

La Figura 3.6 muestra las curvas de hinchamiento de los hidrogeles de CS/PVA, CS/PVA/GA, CS/PVA/GEN, CS/PVA/MWCNTs y CS/PVA/GEN/MWCNTs. En esta gráfica es posible observar que, durante los primeros minutos, los hidrogeles de CS/PVA y CS/PVA/MWCNTs exhiben un comportamiento súper absorbente, seguido de un deshinchamiento gradual hasta alcanzar una estabilidad. Este fenómeno es conocido como efecto de sobrerrespuesta u *overshooting* y se basa tanto en las fuerzas de contracción elásticas de la red polimérica, como en el gradiente adicional de presión osmótica generado por las cargas electrostáticas y la diferencia de concentración de iones dentro y fuera del hidrogel [152-154]. Así, el sobrehinchamiento inicial que experimenta la red polimérica viene dado por la rápida formación de puentes de hidrógeno entre los numerosos grupos hidrófilos, $-NH_2$ y $-OH$, presentes en la mezcla CS/PVA y las moléculas de agua del PBS; lo cual ocasiona que más agua se oriente alrededor de estos puentes de hidrógeno y las cadenas poliméricas se desenreden para expandir la red, permitiendo así la libre entrada de una mayor cantidad de agua [17]. De esta forma, a medida que el hinchamiento aumenta, la presión osmótica va disminuyendo como resultado del balance iónico entre los NH_3^+ presentes en la estructura del CS y la entrada de los iones presentes en el PBS (Na^+ , Cl^- y K^+);

asimismo, la fuerza de contracción elástica de la red se va incrementando y expulsa algunas moléculas de agua fuera de ella, ocasionando su deshinchamiento. Con el tiempo, ambas fuerzas se nivelan y se logra un equilibrio fisicoquímico [9, 155]. Este fenómeno se presenta frecuentemente en los hidrogeles de CS debido a la protonación y desprotonación que pueden experimentar las aminas ($-NH_2$) presentes en sus cadenas poliméricas; así, Berger et al. [154] lo observaron en hidrogeles de CS entrecruzados iónicamente, Gunasekaran et al. [152] lo han reportado en hidrogeles híbridos de CS/PVA y, recientemente, nuestro grupo de investigación lo observó en hidrogeles de CS/PVA entrecruzados con epíclorhidrina [4]. En el presente trabajo de investigación, los hidrogeles de CS/PVA y CS/PVA/MWCNTs experimentaron un sobrehinchamiento de 1040% y 622%, respectivamente, a los 2.5 min de iniciada la prueba; sin embargo, tras un periodo aproximado de 3 horas, su hinchamiento al equilibrio fue de 500% y 400%, respectivamente.

En la Figura 3.6 puede apreciar que los hidrogeles entrecruzados de CS/PVA/GA, CS/PVA/GEN y CS/PVA/GEN/MWCNTs (Figura 3.6; curva amarilla, azul cielo y azul marino, respectivamente) mostraron un menor índice de hinchamiento al equilibrio, no presentaron el efecto de sobrerrespuesta y mantuvieron un comportamiento estable prácticamente desde el inicio de la prueba. Lo anterior se debe a que, como fue demostrado en los estudios de FT-IR, gran parte de los grupos hidrófilos, $-NH_2$ y/o $-OH$, fueron consumidos durante las respectivas reacciones de entrecruzamiento, dando lugar a una red polimérica con una menor capacidad para formar puentes de hidrógeno con las moléculas de agua, y con una estructura más rígida y compacta que limita la movilidad y deformación de sus cadenas; lo que resulta en la reducción de la capacidad de hinchamiento de estos materiales [145, 146]. Así, el GA disminuyó 310 puntos porcentuales la capacidad de hinchamiento al equilibrio de los hidrogeles control de CS/PVA, lo que corresponde a una reducción del 60%; mientras que el GEN la disminuyó un 46% (i.e. 230 puntos porcentuales). No obstante, a fin de asegurar su estabilidad física y química a largo plazo en estado hidratado, el entrecruzamiento químico de dichos hidrogeles es necesario.

Asimismo, resulta evidente que la capacidad de hinchamiento al equilibrio de los hidrogeles híbridos de CS/PVA/GEN fue significativamente mayor a la exhibida por los hidrogeles de CS/PVA/GA (i.e. 270% contra 190%, respectivamente). Esto se podría explicar mediante el hecho de que, a diferencia del entrecruzamiento de la mezcla CS/PVA con GA, el uso de GEN únicamente implica el consumo de aminas primarias, manteniendo intactos todos los grupos $-OH$ presentes en el sistema; lo que favorece la hidrofiliidad de estos hidrogeles y genera una red con un mayor volumen libre. Por tanto, estos resultados demuestran que los agentes entrecruzantes tienen un efecto significativo sobre la red polimérica, produciendo materiales más estables con diferentes capacidades de absorción.

Por otra parte, los hidrogeles nanocompuestos (CS/PVA/MWCNTs y CS/PVA/GEN/MWCNTs) presentaron un hinchamiento al equilibrio de 400% y 225%, respectivamente; por lo que, el uso de MWCNTs en las matrices poliméricas de CS/PVA y CS/PVA/GEN redujo su capacidad de hinchamiento alrededor de un 20% y 17%, respectivamente (i.e. 100 y 45 puntos porcentuales, respectivamente). Resultado que puede ser atribuido a la naturaleza hidrófoba de estas nanopartículas [86]. De esta forma, a pesar de que los MWCNTs redujeron la capacidad de hinchamiento al equilibrio de los hidrogeles, su efecto no fue tan significativo como el generado por los entrecruzantes químicos utilizados en este trabajo de investigación.

Con todo esto es posible concluir que, la capacidad de hinchamiento al equilibrio de los hidrogeles depende principalmente de 4 factores: la presencia de grupos hidrófilos en su red polimérica, la densidad de entrecruzamiento, la elasticidad de la red y el volumen libre disponible. De ahí que, en otras investigaciones se ha señalado que la cantidad de líquido que los hidrogeles son capaces de retener se encuentra directamente relacionada con su comportamiento mecánico y la estructura de su red polimérica [4, 44, 56, 151]. Por lo que es de esperarse que los hidrogeles con menor índice de hinchamiento (i.e. CS/PVA/GA, seguidos por CS/PVA/GEN y CS/PVA/GEN/MWCNTs), sean los que presenten una menor razón de deformación (λ), una mayor resistencia a la tracción (UTS), un mayor módulo elástico (E), un menor peso molecular entre puntos de entrecruzamiento (M_{cri}) y un menor tamaño de poro o malla (D_N). Conjeturas que podrán ser corroboradas una vez que las propiedades mecánicas y los parámetros estructurales de todas las redes poliméricas sean evaluados y discutidos en el siguiente capítulo del presente trabajo de investigación.

3.6.2 Ángulo de Contacto (CA)

Las pruebas de ángulo de contacto son uno de los métodos más utilizados para estudiar las propiedades de superficie de los polímeros; mediante ellas es posible evaluar la naturaleza hidrófila o hidrófoba de la superficie de un determinado material, con relativa simplicidad [88]. Por consiguiente, si el CA se encuentra entre valores de $0^\circ < \theta < 90^\circ$, significa que el líquido utilizado moja la superficie del sólido y por ende es hidrófila a él; mientras que, si el ángulo toma valores entre $90^\circ < \theta < 180^\circ$, la superficie del sólido es hidrófoba al líquido y este no será capaz de mojar su superficie [146].

Cabe resaltar que, a diferencia de las condiciones comúnmente reportadas en otros trabajos de investigación, nuestras pruebas se llevaron a cabo con los hidrogeles en estado de hidratación

al equilibrio. Esto debido principalmente a dos razones: la primera es que, teniendo presente la capacidad natural de estos materiales de absorber grandes cantidades de líquido, se ha reportado que al momento de depositar la gota sobre la superficie del hidrogel en estado seco, este comienza a hincharse; por lo que a medida que la absorción incrementa, el volumen de la gota disminuye y el CA se hace más pequeño [88], lo que ocasiona disparidades en el método y errores en las mediciones cuando es necesario comparar diferentes materiales. La segunda razón está relacionada con el estado en el que se encontrarán los hidrogeles en su campo de aplicación; de tal forma que, en el caso de nuestros probables andamios celulares o membranas para limpieza de aguas residuales, los hidrogeles estarán hidratados en todo momento (i.e. durante la formación de los constructos, en el cultivo *in vitro*, durante las pruebas de caracterización biológica, al interior del cuerpo, etc.); por lo que evaluar el CA en dicho estado nos permitirá obtener resultados más certeros.

Así, en la Figura 3.7 se muestra el ángulo de contacto estático que forma una gota de agua desionizada inmediatamente después de ser depositada sobre la superficie de los hidrogeles híbridos de CS/PVA, entrecruzados y/o nanocompuestos.

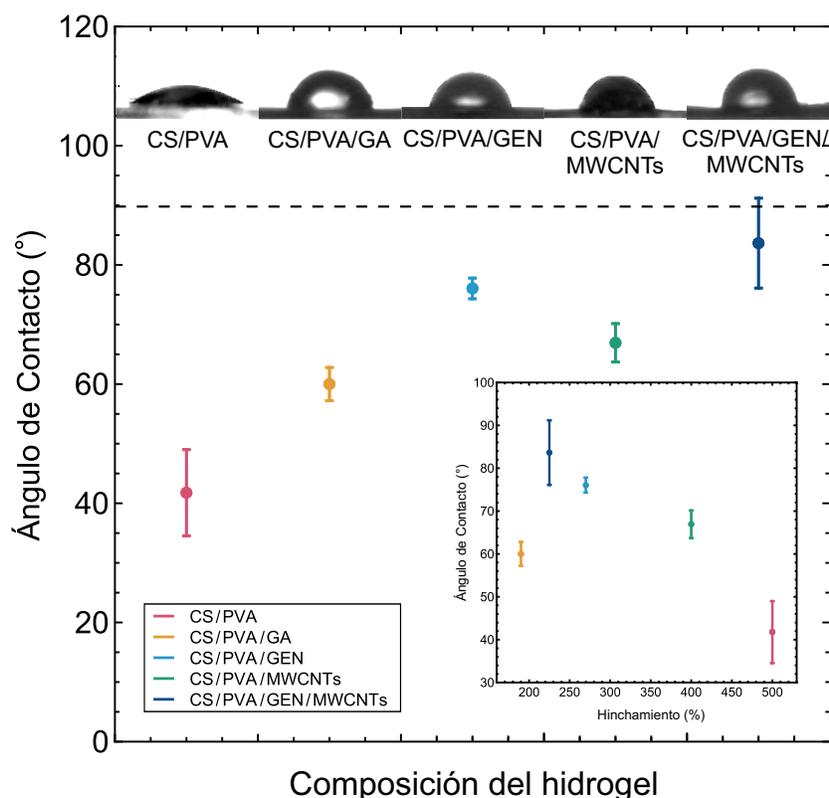


Figura 3.7 Ángulos de contacto formados por las gotas sésiles de agua desionizada (0.5 μL) depositadas sobre la superficie de los hidrogeles de CS/PVA, entrecruzados y/o nanocompuestos. En el recuadro interno de la figura se muestra la variación del ángulo de contacto como función del hincharamiento al equilibrio de estos hidrogeles.

En esta figura se puede apreciar como el CA varía significativamente con la composición de los hidrogeles. Por un lado, los hidrogeles control de CS/PVA hidratados al equilibrio (Figura 3.7, viñeta de color rojo) presentaron un CA de $42^\circ \pm 7^\circ$; concordando con lo reportado previamente por Bahrami et al. [64]. Por otro lado, cuando los hidrogeles fueron químicamente entrecruzados redujeron su hidrofiliidad; de tal forma que, en los hidrogeles de CS/PVA/GA (Figura 3.7, viñeta de color amarillo), el CA se incrementó alrededor de un 43% pasando de $42^\circ \pm 7^\circ$ a $60^\circ \pm 3^\circ$; mientras que los hidrogeles entrecruzados con GEN (Figura 3.7, viñeta de color azul cielo) mostraron un CA de $76^\circ \pm 2^\circ$, lo cual corresponde a un incremento aproximado del 81% respecto a los hidrogeles control de CS/PVA. Ya que en los hidrogeles de CS/PVA/GA la mayoría de los grupos polares $-NH_2$ y $-OH$, fueron consumidos durante la reacción de entrecruzamiento con GA, era de esperarse que estos presentaran una superficie más hidrófoba (i.e. un mayor CA) que la de los hidrogeles de CS/PVA/GEN, en los cuales únicamente se consumieron grupos $-NH_2$ durante el entrecruzamiento de su red; no obstante, el resultado fue el contrario. Dicho comportamiento puede deberse a que, en los hidrogeles entrecruzados con GEN, las macromoléculas de PVA tienen una mayor libertad para reordenarse y reorientarse hacia la superficie en respuesta al ambiente acuoso en el que se encuentran inmersos durante el hinchamiento; de tal forma que, como resultado de dicho reordenamiento, el número de grupos polares $-OH$ presentes en la superficie de los hidrogeles de CS/PVA/GEN se incrementa, minimizando la energía superficial del sistema e incrementando de esta forma el ángulo de contacto. Fenómeno que también ha sido observado por Gupta et al. [156] y Kim et al. [157], al variar la concentración de grupos $-OH$ en hidrogeles de PVA.

En la Figura 3.7 también es posible observar como la adición de una pequeña cantidad de MWCNTs (i.e. 0.2% masa/masa) disminuye significativamente la hidrofiliidad de superficie de los hidrogeles nanocompuestos, respecto a sus símiles sin cargar; lo cual es atribuido a la naturaleza hidrófoba de dichas nanopartículas. De esta forma, el CA en los hidrogeles de CS/PVA/MWCNTs (Figura 3.7, viñeta de color verde) pasó de $42^\circ \pm 7^\circ$ a $67^\circ \pm 3^\circ$ y de $76^\circ \pm 2^\circ$ a $84^\circ \pm 7^\circ$ en los hidrogeles de CS/PVA/GEN/MWCNTs (Figura 3.7, viñeta de color azul marino); cambios que corresponden a un incremento del 60% y 11%, respectivamente. Así, de todos los hidrogeles estudiados, los que presentaron el mayor ángulo de contacto fueron los hidrogeles de CS/PVA/GEN/MWCNTs, los cuales cuentan tanto con la contribución hidrófoba de los MWCNTs, como del agente entrecruzante (i.e. genipin).

A pesar de que los resultados de las pruebas de ángulo de contacto demostraron que todos los hidrogeles sintetizados tenían una superficie moderadamente hidrófila, resulta evidente que tanto los agentes entrecruzantes como los MWCNTs son capaces de modificar de manera significativa la hidrofiliidad de superficie de las membranas de CS/PVA; por lo que sería posible

obtener un hidrogel con una hidrofiliidad de superficie específica, simplemente con variar la concentración de CNTs y/o el tipo de agente entrecruzante utilizado (GEN o GA).

En el recuadro interno de la Figura 3.7 se muestra la variación del CA como función del hinchamiento al equilibrio alcanzado por los hidrogeles híbridos de CS/PVA, entrecruzados y/o nanocompuestos. En esta gráfica se evidencia como la humectabilidad o hidrofiliidad de superficie de los hidrogeles híbridos está fuertemente relacionada con su hidrofiliidad de volumen; ya que, a mayor capacidad de absorción, mayor hidrofiliidad de superficie; o bien, dicho de otra forma: a mayor índice de hinchamiento, menor ángulo de contacto. Correlación que también ha sido observada en otros trabajos de investigación [64, 88].

Cabe destacar que, la hidrofiliidad/hidrofobicidad de superficie de un biomaterial es uno de los parámetros que más influye tanto en la adhesión celular, como en la tasa de proliferación. Recientemente se ha encontrado que la adhesión celular es mayor cuando la superficie del sustrato es moderadamente hidrófila, ello debido a que las interacciones polares (i.e. puentes de hidrógeno) que toman lugar entre las proteínas de la membrana celular y los grupos hidrófilos presentes en la superficie del material se ven favorecidas [18]. En este sentido, la topografía y rugosidad de la superficie son dos factores que también influirán en este proceso, ya que una mayor rugosidad implica un área superficial más grande en la cual podrían encontrarse un mayor número de grupos hidrófilos/hidrófobos. De acuerdo con lo reportado por Gupta et al. [156], el CA idóneo para el cultivo de fibroblastos se encuentra entre los 55° y 75°. Por lo que, considerando únicamente este parámetro y conforme a los resultados presentados en esta sección, es probable que los hidrogeles de CS/PVA/GA, CS/PVA/GEN y CS/PVA/MWCNTs sean los que presenten una mayor adhesión y proliferación celular. Hipótesis que podrá ser validada una vez que se lleven a cabo las pruebas de caracterización biológica (Capítulo 6 del presente trabajo de investigación).

3.7 TOPOGRAFÍA Y RUGOSIDAD DE SUPERFICIE

En los hidrogeles híbridos la morfología de superficie depende de algunos parámetros tales como: su composición química, la solubilidad de los polímeros, la velocidad de evaporación de los disolventes utilizados, el espesor final de la membrana, entre otros [158]. De acuerdo con lo reportado en la literatura, tanto la hidrofiliidad como la morfología y la rugosidad de la superficie son tres de los factores más relevantes para propiciar la adhesión de las células a un sustrato [18].

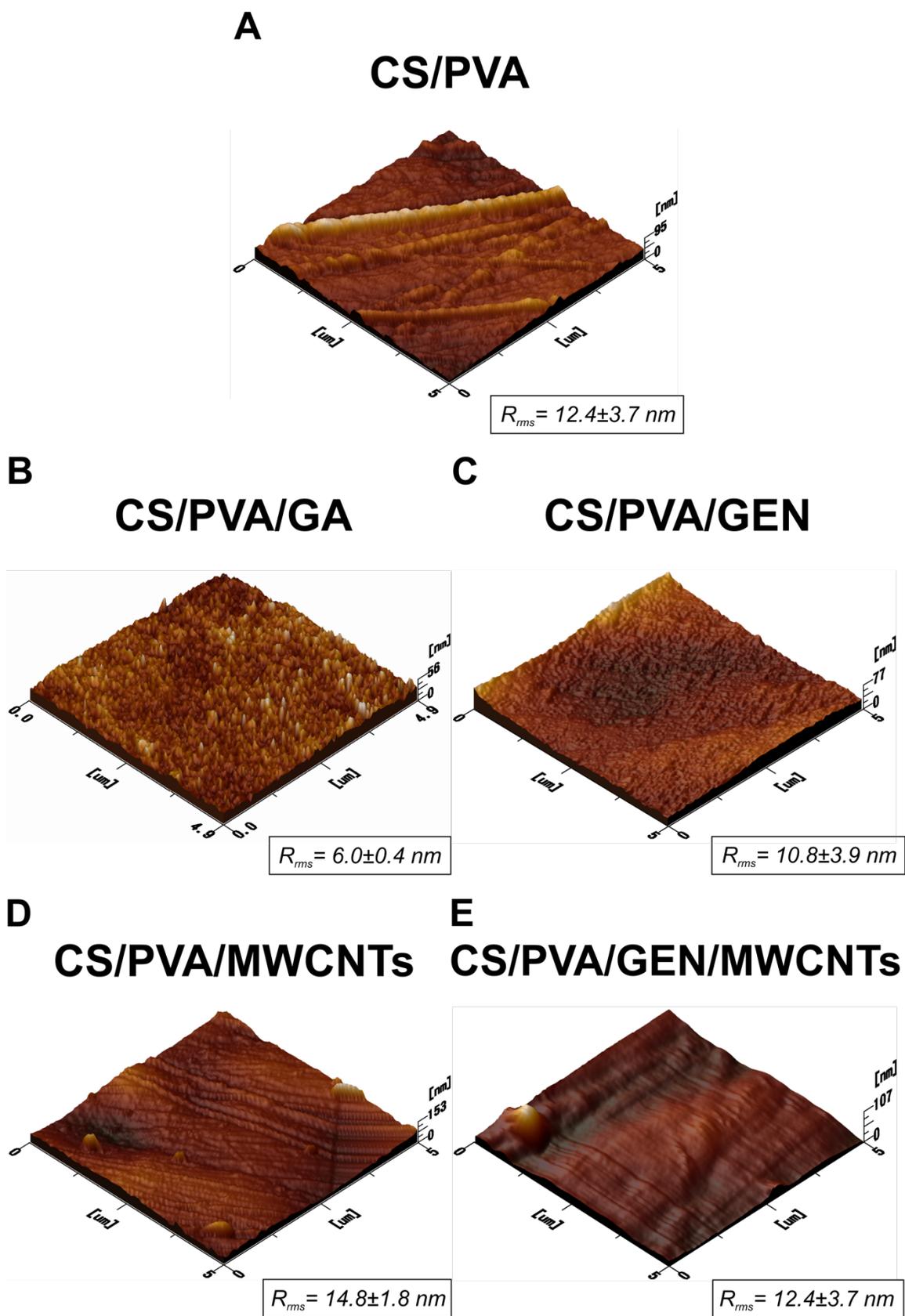


Figura 3.8 Imágenes topográficas de las superficies de los hidrogeles de CS/PVA, CS/PVA/GA, CS/PVA/GEN, CS/PVA/MWCNTs, y CS/PVA/GEN/MWCNTs obtenidas mediante microscopía de fuerza atómica.

Así, a fin de examinar la topografía de superficie y cuantificar su rugosidad, los hidrogeles híbridos de CS/PVA, entrecruzados y/o cargados con MWCNTs, fueron estudiados mediante microscopía de fuerza atómica (AFM, por sus siglas en inglés). En la Figura 3.8 se muestran las imágenes tridimensionales correspondientes a la topografía de superficie de cada tipo de hidrogel híbrido sintetizado, junto con su valor promedio de rugosidad (R_{rms}). En estas imágenes se aprecia como los hidrogeles presentan morfologías y rugosidades muy diferentes dependiendo de su composición.

Por un lado, es posible observar como la superficie de las membranas control (CS/PVA, Figura 3.8 A) exhibe una serie de estructuras fibrilares orientadas al azar, embebidas en una matriz polimérica de apariencia amorfa y compacta. Este tipo de arreglos fibrilares han sido previamente observadas por Zhu et al. [159], Bajpai et al. [160] y Yarimitsu et al. [161] en membranas de PVA obtenidas mediante la técnica de evaporación de los disolventes. De manera que, en el presente trabajo de investigación, dichas estructuras están asociadas al PVA cristalino; mientras que, la matriz sobre la cual se encuentran dispuestas corresponde, en gran parte, a las regiones amorfas del CS y el PVA. En cuanto a la rugosidad, las membranas de CS/PVA presentaron una $R_{rms} = 12.4 \text{ nm} \pm 3.7 \text{ nm}$.

Por otro lado, cuando la mezcla de CS/PVA es entrecruzada con GA o GEN, los hidrogeles muestran una superficie completamente distinta (Figura 3.8 B y C, respectivamente). Dichos cambios en la topografía son inducidos principalmente por la reacción de entrecruzamiento; la cual da lugar a una reorganización dinámica diferente de la superficie, dependiendo de las interacciones polímero-polímero que se lleven a cabo. Así, en los hidrogeles de CS/PVA/GA (en donde el GA es capaz de reaccionar tanto con los -OH del CS y el PVA, como con los -NH₂ del CS), se aprecia una superficie densa, conformada por pequeñas protuberancias; las cuales aparentemente se encuentran distribuidas de forma uniforme a lo largo de toda la superficie. Mientras que, en los hidrogeles en donde únicamente son entrecruzados los grupos -NH₂ del CS (i.e. CS/PVA/GEN, Figura 3.8 C), se observa una superficie compacta, áspera y arrugada, con zonas de mayor elevación. Asimismo, en la Figura 3.8 es posible apreciar como el entrecruzamiento químico de la red polimérica mediante GA o GEN produce una disminución de la R_{rms} respecto a los hidrogeles control de CS/PVA de alrededor de un 52% y 13%, respectivamente. Estos resultados sugieren que, la reorganización molecular que conlleva el entrecruzamiento químico de los hidrogeles de CS/PVA no solo influye en su cristalinidad, sino que también se ve reflejada en la rugosidad de su superficie. Así, el incremento de la fracción amorfa produce cadenas poliméricas orientadas al azar, las cuales dan lugar a una superficie áspera y arrugada; mientras que, el arreglo regular de las zonas cristalinas genera estructuras compactas, bien definidas, capaces de incrementar la rugosidad de superficie debido a la altura

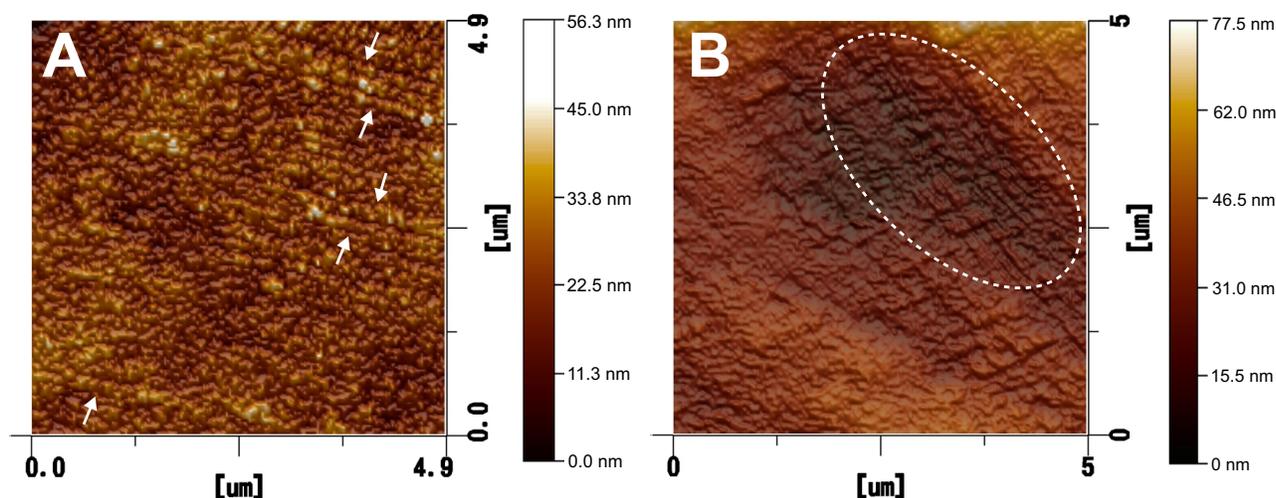


Figura 3.9 Vista superior de la superficie de los hidrogeles de A) CS/PVA/GA y B) CS/PVA/GEN, obtenidas mediante AFM. Las flechas señalan las estructuras fibrilares detectadas en la superficie del hidrogel químicamente entrecruzado con GA; mientras que, la región punteada marca la zona que presenta una alineación preferencial en los hidrogeles entrecruzados con GEN.

y disposición que dichas estructuras pueden llegar a tener dentro de la matriz amorfa. Fenómeno que también ha sido observado en otras investigaciones [147, 162, 163]. De esta manera, dependiendo del agente entrecruzante utilizado (i.e. GEN o GA), se obtendrán hidrogeles con morfologías y rugosidades muy diferentes.

A pesar de que las superficies de los hidrogeles de CS/PVA/GA y CS/PVA/GEN parecen no presentar las estructuras fibrilares asociadas al PVA cristalino, si se analiza una vista superior de su topografía, es posible identificar zonas completamente amorfas y pequeñas zonas con una orientación lineal preferencial (Figura 3.9 A y B; flechas y elipse, respectivamente); las cuales podrían estar asociadas a las regiones cristalinas aún presentes en estos hidrogeles tras su entrecruzamiento químico. Como se puede observar en la Figura 3.9, estas regiones son mayores y se encuentran más definidas en los hidrogeles de CS/PVA/GEN, lo cual cobra sentido si se recuerda que, en ellos, el PVA posee una mayor capacidad de plegarse y formar regiones cristalinas al no ser capaz de reaccionar con el GEN.

Finalmente, la Figura 3.8 D muestra como la adición de una pequeña concentración de MWCNTs (i.e. 0.2% masa/masa) en la mezcla CS/PVA conlleva un incremento en la densidad de las estructuras fibrosas. A diferencia de lo observado en las membranas control, estas fibras son más delgadas y presentan cierta alineación; lo cual puede deberse a un acomodo más ordenado de las macromoléculas, derivado de las interacciones entre los MWCNTs y las cadenas de PVA durante la evaporación de los disolventes (interacciones que fueron comprobadas en los estudios de XRD, Sección 3.4). Esta tendencia también fue observada por Terrazas-Bandala et al. en membranas de triacetato de celulosa cargadas con 1% masa/masa de nanopartículas de

carbono [164]. Asimismo, la superficie de los hidrogeles entrecruzados y cargados (i.e. CS/PVA/GEN/MWCNTs, Figura 3.8 E) también presenta las estructuras fibrilares atribuidas al PVA cristalino [159-161]; las cuales, en este caso, se observan con una estructura más definida que las presentes en las membranas de CS/PVA/GEN y se sitúan sobre una matriz de apariencia áspera y compacta con algunas regiones de mayor elevación. Además, cabe observar que, las imágenes topográficas de ambos hidrogeles nanocompuestos exhiben pequeños montículos que sobresalen de la superficie y generan un marcado incremento en la altura; de manera que dichas estructuras son atribuidas a la formación de cúmulos de MWCNTs.

A su vez, la adición de MWCNTs modificó la R_{rms} de los hidrogeles respecto a sus símiles sin cargar (i.e. CS/PVA y CS/PVA/GEN), incrementándola alrededor de un 19% y 15% en los hidrogeles de CS/PVA/MWCNTs y CS/PVA/GEN/MWCNTs, respectivamente. Así, al comparar la rugosidad de ambos hidrogeles nanocompuestos (i.e. 14.8 nm vs. 12.4 nm para los hidrogeles de CS/PVA/MWCNTs y CS/PVA/GEN/MWCNTs, respectivamente), es posible apreciar que, nuevamente, el hidrogel entrecruzado es el que presenta la menor R_{rms} debido a la reorganización que experimentan las cadenas poliméricas.

Todos estos resultados parecen confirmar la existencia de una relación entre la cristalinidad y la rugosidad de superficie de los hidrogeles híbridos sintetizados, puesto que aquellos que presentaron una mayor R_{rms} también fueron los que mostraron un mayor porcentaje de cristalinidad (Sección 3.4), y viceversa. Por lo que se refiere a la homogeneidad de la superficie, los hidrogeles de CS/PVA/GA y de CS/PVA/MWCNTs fueron los que tuvieron las superficies más uniformes, ya que, en comparación con el resto de los hidrogeles estudiados, la desviación estándar de su rugosidad fue tres veces menor (i.e. $SD \approx 10\%$). En consecuencia, tanto la topografía como la rugosidad de superficie de los hidrogeles híbridos de CS/PVA, han demostrado ser dos parámetros altamente dependientes de la estructura de la red polimérica de los hidrogeles, de manera que estos pueden ser fácilmente modificados y optimizados al variar el tipo de agente entrecruzante y/o la concentración de los MWCNTs. En este sentido, Battt et al. [162] reportaron un comportamiento similar en membranas de CS/PVA entrecruzadas mediante radiación gamma; de manera que, dependiendo de la dosis aplicada la topografía y rugosidad de las membranas se modificaba.

A pesar de que en otros estudios se ha observado una correlación entre la rugosidad y el ángulo de contacto [165], los resultados obtenidos en el presente trabajo de investigación no mostraron una correlación directa entre ambos, de manera que la composición química de la superficie jugó un papel mucho más relevante en la humectabilidad de estos hidrogeles. De forma análoga, otras investigaciones señalan que la hidrofiliidad de volumen de los hidrogeles también se ve influenciada por la rugosidad [27, 166]. Así, se observó que los hidrogeles que presentaron

el mayor hinchamiento al equilibrio (Sección 3.6.1) también fueron los que tuvieron la mayor rugosidad. Esto debido a que, por un lado, las imperfecciones topográficas permiten que el líquido se aloje en las cavidades; mientras que, el incremento del área superficial, propicia que éste penetre más fácilmente en la red debido al aumento de grupos hidrófilos sobre la superficie del hidrogel. No obstante, es preciso señalar que si bien los hidrogeles nanocompuestos exhibieron las rugosidades más altas, estos no fueron los que presentaron el mayor hinchamiento, lo cual, como se discutió anteriormente, se debe al efecto hidrófobo de los MWCNTs.

CAPÍTULO 4

PROBADOR MECÁNICO PARA ENSAYOS DE TRACCIÓN BIAIXAL POR INDENTACIÓN ESFÉRICA

Como se mencionó anteriormente, uno de los principales objetivos y aportes del presente trabajo de tesis fue el desarrollo de una metodología y de un dispositivo experimental capaz de evaluar el comportamiento macro y micromecánico de membranas elastoméricas (i.e. hidrogeles, polímeros suaves e incluso algunos tejidos biológicos), sometidas a una tracción biaxial mediante su indentación esférica. En este capítulo se abordan los aspectos fundamentales sobre el diseño, la instrumentación y la validación de dicho probador. Asimismo, se presentan y se analizan a detalle los tres modelos comúnmente utilizados para determinar las propiedades mecánicas de membranas delgadas indentadas axisimétricamente (i.e. Yang-Hsu, Liu y Begley-Mackin). Finalmente, se proponen dos metodologías alternas y una nueva expresión analítica general, útiles para determinar de manera certera el módulo elástico de los materiales ensayados.

4.1 TRACCIÓN BIAIXAL POR INDENTACIÓN ESFÉRICA

Si bien el ensayo de tracción uniaxial es muy útil para evaluar la respuesta mecánica de gran parte de los materiales poliméricos, dicho ensayo no brinda información suficiente cuando se trata de membranas delgadas o hidrogeles, ya que estos materiales difícilmente se encuentran expuestos a esfuerzos uniaxiales en su campo de aplicación (i.e. andamios celulares, sustitutos de tejidos biológicos, dispositivos médicos y actuadores, entre otros). Por lo tanto, caracterizar este tipo de materiales bajo esfuerzos biaxiales, esfuerzos aún más cercanos a los presentes en el mundo real, resulta de vital importancia.

La imposición de un estado de esfuerzos biaxial sobre una membrana puede llevarse a cabo a través de una presión impuesta por un líquido/gas (i.e. prueba de inflamamiento), o bien, mediante la aplicación de cargas puntuales (i.e. prueba de indentación) [33]. Por un lado, las pruebas de inflamamiento requieren que las muestras a ser ensayadas se encuentren libres de agujeros o poros, lo cual es poco factible en el caso de muchos polímeros y tejidos biológicos. Por otro lado, en las pruebas de indentación sí es posible evaluar este tipo de materiales, ya sea colocando la membrana sobre un sustrato, o bien, sujetándola firmemente entre dos placas con un orificio central, de tal forma que la región de prueba quede libre y totalmente expuesta a la deflexión que

le será impuesta a través de un indentador con geometría esférica (método que se conoce en inglés como *free-standing*). De acuerdo con lo reportado en la literatura, el método de *free-standing* ofrece varias ventajas en comparación con el ensayo de indentación sobre un sustrato, ya que en el caso de membranas muy delgadas las propiedades del sustrato pueden influenciar el resultado de la prueba. Asimismo, con el método de *free-standing* se evitan las complicaciones asociadas con la interfase membrana-sustrato y se genera una distribución esfuerzo/deformación que fácilmente puede ser relacionada con la fuerza y los desplazamientos aplicados; además de que, a diferencia de la indentación sobre un sustrato, esta permite someter el material ensayado a grandes deformaciones [33, 38, 167].

Así, en el presente trabajo de investigación, la caracterización mecánica bajo tracción biaxial se llevó a cabo utilizando el método de *free-standing*; lo cual implicó el diseño, construcción, instrumentación, control y validación de un probador mecánico con la capacidad de evaluar simultáneamente el comportamiento macro y micromecánico de hidrogeles, polímeros suaves e incluso tejidos biológicos suaves, a través de un análisis por correlación de imágenes digitales en tres dimensiones y del análisis de su perfil de deformación (equipo que en su conjunto no existía a nivel científico ni comercial). Asimismo, se desarrolló una nueva metodología para determinar de forma efectiva el módulo elástico de los materiales ensayados.

4.2 DISEÑO E INSTRUMENTACIÓN DEL PROBADOR MECÁNICO

El probador mecánico fue diseñado y desarrollado en el Laboratorio de Mecánica y Micromecánica de Sólidos del Instituto de Investigaciones en Materiales (IIM, UNAM). Dicho dispositivo incorpora diversos sensores electrónicos que registran la fuerza y el desplazamiento aplicados, e incluye tres cámaras CCD capaces de registrar, desde diferentes perspectivas, la deformación de la membrana durante la prueba de indentación. Tanto la adquisición de datos, como la sincronización de los dispositivos ópticos y electrónicos son llevadas a cabo de manera eficiente mediante un instrumento virtual (VI) programado en *LabVIEW*.

En la Figura 4.1 se presenta una vista general del probador mecánico a través de una imagen real (Figura 4.1 A) y de un diagrama en el que se señalan sus componentes (Figura 4.1 B). En esta figura se pueden apreciar los tres módulos principales que componen al probador, a saber:

- i) el módulo de indentación,
- ii) el módulo de visión estereoscópica y
- iii) el módulo de visión 2D.

Las características y funciones específicas de cada uno de estos módulos se presentarán a detalle en las siguientes subsecciones.

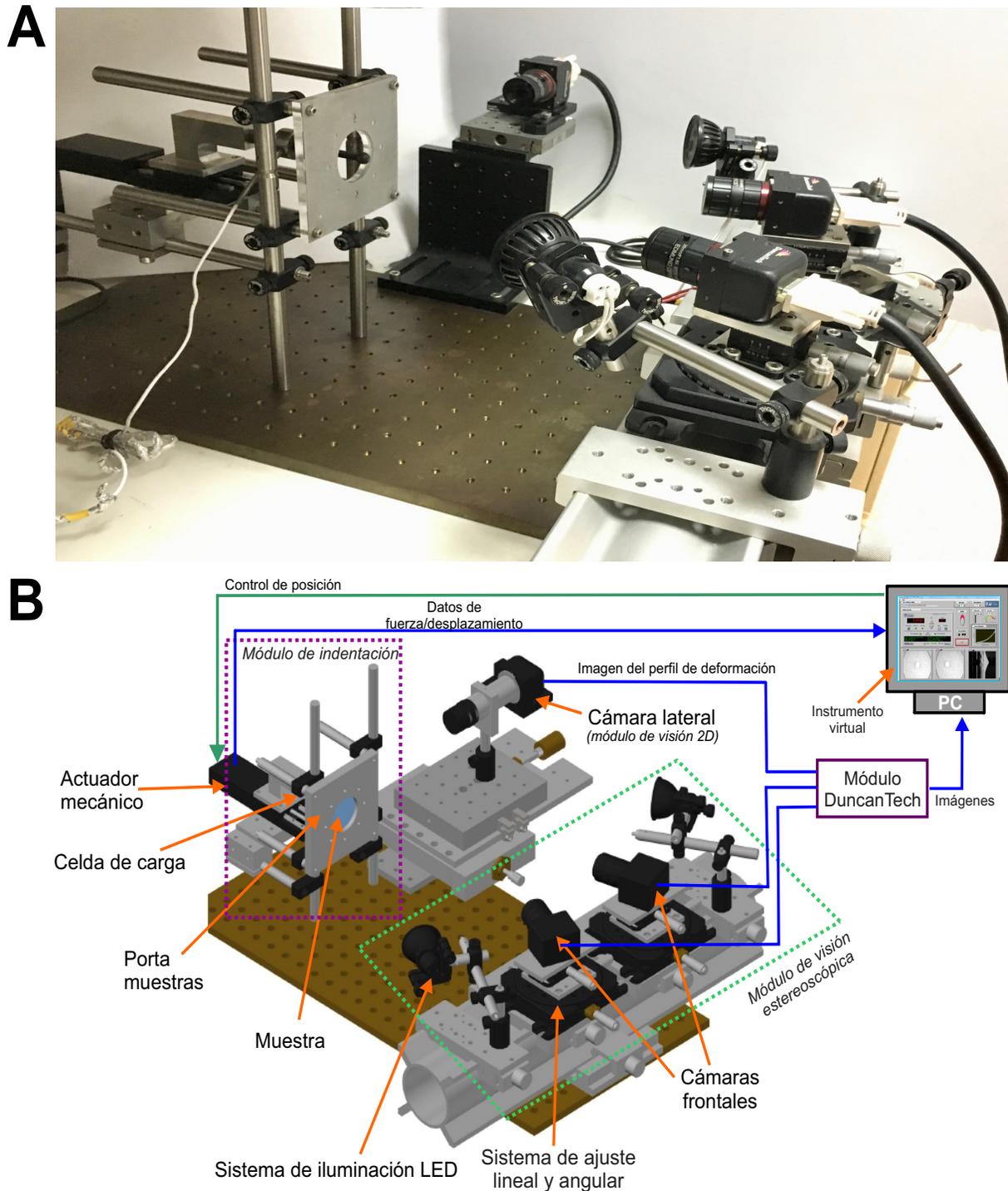


Figura 4.1 Probador mecánico de tracción biaxial mediante indentación esférica. A) Imagen real del probador mecánico. B) Diagrama del probador en el que se señalan cada uno de los módulos y componentes que lo integran. El recuadro morado engloba el módulo de indentación (i), el verde el módulo de visión estereoscópica (ii) y entre ambos se ubica la cámara lateral o el módulo de visión 2D.

