



**DESARROLLO DE VIDRIO
BIOACTIVO A PARTIR DE
DIFERENTES FUENTES DE SILICIO
PARA USO COMO REFUERZO DE
SCAFFOLDS DE QUITOSANO EN
INGENIERÍA DE TEJIDOS.**

PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

LINDSEY ALEJANDRA QUINTERO SIERRA

Medellín, 2017



UNIVERSIDAD DE ANTIOQUIA - FACULTAD DE INGENIERÍA - PROGRAMA DE POSGRADOS

DESARROLLO DE VIDRIO BIOACTIVO A PARTIR DE DIFERENTES FUENTES DE SILICIO PARA USO COMO REFUERZO DE SCAFFOLDS DE QUITOSANO EN INGENIERÍA DE TEJIDOS.

TRABAJO REALIZADO POR:

LINDSEY ALEJANDRA QUINTERO SIERRA

Bioingeniera

Grupo de Investigación en Biomateriales BIOMAT

Trabajo realizado para optar al título de Magister en Ingeniería de Materiales

ASESORA:

DIANA MARCELA ESCOBAR SIERRA

Ing. Met. Ph.D en Ciencias Químicas

Directora Grupo de Investigación en Biomateriales BIOMAT

UNIVERSIDAD DDE ANTIOQUIA

FACULTAD DE INGENIERÍA

PROGRAMA DE POSGRADOS

Medellín, 2017



**Dedico este trabajo a Erwin y a mi familia, quienes con su apoyo incondicional supieron mostrarme que no es tiempo de desfallecer, que para alcanzar los sueños hay que seguir adelante aunque el viento sople en dirección contraria.
Gracias por ser mi luz cuando creí que todo era oscuridad.**

*“Hay que tener sueños lo suficientemente grandes para no perderlos de vista
mientras se persiguen”*

William Faulkner



AGRADECIMIENTOS

Quisiera agradecer inicialmente a mi familia por su gran apoyo, paciencia y acompañamiento durante todo este proceso formativo.

A la profesora Diana Marcela Escobar por su apoyo durante el desarrollo de este proyecto.

A la profesora Claudia Patricia Ossa por su ayuda para lograr cumplir los objetivos.

A mis compañeros de grupo por estar allí cuando tenía dudas o cuando necesitaba momentos de ocio; especialmente a Liliana Arroyave, Mateo Escobar y Giovanni Cuervo porque me apoyaron en los momentos que creí que no podría culminar mi proyecto.

A Jazmín Gonzáles por siempre saber qué decir para levantarme el ánimo y mostrarme que el único camino que podía seguir era hacia adelante.

A Jerónimo Osorio por toda su ayuda con los análisis antimicrobianos que lo hicieron trabajar por horas los fines de semana y a Jonathan Gómez por ayudarme con los ensayos mecánicos.

A mis nuevos amigos por extensión, Robinson Aguirre por sus consejos durante la fase de evaluación. Manuel Zapata por su ayuda con los ensayos. Ellos, junto a Natalia Paniagua, por ser personas tan amables que estuvieron ahí para sacarme risas.

Finalmente pero no menos importante, le agradezco a Erwin Ciro por ser la luz que me guio durante todo este proceso, por sus asesorías y consejos.



TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN	xiii
CAPÍTULO I	15
PRÓLOGO.....	15
1. INTRODUCCIÓN.....	16
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	17
3. JUSTIFICACIÓN	18
4. OBJETIVOS.....	19
4.1. General.....	19
4.2. Específicos.....	19
4.3. Alcance del proyecto	19
5. ANTECEDENTES	20
6. OBSERVACIONES FINALES.....	23
7. REFERENCIAS	24
CAPÍTULO II	28
PRÓLOGO.....	28
1. HUESO.....	29
1.1. Generalidades del sistema óseo.....	29
1.2. Traumatología del hueso	38
2. INGENIERÍA DE TEJIDOS	39
2.1. Plataformas de crecimiento celular	40
2.2. Biomateriales usados en la fabricación de scaffolds	42
2.2.1. Vidrio bioactivo	43
2.2.2. Quitosano.....	47
2.3. Técnicas de caracterización	48
3. REFERENCIAS	50
CAPÍTULO III	56
PRÓLOGO.....	56
1 MATERIALES Y PROCESAMIENTO	57



