



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN
NICOLÁS DE HIDALGO



INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN EN
METALURGIA Y MATERIALES

PROGRAMA DE MAESTRÍA EN METALURGIA Y CIENCIAS DE LOS
MATERIALES

“SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE ANDAMIOS FORMADOS POR AGREGADOS
NANOESTRUCTURADOS DE BIOVIDRIO 45S5, OBTENIDOS POR SÍNTESIS SOL-GEL
ACOPLADA A UN SECADO POR LIOFILIZACIÓN”

Tesis que para obtener el Grado de Maestro en Ciencias en Metalurgia y Ciencia de los
Materiales presenta:

Ing. Carlos Abraham Pérez Miranda

Director de Tesis

D.C. María Eugenia de la Salud Contreras García

Co-Director de Tesis

D.C. Rosa Elvira Núñez Anita



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO



Instituto de Investigación en Metalurgia y Materiales

Of. Núm. IIMM-ST-006-2020

DRA. MA. EUGENIA CONTRERAS GARCIA
DRA. ROSA ELVIRA NUÑEZ ANITA
DR. IGNACIO MEJIA GRANADOS
DR. JOSE LEMUS RUIZ
DR. GERARDO ANTONIO ROSAS TREJO
DR. JUAN ZARATE MEDINA

Por medio de la presente, me permito comunicar a Ustedes que han sido designados para formar parte de la mesa sinodal que realizará el examen de grado del **ING. CARLOS ABRAHAM PEREZ MIRANDA**, quien está inscrito en el programa de Maestría en Metalurgia y Ciencias de los Materiales. En este contexto, les pedimos hacer la revisión de tesis en tiempo y forma en **20 días hábiles** para culminar a la brevedad posible, pero con la seriedad debida, el proceso de titulación de la estudiante y cumplir con los indicadores que marca el CONACYT para continuar siendo un Programa reconocido como Posgrado Nacional de Calidad

Esperando contar con su valiosa participación, agradecemos la prioridad que en sus actividades le pueda dar a esta importante actividad académica.

Morelia Mich. a 16 de Junio de 2020

Dr. Arnoldo Bedolla Jacuinde
Sub-Director Técnico

Instituto de Investigación en Metalurgia y Materiales
Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo



*Instituto de Investigaciones Metalúrgicas
Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo
Edificio "U" Ciudad Universitaria
Morelia Mich. C.P. 58060
México.*

AGRADECIMIENTOS

A mis padres ya que me alentaron a continuar mi preparación y siempre han sido un apoyo incondicional para mi

A mis asesoras, la Doctora María Eugenia de la Salud Contreras García y la Doctora Rosa Elvira Núñez Anita por haberme transmitido sus conocimientos, así como su apoyo brindado para la realización de este proyecto

Al CONACYT por la beca de manutención durante mi periodo estudiantil

Al Instituto de investigación en metalurgia y materiales, particularmente a todos los profesores que hicieron posible mi desarrollo tanto personal como académico, así como a todo su personal, quienes hacen posible tener un instituto de calidad

Al Proyecto de investigación del “CONACYT CB - A1-S-36506” y al proyecto de Investigación de la “CIC”, por el financiamiento del proyecto.

ÍNDICE GENERAL

CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Justificación	1
1.2 Hipótesis	2
1.3 Objetivo general	2
1.3.1 Objetivos específicos	3
1.4 Metas científicas	3
CAPÍTULO II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	4
2.1 Biomateriales	4
2.1.1 Tipos de biomateriales	4
2.1.1.1 Materiales bioactivos	4
2.1.1.2 Materiales bioinertes/biotolerantes	5
2.1.1.3 Materiales biodegradables o bioabsorbibles	5
2.1.1.4 Biomateriales naturales	5
2.1.1.4.1 Polisacáridos	6
2.1.1.4.2 Proteínas	7
2.1.1.4.3 Polipéptidos	8
2.1.1.5 Biomateriales sintéticos	8
2.1.1.5.1 Cerámicos	8
2.1.1.5.2 Polímeros sintéticos	9
2.1.1.5.3 Metales	9
2.1.2 Biocompatibilidad	10
2.1.3 Ingeniería de tejidos	15
2.1.4 Andamios	18
2.2 Biovidrio 45S5	26
2.2.1 Propiedades	26
2.2.2 Aplicaciones	27
2.3 Síntesis Sol-Gel	28
2.3.1 Síntesis Sol-Gel asistida por freeze drying	31
2.3.2 Síntesis Sol-Gel asistida por spray drying	34
2.3.3 Técnica Sol-Gel asistida por microemulsión	36

2.4 Células	37
2.4.1 Cultivo	37
2.5 Modelos "in vitro" para el análisis de bioactividad	38
2.5.1 Soluciones amortiguadoras.....	38
2.5.2 Medio de cultivo DMEM.....	38
2.5.3 Fluidos corporales simulados	39
CAPÍTULO III. DESARROLLO EXPERIMENTAL.....	41
3.1 Reactivos	42
3.2 Obtención de andamios porosos de biovidrio 45S5	42
3.2.1 Síntesis de biovidrio 45S5 por la técnica sol-gel	42
3.2.2 Secado por liofilización	43
3.2.3 Formado de andamios	45
3.2.4 Tratamiento térmico	46
3.3 Caracterización	46
3.3.1 Microscopía electrónica de barrido	46
3.3.2 Espectroscopía dispersiva de electrones (EDS)	47
3.3.3 Difracción de rayos-X.....	47
3.3.4 Espectroscopía de transmisión de infrarrojo con transformada de Fourier	47
3.3.5 Determinación del área superficial específica del andamio	48
3.4 Bioactividad y citotoxicidad del andamio	48
3.4.1 Preparación de solución amortiguadora de trisaminometano (TRIS)	48
3.4.2 Cultivo de células	49
3.4.2.1 Preparación de solución amortiguadora de fosfatos	49
3.4.2.2 Conteo de células	49
3.4.2.3 Cultivo celular.....	51
3.4.3 Biofuncionalización	51
3.4.3.1 Colágeno hidrolizado tipo I	51
3.4.3.2 Cultivo celular de macrófagos de ratón	51
3.4.3.3 Evaluación de la variación de pH respecto al material	52
3.4.4 Evaluación de la citotoxicidad.....	52
3.4.4.1 Ensayo de viabilidad celular con DAPI ó (4',6-diamidino-2-fenilindol)	52

CAPÍTULO VI. RESULTADOS.....	54
4.1 Síntesis de biovidrio 45S5 mediante síntesis sol-gel acoplada a la técnica de secado por liofilización	54
4.1.1 Composición elemental	54
4.1.2 Estructura de los andamios	55
4.1.3 Análisis microestructural de los geles envejecidos a 24, 48 y 72 horas, así como tratados térmicamente a 650, 750 y 850 °C	57
4.1.4 EDS.....	66
4.1.5 Difracción de rayos-X.....	68
4.1.6 Espectroscopía de infrarrojo	80
4.1.7 Área superficial específica	81
4.1.8 Prensado con NaCl y evaluación de macroporosidad.....	82
4.2 Ensayos de bioactividad	87
4.2.1 Crecimiento de hidroxiapatita en los andamios de biovidrio	87
4.2.2 Evaluación de la variación de pH respecto al material	90
4.2.3 Difracción de rayos-X de los andamios con hidroxiapatita.....	90
4.3 Pruebas de viabilidad celular DAPI.....	93
4.4 Discusión general de resultados	95
CAPÍTULO V. CONCLUSIONES	99
RECOMENDACIONES Y TRABAJO FUTURO.....	100
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	101

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 2.1. Estructura de la quitina [10].	6
Figura 2.2. Estructura del colágeno tipo I [12].	7
Figura 2.3. Implantes dentales con raíz hecha de una aleación de titanio [23].	10
Figura 2.4. Empaquetamiento de los átomos de Ca, O, P y OH en la celda unitaria de la hidroxiapatita [34].	14
Figura 2.5. Tejido de ingeniería tríada de células, señales (proporcionadas químicamente por factores de crecimiento o físicamente por un bioreactor), y el andamio que actúa como una plantilla para la formación de tejido permitiendo que las células migren, se adhieran y produzcan tejido [36].	16
Figura 2.6. Resistencia mecánica contra su modulo de Young de los biomateriales más utilizados[37].	17
Figura 2.7. Representación esquemática de la localización quirúrgica de la interfase hueso-cartílago y el diseño del andamio [39].	18
Figura 2.8 Comparación modelos CAD, imagen del andamio y MEB [40].	20
Figura 2.9 Imágenes de MEB para los andamios de biovidrio (BG), Hidroxiapatita(HAP) e Hidroxiapatita dopada con Mg y Zn luego de dos días de inmersión en suero corporal simulado [41].	21
Figura 2.10 Imágenes de MEB para los andamios de biovidrio (BG), Hidroxiapatita(HAP) e Hidroxiapatita dopada con Mg y Zn, donde se muestran precipitados hexagonales [41].	22
Figura 2.11 Resultados del ensayo WST-8 para evaluar la proliferación celular sobre cada una de las variantes de los andamios [41].	22
Figura 2.12 Morfología de los andamios de biovidrio 45S5 obtenidos por Wei y col. [42].	23
Figura 2.13 Imágenes de MEB de la estructura del andamio [42].	24
Figura 2.14 Agregados de hidroxiapatita. imágenes obtenidas por MEB [42].	24
Figura 2.15 Viabilidad celular obtenida mediante la evaluación de citotoxicidad por MTT[42].	25
Figura 2.16 Ilustración de la estructura de un gel [54].	28

Figura 2.17 Ruta típica del proceso sol-gel para la obtención de diversos materiales [57].	30
Figura 2.18 Imágenes de MEB de los nanocompuestos de $\text{LiMnXFe}_1\text{-XPO}_4/\text{C}$ obtenidos por sol-gel asistido por liofilización [62].	33
Figura 2.19 Imágenes de MEB de los criogeles de carbono a diferentes condiciones [63].	34
Figura 2.20 Imágenes de MEB de las microesferas de sílice obtenidas por sol-gel asistida por aspersión [64].	35
Figura 2.21 Imágenes de (a) imágenes FIB de la muestra LFPb a través del método sol-gel-SD. (b) Imagen MEB del área [65].	36
Figura 3.1 Ruta de procesamiento sol-gel.	41
Figura 3.2 Cuadrantes de la cámara de Neubauer.	50
Figura 4.1 Comparación estructural de las rutas de obtención realizadas.	56
Figura 4.2 Imagen de MEB del material envejecido a 24 h y tratado a 650 °C.	57
Figura 4.3 Imagen de MEB del material envejecido a 24 h y tratado a 750 °C.	58
Figura 4.4 Imagen de MEB del material envejecido a 24 h y tratado a 850 °C.	59
Figura 4.5 Imagen de MEB del material envejecido a 48 h y tratado a 650 °C.	60
Figura 4.6 Imagen de MEB del material envejecido a 48 h y tratado a 750 °C.	61
Figura 4.7 Imagen de MEB del material envejecido a 48 h y tratado a 850 °C.	62
Figura 4.8 Imagen de MEB del material envejecido a 72 h y tratado a 650 °C.	63
Figura 4.9 Imagen de MEB del material envejecido a 72 h y tratado a 750 °C.	64
Figura 4.10 Imagen de MEB del material envejecido a 72 h y tratado a 850 °C.	65
Figura 4.11 Espectros obtenidos por dispersión de electrones, (a-c) 24 h de envejecimiento, (d-f) 48 h de envejecimiento, (g-i) 72 h de envejecimiento	67
Figura 4.12 Patrón de difracción de rayos-X para el material envejecido por 24 h y tratado a 650 °C.	68
Figura 4.13 Patrón de difracción de rayos-X para el material envejecido por 24 h y tratado a 750°C.	69

Figura 4.14 Patrón de difracción de rayos-X para el material envejecido por 24 h y tratado a 850 °C.	70
Figura 4.15 Patrón de difracción de rayos-X para el material envejecido por 48 h y tratado a 650 °C.	71
Figura 4.16 Patrón de difracción de rayos-X para el material envejecido por 48 h y tratado a 750 °C.	72
Figura 4.17 Patrón de difracción de rayos-X para el material envejecido por 48 h y tratado a 850 °C.	73
Figura 4.18 Patrón de difracción de rayos-X para el material envejecido por 72 h y tratado a 650 °C.	74
Figura 4.19 Patrón de difracción de rayos-X para el material envejecido por 72 h y tratado a 750 °C.	75
Figura 4.20 Patrón de difracción de rayos-X para el material envejecido por 72 h y tratado a 850 °C.	76
Figura 4.21 Patrones de difracción de rayos-X para los tratamientos hechos a 650 °C y diferentes condiciones de envejecimiento.	77
Figura 4.22 Patrones de difracción de rayos-X para los tratamientos hechos a 750 °C y diferentes condiciones de envejecimiento.	78
Figura 4.23 Patrones de difracción de rayos-X para los tratamientos hechos a 850 °C y diferentes condiciones de envejecimiento.	79
Figura 4.24 Espectros de infrarrojo por transformada de Fourier.	80
Figura 4.25 Gráfico de barras del área superficial específica obtenida por adsorción de nitrógeno.	81
Figura 4.26 Fotografías de los diferentes andamios, a) 10% NaCl, b) 20% NaCl, c) 30% NaCl y d) 40% NaCl.	82
Figura 4.27 Imagen de microscopía óptica de la macroporosidad del andamio e4.	83
Figura 4.28 Imágenes obtenidas de microscopía óptica de los diferentes andamios, a) e1, b) e2, c) e3 y d) e4.	84

Figura 4.29 Distribución de porosidades y contenidos de cloruro de sodio.....	85
Figura 4.30 Imágenes de MEB de la microestructura del andamio.....	86
Figura 4.31 Imágenes de MEB del gel envejecido a 24 h y sumergido en solución de TRIS-HCl durante 24 h.	87
Figura 4.32 Imágenes de MEB del gel envejecido a 48 h y sumergido en solución de TRIS-HCl durante 24 h.	88
Figura 4.33 Imágenes de MEB del gel envejecido a 48 h y sumergido en solución de TRIS-HCl durante 24 h.	89
Figura 4.34 Patrones de difracción de rayos-X correspondientes a 24 h de envejecimiento.	91
Figura 4.35 Patrones de difracción rayos-X correspondientes a 48 h de envejecimiento.	92
Figura 4.36 Patrones de difracción rayos-X correspondientes a 72 h de envejecimiento.	92
Figura 4.37 Micrografías de los núcleos celulares de lo macrófagos teñidos por DAPI.....	94

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 3.1 Reactivos utilizados en la síntesis.	42
Tabla 3.2 Tiempo de envejecimiento de los geles.	44
Tabla 3.3 Rutas de procesamiento y cantidad de templante.	45
Tabla 3.4 Condiciones del tratamiento térmico.	46
Tabla 4.1 Composición nominal 45S5 y composición obtenida por EDS.	54
Tabla 4.2 Evaluación de la variación de pH respecto al material.	90

RESUMEN

El vidrio bioactivo 45S5 fue desarrollado por Larry Hench en 1969, desde entonces este vidrio bioactivo ha sido ampliamente utilizado en ingeniería de tejidos para fabricar andamios porosos utilizados para favorecer la regeneración ósea debido a su capacidad para formar hidroxiapatita en presencia de fluido corporal. Sin embargo, el 45S5 comercial se fabrica mediante el proceso de fusión tradicional, el cual ofrece poca pureza como resultado de los pasos del proceso de molienda, pulido, tamizado, etc, así como poco control químico de los elementos que componen el biovidrio 45S5, particularmente el contenido de silicio se ve afectado debido al fenómeno de segregación a la temperatura de liquidus, además, el tamaño de partícula y la morfología no pueden manipularse con tanta facilidad como en la síntesis sol-gel.

En este trabajo se estudiaron dos rutas de obtención de andamios de biovidrio 45S5 mediante síntesis sol-gel asistida por liofilización para obtener una porosidad jerárquica, además se estudió la influencia en la mesoporosidad y cristalinidad del tiempo de envejecimiento de los geles obtenidos mediante la síntesis sol-gel. Se funcionalizaron los andamios con colágeno tipo I para obtener una superficie óptima para el anclaje de las células. La morfología y la estructura cristalina se caracterizaron con microscopía electrónica de barrido (MEB) y difracción de rayos-X, la citotoxicidad del andamio se estudió mediante tinción celular (DAPI) de macrófagos de ratón en ensayos “*in vitro*”. En general los resultados indicaron que el tiempo de envejecimiento de los geles de biovidrio 45S5 controlan el grado de mesoporosidad presente en los andamios, así como la presencia de fase amorfa en los andamios, conforme el tiempo de envejecimiento del gel aumenta, la porosidad disminuye y la cristalinidad aumenta debido a la condensación del gel. Por otro lado, se observó que la ruta de obtención con cloruro de sodio en polvo, genera una estructura tipo esponja deseable para la formulación de los andamios.

Palabras clave: Biomateriales, sol-gel, liofilización, andamios cerámicos, biovidrio 45S5.

ABSTRACT

45S5 bioactive glass was developed by Larry Hench in 1969, since then this bioactive glass has been widely used in tissue engineering to make porous scaffolds, used to promote bone regeneration due to its ability to form hydroxyapatite in the presence of body fluid. However, the commercial 45S5 is manufactured through the traditional melting process, which offers low purity as a result of the process steps of grinding, polishing, sieving, etc., as well as little chemical control of the 45S5 bioglass elements. particularly the silicon content is affected by the phenomenon of segregation at liquidus temperature, furthermore, the particle size and the morphology cannot be manipulated as easily as in sol-gel synthesis.

In this work, two routes of obtaining 45S5 bioglass scaffolds were studied using sol-gel synthesis assisted by lyophilization to obtain a hierarchical porosity scaffolds, in addition, the influence on mesoporosity and crystallinity of the aging time of the gels obtained by sol-gel synthesis was studied. Scaffolds were functionalized with type I collagen to obtain an optimal surface for anchoring the cells. Morphology and crystal structure were characterized by scanning electron microscopy (SEM) and “x-ray” diffraction, the cytotoxicity of the scaffold was studied by cell staining (DAPI) of mouse macrophages in "in vitro" assays. In general, the results indicated that the aging time of 45S5 bioglass gels controls the porosity degree present in the scaffolds, as well as the presence of amorphous phase in the scaffolds, as the aging time of the gel increases, the porosity decreases and crystallinity increases due to condensation of the gel. On the other hand, it was observed that the route of obtaining with sodium chloride powder generates a desirable sponge-like structure for the formulation of the scaffolds.

Keywords: Biomaterials, sol-gel, freeze drying, ceramic scaffolds, bioglass 45S5

CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN

Dentro de la ingeniería de tejidos existe una vertiente específica que se enfoca en el desarrollo de andamios porosos cerámicos que propicien el crecimiento y regeneración ósea. Los criterios a seguir para el desarrollo y aplicación de estos andamios se pueden resumir en: la habilidad para liberar células (1), osteoconductividad (2), biodegradabilidad (3), propiedades mecánicas apropiadas (4) y un grado de porosidad alto (5) [1]. Se han fabricado andamios de materiales cerámicos basados en fosfatos de calcio y biovidrios, los cuales pueden proveer una mayor resistencia mecánica en comparación con aquellos andamios fabricados de polímeros, por estas razones se ha planteado obtener andamios de biovidrio 45S5 mediante síntesis sol-gel asistida por liofilización con y sin la adición de esferas de polimetilmetacrilato o cloruro de sodio en polvo como plantillas de sacrificio, con la finalidad de obtener diversos grados de porosidad.

1.1 Justificación

Debido al incremento en la expectativa de vida del ser humano, es necesario el desarrollo de implantes para el tratamiento de patologías propias de la degeneración del tejido.

En las últimas décadas la ingeniería de tejidos ha emergido y avanzado, prometiendo una brillante solución a la reparación y regeneración de tejidos y órganos dañados o perdidos completamente como resultado de enfermedades degenerativas así como de lesiones traumáticas. Se estima que al menos en los Estados Unidos de Norte América hay una incidencia de 6.2 millones de fracturas óseas por año [2]. México ocupa el octavo lugar en América Latina en defunciones ocasionadas por accidentes; el décimo segundo sitio en cuanto a años de vida saludable perdidos a causa de accidentes en general. Específicamente en México, los accidentes ocupan el séptimo lugar como causa de defunción; de ellos, los de tráfico alcanzan el quinto lugar, con el 40% sufridos por gente joven [3] debido a la alta incidencia de accidentes en el país es que los andamios de biovidrio 45S5 pueden ser empleados en el tratamiento de lesiones postraumáticas. En conjunto los andamios de biovidrio 45S5 funcionalizados con células, ofrecen una alternativa en el desarrollo de materiales que favorezcan la regeneración de tejidos dañados,

esta área de la ingeniería impacta fuertemente a la sociedad mediante el desarrollo de nuevas oportunidades para inducir la generación de tejidos óseos, luego de un traumatismo. En el presente trabajo se contribuye al desarrollo de las técnicas de procesamiento de andamios porosos, así como al conocimiento del comportamiento biológico de andamios de biovidrio 45S5 obtenidos mediante síntesis sol-gel acoplada a un secado por liofilización.s

1.2 Hipótesis

Se ha probado en diversos estudios que los andamios de biovidrio 45S5 con porosidad jerárquica, constituyen biomateriales, biocompatibles, bioabsorbibles, que se integran exitosamente, debido a estas características al tejido óseo, cuando son utilizados como andamios, función en la que la estructura jerárquica porosa, es fundamental.

En este estudio, se propone la síntesis sol-gel acoplada al secado por liofilización para la obtención de andamios de biovidrio 45S5 con porosidad jerárquica por lo que se espera que los andamios obtenidos mediante esta combinación de técnicas estén constituido de agregados nanoestructurados que posean poros interconectados.

Asimismo se espera que por medio de la combinación de estas técnicas de obtención y la variación de tiempos de envejecimiento del gel, se pueda lograr un material con una microestructura diseñada, sin que la estructura colapse durante el secado y tratamientos térmicos. Se espera que los andamios de biovidrio 45S5 obtenidos tengan una bioactividad buena y que estos no representen un agente nocivo para las células en cultivos “in vitro”.

1.3 Objetivo general

Elaborar andamios con una porosidad jerárquica de biovidrio 45S5 mediante de la técnica de síntesis sol-gel acoplada a un secado por liofilización, de igual manera, mediante la adición de dos diferentes templantes de sacrificio y evaluar las estructuras obtenidas de cada uno de estos templantes, finalmente, evaluar el comportamiento biológico de los andamios.

1.3.1 Objetivos específicos

1. Sintetizar biovidrio 45S5 vía sol-gel acoplada a un secado por liofilización.
2. Determinar los parámetros de síntesis y secado por liofilización.
3. Elaborar andamios con porosidad jerárquica a partir del biovidrio 45S5 liofilizado.
4. Caracterizar la morfología y microestructura de los andamios.
5. Caracterizar químicamente y cristalográficamente los andamios.
6. Evaluar la condensación de la fase de hidroxiapatita.
7. Evaluar la citotoxicidad con macrófagos de ratón.

1.4 Metas científicas

1. Obtener biovidrio nanoestructurado con mesoporosidad ($<50 \mu\text{m}$).
2. Obtener porosidad jerárquica en el andamio; mesoporos en las paredes del andamio y macroporos en la estructura, así como la composición química del andamio.
3. Obtener el andamio con la composición química del biovidrio 45S5.
4. Obtener porosidad jerárquica en el andamio; mesoporos en las paredes de la microestructura del andamio y macroporos en la estructura.
5. Obtener agregados del material con un tamaño menor a $1 \mu\text{m}$ así como poros interconectados entre sí, con una porosidad mayor o igual a 40%.
6. Obtener formación de hidroxiapatita en la superficie en un periodo menor a 5 días.
7. Obtener un porcentaje cercano al 100% de células vivas.

CAPÍTULO II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

En el presente capítulo, se abordarán conceptos y trabajos relevantes dentro del área de los biomateriales en general, así como trabajos específicos del área de los biomateriales vitro-cerámicos, con la finalidad de que el lector de este trabajo cuente con el conocimiento del estado actual en el que se encuentran los biomateriales, particularmente, los materiales constituidos de biovidrio 45S5 empleados para estimular la creación de hueso en los organismos vertebrados. De igual manera, dicho conocimiento servirá como una herramienta en la comprensión y juicio de los resultados obtenidos en el presente trabajo.

2.1 Biomateriales

Un biomaterial puede ser definido como un material sintético que ha sido diseñado para inducir una actividad biológica. La principal diferencia de los biomateriales con respecto al resto de los materiales, es la habilidad de permanecer en un ambiente biológico sin causar algún daño al sistema donde se encuentra [4].

2.1.1 Tipos de biomateriales

2.1.1.1 Materiales bioactivos

La reacción bioactiva pertenece a un tipo particular de materiales biocompatibles, que interactúan con las diferentes moléculas del huésped, iniciando una reacción que culmina con la unión directa del material a los diferentes tejidos del huésped, formando tanto enlaces químicos, como biológicos durante la primeras etapas de la implantación del material en cuestión [5].

2.1.1.2 Materiales bioinertes/biotolerantes

Dentro de los materiales biocompatibles, existe un gran grupo de materiales que debido a la poca o nula interacción que tienen estos con el huésped, se les atribuye el carácter de bioinertes. La reacción bioinerte o biotolerante es aquella reacción en la que no tienen lugar ningún tipo de interacción superficial entre el material implantado y los tejidos y/o fluidos del huésped [6].

2.1.1.3 Materiales biodegradables o bioabsorbibles

Se puede llegar a confundir entre un material “bioactivo” y un material “reabsorbible”, cuya característica principal es ser absorbido por el huésped con el paso del tiempo en forma gradual, hasta que finalmente, estos materiales desaparezcan completamente y en su lugar se obtengan tejidos nuevos que hayan reemplazado al material [7].

2.1.1.4 Biomateriales naturales

Los biomateriales naturales a menudo están compuestos por una matriz extracelular, que es un medio de integración fisiológico de naturaleza bioquímica compleja, en el que están "inmersas" las células.

El término “matriz celular” se ha aplicado a un grupo de proteínas extracelulares que no contribuyen directamente a la formación de elementos estructurales en los vertebrados, sin embargo, sirven para modular las interacciones célula-matriz y la función celular [8].

La composición específica y la estructura de la matriz variarán dependiendo del tejido fuente. Este tipo de materiales cada vez toman más auge en la medicina regenerativa debido a sus propiedades inductivas. La composición de los andamios de matriz extracelular incluye una mezcla compleja de moléculas arregladas en patrones tridimensionales únicos, que son ideales para el tejido del que se extrae. La matriz proporciona señales que indican la migración celular, la proliferación y la diferenciación de células.

Existen diversas proteínas que forman parte de una matriz extracelular, estas proteínas han sido empleadas tanto de manera individual, como de manera conjunta, actuando como sustratos para el anclaje y crecimiento celular, tal es el caso del colágeno tipo I, lamininas (grupo de

glucoproteínas de elevada masa molecular) y fibronectina (glicoproteína adhesiva presente en forma soluble en el plasma biológico e insoluble en la matriz extracelular de la mayoría de los tejidos), que han facilitado el apego, proliferación y diferenciación de células madre en líneas celulares específicas en ensayos "in vitro" [5].

La gran cantidad de polisacáridos con diferentes estructuras químicas y propiedades físicas constituyen una gran fuente de materiales para más aplicaciones en el futuro, especialmente en el dominio de biomateriales para ingeniería de tejidos, portadores de medicamentos, viscosuplementación (sustitución del ácido hialurónico natural en el líquido de las articulaciones que se degrada en gente que sufre osteoartritis), etc.

2.1.1.4.1 Polisacáridos

Los polisacáridos son moléculas formadas por la unión de varios monosacáridos entre sí. Existen dos grupos de polisacáridos, los homopolisacáridos, que como su nombre lo indica, están formados por monosacáridos iguales entre sí, y los heteropolisacáridos, que están formados por monosacáridos diferentes entre sí. Los polisacáridos son obtenidos mediante "biosíntesis" de plantas o animales [9].

La quitina por ejemplo, se localiza ampliamente en una gran cantidad de organismos vivos, considerando la cantidad de quitina que se produce anualmente esta se posiciona como el segundo polímero más abundante después de la celulosa, el monómero de la quitina se muestra en la **Figura 2.1**.

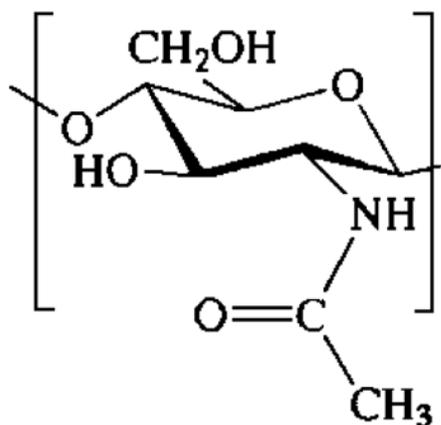


Figura 2.1. Estructura de la quitina [10].

La quitina en la naturaleza tiene forma de microfibras cristalinas y se encuentra principalmente en los exoesqueletos de los artrópodos, así como en la pared celular de algunos hongos y levaduras [10].

La quitina en conjunto con la hidroxiapatita y el quitosano puede ser usada como material de relleno en hueso formando una pasta autoendurecible para la regeneración guiada de tejido en tratamientos periodontales [11].

2.1.1.4.2 Proteínas

La proteína morfogenética ósea-2 (BMP-2 por sus siglas en inglés) es uno de los factores de crecimiento en regeneración celular más utilizados. Las proteínas endógenas BMP-2 se sintetizan dentro de las células como precursores, que contienen un péptido señal y un péptido maduro.

El colágeno es una proteína fibrosa que juega un papel importante en la regeneración de tejidos, en la **Figura 2.2** se muestra su estructura. El colágeno proporciona un microambiente biológico para el crecimiento celular y estimula la migración, la proliferación y unión celular [12]. El quitosano también altamente empleado en ingeniería de tejidos un efecto benéfico como promotor de curación de heridas, mejora las funciones de los fibroblastos, macrófagos y células inflamatorias [13], sin embargo, el efecto del quitosano puro en la promoción de la proliferación celular es limitado, y su biodegradabilidad depende de su grado de desacetilación [14].

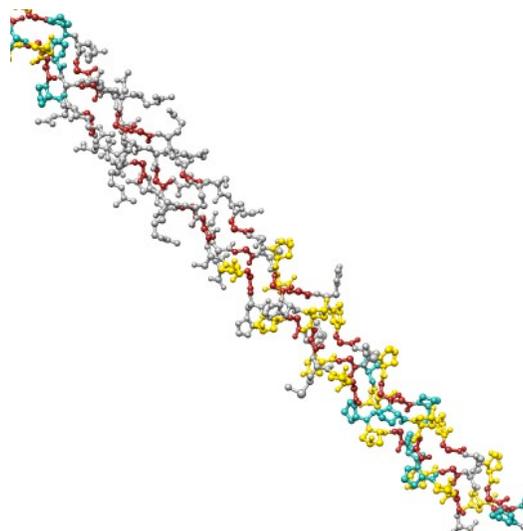


Figura 2.2. Estructura del colágeno tipo I [12].

2.1.1.4.3 Polipéptidos

Los péptidos se distinguen de las proteínas en dimensión, siendo los péptidos más pequeños (menor de 12,000 Da de masa) ,en adición las proteínas pueden estar formadas por la unión de varios polipéptidos y a veces grupos prostéticos(componente no aminoácido que forma parte de la estructura de las heteroproteínas).

El enlace peptídico es un enlace covalente entre el grupo amino ($-NH_2$) de un aminoácido y el grupo carboxilo ($-COOH$) de otro aminoácido

Un polipéptido, es una secuencia de aminoácidos que están vinculados a través de enlaces peptídicos [15].

2.1.1.5 Biomateriales sintéticos

Los biomateriales sintéticos, son materiales creados por el hombre para satisfacer una necesidad que los materiales naturales no podrían satisfacer. Los biomateriales sintéticos se dividen en cuatro grupos: metales, cerámicos, polímeros y compuestos.

2.1.1.5.1 Cerámicos

Los materiales cerámicos empleados en ingeniería de tejidos se dividen en tres tipos; cerámicos reabsorbibles, cerámicos bioactivos y cerámicos inertes.

Cerámicos bioactivos: cuando se implantan en hueso vivo, se forma un enlace químico para incorporar el material cerámico bioactivo en el tejido óseo, en otras palabras, el material reacciona con el huésped y forma una capa mineral similar al hueso.

Cerámicos reabsorbibles: este tipo de cerámicos se degradan en el organismo sin causar respuesta inmune del huésped.

Cerámicos inertes: son sumamente estables y no tienen interacción química con el medio que los rodea. La alúmina y zirconia son cerámicos inertes. Ciertas cerámicas de vidrio (45S5), hidroxiapatitas densas ($9CaO \cdot Ca(OH)_2 \cdot 3P_2O_5$), fosfatos semi-inertes (bioactivos) y de calcio,

fosfatos de aluminio-calcio, coralinos, fosfatos tricálcicos ($3\text{CaO P}_2\text{O}_5$) son cerámicos reabsorbibles [16, 17].

2.1.1.5.2 Polímeros sintéticos

Se entiende por polímeros sintéticos a todos aquellos que se obtienen mediante procesos químicos de polimerización y se pueden dividir en dos categorías de acuerdo a su reactividad en el organismo como biodegradables y no biodegradables.

Algunos polímeros no degradables incluyen; alcohol polivinílico, poli(hidroxietilmetacrilato) (PHEMA) y poli (N-isopropilacrilamida).

Algunos polímeros degradables incluyen; poli(α -hidroxi ésteres) como el ácido poliglicólico (PGA), la polilactida (PLA) y su copolímero poli(láctico-co-glicólico) (PLGA), polifosbenceno, polianhídrido, poli (fumarato de propileno), policianoacrilato, policaprolactona, polidioxanona, poliuretanos biodegradables, etc [18].

2.1.1.5.3 Metales

Dentro de los materiales inorgánicos, las aleaciones metálicas son muy importantes en el área biomédica ya que estas son empleadas para la fabricación de prótesis. El acero inoxidable es una aleación empleada en medicina gracias a su alta resistencia a la corrosión, particularmente el acero 316L de bajo contenido de carbono, su biocompatibilidad se debe a que en su superficie se forma una capa de óxido de cromo sumamente estable [19], la mayoría de los dispositivos de fijación interna como alambres, pasadores, tornillos, placas y clavos o varillas intramedulares están hechos, en su mayoría de metales como hierro (Fe), cromo (Cr), cobalto (Co), níquel (Ni), titanio (Ti), tántalo (Ta), niobio (Nb), molibdeno (Mo) y tungsteno (W) [20], algunos de los elementos metálicos mencionados son esenciales en las funciones de los seres vivos como es el caso del hierro que se encuentra en los glóbulos rojos, o el cobalto que interviene en la síntesis de vitamina B-12, sin embargo, estos no pueden ser tolerados en altas dosis en el organismo [21].

2.1.2 Biocompatibilidad

La biocompatibilidad es un concepto que se ha discutido ampliamente durante los últimos años, gracias a que las ciencias de la salud así, como la tecnología aplicada al área biomédica han crecido vastamente durante los últimos años, con el desarrollo de nuevos implantes y/o prótesis causando que el uso, aplicación y por supuesto el desarrollo de nuevos materiales con una biocompatibilidad sea cada vez mayor. Durante los últimos 50 años el concepto de biocompatibilidad ha sido motivo de discusión e investigación; acerca de los requerimientos que los materiales deben cumplir para ser implementados en diversas aplicaciones del área biomédica. Williams [22] ha definido de una manera sumamente sencilla y concisa el concepto de un material biocompatible de la siguiente manera: “Un biomaterial es una sustancia que ha sido diseñada para tomar una forma dada y que es utilizado para dirigir el curso de cualquier procedimiento terapéutico o de diagnóstico mediante el control de las interacciones del material con los componentes de los organismos vivos”. En la **Figura 2.3**, se ilustra cómo un implante dental hecho de aleaciones metálicas funge como una raíz artificial, la interacción que existe entre el material metálico y el huésped, implica corrosión biológica, esto ha sido observado en la mayoría de estudios "*in vivo*".



Figura 2.3. Implantes dentales con raíz hecha de una aleación de titanio [23].

Los tipos de corrosión documentados "*in vivo*" incluyen: (1) Disolución selectiva, (2) Corrosión por picaduras, (3) Corrosión por fricción, (4) Tribocorrosión, (5) Conversión directa a óxidos (aleaciones base Ti), (6) Corrosión bajo tensión inducida por óxidos (OISCC) (aleaciones base

Ti), (7) Corrosión intergranular (CoCrMo), (8) Ataque químico, (9) Corrosión por agrietamiento, y (10) Células inflamatorias inductoras de corrosión (CoCrMo) [23].

Es ineludible referirse a que aplicación en específico estará sometido el material en cuestión cuando se habla de biocompatibilidad, puesto que, esta determina el tipo de material y los parámetros bajo los cuales se desempeñará, esto se refleja en la definición empleada más ampliamente, la cual define la biocompatibilidad como “la habilidad de un material de desempeñarse apropiadamente con una respuesta favorable por parte del huésped en una aplicación específica” [24].

La implicación lingüística de la definición “biocompatibilidad” es que debería ser desaprobada dada la discrepancia que existe entre definiciones; sin embargo en los últimos 25 años esta definición se ha expandido en lugar de disminuirse. La coyuntura principal es que la biocompatibilidad es una característica compleja de un sistema y no de un solo material debido a la interacción entre el huésped y el material [25].

Otro concepto que es de vital importancia para esta investigación es “biorespuesta” el cual es una medida de la magnitud en la duración de los efectos adversos en los mecanismos homeostáticos que determina la respuesta del huésped. El propósito principal de la biorespuesta es predecir el comportamiento de los biomateriales o los dispositivos médicos que puedan presentar un potencial daño hacia el paciente.

En medicina regenerativa el uso de biomateriales es esencial para diversas aplicaciones como; portadores de material genético a implantes de ingeniería tisular que puedan contener materiales genéticos autólogos, alogénicos o xenogénicos, células, y materiales de andamios. Los andamios pueden estar compuestos por materiales sintéticos o naturales modificados. Las tres respuestas principales del cuerpo humano ante la evaluación de un biomaterial son la inflamación, curación de heridas y reacciones inmunológicas [26].

Los patólogos emplean los términos inflamación e inmunidad para denotar reacciones adversas en los tejidos, mientras que para los estudiosos de la inmunología se refieren a la inflamación como la reacción de activación inmune innata de los organismos vivos, ante la presencia de un agente nocivo y/o extraño en el cuerpo. Inmunotoxicidad son los sucesos adversos en función o

estructura del sistema inmune u otros sistemas como resultado de la disfunción del sistema inmune [27].

En el caso de los materiales empleados para unir superficies en el cuerpo como lo son los cementos, su función es mecánica, en lugar de biológica por lo tanto, en este sentido los conceptos de biocompatibilidad (comportamiento mecánico, porosidad, bioactividad, etc) no son empleados, sin embargo, la superficie del material juega un papel de suma importancia en el cual, la seguridad biológica es imprescindible, puesto que las superficies al estar en contacto con tejidos que, en la mayoría de los casos es óseo, requiere el análisis de la bioactividad, pero la realidad es que la bioactividad en las superficies de cementos se limita a un efecto marginal sobre la tasa de creación de hueso nuevo, que puede ser compensada por una degradación, reabsorción o deslaminación final del material, es decir que, la seguridad biológica está sujeta en gran medida a la química de los materiales, dado que, por efecto de los fenómenos de solvatación, oxidación entre otros, se llevan a cabo numerosas reacciones químicas dentro del huésped, lo cual se traduce en toxicidad hacia el mismo [28].

Por estos motivos se deben realizar diversas pruebas biológicas, ya sea "*in vitro*" o "*in vivo*" para evaluar la biocompatibilidad. Las pruebas "*in vitro*" (del latín: dentro del vidrio) son una serie de pruebas que tienen como finalidad la evaluación y adquisición de datos precisos de procesos biológicos individuales, motivo por el cual son realmente socorridas, pero este tipo de pruebas no aportan información clínica productiva del comportamiento de los biomateriales, así como lo hacen las pruebas "*in vivo*" (del latín: dentro de lo vivo), el principal inconveniente de estas pruebas son las regulaciones impuestas por diversos organismos de salud. Para una correcta evaluación de la biocompatibilidad de los biomateriales y la interacción con el huésped son necesarias ambas pruebas.

Algunos autores han desarrollado modelos experimentales "*in vitro*" para poder evaluar cuantitativamente los efectos tisulares con respecto a los biomateriales, tal es el caso de Loaiza y col. [29] que desarrollaron un modelo "*in vitro*" para evaluar cuantitativamente el efecto de los fármacos dirigidos a la proteostasis sobre las propiedades físicas de los tejidos. En el cual utilizaron una combinación de métodos de caracterización basados en la ciencia de materiales para demostrar, que un deterioro leve de la proteostasis intracelular puede modificar las

propiedades físicas del tejido en un modelo "*in vitro*" derivado de células que imita la formación de tejido óseo nativo.

Las pruebas "*in vitro*" se pueden complementar con las técnicas de caracterización de materiales, para tener un panorama más amplio acerca de los fenómenos que suceden en dichas pruebas [30]. Kokubo y col. [31] utilizaron modelos "*in vitro*" para reproducir una capa de hidroxiapatita, la cual se forma en la superficie de los andamios empleados para el crecimiento tisular óseo, en su discusión, prueban que la bioactividad de los biomateriales puede cuantificarse examinando la formación de la capa de hidroxiapatita en la superficie del material en una solución apropiada. De acuerdo a sus resultados, es necesario una cuidadosa selección de la solución a usar para una correcta evaluación y simulación "*in vitro*" de los procesos "*in vivo*".

La bioactividad de los biovidrios radica en el mecanismo de formación de una capa de sílice hidratada por policondensación de silanoles creados durante el intercambio iónico de protones para iones Na^+ del biovidrio. La alta área superficial y el bajo punto isoeléctrico proporcionan sitios de quimisorción para los iones de Ca^{2+} y P^{3-} los cuales nuclea cristales de hidroxicarbonato de apatita (HCA de sus siglas en inglés) [32].