4.2.1 Módulo de indentación

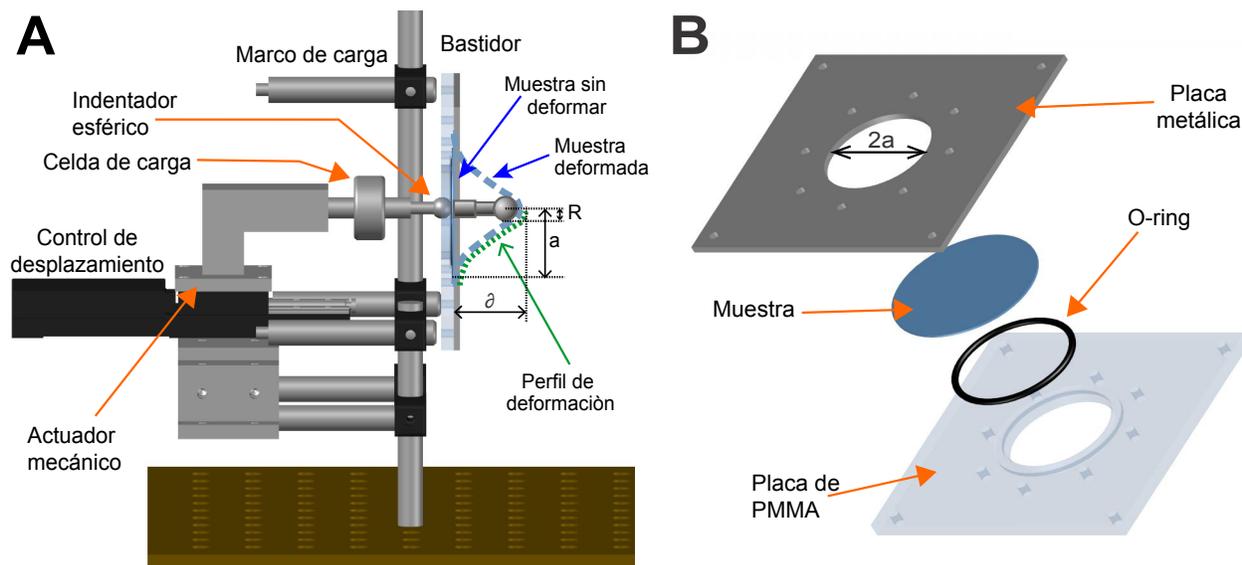


Figura 4.2 Módulo de indentación. A) Componentes del sistema de indentación, B) Diagrama del porta-muestras.

El módulo de indentación (Figura 4.1 B, recuadro morado) es capaz de imponer un estado de esfuerzos biaxial a través de un indentador esférico, el cual es utilizado para aplicar una carga transversal sobre la membrana colocada en el porta-muestras. Como se puede observar en la Figura 4.2 A, el módulo de indentación se basa en un marco de carga especialmente diseñado para ensayar elastómeros suaves y delgados; y fue construido utilizando una serie de postes de acero inoxidable sobre los cuales descansan el porta-muestras y el sistema de indentación.

Por un lado, el porta-muestras está compuesto por dos placas cuadradas (Figura 4.2 B); la primera es una placa de polimetilmetacrilato (PMMA), mientras que la segunda es una placa delgada de acero inoxidable. Ambas placas presentan un orificio central de 50 mm de diámetro, el cual corresponde a la región de prueba (i.e. $2a$ en la Figura 4.2 B). Como se observa en la Figura 4.2 B, entre ambas placas se localiza un O-ring, el cual es utilizado para sujetar firmemente a la muestra sin causarle algún daño que pudieran afectar su respuesta mecánica. Una vez que la muestra es puesta cuidadosamente en el porta-muestras, este se coloca en el marco de carga utilizando cuatro tornillos de acero inoxidable.

Por otro lado, el sistema de indentación está conformado por un indentador esférico, un sensor de fuerza y un actuador mecánico (Figura 4.2 A). El actuador mecánico es una platina motorizada (MTS50-Z8 de Thorlabs), con un intervalo de desplazamiento lineal de 50 mm. La potencia mecánica de la platina es provista por un servomotor de corriente continua (DC) capaz de producir movimientos incrementales mínimos de $0.05 \mu\text{m}$, a una velocidad máxima de

2.4 mm/s y con una precisión de 0.7%, a lo largo de todo el intervalo de desplazamiento. Durante la prueba, el desplazamiento del actuador lineal es controlado y registrado desde *LabVIEW* a través de una interfaz gráfica de usuario provista por Thorlabs. A fin de validar la exactitud del desplazamiento del actuador lineal MTS50-Z8, se le acopló un indicador de posición digital *Mitutoyo* (modelo ID-F150HE); el cual fue utilizado como referencia para medir la longitud de los desplazamientos. Así, desplazamientos incrementales de 0.1 mm fueron aplicados entre los 0 mm - 10 mm de la carrera del actuador, incrementos de 0.5 mm entre los 20 mm - 40 mm y, finalmente, entre los 40 mm - 50 mm nuevamente se aplicaron movimientos incrementales de 0.1 mm. Todos estos desplazamientos fueron aplicados en ambas direcciones y los datos de la platina motorizada MTS50-Z8 y del indicador digital *Mitutoyo* fueron registrados y graficados como se muestra en la Figura 4.3 A. En esta gráfica, es fácil observar la buena concordancia que hubo entre los desplazamientos registrados por ambos instrumentos. De acuerdo con estos resultados, la platina motorizada presenta un error en desplazamiento menor a una décima de micra, lo cual demuestra la exactitud del actuador mecánico.

Acoplada a la platina motorizada se encuentra una pieza de acero inoxidable en forma de L invertida, la cual aloja en uno de sus extremos una celda de carga de alta precisión Honeywell modelo 34 (fuerzas de tracción y compresión, ± 111 N) de *Honeywell Sensotec*. Dicha celda es utilizada como sensor de fuerza para medir la carga axial que se produce durante el proceso de indentación (ver Figura 4.2 A). La adquisición de los datos generados por la celda de carga se lleva a cabo mediante una tarjeta NI PCI-GPIB (*National Instruments*) acoplada a un multímetro digital (modelo 34401A, *Hewlett Packard*), el cual es utilizado para registrar la diferencia de potencial a la salida de la celda de carga durante la prueba de indentación. Así, la diferencia de potencial registrada es transformada en datos de fuerza usando la función matemática obtenida durante el proceso de calibración de la celda; la cual se llevó a cabo utilizando una serie de pesas patrón. Así, la curva de calibración de la celda, tanto para el caso de carga como de descarga, exhibió un comportamiento lineal (Figura 4.3 B). Estos datos fueron ajustados mediante el método de cuadrados mínimos lineales a fin de obtener un modelo matemático que relacionara la diferencia de potencial a la salida de la celda con la fuerza censada, y a partir de estos resultados se encontró que, el dispositivo es capaz de detectar fuerzas de hasta 111 N con una incertidumbre de ± 0.03 N bajo cargas de tracción o compresión.

La carga aplicada por el actuador mecánico es transferida a la muestra mediante el indentador (una esfera de acero inoxidable de 5 mm de radio, acoplada a la celda de carga). De modo que este es posicionado en el centro de la región de prueba, a fin de producir la deformación axisimétrica de la membrana (Figura 4.2). Tanto el porta-muestras, como el indentador esférico fueron diseñados y manufacturados considerando una serie de parámetros geométricos

utilizados en trabajos previos [36, 37, 39]; los cuales sugieren el uso de una razón, entre el radio del bastidor (a) y el radio del indentador (R), cercana a 5. Asimismo, existen otras condiciones importantes que deben ser satisfechas a fin de asegurar un comportamiento de membrana durante los ensayos de indentación. La primera de ellas está relacionada con el desplazamiento central aplicado (δ), de tal forma que este debe ser al menos 10 veces mayor al espesor de la muestra (h), i.e. $\delta/h > 10$. La segunda condición corresponde a la razón entre el radio del bastidor (a) y el espesor de la membrana (h), de manera que se debe cumplir que $a/h > 6$. De acuerdo con lo descrito en la literatura, si se cumplen estas tres condiciones, los efectos por flexión pueden ser despreciados, asegurando un comportamiento de membrana no lineal en la muestra ensayada [168].

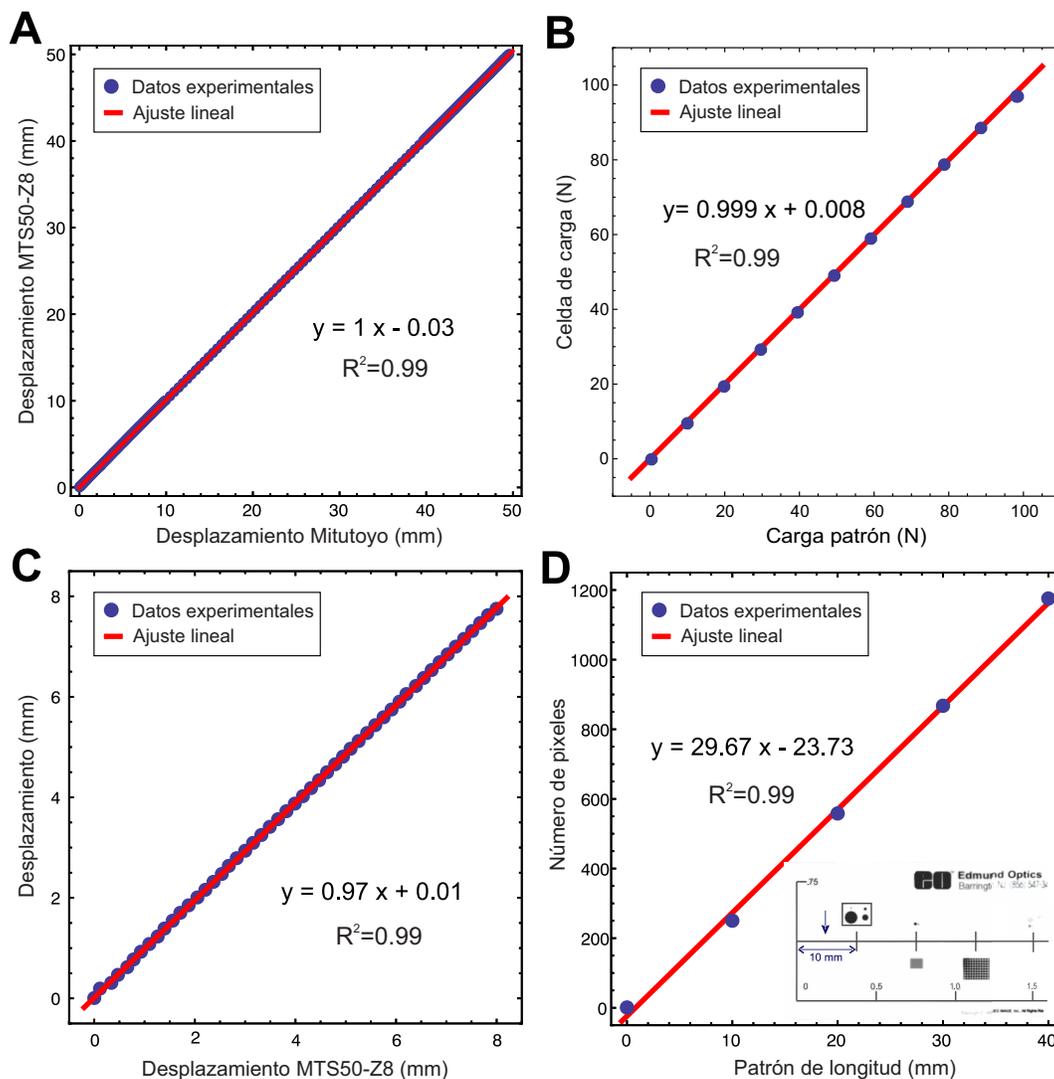


Figura 4.3 Resultados de la calibración de sensores y actuadores. A) Platina motorizada MTS50-Z8, B) Celda de carga Honeywell, C) Medida del desplazamiento fuera del plano utilizando 3D-DIC y D) Determinación del tamaño de pixel de la cámara lateral.

4.2.2 Módulo de visión

El sistema de adquisición de imágenes del probador mecánico biaxial está compuesto por tres cámaras CCD. Dos de ellas se localizan frente al módulo de indentación (conformando el sistema de visión estereoscópico); mientras que, la tercera se ubica a un costado del porta-muestras a fin de registrar el perfil deformado de la membrana (esta última cámara conforma el denominado módulo de visión lateral o 2D). Cabe señalar que ambos módulos son capaces de trabajar de forma simultánea o independiente, de manera que el usuario puede seleccionar la modalidad de trabajo dependiendo de los datos requeridos para estimar las propiedades mecánicas de la muestra a ensayar.

4.2.2.1 Módulo de visión estereoscópica

El módulo de visión estereoscópica (Figura 4.1 B, recuadro verde) utiliza dos cámaras CCD monocromáticas (1/2 CCD), acopladas con lentes de 35 mm, a fin de obtener una magnificación adecuada de la deformación de la superficie del material. Las cámaras están situadas sobre un riel de aluminio localizado frente al módulo de indentación biaxial, de tal forma que ambas son capaces de adquirir imágenes de la superficie de la muestra desde puntos de vista ligeramente diferentes, pero conocidos. A fin de alinear las cámaras para obtener pares de imágenes análogos, su posición puede ser ajustada de forma independiente a través de unas platinas lineales bidimensionales (X - Y) de alta precisión. Así, en la dirección X se lleva a cabo el ajuste de la distancia entre las cámaras (también conocida como separación interaxial o base estereoscópica); mientras que en el eje Y se ajusta la distancia de trabajo, es decir, la distancia entre las cámaras y el objeto de medición. Asimismo, una platina goniométrica es utilizada para fijar el ángulo entre el eje óptico de la cámara y la superficie de la muestra (i.e. el ángulo estereoscópico); lo cual permite tomar imágenes de una misma área del objeto, pero desde ángulos ligeramente diferentes, conformando así los pares de imágenes estereoscópicas [169]. En la Figura 4.4 se muestra un esquema ilustrativo de estas distancias, así como del plano de visión que tendría cada cámara conforme al ángulo estereoscópico establecido.

La adquisición de las imágenes se lleva a cabo mediante una tarjeta de video NI IMAQ PCI-1428 de *National Instruments* y, a través de un VI programado en *LabVIEW*, los pares de imágenes capturados son mostrados en tiempo real y almacenados para su posterior procesamiento y análisis. Así, los pares de imágenes capturados por el módulo de visión estereoscópica, serán útiles para evaluar el comportamiento micromecánico de los materiales ensayados mediante un análisis de correlación de imágenes digitales en 3D (3D-DIC).

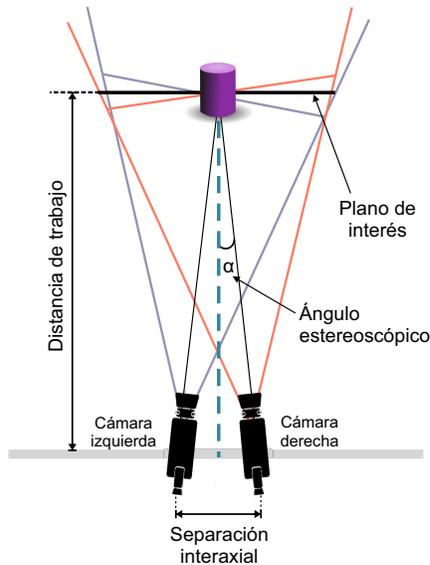


Figura 4.4 Diagrama de la posición de las cámaras y sus respectivos planos de visión.

A fin de obtener el campo de microdeformaciones que presentan los materiales ensayados, en este proyecto de investigación, la 3D-DIC se llevará a cabo utilizando el software *ARAMIS v.6.3* de Gom Optical Measurements Techniques; el cual es un software especializado de correlación de imágenes digitales capaz de registrar, analizar y estimar, mediante 2D-DIC o 3D-DIC las deformaciones materiales experimentadas por un objeto.

La 3D-DIC es una técnica óptica no intrusiva que permite medir con precisión el campo de desplazamientos de una superficie 3D, curva o plana, haciendo uso de una función de correlación cruzada entre los pares de imágenes estudiados [169, 170]. El software de 3D-DIC identifica la estructura de la superficie del objeto medido en las imágenes digitales y les asigna coordenadas a los píxeles de las imágenes a evaluar. De este modo, las imágenes se segmentan en pequeñas regiones de interés conocidas como facetas. Luego, el software de 3D-DIC combina cada imagen adquirida considerando un índice de correlación máximo entre facetas y calcula su campo de desplazamiento; lo cual se logra comparando una imagen de referencia (que representa el estado no deformado de la muestra), con las imágenes subsecuentes a diferentes etapas de deformación (Figura 4.5) [169]. Posteriormente, aplicando diferentes criterios de tracción (tales como von Mises o Tresca), las microdeformaciones principales (máxima y mínima) pueden ser fácilmente calculadas a partir del campo de desplazamiento y del tensor del gradiente de deformación. Es importante tener en cuenta que la superficie del objeto evaluado debe presentar un patrón estocástico a fin de asignar e identificar claramente las facetas en el conjunto de imágenes [171]. No obstante, la mayoría de los materiales muestran una superficie ópticamente uniforme, por lo que es necesario crear un patrón aleatorio sobre la superficie de la muestra, buscando mejorar el proceso de correlación cruzada entre las imágenes estereoscópicas.

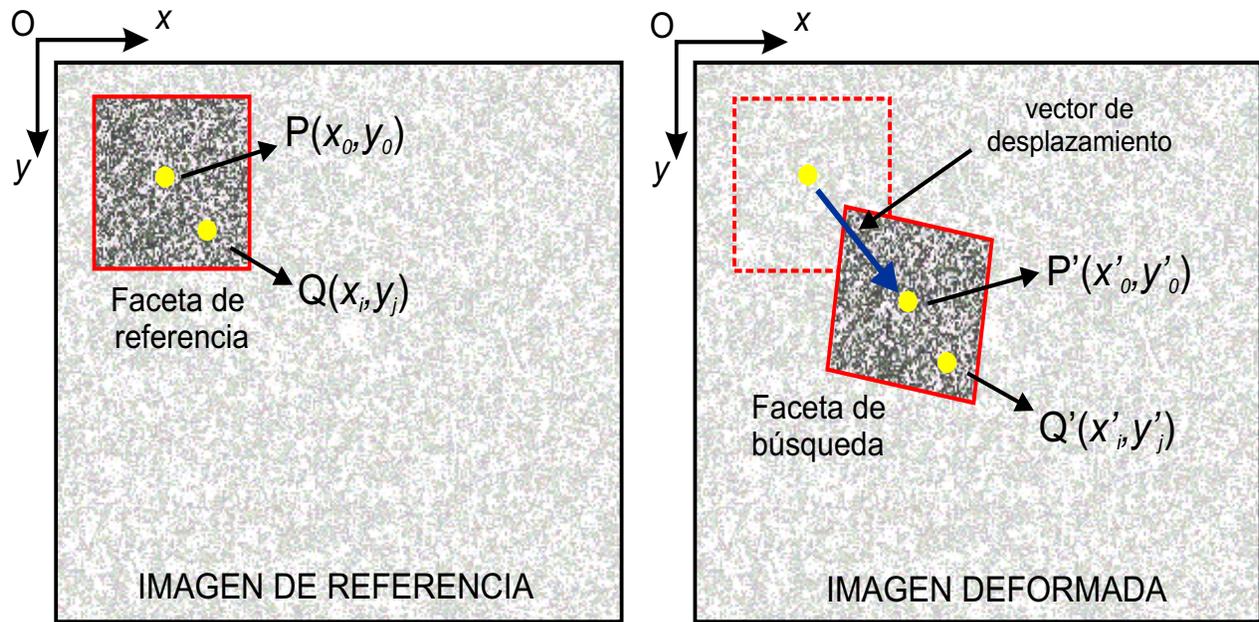


Figura 4.5 Esquema ilustrativo del método de correlación de imágenes digitales.

Con la finalidad de compensar las distorsiones de la lente y minimizar los errores durante el proceso de correlación, garantizando así la consistencia dimensional del sistema de medición, es muy importante que antes de realizar cualquier medición las cámaras CCD sean calibradas siguiendo el protocolo descrito en el manual de usuario de *ARAMIS* [171]. Así, el proceso de calibración se realiza utilizando paneles de calibración especializados, los cuales contienen un conjunto de puntos de referencia dispuestos a distancias específicas a lo largo del panel. Durante la calibración, la separación interaxial, la distancia de trabajo y el ángulo estereoscópico de las cámaras son determinados.

Con la finalidad de confirmar la consistencia dimensional de las mediciones hechas por el software de DIC tras la calibración de las cámaras, los desplazamientos registrados por el actuador mecánico se compararon con los determinados mediante 3D-DIC (Figura 4.3 C), encontrándose una incertidumbre de $\pm 0.1\%$. Este resultado demuestra la buena correspondencia entre ambos métodos de medición.

4.2.2.2 Módulo de visión lateral o 2D

El módulo de visión lateral está compuesto por una cámara CCD monocromática (1/2 en CCD) con una montura tipo C y una lente de 35 mm. Esta tercera cámara se localiza a un costado del porta-muestras (perpendicular al plano de indentación) con la finalidad de registrar el perfil de deformación de la muestra ensayada (Figura 4.2 A). La cámara se colocó a 315 mm del

objeto de medición, siendo esta una distancia de trabajo que permitía un aumento y una resolución adecuada del perfil de deformación completo de la muestra.

Al igual que el módulo de visión estereoscópica, la adquisición de imágenes durante la prueba de indentación se lleva a cabo mediante una tarjeta de video NI IMAQ PCI-1428 de *National Instruments*, lo que permite que las imágenes de los perfiles de deformación se guarden en la computadora para su posterior procesamiento y análisis. En este caso, las imágenes del perfil deformado de la membrana serán útiles para determinar, mediante una nueva metodología, el módulo elástico macromecánico (E) y la razón de deformación en el polo (λ_o) de los materiales ensayados. El desarrollo de dicha metodología será presentado a detalle en la Sección 4.4.2.

La calibración de la cámara lateral se llevó a cabo utilizando un micrómetro para análisis de imagen de Edmund Optics. En la Figura 4.3 D se muestran los resultados del proceso de calibración, así como una imagen de la barra de escala utilizada. A partir de esta calibración, fue posible determinar que $29.7 \text{ pixeles} \pm 0.7 \text{ pixeles}$ corresponden a 1 mm, lo que indica que el tamaño de píxel para las imágenes laterales es de $33.7 \text{ } \mu\text{m/pixel} \pm 0.8 \text{ } \mu\text{m/pixel}$. Este factor de escala o tamaño de píxel será necesario para determinar, a partir de las imágenes de deformación del perfil, el radio de la región de contacto (ρ_c), la deflexión central máxima (δ_o) y la función matemática que describe el perfil indentado ($f(\bar{\rho}_c)$). Dicha información, junto con los datos de fuerza, el radio del indentador (R) y el espesor de la muestra (h), permitirán estimar el módulo de elasticidad macromecánico de los materiales analizados.

4.2.3 Instrumento virtual (VI)

Como se mencionó anteriormente, todos los datos e imágenes derivados de los experimentos realizados con el dispositivo de pruebas biaxial (incluidos los datos de tiempo, desplazamiento y fuerza; así como las imágenes capturadas por los módulos de visión lateral y estereoscópica), fueron sincronizados y almacenados en una PC a través de un VI programado en *LabVIEW*. Dicho VI está compuesto por dos módulos: el primer módulo se utiliza para controlar algunos parámetros experimentales tales como la longitud de la indentación, la velocidad de indentación y la configuración de las cámaras (i.e. la ganancia, el tiempo de integración y la frecuencia de adquisición, entre otros). Por otro lado, el segundo módulo se encarga de almacenar y mostrar en tiempo real los datos experimentales (i.e. tiempo, desplazamiento y fuerza aplicada) y el conjunto de imágenes digitales registradas por los módulos de visión. En la Figura 4.6 se muestra una imagen de la interfaz gráfica de dicho VI.

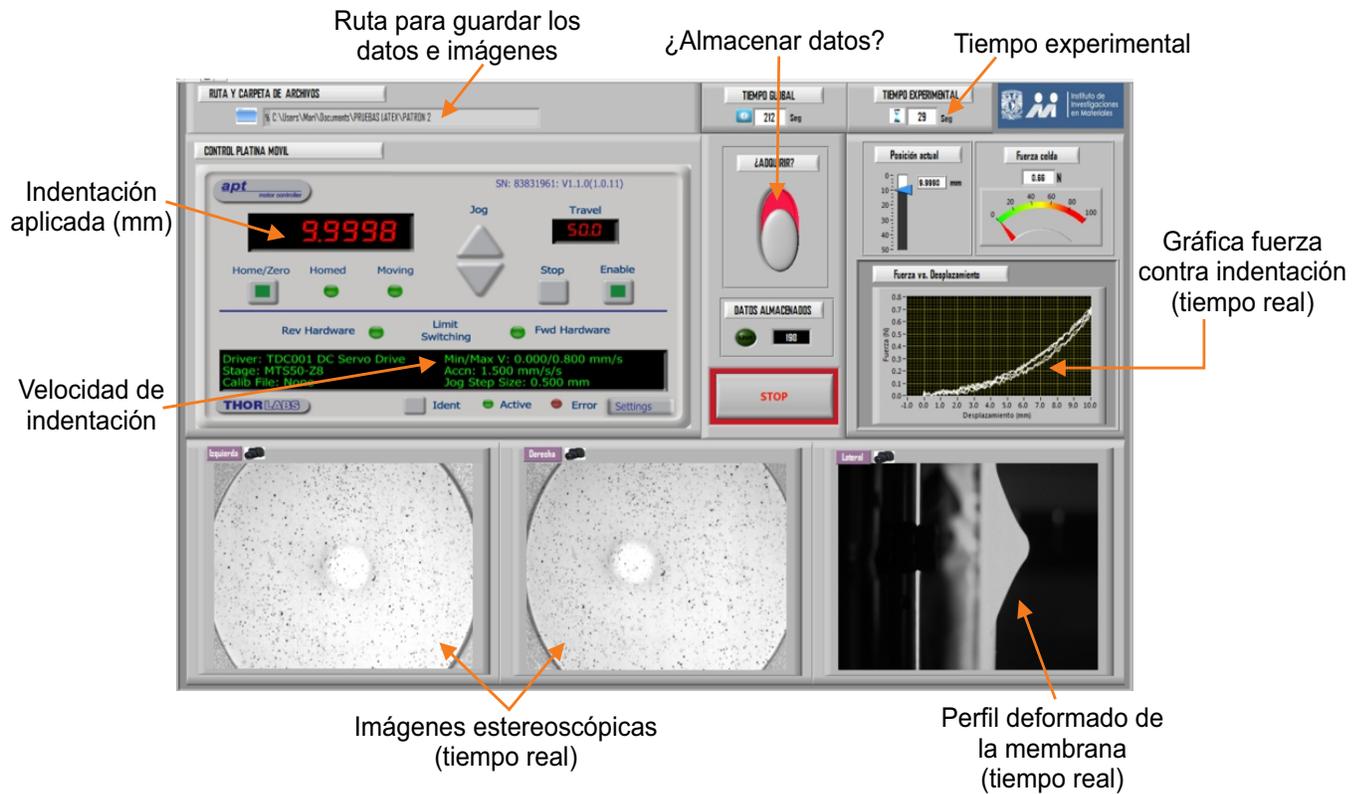


Figura 4.6 Interfaz gráfica del VI programado en LabVIEW para el control y la adquisición de datos del probador mecánico de tracción biaxial por indentación.

4.3 METODOLOGÍA PARA LA VALIDACIÓN DEL PROBADOR MECÁNICO

A fin de validar el probador mecánico fue necesario caracterizar un material cuyas propiedades mecánicas ya estuvieran ampliamente reportadas. Así, el material de referencia elegido fue el látex natural (NR, por sus siglas en inglés); por lo que resultó necesario preparar membranas de NR y, posteriormente, someterlas a pruebas de tracción uniaxial y biaxial por indentación esférica.

4.3.1 Preparación de las membranas de látex natural

Para la elaboración de las membranas se utilizó látex natural fresco (NRL) procedente de árboles *Hevea brasiliensis*. Con el fin de obtener membranas delgadas, aproximadamente 15 mL del látex líquido fueron vertidos en discos de Teflón; los cuales, posteriormente, fueron colocados sobre una superficie nivelada y se dejaron secar a temperatura ambiente durante seis días. Una

vez formadas, las membranas de NR fueron cuidadosamente separadas de los discos y su espesor fue medido a lo largo de diferentes puntos con ayuda de un micrómetro digital Mitutoyo. Así, las membranas presentaron un diámetro de 14 cm y un espesor promedio de $0.72 \text{ mm} \pm 0.04 \text{ mm}$; asimismo, mostraron una superficie uniforme, ligeramente amarillenta, libre de burbujas u orificios que pudieran modificar su comportamiento mecánico. Finalmente, las membranas de NR fueron almacenadas en un desecador hasta su caracterización mecánica.

4.3.2 Caracterización mecánica

Cabe señalar que, conocer la respuesta mecánica de materiales poliméricos, únicamente bajo esfuerzos uniaxiales, no es suficiente cuando dichos materiales se utilizan en aplicaciones cuyos entornos están sometidos a esfuerzos biaxiales. De modo que, la caracterización mecánica de las membranas de NR se llevó a cabo mediante pruebas de tracción uniaxial y biaxial.

Las pruebas de tracción uniaxial se realizaron con el fin de comparar los resultados de ambos ensayos. De manera que, el módulo de elasticidad determinado a partir de estas pruebas será considerado como un valor de referencia para validar los resultados obtenidos a partir de la indentación axisimétrica de las membranas utilizando el probador mecánico desarrollado. Asimismo, estos resultados experimentales serán comparados con los modelos mecánicos de Yang et al. [36], Begley et al. [38] y Liu et al. [37]; los cuales son considerados estándares para describir el comportamiento mecánico de membranas delgadas bajo indentación esférica.

4.3.2.1 Prueba de tracción uniaxial

Para llevar a cabo las pruebas de tracción uniaxial fueron cortadas 5 probetas de NR con ayuda de un suaje con geometría de *mancuerna* y dimensiones escaladas acordes al estándar ASTM D1708 [122]. Posteriormente, el espesor de las probetas se midió en 3 puntos diferentes, con un micrómetro digital *Mitutoyo*, a fin de obtener el espesor promedio de cada muestra. Finalmente, las probetas se montaron cuidadosamente entre las mordazas del probador de tracción uniaxial descrito en el Capítulo 2 (Sección 2.3.1.1) y se deformaron a temperatura ambiente (i.e. $23 \text{ °C} \pm 1 \text{ °C}$) a una velocidad de 0.16 mm/s.

Los datos de desplazamiento y fuerza registrados se utilizaron para obtener curvas de tracción (σ) vs. razón de elongación (λ), a partir de las cuales el módulo de corte (μ) de cada probeta fue determinado mediante el modelo de Ogden, de segundo orden, para sólidos incomprensibles (12) [125]:

$$\sigma(\lambda) = \mu_1(\lambda^{\alpha_1-1} - \lambda^{-(1+0.5\alpha_1)}) + \mu_2(\lambda^{\alpha_2-1} - \lambda^{-(1+0.5\alpha_2)}) \quad (12)$$

en dónde μ_1 , μ_2 , α_1 y α_2 son coeficientes usados para determinar el módulo de corte. Es preciso notar que, de acuerdo con la función de energía de tracción propuesta por Ogden, todos estos parámetros están relacionados con los invariantes de deformación de materiales incompresibles. De acuerdo con Ogden [125], una vez que los parámetros elásticos μ_1 , μ_2 , α_1 y α_2 , son determinados, el módulo de corte (μ) puede ser obtenido de la relación $\mu = \frac{1}{2}(\mu_1\alpha_1 + \mu_2\alpha_2)$. Finalmente, teniendo en cuenta que el NR puede considerarse como un material incompresible, el módulo elástico (E) se puede estimar como $E = 2\mu(1 + \nu)$, donde el coeficiente de Poisson, representado por ν , toma un valor de 0.5 para los elastómeros [124].

4.3.2.2 Prueba de tracción biaxial por indentación esférica

A fin de evaluar el comportamiento macro y micromecánico de las membranas de NR, las probetas que serían ensayadas bajo tracción biaxial por indentación esférica fueron cortadas con ayuda de un suaje circular de 60 mm de diámetro. Debido a que las muestras presentaban una superficie uniforme, fue necesario crear un patrón estocástico blanco/negro sobre su superficie, a fin de obtener resultados certeros y de hacer más eficiente el proceso de correlación de las imágenes digitales. Por lo tanto, una cara de las probetas fue cubierta con maquillaje artístico blanco mate y sobre ella se esparció cuidadosamente el polvo de un gis negro, creando así el patrón estocástico requerido. Posteriormente, las probetas fueron colocadas cuidadosamente entre las placas del porta-muestras y ambas se fijaron firmemente procurando que la muestra mantuviera una superficie libre de arrugas. Finalmente, las membranas fueron sometidas a una indentación de 4 mm, 6 mm y 8 mm, a una velocidad constante de 0.16 mm/s.

A fin de obtener mediciones confiables, antes de iniciar las pruebas, las cámaras fueron calibradas conforme al protocolo señalado en el manual de *ARAMIS* [171]. De modo que el ángulo estereoscópico fue de 25 °, la separación interaxial entre cámaras de 176 mm y la distancia de trabajo de 485 mm. Mientras tanto, la cámara lateral se mantuvo a una distancia de 315 mm del centro del porta-muestras a fin de obtener una imagen completa del perfil de deformación. Con todos estos parámetros fue posible tener un volumen de trabajo de hasta 100 mm x 85 mm x 100 mm, lo cual resultó suficiente para el arreglo experimental propuesto.

A lo largo de la prueba de indentación, los datos de la fuerza aplicada, la profundidad de indentación y el tiempo son registrados y almacenados junto con sus correspondientes imágenes estereoscópicas y perfiles de deformación. Como se mencionó anteriormente, las imágenes

estereoscópicas son útiles para evaluar el comportamiento micromecánico de las membranas a través de su análisis por 3D-DIC utilizando el software *ARAMIS*. Durante la 3D-DIC, se utilizó una ventana de correlación de 19 píxeles x 19 píxeles y un tamaño de paso de 4 píxeles. Además, las deformaciones principales se calcularon utilizando el criterio de von Mises del software *ARAMIS*.

Por otro lado, el comportamiento macromecánico de las membranas de NR se evaluó a partir de los datos de carga y desplazamiento central, utilizando los modelos disponibles en la literatura para tal fin, es decir, los de Yang [36], Liu [37] y Begley [38]. De manera paralela fue desarrollada una metodología alterna, útil para determinar el módulo elástico de las membranas a partir de la imagen del perfil deformado de la membrana, o bien, mediante los datos de fuerza e indentación registrado por el probador mecánico.

4.4 VALIDACIÓN DEL PROBADOR MECÁNICO PARA ENSAYOS DE TRACCIÓN BIAIXIAL Y DESARROLLO DE LA METODOLOGÍA PARA EVALUAR PROPIEDADES MECÁNICAS DE MEMBRANAS

En las siguientes subsecciones se presentarán y se compararán a detalle los resultados, experimentales y analíticos, derivados de las pruebas mecánicas realizadas.

4.4.1 Respuesta mecánica del NR bajo tracción uniaxial

Como se mencionó anteriormente, la prueba de tracción uniaxial se realizó a fin de tener un valor de referencia del módulo elástico de las membranas de NR, el cual, posteriormente será comparado con el obtenido a través de las pruebas de tracción biaxial. La Figura 4.7 muestra una curva representativa de esfuerzo (σ) como función de la razón de elongación (λ) de una de las probetas de NR ensayadas (línea continua), junto con su correspondiente curva ajustada (línea roja discontinua). En esta figura es posible observar como la respuesta mecánica no lineal, característica de los materiales elastoméricos sujetos a un sistema de esfuerzos uniaxial, es perfectamente descrito por el modelo de Ogden de segundo orden. Así, las muestras de NR mostraron un módulo de elasticidad (E) de $0.81\text{MPa} \pm 0.07\text{MPa}$, el cual se encuentra dentro del intervalo de valores previamente reportado por otros autores [172-175]. De acuerdo con estos trabajos, el E del látex natural oscila entre 0.7MPa y 1.5MPa . Es bien sabido que las propiedades mecánicas del NR varían con la temperatura y tienden a deteriorarse cuando este se expone a la luz solar, el ozono o el oxígeno [173, 176], lo cual explicaría el intervalo tan amplio reportado para su módulo elástico.

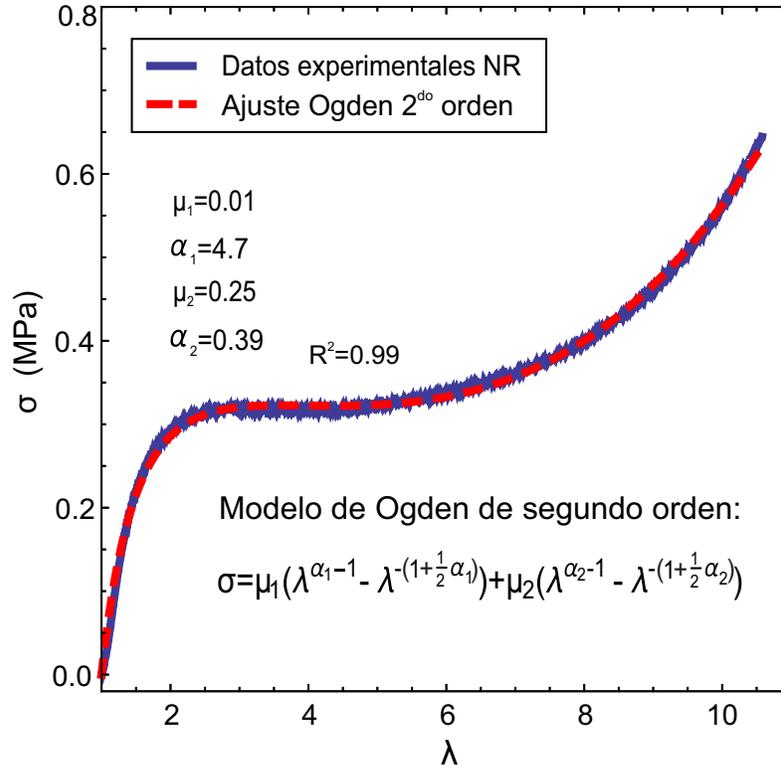


Figura 4.7 Comportamiento mecánico de las membranas de látex natural bajo un sistema uniaxial de esfuerzos.

4.4.2 Respuesta macromecánica del NR y desarrollo de las metodologías para evaluar el módulo elástico de las membranas

A continuación, se lleva a cabo el análisis de los modelos disponibles en la literatura para evaluar el comportamiento mecánico de membranas delgadas esféricamente indentadas a fin de discutir los alcances y limitaciones de cada uno de ellos. Asimismo, se desarrollan dos metodologías y una nueva expresión general para determinar el módulo elástico de las membranas a partir de los datos capturados con el probador mecánico para ensayos de tracción biaxial (i.e. imagen del perfil de deformación y/o datos de fuerza y desplazamiento).