1.1	Extracción de sílice a partir de fuentes naturales	57
1.2	Síntesis vidrio bioactivo	59
1.3	Fabricación de scaffolds de quitosano/vidrio bioactivo.....	60
2	CARACTERIZACIÓN DEL SILICIO EXTRAÍDO DE FUENTES NATURALES Y LOS POLVOS DE VIDRIO BIOACTIVO SINTETIZADOS	61
2.1	Caracterización química	61
2.1.1.	Difracción de Rayos X (DRX)	61
2.1.2.	Espectroscopía Infrarroja con Transformada de Fourier (FTIR)	62
2.1.3.	Espectroscopía Raman	62
2.2	Caracterización morfológica.....	62
2.2.1.	Microscopía Electrónica de Barrido (SEM).....	62
2.3	Caracterización física	62
2.3.1.	Método del picnómetro	62
2.4	Caracterización biológica.....	62
2.4.1.	Ensayo de bioactividad.....	63
3	CARACTERIZACIÓN DE LOS SCAFFOLDS PRODUCIDOS	63
3.1	Caracterización química	63
3.1.1.	Difracción de Rayos X (DRX)	63
3.1.2.	Espectroscopía Infrarroja con Transformada de Fourier (FTIR)	63
3.2	Caracterización morfológica.....	63
3.2.1.	Microscopía Electrónica de Barrido (SEM).....	64
3.3	Caracterización física	64
3.3.1.	Pruebas de compresión	64
3.3.2.	Porcentaje de porosidad.....	64
3.4	Pruebas de estabilidad.....	64
3.4.1.	Pruebas de degradación en SBF.....	65
3.4.2.	Termogravimetría	65
3.5	Caracterización biológica.....	65
3.5.1.	Ensayo de bioactividad.....	65
3.5.2.	Análisis antimicrobiano	65
4	DISEÑO ESTADÍSTICO	66



4.1	Diseño de mezclas.....	66
4.2	Diseño experimental factorial 2 ²	68
5	REFERENCIAS	69
CAPÍTULO IV.....		71
PRÓLOGO.....		71
1.	SÍLICE OBTENIDA DE FUENTES NATURALES	72
1.1.	Extracción de sílice desde raquis de palma	72
1.2.	Extracción de sílice desde cáscara de corozo.....	73
1.3.	Extracción de sílice desde cascarilla de arroz	75
2.	CARACTERIZACIÓN DE LOS POLVOS DE VIDRIO BIOACTIVO SINTETIZADOS	77
2.1.	Vidrio bioactivo sintetizado con TEOS.....	77
2.1.1.	Difracción de Rayos X (DRX)	78
2.1.2.	Caracterización posterior a los ensayos <i>in vitro</i>	79
2.1.3.	Espectroscopía Raman.....	84
2.1.4.	Microscopía Electrónica de Barrido (SEM).....	85
2.2.	Vidrio bioactivo sintetizado con sílice de fuente natural.....	86
2.2.1.	Difracción de Rayos X (DRX)	87
2.2.2.	Caracterización posterior a los ensayos <i>in vitro</i>	89
2.2.3.	Espectroscopía Raman.....	92
2.2.4.	Microscopía Electrónica de Barrido (SEM).....	93
3.	CARACTERIZACIÓN DE LOS SCAFFOLDS PREPARADOS CON LOS VIDRIOS BIOACTIVOS OBTENIDOS.....	94
3.1.	Caracterización Química.....	94
3.1.1.	Difracción por Rayos X (DRX).....	94
3.1.2.	Espectroscopía Infrarroja con Transformada de Fourier (FTIR-ATR).....	97
3.2.	Caracterización Morfológica	99
3.2.1.	Microscopía Electrónica de Barrido (SEM).....	99
3.3.	Caracterización Mecánica.....	103
3.3.1.	Compresión	103
3.3.2.	Porcentaje de porosidad en los scaffolds fabricados	106



3.4. Pruebas de estabilidad	107
3.4.1. Ensayo de degradación	107
3.4.2. Análisis Termogravimétrico (TGA)	108
3.5. Caracterización biológica	111
3.5.1. Ensayo de bioactividad	111
3.5.2. Análisis de efecto antimicrobiano en los scaffolds	116
4. REFERENCIAS	122
CAPÍTULO V	126
PRÓLOGO	126
1. CONCLUSIONES	127
2. PROSPECTIVAS FUTURAS	129



LISTA DE TABLAS

CAPÍTULO II

Tabla 1. Propiedades mecánicas del hueso cortical (5)	33
Tabla 2. Porcentaje de sílice en las cenizas de algunas fuentes naturales	46

CAPÍTULO III

Tabla 1. Restricciones definidas en el diseño de mezclas.	66
Tabla 2. Nomenclatura y fracción molecular de cada combinación empleada en el diseño de mezclas.	67
Tabla 3. Diseño factorial para la fabricación de los scaffolds	68

CAPÍTULO IV

Tabla 1. Valores promedio módulo de Young en los scaffolds fabricados	105
Tabla 2. Porcentaje de porosidad de los scaffolds fabricados	106
Tabla 3. Promedios de porcentajes de degradación en cada scaffold fabricado a diferentes días de exposición en SBF	107
Tabla 4. Valores promedio del pH en la solución de SBF usada en el ensayo de degradación	108
Tabla 5. Composición de las deposiciones sobre los scaffolds después de ser sometidos en ensayo de bioactividad en diferentes intervalos de tiempo	114
Tabla 6. Codificación usada en ensayos antimicrobianos	116
Tabla 7. Diámetro promedio del halo de inhibición de los scaffolds contra S. aureus	119
Tabla 8. Diámetro promedio del halo de inhibición de los scaffolds fabricados contra E. coli	120
Tabla 9. Diámetros promedio halo de inhibición de los scaffolds sobre Fusarium oxysporum	121



LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I

Figura 1. Gráfico de publicaciones sobre IT en función del tiempo en años. Gráfica obtenida usando la base de datos Scopus (30) 21

CAPÍTULO II

Figura 1. Anatomía hueso cortical y trabecular (3) 30
Figura 2. Contraste entre hueso cortical y trabecular en algunos huesos largos (5)..... 31
Figura 3. Composición ósea (Edición propia (9)) 32
Figura 4. Etapas de la osificación endocondral (Adaptado de (13)) 36
Figura 5. Esquema modelación ósea (Adaptado de (13))..... 37
Figura 6. Esquema remodelación ósea (Adaptado de (17))..... 38
Figura 7. Elementos clave de la IT (Adaptado de (22)) 40
Figura 8. Esquema proceso de liofilizado (Adaptado de (33))..... 42
Figura 9. Ilustración esquemática de la secuencia de reacción entre la superficie de vidrio bioactivo y SBF (Adaptado de (38))..... 44
Figura 10. Esquema proceso Sol-Gel (Adaptado de (52))..... 47
Figura 11. Estructura del quitosano (59) 48

CAPÍTULO III

Figura 1. Tratamiento térmico para obtener sílice a partir de cascarilla de arroz. 57
Figura 2. Rampa usada para calcinar la sílice precipitada a partir de raquis y corozo..... 58
Figura 3. Esquema síntesis vidrio bioactivo por sol-gel..... 59
Figura 4. Tratamiento térmico estabilización del polvo sintetizado..... 60
Figura 5. Esquema fabricación de scaffolds por liofilizado 61

CAPÍTULO IV

Figura 1. FTIR para sílice obtenida de raquis con dos tratamientos térmicos 73
Figura 2. FTIR sílice extraída de la cáscara de corozos 74
Figura 3. DRX sílice extraída a partir de raquis de palma africana..... 75
Figura 4. Polvo de sílice obtenido de la calcinación de cáscara de arroz..... 76
Figura 5. FTIR sílice extraída a partir de cascarilla de arroz 76
Figura 6. DRX y EDS polvo de sílice extraído de cáscara de arroz..... 77
Figura 7. Espectros de DRX para los VB sintetizados después de un tratamiento a 1050°C. a) VB1 a VB5; b) VB6 a VB10..... 79
Figura 8. Imágenes SEM de la capa de apatita formada en la superficie de cada uno de los VB sintetizados..... 80
Figura 9. Porcentaje de apatita formada n los VB sintetizados a 7 y 14 días en SBF..... 81
Figura 10. Valor Ca/P para cada uno de los VB después de 7 y 14 días en SBF 82



Figura 11. SEM de la capa de apatita formada sobre VB7 a 14 días en SBF	83
Figura 12. Espectro FTIR en VB7 para 0, 7 y 14 días de exposición en SBF	84
Figura 13. Espectroscopía Raman en VB sintetizado con TEOS.....	85
Figura 14. Imágenes SEM para VB sintetizado con TEOS, a) aumento a 3000X, b) aumento a 20000X, c) aumento a 25000X y d) aumento a 30000X	86
Figura 15. DRX para VB sintetizado usando sílice obtenida de raquis de palma africana..	88
Figura 16. DRX comparativo para VB de TEOS, cascarilla de arroz y cáscara de corozo..	89
Figura 17. Imágenes SEM capa de apatita en VB sintetizado con sílice extraída de cascarilla de arroz, a) 7 días en SBF y b) 14 días en SBF	90
Figura 18. SEM en capa de apatita formada sobre VB después de 14 días de exposición en SBF	91
Figura 19. FTIR para VB sintetizado con la sílice extraída a 0, 7 y 14 días de exposición en SBF	92
Figura 20. Espectroscopía Raman en VB sintetizado con cascarilla de arroz.....	93
Figura 21. Imágenes SEM para VB sintetizado con cascarilla de arroz, a) aumento de 3000X y b) aumento de 30000X	94
Figura 22. DRX scaffolds fabricados con quitosano y VB sintetizado con a) sílice extraída y b) TEOS.....	96
Figura 23. FTIR en los scaffolds fabricados con los VB sintetizados de a) sílice extraída y b) TEOS	98
Figura 24. Imágenes SEM en scaffold de quitosano en vista transversal a) 30X y b) 200X y vista superior c) 30X y d) 200X	99
Figura 25. Imágenes SEM en scaffold CH/VB (2:1) sintetizado con TEOS en vista transversal a) 33X y b) 200X y vista superior c) 33X y d) 200X	100
Figura 26. Imágenes SEM en scaffold de CH/VB (2:1) sintetizado con sílice extraída en vista transversal a) 33X y b) 200X y vista superior c) 33X y d) 200X.....	101
Figura 27. Imágenes SEM en scaffold CH/VB (1:1) sintetizado con TEOS en vista transversal a) 33X y b) 200X y vista superior c) 33X y d) 200X	102
Figura 28. Imágenes SEM en scaffold de CH/VB (1:1) sintetizado con sílice extraída en vista transversal a) 33X y b) 200X y vista superior c) 33X y d) 200X.....	103
Figura 29. Comportamiento mecánico a compresión de los scaffolds fabricados con TEOS (T) y cascarilla de arroz (A)	105
Figura 30. Análisis TGA en el scaffold 1:1 CH/VB_A.....	110
Figura 31. Análisis TGA en el scaffold 1:1 CH/VB_T	111
Figura 32. Imágenes SEM ensayo de bioactividad en los scaffolds a distintos días, vista transversal a 33X	113
Figura 33. Imágenes SEM a 21 días en SBF de scaffolds fabricados con a) 2:1 CH/VB_A y b) 1:1 CH/VB_A.....	115
Figura 34. Fotos ensayo con E. coli en a) momento del cultivo y b) después de 24 h de incubación.....	117



