



**UNIVERSIDAD MICHOACANA
DE SAN NICOLAS DE HIDALGO**

**INGENIERÍA EN INNOVACIÓN TECNOLÓGICA DE
MATERIALES**

**“EVALUACIÓN DE BIOACTIVIDAD Y
BIODEGRADACIÓN DE ANDAMIOS DE
COMPOSITOS HA-PCL-BIOVIDRIO”**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TITULO DE INGENIERA: EN INNOVACIÓN
TECNOLÓGICA DE MATERIALES**

PRESENTA:

Lorena Elizabeth Barragán Navarro

ASESORA:

Dra. Ana Beatriz Martínez Valencia

COASESORA

Dra. Georgina Carbajal De La Torre

Morelia Michoacán, febrero del 2022

DEDICATORIAS

Esta dedicatoria es para el forjador de mi camino, mi padre celestial, el que me acompaña y siempre me levanta de mis continuos tropiezos.

A mis padres que son las personas que más amo por su constante apoyo y porque han sabido formarme para ser una persona exitosa, con buenos sentimientos, hábitos y valores.

A mi hermana que soy ejemplo de ella y siempre ha estado a mi lado apoyándome en lo que me propongo.

Y a todas las personas importantes que han estado a lo largo de mi vida.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a mi asesora de tesis la Dra. Ana Beatriz Martínez Valencia y a mi co-asesora la Dra. Georgina Carbajal de la Torre por haberme brindado la oportunidad de recurrir a su capacidad y conocimiento científico.

También agradezco a mis maestros por sus enseñanzas y los conocimientos que se me otorgaron a lo largo de estos cuatro años.

A mis compañeros con los que conviví durante este largo tiempo aprendiendo de sus diferentes habilidades, capacidades y formas de ser, en especial a mi compañera y amiga del alma María del Sagrario Merino Durán quien estuvo apoyándome siempre en todo momento.

Agradecimiento a la beca CONACYT del proyecto de Ciencia Básica CB-2014-243236-Y “Desarrollo y caracterización de andamios de BV-HA-PCL para ingeniería de tejidos”, Responsable y Técnico la Dra. Georgina Carbajal De la Torre. Proyecto Aprobado por el Fondo Sectorial de Investigación para la Educación.

RESUMEN

La regeneración de tejido óseo ha sido tema de constante investigación, por ello el desarrollo de andamios de hidroxiapatita (HA) es una alternativa para el tratamiento de defectos óseos. A pesar de que la hidroxiapatita (HA) es un material ampliamente estudiado, se ha buscado mejorar sus propiedades.

Esta tesis presenta el desempeño de andamios de hidroxiapatita (HA) combinados con un polímero llamado policaprolactona (PCL) y un biovidrio (BV). Para ello se fabricaron andamios de dos diferentes composiciones y fueron sometidos a pruebas de biodegradación y bioactividad. La estructura de estos andamios fue analizada mediante Microscopía Electrónica de Barrido (SEM) y también por el análisis micro elemental SEM-EDS. Finalmente los resultados de las pruebas de las dos composiciones fueron comparados. Se observó que los andamios realizados y estudiados cumplen su función de formar la hidroxiapatita y a su vez degradarse con el tiempo, resultando que una composición es mejor que la otra. La composición que proporcionó los mejores resultados fue la que contenía un mayor porcentaje en peso de hidroxiapatita y menor de biovidrio HA (50%), PCL (40%), Bv (10%), ya que hubo menos disolución en los andamios, siendo así su degradación más lenta dándole tiempo a la hidroxiapatita para poder crecer en andamio. Referente a la policaprolactona se observaron mejores propiedades mecánicas arriba del 40% en peso.

ABSTRACT

The bone tissue regeneration has been the subject of constant research; therefore, the development of hydroxyapatite (HA) scaffolds is an alternative for the treatment of bone defects. Although hydroxyapatite (HA) is a widely studied material, it has been sought to improve its proprieties.

This thesis presents the performance of hydroxyapatite (HA) scaffolds combined with a polymer polycaprolactone (PCL) and a bio glass (BV). For this, scaffolds of two different compositions were manufactured and subjected to biodegradation and bioactivity tests. The structure of these scaffolds was analyzed by Scanning Electron Microscopy (SEM) and also by micro elemental analysis SEM-EDS. Finally, the test results of the two compositions were compared. It was observed that the scaffolds made and studied fulfill their function of forming hydroxyapatite and in turn degrading over time, resulting in one composition being better than the other. The composition that provided the best results was the one that contained a higher percentage by weight of hydroxyapatite and a lower percentage of bioglass HA (50%), PCL (40%), Bv (10%), since there was less dissolution in the scaffolds, being Thus, its slower degradation, giving hydroxyapatite time to grow into a scaffold, with respect to polycaprolactone, better mechanical properties were observed above 40% by weight.

PALABRAS CLAVE: Regeneracion, tejido oseo, Ivestigación, Desarrollo, Desempeños.

CONTENIDO

LISTA DE FIGURAS.....	4
LISTA DE TABLAS.....	6
NOMENCLATURA.....	7
CAPITULO I.....	8
1. ANTECEDENTES.....	8
1.2 Objetivos. General y específicos.....	10
HIPÓTESIS.....	11
CAPÍTULO II.....	12
2. MARCO TEÓRICO.....	12
2.1 Biomateriales.....	12
2.2 Estado actual de los Biomateriales.....	12
2.3 Biomateriales usados para reparación y regeneración ósea.....	13
2.4 Regeneración de Tejidos Óseos.....	14
2.5 Biocerámicas.....	16
2.5.1 Hidroxiapatita (HA).....	17
2.5.2 Estructura.....	17
2.5.3 Métodos de Síntesis de Hidroxiapatita.....	19
2.5.4 Policaprolactona (PCL).....	19
2.5.5 Biovidrio.....	19
CAPITULO III.....	21
3. DESARROLLO EXPERIMENTAL.....	21
3.3 Síntesis de Hidroxiapatita (HA).....	21
3.1 Policaprolactona PCL.....	22
3.2 Preparación del Fluido Fisiológico Simulado (SBF) (Kokubo, 2006).....	22
3.3 Preparación del Fluido PBS (Phosphate buffered saline).....	24
3.4 Síntesis de Biovidrio.....	24
3.6 Elaboración de Andamios.....	26
3.6.1 Prueba de Biodegradación (F1635-16, 2016).....	28
3.6.2 Prueba de Bioactividad (Tadashi Kokubo, 2006).....	29
3.7 Preparación de las muestras para su Caracterización.....	30
3.8 Técnicas de Caracterización.....	31

3.8.1 Microscopía Electrónica de Barrido (MEB)	31
3.8.2 Espectroscopía de Energía Dispersiva (EDS).....	33
3.8.3 Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR).....	33
CAPÍTULO IV	34
4. RESULTADOS Y DISCUSION	34
4.1 FTIR Biovidrio	34
4.2 FTIR Hidroxiapatita.....	35
4.3 Difracción de Rayos x Hidroxiapatita (DRX).....	35
4.4 Microscopía Electrónica de Barrido, (MEB).....	36
4.4.1 Muestras de biodegradación (50-40-10)	36
4.4.2 Muestras de bioactividad (50-40-10).....	38
4.4.3 Muestras de biodegradación (10-40-50)	41
4.4.4 Muestras de bioactividad (10-40-50).....	43
4.5 Espectroscopia de energía dispersiva (EDS).....	44
CONCLUSIÓN	46
Referencias.....	47

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Porcentaje de los componentes del tejido óseo (Vallet-Regí, 2011).....	15
Figura 2. Arreglo atómico de la celda unitaria hexagonal de la hidroxiapatita (García-Garduño & Reyes-Gasga, 2006).....	18
Figura 3. Pesaje de Reactivos en balanza.....	21
Figura 4. Síntesis de hidroxiapatita por el método de precipitación.....	22
Figura 5. Síntesis de biovidrio.....	24
Figura 6. Sinterización del biovidrio.....	25
Figura 7. Biovidrio triturado.....	25
Figura 8. Síntesis Biovidrio (sol-gel).....	26
Figura 9. Tamaño del orificio del molde.....	27
Figura 10. Moldes con compósito.....	27
Figura 11. Andamios.....	28
Figura 12. Ejemplo de muestra de la cuarta semana de biodegradación.....	28
Figura 13. Muestras para análisis SEM.....	30
Figura 14. Microscopio Electrónico de Barrido JSM-6400.....	31
Figura 15. Recubrimiento de muestras con carbón.....	32
Figura 16. PD3 Desgasificador de placas.....	32
Figura 17. S150A Sputter coater.....	33
Figura 18. Espectrometría infrarroja del Biovidrio.....	34
Figura 19. Espectrometría infrarroja de Hidroxiapatita.....	35
Figura 20. Difractograma de HA.....	35
Figura 21. Gráfica de la pérdida de peso de las muestras de biodegradación composición HA (50%), PCL (40%), Bv (10%).....	36
Figura 22. Micrografía SEM. Muestra # 1 biodegradación, composición HA (50%), PCL (40%), Bv (10%).	37
Figura 23. Micrografía SEM muestra 2 biodegradación composición HA (50%), PCL (40%), Bv (10%).	38
Figura 24. Micrografía SEM muestra 3 bioactividad composición HA (50%), PCL (40%), Bv (10%)....	39
Figura 25. Gráfica del incremento de peso de las muestras de bioactividad composición HA (50%), PCL (40%), Bv (10%).....	40
Figura 26. Micrografía SEM muestra 4 bioactividad de la composición HA (50%), PCL (40%), Bv (10%).	40
Figura 27. Micrografía SEM muestra 4 biodegradación composición HA (10%), PCL (40%), Bv (50%).	41
Figura 28. Gráfica de la pérdida de peso de las muestras de biodegradación composición HA (10%), PCL (40%), Bv (50%).....	42
Figura 29. Micrografía SEM muestra 6 biodegradación composición HA (10%), PCL (40%), Bv (50%).	42
Figura 30. Micrografía SEM bioactividad de la composición HA (10%), PCL (40%), Bv (50%).	43

Figura 31. Gráfica del incremento de peso de las muestras de bioactividad composición HA (10%), PCL (40%), Bv (50%).....	44
Figura 32. Espectroscopía de energía dispersiva (EDS) muestra 3, semana 1 bioactividad composición HA (50%), PCL (40%), Bv (10%).....	44
Figura 33. Espectroscopía de energía dispersiva (EDS) muestra 8, semana 3 bioactividad composición HA (10%), PCL (40%), Bv (50%).....	45

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Biomateriales para regeneración ósea. (Barba).....	14
Tabla 2. Composición genérica de los Huesos (Bernabéu Martínez, 2006).....	16
Tabla 3. Comparación en la composición del hueso y la hidroxiapatita sintética. (Sáenz Ramírez).....	18
Tabla 4. Reactivos para síntesis de Hidroxiapatita.	21
Tabla 5. Orden de reactivos para SBF.	23

NOMENCLATURA

SÍMBOLO	DEFINICIÓN
HA	Hidroxiapatita
PCL	Policaprolactona
BV	Biovidrio
SBF	Simulated Body Fluid
PBS	Phosphate Buffered Saline
MEB	Microscopio electrónico de barrido
EDS	Energy Dispersive X-Ray Spectroscopy
FTIR	Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier

CAPITULO I

1. ANTECEDENTES

Los materiales en el día a día han sido y serán un tema de gran importancia en la vida. Hoy en día la tecnología enfocada a los materiales está siendo dirigida a los polímeros y materiales compuestos ya que con ellos es posible obtener un material con mejores características y propiedades óptimas para la aplicación requerida. Otro tipo de materiales como lo son los biomateriales, también en un significativo crecimiento debido a la necesidad de ofrecer una mejor calidad de vida a personas que sufren ciertos padecimientos crónicos sin solución médica ha llevado a la búsqueda de materiales que puedan sustituir las diferentes partes del cuerpo humano. Así surgieron los biomateriales que están destinados a su aplicación en seres vivos, y para su fabricación se requiere la coordinación de expertos de muy diversos campos.

Por otro lado en la aplicación biomédica, los materiales utilizados actualmente tienen un alto costo económico, sin embargo, es posible desarrollar otros sistemas de materiales compuestos polímero-cerámico que permitan reducir los costos y sean biocompatibles, una de las razones de la atracción que ofrecen estos materiales es el interés comercial, pero la razón fundamental es que el hueso está constituido principalmente por fosfatos de calcio, entre los que la hidroxiapatita ha recibido atención especial.

Para el área de la ingeniería de tejidos y de medicina regenerativa, los biomateriales son muy importantes para la regeneración del cuerpo por ende los materiales utilizados en estas disciplinas deben ser biocompatibles y proporcionar un ambiente mecánico donde el nuevo tejido pueda ser sometido al estrés normal de la célula, también deben ser porosos y permeables para tener un buen ingreso de nutrientes a las células y obtener una estructura superficial adecuada para que las células se adhieran (Yang, 2001).

Por ello los andamios son usados en ingeniería de tejidos como un soporte físico y biológico de las células, es decir, para retener, proliferar, diferenciar y transportar las células. Siendo todo esto una alternativa para el tratamiento de defectos causados por cáncer u otras enfermedades y traumas. Estos están formados por la combinación de una matriz (andamio, células y agentes biológicos activos).