En concreto para la bioactividad del biovidrio 45S5, algunos autores han realizado pruebas "*in vitro*" para demostrar la capacidad del biovidrio 45S5 para la formación de la capa de hidroxiapatita requerida en la regeneración de tejido óseo, tal es el caso de Adams y col. [33] que por medio de un modelo "*in vitro*" confirmaron la bioactividad de biovidrio 45S5 preparado con biosilice diatómica como fuente de silicio. Evaluaron la bioactividad de la muestra en suero corporal simulado, lo que conlleva a la formación de apatita con cambios del pH, concordando con un material cerámico o vítreo, que experimenta una reacción superficial en un fluido biológico para formar apatita. Compararon los resultados con los ya existentes del biovidrio procesado vía sol-gel empleando tetraetil ortosilicato (TEOS) como fuente de silicio, llegando a la conclusión de que el comportamiento de su biovidrio fue similar al preparado con TEOS, por lo tanto el uso de biosilice diatómica es posible para la sustitución del precursor más común que es el ortosilicato de tetraetilo (TEOS).

La hidroxiapatita es uno de los materiales cerámicos más utilizados para la fabricación de andamios cerámicos para la formación de hueso en concreto, ya que este material es el

componente inorgánico principal de la matriz mineralizada del hueso, la hidroxiapatita $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ pertenece al sistema hexagonal el grupo espacial P63/m del sistema hexagonal de apatitas está caracterizado por seis ejes que se doblan en tres ejes equivalentes con ejes a_1 , a_2 y a_x y ángulos a 120° uno de otro. La celda unitaria de estos puede contener 10 átomos calcio seis grupos fosfatos y dos grupos hidroxilo empaquetados compactamente como se muestra en la **Figura 2.4**.

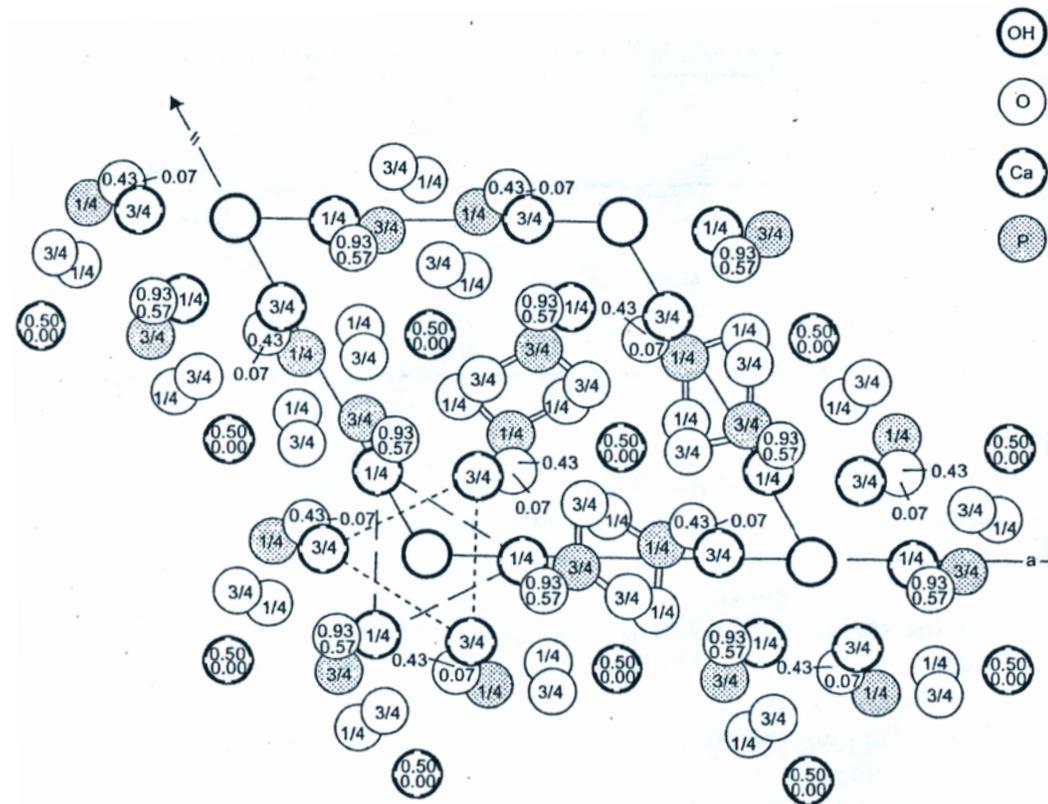


Figura 2.4. Empaquetamiento de los átomos de Ca, O, P y OH en la celda unitaria de la hidroxiapatita [34].

Se han desarrollado andamios porosos (77% porosidad) constituidos de hidroxiapatita a altas temperaturas, capaces de inducir la osteogénesis y con un buen comportamiento mecánico (17.4 MPa en compresión) [34].

De igual modo Faure y col. [35] demostraron por medio de pruebas "in vitro" la bioactividad de su biovidrio procesado por síntesis sol-gel usando un ácido orgánico como una opción para

sustituir al ácido nítrico como catalizador de reacción de hidrólisis, llegando a la conclusión de que la bioactividad de este biovidrio es mayor que la del biovidrio 45S5 comercial influenciada principalmente por el área superficial específica del material sinterizado en lugar de la presencia de la fase cristalina de combeita dentro del vidrio.

2.1.3 Ingeniería de tejidos

La ingeniería de tejidos es una rama de la ingeniería que busca mejorar los tratamientos actuales de la medicina regenerativa por medio del desarrollo de técnicas, que favorezcan la regeneración de tejidos o la emulación de tejido dañados. La ingeniería de tejidos es relativamente nueva, los primeros trabajos que aplicaban los conceptos de ingeniería de tejidos fueron desarrollados en la década de los ochenta. La primera formulación formal de esta disciplina se remonta al artículo de 1993 de los autores J. Vacanti & R. Langer publicado en la revista “*Science*” [2].

La ingeniería de tejidos es una ciencia multidisciplinaria en la cual se pueden remarcar tres grandes ciencias para el desarrollo de esta, estas son la ciencia de materiales, biología y bioquímica.

La ingeniería de tejidos en el área medica tiene gran importancia para diversos procedimientos quirúrgicos, particularmente el uso de la ingeniería de tejidos en esta área es la regeneración de tejido óseo, por lo tanto la discusión de esta sección estará basada en relación a la regeneración de tejido óseo ya que la finalidad de este proyecto de investigación es proporcionar una herramienta al cuerpo para la regeneración favorable y eficaz de tejido óseo [24].

El campo de la ingeniería de tejidos se basa en gran medida en el uso de andamios tridimensionales porosos para proporcionar el entorno adecuado para la regeneración de tejidos y órganos.

Se conoce cómo andamio a los materiales que tienen por función aportar el ambiente ideal para propiciar el crecimiento tisular y estos pueden o no estar funcionalizados con células que al proporcionarles un estímulo químico comiencen a generar tejido nuevo, esta combinación de

elementos se le conoce como triada de ingeniería de tejidos y esta ilustrado en forma de diagrama en la **Figura 2.5**.

Sin embargo, los andamios también están sujetos a esfuerzos mecánicos, por lo cual deben ser capaces de soportar ciertos esfuerzos al momento de estar en función, propiedades que dependen de la composición y la microestructura del material en cuestión.

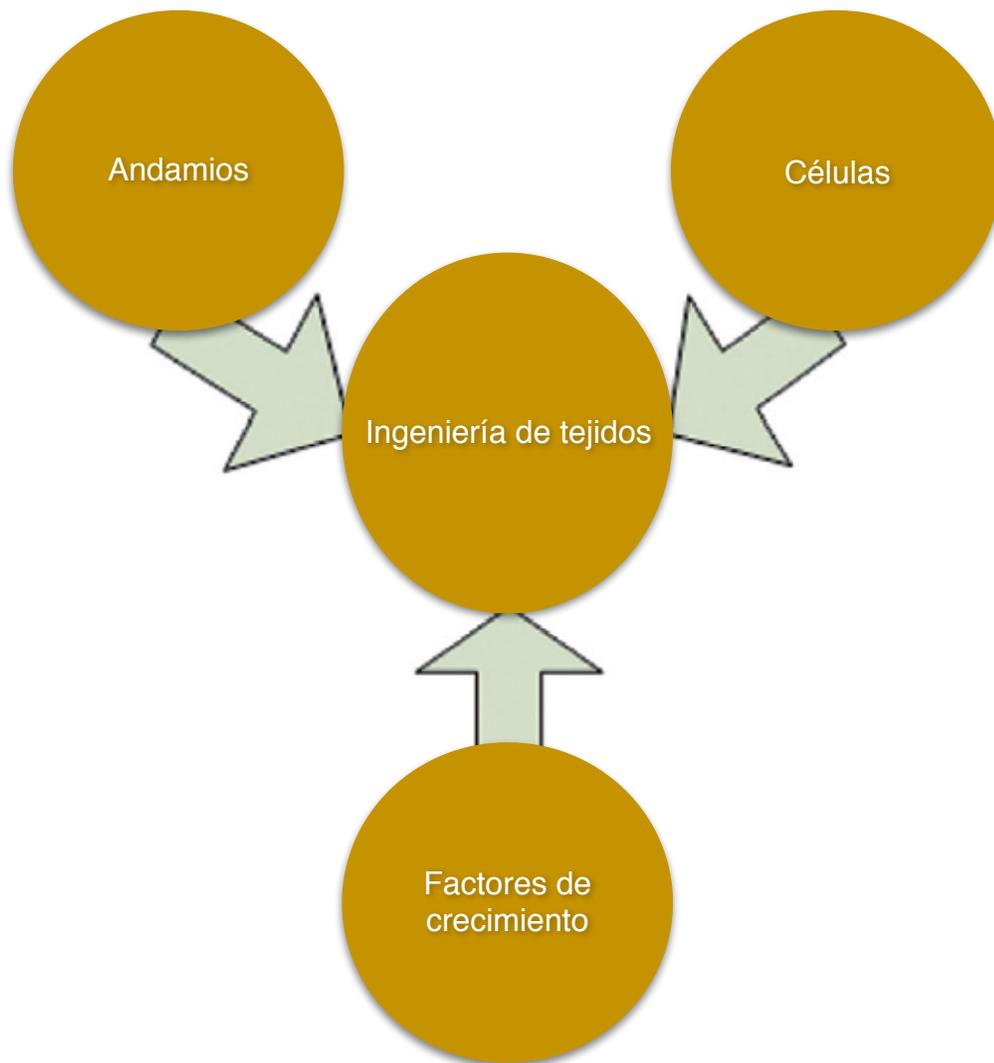


Figura 2.5. Tejido de ingeniería triada de células, señales (proporcionadas químicamente por factores de crecimiento o físicamente por un bioreactor), y el andamio que actúa como una plantilla para la formación de tejido permitiendo que las células migren, se adhieran y produzcan tejido [36].

La **Figura 2.6** muestra una gráfica que representa la resistencia y el módulo elástico de materiales naturales y sintéticos (típicamente con una microestructura densa que no contiene porosidad). Los andamios constituidos de biovidrio se ubican en la zona de materiales cerámicos la cual esta denotada en color verde en la **Figura 2.6**.

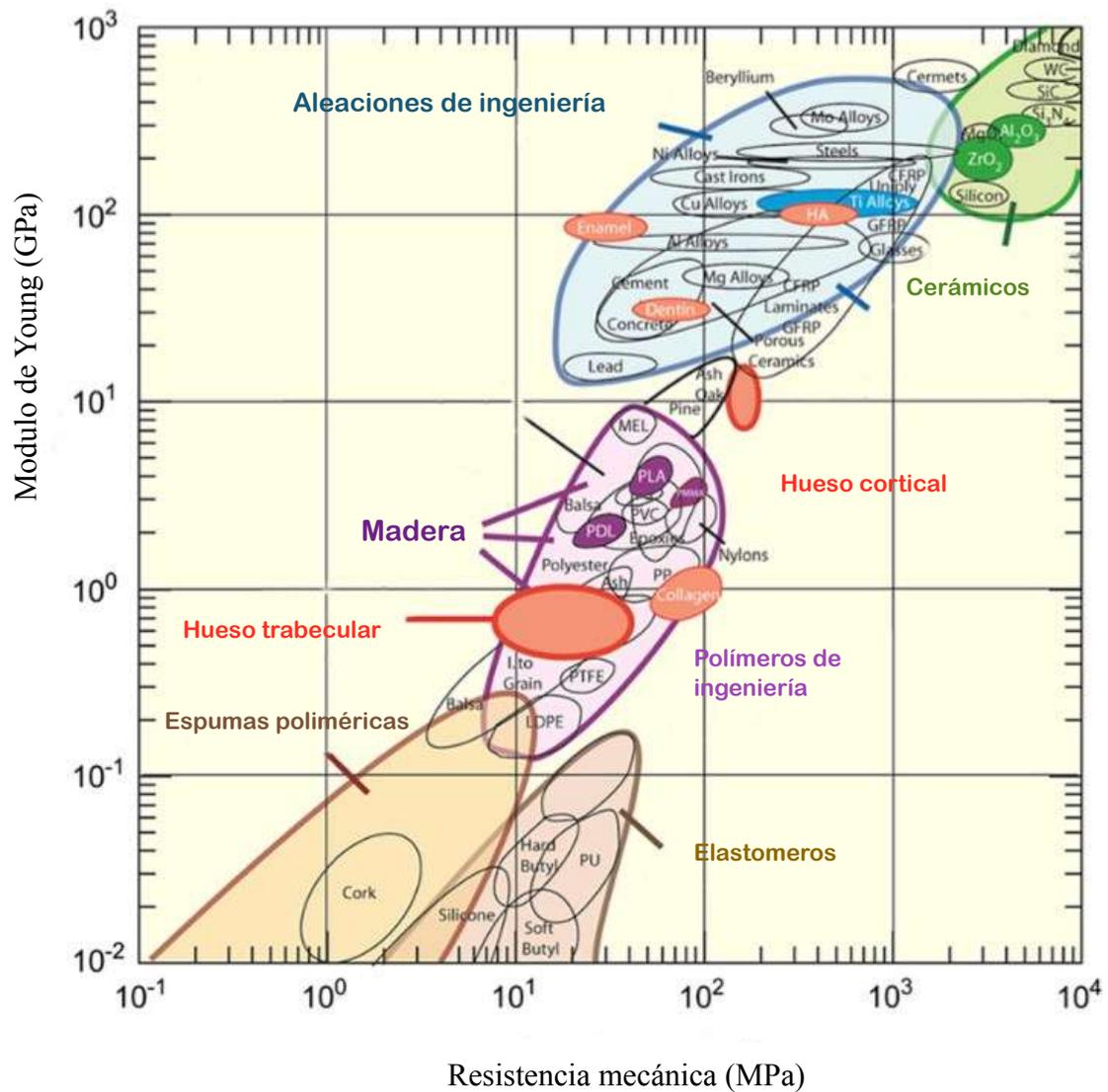


Figura 2.6. Resistencia mecánica contra su módulo de Young de los biomateriales más utilizados[37].

2.1.4 Andamios

Según los requerimientos tanto de estabilidad química, resistencia mecánica, biocompatibilidad etc, delimitan qué tipo de material será utilizado para conformar los andamios.

Los andamios por sus interacciones con la bioquímica del huésped, se dice que son reactores biológicos o bien algunos autores se refieren a ellos como bioreactores.

El diseño del andamio tanto la selección del material como el método de procesamiento del andamio, permiten que la ingeniería de tejidos en concreto, de tejido óseo determinen la arquitectura del andamio[38], en la **Figura 2.7** se muestra la morfología de una rotula ósea y la ubicación quirúrgica, así como la arquitectura de un andamio aplicado para la regeneración de tejido óseo, el cual esta denotado en color negro [39].

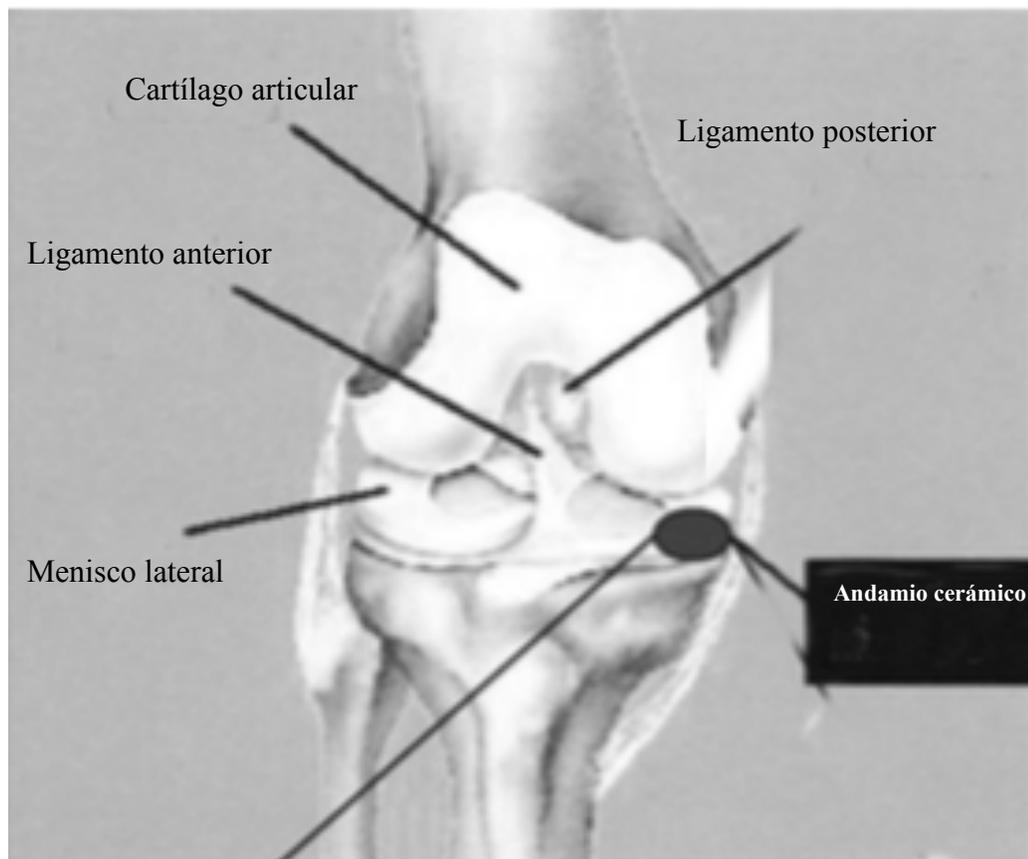


Figura 2.7. Representación esquemática de la localización quirúrgica de la interfase hueso-cartílago y el diseño del andamio [39].

Los andamios para ingeniería de tejidos, en particular para tejido óseo, demandan altos grados de porosidad de diversas escalas, para alojar células, así como para permitir el paso de fluidos. Esta porosidad debe ser similar a la porosidad que poseen los huesos, en concreto los huesos porosos, que contienen un grado de porosidad entre 50-70% del volumen total. Existen trabajos previos en los que se han desarrollado andamios porosos por diferentes técnicas de procesamiento, las son, en su mayoría partiendo de polvos del material del cual el andamio estará constituido, dichas técnicas son prensado de polvos, impresiones 3D, etcétera.

Castro y col. [40] emplearon la técnica de impresión 3D para fabricar andamios porosos cuya porosidad puede ser perfectamente diseñada a través de un software de desarrollo libre (Prontrface®), la impresora 3D empleada fue Solidoodle® 3D con un Láser de UV de estado sólido acoplado a fibra óptica de 110 μm (355 nm) (MarketTech, Scotts Valley, CA). Usaron una solución de hidrogel (60% en peso /en peso de diacrilato de polietilenglicol (PEG-Da, Mn = 700)) se seleccionó como material de matriz de impresión a granel para caracterizar la profundidad de curado la impresora y se utiliza para la incorporación de nanomateriales, un fotoiniciador, bis (2,4,6-trimetilbenzoil) -fenilfosfina (BAPO) (BASF, Florham Park, NJ), con excitación en el rango ultravioleta (UV) se añadió a la mezcla. Para la síntesis de nanoesferas de núcleo-cubierta de ácido poli(láctico-co-glicólico) (PLGA) encapsuladas con nHA y TGF- β 1 encapsuladas hidrotérmicamente; se emplearon 37,5 ml de una solución de fosfato de amonio 0.6 M (Sigma Aldrich, St. Louis, MO)se añadió a 375 ml de agua y se ajustó a pH 10 con hidróxido de amonio. Se añadió gota a gota una solución de nitrato de calcio 1 M (Sigma Aldrich, St. Louis, MO)en la mezcla. Fabricaron los andamios a través de una Impresora 3D SL de mesa. Como resultados obtuvieron andamios 3D con porosidad controlada y tres grados de porosidad; 40%, 60% y 80%, los cuales se muestran en la **Figura 2.8**.

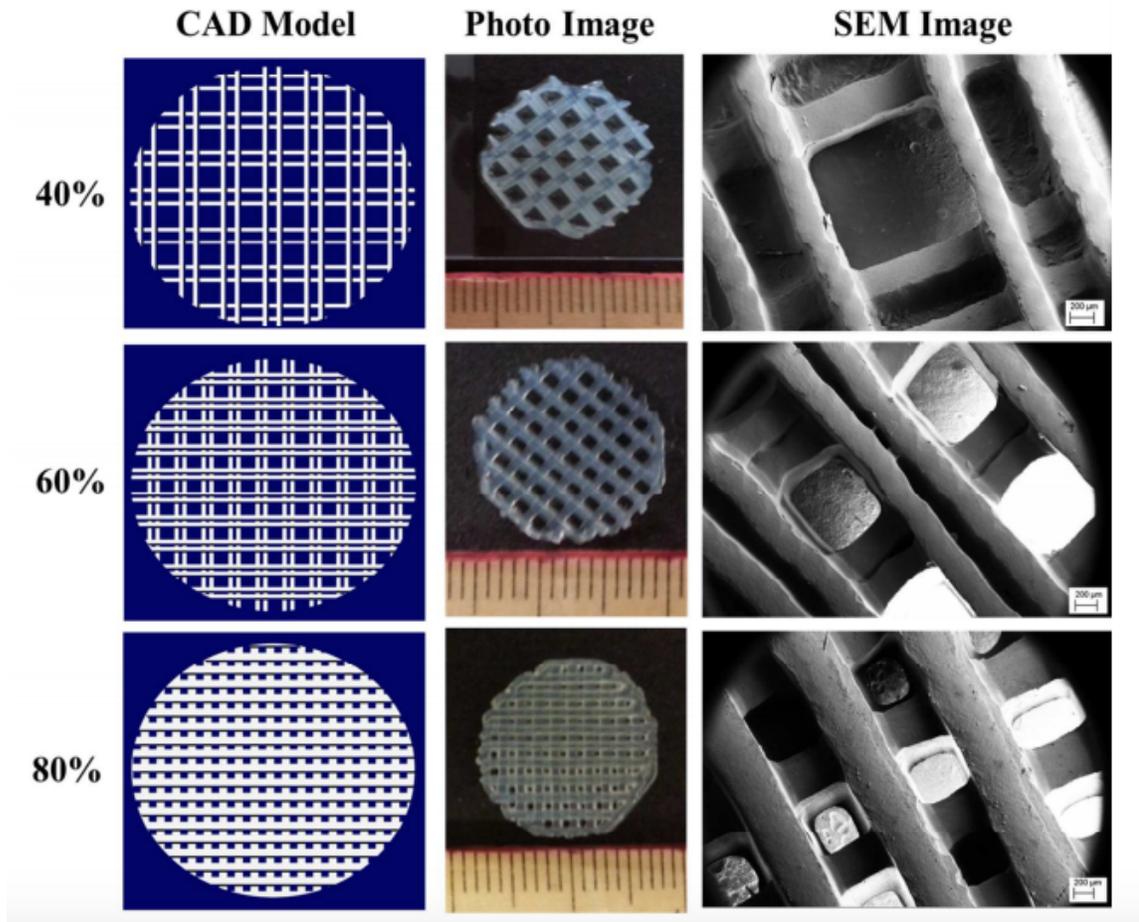


Figura 2.8 Comparación modelos CAD, imagen del andamio y MEB [40].

Dittler y col. [41] realizaron andamios tridimensionales basados en vidrio bioactivo (45S5) recubiertos con magnesio y zinc y nanopartículas de hidroxiapatita, emplearon polvos de biovidrio 45S5 en conjunto con una espuma de poliuretano para crear los andamios porosos, en adición con nanopartículas de hidroxiapatita dopadas con iones de Mg^{2+} y Zn^{2+} con la finalidad de modificar el parámetro de red de la hidroxiapatita, dicha sustitución tiene el objetivo de modificar el comportamiento de la hidroxiapatita en términos de su química de superficie (área superficial, adsorción y liberación de sustancias etc.) degradabilidad, mineralización y respuesta biológica. Demostraron que gracias a dicha sustitución de iones en la hidroxiapatita, no se observó un cambio en el grado de porosidad con respecto a los andamios fabricados sin esta sustitución (porosidad 92-94%) sin embargo, encontraron en las imágenes de microscopía electrónica de barrido que la nanoestructura presenta una porosidad entre los agregados como se ilustra en la **Figura 2.9**.

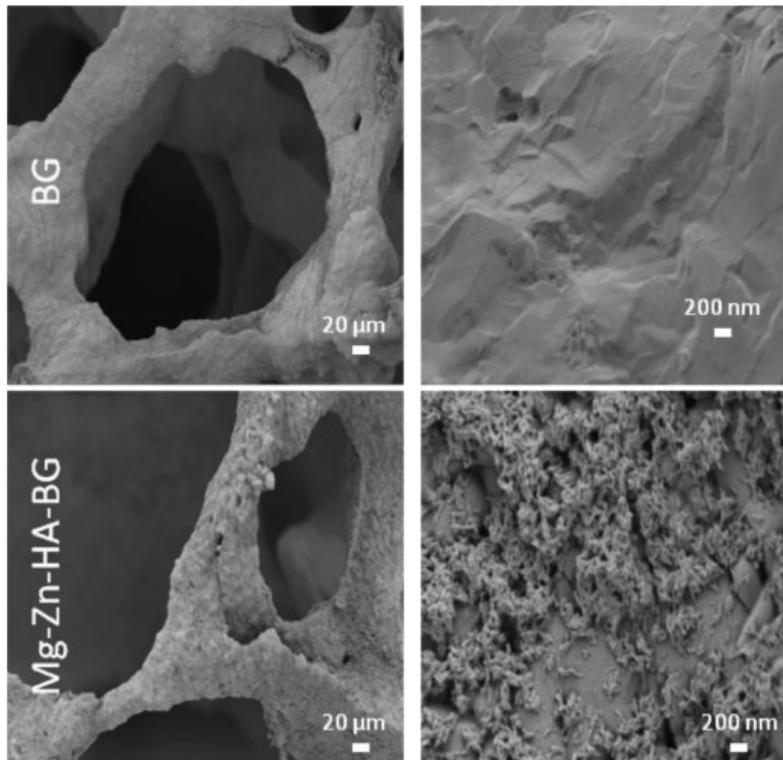


Figura 2.9 Imágenes de MEB para los andamios de biovidrio (BG), Hidroxiapatita(HAP) e Hidroxiapatita dopada con Mg y Zn luego de dos días de inmersión en suero corporal simulado [41].

En cuanto a la bioactividad y a al comportamiento del andamio en el suero corporal simulado, hallaron que luego de dos días de inmersión del andamio en el suero corporal simulado a 37 °C, se crearon estructuras hexagonales de precipitados en los andamios de biovidrio e hidroxiapatita (**Figura 2.10**), posteriormente se cultivaron osteoblastos humanos para evaluar la respuesta celular de los andamios (**Figura 2.11**) y se realizó un ensayo WST-8 de conteo celular para evaluar la proliferación celular sin encontrar ningún comportamiento errático en la proliferación celular sobre los andamios.

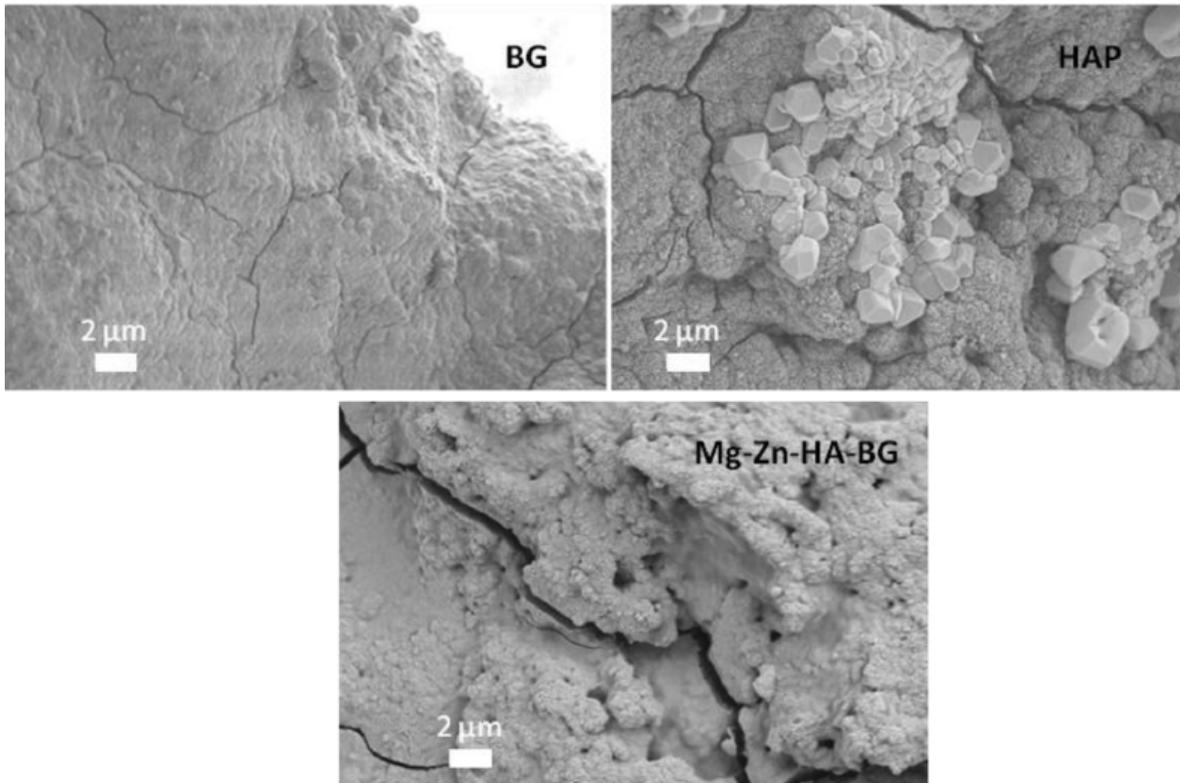


Figura 2.10 Imágenes de MEB para los andamios de biovidrio (BG), Hidroxiapatita(HAP) e Hidroxiapatita dopada con Mg y Zn, donde se muestran precipitados hexagonales [41].

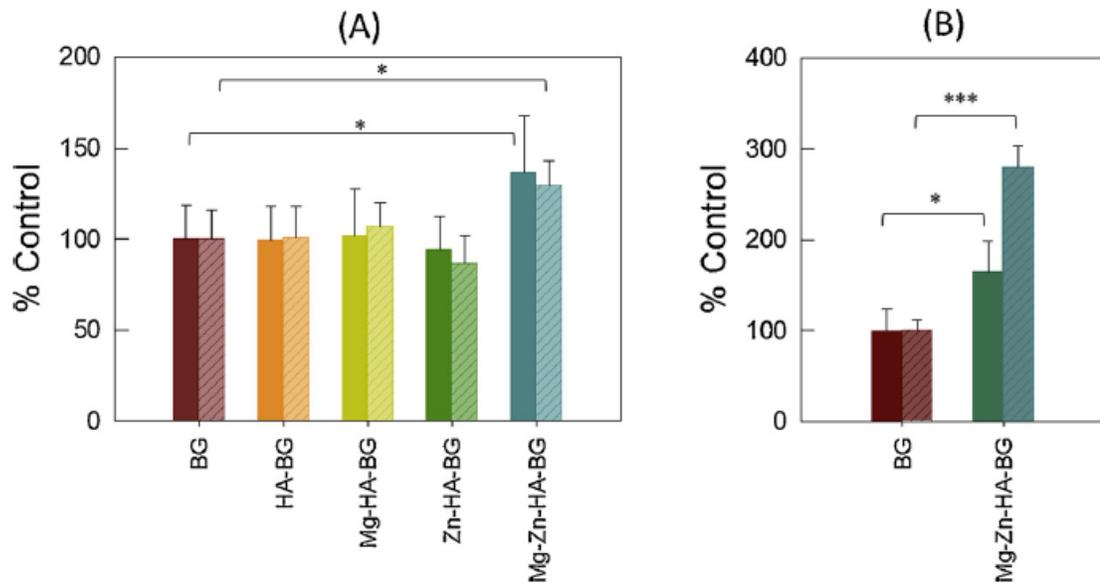


Figura 2.11 Resultados del ensayo WST-8 para evaluar la proliferación celular sobre cada una de las variantes de los andamios [41].

Wei Li y col. [42] realizaron andamios compuestos por polvos de biovidrio 45S5 obtenido por fusión con un tamaño de partícula aproximado de 5 μm y espuma de poliuretano, los andamios fueron fabricados por medio de la técnica de replicación de esponja, preparando una mezcla solución de alcohol polivinílico en agua (6% peso/volumen), posteriormente se añadieron los polvos de biovidrio a la solución acuosa (50% en peso) y finalmente se sumergió la espuma de poliuretano en la solución, el exceso de la solución remanente en la espuma fue removido, posteriormente se calentó el material compuesto a una temperatura de 400 $^{\circ}\text{C}$ para descomponer el poliuretano y se calcinó a 1100 $^{\circ}\text{C}$ por una hora para densificar el biovidrio, en la **Figura 2.12** se muestra la morfología del andamio obtenido.

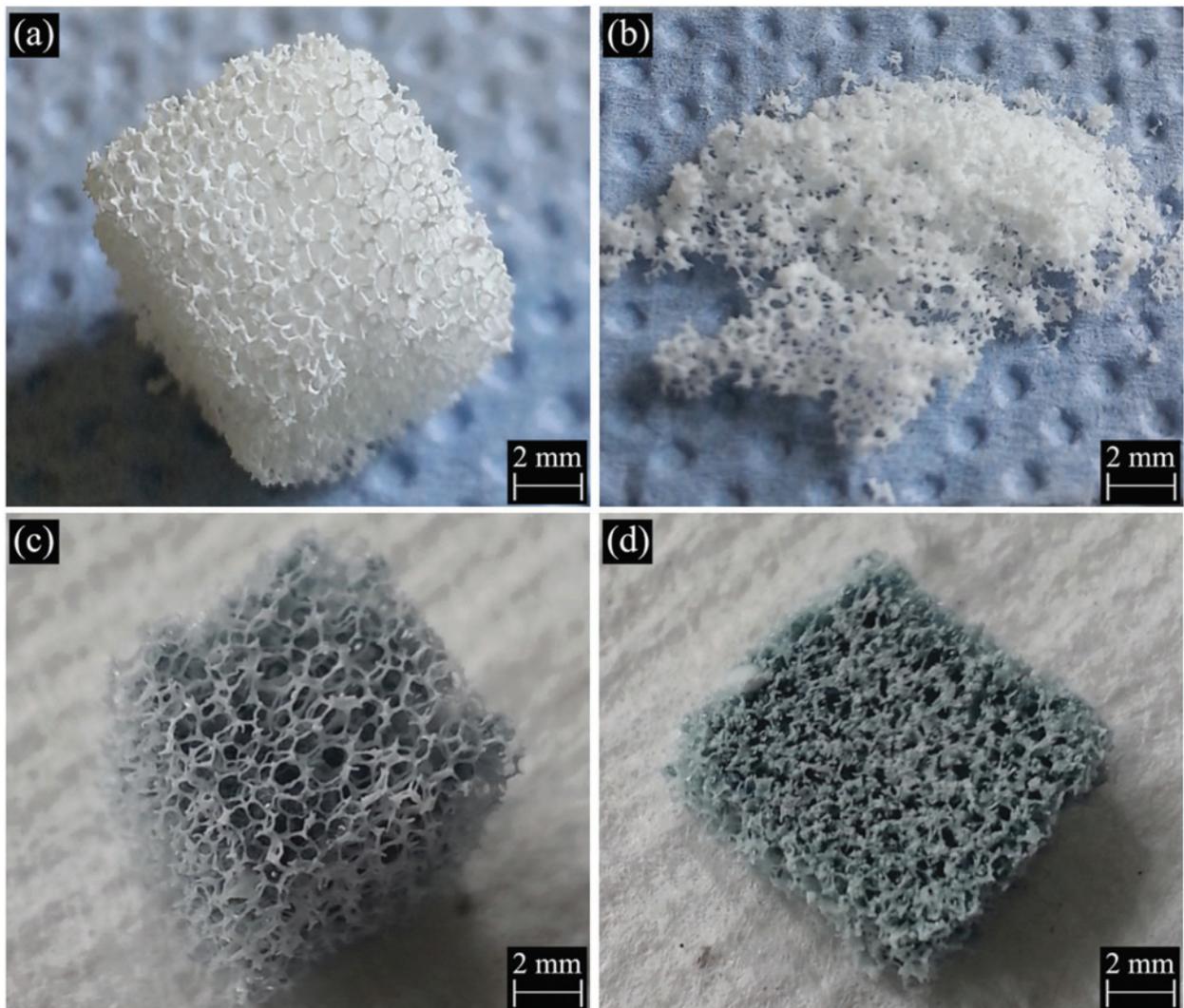


Figura 2.12 Morfología de los andamios de biovidrio 45S5 obtenidos por Wei y col. [42].

La microestructura resultante de los andamios se muestra en la **Figura 2.13**, donde se aprecia una interconectividad del andamio obtenido por el método de replicación.

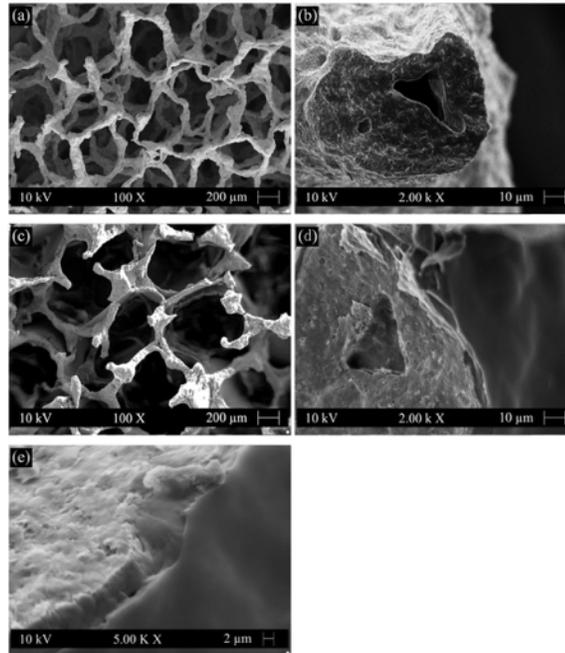


Figura 2.13 Imágenes de MEB de la estructura del andamio [42].

La **Figura 2.14** muestra la formación de agregados de hidroxiapatita sobre la estructura del andamio.

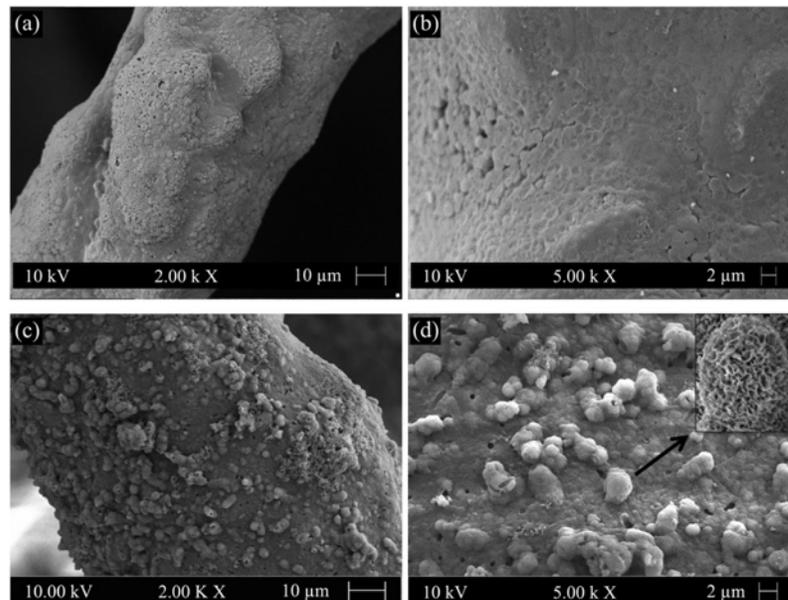


Figura 2.14 Agregados de hidroxiapatita. imágenes obtenidas por MEB [42].

Los andamios obtenidos fueron probados en cultivos *"in vitro"* con células MG-63 (fibroastos humanos) mostrando una buena proliferación celular sobre ellos, el control celular se muestra en la **Figura 2.15**.