4.4.2.1 Metodología para estimar el módulo elástico mediante el archivo de datos

Con el fin de resolver el problema de la membrana circular indentada axisimétricamente mediante un indentador esférico, Yang y Hsu [36] dividieron la membrana deformada en dos regiones: la región en contacto con el indentador, denominada región de contacto, y la región libre de una carga externa, llamada región de no contacto. En la Figura 4.8 se muestra un esquema descriptivo de la deformación que experimenta una membrana delgada al ser

esféricamente indentada; en dicho diagrama se señalan las regiones de contacto y de no contacto consideradas por Yang y Hsu, y se señalan una serie de variables que serán de suma utilidad para entender los modelos mecánicos estudiados de aquí en adelante.

Dado que las membranas elastoméricas se consideran elásticas, isotrópicas e incompresibles, la función de energía de deformación de Mooney-Rivlin es frecuentemente utilizada para modelar su comportamiento [126, 177]. Así, tomando como base dicha función de energía, Yang y Hsu desarrollaron y proporcionaron las soluciones numéricas de tres ecuaciones diferenciales ordinarias no lineales de primer orden, las cuales rigen el comportamiento de deformación de la membrana cuando se le aplica una carga en dirección transversal [36].

En su enfoque, Yang y Hsu solo consideran la tracción por estiramiento, mientras que la tracción por flexión es ignorada. Dichas soluciones numéricas fueron adoptadas por Liu y Ju para obtener un modelo matemático a través del cual se pudiera determinar el módulo elástico de membranas delgadas [37]. En el modelo de Liu (ecuación (13)), w representa la carga aplicada, h es el espesor de la membrana, δ es el desplazamiento central y R es el radio del indentador.

$$0.78 \left(\frac{\delta}{R}\right) + 0.075 \left(\frac{\delta}{R}\right)^2 = \frac{6w}{EhR} \quad (13)$$

Así, el módulo elástico de la membrana puede ser fácilmente determinado reorganizando la expresión (13) una vez que w , h y R son conocidos.

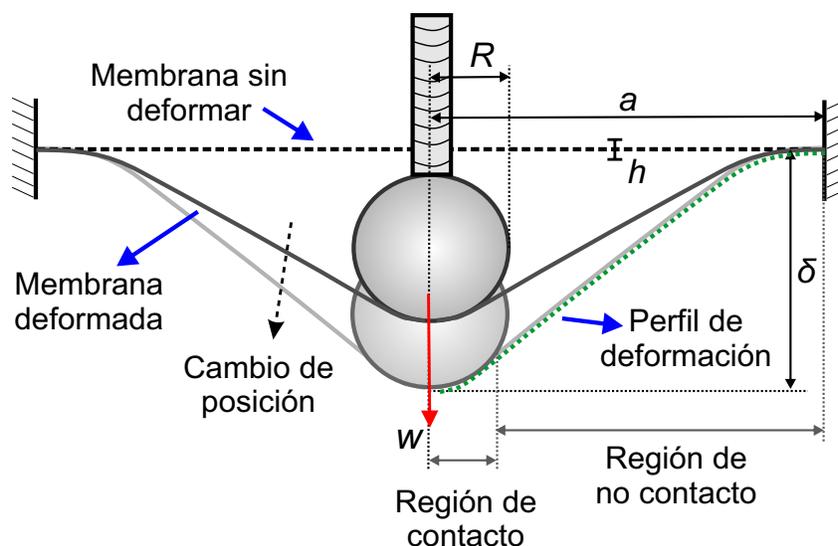


Figura 4.8 Esquema descriptivo de la deformación de la membrana bajo tracción biaxial. En el esquema R se refiere al radio del indentador, a es el radio de la región de prueba, h es el espesor de la membrana, w la carga aplicada y δ hace referencia al desplazamiento/deflexión/indentación de la membrana.

De este modo, aplicando el modelo de Liu a los datos adquiridos durante las pruebas de indentación de las membranas de NR, los módulos elásticos estimados fueron $0.16 \text{ MPa} \pm 0.01 \text{ MPa}$, $0.34 \text{ MPa} \pm 0.01 \text{ MPa}$ y $0.55 \text{ MPa} \pm 0.02 \text{ MPa}$ para desplazamientos centrales δ de 4 mm, 6 mm y 8 mm, respectivamente; los cuales a su vez corresponden a valores $\frac{\delta}{R}$ de 0.8, 1.2 y 1.6, respectivamente.

De acuerdo con los trabajos de Liu [37, 39, 178, 179], su modelo fue desarrollado para un arreglo experimental en donde se cumpliera que $\frac{a}{R} \approx 5$ y la razón $\frac{\delta}{R}$ oscilara entre 0 y 1.7. Cabe señalar que, en nuestros experimentos, ambas condiciones fueron satisfechas; no obstante, el valor estimado de E fue significativamente diferente para cada $\frac{\delta}{R}$ ensayado, lo que indica que el modelo de Liu no es lo suficientemente exacto para determinar el módulo elástico de materiales elastoméricos en el intervalo especificado. Esto debido a que un modelo consistente debería de predecir módulos similares a lo largo de todo su intervalo de trabajo.

Asimismo, el modelo de Liu asume que el esfuerzo de tracción dominará la deformación de la membrana sobre la flexión, de modo que la muestra exhibirá un comportamiento de membrana no lineal. Sin embargo, tales suposiciones no pueden ser aseguradas para todo el intervalo $\frac{\delta}{R}$ sugerido por los autores (i.e. $0 \leq \frac{\delta}{R} \leq 1.7$) [37, 39, 178, 179]. Con el objetivo de determinar si los efectos de flexión de la muestra pueden ser despreciados, es importante tomar en consideración un conjunto de criterios particulares. Así, a fin de limitar el esfuerzo de indentación y evitar una deformación altamente localizada, el radio del indentador debe de ser del tamaño de una fracción representativa de la región de prueba, por lo que $\frac{a}{R} \approx 5$ [36]; además, la razón $\frac{a}{h}$ debe de ser mayor a 6 para considerar a la muestra como una membrana delgada cuyo comportamiento de deformación a grandes deflexiones estará dominado por el esfuerzo de tracción [180]; y, finalmente, para garantizar la imposición de una deformación en la que el efecto de flexión pueda ser considerado insignificante, la δ aplicada debe de ser, al menos, 10 veces el valor de h [181]. Bajo nuestras condiciones experimentales, los primeros dos criterios siempre se cumplieron; no obstante, el tercer criterio solo se cumplió cuando $\delta = 8 \text{ mm}$.

Además, de acuerdo con lo propuesto y definido por Begley y Mackin [38], la suposición de que el estado de tracción domina sobre la flexión, debe de ser validada utilizando un parámetro adimensional denominado λ_s :

$$\lambda_s = [12(1 - \nu^2)]^{\frac{3}{2}} \left(\frac{wa^2}{Eh^4} \right) \quad (14)$$

donde ν es el coeficiente de Poisson y, como ya se ha planteado anteriormente, usualmente toma un valor de 0.5 para materiales elastoméricos [124], a es el radio de la región de prueba, w es la carga aplicada, h corresponde al espesor de la membrana y E representa el módulo elástico esperado para la muestra.

Según Begley y Mackin [38, 168], para una membrana sujeta a *free-standing*, un comportamiento de placa o de flexión dominará cuando $\lambda_s < 85$; la tracción dominará si λ_s es mayor que 3×10^4 y una transición gradual de flexión-tracción (i.e. comportamiento de placa-membrana no lineal) se presentará en el intervalo intermedio, $85 < \lambda_s < 3 \times 10^4$. De esta manera, λ_s puede ser utilizado para determinar si la flexión podría ser, o no, razonablemente despreciada. Así, los valores de λ_s para nuestras membranas de NR (considerando el módulo elástico uniaxial obtenido previamente como la E esperada), fueron 5.13×10^3 , 1.81×10^4 y 4.36×10^4 para $\delta = 4$ mm, 6 mm y 8 mm, respectivamente. Estos resultados confirman que solo bajo desplazamientos centrales de $\delta = 8$ mm las membranas de NR presentarán un comportamiento de membrana no lineal. Por lo tanto, en nuestro caso, el modelo de Liu únicamente es válido para estimar el módulo elástico de las membranas de NR cuando se aplican desplazamientos centrales de $\delta = 8$ mm. No obstante, el módulo de elasticidad calculado para dicha δ fue aproximadamente 33% más bajo que el estimado por la prueba de tracción uniaxial, es decir, $0.55 \text{ MPa} \pm 0.02 \text{ MPa}$ frente a $0.81 \text{ MPa} \pm 0.07 \text{ MPa}$, respectivamente. Por otro lado, para evaluar E a $\delta = 6$ mm y 4 mm, es necesario utilizar un modelo capaz de describir correctamente la transición de comportamiento de tipo placa (i.e. flexión pura) a un comportamiento de membrana no lineal (i.e. tracción pura).

El estudio de Begley y Mackin [38] también considera la indentación de una membrana circular en el contexto de la teoría de grandes deformaciones. En este sentido, ellos adoptaron la descripción de un material de tipo neo-Hookean¹² para desarrollar soluciones aproximadas que resolvieran el problema de una membrana deformada axisimétricamente, considerando un tamaño de contacto finito entre esta y el indentador. Para ello, al igual que Yang y Hsu [36], Begley y Mackin también dividieron la membrana deformada en dos regiones y obtuvieron dos expresiones que describen su comportamiento de deflexión: una para la región de contacto y otra para la región de no contacto. Para el análisis de la región de contacto, asumieron que las razones de tracción son aproximadamente iguales; mientras que, para describir la respuesta de la región de no contacto, asumieron que las deformaciones circunferenciales son despreciables en relación con las deformaciones radiales que se producen [38]. Además, supusieron que la rigidez de flexión de la membrana es despreciable en comparación con la rigidez de tracción.

¹² Este tipo de materiales presentan un comportamiento elástico no lineal a grandes deformaciones y un comportamiento lineal a pequeñas deformaciones.

Según las soluciones aproximadas de forma cerrada obtenidas por Begley y Mackin [33, 38], la deflexión de la membrana en función de la carga aplicada está dada por:

$$\frac{\delta}{R} = \left(\frac{a}{R}\right)^{\frac{3}{4}} \left(\frac{16 w}{9 \pi E h R}\right)^{\frac{1}{3}} \quad (15)$$

Este modelo es válido para membranas con un coeficiente de Poisson $\nu = 0.5$, que no presenten predeformación ($\epsilon_0 = 0$) y que tengan un contacto libre de fricción con el indentador esférico [38]. Dado que el modelo aproximado de carga-deflexión desarrollado por Begley y Mackin considera que la presión de contacto se distribuye sobre un radio finito (ecuación (15)), este presenta una dependencia tanto de la región de prueba, a , como del radio del indentador, R . Asimismo, exhibe una relación constitutiva no lineal, $w \propto \delta^3$, similar a la de los modelos de carga puntual que desprecian el tamaño de la región de contacto (i.e. las soluciones clásicas de tipo Schwerin) [33, 168].

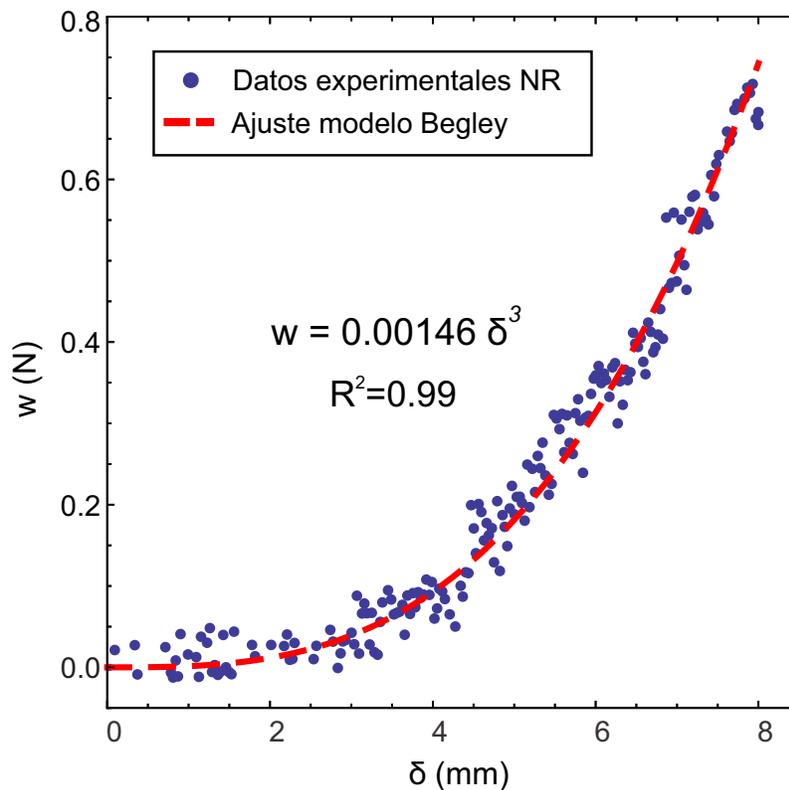


Figura 4.9 Comportamiento mecánico de las membranas de látex natural bajo un sistema biaxial de esfuerzos impuesto mediante indentación esférica. Los datos experimentales (puntos) fueron ajustados conforme al modelo reportado por Begley-Mackin (línea discontinua).

Para determinar si la solución aproximada carga-deflexión proporcionada por Begley y Mackin es lo suficientemente precisa para extraer las propiedades mecánicas de membranas sujetas a pruebas de indentación esférica, se llevó a cabo una comparación entre su solución analítica y nuestros datos experimentales. La Figura 4.9 muestra la curva experimental carga-deflexión (w vs. δ) de una de las membranas de NR indentada a $\delta = 8$ mm utilizando el probador mecánico biaxial desarrollado. En esta gráfica es posible observar como la carga requerida para deflectar la membrana de NR aumenta a medida que el desplazamiento central es mayor, hasta alcanzar un valor máximo a la indentación máxima aplicada. Además, los datos experimentales (Figura 4.9, puntos) siguen el comportamiento de la ley de potencia cúbica, típica de membranas no lineales en las que domina la tracción. La línea discontinua en esta figura corresponde a la solución analítica del modelo aproximado carga-deflexión de Begley-Mackin, el cual, como puede apreciarse, coincide de forma adecuada con los datos experimentales a lo largo de todo el intervalo de δ . De modo que, el modelo de carga-deflexión de Begley-Mackin es capaz de describir de manera eficiente el comportamiento de una membrana sometida a una indentación axisimétrica.

Dado que, en nuestro arreglo experimental, R , a , h , ν , w y δ son parámetros conocidos, el módulo elástico de las membranas de NR puede ser fácilmente calculando al despejar E de la ecuación (15) y evaluar la expresión resultante en el desplazamiento central requerido. Así, los módulos elásticos experimentales de las membranas de NR fueron de $0.84 \text{ MPa} \pm 0.05 \text{ MPa}$, $0.86 \text{ MPa} \pm 0.01 \text{ MPa}$ y $0.81 \text{ MPa} \pm 0.01 \text{ MPa}$ para desplazamientos centrales δ de 4 mm, 6 mm y 8 mm, respectivamente. Estos resultados demuestran que el modelo aproximado de carga-deflexión desarrollado por Begley-Mackin permite calcular de manera óptima un E congruente y consistente, independientemente del desplazamiento central aplicado; mientras que el modelo de Liu no lo hace. Asimismo, los módulos elásticos obtenidos concuerdan de buena manera con el módulo elástico estimado por la prueba tradicional de tracción uniaxial (i.e. $E = 0.81 \text{ MPa} \pm 0.07 \text{ MPa}$).

Así, los resultados experimentales mostraron que, el modelo de Begley-Mackin es confiable y puede ser utilizado para estimar el módulo de elasticidad de membranas indentadas con resultados razonablemente adecuados, incluso entre los límites de flexión y tracción. No obstante, la solución aproximada de Begley-Mackin determina el módulo elástico de las membranas de una manera particular. Es decir, en lugar de considerar todo el conjunto de datos carga/deflexión central que se genera a lo largo de la prueba de indentación, la solución de Begley-Mackin únicamente toma los datos experimentales de una deflexión central específica (δ), la cual generalmente es la deflexión central máxima, y junto con su correspondiente valor de carga (w)

el módulo elástico de las membranas puede ser fácilmente estimado al sustituir este par de datos en la expresión (15).

Como se mencionó anteriormente, uno de los objetivos principales del presente trabajo de investigación consistió en desarrollar un probador mecánico que fuese de utilidad para caracterizar, macro y micromecánicamente, hidrogeles, membranas elastoméricas delgadas y tejidos blandos. Asimismo, se buscó generar un modelo analítico efectivo y apropiado, así como una metodología sencilla, que permitiera evaluar el comportamiento mecánico de membranas bajo tensiones biaxiales. Los modelos de Yang-Hsu [36], de Liu [37] y de Begley-Mackin [38], presentados anteriormente, hasta ahora han sido ampliamente utilizados como estándares para la extracción de propiedades mecánicas de membranas sometidas a indentación. Sin embargo, como se ha demostrado, estos modelos no son siempre válidos y confiables en el intervalo de deformaciones que especifican; por lo que, se deben de tener presentes ciertas consideraciones antes de usarlos.

Al combinar la solución carga-deflexión desarrollada por Begley-Mackin [33, 38] con las soluciones numéricas para membranas elásticas no lineales obtenidas por Yang-Hsu [36, 182], fue posible deducir una nueva expresión analítica capaz de describir la deflexión de membranas elastoméricas y de estimar su módulo elástico de manera eficiente. De acuerdo con Yang y Hsu [36], las soluciones numéricas de sus ecuaciones brindan una relación entre la carga que se le aplica a la membrana y su deformación correspondiente; de manera que dicha relación puede ser expresada en términos de una carga adimensional, $\frac{w}{C_1 h R}$, y de una deformación normalizada, $\frac{\delta}{R}$, por lo que:

$$y(\delta/R) = \frac{w}{C_1 h R} \tag{16}$$

en donde C_1 es una constante material que toma un valor de $\frac{1}{6}E$ para materiales elastomérico [172], y y es una función de $\frac{\delta}{R}$ que describe la deflexión de la membrana. A fin de encontrar la función $y(\delta/R)$ que relaciona la carga y la deflexión aplicadas a la membrana, los módulos elásticos obtenidos mediante la solución aproximada de Begley-Mackin, fueron utilizados para obtener una gráfica δ vs. $\frac{w}{C_1 h R}$, similar a la presentada por Yang y Hsu [36]. Cabe señalar que Yang y Hsu únicamente presentan soluciones numéricas para arreglos experimentales en donde $\frac{a}{R} = 5$.

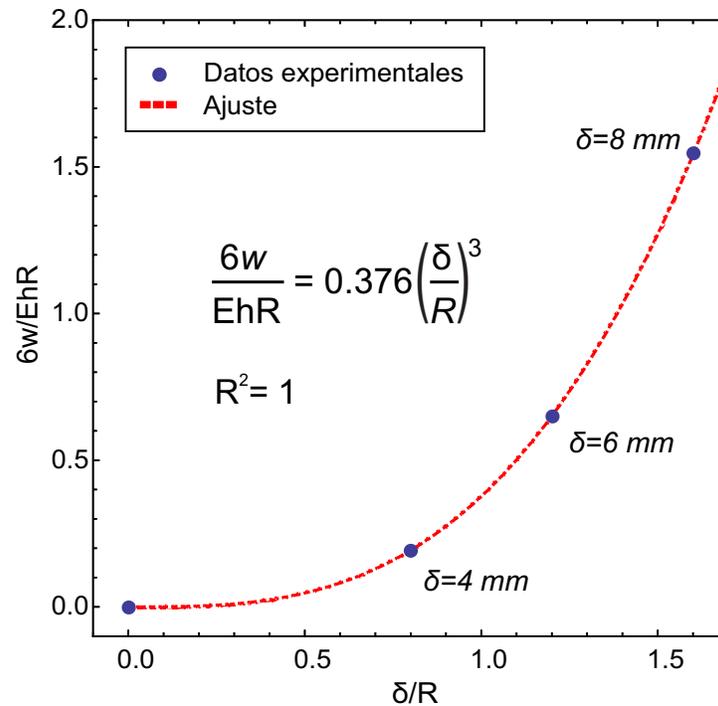


Figura 4.10 Curva carga vs. deflexión para las membranas de NR de la forma presentada por Yang y Hsu [36]. Los E obtenidos mediante el modelo de Begley fueron utilizados para graficar los datos.

En la Figura 4.10 se muestra la curva carga vs. deflexión obtenida para las membranas de NR a $\delta = 4$ mm, 6 mm y 8 mm; asimismo, la función $y(\delta/R)$ estimada a través del ajuste de los datos mediante el método de los cuadrados mínimos es presentada, i.e. $y(\delta/R) = 0.376 \left(\frac{\delta}{R}\right)^3$. En esta figura es posible apreciar la buena concordancia entre los datos experimentales y la función $y(\delta/R)$ obtenida, de modo que esta última será útil para describir adecuadamente el comportamiento mecánico de las membranas de NR. Es importante mencionar que, para validar esta nueva expresión, un análisis similar fue llevado a cabo utilizando otros materiales elastoméricos (i.e. PDMS, nitrilo, hidrogeles de PVA e hidrogeles de CS/PVA/GEN), obteniéndose siempre el mismo valor para el coeficiente del término cúbico; es decir, 0.367. Por lo tanto, el valor de dicho coeficiente no depende del material, la carga aplicada, el desplazamiento central o el espesor de la membrana; sino que únicamente depende del arreglo experimental, específicamente de la relación $\frac{a}{R}$.

De esta forma, para un arreglo experimental con una razón $\frac{a}{R}$ de 4.41 y una predeformación de la membrana igual a cero ($\epsilon_o = 0$), la carga w puede ser expresada como función de δ mediante la sustitución de la función $y(\delta/R)$, obtenida previamente, en la ecuación (16); así:

$$0.376 \left(\frac{\delta}{R}\right)^3 = \frac{6w}{EhR} \quad (17)$$

Es importante resaltar que, en la ecuación (17), la carga es proporcional al cubo del desplazamiento aplicado (i.e. $w \propto \delta^3$), manteniendo así la relación constitutiva no lineal característica del comportamiento de membrana.

Una vez que la expresión que relaciona el desplazamiento central de la membrana con la carga aplicada (Figura 4.10) fue determinada, el módulo elástico (E) puede ser fácilmente calculado de la siguiente forma: primero, los datos experimentales de carga y desplazamiento adquiridos a lo largo de la prueba de indentación deben ser graficados de la forma $6w$ vs. $0.376 \left(\frac{\delta}{R}\right)^3 hR$, a fin de obtener un comportamiento lineal similar al mostrado en la Figura 4.11. Posteriormente, se debe de aplicar un ajuste lineal a la curva obtenida a fin de determinar la función que describe los datos experimentales. Es importante notar que el análisis dimensional de la expresión obtenida tras el ajuste lineal de los datos, posee unidades de MPa (i.e. N/mm^2); de manera que, el módulo elástico (E) de las membranas indentadas esféricamente estará determinado por la pendiente de los datos graficados en la forma $6w$ vs. $0.376 \left(\frac{\delta}{R}\right)^3 hR$. Así, mediante esta nueva expresión, la metodología para estimar E se torna sencilla y familiar para los usuarios, ya que se asemeja a aquella utilizada para determinar el módulo elástico de materiales con un comportamiento elástico lineal (i.e. ley de Hooke).

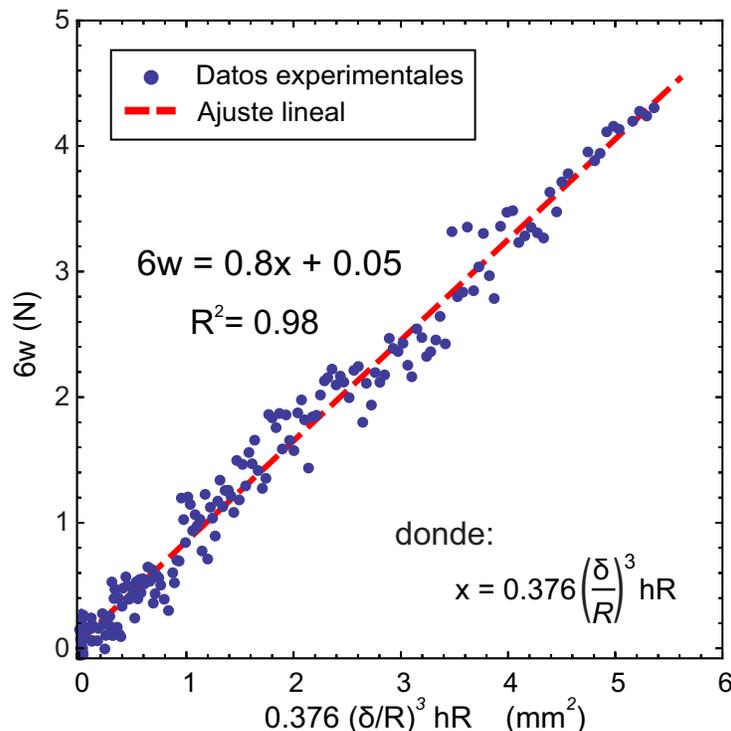


Figura 4.11 Gráfica fuerza aplicada vs. desplazamiento obtenida mediante la nueva metodología. La pendiente del ajuste lineal de los datos corresponde al módulo elástico; el cual en el caso de membranas de NR es de 0.8 MPa.

La Figura 4.11 muestra los datos experimentales de una membrana de NR indentada a $\delta = 8$ mm. En esta gráfica el conjunto de datos (Figura 4.11, puntos azules) fue graficado conforme a la metodología previamente descrita, de manera que la curva obtenida muestra una tendencia claramente lineal y el ajuste aplicado (Figura 4.11, línea roja discontinua) describe perfectamente su comportamiento. Así, el módulo elástico de la membrana fue de 0.8 MPa, tal como se muestra en la Figura 4.11.

Siguiendo esta nueva metodología, los módulos elásticos promedio para las membranas de NR indentadas a $\delta = 4$ mm, 6 mm y 8 mm fueron de $0.73 \text{ MPa} \pm 0.07 \text{ MPa}$, $0.85 \text{ MPa} \pm 0.02 \text{ MPa}$ y $0.79 \text{ MPa} \pm 0.05 \text{ MPa}$, respectivamente. Estos resultados mostraron una diferencia menor al 8% entre ellos (i.e. $\pm 0.06 \text{ MPa}$), de modo que los módulos elásticos estimados por este método son consistentes, independientemente del desplazamiento central aplicado. Además, los módulos elásticos obtenidos a través de este método son comparables con el E determinado mediante tracción uniaxial (i.e. $0.81 \text{ MPa} \pm 0.07 \text{ MPa}$). Por lo tanto, esta nueva metodología puede ser utilizada para estimar el E de membranas elastoméricas delgadas sometidas a tensiones biaxiales a través de una indentación esférica axisimétrica. Cabe resaltar que, este análisis considera todos los datos experimentales registrados a lo largo del ensayo de indentación y no únicamente un par de ellos, haciendo que el resultado obtenido sea más representativo y confiable.

Es importante tener presente que, la expresión (17) únicamente es válida para arreglos experimentales con una razón de 4.41 entre a y R . No obstante, es posible derivar un modelo general igualando las soluciones numéricas de Yang y Hsu con la solución aproximada de Begley y Mackin. De esta manera, resolviendo la ecuación (15) para E y sustituyendo el resultado en (16), es posible obtener una función general $y(\delta/R)$ que describa la deflexión de la membrana, independientemente de la indentación aplicada:

$$y(\delta/R) = \frac{27\pi}{8} \left(\frac{R}{a}\right)^{\frac{9}{4}} \left(\frac{\delta}{R}\right)^3 \quad (18)$$

La cual a su vez puede ser expresado como función de la carga, generando así una expresión general carga-deflexión, apropiada para cualquier arreglo experimental (ecuación (19)).

$$\frac{27\pi}{8} \left(\frac{a}{R}\right)^{\frac{9}{4}} \left(\frac{\delta}{R}\right)^3 = \frac{6w}{EhR} \quad (19)$$

Esta expresión general permite determinar el módulo elástico (E) de las membranas como la pendiente de la sección lineal de la curva de carga-deflexión, $6w$ vs. $\frac{27\pi}{8} \left(\frac{\delta}{R}\right)^3 hR$, para cualquier razón $\frac{a}{R}$. Cabe mencionar que, la ecuación (19) es válida para membranas no predeformadas (i.e. $\epsilon_0 = 0$) con un coeficiente de Poisson de 0.5, las cuales pueden ser ensayadas a diferentes desplazamientos centrales, utilizando diversos tamaños de indentador y regiones de prueba, siempre y cuando se cumpla que: $5 \leq \frac{\delta}{h} \leq 12$ y $0.8 \leq \frac{\delta}{R} \leq 2$.

A fin de conferirle confiabilidad a esta expresión general, otros materiales elastoméricos fueron ensayados (i.e. neopreno, nitrilo, PDMS e hidrogeles de PVA) y los valores estimados de E coincidieron con los módulos elásticos reportados por pruebas tradicionales de tracción uniaxial, mostrando una desviación menor al 10% en la mayoría de los casos. Por consiguiente, fue posible obtener una metodología y una expresión analítica útil que permite implementar el método de los cuadrados mínimos para determinar, de una forma fácil y certera, el E de materiales elastoméricos que presenten un comportamiento mecánico de membrana no lineal o entre placa y membrana no lineal (i.e. que se encuentren en la región de transición). Así, conociendo el espesor de la membrana (h), el radio del indentador (R), el radio del porta-muestras (a), las cargas aplicadas (w) y sus correspondientes valores de desplazamiento central (δ), la curva carga vs. deflexión puede ser generada y el E de la membrana podrá ser fácilmente estimado.

4.4.2.2 Metodología para estimar el módulo elástico a través de la imagen lateral

Un aspecto importante del dispositivo experimental desarrollado es que involucra un registro fotográfico, desde diferentes perspectivas, de la deformación que experimenta la membrana a lo largo del ensayo de indentación. De manera que, a través de un sencillo método gráfico, los perfiles de deformación de la membrana registrados por el módulo de visión 2D pueden ser utilizados para determinar parámetros mecánicos importantes.

Algunas aproximaciones al método descrito en el presente trabajo de investigación han sido reportadas previamente por Liu et al. [37, 178, 179], quienes colocaron esferas de diferentes pesos sobre una membrana circular en *free-standing* y, a través de métodos ópticos, determinaban el desplazamiento central que cada una de ellas generaba después de cierto tiempo. En este sentido, al incorporar mediciones instrumentadas de carga/desplazamiento, así como cámaras CCD que registran el perfil deformado de la membrana en secuencias de imágenes, nuestra investigación amplía significativamente el alcance de dichos estudios previos. Así, a partir de las imágenes capturadas por el módulo de visión 2D es posible determinar tres

parámetros experimentales relevantes, a saber: el radio de la región de contacto entre el indentador esférico y la membrana (ρ_c), la función matemática específica que describe el perfil deformado de la membrana indentada $f(\bar{\rho})$, y la deflexión central máxima (δ_o) (Figura 4.8). De manera que, a partir de estos parámetros, será posible calcular tanto E , como la razón de deformación de las membranas en la región de contacto (λ_o) sin la necesidad de un sensor eléctrico especializado para conocer el desplazamiento central.

El primer parámetro que debe ser determinado es ρ_c , ya que a partir de él se podrá calcular λ_o y la función que describe el perfil deformado de las membranas, $f(\bar{\rho})$. Por lo tanto, para determinar la longitud de ρ_c es necesario superponer una circunferencia, con las mismas dimensiones que el indentador, sobre la imagen del perfil deformado a analizar. Posteriormente, la distancia radial (ρ) del eje de simetría al límite de la superficie de contacto entre el indentador esférico y la membrana deberá ser determinada utilizando algún software de procesamiento de imágenes. Es importante tener presente que, la medición debe realizarse considerando el factor de escala obtenido durante la calibración de la cámara lateral, el cual en nuestro caso tiene un valor de $33.7 \mu\text{m}/\text{pixel} \pm 0.8 \mu\text{m}/\text{pixel}$, como se mencionó en secciones anteriores. En la Figura 4.12 se muestra la imagen del perfil deformado de una membrana de NR, registrado por la cámara lateral que conforma el módulo de visión 2D. A través de esta imagen es posible apreciar cómo la superficie de la membrana de NR se deforma axisimétricamente debido a la acción del indentador esférico y cómo el radio de la región de contacto, ρ_c , puede determinarse fácilmente usando la metodología descrita.

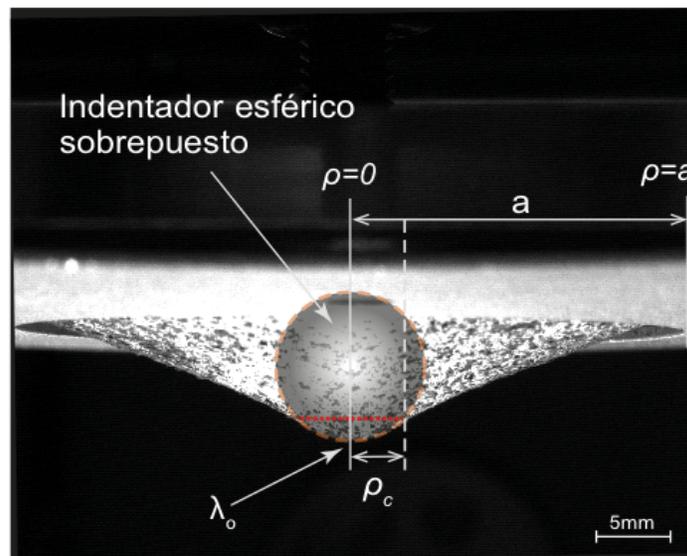


Figura 4.12 Imagen del perfil deformado de la membrana la NR capturado por el módulo de visión de 2D. En la imagen se señalan los parámetros necesarios para determinar ρ_c a través del método óptico.

Así, siguiendo este enfoque, nuestras membranas de NR presentaron valores de ρ_c de 1.84 mm, 2.45 mm y 3.07 mm para δ de 4 mm, 6 mm y 8 mm, respectivamente. En términos de facilidad, eficiencia y precisión, este método gráfico presenta grandes ventajas sobre las expresiones analíticas desarrolladas por otros autores [36, 38], ya que no es necesario conocer previamente la predeformación de la membrana (ϵ_o), la razón de deformación en la región de contacto (λ_o) o el módulo elástico del material, para poder determinar ρ_c . Además, este método gráfico proporciona un valor real de ρ_c y no solo un valor aproximado.

Para deducir la función $f(\bar{\rho})$ que describe el perfil deformado de la membrana es necesario llevar a cabo otro análisis utilizando, nuevamente, las imágenes del perfil deformado. Dicho análisis consiste en seleccionar un conjunto de pixeles a lo largo del borde deformado de la membrana para, posteriormente, mediante el uso del factor de escala determinado durante la calibración de la cámara lateral, transformar sus coordenadas de pixel (x, y) en puntos con coordenadas (ρ, δ), y así poder obtener una curva experimental del perfil indentado de la forma: $\frac{\delta}{R}$ vs. $\frac{\rho}{R}$. En donde, ρ representa la distancia radial de un punto sobre el borde de la membrana deformada al eje de simetría, $\rho(0 \rightarrow a)$; δ es el desplazamiento transversal del mismo punto desde el estado de membrana no deformado al estado indentado analizado; y R es el ya conocido radio del indentador esférico (Figura 4.12).

En su estudio, Yang y Hsu [36] asumen que la curva del perfil deformado de la membrana podría expresarse matemáticamente como la suma algebraica de dos funciones particulares, las cuales describen las regiones de contacto y no contacto. De acuerdo con sus simulaciones numéricas, la región de contacto, i.e. $\bar{\rho}(0 \rightarrow \bar{\rho}_c)$, es descrita adecuadamente por una función cuadrática $f_c(\bar{\rho})$; mientras que, la región libre o sin contacto, i.e. $\bar{\rho}(\bar{\rho}_c \rightarrow \bar{a})$, es definida por una función cúbica $f_f(\bar{\rho})$ tal que $f(\bar{\rho}) = f_c(\bar{\rho}) + f_f(\bar{\rho})$, de donde $\bar{\rho}$, $\bar{\rho}_c$ y \bar{a} se refieren a ρ , ρ_c y a normalizado por R , respectivamente. Por lo tanto, al aplicar un ajuste por cuadrados mínimos a los datos experimentales de cada región, tomando en consideración el grado de las funciones algebraicas propuestas por Yang y Hsu, es posible determinar la función matemática $f(\bar{\rho})$ que gobierna el perfil deformado de la membrana indentada.

La Figura 4.13 A muestra la curva experimental del perfil deformado de la membrana a lo largo del eje de simetría (puntos); el cual corresponde a la membrana de NR mostrada en el recuadro interno. En esta misma gráfica también se presenta el ajuste por cuadrados mínimos de las regiones de contacto y de no contacto (líneas discontinuas rojas) de la forma inferida por Yang y Hsu, así como sus funciones ajustadas resultantes; de modo que, la curva del perfil de deformación experimental es completamente descrita por $\frac{\delta}{R} = f_c(\bar{\rho})\frac{\bar{\rho}_c}{R} + f_f(\bar{\rho})\frac{\bar{a}}{R}$. Como se puede

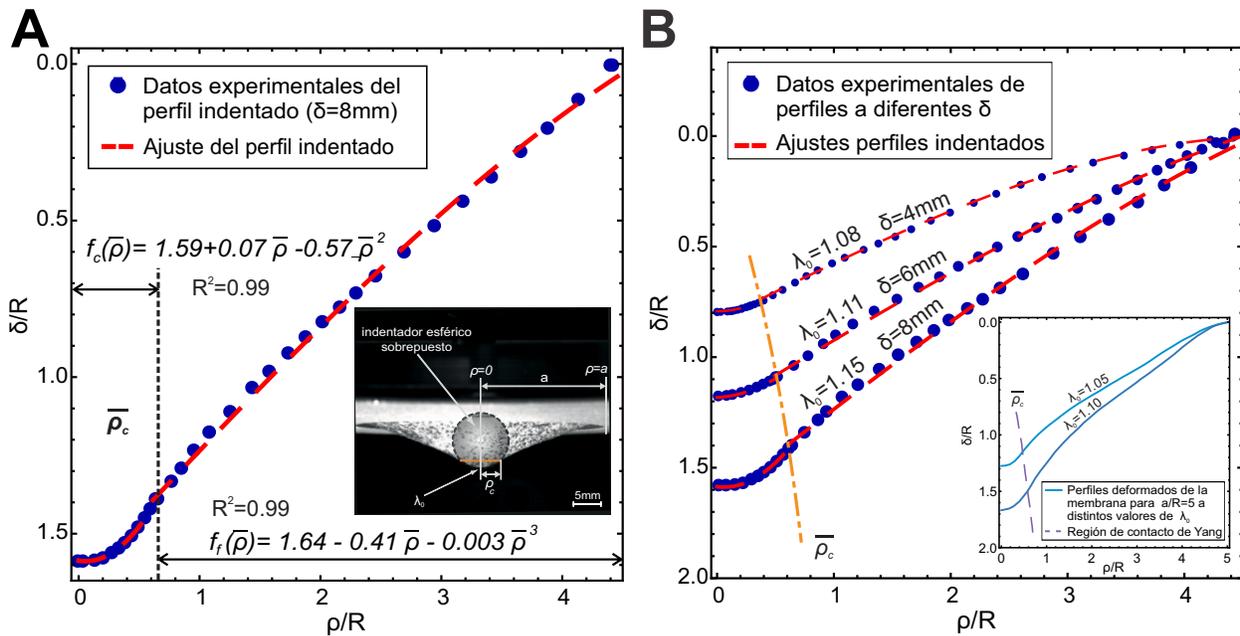


Figura 4.13 Curva de la mitad del perfil deformado de la membrana de NR. A) Curva experimental del perfil indentado con los modelos matemáticos que describen la región de contacto y no contacto a $\delta = 8\text{ mm}$; el recuadro en la gráfica muestra la imagen capturada por el módulo de visión 2D correspondiente a dicha curva. B) Comparación de diferentes perfiles teórico y experimentales a diferentes indentaciones; en el recuadro de la gráfica se muestran las simulaciones numéricas reportadas por Yang y Hsu.

observar, las funciones obtenidas coinciden perfectamente con el perfil deformado experimental; sin embargo, es importante notar que en la región de contacto son necesarios una mayor cantidad de puntos experimentales a fin de obtener un ajuste más adecuado que propicie una transición suave y continua entre regiones.

