



**UNIVERSIDAD MICHOACANA DE
SÁN NICOLÁS DE HIDALGO**



INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN EN METALURGIA Y MATERIALES

**PROGRAMA DE DOCTORADO EN METALURGIA Y CIENCIAS DE LOS
MATERIALES**

**DESARROLLO E INCORPORACIÓN DE MICROESFERAS
BIODEGRADABLES EN ANDAMIOS POROSOS DE BIOVIDRIO CEL2**

Tesis que para obtener el grado de
Doctor en Metalurgia y Ciencias de los Materiales presenta:

M. C. ESMERALDA VILICAÑA MOLINA

Director de Tesis:

PhD. ENA ATHENEA AGUILAR REYES

MORELIA, MICHOACÁN, FEBRERO DEL 2019.

DEDICATORIA Y AGRADECIMIENTOS.

“La vida no es fácil, pero hay un motor llamado CORAZÓN, un seguro llamado FÉ y un conductor llamado DIOS”

El presente trabajo de investigación está dedicado a:

Mi esposo Neftali y mi hija Nathalie, quienes durante todo este proceso estuvieron a mi lado y me apoyaron en todas las decisiones que tomé, aunque a veces fuera difícil. Por la paciencia que me tuvieron y el apoyo que me brindaron, por ser esos dos pilares que sostuvieron mis ganas de seguir.

A mi madre Raquel Molina, quien con sus consejos, apoyo y regaños me ha mantenido siempre firme haciendo de mi lo que hasta el día de hoy soy, alguien que sabe que siempre puede más y no se rinde fácilmente.

A mi padre Miguel Villicaña, que desde el cielo sabe que gran parte de mi trabajo es dedicado a él por haber sido el principal promotor de mis sueños.

A mis hermanos Miguel, Yesi y Edgar, quienes han estado siempre presentes, acompañándome en todo momento y apoyándome moralmente durante toda esta etapa.

Doy gracias principalmente a Dios por inspirarme y darme fuerza para levantarme cada mañana y seguir adelante, por dejarme existir en cuerpo y alma, brindarme lo que necesito y retirarme lo que no, en el momento justo.

Gracias al Instituto de Investigación en Metalurgia y Materiales (UMSNH) por haberme abierto sus puertas y brindado la oportunidad de realizar mis estudios en un ambiente lleno de apoyo.

Gracias a mi asesora, la Dra Ena Athenea Aguilar Reyes por su apoyo, sus consejos, su dedicación y su empeño en que mi trabajo tuviera resultados favorables, por haberme aceptado en su grupo de trabajo y darme la oportunidad de crecer en el área de la investigación.

Finalmente, gracias al CONACYT, por el apoyo económico brindado durante esta etapa de mi vida.

ÍNDICE GENERAL

DEDICATORIA Y AGRADECIMIENTOS.....	ii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	viii
ÍNDICE DE TABLAS.....	xii
GLOSARIO	xiv
RESUMEN.....	xvii
ABSTRACT	xviii
CAPITULO 1. INTRODUCCIÓN	20
1.1 Objetivos.....	23
1.1.1 Objetivo general.....	23
1.1.2 Objetivos particulares	23
1.2 Justificación.....	24
1.3 Hipótesis	25
1.4 Metas del proyecto	25
CAPITULO 2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	26
2.1 ¿Que son los Biomateriales?.....	26
2.1.2 Características de la ciencia de los biomateriales.	27
2.1.3 Clasificación general de los biomateriales	27
2.2 Evolución de los Biocerámicos: de inertes a regenerativos.....	28
2.3 Composición de los tejidos duros del cuerpo humano.....	32
2.4 La ingeniería de tejidos.....	33
2.5 Vidrios bioactivos y su relación con el sistema óseo.....	37
2.5.1 Vidrio bioactivo CEL2.....	37
2.6 Polímeros Biodegradables y sus aplicaciones biomédicas	38
2.6.1 Quitosano	40

2.6.2 Pectina	41
2.7 Mecanismos de liberación de fármacos	42
2.7.1 Matrices vítreas bioactivas: Liberación de fármacos	43
2.7.2 Métodos para sintetizar cerámicos porosos.....	47
2.8 Liberación de fármacos en andamios regenerativos	52
2.8.1 Liberación de antibióticos para evitar infecciones.....	54
2.9 Microesferas biodegradables de liberación controlada.....	57
2.9.1 Métodos de obtención de microesferas (MEs).....	59
2.10 Estado del arte.....	67
2.10.1 Andamios y microesferas	67
CAPITULO 3. DESARROLLO EXPERIMENTAL	75
3.1 Materias primas.....	75
3.1.1 Para la fabricación de los andamios	75
3.1.2 Para la producción de microesferas.....	75
3.1.3 Para las pruebas biológicas	75
3.2 Elaboración del vidrio bioactivo CEL2	76
3.2.1 Caracterización del polvo del biovidrio CEL2.....	77
3.3 Elaboración de los andamios de vidrio bioactivo CEL2.....	77
3.4 Caracterización de los andamios de vidrio bioactivo CEL2.....	80
3.4.1 Cálculo de la porosidad	80
3.4.2 Morfología de la superficie	81
3.4.3 Análisis de las fases presentes.....	81
3.4.4 Determinación del área superficial específica.....	81
3.4.5 Pruebas de compresión.....	82
3.5 Evaluación de la bioactividad	83

3.6 Caracterización de los andamios después de la inmersión en SBF	86
3.7 Elaboración de las microesferas de biopolímeros.....	86
3.7.1 Microesferas de pectina.....	87
3.7.2 Microesferas de quitosano.....	88
3.8 Caracterización de las microesferas.....	89
3.8.1 Porcentaje de rendimiento	89
3.8.2 Cálculo de la pérdida de humedad	90
3.8.3 Determinación del tamaño de partícula y distribución de tamaño de partícula	90
3.8.4. Estudio morfológico.....	90
3.8.5 Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC)	90
3.8.6 Difracción de rayos X (XRD)	90
3.8.7 Espectrofotometría infrarroja	91
3.9 Adición del fármaco en las microesferas de quitosano.....	91
3.10 Caracterización de las microesferas de quitosano cargadas con fármaco.....	92
3.10.1 Porcentaje de rendimiento de las microesferas cargadas con fármaco	92
3.10.2 Caracterizaciones complementarias	92
3.10.3 Eficiencia de encapsulamiento de la droga	92
3.11 Adición de microesferas a los andamios.....	93
3.12 Caracterización de los andamios de biovidrio CEL2/microesferas cargadas de acetaminofén.....	93
3. 12.1 Morfología de los andamios.....	93
3.12.2 Porosidad.....	94
3.12.3 Pruebas de compresión.....	94
3.13 Pruebas de bioactividad <i>in vitro</i>	94
3.13.2 Pruebas mecánicas después de inmersión en SBF	95

3.14 Cinética de liberación de fármaco de las microesferas incorporadas a los andamios tridimensionales	96
3.15 Pruebas celulares.....	97
3.15.1 Cultivo celular	97
3.15.2 Ensayo de viabilidad celular	98
CAPITULO 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	100
4.1 Fabricación y caracterización del vidrio bioactivo CEL2.....	100
4.1.1 Tamaño y distribución de tamaño de partícula	100
4.1.2 Resultados de DRX	101
4.1.3 Análisis térmico diferencial	102
4.2 Resultados de los primeros andamios sinterizados.....	103
4.2.1 Porosidad de los andamios sinterizados	103
4.2.2 Resultados por microscopia electrónica de barrido.....	105
4.2.3 Resultados de difracción de rayos X.....	106
4.2.4 Superficie específica de los andamios de vidrio bioactivo CEL2	107
4.2.5 Pruebas de compresión.....	107
4.3 Bioactividad in vitro en SBF.....	109
4.4 Resultados de la fabricación de microesferas de biopolímeros	112
4.4.1 Microesferas de pectina.....	112
4.5.2 Microesferas de quitosano sin y con fármaco	119
4.6 Resultados de los andamios con adición de microesferas de quitosano	131
4.6.1 Morfología de los andamios.....	131
4.6.2 Porcentaje de MEs de quitosano adheridas a los andamios tridimensionales.....	133
4.6.3 Porosidad de los andamios después de la adhesión de microesferas	133
4.6.4 Pruebas de compresión.....	134

4.6.5 Evaluación de la bioactividad in vitro en SBF.....	136
4.6.7 Espectrofotometría infrarroja	137
4.6.8 Difracción de Rayos X.....	138
4.6.9 Cinética de liberación.....	139
4.7 Resultados de las pruebas biológicas.....	142
4.7.1 Viabilidad celular	142
4.7.2 Proliferación celular	142
4.7.3 Adhesión celular.....	144
CAPITULO 5. CONCLUSIONES.....	146
Recomendaciones y trabajo futuro.	147
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	148

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. 1 Esquema de distintas matrices y tipos de fármacos que pueden intercambiarse.	22
Figura 2. 1 Aplicaciones biomédicas de los materiales cerámicos [20]......	29
Figura 2. 2 Biomateriales y su relación con las ciencias e ingeniería [20].	30
Figura 2. 3 Sustancias que intervienen en la regeneración de tejido óseo [21]......	31
Figura 2. 4 Estrategia de ingeniería de tejidos [24]......	34
Figura 2. 5 Distintas posibilidades de implantar un andamio en la reconstrucción de hueso natural [20].	35
Figura 2. 6 Estructura química del Quitosano	40
Figura 2. 7 Estructura química de la pectina.	42
Figura 2. 8 Representación bidimensional de (a) red cristalina de SiO ₂ , (b) red de SiO ₂ vítrea, y (c) red de sílice con modificadores de red. En los tres casos el cuarto átomo de oxígeno de cada tetraedro [SiO ₄] se encuentra situado en un plano superior o inferior. En (d) puede observarse, en detalle, los distintos constituyentes de un vidrio con modificadores de red [29]......	43
Figura 2. 9 Protocolos estático y dinámico. En este último se hace circular el suero con una bomba peristáltica [29].	45
Figura 2. 10 Esquema de las técnicas de caracterización útiles para evaluar la bioactividad de los vidrios.	46
Figura 2. 11 Técnica de la réplica [54]......	48
Figura 2. 12 Método del molde de sacrificio [54]......	49
Figura 2.13 Método del espumado directo [54].	50
Figura 2. 14 Método por tecnología de polvos [55].	51
Figura 2. 15 Posibles localizaciones de la gentamicina respecto a los poros de un andamio [92].	56
Figura 2. 16 Preparación del método de evaporación/extracción del solvente en fase acuosa o/w [94].	61
Figura 2. 17 Diagrama de flujo para la obtención de las microesferas por el método de emulsión múltiple w/o/w [94].	62

Figura 2. 18 Preparación del método de evaporación/extracción del solvente en fase oleosa o/o [94].	63
Figura 2. 19 Microesferas de PHBV a diferentes aumentos [35].....	69
Figura 2. 20 Adhesión de microesferas de PHBV en los andamios de biovidrio 45S5 [35].....	69
Figura 2. 21 Capa de hidroxiapatita en andamios 45S5/MEs de PHBV a diferentes magnificaciones [35].	70
Figura 2. 22 Microesferas de quitosano y andamio compuesto del polímero y microesferas [139].	70
Figura 2. 23 Microesferas de PHBV a diferentes magnificaciones [66].....	71
Figura 2. 24 Microesferas de PHBV adheridas a la superficie del andamio [66].	72
Figura 2. 25 Andamio de biovidrio 45S5 con microesferas de PHBV después de inmersión en SBF [66].	72
Figura 2. 26 Microesferas de PHBV a diferentes magnificaciones [73].....	73
Figura 2. 27 Imágenes de SEM de los andamios de PLGA/microesferas PHBV antes (a, b, c) y después (d, e, f) de cultivos celulares [73].	73
Figura 2. 28 Andamios para regeneración ósea hecho a base de microesferas de quitosano, interconectividad y microtomografía.....	74
Figura 3. 1 Ciclo térmico para la fabricación del vidrio CEL2.	76
Figura 3. 2 Diagrama esquemático del método combinado de tecnología de polvos y espumado de polímeros.	78
Figura 3. 3 Ciclo térmico diseñado para el espumado.....	79
Figura 3. 4 Ciclo térmico diseñado para la pirólisis y el sinterizado.	79
Figura 3. 5 Proceso completo para la elaboración de andamios de biovidrio CEL2.	80
Figura 3. 6 Diseño de corte para el análisis por MEB a las espumas de biovidrio CEL2.....	81
Figura 3. 7 Máquina universal para ensayos de compresión.....	82
Figura 3. 8 Procedimiento de inmersión de andamios en solución SBF.	86
Figura 3. 9 Método de emulsión/evaporación del solvente para la fabricación de microesferas.	87

Figura 3. 10 Proceso de obtención de las microesferas de pectina.	88
Figura 3. 11 Proceso de obtención de las microesferas de quitosano.	89
Figura 3. 12 Proceso de adición de microesferas de quitosano a las paredes del andamio.	93
Figura 3. 13 Andamio de biovidrio CEL2/microesferas inmerso en solución SBF después de 7 días, listo para someterse a prueba de resistencia a la compresión.	95
Figura 3. 14 Procedimiento para medir la cinética de liberación del fármaco en los andamios cargados con microesferas.	96
Figura 3. 15 Método de sembrado de células e incubación.	97
Figura 3. 16 Diagrama de proceso del ensayo MTT para medir la viabilidad celular.	98
Figura 4. 1. Distribución de tamaño de partícula del biovidrio CEL2.	101
Figura 4. 2 Espectro de difracción de rayos X del vidrio amorfo	102
Figura 4. 3 Análisis térmico diferencial del vidrio CEL2.	103
Figura 4. 4 Apariencia física de las primeras 4 formulaciones (Lote 1).	104
Figura 4. 5 Apariencia física y micrografía de las espumas de 55% CEL2 (Lote 2).	105
Figura 4. 6 Micrografías de los andamios con composición 55% CEL2, 3% TSH, 42% resina a diferentes magnificaciones.	106
Figura 4. 7 Espectro de difracción de rayos X del andamio de biovidrio CEL2.	107
Figura 4. 8 Curva esfuerzo-deformación de un andamio poroso.	108
Figura 4. 9 resistencia a la compresión obtenida para tres composiciones de andamios de biovidrio CEL2.	109
Figura 4. 10 Espectro de Rayos X de una espuma de biovidrio CEL2 sin inmersión en SBF y una con 3 días de inmersión.	110
Figura 4. 11 Micrografías por MEB de andamios sumergidos en SBF durante 1, 3, 7, 14 y 21 días, respectivamente.	111
Figura 4. 12 Distribución de tamaño de microesferas de pectina.	113
Figura 4. 13 Micrografías por MEB de microesferas de pectina a: (a) 100X, (b) 250X, (c) 1000X, y (d) 4000X.	115

Figura 4. 14 Micrografías de (a) polvos de pectina a 100X, (b, c, d, e) microesferas de pectina a diferentes magnificaciones, 50, 100, 250 y 1000X.	116
Figura 4. 15 Termogramas de DSC de pectina pura y microesferas de pectina.....	117
Figura 4. 16 Espectro de difracción de rayos X de la pectina pura y de las microesferas de pectina.....	118
Figura 4. 17 Espectro de infrarrojo de la pectina pura y las MEs de pectina.	119
Figura 4. 18 Distribución de tamaño de partícula de las MEs de quitosano	120
Figura 4. 19 Microesferas de quitosano sin carga (a) 10,000X y (b)100 000X.	122
Figura 4. 20 Microesferas de quitosano con carga de acetaminofén.....	123
Figura 4. 21 Termogramas de DSC para el (a) acetaminofén puro, (b) quitosano puro, y (c) MEs de quitosano, y MEs de quitosano cargadas con fármaco.	124
Figura 4. 22 Espectro de difracción de rayos X del (a) acetaminofén puro.	125
Figura 4. 23 Espectro de difracción de rayos X de las MEs de quitosano con carga y sin carga.	126
Figura 4. 24 Espectro de FT-IR de acetaminofén puro, quitosano puro, microesferas de quitosano, y microesferas de quitosano cargadas con acetaminofén.....	127
Figura 4. 25 Espectro UV-vis de las muestras estándares del acetaminofén.	128
Figura 4. 26 Curva de calibración del acetaminofén.....	129
Figura 4. 27 Curvas de absorbancia obtenidas en 6 muestras de MEs de quitosano con acetaminofén en relación 2:1.....	130
Figura 4. 28 Micrografías por MEB de andamios de biovidrio CEL2 con MEs de quitosano/acetaminofén. (a) Estructura del andamio, (b, c, d, e, f) acercamiento del andamio, diferentes magnificaciones.	132
Figura 4. 29 Comportamiento típico de un material poroso sometido a compresión, resultado de una de las muestras húmedas sometida a compresión.....	135
Figura 4. 30 Resistencia mecánica de andamios de biovidrio CEL2 sin microesferas, andamios sin microesferas en medio húmedo y andamios con microesferas en medio húmedo después de la inmersión en SBF por 21 días.	135
Figura 4. 31 Monitoreo de pH en los andamios durante 21 días.	136

Figura 4. 32 Micrografías por MEB de andamios con MEs sumergidos en SBF durante 7 días. (a) 250X, (b) 1500X, (c) 5000X, y (d) 10000X.	137
Figura 4. 33 Espectros de FT-IR de andamios de CEL2 con MEs a (a) 0 d, (b) 1d, (c) 3 y (d) 7 d después de haber sido inmersas en solución SBF.	138
Figura 4. 34 Espectros de Rayos X de espumas de biovidrio CEL2 con MEs después de inmersión en SBF por 0, 1, 3 ,7 y 14 días.	139
Figura 4. 35 Cinética de liberación de acetaminofén en MEs de quitosano y en andamios de biovidrio CEL2 cargados con MEs de quitosano.	140
Figura 4. 36 Cinética de liberación de acetaminofén en los andamios cargados de MEs mediante la ecuación de Peppas [48].	141
Figura 4. 37 Medición de la densidad óptica (D.O.) de C: Control, E: andamios, E/MEs: andamios con MEs cargadas de acetaminofén, para la evaluación de la viabilidad celular.....	142
Figura 4. 38 Proliferación celular durante 5 días. Resultados de el ensayo MTT para el control (solamente fibroblastos), andamios y andamios con MEs de quitosano en un tiempo de 4, 48, 72, 96 y 120 h. las letras diferentes indican las diferencias estadísticas. cada variación estadística fue analizada entre el mismo grupo experimental: letra a para el control, a´ para los andamios y a’’ para andamios con MEs. b y c para los demás grupos experimentales	144
Figura 4. 39 Imágenes de MEB de fibroblastos adheridos a las paredes del andamio con microesferas de quitosano cargadas con acetaminofén a diferentes magnificaciones: (a) 250 X, (b) 500 X, (c) 1000 X, (d) 5000X.....	145

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 2. 1 Clasificación de los Biomateriales según su interacción con el entorno [19.].	28
Tabla 2. 2 Composiciones de vidrios bioactivos que han mostrado excelentes propiedades bioactivas <i>in vitro</i>	38
Tabla 2. 3 Ejemplos de principios activos y polímeros empleados para la preparación de MEs biodegradables.....	65
Tabla 3. 1 Matriz de composiciones para la elaboración de los andamios.....	78
Tabla 3. 2 Reactivos y cantidades que conforman la Solución SBF. mM (=mmol/dm ³)......	83
Tabla 3. 3 Parámetros empleados en la elaboración de microesferas de quitosano.	91

Tabla 4. 1 Porosidad obtenida de los andamios de biovidrio para diferentes formulaciones biovidrio-ligante-espumante.....	103
Tabla 4. 2 Características de microesferas reportadas en la literatura.....	113
Tabla 4. 3 Comparación de temperaturas características en la pectina pura y las microesferas de pectina.....	117
Tabla 4. 4 Trabajos reportados en la literatura sobre MEs de quitosano.....	121
Tabla 4. 5 Grupos funcionales del quitosano y del acetaminofén.	127
Tabla 4. 6 Absorbancia obtenida en cada concentración de estándar.....	128
Tabla 4. 7 Concentración y eficiencia de encapsulamiento calculada respecto a la absorbancia obtenida.	131
Tabla 4. 8 Valores de porosidad de los andamios con y sin incorporación de MEs.	133

GLOSARIO

Acetaminofén: Es un fármaco con propiedades analgésicas y antipiréticas utilizado principalmente para tratar la fiebre, el resfriado y el dolor.

Agente quelante: Un Agente quelante, o secuestrante, o antagonista de metales pesados, es una sustancia que forma complejos fuertes con iones de metales pesados. A estos complejos se los conoce como quelatos, y generalmente evitan que estos metales pesados puedan reaccionar.

Aloinjerto: Transferencia de un tejido entre dos individuos de la misma especie, pero genéticamente diferentes, como en los trasplantes realizados entre dos seres humanos que no son gemelos idénticos.

Bioactividad: Capacidad de formar un enlace directo con el hueso, sin interposición de una cápsula fibrosa.

Biocompatibilidad: Habilidad de un material para actuar con una respuesta del huésped apropiada a una reacción específica.

Biomaterial: Material del que interactúa interracialmente con sistemas biológicos con el fin de evaluar, tratar, aumentar o substituir algún tejido, órgano o función del organismo. celulares. Son los agentes responsables de la comunicación intercelular.

Biopolímero: son macromoléculas presentes en los seres vivos. Se consideran materiales poliméricos o macromoleculares sintéticos con la particularidad de ser biocompatibles con el ser vivo

Colágeno: Sustancia proteínica albuminoidea que existe en el tejido conjuntivo, en los cartílagos y en los huesos.

Densidad aparente: Densidad del volumen del material, incluyendo poros y vacíos presentes en el mismo.

Densidad esquelética: Densidad real del material, sin considerar poros o vacíos presentes en el mismo.

Diferenciación celular: Es el proceso mediante el cual una célula se convierte en otro tipo celular más especializado. Este cambio implica muchas veces variaciones morfológicas, de la composición de su membrana o de su localización se producen debido a una reprogramación de la de su expresión génica.

Emulsión: En el ámbito de la química, se llama emulsión a la dispersión de un fluido en otro con el cual no puede mezclarse.

Fibroblasto: Son células con forma de cohetes o estrellas y proceden de las células cutáneas del tejido conectivo (células del tejido conectivo forman los tejidos de relleno y de soporte del cuerpo). Producen colágeno y elastina, dos sustancias que proporcionan fuerza y flexibilidad a la piel y tienen un papel importante en la reparación de las lesiones cutáneas.

HA. Hidroxiapatita. Su fórmula molecular $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$.

In vitro: Que se produce u ocurre en un tubo de ensayo.

In vivo: Que está situado u ocurre en un cuerpo vivo.

Ingeniería de tejidos: Especialidad que aplica los principios de la ingeniería y las ciencias de la vida a la fabricación de sustitutos biológicos que mantengan, mejoren o restauren la función de órganos y tejidos en el cuerpo humano.

Macroporosidad: Porosidad asociada a interconexiones de poros de un diámetro superior a $10\mu\text{m}$.

Matriz extracelular: Es el conjunto de materiales extracelulares que forman parte de un tejido. La MEC es un medio de integración fisiológico, de naturaleza bioquímica compleja, en el que están "inmersas" las células. Así la MEC es la sustancia del medio intersticial (intercelular).

Microesfera: En medicina es una partícula esférica de tamaño micrométrico las culas están hechas de materiales sintéticos y sirve para encapsular agentes terapéuticos que deben ser suministrados al paciente de manera oral o inyectada comúnmente.

Microporosidad: Porosidad asociada a interconexiones de poros de un diámetro de entre $0.1\mu\text{m}$ e inferior a $10\mu\text{m}$.

Nanoporosidad: Porosidad asociada a interconexiones de poros de un diámetro inferior a $0.1\mu\text{m}$.

Surfactante: Compuesto constituido por una zona de carácter hidrófobo y otra de carácter hidrófilo que se acumula en la interface de un sistema heterogéneo reduciendo la tensión superficial. Agente tenso activo.

Osteoconducción: Capacidad que posee un material de conducir o guiar el crecimiento del hueso.

Osteogénico: Compuesto de u originado a partir de cualquier tejido que participa en el desarrollo, crecimiento o reparación de un hueso.

Osteoinducción: Capacidad que posee un material de estimular la producción de tejido óseo.

Pectina: La pectina es el principal componente enlazante de la pared celular de los vegetales y frutas. Químicamente, es un polisacárido.

Periostio: Membrana fibrosa que rodea los huesos y sirve para su nutrición y renovación.

Pirólisis: Es la descomposición térmica del carbón en una atmósfera exenta de oxígeno. Como consecuencia de la destilación destructiva del carbón, se obtienen gases combustibles, aceites y residuos.

Porosidad: Porcentaje de volumen vacío de un material, que no está ocupado por una fracción sólida.

Proliferación celular: Aumento del número de células como resultado del crecimiento y la multiplicación celular.

Quitosano: Son unos polímeros naturales que se obtienen a partir de la quitina, una sustancia que se encuentra en el exoesqueleto de los crustáceos (gambas, cangrejos, langostinos, etc)

Reabsorbible: Propiedad de un material de degradarse químicamente, absorbiéndose de forma controlada mientras es reemplazado por tejido óseo.

Regeneración: Sustitución progresiva de un material por tejido nuevo.

Resección: Extirpación quirúrgica de parte o de la totalidad de un órgano.

Xenoinjerto: Injerto de tejido procedente de un donante de una especie diferente a la del receptor.

SBF: Fluido corporal simulado (*Simulated body fluid*). Fluido que posee concentraciones iónicas casi iguales a aquellas del plasma sanguíneo humano, utilizado para la predicción del comportamiento *in vivo* de biomateriales

RESUMEN

En la presente investigación se fabricaron microesferas biodegradables de quitosano y pectina con la capacidad de encapsular acetaminofén; la técnica empleada para la obtención fue emulsión/evaporación del solvente a partir de una emulsión agua en aceite, ambos tipos de microesferas fueron caracterizados por microscopía electrónica de barrido (MEB), difracción de rayos-X (DRX), calorimetría diferencial de barrido (DSC) y espectrofotometría infrarroja (FTIR). Se determinó el rendimiento, la eficiencia de encapsulamiento, la pérdida de humedad y en el caso de las microesferas de quitosano la cinética de liberación del fármaco. Se eligieron las microesferas de quitosano para ser adheridas a las paredes de andamios tridimensionales de biovidrio CEL2 por medio de inmersión en una dispersión de microesferas en hexano. Los andamios fueron preparados mediante el método de metalurgia de polvos y espumado de polímeros usando el sistema $\text{SiO}_2\text{-P}_2\text{O}_5\text{-CaO-MgO-Na}_2\text{O-K}_2\text{O}$. El biovidrio CEL2 se preparó por la ruta convencional de fusión y temple, pero con la variante de que fue sometido a una frita, posteriormente se molió para obtener un tamaño de partícula $< 20 \mu\text{m}$. El vidrio fue caracterizado usando difracción de rayos X (DRX) y calorimetría diferencial de barrido (DSC). Inicialmente, se realizaron varias formulaciones, de las cuales se eligió la de 3% espumante/42% ligante/55% biovidrio, en peso. Los andamios se sometieron a un tratamiento térmico de dos etapas, la primera de espumado y la segunda de pirólisis y sinterizado, con el objetivo de obtener un equilibrio entre la resistencia mecánica y la porosidad de éstos. La temperatura de sinterización de los andamios fue de 950°C . Posteriormente, los andamios se maquinaron para obtener cilindros uniformes en dimensión, los cuales se usaron para las pruebas mecánicas de compresión. Para las pruebas de bioactividad y celulares, los andamios, con y sin microesferas, se cortaron en pastillas que fueron inmersas en SBF durante 1, 3, 7, 14, y 21 días y en cultivos celulares de fibroblastos durante 5 días.

La morfología de los andamios de todos los grupos experimentales fue observada mediante microscopía electrónica de barrido (MEB), además se realizaron pruebas de compresión, determinación de porosidad y densidad, y se analizaron por EDS, difracción de rayos X (DRX) y espectroscopia infrarroja (FT-IR).

Las microesferas de quitosano que fueron las elegidas para ser adheridas a los andamios resultaron con una morfología esférica y un tamaño de partícula de $0.55 \pm 0.25 \mu\text{m}$, se logró su adhesión exitosa a los andamios de biovidrio CEL2, se obtuvo una eficiencia de encapsulamiento de

acetaminofén de 32.6%, un rendimiento de 89 ± 0.087 % así como una liberación sostenida durante 200 h; por otro lado, los andamios presentaron una porosidad interconectada del 73.2%, una resistencia a la compresión promedio de 4 MPa, mostraron la formación de la capa de hidroxiapatita a los 7 días de haber sido inmersos en SBF y adhesión celular de fibroblastos con proliferación celular durante 5 días cumpliendo con los requisitos para poder utilizarse como andamios en regeneración ósea. Los métodos empleados en este trabajo permiten controlar el tamaño de microesfera, así como la porosidad y resistencia a la compresión de las espumas mediante la variación de los parámetros empleados.

Microesferas, andamios, biovidrio, biodegradable, osteoinducción.

ABSTRACT

This project aims to produce pectin and chitosan microspheres for the encapsulation of acetaminophen. The technique used to obtain the microspheres was water-in-oil (W/O) emulsion solvent evaporation method; both types of microspheres were characterized by scanning electron microscopy (SEM), X-ray diffraction (XRD), differential scanning calorimetry (DSC) and infrared spectrophotometry (FTIR). The yield, the encapsulation efficiency and the moisture loss were determined and in the case of chitosan microspheres the kinetics of drug release was determined. The chitosan microspheres were chosen to be incorporated into the walls of the three-dimensional CEL2 bioglass scaffolds by immersion technique in a microsphere's dispersion of hexane. The scaffolds were prepared by the combined method of powder metallurgy and foaming of polymers using the $\text{SiO}_2\text{-P}_2\text{O}_5\text{-CaO-MgO-Na}_2\text{O-K}_2\text{O}$ system. The CEL2 bioactive glass was characterized using X-ray diffraction (XRD) and differential scanning calorimetry (DSC). Initially, several formulations were made, of which the 3 wt.% foaming agent/42 wt.% binder/55 wt.% bioactive glass was chosen. The scaffolds were subjected to a heat treatment in two stages, the first one of foaming and the second one of pyrolysis and sintering, with the goal of obtaining a balance between their mechanical stress and porosity. The sintering temperature of the scaffolds was 950 °C. Subsequently, the scaffolds were machined to obtain uniform cylinders in dimension for the mechanical tests. For the bioactivity and cell culture assays, the scaffolds, with and without microspheres, were cut into slices (discs) that were immersed in SBF for 1, 3, 7, 14, and 21 days, and cell-culture with fibroblasts for 5 days.

The morphology of the scaffolds with and without microspheres, before and after immersion in SBF, was observed by scanning electron microscopy (SEM), moreover compression test, determination of porosity and density were performed, and they were analyzed by EDS, X-ray diffraction (DRX) and infrared spectroscopy (FT-IR).

The chitosan microspheres obtained by the experimental method described above, resulted in a spherical morphology and a particle size of $0.55 \pm 0.25 \mu\text{m}$, adhesion to the CEL2 bioglass scaffolds was achieved successfully, an encapsulation efficiency of 32.6% and a yield of 89 ± 0.087 % were obtained in the chitosan microspheres as well as a sustained release during 200 h; on the other hand, the scaffolds showed an interconnected porosity of 73%, an average compressive strength of 4 MPa, and showed the formation of the uniform hydroxyapatite layer 7 days after being immersed in SBF, fulfilling the requirements to be used as scaffolds in bone regeneration. The methods used in this work allow controlling the size of the microsphere as well as the porosity and compressive strength of the foams by varying the used parameters.

CAPITULO 1. INTRODUCCIÓN

Los cerámicos con aplicaciones médicas son un interesante campo de investigación y desarrollo para la obtención de biomateriales útiles en la fabricación y/o fijación de implantes. Con biomateriales en general, se pueden recambiar muchas piezas de nuestro cuerpo [1][2].

En la actualidad, para realizar una sustitución ósea, predomina el uso de tejido donante, tanto de aloinjertos como de autoinjertos, si bien está aumentando el porcentaje relativo de materiales artificiales. Los tejidos donantes, frente a su buena biocompatibilidad, tienen una serie de claras desventajas, ya que son costosos, escasos, presentan riesgo de transmisión de enfermedades, etc., frente a los materiales sintéticos, que a la larga acabarán por conquistar una parte importante de este mercado.

Poder incluir fármacos en estos materiales sería un avance importante para el campo de la salud repercutiendo de forma directamente proporcional al mundo económico. Son muchos los fármacos en los que se puede pensar, según el implante de que se trate y el problema de salud del paciente. Desde un antibiótico o antiinflamatorio hasta un anticancerígeno, pasando por una gran cantidad de posibilidades. Se pueden citar los fosfatos de calcio en general, la hidroxiapatita y el β -fosfato tricálcico en particular como los representantes más significativos de los biocerámicos cristalinos [3], los vidrios bioactivos muy representativos de los cerámicos amorfos [4], los vitrocerámicos bioactivos, [5,6] los cementos de sales de calcio, todo tipo de combinaciones de materiales bifásicos como, hidroxiapatita-biovidrio e hidroxiapatita- β -fosfato tricálcico, cerámicos híbridos bioactivos y materiales mesoporosos ordenados de óxido de silicio [7].

Los cirujanos aplican estos cerámicos para relleno y/o sustitución de huesos y, en función de las necesidades, algunas veces los requieren en forma de granulado, otras de piezas porosas o densas. Por último, en casos donde se requieran propiedades mecánicas solo alcanzadas por metales, se recurre a realizar recubrimientos cerámicos sobre las prótesis metálicas [7].

La biocompatibilidad de la hidroxiapatita y la similitud de su estructura cristalina con el hueso mineral son de gran interés para que se considere su uso en implantes ortopédicos [8]. El concepto de implantes porosos que desarrollen o sean completamente de hidroxiapatita, con tamaños de poro y porosidades interconectadas similares a las de la estructura ósea, ha sido introducido de manera reciente. A consecuencia de que la hidroxiapatita puede ser absorbida por los osteoblastos, se

produce una fijación excelente de la prótesis debido a la formación de interfaces indefectibles entre el hueso y el implante o su recubrimiento. Estos implantes ofrecen propiedades inertes y estabilidad mecánica en la interface desarrollada cuando el hueso crece dentro de los poros dando como consecuencia reparación osteointegrada.

Sin embargo, los cerámicos porosos están limitados para aplicaciones de baja o nula carga; cuando la carga no es un requerimiento primario, los cerámicos porosos inertes, pueden proporcionar un implante funcional [9].

En las estructuras porosas, el tamaño mínimo de los poros debe permitir la integración mediante el crecimiento de los vasos sanguíneos y capilares que aseguren la irrigación de las células óseas. El potencial regenerativo del tejido de los biomateriales se ha demostrado *in vivo* y en la práctica clínica; los biomateriales investigados para este uso han sido ciertas composiciones de vidrios bioactivos que ofrecen la capacidad para adaptarse a los tejidos blandos y/o duros, regenerándolos.

Si se tienen en cuenta las estadísticas de infecciones en prótesis articulares de cadera el número oscila entre un 2 y un 4%, infecciones óseas que se elevan hasta un 45% en los clavos que se utilizan en fijadores externos. Uno de los principales problemas es como acceder a la zona de hueso infectado para suministrar el antibiótico adecuado. Si se logra agregarlo en el propio implante, sin duda alguna el valor añadido se conseguiría [7].

Volviendo a las matrices exclusivamente cerámicas, la cantidad de posibilidades es grande (Fig. 1.1) y adicionarles distintos fármacos también lo es. Más aún, pueden agregárseles no solo fármacos, también sustancias que propicien una cinética rápida de crecimiento del hueso como son determinados péptidos y proteínas.

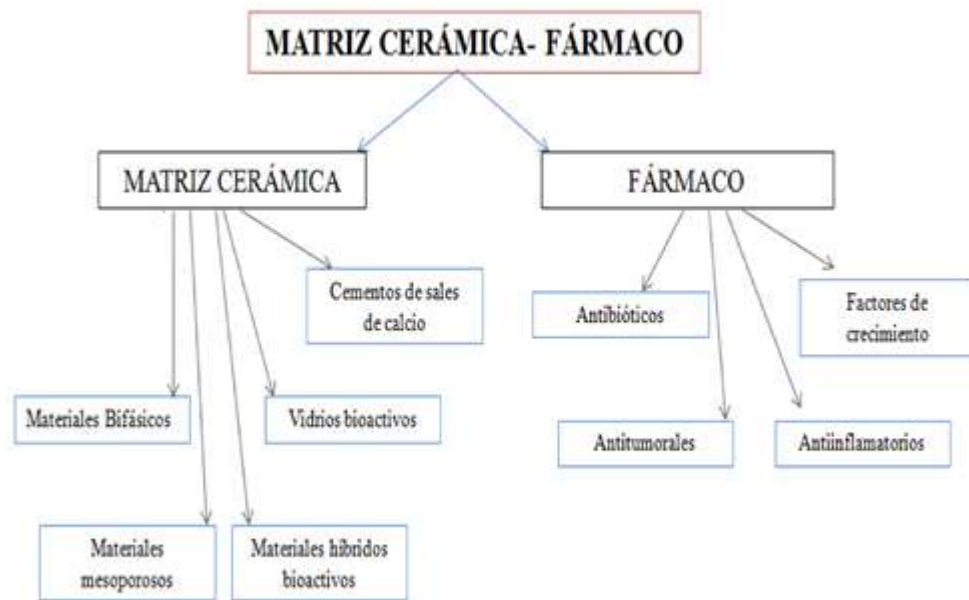


Figura 1. 1 Esquema de distintas matrices y tipos de fármacos que pueden intercambiarse.

Actualmente, la liberación de fármacos en andamios regenerativos ha causado un enorme impacto en la tecnología médica, lo que mejora el rendimiento de muchos fármacos existentes y ha permitido el uso de nuevas terapias para la recuperación de algunas enfermedades.

El vidrio bioactivo CEL2 presenta un potencial muy elevado para ser usado como materia prima en la fabricación de andamios regenerativos y para ser implantado en una gran cantidad de componentes del sistema óseo humano. Estudios recientes han demostrado que entre más poroso sea un vidrio bioactivo, mayor será su capacidad para regenerar el tejido humano por medio de la producción de hidroxiapatita [10].

Una posibilidad de las matrices cerámicas es obtener una textura abierta con elevada superficie específica y porosidad. Esto puede conseguirse con cerámicos tradicionales tales como fosfatos, vidrios, cementos o cualquiera de sus combinaciones bifásicas, utilizando procedimientos adecuados [7].

Cualquiera de estos cerámicos que dispongan de numerosos poros con un tamaño adecuado donde quepan las moléculas del fármaco que se desee incluir, son buenos candidatos para utilizar en liberación controlada.

Las microesferas de polímeros biodegradables son una excelente opción para la liberación de fármacos ya que permiten controlar la liberación dentro de un rango terapéutico deseado, disminuyendo así, el tiempo y la cantidad de medicamento empleado para el tratamiento de enfermedades y por consiguiente disminuyen los efectos secundarios del medicamento en el organismo.

1.1 Objetivos

1.1.1 Objetivo general

Producir y adherir microesferas biodegradables a las paredes de andamios porosos de biovidrio CEL2 con la capacidad de encapsular y posteriormente liberar medicamento, esto con el propósito de poder ser aplicados en conjunto en el área de ingeniería de tejidos para regenerar tejido óseo y disminuir algunos efectos secundarios causados después de la implantación.

1.1.2 Objetivos particulares

- Obtener el biovidrio base sílice CEL2 mediante el proceso convencional de fusión y temple.
- Obtener espumas de biovidrio CEL2 con las características para ser usadas como andamios para regeneración ósea, necesarias para la liberación controlada de medicamentos.
- Obtener una relación entre la resistencia mecánica a la compresión de las espumas de biovidrio y su relación con las características morfológicas de las estructuras porosas.
- Obtener microesferas de polímeros biodegradables con un tamaño menor a 3 μm , las cuales puedan encapsular un fármaco modelo para ser adheridas a las paredes de los andamios y posteriormente liberar el medicamento empleado.
- Estudiar la bioactividad de las espumas de biovidrio CEL2, mediante ensayos *in vitro*, llevando a cabo la inmersión de muestras en fluido corporal simulado (SBF) y mediante cultivo celular.

- Determinar mediante cultivo celular la citotoxicidad, la adhesión, la viabilidad y la proliferación celular en los andamios solos y con microesferas.

I.2 Justificación

El uso de transportadores o vectores para la liberación local de fármacos es un tema importante e interesante tanto en terapéutica como en el campo de cirugía ortopédica, ya que ni la meticulosidad ni la precisión quirúrgica han demostrado ser suficientes para el tratamiento de situaciones clínicas donde se ha detectado la presencia de microorganismos infecciosos. De hecho, la incidencia de la osteomielitis hace esencial la retirada del implante para evitar mayores complicaciones, como son la pérdida de función o la septicemia [7].

Sin embargo, hay un hecho claro, y es la necesidad de encontrar procedimientos de incorporación de fármacos a los biomateriales implantados, ya que en cualquier tipo de intervención quirúrgica el riesgo de infección es muy elevado. Si el antibiótico y/o antiinflamatorio puede ubicarse en el propio implante, no cabe duda de que actuará mayoritariamente de forma local, aprovechando su acción sin perjudicar otras partes del organismo. Entre los materiales utilizados para relleno y sustitución ósea, los vidrios bioactivos han mostrado poseer excelentes propiedades, como biocompatibilidad y bioactividad, es decir, son capaces de unirse íntimamente al hueso sin interposición de tejido fibroso, promoviendo de este modo la regeneración del mismo [1]. Estos vidrios suelen aplicarse en forma de granulado, lo que en ocasiones dificulta la labor del cirujano porque es muy frecuente que se produzca la diseminación del material durante la intervención quirúrgica, de ahí la necesidad de conformarlos en piezas, pero en este caso, la dificultad consiste en como incorporar el antibiótico sin aplicar temperatura.

Por lo tanto, el presente estudio pretende crear espumas bioactivas con porosidad interconectada para restaurar, mantener o mejorar la función de un componente óseo mediante la creación de sustitutos biológicos que incluyan el crecimiento de células, así como la liberación de un fármaco modelo mediante microesferas biodegradables, para poder sustentar el método de liberación y posteriormente poder emplear algún antibiótico que permita evitar infecciones causadas por la cirugía.

I.3 Hipótesis

La fabricación de microesferas de biopolímeros incorporadas en andamios 3D hechos a partir de biovidrio CEL2 los cuales cumplan con las características fisicoquímicas, microestructurales y mecánicas necesarias para su potencial aplicación en regeneración de tejido óseo y las cuales son proporcionadas por el método combinado de metalurgia de polvos y espumado de polímeros dará como resultado una respuesta celular favorable, así como la capacidad de liberar un fármaco modelo mediante las microesferas biodegradables adheridas a sus paredes, para poder usar antibióticos y prevenir infecciones causadas por la implantación.

I.4 Metas del proyecto

Obtener andamios de biovidrio CEL2 (45% SiO₂, 3% P₂O₅, 26% CaO, 7% MgO, 15% Na₂O, 4% K₂O) mediante tecnología de polvos, logrando un equilibrio entre las propiedades mecánicas y morfológicas para que puedan ser usados en regeneración ósea. Estas propiedades son una porosidad interconectada con microporos $\leq 20 \mu\text{m}$, macroporos entre 150 a 500 μm . y resistencia a la compresión entre 2 y 12 MPa. Posteriormente fabricar microesferas de algún biopolímero mediante el método de emulsión evaporación del solvente que contenga un fármaco modelo encapsulado para su liberación de forma modulada, e incorporarlas en la estructura del andamio. Finalmente estudiar el conjunto andamio/MEs para poder determinar su capacidad bioactiva.

CAPITULO 2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

En este capítulo se realizó la discusión del estado del arte de lo que hasta la fecha se ha desarrollado respecto a la producción de andamios tridimensionales para su uso en ingeniería de tejidos, así como producción de microesferas para liberación de algún factor. Todo esto abarca desde la definición de un biomaterial y su clasificación hasta sus actuales aplicaciones. Se analizan métodos de obtención de andamios y microesferas, así como su uso en conjunto. Se hizo un breve resumen de los polímeros que han sido usados hasta la fecha en la elaboración de microesferas, las ventajas y desventajas de estos, así como de los métodos de obtención y finalmente se presenta un resumen de investigaciones que han inspirado a realizar este proyecto.

2.1 ¿Que son los Biomateriales?

Los biomateriales se pueden definir como materiales biológicos comunes tales como piel, madera, o cualquier elemento que reemplace la función de los tejidos o de los órganos vivos. En otros términos, un biomaterial es un material no viable usado en un dispositivo médico, destinado a interactuar con sistemas biológicos [11].

Los biomateriales se implantan con el objeto de reemplazar y/o restaurar tejidos vivos y sus funciones, lo que implica que estén expuestos de modo temporal o permanente a fluidos del cuerpo, aunque en realidad pueden estar localizados fuera del propio cuerpo, incluyéndose en esta categoría, la mayor parte de los materiales dentales que tradicionalmente han sido tratados por separado.

Debido a que los biomateriales restauran funciones de tejidos vivos y órganos en el cuerpo, es esencial entender las relaciones existentes entre las propiedades funcionales y estructurales de los materiales biológicos. Los dispositivos como miembros artificiales, amplificadores de sonido para el oído y prótesis faciales externas, no son considerados como implantes [12].

Los requisitos que debe cumplir un biomaterial son [12]:

- Ser biocompatible, es decir, debe ser aceptado por el organismo, no provocar que éste desarrolle sistemas de rechazo ante la presencia del biomaterial.
- No ser tóxico, ni carcinógeno.
- Ser químicamente estable (no presentar degradación con el tiempo).

- Tener una resistencia mecánica de acuerdo a la estructura que se desea reemplazar.
- Tener un tiempo de fatiga dependiendo del implante requerido.
- Tener densidad y peso conforme a los requerimientos del implante.
- Tener un diseño de ingeniería perfecto; esto es, el tamaño y la forma del implante que se desea reemplazar.
- Ser relativamente barato, reproducible y fácil de fabricar y procesar para su producción en gran escala.

2.1.2 Características de la ciencia de los biomateriales.

Dentro de la ciencia de los biomateriales la rama de los biomateriales es una de las que ha despertado mayor interés para su investigación básica y su desarrollo tecnológico. La ciencia de los biomateriales se considera como uno de los prototipos más característicos de campos de investigación y desarrollo totalmente interdisciplinario, cuyo crecimiento más espectacular se ha producido predominantemente durante las dos últimas décadas [13].

El área de biomateriales ocupa una posición especial entre la Medicina, Biología, Física, Química e Ingeniería, de tal forma que desde un punto de vista académico se considera a la Biotecnología y la Bioingeniería como dos disciplinas estrechamente interconectadas [14].

Quizá uno de los principales incentivos del desarrollo de la Ciencia de Biomateriales ha sido la imperiosa necesidad de encontrar, desarrollar y utilizar materiales biocompatibles, es decir, aquellos que induzcan una respuesta apropiada con el medio fisiológico [15].

2.1.3 Clasificación general de los biomateriales

Existen varias clasificaciones de los biomateriales. Una de ellas y la más general es en naturales y sintéticos. Los naturales son en general complejos, heterogéneos y difícilmente caracterizables y procesables [16-18].

Pero de acuerdo con la ABET (Accreditation Board for Engineering and Technology), otra clasificación de los Biomateriales que sobresale es en función de la respuesta del organismo y la interacción con su entorno, como se muestra en la Tabla 2. 1.

Los materiales inertes presentan la ventaja de ser más resistentes, pero no interactúan con el cuerpo, por lo cual no son reconocidos como parte de éste por el sistema inmunológico. Éstos pueden también producir una inflamación de los tejidos cercanos debido a las reacciones que se producen con el cuerpo humano. En cambio, los materiales bioactivos tienen una interacción fuerte con el cuerpo mediante su superficie.

Tabla 2. 1 Clasificación de los Biomateriales según su interacción con el entorno [19].

Tipo de material	Tipo de respuesta
Inertes	Sin respuesta
Biotolerante	Respuesta específica prediseñada (crecimiento del tejido, pero no se adhiere a la superficie del ímplate)
Bioactivos viables	Formación de tejido alrededor del implante (absorción y/o remodelación)
Bioreabsorbibles	Respuesta positiva, interacción con el tejido y degradación química con el tiempo

Los materiales bioreabsorbibles presentan la propiedad de degradarse químicamente, absorbiéndose de forma controlada y siendo reemplazados por el tejido nuevo [19].

2.2 Evolución de los Biocerámicos: de inertes a regenerativos

Los cerámicos son sólidos inorgánicos cristalinos o amorfos como los vidrios, de densidad generalmente más baja que la de los metales y más alta que la de los polímeros. Presentan también un alto punto de fusión, una dureza alta, una resistencia mecánica más alta frente a compresión que

a tensión y una fragilidad elevada debida a la fácil propagación de defectos en su estructura. La Figura 2.1 muestra las posibles aplicaciones de los biomateriales cerámicos.