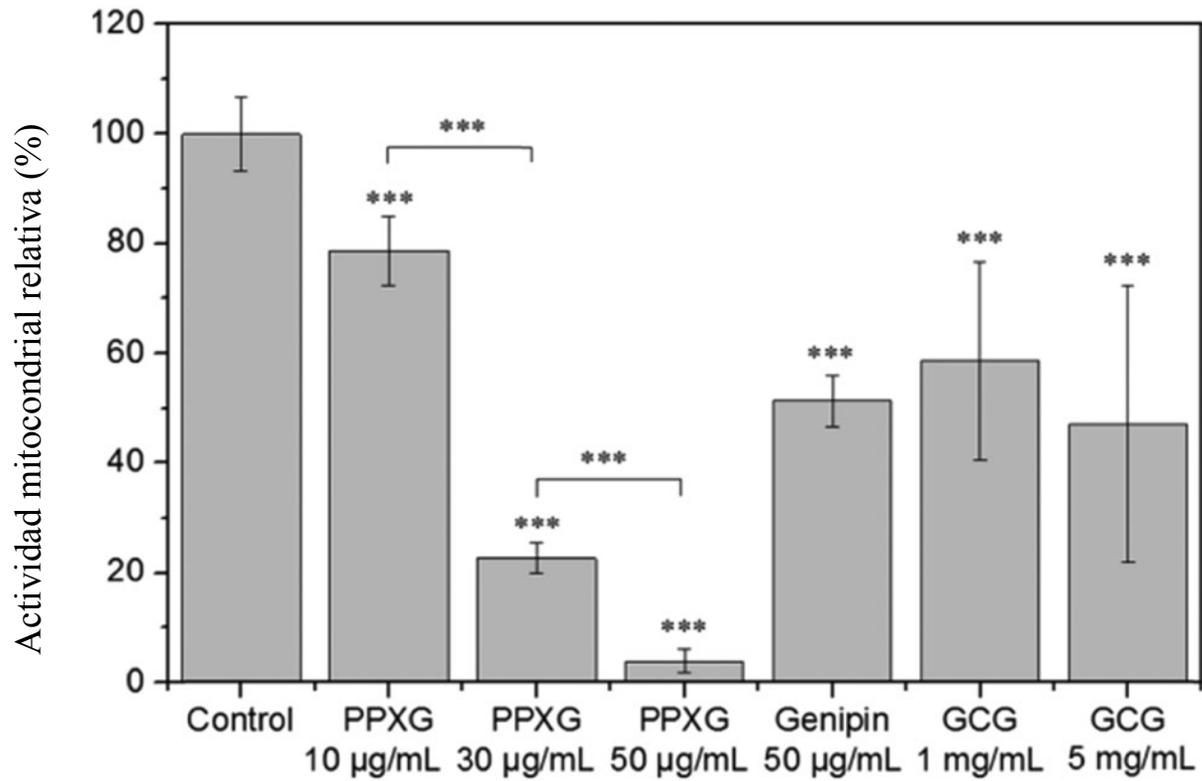


Figura 2.15 Viabilidad celular obtenida mediante la evaluación de citotoxicidad por MTT[42].

2.2 Biovidrio 45S5

2.2.1 Propiedades

El biovidrio 45S5 fue descubierto el año de 1969 por L. Hench [43] y desde entonces ha sido objeto de estudio gracias a sus características de bioactividad, las cuales lo posicionan en uno de los materiales más acertados para su uso en aplicaciones biomedicas, principalmente en la fabricación de andamios vitro-cerámicos como es el caso del trabajo realizado por Abad Javier y col. [44], en cual se reporta el efecto de la funcionalización con colágeno tipo I y vitamina D3 de andamios biomiméticos de biovidrio en la condensación de hidroxiapatita; los andamios fueron realizados por síntesis sol-gel acoplada con aspersion para generar agregados esféricos, asimismo demostraron que la funcionalización de andamios con colágeno I y vitamina D3 tienen un efecto benéfico para la osteogénesis.

El biovidrio 45S5 es uno de los pocos biomateriales que ofrece una rápida formación de una capa de hidroxiapatita en su superficie, además, posee una alta capacidad de funcionalización que le confiere la capacidad de unirse a tejidos blandos como cartílago y músculos, causando el crecimiento de nuevos tejidos. La mayor desventaja del biovidrio 45S5, es su escasa resistencia mecánica, la cual lo limita a aplicaciones que no demanden altos esfuerzos que propicien una fractura del material [45].

Las bajas propiedades mecánicas del biovidrio 45S5 también producen una baja maquinabilidad y lo limitan para aplicaciones que involucren una forma compleja, a pesar de que este material posea transformaciones alotrópicas las cuales han sido investigadas por Chevalier y col.[46] demostraron que el biovidrio 45S5 a 550 °C posee la temperatura de transición vítrea, a 570°C el material comienza a ser heterogéneo a causa de la difusión que existe a esta temperatura y a 610°C el material presenta la primer fase cristalina compleja ($\text{Na}_2\text{CaSi}_2\text{O}_6$), aunque existe gran discrepancia ya que, ciertos autores aseguran que la fase cristalina que aparece a esta temperatura es $\text{Na}_2\text{Ca}_2\text{Si}_3\text{O}_9$ en el rango de 800 a 950 °C encontraron que comienza la nucleación de fosfatos secundarios ($\text{Na}_2\text{Ca}_4(\text{PO}_4)_2\text{SiO}_4$).

2.2.2 Aplicaciones

Las aplicaciones del biovidrio 45S5 se reducen al área biomédica, sin embargo, el biovidrio no solo se limita a la formación de hidroxiapatita después de ponerse en contacto con fluidos biológicos, promoviendo así un enlace estable al hueso vivo (osteoconducción), sino también es un material osteoinductor, es decir, puede estimular las células óseas hacia un camino de regeneración y auto reparación, acelerando significativamente la cinética de cicatrización de tejidos [47], en el año de 1985 la agencia para el control de drogas y alimentos de los Estados Unidos de Norte America, aprobó el uso del biovidrio 45S5 para usarse como una alternativa a los implantes inertes usados para sustituir los huesos del oído medio [48], este implante constituido por biovidrio 45S5 no poroso tuvo buena aceptación, sin embargo, las revisiones a largo plazo (10 años) de los implantes de prótesis de oído medio hechos de biovidrio 45S5 develaron que estos eran propensos a diluirse y fragmentarse en el cuerpo humano, por lo cual estos fueron retirados de circulación en los Estados Unidos de Norte America en los años 2000 [49].

En la década de los noventa se comercializaron implantes de cono de biovidrio 45S5 bajo licencia de la Universidad de Florida a Geltech, Inc. derivados de los trabajos de Stanley y col. [50], los implantes dieron como resultado una cresta alveolar estable (parte de la mandíbula humana que contiene alvéolos dentales).

Otra aplicación sumamente relevante del biovidrio 45S5 es la conformación de andamios para ingeniería de tejidos, obtenidos mediante diversos métodos como lo son síntesis sol-gel y sus variaciones, replicas de esponjas con barbotinas, prensado de polvos, impresión 3D etc. Chen y col. [51] obtuvieron andamios de biovidrio 45S5 porosos mediante replicación con barbotinas y a la vez demostraron el efecto de la cristalinidad en la formación de hidroxiapatita.

2.3 Síntesis Sol-Gel

La síntesis sol-gel es una técnica ampliamente usada para el procesamiento de diversos productos, de entre los cuales se distinguen los materiales cerámicos, para estos materiales el resultado de este proceso es la formación de un cuerpo monolítico o polvos para su posterior conformado y sinterización. Se pueden dividir los geles de materiales cerámicos en varios tipos, pero los dos grupos más grandes son los geles particulados y los geles poliméricos [52]. Se entiende por gel al sistema en el cual existe un medio sólido continuo a través de un medio líquido, si se cambia la fase líquida por un gas se obtiene un aerogel [53].

Como las fases líquido y sólido tienen dimensiones coloidales (1 a 200 nm), se forman poros luego del secado como se ilustra en la **Figura 2.16**. El área color gris es la fase sólida contenida en un gel, mientras que el resto es la fase líquida en donde la fase sólida está contenida. Las flechas “P” y “S” indican la longitud que existe entre fase líquida y sólida, ya que este sistema es coloidal, la dimensión de cualquier flecha de la microestructura es menor de 1 μm de longitud.

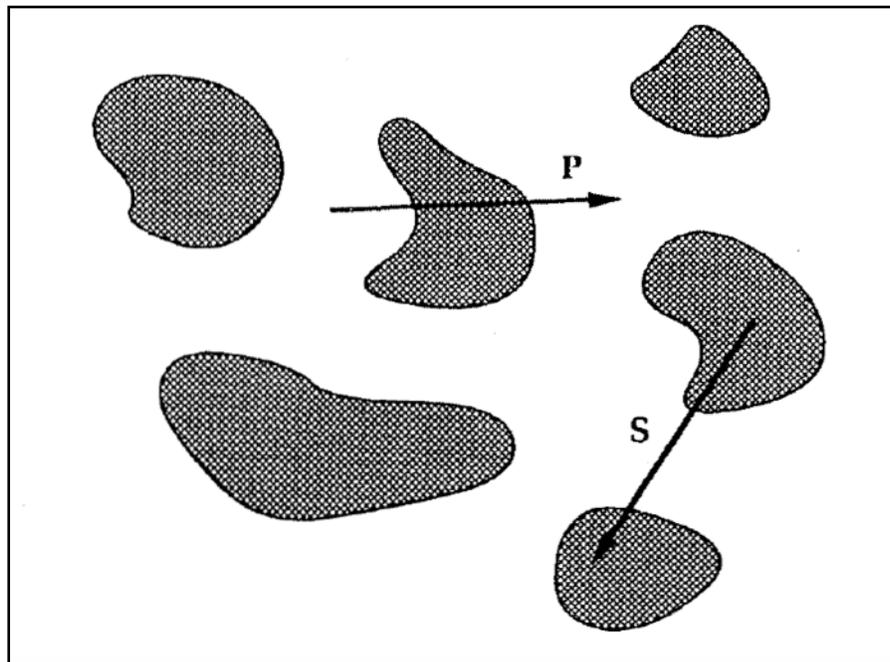


Figura 2.16 Ilustración de la estructura de un gel [54].

La técnica tradicional de procesamiento de vidrio en grandes escalas industriales ha sido la fundición de las materias primas, las cuales por su naturaleza vitrifican a ciertas condiciones de enfriamiento, sin embargo esta técnica resulta costosa por las altas temperaturas que el proceso requiere, a partir de los años ochenta se optó por la síntesis sol-gel como una opción asequible para el procesamiento de vidrios, Li y col. [55] demostraron que el método de síntesis sol-gel es otra opción para la fabricación de biovidrio en concreto; con muchas ventajas sobre la fundición sobre todo para aplicaciones biomédicas [55], Li y col. remarcaron algunos inconvenientes del uso del método tradicional para la obtención de biovidrio, en el que los polvos del biovidrio son hechos vertiendo el biovidrio fundido en un medio líquido como el agua, posteriormente se fractura el biovidrio en pequeñas porciones. Consecutivamente es necesario la selección del tamaño de partículas las cuales están comprendidas en rango de 90 a 170 μm debido a las demandas de su aplicación en tratamientos periodontales. Algunas de las desventajas de los vidrios obtenidos por fundición son las siguientes:

- a) Es particularmente difícil obtener y mantener el alto grado de pureza requerida para cualquier aplicación biomédica, primeramente esto es debido a las altas temperaturas del proceso empleadas para realizar la fusión y homogeneización del producto, pero también esta relacionado con la baja concentración de sílice y al alto contenido álcali de las composiciones tradicionales del biovidrio, las cuales son químicamente reactivas y poseen la tendencia de disolver varios elementos de la composición química del producto.
- b) Los procesos de molienda, pulido, desbaste, tamizado etc, exponen al biovidrio a la contaminación inherente por la manipulación y contacto con la maquinaria u objetos necesarios para su procesamiento y acondicionamiento.
- c) Existe una limitante de la composición química del producto consolidado de biovidrio, esto es debido a la temperatura de equilibrio de “liquidus” en el diagrama del sistema de dióxido de silicio la cual es de 1,713 °C y en parte a la alta viscosidad del silicato fundido con un alto contenido de dióxido de silicio.
- d) Las altas temperaturas de procesamiento, el inherente uso de crisoles fabricados de platino y las múltiples operaciones de producción, representan un alto costo que en ciertos

casos puede llegar a ser inasequible la producción tradicional de biovidrio a través de la fundición y el acondicionamiento del producto final.

Por estas razones es que la producción tradicional del biovidrio es cada vez menos utilizada para productos de aplicación biomédica. La síntesis de productos por sol-gel ofrece la posibilidad de conformar productos cerámicos y en concreto biovidrios a baja temperatura, además de poder conseguir productos con tamaños de partículas de orden nanométrico a un bajo costo y sobre todo ofrece la posibilidad de obtener productos con una composición química más homogénea y con un mayor control de los elementos presentes en el producto, sin las complicaciones que se presentan en el método tradicional de fundición y que terminan elevando el costo del producto, o simplemente se torna inaccesible tanto económicamente como tecnológicamente, desde entonces, la síntesis sol-gel ha tomado mayor importancia en diversos productos industriales. En la **Figura 2.17** se muestran las rutas de procesamiento por sol-gel para la obtención de diversos productos desde aerogeles, polvos, películas o monolitos según se requiera, estos productos se obtienen siguiendo diferentes caminos como se ilustra en la **Figura 2.17**, asimismo muestra con flechas las etapas de hidrólisis y condensación en ese orden [56].

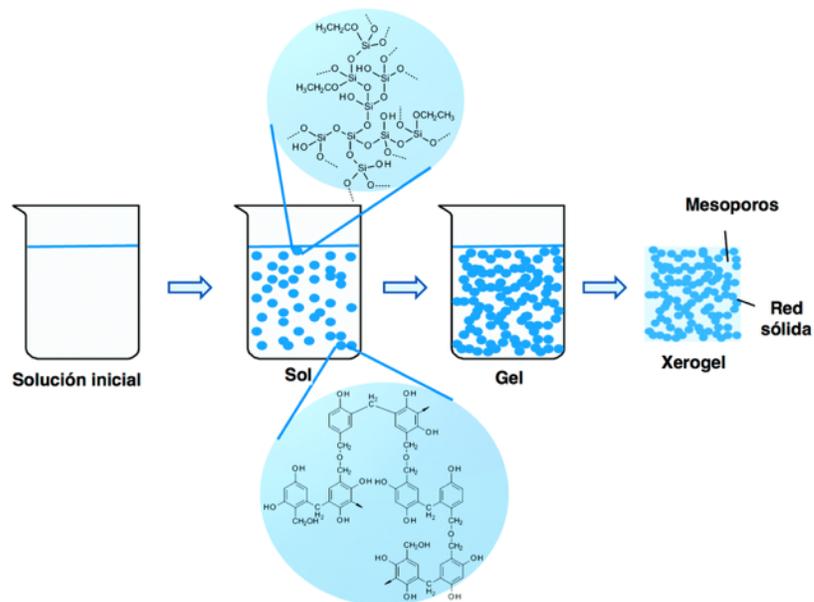


Figura 2.17 Ruta típica del proceso sol-gel para la obtención de diversos materiales [57].

Se han realizado diversos proyectos para la obtención de productos de biovidrio 45S5 por medio de síntesis de geles. Faure y col. [35], llevó a cabo un método novedoso de síntesis de biovidrio 45S5 en el cual se utilizó como catalizador del proceso un ácido orgánico, como precursores utilizaron tetraetil ortosilicato $\text{Si}(\text{OC}_2\text{H}_5)_4$ (TEOS), fosfito de trietilo $\text{P}(\text{C}_2\text{H}_5\text{O})_3$ (TEP), nitrato de calcio tetrahidratado $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ y nitrato de sodio NaNO_3 , adicionaron el ácido cítrico al sistema como catalizador, obteniendo resultados aceptables al emplear ácido cítrico como catalizador se puede sintetizar biovidrio 45S5 por medio de síntesis sol-gel con una pequeña concentración de ácido cítrico en la solución en lugar de la alta concentración empleada de ácido nítrico para catalizar la reacción de hidrólisis.

El proceso de síntesis sol-gel es sumamente versátil gracias a la posibilidad de variar ciertos reactivos y/o concentraciones de estos, para el presente trabajo, la finalidad de emplear la síntesis sol-gel es conseguir una estructura amorfa asequible a temperaturas de procesamiento bajas.

2.3.1 Síntesis Sol-Gel asistida por freeze drying

El secado por liofilización (Freeze-Drying) es un proceso ampliamente usado en la industria alimenticia, sin embargo puede emplearse en el procesamiento de materiales cerámicos para remover la humedad resultado de las reacciones de hidrólisis y condensación que tienen lugar en la síntesis sol-gel [58].

Esta técnica puede resumirse en tres pasos los cuales son el congelamiento del material, aplicación de vacío y secado, las cuales serán descritas seguidamente.

El congelamiento se realiza para formar cristales de agua o del medio líquido con el que se mezclaron los polvos, conforme el congelamiento continua la formación de cristales aumenta. Si el contenido de líquido de la suspensión es demasiado, la viscosidad del líquido solidificándose aumenta considerablemente llegando a dificultar la solidificación de nuevos cristales. El porcentaje mínimo que permanece en el cuerpo se conoce como agua de ligadura.

Posteriormente en la aplicación de una presión negativa o un vacío por debajo del punto triple del agua. Esto es con la finalidad de que en combinación con calor, los cristales congelados logren sublimar y dejen el cuerpo cerámico.

El secado involucra la sublimación de los cristales congelados como producto del congelamiento. En el proceso se suministra calor hacia la pieza congelada, donde los cristales comenzaran a sublimar y pasaran a través del material dejando huecos donde estaban contenidos estos cristales, el vapor de los cristales sublimados se transfiere hacia la superficie del material para posteriormente ser transferidos hacia la cámara condensadora.

Existen diversas variables a considerar durante el proceso para lograr una estructura del cuerpo en verde satisfactoria, uno de los principales problemas es el colapso de la estructura por los esfuerzos que se generan cuando los cristales están sublimando.

Es de suma importancia proteger a las partículas de los esfuerzos causados por el congelamiento y secado que sufren por medio del secado por liofilización y las condiciones de almacenamiento. En la formulación, los aditivos usados en la suspensión poseen un papel de gran importancia, sobretodo aquellos que protegen a las partículas de los esfuerzos causados por el congelamiento y el secado (crioprotectores y lioprotectores). Los crioprotectores mayormente empleados son los polisacáridos, dado que estas moléculas al solidificar a la temperatura de congelamiento T_g , vitrifican, por ende las partículas se ven inmovilizadas en la fase amorfa formada por los polisacáridos añadidos a la suspensión [59].

Algunos trabajos previos han encontrado que para el uso de lioprotectores para nanopartículas, no es de gran importancia la cantidad de lioprotector empleado, sin embargo se ha encontrado que la concentración inicial de nanopartículas antes del proceso de liofilizado toma un rol importante en los mecanismos en que actúan los lioprotectores. A mayor concentración de nanopartículas en suspensión, mayor será la eficiencia del lioprotector [60].

La trehalosa es un disacárido formado por dos moléculas de glucosa en donde la unión glucosídica involucra los radicales OH de los dos carbonos anoméricos de la molécula de trehalosa. Dicho polisacárido ha sido empleado como lioprotector gracias a la gran habilidad que posee en conjunto con una porción de agua de la suspensión a formar una matriz amorfa durante el proceso de enfriamiento [61].

Liyang y col. [62], sintetizaron nanocompuestos de $\text{LiMn}_x\text{Fe}_{1-x}\text{PO}_4/\text{C}$ mediante síntesis sol-gel asistida por liofilización (Freeze-Drying), gracias a esta variante de la síntesis sol-gel obtuvieron agregados nanoestructurados con diámetros de 50-100 nm uniformemente distribuidos, el secado

del gel líquido lo llevaron a cabo durante un tiempo de 2 días, posteriormente los polvos obtenidos fueron molidos y calcinados a 700 °C. en la **Figura 2.18** se muestran las imágenes de MEB de los nanocompuestos obtenidos, Liying y col. demostraron que es posible obtener nanocompuestos de $\text{LiMn}_x\text{Fe}_{1-x}\text{PO}_4/\text{C}$ sintetizados con éxito mediante el método de sol-gel asistido por liofilización.

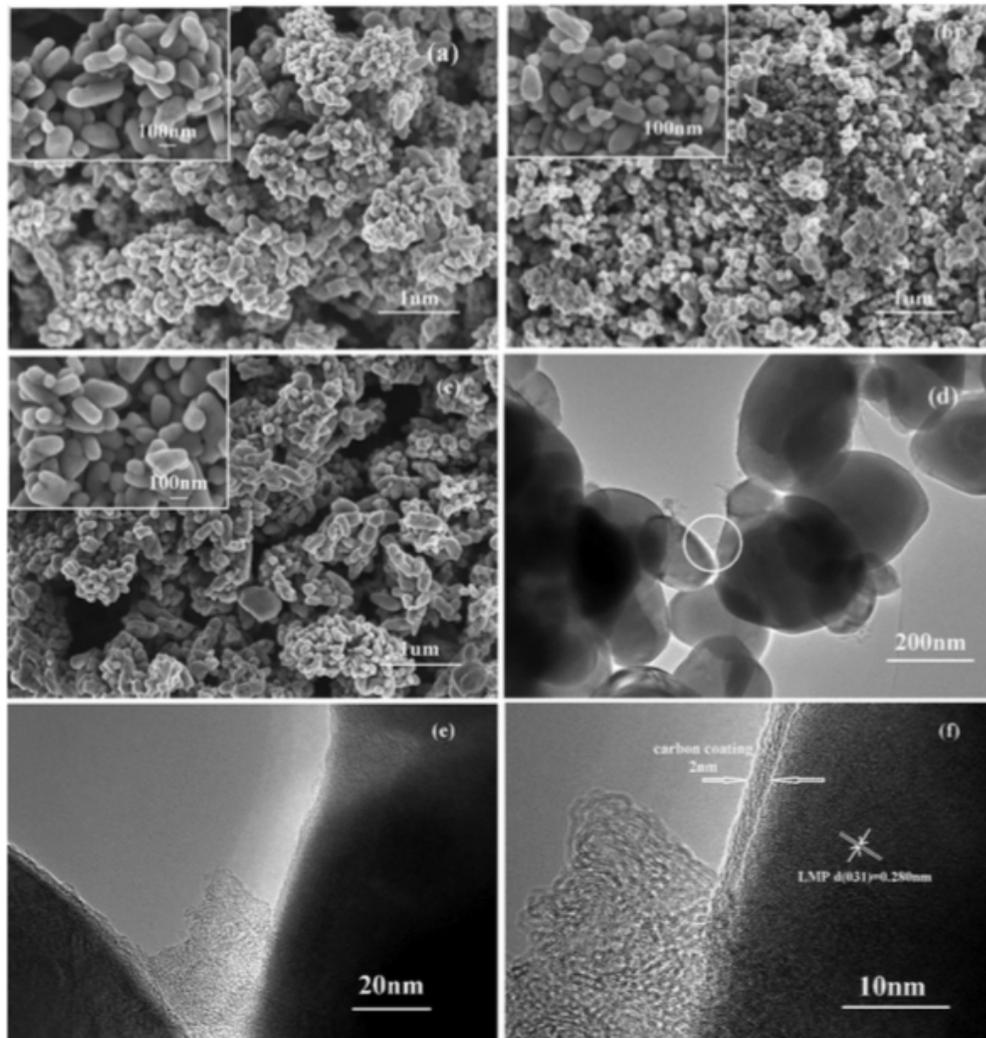


Figura 2.18 Imágenes de MEB de los nanocompuestos de $\text{LiMn}_x\text{Fe}_{1-x}\text{PO}_4/\text{C}$ obtenidos por sol-gel asistido por liofilización [62].

Yamamoto y col. obtuvieron geles de carbon obtenidos por síntesis sol-gel asistida por liofilización, gracias a esta metodología controlaron la porosidad de estos geles. La obtención de los geles fue por medio de policondensación de una solución acuosa de resorcinol y formaldehído en agua destilada, posteriormente se disolvió en la solución carbonato de sodio. El control de la

porosidad se realizó mediante el tiempo de envejecimiento del gel durante 1 día a 24 °C, 1 día a 49 °C y 3 días a 89 °C, subsecuentemente los geles se congelaron a -30 °C por 6 h y liofilizados a -10 °C durante 24 h. Yamamoto y col. concluyeron que mediante esta técnica se pueden obtener materiales mesoporosos, el grado de porosidad depende de la relación molar de hidrólisis y del tiempo de envejecimiento. En la **Figura 2.19** se muestran micrografías obtenidas por microscopía electrónica de barrido [63].

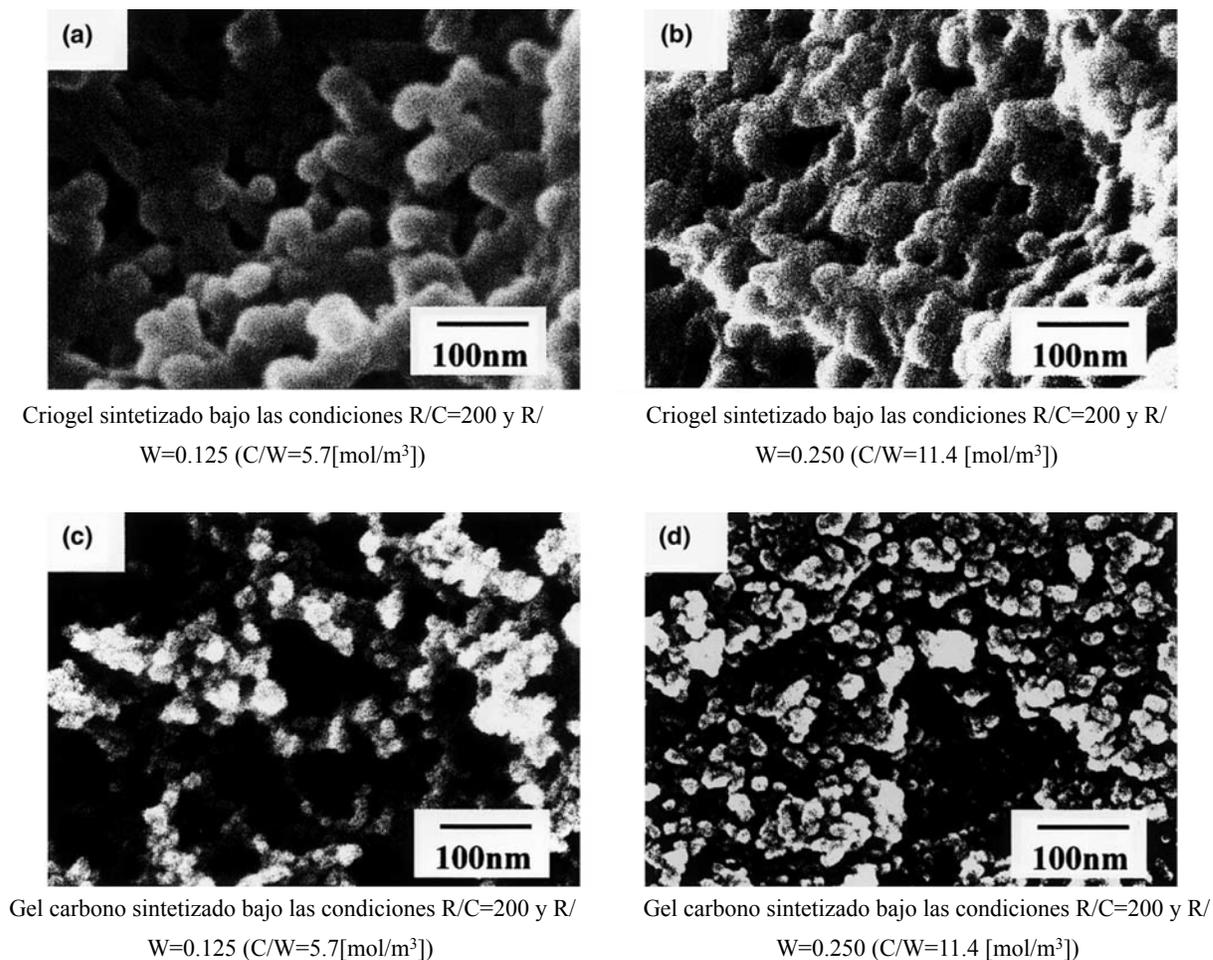


Figura 2.19 Imágenes de MEB de los criogeles de carbono a diferentes condiciones [63].

2.3.2 Síntesis Sol-Gel asistida por spray drying

El secado por aspersión es una técnica de obtención de polvos a partir de un líquido con un alto contenido de sólidos, que posteriormente es atomizado con la finalidad de crear gotas de tamaño micrométrico que contengan al sólido para su posterior tratamiento térmico. El método sol-gel es

una ruta prometedora que permite una mayor evaporación del líquido contenido en el gel, en comparación con los procesos de evaporación ordinarios y exhibe un rendimiento superior en términos de ahorro de energía, rentabilidad, preparación continua y ambientalmente benigno .

Wang y col. [64] obtuvieron micropartículas de sílice mediante síntesis sol-gel asistida por liofilización para fungir como liberadores de medicamentos. Concluyeron que mediante este arreglo de síntesis se pueden obtener partículas esféricas a pH moderados, las porosidades se controlan variando la adición de Dextran. El secado por aspersión otorga la facilidad de crear morfologías esféricas en los agregados como se muestra en la **Figura 2.20**.

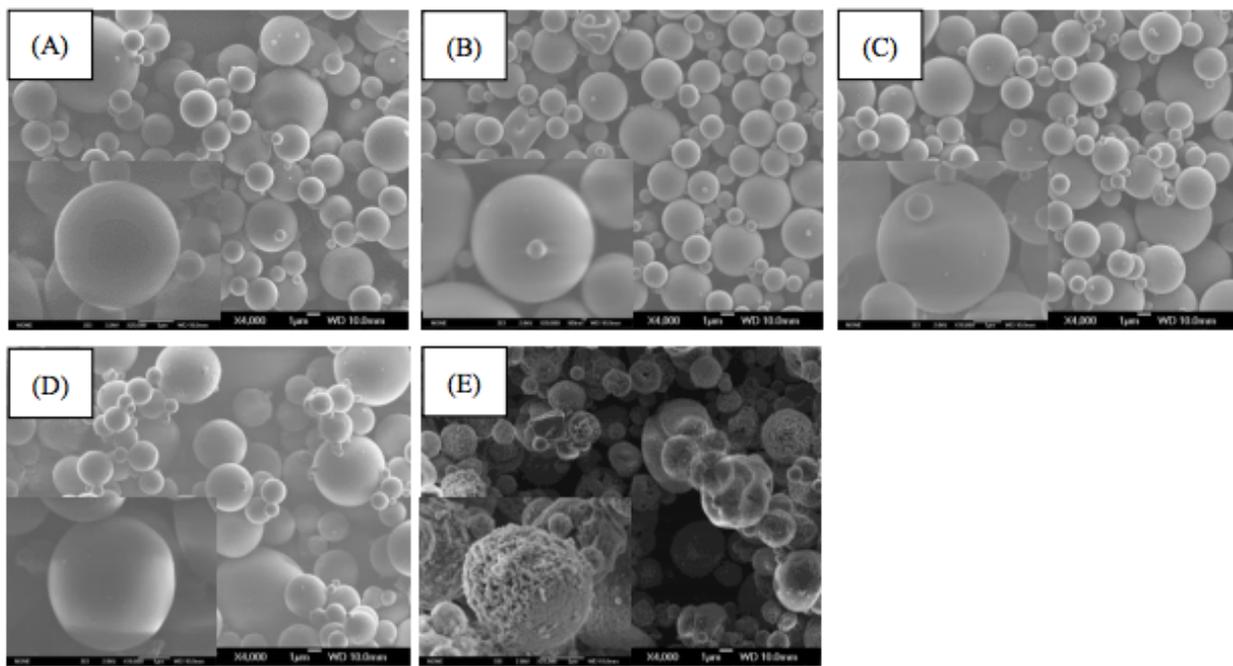


Figura 2.20 Imágenes de MEB de las microesferas de sílice obtenidas por sol-gel asistida por aspersión [64].

Yu y col. obtuvieron agregados en forma de microesferas mediante síntesis sol-gel asistida por aspersión de LiFePO_4/C . La obtención del gel fue mediante cantidades de Li_2CO_3 , $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ (AR), H_3PO_4 y ácido tartárico, se disolvió en agua destilada en relación: $n\text{Li}: n\text{Fe}: n\text{P}: n\text{ácido} = 1: 1: 1: 1$ para formar un gel homogéneo. El gel se secó por aspersión en una unidad de secador por aspersión a una velocidad de 15 ml/min las temperaturas de entrada y salida se mantuvieron a 200°C y 130°C , respectivamente. Yu y col. demostraron que las microesferas

porosas LiFePO_4 obtenidas mediante síntesis sol-gel asistida por aspersion tienen tamaño de poro promedio de 45 nm y proporciona un área de superficie específica grande ($20.2 \text{ m}^2/\text{g}^{-1}$) las cuales se muestran en la **Figura 2.21** [65].

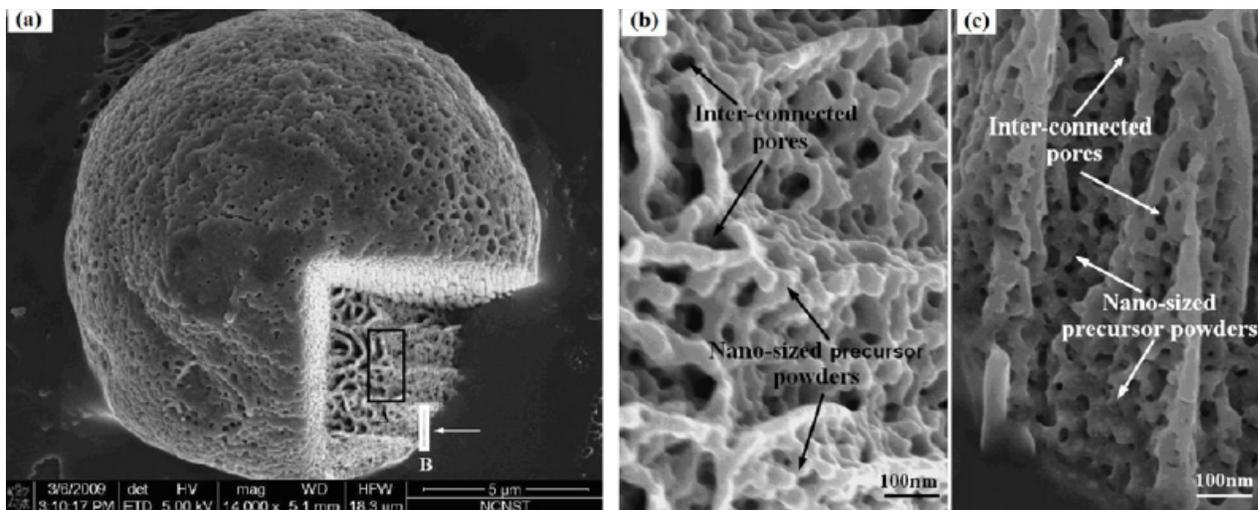


Figura 2.21 Imágenes de (a) imágenes FIB de la muestra LFPb a través del método sol-gel-SD. (b) Imagen MEB del área [65].

2.3.3 Técnica Sol-Gel asistida por microemulsión

El método de microemulsión es empleado para la obtención de polvos nanométricos, sin embargo, se ve limitada la cantidad de producto final a obtener, ya que tanto el proceso de emulsión como demulsificación deben ser cuidadosamente controlados.

Wang y col. obtuvieron polvos submicrónicos de ZrSiO_4 mediante sol-gel asistido por microemulsión usando octahidrato de cloruro de circonilo ($\text{ZrOCl}_2 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$), alcohol n-hexílico, Triton X-100 y ciclohexano, Tetraetoxisilano (TEOS), ciclohexano, fluoruro de litio (LiF)

Se prepararon 35.00 g de tensioactivo compuesto por Triton X-100 y alcohol n-hexílico disuelto primero en 100.00 g de ciclohexano, con una fracción masa entre Triton X-100 y n-hexilo el alcohol en relación 4:3. La solución se vertió uniformemente en dos vasos de precipitados, luego se mezcló con 30.00 ml de ZrOCl_2 solución acuosa ($n = 2,34 \text{ mol / L}$) y 12.50 g de TEOS por agitación magnética, respectivamente.

Las microemulsiones transparentes se mezclaron agitando rápidamente y envejeciendo durante 1 hora. La microemulsión se vertió en un revestimiento de politetrafluoroetileno y se trató hidrotermalmente a 150°C durante diferentes tiempos (2-8 h) bajo la protección de un reactor de acero inoxidable, para obtener un gel blanco el gel se recogió y se secó en un horno a 150 ° C durante 12 h.

El polvo submicrónico $ZrSiO_4$ se prepara con éxito mediante el método sol-gel asistido por microemulsión. El polvo de $ZrSiO_4$ tiene una distribución de tamaño de partícula uniforme y un diámetro medio de aproximadamente 0.67 μm [66].

2.4 Células

2.4.1 Cultivo

Se entiende por cultivo celular, el conjunto de técnicas que permiten el mantenimiento de células "*in vitro*", preservando al máximo sus propiedades fisiológicas, bioquímicas y genéticas. Bajo unas condiciones adecuadas (medios y superficies de cultivo, presencia de antibióticos, asepsia ambiental, instrumental adecuado, etc) se consiguen mantener clones de un solo tipo de células de origen animal y/o vegetal bien definidos a partir de cada cultivo celular. Debido a que se facilita su manipulación, se puede alcanzar una mayor viabilidad en las células lo que, hace que los cultivos celulares sean óptimos para trabajos de investigación básica, estudios de ingeniería genética y/o producción de compuestos biológicos como, por ejemplo, vacunas virales [67].

2.5 Modelos "in vitro" para el análisis de bioactividad

2.5.1 Soluciones amortiguadoras

La Solución Salina Amortiguada por Fosfatos (PBS) constituye una solución amortiguadora de pH comúnmente empleada para procedimientos bioquímicos. Su osmolaridad y concentración de iones (Cl^- , Na^+ y K^+) es muy semejante a la del líquido extracelular de los mamíferos.

Esta solución se prepara a partir de Cloruro de Sodio, Fosfato de Sodio y, en algunas formulaciones, con Fosfato de Potasio. Esta solución es isotónica y no-tóxica para las células de los mamíferos. El PBS se emplea como vehículo neutro para células, ya que no modifica el perfil de expresión y funcionamiento celular normal. Esta solución es empleada comúnmente para lavar células a través de centrifugación. El PBS puede ser empleado como diluyente para métodos de desecación de biomoléculas, ya que las moléculas de agua presentes en el PBS se adhieren alrededor de la biomolécula permitiendo inmovilizarla a una superficie sólida. Esta monocapa de agua evita que la biomolécula sea desnaturalizada (o sufra modificaciones conformacionales) en el proceso de desecación. Los amortiguadores a base de carbonatos también son empleados para este procedimiento, aunque con menor éxito. El PBS también es empleado como referencia espectral para procedimientos de elipsometría por absorción proteica. El PBS puede ser complementado con aditivos para procedimientos específicos. La adición de EDTA, por ejemplo, permite disgregar células cuando estas forman agregados. La incorporación de Zinc, no obstante, no es recomendada ya que provoca la precipitación de otras sales constituyentes [68].

2.5.2 Medio de cultivo DMEM

Los medios de cultivo contienen una mezcla de aminoácidos, glucosa, sales, vitaminas, y otros nutrientes, y se encuentran disponibles comercialmente tanto en polvo como líquidos[69]. Los requerimientos de estos componentes varían entre líneas celulares, y estas diferencias son en parte responsables del gran número de formulaciones de medios de cultivo [70].

El DMEM es un medio basal y no contiene proteínas o agentes que promuevan el crecimiento. Comúnmente, se suplementa con 5 a 10 % de suero fetal bovino. El DMEM utiliza un sistema de tampón de bicarbonato de sodio (3.7 g/L) y por lo tanto requiere de niveles artificiales de CO₂ para mantener el pH requerido. Los medios en polvo son formulados sin bicarbonato de sodio porque éste tiende a perderse por gasificación. Los medios en polvo requieren de la adición de 3.7 g/L de bicarbonato de sodio al momento de disolverlos en agua. El DMEM fue utilizado en un principio para el cultivo de células de embrión de ratón, ha sido demostrado ser ampliamente aplicable en estudios de células primarias de ratón y de pollo, de formación de placa viral y de inhibición por contacto.

Los medios completos de crecimiento recomendados para ciertas líneas celulares requieren de componentes adicionales que no se encuentran presentes en los medios basales ni en el suero fetal[71]. Si bien suplementos como hormonas, factores de crecimiento y sustancias de señalización son requeridos para el normal crecimiento de algunas líneas celulares, siempre es mejor tomar las siguientes precauciones: ya que la adición del suplemento puede alterar la osmolalidad del medio de cultivo completo, lo que puede afectar negativamente el crecimiento de las células, siempre es mejor comprobar nuevamente la osmolalidad (Concentración de las partículas osmóticamente activas contenidas en una disolución, expresada en osmoles o en miliosmoles por kilogramo de disolvente) tras añadir el suplemento. Para la mayoría de las líneas celulares, la osmolalidad óptima se encuentra entre 260 mOSM/kg y 320 mOSM/kg [72].

2.5.3 Fluidos corporales simulados

En 1980, Hench y col. [73] mostró que una capa rica en SiO₂ y forma de película de fosfato de calcio en la superficie de biovidrio cuando se implanta en el entorno corporal, lo que permite unión al hueso vivo, y que la formación "*in vivo*" de la película de fosfato de calcio puede reproducirse en un tampón solución que consiste en Tris hidroximetilaminometano y ácido clorhídrico (solución tampón Tris) a pH 7.4.

El cuerpo desempeña el papel esencial en la formación del enlace químico del material bioactivo con el hueso vivo, es decir, la formación de hidroxiapatita. Esta capa de apatita se puede reproducir "*in vitro*". Por lo tanto, se puede decir que es posible evaluar la bioactividad de un material examinando la formación de la capa de apatita en su superficie en una solución adecuada [31].

Cabe señalar aquí que el suero corporal simulado original utilizado por Kokubo y col. [31] y Hench y col. [74] carece de los iones SO_4^{2+} contenidos en el plasma sanguíneo humano [75]. Esta carencia de iones SO_4^{2+} fue corregida en documentos publicados por Kokubo y col.[76] en 1991. Desde entonces, el suero corporal simulado corregido ha sido utilizado como "Suero corporal simulado " por muchos investigadores.

El trisaminometano (TRIS) forma parte de la formulación del suero corporal simulado (Suero corporal simulado), la solución tampón de TRIS ha sido recomendada para evaluación "*in vitro*" de la bioactividad del biovidrio[77], esta solución es usada en estudios "*in vitro*" como solución amortiguante del pH para mantener un pH fisiológico de 7.3, para estos estudios el pH de la solución es ajustado con ácido clorhídrico[78].