La Figura 4.13 B proporciona una comparativa, a distintos desplazamientos centrales, de las curvas experimentales del perfil de deformación de las membranas de NR. En ella es posible apreciar cómo las funciones ajustadas describen perfectamente los datos experimentales independientemente del desplazamiento central aplicado. Es importante observar como la curva experimental del perfil deformado de la membrana pasa de tener una curvatura positiva, cuando está en contacto con el indector esférico, a una curvatura negativa en la región libre, adquiriendo así una forma cónica a medida que se incrementa el desplazamiento central y el esfuerzo de tracción domina el comportamiento de deformación de la membrana sobre los mecanismos de flexión [181, 183]. Al comparar los perfiles de deformación teóricos reportados por Yang y Hsu (recuadro interno en la Figura 4.13 B) con nuestros resultados experimentales, es posible observar que ambos perfiles tienen aspectos similares. Asimismo, se puede apreciar que la ruta que ρ_c sigue conforme el indector entra en contacto con el material (Figura 4.13 B,

línea discontinua de color naranja) muestra una tendencia incremental similar a la simulación numérica reportada por Yang y Hsu (Figura 4.13 B, línea discontinua de color púrpura en el inset).

Aunque el probador mecánico biaxial cuenta con una alta precisión en desplazamiento (tal como fue comprobado durante su calibración, Sección 4.2.1), un desafío experimental es determinar cuándo se ha establecido el contacto entre la membrana y el indentador esférico, para así poder precisar el desplazamiento central que en realidad experimenta la membrana. No obstante, tras obtener $f(\bar{\rho})$, la deflexión máxima de la membrana (δ_o) puede ser determinada. Cabe señalar que, esta deflexión es la distancia total de la indentación que experimenta la membrana en el polo y se puede obtener mediante la función experimental del perfil deformado $f(\bar{\rho})$ a $\bar{\rho} = 0$, de forma que $\frac{\delta_o}{R} = f_c(0)$. Una vez hecho esto, el módulo elástico de la membrana puede ser fácilmente estimado al sustituir el valor de $f_c(0)$ en el modelo de Begley-Mackin (ecuación (15)), o bien, en la expresión analítica general carga-deflexión derivada de los resultados de Yang y Begley (ecuación (19)). Además, una vez que el módulo elástico es conocido, la distribución de la carga transversal, w , a lo largo de la región libre de la membrana podría conocerse utilizando la función $f_f(\bar{\rho})$.

Es así que, siguiendo este método gráfico y utilizando la expresión general carga-deflexión desarrollada en este trabajo de investigación (i.e. ecuación (19)), los E promedio (calculados a partir del análisis de ambos lados del perfil deformado de la membrana) de las membranas de NR fueron $0.80 \text{ MPa} \pm 0.01 \text{ MPa}$, $0.84 \text{ MPa} \pm 0.01 \text{ MPa}$ y $0.80 \text{ MPa} \pm 0.07 \text{ MPa}$ para deflexiones máximas $\delta_o = 4 \text{ mm}$, 6 mm y 8 mm , respectivamente. De manera que, los E estimados son prácticamente insensibles al desplazamiento central aplicado y concuerdan con aquellos calculados por el modelo de Begley-Mackin, por la nueva expresión general carga-deflexión y por la prueba de tracción uniaxial.

A partir de estos resultados es posible inferir que, nuestra metodología permite una determinación de valores repetibles de las propiedades mecánicas, como el módulo de elasticidad y la ρ_c , a partir de las imágenes de la membrana deformada del perfil y de las relaciones de desplazamiento transversal (δ) - posición radial (ρ).

4.4.3 Respuesta micromecánica bajo tracción biaxial por indentación esférica

Los pares de imágenes registrados por el módulo de visión estereoscópica durante el ensayo de indentación, fueron útiles para llevar a cabo la caracterización micromecánica de las membranas de NR. De manera que, mediante su análisis por 3D-DIC en el software ARAMIS v.6.3, fue posible calcular los campos de desplazamiento y de deformación que experimentan las membranas durante su indentación.

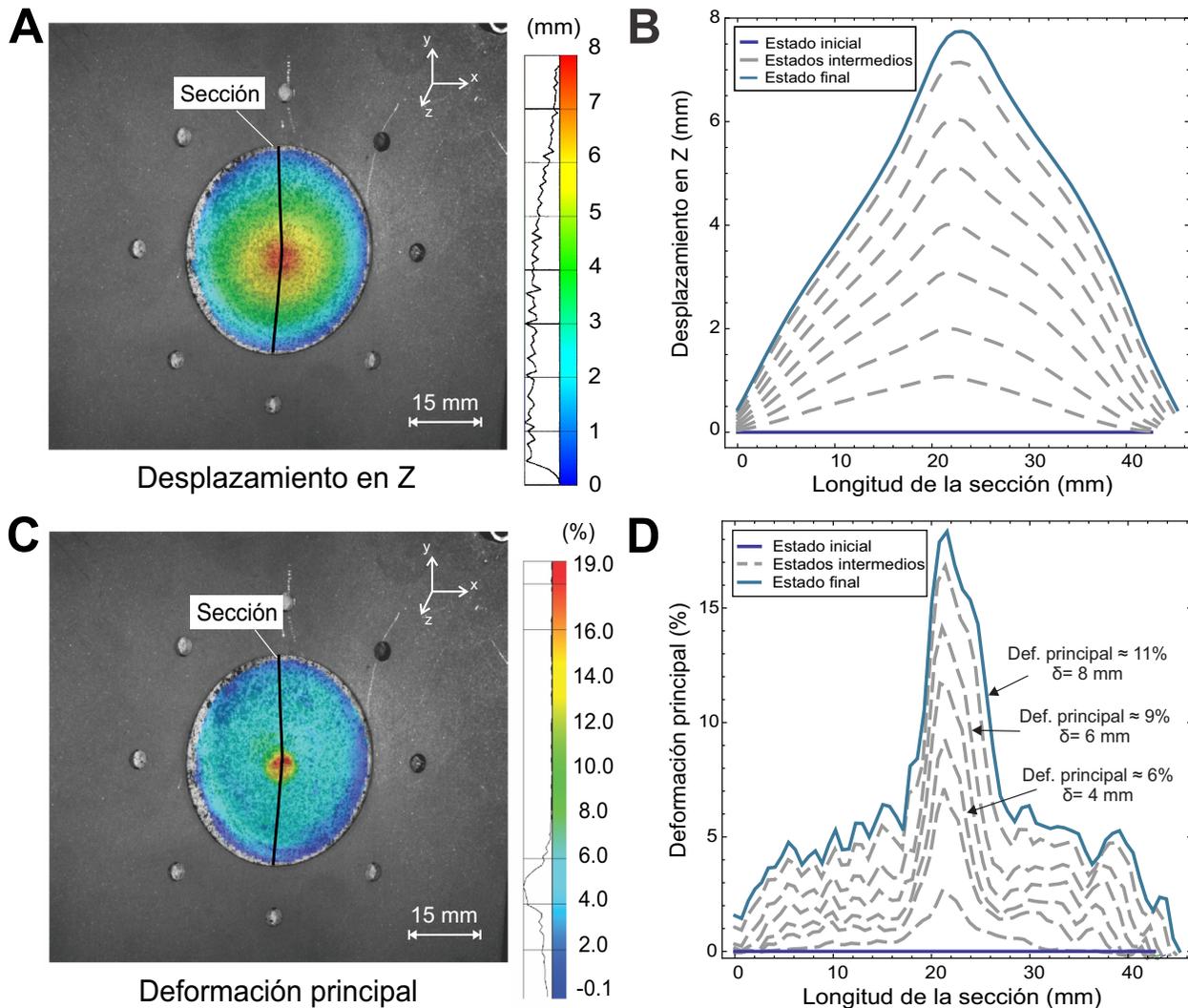


Figura 4.14 Respuesta micromecánica exhibida por las membranas de NR. A) Campo de desplazamientos fuera del plano a $\delta=8$ mm. B) Desplazamiento experimentado por la membrana a lo largo de la sección marcada en la imagen A, a distintas δ . C) Campo de deformaciones principales a $\delta=8$ mm. D) Deformaciones principales experimentadas por la membrana a lo largo de la sección marcada en la figura C, a distintas δ .

La Figura 4.14 A muestra el campo de desplazamientos fuera del plano exhibido por una de las membranas de NR cuando es indentada a $\delta = 8$ mm. En esta imagen es posible observar el desplazamiento que experimenta cada región de la membrana, de manera que se aprecia un patrón de anillos concéntricos en ella. Así, el máximo desplazamiento fuera del plano ocurre en el polo de la membrana (i.e. $\bar{\rho} = 0$), mientras que los desplazamientos más pequeños están presentes en las secciones más cercanas al borde del porta-muestras (i.e. $\bar{\rho} = a$), como era de esperarse. Teniendo en cuenta la simetría del problema y el patrón de anillos concéntricos obtenido para el campo de desplazamientos, durante el posterior análisis de resultados solo se considerarán los valores de desplazamiento a lo largo de una sección vertical ubicada en el centro

de la muestra (línea negra en la Figura 4.14 A). De esta forma, se analizará un perfil de deformación similar al registrado por el módulo de visión lateral 2D, pero a diferencia de este último, el nuevo perfil se deriva de una perspectiva frontal de la deformación de la membrana.

En la Figura 4.14 B se presenta la gráfica del desplazamiento fuera del plano a lo largo de dicha sección longitudinal. Aquí, el estado inicial de la membrana sin indentar (i.e. $\frac{\delta}{R} = 0$) corresponde a la línea púrpura; mientras que, los estados de la membrana con indentación intermedia (i.e. $\frac{\delta}{R} = 0.2 - 1.4$) se muestran en líneas discontinuas de color gris y, finalmente, el estado de la membrana a la máxima indentación (i.e. $\frac{\delta}{R} = 1.6$) es representado en color azul; cabe señalar que, estos perfiles de deformación son análogos a los perfiles experimentales y analíticos mostrados en la Figura 4.13 B, en la cual, solo se muestra la mitad del perfil debido a la simetría del problema. Así, de acuerdo con los resultados de 3D-DIC, el desplazamiento normalizado de la membrana a la máxima indentación aplicada fue $\frac{\delta}{R} = 1.55$, encontrándose una pequeña diferencia entre el desplazamiento aplicado (i.e. $\frac{\delta}{R} = 1.6$) y el detectado por 3D-DIC. Esto podría atribuirse a la existencia de una pequeña distancia entre la muestra y el indentador, a fin de evitar producir una predeformación en la membrana al inicio de la prueba; por otro lado, también podría deberse a variaciones en el grosor de la membrana y en las propiedades materiales durante el proceso de indentación, tal como ha sido observado por Muriene y Nguyen [170].

Una vez obtenido el campo de desplazamientos, el campo de deformación de la membrana indentada (*Major Strain*) es fácilmente estimado utilizando el criterio de deformación de von Mises disponible en el software *ARAMIS v.3.6* [171]. En la Figura 4.14 C se muestra el campo de deformación de la membrana indentada a 8mm. En este caso, el campo de microdeformaciones reveló una deformación local máxima de 18.6% en la punta del indentador (i.e. $\bar{\rho} = 0$); asimismo, es posible apreciar que las membranas experimentaron una mayor deformación en la parte superior de la región de contacto, lo cual podría deberse a la presencia de inhomogeneidades en el material, o bien a una mala alineación del indentador.

La Figura 4.14 D muestra los perfiles de deformación de la membrana conforme es indentada hasta una $\delta = 8$ mm; de manera que, la línea de color púrpura corresponde al estado inicial de la membrana (i.e. $\delta = 0$ mm), las líneas discontinuas de color gris representan la deformación de la membrana en el intervalo $1 \text{ mm} < \delta < 7 \text{ mm}$ y la línea de color azul corresponde a la deformación que experimenta la membrana a $\delta = 8$ mm. Cabe recordar que dichos perfiles de deformación corresponden a la sección longitudinal marcada en la Figura 4.14 C. Así, en la Figura 4.14 D resulta evidente la presencia de una deformación local máxima en el polo del indentador, la cual aumenta gradualmente conforme la indentación y la región de contacto entre el indentador y la

membrana (ρ_c) se van incrementando; de manera que, para $\delta = 4$ mm, 6 mm y 8 mm, las membranas de NR presentaron una deformación máxima en la punta del indentador (i.e. $\bar{\rho} = 0$) de 8.3%, 13.4% y 18.6%, respectivamente.

De acuerdo con lo reportado en la literatura, las deformaciones en la región de contacto (ε_{ρ_c}) están altamente localizadas y dependen del tamaño y la geometría del indentador, así como del desplazamiento central aplicado [34, 36, 38]. En este sentido, en la Figura 4.14 D (zonas señaladas con flechas) es posible apreciar cómo la deformación máxima va disminuyendo a lo largo de la región de contacto; de manera que, para una $\delta = 4$ mm, 6 mm y 8 mm la deformación promedio en esta región fue de ~6%, ~9% y ~11%, respectivamente. Finalmente, lejos del polo y del límite de contacto, la deformación promedio es aproximadamente tres veces menor que en la región de contacto. A partir de estos resultados experimentales queda claro que la razón de deformación a lo largo la región de contacto ($\lambda_o = \varepsilon_{\rho_c} + 1$) depende en gran medida de ρ_c .

En su trabajo Yang y Hsu presentan una serie de simulaciones numéricas para evaluar λ_o como función de $\bar{\rho}_c$ [36]. A fin de comparar estos resultados teóricos con los resultados experimentales obtenidos mediante 3D-DIC, es necesario utilizar la ρ_c determinada mediante el método grafico descrito en la Sección 4.4.2.2. Una vez que la ρ_c es conocida, la deformación promedio en la región de contacto, $\varepsilon_{\rho_c}(0 \rightarrow \bar{\rho}_c)$, se calculó a partir del conjunto de datos obtenidos

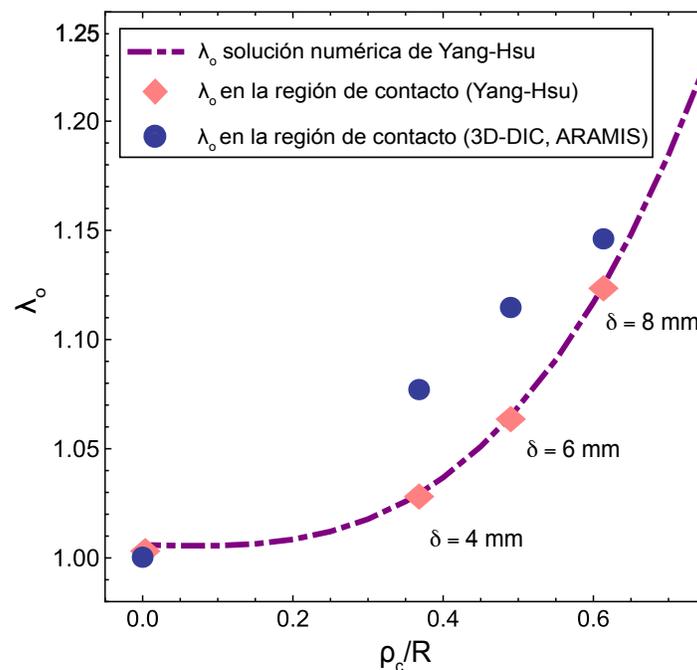


Figura 4.15 Comparativa de las razones de deformación a lo largo de la región de contacto (λ_o) determinadas experimentalmente mediante ARAMIS 3D-DIC (círculos de color azul) y utilizando las simulaciones numéricas reportadas por Yang-Hsu (diamantes de color rosa).

mediante el análisis de 3D-DIC en *ARAMIS*, de manera que la λ_o experimental pudo ser determinada fácilmente mediante $\lambda_o = \varepsilon_{\rho_c} + 1$. Por otra parte, el valor teórico de λ_o se obtuvo sustituyendo directamente el valor $\bar{\rho}_c$ en la solución numérica presentada por Yang y Hsu [36].

La Figura 4.15 muestra una comparativa entre los valores experimentales de λ_o (círculos azules) y los λ_o teóricos (diamantes de color rosa) para $\bar{\rho}_c$ de 0.4 mm, 0.5 mm y 0.6 mm, los cuales a su vez corresponden a desplazamientos centrales δ de 4 mm, 6 mm y 8 mm, respectivamente. A partir de esta figura, es posible observar que solo a grandes $\bar{\rho}_c$ las simulaciones teóricas de Yang y Hsu se aproximan a los resultados experimentales. Esto podría explicarse debido al hecho de que dichas simulaciones fueron desarrolladas para describir el comportamiento mecánico de membranas no lineales en las cuales la deformación por tracción domina sobre la flexión; lo cual, como ya se ha demostrado anteriormente, en nuestro caso únicamente se cumple cuando $\delta = 8$ mm.

Finalmente, a manera de resumen, en la Tabla V se una presenta una comparativa de los módulos elásticos de las membranas de NR obtenidos mediante los modelos estándar (i.e. Liu y Begley-Mackin), y las metodologías y modelos desarrollados en este trabajo de tesis (i.e expresión general e imagen lateral). Así, en comparación con los modelos reportados en la literatura, los módulos determinados mediante las metodologías aquí propuestas fueron más certeros tanto en comportamiento de membrana no lineal (i.e. $\delta = 8$ mm), como en la región de transición placa - membrana no lineal (i.e. $\delta = 4$ mm - 6 mm). Lo anterior considerando que el valor de referencia del módulo elástico por tracción uniaxial para el NR fue de $0.81 \text{ MPa} \pm 0.07 \text{ MPa}$.

Tabla V. Comparativa de los módulos elásticos (E) de las membranas de NR obtenidos a través de los distintos modelos estándar reportados en la literatura y mediante la nueva expresión general y metodología desarrollada.

MÉTODO	CP-CMNL ($\delta = 4 \text{ mm}$)	CP-CMNL ($\delta = 6 \text{ mm}$)	CMNL ($\delta = 8 \text{ mm}$)	PROMEDIO (MPa)
Liu (ec. (13))	0.16 ± 0.01	0.34 ± 0.01	0.55 ± 0.02	0.35 ± 0.19
Begley-Mackin (ec. (15))	0.84 ± 0.05	0.86 ± 0.01	0.81 ± 0.01	0.84 ± 0.03
Expresión general (ec. (19))	0.73 ± 0.07	0.85 ± 0.02	0.79 ± 0.05	0.79 ± 0.06
Imagen lateral	0.80 ± 0.01	0.84 ± 0.01	0.80 ± 0.07	0.81 ± 0.02

En la tabla CP es la abreviatura de comportamiento de placa; mientras que, CMNL lo es de comportamiento de membrana no lineal. Todos los módulos son reportados como el promedio y su desviación típica muestral

El objetivo de este capítulo consistió en desarrollar un probador mecánico y una metodología que fuera útil para caracterizar el comportamiento macro y micromecánico de membranas elastoméricas, hidrogeles hidratados y polímeros suaves que experimenten una indentación esférica biaxial. Los resultados obtenidos, han demostrado que el instrumento desarrollado es capaz de adquirir datos útiles para evaluar la respuesta macro y micromecánica de las membranas a través de tres métodos diferentes: los datos de carga y desplazamiento, registrados por los sensores y actuadores; las imágenes del perfil deformado de la membrana, capturadas por el módulo de visión 2D (cámara lateral); y las imágenes estereoscópicas de la deformación frontal de la membrana, registradas por el módulo de visión estereoscópico.

Asimismo, los tres modelos principales (i.e. Yang-Hsu, Liu y Begley-Mackin) utilizados para determinar las propiedades mecánicas de membranas esféricamente indentadas fueron analizados a profundidad, encontrándose que el modelo de Liu muestra discrepancias en los resultados que se obtienen, respecto a los datos experimentales y a otros modelos analíticos ampliamente utilizados. Por lo tanto, utilizar la solución propuesta por Liu para determinar las propiedades mecánicas de hidrogeles y membranas elastoméricas podría implicar errores significativos.

Tomando como base las soluciones numéricas para membranas no lineales presentadas por Yang y Hsu, las relaciones propuestas por Begley-Mackin, y los datos experimentales obtenidos a partir de un ensayo de indentación utilizando el probador mecánico desarrollado, fue posible establecer una nueva expresión analítica y una metodología para entender la respuesta mecánica de los hidrogeles, demostrándose que es posible determinar su módulo elástico de manera más fácil y certera que con los modelos tradicionales. Razón por la cual dicha metodología y expresión serán utilizadas para determinar el módulo elástico bajo tracción biaxial de los hidrogeles de CS/PVA, entrecruzados y/o nanocompuestos (Capítulo 5, Sección 5.3).

De esta manera, el probador mecánico y la metodología desarrollada constituyen una excelente herramienta para evaluar el comportamiento macro y micromecánico de polímeros suaves, hidrogeles entrecruzados e incluso de tejidos biológicos con un comportamiento elastomérico.

CAPÍTULO 5

COMPORTAMIENTO MECÁNICO DE LOS HIDROGELES

En este capítulo se analizan las propiedades mecánicas exhibidas por los hidrogeles de CS/PVA, entrecruzados y/o nanocompuestos, al ser expuestos a un sistema uniaxial o biaxial de esfuerzos. De manera paralela, el capítulo tiene por objetivo evaluar los parámetros estructurales que describen la configuración de su red polimérica (i.e. φ_c , M_{cr1} , D_N y v_s), y estudiar el comportamiento opto-mecánico de los hidrogeles cargados con MWCNTs. Es importante tener presente que todos los hidrogeles fueron ensayados en estado hidratado con la finalidad de caracterizarlos en la forma en la que se encontrarán en su campo de aplicación.

5.1 PROPIEDADES MECÁNICAS BAJO TRACCIÓN UNIAXIAL

La Figura 5.1 muestra el comportamiento mecánico, bajo tracción uniaxial, de los hidrogeles híbridos de CS/PVA, CS/PVA/GA, CS/PVA/GEN, CS/PVA/MWCNTs y CS/PVA/GEN/MWCNTs. En dicha figura es posible apreciar el comportamiento no lineal que presentaron todos los hidrogeles estudiados (cabe señalar que, debido a la repetitividad mostrada en su comportamiento mecánico, únicamente se presenta una curva representativa de todas las muestras ensayadas). De acuerdo con investigaciones previas [55, 123, 184], en estado hidratado, la mayoría de los hidrogeles se comportan como elastómeros; lo cual implica que su comportamiento mecánico sea no lineal y dependa en gran parte de la estructura de su red polimérica, así como de la cantidad de líquido que ésta es capaz de retener. Como se puede observar en la Figura 5.1, los hidrogeles que mostraron la mayor razón de elongación (λ) y la menor resistencia de ruptura a la tracción¹³ (UTS, por sus siglas en inglés) fueron los hidrogeles control de CS/PVA (i.e. 2 ± 0.18 y $0.24 \text{ MPa} \pm 0.06 \text{ MPa}$, respectivamente), los cuales, de acuerdo con los resultados obtenidos en el capítulo anterior (Figura 3.6, Sección 3.6.1), también fueron los que presentaron el mayor índice de hinchamiento al equilibrio (i.e. $Q_e = 501\%$).

Ahora bien, cuando la mezcla de CS/PVA es químicamente entrecruzada con GA o GEN (Figura 5.1, curvas de color amarillo y azul cielo, respectivamente), la respuesta mecánica de los hidrogeles presenta cambios significativos, observándose un marcado incremento en la UTS y

¹³ Máximo esfuerzo de tracción que el material es capaz de soportar antes de que se produzca la fractura del mismo.

un notable decremento en la razón de elongación. Así, los hidrogeles de CS/PVA/GA y CS/PVA/GEN presentaron una UTS promedio de 0.52 MPa \pm 0.10 MPa y 0.41 MPa \pm 0.15 MPa, lo cual corresponde a un incremento de 2.2 veces y 1.7 veces el valor de la UTS exhibida por la mezcla control; mientras que, su razón de elongación sufrió una reducción aproximada de 86% y 84%, respectivamente, en relación con la mezcla CS/PVA. Evidentemente estos cambios son atribuidos a las modificaciones en la arquitectura de la red polimérica que producen los agentes entrecruzantes; ya que, como fue previamente sugerido en la Figura 3.1 del capítulo anterior, los puntos de entrecruzamiento (i.e. los enlaces covalentes) que se generan entre las cadenas de CS y/o PVA inhiben el desdoblamiento y movimiento de las mismas, reduciendo su λ y oponiendo una mayor resistencia a ser deformadas (lo que a su vez resulta en el incremento de la UTS) [30, 69, 73]. Dado que el entrecruzamiento con GA genera una red más rígida y compacta (como se vislumbró en la caracterización fisicoquímica), estos hidrogeles presentan una menor λ y una mayor UTS que aquellos entrecruzados con GEN.

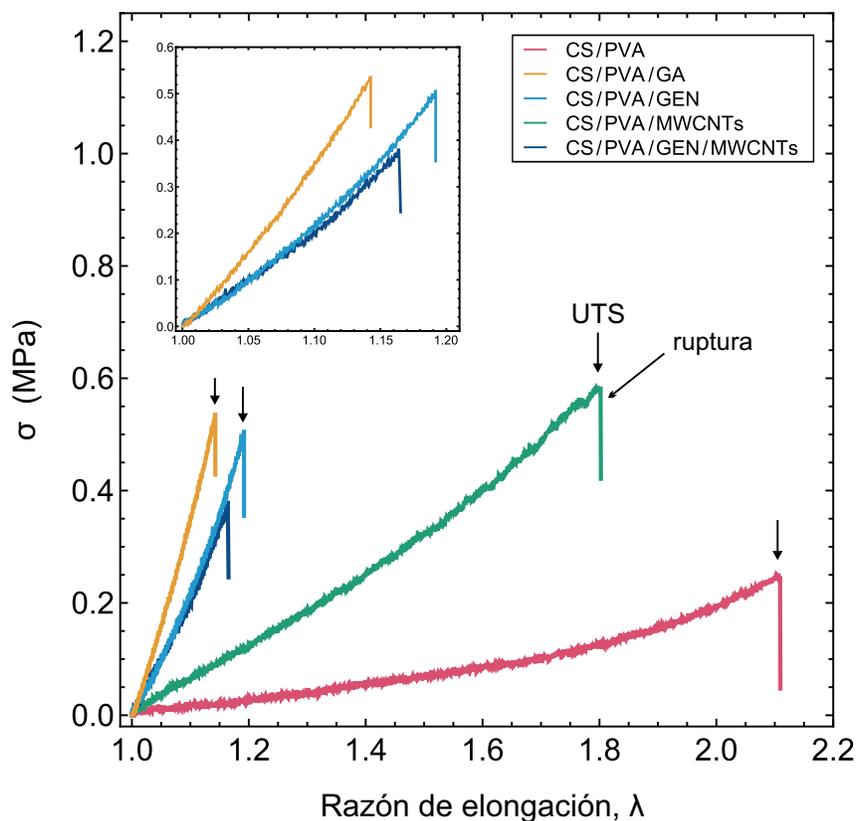


Figura 5.1 Respuesta mecánica bajo tracción uniaxial de los hidrogeles híbridos de CS/PVA, CS/PVA/GA, CS/PVA/GEN, CS/PVA/MWCNTs y CS/PVA/GEN/MWCNTs. A fin de apreciar de mejor forma la respuesta no lineal de los hidrogeles entrecruzados, en el recuadro interno de la gráfica se muestra una ampliación de su comportamiento mecánico. Las flechas indican el punto de ruptura de cada material y la UTS alcanzada. Debido a la repetitividad mostrada en el comportamiento mecánico, únicamente se presenta una curva representativa de cada uno de los grupos de hidrogeles estudiados.

Un comportamiento semejante fue observado en los hidrogeles nanocompuestos de CS/PVA/MWCNTs y CS/PVA/GEN/MWCNTs. De modo que, en los hidrogeles de CS/PVA/MWCNTs (Figura 5.1, curva de color verde) es posible apreciar como los MWCNTs reducen la capacidad de deformación de la matriz polimérica alrededor de un 23%, respecto a la mezcla CS/PVA; pero en contraste incrementan su UTS 2.6 veces, presentando la mayor resistencia a la tracción experimentada por alguno de los hidrogeles estudiados. Así, los MWCNTs sacrifican ligeramente la capacidad de elongación de los hidrogeles, pero incrementan su resistencia. Estos resultados demuestran que, los nanotubos de carbono realmente están actuando como refuerzos mecánicos, de manera que la carga aplicada se transfiere eficientemente gracias a la buena distribución que presentan los MWCNTs a lo largo de la membrana y a la fuerte interfase que generan con las macromoléculas de CS y PVA. Dicho comportamiento concuerda con lo observado por Liao et al. en nanofibras de PVA/CS cargadas con 1% masa/masa de MWCNTs [30].

Por otro lado, en los hidrogeles de CS/PVA/GEN/MWCNTs (Figura 5.1, curva de color azul marino), la UTS exhibe un incremento del 29%, mientras que la razón de elongación presenta una reducción del 86% respecto a la mezcla control (Figura 5.1, curva de color rojo); sin embargo, con relación a su símil sin cargar (i.e. CS/PVA/GEN, curva azul claro), la UTS y la λ disminuyen alrededor de 24% y 12.5%, respectivamente. De manera que, en los hidrogeles entrecruzados con GEN, la adición de una pequeña concentración de MWCNTs (i.e. 0.2% masa/masa) no contribuye a la mejora de su resistencia mecánica; lo cual puede deberse a la formación de una interfase débil entre las nanopartículas y la matriz polimérica.

Tabla VI. Relación entre las propiedades mecánicas y el índice de hinchamiento al equilibrio de las membranas.

COMPOSICIÓN DEL HIDROGEL	Razón de elongación, λ	^a UTS (MPa)	^b E (MPa)	^c Q_e (%)
CS/PVA	2.00 ± 0.18	0.24 ± 0.06	0.22 ± 0.05	501
CS/PVA/GA	1.14 ± 0.02	0.52 ± 0.10	2.82 ± 0.33	189
CS/PVA/GEN	1.16 ± 0.04	0.41 ± 0.15	2.08 ± 0.11	271
CS/PVA/MWCNTs	1.77 ± 0.14	0.62 ± 0.15	0.69 ± 0.12	402
CS/PVA/GEN/MWCNTs	1.14 ± 0.02	0.31 ± 0.07	1.69 ± 0.33	225

^aUTS representa la resistencia de ruptura a la tracción, ^b Q_e es el índice de hinchamiento al equilibrio y ^c E el módulo elástico de los hidrogeles. Todas las cantidades reportadas corresponden al valor promedio y su desviación típica muestral.

A fin de facilitar el análisis de los resultados, en la Tabla VI se concentran los valores promedio de la razón de elongación (λ), resistencia de ruptura a la tracción (UTS), módulo elástico (E) y capacidad de hinchamiento al equilibrio (Q_e) que presentó cada grupo de hidrogeles.

Dado que en estado hidratado la deformación elástica que experimentan los hidrogeles no es proporcional a la fuerza aplicada (i.e. comportamiento no lineal), su módulo elástico (E) se determinó utilizando la relación $E = 3\mu$ [124]; de modo que, el módulo de corte (μ) fue estimado mediante el ajuste de las curvas, σ vs. λ , al modelo de Ogden [125].

En la Figura 5.2, se muestra una comparativa de los módulos elásticos de los hidrogeles control de CS/PVA, de las mezclas entrecruzadas (i.e. CS/PVA/GA y CS/PVA/GEN) y de aquellas cargadas con MWCNTs (i.e. CS/PVA/MWCNTs y CS/PVA/GEN/MWCNTs). Como se puede apreciar en la gráfica, tanto el entrecruzamiento químico de la mezcla como la adición de nanopartículas mejoraron significativamente el módulo elástico de los hidrogeles. De acuerdo con los resultados obtenidos, los hidrogeles control tuvieron un $E = 0.22 \text{ MPa} \pm 0.05 \text{ MPa}$, mientras que los hidrogeles entrecruzados con GA o GEN presentaron módulos de $2.82 \text{ MPa} \pm 0.33 \text{ MPa}$ y $2.08 \text{ MPa} \pm 0.11 \text{ MPa}$, respectivamente. El GA produce un mayor incremento en el módulo elástico debido a que este agente entrecruzante da lugar a una sola red polimérica que inhibe/restringe el movimiento de las macromoléculas (CS y PVA); mientras que, en los hidrogeles

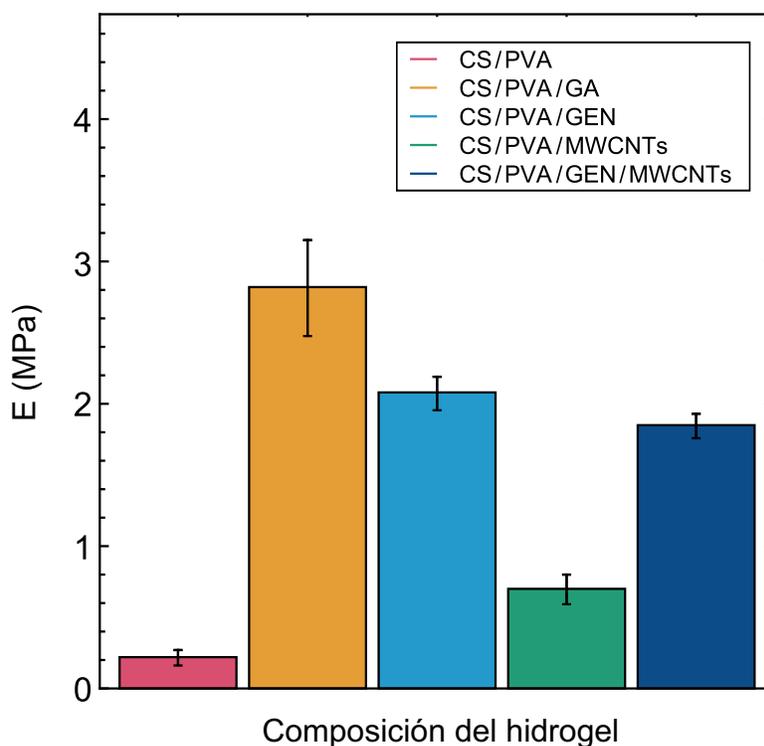


Figura 5.2 Gráfica comparativa del módulo elástico obtenido a través del modelo de Ogden y la relación $E = 3\mu$ para los hidrogeles híbridos de CS/PVA, entrecruzados y/o nanocompuestos.

entrecruzados con GEN se genera una red semi-interpenetrada en la cual las cadenas de PVA tienen una mayor libertad de movimiento [9]. No obstante se debe tener presente que, de acuerdo con investigaciones previas, el GA ha mostrado ser más citotóxico que el GEN [85]; por lo cual este último se perfilaría como un agente entrecruzante más viable si se considera un balance entre las propiedades mecánicas que aporta y su citotoxicidad.

Asimismo, en los hidrogeles de CS/PVA/MWCNTs, también se observó un incremento en E ; de modo que la adición de 0.2% masa/masa de MWCNTs mejoró, aproximadamente tres veces, el módulo elástico de la matriz de CS/PVA. Este resultado podría corroborar la presencia de una fuerte interfase entre los nanotubos y la matriz polimérica, dado que existe una transferencia eficiente de los esfuerzos que permite incrementar la UTS y el módulo elástico de dichos hidrogeles. En contraste con lo anterior, los hidrogeles de CS/PVA/GEN/MWCNTs presentaron un ligero decremento en E (i.e. 11%) respecto a aquellos únicamente entrecruzados con GEN, pasando de $2.08 \text{ MPa} \pm 0.11 \text{ MPa}$ a $1.85 \text{ MPa} \pm 0.08 \text{ MPa}$. Dicho decremento, como se ha comentado anteriormente, puede ser atribuido a dos factores. Por un lado, a la formación de conglomerados de MWCNTs; los cuales, en lugar de actuar como refuerzos mecánicos se comportan como concentradores de esfuerzos, propiciando la falla del material a menores solicitaciones. Por otro lado, el decremento en E también puede ser atribuido a la formación de una interfase matriz-nanopartículas débil, la cual es incapaz de transferir de forma eficiente tanto los esfuerzos mecánicos, como los térmicos (Capítulo 3, Sección 3.5.1).

Como se planteó al inicio de esta sección, la respuesta mecánica de los hidrogeles está fuertemente relacionada con su hinchamiento, por lo que, al observar cuidadosamente la Tabla VI es posible apreciar que un decremento en el índice de hinchamiento implica: un decremento en su capacidad de elongación, un aumento en su resistencia a la ruptura y un mayor módulo elástico. Es decir, a menor Q_e : mayor UTS, mayor E y menor λ . Esto se debe a que en una red con alto índice de hinchamiento las cadenas poliméricas poseen una mayor libertad de movimiento, por lo que el hidrogel opone menor resistencia a ser deformado e incrementa su flexibilidad. Así, en los hidrogeles el agua funciona como una especie de plastificante que, en sinergia con los agentes entrecruzantes y/o las nanopartículas, permite modificar el comportamiento mecánico de estos materiales; de modo que, un bajo porcentaje de hinchamiento será indicativo de un hidrogel más rígido, y viceversa [148]. Esta tendencia observada en los hidrogeles de CS/PVA, entrecruzados y/o nanocompuestos, concuerda con el comportamiento reportado en la literatura para diferentes tipos de hidrogeles (i.e. polietilenglicol, policaprolactona, poli(ácido láctico) y poli(óxido de etileno), entre otros) [123, 185, 186].

5.2 ESTRUCTURA FÍSICA DE LA RED POLIMÉRICA

Tabla VII. Propiedades estructurales de los hidrogeles de CS/PVA entrecruzados y nanocompuestos.

COMPOSICIÓN DEL HIDROGEL	φ_c^a (mol/m ³)	M_{crl}^b (g/mol)	D_N^c (nm)	ν_s^d
CS/PVA/GA	384 ± 27	111 ± 8	2.0 ± 0.05	0.53 ± 0.06
CS/PVA/GEN	283 ± 15	142 ± 8	2.2 ± 0.04	0.37 ± 0.02
CS/PVA/GEN/MWCNTs	251 ± 11	160 ± 8	2.3 ± 0.04	0.44 ± 0.01

^a φ_c se refiere a la densidad de entrecruzamiento teórica, ^b M_{crl} representa el peso molecular entre puntos de entrecruzamiento, ^c D_N es el tamaño de malla de la red polimérica y ^d ν_s es la fracción volumétrica de polímero en el hidrogel hinchado hasta su equilibrio. Todos los parámetros reportados corresponden al valor promedio y su desviación típica muestral.

Uno de los principales objetivos del Capítulo 3 fue el tratar de entender la forma en la que las macromoléculas, los agentes químicos entrecruzantes y las nanopartículas, interaccionaban entre sí para conformar la red polimérica de los distintos grupos de hidrogeles estudiados. Así, a través de algunas pruebas de caracterización fisicoquímicas, las estructuras químicas propuestas en la Figura 3.1 (Capítulo 3, Sección 3.2) fueron corroboradas. Ahora bien, con el propósito de conocer la constitución física de la red polimérica de aquellos hidrogeles que fueron químicamente entrecruzados (i.e. CS/PVA/GA, CS/PVA/GEN y CS/PVA/GEN/MWCNTs), en esta sección se lleva a cabo un análisis de sus parámetros estructurales tomando como base la teoría elástica de los elastómeros [43, 123, 124].

De acuerdo con la teoría elástica de los elastómeros, si se conoce el módulo de corte (μ) y la concentración de los polímeros en la disolución entrecruzada (c), es posible estimar las dimensiones de los parámetros utilizados para describir la estructura física de la red polimérica que se forma (i.e. φ_c , M_{crl} , D_N y ν_s). En la Tabla VII se muestra el efecto que los distintos entrecruzantes, GA o GEN, y los MWCNTs tienen sobre la estructura de la red polimérica de los hidrogeles de CS/PVA; es importante mencionar que, estos valores fueron determinados utilizando el módulo de corte obtenido mediante las pruebas de tracción uniaxial.

De los tres tipos de hidrogeles estudiados, los hidrogeles entrecruzados con GA fueron los que mostraron la mayor densidad de entrecruzamiento teórica (φ_c), siendo esta de 384 mol/m³ ± 27 mol/m³. En comparación con este resultado, la φ_c de los hidrogeles entrecruzados con GEN fue aproximadamente un 26% más baja; mientras que, los hidrogeles entrecruzados con genipin y cargados con MWCNTs presentaron un decremento del 11%

respecto a sus símiles sin cargar (i.e. CS/PVA/GEN). Así, a pesar de que el GA y el GEN fueron añadidos en la misma concentración a sus respectivas mezclas de CS/PVA, el GA genera una mayor φ_c debido a su capacidad para reaccionar químicamente tanto con los grupos $-\text{NH}_2$ del CS, como con los $-\text{OH}$ presentes en el CS y el PVA. Por otro lado, resulta evidente que los MWCNTs interfieren en el entrecruzamiento de la red; de manera que, dichas nanopartículas podrían estar actuando como una especie de barrera física que impide la formación de enlaces covalentes entre las cadenas de CS. Dicho comportamiento, ya se venía intuyendo desde el análisis térmico y mecánico de estos hidrogeles, por lo que el presente resultado confirma dicha suposición.