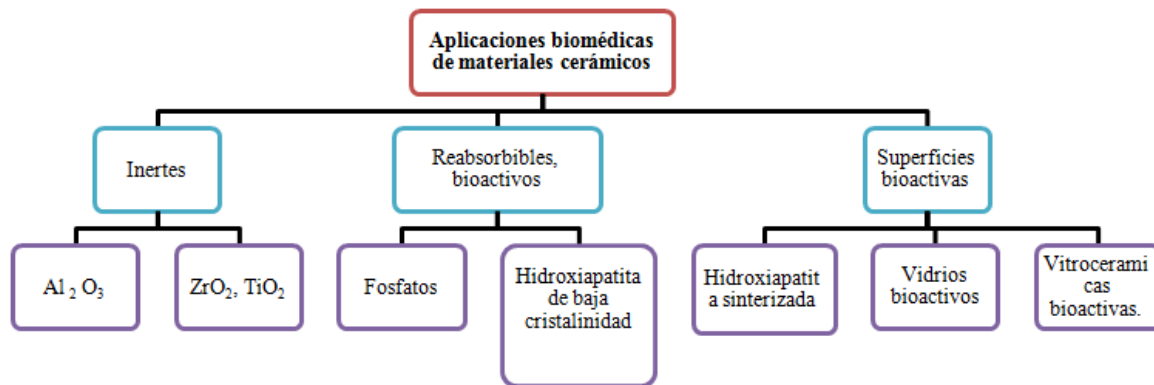


Figura 2. 1 Aplicaciones biomédicas de los materiales cerámicos [20].

La evolución de los biomateriales está siendo espectacular. En muy pocos años han cambiado muchos conceptos y formas de trabajar. Todo ello impulsado por la demanda social, las necesidades clínicas, el desarrollo tecnológico, etc.

El avance de los biomateriales no ha cesado de reclutar especialistas de los campos de las ciencias, la ingeniería, la biología y la medicina. Los biomateriales deben interactuar en sistemas biológicos, tales como células, tejidos, órganos y fluidos corporales. Las especialidades médicas y farmacológicas incluyen la cirugía reparadora y plástica, la medicina regenerativa, la administración de fármacos y la diálisis, entre otros. Y en todo este conjunto no deben olvidarse los dispositivos de diagnóstico y pronóstico clínico en base a sensores o material biológico como el análisis genético y molecular en base a marcadores.

Los biomateriales se enmarcan en la ingeniería biomédica, y comprenden conocimientos del mundo de las ciencias, la ingeniería, la biología y la medicina. (Figura 2. 2)

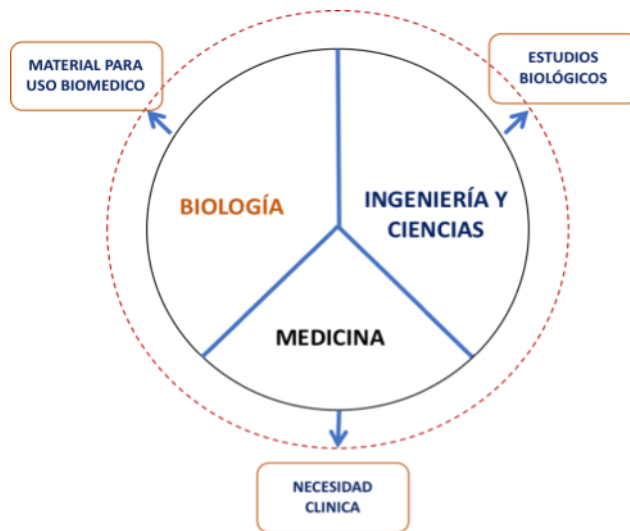


Figura 2. 2 Biomateriales y su relación con las ciencias e ingeniería [20].

Los biomateriales han pasado de utilizar materiales inertes para sustitución de tejidos vivos, al diseño de materiales bioactivos y biodegradables para reparación de estos, y esto ha desembocado en la tercera generación de biomateriales donde el objetivo es su regeneración.

La regeneración de tejido óseo es un proceso natural que involucra tanto a células como a la matriz ósea. Las células son las responsables de la formación de hueso, y en ese proceso intervienen muchos factores. En efecto, la matriz ósea está formada fundamentalmente por materia orgánica (un 25%), materia inorgánica (60-70%) y agua (5-8%). La parte orgánica está constituida mayoritariamente por fibras de colágeno tipo I (90%), y en menor proporción, pero no por eso con un papel menos importante, por proteínas no colagénicas y factores bioquímicos locales (Figura 2.3). Teniendo en la mente el proceso natural de formación del tejido óseo, no es difícil entender el rumbo que ha tomado el mundo de los biomateriales de tercera generación, donde el papel de las células es prioritario, y la necesidad de funcionalizar la superficie de los biomateriales con diversos grupos funcionales ha pasado a ser una necesidad evidente para poder anclar proteínas y/o factores de crecimiento [21].

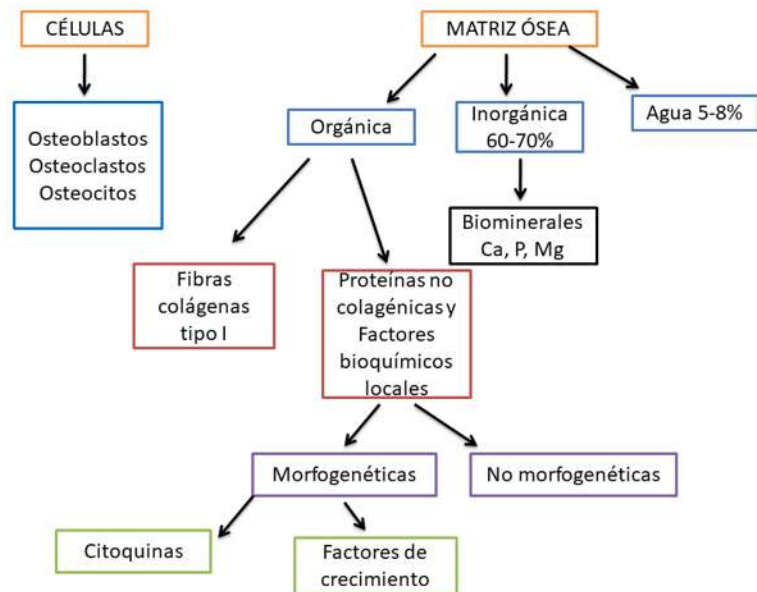


Figura 2. 3 Sustancias que intervienen en la regeneración de tejido óseo [21].

Cuando un biomaterial se implanta en el cuerpo humano es imprescindible tener en cuenta el contexto biológico que se va a encontrar, que es complejo tanto a escala celular como molecular. Se va a poner en contacto con distintos tipos celulares y diferentes biomoléculas, que van a interactuar y a entrar en contacto directo con el implante. En función de cómo sea esa interacción célula-biomaterial se producirán situaciones muy diferentes: encapsulación del implante en una cápsula colagínosa acelular, que es lo que ocurre con los biomateriales inertes, o, por el contrario, si esa interacción es positiva, el tejido dañado se regenerará, y nos encontraremos, por tanto, con implantes de tercera generación.

En esta última situación pueden intervenir proteínas y factores de crecimiento, de forma similar a como se produce el proceso natural. Entre las moléculas de interés para unirse covalentemente a la superficie de los biomateriales se encuentran todas aquellas que favorecen la interacción con la matriz extracelular y con la membrana celular, de tal forma que se faciliten los procesos de adhesión y proliferación celular en la zona del implante. No hay que olvidar en este contexto a las moléculas que facilitan y promueven la angiogénesis, para favorecer la formación de vasos sanguíneos. En biocerámicos de tercera generación se busca dar soporte a las células para que ellas desarrollen el

trabajo de regeneración. La ingeniería tisular se sustenta en tres pilares fundamentales, las células, las señales y los andamios.

Así como los biomateriales de primera generación no estaban específicamente diseñados para interactuar con el mundo biológico, los de tercera generación, por el contrario, están diseñados teniendo en cuenta que van a estar en contacto con tejidos vivos y que las propiedades de superficie de dichos materiales, tales como la topografía, la carga superficial y todos los aspectos relacionados con la química de sus superficies, son fundamentales para una respuesta positiva cuando dicho material se ponga en contacto con los tejidos vivos. Esto conlleva una funcionalización adecuada de las superficies libres de dichos biomateriales para facilitar la adherencia, proliferación y diferenciación celular en condiciones óptimas, como ya se ha dicho [21].

Los andamios ideales para ingeniería de tejidos deben proporcionar un soporte mecánico biocompatible, que no induzca a una respuesta tisular adversa y que pueda sostener temporalmente carga mecánica. También debe tener una tasa de degradación apropiada, equivalente a la del proceso de regeneración del tejido, y una porosidad interconectada con una distribución de tamaño de poro apropiada, que promuevan la invasión celular y del tejido, el tráfico de metabolitos y con una elevada área superficial para el anclaje celular. Por supuesto debe propiciar el reconocimiento biológico, de tal forma que dé soporte y promueva adhesión, migración, proliferación y diferenciación celular. Y por supuesto debe constituir un nicho adecuado para el desarrollo de tejido vivo.

La reparación del cuerpo humano por tanto tiene dos vías o aproximaciones para abordarla: la aproximación biónica, que utiliza biomateriales de primera y segunda generación para la fabricación de prótesis e implantes útiles para todas las especialidades clínicas, y la aproximación de medicina regenerativa que incluye tanto terapia celular como ingeniería de tejidos, y utiliza biomateriales de tercera generación.

2.3 Composición de los tejidos duros del cuerpo humano

Los tejidos duros del ser humano, huesos y dientes, están constituidos por un compuesto a base de fosfato de calcio, de estructura y composición muy similar al mineral denominado hidroxiapatita

(HA) y una matriz orgánica de diversos colágenos principalmente el colágeno tipo I y células óseas. Los huesos humanos (cortical y trabecular) están constituidos por microcristales de HA en un 60-80% en forma de fibras hexagonales de dimensiones variables y una matriz proteica de colágeno embebido en agua. El armazón del hueso vivo está formándose continuamente y deshaciéndose por acción de las células óseas (osteoblastos-osteoclastos). Los osteoblastos van formando hueso nuevo mientras los osteoclastos van disolviendo el hueso [22].

La HA es conductora y bioactiva, esto quiere decir que sirve como base para el crecimiento óseo y se une químicamente al tejido vivo, pero las células que se unen al material pueden permanecer en ella sin llevar a cabo una división o crecimiento.

2.4 La ingeniería de tejidos

La ingeniería de tejidos ha sido definida como la aplicación de los principios científicos para el diseño, construcción, modificación y crecimiento de los tejidos vivos utilizando biomateriales, células y factores, solos o combinados. Representa un nuevo e interdisciplinario campo que aplica un conjunto de métodos, materiales de ingeniería y ciencias de la vida para crear construcciones para regeneración de tejido nuevo [23].

Esta área ha atraído a numerosos científicos y cirujanos con la esperanza de tratar pacientes de una manera mínimamente invasiva y menos dolorosa. El paradigma de la ingeniería de tejidos consiste en aislar células específicas a través de una pequeña biopsia del paciente, para hacerlas crecer en un andamio tridimensional bajo condiciones de cultivo controladas apropiadamente, a fin de trasplantar este conjunto a la zona deseada del cuerpo del paciente, y para dirigir la formación del nuevo tejido dentro del andamio que puede ir degradándose a través del tiempo [24]. Lo anterior es mostrado en la Figura 2.4.

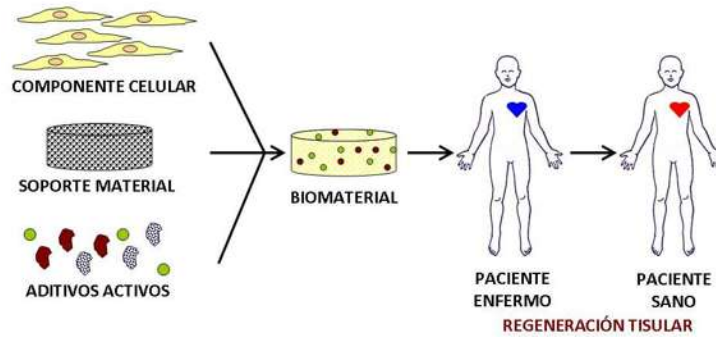


Figura 2. 4 Estrategia de ingeniería de tejidos [24].

La ingeniería tisular se sustenta en tres pilares, las células madre y células progenitoras, responsables de la ontogénesis, que es la capacidad de producir tejido óseo por la acción de las células, los factores bioquímicos que son las señales y factores de crecimiento responsables de la osteoinducción, que es la capacidad para promover la formación de hueso, y los andamios, fabricados con biomateriales naturales y/o sintéticos, que son los responsables de la osteoconducción, que es la capacidad para permitir y favorecer el crecimiento y organización del tejido óseo. La Figura 2.5 es un esquema de las distintas posibilidades de implantar un andamio. Lo más sencillo es implantar directamente el andamio con los únicos requisitos de ser biocompatible, poroso, biodegradable o reabsorbible, osteoconductor y con unas propiedades mecánicas mínimas. La siguiente opción sería implantar el andamio en el que previamente se hayan sembrado células del propio paciente, que es lo que se conoce como Ingeniería de Tejidos. Pero habría otras dos opciones más, implantar el andamio funcionalizado con señales, o implantar el andamio donde estén incluidas tanto señales como células. Estos andamios tridimensionales deben tener una porosidad que permita la entrada de células, a las que debe alojar. Si se implanta directamente *in vivo*, las células del paciente deberán poder entrar y alojarse en todos sus poros. Y si previamente se hace un sembrado de células *in vitro*, las células progenitoras deberán colonizar todo el andamio para posteriormente implantarlo [20].

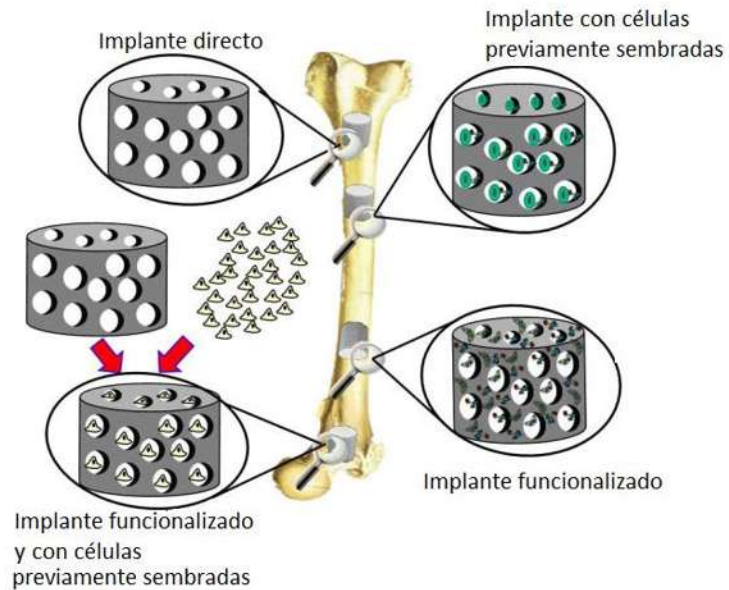


Figura 2. 5 Distintas posibilidades de implantar un andamio en la reconstrucción de hueso natural [20].

Un defecto óseo puede ser reemplazado potencialmente por tejido óseo natural con una unión y restauración de la función completa, sin el uso de implantes permanentes [25].

Para lograr un tratamiento efectivo en la regeneración del tejido óseo, un dispositivo diseñado dentro del campo de la ingeniería de tejidos deberá cumplir con los siguientes requerimientos [26, 27]:

1. Proveer de resistencia mecánica de manera temporal en el área afectada.
2. Actuar como un sustrato para la deposición y crecimiento de los osteoides (osteconductividad).
3. Poseer una estructura porosa que permita la vascularización y el crecimiento óseo.
4. Fomentar la migración de células reparadoras del hueso a la zona del defecto y estimular su actividad para la regeneración y reparación.

5. Degradarse de manera controlada para facilitar la transferencia de la sollicitación mecánica al hueso en formación y para permitir su crecimiento dentro del defecto (biodegradabilidad).
6. Degradarse liberando productos no tóxicos que puedan ser eliminados por el cuerpo (biocompatibilidad).
7. No causar una respuesta inflamatoria significativa.
8. Ser esterilizable sin perder su cualidad de bioactivo.

Las propiedades mecánicas de un andamio deben adecuarse a aquellas del tejido que se busca reparar o regenerar para proveer una estabilidad estructural en el lugar del daño. El biomaterial elegido debe ser lo suficientemente fuerte para soportar la carga fisiológica del cuerpo sin absorber el estímulo mecánico requerido para el crecimiento natural en el área afectada. También es imprescindible que el biomaterial permita una transferencia gradual de carga para permitir una reparación correcta del tejido.

Para ello, se requiere de una estructura porosa que permita el crecimiento del hueso y la vascularización a través del andamio. Idealmente, un andamio debe estar diseñado para maximizar la porosidad manteniendo unas propiedades mecánicas suficientes, y poseer poros interconectados en el rango de tamaños de 50-700 μm [28].

Este tipo de estructura debe proveer una elevada área superficial para la adhesión, crecimiento y desarrollo de la función de las células, y al mismo tiempo, espacios vacíos de un tamaño suficiente para permitir la formación del hueso y la vascularización. Un biomaterial que pueda ser formado por inyección ofrece la ventaja adicional de la fabricación de implantes de formas irregulares mediante el uso de moldes o de su inyección directa en un defecto [28].

El andamio tampoco deberá producir una respuesta inflamatoria significativa que pueda resultar en la formación de una cápsula fibrosa alrededor del implante, de lo contrario éste se vuelve inefectivo. Una respuesta tóxica del tejido circundante al biomaterial causaría la muerte celular y agravaría el daño.

Finalmente, el biomaterial del andamio debe ser esterilizable sin que éste pierda su funcionalidad, es decir, el proceso de esterilización no debe alterar la composición química del material, ya que esto podría afectar su bioactividad, biocompatibilidad y biodegradabilidad [28].

2.5 Vidrios bioactivos y su relación con el sistema óseo

Ciertas composiciones de vidrios, cerámicos, vitrocerámicos y compuestos han demostrado la capacidad de unión con el tejido óseo [29-31]. Estos materiales se les conocen como cerámicos bioactivos.

En 1971 Hench y col. [32] descubrieron que ciertas composiciones de vidrios se unen al hueso. Desde dicho descubrimiento, se han llevado a cabo muchos estudios con propuestas para su uso como implantes para la reconstrucción ósea. Se han establecido requisitos de composición en cuanto a la bioactividad de los vidrios del sistema $\text{Na}_2\text{O}-\text{K}_2\text{O}-\text{CaO}-\text{MgO}-\text{B}_2\text{O}_3-\text{P}_2\text{O}_5-\text{SiO}_2$ sintetizados por fusión. Los requisitos son: menos del 59% mol de SiO_2 , entre el 14% y el 30% mol de óxidos alcalinos ($\text{Na}_2\text{O} + \text{K}_2\text{O}$) y entre el 14% y el 30 % mol de óxidos alcalinotérreos ($\text{CaO} + \text{MgO}$). Los vidrios descubiertos por Hench y col. [33], además de ser bioactivos mostraron tener una alta reabsorción en el cuerpo. La principal desventaja que tienen es que sus propiedades mecánicas son bastante bajas.

Actualmente, en el Instituto de Investigación en Metalurgia y Materiales (UMSNH) se han obtenido muy buenos resultados respecto a la producción de andamios porosos de biovidrio 45S5 [34, 35].

2.5.1 Vidrio bioactivo CEL2

El vidrio CEL2 es un vidrio altamente bioactivo, desarrollado en el Politécnico di Torino que ha sido estudiado recientemente, tiene una composición similar al biovidrio 47.5A (ver Tabla 2.2) respecto a la relación que mantienen $(\text{SiO}_2 + \text{P}_2\text{O}_5) / (\text{MO} + \text{M}_2\text{O})$ (donde M puede ser Mg, Ca, K ó Na), pero difiere de él por la presencia de MgO y una relación de $\text{Na}_2\text{O}/\text{K}_2\text{O}$ diferente. Estas diferencias han mostrado una influencia en los ensayos in vitro donde se ve claramente una mayor adhesión celular como se describe en trabajos previos [36-40]. Por ejemplo, un menor contenido de óxido monovalente (menos de 20% mol) y un contenido mayor de P_2O_5 (3 % mol) en

comparación con otros vidrios, produce un mejor control de las variaciones de pH durante la inmersión en SBF. La presencia de varios óxidos alcalinos con una relación 4:1 (Na₂O/K₂O) podría ser útil con respecto al equilibrio iónico celular, que es gobernado por el Na⁺/K⁺, lo que requiere una cantidad apropiada de estos iones dentro y fuera de la membrana celular. Por otra parte, la presencia de MgO es adecuado para promover metabolismo celular. En la Tabla 2.2 se muestran 3 tipos de vidrios los cuales de acuerdo a la bibliografía han mostrado muy buenas propiedades bioactivas *in vitro*

Tabla 2. 2 Composiciones de vidrios bioactivos que han mostrado excelentes propiedades bioactivas *in vitro*

Biovidrio	SiO ₂	P ₂ O ₅	Al ₂ O ₃	MgO	CaO	K ₂ O	Na ₂ O
SCNA	57	–	3	–	34	–	6
47.5 A	47.5	2.5	–	–	30	10	10
CEL2	45	3	–	7	26	4	15

Actualmente hay dos maneras de producir vidrio bioactivo: la tradicional fusión y temple y el proceso sol-gel.

El interés de los vidrios bioactivos ha sido expandido desde su descubrimiento inicial y ahora no sólo se centra en el estudio de la unión de éstos al hueso, sino también en su potencial ontogénico y sus aplicaciones en ingeniería de tejidos.

2.6 Polímeros Biodegradables y sus aplicaciones biomédicas

Los polímeros biodegradables son materiales utilizados en biomedicina para desempeñar diferentes funciones dependiendo de la estructura específica de cada material y de la zona de implantación en el organismo. Este grupo de materiales es muy amplio, abarcando tanto polímeros naturales como sintéticos, obtenidos a partir de diferentes fuentes naturales y metodologías sintéticas, respectivamente. La función común que estos materiales deben de llevar a cabo en contacto con el medio fisiológico es mantener sus propiedades, tales como propiedades mecánicas y biocompatibilidad, durante el período de tiempo en el cual son usados. Una vez transcurrido dicho tiempo, los productos de degradación generados debido al proceso biodegradativo deben de ser eliminados del organismo.

Los polímeros biodegradables presentan algunas propiedades que pueden tener efectos en su biocompatibilidad, como son [41]:

- Peso molecular.
- Forma y estructura del implante.
- Química del material.
- Carácter hidrofóbico o hidrofílico.
- Energía superficial.
- Degradación
- Solubilidad
- Lubricación
- Absorción de agua
- Mecanismo de erosión.

Existen polímeros naturales y sintéticos utilizados como biomateriales; los naturales son considerados como los primeros biomateriales biodegradables utilizados clínicamente. Se ha observado en pruebas *in vivo* que la velocidad de degradación enzimática de los polímeros naturales depende del sitio de inserción, de la disponibilidad y la concentración de enzimas. La modificación química puede afectar la velocidad de degradación: este tipo de polímeros presenta buenas características como bioactividad, la capacidad de presentar unión de ligandos de receptores celulares y la susceptibilidad a digestión intracelular. Algunas de sus desventajas son su purificación y la posible transmisión de enfermedades.

Los polímeros sintéticos son en general biológicamente inertes, presentan características más predecibles como por ejemplo uniformidad en su producción, propiedades específicas de acuerdo a la aplicación que se les vaya a dar, estos están desprovistos de muchas ventajas de los polímeros naturales o biopolímeros [42].

2.6.1 Quitosano

El quitosano es un polisacárido semicristalino formado por copolímeros de glucosamina y N-acetil glucosamina (Figura 2.6), que proviene de la desacetilización de la quitina. El quitosano es un polímero natural, biocompatible, no tóxico, posee propiedades bioadhesivas, tiene características antibacteriales, antifúngico, antitumoral y una excelente capacidad de formación de películas, presenta un carácter catiónico por lo cual tiene muchas aplicaciones debido a su carácter iónico y la posibilidad de entrecruzamientos covalentes a través de su grupo amino para permitir la estabilización de sistemas para liberación controlada de fármacos. El quitosano se ha convertido en el polímero natural prometedor para la preparación no solo de microesferas sino también de nano esferas y microcápsulas. Comercialmente existen dos tipos de quitosano que se distinguen por su peso molecular y por su grado de desacetilización (DD), el quitosano de bajo peso molecular se encuentra entre 20 KDa-190 KDa; KDa= kilo Dalton, también se conoce como UMA (Unidad de masa atómica). $1Da = 1.660538921 \times 10^{-27}kg$ y su $DD \leq 75\%$; por el contrario, el quitosano de peso molecular alto se encuentra entre 190 KDa y 375 KDa con $DD \geq 75\%$ [43, 44] .

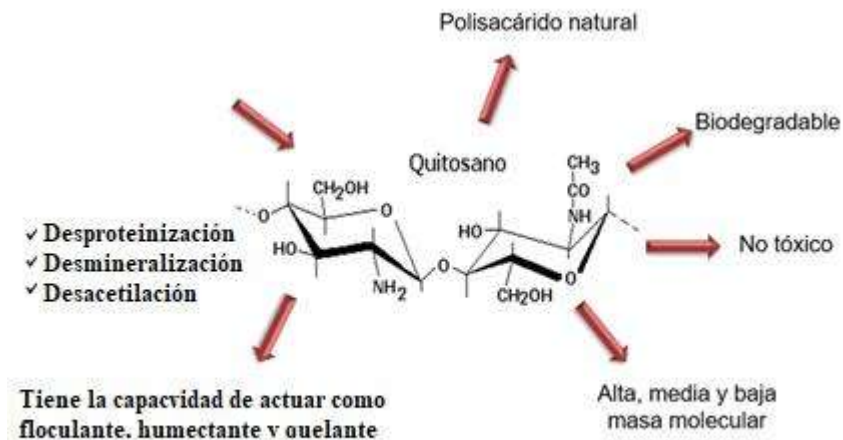


Figura 2. 6 Estructura química del Quitosano

Actualmente, el quitosano tiene mayor aplicación en la ingeniería de tejidos como biomaterial para la regeneración ósea y regeneración de tejidos, el quitosano posee la capacidad para unirse a las moléculas aniónicas como glicanos de glucosamina, factores de crecimiento y ADN, lo cual lo hace un buen candidato para terapia génica. Otro sector de gran impacto en el cual tiene aplicación el quitosano, es el ambiental, se utiliza para el tratamiento de aguas residuales, lixiviación de metales pesados y como biosensores [45,46].

La biodegradabilidad del quitosano juega un papel muy importante, la absorción sistemática de polímeros hidrofílicos requiere que el polímero tenga un peso molecular adecuado de 30 KDa a 40 KDa dependiendo del polímero, si excede este peso, el polímero deberá ser sometido a degradación química enzimática para proporcionar fragmentos adecuados. Una gran cantidad de microorganismos sintetiza y degrada la quitina, el precursor biológico del quitosano; la velocidad y el grado de degradación del quitosano en los organismos está ligado con el DD (grado de desacetilización), el aumento en éste disminuye la velocidad de degradación.

2.6.2 Pectina

La pectina es una sustancia natural que se forma principalmente en la pared primaria y en los tejidos mesenquimáticos y parenquimáticos de frutos y vegetales, y tiene la función de cemento intercelular. La pectina fue aislada por primera vez por el químico francés Henri Braconnot en 1825, quien la designó como “pectina”, que deriva del griego pektikos, que significa congelar o solidificar. La pectina forma coloides por excelencia, ya que tiene la propiedad de absorber una gran cantidad de agua, pertenecen a la familia de los oligosacáridos y polisacáridos de alto peso molecular y contienen largas cadenas formadas por unidades de 1,4- α -D-ácido galacturónico (GalpA) [47].

En la Figura 2.7 se puede observar que la pectina está compuesta de por una cadena lineal de restos de ácido α . (1-4), D-galacturónico, sus grupos carboxílicos se encuentran parcialmente metoxilados, su peso molecular oscila entre 50 y 180 DKa.

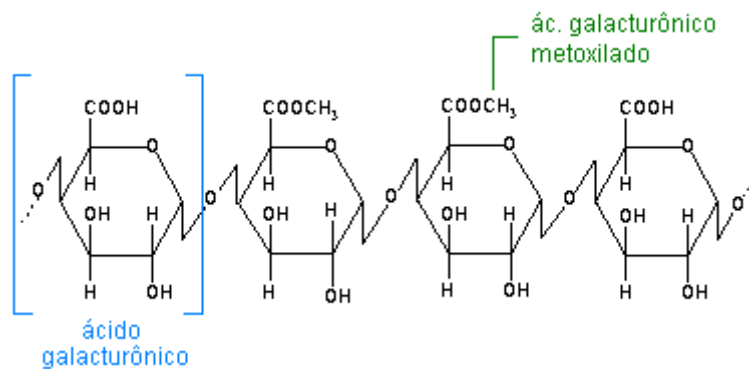


Figura 2. 7 Estructura química de la pectina.

Existen dos tipos de pectinas, las altamente metiladas (HM) que presentan alto grado de metilación $\geq 50\%$, tienden a formar geles en medios ácidos y en presencia de azúcares, los geles formados con este tipo de pectinas son irreversibles. Las pectinas de baja metilación (LM) $\leq 49\%$ son también muy importantes y forman geles termo-reversibles en presencia de ciertos iones metálicos divalentes como el calcio, además son independientes del pH y son altamente usadas en la industria farmacéutica. El grado de metilación se define como la proporción de ácidos galacturónicos metil esterificados por cada 100 ácidos galacturónicos totales, si la metilación es inferior al 5% se clasifica como ácido péptico.

La pectina se encuentra inscrita en la FDA (*US Food and Drug Administration*), como aditivo seguro sin límite de consumo diario, por lo que puede ser usada ampliamente como excipiente en formulación de comprimidos matriciales, geles, cubiertas farmacéuticas, etc.

2.7 Mecanismos de liberación de fármacos

Durante años los sistemas poliméricos se han utilizado en aplicaciones farmacéuticas, especialmente para proporcionar una liberación controlada del fármaco. El desarrollo de estos sistemas comienza con el uso de polímeros no biodegradables que principalmente se basan en el proceso de difusión y posteriormente en el uso de polímeros biodegradables donde se dan fenómenos como el hinchamiento y la erosión. Tomando en cuenta las características físico químicas del polímero, el mecanismo de liberación del fármaco se puede clasificar en tres procesos [48-50]

- Sistema controlado por difusión: difusión del fármaco desde el polímero no degradado.
- Sistema controlado por hinchazón: aumento en la difusión del fármaco debido a la hinchazón del polímero.
- Sistema controlado por erosión: la liberación es debido a la degradación del polímero.

2.7.1 Matrices vítreas bioactivas: Liberación de fármacos

Los vidrios son sólidos que tienen un elevado desorden estructural o, mejor aún, líquidos con una viscosidad muy elevada. El método tradicional de obtención de vidrios es la fusión de una mezcla de componentes entre los que debe estar un formador de red, seguido de un enfriamiento rápido del fundido. El silicio es un candidato espléndido como formador de red, ya que tiende a formar cadenas Si-O-Si. La estructura de los vidrios de silicato está formada por tetraedros $[\text{SiO}_4]$ unidos por sus vértices a través de oxígeno (Figura 2.8).

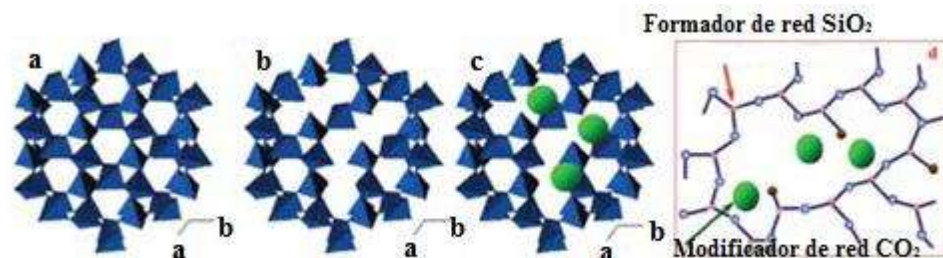


Figura 2. 8 Representación bidimensional de (a) red cristalina de SiO_2 , (b) red de SiO_2 vítrea, y (c) red de sílice con modificadores de red. En los tres casos el cuarto átomo de oxígeno de cada tetraedro $[\text{SiO}_4]$ se encuentra situado en un plano superior o inferior. En (d) puede observarse, en detalle, los distintos constituyentes de un vidrio con modificadores de red [29.].

La sílice cristalina, por el hecho de ser cristalina, tiene una estructura ordenada y está formada exclusivamente por silicio y oxígeno. Sin embargo, los vidrios pueden incluir distintos cationes, conocidos como modificadores de red, que originan zonas distorsionadas y enlaces rotos en la red de silicato, proporcionando una disposición muy desordenada, con tensiones estructurales, zonas

donde los niveles de energía están situados por encima del mínimo y, por tanto, propician que estos materiales desordenados sean muy reactivos.

El método tradicional de fusión y enfriamiento rápido produce materiales con superficie específica y porosidades muy pequeñas. Pero pueden buscarse alternativas para conseguir fabricar vidrios con superficies específicas y porosidades muy elevadas. Esto facilitaría que materiales que por sí mismos ya son reactivos, aumenten su reactividad, lo que es bueno para el tipo de vidrios bioactivos porque lo que interesa es que reaccionen con los fluidos fisiológicos y que como producto de esa reacción química se forme nuevo hueso.

Los vidrios bioactivos reaccionan con los fluidos y, como producto de la reacción, se forma carbonato de hidroxapatita. Este tipo de ensayos se puede realizar en muy diversos fluidos, pero de cara a las aplicaciones que se buscan, una buena elección es utilizar un fluido fisiológico simulado, que tenga los mismos iones y en concentraciones similares a las del plasma humano [51]. El ensayo *in vitro* se puede llevar a cabo tanto en sistema estático como en sistema dinámico para reproducir mejor las condiciones en las que se encontrará el vidrio cuando se ensaye *in vivo* [29,31]. La Figura. 2.9 muestra un esquema de ambos dispositivos. En cualquier caso, el interés de estos materiales, que son sólidos amorfos muy reactivos con composiciones plenamente compatibles con el cuerpo humano, es que el producto obtenido tras la reacción entre ellos y los fluidos fisiológicos sea una nanoapatita carbonatada y deficiente en calcio equivalente a las apatitas biológicas.

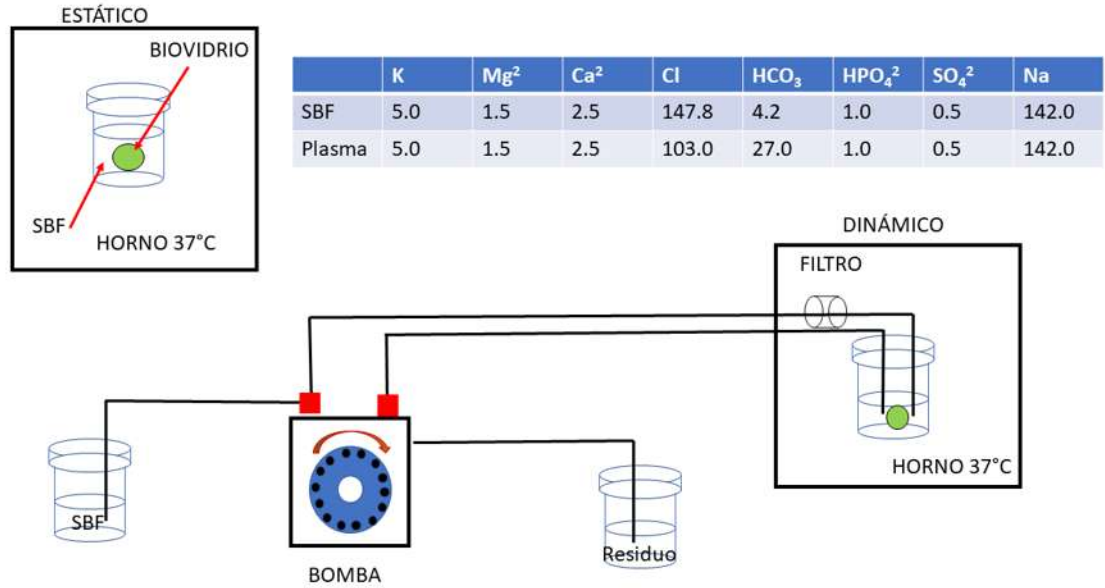


Figura 2. 9 Protocolos estático y dinámico. En este último se hace circular el suero con una bomba peristáltica [29].

En la figura 2.9 se incluye la composición y concentraciones del suero fisiológico simulado (SBF). La evolución de la reacción que tiene lugar entre el vidrio y el medio fluido que lo rodea se puede seguir tanto en la solución, analizando los valores de pH y la presencia de los distintos iones, así como el aumento o disminución de su concentración, como en la superficie del vidrio utilizando las técnicas adecuadas (Figura. 2.10).

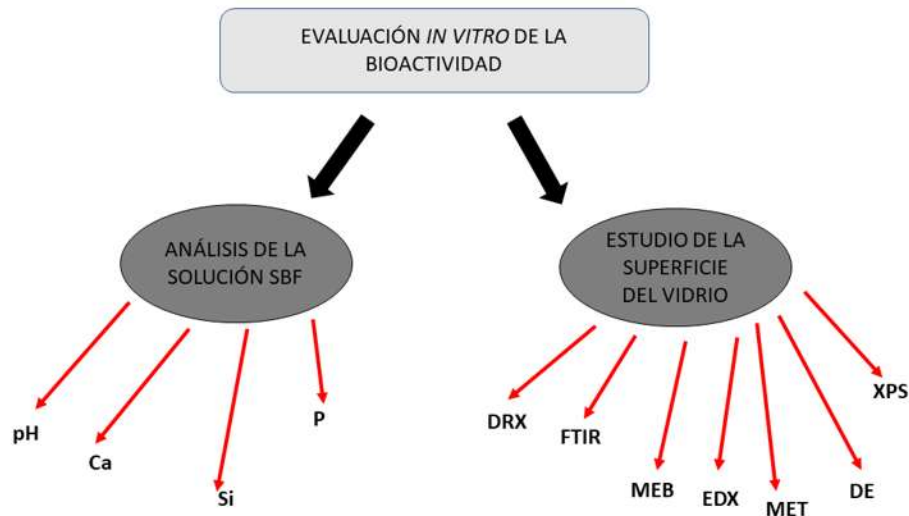


Figura 2. 10 Esquema de las técnicas de caracterización útiles para evaluar la bioactividad de los vidrios.

Una primera posibilidad en la liberación de fármacos consiste en combinar vidrio y antibiótico con polímeros bioestables. De esta forma se obtienen piezas cerámico-polímero-fármaco sin emplear temperatura en su conformado, pero con el inconveniente de que el componente polimérico tiene que permanecer en el organismo, por tanto, se está introduciendo un cuerpo extraño no degradable.

La posibilidad de disponer de piezas constituidas exclusivamente por un vidrio bioactivo y un antibiótico requiere la búsqueda de un procedimiento de conformado adecuado para este propósito. La idea es que estas piezas permitan una liberación controlada de antibiótico a escala local durante periodos de tiempo prolongados y, simultáneamente, el vidrio estimule la regeneración del tejido óseo, siendo todos los componentes reabsorbibles a medio plazo, por lo que ninguno necesite ser retirado posteriormente.

El implante debería ser una pieza compacta para evitar las complicaciones técnicas por dispersión del material durante su implantación quirúrgica, debería garantizar una concentración superior a la concentración inhibitoria en el hueso para la mayoría de los microorganismos causantes de la osteomielitis y debería no ser necesario una retirarlo posteriormente, ya que el vidrio es bioactivo

y reabsorbible a medio plazo. A su vez, si el vidrio funcionara como material bioactivo, debería ir regenerando el hueso y formarse nuevo hueso.

Aquí es donde surge la idea de crear piezas exclusivamente de biovidrio, porosas con integración de microesferas que contengan el fármaco para liberarlo gradualmente.

2.7.2 Métodos para sintetizar cerámicos porosos

Hasta el día de hoy existen tres métodos principales para fabricar cerámicos porosos, de los cuales hay subdivisiones a su vez. Los tres métodos se describen a continuación [52].

Método de la réplica

La técnica de la réplica es considerada como el primer método usado para la fabricación de cerámicos macroporosos. La invención original data de principios de los 60's, cuando Schwartzwalder y Somers [53] comenzaron a utilizar esponjas poliméricas como moldes para preparar estructuras celulares de diferentes tamaños de poro, tipos de porosidades y composiciones químicas.

Desde entonces la técnica de la réplica con esponja se ha convertido en el método más popular para la producción de cerámicos macroporosos y en la actualidad es extensivamente usado en la industria para la fabricación de filtros que son usados para el proceso del filtrado de metal líquido y otras aplicaciones. El éxito de esta técnica radica en su simplicidad y flexibilidad para producir cerámicos celulares. En la técnica de la réplica polimérica, una esponja polimérica altamente porosa (poliuretano típicamente) es inicialmente sumergida en una suspensión cerámica hasta que los poros internos se llenan con el material cerámico. Después, la esponja impregnada se pasa a través de rodillos con la finalidad de remover el exceso de la suspensión y permitir la formación de una capa cerámica fina sobre las paredes de la estructura celular original. En este paso, la mezcla tiene que ser lo suficientemente fluida para poder ser parcialmente removida cuando los rodillos son utilizados, aunque el cerámico remanente que recubre la estructura deberá ser lo suficientemente viscoso para evitar goteo de la suspensión. El molde polimérico recubierto con el cerámico es a continuación secado y pirolizado cuidadosamente a temperaturas entre 300 y 800 °C. Velocidades de calentamiento menores a 1 °C/min son usualmente requeridas en este paso para

promover la descomposición gradual y la difusión del material polimérico y así evitar la acumulación de presión dentro de las paredes de la estructura [54]. Ligantes y plastizantes son usualmente adheridos en la suspensión inicial con la finalidad de proveer al recubrimiento cerámico resistencia suficiente para prevenir fracturas de las paredes durante la pirólisis. Los ligantes típicos que son usados son: ortofosfato de aluminio coloidal, silicato de potasio y sodio, ortoborato de magnesio, alúmina hidratada, sílice coloidal, entre otros. Una vez removido el molde polimérico, la capa cerámica es finalmente densificada por sinterización bajo una atmósfera apropiada en un rango de temperaturas de 1100 a 1700 °C, dependiendo del material. Cerámicos macroporosos de diferentes composiciones químicas han sido preparadas mediante la técnica de réplica con esponja. Este método se ilustra en la Figura. 2.11.

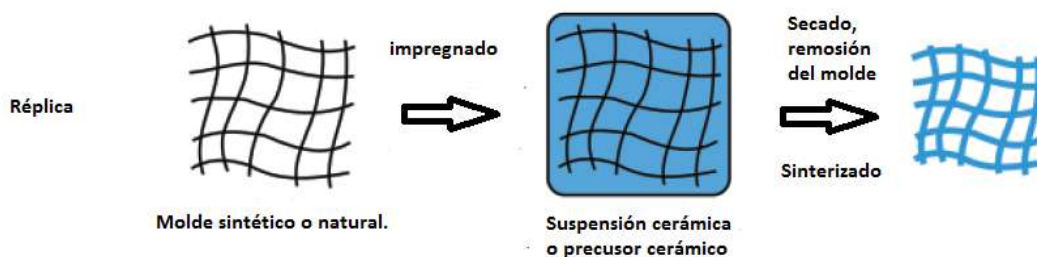


Figura 2. 11 Técnica de la réplica [54].

Método del molde de sacrificio

Esta técnica consiste generalmente en la preparación de un compuesto bifásico que comprende una matriz continua de partículas cerámica o precursores cerámicos y una fase dispersa de sacrificio que, inicialmente, se distribuye homogéneamente por toda la matriz y finalmente es extraída para generar poros dentro de la microestructura, Figura. 2.12. Este método conduce a materiales porosos que muestran una réplica negativa del molde original, contrario a la morfología positiva obtenida a partir de la técnica de réplica que se ha descrito anteriormente.



Figura 2. 12 Método del molde de sacrificio [54].

El compuesto bifásico es comúnmente preparado por: (a) compresión de una mezcla de polvos de los dos componentes, (b) formando una suspensión de dos fases que se procesa posteriormente por rutas húmedas coloidales tales como deslizamiento, cinta o colada directa, o (c) una impregnación previa de preformas consolidadas del material de sacrificio con un precerámico o suspensión de polímero cerámico.

La forma en que el material de sacrificio se extrae del compuesto consolidado depende principalmente del tipo de formador de poros que se haya empleado. Una amplia variedad de materiales de sacrificio se ha utilizado como formadores de poros, incluyendo materias orgánicas, naturales y sintéticas, sales, líquidos, metales, cerámicos y compuestos [53].

Método del espumado directo

En este método, los materiales porosos se producen mediante la incorporación de aire en una suspensión o un medio líquido, que, posteriormente, se mantiene con el fin de conservar la estructura de burbujas de aire creadas, Figura. 2.13. En la mayoría de los casos, las espumas consolidadas son posteriormente sinterizadas a altas temperaturas para obtener alta resistencia.

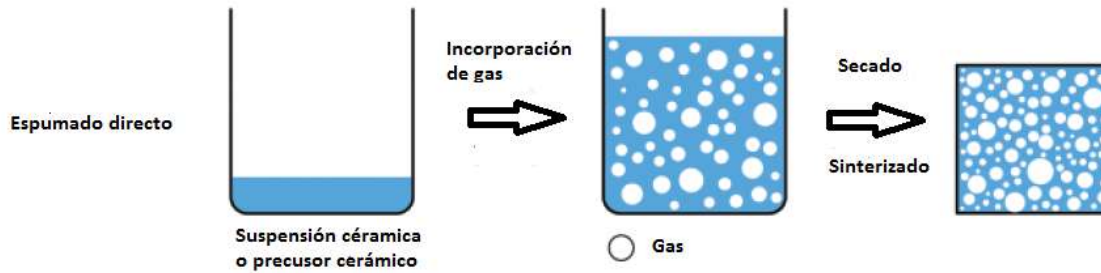


Figura 2.13 Método del espumado directo [54].

La porosidad total de la espuma cerámica es directamente proporcional a la cantidad de gas incorporado en la suspensión o medio líquido durante el proceso de formación de la espuma. El tamaño de poro, por el contrario, está determinado por la estabilidad de la espuma húmeda antes de que el proceso se lleve a cabo.

Las espumas son sistemas termodinámicamente inestables que se someten a procesos de coalescencia con el fin de disminuir la energía libre de la misma. Los métodos de espumado son fáciles y relativamente baratos. La estabilización de estas espumas es un paso importante en este método. Las espumas suelen ser estabilizadas con surfactantes para obtener cerámicos porosos y que exhiban un tamaño de poro que va de los 35 μm a 1.2 mm.

Las estructuras porosas fabricadas con este método tienen mayor resistencia mecánica que las hechas con el método de la réplica debido a que éstas carecen de defectos puntuales en su estructura [53].

Método por tecnología de polvos

Desarrollado por Lefevre y Thomas [55], este proceso consiste en la mezcla en seco de los polvos cerámicos o metálicos con un aglutinante polimérico sólido y un agente espumante. La mezcla es entonces moldeada en la forma deseada y tratada térmicamente en un ciclo de tres periodos como se muestra en la Figura 2.14.

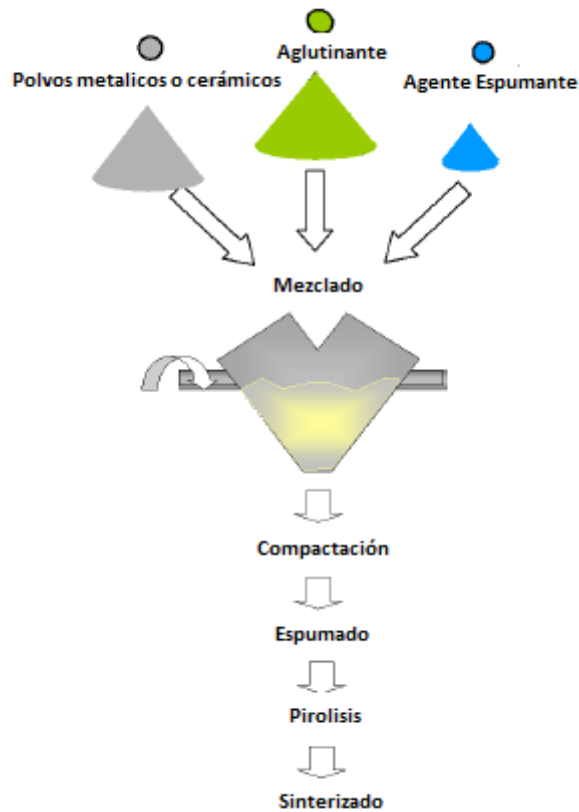


Figura 2. 14 Método por tecnología de polvos [55].