La primera generación de biomateriales fue en el año 1950, llamando a estos materiales bio-inertes los cuales incluían materiales como metales, aleaciones, cerámicas inertes biocompatibles. El objetivo de estos primeros biomateriales era “alcanzar una combinación conveniente de propiedades físicas para reemplazar las del tejido sustituido con una respuesta tóxica mínima del receptor” (Hench, 1980).

El 1980 fue la segunda generación de materiales (Evelina Andreea Piciorang, 2019) bioactivos o bioabsorbibles en los que se encontraban materiales como la hidroxiapatita, biovidrios, polímeros y materiales biodegradables. Los materiales bioactivos tienen la habilidad de interactuar con el medio biológico para mejorar la respuesta biológica y el enlazamiento entre el tejido y la superficie del biomaterial. Los materiales bioabsorbibles tienen la habilidad de sufrir una degradación

progresiva mientras el nuevo tejido se regenera y se cura. El objetivo era producir componentes biocompatibles y capaces de interactuar con el medio biológico favoreciendo su integración.

La tercera generación fue en el año de 1990 de materiales bioactivos y bioreabsorbibles (Losada, 2011). Se utilizaron materiales como el fosfato tricálcico β y compuestos orgánicos/inorgánicos. Estos permitieron obtener biomateriales capaces de estimular respuestas celulares específicas a nivel molecular.

Para la cuarta generación y más reciente (2010) fueron los materiales biomiméticos que estimulan la reparación por procesos fisiológicos utilizando materiales biomiméticos y nanocompuestos (Rangel, 2010). Están considerados más como una herramienta que ayuda el cuerpo a autocurarse que como un material, también llamados “biomateriales inteligentes”.

Entre los biomateriales se encuentran también los polímeros sintéticos aprobados por la FDA (Food and Drug Administration) y con gran número de aplicaciones biomédicas están la policaprolactona y el ácido poliláctico. La policaprolactona (PCL) es extensamente usada para producir andamios para aplicaciones en ingeniería de tejidos debido a su biocompatibilidad, biodegradabilidad, estabilidad estructural y propiedades mecánicas (Ana Beatriz Martínez Valencia, 2019). Sin embargo, esta presenta baja bioactividad y alta hidrofobicidad, reduciendo la afinidad celular y rangos bajos para la regeneración de tejido.

Otros biomateriales muy usados son los biovidrios que se caracterizan por ser sólidos amorfos cuando poseen un desorden estructural muy elevado, o bien como líquidos cuando poseen una viscosidad muy elevada. El desarrollo y utilización de biovidrios en ingeniería de tejidos, en especial en aplicaciones para regeneración ósea, se han realizado durante los últimos 45 años a partir de que Hench y col., en 1971 desarrollaran el biovidrio 45S5 (Hench, 1980). Los vidrios se dividen en dos grandes grupos los de base silicio y los de base fosfato. Los vidrios del primer grupo, como ya se mencionó anteriormente fueron desarrollados por Hench y colaboradores quienes descubrieron que determinadas características de los vidrios eran biocompatibles, es decir, permitían generar una unión entre los huesos y los vidrios implantados. Por otro lado, los vidrios de fosfato de calcio se caracterizan porque la variación en su composición química permite modificar su velocidad de degradación, además de poseer propiedades osteoconductoras bajo determinadas condiciones, que en diversos estudios han permitido la adhesión, proliferación y diferenciación de células mesenquimales y osteoblastos.

Para mejorar las propiedades de estos tres materiales biocompatibles se propone combinar PCL permitiendo controlar la velocidad de degradación del polímero, mientras que el biovidrio y la hidroxiapatita le conferirán mejores propiedades de bioactividad, además de mejorar las propiedades mecánicas del andamio.

1.2 Objetivos. General y específicos

OBJETIVO GENERAL

Fabricar andamios con diferentes composiciones de HA-PCL-Bv y **caracterizar** mediante análisis de bioactividad y biodegradación, para aplicación en ingeniería de tejidos.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- **Sintetizar hidroxapatita** y biovidrio mediante métodos químicos.
- **Fabricar** andamios de polímero, hidroxapatita y biovidrio con dos composiciones diferentes de **hidroxapatita** y biovidrio.
- **Analizar la** biodegradación y bioactividad de los andamios fabricados, utilizando fluidos corporales simulados, simulated body fluid (SBF) y Phosphate-Buffered Saline (PBS).
- **Caracterizar** los andamios mediante las técnicas de **Difracción de Rayos X (DRX)**, Scanning Electron Microscopy (SEM) y Energy dispersive spectroscopy (EDS).

HIPÓTESIS

Los andamios fabricados de hidroxiapatita-policaprolactona-biovidrio, presentan buenas características de bioactividad y biodegradación para aplicación en ingeniería de tejidos.

CAPÍTULO II

2. MARCO TEÓRICO

2.1 Biomateriales

La descripción como la clasificación de biomateriales es muy extensa, el término biomaterial se podría definir separando la palabra en dos: bio (vida) y material se puede entender como sustancia. Éstas dos palabras se pueden relacionar de diferentes maneras, en sí un biomaterial es una sustancia que se encuentra en contacto con un organismo vivo (Sáenz Ramírez, Biomateriales, 2004)

En 1986 “The European Society for Biomaterials Consensus Conference” definió un biomaterial como una sustancia o material usado solo o para la fabricación de un aparato médico que pudiera interactuar con los tejidos humanos y el monitoreo de funciones corporales, así como para tratar alguna condición patológica del cuerpo. (Ravaglioli, 1992; Mattox, 1992)

Un tipo de biomaterial aplicado en el cuerpo humano para el tratamiento de defectos óseos son los andamios (Enrique Gallegos Nieto, 2013). El andamio es un elemento que sirve como plantilla y soporte estructural para las interacciones celulares y la formación de tejido. Los andamios para la regeneración ósea deben cumplir ciertas características para realizar su función: propiedades mecánicas similares a las del sitio de reparación, como lo es la biocompatibilidad que se deriva del prefijo bio y de la palabra compatibilidad, que es la capacidad de un material para no degradar ni interferir el medio biológico en el cual son utilizados. La necesidad del estudio de la biocompatibilidad surge del reconocimiento de la diferencia existente entre tejido vivo y los materiales no viables. (P., 2015) y la biodegradación que se define como la descomposición natural y no contaminante de una sustancia o producto por la acción de agentes biológicos. Las fracciones resultantes de material pueden ser desplazadas del lugar de implantación, pero no necesariamente fuera del organismo y pueden ser depositadas en algún otro tejido receptor. (Vert, 1992)

2.2 Estado actual de los Biomateriales

Los biomateriales se han convertido en un tema de investigación y desarrollo muy activo para científicos e ingenieros de todo el mundo. Cada año surgen nuevas revistas especializadas en este tema. Varios de los aspectos más relevantes de la ciencia y tecnología de biomateriales han llegado a ser muy atractivos como lo son la HA, vidrios cerámicos, alúmina, hidrogeles etc. Los biomateriales presentan un mercado potencial de varios millones de dólares anuales, y cualquier innovación que sea adecuada para resolver un problema en específico representa ganancias muy atractivas.

La palabra biomaterial se usa para describir una amplia gama de materiales usados en aplicaciones biomédicas. Los compuestos como lo son los carbonatos y los fosfatos son los más destacados, su

razón fundamental es que el hueso está constituido principalmente por fosfatos de calcio, entre los que la hidroxiapatita ha recibido atención especial. (Sáenz Ramírez, Biomateriales, 2004).

El desarrollo de nuevas tecnologías ha provisto materiales con propiedades físicas, químicas y mecánicas que los hacen muy adecuados para implantes ortopédicos o dentales. (Jose Luis San Román García). En la medicina moderna los biomateriales se emplean principalmente en la regeneración ósea, cirugía maxilofacial, cardiovascular y oftalmología.

2.3 Biomateriales usados para reparación y regeneración ósea.

Más de cincuenta millones de personas en todo el mundo tienen implantado algún tipo de prótesis y es un hecho bien conocido en nuestra sociedad la utilidad y necesidad de todo tipo de implantes, siendo raro que en nuestro entorno próximo no conozcamos algún caso de familiar o amigo que los necesite.

Los biomateriales están destinados a su aplicación en seres vivos, y para su fabricación se requiere la coordinación de expertos de muy diversos campos. El campo de los biomateriales ha experimentado un espectacular avance en los últimos años y una motivación importante para ello ha sido el hecho de que la esperanza de vida aumente de forma considerable. (Regí, 2012)

La primera generación de biomateriales utilizados, se clasificó como materiales bioinertes. Con el tiempo se dio a conocer que dichos materiales presentan grandes limitaciones, un ejemplo de ello era que la interacción material-tejido estaba muy comprometida, y nada controlada. Así surgieron los biomateriales bioactivos, cuyo objetivo es el de interactuar de manera activa con el organismo favoreciendo la integración del biomaterial. La segunda generación fueron los materiales bioabsorbibles que son diseñados para degradarse gradualmente y ser reemplazados por el tejido huésped, se emplean en la sutura reabsorbible o en reconstrucciones óseas como material de relleno en cirugía maxilofacial y ortopédica.

En los últimos años, se han desarrollado una tercera generación de biomateriales, estos buscan interactuar con el tejido de forma específica, a nivel celular y molecular combinando las propiedades de bioactividad y bioabsorbibilidad dentro del mismo material (Elena, y otros, 2016). Los biomateriales más importantes usados para la regeneración ósea de encuentran algunos metales, cerámicos, polímeros sintéticos y naturales, vidrios biológicos, los cuales se aplican en especialidades médicas.

Dentro de los tipos de biomateriales (Tabla 1) que existen tenemos:

- Biomateriales metálicos: La principal limitación de estos materiales es su pobre comportamiento tribológico, el cual se caracteriza por un alto coeficiente de fricción y un desgaste por adhesión severo (Elena V. S., 2013).
- Biomateriales cerámicos: Compuestos químicos complejos que contienen elementos metálicos y no metálicos, debido a sus enlaces iónicos o covalentes son generalmente duros y frágiles, pero también resistentes al desgaste. El requisito fundamental es su no toxicidad en el organismo (Montoliu, 1993).

- Biovidrios: En 1971, Hench y col. Descubrieron que ciertas composiciones de vidrios se enlazaban al hueso. A dichos vidrios se les denominó vidrios bioactivos y han sido objeto de numerosos estudios, con vistas a su utilización clínica como implantes para la sustitución y reparación de tejidos óseos (Regí, Biomateriales para sustitución y reparación de tejidos, 2012)
- Biomateriales poliméricos: En la actualidad, estos biomateriales pueden llegar a reemplazar, reforzar o cumplir una función específica en el cuerpo humano. (Osorio-Delgado, 2017) Presentan enormes posibilidades, tanto en variedad de compuestos como en fabricación con propiedades muy diversas.

Tabla 1. Biomateriales para regeneración ósea. (Barba)

Materiales	Aplicaciones
Metales	Prótesis, válvulas cardíacas, aplicaciones dentales, clavos y tornillos.
Cerámicos y Biovidrios	Defectos óseos, relleno de cavidades, prótesis de cadera.
Polímeros	Liberación de fármacos, suturas quirúrgicas e ingeniería de tejidos.

Para poder ser implantado cualquier biomaterial debe cumplir ciertos requisitos los cuales engloban ciertos criterios: biocompatibilidad, bioestabilidad a corto y largo plazo, mantenimiento de sus propiedades mecánicas, químicas y físicas en el entorno biológico durante el tiempo de permanencia en el organismo.

Los requisitos que debe cumplir un biomaterial son: 1) Ser biocompatible, aceptado por el organismo receptor y que no se dé un rechazo; 2) No debe ser tóxico ni cancerígeno; 3) Biodegradable en productos no tóxicos y químicamente estable; 4) Que el peso, sus características superficiales, resistencia y propiedades mecánicas, y el tiempo de fatiga sean los apropiados; 5) Tamaño forma y diseño deben ser los adecuados. (Biblioteca digital, s.f.)

2.4 Regeneración de Tejidos Óseos

El hueso es un órgano duro y resistente, su composición se basa de tejidos y sustancias minerales. Su función es proteger órganos y partes del cuerpo, dando soporte y conectando los músculos. Está compuesto por una fase mineral de la cual el colágeno es el principal componente de la fase orgánica (Figura 1).

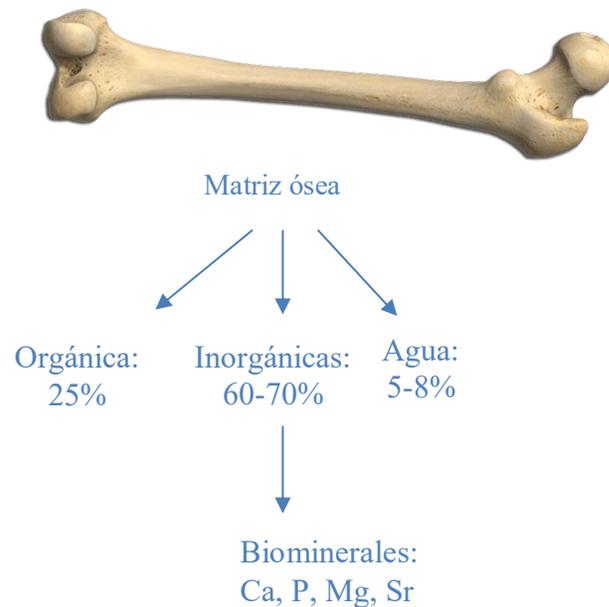


Figura 1. Porcentaje de los componentes del tejido óseo (Vallet-Regí, 2011)

El hueso es el único tejido del organismo capaz de regenerarse permitiendo la restitución e integración tras el trauma (Davies, 2003). Cuando se produce una fractura, se coloca un implante osteointegrado o se realiza un injerto para aumentar el sustrato óseo antes de la inserción de implantes, lo que se pretende es la regeneración ósea, es decir, la formación de hueso nuevo que, tras un proceso de remodelado, sea idéntico al preexistente. (Isabel Fernández-Tresguerres, 2006) La regeneración a diferencia de la reparación, es donde el tejido que se forma es un tejido cicatricial, con características diferentes al original.