De acuerdo con Flory [131], el tamaño de poro o malla (D_N) es un indicativo de la distancia promedio entre puntos de entrecruzamiento; mientras que, el peso molecular entre puntos de entrecruzamiento (M_{cr1}) hace referencia al peso molecular promedio de las cadenas que conforman la red polimérica. Conforme a los resultados presentados en la Tabla VII, es fácil observar que tanto el M_{cr1} como el D_N incrementan sus valores conforme la φ_c disminuye. Es decir que, a medida que la densidad de entrecruzamiento de la red polimérica es menor, las cadenas poliméricas que la integran estarán conformadas por un mayor número de monómeros, lo cual implica cadenas más largas y de mayor peso molecular [8, 55].

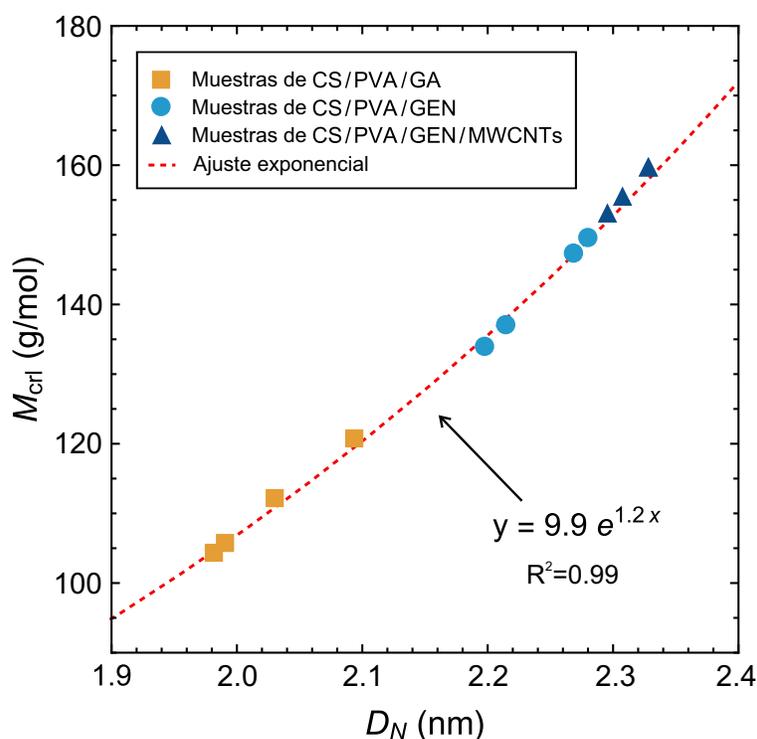


Figura 5.3 M_{cr1} como función de D_N para los hidrogeles de entrecruzados de CS/PVA. Los cuadros representan a las muestras de CS/PVA/GA, los círculos a las de CS/PVA/GEN y los triángulos a las de CS/PVA/GEN/MWCNTs (únicamente se aprecian tres triángulos debido a que dos de ellos se superponen).

La Figura 5.3 muestra la relación entre el M_{crl} y el D_N en los hidrogeles de CS/PVA/GA, CS/PVA/GEN y CS/PVA/GEN/MWCNTs mediante el comportamiento de cuatro de sus muestras. De acuerdo con esta gráfica, el M_{crl} incrementa exponencialmente conforme el valor del D_N aumenta, siendo los hidrogeles de CS/PVA/GEN/MWCNTs los que presentan el mayor tamaño de poro y peso molecular entre puntos de entrecruzamiento, y los entrecruzados con GA el menor. Con base en estos resultados es posible deducir que, el tipo de agente entrecruzante y/o los MWCNTs no solo pueden modificar las propiedades macroscópicas de los hidrogeles (i.e. el ángulo de contacto, la cristalinidad o la rugosidad de superficie), como se había venido evidenciado en resultados anteriores, sino que también son capaces de inducir cambios a nivel microestructural.

Consecuentemente, al modificarse la estructura de la red polimérica también será modificada su capacidad de hinchamiento y su respuesta mecánica. Así, conforme a los resultados presentados en la Tabla VII, el incremento en la densidad de entrecruzamiento produce un aumento en la fracción volumétrica de polímero (v_s), indicando una menor capacidad de absorción. De manera que, dicho comportamiento se debe principalmente a dos factores: por un lado, una red con mayor densidad de entrecruzamiento tiene menos espacio disponible para ser ocupado por el agua debido al decremento del D_N . Por otro lado, la reducción de la longitud de las cadenas (y por ende del M_{crl}) limita su movilidad e incrementa la fuerza elástica que se opone al hinchamiento de la red [132].

Así, los hidrogeles de CS/PVA/GEN que presentaron un índice de hinchamiento de 271% poseen un D_N y un M_{crl} mayor al de los hidrogeles de CS/PVA/GA que solo alcanzaron un hinchamiento al equilibrio de 189%. Esta pérdida en la capacidad de absorción de los hidrogeles entrecruzados con GA era atribuida, en el Capítulo 3-Sección 3.6.1, a una mayor densidad de entrecruzamiento de la red, lo cual queda finalmente comprobado en esta sección. Ahora bien, a pesar de que los hidrogeles de CS/PVA/GEN/MWCNTs presentaron un tamaño de poro y un peso molecular entre puntos de entrecruzamiento mayor al de los hidrogeles de CS/PVA/GEN, su índice de hinchamiento al equilibrio fue menor (i.e. 225% vs. 271%, respectivamente). Lo cual, independientemente de las dimensiones de su red polimérica, este comportamiento es debido a la naturaleza hidrófoba de los MWCNTs.

Como ya se ha comentado a lo largo de este capítulo, el comportamiento mecánico de los hidrogeles también puede ser descrito en términos de la estructura de la red polimérica conforme al número de cadenas elásticamente activas y al peso molecular entre puntos de entrecruzamiento [43]. Por lo tanto, entender la estructura de su red, es extremadamente importante para obtener información acerca de sus propiedades mecánicas.

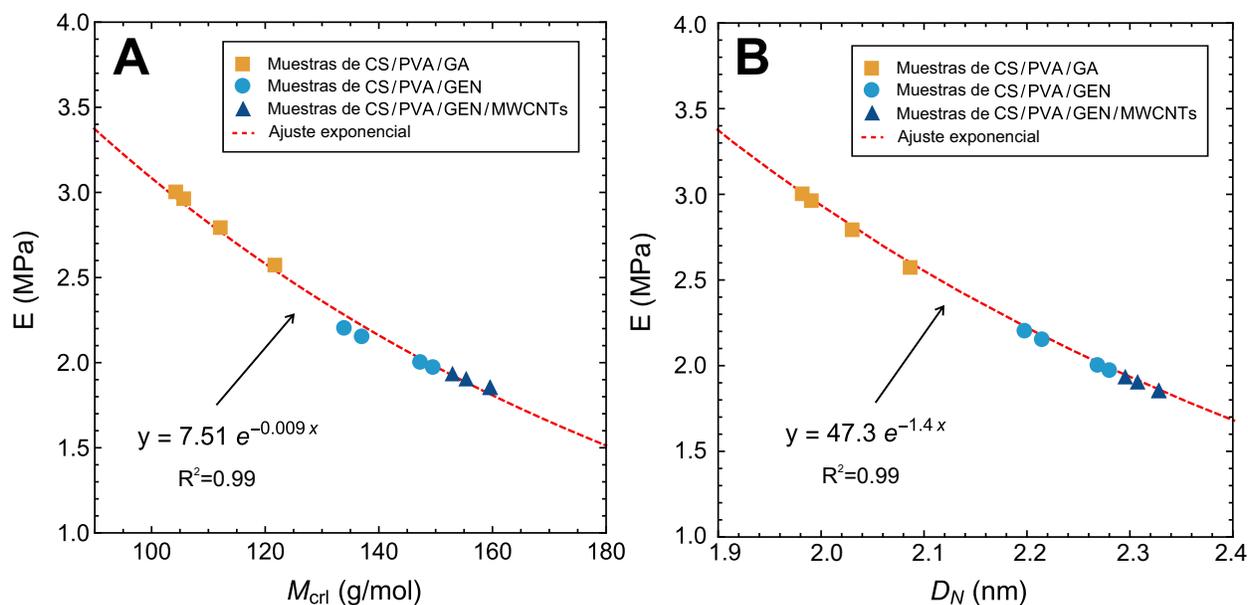


Figura 5.4 Relación del módulo elástico con los parámetros estructurales de la red polimérica en los hidrogeles entrecruzados. A) Relación entre el módulo elástico y el peso molecular entre puntos de entrecruzamiento. B) Relación entre el módulo elástico y el tamaño de poro. **En el caso de los hidrogeles de CS/PVA/GEN/MWCNTs únicamente se aprecian tres triángulos debido a que dos de ellos se superponen

La Figura 5.4 A muestra la relación entre el módulo elástico y el peso molecular entre puntos de entrecruzamiento. En ella se puede observar cómo, en nuestros hidrogeles, al incrementarse el M_{crit} , el valor del módulo elástico (E) decrece exponencialmente. Esto debido a que el incremento del M_{crit} implica la presencia de cadenas más largas en la red y por ende también de un mayor D_N , una menor φ_c y un mayor Q_e ; de modo que la red polimérica es más flexible y opone menor resistencia a ser deformada. Así, de manera análoga, conforme el D_N crece, el módulo elástico disminuye exponencialmente (Figura 5.4 B). Por lo tanto, a mayor φ_c , menor M_{crit} , menor D_N , mayor E y viceversa.

Con estos resultados es evidente que, el módulo elástico de los hidrogeles de CS/PVA/GA, CS/PVA/GEN y CS/PVA/GEN/MWNT se rige en gran medida por la estructura física de su red polimérica; la cual, en el caso de los hidrogeles cargados con MWCNTs, tiene mucho mayor relevancia en la respuesta mecánica de dichos materiales que las mismas nanopartículas.

5.3 PROPIEDADES MECÁNICAS BAJO TRACCIÓN BIAxIAL POR INDENTACIÓN ESFÉRICA

Si bien mediante el ensayo de tracción uniaxial fue posible evaluar algunas de las propiedades mecánicas de los hidrogeles de CS/PVA, entrecruzados y/o nanocompuestos, dicha

prueba resulta insuficiente para estudiar el comportamiento mecánico de los hidrogeles. Esto debido a que, en sus entornos de aplicación, difícilmente se encontrarán expuestos a esfuerzos uniaxiales puros. Debido a ello, caracterizar este tipo de materiales bajo esfuerzos biaxiales, solicitaciones aún más cercanas a las presentes en el mundo real, resulta de vital relevancia.

La caracterización mecánica de los hidrogeles, bajo un sistema biaxial de esfuerzos, se llevó a cabo utilizando el probador mecánico diseñado en el presente trabajo de investigación (Capítulo 4). De manera que, utilizando la nueva expresión analítica general y siguiendo las metodologías desarrolladas en el capítulo anterior fue posible determinar el módulo elástico y el campo de microdeformaciones que experimentan los hidrogeles. Cabe resaltar que, hasta el momento nadie ha realizado estudios del comportamiento macro y micromecánico bajo tracción biaxial por indentación esférica de los hidrogeles de CS/PVA entrecruzados con genipin o glutaraldehído y/o reforzados con MWCNTs.

5.3.1 Comportamiento macromecánico de los hidrogeles

La Figura 5.5 muestra los resultados de la caracterización macromecánica de los hidrogeles a través del método de tracción biaxial por indentación esférica. De manera que, en la Figura 5.5 A se presentan las curvas de fuerza vs. desplazamiento, w vs. δ , correspondientes a cada uno de los hidrogeles sintetizados. Como se puede observar, al igual que en los resultados de las pruebas de tracción uniaxial (Sección 5.1), estas curvas también evidencian el comportamiento no lineal de los hidrogeles. A partir de esta gráfica es claro que los hidrogeles entrecruzados (i.e. CS/PVA/GA, CS/PVA/GEN y CS/PVA/GEN/MWCNTs; curvas de color amarillo, azul cielo y azul rey, respectivamente) requieren de cargas más grandes para ser indentados a la misma longitud que sus símiles sin entrecruzar (i.e. CS/PVA y CS/PVA/MWCNTs; curvas de color rojo y verde, respectivamente); siendo los hidrogeles entrecruzados con GA los más resistentes, ya que, como se evidenció anteriormente (Sección 5.2), dicho entrecruzante da lugar a una red polimérica más rígida y compacta que inhibe el movimiento de las cadenas.

Asimismo, es posible apreciar como la adición de MWCNTs influye en la resistencia de las membranas; por un lado, en los hidrogeles de CS/PVA/MWCNTs (Figura 5.5 A inset, curva de color verde) los nanotubos hacen que sea necesario aplicar el doble de fuerza, que en los hidrogeles control de CS/PVA (Figura 5.5 A inset, curva de color rojo) para indentar la membrana 8.5 mm. Sin embargo, en el caso de los hidrogeles de CS/PVA/GEN/MWCNTs (Figura 5.5 A, curva de color azul marino) el efecto es el contrario, evidenciando nuevamente que, en los hidrogeles entrecruzados con GEN los MWCNTs no actúan como refuerzos mecánicos, sino todo

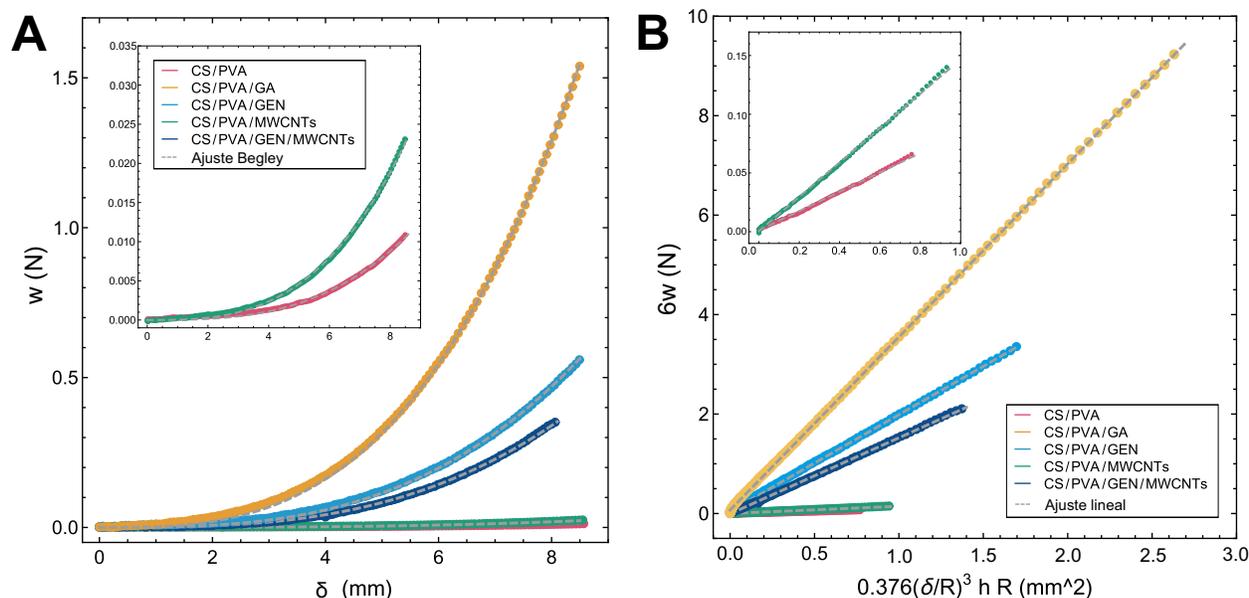


Figura 5.5 Caracterización macromecánica de los hidrogeles híbridos de CS/PVA entrecruzados y nanocompuestos mediante indentación esférica. A) Curvas de fuerza vs. desplazamiento y ajuste de Begley. B) Curvas obtenidas mediante la metodología y expresión general desarrolladas en este trabajo de investigación. La pendiente de las rectas corresponde al módulo elástico de las membranas. *Todos los ajustes presentaron un coeficiente de determinación $R^2=0.99$.

lo contrario. Cabe recordar que este comportamiento ya se había observado durante las pruebas de tracción uniaxial y durante la evaluación de la estructura de la red polimérica.

Como se puede apreciar en la Figura 5.5 A, todos los materiales exhiben la misma tendencia, en donde la carga es proporcional al cubo del desplazamiento (i.e. $w \propto \delta^3$); de forma que, se ajustan perfectamente a la solución aproximada desarrollada por Begley para describir el comportamiento no lineal de membranas delgadas esféricamente indentadas.

Utilizando la metodología y la expresión analítica general (ecuación (19)), deducidas y validadas en el capítulo anterior, el módulo elástico (E) de los hidrogeles fue determinado como la pendiente de la sección lineal de la curva fuerza vs. deflexión, $6w$ vs. $0.376 hR \left(\frac{\delta}{R}\right)^3$, tal como se muestra en la Figura 5.5 B. En esta figura se puede observar como todos los hidrogeles presentan la tendencia lineal esperada, indicando un comportamiento de membrana no lineal en el cual los esfuerzos por flexión pueden ser despreciados [37, 38]. Así, los hidrogeles de CS/PVA, CS/PVA/GA, CS/PVA/GEN, CS/PVA/MWCNTs y CS/PVA/GEN/MWCNTs presentaron un módulo elástico promedio de $0.1 \text{ MPa} \pm 0.01 \text{ MPa}$, $3.17 \text{ MPa} \pm 0.64 \text{ MPa}$, $1.93 \text{ MPa} \pm 0.02 \text{ MPa}$, $0.13 \text{ MPa} \pm 0.03 \text{ MPa}$ y $1.59 \text{ MPa} \pm 0.09 \text{ MPa}$, respectivamente.

A fin de comparar el módulo elástico de los hidrogeles obtenido mediante este método, se utilizaron tanto el modelo desarrollado por Begley (ecuación (15)), como las imágenes del perfil

deformado de las membranas y su metodología asociada (Capítulo 4, Sección 4.4.2.2); llevándose a cabo un estudio profundo del comportamiento macromecánico de dichos materiales. Así, en la Figura 5.6 se presenta una comparativa de los módulos elásticos obtenidos mediante los distintos métodos. En dicha figura las barras de color sólido corresponden a los módulos estimados a través de pruebas clásicas de tracción uniaxial; mientras que, el resto de las barras, aquellas rellenas con diferentes achurados, corresponden a los módulos exhibidos por las membranas bajo un sistema biaxial de esfuerzos impuesto mediante su indentación esférica. Al observar esta gráfica resulta evidente que, en tracción biaxial no existe una diferencia significativa entre los módulos elásticos determinados por los distintos métodos (i.e. modelo de Begley, expresión general e imagen lateral); de tal forma que nuevamente queda comprobada la consistencia, precisión y utilidad de los modelos y metodologías desarrolladas en el presente trabajo de investigación, perfilándose así como una herramienta útil para caracterizar mecánicamente este tipo de materiales.

Por otro lado, comparando el módulo elástico estimado mediante tracción uniaxial con aquel determinado mediante tracción biaxial (Figura 5.6), resulta evidente que, en algunos casos, el mismo hidrogel híbrido puede presentar un comportamiento mecánico diferente dependiendo de su composición y del sistema de esfuerzos al que se encuentre sometido. En este sentido, a

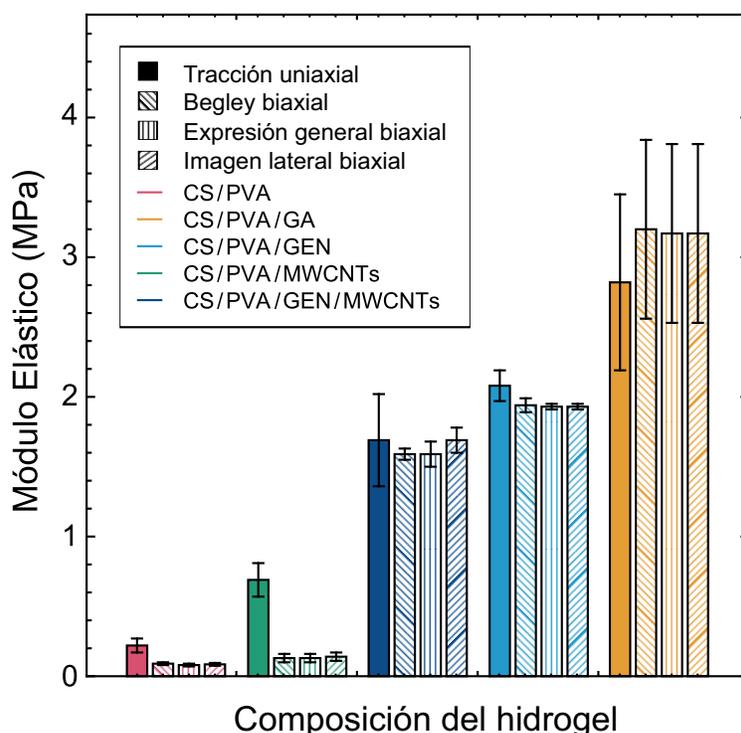


Figura 5.6 Comparación del módulo elástico bajo tracción uniaxial y biaxial de los hidrogeles de CS/PVA, CS/PVA/GA, CS/PVA/GEN, CS/PVA/MWCNTs y CS/PVA/GEN/MWCNTs.

diferencia de los hidrogeles entrecruzados (i.e. CS/PVA/GA, CS/PVA/GEN y CS/PVA/GEN/MWCNTs), los hidrogeles híbridos de CS/PVA y CS/PVA/MWCNTs exhibieron un módulo elástico distinto, dependiendo del sistema de solicitaciones (uniaxial o biaxial) al que fueron expuestos. Así, el efecto del agente entrecruzante sobre la estructura química de los hidrogeles híbridos produce hidrogeles mecánicamente más estables, mostrando una repetitividad aceptable en su módulo elástico incluso utilizando diferentes métodos de evaluación. No obstante, se debe de poner especial atención cuando se evalúan las propiedades mecánicas de hidrogeles híbridos suaves cuyas cadenas poliméricas presentan un alto grado de movilidad; ya que su comportamiento variará significativamente dependiendo del sistema de esfuerzos al que se encuentren sometidos. Así, los hidrogeles de CS/PVA y CS/PVA/MWCNTs mostraron, respectivamente, módulos elásticos hasta tres y cinco veces más pequeños en tracción biaxial. Lo anterior podría deberse a que, debido a la carencia de una red polimérica tridimensional que se oponga/restrinja la deformación de las macromoléculas en múltiples direcciones, en estos materiales se podrían estar generando deformaciones altamente localizadas que afectan el comportamiento macromecánico de la membrana. A fin de confirmar estas suposiciones, en la siguiente sección se presentarán los resultados del análisis micromecánico mediante correlación de imágenes en 3D.

5.3.2 Comportamiento micromecánico de los hidrogeles

La Figura 5.7 muestra la respuesta micromecánica de los hidrogeles híbridos bajo un sistema biaxial de esfuerzos. Cabe recordar que, la deformación de las membranas fue determinada a través del análisis mediante 3D-DIC de los pares de imágenes capturados por el sistema de visión estereoscópica durante el ensayo de indentación. De manera que, en la columna izquierda de dicha figura se presentan los campos de microdeformación correspondientes a una indentación $\delta = 8.5$ mm (Figura 5.7; A, C, E, G e I). Imágenes similares fueron obtenidas para 2 mm, 4, mm y 6 mm de indentación; sin embargo, solo se presentan los resultados de la indentación máxima a la que fue sometido cada material. Al observar los campos de microdeformaciones exhibidos por los hidrogeles es posible percatarse que existen pequeñas zonas en las cuales no fue asignado un color; lo cual se debe a la pérdida de la correlación durante el análisis por DIC como resultado de los cambios de brillo que se generan en la superficie de la membrana durante su indentación, esto debido al estado hidratado en el que se encontraban los hidrogeles.

Por otro lado, las gráficas de la columna derecha en la Figura 5.7 (graficas B, D, F, H y J) corresponden a la deformación que presentan las membranas a lo largo de una sección vertical localizada en el centro de la muestra; obteniendo así el perfil de microdeformaciones asociado a

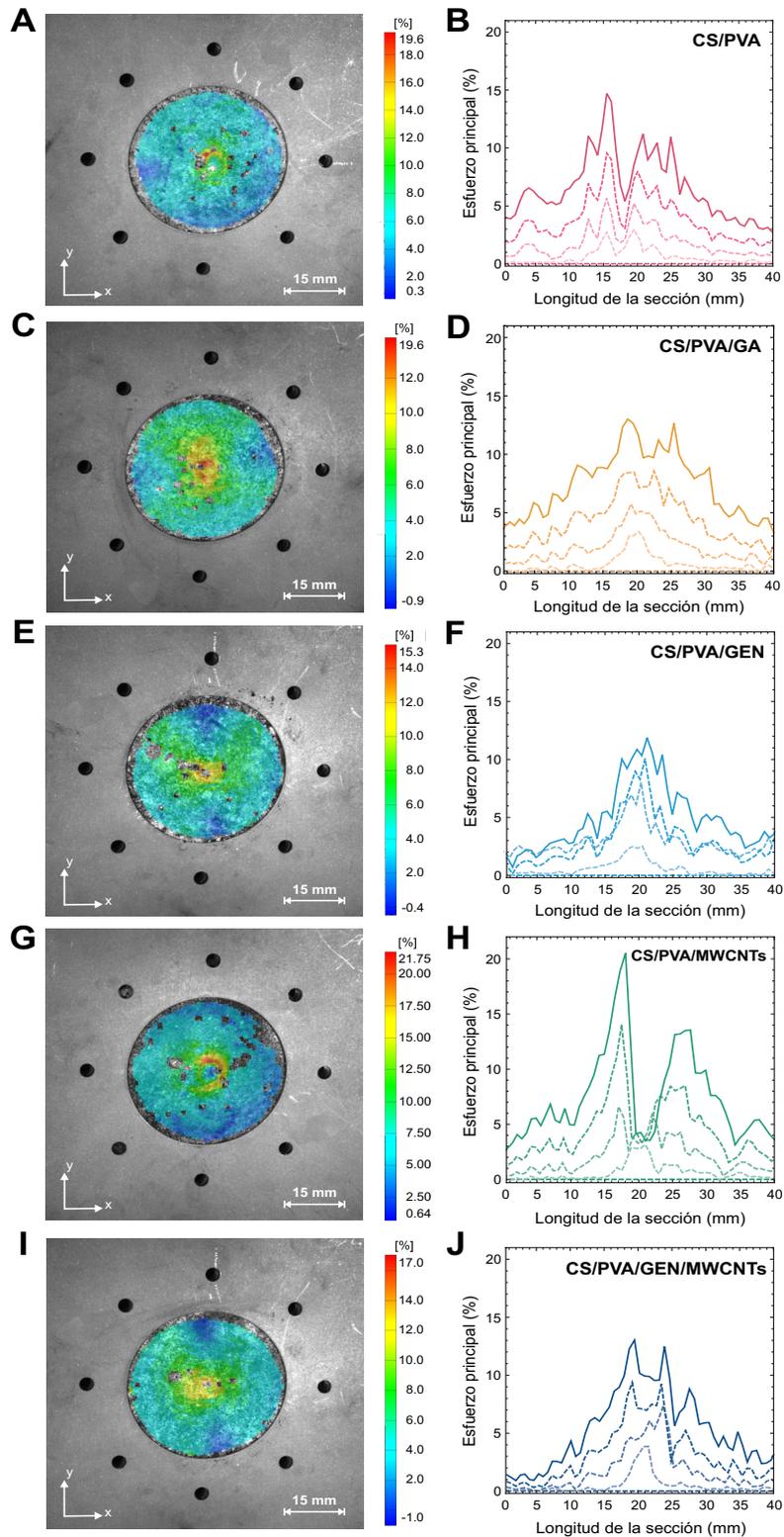


Figura 5.7 Respuesta micromecánica de los hidrogeles híbridos mediante correlación de imágenes digitales en 3D. La columna de la izquierda representa el campo de microdeformaciones exhibido por las membranas al ser indentadas 8.5 mm. El porcentaje de deformación principal como una escala de color, obtenida mediante 3D-DIC, es mostrada a un costado. Por otro lado, la columna de la derecha muestra los perfiles de deformación a distintas deflexiones (2 mm, 4 mm, 6 mm y 8.5 mm) para una sección longitudinal que pasa a través del centro de la membrana (alineada con el eje y).

la imagen capturada por el módulo de visión lateral, pero desde una perspectiva frontal de la deformación que experimenta la membrana.

Al comparar todos estos resultados es evidente que, los hidrogeles que no fueron químicamente entrecruzados (i.e. CS/PVA y CS/PVA/MWCNTs, Figura 5.7 A-B y G-H, respectivamente) muestran campos de deformación más heterogéneos y experimentan mayores niveles de deformación local a lo largo de la región de contacto con el indentador que aquellos entrecruzados con GA o GEN. Lo cual, es debido a que una red sin puntos de entrecruzamiento favorece el grado de movilidad polimérica, de modo que las cadenas son capaces de elongarse y reorientarse libremente, ocasionando deformaciones heterogéneas. Así los hidrogeles de CS/PVA y CS/PVA/MWCNTs muestran importantes gradientes de deformación, particularmente, en la zona de contacto con el indentador. Por el contrario, los perfiles de deformación de los hidrogeles entrecruzados (i.e. CS/PVA/GA, CS/PVA/GEN y CS/PVA/GEN/MWCNTs) presentan cambios graduales en la misma zona de interés, esto debido a la restricción en movimiento y orientación que impone la red macromolecular. Así, al comparar la deformación principal máxima que experimenta cada una de las membranas en la región de indentación, se encontró que los hidrogeles híbridos entrecruzados tuvieron una microdeformación de entre 12% y 13%; lo cual significa que fue, aproximadamente, 8% menor a la deformación principal experimentada por los hidrogeles de CS/PVA y CS/PVA/MWCNTs.

Respecto a la adición de MWCNTs en los hidrogeles de CS/PVA y CS/PVA/GEN, no se observaron cambios significativos en la distribución heterogénea de las deformaciones (Figura 5.7, G e I, respectivamente); sin embargo, sí se apreció un ligero incremento en la proporción de deformación máxima respecto a sus símiles sin cargar, siendo dicho aumento de aproximadamente 6% para los hidrogeles de CS/PVA/MWCNTs (Figura 5.7, H) y de alrededor de 1% para los de CS/PVA/GEN/MWCNTs (Figura 5.7, J). De modo que, a pesar de que la contribución de los MWCNTs no es significativa nuevamente se comprueba que, en el caso de los hidrogeles entrecruzados y cargados con MWCNTs, los nanotubos realmente no ejercen su función de refuerzo mecánico debido a la poca o nula área interfacial que se podría estar generando entre estos y la matriz polimérica de CS/PVA/GEN.

5.4 COMPORTAMIENTO OPTO-MECÁNICO

Mientras que la mayoría de los esfuerzos en el campo de los hidrogeles nanocompuestos con CNTs se han enfocado en mejorar sus propiedades pasivas (i.e. mecánicas, eléctricas y térmicas), se ha reportado que en las matrices poliméricas de PDMS, las nanopartículas de

carbono producen efectos térmicos y mecánicos localizados como respuesta a un estímulo externo. De modo que, al ser expuestas a una radiación infrarroja, las membranas nanocompuestas de PDMS son capaces de contraerse o expandirse, teniendo aplicaciones potenciales como sistemas de liberación de fármacos, andamios celulares, terapias localizadas y como sensores o actuadores en microfluídica, entre otras [22, 133]. Así, con la finalidad de determinar si dicho fenómeno es propio de ese sistema o si se podría presentar en los hidrogeles de CS/PVA cargados con MWCNTs, este grupo de hidrogeles fue sometido a un ensayo adicional.

En la Figura 5.8 A y B se muestran las curvas de esfuerzo como función del tiempo (σ vs. t) de las muestras hidratadas de CS/PVA/MWCNTs y CS/PVA/GEN/MWCNTs, respectivamente. Como se puede observar en estas gráficas, las muestras fueron pretensadas y una vez que se alcanzó el equilibrio en la relajación del material, se encendió un diodo láser a diferentes potencias (i.e. 100 mW - 500 mW) esperando ver un cambio en el esfuerzo (incremento/decremento) debido a posibles microdeformaciones inducidas por la absorción de la radiación infrarroja. No obstante, en ninguno de los dos hidrogeles se observó tal fenómeno. Lo anterior podría deberse a que, debido a las condiciones de iluminación necesarias para llevar a cabo estos ensayos, los hidrogeles se van deshidratando rápidamente a lo largo de la prueba, lo que ocasiona que su red polimérica se contraiga y se produzca un incremento gradual en el esfuerzo detectado (Figura 5.8 A y B); de manera que, la magnitud de este esfuerzo posiblemente estaría enmascarando al esfuerzo opto-mecánico que se pudiera producir. Si bien, en el caso de los hidrogeles de CS/PVA/GEN/MWCNTs fue detectado un decremento en esfuerzo cuando el láser se encendió a 500 mW (Figura 5.8 B), este se asocia a la combustión de la muestra en el sitio de irradiación debido la alta potencia del láser.

Ya que el comportamiento opto-mecánico de los hidrogeles nanocompuestos no pudo ser evaluado en estado hidratado, se decidió llevar a cabo una prueba con los materiales secos. Así, las Figura 5.8 C y D corresponden a las gráficas σ vs. t de los hidrogeles de CS/PVA/MWCNTs y CS/PVA/GEN/MWCNTs, en estado deshidratado. A diferencia del caso anterior, cuando los hidrogeles se encuentran secos, sí fue posible observar un cambio en el esfuerzo mientras las muestras son irradiadas; de manera que, en ambos materiales, se aprecian decrementos en el esfuerzo a partir del uso de potencias de 200 mW. Así, las microdeformaciones reversibles generadas por la radiación infrarroja provocaron cambios en el esfuerzo ($\Delta\sigma_{light}$) de -390 kPa, -450 kPa, -1270 kPa y -230 kPa en los hidrogeles de CS/PVA/MWCNTs para potencias de 200 mW, 300 mW, 400 mW y 500 mW, respectivamente; mientras que, para los hidrogeles entrecruzados y nanocompuestos (i.e. CS/PVA/GEN/MWCNTs) los $\Delta\sigma_{light}$ fueron

de -10 kPa, -15 kPa, -19 kPa y -35 kPa para potencias de 200 mW, 300 mW, 400 mW y 500 mW, respectivamente.

El hecho de que en ambos casos el efecto opto-mecánico que experimentan las membranas se vea reflejado como un decremento en esfuerzo, es un indicativo de que el hidrogel pretensado se expande. Es decir, al ser irradiadas, los CNTs actúan como microcalentadores de las cadenas poliméricas cercanas a ellos, ocasionando un movimiento en ellas debido al incremento de la

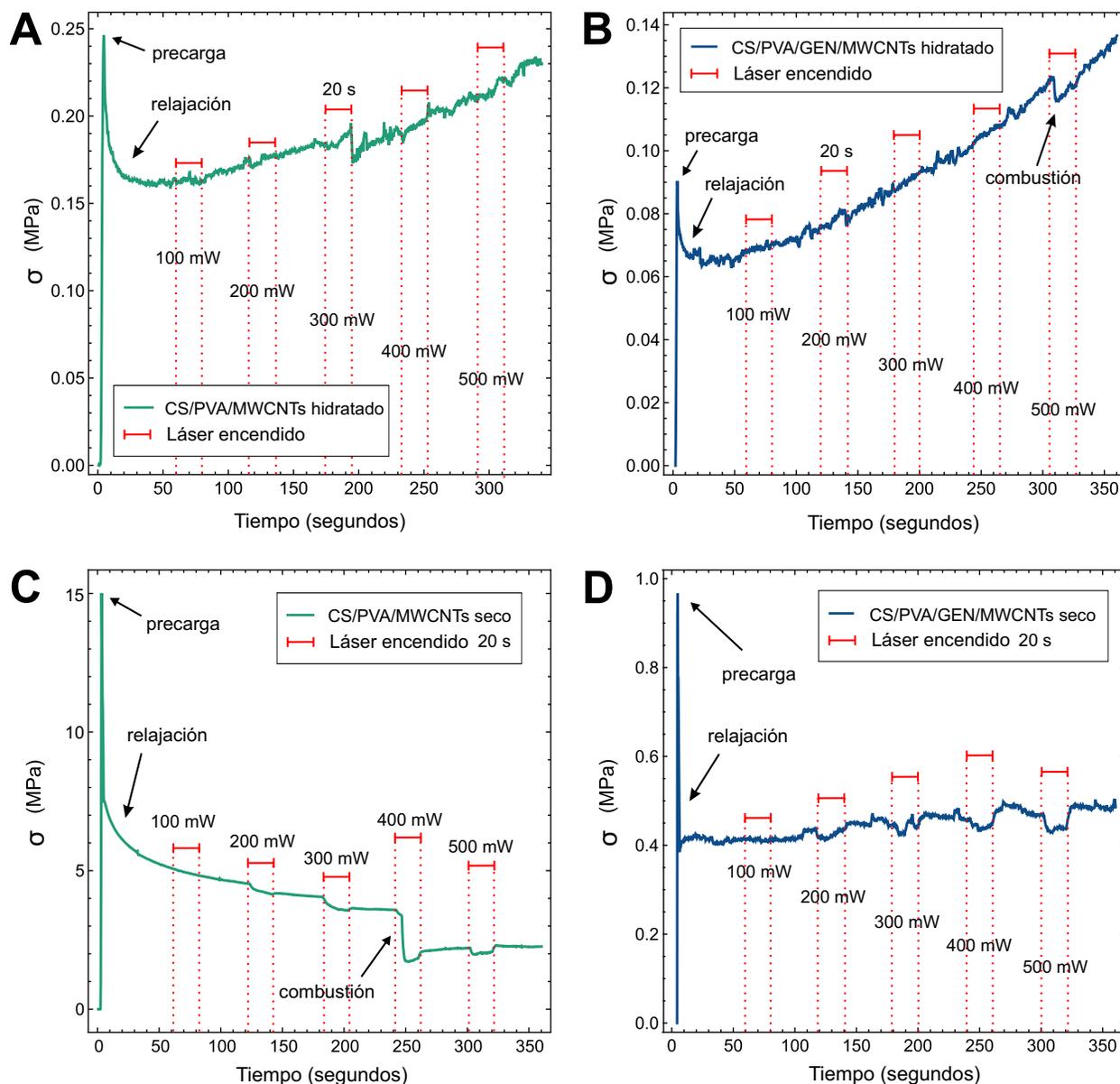


Figura 5.8 Comportamiento opto-mecánico de los hidrogeles híbridos nanocompuestos. A y B) Respuesta opto-mecánica de los hidrogeles de CS/PVA/MWCNTs y CS/PVA/GEN/MWCNTs hidratados al equilibrio, respectivamente. C y D) Respuesta opto-mecánica de los hidrogeles de CS/PVA/MWCNTs y CS/PVA/GEN/MWCNTs secos, respectivamente.

temperatura; el cual, ocasiona que la red polimérica se distienda debido a que, a la predeformación aplicada, no todas las cadenas estaban alineadas y tenían mayor libertad de movimiento. De acuerdo con Ahir et al. [25], la contracción o expansión de las membranas de PDMS/MWCNTs depende de la predeformación aplicada (con una deformación mayor al 10% se contraen y menor al 10% se expanden); lo cual también se cumple para los hidrogeles de CS/PVA/MWCNTs y CS/PVA/GEN/MWCNTs; ya que, durante la precarga, a ambas muestras se les aplicó una elongación de 2 mm, equivalente a una deformación del 9%.