CAPÍTULO III. DESARROLLO EXPERIMENTAL

En este capítulo se abordará detalladamente la metodología experimental realizada con la finalidad de obtener andamios porosos así como su evaluación de bioactividad y citotoxicidad “*in vitro*”, en la **figura 3.1** se esquematizan las dos rutas propuestas para la obtención de los andamios para su posterior caracterización y evaluación biológica “*in vitro*”.

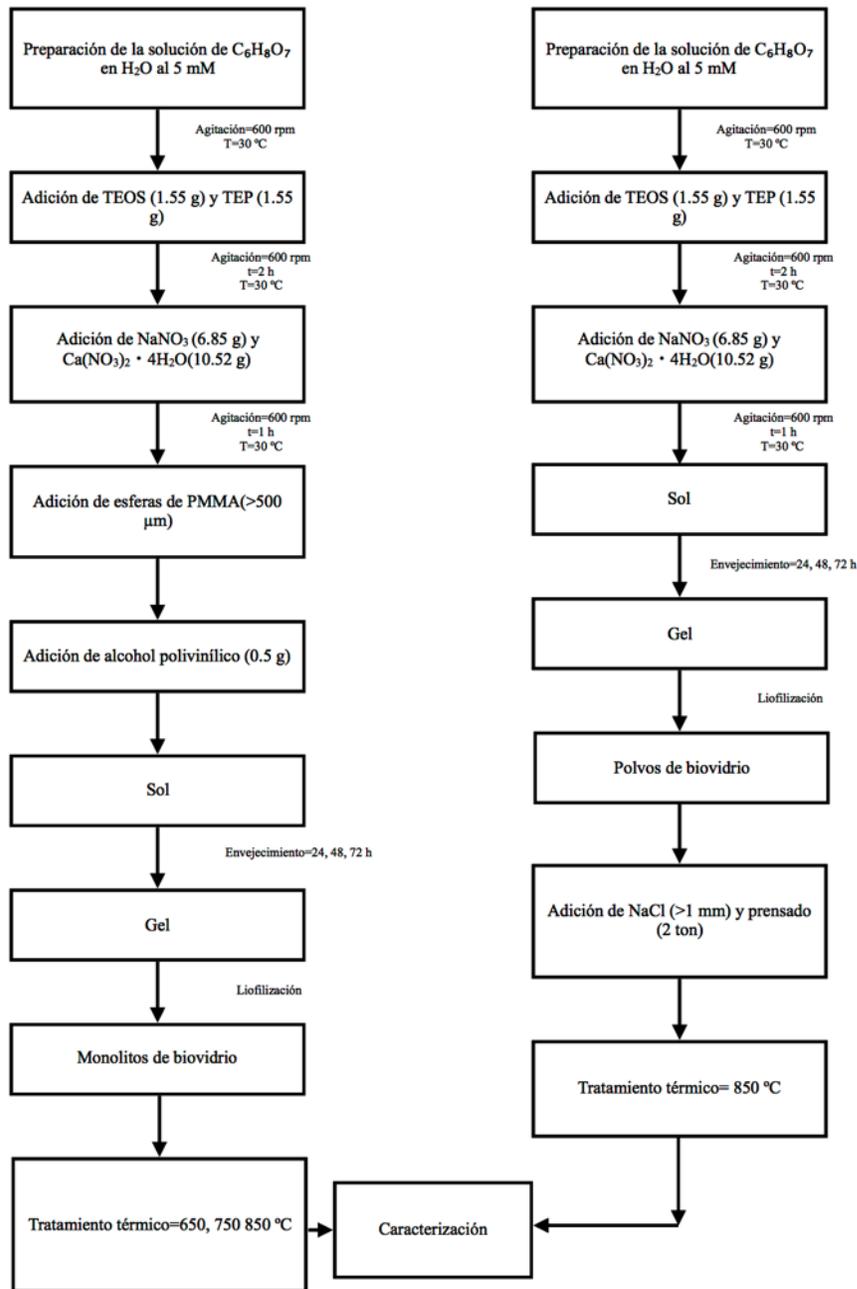


Figura 3.1 Ruta de procesamiento sol-gel.

3.1 Reactivos

Para llevar a cabo la síntesis sol-gel se utilizaron los siguientes reactivos en cantidades estequiométricas calculadas para obtener 10 g de material, los cuales se muestran en la **Tabla 3.1**.

Tabla 3.1 Reactivos utilizados en la síntesis.

Reactivo	Pureza	Cantidad
TEOS (Sigma Aldrich)	98%	16.07 g
TEP (Sigma Aldrich)	99.80%	1.55 g
Ca(NO ₃) ₂ · 4H ₂ O	99.01%	10.52 g
NaNO ₃	99.00%	6.85 g
Ácido cítrico monohidratado	99.0%	0.0405 g
Agua desionizada	99%	38.56 ml

3.2 Obtención de andamios porosos de biovidrio 45S5

3.2.1 Síntesis de biovidrio 45S5 por la técnica sol-gel

Por medio de la técnica de síntesis sol-gel y usando como catalizador ácido cítrico, se obtuvo el biovidrio 45S5 para su posterior secado por liofilización. Gracias a esta técnica de procesamiento de materiales se puede sintetizar el biovidrio 45S5 con la composición necesaria sin la necesidad de recurrir a temperaturas altas, además por medio de esta técnica se puede manipular perfectamente la composición y el tamaño de partículas que se desea obtener, la síntesis se realizó en las instalaciones del Instituto de Investigaciones Metalúrgicas. Para obtener 10 g de material se empleó como precursor de reacción tetraetil ortosilicato Si(OC₂H₅)₄ (TEOS) (16.07 g), fosfito de trietilo P(C₂H₅O)₃ (TEP) (1.55 g), nitrato de calcio tetrahidratado Ca(NO₃)₂ · 4H₂O (10.52 g) y nitrato de sodio NaNO₃ (6.85 g), como catalizador de reacción se utilizó ácido cítrico monohidratado (C₆H₈O₇ · H₂O) (0.0405 g) en solución acuosa a 5 mM para obtener una solución de carácter ácido.

Inicialmente, se añadió la solución acida para obtener una molaridad de 2 con respecto al TEOS, se agregó el TEOS y TEP a una rapidez de agitación de 600 rpm y una temperatura de reacción de 30 °C durante un tiempo de 2 h hasta conseguir un sol traslúcido, posteriormente se agregaron los polvos de nitrato de sodio hasta que estos se diluyeron completamente, seguido de esta acción se agregaron los polvos de nitrato de calcio tetrahidratado y se agitó la solución a la misma rapidez y temperatura durante 1 h, se añadió el polimetilmetacrilato que actuó como un agente formador de macroporos finalmente, se añadió polvo de alcohol polivinílico al sol disminuyendo la rapidez de agitación a 300 rpm hasta que todo el alcohol polivinílico se diluyó completamente, subsecuente a la obtención del sol, este se deposita en moldes de poliestireno, por otro lado, otra parte del sol sin esferas de polimetilmetacrilato se depositó en moldes cilíndricos de poliestireno de 0.2 ml de volumen, en los cuales ocurrieron los procesos de gelación del sol a través de reacciones de condensación durante un tiempo de 24, 48, 72 y 96 h para su posterior secado por medio de la técnica de liofilización, con la finalidad de obtener polvos de biovidrio para ser prensados con cloruro de sodio y así obtener macroporosidad, así como los andamios formados mediante la adición de polimetilmetacrilato.

3.2.2 Secado por liofilización

Por medio del secado por liofilización se removió el líquido del gel y a su vez se obtuvo el xerogel formado por agregados nanoestructurados del biovidrio 45S5, los cuales tendrían una porosidad de orden nanométrico gracias a la remoción del líquido por medio de la sublimación, en éste proceso como se mencionó en la sección anterior, se efectuó en dos etapas, las cuales consistieron en el congelamiento del gel para posteriormente sublimar el líquido solidificado por efecto de una disminución de temperatura y aplicación de vacío, lo cual provoca que el espacio que ocupaba el líquido en la suspensión devengan en pequeños huecos que tienen la utilidad del transporte de fluidos corporales. Es decir que las condiciones a las que se sometió el gel son inferiores a las condiciones de presión y temperatura estándar; para esta etapa se congeló el gel a temperatura y presión determinadas con ayuda de los sensores con los que cuenta el equipo liofilizador “SRK LYO GT-2” así como con la metodología que el mismo equipo proporciona para la determinación de estos parámetros; La metodología para la determinación de este par de valores consistió en colocar el material a secar dentro de las bandejas que el equipo posee, aislar

la cámara de vacío de la bobina condensadora y cerrar todas las válvulas de escape, comenzar con el secado hasta que la presión y temperatura no varíen. Posteriormente, se abre la válvula de escape durante 60 segundos y se cierra de nuevo mientras la bomba de vacío continua operando hasta que se vuelvan a obtener valores constantes de temperatura y presión, dichos valores son la presión y temperatura requeridas para llevar a cabo el proceso.

Las condiciones del proceso de secado por liofilización se determinaron de manera experimental dado que no existen trabajos previos en donde se emplee el secado por liofilización a geles de biovidrio 45S5; la mayoría de los trabajos reportados en la literatura científica existente, se centran en diversas áreas del conocimiento tales como la industria farmacéutica y alimenticia[79-82], sin embargo, el equipo empleado para llevar a cabo dicho proceso, tiene la capacidad de determinar la temperatura y presión de sublimación para conseguir liofilizar el material en cuestión; de esta manera se logró determinar que la presión y temperatura óptima para que la remoción del agua contenida en el gel sea eficiente son de $P=9.4 \times 10^{-1}$ mBar y $T=-21$ °C.

El envejecimiento de los geles es el factor más relevante para el control del grado de mesoporos en este trabajo, esto debido a que el equipo de liofilización determinó las condiciones óptimas para el secado, sin embargo el envejecimiento está relacionado con la cantidad de agua presente en el gel, es decir que a mayor tiempo de envejecimiento, menor será la cantidad de agua presente en el gel, tomando en cuenta la naturaleza del gel se propusieron tres tiempos de envejecimiento diferentes realizados a temperatura ambiente. En la **Tabla 3.2** se muestra la denominación que recibe cada muestra y los tiempos de envejecimiento en horas.

Tabla3.2 Tiempo de envejecimiento de los geles.

Denominación de muestra	Tiempo de envejecimiento (h)
a	24
b	48
c	72

3.2.3 Formado de andamios

Para obtener la macroporosidad se probaron dos rutas de procesamiento con dos diferentes plantillas de sacrificio; (1) Esferas de polimetilmetacrilato y (2) Cloruro de sodio en polvo. En la primera ruta para la elaboración de los andamios macroporosos se utilizaron esferas de polimetilmetacrilato en solución, estos fueron añadidos a los geles antes del secado por liofilización, de tal forma que estos se distribuyen homogéneamente por toda la estructura. Se añadieron en 10, 20, 30 y 40% en peso, para originar diferentes grados de porosidad, las muestras se denominaron con la letra p por el uso del polimetilmetacrilato y con números de acuerdo al contenido de plantilla siendo 1 equivalente a 10% en peso .

En la segunda ruta se utilizó cloruro de sodio como agente plantilla de sacrificio. Se añadió cloruro de sodio en polvo con un tamaño de partícula de 1mm para obtener macroporosidad en los andamios, el cloruro de sodio se añadió en 10, 20, 30, 40% en peso. El prensado se realizó con una presión de 96 MPa. La denominación de las muestras se denota con la letra n aludiendo al cloruro de sodio y de igual manera los números indican la cantidad de plantilla usado.

Tabla 3.3 Rutas de procesamiento y cantidad de plantilla.

Denominación de muestra	Ruta 1 PMMA % en peso	Ruta 2 NaCl % en peso
p1	10	x
p2	20	x
p3	30	x
p4	40	x
n1	x	10
n2	x	20
n3	x	30
n4	x	40

3.2.4 Tratamiento térmico

En esta etapa se realizó un sinterizado parcial del andamio con dos objetivos principales: el primero es otorgar la rigidez suficiente al andamio sin llegar que afecte la porosidad que se ha obtenido del secado por liofilización y la síntesis sol-gel, la cual es vital para las interacciones entre el huésped y los andamios. El segundo fue remover por el efecto de la descomposición térmica las esferas de polimetilmetacrilato que se ha adicionado previamente para la formación de las cavidades o huecos de mayor dimensión. Se realizó el sinterizado parcial a tres temperaturas: 650, 750 y 850 °C. Estas temperaturas se han seleccionado de esta manera gracias al trabajo previo de Contreras y col. en el que se demostró que estas temperaturas son las más óptimas para obtener la rigidez necesaria para estos fines [83]. En la **Tabla 3.4** se muestran las condiciones a las que se realizaron los tratamientos.

Tabla 3.4 Condiciones del tratamiento térmico.

Temperatura de sinterización parcial	Rapidez* de calentamiento	Temperatura 1	Permanencia	Rapidez* de calentamiento	Temperatura 2	Permanencia	Denominación de tratamiento
650	2 °C/min	100 °C	60 min	2 °C/min	650 °C	180 min	1
750	2 °C/min	100 °C	60 min	2 °C/min	750 °C	180 min	2
850	2 °C/min	100 °C	60 min	2 °C/min	850 °C	180 min	3

3.3 Caracterización

3.3.1 Microscopía electrónica de barrido

Por medio de la técnica de microscopía electrónica de barrido se observó y caracterizó la superficie de los andamios obtenidos de las dos rutas de procesamiento realizadas, las imágenes obtenidas se analizaron para conocer el tamaño de los agregados obtenidos mediante la síntesis,

así como para observar el efecto de los tratamientos realizados sobre la porosidad y los agregados. Todas las muestras que fueron analizadas se metalizaron con cobre y fueron montadas en un porta objetos usando cinta adhesiva de doble cara.

3.3.2 Espectroscopía dispersiva de electrones (EDS)

Por medio de la acoplación de EDS al microscopio electrónico de barrido empleado para obtener las imágenes de microscopía electrónica de barrido, fue posible analizar puntualmente la composición química de los materiales obtenidos y realizar un estimado de la composición química del volumen del material. El ensayo fue realizado a todas las muestras obtenidas.

3.3.3 Difracción de rayos-X

Por medio de la técnica de difracción de rayos-X de polvos, se conocieron las fases cristalinas presentes en los materiales tratados térmicamente a 650, 750 y 850 °C de los lotes envejecidos a 24, 48 y 72 h. Las condiciones para la obtención de los patrones de difracción de rayos-X fueron las siguientes: Filamento de cobre con una longitud de onda 1.5406 Å, un paso de 0.02° por 0.6 s y un rango de 10 a 70°. La identificación de los patrones de difracción de rayos-X obtenidos serán comparados con los patrones de libre acceso (COD) de la base de datos abierta de cristalografía [84].

3.3.4 Espectroscopía de transmisión de infrarrojo con transformada de Fourier

Por medio de la técnica de espectroscopía de transmisión de infrarrojo con transformada de Fourier se conocieron los grupos funcionales del material y se relacionaron con los grupos funcionales reportados previamente en la literatura, la espectroscopía de transmisión de infrarrojo con transformada de Fourier se realizó partiendo del material en polvo para formar una pastilla en adición de bromuro de potasio en polvo del biovidrio 45S5, la relación usada es =0.003 g de

polvo de 45S5 en 0.3 g de bromuro de potasio, de igual manera se realizaron espectroscopías de transmisión de infrarrojo para los materiales tratados a 650, 750 y 850 °C de los lotes envejecidos a 24, 48 y 72 h.

3.3.5 Determinación del área superficial específica del andamio

Se determinó el área superficial de los andamios obtenidos con un envejecimiento de 24, 48 y 72 h de envejecimiento tratados térmicamente a 650, 750 y 850 °C por medio de la técnica de adsorción de nitrógeno (BET) con la finalidad de conocer el efecto del tiempo de envejecimiento de los materiales sobre el área superficial específica, así como las temperaturas a las cuales se ha tratado el material.

3.4 Bioactividad y citotoxicidad del andamio

3.4.1 Preparación de solución amortiguadora de trisaminometano (TRIS)

Para la formación de la capa de hidroxiapatita se puede realizar tanto con suero corporal simulado, como con una solución de trisaminometano en agua desionizada al 0.062 M. La solución fue preparada en un recipiente de polipropileno con la finalidad de evitar que en la superficie del recipiente se forme hidroxiapatita, como sería el caso si el recipiente fuera de vidrio. La temperatura para la solución fue de 37.5 °C con una tolerancia para variar la temperatura de 1.5 °C positiva o negativamente, se añadió 7.545 g de TRIS en 800 ml de agua desionizada con agitación magnética, luego de haber sido disuelto gradualmente todo el TRIS, se ajustó el pH a un valor de 7.40 usando una solución de ácido clorhídrico al 1 M, luego de haberse realizado el ajuste de la solución se almacenó en refrigeración a 4 °C.

Los materiales obtenidos previamente, así como el material control se sumergieron en tubos Eppendorf con un volumen de solución de 600 µl por un tiempo de inmersión de 5 días a una temperatura de 37.5 °C en una atmósfera con 5% de CO₂.

3.4.2 Cultivo de células

3.4.2.1 Preparación de solución amortiguadora de fosfatos

Se realizó 250 ml de la solución madre, con 0.5 g de KCl, 0.6 g de KH₂PO₄, 20 g de NaCl y 3.6 g de Na₂HPO₄, se disolvió Na₂HPO₄ en 40 ml de agua destilada con agitación y con calor (37 °C), luego, se disolvió KCl, NaCl y KH₂PO₄ en 130 ml de agua destilada, posteriormente se combinaron ambas soluciones, se midió y se ajustó el pH a 7.4 con NaOH o HCl [85].

3.4.2.2 Conteo de células

El conteo celular se realizó por medio de la cámara de Neubauer, este procedimiento tuvo la finalidad de cuantificar el número de células existentes para posteriormente realizar el cultivo con un número específico de células. A diferencia de las zonas exteriores, que se utilizan para rotulación, los campos interiores están esmerilados y pulidos. El número de células contadas se calcula mediante la siguiente fórmula.

$$\frac{n \text{ células}}{\mu\text{l Solución}} = \frac{n \text{ Células contadas}}{a \cdot L \cdot V_i/V_o}$$

Donde:

n células contadas=cantidad de células contadas en los cuadrantes de la cámara

a =superficie contada (mm²)

L =profundidad de la cámara (mm)

V_i/V_o =dilución de la muestra

La cuadrícula de recuento está formada por 9 cuadrados grandes, cada uno de ellos con una superficie de 1 mm².

El cuadrado grande central, está dividido en 25 cuadrados medianos, cada uno de ellos con 16 cuadrados pequeños en su interior. Los cuatro cuadrados grandes de las esquinas, están formados por 16 cuadrados medianos.

El recuento se puede realizar tanto en el cuadrado grande central como en los de las esquinas, dependiendo del tamaño de las células en estudio. En la **Figura 3.2** se muestra un esquema de los cuadrantes de la cámara de Neubauer.

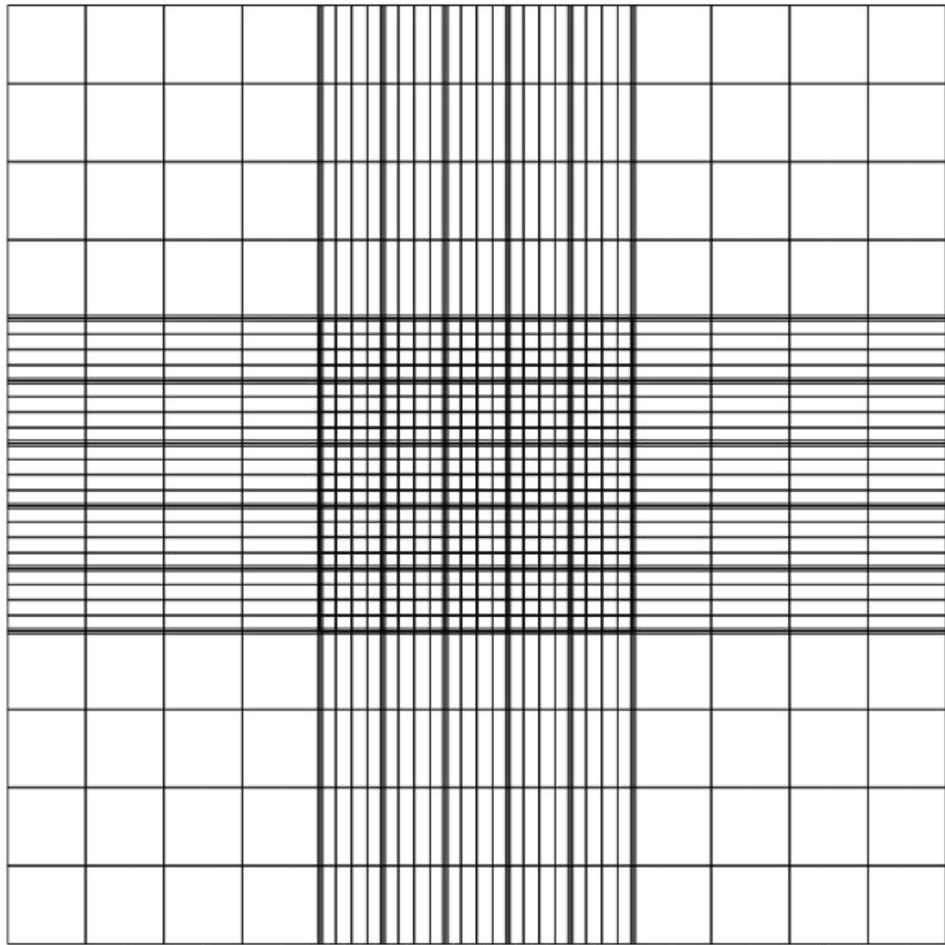


Figura 3.2 Cuadrantes de la cámara de Neubauer.

3.4.2.3 Cultivo celular

Se realizó el cultivo celular con macrófagos de ratón; células del sistema inmunitario que se localizan en diversos órganos y tejidos, debido a que son células del sistema inmune y estar presentes en diferentes tejidos del cuerpo es que este tipo de células se pueden emplear para evaluar la citotoxicidad de los andamios. Proceden de células precursoras de la médula ósea que se dividen dando monocitos (un tipo de leucocito), que tras atravesar el epitelio de los capilares y penetrar en el tejido conjuntivo se convierten en macrófagos. Pueden ingerir y destruir bacterias, células dañadas y eritrocitos gastados [86].

Se suplementó el medio de cultivo DMEM con un 20% de suero fetal bovino, 100 μ M de 2P-ácido ascórbico, 2 mM de L-Glutamina y 100U/ml de penicilina, así como 100 μ g/ml de estreptomina.

Se cultivaron las células durante 24 horas con medio de cultivo DMEM completo y se incubaron en un ambiente con 5% de CO₂ a una temperatura de 37 °C.

3.4.3 Biofuncionalización

3.4.3.1 Colágeno hidrolizado tipo I

Se realizó una funcionalización con colágeno hidrolizado tipo I en solución en buffer de fosfatos. La solución se realizó al 1.4% con la finalidad de evitar la saturación de colágeno en la solución. La funcionalización se realizó por medio de inmersión de los materiales en la solución al 1.4% de colágeno en un volumen de 600 μ l en tubos Eppendorf durante 25 min a 25 °C con agitación de 150 rpm de acuerdo con el protocolo estipulado por abad y col. [44].

3.4.3.2 Cultivo celular de macrófagos de ratón

Se realizaron cultivos previos al cultivo con el material para que las células crecieran y se posea la cantidad de células necesaria por pocillo. El cultivo se realizó con medio de cultivo DMEM

(Gibco Invitrogen, Carlsbad, CA) con 10% de suero fetal de bovino y 100 U/ ml de penicilina-streptomina a un temperatura de 37 °C en una atmósfera con 5% de CO₂ y a una humedad de 95%. Se incubaron 100,000 células por pocillo para el ensayo de citotoxicidad con tinción celular DAPI.

3.4.3.3 Evaluación de la variación de pH respecto al material

Dado que el biovidrio 45S5 es un material bioactivo en el que es de gran importancia evaluar los cambios de pH que este pueda ocasionar al medio de cultivo (DMEM) ya que las células no soportan condiciones extremas de pH, es decir que estas deben estar inmersas en un ambiente de pH neutro. Se realizaron inmersiones de 24 h de permanencia en el medio de cultivo del biovidrio 45S5 tratado a 850 °C sin recubrimiento de colágeno tipo I, ni inmersión en TRIS, biovidrio 45S5 inmerso en TRIS por 24 h, biovidrio 45S5 recubierto en colágeno tipo I e inmerso en TRIS por 240 h.

3.4.4 Evaluación de la citotoxicidad

3.4.4.1 Ensayo de viabilidad celular con DAPI ó (4',6-diamidino-2-fenilindol)

DAPI (4',6-diamino-2-fenilindol) es un marcador fluorescente que tiene afinidad a las regiones ricas de adenina y timina en las secuencias de ADN, gracias a que DAPI no puede traspasar la membrana celular es que es utilizado para teñir núcleos celulares.

Primeramente, se incubaron los macrófagos (1 durante 24 h para que estos se fijen en la placa de 24 pocillos), luego, se añadieron 5 fragmentos de biovidrio 45S5 con un peso de 0.5 g previamente esterilizados en luz UV al cultivo y se mantuvo durante 24 h con medio de cultivo nuevo posteriormente, se retiró el medio y se lavó la caja con PBS (1 ml por pocillo) una vez durante 5 minutos posteriormente, se añadió formaldehído durante 15 min y se retiró el

formaldehído, se lavó la caja con PBS (1 ml por pocillo) por 5 min y se retiró posteriormente se añadió PBS (1 ml por pocillo) nuevo finalmente, se añadió DAPI (10 mg/ml en solución madre de H₂O; invitrogen D1306) 1 µl por pocillo en la caja y se dejó reposar a temperatura ambiente durante 1 hora, finalmente se examinó la caja con los núcleos celulares teñidos con el DAPI bajo microscopio de epifluorescencia, el nucleo celular se observa a λ excitación ~ 359 nm, λ emisión ~ 461 nm.

CAPÍTULO VI. RESULTADOS

A continuación se analizarán y compararán los resultados obtenidos de la metodología experimental, primeramente se analizarán los resultados pertinentes a la síntesis y formado del andamio en sí, subsecuente a ello se analizarán los resultados obtenidos de los ensayos “*in vitro*”, particularmente se analizará la formación de hidroxiapatita como una medida indirecta de la bioactividad del material y la citotoxicidad del andamio en los macrófagos de ratón.

4.1 Síntesis de biovidrio 45S5 mediante síntesis sol-gel acoplada a la técnica de secado por liofilización

4.1.1 Composición elemental

En la **Tabla 4.1** se muestra la composición química promedio obtenida por medio de la síntesis sol-gel catalizada por medio de una solución de ácido cítrico en agua al 5 mM y envejecida a 24, 28 y 72 h a su vez se comparó con la composición química del biovidrio 45S5 comercial.

Tabla 4.1 Composición nominal 45S5 y composición obtenida por EDS.

	Si	P	Ca	Na	O
45S5®	21.03	2.62	17.51	18.18	40.66
45S5 acido citrico 24 h	20.57	2.20	19.18	17.60	40.45
45S5 acido citrico 48 h	20.76	2.45	18.92	17.96	40.31
45S5 acido citrico 72 h	20.83	2.34	18.52	17.89	40.14

Como se aprecia en la tabla anterior los resultados obtenidos mediante la técnica de fluorescencia de rayos-X por energía dispersiva (EDS) las composiciones químicas no muestran una gran variación entre la síntesis realizada con la composición nominal del biovidrio comercial así como en la composición mostrada en los trabajos de L. Hench y J. Faure [32, 35, 43].

Sin embargo, la pérdida de silicio y el aumento de calcio se pueda deber a una insuficiencia del catalizador al 5 mM para protonar completamente a los precursores de silicio (TEOS) y calcio ($\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) o mayor tiempo de reacción para que el catalizador empleado sea capaz de lograr una mayor hidrólisis de estas especies.

4.1.2 Estructura de los andamios

La **Figura 4.1(a)** corresponde a la variante de andamios obtenidos con esferas polimetilmetacrilato, como se puede observar a simple vista, la superficie del andamio tiene una apariencia densa, es decir que no se aprecia la macroporosidad en el andamio a diferencia del andamio obtenido con cloruro de sodio en polvo 4.1(b), donde a simple vista es apreciable una superficie con menor grado de densidad respecto al andamio anterior. En la Figura 4.1 (c) se muestra una imagen de microscopía electrónica de barrido del andamio obtenido mediante la adición de polimetilmetacrilato como templante de sacrificio, se aprecia que la superficie del andamio esta constituida por agregados de biovidrio 45S5 cuyo tamaño es variante, desde 200 μm , hasta 20 μm los agregados de menor tamaño, sin embargo, se aprecia nula porosidad en la superficie, en la Figura 4.1(d) se aprecia en la superficie poros obtenidos mediante la adición de polvos de cloruro de sodio cuyo tamaño de partícula es inferior a 1mm. Finalmente, las Figuras 4.1 (e y f) muestran una estructura de los agregados similar, en (e), se aprecian pequeños poros marcados en color rojo, cuyo tamaño aproximado es de 1.06 μm , en la Figura 4.1 (f) de igual manera se muestran poros similares (círculos rojos), sin embargo, en la Figura 4.1 (f) se aprecian fases cúbicas, remanentes de los polvos de cloruro de sodio.

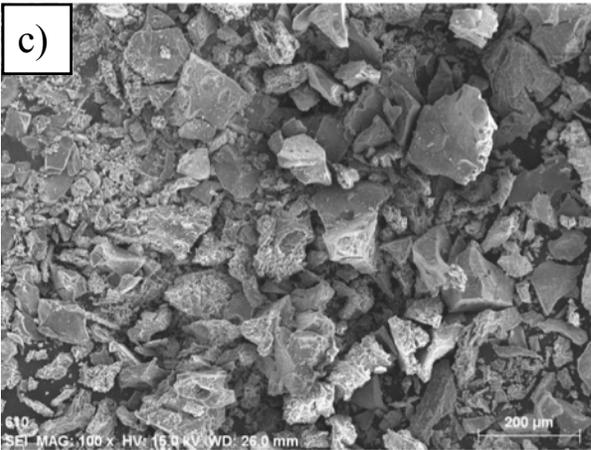
De acuerdo con la **Figura 4.1**, se ha podido deducir que los andamios obtenidos mediante la adición de plantillas de polimetilmetacrilato con partículas con tamaño mayor de 500 μm y con la facilidad de formar agregados entre ellas no es suficiente para conseguir macroporosidad, debido a esta razón es que se optó por la ruta de procesamiento de andamios mediante la adición de cloruro de sodio.



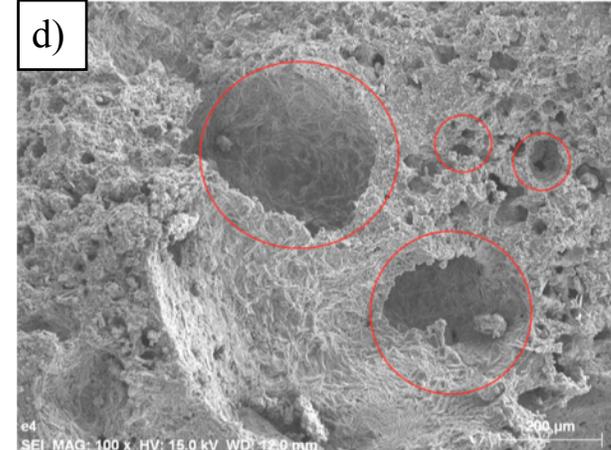
Andamios obtenidos con PMMA



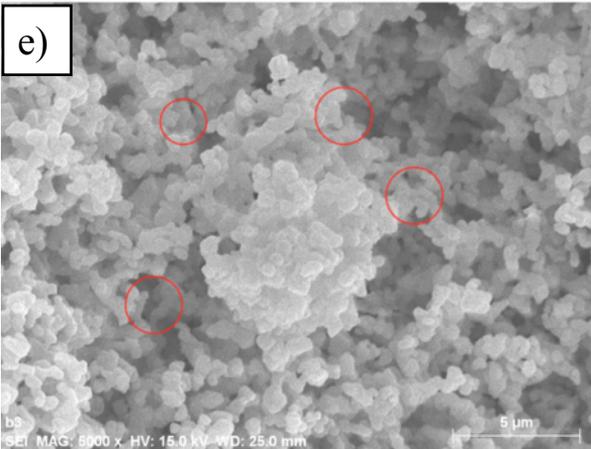
Andamios obtenidos con NaCl



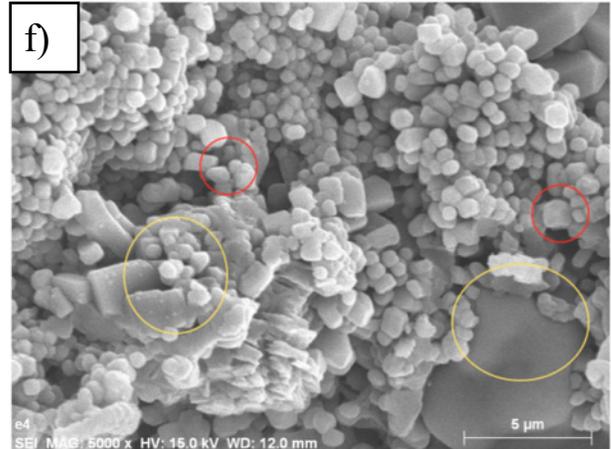
Andamios obtenidos con PMMA (100x)



Andamios obtenidos con NaCl (100x)



Andamios obtenidos con PMMA (5000x)



Andamios obtenidos con NaCl (5000x)

Figura 4.1 Comparación estructural de las rutas de obtención realizadas.

4.1.3 Análisis microestructural de los geles envejecidos a 24, 48 y 72 horas, así como tratados térmicamente a 650, 750 y 850 °C

A continuación se muestran imágenes más características obtenidas por microscopía electrónica de barrido para las condiciones de envejecimiento de 24, 48 y 72 h, así como las diferentes temperaturas (650, 750 y 850 °C) a las cuales fueron tratados los geles.

Como se aprecia en la **Figura 4.2**, las paredes del andamios están formadas por agregados con forma esferoidal con tamaños del orden de 0.3 μm , lo cual es algo sumamente deseable ya que el comportamiento mecánico de este tipo de agregados es muy bueno por la distribución de esfuerzos, además se aprecia la porosidad entre agregados, la cual fue causada por la sublimación del agua y la baja temperatura del tratamiento.

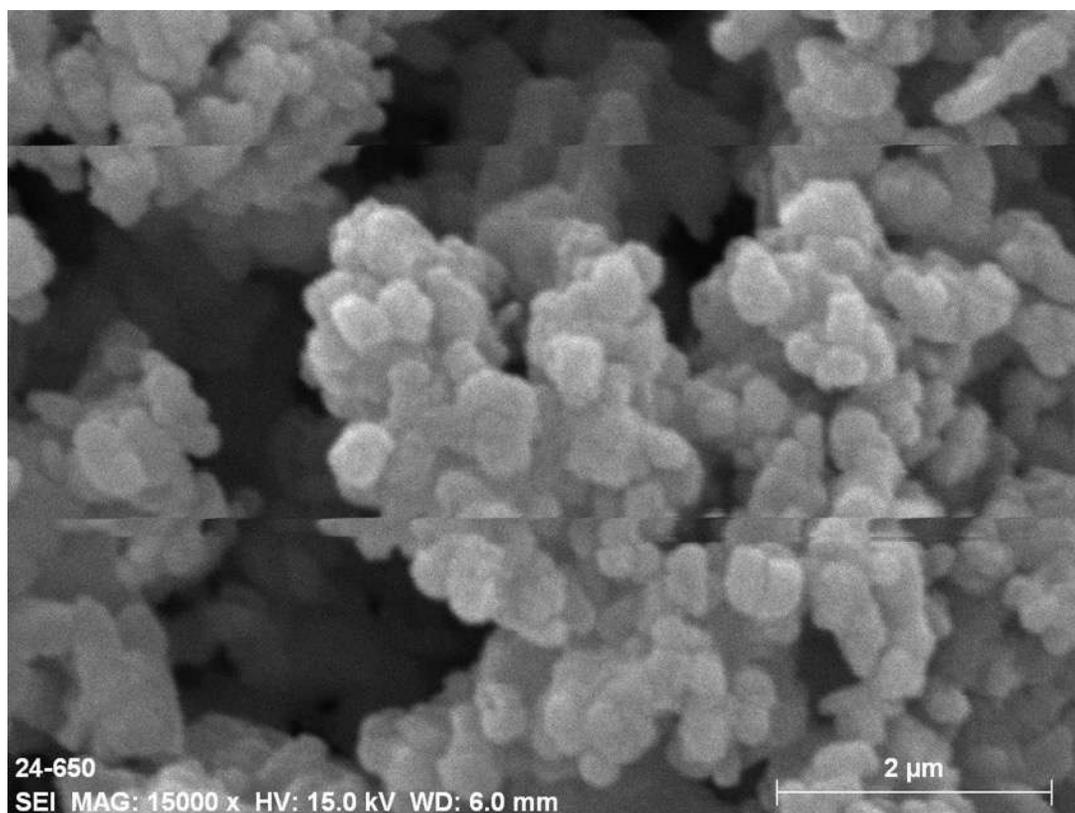


Figura 4.2 Imagen de MEB del material envejecido a 24 h y tratado a 650 °C.

En la **Figura 4.3** se muestra la imagen obtenida por MEB del material obtenido con 24 h de envejecimiento y 750 °C de tratamiento térmico, como se logra apreciar en la imagen el tamaño de los agregados es similar a la **Figura 4.2**, sin embargo, estos agregados tienen una apariencia menos esférica y los poros que se aprecian son de menos tamaño respecto a la imagen anterior mas no existe un cambio, se alcanza a distinguir la naturaleza porosa de estos agregados mostrando nanoestructura tipo esponja, lo que demuestra que las 24 horas de envejecimiento del gel antes de ser secado por liofilización, le dan a la estructura porosa la resistencia suficiente.

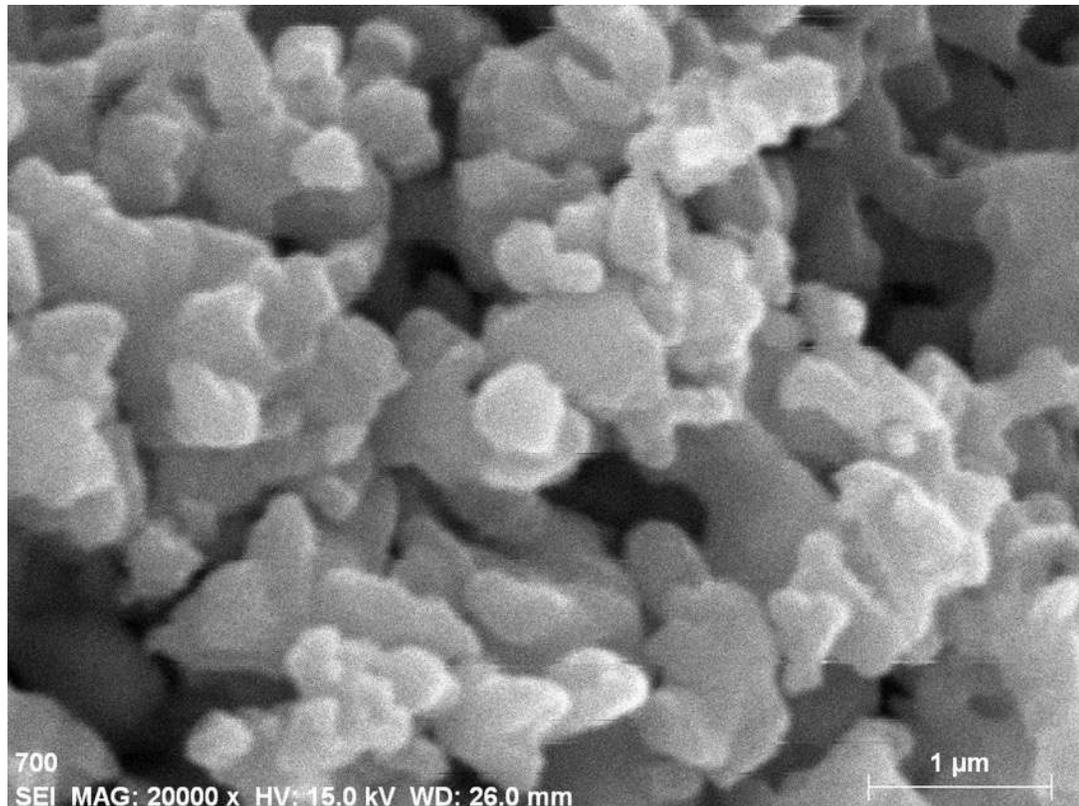


Figura 4.3 Imagen de MEB del material envejecido a 24 h y tratado a 750 °C.

En la **Figura 4.4** se muestra el biovidrio tratado a 850 °C con el mismo tiempo de envejecimiento de 24 h, se aprecia una disminución de la porosidad esto se debe principalmente al fenómeno de encuellamiento el cual se produce por procesos de difusión entre agregados cerámicos al someterlos a temperaturas elevadas. Sin embargo, no se pierde la estructura porosa de los agregados mismos, manteniendo su estructura tipo esponja, sin colapsar los mesoporos con esta

temperatura de tratamiento térmico (850 °C), aún cuando se tiene la formación de cuellos entre los agregados.