El hueso está compuesto por tejidos, el tejido fundamental es el tejido óseo. Esto no quiere decir que no haya más tejidos, ya que también hay nervios, grasa, vasos sanguíneos, El tejido óseo es un tejido conjuntivo es duro porque sufre un proceso de mineralización.

El hueso está compuesto por células y sustancia extracelular que se llama la matriz del hueso, esta última a su vez se divide en una fracción orgánica y otra mineral.

El componente mineral del hueso representa el 65% del peso óseo. (Manuel Megías, 2017) Éste está formado por calcio, fosfato y carbonato en proporciones de (10:6:1) formado por pequeños cristales de hidroxiapatita $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, y en menor proporción contiene magnesio, sodio, potasio, manganeso, y flúor (Tabla 2).

La regeneración ósea origina una respuesta en la que están involucrados los vasos sanguíneos las células y la matriz extracelular. La importancia de los vasos sanguíneos es la osteogénesis (Reikerås, 1992).

Tabla 2. Composición genérica de los Huesos (Bernabéu Martínez, 2006)

Fase inorgánica	% Peso	Fase orgánica
Hidroxiapatita	60	Colágeno
Carbonato	4	Agua
Citrato		0.9
		Proteínas no colágenas (osteocalcina, steonectina, osteopontina, trombospondina, Proteínas orfogenéticas, sialoproteínas, proteínas de suero)
Sodio	0.7	
Magnesio	0.5	
Cl-, F-, K+ Sr2+, Pb2+, Zn2+, Cu2+, Fe2+		Polisacáridos, lípidos, citoquinas
		Células óseas primarias: osteoblastos, osteocitos, osteoclastos

Los cristales de hidroxiapatita, formada sobre todo por fosfato tricálcico, pero también por carbonato cálcico e impurezas que aumentan la solubilidad y modifican otras propiedades físicas, se disponen alrededor de las fibras colágenas formando un importante armazón, dando lugar a excepcionales propiedades mecánicas. Estos cristales mineralizados son los responsables de la resistencia del hueso a las fuerzas de compresión. En esencia el tejido óseo es muy similar a las construcciones de edificios donde se forman barras de acero (colágeno) y entre ellos cemento (cristales de hidroxiapatita) (Vázquez, 2014).

2.5 Biocerámicas

La primera biocerámica se encuentra en nuestros huesos (M. Vallet-Regí, 2008). Es una apatita biológica deficiente en calcio y carbonatada, su tamaño es nanométrico.

Las cerámicas son usadas en los biomateriales y se obtienen a temperaturas y presiones altas, algunas de sus características son la alta resistencia a la compresión, baja conductividad térmica y eléctrica.

Existen varias formas y fases de las biocerámicas, que se usan principalmente para la reparación de diferentes partes del cuerpo. Sus principales aplicaciones están relacionadas con la restauración del sistema esquelético, como lo son huesos, dientes, articulaciones y tejido.

Tipos de Biocerámicas

- Cerámicas Inertes:

Álmina: Buena biocompatibilidad y dureza.

Zirconia: Cerámica inestable, con la adición de óxidos se estabiliza parcialmente.

- Cerámicas Bioabsorbibles:

Cementos de Fosfato cálcico: Activan las funciones osteoblásticas y osteoclásticas transformando el material en una estructura similar al hueso.

- Fosfato tricálcico: presenta biocompatibilidad, reabsorción y osteo-conducción siendo responsables de la remodelación ósea. El más empleado es el β -TCP (Olivo EA, 2015).

Uno de los aspectos importantes en las aplicaciones de las biocerámicas es la interacción que pueda existir en la interfase con el tejido vivo, tanto en términos de disolución, de toxicidad como de las funciones activas que promueven la formación de nuevo tejido óseo (Vallet-Regí, 2011).

2.5.1 Hidroxiapatita (HA)

La hidroxiapatita es de gran importancia en los tejidos mineralizados porque se ha demostrado que es un material biocompatible, con algunas de las aplicaciones biomédicas en Odontología, Ortopedia y Cirugía Máxilofacial. Es el cristal principal de huesos y dientes ya que les aporta su dureza característica y, a su vez con la colágena, les transfiere cierta elasticidad.

En la naturaleza se le encuentra formando parte de rocas metamórficas.

En los tejidos vivos, la hidroxiapatita y sus precursores se encuentran en diferentes grupos animales como los corales, estrellas de mar, etc. Como biomaterial se realizan investigaciones para determinar sus formas óptimas de aplicación.

La HA pura se puede obtener mediante reacciones en sistemas acuosos o por reacciones en estado sólido. Sin embargo, cuando es preparada a través de sistemas acuosos de precipitación o métodos de hidrólisis es importante manejar las cantidades adecuadas de precursores para lograr una HA totalmente estequiométrica (relación molar Ca/P= 1.67) debido a que, en ocasiones, se obtiene una HA deficiente en calcio. El uso de métodos acuosos en condiciones alcalinas provoca que el precipitado contenga carbonato, lo cual también afecta la relación molar Ca/P. (Chávez, 2012)

2.5.2 Estructura

La hidroxiapatita es un biocristal, formado por átomos de calcio, fósforo, e hidrógeno, de acuerdo con la fórmula $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{HO})_2$.

Pertenece a la familia de las apatitas y presenta una estructura hexagonal (figura 2) (García-Garduño & Reyes-Gasga, 2006).

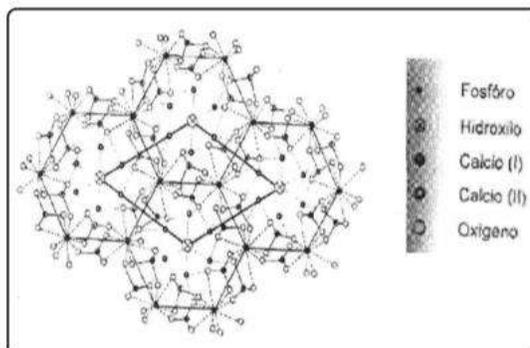


Figura 2. Arreglo atómico de la celda unitaria hexagonal de la hidroxiapatita (García-Garduño & Reyes-Gasga, 2006)

Se puede obtener de forma sintética, tiene características de biocompatibilidad, estabilidad química, no toxicidad osteoconducción y bioactividad; esto hace al material adecuado para para usos médicos.

En la tabla 3, se muestra una comparación en la composición de la hidroxiapatita biológica y sintética.

Tabla 3. Comparación en la composición del hueso y la hidroxiapatita sintética. (Sáenz Ramírez)

Elemento (% en peso)	Hueso	Hidroxiapatita sintética
Calcio	36.1	39.0
Fósforo	17.3	18.5
Dióxido de carbono	3.0	-
Magnesio	0.5	-
Sodio	0.2	-
Potasio	0.1	-
Cloro	0.3	-
Flúor	0.016	-
Azufre	0.01	-
Zinc	0.016	-
Silicio	0.003	-
Relación atómica Ca/P	1.62	1.667
Índice de Cristalinidad	70-75	80-100

2.5.3 Métodos de Síntesis de Hidroxiapatita

El método de síntesis para la obtención de hidroxiapatita para poder utilizarse como un sustituto óseo debe ofrecer alta pureza, rendimiento y bajo costo, también contar con propiedades como la biocompatibilidad, bioactividad, osteoconducción y unión con el hueso.

Hay distintos métodos para la obtención de hidroxiapatita que se describen brevemente a continuación.

Sinterización en estado sólido: Se realiza mediante la compactación de los reactivos sólidos, después esta mezcla es sometida a altas temperaturas de calentamiento. Uno de los problemas del método radica en las irregularidades del grano.

Sinterización sol-gel: Se realiza mediante una suspensión coloidal de partículas sólidas o cúmulos en un líquido que es el sol, se realiza la hidrólisis y condensación de este sol para formar el material sólido (la hidroxiapatita) lleno de solvente que es el gel. Se utilizan precursores como: nitrato de calcio tetrahidratado $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$, fosfato de amonio monobásico $(\text{NH}_4)\text{H}_2\text{PO}_4$ y nitrato de plata $\text{Ag}(\text{NO}_3)$.

Sinterización hidrotermal: Se realiza en una solución acuosa a temperaturas relativamente bajas y presiones altas, el proceso se lleva a cabo en una autoclave.

Sinterización por precipitación: La precipitación de una fase sólida en una disolución permite un buen control de las características, a través de los procesos de nucleación y crecimiento, presentando éste un buen control sobre la formación de partículas sólidas, duración y cantidad del producto que se obtiene (Paez, 2001).

2.5.4 Policaprolactona (PCL)

La policaprolactona es un polímero biodegradable con un bajo punto de fusión (alrededor de 60° C). Es un material seguro, se metaboliza por hidrólisis reabsorbiéndose por completo sin dejar ningún tipo de residuo en el organismo.

Usada para mejorar las propiedades de la hidroxiapatita y el biovidrio, la cual permite controlar la velocidad de degradación del compósito.

La policaprolactona es extensamente utilizada en la fabricación de andamios para aplicaciones en ingeniería de tejidos debido a su biocompatibilidad, biodegradabilidad, estabilidad estructural y propiedades mecánicas (Patricio, 2013).

2.5.5 Biovidrio

Los biovidrios se caracterizan por ser sólidos amorfos cuando poseen un desorden estructural muy elevado. El desarrollo y utilización de biovidrios en ingeniería de tejidos, principalmente en aplicaciones para regeneración ósea. (Hench, 1980)

El biovidrio le confiere mejores propiedades de bioactividad al compuesto, además de mejorar las propiedades mecánicas.

Los materiales bioactivos son aquellos que están en capacidad de establecer una fuerte unión con el tejido óseo; despiertan un gran interés con miras a su aplicación en la industria biomédica en implantación para sustitución y reparación de tejidos óseos. (Ng, Annergen, Soutar, Khor, & Jarfors, 2005) (Donald I. W., Mallison, Metcalfe, Gerrad, & Fernie, 2011)

CAPITULO III

3. DESARROLLO EXPERIMENTAL

3.3 Síntesis de Hidroxiapatita (HA)

En la tabla 4 se enlistan los reactivos utilizados para la síntesis de Hidroxiapatita:

Tabla 4. Reactivos para síntesis de Hidroxiapatita.

REACTIVOS	FÓRMULA
Nitrato de calcio tetrahidratado	$(\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O})$ ó $(\text{CaN}_2\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O})$
Fosfato ácido de amonio	$(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ ó $(\text{H}_9\text{N}_2\text{O}_4\text{P})$
Hidróxido de amonio	(NH_4OH)
Agua destilada	H_2O



Figura 3. Pesaje de Reactivos en balanza

Se realizó la síntesis de HA mediante el método de precipitación de la siguiente forma:

1. Se lavó todo el material de vidrio antes de utilizarse y se enjuagó con agua destilada.
2. Se preparó una solución 1M de Hidróxido de amonio (NH_4OH), en un matraz aforado y se llevó al volumen del aforo.
3. Se preparó una solución a partir de 14.10g de nitrato de calcio tetrahidratado ($\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) en 50.4 ml de agua destilada (Figura 3). Se agitó con la ayuda de la parrilla de agitación y un agitador magnético hasta la disolución completa (Solución 1).
4. Se elaboró otra solución de 4.73g de fosfato ácido de amonio ($(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$) en 179.3 ml de agua destilada (Solución 2). Se agitó con la ayuda de la parrilla de agitación y un agitador magnético hasta la disolución completa (Figura 4).

5. Sobre la parrilla de calentamiento y agitación se puso a agitar la solución 1 dentro de un vaso de precipitado. Se mantuvo una temperatura constante de 60 ± 2 °C y una agitación a 400 rpm aproximadamente, durante toda la síntesis (Figura 4).
6. La solución 2, se adicionó lentamente en la solución 1 mediante una bureta por goteo muy lentamente.
7. El pH de la solución 1 se ajustó entre 8.5 y 9 mediante la adición del hidróxido de amonio preparada previamente. El pH fue medido en todo momento ya que éste disminuía constantemente debido a la solución de fosfato y se estuvo agregando más solución de hidróxido.
8. La síntesis terminó cuando se terminó de adicionar toda la solución 2, se prosiguió con la agitación unos minutos mientras se estabilizó el pH y se terminó la reacción.
9. El precipitado obtenido se sostuvo 10 min. en el ultrasonido para disminuir el tamaño de partícula y después se filtró con la ayuda del papel filtro y un embudo, se lavó con agua caliente dentro del mismo embudo y se metió al horno mufla a secar a 60 °C por 24 hrs.
10. El material obtenido después del secado se molió en un mortero hasta obtener un polvo muy fino, se tamizó el polvo a 200 micras y para finalizar se envasó en un recipiente de plástico y se guardó.