Durante la primera etapa, que es el espumado, el aglutinante es fundido para crear una suspensión cargada con partículas cerámicas o metálicas. Durante este periodo el agente espumante se descompone y libera un gas que expande la estructura, creando así, porosidad interconectada en la estructura. La segunda etapa que es la de pirólisis, consiste en la descomposición del ligante polimérico a una temperatura intermedia. La tercera etapa, que es la de sinterizado, se realiza para proveer resistencia mecánica a la espuma. La estructura de las espumas puede ser modificada mediante cambios en la formulación o con la variación de las condiciones de espumado y/o sinterizado.

Este proceso ha sido exitosamente utilizado para la obtención de espumas de diferentes materiales como hierro, níquel, titanio y aleaciones Ti-6Al-4V [56].

Con la ingeniería de tejidos, a diferencia de los autotransplantes óseos, las operaciones en las que se usan andamios regenerativos no son tan largas y la recuperación del paciente es mucho más

rápida[57]. Por otro lado, comparada con la xenotrasplatación, el riesgo de infección es mucho menor, por ésta y otras causas el uso de andamios tridimensionales ha aumentado en los últimos años [57].

La ingeniería de tejidos es un área interdisciplinaria que está creciendo rápidamente. Las propiedades más relevantes que debe de tener un andamio tridimensional se han discutido durante varios años en la literatura [58-61]. Por otra parte, este tipo de andamios tienen baja resistencia mecánica, para hacer frente a este inconveniente, se ha demostrado que la adición de un recubrimiento de polímero puede mejorar las propiedades mecánicas de los biocerámicos frágiles y andamios a base de vidrio bioactivo [62-64].

El objetivo del proyecto fue crear MEs de un material biodegradable, las cuales se puedan adherir a las paredes de andamios con porosidades mayores al 73% y que sean capaces de encapsular acetaminofén, que es un antiinflamatorio, sin afectar la resistencia mecánica de los mismos o que cause algún tipo de interacción desfavorable en ellos.

2.8 Liberación de fármacos en andamios regenerativos

Se sabe que los recubrimientos de polímero pueden ser portadores de fármacos, que a su vez pueden proporcionar una viabilidad de evitar los riesgos de efectos secundarios asociados con la terapia oral o parenteral [65-67]. Recientemente se han hecho estudios acerca de andamios tridimensionales con la capacidad de liberar algún tipo de fármaco mediante MEs biodegradables [66,68]. Actualmente la liberación de fármacos en andamios regenerativos ha causado un enorme impacto en la tecnología médica, lo que mejora el rendimiento de muchos fármacos existentes y ha permitido el uso de nuevas terapias para la recuperación de algunas enfermedades.

Algunos ejemplos de suministro de fármacos biomédicos son mediante andamios regenerativos en forma de espumas para la terapia y regeneración tisular.

Los andamios no solo actúan como matrices extracelulares que organizan y acomodan células dentro del mismo, sino que también sirven como guías para que las células se adhieran y proliferen, si el andamio no cumple los requisitos de biomaterial, las células no se adaptarán al mismo [69-71].

El andamio ideal debe cumplir ciertos criterios como excelente biocompatibilidad, alta porosidad (mayor al 70%), resistencia mecánica suficiente, y biodegradabilidad controlable [72-74]. Adicionalmente, estos andamios podrían tener la capacidad de liberar algún tipo de droga mediante diferentes vías [75-77].

Respecto a la porosidad del andamio, muchos investigadores han reportado un rango de tamaño óptimo (microporos $\leq 20\mu\text{m}$ y macroporos entre 150 y $500\mu\text{m}$) para que las células se adhieran [78-80]. Los andamios con un rango óptimo de poro proporcionan a las células un medio apropiado para el crecimiento celular ya que ofrecen ventajas y desventajas. El tamaño de poro o la porosidad del andamio pueden afectar el suministro de nutrientes, la difusión de gases, la eliminación de desechos metabólicos, la fijación celular y la señalización celular [79,81].

Hay varias formas de suministrar fármacos mediante andamios porosos bioactivos en los que las moléculas, como el ADN, factores de crecimiento y reguladores de la respuesta de la inflamación deben ser liberados localmente de una manera crono-programada. Ungaro y col. [82.] fabricaron microesferas de colágeno y ácido hialurónico con fármaco encapsulado. Al ajustar la estructura porosa de las microesferas y los andamios, los autores fueron capaces de ajustar la velocidad de liberación. La incorporación de microesferas cargadas con fármaco dentro de una matriz porosa también da la posibilidad de una entrega secuencial múltiple de factores de crecimiento, imitando así de origen natural los procesos de regeneración de tejidos y vascularización [83].

La ingestión oral es la ruta predominante para la administración de fármacos, ya que permite la liberación inmediata de la dosis deseada, minimizando las fluctuaciones en las concentraciones de fármaco en el cuerpo, reduciendo la frecuencia de administración. El control adecuado del tiempo de residencia gástrica, combinado con los patrones de liberación de fármaco controlados por el tiempo, puede aumentar significativamente la biodisponibilidad del fármaco y, por lo tanto, la eficiencia del tratamiento médico.

Los andamios porosos con tamaño de partícula muy pequeña han sido objeto de una intensa investigación por la comunidad de la ingeniería tisular en vista de sus usos, entre otros, como portadores de fármacos y de suministro de células así como bloques de construcción para el diseño del andamio de abajo hacia arriba y la fabricación de tejidos. De hecho, estos andamios pueden ser fabricados a partir de biomateriales diferentes, mientras que su composición, tamaño, forma,

microestructura y la capacidad de liberación de fármaco pueden controlarse, seleccionando apropiadamente la técnica de fabricación y las condiciones de procesamiento [84].

Dependiendo de la aplicación requerida, las células y los fármacos pueden ser encapsulados dentro de microesferas o hacer un cultivo en la superficie del poro.

2.8.1 Liberación de antibióticos para evitar infecciones

Uno de los problemas más comunes y complicados de resolver es la infección ósea (osteomielitis) en cirugía ortopédica. La incidencia de osteomielitis causada fundamentalmente por microorganismos, en este caso bacterias, es relativamente elevada. El problema se complica cuando estos microorganismos son capaces de desarrollar una biopelícula sobre la superficie del implante. En ese momento la administración sistemática de medicamentos es muy poco eficaz y la solución más común es la retirada del implante por septicemia.

A pesar de que es una enfermedad conocida desde hace mucho tiempo, la infección ósea sigue siendo todo un reto para la medicina moderna debido a los grandes problemas que presenta no sólo en los pacientes que la padecen, sino a todo el sistema sanitario. La osteomielitis es una infección inflamatoria y destructiva que da lugar a la aparición de una cavidad encapsulada denominada secuestro, en cuyo interior quedan muestras de tejido óseo desvitalizado y un contenido purulento formado por células inflamatorias y microorganismos [85].

Hay muchos tipos de osteomielitis dependiendo de la duración, mecanismo de infección, porción del hueso afectado y otros factores, pero en todos ellos los microbios más comúnmente responsables de la osteomielitis son: *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Mycobacterium tuberculosis* y bacterias Gram negativas (particularmente *Enterobacteriaceae*, incluyendo *Salmonella* y *Pseudomonas aeruginosa*). Para combatirlos, los agentes antimicrobianos que se suelen emplear son fluoroquinolonas, clindamicina, rifampicina y cotrimoxazol por su mejor penetración en el hueso. Los Beta-lactámicos, glucopéptidos y aminoglucósidos difunden menos del 20% por lo que sus dosis deben ser altas. También suele resultar eficaz la combinación de varios antibióticos para prevenir resistencia y para tratar infecciones mixtas.

El tratamiento convencional de este cuadro clínico incluye una doble aproximación médico-quirúrgica con el suministro de antibióticos durante periodos prolongados de tratamiento y extirpación de tejido óseo desvitalizado utilizando un material de relleno que estimule el

crecimiento de nuevo tejido óseo. La extirpación del tejido necrosado es un procedimiento imprescindible, pero el suministro de antibióticos, por vía intravenosa y/o oral, durante 4 a 6 semanas presenta el inconveniente de distribuir los antibióticos por todo el cuerpo del paciente. Esto unido a la necesidad de dosis elevadas debido a la dificultad de que el antibiótico llegue al hueso, hace que los potenciales efectos secundarios sean más probables. Todo esto supone no sólo una molestia para el paciente sino un elevado costo económico [85].

Por todo ello, actualmente sigue siendo un reto plantear estrategias alternativas para el tratamiento de la osteomielitis. La liberación local y controlada de fármacos es una nueva modalidad terapéutica que se ha venido estudiando en los últimos años al permitir dosificar concentraciones de antibióticos en el punto de la infección evitando la toxicidad sistémica [86, 87]. Como portadores de los antibióticos se han utilizado tanto materiales no biodegradables como biodegradables. Dentro de los materiales no biodegradables, el más utilizado es el polimetilmetacrilato, PMMA, [87] en el que se han introducido antibióticos como gentamicina [88] o vancomicina [89]. Aunque la combinación PMMA-antibiótico para el tratamiento de la osteomielitis resulta eficaz, su no-biodegradabilidad hace que estos sistemas deban ser retirados en un segundo procedimiento quirúrgico, con los inconvenientes que esto plantea tanto para el paciente como para el sistema sanitario.

En cambio, los materiales biodegradables, además de permitir la liberación de antibióticos, no requieren de una segunda intervención para ser retirados. Adicionalmente, y como valor añadido, el implante biodegradable puede ser utilizado como un material de relleno que ocupe la zona donde estaba el tejido óseo necrosado, y a medida que se vaya degradando, vaya surgiendo la formación de nuevo tejido óseo y guiando la reparación. Para conseguir este efecto, el material utilizado para el implante debe presentar capacidad regenerativa. Esta aproximación es a lo que tiende la investigación clínica actual, en lo que se viene llamando medicina regenerativa [85].

Dentro de los materiales biodegradables, se han utilizado diversos materiales como esponjas de colágeno impregnadas con gentamicina [90], polímeros derivados del ácido láctico con quinolonas fluoradas como pefloxacin [91], biocerámicos como cementos de hidroxiapatita, cementos de brushita o xerogel de apatita donde se introduce vancomicina [89]. Muchos de los materiales que se utilizan como portadores para liberación controlada de fármacos se pueden utilizar como implantes óseos porque son biodegradables y biocompatibles pero algunos no tienen resistencia

mecánica suficiente y sólo tienen propiedades osteoconductoras (actúan como soporte estructural en la formación y crecimiento de nuevo hueso) pero no tienen propiedades osteoinductoras (no promueven la fijación de las células específicas del tejido óseo) ni osteogénicas [86].

Por todo ello, con el fin de prevenir y/o tratar una posible infección ósea sería deseable obtener un material de relleno óseo que fuera biodegradable, biocompatible, con propiedades osteoconductoras, osteoinductoras y osteogénicas a la vez que permitiera la liberación controlada de agentes antimicrobianos.

Es por lo que la administración local y controlada de antibióticos desde el implante se plantea como una excelente alternativa frente a este problema de infección. Xia y Chang [92] propusieron por primera vez la incorporación de antibióticos en el seno de la estructura porosa de matrices vítreas. Para ello, aplicaron una estrategia convencional de impregnación del fármaco, poniendo en contacto el vidrio de composición 58S con una disolución concentrada de sulfato de gentamicina. Se observó que el andamio podía incorporar hasta 3 veces más gentamicina que el mismo vidrio obtenido por el método sol-gel convencional. Así mismo, el perfil de la cinética de liberación de gentamicina puede explicarse según el modelo mostrado en la Figura 2.15 en la cual las moléculas de antibiótico pueden ocupar cualquier lugar en el poro, esto es, ventana de salida del poro (1), interior del poro con interacciones material-gentamicina por enlace de hidrógeno (2), interior del poro con interacción gentamicina-gentamicina (3,2), adsorción en la superficie externa del material (4), estableciéndose diferentes cinéticas de liberación para cada una de estas posiciones.

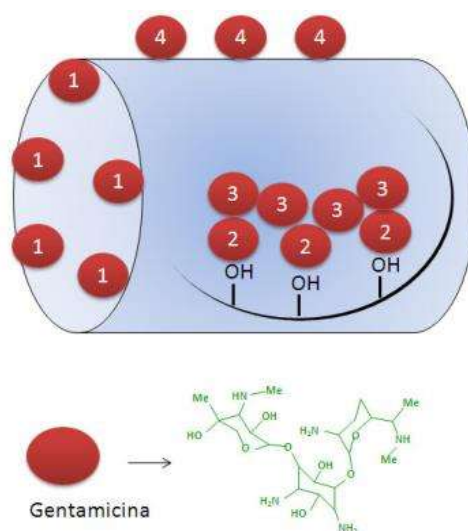


Figura 2. 15 Posibles localizaciones de la gentamicina respecto a los poros de un andamio [92].

La capacidad de carga y la cinética de liberación del fármaco son dependientes no sólo de la porosidad sino también de la composición química del andamio como demostraron Zaho y col. [93], por ejemplo, la adsorción de tetraciclinas en matrices vítreas es función del contenido de CaO, el cual actúa a modo de agente quelante en la pared del poro. Por el mismo motivo, la cinética de liberación se retarda al incrementar el contenido de CaO en el sistema SiO₂-CaO-P₂O₅, pues la afinidad de la tetraciclina por el CaO controlaría su suministro al medio híbrido.

Las constantes cinéticas podrían controlarse en función de la fortaleza de los enlaces de hidrógeno que se establecieran entre el fármaco y los diferentes grupos funcionales.

La preparación de microesferas de tamaño controlado ha llamado la atención de diferentes grupos. Un sistema constituido por esferas de tamaño pequeño ofrece posibilidades de reproducibilidad y control muy superiores a aquellos sistemas constituidos por partículas irregulares y tamaños variables. Los métodos para obtener microesferas son variables. Algunas de estas esferas han sido propuestas como injerto óseo y sistemas de liberación de fármacos [94].

2.9 Microesferas biodegradables de liberación controlada

El interés de la microencapsulación data desde los años 30's, los primeros estudios fueron desarrollados por la *National Cash Register*, las microesferas (MEs) son el resultado de un proceso de recubrimiento de algún compuesto, bajo la forma de moléculas, partículas sólidas o glóbulos líquidos con materiales de distinta naturaleza [94,96]. El quitosano (2-amino-2-deoxi-D-glucosaβ1-4-oD-glucosamina) es un polisacárido extraído del caparazón de algunos crustáceos con excelentes propiedades biológicas. La carga positiva que se produce en medio ácido como resultado de la protonación del grupo amino presente en cada unidad de glucosamina, le confiere solubilidad en medio acuoso y es motivo de su actividad biocida [97].

Las partículas de quitosano se pueden entrecruzar y así modificar su solubilidad en medio acuoso aumentando su resistencia a la degradación química o biológica. Este polímero biocompatible y biodegradable tiene diversas aplicaciones en el área biomédica como vehículo para la entrega y descarga de fármacos [97,98].

A lo largo de las últimas décadas varios autores han trabajado con microesferas de quitosano, [96, 99-105] pero ninguno las ha empleado como acompañante en andamios tridimensionales de

biovidrio. Los factores más importantes que intervienen en la eficiencia de encapsulación de MEs de quitosano son: la cantidad de fármaco, a mayor concentración mayor encapsulación, pero debe encontrarse un punto de equilibrio y éste lo define el fármaco, la cantidad de entrecruzante, etc. Los medicamentos usados hasta el momento en microesferas de quitosano son: anticancerígenos, antiinflamatorios, agentes cardiacos, antibióticos, antitrombóticos, drogas esteroidales, agentes anticálcicos, proteínas antidiabéticas, diuréticos etc. [106]. Además del quitosano se han estudiado MEs de otros polímeros por medio del método emulsión/evaporación del solvente [107-112]. Este método fue propuesto por Thanoo y col. [113] y modificada por Dhawan y col. [45].

Este deseo de dirigir las drogas a los órganos blancos específicos es un viejo sueño discutido desde comienzo del siglo. La ciencia farmacológica actual encamina sus estudios hacia la búsqueda de un vehículo capaz de transportar el fármaco hasta su lugar de acción a fin de evitar, en lo posible, sus efectos adversos. De acuerdo con este criterio, se han desarrollado últimamente nuevos sistemas de administración de fármacos como las microesferas, entre otros, siendo portadores coloidales particulares que se usan como sistemas de liberación de drogas [94].

Los sistemas de liberación de fármacos consistentes de polímeros biodegradables que permiten controlar la liberación de fármacos efectivamente dentro del rango terapéutico deseado, evitando las consecuencias de un exceso o un déficit, que podrían comprometer su eficacia antes de la administración de la siguiente dosis, son un campo de estudio prometedor.

Estas microesferas son partículas esféricas análogas de las micropartículas, pero sin una distinción clara entre núcleo y pared. Tienen una estructura monolítica preparada a partir de materiales biodegradables y con un gran espectro de velocidad de suministro y propiedades degradativas, donde el principio activo o agente terapéutico está distribuido a través de la matriz como una dispersión molecular o de partículas.

Se han usado varios métodos para la preparación de microesferas de diferentes polímeros biodegradables, incluyendo polímeros naturales y sintéticos. La selección de un método de preparación adecuado depende de las propiedades del polímero y el principio activo que se utilice y puede afectar las características de las microesferas [114].

2.9.1 Métodos de obtención de microesferas (MEs)

Los métodos de obtención comúnmente empleados, encontrados en la literatura son:

- Evaporación del solvente.
- Separación de fases (coacervación).
- Secado por aspersion.

La elección de la técnica de micro-encapsulación se hace principalmente sobre la base de las características físico-químicas del polímero [115] y del principio activo a encapsular y se deben tener en cuenta los requerimientos siguientes:

- El rendimiento de microesferas con el intervalo de tamaños deseado debe ser alto.
- La eficiencia de encapsulación del principio activo debe ser alta.
- La actividad biológica del principio activo debe mantenerse durante el proceso de encapsulación.
- La reproducibilidad en términos de un perfil cualitativo y de liberación del principio activo debe estar dentro de los límites especificados.
- El perfil de liberación debe ser ajustable mediante el control de la composición y las variables del proceso.
- Las microesferas no deben agregarse, deben ser un polvo fino que fluya libremente.

Por otra parte, algunas de las propiedades de las microesferas deben ser optimizadas como son:

- Tamaño y distribución de tamaños.
- Propiedades de superficie.
- Carga de principio activo.
- Velocidad de liberación del principio activo.
- Velocidad de degradación de la matriz.

Método de evaporación/extracción del solvente

En este método están incluidos todos los procesos en los que tiene lugar la eliminación del solvente en el que está disuelto el polímero, ya sea por evaporación o por extracción de éste. En todos los casos previamente tiene que formarse una emulsión. En dependencia de la naturaleza de la fase continua de la emulsión que se forme se clasificarán en técnicas de evaporación/extracción del solvente en fase acuosa o en fase oleosa. Este método es el más utilizado en los laboratorios a nivel industrial debido a la sencillez del proceso y el equipo requerido [114,116].

De acuerdo a la naturaleza de la fase continua de la emulsión que se esté formando, las técnicas de evaporación del solvente se clasifican en fase acuosa o fase oleosa.

a) En fase acuosa:

Método de la emulsión aceite en agua (o/w)

En este método la fase orgánica que contiene el polímero y el principio activo se emulsifica en una fase acuosa que contiene un tensioactivo. Posteriormente las gotas orgánicas emulsificadas que contienen el polímero y el principio activo son endurecidas como microesferas por eliminación del solvente orgánico [94]. En la Figura 2.16 aparece representado el esquema de preparación de este método.

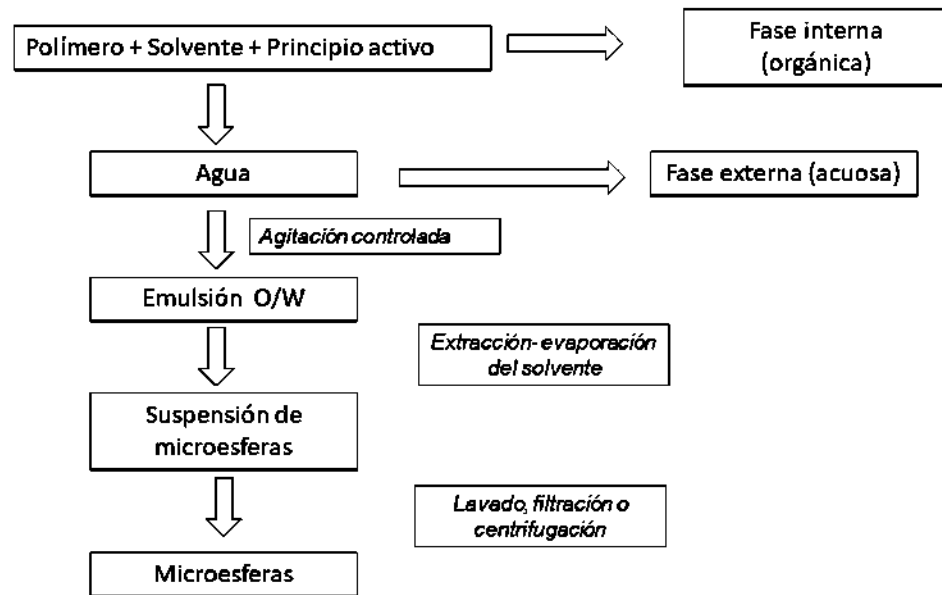


Figura 2. 16 Preparación del método de evaporación/extracción del solvente en fase acuosa o/w [94].

Ventajas del método o/w:

- Es ampliamente usado en la encapsulación de sustancias liposolubles, debido a que se logra una eficiente incorporación de principio activo lipofílicos.
- Amplio rango de tamaños (1 a 500 μ m) esencialmente controlados por la velocidad y las condiciones de agitación.
- Las microesferas tendrán propiedades superficiales hidrofílicas, lo que permite su resuspensión sin agregación.

Desventajas del método o/w:

La incorporación de principios activos solubles en agua es muy baja debido a la repartición del principio activo en la fase acuosa externa de la emulsión.

Método de la emulsión agua en aceite en agua (w/o/w)

También se conoce como método de la emulsión múltiple. Es una modificación del método o/w. Se utiliza para encapsular principios activos solubles en agua y se ha probado que es muy eficiente para encapsular este tipo de sustancia. En este método el principio activo se disuelve en agua (fase acuosa) y el polímero se disuelve en un solvente orgánico (fase orgánica). Ambas fases se mezclan obteniéndose la emulsión w/o, la que se adiciona lentamente sobre un medio acuoso que contiene un emulsificante como el alcohol polivinílico. Luego el solvente orgánico es eliminado y se obtienen las microesferas. En la Figura 2.17 se muestra el esquema de preparación de este método.

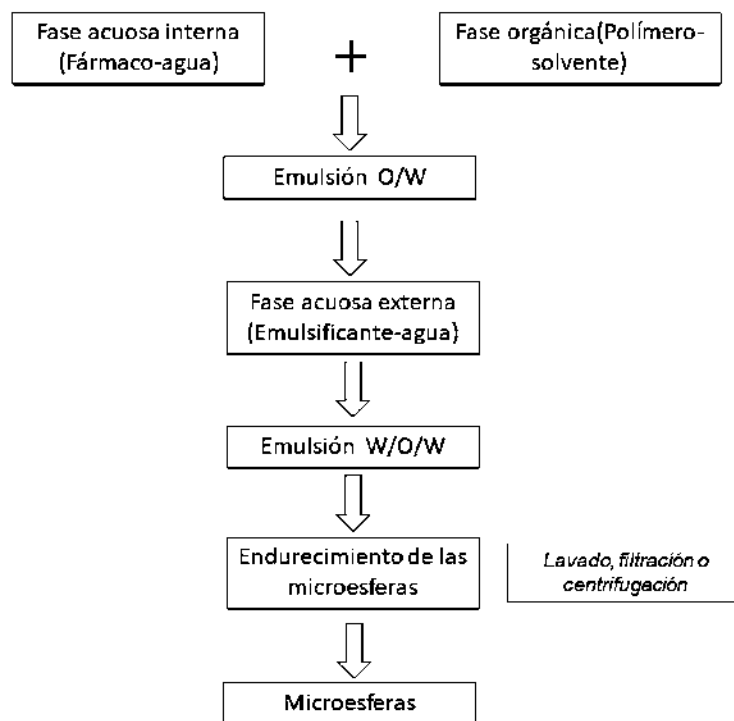


Figura 2. 17 Diagrama de flujo para la obtención de las microesferas por el método de emulsión múltiple w/o/w [94].

b) En fase oleosa:

Método de la emulsión aceite en aceite (o/o)

Este método mostrado en la Figura 2.18 es otra modificación de la emulsión o/w y la fase continua estará formada por un líquido orgánico como el aceite mineral y se forma la emulsión o/o. Se usa para encapsular eficazmente principios activos solubles en agua.

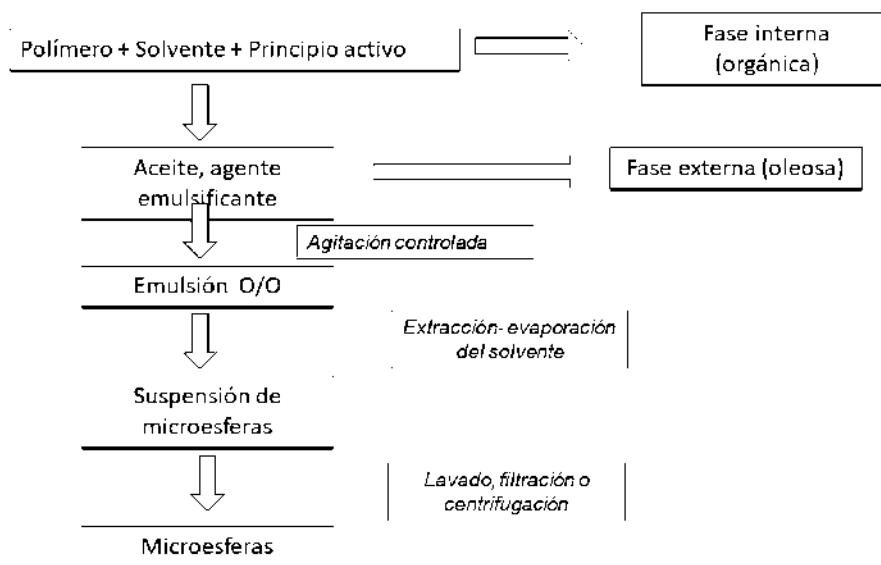


Figura 2. 18 Preparación del método de evaporación/extracción del solvente en fase oleosa o/o [94].

Tsai y col. [117] usaron este método para encapsular mitomicina en microesferas de ácido poliláctico.

Separación de fases

Este método es usado principalmente para principios activos solubles en agua. Se disuelve el polímero en un agente orgánico y el fármaco en agua; esta solución se emulsiona y se vierte en un primer no solvente, el cual genera pequeñas gotas del coacervado. Debido a que estas gotas son blandas para su recolección es necesaria la adición de un segundo no solvente para endurecer estas gotas y formar las microesferas.

Este método presenta pocas ventajas, la más destacable es la alta eficiencia de encapsulación de fármacos solubles en agua, y entre las desventajas se encuentra la formación de aglomerados, no existe la reproducibilidad total y el costo es elevado [116, 118].

Secado por aspersión

Este método consiste en disolver el polímero en un solvente orgánico, el fármaco se dispersa en esta solución mediante homogeneización a alta velocidad. La dispersión se atomiza en una corriente de aire caliente, donde el solvente se evapora produciendo microesferas que tienen un tamaño entre 1 a 100 μm , dependiendo de las condiciones de atomización. Las microesferas son recolectadas mediante un separador de ciclón.

Este método es reproducible, el tamaño se puede controlar y existe alta eficiencia de encapsulación. Algunas desventajas son, alto costo del equipo, descomposición de fármacos sensibles a temperaturas altas y el uso de otras técnicas como liofilización [118,119].

Polímeros, solventes, emulsificadores y principios activos empleados

Polímeros

La necesidad de biodegradabilidad en un sistema inyectable o implantable es evidente. Los poliésteres son particularmente atractivos para sistemas poliméricos inyectables de liberación controlada por su disponibilidad, biodegradabilidad, no toxicidad, biocompatibilidad y por ser fácilmente combinables con una amplia variedad de principios activos. Entre éstos, el uso de ácido poli-DL-láctico y/o ácido poli-D-láctico-co-glicólico ha prevalecido por la ausencia total de toxicidad de los productos de degradación y su modulable velocidad de degradación.

Otro poliéster, el poli- ϵ -caprolactona, presenta una mayor vida media biológica en el cuerpo y mayor permeabilidad que el ácido poli-DL-láctico, y se ha usado en el diseño de sistemas biodegradables para encapsular esteroides contraceptivos y ciclosporina. Muchas combinaciones de fármacos y materiales control/soporte se han desarrollado. En la Tabla 2.3 se muestran diversos ejemplos de principios activos y polímeros empleados para la preparación de MEs biodegradables.

Tabla 2. 3 Ejemplos de principios activos y polímeros empleados para la preparación de MEs biodegradables.

Principio activo	Polímeros	Referencia
Doxorrubicina	L-PLA	[120, 121]
Cisplatino	DL-PLA	[122, 123]
5-fluorouracilo	L-PLA	[124]
	PLGA	[125]
Lomustina	DL-PLA	[126]
Metotrexato	PLGA	[127]
Cefazolina Sodica	PLGA	[128]
Ciprofloxacina	L-PLA	[129]
Indometacina	DL-PLA	[130]
	PLGA	[131]
Piroxicamo	DL-PLA	[130]
Morfina	PLGA	[132]
Progesterona	DL-PLA	[126]
Levonogestrel	PLGCLA	[133]
Timolol maleato	PLGA	[134]

Los principios activos antes mencionados abarcan diferentes categorías farmacológicas, entre las que se encuentran: citostáticos, inmunosupresores, antiinflamatorios no esteroideos, antibióticos, analgésicos narcóticos, anticonceptivos, anestésicos, antagonistas narcóticos, proteínas y péptidos [94].

La liberación de principios activos convencionales de MEs generalmente ocurre por difusión a través de la matriz del polímero, así como a través de los poros de la estructura del polímero. Sin embargo, la biodegradación de la matriz del polímero y disolución del polímero degradado continuamente cambia la geometría de la ME y la textura de la matriz del polímero. Como resultado, el modelo de liberación de principios activos es una combinación de difusión y degradación [94].

Debido a que la biodegradación del polímero generalmente involucra la erosión de la masa, la microesfera toma agua antes de comenzar la degradación de la matriz y disolución. Después que la hidratación de la matriz del polímero ha ocurrido, la molécula de principio activo encapsulado comienza a disolverse en el medio acuoso y difunde fuera de la matriz del polímero, por lo tanto, el mecanismo de liberación de principios activos puede verse como en 3 etapas:

1. Una liberación inicial del principio activo enlazado a la superficie o embebida en la región superficial de la ME.
2. Liberación difusional del principio activo a través de la matriz del polímero y a través de los poros durante la degradación de la matriz.
3. Liberación erosional del principio activo por la desintegración de la matriz del polímero y disolución después que la matriz pierde su integridad y las cadenas del polímero son degradadas a un tamaño lo suficientemente pequeñas como para ser solubilizadas [94].

Dentro de los principios activos que se pueden emplear están los fármacos y estos pueden ser:

Fármacos hidrofílicos: liberar un fármaco hidrofílico representa un gran reto, ya que estos sistemas presentan una gran ráfaga inicial de liberación de fármaco, seguida de una liberación lenta. El coeficiente de difusión de las moléculas hidrofóbicas es más bajo que el de las hidrofílicas, al igual que la velocidad de disolución del fármaco. La liberación de fármacos hidrofílicos está influenciada por dos mecanismos, la difusión del fármaco y la disolución del fármaco.

Fármacos hidrofóbicos: El reto de la administración de estos fármacos es debido a la baja solubilidad del fármaco y la baja difusividad dentro de la matriz polimérica, por lo cual el perfil de liberación suele ser lento al igual que la constante de disolución; el proceso de difusión se rige principalmente por difusión y erosión.

Acetaminofén

El acetaminofén es un fármaco que funciona como analgésico antipirético, se obtiene mediante la acetilación de ácido paminofenol. Este fármaco se presenta como un polvo blanco finamente cristalino e inodoro, tiene un peso molecular de 151.17 g/mol, su fórmula empírica es $C_8H_9NO_2$, presenta un $pka= 9.78$ y su longitud de onda máxima (λ_{max}) oscila entre 242 y 250 nm, es soluble en agua (1 g/100 mL), etanol y acetona; su punto de ebullición es superior a 500 °C, la temperatura de fusión esta entre 169 y 170 °C y su densidad es de 1.3 g/cm³.

El acetaminofén ayuda a aliviar dolores leves y crónicos, su mecanismo de acción es a nivel de sistema nervioso central, esto se relaciona con la inhibición de la producción de prostaglandinas, compuesto relacionado con el proceso de dolor y su acción antipirética la realiza de igual forma inhibiendo la producción de prostaglandinas a nivel hipotalámico.

Tiene una absorción rápida y completa vía oral y rectal, tiene una vida media de 1 a 4 horas después de su ingesta. [135].

Solventes

Diferentes solventes han sido evaluados en la producción de microesferas. Los solventes miscibles en agua no forman microesferas durante el método de emulsión, tienden a formar aglomerados irregulares debido al intercambio de éste, también hay que tener en cuenta que el punto de ebullición debe de ser menor al del medio de suspensión. Los más adecuados presentan baja toxicidad, fácil eliminación y habilidad del solvente para disolución del fármaco [136].

2.10 Estado del arte

2.10.1 Andamios y microesferas

Las microesferas de biopolímeros han sido ampliamente investigadas para su uso como sistemas de liberación, pero nunca esferas de quitosano o pectina dentro de un andamio regenerativo de biovidrio CEL2. La manera en la que incorporan las microesferas suele ser al mismo tiempo de la

fabricación del andamio, lo cual no es posible en el método utilizado en este proyecto, ya que se emplean temperaturas mayores a 100°C las cuales eliminarían completamente el biopolímero.

Las microesferas de quitosano y pectina tienen una gran capacidad para resistir la degradación en el tracto digestivo, por lo que se han estado empleando como agentes de liberación independientes, actualmente existe la posibilidad de poder combinar estos vehículos de liberación con andamios tridimensionales para mejorar la aplicación de los dos. Respecto a la parte de fabricación de microesferas; Giunchedi y col [137]. Trabajaron en la fabricación de microesferas de pectina para aplicaciones oftálmicas que liberaran piroxicam el cual es un medicamento antiinflamatorio. El método que emplearon fue secado por aspersión con una boquilla de 0.7mm. obtuvieron partículas esféricas lisas con tamaños inferiores a 10 μ m, un rendimiento del 41 al 46% y una eficiencia de encapsulación del 97 al 100%. Cabe mencionar que el medicamento empleado en esta investigación fue hidrofóbico, es por eso por lo que la eficiencia de encapsulación fue alta.

Benerjee y col [138] desarrollaron microesferas de pectina para liberación de un medicamento para la diabetes que fue la metformina, usaron el método de emulsión evaporación del solvente agua en aceite, variando la relación polímero/droga obtuvieron partículas semiesféricas con superficie rugosa de 34.56 \pm 1.94 μ m con un eficiencia de encapsulamiento de 67.3 \pm 1.78%.

Olivera y col [99] trabajaron en la producción de microesferas de quitosano con ADN encapsulado, estas fueron sinterizadas por el método de emulsión evaporación del solvente. Disolvieron el quitosano en ácido acético para obtener la fase acuosa y posteriormente la mezclaron con la fase orgánica (aceite de girasol), span 80 y glutaraldehído como agente entrecruzante. Obtuvieron partículas semiesféricas con superficie rugosa y tamaños entre 1 y 20 μ m. hicieron estudios de liberación en pH fisiológico observando una liberación rápida en la primera hora del 85% liberando por completo la sustancia a las 2h.

Macías-Andrés y col. [35] en su investigación desarrollaron MEs de PHBV cargadas de daidzeina las cuales incorporaron a andamios tridimensionales de biovidrio 45S5 mediante la técnica de goteo, en la Figura 2.19 se puedan observar la morfología así como el tamaño de las MEs. Ellos obtuvieron microesferas de 2 a 6 μ m mediante el método de emulsión evaporación del solvente y mostraron alta bioactividad después de haber sido inmersos en solución SBF a los 3 días. En la Figura 2.20 se muestra la morfología del andamio y a un mayor aumento las microesferas adheridas

a sus paredes y finalmente en la Figura 2.21 se puede observar el crecimiento de la capa apática en su superficie a dos magnificaciones diferentes,

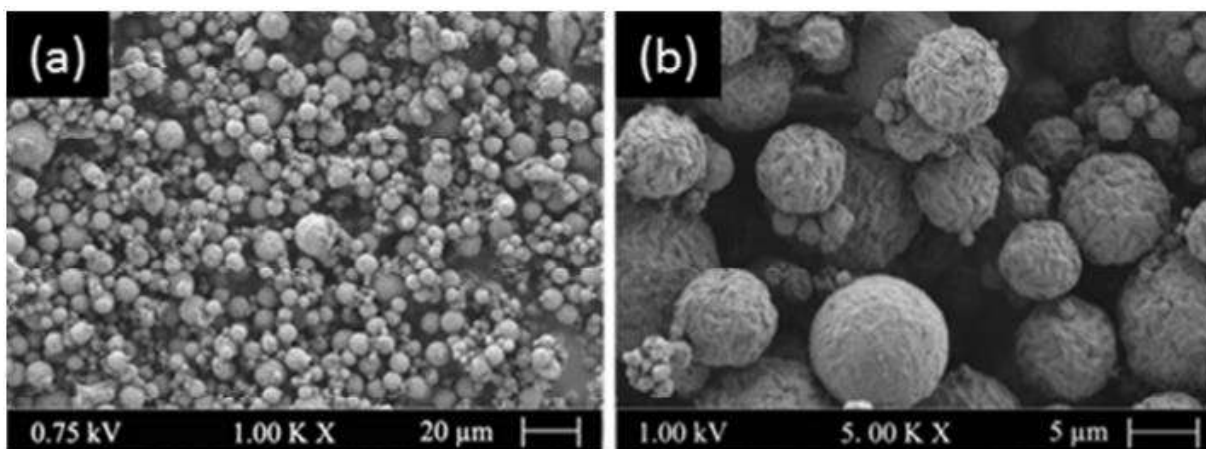


Figura 2. 19 Microesferas de PHBV a diferentes aumentos [35].

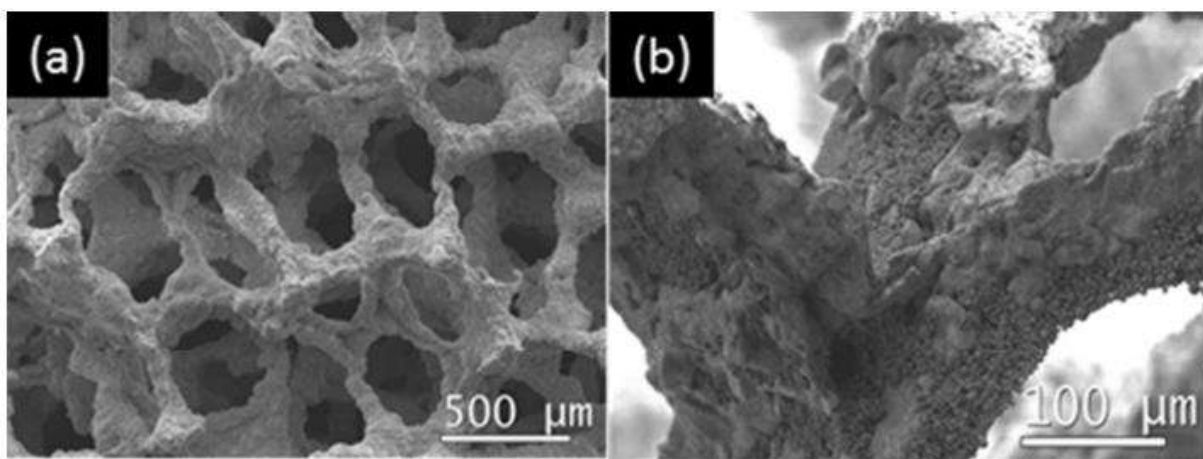


Figura 2. 20 Adhesión de microesferas de PHBV en los andamios de biovidrio 45S5 [35].

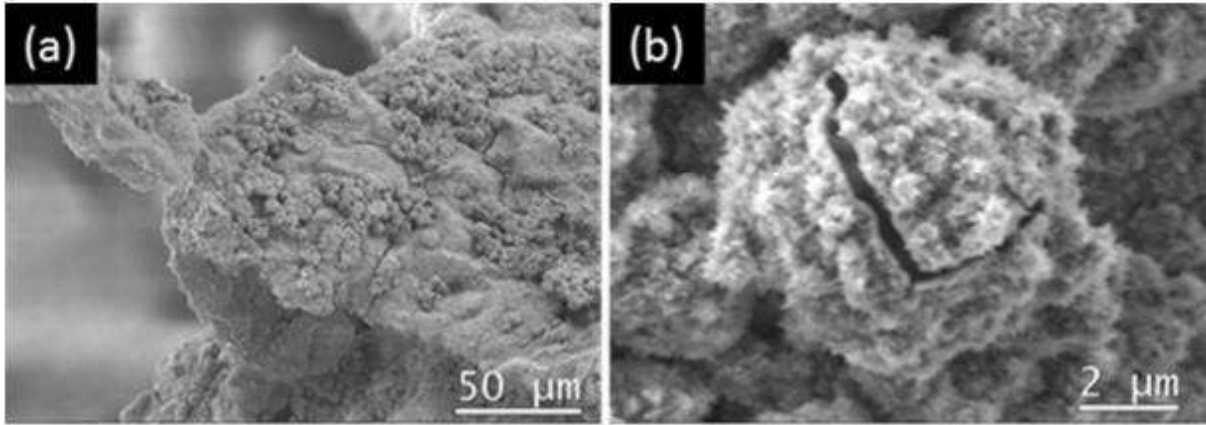


Figura 2. 21 Capa de hidroxiapatita en andamios 45S5/MEs de PHBV a diferentes magnificaciones [35].

Niu y col. [139] desarrollaron andamios de nano-HA/Colágeno/PLLA que contenían microesferas de quitosano para liberación de un péptido. Los andamios que contenían microesferas fueron preparados mediante el método de separación de fases por inducción térmica, determinaron que entre mayor porcentaje de microesferas incluyeran en el andamio, la porosidad disminuía y la resistencia mecánica aumentaba. Sus resultados mostraron que el grado de degradación incrementó con el incremento de cantidad de microesferas adheridas, el péptido fue liberado de manera controlada. Este nuevo andamio con microesferas mostró un gran potencial bioactivo y ofrece un nuevo sistema de liberación. En la Figura 2.22 se pueden observar las microesferas de quitosano y el andamio compuesto de polímero y microesferas.

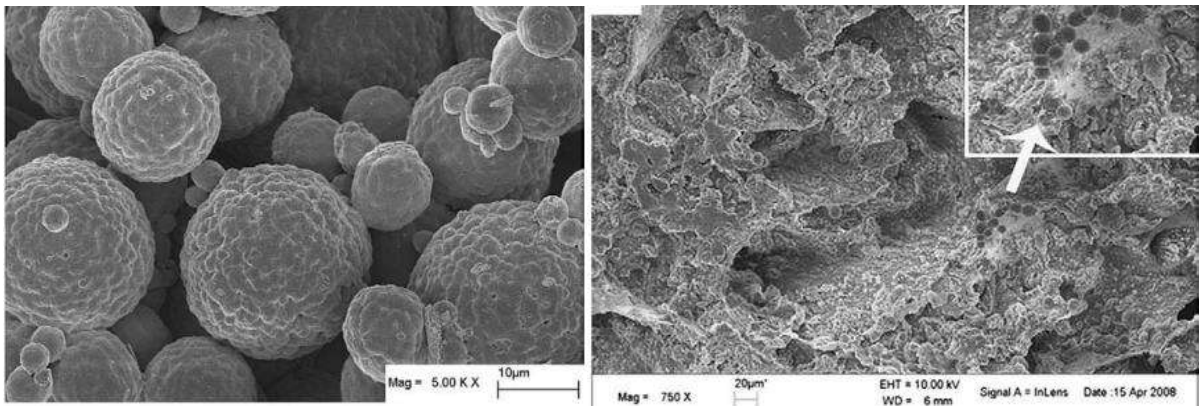


Figura 2. 22 Microesferas de quitosano y andamio compuesto del polímero y microesferas [139].

Li y col. [66] hicieron andamios de biovidrio 45S5 con microesferas adheridas de PHBV para poder liberar vancomicina, los andamios mostraron una porosidad interconectada del 94% y fueron producidos por el método de la réplica, las microesferas mostraron un tamaño promedio de $3.5 \mu\text{m}$ y fueron producidas por el método de emulsión evaporación del solvente, en la Figura 2.23 se puede observar la morfología de estas y su tamaño, obtuvieron un recubrimiento de microesferas homogéneo en toda la superficie de los cuellos de la estructura porosa del andamio como se muestra en la Figura 2.24 que además de liberar el fármaco también produjo un incremento de resistencia mecánica en los andamios finales, hicieron pruebas de bioactividad mediante inmersión en SBF y obtuvieron una capa de hidroxiapatita uniforme en la superficie del andamio (Figura 2.25), finalmente hicieron pruebas de liberación del fármaco obteniendo una liberación brusca del 21% pero sostenida durante 40 días.

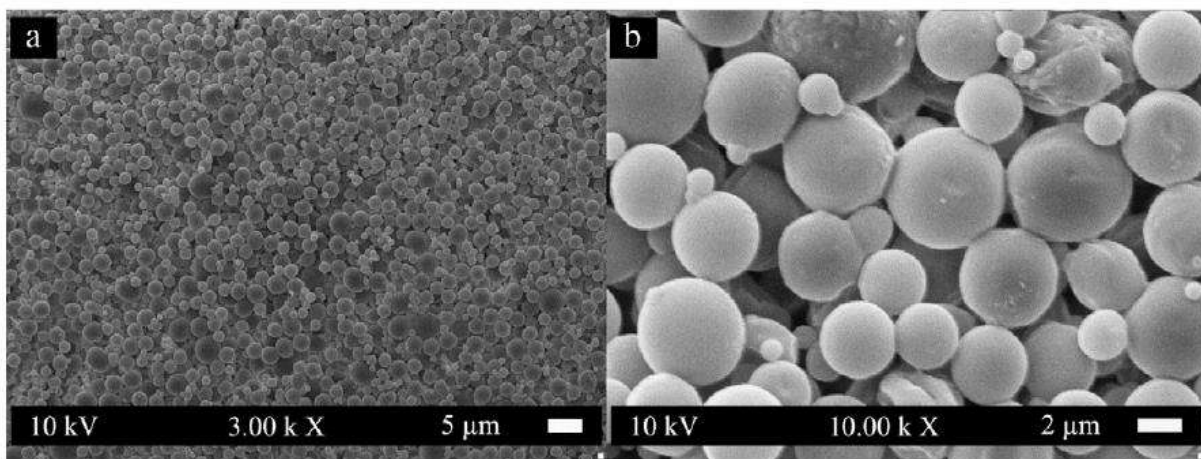


Figura 2. 23 Microesferas de PHBV a diferentes magnificaciones [66].

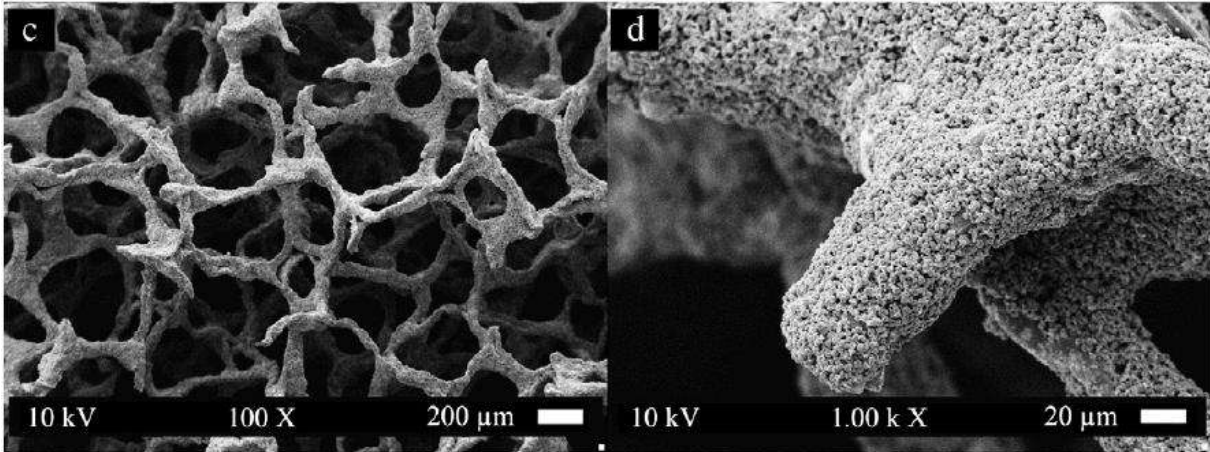


Figura 2. 24 Microesferas de PHBV adheridas a la superficie del andamio [66].