Asimismo, es posible observar que el $\Delta\sigma_{light}$ fue mayor conforme la potencia del láser se incrementó; de modo que, los esfuerzos opto-mecánicos que se generan se pueden ajustar en función de la potencia de la radiación infrarroja suministrada. Cabe mencionar también que, los hidrogeles entrecruzados con GEN (i.e. CS/PVA/GEN/MWCNTs) presentaron $\Delta\sigma_{light}$ significativamente más pequeños. Lo que podría estar asociado principalmente a dos factores: por un lado, como ya se ha planteado anteriormente, el entrecruzamiento químico de la red polimérica limita la movilidad de las cadenas que la conforman, de modo que la expansión que pudieran experimentar se ve sumamente reducida en comparación con los hidrogeles de CS/PVA/MWCNTs. Por otro lado, la pobre interacción interfacial entre los MWCNTs y la matriz de CS/PVA/GEN podría estar dificultando la transmisión efectiva de la energía térmica generada por las nanopartículas, hacia las cadenas poliméricas cercanas a su superficie; de modo que, su movimiento y el esfuerzo resultante de este, quedan condicionados a la cantidad de energía recibida [87].

Además, vale la pena señalar que el esfuerzo opto-mecánico inducido en los hidrogeles secos de CS/PVA/MWCNTs está muy por encima del reportado en matrices de PDMS cargadas con SWCNTs, MWCNTs o nanopulvo de carbono (i.e. 10 kPa - 30 kPa) [133, 187]; mientras que, el presentado por los hidrogeles de CS/PVA/GEN/MWCNTs se encuentra dentro de estos valores, pero utilizando una concentración menor de nanopartículas (i.e. 0.2% masa/masa).

Así, a pesar de que el efecto opto-mecánico puede ser evaluado con los hidrogeles en estado deshidratado, resulta importante tener presente que su comportamiento es muy distinto una vez hidratados y en sus campos de aplicación siempre se encontrarán en dicho estado. Por tanto, a fin de evaluar el comportamiento opto-mecánico de los hidrogeles hidratados, se considera necesario diseñar e implementar un dispositivo que permita mantener la humedad de las muestras a lo largo de la prueba, tarea que por el momento queda fuera del alcance de los objetivos del presente trabajo de tesis.

CAPÍTULO 6

CARACTERIZACIÓN BIOLÓGICA

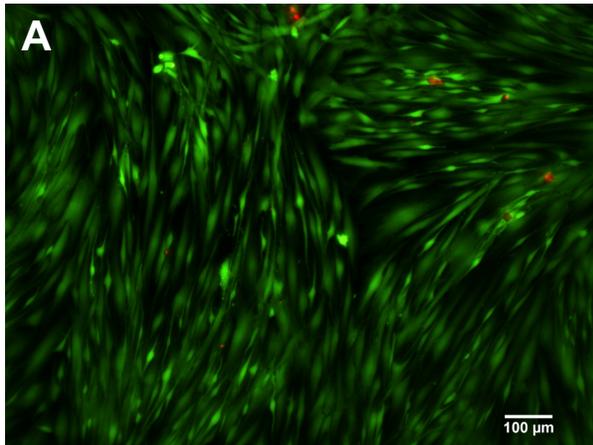
En este capítulo se presentan los resultados experimentales derivados de las pruebas biológicas a las cuales fueron sometidos los distintos grupos de hidrogeles híbridos sintetizados. Asimismo, se lleva a cabo un análisis de resultados en el que se integran las propiedades fisicoquímicas y mecánicas de los hidrogeles, a fin de entender y explicar de mejor manera la respuesta de las células a cada tipo de material (CS/PVA, CS/PVA/GA, CS/PVA/GEN, CS/PVA/MWCNTs y CS/PVA/GEN/MWCNTs). Cabe recordar que, los ensayos biológicos se llevaron a cabo en el Laboratorio de Inmunoterapia e Ingeniería de Tejidos de la Facultad de Medicina de la UNAM, utilizando fibroblastos dérmicos humanos para la formación de los constructos.

6.1 VIABILIDAD CELULAR

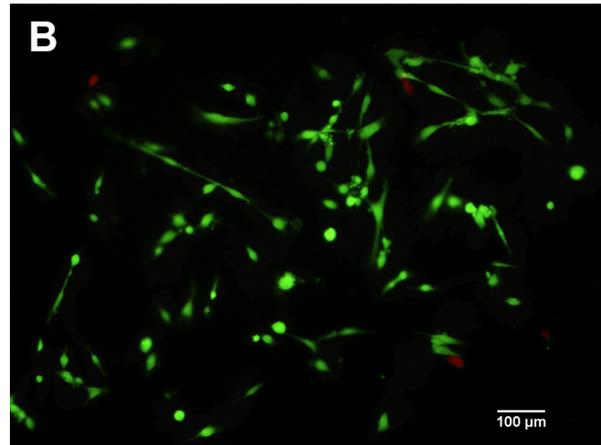
Es bien sabido que propiedades como la composición, el índice de hinchamiento, el ángulo de contacto, la carga superficial, la porosidad, la rugosidad y el módulo elástico de los biomateriales, son capaces de influir en el comportamiento de las células; por lo que entender la interacción célula-biomaterial es un primer paso para predecir la viabilidad de las membranas que pretendan ser utilizadas como andamios celulares en la regeneración de tejidos biológicos [10]. Uno de los ensayos frecuentemente utilizados para estudiar dichas interacciones son los cultivos celulares *in vitro*. Si bien, dichos cultivos no reproducen todo el abanico de condiciones celulares observadas *in vivo*, estos constituyen una primera aproximación para evaluar la citocompatibilidad del material y la viabilidad de las células sembradas sobre él.

Teniendo esto en consideración, la viabilidad de los fibroblastos dérmicos sembrados sobre la superficie de los hidrogeles de CS/PVA, entrecruzados y/o nanocompuestos, se estudió mediante pruebas con calceína-AM y homodímero de etídio a los 3, 7 y 21 días de cultivo *in vitro*. En la Figura 6.1 se muestran las micrografías de fluorescencia (10x) correspondientes a los fibroblastos sembrados sobre la caja de Petri (micrografía A, cultivo control) y sobre los hidrogeles de CS/PVA, CS/PVA/GA, CS/PVA/GEN, CS/PVA/MWCNTs y CS/PVA/GEN/MWCNTs (micrografías B-F, respectivamente), tras 21 días de cultivo *in vitro*. En ellas es posible apreciar en color verde las células vivas y en rojo las muertas.

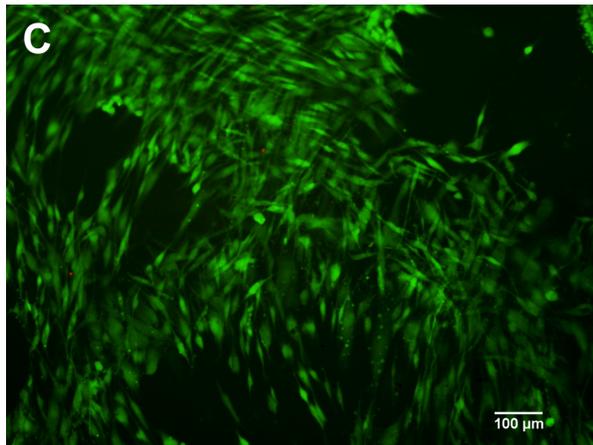
CULTIVO CONTROL



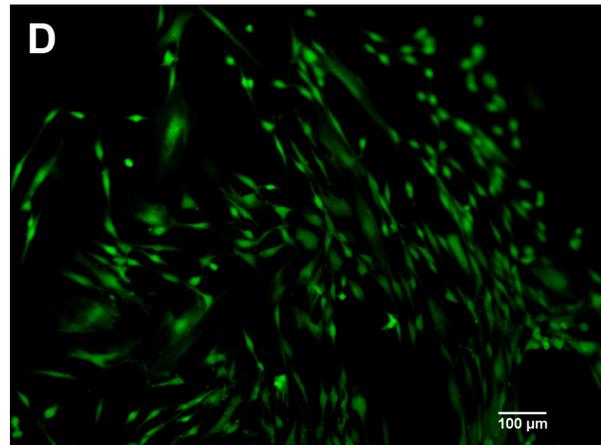
CS/PVA



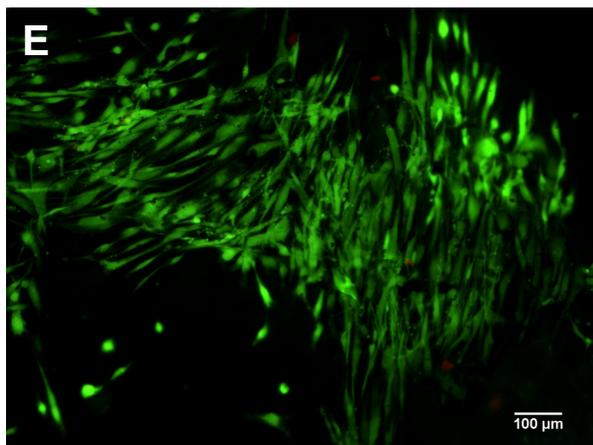
CS/PVA/GA



CS/PVA/GEN



CS/PVA/MWCNTs



CS/PVA/GEN/MWCNTs

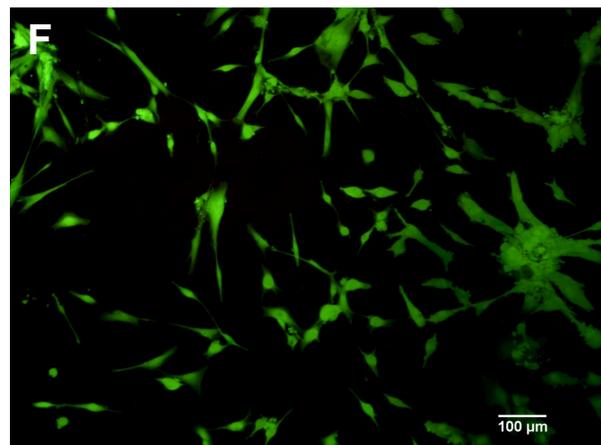


Figura 6.1. Micrografías de fluorescencia (10x) del cultivo control y de los constructos sometidos a la prueba de viabilidad celular mediante calceína-AM y homodímero de etidio tras 21 días de cultivo in vitro. En color verde se observan los fibroblastos vivos y los muertos en rojo. El porcentaje de viabilidad de los hidrogeles fue del 95%-99%.

El porcentaje de viabilidad de los fibroblastos sobre los hidrogeles se obtuvo comparando directamente la cantidad de células vivas (i.e. células verdes) en relación con el número total de células adheridas a la superficie de los hidrogeles (i.e. células verdes + rojas); de manera que su valor osciló entre el 95% - 99%, siendo los hidrogeles entrecruzados (i.e. CS/PVA/GA, CS/PVA/GEN y CS/PVA/GEN/MWCNTs) los que presentaron el porcentaje de viabilidad más alto. Con esto es posible concluir que, tras 21 días de cultivo *in vitro*, no se observan efectos citotóxicos por parte de ninguno de los hidrogeles híbridos estudiados y aparentemente estos promueven la adhesión celular.

En la Figura 6.1 es posible observar que, tras 21 días de cultivo *in vitro*, los hidrogeles de CS/PVA/GA y CS/PVA/MWCNTs (Figura 6.1 C y E, respectivamente) mostraron una mayor densidad de fibroblastos adheridos a su superficie respecto al resto de materiales, mientras que los hidrogeles control de CS/PVA (Figura 6.1 B) tuvieron la menor. Asimismo, es posible apreciar que algunos de los fibroblastos adheridos a los hidrogeles control todavía exhibían una morfología poligonal en comparación con los presentes sobre los hidrogeles entrecruzados y/o nanocompuestos, en los cuales las células ya habían adoptado una morfología fusiforme, similar a la de los fibroblastos dérmicos del cultivo control (Figura 6.1 A).

La adhesión celular que presentan los hidrogeles de CS/PVA/GA y CS/PVA/MWCNTs puede estar relacionada con su hidrofiliidad de superficie; ya que, de acuerdo con lo reportado por Gupta et al. [156], ángulos de contacto entre 55° y 75° favorecen la adhesión de fibroblastos sobre superficies poliméricas. De manera que, con estos resultados y con aquellos presentados en la Sección 3.6.2 (Capítulo 3) es posible confirmar dicha proposición; pues como se recordará, el ángulo de contacto (CA) de los hidrogeles de CS/PVA/GA y CS/PVA/MWCNTs fue de $60^\circ \pm 3^\circ$ y $67^\circ \pm 3^\circ$, respectivamente. Asimismo, los hidrogeles de CS/PVA/GEN que tuvieron un CA de $76^\circ \pm 2^\circ$, ubicado en el límite superior del intervalo marcado por Gupta et al., también presentaron una un gran número de células adheridas a su superficie, las cuales tuvieron una morfología predominantemente fusiforme. Mientras que, los hidrogeles de CS/PVA/GEN/MWCNTs que tuvieron un CA hidrófobo mayor al señalado por Gupta et al. (i.e. $84^\circ \pm 7^\circ$), presentaron células en su mayoría fusiformes, pero en menor cantidad que los hidrogeles de CS/PVA/GA, CS/PVA/GEN y CS/PVA/MWCNTs.

De esta manera, a pesar de que la prueba de viabilidad/citotoxicidad mediante calceína-AM y homodímero de etidio no es un ensayo propiamente diseñado para evaluar la morfología celular, las micrografías obtenidas fueron útiles para valorar rápidamente y de forma indirecta la configuración que adquirirían los fibroblastos al adherirse a la superficie de los distintos tipos de hidrogeles híbridos. A fin de presentar un análisis cuantitativo sobre la morfología de los fibroblastos, las micrografías de fluorescencia a 4x serán analizadas en la Sección 6.3. del

presente capítulo, mediante el uso de parámetros más apropiados (i.e. el diámetro máximo de Feret y el coeficiente de excentricidad) a través del software especializado *CellProfiler*.

6.2 CONTEO CELULAR

De acuerdo con lo reportado en la literatura la proliferación, la viabilidad y la diferenciación celular son parámetros altamente dependientes de la adhesión y la morfología de las células durante la fase de cultivo *in vitro* de los constructos [57, 88]. De manera que, los biomateriales que pretendan ser utilizados en aplicaciones de ingeniería de tejidos, no solamente deberán ser citocompatibles y servir como apoyo en la adhesión celular, sino que también deberán de promover la proliferación de las células adheridas a ellos [115].

El método más directo para obtener información sobre la proliferación celular consiste en contar las células adheridas a un sustrato a lo largo de un determinado periodo de tiempo. A fin de obtener información detallada sobre el número, el tamaño y la forma de los fibroblastos adheridos a los hidrogeles durante el periodo de cultivo *in vitro* (i.e. 3, 7 y 21 días), las micrografías de fluorescencia capturadas a un aumento de 4x fueron sometidas a un análisis por procesamiento de imágenes mediante el uso del software especializado *CellProfiler*.

En la Figura 6.2 se presentan los resultados del conteo celular a los 3, 7 y 21 días de cultivo *in vitro* de los constructos formados a partir de los hidrogeles de CS/PVA, entrecruzados y/o nanocompuestos, y de los fibroblastos dérmicos. Como se puede observar en esta gráfica los hidrogeles control de CS/PVA y los hidrogeles entrecruzados con genipin (i.e. CS/PVA/GEN y CS/PVA/GEN/MWCNTs) presentaron una misma tendencia de proliferación; mientras que los hidrogeles de CS/PVA/GA y CS/PVA/MWCNTs mostraron otra.

De acuerdo con el análisis realizado, en los hidrogeles de CS/PVA, CS/PVA/GEN y CS/PVA/GEN/MWCNTs (Figura 6.2, barras de color rojo, azul claro y azul fuerte, respectivamente) los fibroblastos se replican de manera logarítmica conforme se incrementa el tiempo de cultivo; lo cual, coincide con el comportamiento reportado en la literatura para cultivos celulares en proliferación [188, 189]. Dicha fase de crecimiento logarítmico (LOG), como se puede apreciar en la Figura 6.2, se caracteriza por un marcado incremento en el número de células, siendo este de aproximadamente el doble [189].

Por otro lado, en los hidrogeles de CS/PVA/GA y CS/PVA/MWCNTs los fibroblastos presentaron una tendencia un poco distinta, dado que al principio exhiben lo que parece ser una fase de latencia, con muy pocas células (3-7 días) y posteriormente una fase LOG (7-21 días).

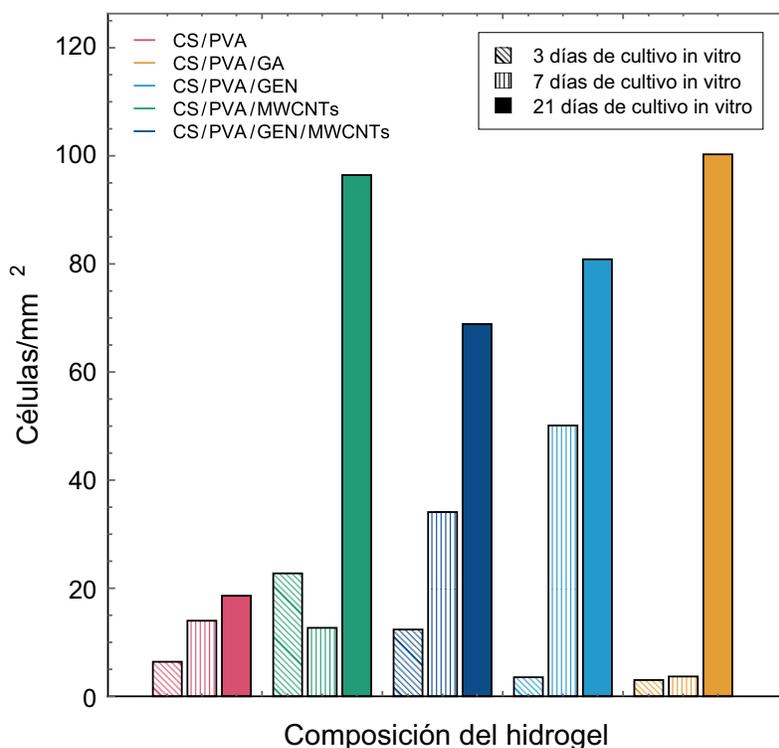


Figura 6.2 Gráfica de conteo celular de los constructos ensayados.

En la fase de latencia, los fibroblastos se encuentran en un periodo de adaptación al nuevo sustrato, por lo cual no comienzan a replicarse de inmediato y el número de células se mantiene prácticamente constante (Figura 6.2, barras achuradas de color amarillo), o incluso se presentan algunas muertes celulares (Figura 6.2, barras achuradas de color verde); de modo que, en esta fase no hay gran actividad metabólica y las células únicamente sintetizan las enzimas y moléculas necesarias para adherirse a los hidrogeles y comenzar a replicarse. Posterior al periodo de latencia, estos constructos experimentaron un marcado incremento en el número de células, siendo a los 21 días de cultivo *in vitro* los que mayor número de células tenían.

Cabe resaltar que justo estos dos sustratos (i.e. CS/PVA/GA y CS/PVA/MWCNTs) poseen componentes que frecuentemente son reportados en la literatura como elementos citotóxicos, a saber, el GA y los MWCNTs; no obstante, estos resultados experimentales demuestran lo contrario. La mayoría de los ensayos de proliferación en los que se reporta la citotoxicidad de estos componentes se llevan a cabo hasta los 7 días, por lo que resulta lógico afirmar que el GA y los MWCNTs son agentes citotóxicos que no promueven o inhiben la proliferación celular; sin embargo, cuando el cultivo se lleva a un periodo de cultivo más largo, los constructos con GA o MWCNTs muestran diferencias significativas al compararlos con los hidrogeles control de CS/PVA. De manera que, en ambos mejora significativamente el número de células adheridas a

la superficie de los hidrogeles de CS/PVA a partir de los 7 días de cultivo *in vitro*, sin comprometer la viabilidad o la morfología de las células. Resultados similares, han sido recientemente reportados por Aryaei et. al. [190] y Liao et. al. [30], para membranas electrohiladas de PVA/CS con MWCNTs.

Tras 21 días de cultivo *in vitro*, los hidrogeles que mostraron el mayor número de células adheridas a su superficie fueron los de CS/PVA/GA y CS/PVA/MWCNTs, seguidos de los hidrogeles entrecruzados con GEN (i.e. CS/PVA/GEN y CS/PVA/GEN/MWCNTs) y, finalmente, con una proliferación 5 veces menor a la presentada por los hidrogeles entrecruzados GA, se encuentra la mezcla control CS/PVA.

Estos resultados nuevamente confirman lo estipulado por Gupta et al. [156], ya que al observar la Figura 6.2 es posible percatarse que justo los hidrogeles con CA entre 55° y 76° (i.e. CS/PVA/GA, CS/PVA/GEN y CS/PVA/MWCNTs) son los que presentan la mayor proliferación celular, tal como se venía discutiendo desde la sección anterior. De modo que, la hidrofiliidad/hidrofobicidad de superficie de los hidrogeles es uno de los parámetros que más influye tanto en la adhesión celular, como en la tasa de proliferación.

Por otro lado, se ha reportado que el modulo elástico de las membranas es otro de los factores relevantes en el mecanismo de adhesión y proliferación celular; de manera que, de acuerdo con Gao et al. [84], los hidrogeles más suaves propician una morfología redonda en los fibroblastos. Lo cual se cumple para los hidrogeles de CS/PVA, pero no así para los de CS/PVA/MWCNTs. Cabe recordar que ambos hidrogeles presentan los módulos elásticos más pequeños tanto en tracción uniaxial como en tracción biaxial (Capítulo 5, Secciones 5.1 y 5.3); sin embargo, después de 21 días de cultivo, únicamente los constructos de CS/PVA presentan células con morfología redondeada y un menor número de células sobre su superficie..

Cabe mencionar que, tras 21 días de cultivo bajo condiciones *in vitro*, en ningún caso las células cubrían la totalidad de la superficie de las membranas, por lo cual, no se cuenta con constructos confluentes y los fibroblastos tienen la posibilidad de seguir replicándose y migrando hacia las zonas despobladas. Conforme a los resultados obtenidos en esta sección, es posible asegurar la viabilidad y la proliferación de los fibroblastos sobre los hidrogeles de CS/PVA, entrecruzados y/o nanocompuestos, descartándose la citotoxicidad de cualquiera de estos materiales.

6.3 ANÁLISIS MORFOLÓGICO Y DIMENSIONAL

De acuerdo con McKenzie et. al. [191] la morfología y tamaño de las células puede proporcionar evidencia de su grado de compatibilidad con el material. De esta forma, un indicador de que una célula interactúa bien con el material empleado como andamio, es la rapidez con la que se extiende sobre la superficie y pierde la forma esférica que asumió mientras se encontraba en un medio acuoso (suspensión celular), para adherirse al sustrato y comenzar proliferar.

Así, con el fin de evaluar la compatibilidad entre los fibroblastos y los hidrogeles de CS/PVA, entrecruzados y/o nanocompuestos, las micrografías de fluorescencia (4x) a los 3, 7 y 21 días de cultivo *in vitro* fueron sometidas a un análisis de imagen mediante el software *CellProfiler* para determinar el tamaño y la forma de los fibroblastos presentes en los constructos.

6.3.1 Evaluación del tamaño de los fibroblastos

El tamaño de los fibroblastos adheridos a la superficie de los hidrogeles fue evaluado utilizando el diámetro máximo de Feret. Dicho parámetro es frecuentemente usado en microscopía para determinar el diámetro promedio de partículas con geometría irregular, de tal forma que este se representa como la distancia entre dos líneas paralelas que son tangenciales al contorno de la proyección de la partícula [136].

En la primera columna de la Figura 6.3 se presenta la evaluación estadística de la longitud máxima (diámetro de Feret) del número total de células vivas, presentes sobre la superficie de durante el periodo de cultivo *in vitro*. Mientras que las columnas restantes muestran las micrografías a los 3, 7 y 21 días de cultivo *in vitro*.

La primera fila de la Figura 6.3 muestra la distribución estadística, del diámetro máximo de Feret de los fibroblastos sembrados sobre los hidrogeles de CS/PVA. En este caso los diámetros promedio de las células fueron de 58.7 μm , 48 μm y 49.7 μm para 3, 7 y 21 días, respectivamente; observándose, asimismo, un aumento en el número de células por mm^2 de 6.4, 14 y 18.6 durante el mismo número de días. De manera que, a pesar de no haber una diferencia significativa en la longitud de las células durante el periodo de cultivo *in vitro*, éstas fueron incrementando lentamente su número, tal como se había observado en la sección anterior.

Por otro lado, en los constructos formados por los hidrogeles químicamente entrecruzados, CS/PVA/GA y CS/PVA/GEN (Figura 6.3 B y C, respectivamente), se observó un pequeño número de células al inicio del periodo de cultivo; el cual, al igual que su diámetro máximo de Feret, fue incrementándose conforme transcurrieron los días. Así en los hidrogeles de CS/PVA/GA los

fibroblastos mostraron un diámetro máximo promedio de 50.16 μm , 51.09 μm y 49.27 μm para 3, 7 y 21 días de cultivo, respectivamente; mientras que, sobre los hidrogeles de CS/PVA/GEN sus diámetros de Feret fueron de 40.1 μm , 40.2 μm y 46.9 μm para los mismos días. Estos resultados muestran que las células adheridas a los hidrogeles entrecruzados con GA presentaban una mayor longitud, lo cual puede deberse, por un lado, a la rigidez del sustrato (Sección 5.1) y por el otro, a su CA, el cual como ya se había comentado anteriormente, se encuentra dentro del intervalo idóneo reportado para el cultivo de fibroblastos [155].

Los constructos de los hidrogeles nanocompuestos de CS/PVA/MWCNTs (Figura 6.3 D) mostraron una distribución estadística similar a la presentada por los hidrogeles entrecruzados, de modo que los fibroblastos fueron incrementando sus dimensiones a lo largo del periodo de cultivo *in vitro*. Así, los diámetros de Feret promedio que estas células presentaron fueron de 46.3 μm , 50.9 μm y 54.8 μm para 3, 7 y 21 días, respectivamente. Mientras que, en los hidrogeles de CS/PVA/GEN/MWCNTs (Figura 6.3 E) se observó una variación en la longitud de las células durante el cultivo *in vitro*, de modo que a los 3, 7 y 21 días sus diámetros promedio fueron de 35.1 μm , 85.3 μm y 43.9 μm , respectivamente. No obstante, como se puede observar en la Figura 6.2, las células continuaron proliferando rápidamente.

En la última columna de la Figura 6.3 se muestran las micrografías de los constructos tras 21 días de cultivo *in vitro*; en ellas los fibroblastos se encuentran coloreados conforme a su diámetro máximo de Feret, de tal manera que la escala de color a la derecha clasifica su dimensión de 0 μm a 300 μm (rojo a magenta). Al comparar los resultados de todos los hidrogeles a los 21 días, se puede observar que todas las membranas exhibieron una mejor proliferación celular que los hidrogeles control de CS/PVA. Asimismo, es fácil notar que los colores predominantes a los 21 días en todas las micrografías son el naranja, amarillo y verde; lo cual significa que las células presentan longitudes entre 30 μm y 110 μm , según la escala de color. Sin embargo, en cada material se observan diferentes proporciones de color. Por ejemplo, en los hidrogeles de CS/PVA y CS/PVA/GA predominan las células en colores naranja y amarillo que corresponden a 40 μm -70 μm ; mientras que, para los de CS/PVA/GEN se aprecian en mayor proporción células en color naranja, amarillo y verde, con tamaños entre 30 μm y 80 μm . En los hidrogeles de CS/PVA/MWCNTs un gran número de células presentaron diámetros de 60 μm – 90 μm , correspondientes a un color amarillo y verde; sin embargo, al entrecruzar e cargar la mezcla (CS/PVA/GEN/MWCNTs) se observó una disminución en el tamaño de las células de manera que los colores predominantes fueron el rojo y amarillo claro (20 μm - 60 μm).

De acuerdo con lo reportado en la literatura, los fibroblastos humanos tienen una longitud promedio de 50 μm -100 μm [189]. Por lo que, conforme a los resultados obtenidos hasta ahora, cualquiera de los hidrogeles híbridos de CS/PVA estudiados en este trabajo de investigación es

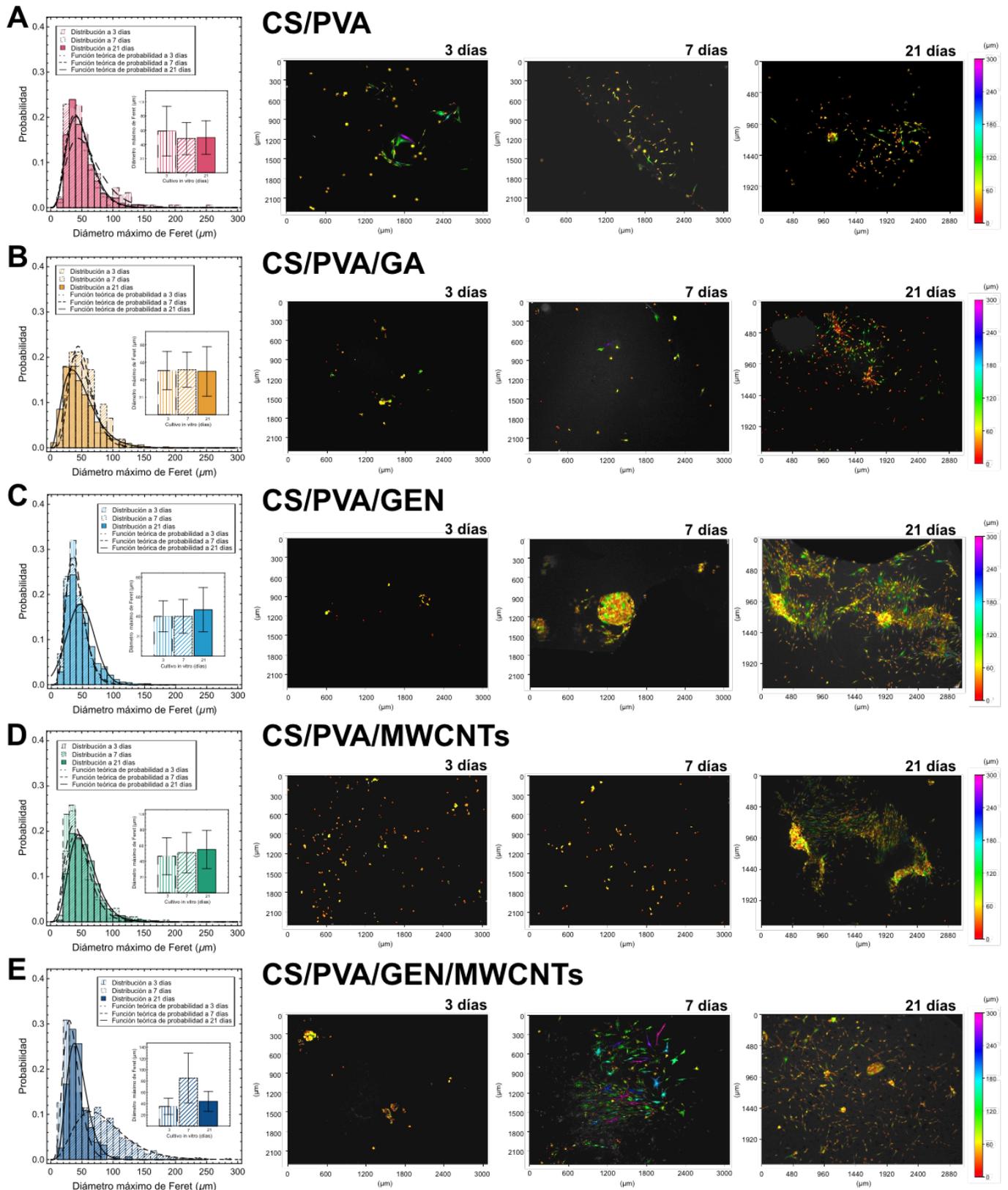


Figura 6.3 Evaluación de la longitud máxima (diámetro de Feret) de los fibroblastos a los 3, 7 y 21 días de cultivo *in vitro*. En la primera columna se muestra la distribución del tamaño presentado por las células y en las columnas restantes se aprecian las microfotografías (4X) tras el análisis de imagen que se llevó a cabo. La barra de color indica el tamaño de las células.

capaz de mantener sus dimensiones, de promover su proliferación celular y de no presentar un efecto citotóxico sobre ellos. Finalmente, en la siguiente subsección se evaluará la capacidad de estos materiales para mantener la morfología alargada (fusiforme), típica de este tipo de células.

6.3.2 Evaluación de la morfología de los fibroblastos

Es bien sabido que la morfología de los fibroblastos depende del tejido del cual formen parte al interior del organismo, así como de los estímulos a los que estén sometidos; sin embargo, por lo regular se trata de células fusiformes (i.e. forma de huso, ancha en el centro y delgada hacia los extremos), planas y con un gran tamaño (50 μm -100 μm de longitud) [189].

Así, el parámetro de excentricidad disponible en el software *CellProfiler* fue utilizado para evaluar la forma que los fibroblastos adquirirían al adherirse y permanecer sobre la superficie de los hidrogeles híbridos. De modo que, las células fueron ajustadas a una elipse para medir su grado de elongación (excentricidad) a través de la razón entre la longitud del semieje mayor y la distancia focal, obteniendo como resultado un valor entre 0 y 1, en donde ambos extremos son considerados casos degenerados. Así, una elipse con excentricidad igual a 0 es en realidad un círculo; mientras que, una elipse cuya excentricidad es 1 corresponde a un segmento de línea [137].

La Figura 6.4 muestra la excentricidad de las células a lo largo de todo el periodo de cultivo *in vitro* (i.e. 3, 7 y 21 días). En la primera columna de dicha figura es posible apreciar como las distribuciones de probabilidad, teóricas y experimentales, de todos los materiales experimentan un desplazamiento hacia la derecha conforme transcurre el tiempo de cultivo; lo cual indica que las células fueron adoptando una morfología más alargada, dejando de lado la forma esférica/poligonal que presentaban cuando fueron sembradas. Asimismo, debido a que la excentricidad de las células es un parámetro morfológico frecuentemente relacionado con la adhesión y proliferación celular [192]; estos resultados son un indicativo más de que las células efectivamente se adhieren a la superficie de los distintos tipos de hidrogel, adquieren una morfología alargada y proliferan (resultados que concuerdan con lo mostrado en la Sección 6.2).

A partir del análisis de las micrografías presentadas en la Figura 6.4 es posible apreciar como en el día 3 todas las membranas presentan células con morfología predominantemente elipsoidal, de manera que sus valores de excentricidad promedio fueron de 0.71, 0.51, 0.73, 0.69 y 0.71 para los hidrogeles de CS/PVA, CS/PVA/GA, CS/PVA/GEN, CS/PVA/MWCNTs y CS/PVA/GEN/MWCNTs, respectivamente. Cabe resaltar que las células presentes en los hidrogeles de CS/PVA, CS/PVA/GEN y CS/PVA/GEN/MWCNTs presentaron los valores de excentricidad más altos; de modo que, al ser más alargadas podrían proliferar más rápidamente,

lo cual tiene sentido si se recuerda que justo esos hidrogeles presentaron una fase de crecimiento logarítmico desde el día 3 (Sección 6.2).

Posteriormente, en el día 7 de cultivo *in vitro* se encontró que las excentricidades de los fibroblastos sobre los hidrogeles de CS/PVA/GEN permanecieron sin cambio respecto al día 3; sin embargo, en los hidrogeles de CS/PVA, CS/PVA/GA, CS/PVA/MWCNTs y CS/PVA/GEN/MWCNTs mostraron mayores valores de excentricidad (i.e. 0.77, 0.64, 0.71 y 0.80, respectivamente), de manera que las células se volvieron alrededor de un 10% más delgadas. Asimismo, conforme a los resultados previamente discutidos (Sección 6.3.1), este incremento en excentricidad también conllevó un incremento en el diámetro máximo de Feret. Finalmente, tras 21 días de cultivo *in vitro* los valores de excentricidad promedio de los fibroblastos sobre las membranas de CS/PVA, CS/PVA/GA, CS/PVA/GEN, CS/PVA/MWCNTs y CS/PVA/GEN/MWCNTs fueron de 0.77, 0.82, 0.79, 0.80 y 0.81, respectivamente. En donde los hidrogeles que mostraron un notorio incremento en excentricidad (i.e. CS/PVA/GA y CS/PVA/MWCNTs, los cuales registraron un aumento de 0.18 y 0.09, respectivamente), también fueron los que exhibieron la mayor tasa de proliferación celular (Figura 6.2). De manera que, los hidrogeles que presentaron las morfologías más fusiformes, también tuvieron las mayores dimensiones y proliferaron más rápido, siendo todo esto indicativo de una buena adhesión al sustrato.

En algunas de las micrografías mostradas en las Figura 6.3 y Figura 6.4 se aprecian algunos cúmulos de células, los cuales, muy probablemente se generaron durante el proceso de tripsinización de los cultivos utilizados para formar los constructos. Cabe mencionar, que en ambos análisis estos cúmulos no fueron considerados para obtener los valores promedio de excentricidad o diámetro máximo de Feret.

Todos los resultados derivados de la caracterización biológica sugieren que los hidrogeles híbridos de CS/PVA, entrecruzados y/o cargados con MWCNTs, son adecuados para el cultivo de fibroblastos dérmicos humanos; siendo los hidrogeles de CS/PVA/GA, CS/PVA/GEN y CS/PVA/MWCNTs los que presentan la mayor cantidad de células adheridos a su superficie tras 21 días de cultivo *in vitro*. Ningún hidrogel mostró ser citotóxico y en todos se aprecia un incremento en el número de células adheridas a su superficie a lo largo del periodo de cultivo *in vitro*, de manera que estas son capaces de mantener su morfología y tamaño característicos. De manera que, los hidrogeles podrían tener un uso potencial en ingeniería de tejidos y aplicaciones biomédicas.

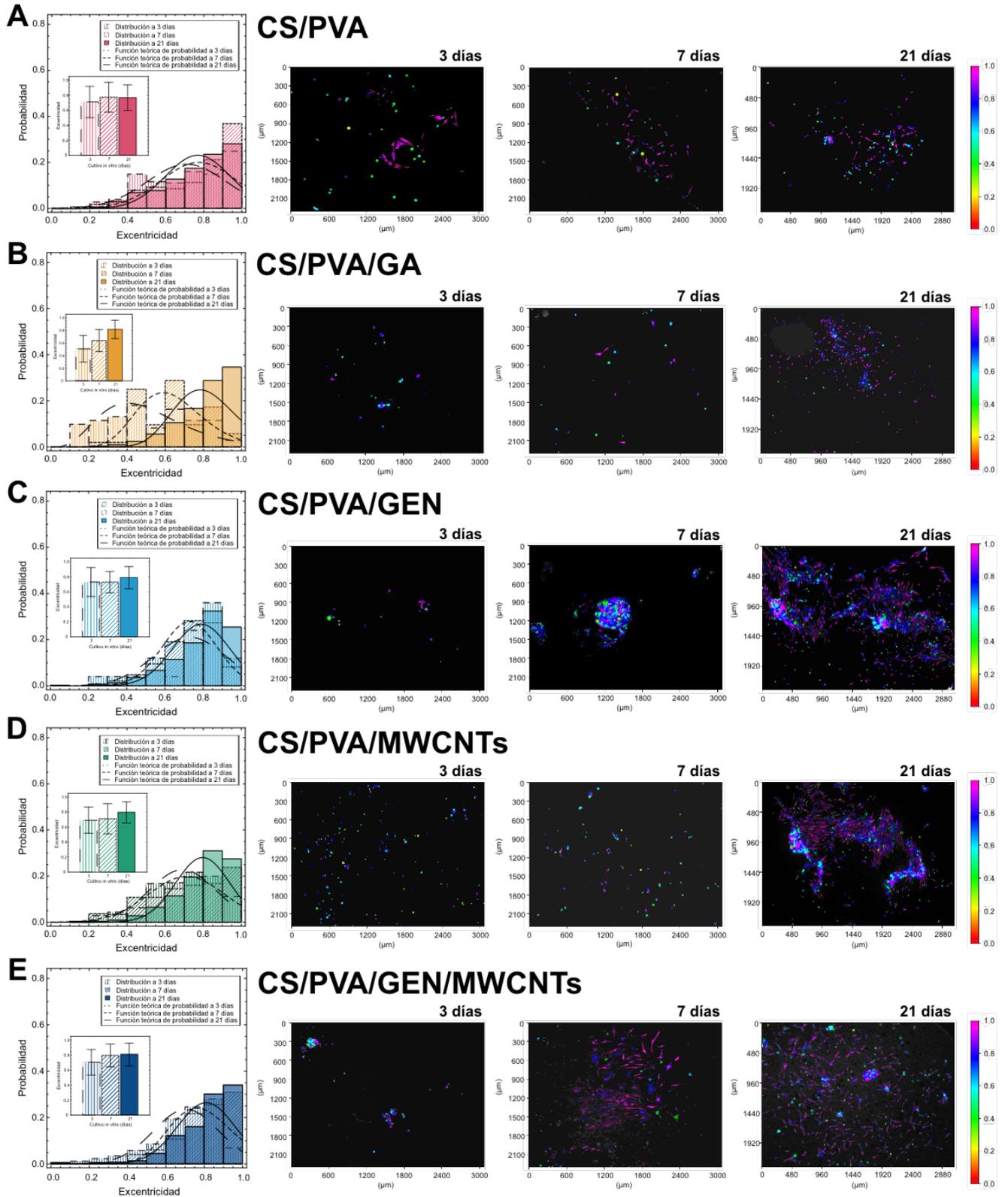


Figura 6.4 Evolución de la morfología exhibida por los fibroblastos a los 3, 7 y 21 días de cultivo in vitro. Valores de excentricidad de 0 hacen alusión a células redondas, mientras que un valor cercano a 1 es indicativo de células con forma alargada. En la 1er columna se muestra la distribución de probabilidad de la excentricidad de los fibroblastos y en las columnas restantes se aprecian las micrografías (4X) tras el análisis de imagen que se llevó a cabo.