Figura 35. Fotos ensayo con *S. aureus* en a) al momento del cultivo y b) después de 24 h de incubación..... 117

Figura 36. Fotografía ensayo antimicrobiano con *S. aureus* después de 5 días en incubación, a) scaffolds ensayados y b) control 118

Figura 37. Fotografías ensayo antimicrobiano con *E. coli* después de 5 días de incubación sobre a) los scaffolds fabricados y b) control..... 119

Figura 38. Ensayo antimicrobiano realizado sobre *Fusarium oxysporum* con a) los scaffolds fabricados y b) control..... 121



RESUMEN

Recientemente se ha incrementado el uso de los biomateriales en la reparación de tejidos dañados debido a las elevadas propiedades que poseen, como lo es la biocompatibilidad, bioactividad, buena integración, entre otras. Principalmente los biomateriales compuestos son deseables en la ingeniería de tejidos debido a que se asemejan más a la estructura natural del cuerpo. Específicamente para la reparación del tejido óseo se buscan materiales compuestos que contengan en su estructura una fase mineral y una fase polimérica.

En la fabricación de estructuras compuestas resaltan materiales como el colágeno y el quitosano como biopolímeros biocompatibles y biodegradables, y los fosfatos de calcio como cerámicos bioactivos. Sin embargo, desde hace algunos años se ha incorporado el uso de otro material cerámico que ha probado ser no solo bioactivo sino oseoinductor, lo que permite que células madre oseoprogenitoras lleguen a la zona afectada y se diferencien en osteoblastos para lograr así promover la regeneración del tejido. Este material es conocido como vidrio bioactivo.

En este trabajo se tuvo como objetivo fabricar plataformas de crecimiento celular (scaffolds) de quitosano reforzadas con vidrio bioactivo sintetizado con diferentes fuentes de sílice. Para lograr esto se abordaron dos metodologías principales, la primera la síntesis de vidrio bioactivo usando distintas fuentes de sílice; y la segunda, la fabricación de los scaffolds usando los vidrios bioactivos sintetizados.

Para la primera etapa se utilizó TetraEtil OrtoSilicato (TEOS) como la primer fuente de sílice, con el cual se evaluó un diseño experimental de mezclas con el fin de determinar la composición con el mejor comportamiento bioactivo. A partir de este diseño se sintetizaron 10 diferentes formulaciones que se analizaron por Difracción de Rayos X (DRX) y ensayo de bioactividad el cual fue evaluado por medio de Microscopía Electrónica de Barrido (SEM) y Espectroscopía por Energía Dispersiva con Rayos X (EDS). Los resultados arrojaron que la composición 60% SiO₂-6% P₂O₅-34% CaO fue la que mejor presentó un comportamiento bioactivo con la formación de una capa de apatita en su superficie con una relación calcio/fósforo (Ca/P) similar a la del hueso y con una morfología sub-micrométrica lo que es adecuada para la regeneración de tejido óseo.

Por otro lado, se utilizaron fuentes naturales de sílice para la segunda síntesis de vidrio bioactivo. Las fuentes utilizadas fueron la cascarilla de arroz, la cáscara de corozo y el raquis de palma africana. Con la primer fuente se siguió un proceso de calcinación para la obtención de la sílice pura, con los restantes se siguió una metodología planteada para extracción de lignina, que consistió en un tratamiento alcalino previo seguido de una precipitación por cambios de pH. Los polvos obtenidos se caracterizaron por DRX y por Espectroscopía Infrarroja con Transformada de Fourier (FTIR), a partir de las cuales se pudo identificar que se lograba obtener sílice puro a partir de la cascarilla de arroz, mientras que de las otras dos fuentes la sílice extraída se encontraba contaminada por cristales de sulfato de sodio. Con estos resultados se determinó que la sílice a usar para la síntesis de vidrio bioactivo sería la extraída a partir de cascarilla de arroz.