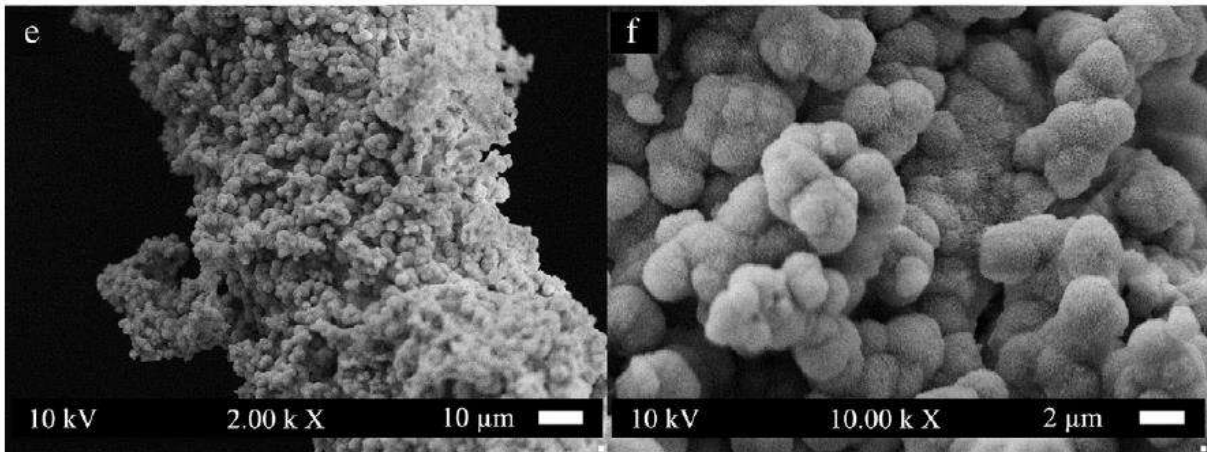


Figura 2. 25 Andamio de biovidrio 45S5 con microesferas de PHBV después de inmersión en SBF [66].

Huguang y col. [73] desarrollaron un andamio compuesto de una matriz de PLGA y microesferas de PHBV para ser aplicado en ingeniería de tejidos. Los andamios mostraron una porosidad mayor al 80%. Cuando la cantidad de microesferas aumentó, la resistencia mecánica también.

Las esferas obtenidas se muestran en la Figura 2. 26 estas con tamaño menor a 50µm y una morfología esférica rugosa., el método empleado fue emulsión evaporación del solvente y posteriormente incorporaron las MEs a los andamios tridimensionales, obtuvieron una buena dispersión debido a que las microesferas fueron incorporada al momento de fabricación del andamio, esto se puede observar en la Figura 2. 27. También mostraron una alta capacidad bioactiva al permitir la adhesión de preostoblastos es su superficie (Figura 2. 27 c, d, f).

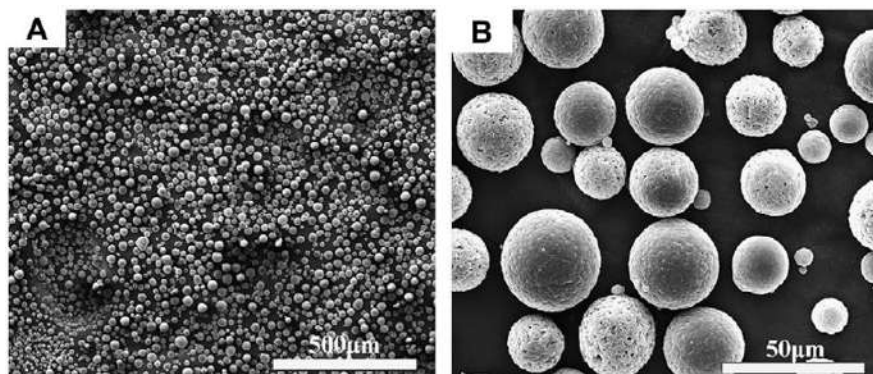


Figura 2. 26 Microesferas de PHBV a diferentes magnificaciones [73].

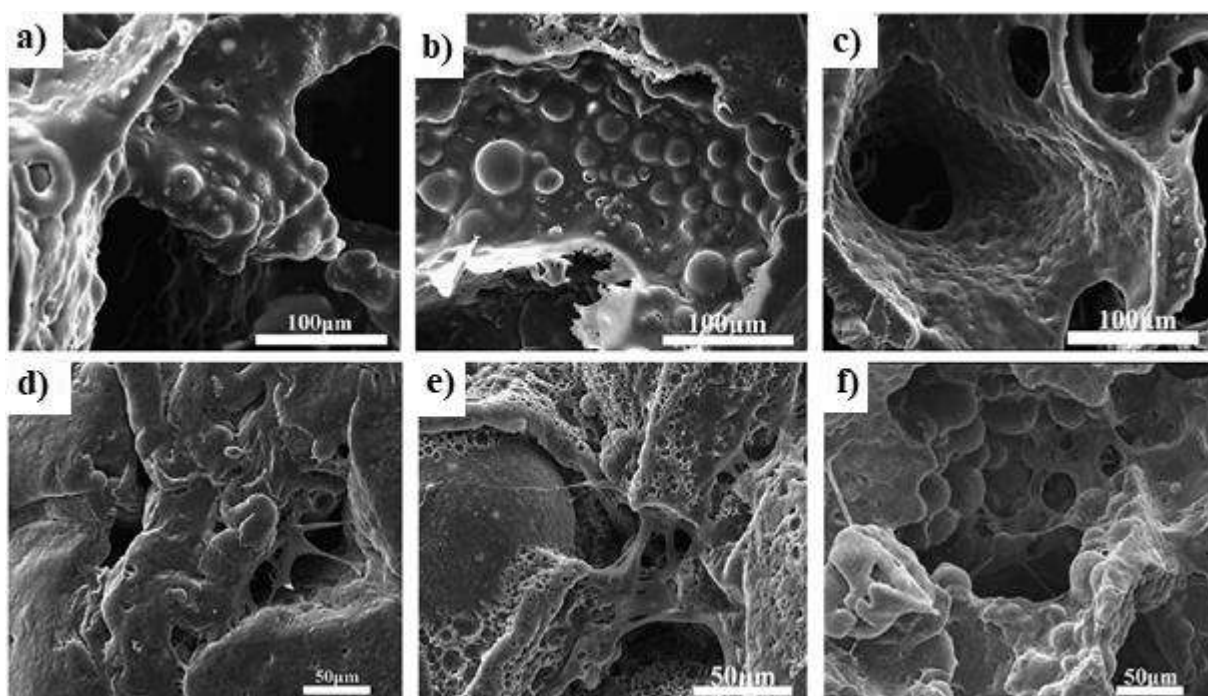


Figura 2. 27 Imágenes de SEM de los andamios de PLGA/microesferas PHBV antes (a, b, c) y después (d, e, f) de cultivos celulares [73].

Por otra parte, hay previas investigaciones de andamios para regeneración ósea hechos de microsferas de algún biopolímero, tal es el caso en donde Kucharska y col [140]. trabajaron con esferas de quitosano obtenida por un método de extrucción con una boquilla de 1mm, las cuales

fueron aglomeradas y aglutinadas con un agente entrecruzante (tripolifosfato de sodio) mediante compresión para formar los andamios tridimensionales, la porosidad fue controlada mediante el diámetro de las microesferas, obteniendo un 40% de porosidad con microesferas de 1mm de diámetro colocándolas de manera que se genera una porosidad interconectada pero no aseguran que exista microporosidad. Este tipo de andamios se degrada rápidamente debido a la cantidad de quitosano en su composición. En la Figura 2.28 se puede observar el andamio obtenido compuesto de gran cantidad de microesferas de quitosano.

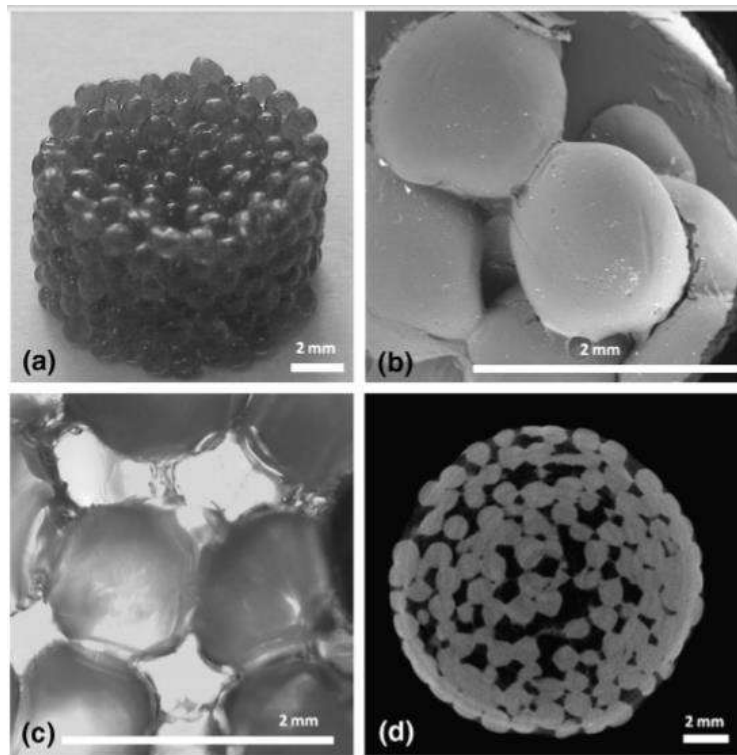


Figura 2. 28 Andamios para regeneración ósea hecho a base de microesferas de quitosano, interconectividad y microtomografía.

CAPITULO 3. DESARROLLO EXPERIMENTAL

En este capítulo se presenta la metodología que se siguió para la producción de andamios de biovidrio CEL2 y microesferas de pectina y quitosano para la liberación de acetaminofén. Se describen brevemente los materiales, procedimientos, técnicas y equipos mediante los cuales fueron caracterizados los andamios y las microesferas

3.1 Materias primas

3.1.1 Para la fabricación de los andamios

El vidrio bioactivo CEL2 se preparó mediante un proceso convencional de fusión y temple a partir de la mezcla de óxidos y carbonatos puros; SiO₂, Na₂CO₃, CaO, MgO, K₂CO₃, y P₂O₅ (Sigma-Aldrich). Como ligante se usó resina fenólica Varcum 29217 en polvo categoría F Reactiva y como agente espumante se empleó p-toluensulfonil hidrazida (TSH) en polvo (Sigma-Aldrich).

3.1.2 Para la producción de microesferas

La pectina (75% de esterificación) se adquirió a Sigma-Aldrich, el agente tenso activo span80 surfactante no iónico sorbitan monoleate, sorbitan oleate. PM 420.60, se adquirió de Sigma Aldrich, el glutaraldehído al 10% (C₅H₈O₂) y parafina líquida o aceite mineral, fueron adquiridos de una droguería comercial.

Para la preparación de las MEs de quitosano se usó quitosano de bajo peso molecular (Sigma-Aldrich), empleando la técnica emulsión/evaporación del solvente a partir de una emulsión agua en aceite. Para la fase acuosa de la emulsión se utilizó ácido acético Glacial CH₃ COOOH, (Sigma-Aldrich) y acetaminofén. BioXtra ≥99.0%. (Sigma-Aldrich), para la fase orgánica se utilizó parafina líquida y un agente tenso activo Span 80 (Sigma-Aldrich). Se utilizó glutaraldehído al 10% para reducir el tamaño de la MEs y Hexanos. C₆H₁₄ (Sigma-Aldrich) como solución para lavar las MEs resultantes.

3.1.3 Para las pruebas biológicas

Para las pruebas de bioactividad se usó fluido corporal simulado (*simulated body fluid - SBF*), el cual fue preparado de acuerdo al protocolo propuesto por Kokubo y col. [51].

Para los ensayos de liberación del fármaco se empleó solución salina tamponada de fosfato (*phosphate buffered saline - PBS*).

Finalmente, para las pruebas celulares, se utilizó la línea celular de fibroblastos de ratón NIH-3T3 (ATCC-CRL-1658) y medio de cultivo DMEM/F12 Ham (Sigma-Aldrich).

3.2 Elaboración del vidrio bioactivo CEL2

El vidrio CEL2 fue preparado mediante la fusión de una mezcla estequiométrica de polvos grado reactivo de alta pureza para obtener la composición final de $45\text{SiO}_2\text{-}3\text{P}_2\text{O}_5\text{-}26\text{CaO-}7\text{MgO-}15\text{Na}_2\text{O-}4\text{K}_2\text{O}$ en % en peso y mezclada en un contenedor de polietileno por un periodo de 15 min. La fusión de los elementos se llevó a cabo en un horno *Carbolite HTF-1700* dentro de un crisol de sílice fundida. El ciclo térmico diseñado se muestra en la Figura 3.1

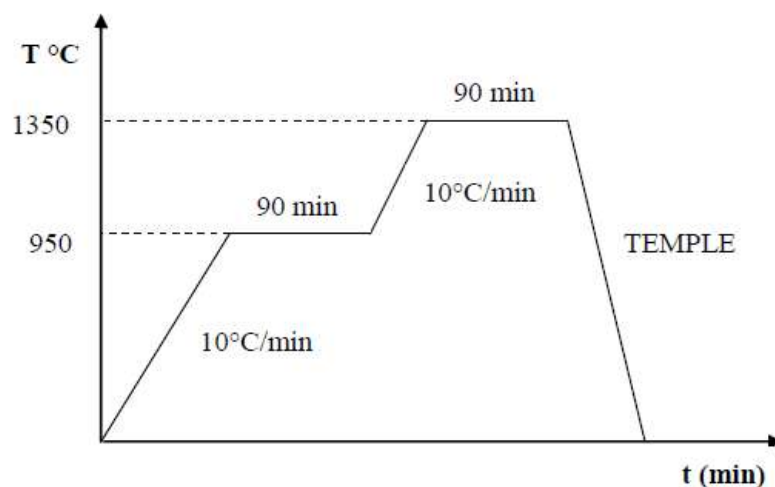


Figura 3. 1 Ciclo térmico para la fabricación del vidrio CEL2.

El vidrio fundido se vació en agua fría haciendo una frita para facilitar el rompimiento debido al choque térmico que éste presenta cuando se hace el vaciado. El vidrio resultante se pesó y se pulverizó para obtener un tamaño de partícula menor a $20\ \mu\text{m}$ en un molino de discos vibratorio *RS 200 Retsch* a una velocidad de 1700 rpm.

3.2.1 Caracterización del polvo del biovidrio CEL2

El tamaño y la distribución de tamaño de partícula del polvo de biovidrio se determinaron haciendo uso de un analizador de partícula *Beckman Coulter LAS 13 320*. La naturaleza amorfa del vidrio se determinó en un difractómetro de rayos X *D8 Advance Bruker* con radiación $\text{CuK}\alpha$ en el rango de 2θ de 10° a 70° usando un paso de 0.02° y un tiempo de 1 s por paso. Las temperaturas de transición del vidrio, cristalización y fusión se determinaron mediante el análisis térmico en un módulo de análisis térmico simultáneo TG/DSC *SDT Q600 TA Instruments* usando un crisol de alúmina y atmósfera de Ar desde temperatura ambiente hasta 1200°C .

La composición final del vidrio se evaluó mediante fluorescencia de rayos X (Siemens SRS 3000 automatizado).

3.3 Elaboración de los andamios de vidrio bioactivo CEL2

Para la fabricación de los andamios se usó el método combinado de tecnología de polvos y espumado de polímeros, esquematizado en la Figura 3.2, propuesto en proyectos anteriores, en el Departamento de Materiales Compuestos del IIMM [34].

El vidrio en polvo se mezcló con resina fenólica PRHA-125 en polvo y un agente espumante en diferentes proporciones (Tabla 3.1) para estudiar el efecto en la morfología y resistencia a la compresión finales de los andamios. Finalmente, se seleccionaron las condiciones que dieran como resultado andamios con las mejores características de porosidad, microestructura y propiedades mecánicas.

El tratamiento térmico para la fabricación de las espumas se llevó a cabo en un horno eléctrico de laboratorio tipo mufla *FD1535M Thermolyne Thermo Scientific*. Durante el espumado el ligante se funde y crea una suspensión cargada con partículas de vidrio CEL2, al mismo tiempo el agente espumante se descompone y forma un gas que es el encargado de expandir la estructura. Después del espumado, el material resultante es un andamio de resina fenólica sólida cargada con partículas del vidrio bioactivo. Los andamios fueron maquinados en pequeños cilindros con la finalidad de crear una estructura más uniforme y evitar problemas de colapso durante los pasos térmicos posteriores. Los cilindros resultantes fueron pirolizados y sinterizados a 500°C y 950°C ,

respectivamente, en atmósfera de aire con la finalidad de obtener un material consolidado libre de resina.

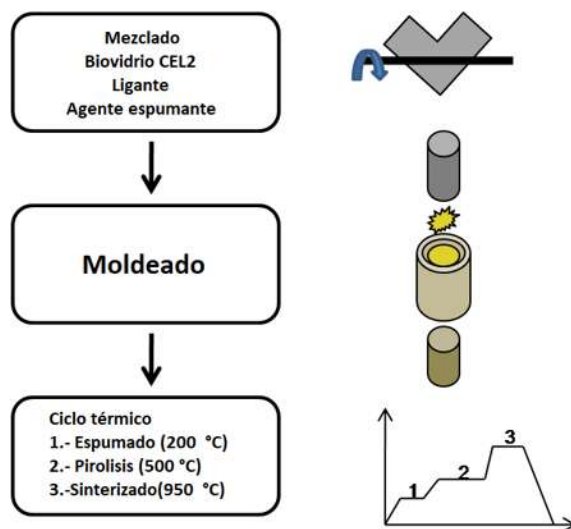


Figura 3. 2 Diagrama esquemático del método combinado de tecnología de polvos y espumado de polímeros.

Tabla 3. 1 Matriz de composiciones para la elaboración de los andamios.

Lote #	Cantidad de andamios	Atmósfera	Biovidrio % en peso	TSH % en peso
1	3	AIRE	A-60%	2%
	3		B-55%	
	3		C-50%	
	3		D-58%	
2	3	AIRE	A-60%	3%
	3		B-55%	
	3		C-50%	

La mezcla de polvos se vació en moldes de acero inoxidable en proporciones de 8 g por cada molde. Los ciclos térmicos diseñados para el espumado, pirólisis y sinterizado se muestran en las Figura 3.3 y 3.4, estos perfiles se diseñaron de acuerdo a los resultados obtenidos del análisis térmico para la resina, el espumante y el biovidrio.

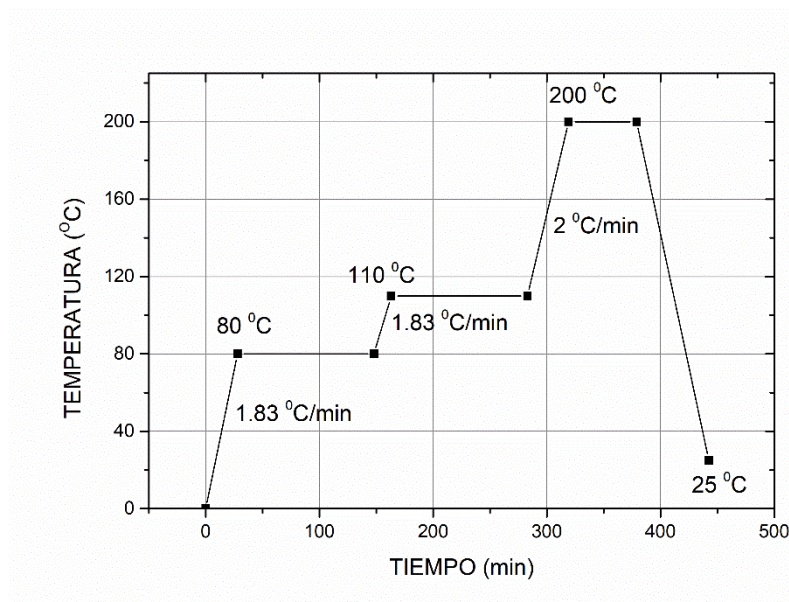


Figura 3.3 Ciclo térmico diseñado para el espumado

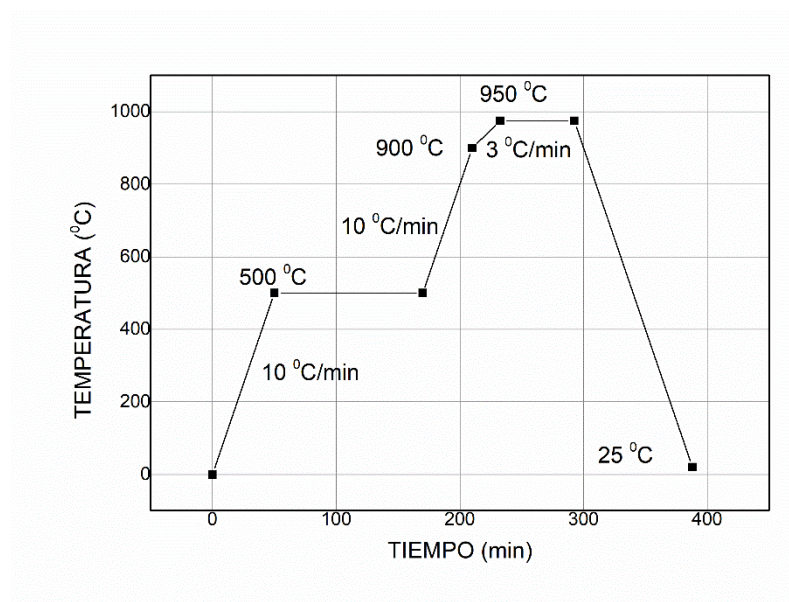


Figura 3.4 Ciclo térmico diseñado para la pirólisis y el sinterizado.

Las probetas obtenidas no fueron uniformes en su morfología por lo cual tuvieron que ser maquinadas para tener cilindros uniformes y poder llevar a cabo las pruebas de compresión y hacer comparaciones entre las mismas. Después de dicho tratamiento se prepararon pastillas para ser sometidas a los ensayos *in vitro*.

El proceso completo desde la producción de biovidrio CEL2 es mostrado en la Figura 3.5.

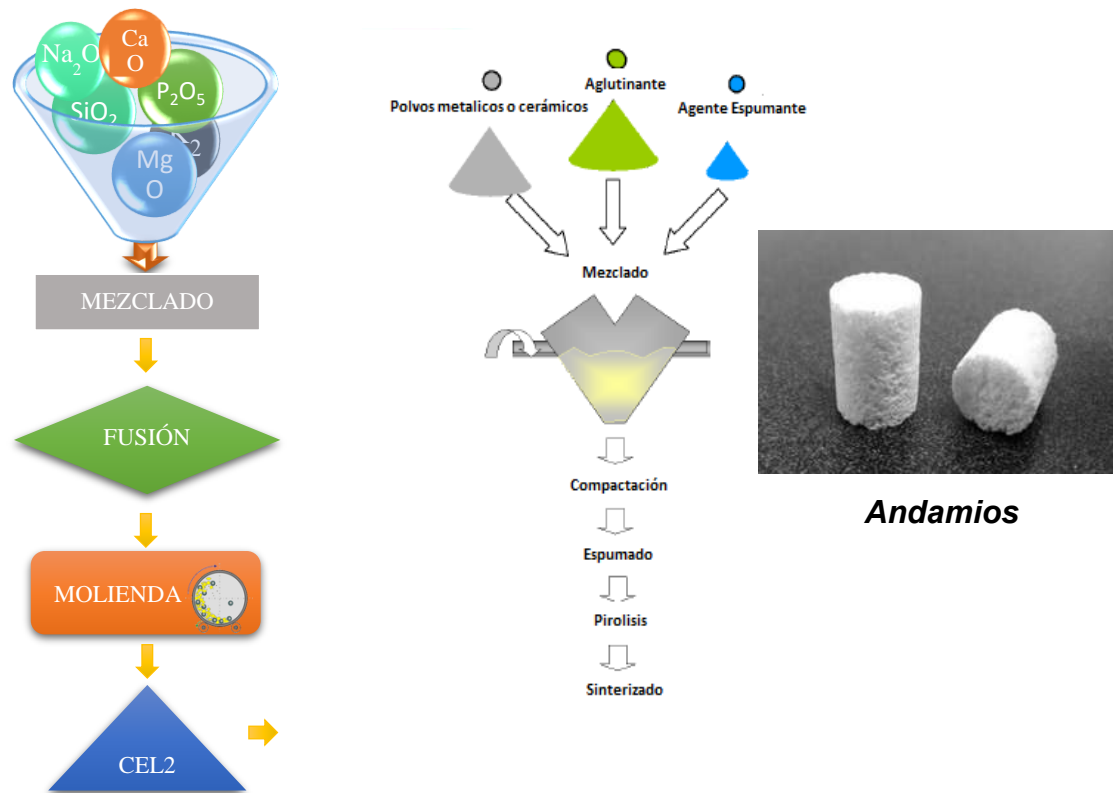


Figura 3. 5 Proceso completo para la elaboración de andamios de biovidrio CEL2.

3.4 Caracterización de los andamios de vidrio bioactivo CEL2

3.4.1 Cálculo de la porosidad

La porosidad P se calcula con la fórmula:

$$P = 1 - (\rho_{esp}/\rho_{teórica}) = 1 - \rho_{relativa} \quad (3.1)$$

Donde la densidad específica ρ_{esp} de los andamios se calculó haciendo uso de la masa y las dimensiones de los cilindros sinterizados, $\rho_{teórica} = 2.6 \text{ g/cm}^3$ es la densidad teórica del vidrio bioactivo CEL2 [40].

3.4.2 Morfología de la superficie

La estructura de los andamios se caracterizó con un microscopio electrónico de barrido *JEOL SEM JSM-6400* sobre superficies fracturadas como muestra la Figura. 3.6.

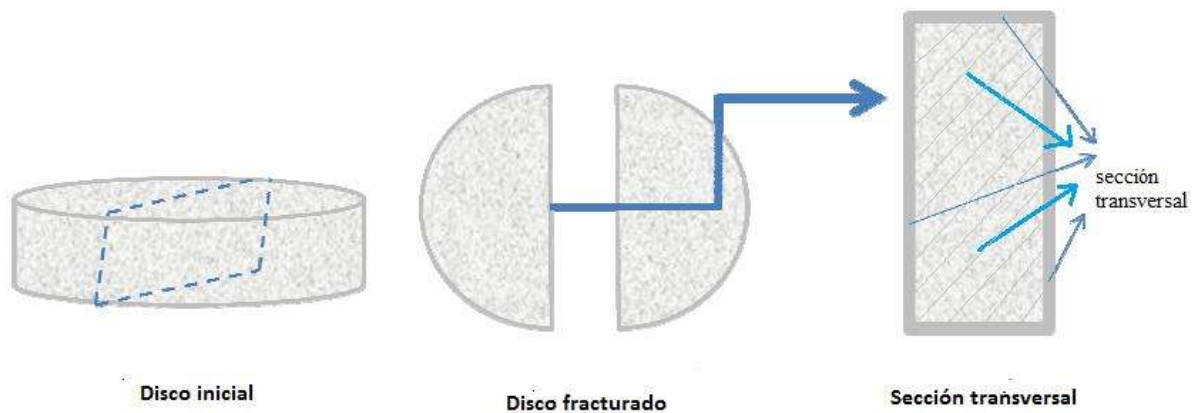


Figura 3. 6 Diseño de corte para el análisis por MEB a las espumas de biovidrio CEL2.

3.4.3 Análisis de las fases presentes

La microestructura de los andamios se caracterizó por medio del microscopio electrónico de barrido de emisión de campo *JEOL FE-SEM JSM-7600F* a un voltaje de aceleración de 15 kV, y la composición de las muestras se determinó por *X-Flash 4010 EDS Bruker*.

3.4.4 Determinación del área superficial específica

El área superficial específica es la relación que hay entre el área superficial total de un sólido y la masa de este, además es una característica importante que influye en aspectos como la cinética de las reacciones y la resistencia mecánica, también es necesaria para calcular el volumen de fluido

corporal simulado necesario para la inmersión de cada disco, por ello, su determinación resulta importante.

El método BET, desarrollado por Brunauer, Emmett y Teller para la determinación del área superficial, se basa en la adsorción de un gas inerte a baja temperatura sobre una superficie sólida. En el caso de las muestras con una superficie específica expuesta igual o superior a $1,0 \text{ m}^2/\text{g}$, el gas que se utiliza para realizar el análisis es el nitrógeno, mientras que para materiales con superficies específicas inferiores a $1.0 \text{ m}^2/\text{g}$, el gas empleado podría ser el criptón. El equipo empleado para realizar estas mediciones fue un analizador de área superficial HORIBA- SA 9600 series. Se usaron 1.129 g de polvos de espuma de biovidrio CEL2.

3.4.5 Pruebas de compresión

Para la evaluación mecánica fue necesario maquinar las muestras en cilindros con dimensiones: $d = 10 \text{ mm}$; $l = 20 \text{ mm}$. Las pruebas de compresión fueron realizadas a 14 probetas elegidas aleatoriamente, en una máquina universal de ensayos mecánicos *Zwick/Roell Z100* con celdas de carga de 5 y 100 kN (Figura 3.7).

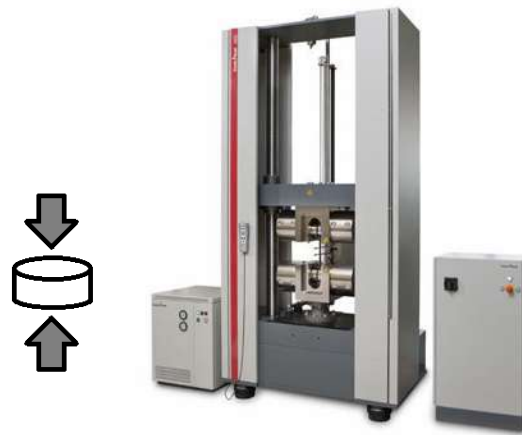


Figura 3. 7 Máquina universal para ensayos de compresión.

3.5 Evaluación de la bioactividad

Para los ensayos de bioactividad, se eligieron los andamios con las mejores propiedades morfológicas y mecánicas, éstos fueron maquinados con dimensiones de 10 mm de diámetro y 3 mm de espesor. Para este estudio, los discos se sumergieron en fluido corporal simulado (SBF) a seis diferentes tiempos de inmersión, 1, 3, 7, 14 y 21 días. Para cada tiempo se dispuso de tres discos como mínimo con el objetivo de limitar la dispersión de los resultados al hacer las caracterizaciones.

Antes de la inmersión, los discos se esterilizaron para evitar o disminuir la presencia de bacterias que pudieran afectar las condiciones del estudio. Para ello, se recurrió a un baño de ultrasonido radial, utilizando etanol y acetona durante 30 min cada uno, después se dejaron secar en una estufa durante 24 h y fueron expuestas a rayos ultravioleta durante 40 min.

Para la preparación del fluido corporal simulado (SBF) se tomó en cuenta el protocolo publicado por Kokubo y col. [51]. Mostrado en la Tabla 3.2

Tabla 3. 2 Reactivos y cantidades que conforman la Solución SBF. mM (=mmol/dm³).

Reactivo	Cantidad (gr)	Ion	Fluido corporal simulado (SBF) (mM)	Sangre humana (mM)
NaCl	8.036	Na ⁺	142	142
NaHCO ₃	0.352	K ⁺	5	5
KCl	0.225	Mg ²⁺	1.5	1.5
K ₂ HPO ₄ ·3H ₂ O	0.23	Ca ²⁺	2.5	2.5
MgCl ₂ ·6H ₂ O	0.311	Cl ⁻	147.8	103
1.0M HCl	40mL	HCO ³⁻	4.2	27
CaCl ₂	0.293	HPO ₄ ²⁻	1	1
Na ₂ SO ₄	0.072	SO ₄ ²⁻	0.5	0.5
(CH ₂ OH) CNH ₂	6.063	pH a 36.5°C	7.4	7.25

Esta solución es estable hasta por 8 semanas, pero si se advierte la presencia de algún tipo de precipitado de alguna de las sales disueltas, debe desecharse y prepararse una nueva solución. Antes de utilizar el SBF, se dejó reposar a temperatura ambiente y se filtró utilizando filtros estériles de 0.22 μm bajo flujo laminar. Los cilindros sumergidos en SBF se conservaron a 37°C en recipientes de polietileno y bajo condiciones estériles, en una sala de cultivos celulares.

El volumen del SBF necesario fue calculado mediante la siguiente ecuación determinada por Kokubo *et al.* [51] en su protocolo de ensayo de bioactividad

$$V = A/10 \quad (3.2)$$

donde V es el volumen (mL) del medio necesario por muestra y A (mm^2) es el área superficial aparente de la muestra.

Si la muestra no fuera porosa, el área se calcularía por medio de la siguiente ecuación para el caso de un cilindro:

$$A = 2\pi r^2 + 2\pi h \quad (3.3)$$

Por tratarse de muestras porosas en el presente trabajo, el área superficial de las pastillas, se calculó por medio del método teórico, suponiendo una pastilla densa y multiplicando el valor final por 1.5 debido a que nuestra pastilla real es porosa, por lo tanto el área superficial debe ser mayor y también se uso el método de BET para comparar resultados de áreas., la cantidad de muestra empleada fue 1.129 g, el gas utilizado fue nitrógeno y la superficie obtenida fue de 144.22 mm^2/g por lo tanto, si sustituimos en la ecuación (3.2), tenemos:

$$A = (1.129\text{g}) \times \left(144.22 \frac{\text{mm}^2}{\text{g}}\right) = 162.83 \text{mm}^2$$

$$V = 162.83 \text{mm}^2 \div 10 = 16.28 \text{mL}$$

El volumen de SBF necesario fue 16.28 mL por cada disco.

Para el proceso de inmersión, se esterilizó la mesa de la campana con acetona y se dejó la luz UV encendida durante 5 min trabajando en régimen laminar; las pastillas se manipularon con pinzas previamente esterilizadas durante todo el proceso.

Las operaciones realizadas fueron las siguientes (Fig. 3.8):

- Se colocaron las muestras en un recipiente de plástico estéril.
- Se filtraron 100 mL de SBF con un filtro (casa comercial Millipore) de 0.22 μm .
- Con una probeta graduada se midió la cantidad de SBF requerido por cada pastilla y se añadió al recipiente.
- Se colocaron los recipientes en la incubadora durante los tiempos de inmersión de: 1, 3, 7, 14 y 21 días. Después de transcurrir el tiempo de inmersión, se sacaron las pastillas de la solución de SBF y se guardó el sobrante de la solución utilizada por cada muestra para analizar su pH.

El control del pH de la solución es indispensable para asegurarse de que no haya cambios bruscos debido a que éste tiene un efecto muy pronunciado en la solubilidad de los vidrios bioactivos, porque la concentración de iones de SBF está sobresaturada respecto a varios de ellos. Se realizaron mediciones para cada concentración de SBF para cada tiempo de inmersión utilizando un electrodo de iones selectivos.

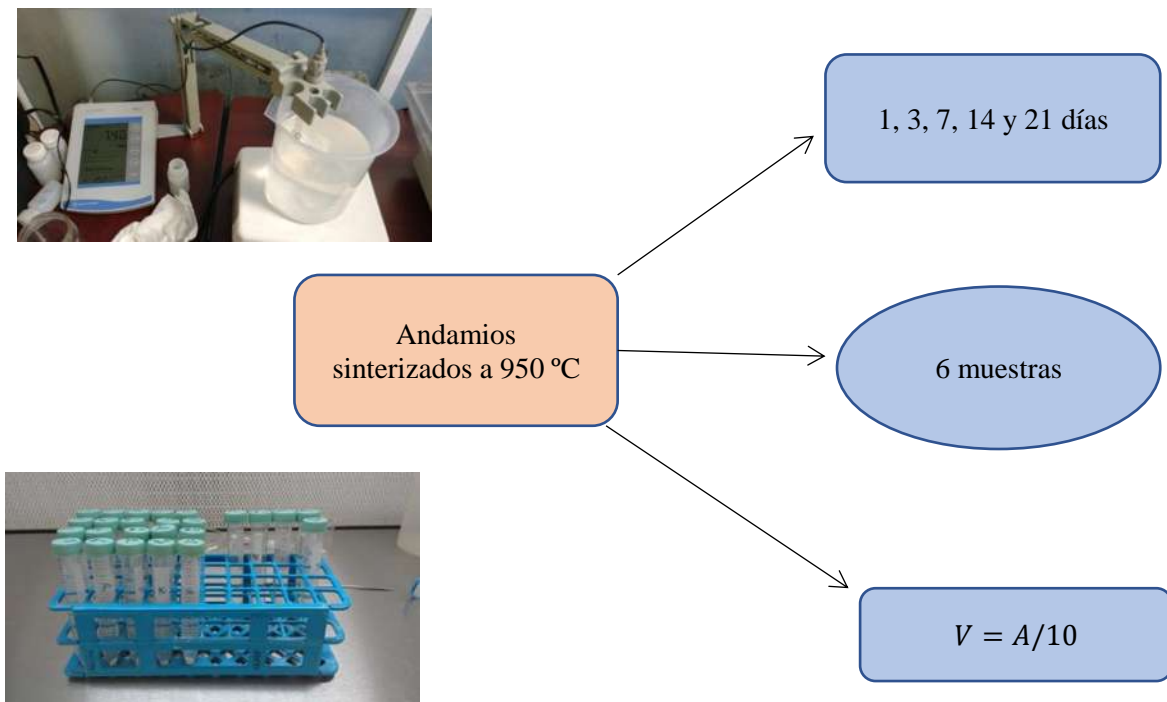


Figura 3. 8 Procedimiento de inmersión de andamios en solución SBF.

3.6 Caracterización de los andamios después de la inmersión en SBF

Para observar las fases presentes se empleó la técnica de difracción de los rayos X. El objetivo fue determinar si los andamios presentaban otras fases diferentes a la combeita y arquemanita.

A fin de observar la evolución de la microestructura y porosidad de los discos al cabo de los diferentes tiempos de inmersión se realizaron micrografías con un microscopio electrónico de barrido.

3.7 Elaboración de las microesferas de biopolímeros

Las microesferas fueron elaboradas a partir de dos polímeros diferentes para tener opción de elegir el más conveniente y ser adheridas a los andamios.

Las microesferas fueron elaboradas mediante la técnica de emulsión/evaporación del solvente, que se muestra esquemáticamente en la Figura 3.9 y está basada en el trabajo de Dhawan y col. [45]. La base es la formación de una emulsión agua en aceite (w/o) con la opción de una posterior adición

de un agente entrecruzante que coagula las microgotas formadas por la fase dispersa. Se cuenta con dos fases, una acuosa y otra orgánica, las cuales se emulsifican a altas revoluciones para posteriormente evaporar el solvente utilizando una plancha con agitación magnética y poder obtener las microesferas.

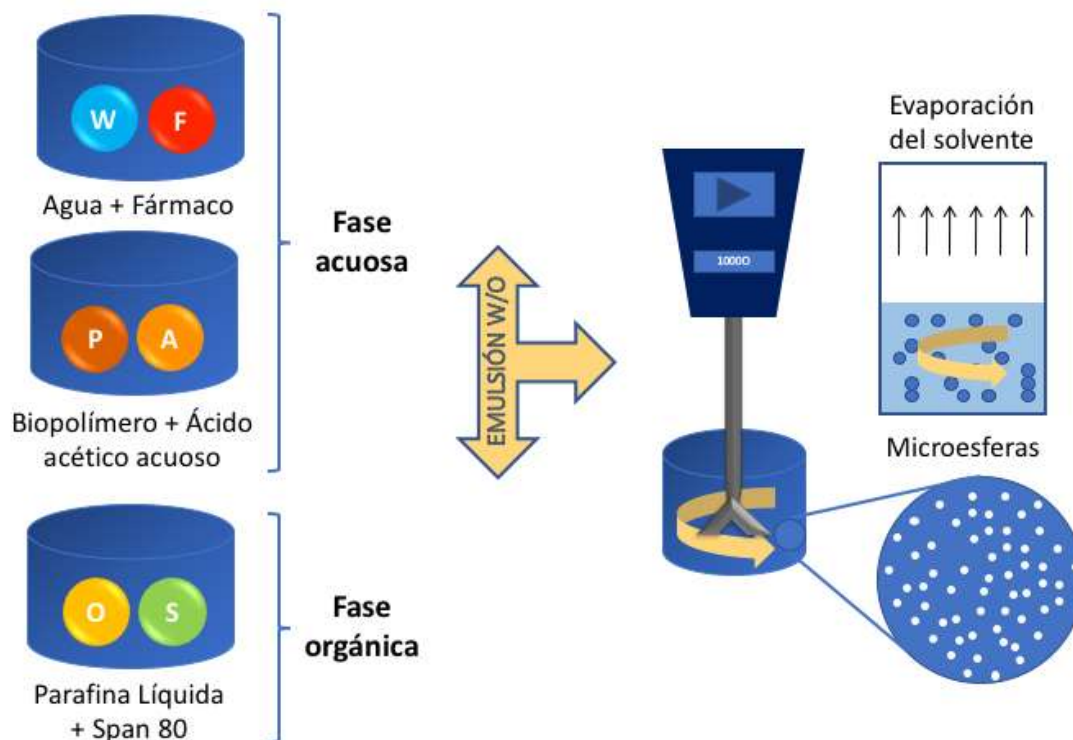


Figura 3. 9 Método de emulsión/evaporación del solvente para la fabricación de microesferas.

3.7.1 Microesferas de pectina

Para la optimización del método empleado se evaluaron las siguientes variables, cantidad de pectina (1-4 g), cantidad de Span 80 (1-2.5 mL), cantidad de aceite y cantidad de agua. La optimización de las variables de formulación se llevó a cabo con el fin de obtener el mayor rendimiento posible, de acuerdo a esto, se seleccionaron las siguientes condiciones finales: 3 g de pectina, 100 mL de agua destilada, 200 mL de parafina líquida y 1 mL de Span 80. Las variables

dependientes como son las velocidades de agitación y la temperatura se determinaron respecto a las cantidades anteriores y fueron 13,000 rpm y 80°C. El proceso de obtención de las microesferas de pectina es mostrado en la Figura 3.10.

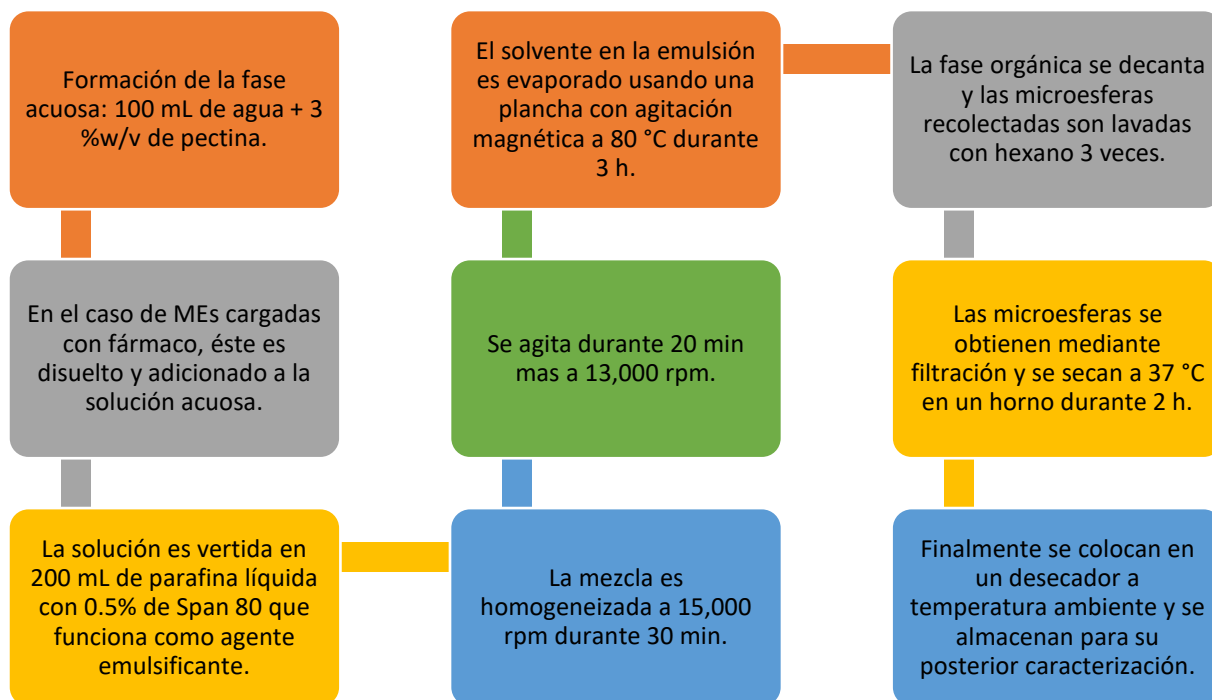


Figura 3. 10 Proceso de obtención de las microesferas de pectina.

3.7.2 *Microesferas de quitosano*

Las microesferas de quitosano se prepararon utilizando la misma técnica, a diferencia de que en estas se usó un agente entrecruzante para controlar el tamaño de microesfera que fue el glutaraldehído. Para preparar la fase dispersa (Fase 1) se disolvió quitosano al 2% (w/v) en solución acuosa de ácido acético al 5% (v/v) con agitación continua durante 24 h utilizando un agitador magnético. La fase continua (Fase 2) se obtuvo mezclando 150 mL de parafina líquida y 1 mL de Span 80 como agente tensioactivo en un emulsificador a 12,000 rpm durante 20 min. La fase 1 se agregó a la fase 2 y se colocó en una plancha con agitación magnética a 50 °C, adicionando 5 mL de glutaraldehído cada 15 minutos hasta completar una hora, posteriormente se aumentó la temperatura y se mantuvo a 90 °C hasta evaporar por completo el solvente.

Para la recolección de las microesferas se empleó un sistema de filtrado con bomba de vacío utilizando papel filtro No. 42 Whatman, se decantó el sobrenadante y se realizaron sucesivos lavados con acetona y hexano. Finalmente, las microesferas se secaron en un horno a 40 °C durante 2 h y puestas en un desecador a temperatura ambiente para su posterior caracterización. El proceso de obtención de las microesferas de quitosano se muestra en la Figura 3.11.

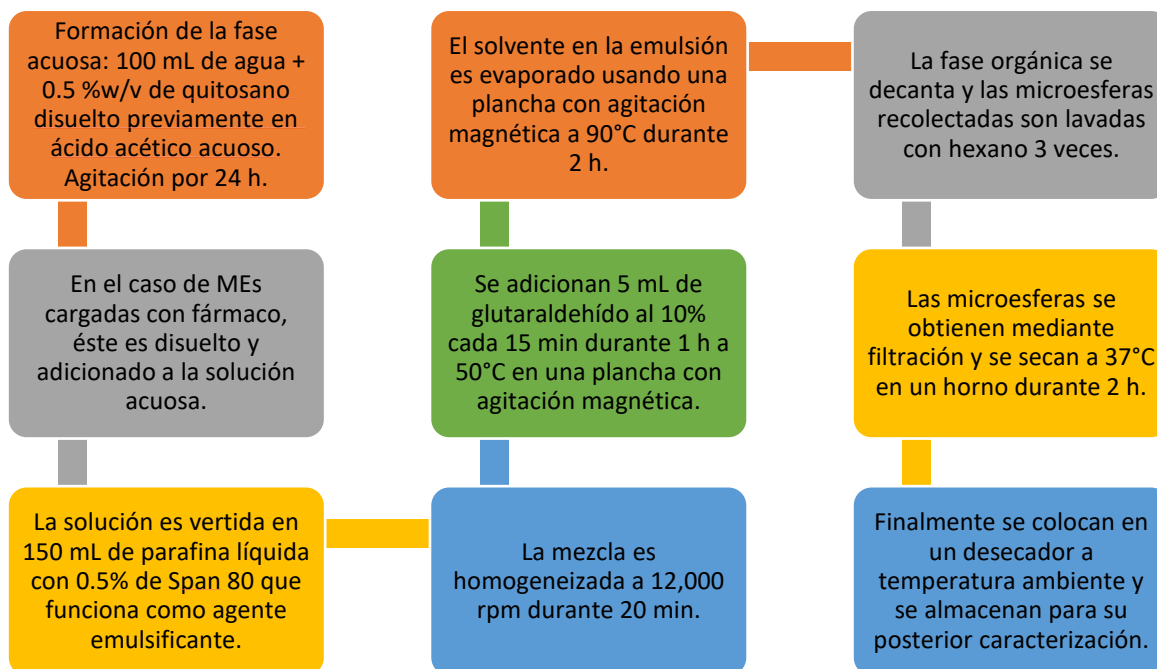


Figura 3. 11 Proceso de obtención de las microesferas de quitosano.

3.8 Caracterización de las microesferas

Para ambos tipos de microesferas; las de pectina y quitosano, se empleó el mismo procedimiento de caracterización.