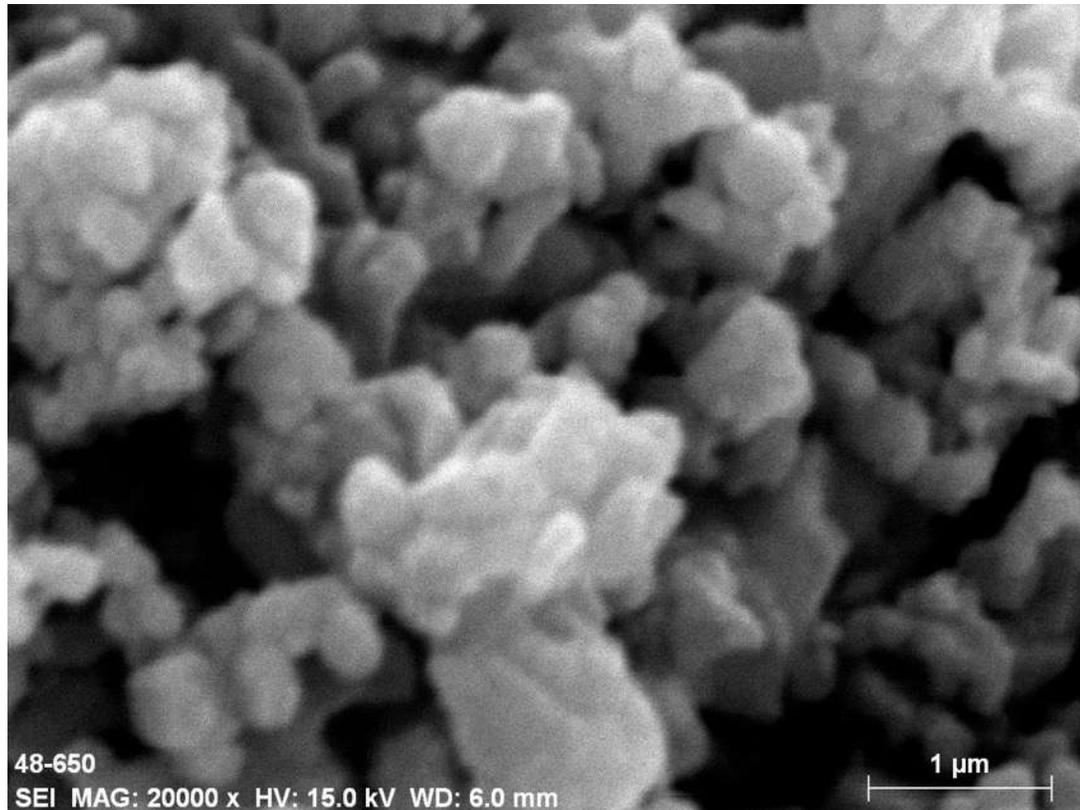


Figura 4.4 Imagen de MEB del material envejecido a 24 h y tratado a 850 °C.

En la **Figura 4.5** se muestra el gel envejecido a 48 h y tratado a 650 °C, se puede apreciar que los agregados están posicionados a menor distancia uno de otro esto se debe al tiempo de envejecimiento ya que en cuanto el sol se convierte en gel, en este continúan las reacciones de condensación, en otras palabras la estructura fractal continua hidrolizandose y condensandose agua de ella, por lo cual es un factor importante a considerar para el secado por liofilización debido a dicha expulsión de agua la porosidad es afectada de manera que esta disminuye. En la **Figura 4.5** se aprecia en la cercanía de los agregados en comparación con el lote anterior una disminución de porosidad. Aunque todavía se distingue la estructura tipo esponja de los agregados, estos son evidentemente más densos debido al mayor tiempo de envejecimiento que origina una mayor condensación de los agregados.

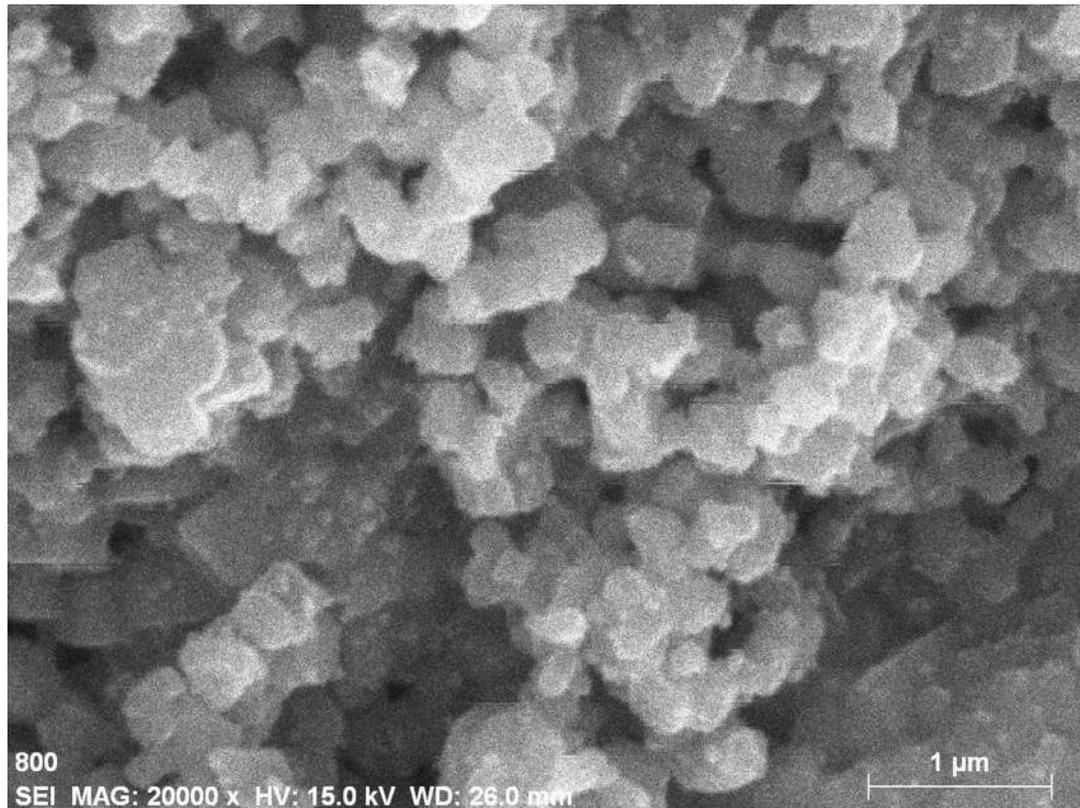


Figura 4.5 Imagen de MEB del material envejecido a 48 h y tratado a 650 °C.

En la **Figura 4.6** se muestra la misma condición de envejecimiento con una mayor temperatura de tratamiento térmico (750 °C), se aprecia cada vez más la formación de cuellos y la unión de los agregados, gracias al efecto de la temperatura y envejecimiento en adición a la cercanía que existe entre agregados, estos tienden por medio procesos de difusión a formar cuellos en todo el volumen del material, causando una pérdida de porosidad entre los agregados, sin embargo el material envejecido durante 48 h mantiene su nanoestructura porosa tipo esponja similar a los materiales envejecidos durante 24 h. Se observa en la **Figura 4.6** que el tamaño promedio de los agregados es de 174 nm aproximadamente, mientras que el tamaño promedio de los poros es de 554 nm aproximadamente, lo cual indica que a la temperatura de tratamiento térmico de 750°C, los poros no se reducen de tamaño.

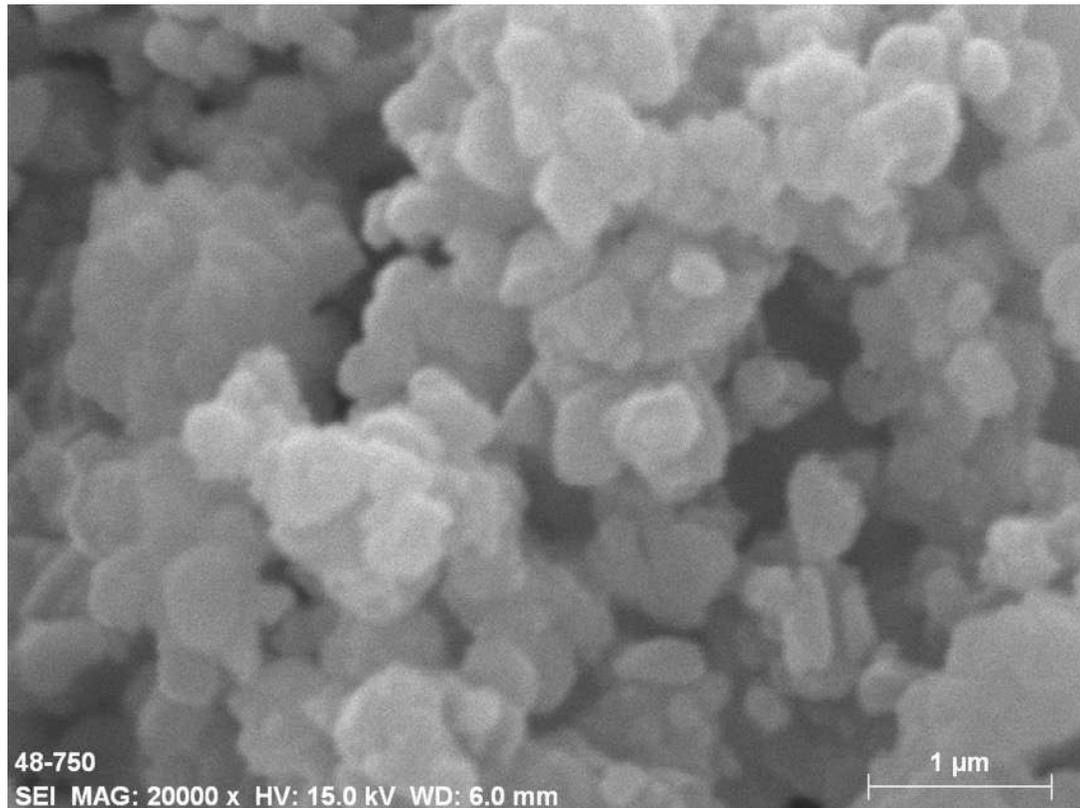


Figura 4.6 Imagen de MEB del material envejecido a 48 h y tratado a 750 °C.

En la **Figura 4.7** se aprecia el material envejecido 48 horas y tratado a 850°C. Cada vez resulta más evidente la pérdida de porosidad propiciada por la sinéresis al envejecer el gel durante 48 h. las reacciones de condensación en el envejecimiento causan que los agregados que han sido formados en el sol mediante reacciones de hidrólisis de los precursores, se agreguen de forma más estrecha entre sí y a su vez causan formación de H₂O, este subproducto es el causante de la mesoporosidad de la estructura fractal del gel, por lo que, a mayor tiempo de envejecimiento, mayor expulsión de H₂O de la estructura fractal del gel y por consecuencia la porosidad decrece. El encuellamiento entre agregados sucede gracias a la alta temperatura a la cual fue tratado térmicamente el material, se muestran agregados más densos entre otros, que al parecer, siguen manteniendo su estructura esponjosa en todos los casos a estas condiciones de envejecimiento y alta temperatura de tratamiento térmico, los agregados tienen en su mayoría tamaños del orden submicrónico.

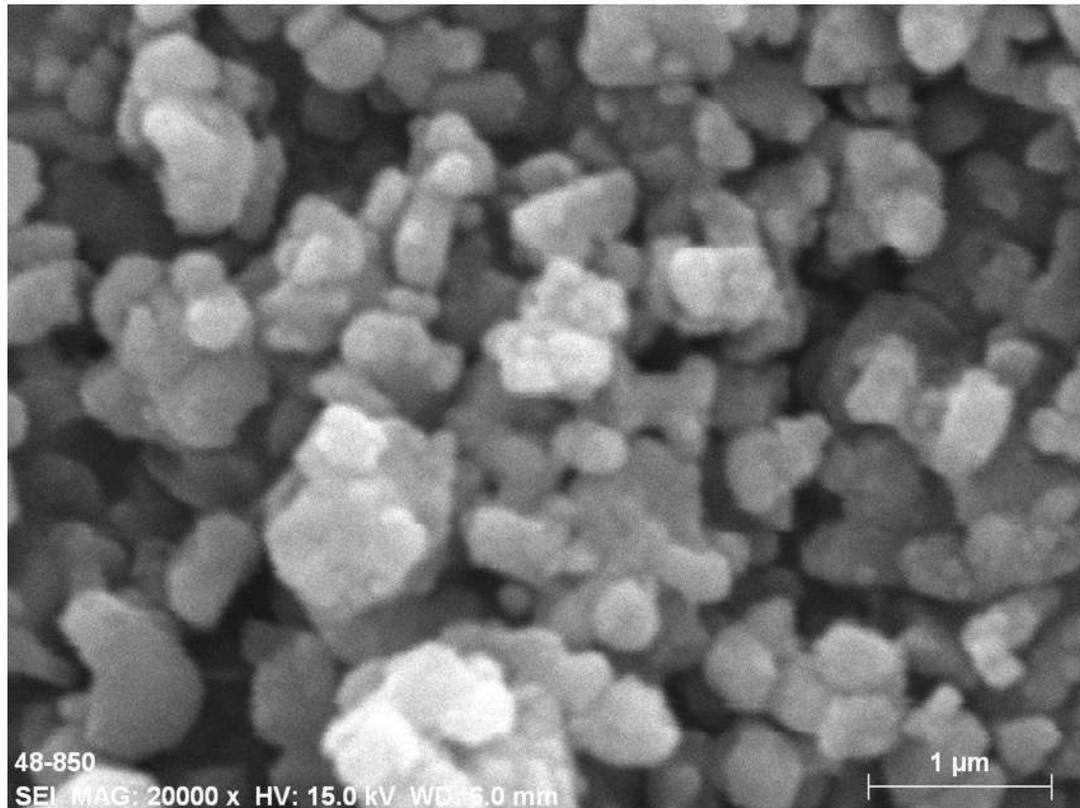


Figura 4.7 Imagen de MEB del material envejecido a 48 h y tratado a 850 °C.

En la **Figura 4.8** se muestra el material obtenido del gel envejecido por 72 h y tratado térmicamente a 650 °C, se logra apreciar que para estas condiciones de envejecimiento del gel y temperatura de tratamiento térmico se presenta un cambio microestructural bastante interesante. Aparentemente, la mayor condensación lograda a largos tiempos de envejecimiento, genera una nanoestructura más definida, ya que los agregados micrónicos que se observaban en las muestras anteriores no llegan a formarse debido al fenómeno de sinéresis existente en el proceso de gelación del sol precursor, por lo que las reacciones de condensación generan nanopartículas que se agregan en toda la estructura con tamaños del orden de 170 nm en promedio en la estructura esponjosa, es evidente en todas las muestras con porosidad entre partículas que varía con unos cuantos nanómetros y porosidades mayores del orden submicrónico en ciertas zonas, entre los agregados de nanopartículas.

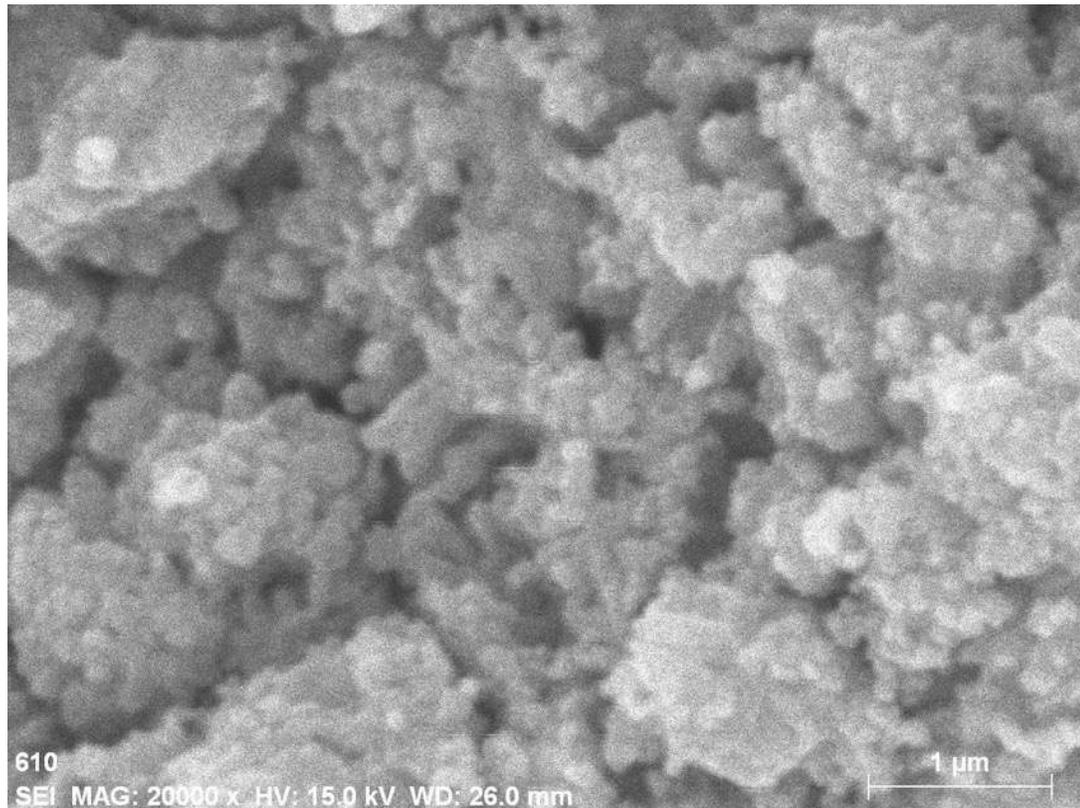


Figura 4.8 Imagen de MEB del material envejecido a 72 h y tratado a 650 °C.

Para la muestra tratada térmicamente a 750°C con un tiempo de permanencia de tratamiento de 3 h y un tiempo de envejecimiento del gel de 72 h se logra apreciar un cambio morfológico en los agregados nanoestructurados que conforman al andamio. Como se observa en la **Figura 4.9**, las partículas han crecido de tamaño. El tamaño de agregados promedio es de 300 nm, este crecimiento de tamaño es debido a la temperatura de tratamiento térmico, la cual promueve fenómenos de difusión entre agregados, causando la formación de cuellos entre agregados, los cuales se aprecian en la estructura de la **Figura 4.9**.

Se observa una pared con mayor densidad de agregados, pero manteniendo la estructura esponjosa, claramente están unidas entre sí a través de cuellos y dejando una estructura porosa uniforme entre ellas, que representa claramente una estructura porosa interconectada con poros de 199 nm en promedio.

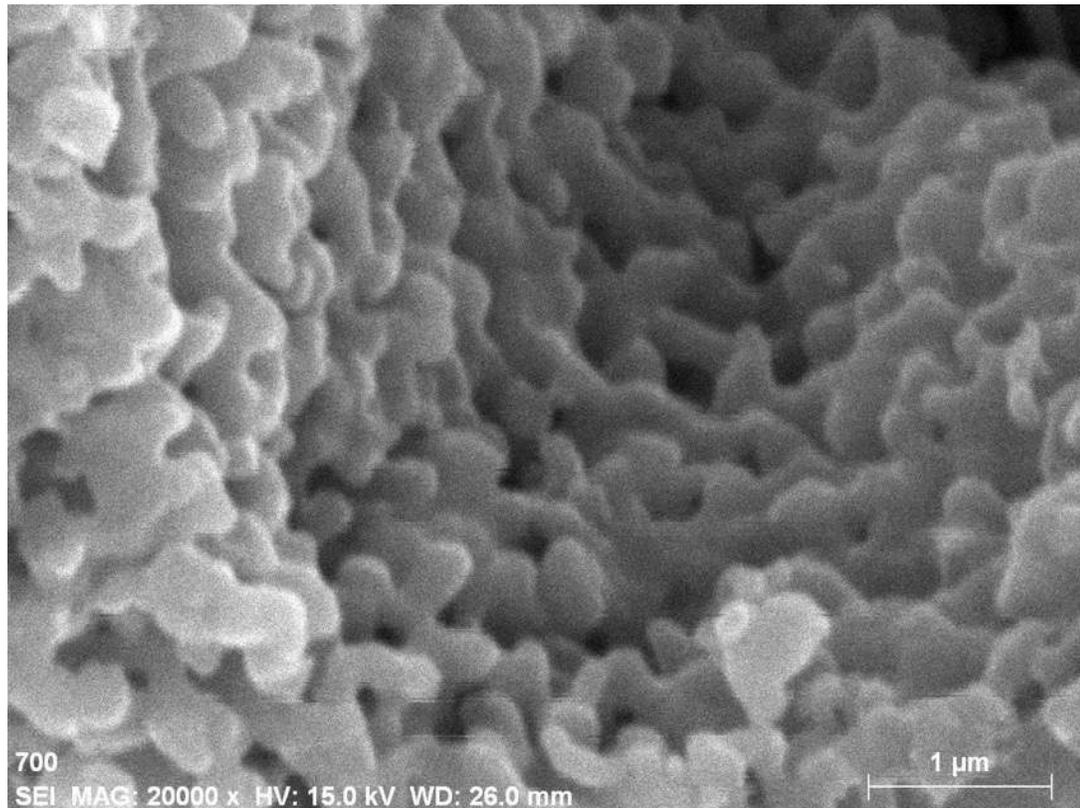


Figura 4.9 Imagen de MEB del material envejecido a 72 h y tratado a 750 °C.

Las muestras envejecidas por 72 h y tratadas térmicamente a 850 °C se muestran en la **Figura 4.10**. En las micrografías del lote de tratado a 850 °C) se observa que las partículas crecen uniformemente con una morfología tipo rodillo, puede observarse en esta nueva morfología de crecimiento en forma de rodillos entrecruzados que existe una porosidad entre partículas a través de toda la estructura que resulta ser interconectada. Las partículas cilíndricas cuyo tamaño promedio de los agregados es de 800 nm mantienen su apariencia esponjosa pero en menor grado, mostrándose más densas que las anteriores, lo que indica el posible colapso de la estructura mesoporosa obtenida del proceso sol-gel con liofilización. Se distingue en esta muestra la formación de cuellos entre las partículas cilíndricas lo que indica un menor grado de unión entre ellas.

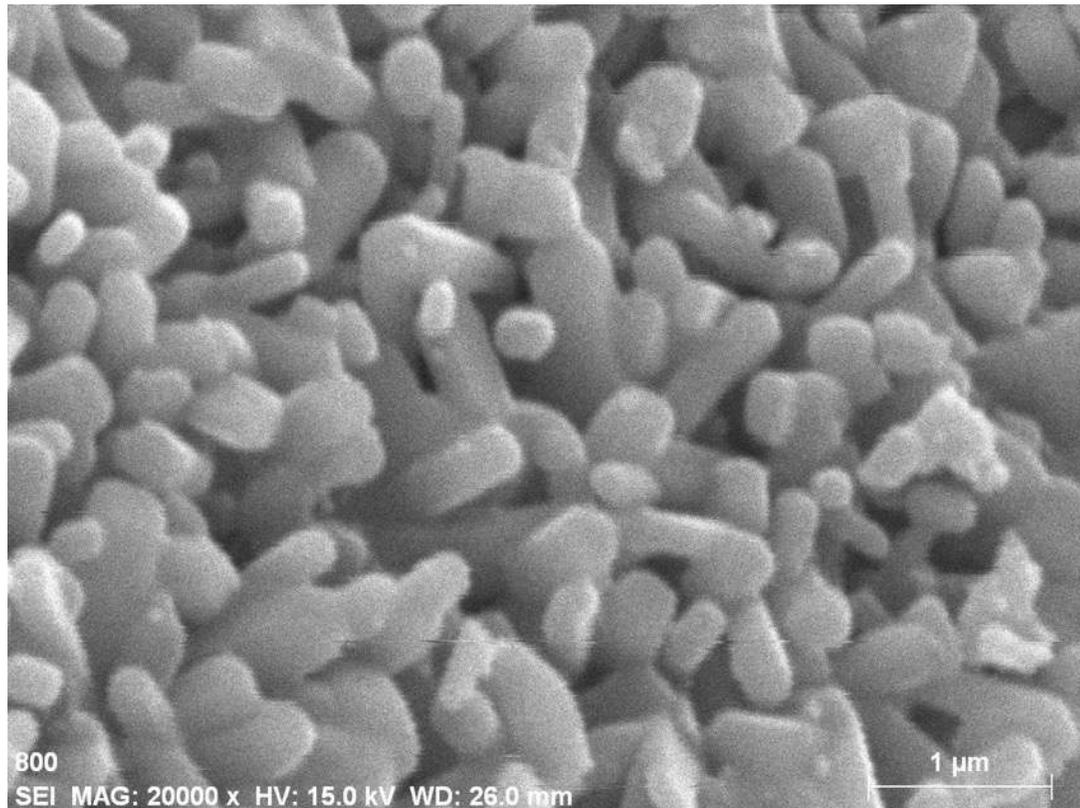


Figura 4.10 Imagen de MEB del material envejecido a 72 h y tratado a 850 °C.

Se concluyó que la condición de envejecimiento de 24 es la más óptima gracias a que esta contiene mayor cantidad de agua en el gel que al ser removida mediante liofilización, esta genera pequeños poros del orden meso. En resumen, la estructura obtenida y mostrada en las imágenes anteriores, se obtuvo una similitud morfológica con respecto a los trabajos realizados por Yamamoto y col. [63] quien de igual manera, realizó un secado mediante liofilización y obtuvo mesoporos en las paredes del gel seco, así mismo la microestructura obtenida mediante la síntesis propuesta en este trabajo posee similitud al trabajo realizado por Liu y col. quienes emplearon la misma técnica de secado [62].

4.1.4 EDS

En la **Figura 4.11** (a-i) los espectros obtenidos para las 9 condiciones experimentales. Se puede apreciar de los espectros que, tanto el envejecimiento de los geles por 24 horas así como los tratamientos térmicos realizados a las diferentes temperaturas (650, 750 y 850°C) **Figura 4.11(a-c)** no causa cambios en la composición del mismo.

En la **Figura 4.11 (d-f)** se muestran los espectros de dispersión de electrones para los geles envejecidos durante un tiempo de 48 h. Se aprecia cierta homogeneidad de los espectros para las tres temperaturas de tratamiento térmico realizadas.

La composición elemental del biovidrio permanece con variaciones muy pequeñas entre las tres condiciones de envejecimiento, lo cual es natural debido a la facilidad de la técnica sol-gel para obtener materiales con una pureza alta[55], este resultado se atribuye a la capacidad de la síntesis sol-gel para la obtención de materiales cerámicos, particularmente para la obtención de biovidrio 45S5 frente a la ruta de obtención tradicional del biovidrio 45S5, la cual es mediante fusión de los óxidos que conforman al biovidrio 45S5 y la adición de fundentes con la finalidad de obtener temperaturas asequibles de fusión de los óxidos, como se menciona en el capítulo I en la sección 2.3, la síntesis sol-gel para la obtención de biovidrio 45S5 es superior al proceso tradicional de fusión de óxidos en cuanto a pureza química del producto obtenido se refiere, ya que, la síntesis sol-gel parte de precursores químicos de alto grado de pureza <90%, gracias a este alto grado de pureza de los precursores es que no existe la presencia de impurezas en los espectros de dispersión de electrones, aunado a que durante el proceso de hidrólisis de los precursores, no existe interacción química, ya que el poliestireno que conforma los recipientes de donde se realizó la síntesis es sumamente estable químicamente frente a los reactivos empleados.

En adición estos espectros indican que no existe interacción entre los contenedores de poliestireno en los cuales se almacenó el gel, ni tampoco existió una interacción entre el ambiente y los geles durante el envejecimiento de estos, así mismo los espectros obtenidos, indican la homogeneidad entre las composiciones químicas de todos los geles obtenidos.

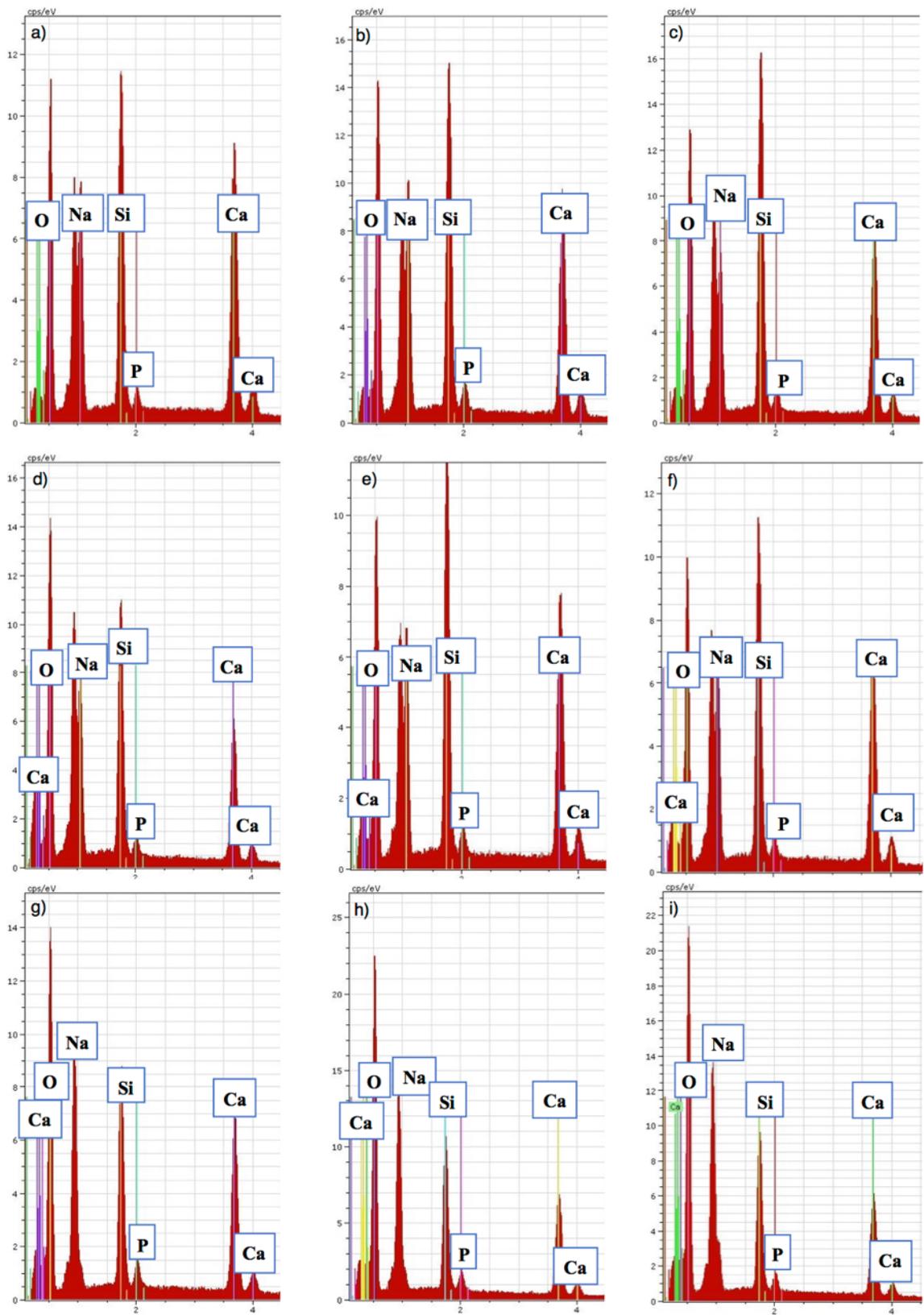


Figura 4.11 Espectros obtenidos por dispersión de electrones, (a-c) 24 h de envejecimiento, (d-f) 48 h de envejecimiento, (g-i) 72 h de envejecimiento

4.1.5 Difracción de rayos-X

Se analizó el comportamiento cristalográfico del material por medio de la técnica de difracción de rayos-X, en concreto la variante Bragg-Brentano para polvos. A continuación se muestran los patrones de difracción de rayos-X para las condiciones de envejecimiento de 24, 48 y 72 h y cada uno de los tratamientos térmicos realizados a 650, 750 y 850 °C. En la **Figura 4.12** se muestra el patrón de difracción de la condición de 650°C Y 24 h de envejecimiento, se pueden apreciar picos correspondientes a la fase de combeita ($\text{Na}_2\text{Ca}_2\text{Si}_3\text{O}_9$), compuesto que es característico en el biovidrio 45S5, además, aparecen silicatos de calcio y calcio libre en menor proporción con respecto a las fases anteriores. La combeita aparece en el biovidrio 45S5 a partir de los 610 °C. debido la separación de la fase vítrea inicial en dos fases vítreas que son inmiscibles entre sí a la temperatura de 580 °C en la cual ocurre la primer transición vítrea, la aparición de esta fase se asocia a una disminución de la la energía necesaria para la nucleación de los núcleos ricos en silicato circundantes mientras que los dominios ricos en fosfato pueden actuar como sitios de nucleación heterogénea [46].

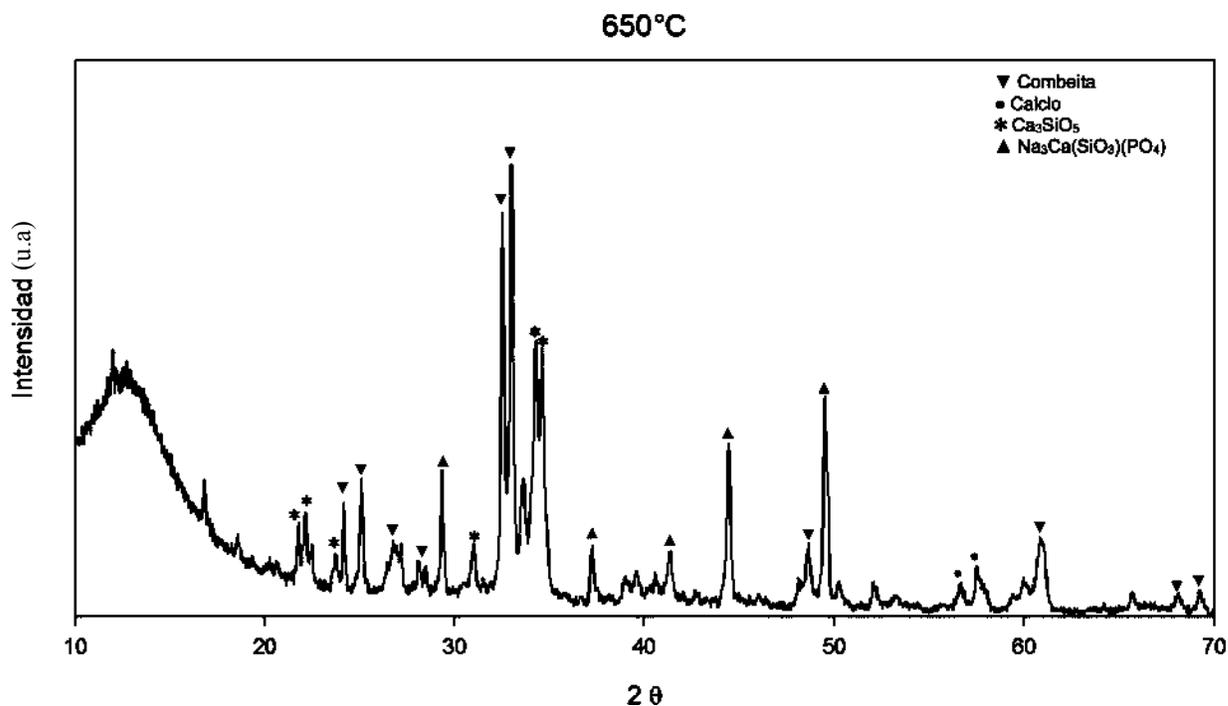


Figura 4.12 Patrón de difracción de rayos-X para el material envejecido por 24 h y tratado a 650 °C.

Los componentes básicos de clinofosinaita $\text{Na}_3\text{CaPSiO}_7$ son unidades tetraédricas de SiO_4 , que puede unirse a través de los átomos de oxígeno para formar anillos aislados de estructuras tetraédricas de ciclosilicato. A. El-Ghannam y col. [87] reportaron que debido a la deformidad de la estructura de clinofosinaita, esta proporciona muchos sitios activos para la unión a proteínas.

Además, en contacto con soluciones fisiológicas, la clinofosinaita libera iones de Si además de Na, Ca y P, que tienen la capacidad de formar hidroxiapatita. El Ca_3SiO_5 o hatrurita es un silicato de calcio que posee una estructura piramidal - ditrigonal piramidal con grupo puntual (3m) y grupo espacial: R 3m. Las dimensiones de la celda unitaria son: $a_1=7.151 \text{ \AA}$, $c_1=25.562 \text{ \AA}$, $Z=9$; $V=1131.63 \text{ \AA}^3$. Su formula semidesarrollada es $3\text{CaO}\cdot\text{SiO}_2$

La aparición de este compuesto se debe a la presencia de los óxidos que componen al biovidrio 45S5, la formación de este compuesto puede deberse a los tiempos del envejecimiento posteriormente de la hidrólisis de las especies de silicio y calcio, este compuesto se descompone térmicamente cerca de los 1200°C motivo por el cual continúan presentes a esta condición de tratamiento térmico. En la **Figura 4.13** se muestra el patrón de difracción de rayos-X del material tratado a 750°C . De igual manera se aprecia la presencia de Combeita, sin embargo los picos característicos se ven desplazados hacia la izquierda en comparación con el patrón anterior, el silicato tricálcico permanece en el patrón sin embargo, los picos se ven disminuidos en intensidad con respecto al patrón anterior.

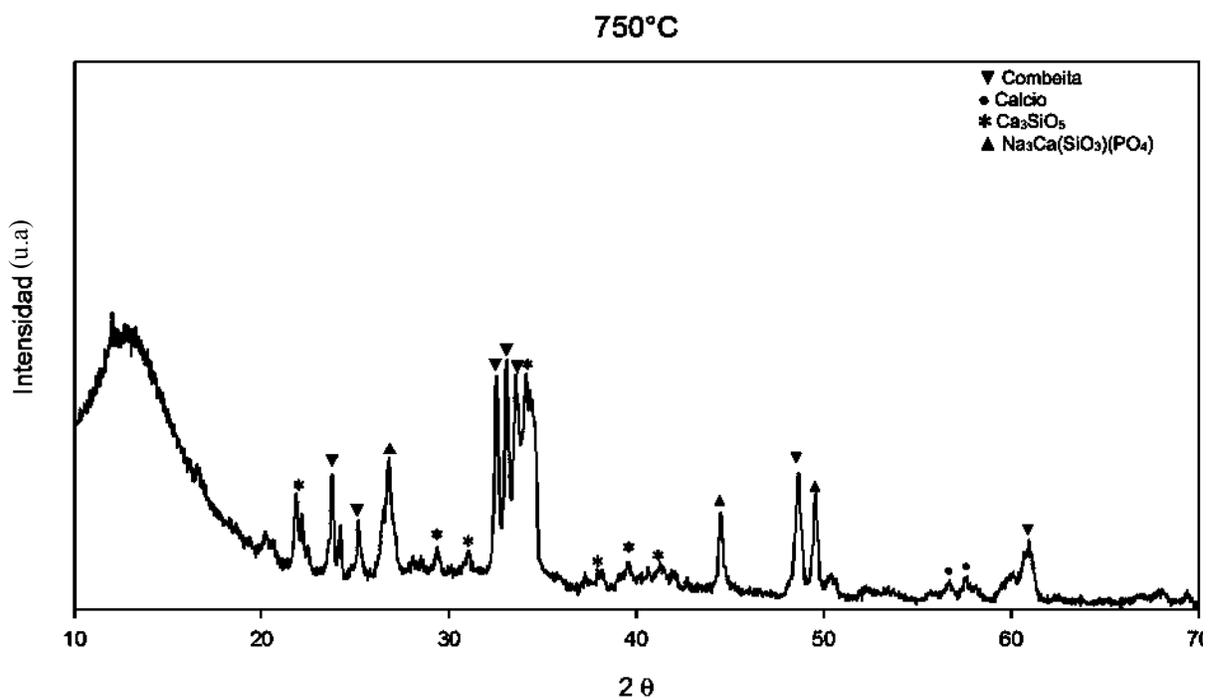


Figura 4.13 Patrón de difracción de rayos-X para el material envejecido por 24 h y tratado a 750°C .

En la **Figura 4.14** se muestra el patrón de difracción del material tratado a 850 °C. No hay cambio en la presencia de las fases mencionadas con anterioridad, sin embargo se aprecian picos muy pequeños correspondientes a calcio libre y óxido de silicio, lo cual indica el comienzo de la descomposición térmica del silicato tricálcico en sus especies formadoras. Se aprecia en el presente patrón de difracción, como la fase amorfa decrece respecto a los patrones anteriores (Figura 4.13 y Figura 4.14), de igual manera aumenta la intensidad de los picos correspondientes a la fase de combeita, comportamiento esperado de acuerdo a la evolución de cristalización del biovidrio 45S5 estudiado anteriormente [88]

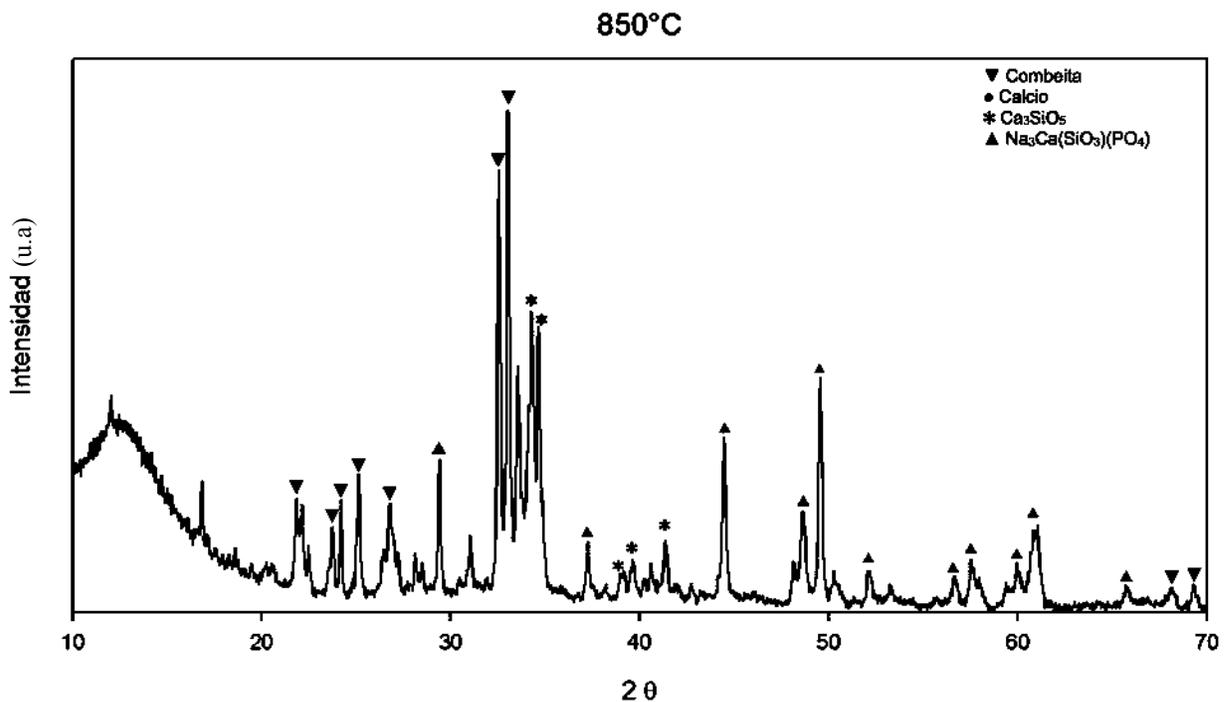


Figura 4.14 Patrón de difracción de rayos-X para el material envejecido por 24 h y tratado a 850 °C.