Figura 4. Síntesis de hidroxiapatita por el método de precipitación

3.1 Policaprolactona PCL

Se utilizaron pellets de policaprolactona ($C_6H_{10}O_2$)_n marca Sigma-Aldrich.

3.2 Preparación del Fluido Fisiológico Simulado (SBF) (Kokubo, 2006)

Para la preparación del SBF los aditivos químicos que se utilizaron se encuentran descritos en la tabla 5 con sus cantidades correspondientes.

Tabla 5. Orden de reactivos para SBF.

ORDEN	REACTIVO	FÓRMULA	CANTIDAD (Gramos)
1	Cloruro de sodio	NaCl	8.035
2	Bicarbonato de sodio	NaHCO ₃	0.355
3	Cloruro de Potasio	KCl	0.225
4	Fosfato ácido de potasio trihidratado	K ₂ HPO ₄ 3H ₂ O	0.231
5	Cloruro de magnesio hexahidratado	MgCl ₂ .6H ₂ O	0.311
6	Ácido Clorhídrico	HCL 1M	39 ml
7	Cloruro de Calcio	CaCl ₂	0.292
8	Sulfato de sodio anhidro	Na ₂ SO ₄	0.072
9	Tris-(hidroximetil)-aminometano	H ₂ NC(CH ₂ OH) ₃	6.118
10	Ácido Clorhídrico	HCL 1M	0-5 ml

Se lavaron los materiales de vidrio y envases de polietileno con detergente neutro y la solución 1M de HCl y agua desionizada.

La solución se preparó de la siguiente manera:

- 1.- En un recipiente de polietileno con capacidad de 1 lt se adicionaron 700 ml de agua desionizada, se calentó a 36.5 °C ± 0.1 el agua con un agitador magnético de manera constante (mediante una parrilla de agitación y calentamiento).
- 2.- Los reactivos se pesaron justo antes de agregarse para evitar la absorción de agua.
- 3.- Se comenzó a agregar uno a uno los reactivos hasta el reactivo número 8 en la cantidad y orden que se muestra en la Tabla 5. Dejando disolver completamente cada uno antes de agregar el siguiente.
- 4.- Se ajustó la temperatura de la solución exactamente a 36.5 °C y se agregó más agua desionizada hasta completar 900 ml.
- 5.- Se comenzó a agregar lentamente el reactivo número 9 hasta un pH de 7.45.
- 6.- Posteriormente se ajustó el pH a 7.25 mediante la adición de más solución de HCL 1M y nuevamente el reactivo 9 para un pH de 7.45. Este procedimiento se repitió varias veces hasta que se agregó todo el reactivo 9 y se ajustó a un pH exacto de 7.40 a una temperatura exacta de 36.5 °C.
- 7.- La solución se transfirió a un matraz aforado de un litro y se esperó a que se enfriara.
- 8.- Se aforó a 1 lt y se dejó enfriar.
- 9.- Finalmente la solución se transfirió a un recipiente de polietileno para almacenar a una temperatura de entre 5 y 10 °C.

3.3 Preparación del Fluido PBS (Phosphate buffered saline)

Se utilizaron las tabletas de PBS de la marca SIGMA y se siguieron las instrucciones que estas incluyen, **disolviendo** una tableta en 200 ml de agua desionizada, **a temperatura ambiente y con agitación contante**. La solución quedó con un pH de 7.4 a 25° C.

3.4 Síntesis de Biovidrio

Para la preparación del biovidrio se requieren varias soluciones, ácido nítrico, TEOS, trietilfosfito y nitrato de calcio. A continuación, se muestran los pasos a seguir:

1. Se agregaron 0.4 ml de Ácido Nítrico aforados a 60 ml en un recipiente de vidrio, y se colocó en la parrilla de agitación (Figura 5).

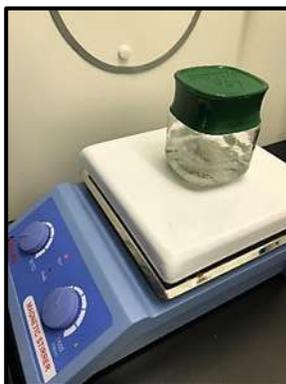


Figura 5. Síntesis de biovidrio.

2. Se midieron 28.57 ml de TEOS y se agregaron al recipiente, se dejó en agitación fuerte durante 60 min.
3. Pasados los 60 min se procedió a añadir 1.878 \approx 1.9 ml de Trietilfosfito y se dejó en agitación durante 45 minutos.
4. Después se agregó poco a poco 12.28 gr de nitrato de calcio y se dejó en agitación durante 1 hora.
5. Para finalizar la síntesis el biovidrio se mantuvo en reposo en su recipiente sellado a temperatura ambiente durante 10 días.
6. Pasados los 10 días el recipiente se metió a la mufla a una temperatura de 70° C y se dejó ahí durante 3 días.



Figura 6. Sinterización del biovidrio

Pasados los tres días se aumentó la temperatura a 120° C durante dos días para remover los solventes (Figura 6).

7. Después se sacó el biovidrio de la mufla y se trituroó en un mortero (Figura 7).



Figura 7. Biovidrio triturado

8. Siguiendo con la síntesis se pasó a un crisol y se metieron nuevamente a la mufla, esta vez se subió la temperatura 5° por minuto hasta llegar a 700° y se dejó ahí durante 24 horas.
9. Se sacó de la mufla, se trituroó nuevamente y se tamizó a un tamaño de 200 micras, se pasó a un recipiente de plástico etiquetado con su fecha y se guardó.

Método sol-gel: La obtención del biovidrio se realizó a partir de la suspensión coloidal de sílice (denominada sol) y su posterior gelificación, formando una red de fase líquida continua (denominada gel) y posterior tratamiento térmico (Osorio, 2018).

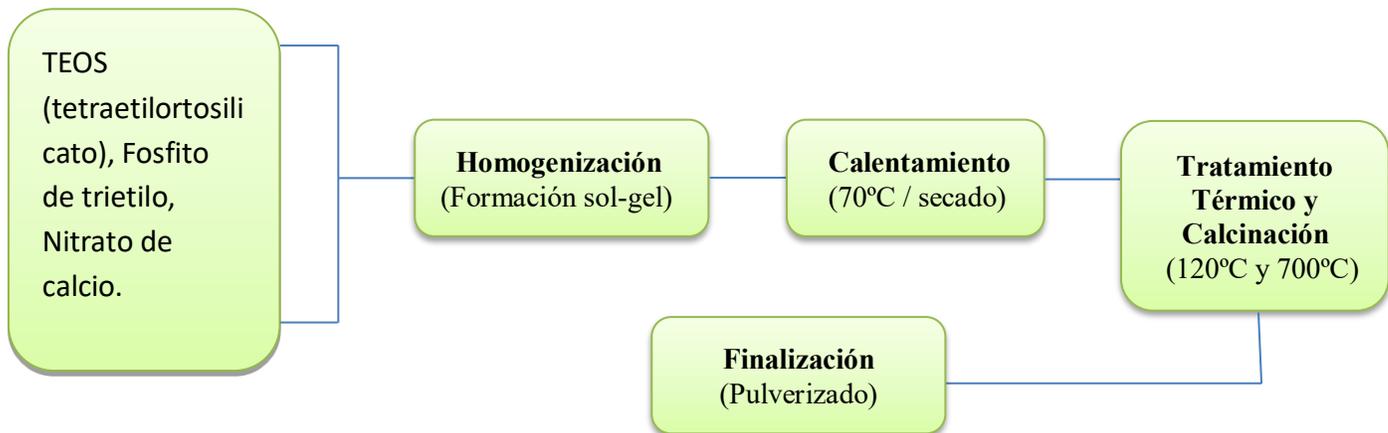


Figura 8. Síntesis Biovidrio (sol-gel).

Para la síntesis del Biovidrio los precursores para sintetizar esos coloides consisten de un elemento metálico o metaloide rodeado de varios ligandos reactivos. Los alcóxidos metálicos son los más populares, debido a que ellos reaccionan fácilmente con agua. (Mehrotra, 1988). Entre ellos se encuentra el tetraetilortosilicato (TEOS) y otros precursores como el nitrato de calcio y el fosfito de trietilo utilizado como ligando reactivo. El gel se forma a partir de las reacciones de hidrólisis y condensación, después el gel formado tiene un calentamiento para el secado, posteriormente un tratamiento térmico y calcinado para estabilizar el vidrio, finalmente su pulverización para su utilización requerida.

3.6 Elaboración de Andamios

1. Se realizaron dos composiciones de andamios para ser evaluados en las pruebas de biodegradación y bioactividad de los cuales la primera composición fue: HA (10%), PCL (40%), Bv (50%) en peso.
2. En la balanza se pesó biovidrio e hidroxiapatita. Se midió también con una pipeta 4 ml de cloroformo y todo esto se colocó en un vaso de precipitado, se mantuvo agitando en una parrilla de agitación durante 30 minutos.
3. Posteriormente se sostuvo en agitación en un baño ultrasónico durante 10 minutos para disminuir el tamaño de partícula.
4. Se pasó nuevamente a la parrilla de agitación y se agregó la policaprolactona lentamente, y se dejó en agitación una hora para formar una mezcla homogénea de los componentes.
5. Cumplida la hora de agitación se procedió a pesar cloruro de sodio (30gr) previamente tamizado para obtener un tamaño promedio y se agregaron a la disolución.

6. Continuando se mantuvo en agitación en un baño ultrasónico durante 10 minutos y se agregó más cloroformo.
7. Previamente a la síntesis del compósito se limpiaron completamente los moldes con acetona, en el cual, cada orificio tubular mide aproximadamente 0.5 cm de diámetro y 1.2 cm de largo (figura 9).
8. Ya con la mezcla de compósito lista se procedió a agregarla en los moldes tratando de llenar completamente cada orificio y volteando los moldes para asegurar que estuvieran completamente cubiertos por el compósito (figura 10).

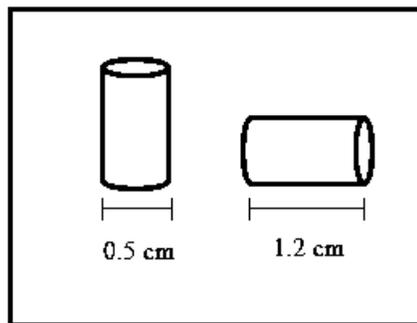


Figura 9. Tamaño del orificio del molde

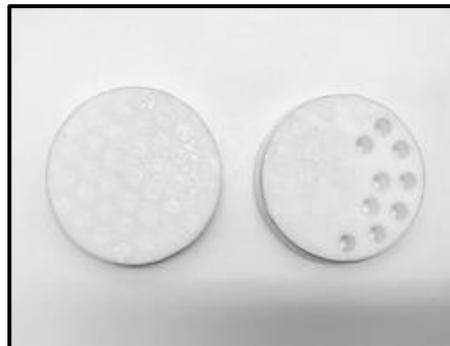


Figura 10. Moldes con compósito

9. Después de tener el compósito en los moldes se dejan durante un día en una superficie limpia para la evaporación del solvente.
10. Al tercer día los moldes se meten al horno a 36 ± 0.5 °C durante 3 días donde se retirará el residuo de solvente y solidificarán.

11. Cumplidos los tres días en el horno se procedió a sacarlos cuidadosamente para poder retirar cada andamio que contenía el molde.
12. Los andamios se colocaron en un vaso de precipitado y se agregó agua desionizada, para retirar el cloruro de sodio de los andamios, este paso se repitió varias veces (Figura 11).



Figura 11. Andamios

13. Ya enjuagados los andamios se metieron al horno durante tres días a una temperatura de 36 ± 0.5 °C.

La segunda composición fabricada de andamios fue: HA (50%), PCL (40%), Bv (10%). Se repitió el mismo proceso anterior para la elaboración de los andamios cambiando únicamente de cantidad de hidroxiapatita y biovidrio.

3.6.1 Prueba de Biodegradación (F1635-16, 2016)

De los andamios previamente realizados se escogieron un total de 24 andamios con composición HA (10%), PCL (40%) Bv (50%) y otros 24 con la composición HA (50%), PCL (40%), Bv (10%).

Se analizó cada muestra compuesta de 3 andamios colocados en diferentes recipientes de polietileno para un total de 8 semanas (Figura 12). Este análisis se llevó a cabo para la evaluación y comportamiento del proceso de degradación en los andamios.



Figura 12. Ejemplo de muestra de la cuarta semana de biodegradación

1. Se calentó el fluido (PBS) en un vaso de precipitado con agitación a 36° C.
2. Se colocaron tres andamios en un recipiente de polietileno y se agregó aproximadamente 20 ml del fluido, se cerró y se metió al horno a una temperatura de 36 ± 0.5 °C.
3. Cada día de la semana se midió el pH del fluido, si este aumentaba o disminuía más de 7.4 el fluido era nuevamente cambiado siguiendo el proceso anterior, esto para mantener un pH continuo de 7.4.
4. Cumplida la semana se sacó la muestra de la primera semana de biodegradación, se dejó enfriar el fluido y se retiró del recipiente, se les agregó 20 ml de agua desionizada a los andamios y se dejó reposar durante 1 hora, esto para enjuagarlos del fluido.
5. Después se les retiró el agua y se llevó al horno a 36 ± 0.5 °C para su secado, se pesaron los andamios día con día para ver la variación en el peso, se observó que después del 3 día el peso ya era constante así que ya se podían sacar del horno y tomar su peso final.
6. Se tomó el peso a los tres andamios antes y después de la prueba para después poder analizar su disminución y/o incremento de peso de acuerdo a la prueba realizada, en este caso pérdida de peso.