3.8.1 Porcentaje de rendimiento

El rendimiento se calculó con la masa final de las microesferas recuperadas de cada lote dividido entre la masa inicial del polímero utilizado, el resultado se multiplicó por 100.

$$\% \text{ Rendimiento} = \frac{M_f}{M_i} \times 100 \quad (3.4)$$

3.8.2 Cálculo de la pérdida de humedad

Las microesferas fueron evaluadas para determinar la pérdida de humedad debido a su comportamiento hidrofílico. Fueron pesadas inicialmente y posteriormente puestas en un desecador a 37 °C durante 24 h. el peso final se determinó cuando ya no hay más cambios en la muestra.

$$\% \text{ Pérdida de humedad} = \frac{M_i - M_f}{M_i} \times 100 \quad (3.5)$$

Donde M_i es la masa inicial y M_f la masa final después de 24h.

3.8.3 Determinación del tamaño de partícula y distribución de tamaño de partícula

Las microesferas fueron medidas y fotografiadas en un microscopio de barrido (MEB) marca *JEOL JSM-700f FE SEM* a un voltaje de aceleración de 15 kV. La distribución de tamaño de microesferas de quitosano fue estimada mediante la medición de 200 MEs, asumiendo que éstas son esféricas, las cuales fueron elegidas al azar y mediante el software *Image J*, sobre imágenes tomadas en el MEB.

3.8.4. Estudio morfológico

La superficie de las microesferas se observó en un microscopio de barrido (MEB) de emisión de campo *JEOL FE-SEM JSM-7600F* a un voltaje de aceleración de 15 kV. Las muestras fueron metalizadas para que estas fueran conductoras eléctricamente.

3.8.5 Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC)

Los termogramas de las microesferas se determinaron mediante un módulo de análisis térmico simultáneo TG/DSC *SDT Q600 TA Instruments* usando un crisol de alúmina y atmósfera de Ar desde temperatura ambiente hasta 300°C y velocidad de calentamiento de 10 °C/min. Este estudio se llevó a cabo para determinar las temperaturas de fusión de las microesferas.

3.8.6 Difracción de rayos X (XRD)

Se utilizó un difractómetro de rayos X *D8 Advance Bruker* con radiación $\text{CuK}\alpha$ en el rango de 2θ de 10 a 70° usando un paso de 0.02 y un tiempo de 1s por paso. Bajo estas condiciones se analizaron

muestras de los polímeros y de las microesferas para corroborar que no hubiera fases cristalinas presentes.

3.8.7 Espectrofotometría infrarroja

Se utilizó esta prueba para constatar la presencia de los grupos funcionales de los biopolímeros, se llevó a cabo en un espectrofotómetro Bruker *Tensor27*.

3.9 Adición del fármaco en las microesferas de quitosano

Después de haber producido microesferas de dos polímeros diferentes y haberlas caracterizado, se tomó la decisión de seguir trabajando con las microesferas de quitosano para posteriormente adicionarles fármaco e incluirlas en los andamios tridimensionales.

Para adicionar el fármaco, en este caso acetaminofén empleado como fármaco modelo, se llevó a cabo el mismo procedimiento para hacer las microesferas, y el acetaminofén como es un fármaco hidrofílico, se disolvió en la fase acuosa.

Para las microesferas cargadas, la cantidad de acetaminofén se diluyó en 20 mL de agua destilada y se adicionó a la solución de quitosano/ácido acético acuoso. La cantidad de fármaco se varió para determinar la mejor eficiencia de encapsulamiento, los parámetros finales empleados en las elaboraciones de microesferas de quitosano están mostrados en la Tabla 3.3.

Tabla 3. 3 Parámetros empleados en la elaboración de microesferas de quitosano.

Fase acuosa (mL)	Fase orgánica (mL)	Cantidad quitosano (g)	Cantidad de fármaco (g)	Vel. emulsión (rpm)	Vel. agitación plancha (rpm)	Temperatura (°C)	Glutaraldehído (mL)
75	150	1	0.5	12,000	600	90	25
			0.4				
			0.3				
			0.2				
			0.1				

3.10 Caracterización de las microesferas de quitosano cargadas con fármaco

3.10.1 Porcentaje de rendimiento de las microesferas cargadas con fármaco

El rendimiento se define como la relación que hay entre la masa final obtenida y la masa inicial empleada en la emulsión. Este se calculó con la siguiente ecuación:

$$\% \text{Rendimiento} = \frac{M_f}{M_i} \times 100 \quad (3.6)$$

Donde M_f es la masa final obtenida y M_i es la masa inicial empleada.

3.10.2 Caracterizaciones complementarias

El cálculo de la pérdida de humedad, determinación de tamaño y distribución de tamaño, la determinación de morfología, el análisis térmico de las microesferas y del fármaco, las fases cristalinas presentes y los grupos funcionales fueron determinados de la misma manera que en las microesferas sin fármaco.

3.10.3 Eficiencia de encapsulamiento de la droga

Se preparó una dispersión de 10 mg de microesferas en 50 mL de agua destilada con pH 8.3, ésta fue sometida a agitación vigorosa en ultrasonido y posteriormente centrifugada, el sobrenadante fue examinado en el espectrofotómetro *Perkin Elmer Lambda 25 UV/VIS Instrument L6020060*. Cada muestra se hizo por triplicado. El porcentaje de encapsulamiento se calculó con la siguiente ecuación.

$$\%EE = \frac{M_{total}}{M_{teórica}} \times 100 \quad (3.7)$$

Donde M_{total} es la masa total encapsulada y $M_{teórica}$ es la masa del fármaco que se agregó inicialmente y que teóricamente debería estar encapsulada en su totalidad.

3.11 Adición de microesferas a los andamios

Se preparó una dispersión (0.5 % en peso) de MEs cargadas con acetaminofén dispersándolas en hexano, el cual es un solvente altamente no polar. Los andamios sinterizados a 950 °C fueron cortados en pequeñas partes las cuales fueron pesadas antes y después de la inmersión para determinar el porcentaje de MEs adheridas. Cada andamio se sumergió en la dispersión durante 1 min y posteriormente se dejaron secar durante 1 h, esto se repitió 4 veces y finalmente se mantuvieron a 40 °C para su posterior uso, como se muestra en la Figura 3.13.

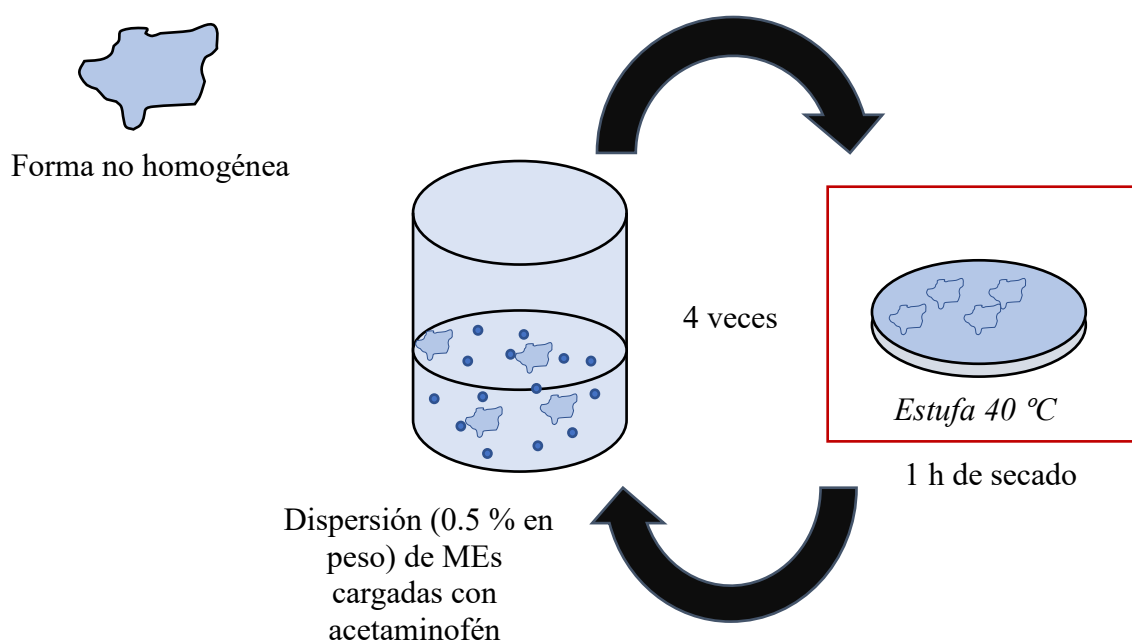


Figura 3. 12 Proceso de adición de microesferas de quitosano a las paredes del andamio.

3.12 Caracterización de los andamios de biovidrio CEL2/microesferas cargadas de acetaminofén

3. 12.1 Morfología de los andamios

La microestructura de los andamios antes y después de haber sido inmersos en SBF, se caracterizó por microscopía electrónica de barrido (MEB) *JEOL FE-SEM JSM-7600F* a un voltaje de aceleración de 15 k, la composición de las probetas se realizó por estudios EDS (*X-Flash 4010 EDS Bruker*).

3.12.2 Porosidad

La densidad específica ρ_{esp} de los andamios se calculó haciendo uso de la masa antes y después de ser inmersas en la solución de microesferas y las dimensiones de los cilindros sinterizados. La porosidad P_1 y P_2 las cuales son antes y después de haber incorporado microesferas, respectivamente, se calcularon con las siguientes ecuaciones:

$$P_1 = 1 - \left(\frac{M_1}{\rho_{CEL2} V_1} \right) \quad (3.8)$$

$$P_2 = 1 - \frac{\left(\frac{M_1}{\rho_{CEL2}} + \frac{M_2 - M_1}{\rho_{CHITOSAN}} \right)}{V_2} \quad (3.9)$$

Donde $\rho_{CEL2} = 2.68\text{g/cm}^3$ es la densidad calculada del vidrio bioactivo CEL2 y $\rho_{QUIT} = 0.15\text{g/cm}^3$, M_1 y M_2 son las masas de los andamios y V_1 y V_2 los respectivos volúmenes.

3.12.3 Pruebas de compresión

Para la evaluación mecánica fue necesario maquinar cilindros con dimensiones: $d = 1\text{ cm}$; $l = 2\text{ cm}$. Las pruebas de compresión fueron realizadas a una serie de 7 muestras elegidas aleatoriamente, en una máquina universal de ensayos mecánicos *Zwick/Roell Z100* con una celda de carga de 5 KN y una velocidad de avance de 2.5 mm/min.

3.13 Pruebas de bioactividad *in vitro*

Los andamios con microesferas fueron inmersos en solución SBF para dar seguimiento a la formación de hidroxiapatita superficial a diferentes tiempos, 1, 3, 7, 14 y 21 días, siguiendo el procedimiento descrito en la Sección 3.5. Para cada tiempo se dispuso de 6 muestras por lote con el objetivo de limitar la dispersión de los resultados al hacer la caracterización. Las muestras fueron esterilizadas para evitar o disminuir la presencia de bacterias que pudieran afectar las condiciones del estudio.

3.13.1 Control de pH

El control de pH de la solución de SBF es primordial para asegurarse de que no haya cambios bruscos durante los ensayos. El pH tiene un efecto muy pronunciado sobre la solubilidad de los vidrios bioactivos, porque la concentración de iones de SBF está sobresaturada. Se realizaron mediciones cada vez que se extraía una muestra de la solución SBF para cada tiempo de inmersión, mediante un medidor de pH *Fisher Scientific AB15*.

3.13.2 Pruebas mecánicas después de inmersión en SBF

Después de los ensayos de inmersión en SBF de los andamios con microesferas, se realizaron pruebas mecánicas de resistencia a la compresión en húmedo, para determinar el efecto del contacto con fluido en la resistencia mecánica de los mismos. En la Figura 3.14 se puede observar un andamio inmerso en SBF después de 7 días.

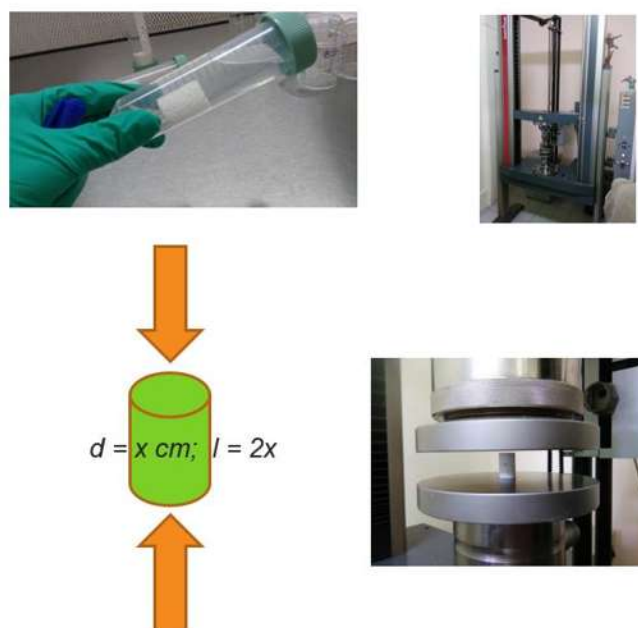


Figura 3. 13 Andamio de biovidrio CEL2/microesferas inmerso en solución SBF después de 7 días, listo para someterse a prueba de resistencia a la compresión.

3.13.3 Caracterizaciones complementarias

Espectrofotometría infrarroja y Difracción de rayos X fueron llevadas a cabo para determinar los grupos funcionales y las fases presentes en los andamios con microesferas después de inmersión en SBF.

3.14 Cinética de liberación de fármaco de las microesferas incorporadas a los andamios tridimensionales

Para realizar el estudio de la cinética de liberación de acetaminofén de las microesferas adheridas a los andamios de CEL2, se suspendieron 7 muestras en viales con 1.5 mL de PBS (pH 7.4) cada una mediante agitación vigorosa en un *Thermo-Shaker TS-100C Biosan* a 200 rpm, enseguida se tomaron 10 μ L de la solución a diferentes tiempos, se centrifugaron en una microcentrífuga *Prism C2500 Labnet* de laboratorio durante 1 min a 10,000 rpm, se tomaron 2 μ L de esta solución y se colocaron en un espectrofotómetro *NanoDrop 2000 ThermoFisher Scientific* para medir su absorbancia a la longitud de onda característica del acetaminofén (293 nm). Se hicieron mediciones durante 10 días para obtener datos de cinética de liberación.

La ecuación propuesta por Ritger y Peppas [48] fue considerada para analizar la cinética de liberación del acetaminofén de las muestras de acuerdo a la ecuación:

$$Q_t = kt^n \quad (3.10)$$

donde Q_t es el porcentaje acumulativo de droga liberada, k es la constante de cinética, n es el exponente de liberación que define el mecanismo de liberación y t es el tiempo de liberación.

En la Figura 3.15 se puede observar el procedimiento para medir la cinética de liberación.



Figura 3. 14 Procedimiento para medir la cinética de liberación del fármaco en los andamios cargados con microesferas.

3.15 Pruebas celulares

3.15.1 Cultivo celular

Para las pruebas con cultivos celulares se utilizó la línea celular de fibroblastos de ratón NIH-3T3 (ATCC-CRL-1658), se cultivaron en medio DMEM/F12 Ham (SIGMA). Se mantuvieron en condiciones estándar de cultivo, empleando medio de cultivo suplementado con penicilina 100 U/mL y estreptomycinina 100 µg/mL (GIBCO); Amikacina 10µg/m y 10 % de suero fetal bovino al 10 % (GIBCO); a 37 °C y atmósfera húmeda de 5% de CO₂ hasta alcanzar una confluencia del 80%. El día del experimento se retiró el medio de cultivo y se lavó la monocapa celular con PBS, se adicionó 0.5 mL de suspensión de Tripsina al 0.025%, se incubó durante 3 a 5 min, se revisó en el microscopio óptico que las células estuvieran despegadas del plato. Se contaron las células en cámara de Neubauer, para utilizar 20,000 células por pocillo.

Por otro lado, los andamios fueron esterilizados bajo luz UV durante 15 min cada cara. Tanto los andamios como las células fueron colocados en platos de 48 pozos, 20,000 células/pozo en 2 mL de medio (Figura 3.16). Los grupos experimentales consistieron en: células sin andamios (Control); células con andamios sin MEs (E) y células con andamios y MEs (E/MEs). Después de 24, 48, 72, 96 y 120 h de incubación se llevó a cabo el ensayo de viabilidad MTT.

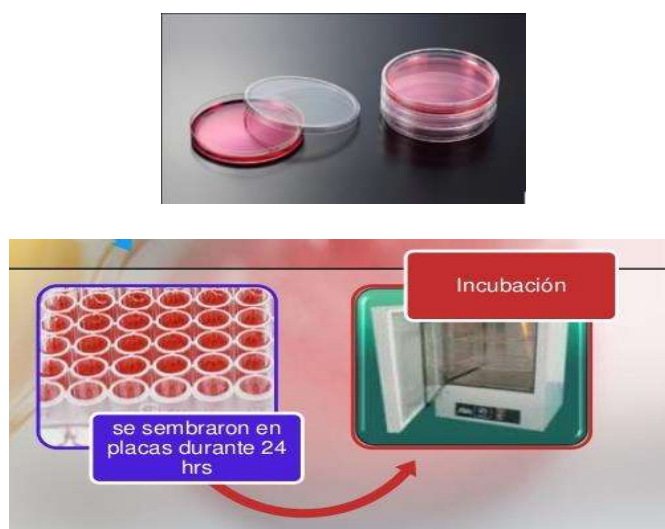


Figura 3. 15 Método de sembrado de células e incubación.

3.15.2 Ensayo de viabilidad celular

El ensayo de viabilidad, toxicidad y proliferación celular se llevó a cabo mediante el ensayo MTT como se muestra en la Figura 3.17. Este ensayo se basa en la reducción metabólica del Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT) la cual se lleva a cabo por la enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa que metaboliza las sales de tetrazolium de color amarillo a un compuesto de color azul, el formazán. Por tanto, la viabilidad celular se determina a través de la funcionabilidad mitocondrial por la acumulación de formazán, es decir, la cantidad de células vivas es proporcional a la cantidad de formazán producido. Este método ha sido muy utilizado para medir supervivencia y proliferación celular.

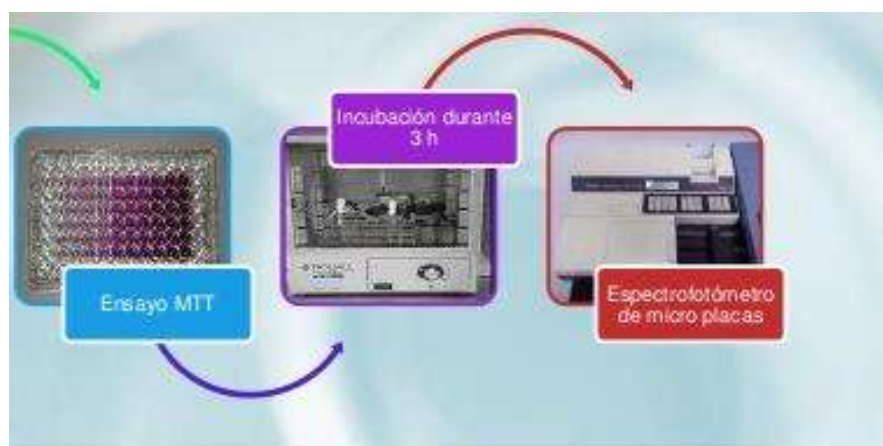


Figura 3. 16 Diagrama de proceso del ensayo MTT para medir la viabilidad celular.

El ensayo consistió en adicionar 20 μl de MTT [5 mg/ml] a cada pozo, seguido de incubación a 37°C durante 4 h. Al finalizar la incubación se retiró el medio de cultivo y se adicionaron 100 μL de DMSO (dimetilsulfóxido) en cada pozo para solubilizar los cristales de formazán. Se tomó una alícuota de 80 μL para leer la densidad óptica (D.O.) de cada muestra a 595 nm en el microlector de placas de *ELISA Bio-Rad*.

Los resultados fueron graficados a partir del valor de la D.O. de los grupos experimentales, donde $n = 9$. La Ecuación 3.9 muestra cómo se calcula la viabilidad celular a partir de la densidad óptica.

$$\% \text{ de Viabilidad} = \frac{\text{D.O. de la muestra}}{\text{D.O. del control}} \times 100 \quad (3.11)$$

Los resultados se interpretan a partir del valor de densidad óptica obtenida D.O. (595 nm). La D.O. del control es la densidad óptica de las células sin tratamiento.

CAPITULO 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En este capítulo se describen y analizan los resultados obtenidos de la caracterización de los andamios y las microesferas de pectina y quitosano, mediante las técnicas empleadas que fueron difracción de rayos X (DRX), microscopia electrónica de barrido (MEB), espectrometría infrarroja (FT-IR), calorimetría diferencial de barrido (DSC) y espectrometría UV-vis. Se evaluaros propiedades de las microesferas como son rendimiento del proceso, eficiencia de encapsulación, cinética de liberación del fármaco, distribución de tamaño de microesfera y adhesión a las paredes del andamio. En los andamios se evaluó el porcentaje de porosidad, la resistencia mecánica a la compresión y un estudio detallado de su capacidad bioactiva *in vitro* mediante inmersión en solución SBF, así como el resultado de pruebas celulares en cultivo de fibroblastos.

4.1 Fabricación y caracterización del vidrio bioactivo CEL2

4.1.1 Tamaño y distribución de tamaño de partícula

En la Figura 4.1 se muestra la distribución de tamaño de partícula (% vol. acumulativo) obtenido a partir del vidrio CEL2 en polvo, las partículas resultantes presentan tamaño menor a 20 μm con la distribución de tamaño de partícula mostrada en la imagen, lo cual favorece la investigación debido a que por el tipo de procedimiento empleado es mejor contar con polvos finos para poder llevar a cabo la compactación del presinterizado para la fabricación de andamios.

La distribución de tamaño del polvo presenta un comportamiento trimodal. Este comportamiento puede estar relacionado con el tipo de procedimiento utilizado para obtener el polvo, ya que el vidrio fue pulverizado en diferentes lotes y posteriormente todo junto para reducir el tamaño. Como las condiciones de pulverizado no eran las mismas para cada lote, cantidad de polvo en la cámara para pulverizar y tamaño de partícula a reducir, esto pudo originar la distribución de partícula multimodal

% >	10	25	50	75	90
μm	12.11	8.411	4.399	1.790	0.834

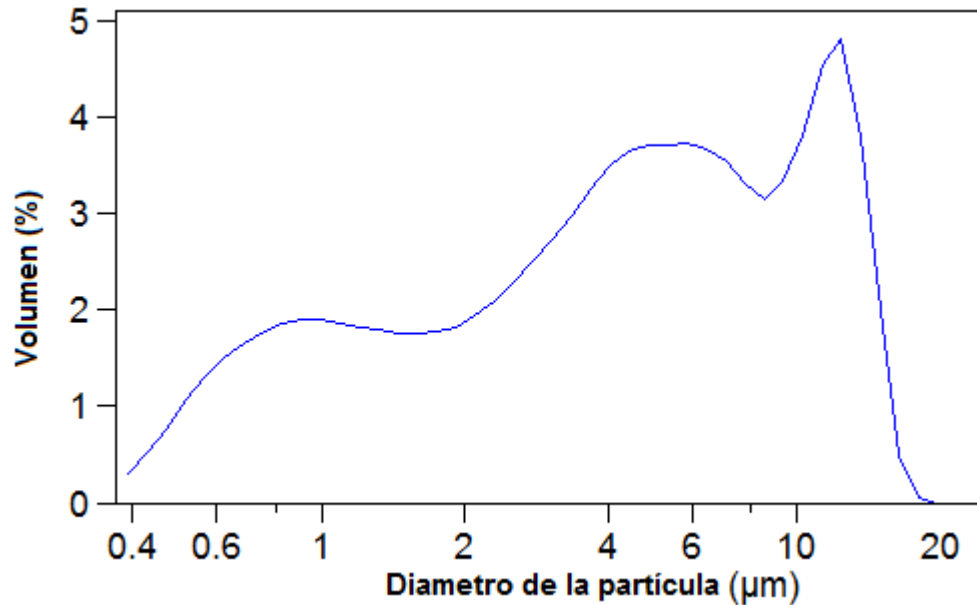


Figura 4. 1. Distribución de tamaño de partícula del biovidrio CEL2.

4.1.2 Resultados de DRX

De acuerdo al difractograma resultante mostrado en la Figura 4.2 se puede observar que el vidrio es amorfo ya que presenta una protuberancia en el rango de $25-35^\circ$, 2θ . Para los materiales amorfos este tipo de difractogramas son muy comunes y resultan debido al ordenamiento a corto alcance de los materiales tratados mediante esta técnica. Adicionalmente se puede observar la ausencia de algún pico bien definido lo cual nos da un indicativo de que no hubo la formación de fases secundarias debido a un agente externo o de algún contaminante detectable dentro de los límites de detección del equipo.

El comportamiento observado en el difractograma es muy similar al reportado en la literatura [40], en donde todos concuerdan con la misma protuberancia en un rango 2θ sin la presencia de ninguna fase extra.

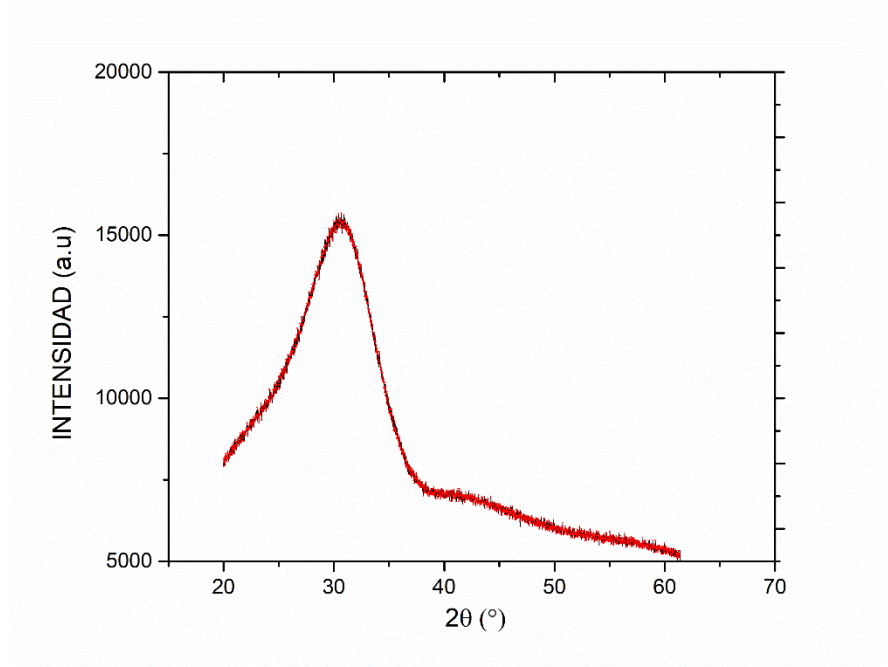


Figura 4. 2 Espectro de difracción de rayos X del vidrio amorfo

4.1.3 Análisis térmico diferencial

La gráfica del análisis térmico diferencial en la Figura. 4.3 muestra una temperatura de transición vítrea ($T_g = 538^\circ\text{C}$), dos temperaturas de cristalización ($T_{c1} = 613^\circ\text{C}$, $T_{c2} = 800^\circ\text{C}$) y una de ablandamiento entre 1000°C y 1100°C , lo cual solamente difiere un poco con investigaciones previas de C. Vitale-Bravarone et al quien ha trabajado con este vidrio [38-40,], estas dos temperaturas de cristalización pertenecen a las dos fases típicas del biovidrio CEL2; combeita y arquemanita pero debido a la complejidad de ambas es imposible una correcta identificación, solamente se puede identificar que las dos son silicatos de calcio y magnesio con diferente composición [38]. La diferencia de temperaturas obtenidas y las reportadas en la literatura se puede atribuir a la velocidad de calentamiento usada en el tratamiento térmico, la cual puede modificar un poco las temperaturas ya sea hacia arriba o hacia debajo de las referenciadas.

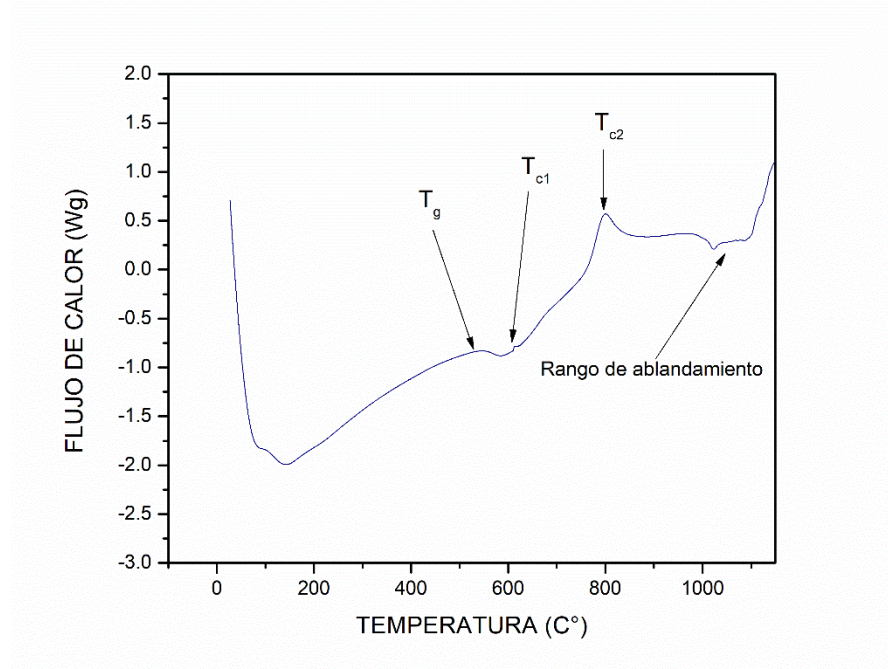


Figura 4. 3 Análisis térmico diferencial del vidrio CEL2.

4.2 Resultados de los primeros andamios sinterizados

4.2.1 Porosidad de los andamios sinterizados

La porosidad de los andamios fue calculada a partir de las densidades específica (masa y dimensiones de los cilindros) y teórica del biovidrio; en la Tabla 4.1 se pueden observar los resultados para las diferentes formulaciones empleadas de biovidrio-ligante-espumante, los cuales muestran que las espumas con menos cantidad de vidrio son más porosas, pero probablemente menos resistentes y uniformes en su morfología.

Tabla 4. 1 Porosidad obtenida de los andamios de biovidrio para diferentes formulaciones biovidrio-ligante-espumante.

Lote #	No. de andamios	Atmósfera	Biovidrio % en peso	TSH % en peso	% Porosidad
1	3	AIRE	A-60	2%	57.37

	3		B-55		60.22
	3		C-50		70.26
	3		D-58		53.94
2	3		A-60	3%	72.23
	3		B-55		72.43
	3		C-50		73.12

En la Figura 4.4 se presentan imágenes de los andamios para las diferentes formulaciones del lote 1; se observa claramente mediante micrografías que las que contienen 50 y 55% de biovidrio tienden a ser más porosas y en la Figura 4.5 se muestra con mayor claridad la morfología del andamio con composición 55% CEL2.

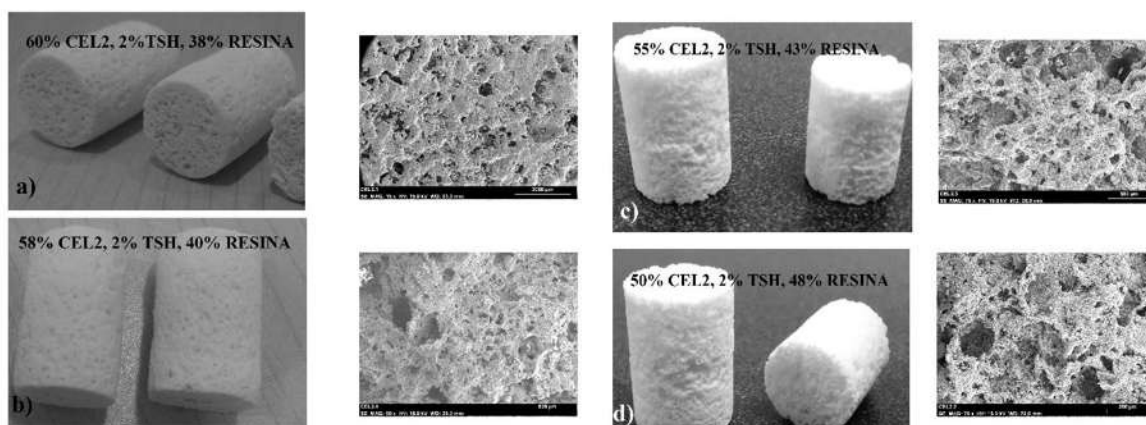


Figura 4. 4 Apariencia física de las primeras 4 formulaciones (Lote 1).

En el lote 2 solo se emplearon tres composiciones de biovidrio, 60, 50 y 55%, pero se cambió el porcentaje de espumante (TSH) a 3%, el resultado fue un aumento de la porosidad en los tres casos, eligiendo las de 55%, ya que mostraron mejor porosidad uniforme

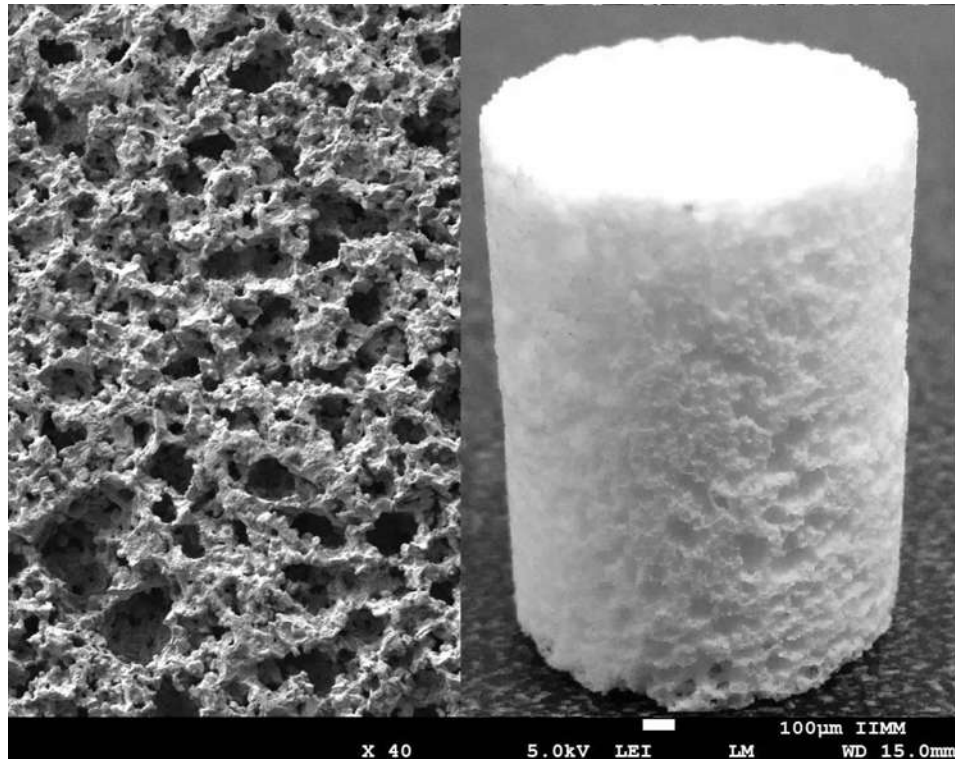


Figura 4. 5 Apariencia física y micrografía de las espumas de 55% CEL2 (Lote 2).

4.2.2 Resultados por microscopia electrónica de barrido

En la Fig. 4.6 se muestran las micrografías de los andamios con composición 55% biovidrio, 3% espumante, 42% ligante obtenidos después haber sido sinterizados a 950°C. Se puede observar una estructura porosa e interconectada, lo cual es conveniente para el proceso de bioactividad en el andamio porque los fluidos corporales necesitan vías de transporte para llevar a cabo las funciones biológicas. Se observa un amplio rango de tamaño de poros que comprende desde 10µm hasta 500µm. Se tomaron imágenes a diferentes magnificaciones con la finalidad de observar la estructura a detalle.

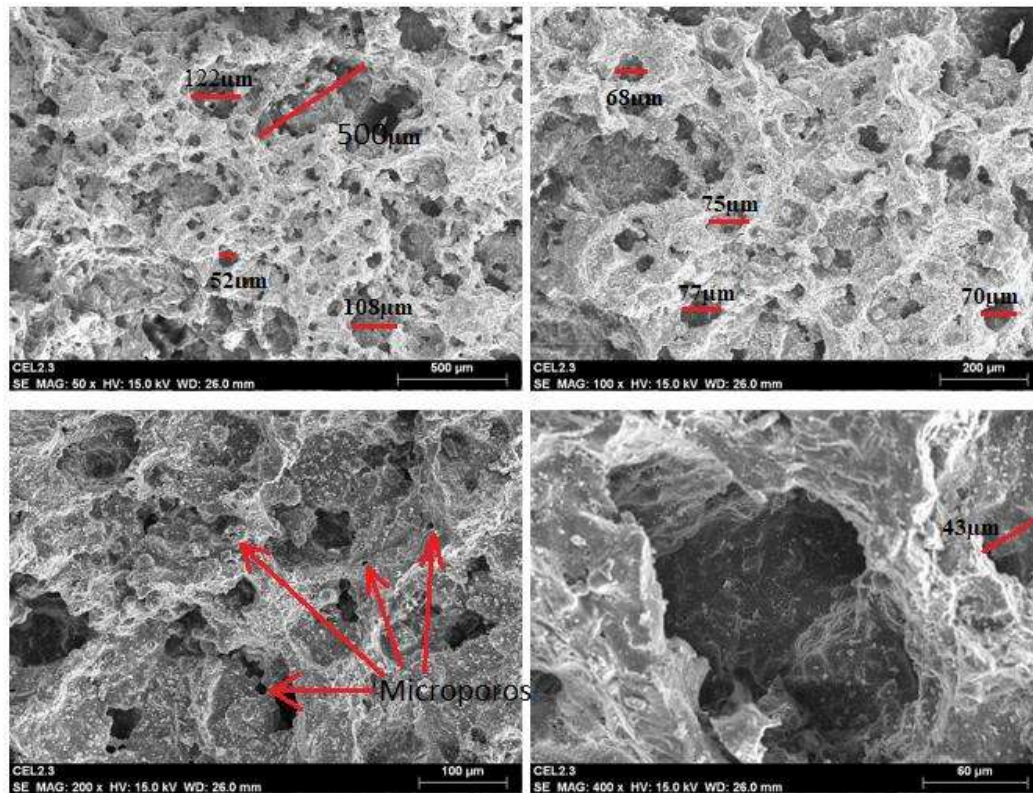


Figura 4. 6 Micrografías de los andamios con composición 55% CEL2, 3% TSH, 42% resina a diferentes magnificaciones.

4.2.3 Resultados de difracción de rayos X.

La Figura 4.7 muestra los difractogramas de rayos X de los andamios sinterizados a 950°C por 1 h. La técnica de DRX reveló la transformación de la fase amorfa en dos fases cristalinas después de que el andamio de biovidrio fue sinterizado, de acuerdo con la base de datos estas fases son Combaita como fase principal ($\text{Na}_4\text{C}_a4(\text{Si}_6\text{O}_{18})$ COD9007721) y Arkemanita como fase secundaria ($\text{Ca}_2\text{Mg}(\text{Si}_2\text{O}_7)$ COD9008448), las cuales coinciden con lo reportado por otros investigadores, y no se observa la presencia de fases adicionales [38-40].

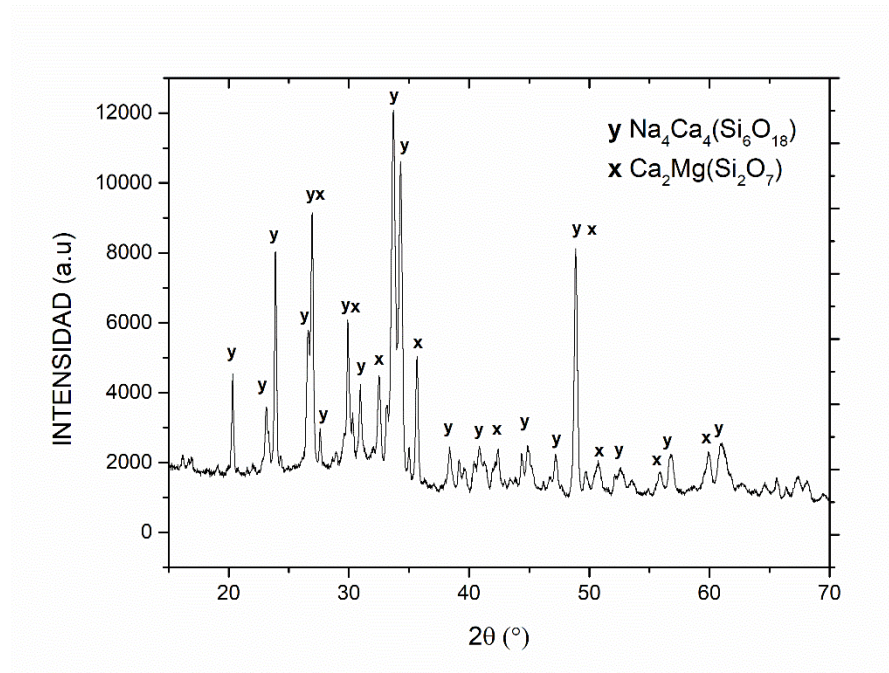


Figura 4. 7 Espectro de difracción de rayos X del andamio de biovidrio CEL2

4.2.4 Superficie específica de los andamios de vidrio bioactivo CEL2

Esta prueba se realizó en un analizador de área superficial HORIBA- SA 9600 series, se usaron 1.3394 g de polvos de espuma de biovidrio 45S5.

con la finalidad de determinar el área superficial de las muestras y poder hacer un cálculo de la solución SBF necesaria para hacer la inmersión de cada pastilla.

Se obtuvo una superficie específica de $162.83 \text{ mm}^2/\text{gr}$

4.2.5 Pruebas de compresión

La Figura. 4.8 muestra una curva típica de esfuerzo-deformación de un material poroso. En la cual se puede observar que debido a la naturaleza y fragilidad del material ocurren una serie de fracturas consecutivas, donde el pico más alto representa el esfuerzo máximo que puede resistir el material a determinado porcentaje de deformación [142]. En la figura 4.9 se puede observar la diferencia de resistencia a la compresión en MPa entre tres composiciones diferentes de andamios, los andamios con 55% de biovidrio presentaron una resistencia a la compresión promedio de $4.06 \pm$

0.56 MPa, los de 50% biovidrio: $2.85 \text{ MPa} \pm 0.345$ y los de 60% biovidrio: $8.24 \text{ MPa} \pm 0.71$, todos ellos con una porosidad $>70\%$, lo cual es favorable para la presente investigación porque se logra un equilibrio entre los dos parámetros. Cabe señalar que la resistencia a la compresión requerida debe estar comprendida en el rango del hueso esponjoso que tiene un valor de 2 a 12 MPa. [142] cabe señalar que los andamios con mayor resistencia mecánica fueron los de 60% biovidrio, pero en porosidad, estos fueron más densos, es por esto que se eligió la composición menor a esta.

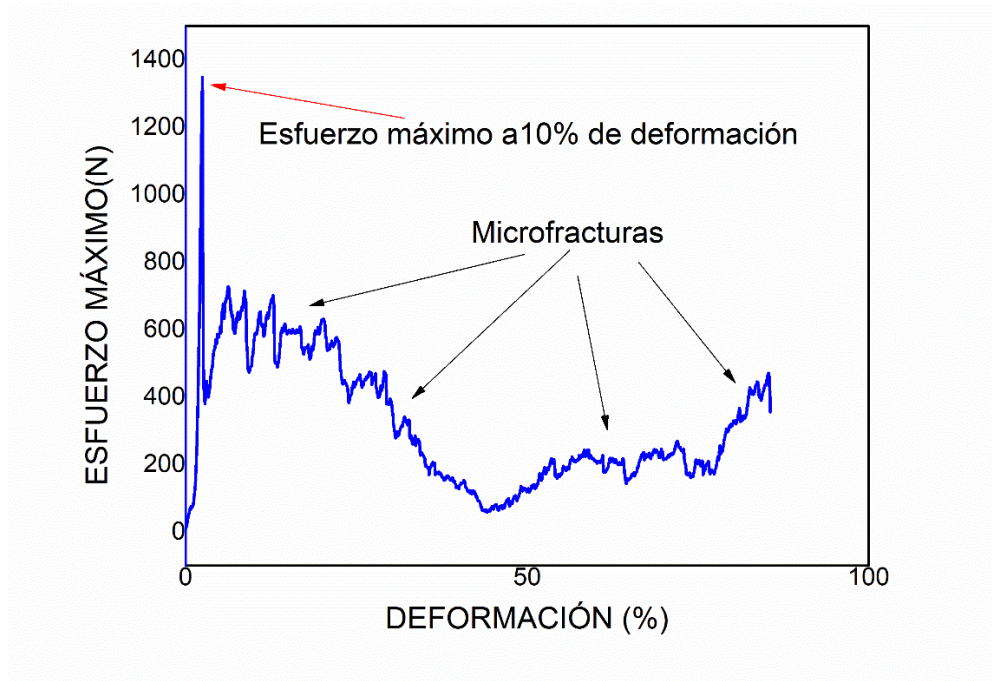


Figura 4. 8 Curva esfuerzo-deformación de un andamio poroso.

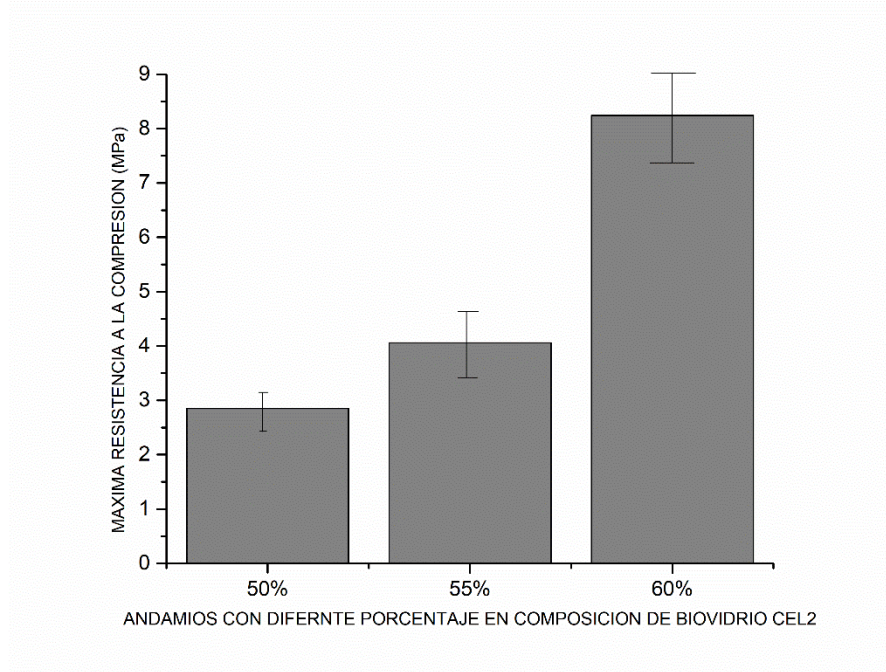


Figura 4. 9 resistencia a la compresión obtenida para tres composiciones de andamios de biovidrio CEL2.

4.3 Bioactividad in vitro en SBF

La Figura 4.10 se puede observar el crecimiento de la capa de hidroxiapatita en la superficie del andamio después de haber estado en contacto con SBF durante 3 días, mediante la aparición de los picos característicos de ésta que se encuentran en los ángulos $2\theta = 26^\circ$ y $2\theta = 32-33^\circ$ de acuerdo con la tarjeta PDF 01-082-1943, También se puede observar que las fases cristalinas características del biovidrio CEL2, combeita ($\text{Na}_4\text{Ca}_4(\text{Si}_6\text{O}_{18})$) y akermanita ($\text{Ca}_2\text{Mg}(\text{Si}_2\text{O}_7)$), se mantienen presentes al tercer día pero en menor cantidad, lo cual indica que con el paso del tiempo la muestra va perdiendo su cristalinidad.