A pesar de que en algunos trabajos se ha reportado que la R_{rms} de los materiales utilizados como andamios influye en la adhesión celular [84], durante el presente trabajo experimental, esta no tuvo una influencia significativa en la respuesta biológica de los fibroblastos, ya que los hidrogeles con un mayor número de células adheridos a su superficie (i.e. CS/PVA/GA, CS/PVA/GEN y CS/PVA/MWCNTs) fueron los que presentaron la menor y la mayor R_{rms} . De modo que, en cuanto a propiedades superficiales, tuvo mayor relevancia el CA de los hidrogeles; siendo el intervalo más idóneo para el cultivo de fibroblastos entre 55° - 80° .

Respecto a la respuesta mecánica, se encontró que el módulo elástico de los hidrogeles tampoco fue un factor determinante en la adhesión, proliferación y morfología de las células. Por lo que, la estructura química de la superficie (presencia de grupos -OH y -NH₂) dominó la respuesta biológica de estos materiales.

CAPÍTULO 7

CONCLUSIONES

Se demostró que mediante el método de la evaporación de los disolventes es posible obtener hidrogeles híbridos de CS/PVA, entrecruzados (i.e. CS/PVA/GA y CS/PVA/GEN) y/o nanocompuestos (i.e. CS/PVA/MWCNTs y CS/PVA/GEN/MWCNTs), en forma de membranas delgadas. A través de la adición de los agentes entrecruzantes (GEN o GA) y/o la incorporación de las nanopartículas (MWCNTs), se modificaron las propiedades fisicoquímicas y la arquitectura de la red polimérica de la mezcla CS/PVA, lo cual permitió obtener hidrogeles con una alta estabilidad mecánica y estructural a largo plazo en estado hidratado.

A través de los resultados de FT-IR se evidenció que los procesos de entrecruzamiento se llevaron a cabo de forma exitosa. Debido a la acción de los agentes entrecruzantes (GEN o GA) se formaron nuevos enlaces covalentes entre los grupos funcionales de las cadenas de CS y PVA, dando lugar a redes poliméricas semi-interpenetradas en el caso de los hidrogeles de CS/PVA/GEN y CS/PVA/GEN/MWCNTs, o bien, a redes poliméricas entrecruzadas en el caso de los hidrogeles de CS/PVA/GA. Asimismo se demostró que los MWCNTs, al no estar funcionalizados, no fueron capaces de formar enlaces covalentes con las macromoléculas de CS o PVA, por lo que únicamente se encuentran embebidos en la red polimérica que estas forman.

Por otra parte, el entrecruzamiento interfiere con el ordenamiento de las cadenas, reduciendo su grado de libertad y limitando e incluso previniendo la formación de regiones cristalinas. Así, el porcentaje de cristalinidad de los hidrogeles de CS/PVA/GEN y CS/PVA/GA se redujo aproximadamente 21% respecto a los hidrogeles control de CS/PVA. Por el contrario, la cristalinidad de los hidrogeles nanocompuestos aumentó un 13% debido a la adición de una pequeña cantidad de MWCNTs (i.e. 0.2% masa/masa). A diferencia de otro tipo de nanopartículas (silicio, cobalto, níquel, etc.) que obstaculizan el empaquetamiento regular de las cadenas poliméricas, el incremento en la cristalinidad sugiere que los MWCNTs actúan como sitios de nucleación propiciando la formación de regiones cristalinas, tal como ha sido reportado por otros investigadores [103].

Además, se observó que los agentes entrecruzantes actúan como barrera para minimizar la escisión y deshidratación de las cadenas macromoleculares presentes en la mezcla, mejorando así la estabilidad térmica de las membranas de CS/PVA. Dado que el entrecruzamiento químico de la mezcla CS/PVA da lugar a una red polimérica más rígida y estable que restringe el libre

movimiento de las macromoléculas, resulta necesario aplicar temperaturas más altas para inducir su movimiento colectivo en las regiones amorfas, lo cual se ve reflejado en el incremento de la T_g de los hidrogeles de CS/PVA/GA y CS/PVA/GEN. Por otro lado, los MWCNTs no optimizan la estabilidad térmica de los hidrogeles, ya que al no estar funcionalizados fueron incapaces de interrelacionarse con las macromoléculas para favorecer la formación de una interfase polímero-nanopartículas fuerte; provocando, por el contrario, el incremento del volumen libre entre cadenas y ocasionando que su movimiento colectivo se origine a menores temperaturas en los hidrogeles nanocompuestos (CS/PVA/MWCNTs y CS/PVA/GEN/MWCNTs).

La capacidad de hinchamiento al equilibrio de los hidrogeles depende principalmente de 4 factores: la presencia de grupos hidrófilos en su red polimérica, la densidad de entrecruzamiento, la elasticidad de la red y el volumen libre disponible. El uso de MWCNTs, GA o GEN en la mezcla CS/PVA reduce su capacidad de hinchamiento un 20%, 62% y 46%, respectivamente. Además, se encontró que el efecto de sobrerrespuesta que presentan los hidrogeles de CS/PVA es inhibido debido a la acción de los agentes entrecruzantes.

Asimismo, se demostró que la humectabilidad o hidrofiliidad de superficie de los hidrogeles híbridos está fuertemente relacionada con su hidrofiliidad de volumen; ya que, a mayor capacidad de absorción, mayor hidrofiliidad de superficie, o bien, dicho de otra forma: a mayor índice de hinchamiento, menor ángulo de contacto. Así, tanto los agentes entrecruzantes como los MWCNTs son capaces de modificar de manera significativa la hidrofiliidad de superficie de las membranas de CS/PVA, por lo que sería posible obtener un hidrogel con una hidrofiliidad de superficie específica, simplemente con variar la concentración de CNTs y/o el tipo de agente entrecruzante utilizado (GEN o GA). Los hidrogeles de CS/PVA/GA, CS/PVA/GEN y CS/PVA/MWCNTs presentaron un CA dentro del intervalo deseable para el cultivo de fibroblastos ($55^\circ - 75^\circ$) de acuerdo con lo reportado por Gupta et. al. [156].

En este sentido, los resultados de AFM mostraron que los hidrogeles que presentaron el mayor hinchamiento al equilibrio también fueron los que tuvieron la mayor rugosidad. Esto debido a que, por un lado, las imperfecciones topográficas permiten que el líquido se aloje en las cavidades; mientras que, el incremento del área superficial propicia que éste penetre más fácilmente en la red debido al aumento de grupos hidrófilos en la superficie del hidrogel.

El entrecruzamiento químico de la red polimérica con GA o GEN disminuyó la R_{rms} de los hidrogeles control de CS/PVA alrededor de un 52% y 13%, respectivamente; mientras que, la adición de MWCNTs aumentó la R_{rms} de los hidrogeles de CS/PVA/MWCNTs y CS/PVA/GEN/MWCNTs alrededor de un 19% y 15%, respecto a sus símiles sin cargar. Así, el entrecruzamiento químico o la adición de nanopartículas no solo implican cambios en la

cristalinidad de los hidrogeles, sino que también conllevan cambios en topografía y en la rugosidad de superficie como consecuencia de la reorganización dinámica de las cadenas dependiendo de las interacciones polímero-polímero, polímero-nanopartículas que se lleven a cabo. Así, la topografía y la rugosidad pueden ser fácilmente modificados y optimizados al variar el tipo de agente entrecruzante y/o la concentración de los MWCNTs.

En estado hidratado, la mayoría de los hidrogeles se comportan como elastómeros, lo cual implica que su comportamiento mecánico sea no lineal y dependa en gran parte de la estructura de su red polimérica. Consecuentemente, al modificarse la estructura de la red polimérica también será modificada su capacidad de hinchamiento y su respuesta mecánica. En este sentido, se observó que el valor del módulo elástico (E) decrece exponencialmente al incrementarse el tamaño de poro (D_N); es decir que, hidrogeles con un mayor tamaño de poro tendrán un menor módulo elástico. Esto debido a que el incremento de D_N implica la presencia de cadenas más largas en la red y por ende una menor densidad de entrecruzamiento (φ_c) y un mayor índice de hinchamiento (Q_e), de manera que, la red polimérica es más flexible y opone menor resistencia a ser deformada.

Por otro lado, el módulo elástico promedio, en tracción uniaxial, para los hidrogeles de CS/PVA fue de $0.22 \text{ MPa} \pm 0.05 \text{ MPa}$, mientras en los hidrogeles de CS/PVA/MWCNTs el valor de E se incrementó 3 veces con la adición de MWCNTs (i.e. $0.69 \text{ MPa} \pm 0.12 \text{ MPa}$). Los hidrogeles entrecruzados de CS/PVA/GEN, CS/PVA/GA y CS/PVA/GEN/MWCNTs presentaron un módulo elástico de $2.08 \text{ MPa} \pm 0.11 \text{ MPa}$, $2.82 \text{ MPa} \pm 0.33 \text{ MPa}$ y $1.69 \text{ MPa} \pm 0.33 \text{ MPa}$, respectivamente; por lo que los agentes entrecruzantes producen un incremento en E de al menos 10 veces.

Asimismo, se logró comprender la respuesta macro y micromecánica de los hidrogeles híbridos de CS/PVA, CS/PVA/GA, CS/PVA/GEN, CS/PVA/MWCNTs y CS/PVA/GEN/MWCNTs bajo un estado de esfuerzos biaxial, lográndose determinar dos de las constantes elásticas más importantes de estos materiales: el módulo de corte y el módulo de elasticidad. Lo anterior implicó uno de los principales objetivos y retos más importantes de este trabajo de investigación que fue desarrollar un probador mecánico y una metodología que permitiera evaluar el comportamiento macro y micromecánico de hidrogeles y membranas elastoméricas, bajo indentación esférica; con lo que se logró aplicar a los hidrogeles híbridos sollicitaciones mecánicas más cercanas a las presentes en su entorno real en distintos campos de aplicación como: andamios celulares para la regeneración de piel, vejiga, pulmón; membranas de filtración. También, se demostró que el probador mecánico desarrollado es capaz de adquirir datos útiles para evaluar la respuesta macro y micromecánica de las membranas de tres formas distintas: a partir del archivo de datos de

fuerza-desplazamiento adquiridos a lo largo de la prueba, a partir de las imágenes del perfil deformado de la membrana capturadas por el sistema de visión 2D (cámara lateral) o a partir de las imágenes estereoscópicas de la deformación de la membrana registradas por el módulo de visión estereoscópico.

Combinando los modelos mecánicos de Yang-Hsu y Begley-Mackin junto con los datos experimentales obtenidos a partir del probador mecánico desarrollado, fue posible establecer una nueva expresión analítica y una metodología para entender la respuesta mecánica de los hidrogeles, demostrándose que es posible determinar su módulo elástico de manera más fácil y certera que con los modelos tradicionales. En este sentido, se evidenció que el modelo de Lui (uno de los principales modelos analíticos reportados en la literatura para evaluar el módulo elástico de membranas delgadas bajo indentación esférica) muestra discrepancias en los resultados que se obtienen, respecto a los datos experimentales y a otros modelos analíticos ampliamente utilizados (i.e. Yang-Hsu y Begley-Mackin). Por lo tanto, utilizar la solución propuesta por Liu para determinar las propiedades mecánicas de hidrogeles y membranas elastoméricas podría implicar errores significativos. Es por esto que, el probador mecánico y la metodología desarrollada constituyen una excelente herramienta para evaluar el comportamiento macro y micromecánico de polímeros suaves, hidrogeles entrecruzados e incluso de tejidos biológicos con un comportamiento elastomérico.

Las pruebas de indentación esférica demostraron que los hidrogeles híbridos pueden presentar un comportamiento mecánico diferente, dependiendo de su composición y del sistema de esfuerzos al que se encuentren sometidos (i.e. uniaxial o biaxial). De manera que, los hidrogeles sin entrecruzar (i.e. CS/PVA y CS/PVA/MWCNTs) mostraron una mayor dependencia al estado de esfuerzos en el que fueron probados que los hidrogeles entrecruzados (i.e. CS/PVA/GA, CS/PVA/GEN y CS/PVA/GEN/MWCNTs), por lo que se demostró que el entrecruzamiento de la red polimérica produce hidrogeles mecánicamente más estables, capaces de exhibir una repetitividad aceptable en su módulo elástico, incluso bajo diferentes sistemas de esfuerzos. Dado que, en los hidrogeles que no fueron entrecruzados, las cadenas poliméricas presentan un alto grado de movilidad debido a la carencia de una red tridimensional que restrinja su deformación en múltiples direcciones, estos hidrogeles mostraron campos de deformación más heterogéneos y experimentaron mayores niveles de deformación local en la región de contacto. Por el contrario, los hidrogeles entrecruzados (i.e. CS/PVA/GA, CS/PVA/GEN y CS/PVA/GEN/MWCNTs) presentaron deformaciones graduales en la misma zona de interés, debido a la restricción de movimiento y a la orientación de las cadenas que impone la red macromolecular. Respecto a la adición de MWCNTs en los hidrogeles de CS/PVA y

CS/PVA/GEN, no se observaron cambios significativos en la distribución heterogénea de las deformaciones.

En cuanto a la caracterización biológica de los materiales, las pruebas preliminares mostraron que, tras 21 días de cultivo *in vitro*, ninguno de los hidrogeles híbridos estudiados presentó efectos citotóxicos. Asimismo, los fibroblastos sembrados sobre los hidrogeles presentaron morfologías fusiformes y tamaños promedio similares a los reportados en la literatura para los fibroblastos humanos (50 μm -100 μm) [189]. Los hidrogeles de CS/PVA/GA, CS/PVA/GEN, CS/PVA/MWCNTs y CS/PVA/GEN/MWCNTs mostraron una mayor cantidad de células adheridas a su superficie en comparación con los hidrogeles control de CS/PVA, por lo que cualquiera de ellos podría encontrar un uso potencial en ingeniería de tejidos u otras aplicaciones biomédicas. Los presentes resultados alientan a continuar con una caracterización biológica mucho más profunda y extensa de estos hidrogeles.

En consecuencia, todos los resultados obtenidos en el presente trabajo de investigación demuestran que las propiedades fisicoquímicas, los parámetros estructurales de la red y la respuesta mecánica de estos hidrogeles híbridos pueden ser ajustados fácilmente en función de la composición química; particularmente, modificando la proporción CS/PVA o variando el tipo/cantidad del agente químico entrecruzante y las nanopartículas. En este contexto, la adición de MWCNTs y/o GEN ha demostrado ser una buena alternativa para mejorar las propiedades fisicoquímicas de la mezcla CS/PVA, sin comprometer su citotoxicidad. Posicionando así a los hidrogeles de CS/PVA/GEN, CS/PVA/MWCNTs y CS/PVA/GEN/MWCNTs como materiales con aplicaciones potenciales en biomedicina (i.e. sistemas de administración de fármacos y andamios en ingeniería de tejidos), medio ambiente (i.e. membranas de absorción para limpieza de aguas residuales de origen industrial) o como sensores/actuadores en el área de microfluídica.

Como trabajo a futuro se propone llevar a cabo un estudio más profundo a través de Resonancia Magnética Nuclear de Protones y de Carbono (^1H RMN y ^{13}C RMN, respectivamente) de los hidrogeles de CS/PVA, entrecruzados y/o nanocompuestos, con la finalidad de comprobar las estructuras químicas de las redes poliméricas propuestas (Capítulo 3, Sección 3.2). Además, dado que el comportamiento opto-mecánico de los hidrogeles nanocompuestos no pudo ser evaluado en estado hidratado, se considera necesario diseñar e implementar un dispositivo que mantenga la humedad de las muestras a lo largo de la prueba para poder llevar a cabo los ensayos que permitan determinar si efectivamente en estos hidrogeles se presenta dicho fenómeno, buscando ampliar el abanico de aplicaciones de dichos materiales hacia el campo de los dispositivos actuados de manera remota a través de medios no invasivos. Finalmente, se

propone realizar una caracterización biológica de los hidrogeles más completa, en la cual se contemplen pruebas de proliferación celular, ensayos de adhesión y pruebas de biocompatibilidad, entre otras, a fin de determinar si realmente estos hidrogeles podrían ser utilizados como andamios celulares para la regeneración de tejidos biológicos.

REFERENCIAS

- [1] P. Chawla, A.R. Srivastava, P. Pandey, V. Chawla, Hydrogels: a journey from diapers to gene delivery, *Mini reviews in medicinal chemistry* 14(2) (2014) 154-167.
- [2] Y. Zu, Y. Zhang, X. Zhao, C. Shan, S. Zu, K. Wang, Y. Li, Y. Ge, Preparation and characterization of chitosan-polyvinyl alcohol blend hydrogels for the controlled release of nano-insulin, *International Journal of Biological Macromolecules* 50(1) (2012) 82-87.
- [3] T. Wu, Y. Li, D.S. Lee, Chitosan-based composite hydrogels for biomedical applications, *Macromolecular Research* 25(6) (2017) 480-488.
- [4] I.M. Garnica-Palafox, F.M. Sánchez-Arévalo, C. Velasquillo, Z.Y. García-Carvajal, J. García-López, C. Ortega-Sánchez, C. Ibarra, G. Luna-Bárceñas, L. Solís-Arrieta, Mechanical and structural response of a hybrid hydrogel based on chitosan and poly(vinyl alcohol) cross-linked with epichlorohydrin for potential use in tissue engineering, *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition* 25(1) (2014) 32-50.
- [5] E.S. Costa-Junior, E.F. Barbosa-Stancioli, A.A.P. Mansur, W.L. Vasconcelos, H.S. Mansur, Preparation and characterization of chitosan/PVA chemically crosslinked blends for biomedical applications, *Carbohydrate Polymers* 76 (2009) 472-481.
- [6] M. Vakili, M. Rafatullah, B. Salamatinia, A.Z. Abdullah, M.H. Ibrahim, K.B. Tan, Z. Gholami, P. Amouzgar, Application of chitosan and its derivatives as adsorbents for dye removal from water and wastewater: A review, *Carbohydrate Polymers* 113 (2014) 115-130.
- [7] N.A. Negm, R. El Sheikh, A.F. El-Farargy, H.H.H. Hefni, M. Bekhit, Treatment of industrial wastewater containing copper and cobalt ions using modified chitosan, *Journal of Industrial and Engineering Chemistry* 21 (2015) 526-534.
- [8] G. D'Errico, M. De Lellis, G. Mangiapia, A. Tedeschi, O. Ortona, S. Fusco, A. Borzacchiello, L. Ambrosio, Structural and mechanical properties of UV-photo-cross-linked poly(N-vinyl-2-pyrrolidone) hydrogels, *Biomacromolecules* 9(1) (2008) 231-40.
- [9] I.M. Garnica-Palafox, F.M. Sánchez-Arévalo, Influence of natural and synthetic crosslinking reagents on the structural and mechanical properties of chitosan-based hybrid hydrogels, *Carbohydrate Polymers* 151 (2016) 1073-1081.
- [10] Z. He, L. Xiong, Evaluation of physical and biological properties of polyvinyl alcohol/chitosan blend films, *Journal of Macromolecular Science, Part B: Physics* 51(9) (2012) 1705-1714.
- [11] P. Sacco, M. Borgogna, A. Travan, E. Marsich, S. Paoletti, F. Asaro, M. Grassi, I. Donati, Polysaccharide-Based Networks from Homogeneous Chitosan-Tripolyphosphate Hydrogels: Synthesis and Characterization, *Biomacromolecules* 15(9) (2014) 3396-3405.
- [12] S.N. Alhosseini, F. Moztarzadeh, F. Mozafari, S. Asgari, M. Dodel, A. Samadikuchaksaraei, S. Kargozar, N. Jalali, Synthesis and characterization of electrospun polyvinyl alcohol nanofibrous

- scaffolds modified by blending with chitosan for neural tissue engineering., *Int J Nanomed* 7 (2012) 25-34.
- [13] H. Hu, J.H. Xin, H. Hu, A. Chan, L. He, Glutaraldehyde-chitosan and poly (vinyl alcohol) blends, and fluorescence of their nano-silica composite films., *Carbohydrate Polymers* 91(1) (2013) 305-13.
- [14] A. Jayakrishnan, S.R. Jameela, Glutaraldehyde as a fixative in bioprotheses and drug delivery matrices, *Biomaterials* 17(5) (1996) 471-484.
- [15] L. Marin, D. Ailincăi, S. Morariu, L. Tartau-Mititelu, Development of biocompatible glycodynameric hydrogels joining two natural motifs by dynamic constitutional chemistry, *Carbohydrate Polymers* 170 (2017) 60-71.
- [16] M.C. Chen, C.T. Liu, H.W. Tsai, W.Y. Lai, Y. Chang, H.W. Sung, Mechanical properties, drug eluting characteristics and in vivo performance of a genipin-crosslinked chitosan polymeric stent, *Biomaterials* 30(29) (2009) 5560-5571.
- [17] J.R. Khurma, D.R. Rohindra, A.V. Nand, Synthesis and properties of hydrogels based on chitosan and poly(vinyl alcohol) crosslinked by genipin, *Journal of Macromolecular Science - Pure and Applied Chemistry* 43(4-5) (2006) 749-758.
- [18] M. Grolík, K. Szczubiałka, B. Wowra, D. Dobrowolski, B. Orzechowska-Wylęgała, E. Wylęgała, M. Nowakowska, Hydrogel membranes based on genipin-cross-linked chitosan blends for corneal epithelium tissue engineering, *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 23(8) (2012) 1991-2000.
- [19] P. Schexnailder, G. Schmidt, Nanocomposite polymer hydrogels, *Colloid and Polymer Science* 287(1) (2009) 1-11.
- [20] M. Kurdtabar, R.N. Koutenaee, G.R. Bardajee, Synthesis and characterization of a novel pH-responsive nanocomposite hydrogel based on chitosan for targeted drug release, *Journal of Polymer Research* 25(5) (2018) 119.
- [21] Q. Jingjing, W. Shiren, Effect of Structure and Morphology on the tensile Properties of Polymer/Carbon Nanotubes, in: M. Vikas (Ed.), *Polymer Nanotube Nanocomposites: Synthesis, Properties and Applications*, Wiley, Salem, Massachusetts, 2010.
- [22] R. Pimentel-Domínguez, F.M. Sánchez-Arévalo, M. Hautefeuille, J. Hernández-Cordero, Laser induced deformation in polydimethylsiloxane membranes with embedded carbon nanopowder., *Smart Materials and Structures* 22(3) (2013) 037001.
- [23] H. Lu, Y. Liu, J. Gou, J. Leng, S. Du, Synergistic Effect of Carbon Nanofiber and Carbon Nanopaper on Shape Memory Polymer Composite, *Applied Physics Letters* 96(8) (2010) 84-102.
- [24] K. Vanherck, S. Hermans, T. Verbiest, I. Vankelecom, Using the photothermal effect to improve membrane separations via localized heating, *J. Mater. Chem.* 21 (2011) 6079-6087.
- [25] S.V. Ahir, E.M. Terentjev, Photomechanical actuation in polymer-nanotube composites, *Nature Materials* 4(6) (2005) 491-495.

- [26] F. Peng, F. Pan, H. Sun, L. Lu, Z. Jiang, Novel nanocomposite pervaporation membranes composed of poly(vinyl alcohol) and chitosan-wrapped carbon nanotube, *Journal of Membrane Science* 300(1-2) (2007) 13-19.
- [27] E. Salehi, S.S. Madaeni, L. Rajabi, A.A. Derakhshan, S. Daraei, V. Vatanpour, Static and dynamic adsorption of copper ions on chitosan/polyvinyl alcohol thin adsorptive membranes: Combined effect of polyethylene glycol and aminated multi-walled carbon nanotubes, *Chemical Engineering Journal* 215-216 (2013) 791-801.
- [28] E. Salehi, S.S. Madaeni, L. Rajabi, V. Vatanpour, A.A. Derakhshan, S. Zinadini, S. Ghorabi, H. Ahmadi Monfared, Novel chitosan/poly(vinyl) alcohol thin adsorptive membranes modified with amino functionalized multi-walled carbon nanotubes for Cu(II) removal from water: Preparation, characterization, adsorption kinetics and thermodynamics, *Separation and Purification Technology* 89 (2012) 309-319.
- [29] Q.W. Yeang, S.H.S. Zein, A.B. Sulong, S.H. Tan, Comparison of the pervaporation performance of various types of carbon nanotube-based nanocomposites in the dehydration of acetone, *Separation and Purification Technology* 107 (2013) 252-263.
- [30] H. Liao, R. Qi, M. Shen, X. Cao, R. Guo, Y. Zhang, X. Shi, Improved cellular response on multiwalled carbon nanotube-incorporated electrospun polyvinyl alcohol/chitosan nanofibrous scaffolds, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 84(2) (2011) 528-535.
- [31] M.A. Shokrgozar, F. Mottaghitalab, V. Mottaghitalab, M. Farokhi, Fabrication of porous chitosan/poly(vinyl alcohol) reinforced single-walled carbon nanotube nanocomposites for neural tissue engineering, *Journal of Biomedical Nanotechnology* 7(2) (2011) 276-284.
- [32] M. Ahearne, Y. Yang, I.K.-K. Liu, Mechanical Characterisation of Hydrogels for Tissue Engineering Applications, *Topics Tissue Eng.* 4 (2008).
- [33] O.N. Scott, M.R. Begley, U. Komaragiri, T.J. Mackin, Indentation of freestanding circular elastomer films using spherical indenters, *Acta Materialia* 52(16) (2004) 4877-4885.
- [34] P. Selvadurai, Deflections of a rubber membrane, 2006.
- [35] Y. Zhang, Large deflection of clamped circular plate and accuracy of its approximate analytical solutions, *Science China Physics, Mechanics & Astronomy* 59(2) (2016) 624602.
- [36] W.H. Yang, K.H. Hsu, Indentation of a Circular Membrane, *Journal of Applied Mechanics* 38 (1971) 227-230.
- [37] K.K. Liu, B.F. Ju, A novel technique for mechanical characterization of thin elastomeric membrane, *Journal of Physics D: Applied Physics* 34(15) (2001) L91.
- [38] M.R. Begley, T.J. Mackin, Spherical indentation of freestanding circular thin films in the membrane regime, *Journal of the Mechanics and Physics of Solids* 52(9) (2004) 2005-2023.
- [39] M. Ahearne, Y. Yang, A.J. El Haj, K.Y. Then, K.-K. Liu, Characterizing the viscoelastic properties of thin hydrogel-based constructs for tissue engineering applications, *Journal of The Royal Society Interface* 2(5) (2005) 455-463.

- [40] S.E. Dunphy, J.A.J. Bratt, K.M. Akram, N.R. Forsyth, A.J. El Haj, Hydrogels for lung tissue engineering: Biomechanical properties of thin collagen-elastin constructs, *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials* 38 (2014) 251-259.
- [41] H. Omidian, K. Park, Introduction to Hydrogels, in: R.M. Ottenbrite (Ed.), *Biomedical Applications of Hydrogels Handbook*, Springer Science, New York, 2010, pp. 1-16.
- [42] T.S. Raghu, Raj; Laverty, Garry; Donnelly, Ryan, *Hydrogels. Design, Sythesis and Application in Drug Delivery and Regenerative Medicine*, 1st ed., CRC Press/Taylor & Francis Group, Boca Raton, FL, 2018.
- [43] A. Borzacchiello, L. Ambrosio, Structure-Propertiy Relationships in Hydrogels, in: R. Barbucci (Ed.), *Hydrogels: Biological Properties and Applications*, Springer-Verlag, Milan, 2009, pp. 9-20.
- [44] J. Li, Polymeric Hydrogels, in: T.S. Hin (Ed.), *Engineering Materials for Biomedical Applications*, World Scientific Publishing Co, UK, 2004, pp. 7-1 - 7-18.
- [45] T. Billiet, M. Vandenhaute, J. Schelfhout, S.V. Vlierberghe, P. Dubruel, A review of trends and limitations in hydrogel-rapid prototyping for tissue engineering, *Biomaterials* 33 (2012) 6020-6041.
- [46] M.V.K. Jaya, Shukla, Cross-linking in Hydrogels - A Review, *American Journal of Polymer Science* 4(2) (2014) 25-31.
- [47] J.L. Drury, D.J. Mooney, Hydrogels for tissue engineering: scaffold design variables and applications, *Biomaterials* 24 (2003) 4337-4351.
- [48] A. Sionkowska, Natural Polymers as Components of Blends for Biomedical Applications, in: S. Dumitriu, V. Popa (Eds.), *Polymeric Biomaterials: Structure and Function*, CRC Press, Boca Raton, FL, 2013, pp. 309-340.
- [49] K.Y. Lee, D.J. Mooney, Hydrogels for tissue engineering, *Chemical Reviews* 101(7) (2001) 1869-1879.
- [50] A.A. Adewunmi, S. Ismail, A.S. Sultan, Carbon Nanotubes (CNTs) Nanocomposite Hydrogels Developed for Various Applications: A Critical Review, *Journal of Inorganic and Organometallic Polymers and Materials* 26(4) (2016) 717-737.
- [51] V. Choudhary, A. Gupta, Polymer/Carbon Nantube Nanocomposites, in: Y. Siva (Ed.), *Carbon Nanotubes-Polymer Nanocomposites*, InTech, Croatia, 2011, pp. 65-90.
- [52] M.L. Andrade Guel, L.I. López López, A. Sáenz Galindo, Carbon nanotubes: Funcionalization and biological applications, *Revista Mexicana de Ciencias Farmaceuticas* 43(3) (2012) 9-18.
- [53] M.Y. Abdelaal, E.A. Abdel-Razik, E.M. Abdel-Bary, I.M. El-Sherbiny, Chitosan-based interpolymeric pH-responsive hydrogels for in vitro drug release, *Journal of Applied Polymer Science* 103(5) (2007) 2864-2874.
- [54] A. Islam, T. Yasin, Controlled delivery of drug from pH sensitive chitosan/poly (vinyl alcohol) blend, *Carbohydrate Polymers* 88(3) (2012) 1055-1060.
- [55] D.T. Mathews, Y.A. Birney, P.A. Cahill, G.B. McGuinness, Mechanical and morphological characteristics of poly(vinyl alcohol)/chitosan hydrogels, *Journal of Applied Polymer Science* 109(2) (2008) 1129-1137.

- [56] E.S. Costa-Junior, M.M. Pereira, M. H.S., Properties and biocompatibility of chitosan films modified by blending with PVA and chemically crosslinked., *J Mater Sci Mater Med* 20 (2009) 553-561.
- [57] H.S. Mansur, E.S. Costa-Junior, A.A.P. Mansur, E.F. Barbosa-Stancioli, Cytocompatibility evaluation in cell-culture systems of chemically crosslinked chitosan/PVA hydrogels *Materials Science and Engineering C* 29 (2009) 1574-1583.
- [58] H. Park, D. Kim, Swelling and mechanical properties of glycol chitosan/poly(vinyl alcohol) IPN-type superporous hydrogels., *J Biomed Mater Res Part A* 78 (2006) 662-667.
- [59] A.R. Fajardo, L.C. Lopes, A.F. Rubira, E.C. Muniz, Development and application of chitosan/poly(vinyl alcohol) films for removal and recovery of Pb(II), *Chemical Engineering Journal* 183 (2012) 253-260.
- [60] S. Mallakpour, A. Nezamzadeh Ezhieh, Preparation and characterization of chitosan-poly(vinyl alcohol) nanocomposite films embedded with functionalized multi-walled carbon nanotube, *Carbohydrate Polymers* 166 (2017) 377-386.
- [61] D. Teng, From chitin to chitosan, in: K. Yao, J.L. Yao, Y. Yin (Eds.), *Chitosan Based Hydrogels: Functions and Applications*, CRC Press, Boca Raton, FL, 2012, pp. 1-38.
- [62] V.K. Nandagiri, Biomaterials of Natural Origin in Regenerative Medicine, in: S. Dumitriu, V. Popa (Eds.), *Polymeric Biomaterials: Structure and Function*, CRC Press, Boca Ratón, FL, 2013, pp. 271-308.
- [63] A.E. Battaner, *Biomoléculas, una introducción estructural a la Bioquímica*, 1st ed., Ediciones Universidad Salamanca, Salamanca, España, 2012.
- [64] S.B. Bahrami, S.S. Kordestani, H. Mirzadeh, P. Mansoori, Poly (vinyl alcohol)-chitosan blends: Preparation, mechanical and physical properties, *Iranian Polymer Journal (English Edition)* 12(2) (2003) 139-146.
- [65] V. Bansal, P.K. Sharma, N. Sharma, O.P. Pal, R. Malviya, Applications of Chitosan and Chitosan Derivatives in Drug Delivery, *Advances in Biological Research* 5(1) (2011) 28-37.
- [66] N. Shaari, S.K. Kamarudin, Chitosan and alginate types of bio-membrane in fuel cell application: An overview, *Journal of Power Sources* 289 (2015) 71-80.
- [67] Y.M. Tan, S.H. Lim, B.Y. Tay, M.W. Lee, E.S. Thian, Functional chitosan-based grapefruit seed extract composite films for applications in food packaging technology, *Materials Research Bulletin* 69 (2015) 142-146.
- [68] Y. Chen, Preparation and Application of the Composite from Chitosan, in: V.K.T. Thakur, Manju Kumari; Kessler, Michael R. (Ed.), *Handbook of Composites from Renewable Materials*, Wiley 2017.
- [69] F.L. Mi, Y.C. Tan, H.C. Liang, R.N. Huang, H.W. Sung, In vitro evaluation of a chitosan membrane cross-linked with genipin, *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition* 12(8) (2001) 835-850.
- [70] A. Borzacchiello, L. Ambrosio, P.A. Netti, L. Nicolais, C. Peniche, A. Gallardo, J. San Roman, Chitosan-based hydrogels: Synthesis and characterization, *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 12(10-12) (2001) 861-864.
- [71] E. Khor, L.Y. Lim, Implantable applications of chitin and chitosan., *Biomaterials* 24 (2003) 2339-2349.

- [72] R.A.A. Muzzarelli, Genipin-crosslinked chitosan hydrogels as biomedical and pharmaceutical aids, *Carbohydrate Polymers* 77(1) (2009) 1-9.
- [73] V.M. Bispo, A.A.P. Mansur, E.F. Barbosa-Stancioli, H.S. Mansur, Biocompatibility of nanostructured chitosan/poly(vinyl alcohol) blends chemically crosslinked with genipin for biomedical applications, *Journal of Biomedical Nanotechnology* 6(2) (2010) 166-175.
- [74] M.S. Austero, A.E. Donius, U.G.K. Wegst, C.L. Schauer, New crosslinkers for electrospun chitosan fibre mats. I. Chemical analysis, *Journal of the Royal Society Interface* 9(75) (2012) 2551-2562.
- [75] G. Paradossi, Hydrogels Formed by Cross-linked Poly(vinyl alcohol), in: S. Dumitriu, V. Popa (Eds.), *Polymeric Biomaterials: Structure and Functions*, CRC Press, Boca Ratón, FL, 2013, pp. 37-56.
- [76] K.C.S. Figueiredo, T.L.M. Alves, C.P. Borges, Poly(vinyl alcohol) films crosslinked by glutaraldehyde under mild conditions, *Journal of Applied Polymer Science* 111(6) (2009) 3074-3080.
- [77] J. Bo, Study on PVA hydrogel crosslinked by epichlorohydrin, *Journal of Applied Polymer Science* 46(5) (1992) 783-786.
- [78] M.I. Baker, S.P. Walsh, Z. Schwartz, B.D. Boyan, A review of polyvinyl alcohol and its uses in cartilage and orthopedic applications, *J Biomed Mater Res Part B (100B)* (2011) 1451-1457.
- [79] L. McKeen, 1 - Introduction to Food Irradiation and Medical Sterilization, in: L. McKeen (Ed.), *The Effect of Sterilization on Plastics and Elastomers (Third Edition)*, William Andrew Publishing, Boston, 2012, pp. 1-40.
- [80] K. Pal, A.T. Paulson, D. Rousseau, 14 - Biopolymers in Controlled-Release Delivery Systems, in: S. Ebnesajjad (Ed.), *Handbook of Biopolymers and Biodegradable Plastics*, William Andrew Publishing, Boston, 2013, pp. 329-363.
- [81] A.M. Ramos-de-la-Peña, C.M.G.C. Renard, J. Montañez, M. de la Luz Reyes-Vega, J.C. Contreras-Esquivel, A review through recovery, purification and identification of genipin, *Phytochemistry Reviews* 15(1) (2016) 37-49.
- [82] B. Manickam, R. Sreedharan, M. Elumalai, Genipin - The Natural Water Soluble Cross-linking Agent and Its Importance in the Modified Drug Delivery Systems: An Overview., *Current Drug Delivery* 11 (2014) 139-145.
- [83] R.A.A. Muzzarelli, M. El Mehtedi, C. Bottegoni, A. Aquili, A. Gigante, Genipin-Crosslinked Chitosan Gels and Scaffolds for Tissue Engineering and Regeneration of Cartilage and Bone, *Marine drugs* 13(12) (2015) 7314-7338.
- [84] L. Gao, H. Gan, Z. Meng, R. Gu, Z. Wu, L. Zhang, X. Zhu, W. Sun, J. Li, Y. Zheng, G. Dou, Effects of genipin cross-linking of chitosan hydrogels on cellular adhesion and viability, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 117 (2014) 398-405.
- [85] H.J. Tseng, T.L. Tsou, H.J. Wang, S.H. Hsu, Characterization of chitosan-gelatin scaffolds for dermal tissue engineering, *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine* 7(1) (2013) 20-31.
- [86] V. Mittal, Overview of Polymer Nanocomposites Nanotubes, in: M. Vikas (Ed.), *Polymer Nanotube Nanocomposites: synthesis, Properties and Applications*, Wiley, Massachusetts, 2010.