El vidrio bioactivo sintetizado con la fuente natural se realizó siguiendo un proceso similar al sintetizado con TEOS, además se realizó con la misma composición ya definida en la



síntesis anterior. Este vidrio bioactivo fue caracterizado por DRX y ensayo de bioactividad, con lo que se pudo comprobar que presentaba un comportamiento similar al sintetizado con TEOS, permitiendo la formación de capa de apatita en la superficie con una relación Ca/P comparable con la del hueso.

Debido a que los vidrios bioactivos sintetizados mostraron buen comportamiento bioactivo, ambos fueron usados en la fabricación de scaffolds de quitosano reforzados con estos materiales con dos composiciones con cada vidrio bioactivo, es decir un scaffold con la misma cantidad en gramos del quitosano y otro scaffold con la mitad de la cantidad denominados 1:1 CH/VB y 2:1 CH/VB, respectivamente. Los scaffolds fueron caracterizados química y morfológicamente para determinar si había unión química entre ambos materiales y si la presencia del cerámico permitía la formación de poros con un tamaño de diámetro superior a 200 μm . Los resultados indican que es posible una interacción química entre los vidrios bioactivos y el quitosano, además los polvos no afectaron la formación de poros del quitosano, obteniéndose estructuras con poros interconectados, buen porcentaje de porosidad y diámetros de poros superiores al establecido.

Por otro lado, los scaffolds fueron evaluados por medio de pruebas mecánicas, comportamiento *in vitro* y comportamiento antimicrobiano, evaluándose resistencia a la compresión, degradación, bioactividad y comportamiento antifúngico y antibacteriano. Para el ensayo a compresión se evaluó la resistencia de los scaffolds comparando el módulo de Young de cada uno con el hueso. En este sentido los resultados obtenidos no fueron tan elevados ya que la porosidad influye en este ensayo generando puntos de tensión provocando fracturas en el material.

En cuanto a los ensayos *in vitro* se evaluó la degradación y bioactividad en Fluido Corporal Simulado (SBF) por 28 y 21 días, respectivamente. Se pudo determinar que la presencia de vidrio bioactivo en la estructura aumenta el comportamiento bioactivo provocando la formación de apatitas en la superficie. Por su parte, con el ensayo de degradación se determinó que los scaffolds pierden su estabilidad después de 21 días en SBF lo que puede afectar la regeneración tisular; no obstante, es necesario realizar más pruebas en este sentido.

Finalmente, respecto a los ensayos antimicrobianos se evaluó el efecto de los scaffolds contra *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Fusarium oxysporum*, como cepas bacterianas y fúngicas. El ensayo se hizo por el método de difusión en agar, con el cual se mide el halo inhibitorio alrededor del material evaluado. Con esto se obtuvo que todos los scaffolds poseen un efecto bactericida ya que generan un halo de inhibición que se mantiene por 5 días, tiempo que duró el ensayo. Respecto al comportamiento contra el hongo, se evidenció una respuesta antifúngica por todos los scaffolds. Ambas respuestas, tanto contra las bacterias como contra el hongo, fue mayor en los scaffolds reforzados con ambos vidrios bioactivos, especialmente con el vidrio bioactivo sintetizado con TEOS, con lo que se puede decir que los cerámicos obtenidos también poseen efecto antimicrobiano.

De acuerdo a todos los resultados obtenidos, se definió que el scaffold con comportamiento superior en todas las pruebas realizadas fue el scaffold con relación 1:1 CH/VB con el vidrio bioactivo sintetizado con TEOS, por lo que se concluye que este scaffold posee propiedades adecuadas para la regeneración de tejido óseo.



CAPÍTULO I

NOTAS INTRODUCTORIAS

PRÓLOGO

La Ingeniería de Tejidos (IT) busca reparar, mejorar o mantener las funciones de un tejido que se encuentra comprometido debido a enfermedades o traumatismos. En un sentido básico las matrices para crecimiento celular o scaffolds sirven como soporte y elementos de transporte para células madre y/o factores de crecimiento. Los biomateriales con los que se fabrican los scaffolds deben poseer una serie de propiedades adecuadas que se adquieren no solo por la estructura química del material sino también por las técnicas de fabricación del scaffold que otorgan propiedades físicas. Este trabajo de investigación busca la combinación de dos materiales reconocidos en ingeniería de tejidos por su alta compatibilidad con el tejido vivo en la fabricación de scaffolds para aplicación en Ingeniería de Tejido Óseo. Además, uno de estos materiales será sintetizado con diferentes fuentes de sus precursores buscando mejorar las propiedades bioactivas del mismo disminuyendo costos de fabricación.