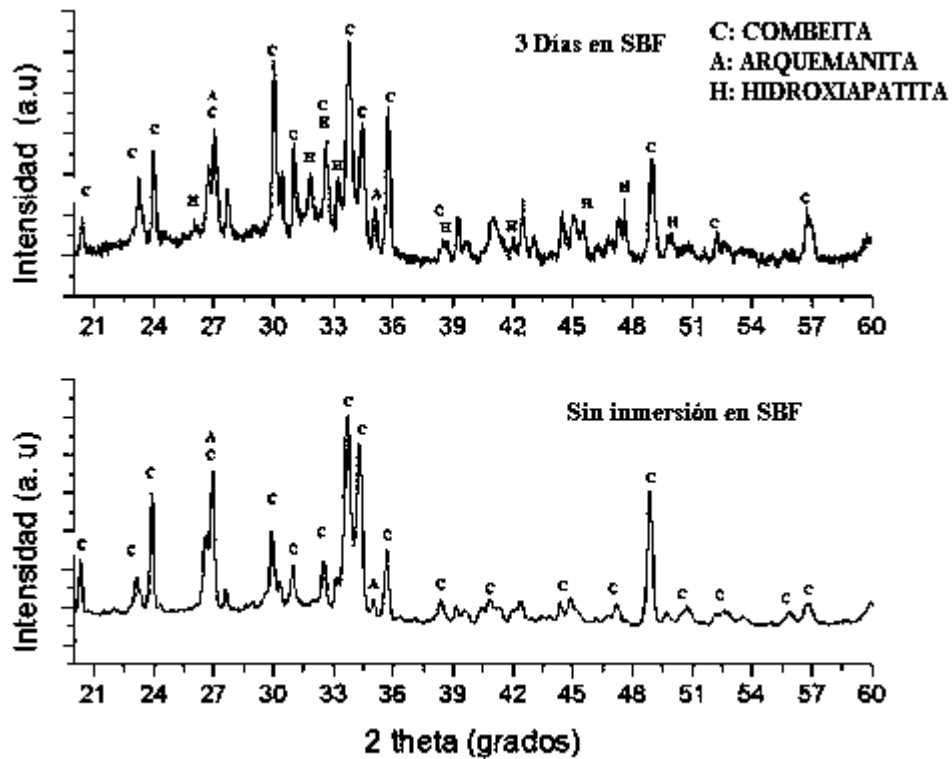


Figura 4. 10 Espectro de Rayos X de una espuma de biovidrio CEL2 sin inmersión en SBF y una con 3 días de inmersión.

La Figura 4.11 presenta imágenes por MEB de la superficie de los andamios sinterizados a 950 °C después de la inmersión en SBF a diferentes tiempos. Todas las imágenes se tomaron a 4000X, con excepción de la última que está tomada a 10,000X y es una ampliación de la del día 21. Se puede observar claramente la presencia de la fase de hidroxiapatita sobre la superficie de los andamios desde el primer día de inmersión presentando una morfología tipo coliflor lo que indica que el material es bioactivo y puede formar una unión con el tejido óseo circundante.

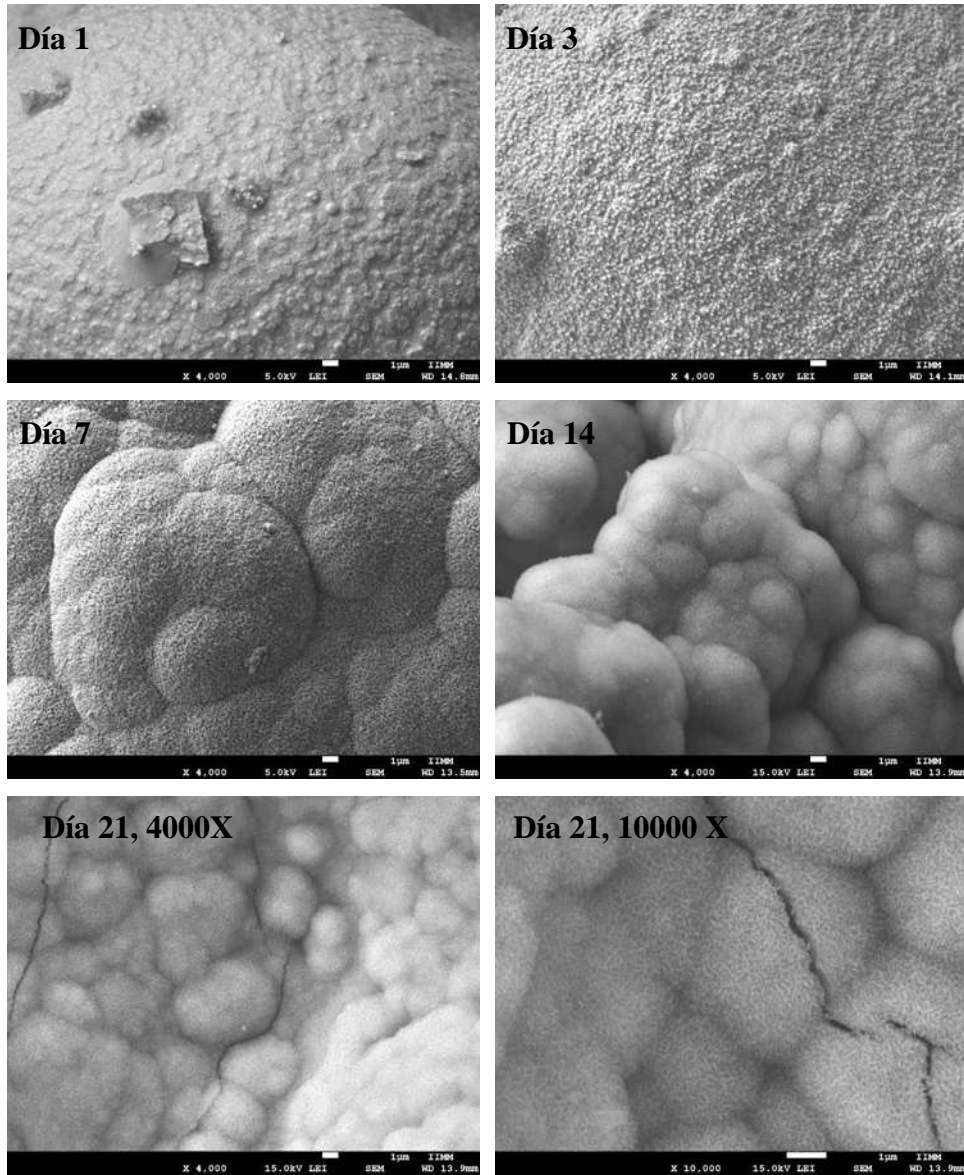


Figura 4. 11 Micrografías por MEB de andamios sumergidos en SBF durante 1, 3, 7, 14 y 21 días, respectivamente.

4.4 Resultados de la fabricación de microesferas de biopolímeros

4.4.1 Microesferas de pectina

4.4.1.1 Porcentaje de rendimiento

El porcentaje de rendimiento fue de $47\% \pm 0.105$ en promedio con respecto a 6 lotes de microesferas obtenidos, debido principalmente a las pérdidas de polímero durante el proceso de evaporación y al material residual en las paredes de los vasos de precipitados.

4.4.1.2 Cálculo de la pérdida de humedad

Se calculó una pérdida de humedad de aproximadamente de $0.932\% \pm 0.0045$ después de 24 h en los 6 lotes, lo cual quiere decir que la presencia de agua en las muestras después de su preparación es despreciable. Este cálculo se lleva a cabo para determinar si hay presencia de agua en las muestras, la cual pueda afectar de manera negativa los estudios posteriores.

4.5.1.3 Determinación del tamaño de microesfera y distribución de tamaño de partícula

De acuerdo a las mediciones realizadas en 190 microesferas de pectina se encontró que su tamaño está en un promedio de $39.5 \mu\text{m} \pm 9.56$, mostrando una distribución de tamaño como se observa en la Figura 4. 12 comparando estos valores con estudios reportados sobre la fabricación de microesferas, el tamaño está dentro del rango promedio o menor como se muestra en la Tabla 4.2, lo cual es un tamaño factible debido a que el objetivo es incorporar las microesferas a matrices tridimensionales con una distribución de poros de 10 a $500 \mu\text{m}$.

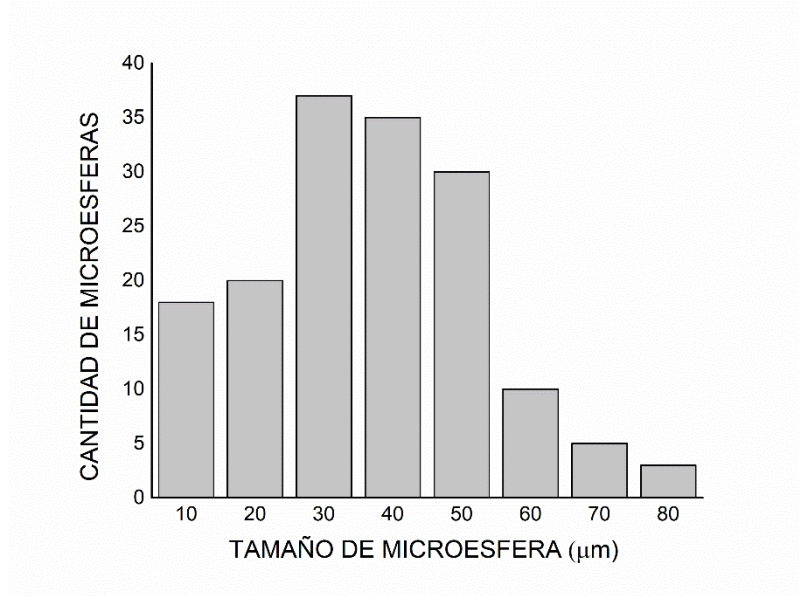


Figura 4. 12 Distribución de tamaño de microesferas de pectina.

Tabla 4. 2 Características de microesferas reportadas en la literatura.

Autor	Fecha	Método empleado	Polímero empleado	Tamaño (µm)	Morfología
Fuentes y col. [107]	2014	Evaporación del solvente SE	PLGA	20.3 ± 11.5	Esférico uniforme
Sriamornsak y col. [108]	2012	Evaporación del solvente SE	Pectina	50 - 95	Esférico uniforme
Banerjee y col. [109]	2012	Evaporación del solvente SE	Pectina	34 ± 2.3	No esférica
Baracat y col. [110]	2012	Coacervación	Pectina/Caseína	3 - 5	No esférica
Paharia y col. [111]	2007	Evaporación del solvente SE	Pectina	25 - 30	Esférico uniforme
Qutachi y col. [146]	2014	Evaporación del solvente DE	PLGA	193 ± 23	Esférico uniforme
Souza y col. [46]	2012	Gelación	Pectina	180 - 300	Esférico uniforme

Raval y col. [143]	2011	Evaporación del solvente DE	PLC	55 - 81	Esférico uniforme
Ige y col. [144]	2015	Secado por aspersión	Mucílago	1- 4	Poco esféricas
Baimark y col. [143]	2014	Evaporación del solvente SE	Alginato de sodio	50 - 230	Esférico uniforme
Qutachi y col. [145]	2014	Evaporación del solvente DE	PLGA	82 ± 24	Esférico uniforme
Qi y col. [147]	2014	Evaporación del solvente SE	PLGA	20.6	Esférico uniforme
		Extracción del solvente S E		22.38	
		Coacervación		21.5	
Vaidya y col. [148]	2012	Evaporación del solvente SE	Pectina	14 - 16	Esférico uniforme
Ghanbar y col. [149]	2013	Disparo electro hidrodinámico	PLGA y PCL	150 - 300	Esférico uniforme

Nota: SE emulsión simple; DE emulsión doble; PLGA ácido poli(láctico-co-glicólico); PLC policaprolactona.

4.5.1.4 Estudio morfológico

En la Figura 4.13 se presentan micrografías tomadas por MEB a diferentes magnificaciones de las microesferas de pectina. De acuerdo a las imágenes mostradas, se obtuvieron partículas con morfología esférica y de superficie rugosa. Esto podría ser favorecedor debido a que la morfología influye en el mecanismo de liberación del fármaco encapsulado, una morfología esférica promueve una liberación uniforme

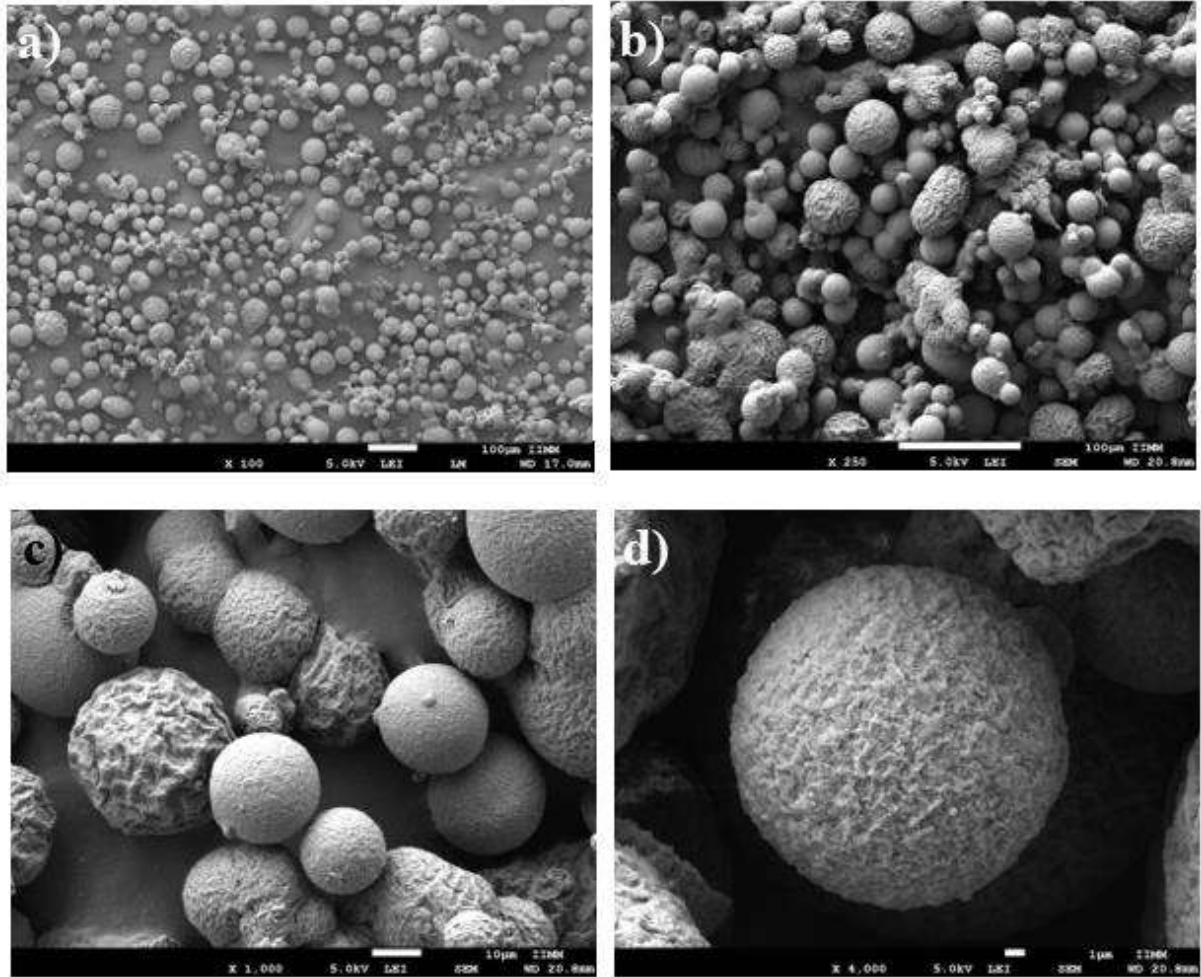


Figura 4. 13 Micrografías por MEB de microsferas de pectina a: (a) 100X, (b) 250X, (c) 1000X, y (d) 4000X.

El método de emulsión/evaporación de solvente es un método muy eficaz respecto a generación de morfología esférica comparado con otros métodos de obtención de microsferas [138]. Algunos autores como Banerjee y col. [109] empleando el método de emulsión/evaporación de solvente y Baracat y col. [110] con el método de secado por aspersión obtuvieron partículas poco esféricas y con superficie no uniforme. En la Figura 4.14 se pueden observar los polvos de pectina antes de ser procesados a microsferas y la morfología de éstas después del proceso. En la Figura 14.14(e) se muestra una microsfera de pectina donde se aprecia su tamaño de aprox. $44.5 \mu\text{m}$ y en la Figura

14.13(f) esta microsfera fue expuesta al rayo incidente de electrones del microscopio para corroborar si se podía partir y observar su interior, pero esto no fue posible.

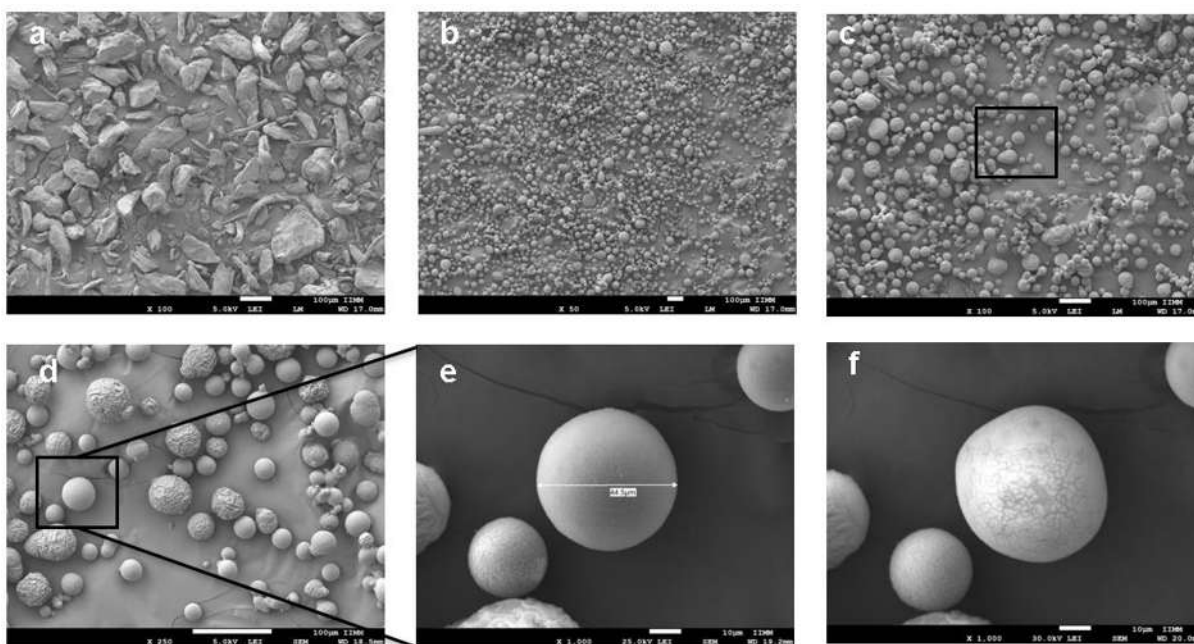


Figura 4. 14 Micrografías de (a) polvos de pectina a 100X, (b, c, d, e) microsferas de pectina a diferentes magnificaciones, 50, 100, 250 y 1000X.

4.5.1.5 Calorimetría diferencial de barrido (DSC)

En la Figura 4.15 se muestran los termogramas de la pectina pura y las microsferas de pectina obtenidos mediante el análisis térmico en un calorímetro diferencial de barrido. Se puede observar en ambas curvas, muy similares entre sí, un pico endotérmico en el rango de 60 a 130°C, el cual está asociado a la remoción de humedad del polímero, mostrando la temperatura de fusión del polímero que es alrededor de 101 °C seguido por un pico exotérmico alrededor de 250°C debido a la descomposición de las cadenas poliméricas, finalmente llegando a la zona de descomposición. En la Tabla 4.3 se resumen las temperaturas características de fusión y descomposición, tanto para la pectina pura como para las MEs de pectina, así como los cambios de entalpía asociados a cada transformación que se calcularon de las áreas bajo las curvas.

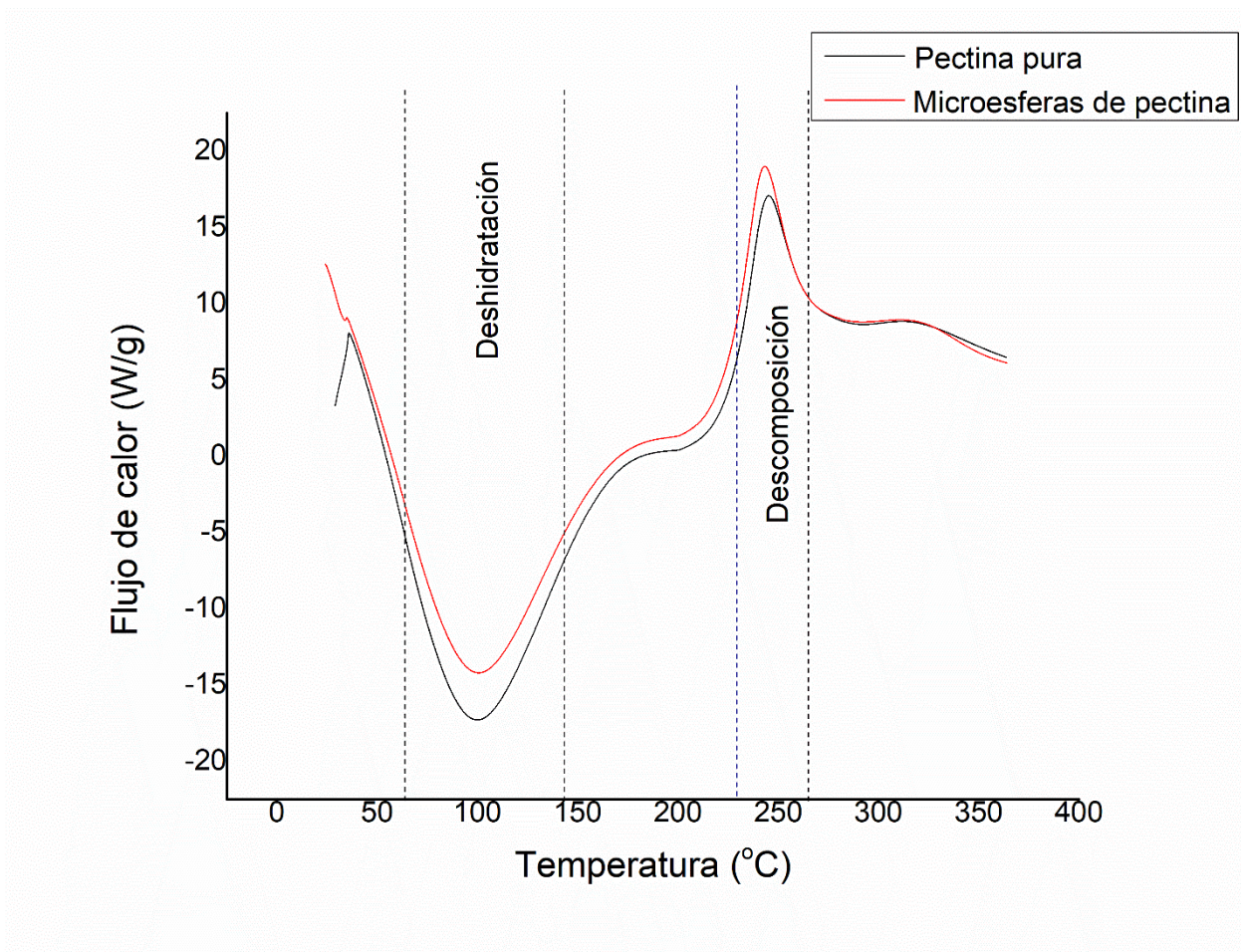


Figura 4. 15 Termogramas de DSC de pectina pura y microesferas de pectina.

Tabla 4. 3 Comparación de temperaturas características en la pectina pura y las microesferas de pectina.

	T_m (°C)	ΔH_m (J/g)	T_d (°C)	ΔH_d (J/g)
Pectina pura	101.15	215.5	238.14	132.5
MEs Pectina	98.58	176	238.25	108.3

4.5.1.6 Difracción de rayos X (XRD)

La técnica de DRX reveló que la pectina, así como las microesferas de pectina son amorfas, como se observa en los difractogramas de la Figura 4.16; se puede observar en ambas muestras una protuberancia en el ángulo 2θ de 25-28°, lo cual es característico de los materiales amorfos. Esto

representa que las microesferas a pesar de haber sido tratadas a temperaturas relativamente altas no sufrieron cristalización.

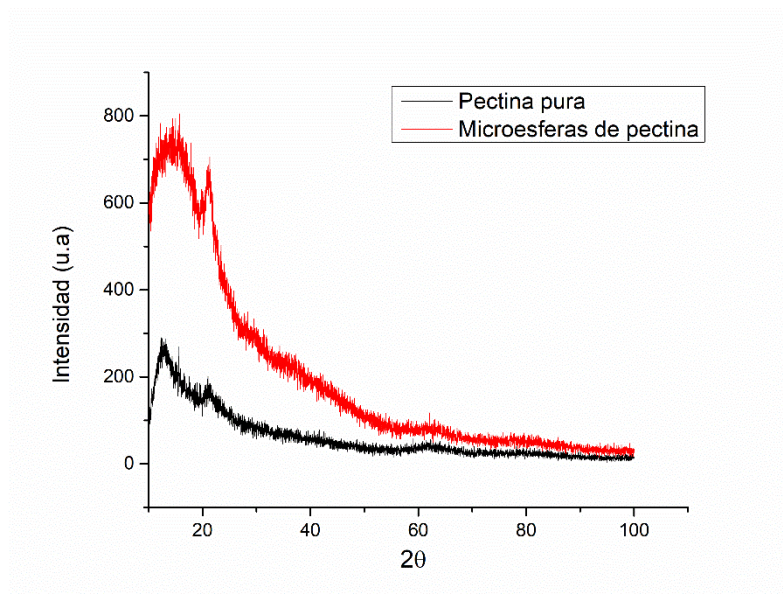


Figura 4. 16 Espectro de difracción de rayos X de la pectina pura y de las microesferas de pectina.

4.5.1.7 Espectrofotometría infrarroja

Una muestra de pectina pura obtenida de la empresa Sigma-Aldrich y una muestra de microesferas de pectina sintetizadas en el laboratorio fueron analizadas por FT-IR para corroborar los grupos funcionales. Los grupos funcionales representativos de la pectina están presentes en las dos muestras y se pueden observar en la Figura 4.17. Los espectros presentan picos de los grupos funcionales hidroxilo (-OH), carbonilo (C = O), metilo (-CH₃) y metileno (-CH₂). Las bandas alrededor de 1650 y 1750 cm⁻¹ son indicadoras de grupos carboxilos libres y esterificados, respectivamente, los cuales son útiles para la identificación de pectinas [148].

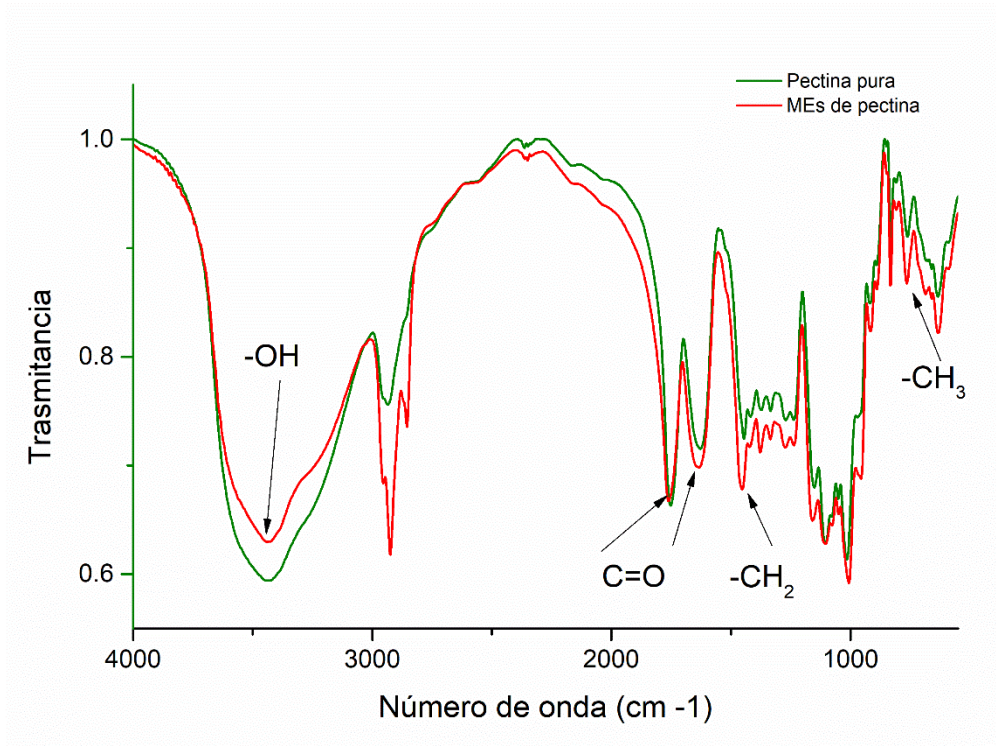


Figura 4. 17 Espectro de infrarrojo de la pectina pura y las MEs de pectina.

4.5.2 Microesferas de quitosano sin y con fármaco

4.5.2.1 Porcentaje de rendimiento de la MEs

El porcentaje de rendimiento de las microesferas de quitosano sin fármaco fue de $92\% \pm 0.067$, con respecto a 7 lotes obtenidos y el rendimiento en las microesferas con fármaco fue de $89\% \pm 0.087$ lo cual indica que si se toma en cuenta solamente la pérdida de polímero sin tomar en cuenta los demás componentes para llevar a cabo la emulsión, este último rendimiento es alto, comparado con otros autores que han trabajado con este mismo polímero usando secado por aspersion y presentan rendimientos de 54% hasta 65% [100,102,103,105].

4.5.2.2 Cálculo de la pérdida de humedad

Este estudio se llevó a cabo solamente en las microesferas de quitosano cargadas con acetaminofén, por su importancia para cumplir con el objetivo de esta investigación. Se observó una pérdida de humedad de aproximadamente $0.89\% \pm 0.0028$ después de 24 h en los 7 lotes, lo cual quiere decir que la presencia de agua en las muestras es mínima y no interfiere en los resultados posteriores de caracterización.

4.5.2.3 Determinación de morfología y tamaño

La distribución de tamaño de esfera se muestra en las Figura 4.18, en la cual se puede observar que las MEs en general presentan un rango de tamaño de partícula entre 0.1 a 1.2 μm y un tamaño de partícula promedio de $0.55 \mu\text{m} \pm 0.24 \mu\text{m}$. Este método ha sido empleado en años recientes en la elaboración de MEs con fines de liberación de algún tipo de fármaco. Otros investigadores que han trabajado con quitosano han desarrollado partículas más grandes; como ejemplo está Nayak y col. [151] que reportan tamaños de 62 a 210 μm debido al método y la cantidad de glutaraldehído empleado. Los tamaños reportados en este trabajo se consideran mejores ya que evitarían cualquier tipo de obstrucción en venas y arterias dentro del cuerpo humano, además los andamios fabricados tienen una porosidad interconectada que va desde 10 hasta 500 μm y las microesferas caben perfectamente en los poros.

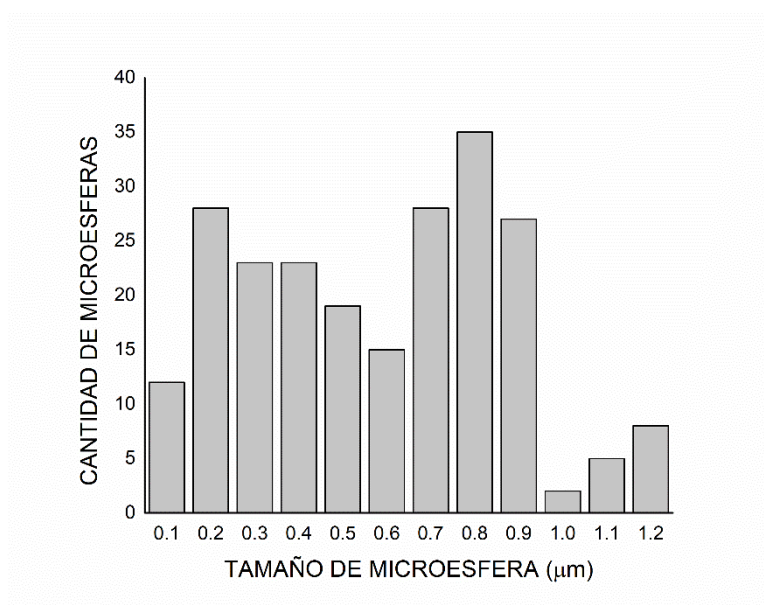


Figura 4. 18 Distribución de tamaño de partícula de las MEs de quitosano

Las características generales de algunas investigaciones previas acerca de MEs de quitosano con capacidad de encapsular y liberar algún tipo de fármaco se muestran en la Tabla 4.4.

Tabla 4. 4 Trabajos reportados en la literatura sobre MEs de quitosano.

Autor	Año	Método	Tamaño (µm)	Morfología	Rendimiento (%)	Eficiencia (%)	Encapsulación
Olivera y col. [99]	2014	ES	1-20	Esférica uniforme	-	-	Proteínas
Ventura y col. [100]	2011	Secado por aspersion	1-5	Esférica uniforme	60	96	Gentamicina
Olivera y col. [101]	2012	ES	1-20	Esférica porosa	-	-	ADN
Garud y col. [102]	2012	ES	352-450	Esférica rugosa	56.80	85	Metformina
Badhana y col. [103]	2012	Gelación	61-90	Irregular	63-84	43-82	Mesalamina
Song y col. [104]	2015	Secado por aspersion	1-5	Esférica rugosa	-	90	Ácido salicílico
Garcia y col. [105]	2014	Secado por aspersion y ES	3-10	Irregular	54	46.60	Ibuprofeno

Nota: SE emulsión simple; DE emulsión doble.

En la Figura 4.19 se pueden observar imágenes tomadas por MEB de microesferas de quitosano a diferentes magnificaciones sin carga alguna. De acuerdo a las imágenes mostradas, se obtuvieron partículas independientes de morfología esférica y tamaños pequeños debido a la cantidad de glutaraldehído empleado que fue de 10 mL cada 15 min durante la evaporación del solvente. En la Figura 4.20 se pueden observar las MEs de quitosano cargadas con fármaco a diferentes magnificaciones, para poder apreciar la morfología esférica. Las MEs se muestran de igual manera como partículas independientes con un poco de aglomeración que desaparece cuando las MEs se encuentran dispersas en alguna solución; la Figura 4.20(c), muestra una microesfera cargada con acetaminofén, la cual presenta una morfología sólida, relativamente lisa y completamente esférica.

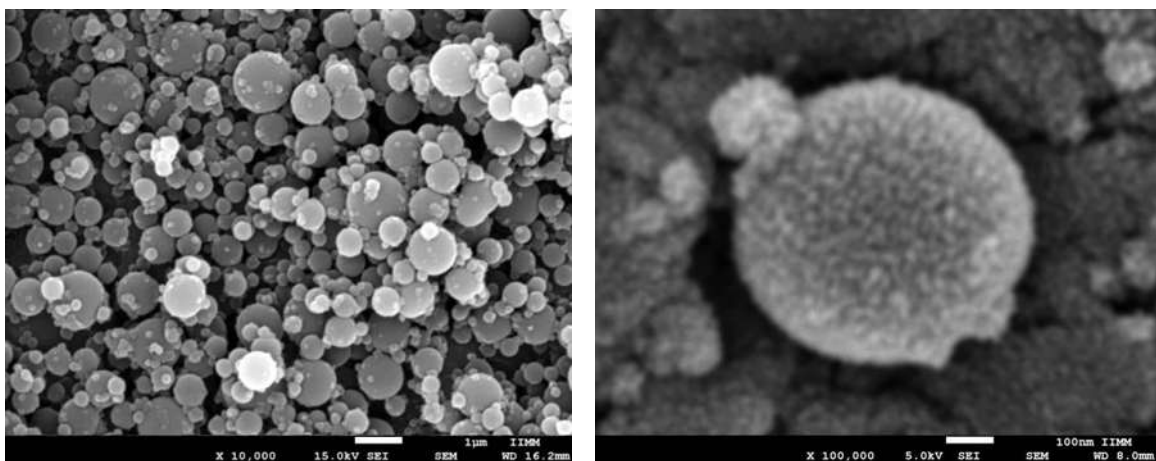


Figura 4. 19 Microesferas de quitosano sin carga (a) 10,000X y (b)100 000X.

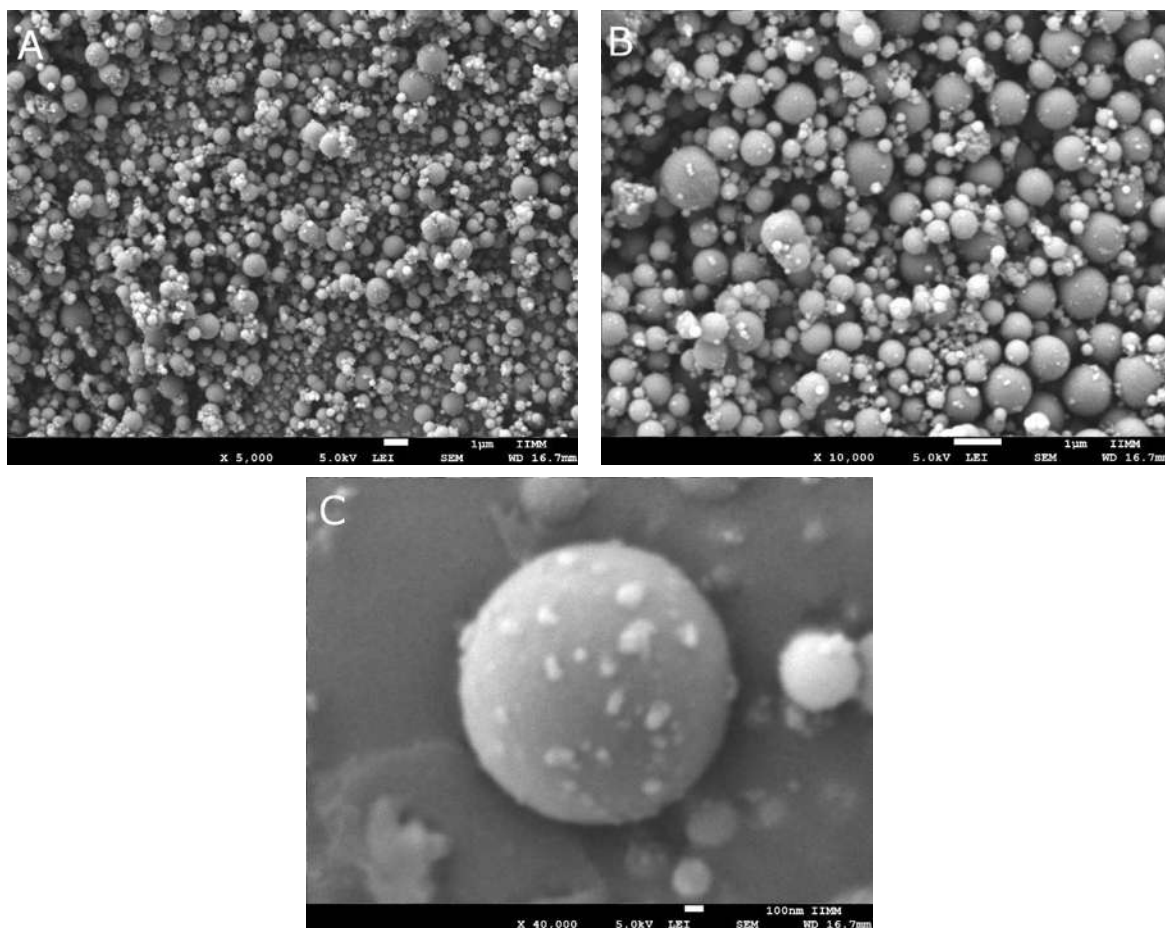


Figura 4. 20 Microesferas de quitosano con carga de acetaminofén.

El método de emulsión/evaporación del solvente es un método muy prometedor para la preparación de partículas con morfología esférica comparado con otros métodos de obtención de microsferas.

4.5.2.4 Calorimetría diferencial de barrido (DSC)

Los termogramas de DSC para el acetaminofén puro, quitosano puro y microsferas de quitosano con y sin carga de fármaco se muestran en la Figura 4.21. El acetaminofén (Figura 4.21 (a)) muestra un pico endotérmico a 167.9 °C, el cual indica su temperatura de fusión, este valor corresponde con el encontrado por Sacchetti y col. [152.]. La curva calorimétrica del quitosano fue la típica de un componente amorfo hidratado (Figura 4.21 (b)), esta muestra que la descomposición ocurre en tres pasos a diferencia de la pectina que ocurre en dos y su estabilidad térmica es mayor; se puede

observar un pico endotérmico entre 85 y 130 °C, correspondiente a la deshidratación del polímero, esta seguida de un pequeño pico exotérmico alrededor de 205 °C, el cual puede estar asociado con la degradación térmica de las cadenas poliméricas [153.], se observa un segundo pico endotérmico el cual se puede atribuir a la ruptura de interacciones electrostáticas inespecíficas [154.]. Después del procesamiento, ya fabricadas las microsferas de quitosano con acetaminofén (Figura 4.21 (c)), se observa una curva muy parecida con la diferencia de un ligero descenso en la curva en el rango de temperatura de 165 °C a 210 °C que podría haber estado asociado con una presencia mínima del medicamento.

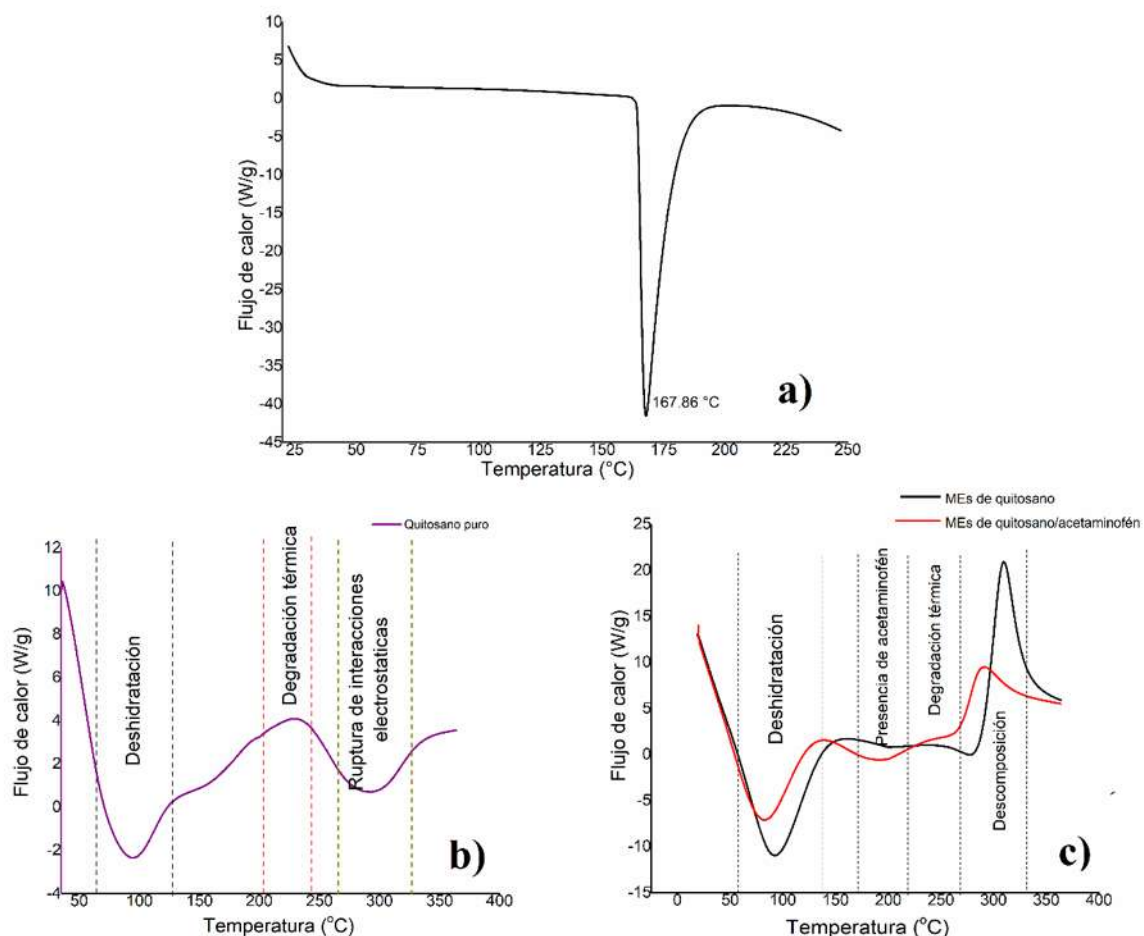


Figura 4. 21 Termogramas de DSC para el (a) acetaminofén puro, (b) quitosano puro, y (c) MEs de quitosano, y MEs de quitosano cargadas con fármaco.

4.5.2.5 Difracción de rayos X (DRX)

En la Figura 4.22 y 4.23 se muestran los difractogramas del acetaminofén puro y de las MEs de quitosano con carga y sin carga de fármaco. El difractograma del acetaminofén muestra que es un compuesto altamente cristalino cuyas reflexiones se ajustan a la tarjeta COD 2300230 de la base de datos. Por otro lado, la técnica de DRX reveló que el quitosano, así como las microesferas de quitosano son de naturaleza amorfa, se pueden observar en la Figura 4. 23 unos semipicos en los ángulos 14.5° y 20° (2θ) dentro de la naturaleza amorfa del quitosano, esto nos muestra que es un polímero semicristalino ya que posee una celda unitaria ortorrómbica [153.], las microesferas con carga también tienen un comportamiento amorfo ya que el difractograma no reveló ningún grado de cristalinidad debido a la presencia de acetaminofén, lo que quiere decir que éste se encuentra dentro de las microesferas y no en la superficie de estas.

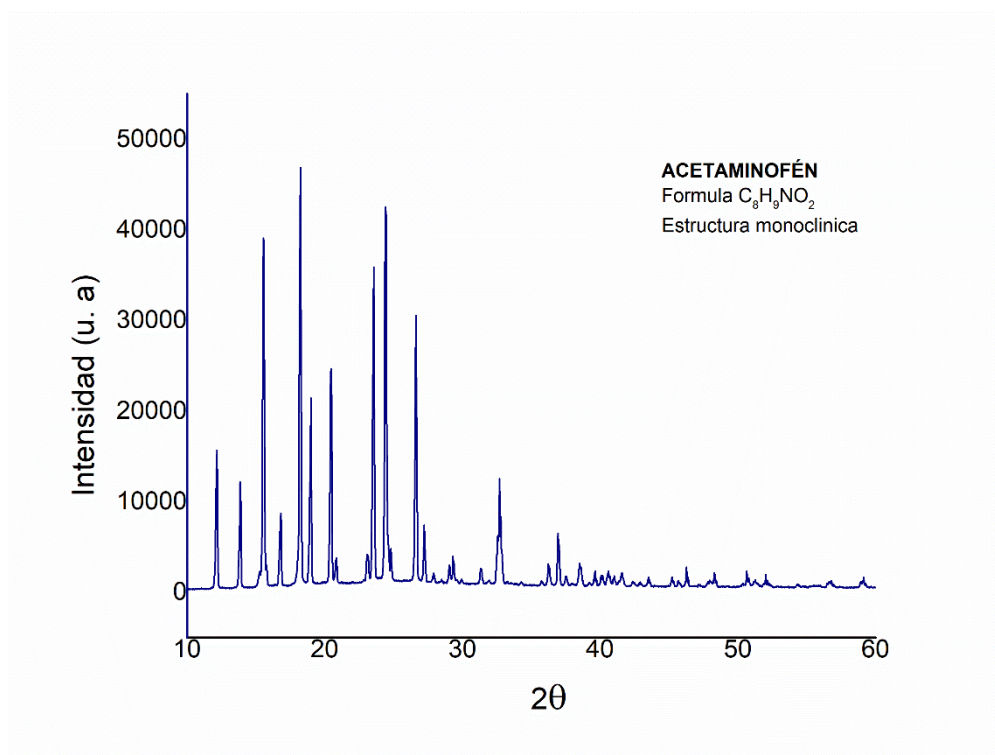


Figura 4. 22 Espectro de difracción de rayos X del (a) acetaminofén puro.

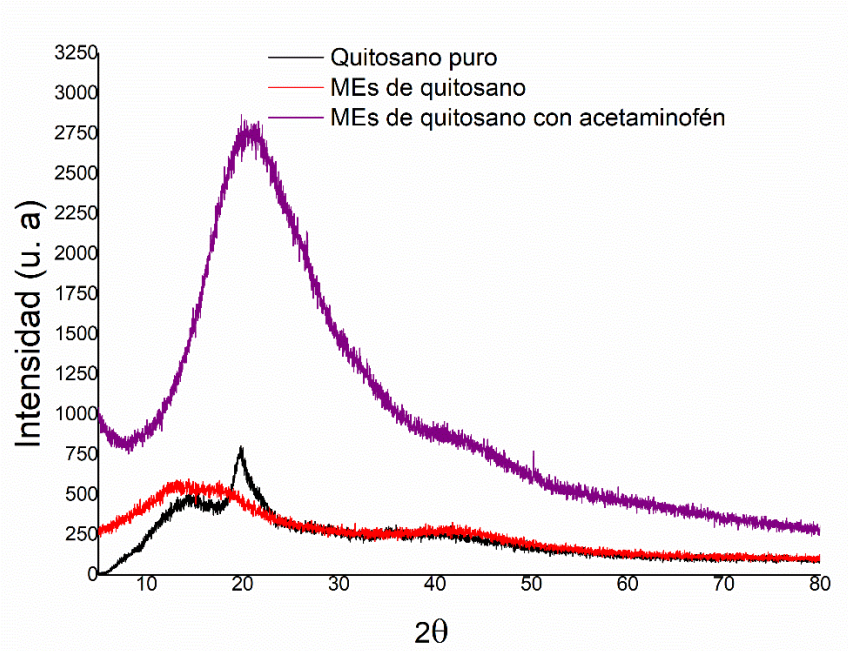


Figura 4. 23 Espectro de difracción de rayos X de las MEs de quitosano con carga y sin carga.