La pérdida de masa se obtuvo mediante la siguiente ecuación:

$$\text{Masa perdida (\%)} = \frac{W_1 - W_2}{W_1} \times 100 \quad (3.1)$$

Donde W_1 es el peso del material seco antes de ser sumergido y W_2 es el peso del material después de la inmersión en PBS.

Este proceso se siguió realizando, midiendo el pH del fluido diariamente y cambiando si era necesario, así como sacando muestras cada semana hasta que se completó la octava semana de biodegradación.

3.6.2 Prueba de Bioactividad (Tadashi Kokubo, 2006)

Se escogieron un total de 24 andamios, 12 andamios con composición HA (10%), PCL (40%) Bv (50%) y otros 12 con la composición HA (50%), PCL (40%), Bv (10%).

Se tomó nota del peso de 3 andamios por recipiente de polietileno, un total de 8 recipientes y se etiquetaron desde la semana 1 hasta la semana 4 con la primera composición y lo mismo con la segunda.

- 1.- Se calentó el fluido (SBF) a 36°C en un vaso de precipitado con agitación.

2.- Se colocaron los tres andamios en un recipiente de polietileno y se agregó aproximadamente 20 ml del fluido caliente, se cerraron y se metieron al horno a una temperatura de 36 ± 0.5 °C.

3.- Cada día de la semana se midió el pH del fluido, si este aumentaba o disminuía más de 7.4 el fluido era nuevamente cambiado siguiendo el proceso anterior, esto para mantener un pH continuo de 7.4.

4.- Cumplida la semana se sacó la muestra de la primera semana de bioactividad, se dejó enfriar el fluido y se sacó, se les agregó 20 ml de agua desionizada a los andamios y se dejó reposar durante 1 hora, esto para enjuagarlos del fluido.

5.- Después se les retiró el agua se volvió a cerrar el frasco y se llevó al horno a 36 ± 0.5 °C para su secado, se pesaron los andamios día con día para ver la variación en el peso, se observó que después del 3 día el peso ya era constante así que ya se podían sacar del horno y tomar su peso final.

6.- Se le tomó el peso a los tres andamios para después poder analizar su disminución y/o incremento de peso de acuerdo a la prueba realizada, en este caso incremento de peso.

El aumento de masa se determinó mediante la siguiente ecuación:

$$\text{Incremento de peso (\%)} = \left(\frac{W_2 - W_1}{W_1} \right) \times 100 \quad (3.2)$$

Este proceso se siguió realizando, midiendo el pH del fluido diariamente y cambiando si era necesario, así como sacando muestras cada semana hasta que se completó la cuarta semana de bioactividad.

3.7 Preparación de las muestras para su Caracterización

Para la realización de las técnicas de caracterización se hizo una preparación previa de los andamios, estos fueron seccionados y separados por composición y tiempo de experimentación (figura 13).



Figura 13. Muestras para análisis SEM.

3.8 Técnicas de Caracterización

Se realizaron las siguientes técnicas de caracterización que fueron utilizadas para analizar las muestras (andamios) después de las pruebas de bioactividad y biodegradación.

3.8.1 Microscopía Electrónica de Barrido (MEB)

El microscopio electrónico de barrido llamado por sus siglas en inglés (SEM, Scanning Electron Microscopy) utiliza electrones en lugar de luz para formar una imagen.

La interacción de un haz de electrones barre un área determinada de la superficie de la muestra y genera una imagen.

El microscopio utilizado para este proyecto fue un Microscopio Electrónico de Barrido JEOL JSM-6400 (figura 14). Este equipo se encuentra equipado con:

- Electrones secundarios, resolución 2.5 nm
- Electrones retrodispersados, resolución 7.5 nm
- Espectroscopía EDS (Bruker)
- Espectroscopía WDS



Figura 14. Microscopio Electrónico de Barrido JSM-6400

PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS

Las muestras que se analizaron en el microscopio electrónico de barrido deben estar secas y ser conductoras para que el haz de electrones que incide la muestra pueda ser dispersado y dar

información sobre la misma. Se escogieron las muestras que iban a ser estudiadas y fueron seccionadas en trozos similares a una pastilla visto ya en la (figura 13).

Después, las muestras se recubrieron (su parte circular inferior) con un adhesivo de carbón para poder sujetarlas (figura 15).



Figura 15. Recubrimiento de muestras con carbón

Continuando con la preparación se metieron las muestras a un desgasificador de placas Edwards PD3 adecuado para desgasificar películas y placas fotográficas, antes de su uso en el microscopio electrónico. Esto ofrece la ventaja de tiempos reducidos de bombeo y tener menos contaminación en la columna del microscopio (figura 16).



Figura 16. PD3 Desgasificador de placas

Para hacer las muestras conductoras se colocaron en una metalizadora durante 20 minutos para ser recubiertas con cobre, para ello se utilizó el quipo S150A Sputter Coater (figura 17).



Figura 17. S150A Sputter coater

3.8.2 Espectroscopía de Energía Dispersiva (EDS)

La Espectroscopía de Energía Dispersiva (EDS) es una técnica de microanálisis químico utilizada en conjunto con la Microscopía Electrónica de Barrido.

Se basa en detectar rayos X emitidos por la muestra durante el bombardeo a la misma por el haz de electrones; caracterizando de esta manera la composición de los elementos de la muestra. (ThermoFisher, s.f.)

Este análisis se llevó a cabo en las muestras para obtener información cuantitativa y cualitativa sobre la composición de la superficie de los andamios, que elementos contenía.

3.8.3 Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR)

Es una técnica que proporciona un espectro de flexión de las bandas de los grupos funcionales de las sustancias orgánicas e inorgánicas, por lo cual es posible realizar la identificación de los materiales. (Física UNAM, s.f.)

CAPÍTULO IV

4. RESULTADOS Y DISCUSION

Como se mencionó en el capítulo anterior, las muestras fueron sometidas durante dos meses a un proceso de biodegradación y durante un mes a un proceso de bioactividad en los cuales cada semana se obtuvo una muestra de biodegradación y de bioactividad para posteriormente analizarla por SEM.

4.1 FTIR Biovidrio

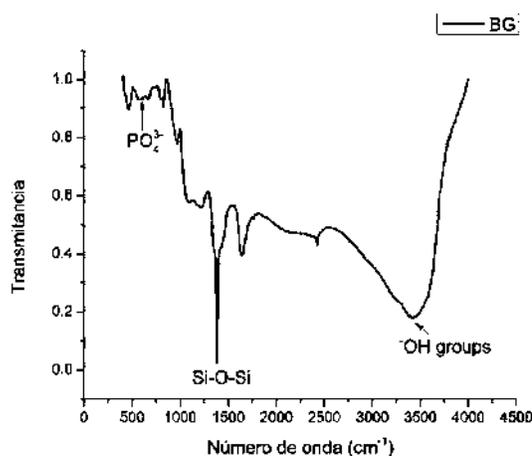


Figura 18. Espectrometría infrarroja del Biovidrio

La figura 18 muestra el espectro infrarrojo del biovidrio, en el mismo se pueden observar las bandas fundamentales correspondientes a las vibraciones de los principales grupos funcionales que conforman del biovidrio.

Presentan las bandas correspondientes en un número de onda de entre 550 y 600 cm^{-1} aproximadamente, la vibración asimétrica $\nu_4^{\text{as}}(\text{PO}_4^{3-})$ (Guadarrama Bello, 2011). La banda correspondiente al Si-O-Si se encuentra en 1300 cm^{-1} ; el grupo OH presenta su banda correspondiente en un número de onda aproximado de 3500 cm^{-1} ; En el espectro de infrarrojo la característica más sobresaliente es una banda intensa y ancha en la región de 3200-3600 cm^{-1} , que se debe al alargamiento O-H (Alonso, s.f.).

4.2 FTIR Hidroxiapatita

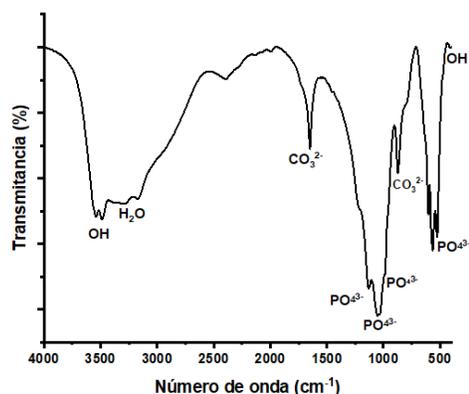


Figura 19. Espectrometría infrarroja de Hidroxiapatita

El espectro infrarrojo fue corrido desde 4000-500 cm^{-1} (Figura19). El espectro presenta las bandas características para una hidroxiapatita típica. A 3600 cm^{-1} , 3500 cm^{-1} , 490 cm^{-1} corresponde a las vibraciones del grupo OH, bandas de los grupos PO_4^{3-} las encontramos alrededor de los 1090 cm^{-1} y 990 cm^{-1} así como también bandas a los 550 cm^{-1} , y debido a que la muestra contiene grupos CO_3^{2-} podemos encontrar bandas a los 1650 cm^{-1} y 870 cm^{-1} .

En la muestra se encuentra agua y carbonatos, la presencia de estos puede deberse a la absorción física de la atmósfera. (A. Echavarría, 1999)

4.3 Difracción de Rayos x Hidroxiapatita (DRX)

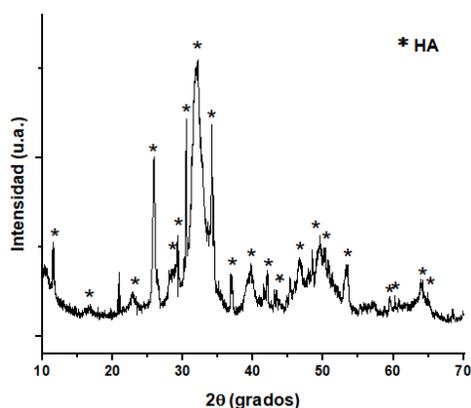


Figura 20. Difractograma de HA

En la figura 20 se puede observar el pico principal de la hidroxiapatita, con la mayor intensidad a $2^\circ=32.5$ acompañado por dos de menor intensidad $2^\circ=31$ y $2^\circ=34$. Algunos picos secundarios de la misma hidroxiapatita encontrados a $2^\circ=26$, $2^\circ=29$, $2^\circ=12$.

4.4 Microscopía Electrónica de Barrido, (MEB)

En el microscopio se analizaron varias de las muestras obtenidas, durante las 8 semanas para las muestras de biodegradación y 4 semanas para las muestras de bioactividad. De este análisis se puede concluir que en las muestras que se realizó el proceso de bioactividad la hidroxiapatita fue creciendo progresivamente con el tiempo, en las muestras de biodegradación también se pudo observar cómo se fueron formando pequeños orificios interconectados entre ellos con el paso de las semanas. También se pueden observar orificios en forma de cristales rectangulares de NaCl.

4.4.1 Muestras de biodegradación (50-40-10)

En la figura 21 se muestra la pérdida de masa a través de los días al mantenerse las muestras en el fluido PBS desde 1 hasta 8 semanas.

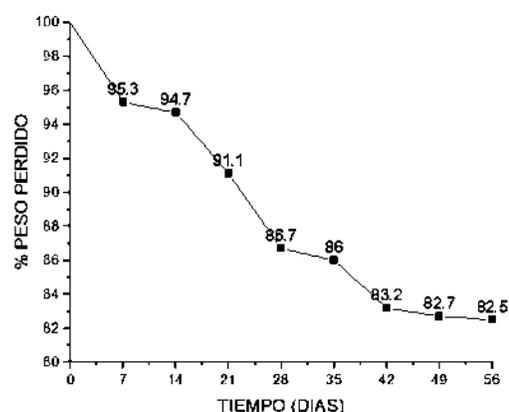


Figura 21. Gráfica de la pérdida de peso de las muestras de biodegradación composición HA (50%), PCL (40%), Bv (10%).

En el proceso de degradación de la muestra a 28 días de análisis, se presentó una pérdida de peso de un 13.3%, observándose que la pérdida de peso fue constante a través de los días. Las micrografías nos muestran una interconexión de orificios en los que se puede corroborar que hubo una pérdida o desintegración de masa, ello se puede deber a diferentes factores, uno, el aumento del pH lo que provoca una disolución del biovidrio, pero ésta a su vez causa la formación de la hidroxiapatita, también se puede observar una superficie rugosa esto debido a la degradación del biomaterial (figura 22).