En este primer capítulo se hace una introducción general a lo que se tratará en este informe de trabajo de investigación, se tendrá como punto central el problema que existe actualmente en la reparación del tejido óseo y la importancia de las nuevas alternativas de tratamiento. Se presentan también los objetivos de investigación y los antecedentes de la ingeniería de tejidos, partiendo de épocas remotas como lo eran las civilizaciones antes de Cristo, hasta llegar a la actualidad y la perspectiva futura en materia de Ingeniería de Tejido Óseo.



1. INTRODUCCIÓN

Desde tiempos remotos la salud de las personas ha sido de gran importancia en la sociedad, es por ello que gran parte de los avances científicos se han dado en ésta área, de forma que la calidad de vida de las personas pueda mejorarse. Sin embargo, la falta de órganos ha sido un problema en aumento a medida que incrementan los accidentes de fallo total o parcial orgánico y la incapacidad de suplir la demanda con los donantes que existen en el momento (1)(2); y la opción de trasplante autólogo (tejido del mismo paciente, extraído de otra zona del cuerpo) se ve limitada por la cantidad de tejido disponible y las posibles infecciones *in situ* (3). Es debido a tal inconveniente que surgió la Ingeniería de Tejidos (IT) con el fin de ayudar en la regeneración celular del tejido usando materiales naturales o sintéticos que cumplan con las condiciones de biocompatibilidad necesarias. Hoy en día el estudio en IT es cada vez más prometedor en el campo médico, ya que ofrece una nueva alternativa en cuanto al uso de materiales sintéticos para promover el crecimiento celular (4). Así se empezaron a crear Plataformas de Crecimiento Celular (Scaffolds) usando materiales biocompatibles que tuvieran características similares a las del tejido para el cual se crean.

Los scaffolds son cuerpos que porosos permiten que las células crezcan a través de ellos para así reparar lesiones en el tejido; pueden ser usados directamente como un injerto, es decir, implantarlo en la zona de la lesión y así permitir que las células crezcan por medio del scaffold dentro del cuerpo. La otra forma de usarlo es permitir el crecimiento celular en el scaffold en una incubadora y una vez las células hayan logrado proliferar, éstas junto con el scaffold son implantadas en el tejido (5).

Uno de los tejidos que sufre mayor cantidad de traumatismos, es el tejido óseo. Los scaffolds para el crecimiento de células óseas deben cumplir con distintas características tales como biocompatibilidad, bioabsorción, osteoconducción, osteoinducción, alta porosidad y biodegradabilidad (1)(6); además de las características mecánicas distintivas del hueso, como buena resistencia a la compresión y la facilidad de ajustarse a las distintas sollicitaciones mecánicas a las que se ve sometido el tejido (7).

El hueso es un material híbrido complejo, ya que se encuentra compuesto principalmente por una proteína blanda y resistente que le confiere propiedades de flexibilidad y elasticidad, el colágeno; y un mineral frágil que le otorga dureza y rigidez, la hidroxiapatita (7)(8).

Para cumplir con las características del hueso se han evaluado una gran cantidad de materiales prometedores para la producción de scaffolds con fines en regeneración de tejido óseo. Dentro de los materiales inorgánicos se cuenta con varias cerámicas que han probado su excelente biocompatibilidad como es el caso de la hidroxiapatita sintética y el vidrio bioactivo; y dentro de los materiales orgánicos se cuenta con varios polímeros algunos naturales como el colágeno y el quitosano, y otros de tipo sintético como la policaprolactona (2,9–11). Sin embargo, la hidroxiapatita sintética por sí sola no presenta las propiedades mecánicas adecuadas, es por ello que los materiales que se han de usar con este fin deben cumplir tanto las propiedades biológicas como mecánicas respectivas del hueso (12).

En vista a la problemática del uso de la hidroxiapatita por sí sola, se ha buscado generar nuevos scaffolds híbridos, en los cuales se unen materiales cerámicos con poliméricos con el



fin de adquirir las propiedades de rigidez que otorgan los cerámicos y la flexibilidad que otorgan los polímeros.

Por otro lado no sólo se tiene la hidroxiapatita como único cerámico disponible para esta aplicación, también se cuenta con otros materiales cerámicos que cumplen con las características de biocompatibilidad, como es el caso de los vidrios bioactivos.

Los vidrios bioactivos poseen la capacidad de formar en su superficie una capa de apatita en presencia de fluidos fisiológicos lo que los hace biocompatibles con el hueso (13), además poseen buenas propiedades mecánicas.

Por otra parte, para lograr obtener las propiedades de elasticidad se cuenta con los materiales poliméricos, que pueden ser sintéticos como la policaprolactona o naturales como el colágeno y el quitosano (14), este último ya reconocido por su gran gama de aplicaciones en medicina regenerativa con las que cuenta.