4.5.2.6 Espectrofotometría infrarroja

Los resultados de FT-IR de acetaminofén puro, quitosano puro, microesferas de quitosano, y microesferas de quitosano con carga se muestran en la Figura 4.24. Las bandas obtenidas de los grupos funcionales característicos del acetaminofén y del quitosano se muestran en la Tabla 4.5. Se puede observar en la figura que las microesferas de quitosano presentan las mismas bandas que el quitosano puro, mientras que las bandas de las microesferas cargadas con acetaminofén muestran un pequeño traslape con las del acetaminofén puro en los grupos CH y NH lo cual indica que existe interacción a nivel molecular.

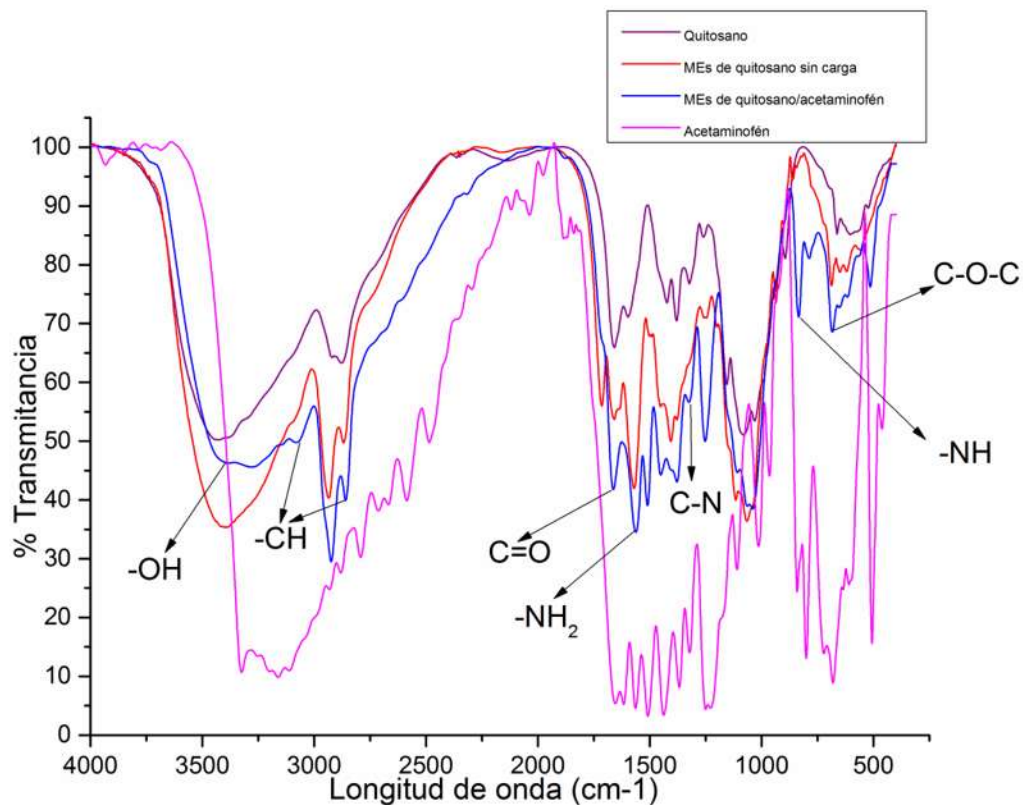


Figura 4. 24 Espectro de FT-IR de acetaminofén puro, quitosano puro, microesferas de quitosano, y microesferas de quitosano cargadas con acetaminofén.

Tabla 4. 5 Grupos funcionales del quitosano y del acetaminofén.

Quitosano		Acetaminofén	
OH	3405	CH	3100
CH	2866	NH	1506, 1250, 827
C=O	1662		
NH ₂	1575		
C-N	1324		
C-O-C	901, 648		

4.5.2.7 Ensayos de liberación del fármaco y eficiencia de encapsulamiento

Para realizar la curva de calibración del acetaminofén, se prepararon 5 concentraciones conocidas de 2.5, 5, 10, 20 y 30 ppm de acetaminofén en agua destilada, estas concentraciones representaron las bandas estándares que se muestran en la Figura 4.25. En la Tabla 4.6 se muestran los resultados de las absorbancias obtenidas, los cuales indican que son directamente proporcionales al aumento de concentración, si la concentración aumenta el doble, la absorbancia aumenta acorde a esto.

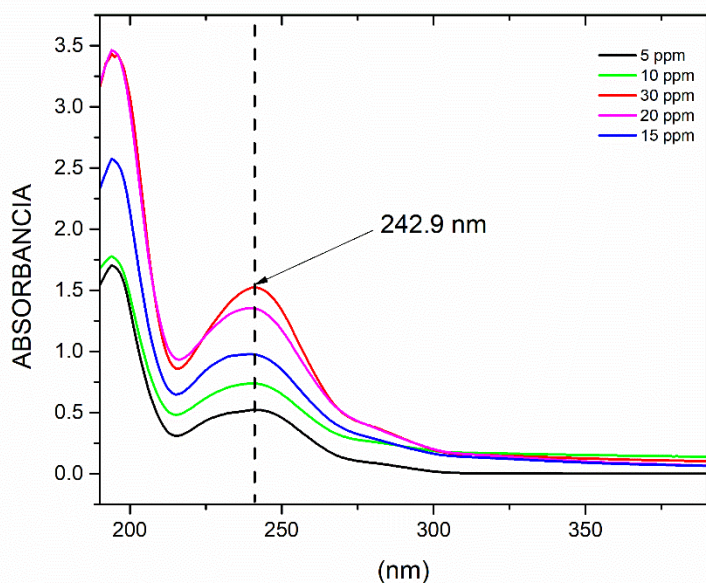


Figura 4. 25 Espectro UV-vis de las muestras estándares del acetaminofén.

Tabla 4. 6 Absorbancia obtenida en cada concentración de estándar.

Concentración (ppm)	Absorbancia
2.5	0.13
5	0.3
10	0.56
20	1.14
30	1.73

En la Figura 4.26 se muestra la curva de calibración del acetaminofén; se graficaron las concentraciones conocidas contra las absorbancias obtenidas, que posteriormente se usaron para el cálculo de las concentraciones finales de fármaco en las microsferas. Se obtuvo una recta con la ecuación siguiente:

$$y = 0.057x - 0.007 \quad (4.1)$$

De donde se puede deducir que x es la concentración de acetaminofén que se busca para las 6 muestras de MEs y y es la lectura de absorbancia obtenida de las curvas de la Figura 4.27. Por lo tanto, despejando x se tiene que:

$$x = \frac{(y + 0.007)}{0.057} \quad (4.2)$$

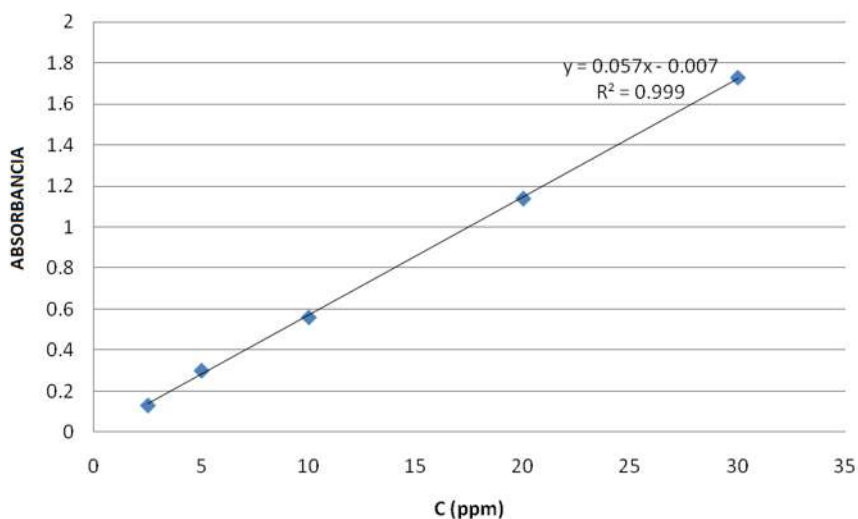


Figura 4. 26 Curva de calibración del acetaminofén.

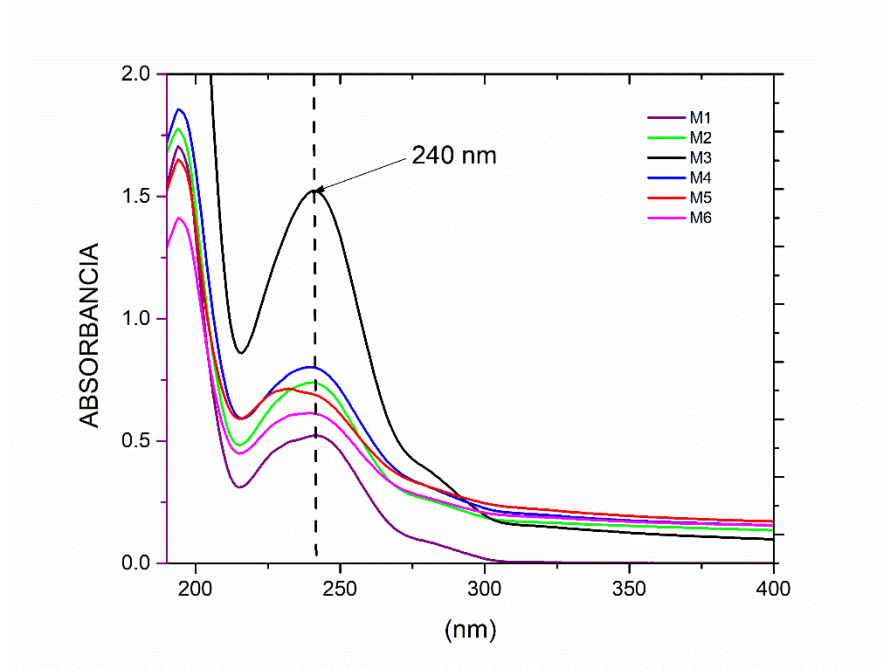


Figura 4. 27 Curvas de absorción obtenidas en 6 muestras de MEs de quitosano con acetaminofén en relación 2:1.

Las concentraciones obtenidas se muestran en la Tabla 4.7. La eficiencia de encapsulamiento (% EE) se calculó con la Ec. (3.5) descrita en el Desarrollo Experimental, y tomando en cuenta la dilución que se hizo de cada muestra. Por ejemplo, para las muestras M5, M10 Y M14 se tomaron 0.25 mL que se aforaron a 10 mL para hacer la dilución, de las restantes solo se tomó 1 mL y se aforó a 10 mL. Para ajustar las concentraciones tomando en cuenta la dilución se utilizó la siguiente ecuación:

$$C_1V_1 = C_2V_2; C_2 = C_1V_1/V_2 \quad (4.3)$$

Tabla 4. 7 Concentración y eficiencia de encapsulamiento calculada respecto a la absorbancia obtenida.

$x = \frac{(y + 0.007)}{0.057}$			
Muestra	<i>y</i> (Absorbancia)	<i>x</i> (Concentración)	%E
M5	0.5206	9.1456	36.67
M10	0.5779	10.1509	40.6
M11	0.7352	12.9105	22.5
M12	0.5027	8.8316	35.32
M13	1.5128	26.5526	26.55
M14	0.4203	7.3860	34.12

Haciendo un promedio de los resultados se tiene que el %EE fue de 32.6%, la eficiencia es buena, si se habla en términos de que el fármaco es altamente soluble en medio acuoso o hidrofílico. Pero este valor queda por debajo de los valores reportados para el encapsulamiento de otros fármacos como gentamicina, metformina, ácido salicílico e ibuprofeno en MEs de quitosano que sobrepasan el 50% [100, 103, 104]. Este bajo porcentaje de eficiencia de encapsulamiento también se puede atribuir a las pérdidas de fármaco durante la preparación, la evaporación del solvente, y las veces que se centrifugo para poder separar fases.

4.6 Resultados de los andamios con adición de microesferas de quitosano

4.6.1 Morfología de los andamios

En la Figura 4.28 se muestran micrografías por MEB de los andamios; en la imagen 4.28(a) se puede observar la morfología del andamio en general, la cual no cambia aparentemente, la diferencia se hace más notable a altas magnificaciones donde se puede observar que el andamio tiene cientos de microesferas adheridas en las paredes, de diferentes tamaños que van desde nanométricas hasta micrométricas, las más pequeñas están más adheridas a las paredes como se muestra en la imagen 4.28(f), también se puede observar que las MEs no se adhirieron

uniformemente, esto quiere decir que la adhesión depende del tiempo y de la cantidad de veces de inmersión. Li y col. [66] quienes recientemente adhirieron MEs de PHBV en bioglass 45S5, obtuvieron una adhesión uniforme en la superficie del andamio debido a que la cantidad de veces de inmersión fue mayor a la que se empleó en este trabajo.

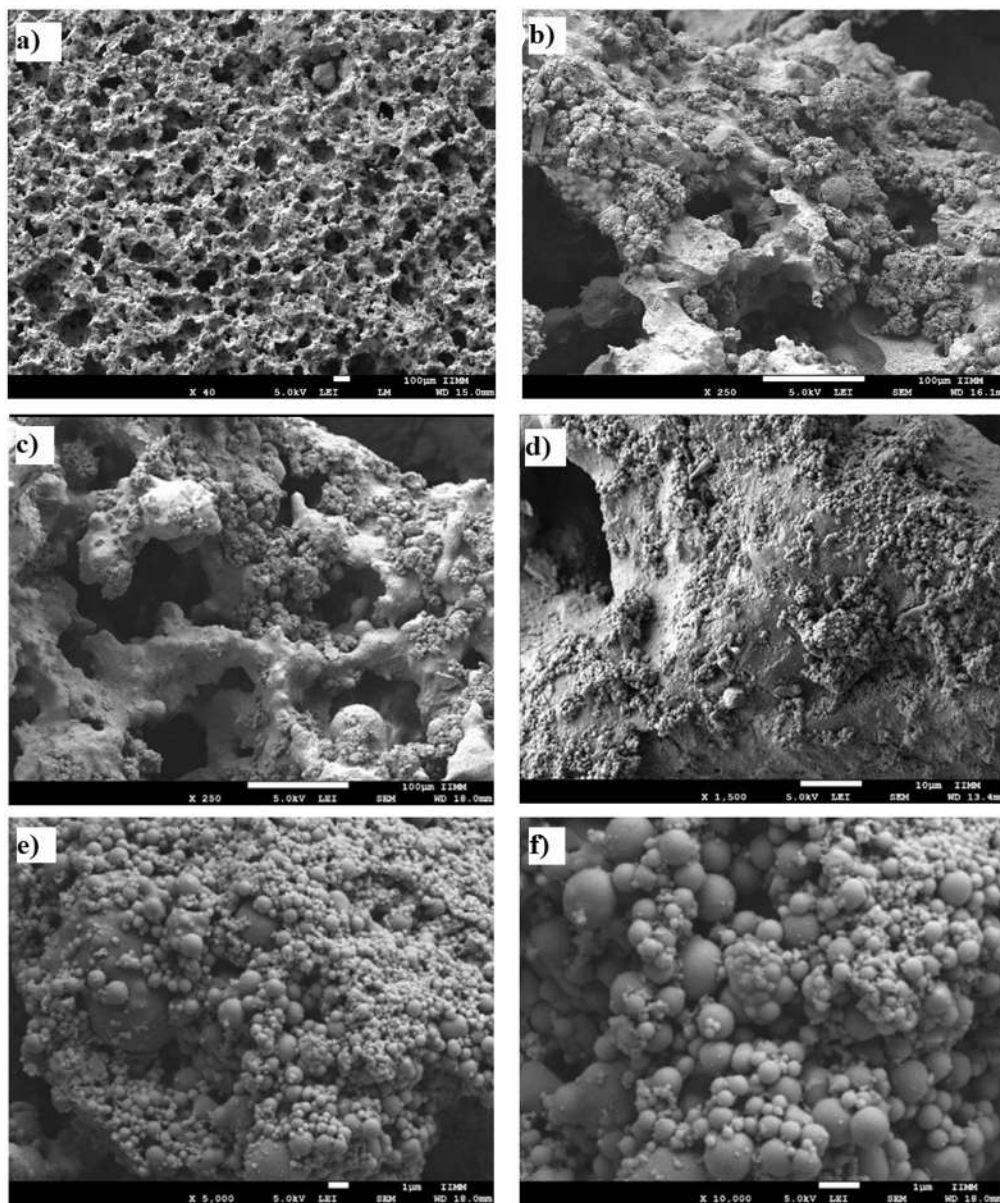


Figura 4. 28 Micrografías por MEB de andamios de biovidrio CEL2 con MEs de quitosano/acetaminofén. (a) Estructura del andamio, (b, c, d, e, f) acercamiento del andamio, diferentes magnificaciones.

4.6.2 Porcentaje de MEs de quitosano adheridas a los andamios tridimensionales

El porcentaje de MEs adheridas a los andamios fue de 40% con una ED de 3.8, este porcentaje es respecto a la cantidad de MEs que se incorporó a la solución inicial de hexano, lo cual quiere decir que la cantidad de MEs es suficiente, el 60% de MEs que queda en la dispersión de hexano puede ser reutilizable debido a que se pueden extraer fácilmente del mismo. La mayoría de las investigaciones previas mencionan que no es necesario que el andamio este completamente cubierto de MEs ya que dependiendo de la cantidad de fármaco que se quiera liberar, así será la cantidad de MEs agregadas. En la presente investigación se confirmó una buena adhesión. Macías-Andrés y col. [34] en su investigación desarrollaron MEs de PHBV cargadas de daidzeina las cuales incorporaron a andamios tridimensionales de bioglass 45S5, la adhesión que presentan ellos es similar a la de este trabajo tomando en cuenta que los biovidrios son muy parecidos.

4.6.3 Porosidad de los andamios después de la adhesión de microesferas

Los valores de porosidad de los andamios se calcularon antes y después de la incorporación de las MEs y se resumen en la Tabla 4.8, donde se puede observar que no hubo un cambio apreciable, esto fue porque el tamaño y la cantidad de microesferas adheridas no obstruyó la porosidad del andamio, lo cual es positivo en este tipo de estudio ya que se requiere de alta porosidad e interconexión para que durante los cultivos celulares se lleve a cabo la proliferación de la células óseas y el transporte de nutrientes.

Tabla 4. 8 Valores de porosidad de los andamios con y sin incorporación de MEs.

Andamio	Atmósfera	% biovidrio	%THS	P1(%)	P2(%)
1	AIRE	55	3	75.63	75.58
2				73.16	73.10
3				73.54	73.12
4				75.06	74.66
5				73.4	73.18
6				73.84	73.76
7				73.69	73.46
8				73.96	73.67
9				72.97	72.51
Promedio				73.97	73.69
DE				0.877	0.878

4.6.4 Pruebas de compresión

Las pruebas de compresión se hicieron a 7 andamios cilíndricos con y sin MEs adheridas, los cuales estuvieron inmersos en SBF durante 21 días para estudiar el efecto del contacto con un ambiente húmedo; el comportamiento típico de la curva esfuerzo-deformación para un material poroso, en este caso un biovidrio sometido a un ensayo de tensión no cambió cómo se muestra en la Figura 3.29, los resultados de compresión se muestran en la Figura 4.30, los cuales indican que respecto a las primeras pruebas de compresión en andamios sin haber sido sumergidos en SBF, la resistencia máxima disminuyó más de la mitad en su valor, esto es 1.48 ± 0.1 MPa y 1.58 ± 0.1 pero se mantuvo en el límite inferior de la resistencia a la compresión del hueso trabecular. debido a que las espumas se encontraban en un medio húmedo (SBF) y este genera la capa de hidroxiapatita, pero no existe regeneración *in vitro* porque no hay presencia de células. Se ha reportado un incremento significativo de la resistencia mecánica de los andamios en experimentos *in vivo* en función del tiempo ya que la capa de apatita aumenta, las células óseas proliferan, y se forma nuevo tejido óseo que recubren por completo el material [35], sin embargo, esto ocurre en un tiempo de 90 días que es en promedio cuando el material se degrada por completo generando tejido nuevo, el cual es mayor a los 21 días de duración del ensayo *in vitro*, donde durante el transcurso de los primeros días el andamio sufre de un debilitamiento de su estructura porque se lleva a cabo su disolución por intercambio iónico con el SBF y la cantidad de la capa de HA depositada no es suficiente para aumentar su resistencia como se observa en la siguiente Sección, además de que el SBF es un fluido corporal simulado que no contiene células que se adhieran al material.

También se ha demostrado que la adición de algún recubrimiento le da mayor resistencia al andamio si éstos logran recubrir las grietas y cuellos entre los poros [66]. En el presente trabajo las MEs no logran tener un efecto contundente en la resistencia mecánica.

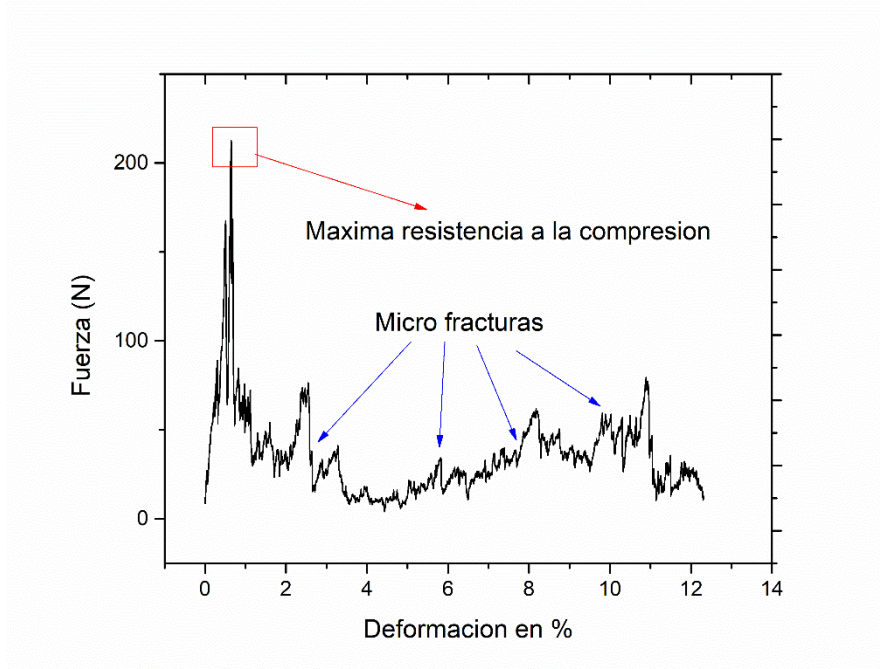


Figura 4. 29 Comportamiento típico de un material poroso sometido a compresión, resultado de una de las muestras húmedas sometida a compresión.

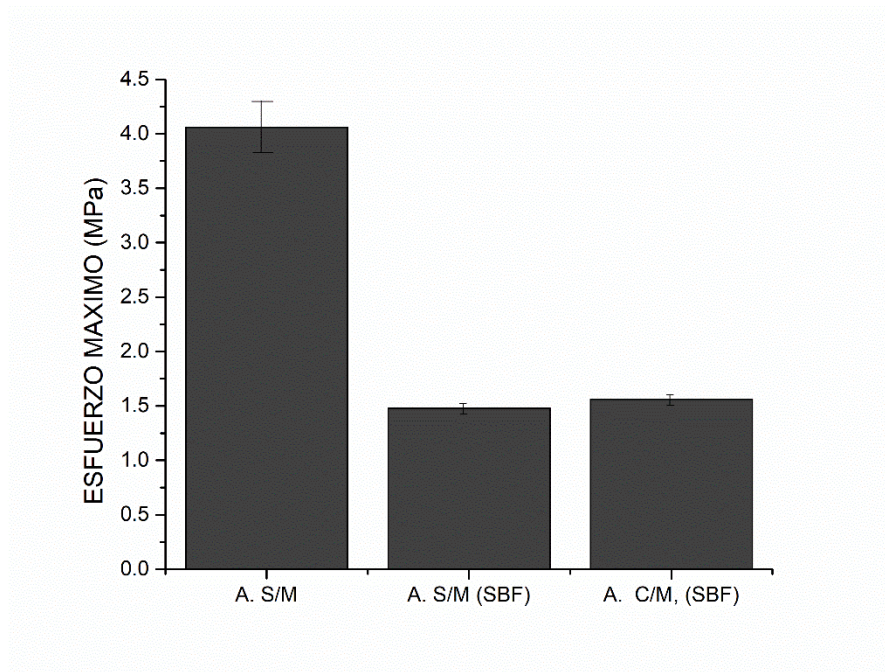


Figura 4. 30 Resistencia mecánica de andamios de biovidrio CEL2 sin microesferas, andamios sin microesferas en medio húmedo y andamios con microesferas en medio húmedo después de la inmersión en SBF por 21 días.

4.6.5 Evaluación de la bioactividad in vitro en SBF

Los resultados de la variación de pH de la solución SBF en función del tiempo de inmersión de los andamios se muestran en la Figura 4.31. En la gráfica se puede observar un ligero incremento de pH en todas las muestras debido al intercambio de iones entre el andamio y el fluido, el cual se mantuvo menor a 7.8 en los 21 días, con un cambio de medio cada 24 h. Mientras el SBF se renueva diariamente, el pH se mantendrá menor a 7.8.

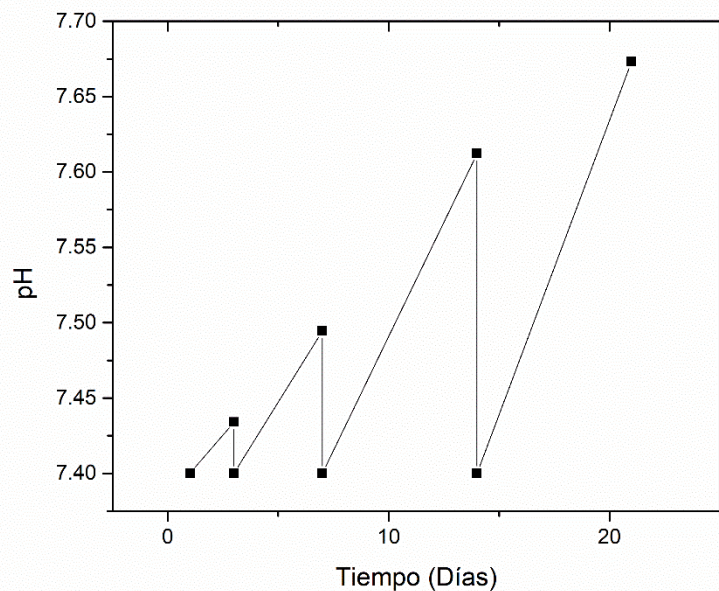


Figura 4. 31 Monitoreo de pH en los andamios durante 21 días.

La Figura 4.32 muestra imágenes por MEB de los andamios con MEs después de su inmersión en SBF por 7 días. El hecho de que las microesferas no cubrieran completamente el andamio facilitó el intercambio de iones entre el SBF y la superficie del andamio, permitiendo así, la creación de la capa de hidroxiapatita. La cual se formó desde el primer día, pero se observó la típica morfología de coliflor cubriendo el andamio completamente a los 7 días. Investigaciones previas muestran que el biovidrio CEL2 tiene la capacidad para generar la capa de hidroxiapatita rápidamente. Se puede observar que las Mes también son cubiertas por esta capa. La presencia de la fase de HA fue corroborada mediante difracción de rayos X y FT-IR en los dos casos. Se realizaron además análisis

puntuales por EDS confirmándose la relación molar Ca/P de aprox. 1.79, la cual es próxima a la relación de la HA natural.

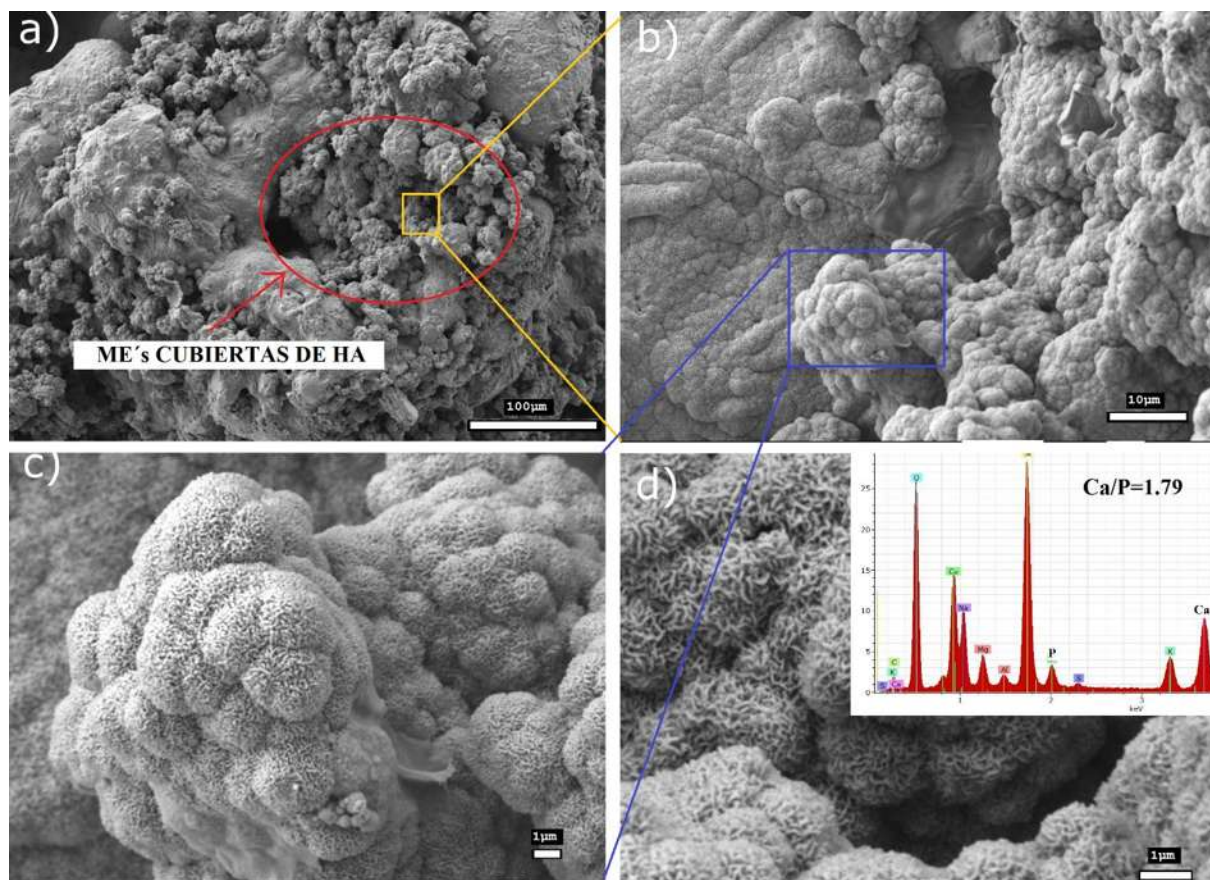


Figura 4. 32 Micrografías por MEB de andamios con MEs sumergidos en SBF durante 7 días. (a) 250X, (b) 1500X, (c) 5000X, y (d) 10000X.

4.6.7 Espectrofotometría infrarroja

Tres muestras de espumas inmersas en SBF a 0, 1, 3 y 7 días, fueron analizadas mediante espectrofotometría infrarroja en el rango de 400 a 1600 cm^{-1} con el fin de corroborar los grupos funcionales de la fase de hidroxiapatita existente en las muestras; de acuerdo a la literatura la aparición de dos picos alrededor de 565 cm^{-1} y 603 cm^{-1} corresponden a los grupos funcionales P-O, los picos cercanos a 874 cm^{-1} y las dos bandas a 1421 cm^{-1} y 1452 cm^{-1} son correspondientes a los grupos C-O, todos estos indican la formación de cristales de hidroxiapatita carbonatada [77, 155, 156], lo cual se muestra evidente en la Figura 4.33.

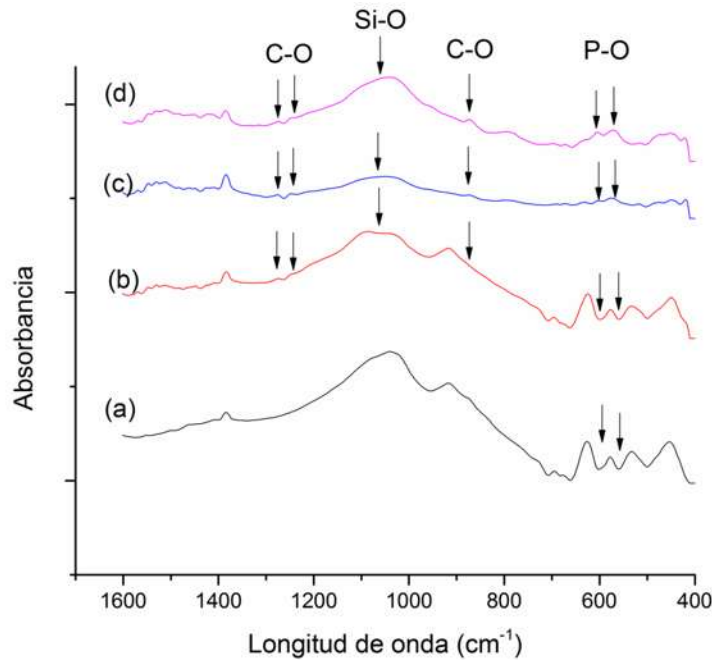


Figura 4. 33 Espectros de FT-IR de andamios de CEL2 con MEs a (a) 0 d, (b) 1d, (c) 3 y (d) 7 d después de haber sido inmersas en solución SBF.

4.6.8 Difracción de Rayos X

La Figura 4.34 muestra los patrones de difracción de espumas de biovidrio CEL2 con MEs de quitosano inmersas en SBF por 0, 1, 3, 7 y 14 días. De la figura se observa el crecimiento de la capa apática que se hace evidente por la aparición de los picos característicos de la fase cristalina hidroxiapatita que se encuentran en los ángulos $2\theta = 26^\circ$ y $2\theta = 32-33^\circ$ de acuerdo con la tarjeta PDF 01-082-1943, así como una disminución de las dos fases características del biovidrio CEL2, combeita $\text{Na}_4\text{Ca}_4(\text{Si}_6\text{O}_{18})$ (COD9007721) y arquemanita $\text{Ca}_2\text{Mg}(\text{Si}_2\text{O}_7)$ (COD9008448)

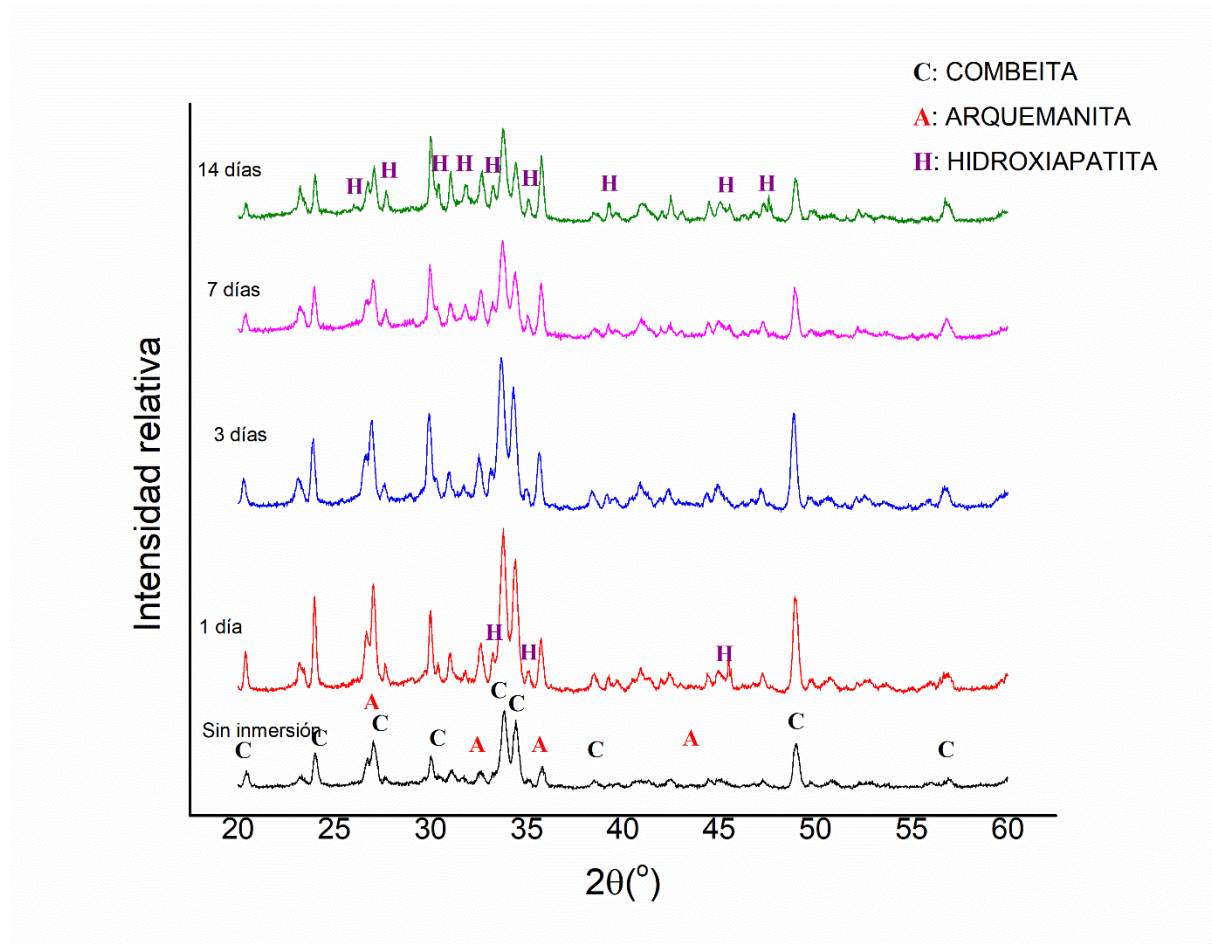


Figura 4. 34 Espectros de Rayos X de espumas de biovidrio CEL2 con MEs después de inmersión en SBF por 0, 1, 3, 7 y 14 días.

4.6.9 Cinética de liberación

Para determinar el perfil de liberación in vitro, se llevaron a cabo dos experimentos se utilizaron 50 mg de microesferas de quitosano y 7 andamios cargados con MEs de quitosano, los resultados de la liberación se muestran en la Figura 4.35. La cinética de liberación muestra 3 zonas: (a) zona de liberación rápida, (b) zona de liberación inducida y (c) zona de liberación sostenida. La liberación rápida en este caso fue del 75% aproximadamente, esto se puede deber a que gran parte del fármaco se quedó infiltrado en la superficie de las MEs. Está comprobado que la presencia del fármaco situado en la superficie de las MEs genera la liberación rápida o ráfaga y las moléculas de droga contenidas dentro de las MEs promueven la liberación prolongada o sostenida [157]; se puede observar que la segunda zona se mantiene hasta el 90% de la liberación y la tercera zona es

cuando esta se mantiene o se libera por completo. Muchos factores pueden afectar la forma y velocidad en la que es liberado el fármaco como son: la capa de hidroxiapatita generada por la inmersión en SBF porque los grupos Si-OH de las microesferas y la superficie de los andamios produce la nucleación de esta, también ha sido reportado que el incremento en la relación droga/fármaco puede modificar la velocidad de la liberación lo cual depende del comportamiento hidrofílico u hidrofóbico del medicamento, en este caso el acetaminofén es hidrofílico. En general la liberación se vuelve lenta en medios ácidos, además está comprobado que entre más pequeña sea la microesfera tendrá mayor área superficial expuesta la cual promoverá una liberación más rápida. [158] en este trabajo la droga encapsulada en las microesferas presenta una liberación ráfaga mayor a la de los andamios con MEs, esto puede ser atribuido a la adhesión de MEs en la superficie del andamio lo cual disminuye el área superficial expuesta en medio SBF y a su vez disminuye la velocidad de liberación.

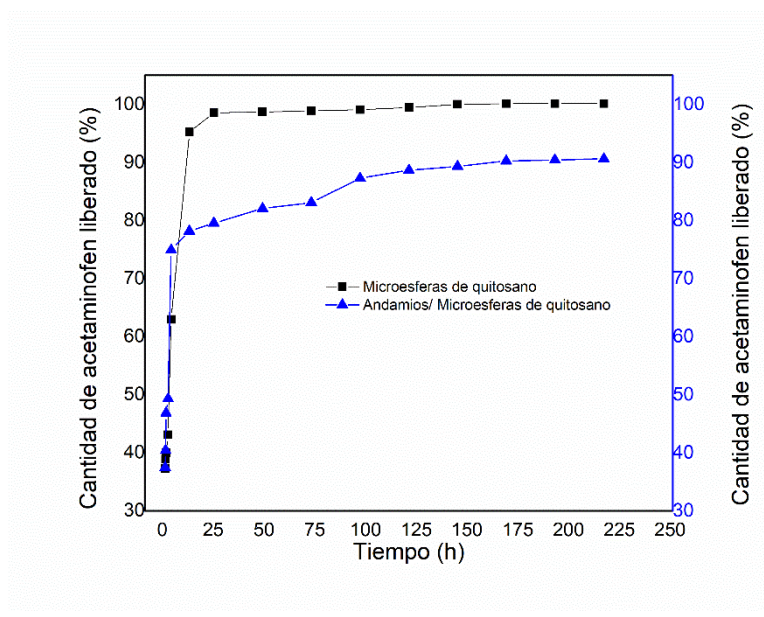


Figura 4. 35 Cinética de liberación de acetaminofén en MEs de quitosano y en andamios de biovidrio CEL2 cargados con MEs de quitosano.

La Figura 4.36 muestra la liberación de acetaminofén usando la ecuación de Peppas [48], donde se obtuvo una R^2 de 0.975 lo cual indica que la liberación de acetaminofén en MEs de quitosano está bien descrita por esta ecuación, el valor experimental de n es menor al valor teórico para la difusión de Fick de 0.43, lo cual quiere decir que la liberación se dio una difusión controlada. Patel y col.

[159] en su investigación estudiaron la liberación de nicorandil en MEs de quitosano, la MEs fueron sinterizadas por el método de emulsión y se encontró que la liberación fue por difusión al igual que en esta investigación, la liberación fue sostenida por 12 h y presentó una liberación rápida a corto tiempo, lo cual quiere decir en comparación con este trabajo que la mayor cantidad de fármaco estuvo situada en la superficie de las MEs. Mothial y col. [160] y Pandey y col. [161] también trabajaron con MEs de quitosano para liberación de diferentes fármacos obteniendo una liberación sostenida de 6 h y 7 días, respectivamente; la liberación del fármaco se ve afectada principalmente por tres factores cuando se trata de sólo de MEs que son hinchamiento de la matriz polimérica, porosidad y solubilidad del fármaco, en este caso en particular en que las MEs están adheridas a las paredes del andamio, existe un cuarto factor que es la formación de la capa de apatita que puede afectar la velocidad de liberación. Dass y col [162] desarrollaron microesferas de diferentes polímeros entre ellos quitosano para la encapsulación de metoclopramida, obteniendo una liberación total a las 6 horas, la liberación del fármaco se dió de forma rápida debido a que la mayor parte de la droga se encontraba en la superficie y el tamaño de las microesferas fue de 20 μ m aproximadamente.

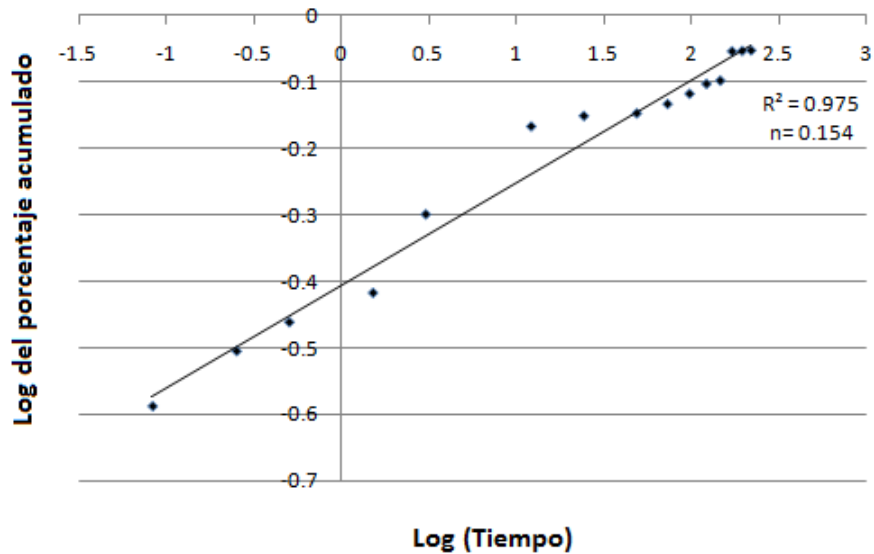


Figura 4. 36 Cinética de liberación de acetaminofén en los andamios cargados de MEs mediante la ecuación de Peppas [48].

4.7 Resultados de las pruebas biológicas

4.7.1 Viabilidad celular

La Figura 4.37 muestra los resultados de las mediciones de D.O. para el cálculo del porcentaje de viabilidad celular mediante el ensayo de MTT a los andamios sin y con MEs mediante la Ec. (3.9); a las 24 h el control arroja un 110% de viabilidad mientras que los andamios sin MEs 150% y los andamios con MEs muestran una mayor viabilidad de 160%.

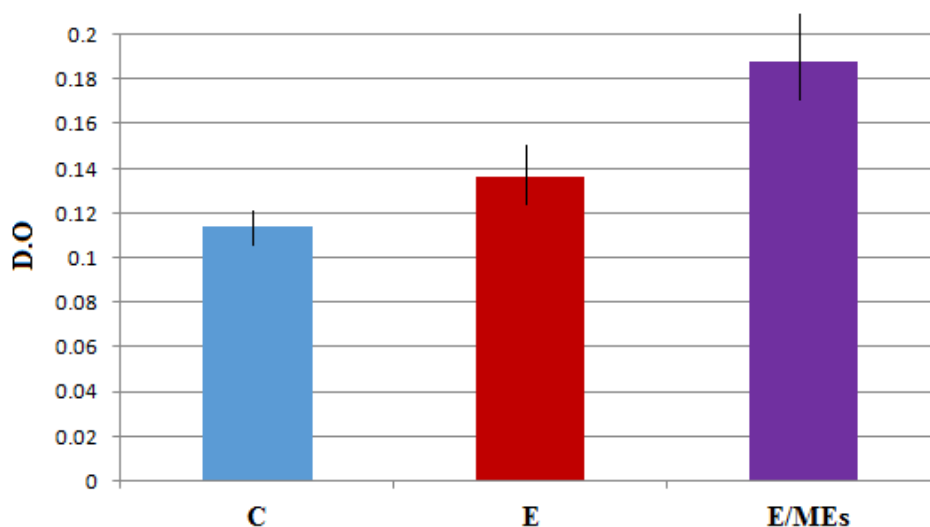


Figura 4. 37 Medición de la densidad óptica (D.O.) de C: Control, E: andamios, E/MEs: andamios con MEs cargadas de acetaminofén, para la evaluación de la viabilidad celular.

4.7.2 Proliferación celular

De acuerdo a la literatura se sabe que durante la interacción de las células con el substrato y el medio que las rodea, las células juegan un importante rol de supervivencia, proliferación y diferenciación. [163]. los fibroblastos son células que dependen del anclaje por lo tanto requieren de una superficie para poder adherirse y posteriormente proliferar. En este trabajo, los resultados de la Figura 4.38 mostraron que los fibroblastos retrasan su proliferación cuando son cultivados en andamios de biovidrio bioactivo CEL2 (con o sin microesferas de acetaminofén) a través de un

mecanismo desconocido, debido a que su proliferación es menor que las células del control. Sin embargo, esta condición no necesariamente afecta la función celular. Otros autores [164], han mostrado que hay al menos dos mecanismos de adhesión celular en andamios. Primero, la unión directa de las células al material no controlada por el receptor, que incluye interacciones no específicas entre el material y las células, tales como: enlaces de hidrógeno, interacciones electrostáticas, polares o iónicas entre varias moléculas en la membrana celular y grupos químicos funcionales en el material. Por otro lado, a través de integrinas que son, moléculas que permiten la adhesión celular, esto incluye células dependientes del anclaje. En este trabajo se puede suponer que, si las células no son capaces de sintetizar y depositar sus propias moléculas de matriz extracelular alrededor de 24 a 48 h después de la siembra, se someten a apoptosis.