- [87] J. Chen, Actuators and Infrared Sensors Based on Carbon Nanotubes-Polymer Composites, in: D. Tasis (Ed.), Carbon Nanotube-Polymer Nanocomposites, The Royal Society of Chemistry 2013, pp. 22-50.
- [88] P.Y. Zhuang, Y.L. Li, L. Fan, J. Lin, Q.L. Hu, Modification of chitosan membrane with poly(vinyl alcohol) and biocompatibility evaluation, *International Journal of Biological Macromolecules* 50(3) (2012) 658-663.
- [89] G.Z. Ke, K.D. Zhu, Y.F. Li, Structure and properties of chitosan and polyvinyl alcohol blend film, *Key Engineering Materials*, 2017, pp. 895-899.
- [90] M.D. Figueroa-Pizano, I. Vélaz, F.J. Peñas, P. Zavala-Rivera, A.J. Rosas-Durazo, A.D. Maldonado-Arce, M.E. Martínez-Barbosa, Effect of freeze-thawing conditions for preparation of chitosan-poly(vinyl alcohol) hydrogels and drug release studies, *Carbohydrate Polymers* 195 (2018) 476-485.
- [91] H.M.P. Naveen Kumar, M.N. Prabhakar, C. Venkata Prasad, K. Madhusudhan Rao, T.V. Ashok Kumar Reddy, K. Chowdoji Rao, M.C.S. Subha, Compatibility studies of chitosan/PVA blend in 2% aqueous acetic acid solution at 30 °C, *Carbohydrate Polymers* 82(2) (2010) 251-255.
- [92] Y. Nakano, Y. Bin, M. Bando, T. Nakashima, T. Okuno, H. Kurosu, M. Matsuo, Structure and mechanical properties of chitosan/poly(vinyl alcohol) blend films, *Macromolecular Symposia* 258 (2007) 63-81.
- [93] J. Jayaraju, J. Keshavayya, S.K. Rai, K.C. Basavajju, Miscibility Studies on Chitosan/Poly(vinyl alcohol) Blends, *Journal of Macromolecular Science - Pure and Applied Chemistry* 45 (2008) 271-275.
- [94] I.R. Rodrigues, M.M. de Camargo Forte, D.S. Azambuja, K.R.L. Castagno, Synthesis and characterization of hybrid polymeric networks (HPN) based on polyvinyl alcohol/chitosan, *Reactive and Functional Polymers* 67(8) (2007) 708-715.
- [95] E.A. El-Hefian, M.M. Nasef, A.H. Yahaya, The Preparation and Characterization of Chitosan / Poly (Vinyl Alcohol) Blended Films, *E-Journal of Chemistry* 7(4) (2010) 1212-1219.
- [96] I.M. Garnica-Palafox, F.M. Sánchez-Arévalo, C. Velasquillo, Z.Y. García-Carvajal, J. García-López, C. Ortega-Sánchez, C. Ibarra, G. Luna-Bárcenas, L. Solís-Arrieta, Mechanical and structural response of a hybrid hydrogel based on chitosan and poly(vinyl alcohol) cross-linked with epichlorohydrin for potential use in tissue engineering, *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition* (2013).
- [97] A. Islam, M. Riaz, T. Yasin, Structural and viscoelastic properties of chitosan-based hydrogel and its drug delivery application, *International Journal of Biological Macromolecules* 59 (2013) 119-124.
- [98] Y. Jiang, X. Meng, Z. Wu, X. Qi, Modified chitosan thermosensitive hydrogel enables sustained and efficient anti-tumor therapy via intratumoral injection, *Carbohydrate Polymers* 144 (2016) 245-253.
- [99] A. Kocemba, M. Mucha, Chitosan/poly(vinyl alcohol) hydrogels as controlled drug delivery systems, *Progress on Chemistry and Application of Chitin and its Derivatives* 22 (2017) 97-105.
- [100] A. Nacer Khodja, M. Mahlous, D. Tahtat, S. Benamer, S. Larbi Youcef, H. Chader, L. Mouhoub, M. Sedgelmaci, N. Ammi, M.B. Mansouri, S. Mameri, Evaluation of healing activity of PVA/chitosan

- hydrogels on deep second degree burn: Pharmacological and toxicological tests, *Burns* 39(1) (2013) 98-104.
- [101] C.V.-G. Gutiérrez-Samperio, F.J; Figueroa-Cárdenas, JD; Gallegos-Corona, MA, Bioprótesis de pericardio bovino tratado con glutaraldehído (PBTG) en la reconstrucción de la pared abdominal, *Cirugía y Cirujanos* 70(4) (2002) 257-266.
- [102] P. Sinha, D. Zurakowski, T.K. Susheel Kumar, D. He, C. Rossi, R.A. Jonas, Effects of glutaraldehyde concentration, pretreatment time, and type of tissue (porcine versus bovine) on postimplantation calcification, *The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery* 143(1) (2012) 224-227.
- [103] M. Cadek, J.N. Coleman, V. Barron, K. Hedicke, W.J. Blau, Morphological and mechanical properties of carbon-nanotube-reinforced semicrystalline and amorphous polymer composites, *Applied Physics Letters* 81(27) (2002) 5123-5125.
- [104] A. Sapalidis, Z. Sideratou, K.N. Panagiotaki, E. Sakellis, E.P. Kouvelos, S. Papageorgiou, F. Katsaros, Fabrication of Antibacterial Poly(Vinyl Alcohol) Nanocomposite Films Containing Dendritic Polymer Functionalized Multi-Walled Carbon Nanotubes, *Frontiers in Materials* 5(11) (2018).
- [105] Y.K. Gun'ko, Chemical Functionalization of Carbon Nanotubes for Polymer Reinforcement, in: D. Tasis (Ed.), *Carbon Nanotube-Polymer Nanocomposites*, The Royal Society of Chemistry 2013.
- [106] C. Mercades, P. Poulin, C. Zakri, Synthesis and Properties of PVA/Carbon Nanotubes Composites, in: V. Mittal (Ed.), *Polymer Nanotube Nanocomposites: Synthesis, Properties and Applications*, Wiley, Massachusetts, 2010.
- [107] R. Xu, R. Tang, Q. Zhou, F. Li, B. Zhang, Enhancement of catalytic activity of immobilized laccase for diclofenac biodegradation by carbon nanotubes, *Chemical Engineering Journal* 262 (2015) 88-95.
- [108] M. Abdolrahimi, M. Seifi, M.H. Ramezanzadeh, Study the effect of acetic acid on structural, optical and mechanical properties of PVA/chitosan/MWCNT films, *Chinese Journal of Physics* 56(1) (2018) 221-230.
- [109] H.K. Moon, S.H. Lee, H.C. Choi, In vivo near-infrared mediated tumor destruction by photothermal effect of carbon nanotubes., *ACS Nano* 3(11) (2009) 3707-3713.
- [110] J.E. Marshall, Y. Ji, N. Torras, K. Zinoviev, E.M. Terentjev, Carbon-nanotube sensitized nematic elastomer composites for IR-visible photo-actuation, *Soft Matter* 8(5) (2012) 1570-1574.
- [111] S. Yang, K.-F. Leong, Z. Du, C.-K. Chua, The Design of Scaffolds for Use in Tissue Engineering. Part I. Traditional Factors, *Tissue Engineering* 7(6) (2001) 679-689.
- [112] S.F. Sun, *Physical chemistry of macromolecules: basic principles and issues*, 1 ed., John Wiley & Sons, New York, NY, 1994.
- [113] J.M.G. Cowie, V. Arrighi, *Polymers: Chemistry and Physics of Modern Materials*, 3 ed., CRC Press, Boca Raton, FL, 2008.
- [114] K.A. Rubinson, J.F. Rubinson, *Análisis Instrumental*, Pearson Education, DF, México, 2001.
- [115] H. Zheng, Y.M. Du, J.H. Yu, L. Xiao, The Properties and Preparation of Crosslinked Chitosan Films, *Kao Teng Hsueh Hsiao Hua Heush Hsueh Pao/ Chemical Journal of Chinese Universities* 21(5) (2000) 812.

- [116] F.M. Sánchez-Arévalo, Estudio experimental del comportamiento mecánico de un material con memoria de forma., Facultad de Ingeniería, Universidad Nacional Autónoma de México, 2007.
- [117] S. Fiejdasz, W. Horak, J. Lewandowska-Łańcucka, M. Szuwarzyński, J. Salwiński, M. Nowakowska, Tuning of elasticity and surface properties of hydrogel cell culture substrates by simple chemical approach, *Journal of Colloid and Interface Science* 524 (2018) 102-113.
- [118] S.R. Montoro, S.d.F. Medeiros, G.M. Alves, Nanostructured Hydrogels, in: T. Sabu, S. Shanks (Eds.), *Nanostructured Polymers Blends*, Elsevier, Oxford, 2014.
- [119] Y. Yuan, R. Lee, Contact Angle and Wetting Properties, in: G. Bracco, B. Holst (Eds.), *Surface Science Techniques*, Springer-Verlag, Berlin, 2013.
- [120] S. Farris, L. Introzzi, P. Biagioni, T. Holz, A. Schiraldi, L. Piergiovanni, Wetting of biopolymer coatings: Contact angle kinetics and image analysis investigation, *Langmuir* 27(12) (2011) 7563-7574.
- [121] A. Islam, T. Yasin, I.u. Rehman, Synthesis of hybrid polymer networks of irradiated chitosan/poly(vinyl alcohol) for biomedical applications, *Radiation Physics and Chemistry* 96(0) (2014) 115-119.
- [122] ASTM-International, ASTM D1708-13: Standard Test Method for Tensile Properties of Plastics by Use of Microtensile Specimens, ASTM International, West Conshohocken, PA, 2013.
- [123] K.S. Anseth, C.N. Bowman, L. Brannon-Peppas, Mechanical properties of hydrogels and their experimental determination., *Biomaterials* 17 (1996) 1647-1657.
- [124] L.R.G. Treloar, *The Physics of Rubber Elasticity.*, Oxford University Press, New York, 2005.
- [125] R.W. Ogden, LARGE DEFORMATION ISOTROPIC ELASTICITY - ON THE CORRELATION OF THEORY AND EXPERIMENT FOR INCOMPRESSIBLE RUBBERLIKE SOLIDS, *Rubber Chemistry and Technology* 46(2) (1973) 398-416.
- [126] M. Mooney, A theory of large elastic deformation, *Journal of Applied Physics* 11(9) (1940) 582-592.
- [127] Y.C. Fung, *Biomechanics: Mechanical Properties of Living Tissues*, 2 ed., Springer, New York, 1993.
- [128] K. Urayama, T. Takigawa, T. Masuda, Poisson's ratio of poly(vinyl alcohol) gels, *Macromolecules* 26(12) (1993) 3092-3096.
- [129] C.G. Robertson, R. Bogoslovov, C.M. Roland, Effect of structural arrest on Poisson's ratio in nanoreinforced elastomers, *Physical Review E* 75(5) (2007) 051403.
- [130] N.A. Peppas, A.G. Mikos, *Hydrogels in medicine and pharmacy*, CRC Press, Boca Ratón, FL, 1987.
- [131] P.J. Flory, *Principles of polymer chemistry*, Cornell University Press, New York, USA, 1953.
- [132] Y. Liu, N.E. Vrana, P.A. Cahill, G.B. McGuinness, Physically crosslinked composite hydrogels of PVA with natural macromolecules: structure, mechanical properties, and endothelial cell compatibility, *Journal of biomedical materials research. Part B, Applied biomaterials* 90(2) (2009) 492-502.
- [133] I.M. Garnica-Palafox, F.M. Sánchez-Arévalo, J. Hernandez-Cordero, M. Hautefeuille, Photomechanical response of PDMS+CNP composite under IR irradiation detected by dynamic speckle, *Latin America Optics and Photonics Conference*, Optical Society of America, Medellin, 2016, p. LW4D.3.
- [134] F.M. Sánchez-Arévalo, I.M. Garnica-Palafox, P. Jagdale, J. Hernández-Cordero, S.E. Rodil, A.O. Okonkwo, F.C. Robles Hernandez, A. Tagliaferro, Photomechanical response of composites based

- on PDMS and carbon soot nanoparticles under IR laser irradiation, *Opt. Mater. Express* 5(8) (2015) 1792-1805.
- [135] Recent Developments and Achievements in Biocybernetics and Biomedical Engineering, 2018.
- [136] J.F. Pertusa Grau, *Técnicas de análisis de imagen: aplicaciones en biología*, Universitat de València, València, 2003.
- [137] A.E. Carpenter, T.R. Jones, M.R. Lamprecht, C. Clarke, I.H. Kang, O. Friman, D.A. Guertin, J.H. Chang, R.A. Lindquist, J. Moffat, P. Golland, D.M. Sabatini, CellProfiler: image analysis software for identifying and quantifying cell phenotypes, *Genome Biology* 7(10) (2006) R100.
- [138] N.R. Kil'deeva, M.A. Kasatkina, S.N. Mikhailov, Peculiarities of obtaining biocompatible films based on chitosan cross linked by genipin, *Polymer Science - Series D* 10(2) (2017) 189-193.
- [139] F.L. Mi, S.S. Shyu, C.K. Peng, Characterization of ring-opening polymerization of genipin and pH-dependent cross-linking reactions between chitosan and genipin, *Journal of Polymer Science, Part A: Polymer Chemistry* 43(10) (2005) 1985-2000.
- [140] J. Ostrowska-Czubenko, M. Gierszewska, M. Pieróg, pH-responsive hydrogel membranes based on modified chitosan: water transport and kinetics of swelling, *Journal of Polymer Research* 22(8) (2015) 153.
- [141] H.S. Mansur, C.M. Sadahira, A.N. Souza, A.A.P. Mansur, FTIR spectroscopy characterization of poly(vinyl alcohol) hydrogel with different hydrolysis degree and chemically crosslinked with glutaraldehyde, *Materials Science and Engineering C* 28(4) (2008) 539-548.
- [142] F.L. Mi, H.W. Sung, S.S. Shyu, Synthesis and characterization of a novel chitosan-based network prepared using naturally occurring crosslinker, *Journal of Polymer Science, Part A: Polymer Chemistry* 38(15) (2000) 2804-2814.
- [143] E.L. Mogilevskaya, T.A. Akopova, A.N. Zelenetskii, A.N. Ozerin, The crystal structure of chitin and chitosan, *Polym. Sci. Ser. A* 48(2) (2006) 116-123.
- [144] C. Li, M. She, X. She, J. Dai, L. Kong, Functionalization of polyvinyl alcohol hydrogels with graphene oxide for potential dye removal, *Journal of Applied Polymer Science* 131(3) (2014).
- [145] Z. Abdeen, Swelling and reswelling characteristics of cross-linked poly(vinyl alcohol)/chitosan hydrogel film, *Journal of Dispersion Science and Technology* 32(9) (2011) 1337-1344.
- [146] M.N. Pervez, G.K. Stylios, Investigating the synthesis and characterization of a novel "green" H₂O₂-assisted, water-soluble chitosan/polyvinyl alcohol nanofiber for environmental end uses, *Nanomaterials* 8(6) (2018).
- [147] K. Lewandowska, Miscibility and thermal stability of poly(vinyl alcohol)/chitosan mixtures, *Thermochimica Acta* 493(1) (2009) 42-48.
- [148] L. Liu, H. Liang, J. Zhang, P. Zhang, Q. Xu, Q. Lu, C. Zhang, Poly(vinyl alcohol)/Chitosan composites: Physically transient materials for sustainable and transient bioelectronics, *Journal of Cleaner Production* 195 (2018) 786-795.

- [149] F. Navarro Pardo, *Cristalización de nanocompuestos poliméricos de Nylon: efecto de la incorporación de nanotubos de carbono y grafeno funcionalizados químicamente*, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Estado de México, México, 2013, p. 156.
- [150] E.A. El-Hefian, M.M. Nasef, A.H. Yahaya, *Preparation and characterization of chitosan/poly(vinyl alcohol) blended films: Mechanical, thermal and surface investigations*, *E-Journal of Chemistry* 8(1) (2011) 91-96.
- [151] F. Ganji, S. Vasheghani Farahani, E. Vasheghani-Farahani, *Theoretical Description of Hydrogel Swelling: A Review*, 2010.
- [152] S. Gunasekaran, W. Tao, C. Chunxiang, *Swelling of pH-sensitive chitosan-poly(vinyl alcohol) hydrogels*, *Journal of Applied Polymer Science* 102(5) (2006) 4665-4671.
- [153] J. Berger, M. Reist, J.M. Mayer, O. Felt, R. Gurny, *Structure and interactions in chitosan hydrogels formed by complexation or aggregation for biomedical applications*, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 57(1) (2004) 35-52.
- [154] J. Berger, M. Reist, J.M. Mayer, O. Felt, N.A. Peppas, R. Gurny, *Structure and interactions in covalently and ionically crosslinked chitosan hydrogels for biomedical applications*, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 57(1) (2004) 19-34.
- [155] N.V. Gupta, H.G. Shivakumar, *Investigation of Swelling Behavior and Mechanical Properties of a pH-Sensitive Superporous Hydrogel Composite*, *Iranian Journal of Pharmaceutical Research : IJPR* 11(2) (2012) 481-493.
- [156] S. Gupta, T.J. Webster, A. Sinha, *Evolution of PVA gels prepared without crosslinking agents as a cell adhesive surface*, *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 22(7) (2011) 1763-1772.
- [157] J.H. Kim, D.S. Shin, M.H. Han, O.W. Kwon, H.K. Lee, S.G. Lee, H.D. Ghim, J.M. Park, S.S. Han, S.K. Noh, W.S. Lyoo, *Surface free energy analysis of poly(vinyl alcohol) films having various molecular parameters*, *Journal of Applied Polymer Science* 105(2) (2007) 424-428.
- [158] M. Yin, X. Chen, R. Li, D. Huang, X. Fan, X. Ren, T.-S. Huang, *Preparation and characterization of antimicrobial PVA hybrid films with N-halamine modified chitosan nanospheres*, *Journal of Applied Polymer Science* 133(46) (2016).
- [159] G. Zhu, F. Wang, K. Xu, Q. Gao, Y. Liu, *Study on properties of poly(vinyl alcohol)/polyacrylonitrile blend film*, *Polímeros* 23 (2013) 146-151.
- [160] A.K. Bajpai, R. Bhatt, R. Katare, *Atomic force microscopy enabled roughness analysis of nanostructured poly (diaminonaphthalene) doped poly (vinyl alcohol) conducting polymer thin films*, *Micron* 90 (2016) 12-17.
- [161] S. Yarimitsu, S. Sasaki, T. Murakami, A. Suzuki, *Evaluation of lubrication properties of hydrogel artificial cartilage materials for joint prosthesis*, 2016.
- [162] R. Bhatt, D.S. Bisen, R. Bajpai, A.K. Bajpai, *Topological and morphological analysis of gamma rays irradiated chitosan-poly (vinyl alcohol) blends using atomic force microscopy*, *Radiation Physics and Chemistry* 133 (2017) 81-85.

- [163] S. Liang, L. Liu, Q. Huang, K.L. Yam, Preparation of single or double-network chitosan/poly(vinyl alcohol) gel films through selectively cross-linking method, *Carbohydrate Polymers* 77(4) (2009) 718-724.
- [164] L.P. Terrazas Bandala, G. González Sánchez, G.V. Nevárez Moorillón, M.d.L. Ballinas Casarrubias, Análisis de membranas poliméricas compuestas por microscopía de fuerza atómica, *Tecnociencia Chihuahua* 1(2) (2007) 18-26.
- [165] M.R.-C. Francisco Javier, Efecto de la rugosidad y heterogeneidad superficial en fenómenos de mojado, *Ciencias Físicas, Universidad de Granada, Granada*, 2009, p. 141.
- [166] T. Thanyacharoen, P. Chuysinuan, S. Techasakul, P. Nooeaid, S. Ummartyotin, Development of a gallic acid-loaded chitosan and polyvinyl alcohol hydrogel composite: Release characteristics and antioxidant activity, *International Journal of Biological Macromolecules* 107 (2018) 363-370.
- [167] C. Jin, A. Davoodabadi, J. Li, Y. Wang, T. Singler, Spherical indentation of a freestanding circular membrane revisited: Analytical solutions and experiments, *Journal of the Mechanics and Physics of Solids* 100 (2017) 85-102.
- [168] U. Komaragiri, M.R. Begley, J.G. Simmonds, The Mechanical Response of Freestanding Circular Elastic Films Under Point and Pressure Loads, *Journal of Applied Mechanics* 72(2) (2005) 203-212.
- [169] M.A. Sutton, J.J. Orteu, H.W. Shreier, *Image Correlation for Shape, Motion and Deformation Measurements: Basic Concepts, Theory and Applications.*, Springer, New York, 2009.
- [170] B.J. Muriene, T.D. Nguyen, A comparison of 2D and 3D digital image correlation for a membrane under inflation, *Optics and Lasers in Engineering* 77(Supplement C) (2016) 92-99.
- [171] GOM, ARAMIS User Manual Software, Optical Measurements Techniques, 2009.
- [172] L.R.G. Treloar, The elasticity and related properties of rubbers, *Reports on Progress in Physics* 36(7) (1973) 755.
- [173] N.C. Dafader, M.E. Haque, F. Akhtar, M.U. Ahmad, Study on the Properties of Blend Rubber Between Grafted Rubber Latex and Natural Rubber Latex by Gamma Radiation, *Polymer-Plastics Technology and Engineering* 45(7) (2006) 889-892.
- [174] E.P. Azevedo, R. Retarekar, M.L. Raghavan, V. Kumar, Mechanical properties of cellulose: chitosan blends for potential use as a coronary artery bypass graft, *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition* (2011) 1-14.
- [175] S. Li, Z. Li, T.L. Burnett, T.J.A. Slater, T. Hashimoto, R.J. Young, Nanocomposites of graphene nanoplatelets in natural rubber: microstructure and mechanisms of reinforcement, *Journal of Materials Science* 52(16) (2017) 9558-9572.
- [176] S. Phomrak, M. Phisalaphong, Reinforcement of Natural Rubber with Bacterial Cellulose via a Latex Aqueous Microdispersion Process, *Journal of Nanomaterials* 2017 (2017) 9.
- [177] R.S. Rivlin, A.G. Thomas, Large Elastic Deformations of Isotropic Materials. VIII. Strain Distribution around a Hole in a Sheet, *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series A, Mathematical and Physical Sciences* 243(865) (1951) 289-298.

- [178] B.F. Ju, K.-K. Liu, Characterizing viscoelastic properties of thin elastomeric membrane, *Mechanics of Materials* 34(8) (2002) 485-491.
- [179] B.F. Ju, K.-K. Liu, S.-F. Ling, W. Hong Ng, A novel technique for characterizing elastic properties of thin biological membrane, *Mechanics of Materials* 34(11) (2002) 749-754.
- [180] L.A. Taber, Large Deflection of a Fluid-Filled Spherical Shell Under a Point Load, *Journal of Applied Mechanics* 49(1) (1982) 121-128.
- [181] K.-T. Wan, Y.-W. Mai, Fracture mechanics of a shaft-loaded blister of thin flexible membrane on rigid substrate, *International Journal of Fracture* 74(2) (1996) 181-197.
- [182] W.H. Yang, W.W. Feng, On Axisymmetrical Deformations of Nonlinear Membranes, *Journal of Applied Mechanics* 37(4) (1970) 1002-1011.
- [183] S.P. Pearce, J.R. King, M.J. Holdsworth, Axisymmetric indentation of curved elastic membranes by a convex rigid indenter, *International Journal of Non-Linear Mechanics* 46(9) (2011) 1128-1138.
- [184] O. Jeon, S.J. Song, K.J. Lee, M.H. Park, S.H. Lee, S.K. Hahn, S. Kim, B.S. Kim, Mechanical properties and degradation behaviors of hyaluronic acid hydrogels cross-linked at various cross-linking densities, *Carbohydrate Polymers* 70(3) (2007) 251-257.
- [185] N. Sanabria-DeLong, A.J. Crosby, G.N. Tew, Photo-cross-linked PLA-PEO-PLA hydrogels from self-assembled physical networks: Mechanical properties and influence of assumed constitutive relationships, *Biomacromolecules* 9(10) (2008) 2784-2791.
- [186] L. Krishna, M. Jayabalan, Synthesis and characterization of biodegradable poly (ethylene glycol) and poly (caprolactone diol) end capped poly (propylene fumarate) cross linked amphiphilic hydrogel as tissue engineering scaffold material, *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 20(SUPPL. 1) (2009) S115-S122.
- [187] S. Lu, S. Ahir, V. Velasco, B. King, P. Xu, E.M. Terentjev, B. Panchapakesan, Photo-mechanical actuation of carbon nanotubes: Mechanisms and applications in micro and nano-devices, *Journal of Micro-Nano Mechatronics* 5(1) (2009) 29-41.
- [188] G.J. Tortora, B.R. Funke, C.L. Case, *Introducción a la microbiología*, 9 ed., Médica Panamericana, Buenos Aires, 2007.
- [189] P.E. Gil-Loyzaga, *Cultivo de Células Animales y Humanas. Aplicaciones en Medicina Regenerativa*, 1 ed., Vision Libros, Madrid, 2011.
- [190] A. Aryaei, A.H. Jayatissa, A.C. Jayasuriya, Mechanical and biological properties of chitosan/carbon nanotube nanocomposite films, *Journal of Biomedical Materials Research - Part A* 102(8) (2014) 2704-2712.
- [191] J.L. McKenzie, T. Webster, Protein Interactions at Material Surface, in: R. Narayan (Ed.), *Biomedical Materials*, Springer Science, New York, NY, 2009, pp. 215-238.
- [192] J. Vivas, D. Garzón-Alvarado, M. Cerrolaza, Modeling cell adhesion and proliferation: a cellular-automata based approach, *Advanced modeling and simulation in engineering sciences* 2 (2015) 32-32.

APÉNDICE A

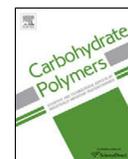
ARTÍCULOS DERIVADOS DE LA INVESTIGACIÓN

Carbohydrate Polymers 151 (2016) 1073–1081



Contents lists available at ScienceDirect

Carbohydrate Polymers

journal homepage: www.elsevier.com/locate/carbpol

Influence of natural and synthetic crosslinking reagents on the structural and mechanical properties of chitosan-based hybrid hydrogels

I.M. Garnica-Palafox^{a,b}, F.M. Sánchez-Arévalo^{a,*}^a Instituto de Investigaciones en Materiales, Universidad Nacional Autónoma de México, Apdo. Postal 70-360, Cd. Universitaria, Cd. de México 04530, Mexico^b Posgrado en Ciencia e Ingeniería de Materiales, Universidad Nacional Autónoma de México, Apdo. Postal 70-360, Cd. Universitaria, Cd. de México 04530, Mexico

ARTICLE INFO

Article history:

Received 26 February 2016

Received in revised form 7 June 2016

Accepted 8 June 2016

Available online 17 June 2016

Chemical compounds studied in this article:

Chitosan (PubChem CID: 71853)

Polyvinyl alcohol (PubChem CID: 11199)

Genipin (PubChem CID: 442424)

Glutaraldehyde (PubChem CID: 3485)

Keywords:

Chitosan

Poly(vinyl alcohol)

Hybrid hydrogels

Genipin

Glutaraldehyde

ABSTRACT

The objective of this work was to correlate the physical and chemical properties of chitosan/poly(vinyl alcohol)/genipin (CS/PVA/GEN) and chitosan/poly(vinyl alcohol)/glutaraldehyde (CS/PVA/GA) hydrogels with their structural and mechanical responses. In addition, their molecular structures were determined and confirmed using FTIR spectroscopy. The results indicated that the hybrid hydrogels crosslinked with genipin showed similar crystallinity, thermal properties, elongation ratio and structural parameters as those crosslinked with glutaraldehyde. However, it was found that the elastic moduli of the two hybrid hydrogels were slightly different: 2.82 ± 0.33 MPa and 2.08 ± 0.11 MPa for GA and GEN, respectively. Although the hybrid hydrogels crosslinked with GEN presented a lower elastic modulus, the main advantage is that GEN is five to ten thousand times less cytotoxic than GA. This means that the structural and mechanical properties of hybrid hydrogels crosslinked with GEN can easily be tuned and could have potential applications in the tissue engineering, regenerative medicine, food, agriculture and environmental industries.

© 2016 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

In recent years, natural and synthetic hydrogels have been developed to meet specific human requirements in different fields, such as the agricultural, environmental, food and even medical industries (Chawla, Srivastava, Pandey, & Chawla, 2014). The synthetic hydrogels that have frequently been used in the aforementioned fields are poly(ethylene glycol) (PEG), poly(ethylene oxide) (PEO) and poly(vinyl alcohol) (PVA) (Chawla et al., 2014). PVA has some particular advantages; among them, it has been reported to possess very low toxicity, hydrophilic behavior and a high elastic response. Nevertheless, PVA is soluble in water. This property could be disadvantageous for some applications; however, PVA has been widely used in applications such as articular cartilage and pancreas regeneration (Baker, Walsh, Schwartz, & Boyan, 2011; Paradossi, 2013, Chapter 2), drug-eluting

contact lenses (Carreira et al., 2014), sensors for biological variables (Carmona, Martinez, Londoño, Montoya, & Torres, 2015; Tou, Koh, & Chan, 2014) and even for capturing organic dyes and metallic ions (Hui, Zhang, & Ye, 2015; Li, She, She, Dai, & Kong, 2014). Natural hydrogels such as collagen, gelatin, alginate, agarose and chitosan (CS) are very attractive and are commonly used for biological applications. These hydrogels take advantage of their excellent biocompatibility properties (Sionkowska, 2013, Chapter 11); however, natural hydrogels do not meet the load requirements for specific applications due to their poor mechanical properties. Furthermore, their mechanical properties have to be tuned.

The combination of synthetic and natural hydrogels has produced the so-called hybrid hydrogels; due to their easy preparation and the miscibility of PVA in CS, the CS/PVA blend is now one of the most used hybrid hydrogels (El-Hefian, Nasef, & Yahaya, 2010; Naveen Kumar et al., 2010). This blend benefits from the high elasticity of PVA and the good strength and biocompatibility of CS; therefore, the resulting blend, using the correct proportions of synthetic and natural hydrogels, could possess mechanical properties that are similar to those of human tissues. However,

* Corresponding author.

E-mail address: fsanchez@iim.unam.mx (F.M. Sánchez-Arévalo).



Macro- and micromechanical responses of an elastomeric membrane undergoing biaxial tension by indentation

I. M. Garnica-Palafox¹ , M. Álvarez-Camacho² , and F. M. Sánchez-Arévalo^{1,*}

¹Instituto de Investigaciones en Materiales, Universidad Nacional Autónoma de México, Apdo. Postal 70-360, Cd. Universitaria, 04510 Mexico, Mexico

²Laboratorio de Ingeniería de Rehabilitación, Instituto Nacional de Rehabilitación, Luis Guillermo Ibarra Ibarra, Av. México Xochimilco 289, Col. Arenal de Guadalupe, 14389 Mexico, Mexico

Received: 20 February 2019

Accepted: 25 July 2019

© Springer Science+Business Media, LLC, part of Springer Nature 2019

ABSTRACT

The aim of this work was to develop a methodology and a mechanical tester to determine the macro- and micromechanical behaviours of elastomers under biaxial tension by spherical indentation. Combining the Yang and Begley models, in addition to the experimental data obtained from our mechanical tester, a new methodology to understand the mechanical response of elastomers is presented; this methodology includes elastic modulus, elongation ratios and full-field micro-strain patterns of polymeric membranes undergoing biaxial tension. It was demonstrated that the micro-strain patterns, obtained through 3D digital image correlation, were heterogeneous and higher than those estimated for region contact by numerical models. After an extensive analysis, a general analytical expression that considers the complete set of load versus central displacement experimental data was found to calculate the elastic modulus of elastomers with better accuracy than traditional models. Our device and methodology could become an excellent tool to evaluate the macro- and micromechanical behaviours of soft polymers, cross-linked hydrogels and even biological tissues that exhibit rubber-like mechanical behaviour.

Introduction

During the last seven decades, the problem of the large deflection of a clamped circular plate has been of interest to authors in areas such as mechanics,

physics of solids and even recently biomedical disciplines and medicine. Analytical, numerical and experimental efforts have been undertaken in previous works to consider these three points of view. In particular, extensive research exists on this problem, and some authors have done excellent recombinations

M. Álvarez-Camacho: Research leave at Instituto de Investigaciones en Materiales, Universidad Nacional Autónoma de México.

Address correspondence to E-mail: fsanchez@iim.unam.mx

<https://doi.org/10.1007/s10853-019-03887-w>

Published online: 05 August 2019



Influencia de Agentes Entrecruzantes Naturales y Sintéticos sobre las Propiedades Mecánicas y Estructurales de Hidrogeles Híbridos de Quitosano y Poli(Alcohol Vinílico)

Garnica-Palafox I.M.^{1,2}, Sánchez Arévalo F.M.¹

¹ Departamento de Reología y Mecánica de Materiales, Instituto de Investigaciones en Materiales, UNAM

² Posgrado en Ciencia e Ingeniería de Materiales, UNAM

INTRODUCCIÓN

Los hidrogeles son redes macromoleculares reticuladas o entrecruzadas capaces de absorber grandes cantidades de líquido sin disolverse, son permeables al oxígeno, poseen una estructura suave y elástica, y presentan una baja tensión interfacial con el agua o fluidos biológicos [1]. Pueden estar compuestos por polímeros sintéticos, por polímeros naturales o bien, por una mezcla de ambos, conformando así los denominados hidrogeles híbridos.

El quitosano (CS) y el poli(alcohol vinílico) (PVA), son dos polímeros ampliamente usados en la formación de hidrogeles híbridos. El CS es un polisacárido biocompatible, biodegradable y con propiedades antimicrobianas; sin embargo, por sí solo, forma hidrogeles sumamente frágiles. Con el fin de mejorar sus propiedades mecánicas, se ha buscado mezclarlo con polímeros de origen sintético entre los que destaca el PVA, un polímero soluble en agua, semicristalino, altamente hidrófilo, elástico y no tóxico. Algunos autores han llevado a cabo investigaciones para entender la respuesta mecánica, térmica y biológica de la mezcla CS/PVA [2, 3], evidenciando el potencial de estos hidrogeles para ser usados como liberadores de fármacos, como andamios celulares para la regeneración de tejidos ó incluso como membranas de adsorción. No obstante, algunas de estas aplicaciones requieren mayor estabilidad en ambientes húmedos y mejores propiedades mecánicas que las que la mezcla CS/PVA puede ofrecer. Es por ello que para optimizar su uso y ampliar su gama de aplicaciones, se ha promovido el uso de diversos agentes entrecruzantes, siendo el glutaraldehído (GA) el agente frecuentemente empleado. El GA es un producto químico sintético altamente citotóxico y mutágeno, lo cual compromete la viabilidad y biocompatibilidad de los hidrogeles de CS/PVA si no reacciona por completo. Debido a ello, en este trabajo se propone el uso de genipin (GEN), un entrecruzante natural entre 5,000-10,000 veces menos citotóxico que el GA [4], como agente entrecruzante de la mezcla CS/PVA.

METODOLOGÍA

Con la finalidad de comparar la eficiencia de ambos agentes entrecruzantes (GA y GEN) así como sus efectos sobre las propiedades mecánicas y estructurales de los hidrogeles de CS/PVA, tres grupos de hidrogeles híbridos en forma de membranas delgadas (CS/PVA, CS/PVA/GEN y CS/PVA/GA) fueron sintetizados mediante el método de evaporación de los disolventes o solvent casting. La concentración de los entrecruzantes, en sus respectivas disoluciones CS/PVA/GEN o CS/PVA/GA, fue de 0.05% p/v.

Una vez que las membranas se formaron, fueron caracterizadas mediante espectroscopia de infrarrojo (FT-IR), difracción de rayos X (DRX), pruebas de hinchamiento y ensayos de tracción uniaxial. A través de FT-IR se buscaba confirmar el entrecruzamiento químico de la red polimérica debido al genipin o glutaraldehído y mediante DRX determinar cuantitativamente el porcentaje de cristalinidad de los hidrogeles.

Por otro lado, las pruebas de hinchamiento fueron útiles para conocer la cinética de absorción de los hidrogeles (i.e. la cantidad de líquido presente en su red polimérica como función del tiempo) y para determinar el porcentaje de agua que pueden retener una vez que se alcanza el equilibrio. En este sentido, el índice de hinchamiento es obtenido por la relación (1):

$$Q (\%) = \frac{w_f - w_0}{w_0} \times 100 \quad (1)$$

en donde Q es el porcentaje de líquido al interior de la red, w_f es el peso de la muestra hinchada a un tiempo t y w_0 el peso en seco de la misma muestra a t = 0, es decir, antes de ser inmersa en el líquido [5].

Elsevier Editorial System(tm) for
Carbohydrate Polymers
Manuscript Draft

Manuscript Number: CARBPOL-D-19-03230

Title: Influence of multi-walled carbon nanotubes on the physico-chemical and biological responses of chitosan-based hybrid hydrogels

Article Type: Research Paper

Keywords: Chitosan; Poly(vinyl alcohol); Hybrid hydrogels; Genipin; Multi-walled carbon nanotubes; Biaxial tension

Corresponding Author: Professor Francisco Manuel Sánchez-Arévalo, Ph D

Corresponding Author's Institution: Instituto de Investigaciones en Materiales, Universidad Nacional Autónoma de México Apdo.Postal 70-360, Cd. Universitaria, D.F. 04510,México

First Author: Itzel M Garnica-Palafox, Ph D

Order of Authors: Itzel M Garnica-Palafox, Ph D; Hector O Estrella-Monroy, BSc; Nadia A Vázquez-Torres, Ph D; Michelin Álvarez-Camacho, Ph D; Andrés Castell-Rodríguez, Ph D; Francisco Manuel Sánchez-Arévalo, Ph D

Abstract: Chitosan (CS) and poly(vinyl alcohol) (PVA) were filled with multi-walled carbon nanotubes (MWCNTs) and successfully crosslinked with genipin (GEN), yielding homogeneous membranes through the solvent casting method. These hybrid hydrogels showed interesting physico-chemical properties that are suitable for biological applications. It was demonstrated that the addition of a small quantity of MWCNTs did not contribute to the thermal stability of hydrogels under a nitrogen atmosphere, but in contrast, the MWCNTs enhanced the crystallinity and increased the elastic modulus of these nano- composite hybrid hydrogels. Moreover, the swelling and wettability capacities of these materials were improved by the obtained chemical structures; the hydrogels offered free OH and NH₂ functional groups on their surface and therefore enhanced the adhesion and proliferation of human dermal fibroblast cells, showing typical morphologies and sizes. Additionally, non-cytotoxic effects were observed for these nanocomposite hybrid hydrogels, suggesting their potential use in tissue engineering and biomedical applications.

Suggested Reviewers: Assunta Borzacchiello Ph D
Institute of Composite and Biomedical Materials, National Research Council
bassunta@unina.it
Professor Borzacchiello is an expert in materials science, particularly in the synthesis, characterization and molecular structures of hybrid hydrogels

Herman Mansur Ph D
Materials and Metallurgical Engineering, Federal University of Minas Gerais: Belo Horizonte
hmansur@demet.ufmg.br
Professor Mansur has huge experience regarding hybrid hydrogels for biomedical applications

*Manuscript

[Click here to view linked References](#)

Influence of multi-walled carbon nanotubes on the physico-chemical and biological responses of chitosan-based hybrid hydrogels

I. M. Garnica-Palafox^{a,b}, H. O. Estrella-Monroy^a, N.A. Vázquez-Torres^{a,c}, M. Álvarez-Camacho^{d,e}, A. E. Castell-Rodríguez^c, F.M. Sánchez-Arévalo^{a,c,*}

^a*Instituto de Investigaciones en Materiales. Universidad Nacional Autónoma de México. Apdo. Postal 70-360, Cd. Universitaria, México, D. F. 04360*

^b*Posgrado en Ciencia e Ingeniería de Materiales. Universidad Nacional Autónoma de México. Apdo. Postal 70-360, Cd. Universitaria, México, D. F. 04360*

^c*Facultad de Medicina. Universidad Nacional Autónoma de México. Apdo. Postal 70-360, Cd. Universitaria, México, 04510.*

^d*Instituto Nacional de Rehabilitación, Luis Guillermo Ibarra Ibarra. Av. México Xochimilco 289, Col. Arenal de Guadalupe, Ciudad de México 14389, México.*

^e*Research leave at Instituto de Investigaciones en Materiales. Universidad Nacional Autónoma de México. Apdo. Postal 70-360, Cd. Universitaria, México, D. F. 04360.*

Abstract

Chitosan (CS) and poly(vinyl alcohol) (PVA) were filled with multi-walled carbon nanotubes (MWCNTs) and successfully crosslinked with genipin (GEN), yielding homogeneous membranes through the solvent casting method. These hybrid hydrogels showed interesting physico-chemical properties that are suitable for biological applications. It was demonstrated that the addition of a small quantity of MWCNTs did not contribute to the thermal stability of hydrogels under a nitrogen atmosphere, but in contrast, the MWCNTs enhanced the crystallinity and increased the elastic modulus of these nanocomposite hybrid hydrogels. Moreover, the swelling and wettability capacities of these materials were improved by the obtained chemical structures; the hydrogels offered free OH and NH₂ functional groups on their surface and therefore enhanced the adhesion and proliferation of human dermal fibroblast cells, showing typical morphologies and sizes. Additionally, non-cytotoxic effects were observed for these nanocomposite hybrid hydrogels, suggesting

*Corresponding author

Email address: fsanchez@iim.unam.mx (F.M. Sánchez-Arévalo)

Preprint submitted to Elsevier

1 de agosto de 2019