Este trabajo busca desarrollar un scaffold híbrido de quitosano/vidrio bioactivo para aplicarlo a la IT de hueso, tal que logre cumplir con las condiciones mecánicas, de biocompatibilidad, bioactividad, osteoinducción, osteoconducción y que permita el crecimiento y proliferación celular.

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En la actualidad existe una gran demanda en reparación de tejido óseo, debido a la gran cantidad de personas que sufren fracturas o deterioro del tejido por enfermedades, accidentes o malformaciones. En Colombia se estima que se producen entre 8000 y 10000 fracturas de cadera anualmente causadas por osteoporosis (15) y enfermedades de menor incidencia como el osteosarcoma o la osteogénesis imperfecta afectan drásticamente el tejido óseo ya que lo fragilizan (16)(17). Con el fin de restaurar funcionalmente este tejido, se ha venido trabajando en la producción de scaffolds altamente porosos y biodegradables (6), que cumplan con la característica de bioabsorbabilidad, para que una vez implantado en la zona de la lesión, permita el crecimiento celular de tejido nuevo y se reabsorba, evitando una nueva cirugía para su extracción.

El tejido óseo se encuentra formado en su mayor parte por fibras de Colágeno tipo I, que le confiere al hueso propiedades de elasticidad y flexibilidad; y de Hidroxiapatita (HA), que le confiere dureza y rigidez (7) . Por ello, la investigación en IT se ha centrado en el uso de estos materiales en la fabricación de scaffolds para reparación ósea; sin embargo la Hidroxiapatita sintética (sHA) no presenta las propiedades mecánicas adecuadas, por lo cual los materiales que se han de usar en IT óseo deben cumplir tanto las propiedades biológicas como mecánicas respectivas del hueso (12), como son los vidrios bioactivos, que por tener una matriz de sílice se hacen más estables mecánicamente y la presencia de calcio y fósforo le proporcionan una biocompatibilidad comparable con la de la HA.

El uso combinado de quitosano y vidrio bioactivo es un campo aún poco explorado pero muy prometedor, ya que ambos materiales presentan buenas características que prometen ser óptimos para la regeneración del tejido óseo. De esta manera se mejora la bioactividad del quitosano y se pueden obtener materiales de vidrio bioactivo con formas tridimensionales



con mejor resistencia. Peter *et al.* (2010) (18) demostraron que al combinar quitosano con vidrio bioactivo en la fabricación de scaffolds, éstos muestran mejor adhesión celular en comparación con los scaffolds fabricados de los mismos materiales de forma individual además que prometen ser adecuados para la IT de hueso alveolar.

Actualmente en Colombia la investigación en scaffolds para regeneración ósea es escasa y no se cuenta con estudios reportados usando vidrio bioactivo como refuerzo en una matriz de quitosano. Por lo cual, es necesario generar una línea de investigación en esta área en el país y que se pueda ofrecer un producto alternativo y confiable para la regeneración del hueso.

3. JUSTIFICACIÓN

En la actualidad la disponibilidad de tratamientos para la recuperación del tejido óseo es muy baja en comparación con la cantidad de pacientes que cada día ingresan a los hospitales con traumatismos o enfermedades que afectan gravemente el sistema locomotor. Se estima que alrededor de 350 cirugías de ortopedia al mes se realizan en el Hospital Pablo Tobón Uribe de la ciudad de Medellín, de los cuales aproximadamente un tercio de estas cirugías corresponden a daños por fractura, donde un 10% de estas requieren reconstrucción del tejido (19).

Los tratamientos convencionales, como el trasplante de órganos, no suplen todas las exigencias de la medicina actual, por lo cual hoy existe una creciente necesidad en buscar alternativas al trasplante de órganos. Según el Instituto Nacional de Salud entre 2007 y 2013 la lista de espera por un órgano aumentó un 155 por ciento. Entre 2005 y 2013 en Colombia se han realizado 9008 trasplantes de órganos de los cuales el 91% se realizó de donante cadavérico y el porcentaje restante de donante vivo (20).

Los daños en el sistema óseo suelen ser tratados con trasplante autólogo o alogénico, sin embargo, estos suelen presentar morbilidad en la zona de extracción o transmisión de patógenos, respectivamente. Por su parte los implantes metálicos/cerámicos difieren del tejido en propiedades mecánicas y estructura, lo que conlleva a ocasionar daño adicional al hueso (21). Es debido a estos inconvenientes que emergió un campo interdisciplinario, la IT, el cual fue sugerido como una posible alternativa en la regeneración de tejidos (22).

La IT es un campo prometedor ya que favorece la regeneración del tejido usando células del mismo paciente lo que implica que se disminuyen los riesgos por patógenos al no usar tejido donado y se reduce también el riesgo de morbilidad en la zona de extracción de tejido cuando se realizan tratamientos con tejido autólogo. No obstante, la práctica de la IT en Colombia se encuentra muy pobre, por lo cual es necesario desarrollar proyectos que promuevan el estudio en esta área.