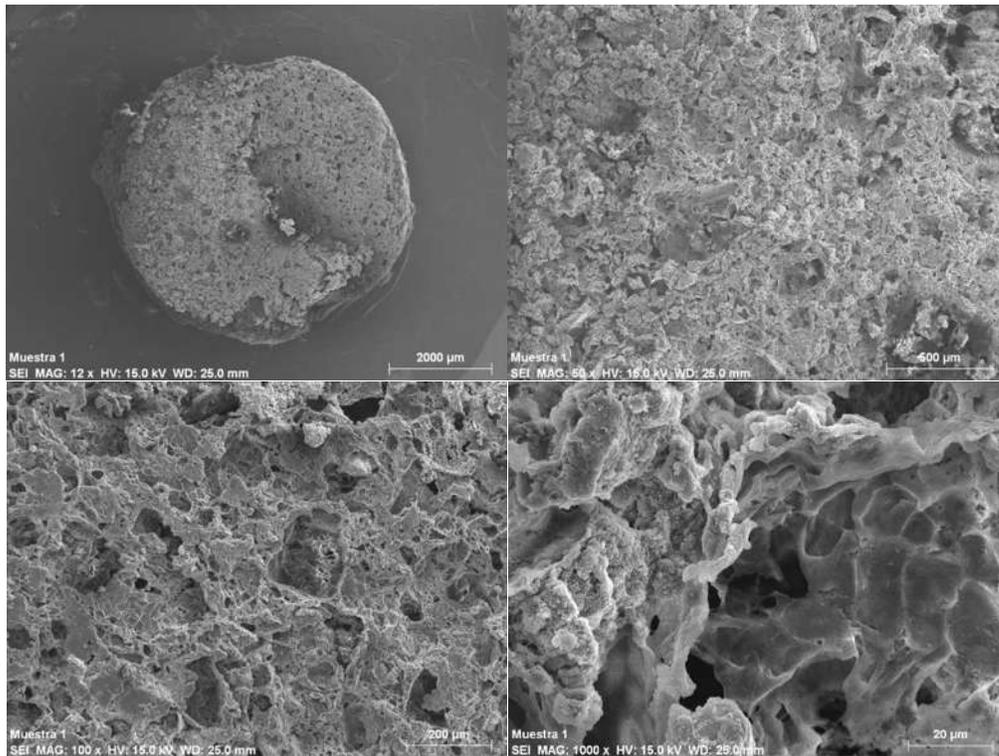


Figura 22. Micrografía SEM. Muestra # 1 biodegradación, composición HA (50%), PCL (40%), Bv (10%).

Durante el proceso de degradación ocurre el rompimiento de los enlaces éster del polímero, en este caso la policaprolactona PCL. Después ocurre la disolución de algunos segmentos de las redes y por lo tanto habrá un aumento del volumen libre de las mezclas, lo que conduce generando una mayor área en la superficie para el acceso del fluido, lo que acelera la degradación. (Valero, 2012)

La siguiente muestra marcada con el No. 2 de la misma composición se mantuvo durante 56 días en el fluido de biodegradación, ésta presentó una pérdida de peso de 17.5%. En las micrografías se pueden observar los orificios que nos indican su degradación, ya que el tiempo en el que estuvo la muestra en el fluido fue mayor el aumento en la rugosidad es visiblemente notable (figura 23).

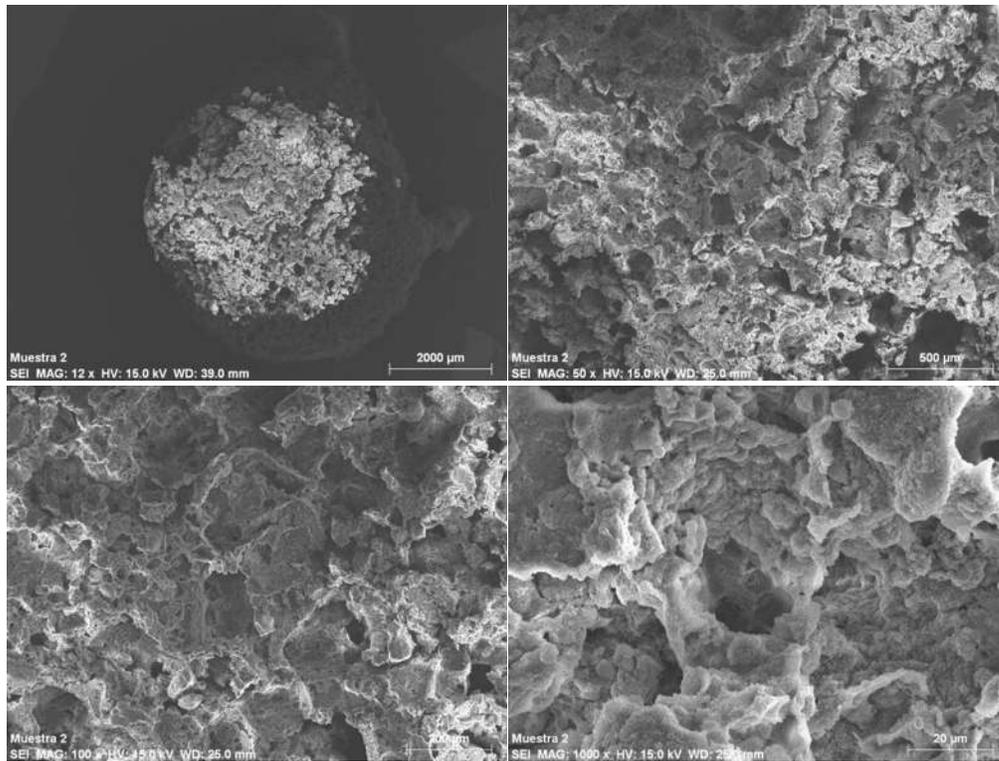


Figura 23. Micrografía SEM muestra 2 biodegradación composición HA (50%), PCL (40%), Bv (10%).

4.4.2 Muestras de bioactividad (50-40-10)

En la figura 24 se muestra la micrografía de la muestra No. 3 (semana 1) de la prueba de bioactividad de la composición HA (50%), PCL (40%), Bv (10%).

El proceso de bioactividad de esta muestra fue de 7 días en fluido SBF en la que no presentó un aumento de peso si no un decremento del -1.9%, se piensa que la pérdida de peso es debido al biovidrio que fue un 10% del total de la mezcla, esta fue mínima a diferencia de la otra composición que se presenta más adelante. Esto se puede deber al biovidrio utilizado ya mencionado antes, ya que se produce una reacción entre los iones del óxido de silicio del biovidrio y los grupos carbonilo presentes en la estructura del polímero PCL, que provoca la degradación del material. (A.Larrañaga, 2013)

Independiente mente de la pérdida de peso que se tuvo, se pueden observar zonas en las que comienza a verse un pequeño crecimiento de la hidroxiapatita. En la imagen se pueden observar conjuntos de partículas granulométricas. Las partículas presentan una superficie rugosa, característica importante para aumentar una adhesión celular (Nathalia Marín Pareja, 2008). También se pueden observar poros de forma irregular y regiones cavernosas de hasta 60μ y los más grandes de 200μ, se ha visto que cuando los fosfatos de calcio son porosos dan una química de superficie que conduce a la formación del hueso. (M. López, 2003). Algunos autores han reportado que los poros deben tener mínimo 50μm de tamaño (L. Sun, 2001) para permitir la

penetración de tejido fibrovascular, además para que la penetración de tejido óseo sea posible y los poros deben estar interconectados.

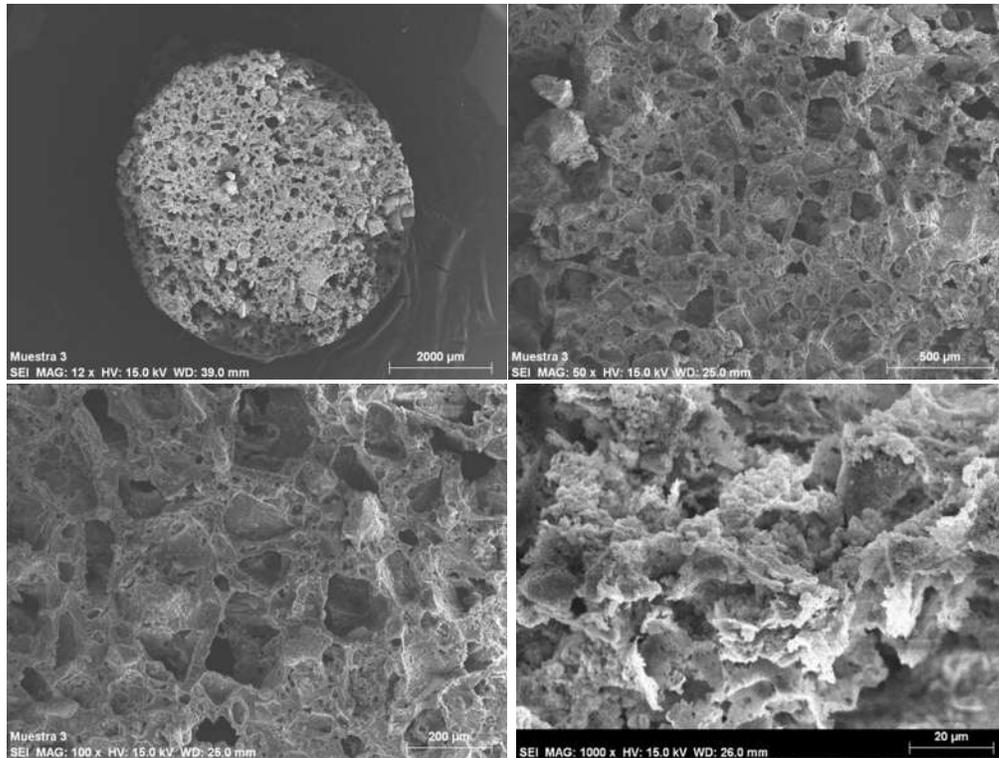


Figura 24. Micrografía SEM muestra 3 bioactividad composición HA (50%), PCL (40%), Bv (10%).

En la figura 25 podemos observar la gráfica de peso de bioactividad, esta nos muestra que en la primera semana que fue la muestra No. 3 hubo una pérdida de peso del -1.9%, en la muestra obtenida a en la segunda semana también se pudo calcular una pérdida de peso del -3.4%, para la tercera semana comenzó a incrementar el peso con un 0.7% respecto a la segunda semana, pero la muestra No.4 de la última semana de bioactividad ya se obtuvo un pequeño incremento de peso del 1.4%.

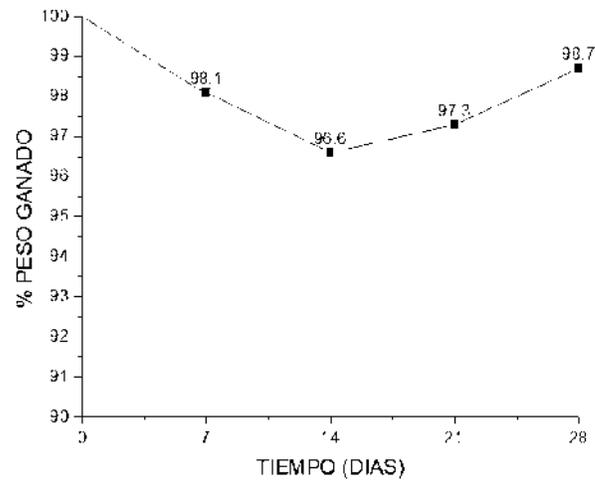


Figura 25. Gráfica del incremento de peso de las muestras de bioactividad composición HA (50%), PCL (40%), Bv (10%).

En la micrografía de la figura 26 del día 28 de la prueba de bioactividad podemos observar que a pesar de la pérdida de peso que se tuvo, el crecimiento de la hidroxiapatita continuó notablemente por la superficie de la muestra.

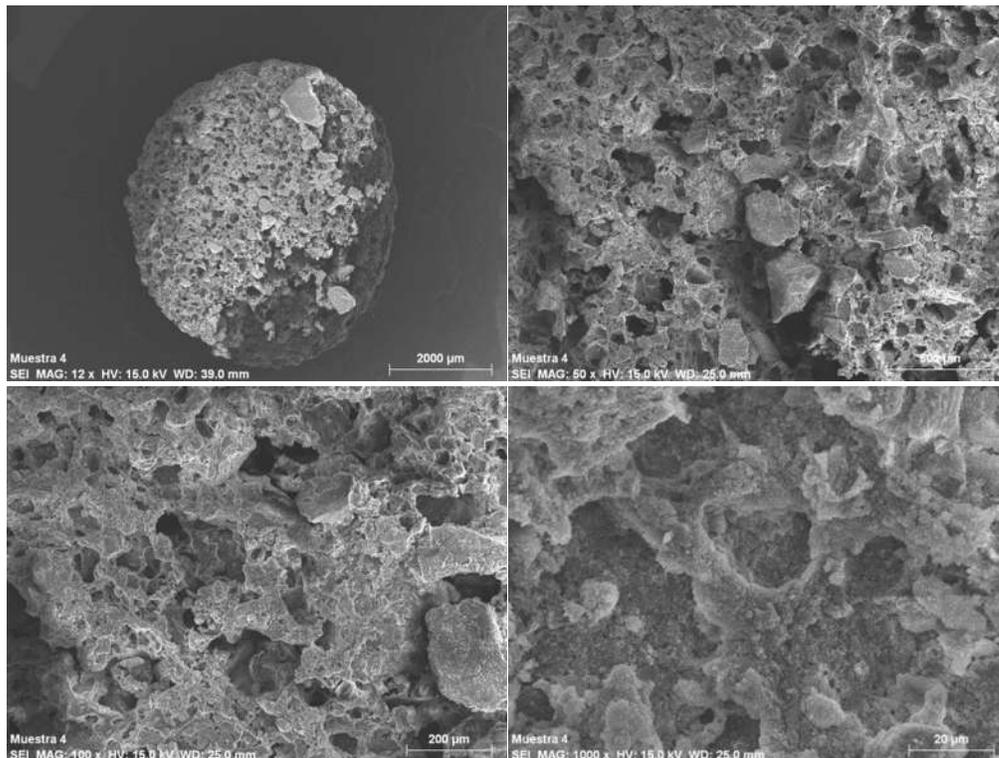


Figura 26. Micrografía SEM muestra 4 bioactividad de la composición HA (50%), PCL (40%), Bv (10%).