En la **Figura 4.15** se muestra el patrón de difracción para el material envejecido a 48 h Y tratado térmicamente a 650°C. se aprecia una ligera disminución de los picos característicos de la combeita, además de presencia de óxido de silicio y calcio libre en conjunto con el silicato tricálcico.

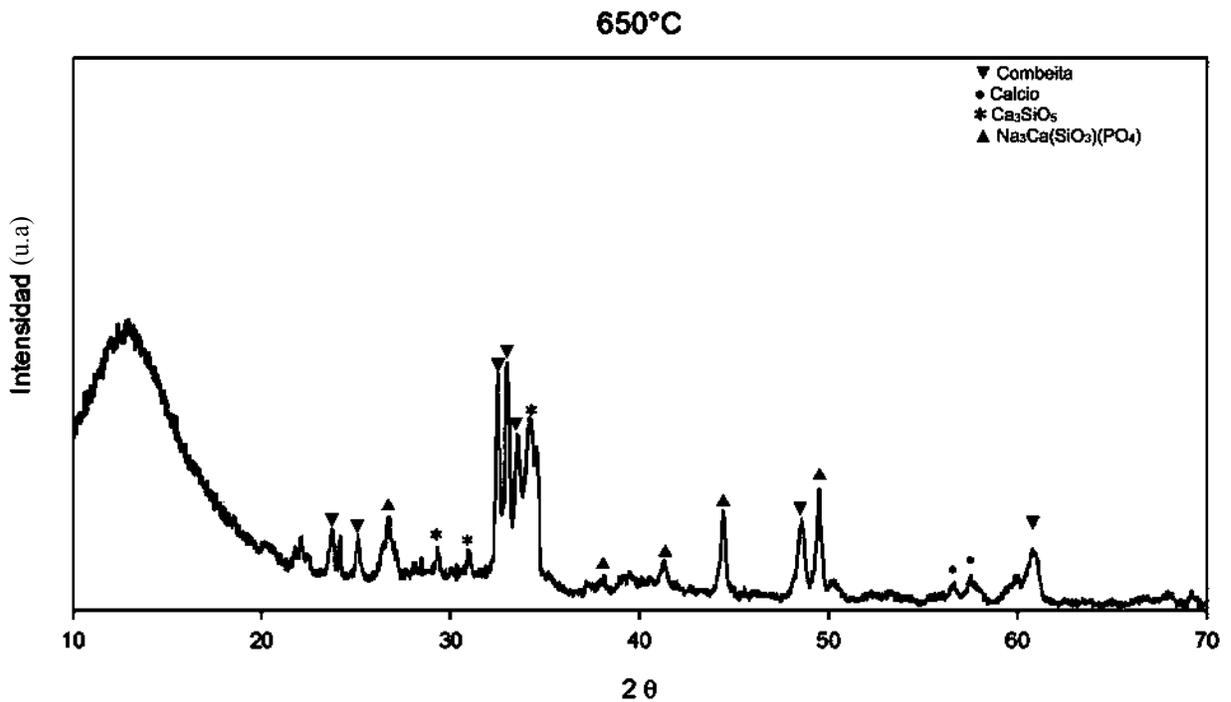


Figura 4.15 Patrón de difracción de rayos-X para el material envejecido por 48 h y tratado a 650 °C.

En la **Figura 4.16** se muestra el patrón de difracción correspondiente al tratamiento térmico de 750 °C en el cual se aprecia una notoria disminución de la fase cristalina y una mayor presencia de los picos de clinofosinaita a partir de los 40 °C. En el rango de 35 a 45 aproximadamente, se aprecia un la presencia de picos característicos de la fase del silicato tricálcico o hatrurita (Ca_3SiO_5) en comparación con el patrón correspondiente al material tratado a 650 °C. Como se menciona anteriormente, esta fase tiene la característica de descomponerse a 1,200 °C, sin embargo a diferencia del material denominado “a2” el cual corresponde a 24 h de envejecimiento y una temperatura de 750 °C, no presenta picos tan definidos de esta fase como ocurre en este difractograma.

750°C

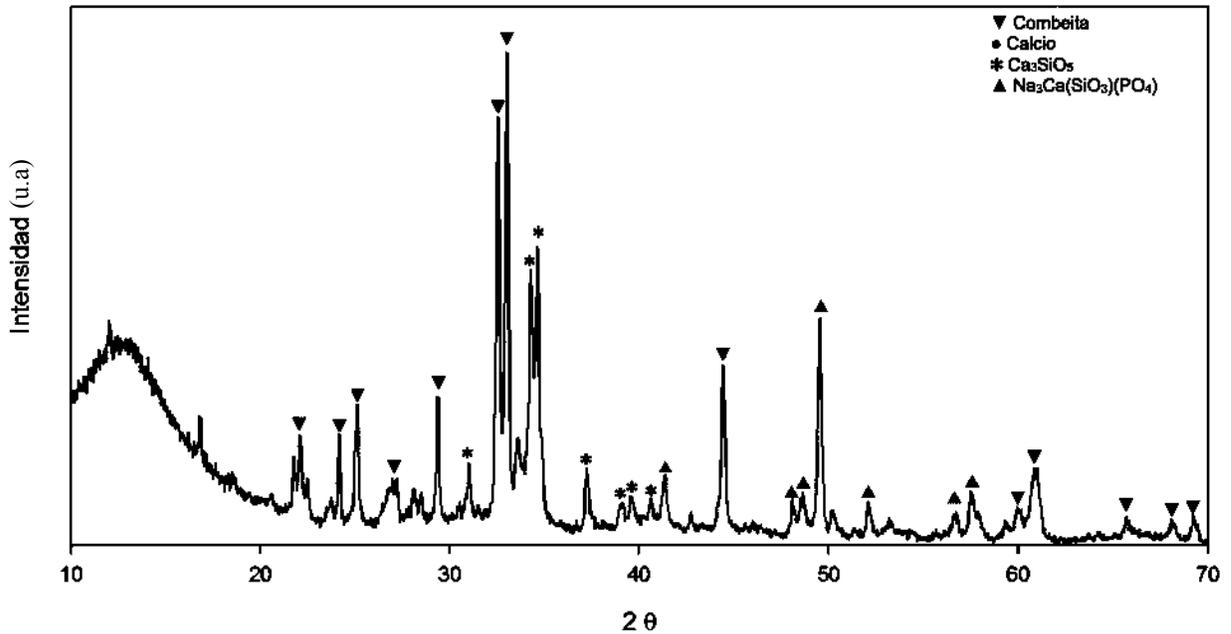


Figura 4.16 Patrón de difracción de rayos-X para el material envejecido por 48 h y tratado a 750 °C.

En la **Figura 4.17** se muestra el patrón de difracción correspondiente al tratamiento térmico de 850 °C en el cual se aprecian picos intensos cerca de los 20°, los cuales son correspondientes al óxido de silicio, al igual que ocurre en el tratamiento térmico de 850 °C para el envejecimiento de 24 h, la presencia de estos picos en conjunto con los picos correspondientes a calcio son indicadores del comienzo de la descomposición térmica del silicato tricálcico formado a raíz del envejecimiento, este compuesto aparece en los cementos Portland y tiene propiedades higroscópicas altas, por lo tanto, la presencia de este compuesto no representa problema alguno en cuanto a la aplicación biológica del material, dado que este cemento es muy socorrido en la práctica odontológica.

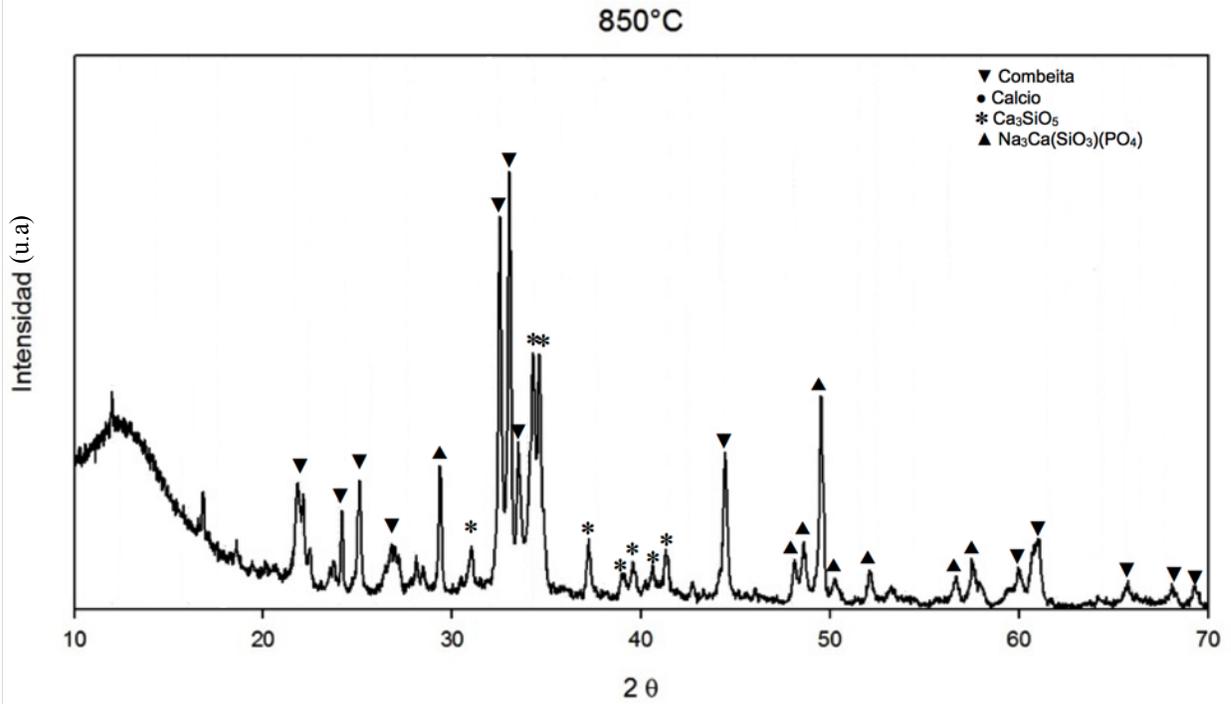


Figura 4.17 Patrón de difracción de rayos-X para el material envejecido por 48 h y tratado a 850 °C.

En la **Figura 4.18** se muestra el patrón de difracción de rayos-X de la muestra envejecida por 72 h y tratada a 650 °C. Se aprecia la aparición de tres picos característicos correspondientes a nitrato de sodio (NaNO_3), la presencia de estas fases es causa del envejecimiento ya que los nitratos de los precursores de calcio y sodio se unieron fuertemente y en gran proporción al sodio por lo que la temperatura del tratamiento y el tiempo de permanencia no consiguieron remover estos nitratos por lo que el tiempo de envejecimiento de 48 h no es favorable para las fases cristalinas del biovidrio 45S5, además se aprecia disminución considerable de la fase amorfa que parece antes de los 20°.

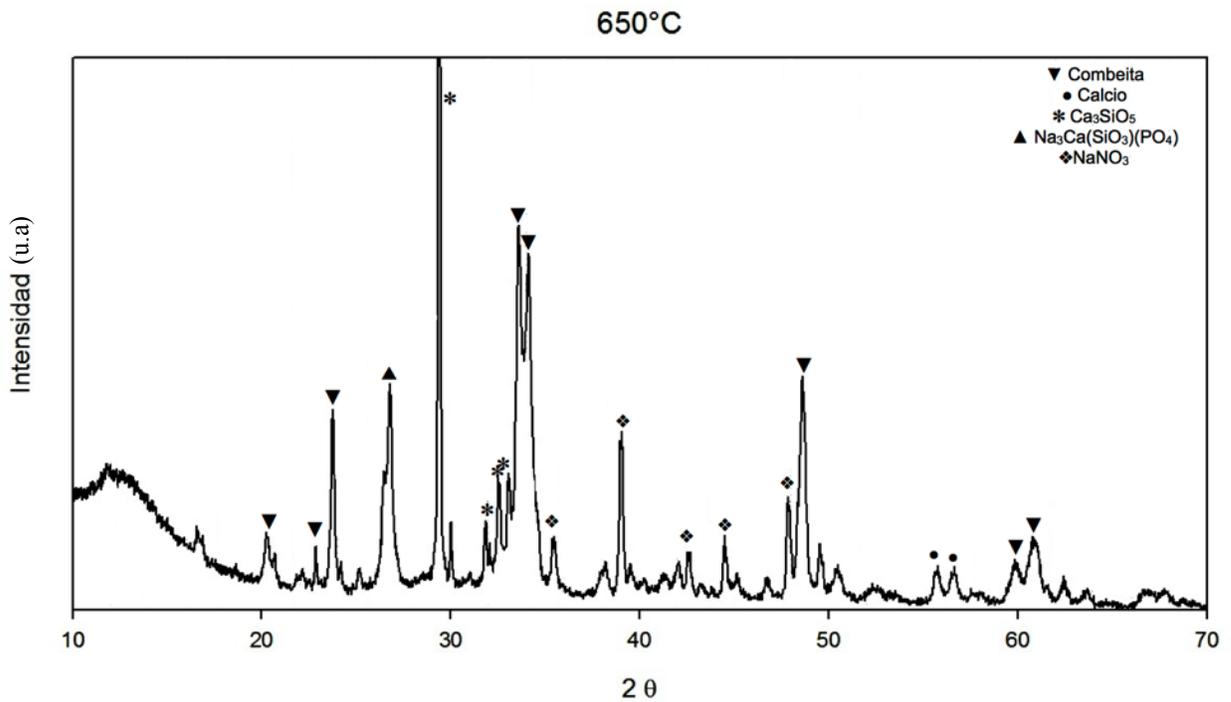


Figura 4.18 Patrón de difracción de rayos-X para el material envejecido por 72 h y tratado a 650 °C.

En la **Figura 4.19** se muestra el patrón de difracción correspondiente al tratamiento térmico realizado 750 °C, en él se aprecia la presencia de las mismas fases cristalinas presentes en los dos lotes anteriores (combeita, hatrurita y clinofosinaita) sin embargo, la fase amorfa característica del material desaparece casi por completo comprometiendo en gran medida la bioactividad del material por lo cual se especula que la liberación de iones en un medio fisiológico será menor con respecto a los envejecimientos de 24 y 48 h, todo esto es indeseable ya que la formación de hidroxiapatita será menor y el material se podría considerar como inerte.

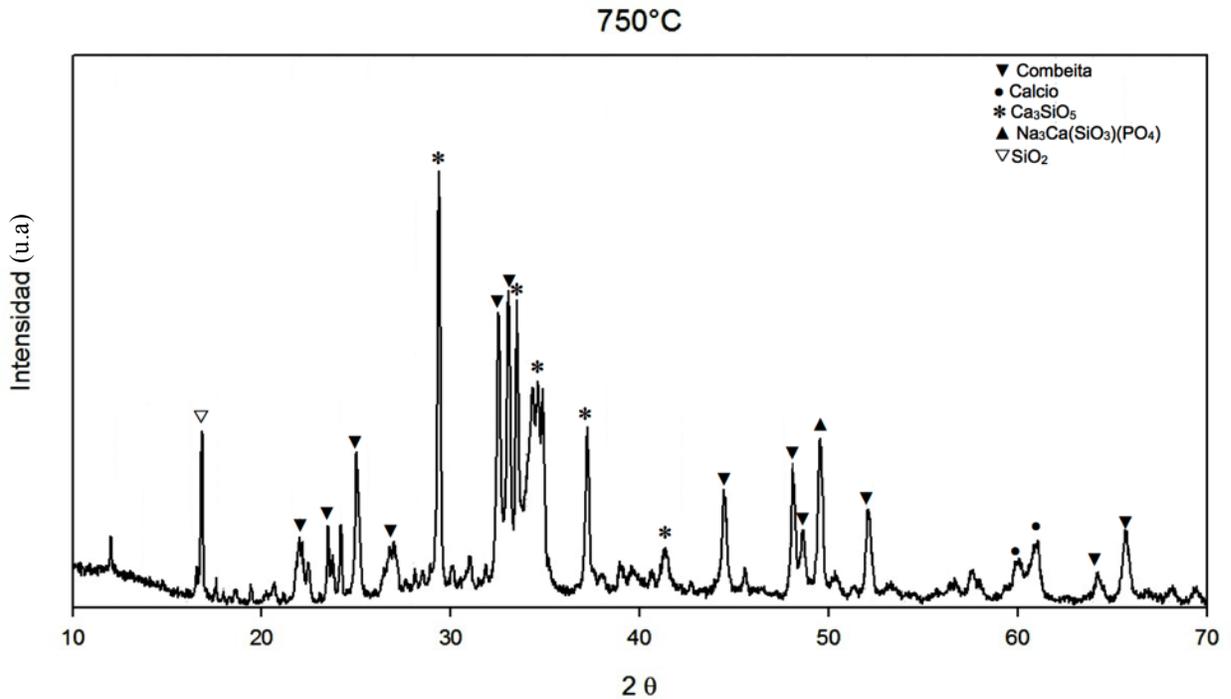


Figura 4.19 Patrón de difracción de rayos-X para el material envejecido por 72 h y tratado a 750 °C.

En la **Figura 4.20** se muestra el patrón de difracción correspondiente a la temperatura de 850 °C. En él se aprecia una mayor presencia de picos correspondientes a la fase de clinofosinaita, los picos comienzan a aparecer a partir de 45° y desaparecen a 65°, a diferencia del patrón para la condición de 850 °C, la fase amorfa es prácticamente inexistente, además, aparece cerca de 54° un pico correspondiente a CaO, de nueva cuenta es un indicador del comienzo de la separación térmica del silicato tricálcico.

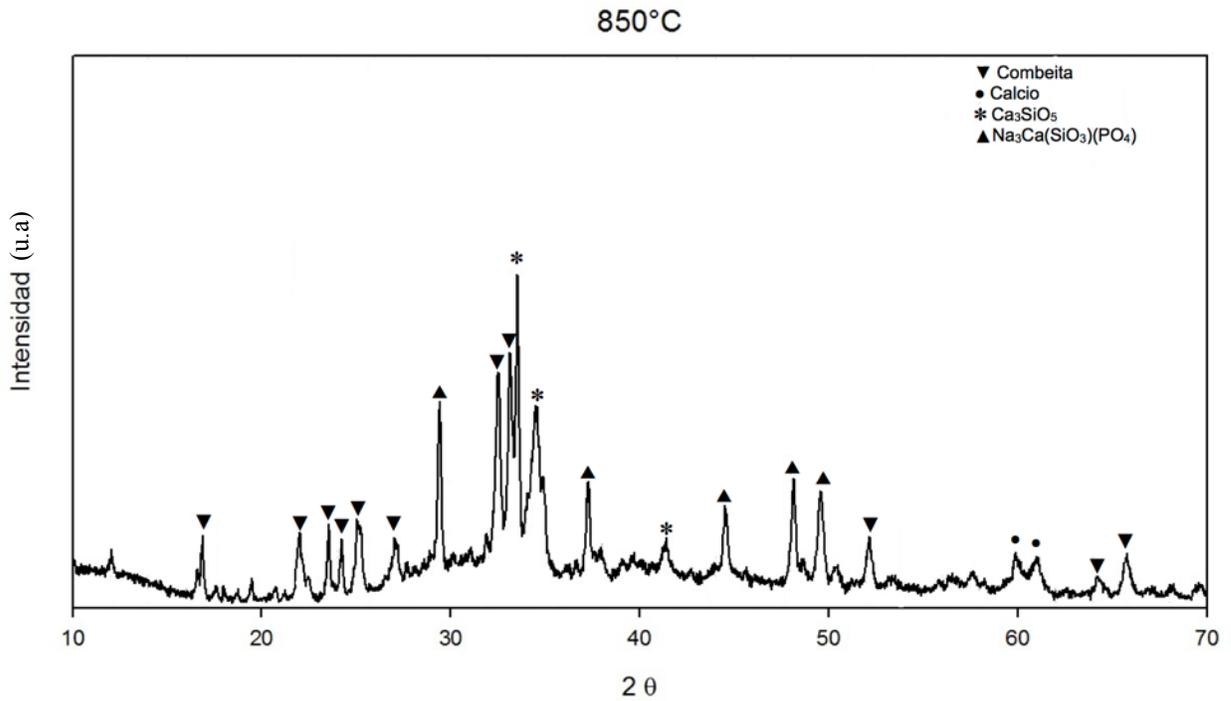


Figura 4.20 Patrón de difracción de rayos-X para el material envejecido por 72 h y tratado a 850 °C.

En la Figura 4.21 se muestra los patrones de difracción a 650 °C para las condiciones de envejecimiento de 24, 48 y 72 h. En el patrón de difracción correspondiente a la condición de 24 horas de envejecimiento se aprecia que en el rango de 10° a 20° se encuentra presente la fase amorfa característica de este material, de igual manera en el patrón de difracción correspondiente a 48 h de envejecimiento se aprecia como dicha fase decrece cerca de los 18°, finalmente el patrón correspondiente a 72 h de envejecimiento presenta una disminución de esta fase amorfa, esto es debido a que durante el tiempo de envejecimiento la estructura fractal del gel continua reaccionando en otras palabras continua hidrolizandose (-OH) lo cual ocasiona que las especies atómicas presentes en el gel reaccionen entre ellas mismas al haber perdido los radicales OH además que el tiempo favorece la difusión lo cual ayuda aquí se generen compuestos tales como silicatos de calcio, óxidos nitratos etc [88].

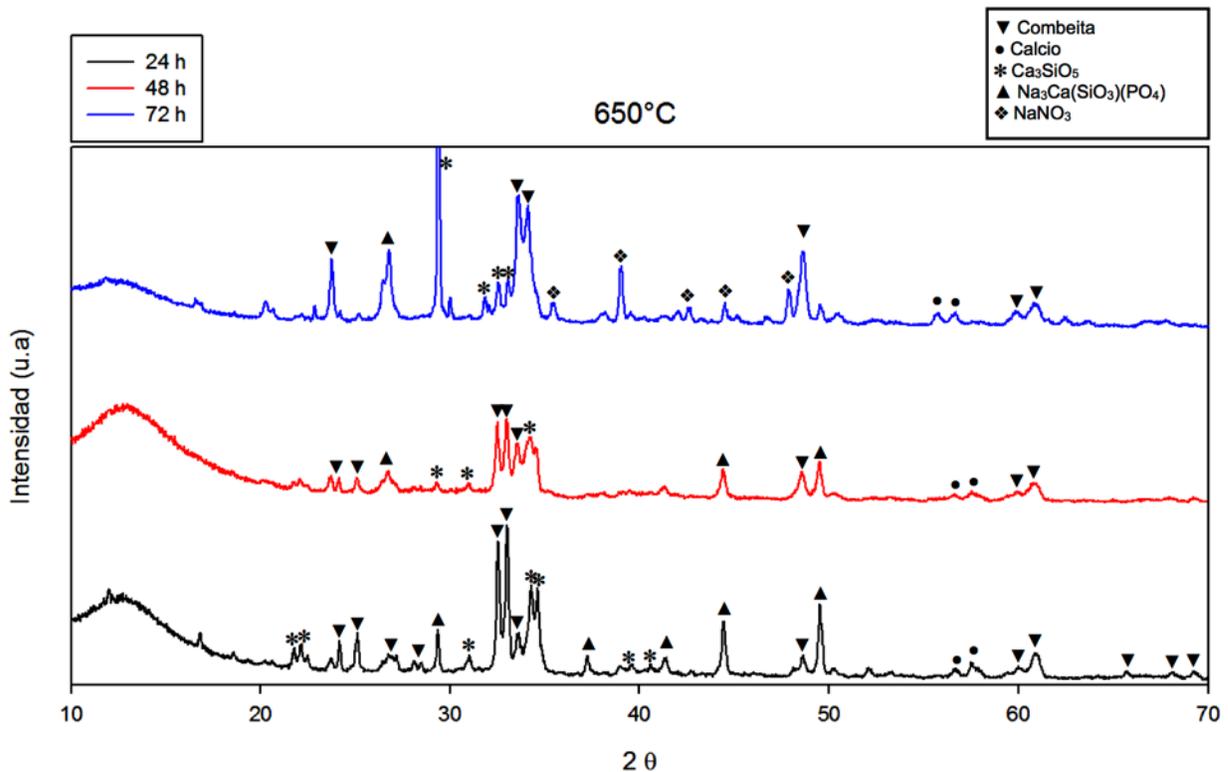


Figura 4.21 Patrones de difracción de rayos-X para los tratamientos hechos a 650 °C y diferentes condiciones de envejecimiento.

En la **Figura 4.22** se muestra la comparación entre los patrones de difracción realizados a la temperatura de 750 °C de tratamiento térmico, se aprecia para la curva de 24 h una fase amorfa mayor que en las curvas de 48 h y 72 h de envejecimiento, se aprecia también las mismas fases presentes entre los 20° y 30° ,las cuales corresponden al silicato tricálcico y combeita, sin embargo los picos comprendidos en el rango de 45° y 52 °C tienen menor presencia en las curvas de 24 h y 48 h de envejecimiento, mientras que, para la curva de 72 h de envejecimiento se aparecen ligeramente más intensos, así mismo, el pico cercano a 30 °C en la curva de 72 h corresponde a calcio libre en la estructura, probablemente a causa de la separación térmica del silicato tricálcico.

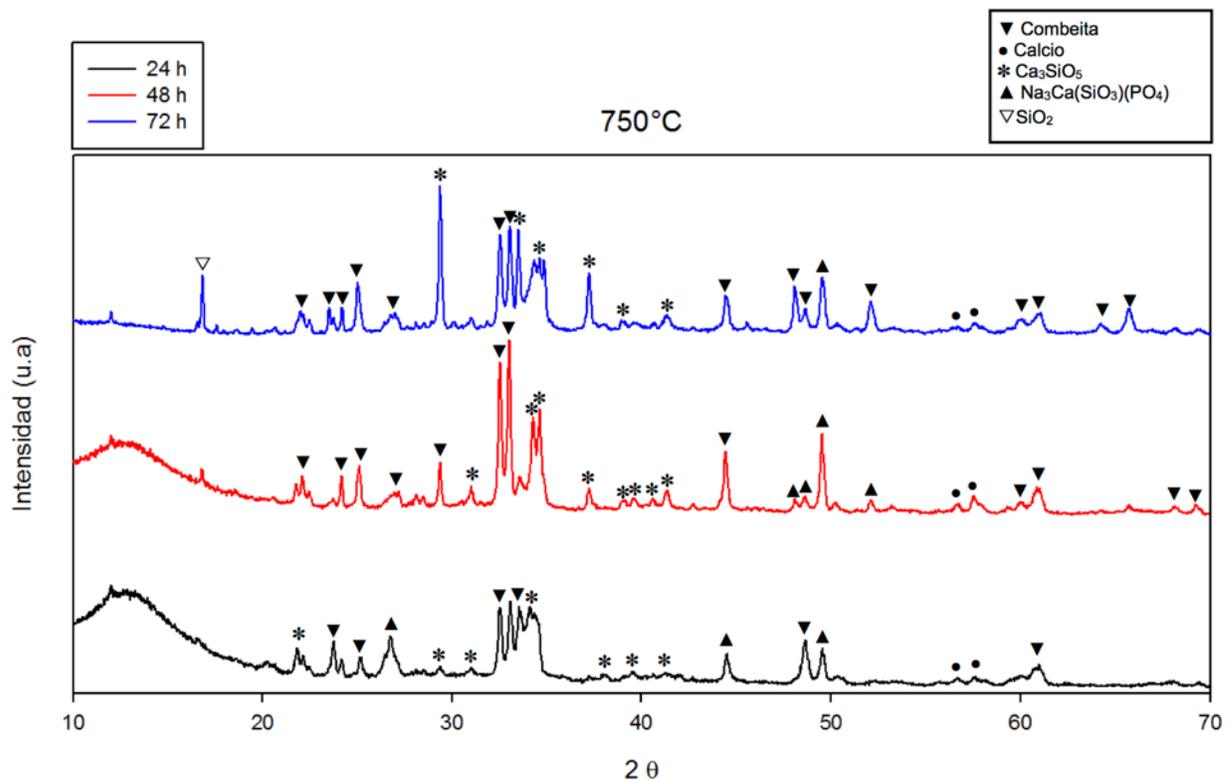


Figura 4.22 Patrones de difracción de rayos-X para los tratamientos hechos a 750 °C y diferentes condiciones de envejecimiento.

En la **Figura 4.23** se muestra la comparación entre los patrones de difracción realizados a la temperatura de 850 °C. Las curvas correspondientes al envejecimiento del gel de 24 h y 48 h, ambas comparten la misma amplitud de fase amorfa, mientras que de nueva cuenta, en la curva de 72 h de envejecimiento se muestra inexistente la fase amorfa del biovidrio 45S5, en las curvas de 24 h y 48 h de envejecimiento se aprecia que ambas comparten en el rango de 30° a 35 °, los picos correspondientes a la fase de la combeita, los picos anteriores a 30° correspondientes a la clinofosinaíta tienen mayor presencia en la curva de 24 h. Se concluye que en cuanto a la cristalinidad del gel envejecido a 72 h es muy alta en comparación con los geles envejecidos a 24 y 48 h, por lo que la bioactividad y la capacidad de formación de hidroxiapatita de estas condiciones, será menor respecto a los geles envejecidos a 24 h y 48 h, además del efecto de pérdida de agua del gel por las reacciones de condensación, las porosidades a obtener por medio del secado por liofilización serán inferiores que a las porosidades de los geles envejecidos a menores tiempos.

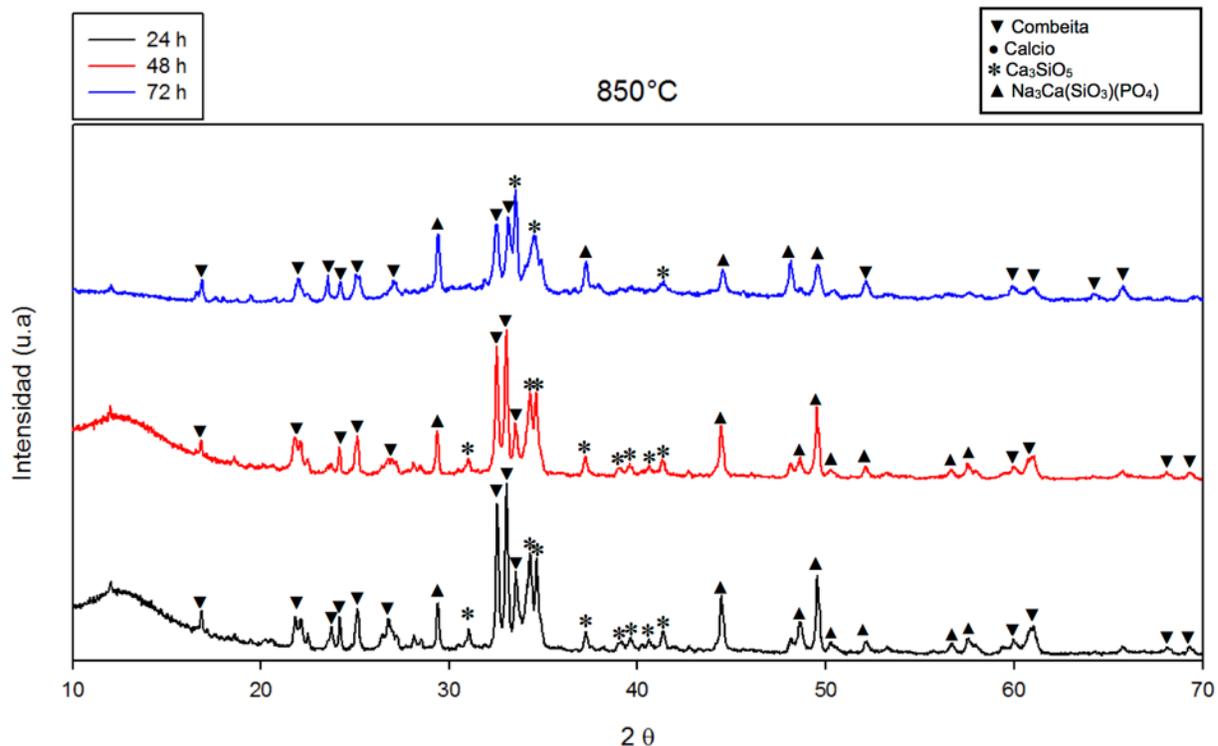


Figura 4.23 Patrones de difracción de rayos-X para los tratamientos hechos a 850 °C y diferentes condiciones de envejecimiento.

De acuerdo con Lefebvre y col.[89], la nucleación de la combeita ($\text{Na}_2\text{Ca}_2\text{Si}_3\text{O}_9$) ocurre a partir de los 610°C, de igual manera Lin y col.[90] determinaron mediante análisis de Raman que el fósforo tiende a despolimerizar la red de silicatos presentes en el biovidrio entrando en la red como un catión cuádruple coordinado cuando la temperatura oscila entre 800 y 900°C, motivo por el cual está presente la fase $\text{Na}_3\text{Ca}(\text{SiO}_3)(\text{PO}_4)$ con ocurrencia en los tratamientos térmicos realizados a 850°C.

4.1.6 Espectroscopía de infrarrojo

En la **Figura 4.24** se muestra el espectro de infrarrojo por transformada de Fourier de las muestras obtenidas a 24, 48 y 72 h de envejecimiento y 650, 750 y 850°C de tratamiento térmico. En él se aprecia que a la inversa de la longitud de onda de 1624.88 cm^{-1} corresponde a la elongación del enlace -OH, el cual se encuentra presente como remanente del alcohol polivinílico, la elongación del enlace correspondiente al enlace O-Si-O aparece en el rango del inverso de longitud de onda entre 1031.12 y 879.22 cm^{-1} , esto corrobora la presencia de la molécula del óxido de silicio, así como su interacción para formar silicatos más complejos, en el rango de 879.22 y 619.19 cm^{-1} corresponde a la presencia del enlace P-O, correspondiente al óxido de fósforo, el enlace Ca-O aparece en el inverso de la longitud de onda de 3424.29 cm^{-1} . Se aprecia en los espectros como hay un gran homogeneidad de las especies químicas presentes en el material, las diferentes condiciones experimentales, no representan un cambio en la composición química de los materiales, sin embargo, estas condiciones afectan tanto en cristalinidad, así como a la cantidad de agua a sublimar dentro del gel y por lo tanto tienen gran influencia al área superficial del material así como a la porosidad.

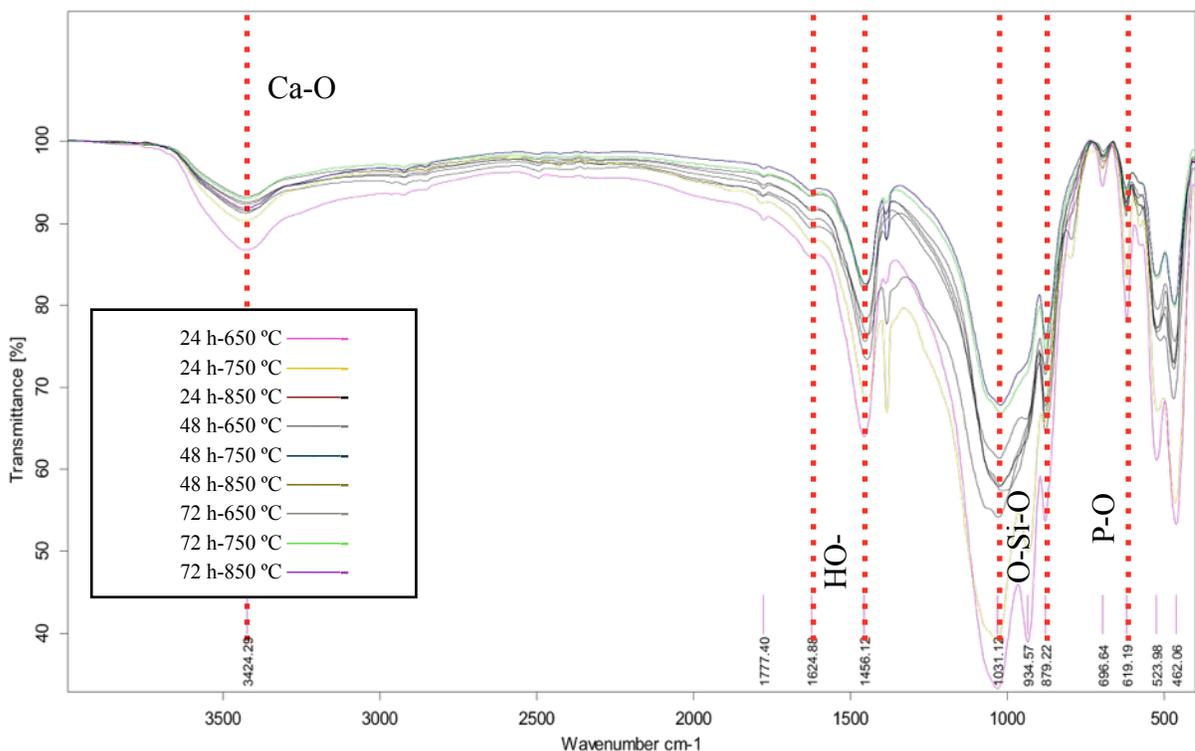


Figura 4.24 Espectros de infrarrojo por transformada de Fourier.

4.1.7 Área superficial específica

En la **Figura 4.25** se muestra un gráfico de barras, el cual ilustra el cambio de área superficial de cada uno de los geles envejecidos a 24, 48 y 72 h y tratados a 650, 750 y 850 °C, El comportamiento que se observa denota que a menor tiempo de envejecimiento y menor temperatura de tratamiento térmico el área superficial es la mayor, siendo esta de 3.17 m²/g, este valor disminuye hasta alcanzar el mínimo de 1.25 m²/g bajo la condición de 72 h de envejecimiento y 850 °C de temperatura de tratamiento térmico, dicho efecto ocurre gracias a las reacciones de condensación del gel, conduciendo a una mayor densificación de la estructura fractal del gel y por consiguiente una aglomeración mayor de los agregados del material.

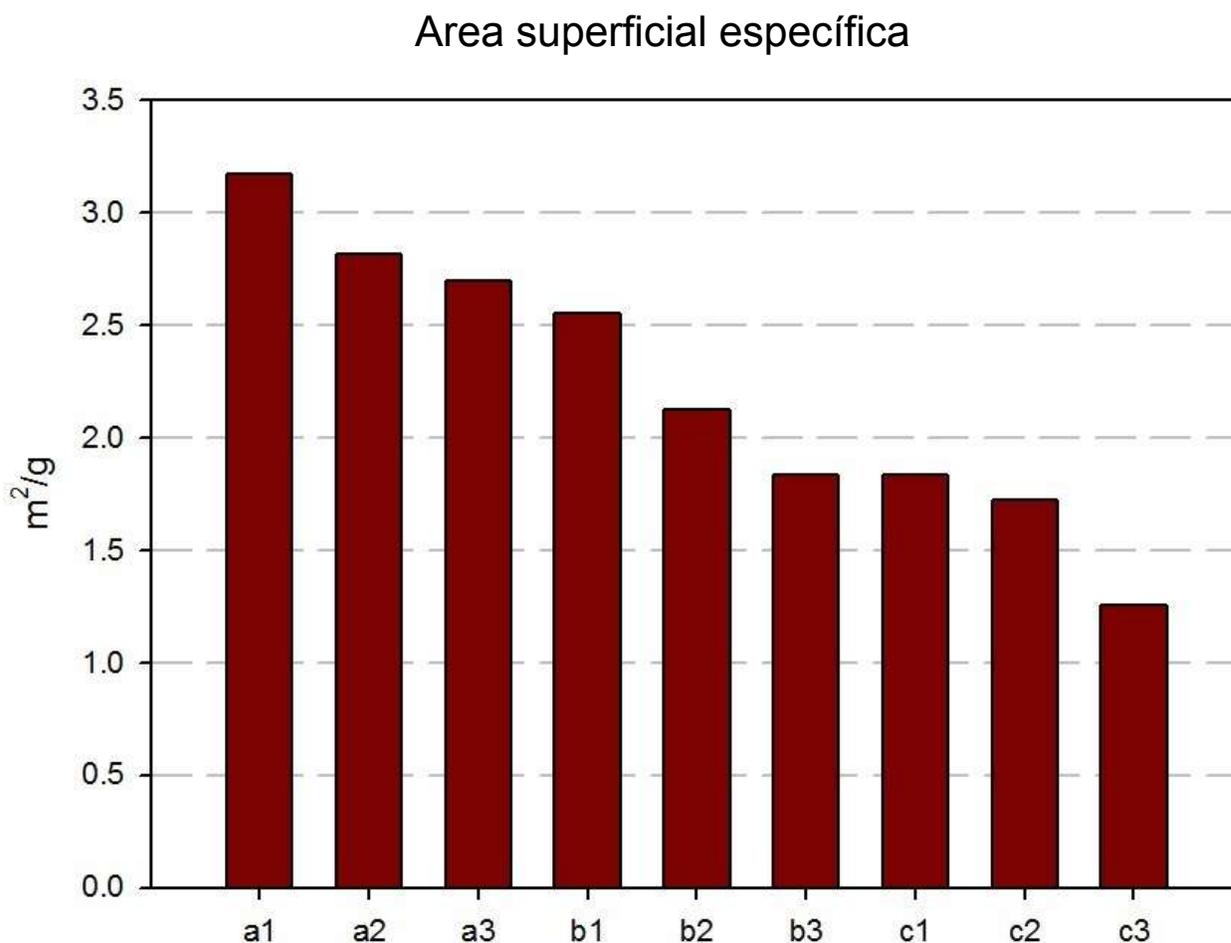


Figura 4.25 Gráfico de barras del área superficial específica obtenida por adsorción de nitrógeno.