Segundo, la unión mediada por receptores a través de moléculas de matriz extracelular o sus partes. En este mecanismo, la adhesión celular mediada por el receptor funcional y la transmisión de señales en un biomaterial convencional está mediada por moléculas de matriz extracelular, algunas de ellas son fibronectina, vitronectina, colágeno o laminina. Estas moléculas se pueden adsorber en la superficie del material del entorno circundante, por ejemplo, medios de cultivo celular. Es importante tener en cuenta que en los experimentos que se muestran en este trabajo, las células retrasan su proliferación, tal vez se atribuyen a la dificultad de adherirse al material, pero nunca mueren.

Por otro lado, en control el pH no sufrió variaciones porque el medio no está en contacto con el andamio de biovidrio CEL2 mientras que, en los otros dos casos, el andamio y las microesferas están presentes, lo cual afecta el pH. Al principio, en las primeras 24h, el ligero aumento en el valor del pH facilita el inicio de la adhesión celular porque las células prefieren un ambiente ligeramente alcalino sin embargo el continuo intercambio de iones del material con el medio que lo rodea hacen que el pH se eleve causando que la proliferación celular disminuya, considerando el aumento de pH y los cambios en iones H^+ , pueden ocurrir múltiples efectos en el metabolismo y funciones celulares como la respiración celular causando alteraciones en las enzimas y afectando la difusión e intercambio de nutrientes.

Otros autores mencionan que los cristales de hidroxiapatita promueven la adhesión celular, por lo cual es recomendable en trabajo a futuro pretratar los andamios en SBF por lo menos 7 días antes de las pruebas celulares para poder determinar si la capa de HA es promotora de adhesión celular

como lo propone Vital-Brovarone y col [36, 38-40], quien trabajo con andamios porosos de biovidrio CEL2 y mostro mayor viabilidad celular en andamios pretratados en SBF.

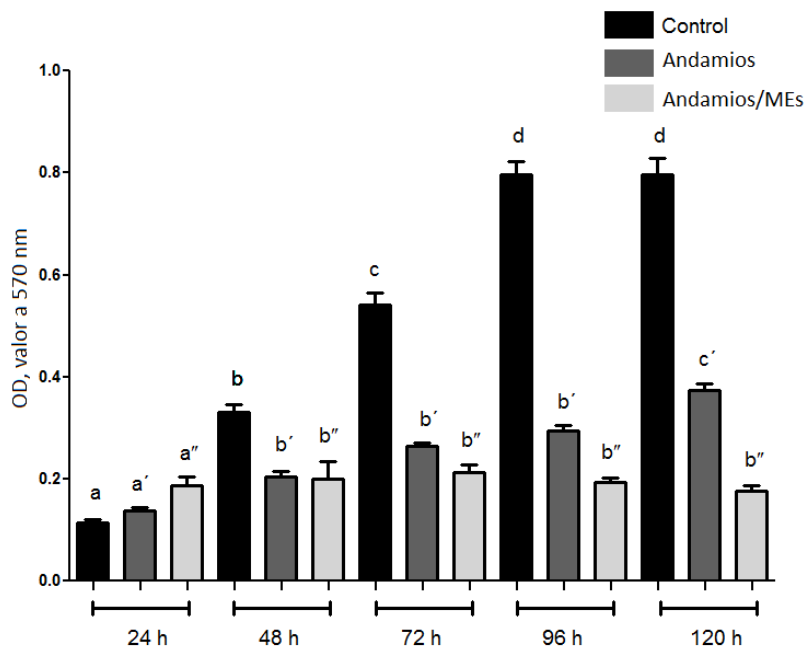


Figura 4. 38 Proliferación celular durante 5 días. Resultados de el ensayo MTT para el control (solamente fibroblastos), andamios y andamios con MEs de quitosano en un tiempo de 4, 48, 72, 96 y 120 h. las letras diferentes indican las diferencias estadísticas. cada variación estadística fue analizada entre el mismo grupo experimental: letra a para el control, a' para los andamios y a'' para andamios con MEs. b y c para los demás grupos experimentales

4.7.3 Adhesión celular

Se comprobó la adhesión celular mediante imágenes de MEB. A primera vista parece que las células no se adhirieron a la superficie del andamio pero a mayores magnificaciones, los fibroblastos se pudieron observar claramente (Figura 4.39); La morfología de un fibroblasto es distinta a la de las demás células ya que como su nombre lo dice, estas células suelen mostrar una morfología de fibras largas, es evidente que este tipo de andamios está destinado a la proliferación de osteoblastos, pero es importante notar que los fibroblastos son las primeras células que se adhieren para generar cualquier tipo de tejido y son la base de la adhesión de todas las demás células. La Figura4.39 (b) muestra como los fibroblastos están adheridos a los andamios después

de 5 días de haber estado en medio de cultivo, se pueden observar los filopodios de las células, las microesferas y la superficie del andamio, los tres interactuando uno con el otro. Este estudio biológico fue preliminar pero aun así muestra ser prometedor para la aplicación de los andamios de biovidrio CEL2 con microesferas incorporadas para su uso en el área de regeneración ósea.

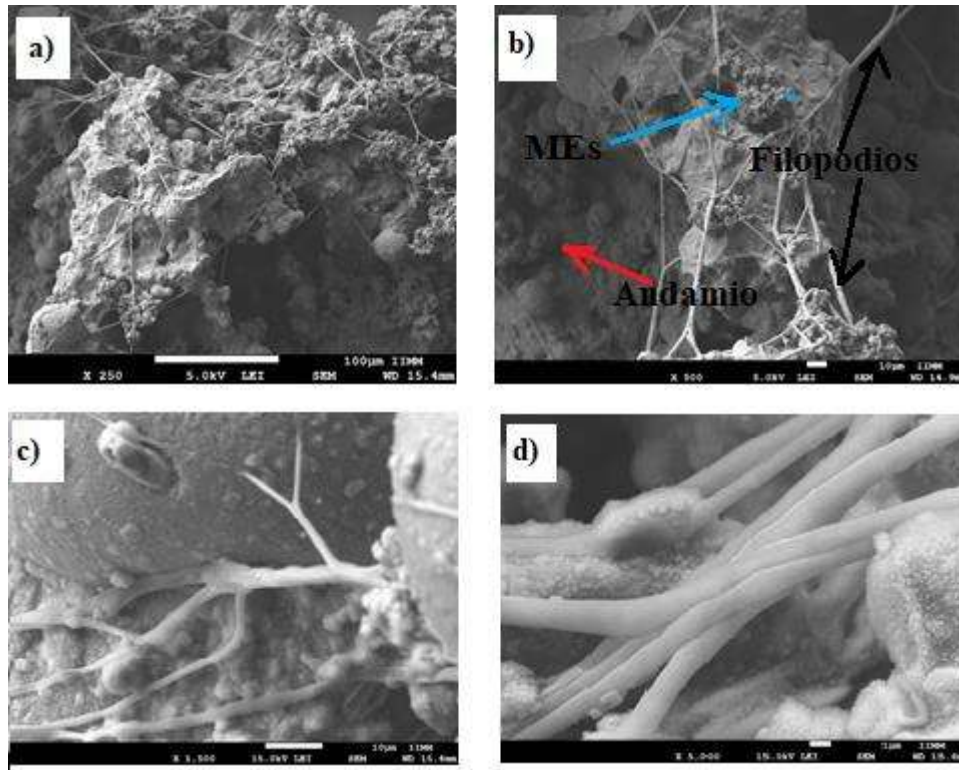


Figura 4. 39 Imágenes de MEB de fibroblastos adheridos a las paredes del andamio con microesferas de quitosano cargadas con acetaminofén a diferentes magnificaciones: (a) 250 X, (b) 500 X, (c) 1000 X, (d) 5000X.

CAPITULO 5. CONCLUSIONES

1. Se lograron fabricar andamios con un porcentaje de porosidad interconectada entre el 70 y 75%, lo cual los hace factibles para poder ser empleados en ingeniería de tejidos como andamiajes óseos. Estos a partir de una composición de polvos de vidrio bioactivo CEL2, ligante y un agente espumante mediante un proceso novedoso combinado de tecnología de polvos y espumado de polímeros.
2. Mediante el proceso propuesto en este proyecto y debido a la separación del perfil térmico en etapas es posible obtener porosidad abierta en los andamios y un tamaño de poro adecuado para el crecimiento óseo (10-500 μm).
3. Es posible fabricar microesferas biodegradables a partir de biopolímeros como la pectina y el quitosano mediante la técnica de emulsión- evaporación del solvente. Variando los parámetros como son la temperatura, la velocidad de emulsificación y la relación polímero-fármaco se pueden obtener microesferas esféricas de diferentes tamaños mediante este método.
4. Las microesferas de quitosano fueron las más aptas para poder emplearse en conjunto con los andamios ya que mostraron mayor rendimiento en su producción, así como menor tamaño de partícula y buena eficiencia de encapsulamiento, pudiendo liberar el acetaminofén de manera sostenida durante 200 h.
5. Los andamios, antes y después de su inmersión en SBF, mostraron valores de resistencia a la compresión en el rango del hueso esponjoso humano (2-12 MPa), tomando en cuenta que teóricamente esta resistencia aumenta *in vivo*, es posible su uso en regeneración ósea.
6. La capa de HA en la superficie de los andamios se formó a partir del primer día después de haber sido inmersos en SBF, y la morfología típica de coliflor fue comprobada mediante MEB, lo cual se atribuye a un buen potencial bioactivo de los mismos.
7. Los andamios en conjunto con las MEs permitieron la adhesión celular y proliferación de los fibroblastos durante 5 días, lo cual tomando en cuenta que no fueron pretratados en SBF, es un resultado prometedor para la ingeniería de tejidos.

Recomendaciones y trabajo futuro.

Se recomienda un estudio más específico en relación a la variación de pH en la parte de pruebas celulares, así como un pretratamiento del conjunto andamio/MEs en SBF para estudiar su efecto en la adhesión y proliferación celular.

Como trabajo a futuro se propone fabricar andamios de diferentes composiciones de biovidrios bioactivos que tengan porosidad superior o cercana al 80%, una resistencia a la compresión en el rango del hueso esponjoso humano y excelente potencial bioactivo. Esto se podrá lograr controlando la variación en las composiciones, así como los perfiles térmicos de espumado y de sinterizado.

Por otra parte, fabricar microesferas de diferentes biopolímeros, las cuales puedan encapsular no solo medicamentos sino diferentes tipos de factores y proteínas para que posteriormente éstas puedan ser estudiadas individualmente o en conjunto con andamios. Respecto a la producción en conjunto andamio/MEs, se pretenden hacer varias combinaciones las cuales resulten prometedoras en el área de ingeniería de tejidos.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] Vallet-Regi M. *Ceramics for medical applications*. **Journal of the Chemical Society, Dalton Transactions**. 2, 97–108 (2001).
- [2] Ambrosio L. *Composite Materials*. En; **Handbook of Biomaterial Properties**. Ed. J. Black and G. Hastings. London, 205-259, 2016.
- [3] Vallet-Regi M, Gonzalez-Calbet M J. *Calcium Phosphates as Substitution of Bone Tissues*. **Progress in Solid State Chemistry**. 32(1–2), 1-3, 2004.
- [4] Vallet-Regi M, Victoria-Rangel C, J-Salinas A. *Glasses with Medical Applications*. **European Journal of Inorganic Chemistry**. 2003 (6), 1029–1042, 2003.
- [5] Cabañas M B, Vallet-Regy M. *Calcium phosphate coatings deposited by aerosol chemical vapour deposition*. **Journal of Materials Chemistry**. 13 (5), 1104–1107, 2003.
- [6] Vallet-Regi M, Roman J, Padilla S, Doadrio J C, Gil F J. *Bioactivity and mechanical properties of SiO₂-CaO-P₂O₅ glass-ceramics*. **Journal of Materials Chemistry**. 15 (13), 1353–1359, 2005.
- [7] Vallet-Regi M, Antonio R, Doadrio J C. *Liberación de fármacos en matrices biocerámicas ; Avances y perspectivas*. En **Monografía XIX; Monografías de la Real Academia Nacional de Farmacia**. España. 19, 111–140, 2006.
- [8] De Groot K, Wolke J G C, Jansen J A., *Calcium phosphate coatings for medical implants*. En; **Proceedings of the Institution of Mechanical Engineers, Part H: Journal of Engineering in Medicine**. 212, 137–147, 1998.
- [9] Jarcho M, Bolen C H, Thomas M B, Bobick J, Kay J F, Doremus R H., *Hydroxylapatite synthesis and characterization in dense polycrystalline form*. **Journal of Materials Science**. 11, 2027–2035, 1976.
- [10] Jones J R, Lin S, Yue S, Lee P D, Hanna J V, Smith M E, Newport R J. *Bioactive glass scaffolds for bone regeneration and their hierarchical characterization*. **Proceedings of the Institution of Mechanical Engineers, Part H: Journal of Engineering in Medicine**. 224, 1373–1387, 2010.
- [11] Guy D L. *Definitions in biomaterials*. **Journal of Polymeric Science. Part C Polymers**. 26 (9), 414, 1988.
- [12] Chapekar M S. *Tissue engineering: challenges and opportunities*. **Journal of Biomedical Materials**. 53, 617–620, 2000.
- [13] Günther H. *Materials for Biomedical Applications—High Long-Term Success Rates Might Pose New Problems*. **Angew. Chemie International. Ed. English**. 1 (7), 234-236. 1989.
- [14] St Jhon K R. *Application of advance composites in orthopedic implants*. En; **Biocompatible polymers, metals, and composites**. Ed. Technomic, 861-871, 1983.

- [15] Park J, Lakes R. *Tissue Engineering Materials and Regeneration*. **Biomaterials. An Introduction**. Ed. Springer-Verlag New York. 485-515, 2007.
- [16] Yannas I V, Burke J F, Gordon P L, Huang C, Rubenstein R H. *Design of an artificial skin. II. Control of chemical composition*. **Journal of Biomedical Materials Research**. 14 (2), 107–132, 1980.
- [17] Dagalakis N, Flink J, Burke J F, Yannas I V. Design of an artificial skin. Part III. Control of pore structure **Journal of Biomedical Materials Research**. 14 (4), 511–528, 1980.
- [18] Liman D J, Rowland S M. *Biomedical Materials*. En; **Encyclopedia of Polymer Science and Technology, American Cancer Society**, 2007.
- [19] Geethaa M, Singhb A K, Asokamania R, Gogia A K. *Ti based biomaterials, the ultimate choice for orthopaedic implants. A review* **Progress in Materials Science**. 54, 397–425, 2009.
- [20] Vallet-Regi M, Martínez L M, Munuera L. *Ingeniería de tejidos*. En; **Biomateriales aquí y ahora**. Ed. Dykinson, Madrid S.L., 2000.
- [21] Vallet-Regi M. *Ceramics for medical applications*. **Journal of the Chemical Society, Dalton Transactions**. 2, 97–108 (2001).
- [22] Nakano T. *Texture & bone reinforcement*. En; **The Encyclopedia of Materials: Science and Technology**. Ed. Elsevier. 1-8, 2005.
- [23] Williams D. *Benefit and risk in tissue engineering*. **Materials Today**. 7(5), 24–29, 2004.
- [24] Felicity R A J, Oreffo R O C. *Bone Tissue Engineering: Hope vs Hype*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. 292(1), 1–7, 2002.
- [25] Shin H, Jo S, Mikos A G. *Biomimetic material for tissue engineering*. **Biomaterials**. 24 (24), 4353–4364, 2003.
- [26] Mistry A S, Mikos A G. *Tissue Engineering Strategies for Bone Regeneration*. **Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology**. 94, 1–22, 2005.
- [27] Reis R L, Cohn D. *Biodegradable Polymers as Scaffolds for Tissue Engineering and as Tissue Regeneration Inducers*. En; **Polymer Based Systems on Tissue Engineering, Replacement and Regeneration**. Ed. Springer, Netherlands, 357-370, 2012.
- [28] Boyan B D, Hummert T W, Dean D D, Schwartz Z. *Role of material surfaces in regulating bone and cartilage cell response*. **Biomaterials**. 17, 137–146, 1996.
- [29] Hench L L, Ethridge E C. **Biomaterials: an interfacial approach**. Ed; Academic Press, New York, 1982.
- [30] Gross U, Kinne R, Schmitz H-J, Strunz V. *The response of bone to surface-active glasses/glass-ceramics*. 4 (2), 155-179, 1988.

- [31] Hench L L, Wilson J. *Bioactive Glasses*. En; **An Introduction to bioceramics**. Ed. World Scientific, 1, Singapore, 1993.
- [32] Hench L L, Splinter R J, Allen W C, Greenlee T K. *Bonding mechanisms at the interface of ceramic prosthetic materials*. **Journal of Biomedical Materials Research** 5 (6), 117–141.
- [33] Shirliff V J, Hench L L. *Bioactive materials for tissue engineering, regeneration and repair*. **Journal of Materials Science**. 38 (23), 4697–4707, 2003.
- [34] Aguilar-Reyes E A, León-Patiño C A, Villicaña-Molina E, Macías-Andrés V I, Lefebvre L-P. *Processing and in vitro bioactivity of high-strength 45S5 glass-ceramic scaffolds for bone regeneration*. **Ceramics International**. 43 (9), 6868–6875 (2017).
- [35] Macías-Andrés V I, Li W, Aguilar-Reyes E A, Ding Y, Roether J A, Harhaus L, León-Patiño C A, Bocaccini A R. *Preparation and characterization of 45S5 bioactive glass-based scaffolds loaded with PHBV microspheres with daidzein release function*. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**. 105 (6), 1765–1774, 2017.
- [36] Bairo F, Vitale-Brovarone C. *Bioactive glass and glass–ceramic foam scaffolds for bone tissue restoration*. En; **Biomedical Foams for Tissue Engineering Applications**, Ed. Netti P A. 213-248, 2014.
- [37] Hoppe A, Bocaccini A R. *Bioactive glass foams for tissue engineering applications*. En; **Biomedical Foams for Tissue Engineering Applications**, Ed. Netti P A. 191-212, 2014.
- [38] Vitale Brabarone C, Verné E, Robigliop L, Martinasso G, Canuto R A, Muzio G. *Biocompatible glass-ceramic materials for bone substitution*. **Journal of Materials Science. Mater. Med.** 19 (1), 471–478, 2008.
- [39] Vitale Brabarone C, Verné E, Robigliop L, Appendino P, Bassi F, Martinasso G, Canuto R A, Muzio G. *Development of glass-ceramic scaffolds for bone tissue engineering: Characterisation, proliferation of human osteoblasts and nodule formation*. **Acta Biomaterial**. 3 (1), 199–208, 2007.
- [40] Vitale Brabarone C, Bairo F, Verné E. *High strength bioactive glass-ceramic scaffolds for bone regeneration*. **J Journal of Materials Science. Mater. Med.** 20 (5), 643–653, 2009.
- [41] Lakshmi S N, Laurencin C T. *Biodegradable polymers as biomaterials*. **Progress in Polymer Science**. 32 (8-9), 762-79, 2007.
- [42] Gunatillake P, Mayadunne R, Adhikari R. *Recent developments in biodegradable synthetic polymers*. **Biotechnology annual review**. 12, 301–347, 2006.
- [43] Dash M, Chiellini F, Ottenbrite R M. *Chitosan, a versatile semi-synthetic polymer in biomedical applications*. **Progress in Polymer Science**. 36(5), 981–1014, 2011.
- [44] Rinaudo M. *Chitin and chitosan: Properties and applications*. **Progress in Polymer Science**. 31, 603–632, 2006.

- [45] Dhawan S, Singla A K, Sinha V R., *Evaluation of mucoadhesive properties of chitosan microspheres prepared by different methods*. **American Association of Pharmaceutical Scientists**. 5(4), 122–128, 2004.
- [46] De Souza J R, De Carvalho J I, Trevisan M T, De Paula R C, Ricardo N M P, Feitosa J P. *Chitosan-coated pectin beads: Characterization and in vitro release of mangiferin*. **Food Hydrocolloids**. 23 (8), 2278–2286, 2009.
- [47] Williams G T, Knox P, Mikkelsen J D. Pectin: New insights into an old polymer are starting to gel. **Trends in Food Science & Technology**. 17 (3), 97-104, 2006.
- [48] Ritger P L, Peppas N A. *A sample equation for description of solute release II. Fickian and anomalous release from swellable devices*. **Journal of Control Release**. 5, 37-42, 1987.
- [49] Arifin D Y, Lee L Y, Wang C H. *Mathematical modeling and simulation of drug release from microspheres: Implications to drug delivery systems*. **Advanced drug delivery reviews**. 58 (12-13), 1274–1325, 2006.
- [50] Siepmann J, Siepmann F. *Mathematical modeling of drug delivery*. **International journal of pharmaceutics**. 364 (2), 328–343, 2008.
- [51] Kokubo T, Takadama H. *How useful is SBF in predicting in vivo bone bioactivity?* **Biomaterials**. 27 (15), 2907–2915, 2006.
- [52] Studart A R, Gonzenbach U T, Tervoort E, Gauckler L J. *Processing Routes to Macroporous Ceramics. A Review*. **Journal of the American Ceramic Society**. 89 (6), 1771–1789, 2006.
- [53] Schwartwalder K, Somers A V. *Method of making porous ceramic*. **United States Patents Application 3090094**. 21 May 1963.
- [54] Woyansky S, Scott C E, Minnear W P. Processing of porous ceramics. **Journal of the American Ceramic Society**. 71, 1674–1682, 1992.
- [55] Lefevre L P, THOMAS Y. *Method of making open cell material*. **United States Patents Application 6660, 224, B2**. Dec 9, 2003.
- [56] Cheung S, Gauthier M, Lefevre L P, Dunbar M, Filiaggi M. *Fibroblastic interactions with high-porosity Ti-6Al-4V metal foam*. **Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials**. 82N (5), 440–449, 2007.
- [57] Rezwan K, Chen Q Z, Blaker J J, Bocaccini A R. *Biodegradable and bioactive porous polymer/inorganic composite scaffolds for bone tissue engineering*. **Biomaterials**. 27(18), 3413–3431, 2016.
- [58] Cao H, Kuboyama N. *A biodegradable porous composite scaffold of PGA/β-TCP for bone tissue engineering*. **Bone**. 46(2), 386–395, 2010.

- [59] Salinas A J, Vallet- Regi M. *Bioactive ceramics: from bone grafts to tissue engineering*. **Royal Society of Chemistry Advances**. 2013(3), 11116–11131, 2013.
- [60] Salgado a j, Coutinho O P, Reis R L. *Bone Tissue Engineering: State of the Art and Future Trends*. **Macromolecular Bioscience**. 4(8), 743–765, 2004.
- [61] Fu Q, Saiz E, Rahaman M N, Tomsia A P. *Bioactive glass scaffolds for bone tissue engineering: state of the art and future perspectives*. **Materials science & engineering. C, Materials for biological applications**. 31(7), 1245–1256, 2011.
- [62] Kim H W, Knoeles J C, Kim H E. *Hydroxyapatite porous scaffold engineered with biological polymer hybrid coating for antibiotic Vancomycin release*. **Journal of Materials Science. Materials in Medicine**. 16(3), 189–19, 2005.
- [63] Mohamad Yunos D, Bretcanu O, Boccaccini A R. *Polymer-bioceramic composites for tissue engineering scaffolds*. **Journal of Material Science**. 43, 4433-4442, 2008.
- [64] Yao Q, Nooeaid P, Roether J A, Dong Y, Zhang Q, Bocaccini A R. *Bioglass®-based scaffolds incorporating polycaprolactone and chitosan coatings for controlled vancomycin delivery*. **Ceramics International Journal**. 39(7), 7517–7522, 2013.
- [65] Goodman S B, Yao Z, Keeney M, Yang F. *The future of biologic coatings for orthopedic implants*. **Biomaterials**. 34(13), 3174–3183, 2013.
- [66] Li W, Ding Y, Rai R, Roether J A, Schubert D W, Boccaccini A R., *Preparation and characterization of PHBV microsphere/45S5 bioactive glass composite scaffolds with vancomycin releasing function*. **Materials science & engineering. C, Materials for biological applications**. 1(41), 320–328, 2014.
- [67] Li W, Ding Y, Rai R, Roether J A, Schubert D W, Boccaccini A R. *Preparation and characterization of vancomycin releasing PHBV coated 45S5 Bioglass®-based glass–ceramic scaffolds for bone tissue engineering*. **Journal of the European Ceramic Society**. 34, 505–514, 2014.
- [68] Zhang H X, Zhang X P, Xiao G Y, Hou Y, Cheng L, Si M, Wangs S S, Li Y H, Nie L. *In vitro and in vivo evaluation of calcium phosphate composite scaffolds containing BMP-VEGF loaded PLGA microspheres for the treatment of avascular necrosis of the femoral head*. **Materials science & engineering. C, Materials for biological applications**. 60, 298–307, 2016.
- [69] Zhang P, Hong Z, Yu T, Chen X, Jing X. *In vivo mineralization and osteogenesis of nanocomposite scaffold of poly (lactide-co-glycolide) and hydroxyapatite surface-grafted with poly(L-lactide)*. **Biomaterials**. 30(1), 58–70, 2008.
- [70] Chen J, Yu Q, Zhang G, Yang S, Wu J, Zhang Q. *Preparation and biocompatibility of nanohybrid scaffolds by in situ homogeneous formation of nano hydroxyapatite from biopolymer polyelectrolyte complex for bone repair applications*. **Colloids and surfaces. B, Biointerfaces**. 1(93), 100–107, 2012.

- [71] Saito E, Liu Y, Migneco F, Hollister S J. *Strut size and surface area effects on long-term in vivo degradation in computer designed poly (l-lactic acid) three-dimensional porous scaffolds*. **Acta Biomaterial**. 8(7), 2568–2577, 2012.
- [72] Singh D, Tripathi A, Zo S, Singh D, Han S S. *Synthesis of composite gelatin-hyaluronic acid-alginate porous scaffold and evaluation for in vitro stem cell growth and in vivo tissue integration*. **Colloids and surfaces. B, Biointerfaces**. 1(116), 502–509, 2014.
- [73] Huang W, Shi X, Ren L, Du C, Wang Y. *PHBV microspheres – PLGA matrix composite scaffold for bone tissue engineering*. **Biomaterials**. 31(15), 4278–4285, 2010.
- [74] Fu S, Ni P, Wang B, Chu B, Peng J, Zheng L, Zhao X, Luo F, Wei Y, Qian Z. *In vivo biocompatibility and osteogenesis of electrospun poly(ϵ -caprolactone)–poly (ethylene glycol)–poly(ϵ -caprolactone)/nano-hydroxyapatite composite scaffold*. **Biomaterials**. 33(33), 8363–8371, 2012.
- [75] Qian N L, Zhang H. *One-step synthesis of protein-encapsulated microspheres in a porous scaffold by freeze-drying double emulsions and tuneable protein release*. **Chemical Communication**. 49, 8833-8835, 2013.
- [76] Lee G-S, Park J H, ShinmU S, Kim H W. *Direct deposited porous scaffolds of calcium phosphate cement with alginate for drug delivery and bone tissue engineering*. **Acta Biomaterial**. 7(8), 3178-3186, 2011.
- [77] Zhu M, Zhang G L, He Q, Zhao J, Guo L, Shi J. *Mesoporous bioactive glass-coated poly (L-lactic acid) scaffolds: A sustained antibiotic drug release system for bone repairing*. **Journal of Materials Chemistry**. 21(4), 1064–1072, 2011.
- [78] Whang K, Healy K E, Elenz D R, Name E, Tsai D C, Thomas C H, Nuber G, Glorieux F, Travers R, Sprague S. *Engineering Bone Regeneration with Bioabsorbable Scaffolds with Novel Microarchitecture*. **Tissue Engineering**. 5(1), 35–51, 1999.
- [79] Yang S, Leong K F, Du Z, Chua C K. *The Design of Scaffolds for Use in Tissue Engineering. Part I. Traditional Factors*. **Tissue Engineering**. 7(6), 679–689, 2001.
- [80] Zeltinger J, Sherwood J K, Graham D A, Müller R, Griffith L G. *Effect of Pore Size and Void Fraction on Cellular Adhesion, Proliferation, and Matrix Deposition*. **Tissue Engineering**. 7(4), 557–572, 2001.
- [81] Van Tienen T G, Heijkants R, Buma P, De Groot J H, Pennings A J, Veth R P. *Tissue ingrowth and degradation of two biodegradable porous polymers with different porosities and pore sizes*. **Biomaterials**. 23(8), 1731–1738, 2002.
- [82] Ungaro F, Biondi M, Indolfi L, De Rosa G, La Rotonda M I, Quaglia F, Netti P. *Bioactivated Polymer Scaffolds for tissue Engeeniering*. En; **Topics in Tissue Engineering. Volume 2, chapter 5** Ed; N. Ashammakhi and R.L. Reis. Napoli Italia 2005.
- [83] Prakriti T, Money J D. *Controlled Growth Factor Delivery for Tissue Engineering*. **Advanced materials (Deerfield Beach, Fla.)**. 21(32-33), 2009.

- [84] Hoppe A, Bocaccini A R. *Bioactive glass foams for tissue engineering applications*. En; **Biomedical Foams for Tissue Engineering Applications**, Ed. Netti P A. 191-212, 2014.
- [85] Vallet-Regi M, Manzano García M, Moreno E, Molina J Manso D. *Materiales bioceramicos para el tratamiento de osteomielitis*, **Madrid, Patente: W02012168512**, 2012. September 2011.
- [86] Nandi S, Mukherjee P, Roy S, Kundu B, Kumar D, Basu D. *Local antibiotic delivery systems for the treatment of osteomyelitis – A review*. **Materials science & engineering. C, Materials for biological applications**. 29(8),2478-2485, 2009.
- [87] Vand De Belt H, Neut D, Schenk W, Horn J, Neut D. *Infection of orthopedic implants and the use of antibiotic-loaded bone cements: A review*. **Acta Orthopaedica Scandinavica**. 72(6), 557-571, 2002.
- [88] Klemm K. *The use of antibiotic-containing bead chains in the treatment of chronic bone infections*. **Clinical Microbiology and Infection**. 7(1), 28–31, 2001.
- [89] Jiang P J, Patel S, Gbureck U, Caley R, Grover L M. *Comparing the efficacy of three bioceramic matrices for the release of vancomycin hydrochloride*. **Journal of biomedical materials research. Part B Applied biomaterials**. 93(1), 51–58, 2010.
- [90] Ipsen T, Jorgensen P S, Damholt V, Torhol C. *Gentamicin-collagen sponge for local applications. 10 cases of chronic osteomyelitis followed for 1 year*. **Acta Orthopaedica Scandinavica**. 62(8), 592–594, 1991.
- [91] Kalellakopoulou K, Galanakis N, Giamarellos-Bourboulis E J, Rifiotis C, Papakostas K, Andreopoulos A, Dounis E, Karagianakos P, Giamarellou H. *Treatment of experimental osteomyelitis caused by methicillin-resistant Staphylococcus aureus with a biodegradable system of lactic acid polymer releasing pefloxacin*. **Journal of Antimicrobial agents and chemotherapy**. 46, 311–314, 2000.
- [92] Xia W, Chang J. *Preparation, in vitro bioactivity and drug release property of well-ordered mesoporous 58S bioactive glass*. **Journal of Non-Crystalline Solids**. 354(12-13), 1338–1341, 2008.
- [93] Zhao L, Yan X, Zhou X, Zhou L, Wang H, Tang J, Yu C. *Mesoporous bioactive glasses for controlled drug release* **Microporous and Mesoporous Materials**. 109(1-3), 210-215, 2008.
- [94] Ramos Picos D, Gómez Carril M, Fernández Mena D. *Métodos de obtención de microesferas biodegradables*. **Revista Cubana de Farmacéutica**. 35 (2) 126-135, 2001.
- [95] Vallet Regi M. *Biomateriales para sustitución y reparación de tejidos*. **Ph. D thesis**. Departamento de Química Inorgánica y Bioinorgánica. Facultad de Farmacia. Universidad Complutense. Madrid. 2008.
- [96] Flores Belmont I A, Jiménez Mungía M T. *Microencapsulación de compuestos activos con quitosano*. **Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos**. 7(1), 48–56, 2013.

- [97] Agnihotri S A, Mallikarjuna N N, Aminabhavi T M. *Recent advances on chitosan-based micro- and nanoparticles in drug delivery*. **Journal of Control Release**. 100(1), 5–28, 2004.
- [98] Kato Y, Onishi H, Machida Y. *Application of Chitin and Chitosan Derivatives in the Pharmaceutical Field*. **Current pharmaceutical biotechnology**. 4(5), 303–309, 2003.
- [99] Olivera A D, Barreiro M F, Lopretti M. *Proteínas de actividad biológica micro encapsuladas, ultraestructura y distribución de carga*. **Revista Iberoamericana de Polímeros**. 15(4), 219–228, 2014.
- [100] Ventura C, Cannava C, Stancanelli R, Paolina D, Cosco D, La Mantia A, Pignatello R, Tommasini S. *Gemcitabine-loaded chitosan microspheres. Characterization and biological in vitro evaluation*. **Biomedical Microdevices**. 13(5), 799–807, 2011.
- [101] Olivera A D, Lopretti M. *Microesferas De Quitosano Como Potenciales*. **Revista Iberoamericana de Polímeros**. 13(5), 238–244, 2012.
- [102] Garud N, Garud A. *Preparation and In-vitro Evaluation of Metformin Microspheres Using Non-Aqueous Solvent Evaporation Technique*. **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**. 11(4), 577–583, 2012.
- [103] Badhana S, Garud N, Garud A. *Colon specific drug delivery of mesalamine using eudragit S100-coated chitosan microspheres for the treatment of ulcerative colitis*. **International Current Pharmaceutical Journal**. 2(3), 42-48, 2013.
- [104] Song Y, Tan S, Sun J, Zhang J, Wu M, Wu Q, Yang J. *Synthesis and sustained-release property of drug-loaded chitosan microspheres by spray drying technique*. **American Journal of Macromolecular Science**. 2(1), 1-10, 2015.
- [105] García C J, Bada Rivero N, López Hernández O, Nogueira Mendoza A, Caracciolo P, Abraham G, Ramón J, Peniche C. *Recubrimiento de microesferas de quitosana-ibuprofeno con un complejo Inter polimérico pH dependiente*. **Revista Cubana de Farmacéutica**. 488(1), 646–657, 2014.
- [106] Sinha V R, Singla A K, Wadhawan S, Kaushik R, Kumria R, Bansal K, Dhawan S. *Chitosan microspheres as a potential carrier for drugs*. **International journal of pharmaceuticals**. 274(1-2), 1–33, 2004.
- [107] Fuentes C, Von Plessing C, Fernández M. *Desarrollo y evaluación de microesferas biodegradables para la liberación prolongada de pramipexol (Development and evaluation of sustained-release pramipexole-loaded biodegradable microspheres)*. **Revista Farmaceutica de Chile**. 7(3), 25–32, 2014.
- [108] Sriamornsak P, Konthong S, Burapapadh K, Sungthongjeen S. *Drug-Loaded Pectin Microparticles Prepared by Emulsion-Solvent Evaporation*. **Advance Materials Research**. 506, 282–285, 2012.

- [109] Banerjee P, Deb J, Roy A, Ghosh A, Chakraborty P. *Fabrication and Development of Pectin Microsphere of Metformin Hydrochloride*. **International Scholarly Research Network Pharmaceuticals**. 2012(1), 1–7, 2012.
- [110] Baracat M M, Nakagawa A M, Casagrande R, Georgetti S R, Verri W A, De Freitas O. *Preparation and Characterization of Microcapsules Based on Biodegradable Polymers: Pectin/Casein Complex for Controlled Drug Release Systems*. **American Association of Pharmaceutical Scientists Technology**. 13(2), 364–372, 2012.
- [111] Paharia A, Yadav A K, Rai G, Jain S K, Pancholi S S, Agrawal G P. *Eudragit-coated pectin microspheres of 5-fluorouracil for colon targeting*. **American Association of Pharmaceutical Scientists Technology**. 8(2), 87-93, 2007.
- [112] Isaac B, Cristerna C, Pozos Guillen A, Quintana Ruiz M, Flore Reyes H. *Síntesis y caracterización de microesferas de ácido poli (d, l – láctico – co – glicólico) cargadas con albúmina sérica de bovino*. **Revista Iberoamericana de Polímeros**. 15(6), 301–311, 2014.
- [113] Thanoo B C, Sunny M C, Jayakrishnan A. *Cross-linked Chitosan Microspheres: Preparation and Evaluation as a Matrix for the Controlled Release of Pharmaceuticals* **Journal of Pharmacy and Pharmacology**. 44(4), 283-286, 1992.
- [114] Paventto F, Conti B, Genta I, Giunchedi P. *Solvent evaporation, solvent extraction and spray drying for polylactide microsphere preparation*. **International Journal of Pharmaceutics**. 84(4), 151–159, 1992.
- [115] Sáez V, Hernández E, Sanz L, Katime I. *Liberación controlada de fármacos. micropartículas*. **Revista Iberoamericana de Polímeros**. 5, 87–101, 2004.
- [116] Saez V, Hernández J R, Peniche C. *Las microesferas como sistemas de liberación controlada de péptidos y proteínas*. **Biotecnología Aplicada**. 24, 98–107, 2007.
- [117] Tsaid C, Howards S A, Hogan T F, Malanga C J, Kandzari S J, Ma J K. *Preparation and in vitro evaluation of polylactic acid-mitomycin C microcapsules*. **Journal of Microencapsulation**. 3(5), 181–193, 1986.
- [118] Sinha V R, Trehan A. *Biodegradable microspheres for protein delivery*. **Journal of Control Release**. 90(8), 261–280, 2003.
- [119] López Hernández O D, Gómez Carril M. *Preparación de microesferas mediante secado por aspersión Preparation of microspheres through spray drying*. **Revista Cubana de Farmacia**. 42(3), 18-31, 2008.
- [120] Ike O, Shimizu Y, Ikada Y, Watanabe S, Natusume T, Wada R, Hyon S H, Hitomi S. *Biodegradation and antitumour effect of adriamycin-containing poly (l-lactic acid) microspheres*. **Biomaterials**. 12(18), 757–762, 1991.
- [121] Ike O, Shimizu Y, Ikada Y, Watanabe S, Natusume T, Wada R, Hyon S H, Hitomi. *Treatment of Malignant Pleural Effusions with Doxorubicin Hydrochloride-Containing Poly (L-Lactic Acid) Microspheres*. **Chest Journal**. 99(4), 911–915, 1991.

- [122] Spenlehauer G, Veillard M, Benoit J P. Formation and characterization of cisplatin loaded poly(d,l-lactide) microspheres for chemoembolization. **Journal of Pharmaceutical Science**. 75, 750–755, 1986.
- [123] Verrijck R, Smolders I J H, Bosnie N, Begg A. *Reduction of systemic exposure and toxicity of cisplatin by encapsulation in poly-lactide-co-glycolide*. **Cancer Research Journal**. 52(5), 6653–6656, 1993.
- [124] Hirano M. *Studies on the new anticancer preparation, 5-fluorouracil-polyglycolic acid-composite and its therapeutic evaluation*. **Journal of the Japanese Surgical**. 85(12), 1508–1517, 1985.
- [125] Niwa T, Takeuchi H, Hino T, Kunou N, Kawashima Y. *Preparations of biodegradable nanospheres of water-soluble and insoluble drugs with D, L-lactide/glycolide copolymer by a novel spontaneous emulsification solvent diffusion method, and the drug release behavior*. **Journal of Control Release**. 25(4), 89–98, 1993.
- [126] Benita S, Benoit J P, Puisieux F, Thies C. *Characterization of Drug-Loaded Poly(d,l-lactide) Microspheres*. **Journal of Pharmaceutical Science**. 73(12), 1721–1724, 1984.
- [127] Singh U V, Udupa N. *In vitro characterization of methotrexate loaded poly(lactic-co-glycolic) acid microspheres and antitumor efficacy in Sarcoma-180 mice bearing tumor*. **Pharm. Pharmaceutica acta Helvetiae**. 72(3), 165–173, 1997.
- [128] Jacob E, Cierny G T, Fallon M F, Mcneill J, Siderys G. *Evaluation of biodegradable cefazolin sodium microspheres for the prevention of infection in rabbits with experimental open tibial fractures stabilized with internal fixation*. **Journal of Orthopaedic Research: Official Publication of the Orthopaedic Research Society**. 11(3), 404–411, 1993.
- [129] Teupe C, Meffert R, Winckler S, Ritzerfeld W, Törmälä P, Brug E. *Ciprofloxacin-impregnated poly-L-lactic acid drug carrier. New aspects of a resorbable drug delivery system in local antimicrobial treatment of bone infections*. **Archives of Orthopaedic and Trauma Surgery**. 112(1), 33–35, 1992.
- [130] Guiziou B, Armstrong D J, Elliott P N C, Ford J L, Rostron C. *Investigation of in-vitro release characteristics of NSAID-loaded polylactic acid microspheres*. **Journal of Microencapsulation**. 13(1), 701–708, 1996.
- [131] Conti B, Genta I, Modena T, Pavanetto F. *Investigation on Process Parameters Involved in Polylactide-Co-Glycolide Microspheres Preparation*. **Journal of Drug Development and Industrial Pharmacy**. 21(5), 615–622, 1995.
- [132] Polard E, Le Corre P, Chevanne F, Le Verge R. *In vitro and in vivo evaluation of polylactide and polylactide-co-glycolide microspheres of morphine for site-specific delivery*. **International Journal of Pharmaceutics**. 134(13), 37–46, 1996.
- [133] Zhong-Wei G, Wei-Ping Y, Ji-Yuan Y, You-Xin L, Xian-Li C, Ge-Wen Z, Xin-De F. *Biodegradable block copolymer matrices for long-acting contraceptives with constant release*. **Journal of Control Release**. 22(3), 3–14, 1992.

- [134] Sturesson C, Carlfors J, Edsman K, Andersson M. *Preparation of biodegradable poly(lactic-co-glycolic) acid microspheres and their in vitro release of timolol maleate.* **International Journal of Pharmaceutics.** 89(4), 235–244, 1993.
- [135] Vargas M P. *Intoxicación por acetaminofén en adulto.* **Medicina legal de Costa Rica.** 33(1), 1-7, 2016.
- [136] Giunchedy P, Conte U, Chetoni P, Saettone M, F. *Pectin microspheres as an ophthalmic carriers for piroxicam: evaluation in vitro and in vivo in albino rabbits.* **European Journal of Pharmaceutical Science.** 9(1), 1-7, 1999.
- [137] Banerjee P, Deb J K, Patel M M. *Formulation and in vitro characterization of spray dried microspheres of amoxicillin.* **Acta Pharmaceutical.** 60(4), 455-465, 2010.
- [138] Bodmeier R, McGinity J W. *Solvent selection in the preparation of poly(dl-lactide) microspheres prepared by the solvent evaporation method.* **International Journal of Pharmaceutics.** 43(4), 179–186, 1998.
- [139] Niu X, Feng Q, Wang M, Guo X, Zheng Q. *Porous nano-HA/collagen/PLLA scaffold containing chitosan microspheres for controlled delivery of synthetic peptide derived from BMP-2.* **Journal of Control Release** 134(7), 111–117, 2009.
- [140] Kucharska M, Walenko K, Butruk B, Brynk T, Heljak M, Ciach T. *Fabrication and characterization of chitosan microspheres agglomerated scaffolds for bone tissue engineering.* **Materials Letters.** 64(9), 1059-1062, 2010.
- [141] Hernández Cocolletzi H, Águila Almanza E, Flores Agustin O, Viveros Nava E L, Ramos Cassellis E. *Obtención y caracterización de quitosano a partir de exoesqueletos de camarón.* **Superficies y Vacío.** 22(3), 57–60, 2009.
- [142] Thompson J D, Hench L L. *Mechanical properties of bioactive glasses, glass-ceramics and composites.* **Proceedings of the Institution of Mechanical Engineers, Part H: Journal of Engineering in Medicine.** 212(2), 127-136, 1998.
- [143] Raval J A, Patel J K, Patel M M. *Formulation and in vitro characterization of spray dried microspheres of amoxicillin.* **Acta Pharmaceutics.** 60(4), 455-65, 2010.
- [144] Pradum P, Ige P, Agrawal K, Patil U. *Enhanced in vitro dissolution of Iloperidone using *Caesalpinia Pulcherrima* mucoadhesive microspheres.* **Journal of Basic and Applied Sciences.** 4(1), 26-32, 2015.
- [145] Baimark Y, Srisuwan Y. *Preparation of alginate microspheres by water-in-oil emulsion method for drug delivery: Effect of Ca²⁺ post-cross-linking.* **Elsevier Advanced Powder Technology.** 25(5), 1541-1546, 2014.
- [146] Qutachi O, Vetsch J R, Gill D, Cox H, Scurr D J. *Injectable and porous PLGA microspheres that form highly porous scaffolds at body temperature.* **Elsevier Acta Biomaterialia,** 10 (12), 5090-5098, 2014.

- [147] Qi F, Wu J, Yang J, Ma G, Su Z. *Mechanistic studies for monodisperse exenatide-loaded PLGA microspheres prepared by different methods based on SPG membrane emulsification*. **Elsevier Acta Biomaterialia**. 10(10), 4247-4256, 2014.
- [148] Vaidya A, Jain S, Agrawal R K, Jain S K. *Pectin–metronidazole prodrug bearing microspheres for colon targeting*. **Journal of Saudi Chemical Society**. 19(3), 257-264, 2015.
- [149] Ghanbar H, Luo C J, Bakhshi P, Day R. *Preparation of porous microsphere-scaffolds by electrohydrodynamic forming and thermally induced phase separation*. **Materials science & engineering. C, Materials for biological applications**. 33(5), 2488-2498, 2013.
- [150] Lee C M, Kim D W, Lee H C, Lee K Y. *Pectin microspheres for oral colon delivery: Preparation using spray drying method and in vitro release of indomethacin*. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**. 9, 191–195, 2004.
- [151] Nayak U Y, Gopal S, Mutalik S, Ranjith A K, Reddy M S, Gupta P. *Glutaraldehyde cross-linked chitosan microspheres for controlled delivery of Zidovudine*. **Journal of Microencapsulation. Micro and Nano Carriers**. 26(3), 214-222, 2009.
- [152] Sacchetti M. *Thermodynamic analysis of DSC data for acetaminophen polymorphs*. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**. 63, 345–350, 2000.
- [153] Mura C, Nácher A, Merino V, Merino-Sanjuan M, Carda C, Ruiz A, Mancon M, Loy G, Fadda A M, Diez-Sales O N. *Succinyl-chitosan systems for 5-aminosalicylic acid colon delivery: in vivo study with TNBS-induced colitis model in rats*. **International Journal of Pharmacology**. 416, 145–154, 2011.
- [154] Sarmiento B, Martins S, Ribeiro A, Veiga F, Neufeld R, Ferrerira D. *Development and comparison of different nanoparticulate polyelectrolyte complexes as insulin carriers*. **International Journal of Peptide Research and Therapeutics**, 12, 131–138, 2006
- [155] Filho O P, La Torre G P, Hench L L. *Effect of crystallization on apatite-layer formation of bioactive glass 45S5*. **Journal of Biomedical Materials Research**. 30, 509-514, 1996
- [156] Liu X, Rahaman M N, Day D E. *Conversion of melt-derived microfibrillar borate (13-93B3) and silicate (45S5) bioactive glass in a simulated body fluid*. **Journal of Material Science and Material Medicine**. 24(3), 583-595, 2013.
- [157] Mondal T, Sunny M C, Khastgir D, Varma H K, Ramesh P. *Poly (l-lactide-co-ε-caprolactone) microspheres laden with bioactive glass-ceramic and alendronate sodium as bone regenerative scaffolds*. **Materials Science and Engineering**. 32, 697–706, 2012.
- [158] Srivastava A K, Ridhurkar D N, Wadhwa S. *Floating microspheres of cimetidine: formulation, characterization and in vitro evaluation*. **Acta Pharmaceutica**. 55(3), 277-285, 2005.
- [159] Patel K S, Patel M B. *Preparation and evaluation of chitosan microspheres containing narcodil*. **International Journal of Pharmaceutical Investigation**. 4(1), 32-37, 2014.

- [160] Mothial M, Nagalaskshmi M. *Optimization and characterization of chitosan microspheres of aceclofenac*. **International Journal of Pharma Sciences and Research**. 3(2), 305-315, 2012.
- [161] Pandey R, Khuller G K. *Chemotherapeutic potential of alginate-chitosan microspheres as anti-trabecular drug carriers*. **The Journal of antimicrobial chemotherapy**. 53(4), 635-540, 2010.
- [162] Dass R, Bhatt D C, Singh S K. *Design and evaluation of Nasal Delivery of Metoclopramide hydrochloride Microspheres*. **Asian Journal of Pharmacy and Pharmacology**. 4(3), 353-357, 2018.
- [163] Deligianni D D. *MWCNTs enhance hBMSCs spreading but delay their proliferation in the direction of differentiation acceleration*. **Cell Adh Migr**. 8(5), 487-492, 2014.
- [164] Bačáková L, Filová E, Rypáček F, Švorčík V, Starý V. *Cell Adhesion on Artificial Materials for Tissue Engineering*. **Physiol Res**. 53, 35-45, 2004.