4.4.3 Muestras de biodegradación (10-40-50)

Continuando con la siguiente composición HA (10%), PCL (40%), Bv (50%) se intercambiaron los valores de la hidroxiapatita y el biovidrio, las micrografías obtenidas fueron las siguientes:

La muestra No. 5 de la (semana 4) de biodegradación de la composición antes mencionada, su proceso de degradación fue de 28 días (figura 27).

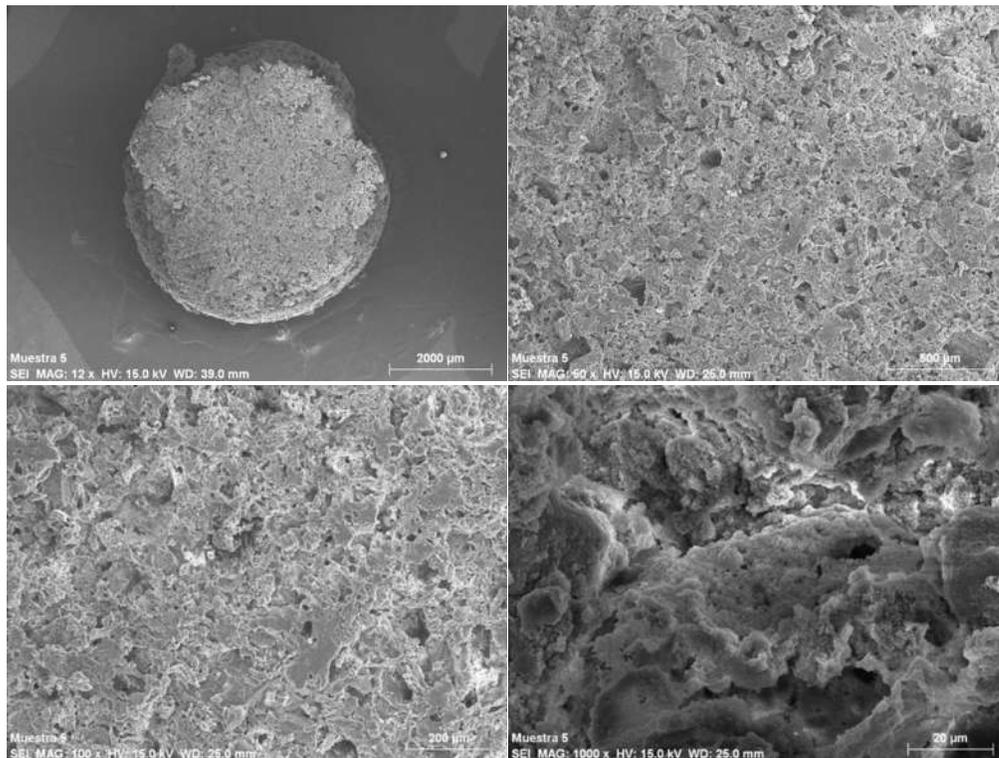


Figura 27. Micrografía SEM muestra 4 biodegradación composición HA (10%), PCL (40%), Bv (50%).

En esta composición pudimos observar que los andamios realizados eran mucho más frágiles en comparación con la otra, se piensa que es debido al aumento considerable en el porcentaje de biovidrio, y esto a su vez nos dio una pérdida de peso mayor (figura 28).

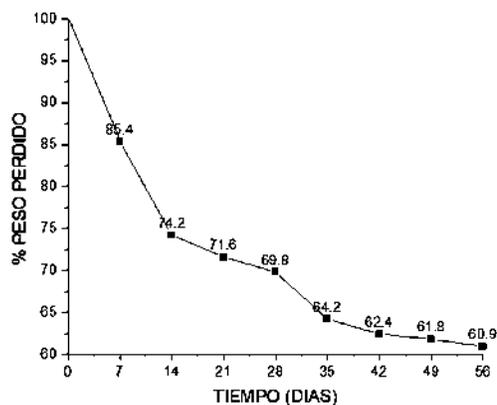


Figura 28. Gráfica de la pérdida de peso de las muestras de biodegradación composición HA (10%), PCL (40%), Bv (50%).

La muestra antes mencionada tuvo una pérdida de peso del -30.2% del peso inicial, la pérdida fue mayor a diferencia de la otra composición que fue de -13.3, esto se atribuye al cambio en el porcentaje de la composición.

Para la muestra No. 6 de la (semana 8) de biodegradación el proceso de degradación fue de 56 días (Figura 29).

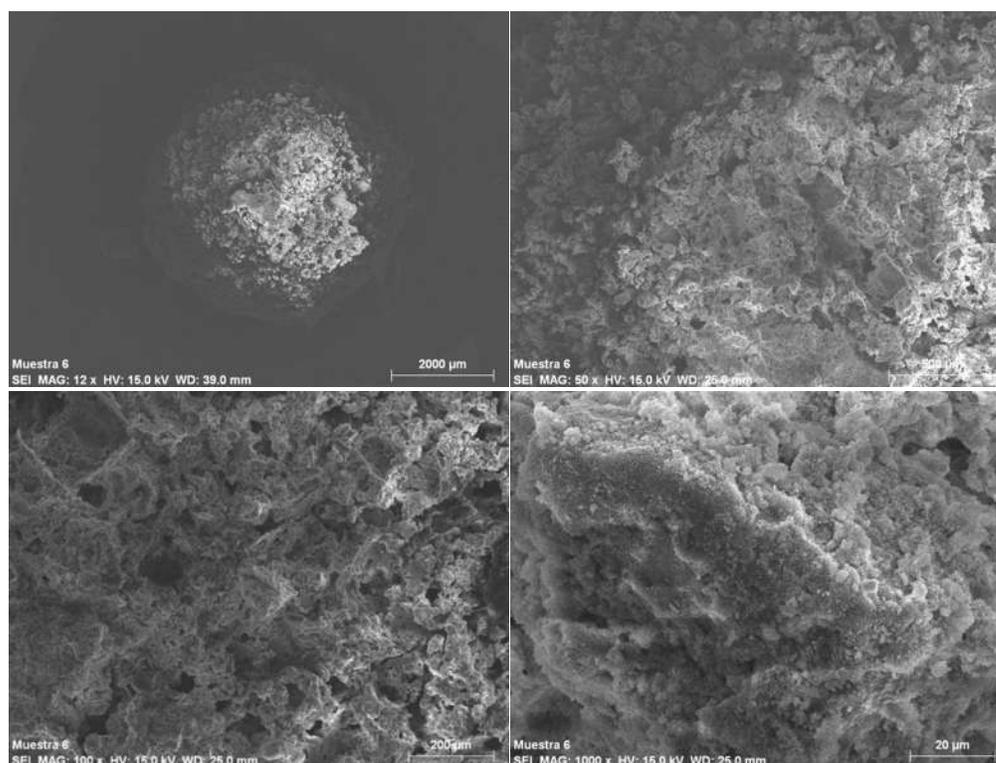


Figura 29. Micrografía SEM muestra 6 biodegradación composición HA (10%), PCL (40%), Bv (50%).

Podemos observar en la micrografía diversos orificios que van desde 10 μ m hasta 100 μ m de tamaño haciendo referencia a la biodegradación que se tuvo.

4.4.4 Muestras de bioactividad (10-40-50)

En la figura 30 se presenta la muestra No. 7 de la semana 1 inciso a) y b) y la muestra No. 8 de la semana 4 inciso c) y d). Podemos analizar que en la micrografía a) y b) de una semana de bioactividad comienza a tenerse un pequeño crecimiento de hidroxiapatita en la superficie del andamio y en comparación con la muestra del inciso c) y d) se puede observar el cambio debido al crecimiento de las partículas de hidroxiapatita, ésta presenta una superficie rugosa siendo una característica importante para aumentar la adhesión celular. (Nathalia Marín Pareja, 2008)

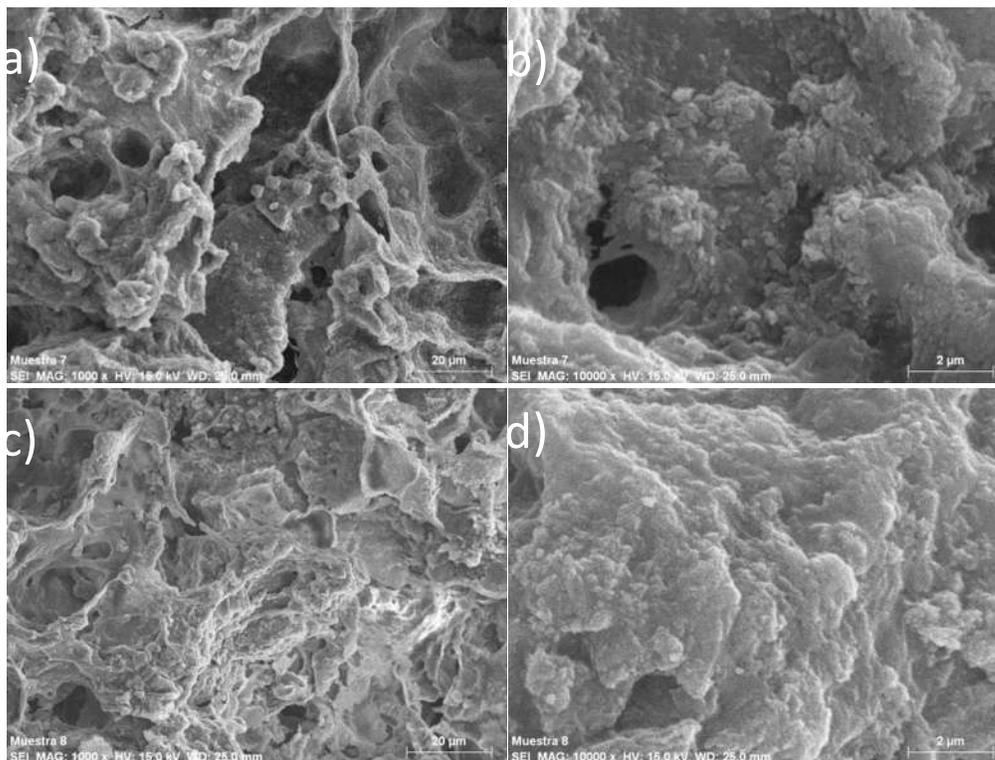


Figura 30. Micrografía SEM bioactividad de la composición HA (10%), PCL (40%), Bv (50%).

En la figura 31 se muestra cómo se tuvo una pérdida de peso en la primera semana de -15.5%, la segunda semana también tuvo una pérdida de peso, pero está no creció considerablemente quedando en -16.8%, para la cuarta semana ya se tuvo un incremento de peso del 1.7% en comparación con la semana anterior, finalizando con la semana 4 en la que se tuvo también un incremento de peso del 1% respecto a la semana 3.

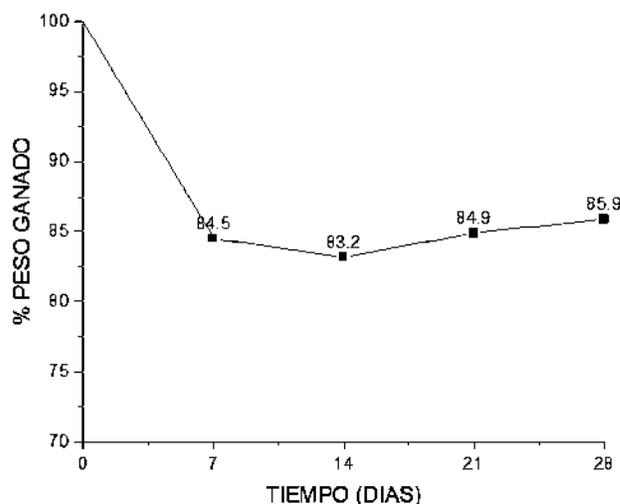


Figura 31. Gráfica del incremento de peso de las muestras de bioactividad composición HA (10%), PCL (40%), Bv (50%).

4.5 Espectroscopia de energía dispersiva (EDS)

Los resultados de espectroscopia de energía dispersiva (EDS) realizados sobre las diferentes muestras revelan la presencia de Ca, P, O, principales componentes de la HA. (Figura 32-33) La presencia de cobre (Cu) en la muestra es debido a la capa conductora que se aplicó previamente a la muestra para su análisis. También se encuentran los componentes del biovidrio que son Si, Ca, P, O. Y a su vez el Carbono (C), debido a que es un compuesto de polímero orgánico.