4.1.8 Prensado con NaCl y evaluación de macroporosidad

Se estudio el gel liofilizado y mezclado con cloruro de sodio tamizado a 1mm. Las cantidades en peso de NaCl usadas fueron desde 10% hasta 40% en peso, posteriormente se analizó la porosidad mediante realizando diversos cortes para obtener imágenes de la macroestructura, mediante análisis de imágenes usando el software ImageJ se obtuvo una medición estadística de la fase densa y por lo tanto de la fase porosa. En las **Figura 4.26** se muestran los andamios conformados con diferente cantidad de NaCl en peso y teñidos con acuarela para destacar visualmente los poros presentes.

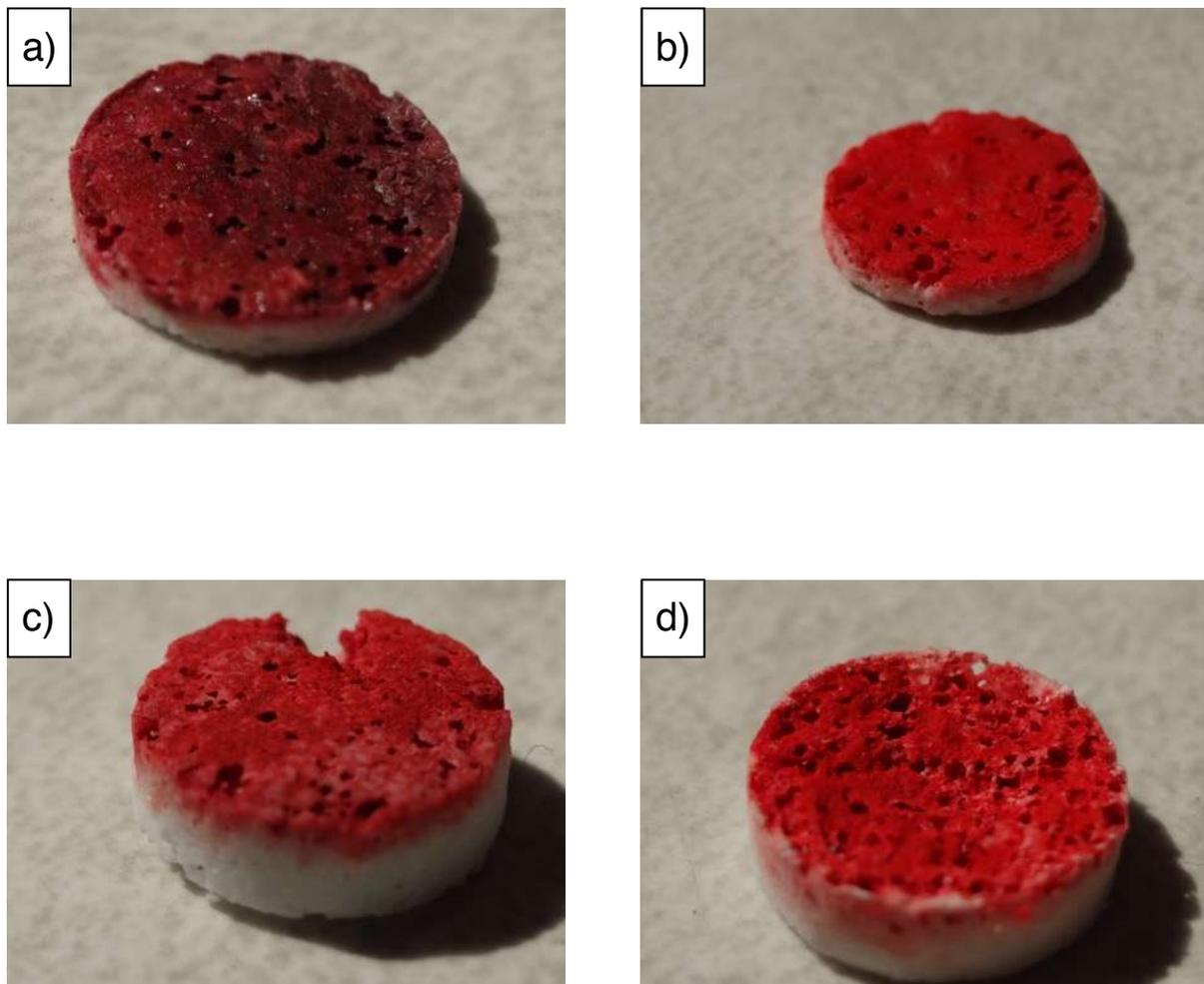


Figura 4.26 Fotografías de los diferentes andamios, a) 10% NaCl, b) 20% NaCl, c) 30% NaCl y d) 40% NaCl.

En la **Figura 4.27** se muestra una imagen obtenida mediante microscopía óptica, del tamaño de poros formados mediante la descomposición térmica del cloruro de sodio, la imagen mostrada corresponde a una fracción de los andamios mezclados (e4) con 40% en peso de NaCl.

Como se puede observar en la imagen, el tamaño de los macroporos varia desde 512 μm de diámetro del poro más grande e inferiores a 60 μm de diámetro de los poros más pequeños, esto es debido a que el polvo de cloruro de sodio fue tamizado con una malla de 1 mm (No. 18), sin embargo esto no representa problema para la aplicación ya que trabajos realizados por diferentes autores [40, 42, 83, 91] han obtenido andamios porosos por diferentes técnicas de obtención, no obstante los macroporos presentes en los andamios son poseen un tamaño inferior a 1mm.

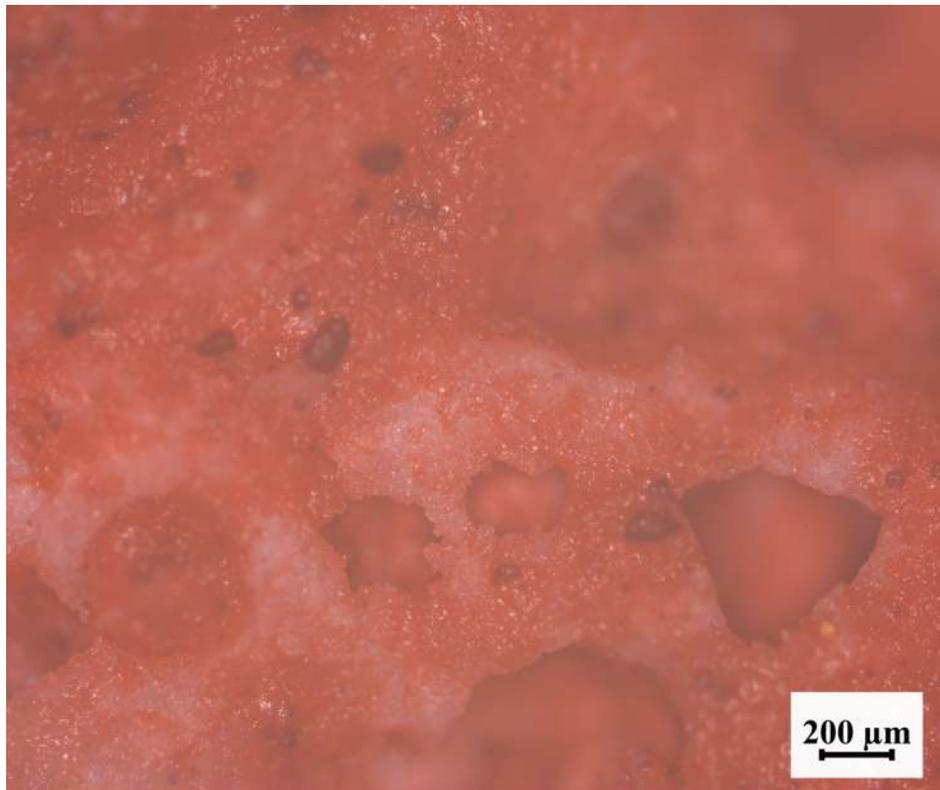


Figura 4.27 Imagen de microscopía óptica de la macroporosidad del andamio e4.

En la **Figura 4.28** se muestran imágenes de la superficie de los diferentes andamios obtenidos mediante la adición de cloruro de sodio, las imágenes fueron obtenidas mediante microscopía óptica.

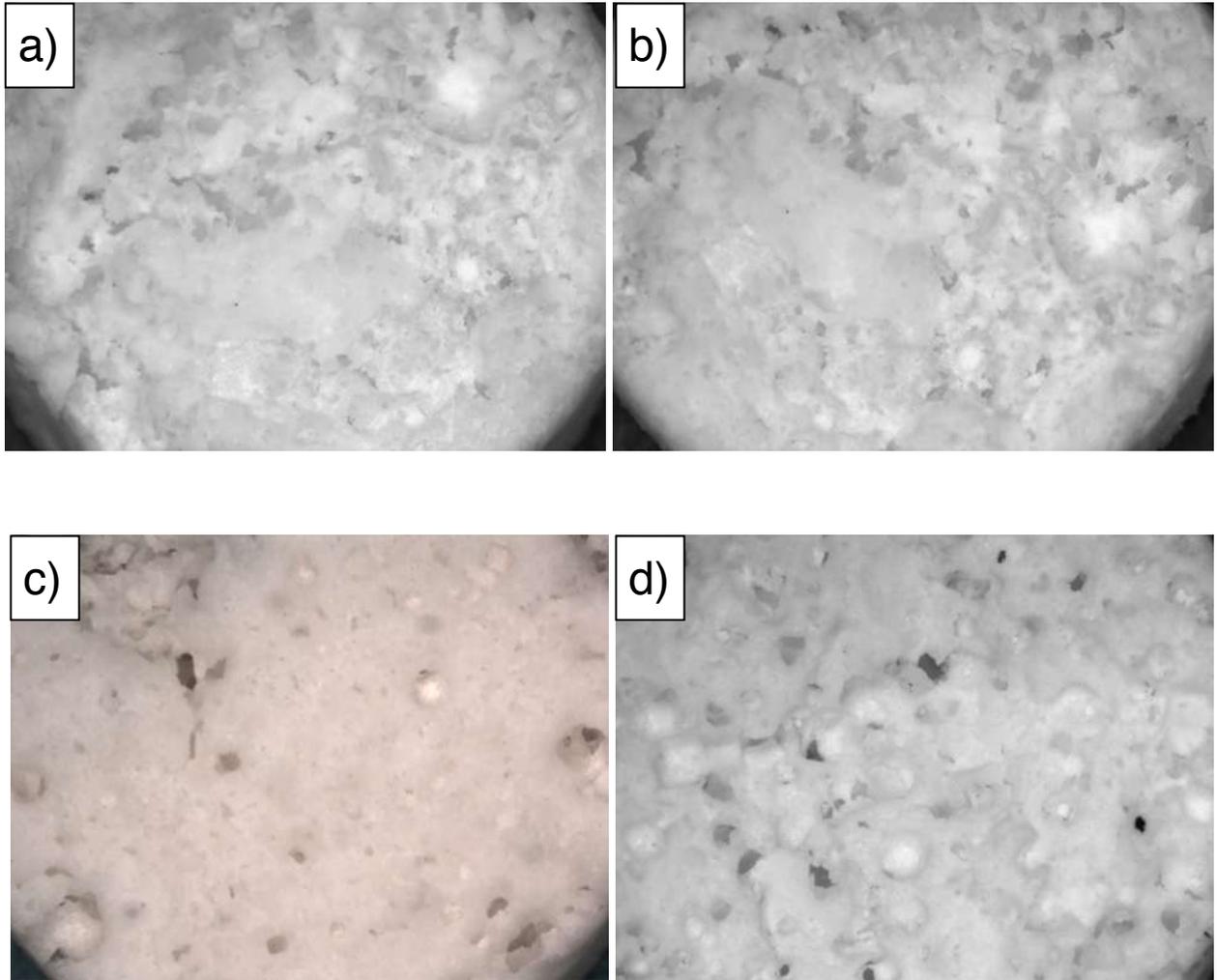


Figura 4.28 Imágenes obtenidas de microscopía óptica de los diferentes andamios, a) e1, b) e2, c) e3 y d) e4.

Como se puede apreciar, la superficie del andamio mezclado con 40 % en peso de cloruro de sodio, la superficie tiene una estructura con un alto grado de macroporosidad, en adición se logra apreciar como los poros presentes se conectan hacia la parte interna del andamio causando una pérdida de brillo conforme estos poros se encuentran a mayor profundidad, este efecto no es tan apreciable en los andamios cuyo contenido de cloruro de sodio es menor.

En la **Figura 4.29** se muestra el cambio en la macroporosidad con respecto al contenido de cloruro de sodio que se ha añadido, de esta gráfica se obtuvo que la cantidad ideal de cloruro de sodio para obtener altas porosidades es de 40% en peso.

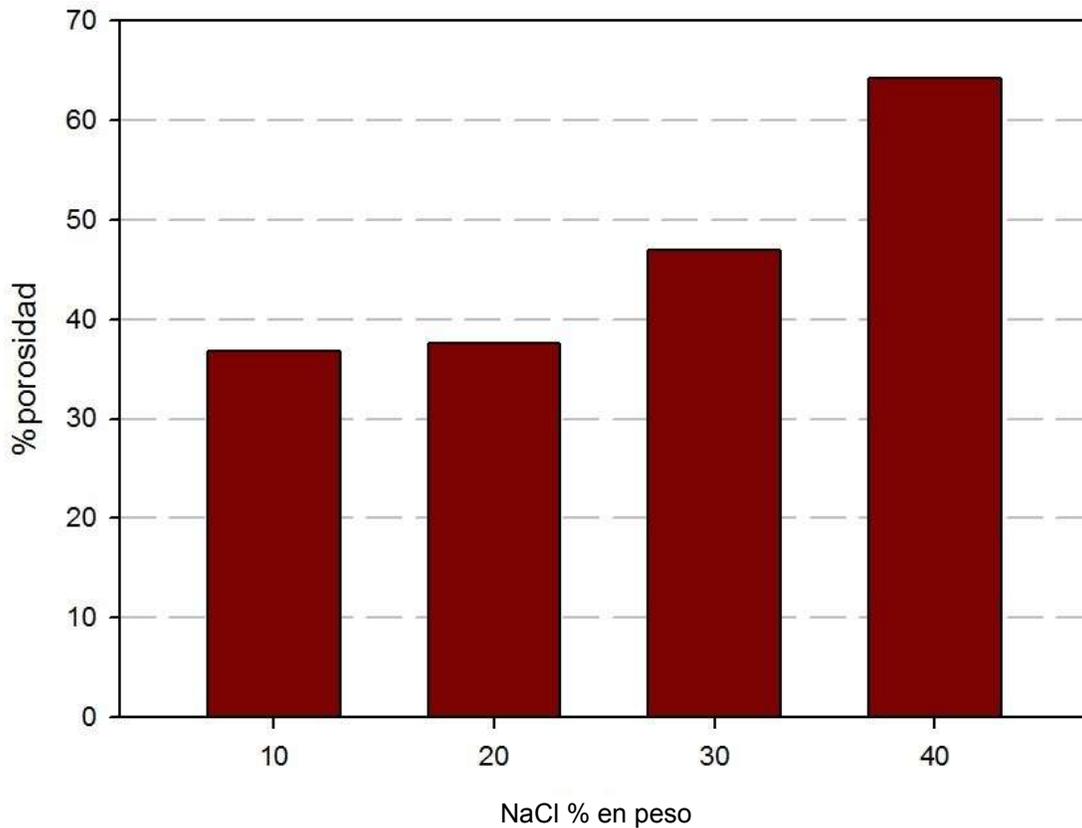


Figura 4.29 Distribución de porosidades y contenidos de cloruro de sodio.

De acuerdo a la **Figura 4.29** al añadir 40% en peso de NaCl se obtiene el mayor grado de porosidad logrando imitar el grado de porosidad del hueso trabecular el cual posee un grado de porosidad desde 50 a 90% [92]. De acuerdo con Yun y col.[93] el grado de porosidad idóneo para ser considerado un buen en términos de biocompatibilidad y capacidad de formación de hueso es de 60% de grado de porosidad. En la Figura 4.28 se muestra cubos remanentes del NaCl posterior del tratamiento, sin embargo, estos cubos de NaCl no representan algún problema de toxicidad para las células.

Las estructuras denotadas con el número “1”, son estructuras cubicas ricas en sodio y cloro, es decir que son remanentes del cloruro de añadido para la obtención de poros, como se puede apreciar, en la Figura 4.28 las flechas rojas señalan estas zonas con una cantidad en peso de 31.22 % en peso de sodio y de 29.18 % en peso, estos porcentajes fueron obtenidos por medio de la técnica de EDS.

Las zonas marcadas con el número “2” en color blanco, corresponden al biovidrio 45S5, como se observa de la **Figura 4.30** esta zona posee los elementos del biovidrio 45S5 ademas del tipo de agregados esféricos que se han mostrado anteriormente.

En la **Figura 4.30** se aprecia que el tamaño promedio de los agregados obtenidos es de .15 nm, mientras que el tamaño promedio de los mesoporos presentes es de 0.38 nm luego del tratamiento térmico a 850°C y 3 h de permanencia por lo que se concluye que la adición de polvo de cloruro de sodio de 1 mm de diámetro en promedio, así como el prensado a 96 MPa no repercuten negativamente en la estructura tipo esponja de los agregados nanoestructurados de los andamios.

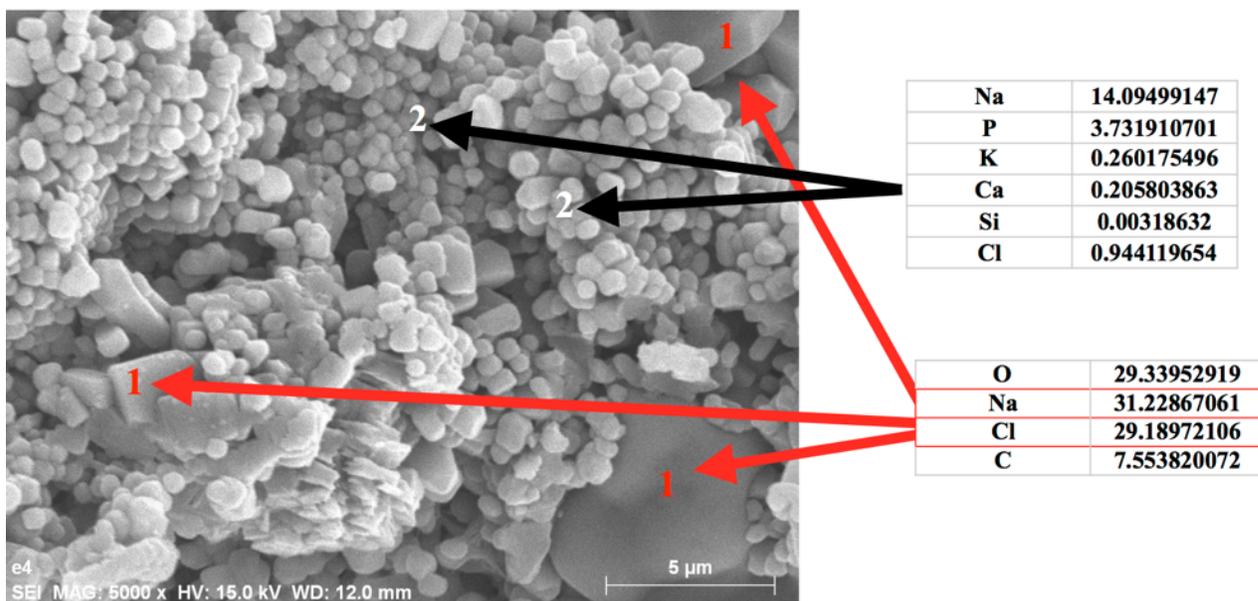


Figura 4.30 Imágenes de MEB de la microestructura del andamio.

4.2 Ensayos de bioactividad

4.2.1 Crecimiento de hidroxiapatita en los andamios de biovidrio

Como se aprecia en la **Figura 4.31(a-c)**, el material reaccionó con el medio formando hidroxiapatita. La morfología de los agregados de la hidroxiapatita parece ser afectada por las fases presentes en el biovidrio producto del tratamiento térmico y del envejecimiento haciendo que a 650 °C (a) se forme hidroxiapatita en forma alargada y en 750 C° (b) y 850 °C (c) se forme hidroxiapatita de apariencia laminar.

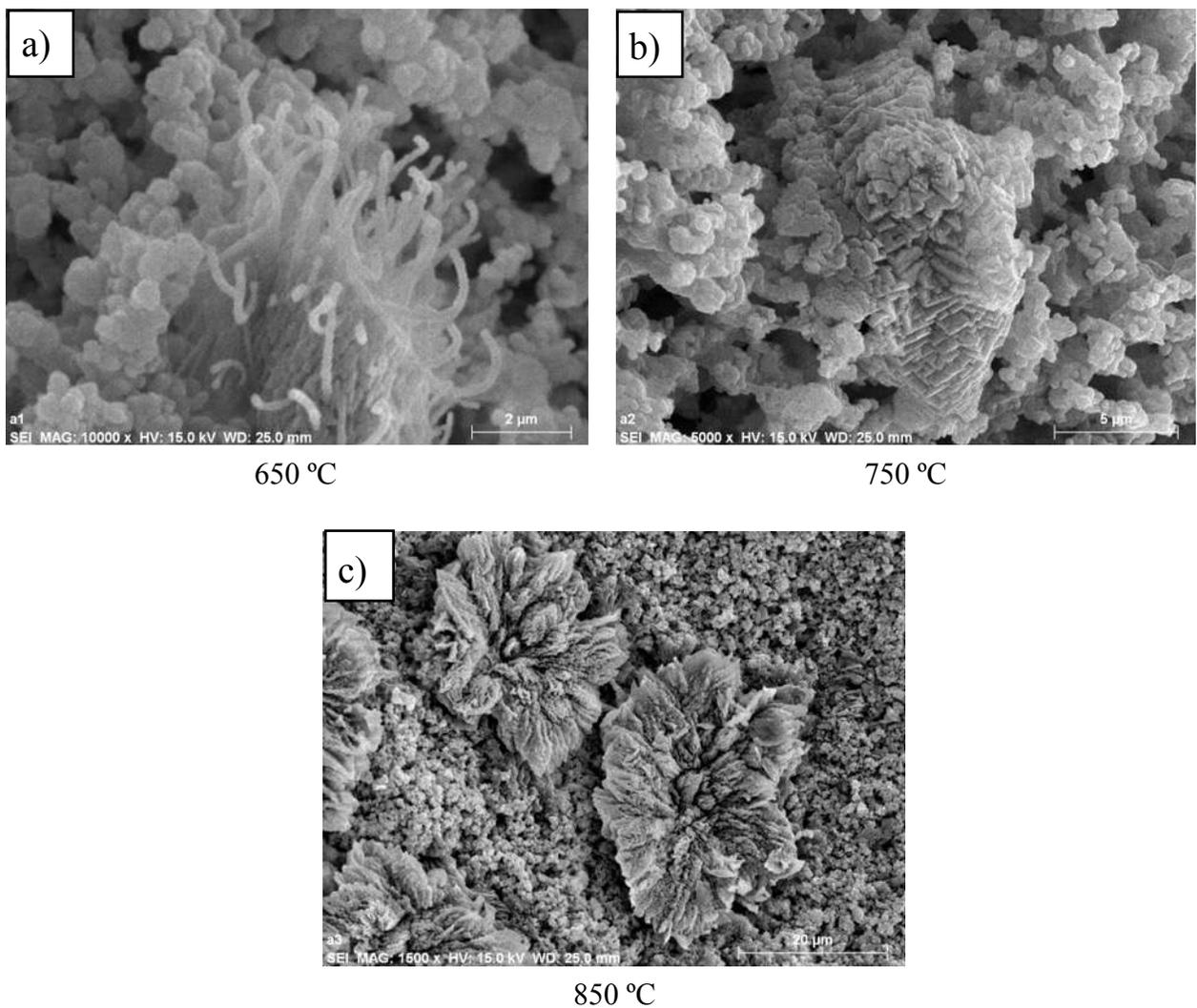


Figura 4.31 Imágenes de MEB del gel envejecido a 24 h y sumergido en solución de TRIS-HCl durante 24 h.

Con el incremento del tiempo de envejecimiento del gel a 48 h, la morfología de la hidroxiapatita presenta forma de glóbulos que varían de tamaño dependiendo de la temperatura del tratamiento térmico haciéndose más finos con forme aumenta la temperatura a la que fue sometido el material, lo que puede observarse en las micrografías de la **Figura 4.32(a-c)**.

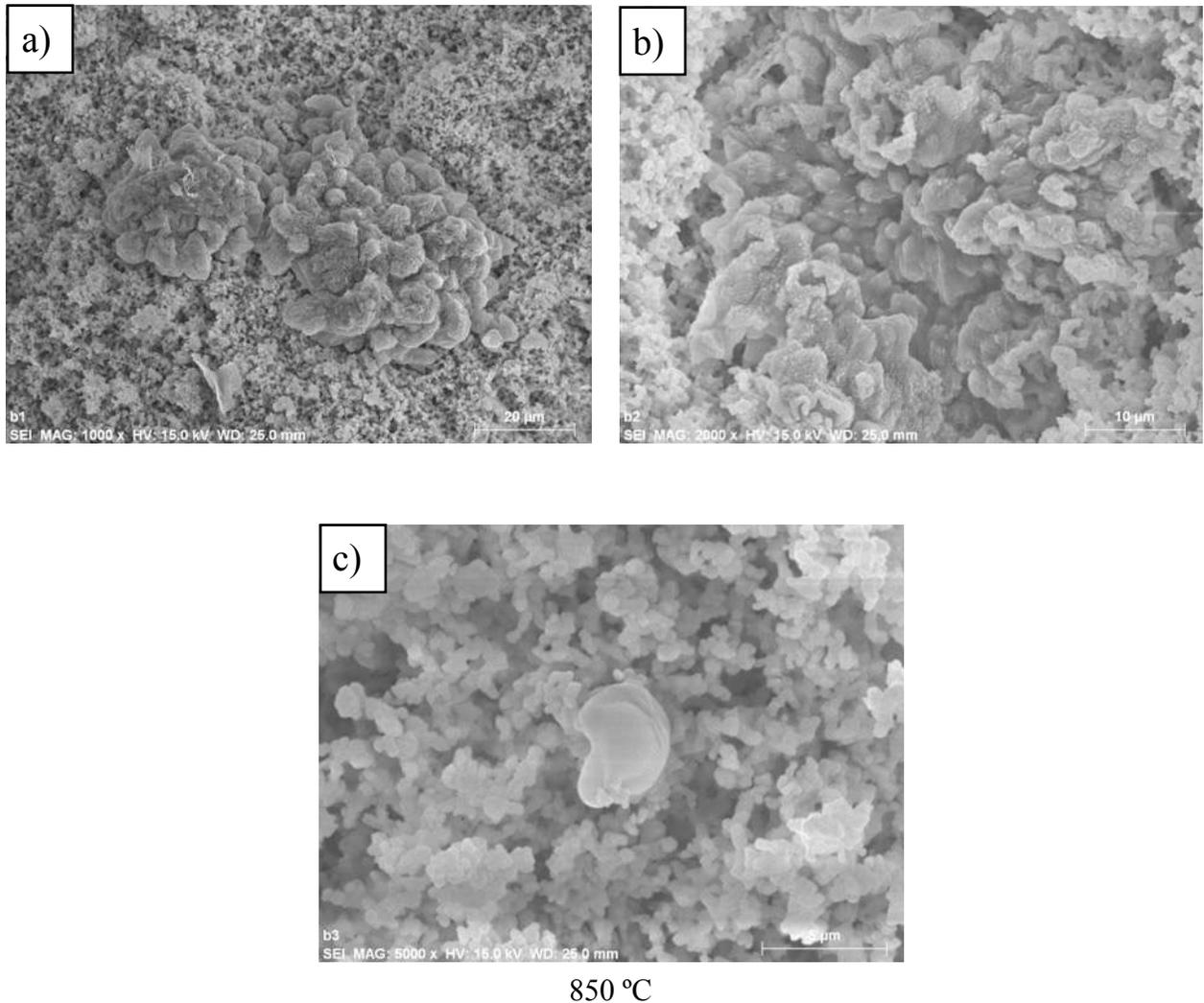


Figura 4.32 Imágenes de MEB del gel envejecido a 48 h y sumergido en solución de TRIS-HCl durante 24 h.

En la **Figura 4.33(a-c)** se aprecia la formación de hidroxiapatita en el material de manera similar morfológicamente entre (a) y (b) mientras que en (c) la formación de hidroxiapatita ocurrió en menor medida y con una morfología completamente diferente a las condiciones anteriores.

En los espectros de dispersión de electrones en todas las figuras se observa un cambio notable en la proporción de calcio respecto al fósforo a diferencia de los espectros de dispersión de electrones de la matriz de biovidrio 45S5 mostrados en los apartados anteriores. Este cambio de composición química es característico de la formación de hidroxiapatita en la superficie del andamio de biovidrio 45S5 [94].

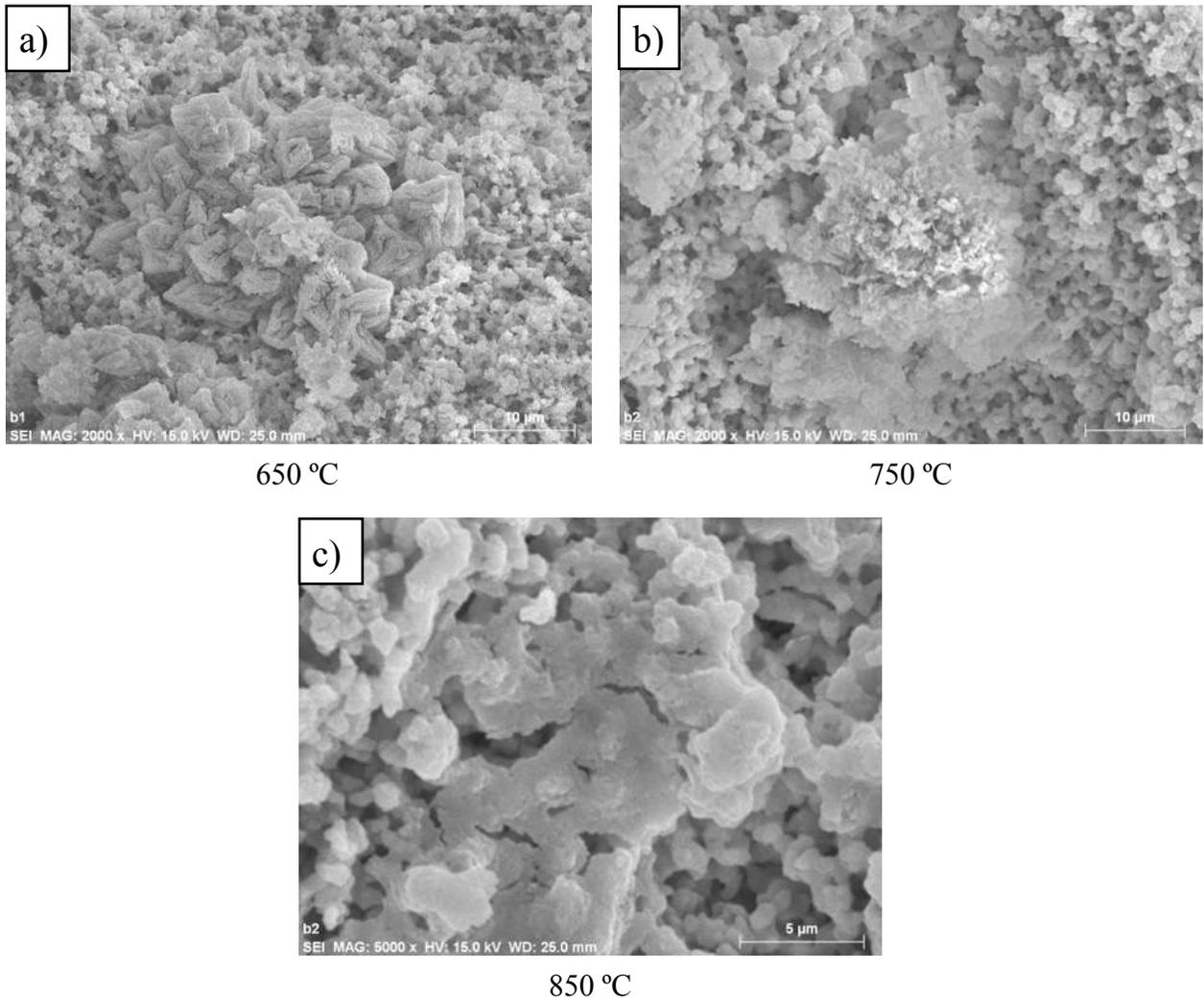


Figura 4.33 Imágenes de MEB del gel envejecido a 48 h y sumergido en solución de TRIS-HCl durante 24 h.

4.2.2 Evaluación de la variación de pH respecto al material

Como se aprecia en la **tabla 4.2**, el biovidrio 45S5 obtenido mediante el uso de ácido cítrico al 5 mM y síntesis sol-gel asistida por liofilización al estar inmerso en el medio de cultivo usado, este causa una elevación del pH a un valor de 12, causando que cualquier línea celular no logre sobrevivir en un ambiente tan básico. El colágeno tipo I, así como la inmersión previa del material en tris(hidroximetil)aminometano causa que el pH no varíe tan radicalmente hacia el espectro básico como en el material sin colágeno o hidroxiapatita, la condición que mantiene un pH lo más cercano a 7 es la condición de 45S5 con colágeno y con hidroxiapatita (240 h).

Tabla 4.2 Evaluación de la variación de pH respecto al material.

Muestra	45S5 sin colágeno y sin HA	45S5 sin colágeno y con HA	45S5 con colágeno y con HA (24 h)	45S5 con colágeno y con HA (240h)
pH	12	10	9	8-9

4.2.3 Difracción de rayos-X de los andamios con hidroxiapatita

En los siguientes patrones de difracción de rayos-X se aprecia que el material obtenido posee la capacidad de formar hidroxiapatita al estar inmerso en la solución de TRIS durante un tiempo de 24 h de inmersión, de igual manera se aprecia que para cada una de las condiciones experimentales, los patrones de difracción muestran una disminución de la fase amorfa, la cual se presenta entre 10 y 20° en los patrones, esto ocurre gracias a las reacciones existentes del material y la solución, llevando a la aparición de picos característicos de la hidroxiapatita marcados con una estrella. De acuerdo con resultados obtenidos por García y col. [95] la formación de hidroxiapatita se ve favorecida en ambientes pH básicos, como se aprecia en la **Tabla 4.2**,

La tendencia de los andamios obtenidos es de tornar los medios en los que está inmerso hacia el rango básico de pH, García y col. comprobaron que la cinética de crecimiento de hidroxiapatita

se ve claramente favorecida por ambientes que oscilan en valores de pH de 10 y 11, de igual manera, determinaron que a estos valores, la formación de hidroxiapatita ocurre en un tiempo menor de 5 días, debido a esta tendencia de los andamios obtenidos y en contraste con estos resultados es que se concluye que la bioactividad del material es sumamente alta para cualquiera de las condiciones de envejecimiento y temperaturas de tratamiento térmico, ya que la fase de hidroxiapatita se logró formar en un lapso de 24 horas mientras que diversos autores alegan que la presencia de fases cristalinas, tales como la combeita, silicatos de calcio, etcétera, retrasan la cinética de formación de hidroxiapatita, es decir, disminuyen la bioactividad del material [96-98].

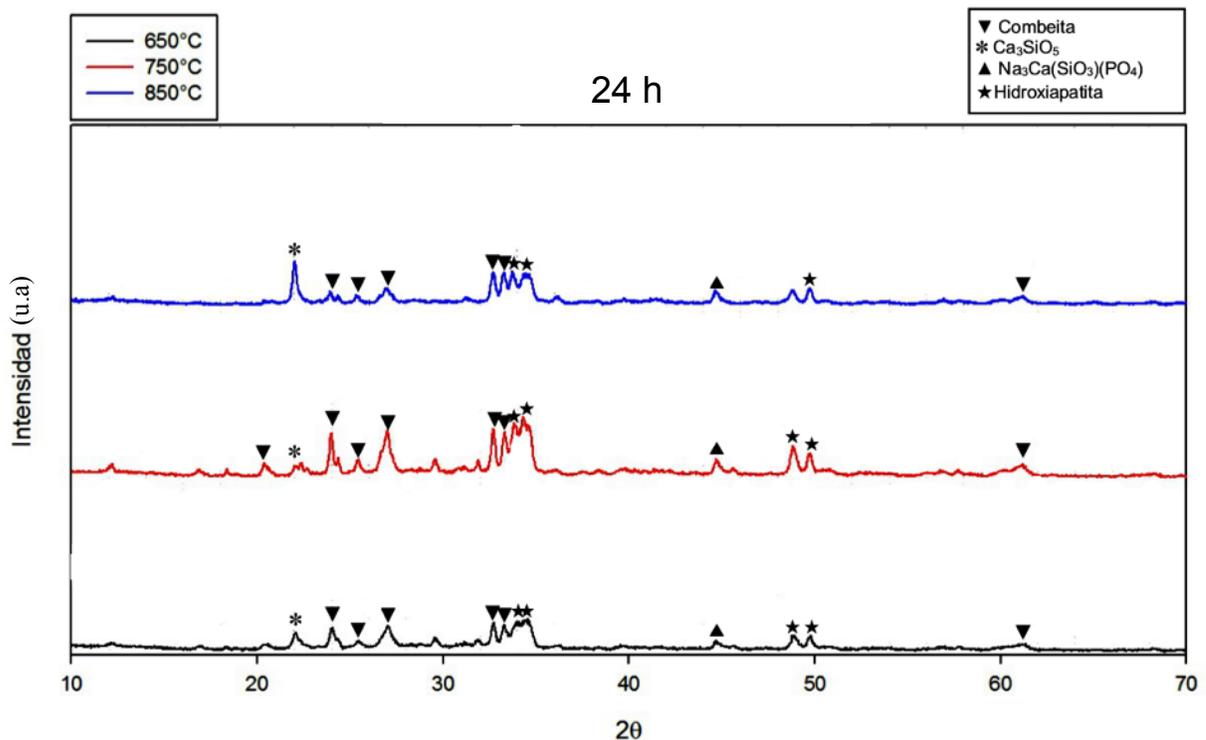


Figura 4.34 Patrones de difracción de rayos-X correspondientes a 24 h de envejecimiento.

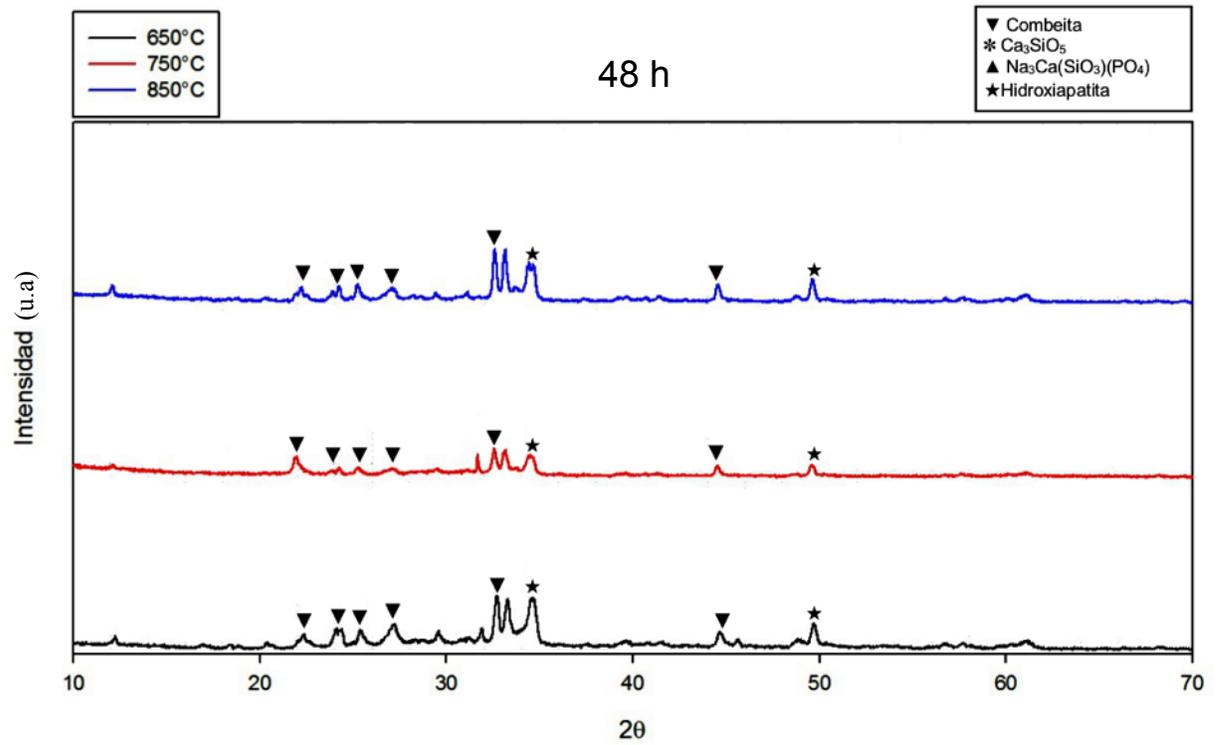


Figura 4.35 Patrones de difracción rayos-X correspondientes a 48 h de envejecimiento.