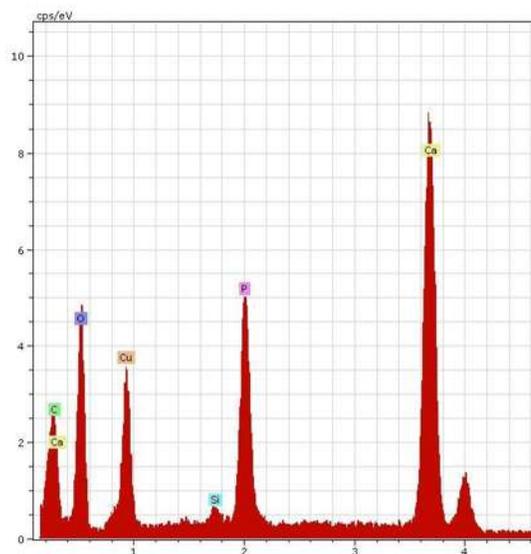


Figura 32. Espectroscopia de energía dispersiva (EDS) muestra 3, semana 1 bioactividad composición HA (50%), PCL (40%), Bv (10%).

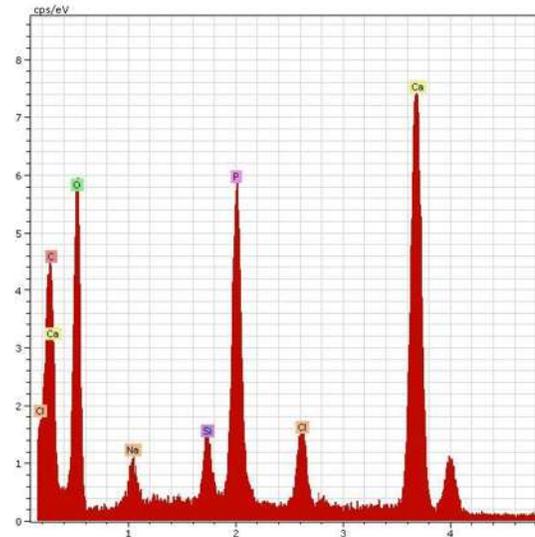


Figura 33. Espectroscopía de energía dispersiva (EDS) muestra 8, semana 3 bioactividad composición HA (10%), PCL (40%), Bv (50%).

La presencia de cloro en la espectroscopía de la figura 29 se debe a residuos de cloruro de sodio incorporado para crear la porosidad y que no se disolvieron al lavar la muestra.

CONCLUSIÓN

La hidroxiapatita y el biovidrio fueron exitosamente sintetizados mediante la técnica de precipitación y sol-gel, respectivamente. Los andamios fabricados tuvieron buenas características de porosidad, bioactividad y biodegradación adecuadas para la regeneración de tejidos óseos.

Se observó que los andamios realizados y estudiados cumplen su función de formar la hidroxiapatita y a su vez degradarse con el tiempo, resultando que las dos composiciones presentan buenos resultados. Sin embargo, la composición que contenía un mayor porcentaje en peso de hidroxiapatita y menor de biovidrio HA (50%), PCL (40%), Bv (10%), tuvo menor disolución en los fluidos, siendo así su degradación más lenta, dándole tiempo a la hidroxiapatita para poder crecer en el andamio. ya que hubo menos disolución en los andamios, siendo así su degradación más lenta dándole tiempo a la hidroxiapatita para poder crecer en andamio. Referente a la policaprolactona se observaron mejores propiedades mecánicas al tacto arriba del 40% en peso.

Referencias

- A. Echavarría, C. R. (1999). Hidroxiapatita sintética de porosidad inducida: Comparación con el hueso calcinado". . *Rev. Fac. Ing. Univ. Antioquía*, 56-64.
- A.Larrañaga, J. R. (2013). "Effect of bioactive glass particles on the thermal degradation behaviour of medical polyesters".
- al, J. C. (2007). *Biomateriales; Fundamentos, Técnicas y Aplicaciones*. Universidad de Guadalajara.
- Alonso, D. C. (s.f.). *Química Organica, FQ, UNAM*. Obtenido de <http://organica1.org/qo1/ok/alcohol2/alcohol2.htm>
- Ana Beatriz Martínez Valencia, L. E. (2019). FABRICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE COMPUESTOS DE POLICAPROLACTONA-BIOVIDRIO. *Ava Cient* , 147-153.
- Barba, M. C. (s.f.). Los biomateriales y sus aplicaciones. *Instituto de Investigaciones en Materiales de la Universidad Nacional Autónoma de México*, 1-4.
- Bernabéu Martínez, E. (2006). *Estudio de la composición ósea para su apropiada regeneración con materiales implantados*. Madrid : Patología del Aparato Locomotor.
- Biblioteca digital*. (s.f.). Obtenido de http://bibliotecadigital.ilce.edu.mx/sites/ciencia/volumen1/ciencia2/37/htm/sec_14.htm
- Chávez, S. J. (2012). *SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE FOSFATOS DE CALCIO POR EL MÉTODO SOL-GEL*. SAN LORENZO – PARAGUAY.
- Davies, J. E. (2003). Understanding Peri-Implant Endosseous Healing. *Journal of Dental Education*, 67.
- Donald, I. W., & Mallison, P. (s.f.).
- Donald, I. W., Mallison, P. M., Metcalfe, B. L., Gerrad, L. A., & Fernie, J. A. (2011). Recent developments in the preparation, caracterización and applications of glass- and glass-ceramic-to-metal seals and coating. *Rev. Mater Sci* , 46.
- Elena, P. E., José, O. E., Anunciada, P. E., Susel, O. B., Graciela, P. E., & Jesica, O. E. (2016). Bioactividad en odontología restauradora. *UNCuyo*, Vol. 10 Nº 2.
- Elena, V. S. (2013). *Tribology - Fundamentals and Advancements*. Croacia: InTech.
- Enrique Gallegos Nieto, H. I. (2013). Análisis del desempeño estructural de andamios de hidroxiapatita utilizados en ingeniería tisular. *Ingeniería Mecánica, tecnología y desarrollo*, 185-194.

- Evelina Andreea Piciorang, A. J. (2019). NUEVAS ESTRATEGIAS BASADAS EN BIOMATERIALES PARA EL TRATAMIENTO DE LA OSTEOPOROSIS Y LA PSEUDOARTROSIS. *UNIVERSIDAD COMPLUTENSE*, 1-20.
- F1635-16, A. (2016). método de prueba estándar para in vitro Pruebas de degradación de resinas poliméricas hidrolíticamente degradables y formas fabricadas para implantes quirúrgicos. *ASTM International*. Obtenido de PBS (solución salina tamponada con fosfato): <https://www.aatbio.com/resources/buffer-preparations-and-recipes/pbs-phosphate-buffered-saline>
- Física UNAM*. (s.f.). Obtenido de Estudio de la Máscara de Malinaltepec con el Espectrómetro FTIR de fibra óptica: https://www.fisica.unam.mx/andreaah/tecnicas_equipos/ftir.html
- García-Garduño, M. V., & Reyes-Gasga, J. (2006). La hidroxiapatita, su importancia en los tejidos mineralizados y su aplicación. *Tip Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*, 90-95.
- GONZALEZ, J. A. (JUNIO 2012). *SÍNTESIS DE BIOVIDRIOS POR LA TÉCNICA SOL-GEL CON INCORPORACIÓN DE METALES Y ESTUDIO DE SUS PROPIEDADES ANTIBACTERIALES*. SANTIAGO DE CHILE : FACULTAD DE CIENCIAS FÍSICAS Y MATEMÁTICAS.
- Guadarrama Bello, D. &. (2011). Determinación de propiedades mecánicas y temperatura máxima de polimerización de cementos óseos acrílicos modificados con micro y nanopartículas de hidroxiapatita. *Revista Latinoamericana de Metalurgia y Materiales.*, 31. 91-98.
- Hench, L. L. (1980). *Biomaterials*. *science*, 208, (4446):826-31.
- Isabel Fernández-Tresguerres, H.-G. M. (2006). Bases fisiológicas de la regeneración ósea I. Histología y fisiología del tejido óseo. *Medicina Oral S. L.*, 47-51.
- Jose Luis San Román García, B. P. (s.f.). *Biomateriales. Aplicación a cirugía ortopedica y traumatológica. Universidad Carlos III Madrid*, págs. 4-184.
- Kokubo, T. (2006). How useful is SBF in predicting in vivo bone bioactivity? *Biomaterials*, 2907-2915.
- L. Sun, B. K. (2001). "Materials Fundamentals and clinical performance of plasma-sprayed hydroxyapatite coatings: a review". *Journal of Biomedical Materials Research: Application Biomaterials.*, 570-592.
- Losada, D. F. (2011). *INGENIERIA E INVESTIGACION*. Colombia, Bogotá: A model research university.
- M. López, A. E. (2003). Síntesis, caracterización y comparación con el hueso esponjoso y calcinado de bovino. *Rev. Fac. Ing. Univ. Antioquia.*, 109-124.
- M. Vallet-Regí, D. A. (2008). *Biomimetic nanoceramics in clinical use*. Cambridge. U.K.: RSC Nanoscience & Nanotechnology.

- Madrid, U. C. (s.f.). *Biomateriales. Aplicación a cirugía ortopédica y traumatológica*. Madrid Espa.
- Manuel Megías, P. M. (2017). *Conectivo óseo*. España.
- Mattox, k. (1992). *Biomaterials-Hard Tissue Repair and Replacement, Vol. 3 (Muster D., Editor)*. Amsterdam: Elsevier.
- Mehrotra, R. (1988). "Synthesis and Reactions of Metal Alkoxides". *Journal of Non Vol. 100*, 1-15.
- Miguel Ipohorski, P. B. (2013). Microscopía Electrónica de Barrido en la Caracterización de Materiales . *cei*, 3-63.
- Montoliu, F. C. (1993). Clasificación de los Materiales. *BIOMATERIALES I*, 139-151.
- Nathalia Marín Pareja, D. M. (2008). Synthesis and characterization of microporous hydroxyapatite, comparison with a commercial product. *Rev. Fac. Ing. Univ. Antioquia*, 67-76.
- Ng, B. (s.f.).
- Ng, B., & Annergren, I. (s.f.).
- Ng, B., Annergen, I., Soutar, A. M., Khor, K. A., & Jarfors, A. E. (2005). Characterization of a duplex TiO₂/CaP coating on Ti6Al4V for hard tissue replacement. . *Biomaterials*, 26, (10): 1087-1095.
- Olivo EA, G. S. (2015). Biocompatibilidad del fosfato tricálcico con quitosano para su uso en regeneración ósea. *Ciencias Básicas, Biotecnología y Bioinformática*, 34-73.
- Osorio, C. y. (2018). Obtención de sílice amorfa empleando el método sol-gel. *Paradigmas*, Vol. 2 Num. 1.
- Osorio-Delgado, M. A. (2017). Aplicaciones biomédicas de biomateriales poliméricos. *Dyna*, 201-241.
- P., C. P. (2015). *Surface functionalization of titanium with antifouling and inhibition of bacterial adhesion treatment in the human body*. Universitat Politècnica de Catalunya: Bachelor thesis.
- Paez, J. (2001). Síntesis de polvos cerámicos por el método de precipitación. *Boletín de la Sociedad Española de Cerámica y Vidrio*, 173-184.
- Patricio, T. D. (2013). Characterisation of PCL and PCL/PLA scaffolds for tissue Engineering. *Procedia CIRP*, 110-114.
- Ramirez Zavaleta, R. (s.f.). Lectura, crítica y desarrollo. *Escuela profesional de ingeniería en materiales, Universidad Nacional de Trujillo*, 1-29.
- Rangel, E. R. (2010). Biomimética: de la naturaleza a la creación humana. *Ciencias 98*, 4-8.
- Ravaglioli, A. a. (1992). *Bioceramics; Materials Properties and Applications*. London: Chapman & Hall.

- Regí, M. V. (2004). BIOMATERIALES PARA SUSTITUCIÓN Y REPARACIÓN DE TEJIDOS. *Departamento de Química Inorgánica y Bioinorgánica*, 167-175.
- Regí, M. V. (2012). *Biomateriales para sustitución y reparación de tejidos*. 28040-MADRID: Departamento de Química Inorgánica y Bioinorgánica. Facultad de Farmacia. Universidad Complutense.
- Reikerås, O. G. (1992). Blood flow and mechanical properties of healing bone. *Acta Orthopaedica Scandinavica*, 487-491.
- Sáenz Ramírez, A. (2004). Biomateriales. *Tecnología en Marcha*, Vol. 17.
- Sáenz Ramírez, A. (s.f.). Biomateriales. *Tecnología en Marcha*, Vol. 17 N° 1.
- Tadashi Kokubo, H. T. (2006). How useful is SBF in predicting in vivo bone bioactivity? *Biomaterials*, 2907-2915.
- ThermoFisher*. (s.f.). Obtenido de <https://www.thermofisher.com/mx/es/home/materials-science/eds-technology.html>
- Valero, M. (2012). In-Vitro degradation of Thermoplastic Polyurethane and Starch Modified. . *Polimeros*, 373-382.
- Vallet-Regí, M. (2011). Biocerámicas: evolución y aplicaciones. *Investigación Química*, 28-35.
- Vázquez, J. L. (2014). EVIDENCIA DE APRENDIZAJE HISTOLOGIA Y ESTRUCTURADEL ORGANISMO. *NUTRICION APLICADA*, 1-17 .
- Vert, M. L. (1992). Mater Sci: Mater Med . *Springer*, 432–446.
- Yang, S. L.-F. (2001). Review the design of scaffolds for use in tissue engineering. *Ingeniería de Tejidos* , 679-689.
- Yoshimoto, M. (2000). Estudo da biocompatibilidade de diferentes revestimentos de implantes de titânio empregando microscopia de luz em coelho. . *Trabajo de grado de maestría*.