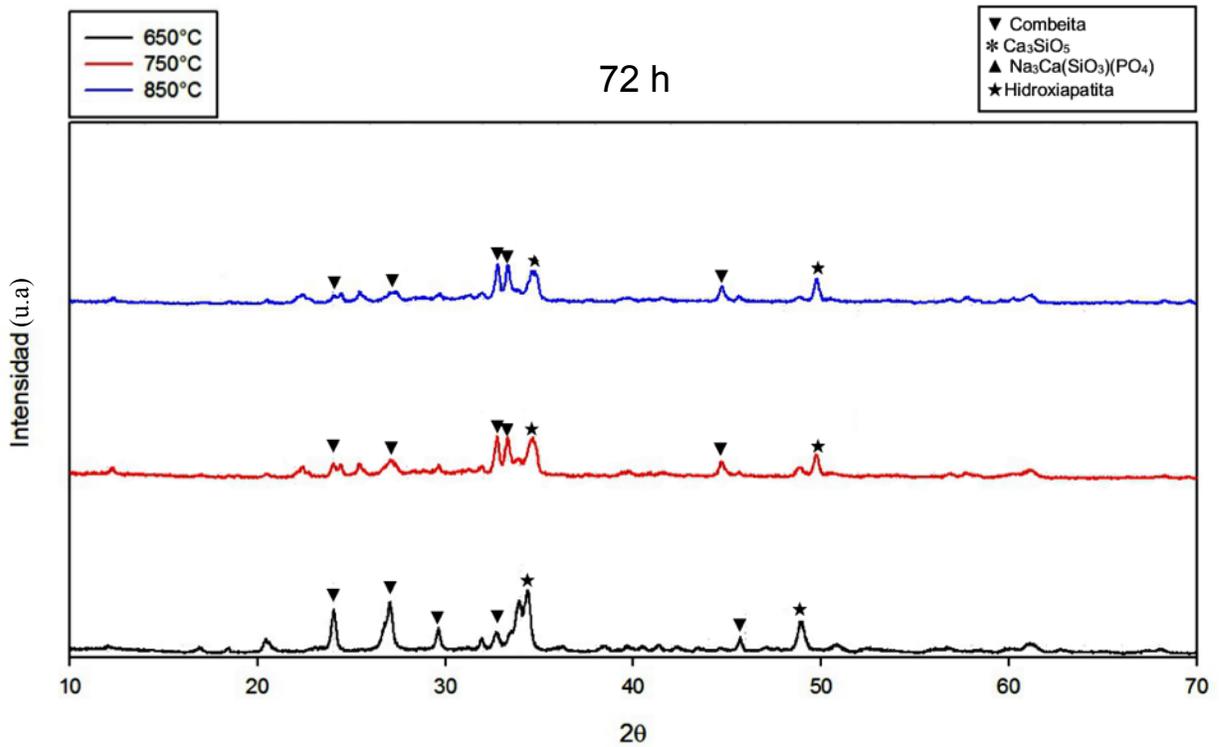
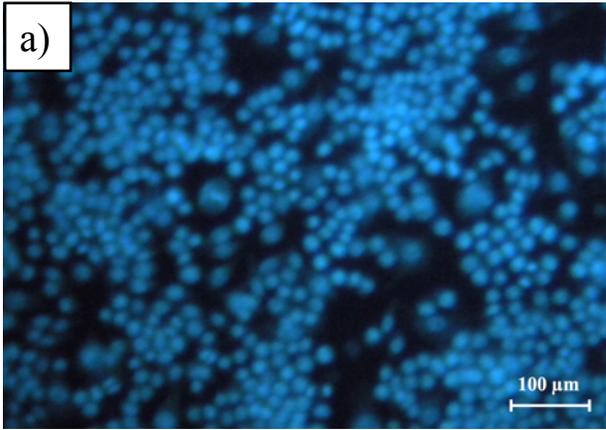


Figura 4.36 Patrones de difracción rayos-X correspondientes a 72 h de envejecimiento.

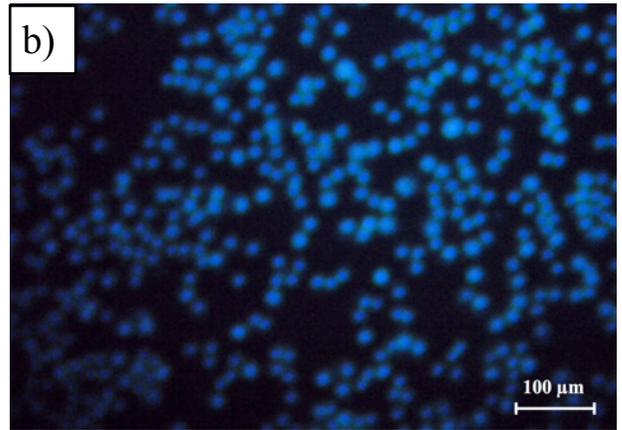
4.3 Pruebas de viabilidad celular DAPI

En la **Figura 4.37** se muestran las fotografías de los núcleos teñidos con el reactivo DAPI del ensayo realizado con el biovidrio 45S5 tratado térmicamente a 850 °C, recubiertas con colágeno tipo I e inmersas en TRIS durante 10 días, el ensayo consistió en el cultivo de 5 replicas del material las cuales se muestran en la **Figura 4.37** (b-f) y células control sin presencia del material **Figura 4.37** (a). Como se logra apreciar, los núcleos de las células control se encuentran perfectamente sanos ya que estos conservan su estructura con tendencia circular, de igual manera se aprecia una alta densidad de células, la muestra control(a) no estuvo en contacto con el biovidrio 45S5, en esta imagen el área ocupada por las células es del 60.097%, este porcentaje fue obtenido en promedio de las imágenes tomadas de la muestra control, en las imágenes (b) y (d) se aprecia una menor densidad de macrófagos con respecto a la muestra control, sin embargo, los núcleos de estos se aprecian íntegros por lo tanto se asume que las células están vivas en presencia del material en la muestra (b) los análisis de imágenes mediante *ImageJ* arrojaron un porcentaje de células menor con respecto al área que estas ocupan, 41.616% es el área que los macrófagos ocupan, en comparación con el porcentaje anterior hubo una disminución del 30.76% con respecto al control.

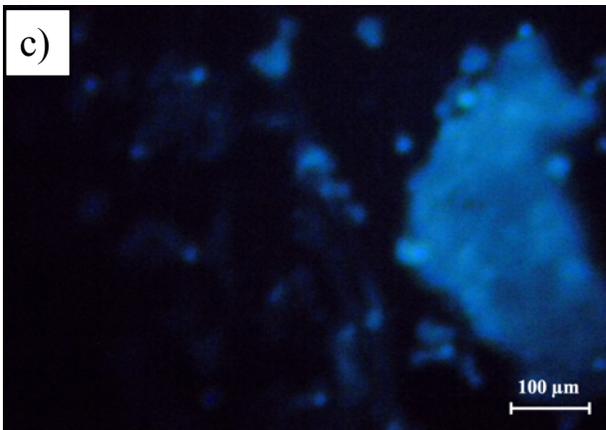
En la muestra (d) sin embargo, el área calculada mediante “*ImageJ*” es de 58.384% del área ocupada por los macrófagos, y esta disminución de área corresponde al 2.86% respecto al control. En las imágenes (c),(e) y (f), se aprecian estructuras celulares amorfas, es decir que los núcleos de los macrófagos perdieron su estructura circular, por lo tanto se asume que las células de estas muestras se vieron afectadas de manera negativa por la presencia del biovidrio 45S5, es decir que el material causó la muerte por necrosis de las células presentes.



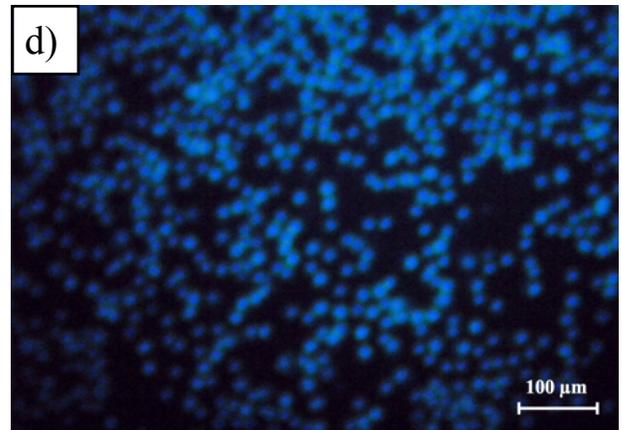
Macrófagos de la muestra control



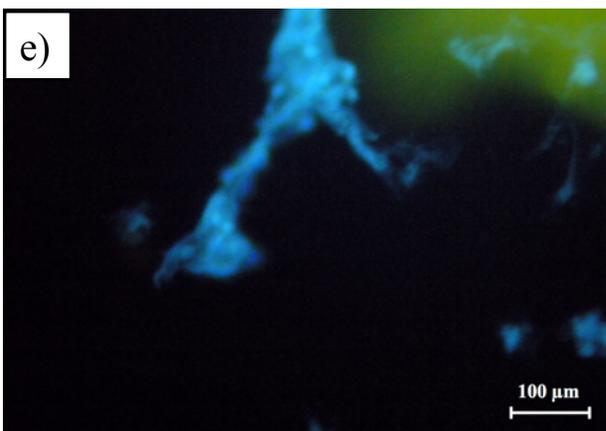
Macrófagos de la muestra no.1



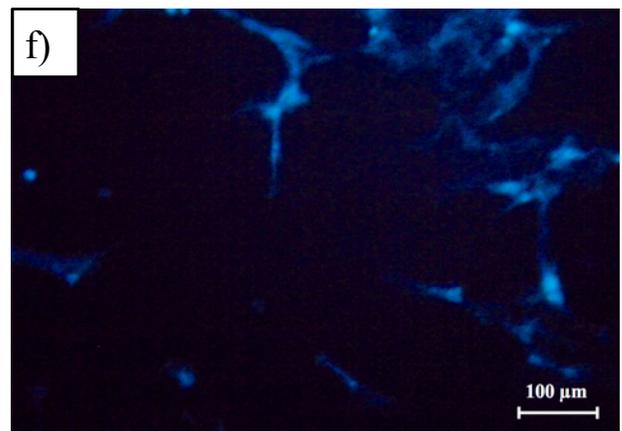
Macrófagos de la muestra no.2



Macrófagos de la muestra no.3



Macrófagos de la muestra no.4



Macrófagos de la muestra no.5

Figura 4.37 Micrografías de los núcleos celulares de lo macrófagos teñidos por DAPI.

4.4 Discusión general de resultados

El método de síntesis sol-gel acoplado al secado por liofilización, es una opción viable en el desarrollo de materiales porosos, sin embargo, este método de secado de geles se ve limitado por la naturaleza de los solventes presentes en el gel, así como por la morfología de los agregados formados y el contenido de estos en el gel.

Esta técnica es capaz de generar poros de tamaños inferiores a un micrómetro, sin embargo, el control de estos poros resulta particularmente complicado haciendo uso de las variables del secado como lo es la presión de vacío, temperatura de secado y el tiempo de permanencia. La dificultad radica en la determinación de estas variables ya que actualmente no existe gran cantidad de artículos que muestren diferentes condiciones experimentales que puedan extrapolarse a diferentes sistemas de geles. Así mismo, gracias a la expansión del agua líquida al solidificar, se provocan fracturas en el gel seco, haciendo que la obtención de piezas monolíticas porosas sea complicada a partir de la síntesis sol-gel acoplada a este tipo de secados mediante liofilización. Debido a estos factores, este tipo de síntesis se ha limitado tradicionalmente a la obtención de polvos.

En este trabajo se observó la influencia del tiempo de envejecimiento de los geles una vez terminada la síntesis del sol, el efecto que se observó fue la influencia de los pequeños poros presentes y registrados en las imágenes obtenidas mediante microscopía electrónica de barrido, así como los datos de adsorción de nitrógeno realizados; los cuales muestran que a menor tiempo de envejecimiento, la porosidad es mayor, mientras que, a mayor tiempo de envejecimiento del gel, la porosidad disminuye.

La mesoporosidad se logró controlar mediante el tiempo de envejecimiento de los geles, ya que debido a que conforme incrementa el tiempo, la estructura del gel se hace más rígida mediante reacciones de condensación y sinéresis (expulsión de agua del gel), esto causa que los agregados que forman el material se encuentren más cerca entre ellos dando más rigidez a la estructura. Se determinó que el tiempo de envejecimiento que genera una estructura con mayor cantidad de mesoporos es de 24 horas también estudió el efecto del tiempo de envejecimiento en la

cristalinidad del material y se determinó que para el tiempo de envejecimiento de 72 horas, la fase amorfa disminuye, desapareciendo casi por completo, por lo que se considera que un tiempo de envejecimiento de 24 horas es adecuado para lograr una estructura amorfa/cristalina que asegura una mayor bioactividad del andamio.

El estudio de diferentes templantes: polimetilmetacrilato y cloruro de sodio, para la obtención de la macroporosidad determinó que el mejor templante fue el cloruro de sodio ya que en este es más fácil controlar el tamaño promedio del polvo y por consiguiente el tamaño y distribución de los poros, mientras que el uso de las esferas de polimetilmetacrilato implica una mayor dificultad para el control del tamaño de los poros. El cloruro de sodio resultó ser fácilmente removible de los andamios mediante el tratamiento térmico, ya que la temperatura de fusión del cloruro de sodio es de 801 °C, aunque esta característica del templante, implica que la temperatura de tratamiento térmico sea por arriba de los 800 °C. En este trabajo con la síntesis propuesta y el envejecimiento de 24 o 48 horas se logra retener un buen contenido de fase amorfa a un a estas altas temperaturas de tratamiento térmico, a diferencia de otros autores que a 800 °C reportan solo fases cristalinas.

Se comprobó que para el sistema estudiado, la síntesis sol-gel asistida mediante liofilización basada en la síntesis propuesta por J. Faure [35], en la cual se cambia el catalizador de reacción de ácido nítrico en concentración de 0.1M, tal y como ha propuesto Cacciotti [99] por el ácido cítrico en bajas concentraciones (5 mM); es posible obtener la composición química del biovidrio 45S5 así como las fases reportadas con anterioridad por otros aut [89] [100]. Se confirma en el presente estudio la afirmación de J. Faure quien comprueba en su artículo que el biovidrio 45S5 obtenido mediante el uso de ácido cítrico en una concentración de 5 mM como catalizador de la reacción, posee una gran capacidad de formación hidroxiapatita. J. Fuare y col, realizaron la evaluación de la capacidad de formación de hidroxiapatita usando fluido corporal simulado con un tiempo de inmersión de 24 h. En el presente trabajo se realizó la evaluación de la formación de hidroxiapatita de acuerdo con el resultado del trabajo realizado por Kirste y col. [101], usando una solución de tris(hidroximetil)aminometano y ácido clorhídrico en agua desionizada. La evaluación de la bioactividad se realizo a los polvos obtenidos de las 9 condiciones experimentales, se observó que la morfología de la hidroxiapatita varía conforme el tiempo de

envejecimiento del gel en la síntesis, así como con la temperatura a la cual ha sido tratado el material. Sin embargo, las fases cristalinas no muestran gran variación con respecto a los resultados obtenidos mediante difracción de rayos-X por otros autores.

Se demostró que el biovidrio 45S5 obtenido mediante síntesis sol-gel acoplada a un secado por liofilización, es capaz de formar hidroxiapatita en un lapso de 24 horas, lo cual se relaciona a la bioactividad del material, en otras palabras, el biovidrio 45S5 obtenido ha demostrado ser altamente bioactivo ya que forma hidroxiapatita más rápido que el biovidrio 45S5 comercial, incluso más rápido que el biovidrio 45S5 sintetizado con ácido nítrico. Así mismo se observó que, la estructura de la hidroxiapatita que se forma cambia de morfología conforme el tiempo de envejecimiento cambia, al igual que conforme la temperatura de tratamiento térmico varía, esto permite predecir, que sería factible producir bioandamios por la metodología propuesta en este trabajo, en los que la formación de hidroxiapatita superficial tenga una morfología preferente y más compatible con el tejido celular que se desea reabsorber en el andamio, como lo afirman otros autores como M.E Abad y col. [102] Sin embargo para las 9 condiciones experimentales estudiadas se comprobó que el material forma hidroxiapatita en un tiempo, menor a 24 horas.

De las pruebas *in vitro* realizadas con células: macrófagos de ratón, se observó que no todo el material mantuvo valores de pH inferiores a 9 (lo cual es necesario para la supervivencia de las células). Las muestras 1 y 3 mantuvieron un valor de pH de 8.86 en el cual los macrófagos de ratón lograron sobrevivir. No obstante el resto de las replicas del ensayo mostraron la elevación de pH a 9.16, valor que causó la muerte celular de los macrófagos de ratón por necrosis. Este incremento de pH se puede atribuir a que el catalizador en la síntesis sol-gel propuesta por J. Faure no es capaz de lograr que los átomos de calcio estén presentes en la estructura fractal del material, es decir que el calcio se encuentra libre para reaccionar en el cultivo celular logrando un incremento de pH tan radical, este fenómeno se puede atribuir a la presencia del hidróxido de calcio en el material. El colágeno tipo I logró disminuir este efecto gracias a que forma un recubrimiento que impide la liberación de iones hacia el medio de cultivo evitando que este llegue a valores de pH tan básicos.

Mediante la propuesta de funcionalización con colágeno tipo I de los andamios producidos, se logró que el biovidrio 45S5 obtenido no presentara una toxicidad para las células con las cuales

se realizó el ensayo, sin embargo, el material elevó el pH del medio de cultivo, lo cual no es recomendable, aunque dicha elevación de pH también puede ser atribuida al carbonato de calcio presente en el medio de cultivo.

Se observó que mediante la adición de colágeno tipo I a los andamios, tiene un efecto positivo en la formación de hidroxiapatita ya que mitiga la liberación de iones de Ca, manteniendo el pH del cultivo en valores cercanos a 7. Los resultados obtenidos sugieren que la variante de síntesis propuesta permite obtener andamios de biovidrio 45S5 adicionados con colágeno no tóxicos para las células, macrófagos de ratón, en los cultivos “*in vitro*”.

CAPÍTULO V. CONCLUSIONES

1. Se logró sintetizar biovidrio 45S5 vía sol-gel acoplada a un secado por liofilización.
2. Se logró que la composición química de los andamios sea cercana a la composición nominal del biovidrio 45S5.
3. Se logró determinar los parámetros de síntesis y secado por liofilización (envejecimiento del gel).
4. Se logró elaborar andamios con porosidad jerárquica a partir del biovidrio 45S5 liofilizado.
5. Se logró obtener las fases cristalinas características del biovidrio 45S5, además de una fracción considerable de fase amorfa característica del biovidrio 45S5.
6. Se logró que el biovidrio 45S5 obtenido vía sol-gel acoplada a un secado por liofilización sea altamente bioactivo.
7. Se logró la formación de hidroxiapatita en la superficie del andamio en un periodo menor a 5 días.
8. Se logró obtener agregados del material con un tamaño menor a 1 μm así como poros interconectados entre sí.
9. Se logró obtener agregados nanoestructurados con un tamaño promedio de 150 nm para la mayoría de las condiciones experimentales.
10. Se logró obtener mesoporos con tamaño promedio aparente de 300 nm.
11. Se logró que una fracción alta de células estuvieran integras al estar en presencia del biovidrio 45S5 durante el cultivo.

RECOMENDACIONES Y TRABAJO FUTURO

De acuerdo con los resultados obtenidos se recomienda el estudio citotóxico del material estudiado anteriormente, pero variando el medio de cultivo por uno con menor cantidad de carbonato de calcio en su composición química con la finalidad de tener un pH menor y más viable para las células.

Se recomienda un estudio más exhaustivo del efecto de la funcionalización del colágeno, en la liberación de iones de calcio en los andamios dentro del cultivo celular.

Dada la situación sanitaria mundial del año 2020, se vio mermada la labor científica nacional y mundial, causando la falta de pruebas que logren caracterizar la porosidad obtenida mediante esta síntesis, así como estudiar diferentes condiciones que no solo permitan que las células vivan en presencia de este material, sino evaluar la capacidad de este sistema para causar la diferenciación celular de células madre de pulpa dental obtenidas mediante extracción dental a linajes celulares involucrados en los procesos de osteogénesis.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] Hutmacher D W. *Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage*. **Biomaterials**. 21 2000.
- [2] Langer R V, J.P. *Tissue engineering*. **Science**. 260 1993.
- [3] Domínguez Glg O V. *Frecuencia y tipos de fracturas clasificadas por la Asociación para el Estudio de la Osteosíntesis en el Hospital General de León durante un año*. **Acta Médica Grupo Ángeles**. 15(4). 275-286. 2017.
- [4] Donaruma L G. *Definitions in biomaterials*, D. F. Williams, Ed., Elsevier, Amsterdam, 1987, 72 pp. **Journal of Polymer Science Part C: Polymer Letters**. 26(9). 414-414. 1988.
- [5] Ashok Kumar D S K, Bikramjit Basu. *Advanced Biomaterials: Fundamentals, Processing, and Applications*. Hoboken, New Yersey. 5-13. Wiley 2009.
- [6] Hoffman A S. *Chapter I.2.1 - Introduction: The Diversity and Versatility of Biomaterials*. **Biomaterials Science (Third Edition)**. Academic Press 63-64. 2013.
- [7] Treiser M, Abramson S, Langer R, Kohn J. *Chapter I.2.6 - Degradable and Resorbable Biomaterials*. **Biomaterials Science (Third Edition)**. Academic Press 179-195. 2013.
- [8] Sage E H, Bornstein P. *Extracellular proteins that modulate cell-matrix interactions*. *SPARC, tenascin, and thrombospondin*. **J Biol Chem**. 266(23). 14831-4. 1991.
- [9] Rinaudo M. *Main properties and current applications of some polysaccharides as biomaterials*. **Polymer International**. 57(3). 397-430. 2008.
- [10] Rinaudo M. *Chitin and chitosan: Properties and applications*. **Progress in Polymer Science**. 31(7). 603-632. 2006.
- [11] Ito M, Matahira Y, Sakai K. *The application of chitin-chitosan to bone filling materials*. *Kichin, Kitosan Kenkyu: Publ.* **Kichin Kitosan Kenkyu**. 4 142-143. 1998.
- [12] Sorkio A E, Vuorimaa-Laukkanen E P, Hakola H M, Liang H, Ujula T A, Valle-Delgado J J, Österberg M, Yliperttula M L, Skottman H. *Biomimetic collagen I and IV double layer Langmuir-Schaefer films as microenvironment for human pluripotent stem cell derived retinal pigment epithelial cells*. **Biomaterials**. 51 257-269. 2015.

- [13] Rezaii M, Oryan S, Javeri A. *Curcumin nanoparticles incorporated collagen-chitosan scaffold promotes cutaneous wound healing through regulation of TGF- β 1/Smad7 gene expression*. **Materials Science and Engineering: C**. 98 347-357. 2019.
- [14] Gámiz-González M A, Correia D M, Lanceros-Mendez S, Sencadas V, Gómez Ribelles J L, Vidaurre A. *Kinetic study of thermal degradation of chitosan as a function of deacetylation degree*. **Carbohydrate Polymers**. 167 52-58. 2017.
- [15] Yúfera E P. *Química orgánica básica y aplicada de la molécula a la industria*. Barcelona, España. Editorial Reverté 2007.
- [16] Billotte W C. *Ceramic Biomaterials*. CRC Press, Taylor & Francis Group. 339. 2006.
- [17] Tateish T. *Biomaterials in Asia: In Commemoration of the 1st Asian Biomaterials*. Tsukuba, japon. W. Scientific. 2007.
- [18] Khang G, Lee, S.J., Kim, M.S. And Lee, H.B. *Biomedical Engineering Handbook* 366–383. **John & Wiley Press**. 366–383. 2006.
- [19] Balamurugan A, Rajeswari S, Balossier G, Rebelo A H S, Ferreira J M F. *Corrosion aspects of metallic implants — An overview*. **Materials and Corrosion**. 59(11). 855-869. 2008.
- [20] Ratner Bd H A, Schoen Fj, Lemons Je. *Biomaterials science. An introduction to materials in medicine California*. Elsevier Academic Press. 864. 2008.
- [21] Srivastav A. *Biomedical Engineering, Trends in Materials Science India. I*. Open. 153-168. 2011.
- [22] Williams D F. *There is no such thing as a biocompatible material*. **Biomaterials**. 35(38). 10009-10014. 2014.
- [23] Gilbert J L. *Corrosion in the Human Body: Metallic Implants in the Complex Body Environment*. **CORROSION**. 73(12). 1478-1495. 2017.
- [24] Williams D. *1 - Concepts in biocompatibility: new biomaterials, new paradigms and new testing regimes*. **Biocompatibility and Performance of Medical Devices**. Woodhead Publishing 3-17. 2012.
- [25] Williams D F. *On the nature of biomaterials*. **Biomaterials**. 30(30). 5897-5909. 2009.
- [26] Anderson J M, Rodriguez A, Chang D T. *Foreign body reaction to biomaterials*. **Semin Immunol**. 20(2). 86-100. 2008.

- [27] Habicht G S. *Inflammation: Basic Principles and Clinical Correlates*. **The Quarterly Review of Biology**. 63(3). 367-368. 1988.
- [28] Phelps E A, Landázuri N, Thulé P M, Taylor W R, García A J. *Bioartificial matrices for therapeutic vascularization*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. 107(8). 3323-3328. 2010.
- [29] Sandra Loaiza S a F, Tamara M. Chinna, B, Alex Kirby, Elena Tsolaki, Camilla Dondi, Katarzyna Parzych, Adam P. Strange, Laurent Bozec, Sergio Bertazzo, Martin A.B. Hedegaard, Eileen Gentleman, Holger W. Auner. *An engineered, quantifiable in vitro model for analysing the effect of T proteostasis-targeting drugs on tissue physical properties*. **Biomaterials**. 183 102-113. 2018.
- [30] Pirayesh H, Nychka J A. *Sol–Gel Synthesis of Bioactive Glass–Ceramic 45S5 and its in vitro Dissolution and Mineralization Behavior*. **Journal of the American Ceramic Society**. 96(5). 1643-1650. 2013.
- [31] Kokubo T, Kushitani H, Sakka S, Kitsugi T, Yamamuro T. *Solutions able to reproduce in vivo surface-structure changes in bioactive glass-ceramic A-W*. **J Biomed Mater Res**. 24(6). 721-34. 1990.
- [32] Hench L L, Wheeler D L, Greenspan D C. *Molecular Control of Bioactivity in Sol-Gel Glasses*. **Journal of Sol-Gel Science and Technology**. 13(1). 245-250. 1998.
- [33] Adams L A, Essien E R, Adesalu A T, Julius M L. *Bioactive glass 45S5 from diatom biosilica*. **Journal of Science: Advanced Materials and Devices**. 2(4). 476-482. 2017.
- [34] Dong J, Kojima H, Uemura T, Kikuchi M, Tateishi T, Tanaka J. *In vivo evaluation of a novel porous hydroxyapatite to sustain osteogenesis of transplanted bone marrow-derived osteoblastic cells*. **J Biomed Mater Res**. 57(2). 208-16. 2001.
- [35] Faure J, Drevet R, Lemelle A, Ben Jaber N, Tara A, El Btaouri H, Benhayoune H. *A new sol–gel synthesis of 45S5 bioactive glass using an organic acid as catalyst*. **Materials Science and Engineering: C**. 47 407-412. 2015.
- [36] O'brien F J. *Biomaterials & scaffolds for tissue engineering*. **Materials Today**. 14(3). 88-95. 2011.
- [37] 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 and Engineering: C**. 31(7). 1245-1256. 2011.

- [38] Ghassemi T, Shahroodi A, Ebrahimzadeh M H, Mousavian A, Movaffagh J, Moradi A. *Current Concepts in Scaffolding for Bone Tissue Engineering. The archives of bone and joint surgery.* 6(2). 90-99. 2018.
- [39] Hutmacher D W. *Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage.* **Biomaterials.** 21(24). 2529-2543. 2000.
- [40] Castro N J, O'brien J, Zhang L G. *Integrating biologically inspired nanomaterials and table-top stereolithography for 3D printed biomimetic osteochondral scaffolds.* **Nanoscale.** 7(33). 14010-14022. 2015.
- [41] Dittler M L, Unalan I, Grünewald A, Beltrán A M, Grillo C A, Destch R, Gonzalez M C, Boccaccini A R. *Bioactive glass (45S5)-based 3D scaffolds coated with magnesium and zinc-loaded hydroxyapatite nanoparticles for tissue engineering applications.* **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces.** 182 110346. 2019.
- [42] Li W, Wang H, Ding Y, Scheithauer E C, Goudouri O-M, Grünewald A, Detsch R, Agarwal S, Boccaccini A R. *Antibacterial 45S5 Bioglass®-based scaffolds reinforced with genipin cross-linked gelatin for bone tissue engineering.* **Journal of Materials Chemistry B.** 3(16). 3367-3378. 2015.
- [43] Hench L L. *The story of Bioglass®.* **Journal of Materials Science: Materials in Medicine.** 17(11). 967-978. 2006.
- [44] Abad-Javier M E, Cajero-Juárez M, Nuñez-Anita R E, Contreras-García M E. *Effect of collagen type I and vitamin D3 functionalization of biomimetic bioglass scaffolds on hydroxyapatite condensation.* **Journal of the European Ceramic Society.** 39(12). 3505-3512. 2019.
- [45] Tancred D C, Carr A J, McCormack B a O. *The sintering and mechanical behavior of hydroxyapatite with bioglass additions.* **Journal of Materials Science: Materials in Medicine.** 12(1). 81-93. 2001.
- [46] Lefebvre L, Chevalier J, Gremillard L, Zenati R, Thollet G, Bernache-Assollant D, Govin A. *Structural transformations of bioactive glass 45S5 next term with thermal treatments.* **Acta Materialia.** 2007.
- [47] Hench L L. *Genetic design of bioactive glass.* **Journal of the European Ceramic Society.** 29(7). 1257-1265. 2009.

- [48] Merwin G E. *Bioglass Middle Ear Prosthesis: Preliminary Report*. **Annals of Otolology, Rhinology & Laryngology**. 95(1). 78-82. 1986.
- [49] Bahmad F, Merchant S N. *Histopathology of Ossicular Grafts and Implants in Chronic Otitis Media*. **Annals of Otolology, Rhinology & Laryngology**. 116(3). 181-191. 2007.
- [50] Hench L L, Stanley H R, Clark A E, Hall M, Wilson J. *Dental Applications of Bioglass® Implants*. **Bioceramics**. Butterworth-Heinemann 231-238. 1991.
- [51] Chen Q Z, Thompson I D, Boccaccini A R. *45S5 Bioglass®-derived glass-ceramic scaffolds for bone tissue engineering*. **Biomaterials**. 27(11). 2414-2425. 2006.
- [52] Flory P J. *Introductory lecture*. **Faraday Discussions of the Chemical Society**. 57(0). 7-18. 1974.
- [53] Hektisch H K, Dennis J, Hanoka J I. *Crystal growth in gels*. **Journal of Physics and Chemistry of Solids**. 26(3). 493-496. 1965.
- [54] Bradley D C. *Metal alkoxides / D.C. Bradley, R.C. Mehrotra, and D.P. Gaur*. London Academic Press; New York. R. C. Mehrotra and D. P. Gaur. 1978.
- [55] Li R, Clark A E, Hench L L. *An investigation of bioactive glass powders by sol-gel processing*. **J Appl Biomater**. 2(4). 231-9. 1991.
- [56] Brinker C J, Scherer G W. *CHAPTER 1 - Introduction*. **Sol-Gel Science**. San Diego. Academic Press xvi-18. 1990.
- [57] Feinle A, Elsaesser M S, Hüsing N. *Sol-gel synthesis of monolithic materials with hierarchical porosity*. **Chemical Society Reviews**. 45(12). 3377-3399. 2016.
- [58] Kun Yang F, Li C, Mei Lin Y, Wang C-A. *Fabrication of Porous Mullite Ceramics with High Porosity Using Foam-Gelcasting*. **Key Engineering Materials**. 2012.
- [59] Tang X, Pikal M J. *Design of Freeze-Drying Processes for Pharmaceuticals: Practical Advice*. **Pharm Res**. 21(2). 191-200. 2004.
- [60] De Jaeghere F, Allemann E, Feijen J, Kissel T, Doelker E, Gurny R. *Freeze-drying and lyopreservation of diblock and triblock poly(lactic acid)-poly(ethylene oxide) (PLA-PEO) copolymer nanoparticles*. **Pharm Dev Technol**. 5(4). 473-83. 2000.
- [61] De Jaeghere F, Allemann E, Leroux J C, Stevels W, Feijen J, Doelker E, Gurny R. *Formulation and lyoprotection of poly(lactic acid-co-ethylene oxide) nanoparticles:*

- influence on physical stability and in vitro cell uptake. Pharmaceutical Research.* 16(6). 859-66. 1999.
- [62] Liu L, Cao Z, Cui Y, Ke X, Zeng G, Liu J, Liu D, Li Q, Lai J, Shi Z, Chou S. *Nanocomposites LiMnxFe_{1-x}PO₄/C synthesized via freeze drying assisted sol-gel routine and their magnetic and electrochemical properties. Journal of Alloys and Compounds.* 779 339-346. 2019.
- [63] Yamamoto T, Nishimura T, Suzuki T, Tamon H. *Control of mesoporosity of carbon gels prepared by sol-gel polycondensation and freeze drying. Journal of Non-Crystalline Solids.* 288(1). 46-55. 2001.
- [64] Tewa-Tagne P, Briancon S, Fessi H. *Preparation of redispersible dry nanocapsules by means of spray-drying: development and characterisation. Eur J Pharm Sci.* 30(2). 124-35. 2007.
- [65] Yu F, Zhang J, Yang Y, Song G. *Porous micro-spherical aggregates of LiFePO₄/C nanocomposites: A novel and simple template-free concept and synthesis via sol-gel-spray drying method. Journal of Power Sources.* 195(19). 6873-6878. 2010.
- [66] Wang C, Wang Q, Liu K, Liu J, Wang Y, Yang Y, Chang Q. *Synthesis, characterization and application of submicron ZrSiO₄ powder via sol-gel-microemulsion-hydrothermal method. Journal of Alloys and Compounds.* 828 154332. 2020.
- [67] Glyn N. Stacey A D M F. *Cell culture methods for in vitro toxicology Kluwer academic publishers* 2001.
- [68] Ilabaca C S B Y R G. *Manual de microbiología Santiago de Chile. Ediciones universidad católica de Chile.* 2018
- [69] Ri. F. *Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique and Specialized Applications.* Wiley-Blackwell. 2005.
- [70] Ri F. *Basic principles of cell culture. Culture of Cells for Tissue Engineering.* Wiley-Blackwell. 1-22. 2006.
- [71] Bottenstein J, Hayashi I, Hutchings S, Masui H, Mather J, McClure D B, Ohasa S, Rizzino A, Sato G, Serrero G, Wolfe R, Wu R. *The growth of cells in serum-free hormone-supplemented media. Methods Enzymol.* 58 94-109. 1979.
- [72] Bettger W J, Boyce S T, Walthall B J, Ham R G. *Rapid clonal growth and serial passage of human diploid fibroblasts in a lipid-enriched synthetic medium supplemented with*

- epidermal growth factor, insulin, and dexamethasone. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 78(9). 5588-5592. 1981.
- [73] Ogino M, Ohuchi F, Hench L L. *Compositional dependence of the formation of calcium phosphate films on bioglass.* **J Biomed Mater Res.** 14(1). 55-64. 1980.
- [74] Filgueiras M R T, La Torre G, Hench L L. *Solution effects on the surface reactions of three bioactive glass compositions.* **J Biomed Mater Res.** 27(12). 1485-1493. 1993.
- [75] Gamble J L, Harvard Medical S. *Chemical anatomy, physiology and pathology of extracellular fluid: a lecture syllabus [Cambridge].* Dept. of pediatrics, the Harvard medical school 1941.
- [76] Cui X, Kim H-M, Kawashita M, Wang L, Xiong T, Kokubo T, Nakamura T. *Apatite formation on anodized Ti-6Al-4V alloy in simulated body fluid.* **Metals and Materials International.** 16(3). 407-412. 2010.
- [77] Maçon A L B, Kim T B, Valliant E M, Goetschius K, Brow R K, Day D E, Hoppe A, Boccaccini A R, Kim I Y, Ohtsuki C, Kokubo T, Osaka A, Vallet-Regí M, Arcos D, Fraile L, Salinas A J, Teixeira A V, Vueva Y, Almeida R M, Miola M, Vitale-Brovarone C, Verné E, Höland W, Jones J R. *A unified in vitro evaluation for apatite-forming ability of bioactive glasses and their variants.* **Journal of Materials Science: Materials in Medicine.** 26(2). 115. 2015.
- [78] Bernhard S A. *Ionization constants and heats of tris(hydroxymethyl)aminomethane and phosphate buffers.* **J Biol Chem.** 218(2). 961-9. 1956.
- [79] Arsiccio A, Matejtschuk P, Ezeajughi E, Riches-Duit A, Bullen A, Malik K, Raut S, Pisano R. *Impact of controlled vacuum induced surface freezing on the freeze drying of human plasma.* **International Journal of Pharmaceutics.** 582 119290. 2020.
- [80] Ciurzyńska A, Marczak W, Lenart A, Janowicz M. *Production of innovative freeze-dried vegetable snack with hydrocolloids in terms of technological process and carbon footprint calculation.* **Food Hydrocolloids.** 108 105993. 2020.
- [81] Różyło R. *Recent trends in methods used to obtain natural food colorants by freeze-drying.* **Trends in Food Science & Technology.** 102 39-50. 2020.
- [82] Vanbillemont B, Carpenter J F, Probst C, De Beer T. *The Impact Of Formulation Composition And Process Settings Of Traditional Batch Versus Continuous Freeze-Drying On Protein Aggregation.* **Journal of Pharmaceutical Sciences.** 2020.

- [83] Me Abad-Javier M C-J, Me Contreras García. 45S5 *Bioglass porous scaffolds: structure, composition and bioactivity characterization*. **Journal of Silicate Based and Composite Materials**. 68(4). 2016.
- [84] Gražulis S. *Crystallography Open Database – an open-access collection of crystal structures*. <http://crystallography.net/cod/>. 2004.
- [85] <https://www.sigmaaldrich.com/life-science/core-bioreagents/biological-buffers/learning-center/buffer-reference-center.html>.
- [86] Golub E S. *Base Celular de la Respuesta Inmunológica*. Editorial Reverté, S.A 1987.
- [87] El-Ghannam A, Ning C Q, Mehta J. *Cyclosilicate nanocomposite: A novel resorbable bioactive tissue engineering scaffold for BMP and bone-marrow cell delivery*. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**. 71A(3). 377-390. 2004.
- [88] Blaeß C, Müller R, Poologasundarampillai G, Brauer D S. *Sintering and concomitant crystallization of bioactive glasses*. **International Journal of Applied Glass Science**. 10(4). 449-462. 2019.
- [89] Lefebvre L, Chevalier J, Gremillard L, Zenati R, Thollet G, Bernache-Assolant D, Govin A. *Structural transformations of bioactive glass 45S5 with thermal treatments*. **Acta Materialia**. 55(10). 3305-3313. 2007.
- [90] Lin Cc H L, Shen P. *Na₂CaSi₂O₆-P₂O₅ based bioactive glasses. Part I: Elasticity and structure*. **Journal of Non-Crystalline Solids**. (351). 3195–3203. 2005.
- [91] Westhauser F, Weis C, Prokscha M, Bittrich L A, Li W, Xiao K, Kneser U, Kauczor H-U, Schmidmaier G, Boccaccini A R, Moghaddam A. *Three-dimensional polymer coated 45S5-type bioactive glass scaffolds seeded with human mesenchymal stem cells show bone formation in vivo*. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**. 27(7). 119. 2016.
- [92] Pugh J W, Rose R M, Radin E L. *Elastic and viscoelastic properties of trabecular bone: Dependence on structure*. **Journal of Biomechanics**. 6(5). 475-485. 1973.
- [93] Yun H-S, Park J-W, Kim S-H, Kim Y-J, Jang J-H. *Effect of the pore structure of bioactive glass balls on biocompatibility in vitro and in vivo*. **Acta Biomaterialia**. 7(6). 2651-2660. 2011.

- [94] Kokubo T, Takadama H. *How useful is SBF in predicting in vivo bone bioactivity?* **Biomaterials**. 27(15). 2907-2915. 2006.
- [95] García C, Paucar C, Gaviria J. *STUDY OF SOME PARAMETERS THAT DETERMINE THE SYNTHESIS OF HYDROXYAPATITE BY THE PRECIPITATION ROUTE*. **DYNA**. 73 9-15. 2006.
- [96] Li P, Yang Q, Zhang F, Kokubo T. *The effect of residual glassy phase in a bioactive glass-ceramic on the formation of its surface apatite layer in vitro*. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**. 3(6). 452-456. 1992.
- [97] Peitl O, Zanotto E, Hench L. *Highly Bioactive P_2O_5 - Na_2O - CaO - SiO_2 Glass-Ceramics*. **Journal of Non-Crystalline Solids**. 292 115-126. 2001.
- [98] Clupper D C, Hench L L. *Crystallization Kinetics of Tape Cast Bioactive Glass 45S5*. **Journal of Non-Crystalline Solids**. 318 43-48. 2003.
- [99] Cacciotti I, Lombardi M, Bianco A, Ravaglioli A, Montanaro L. *Sol-gel derived 45S5 bioglass: synthesis, microstructural evolution and thermal behaviour*. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**. 23(8). 1849-1866. 2012.
- [100] Zandi Karimi A, Rezabeigi E, Drew R a L. *Crystallization behavior of combeite in 45S5 Bioglass® via controlled heat treatment*. **Journal of Non-Crystalline Solids**. 502 176-183. 2018.
- [101] Kirste G, Brandt-Slowik J, Bocker C, Steinert M, Geiss R, Brauer D S. *Effect of chloride ions in Tris buffer solution on bioactive glass apatite mineralization*. **International Journal of Applied Glass Science**. 8(4). 438-449. 2017.