La presente investigación tiene como interés científico buscar alternativas por medio de la IT que permitan la regeneración del tejido óseo sin que sea necesario el uso de los tratamientos convencionales para la reparación de este, por lo que a partir de este estudio se busca desarrollar un producto que cumpla con las condiciones necesarias para ser aplicado como un sustituto óseo y que permita la reparación del hueso.



Además se busca establecer un precedente en la temática en el país con el fin de promover el estudio en esta área, de forma que a mediano y largo plazo el estudio en IT en Colombia logre avanzar hasta etapas de aplicabilidad.

4. OBJETIVOS

4.1.General

Fabricar un scaffold de quitosano reforzado con partículas de vidrio bioactivo obtenido de diferentes fuentes de sílice.

4.2.Específicos

- Obtener sílice a partir de fuentes naturales para evaluar su potencialidad en la producción de vidrio bioactivo.
- Sintetizar vidrio bioactivo empleando diferentes precursores de silicio para ser usado como refuerzo en un scaffold de quitosano.
- Caracterizar química y morfológicamente los vidrios bioactivos obtenidos con las diferentes fuentes de silicio con el fin de establecer las mejores condiciones y bioactividad
- Fabricar por la técnica de liofilización, scaffolds de quitosano reforzados con los vidrios bioactivos seleccionados.
- Caracterizar los scaffolds fabricados mediante DRX, FTIR, SEM, Estabilidad, Termogravimetría y ensayos de compresión con el fin de identificar los de mejor desempeño.
- Evaluar el comportamiento bactericida, fungicida y de bioactividad de los scaffolds obtenidos para conocer su posible reacción en el cuerpo y su actividad antimicrobiana.
- Comparar los scaffolds fabricados con los vidrios bioactivos obtenidos de diferentes fuentes de sílice para seleccionar el que presente el comportamiento más adecuado en la regeneración del tejido óseo reduciendo los costos de fabricación

4.3.Alcance del proyecto

Durante el desarrollo de este proyecto se busca desarrollar una matriz tridimensional porosa de quitosano reforzado con vidrio bioactivo previamente sintetizado con diferentes fuentes de silicio. Inicialmente se procede con la síntesis y caracterización de vidrios bioactivos partiendo de diferentes fuentes de sílice, con el fin de evaluar la formación de capa apatita en su superficie y cómo ésta se ve influenciada por la cantidad de sílice adicionado en la mezcla.

Una vez evaluado y definido el vidrio bioactivo que presente una mayor bioactividad, se procede con la fabricación de los scaffolds por medio de liofilización y su posterior caracterización mecánica, morfológica, química y biológica, con el fin de predecir su



comportamiento en condiciones *in vivo*. De esta manera se definen las mejores proporciones de cada uno de los componentes que hacen parte del scaffold y así lograr identificar aquellas que permiten obtener comportamientos más apropiados para su posterior aplicación como scaffold en la ingeniería de tejido óseo.

5. ANTECEDENTES

El cuerpo humano es un hermoso diseño de la naturaleza que ha evolucionado con el tiempo; sin embargo, el daño en órganos y tejidos puede darse tanto por enfermedades como por accidentes. En la antigua mitología griega ya las palabras Regeneración de Órganos estaban presentes con el mito de Prometeo, quien fue encadenado pasando sus días a la merced de un águila que comía su hígado y en las noches su tejido se regeneraba. Aún es debatible si los antiguos griegos poseían conocimiento sobre la regeneración del hígado (22).

El uso de materiales compatibles data de alrededor de 1500 A.C. con el uso de la madera en prótesis de extremidades (23) o las pieles para cubrir los cuerpos desnudos (24). En Capua, Italia se desenterró una pierna artificial que data aproximadamente 300 A.C elaborada con hierro y bronce, con núcleo de madera; lo que demuestra ya el uso de materiales naturales en la fabricación de prótesis (23). Las primeras prótesis se usaron para el reemplazo de un miembro de forma que pudiese solucionarse la problemática motora cuando falta alguna extremidad, esto es en cierta medida un indicio de reemplazo óseo.

Los biomateriales han formado parte de la evolución humana; sin embargo, la IT se dio a conocer en 1962 cuando científicos empezaron a desarrollar la primera piel sintética, siendo a mediados de los 70's usada como una terapia exitosa en el tratamiento de quemadura (25). Aun así, la IT como un campo de estudio se definió a finales de los 80's (26). Para entonces empezaron a crecer las investigaciones en el campo como se ve reflejado en el número de artículos publicados hasta la fecha y que se puede observar en la Figura 1, donde se evidencia que desde los 60's ya habían investigaciones relacionadas a IT, pero es desde mediados de los 70's y principio de los 80's cuando este campo empezó a tomar fuerza, definiéndose como campo interdisciplinario a mediados de 1980 y acuñándose el término de Ingeniería de Tejidos en 1987 (27)(28).

Durante los primeros años, las investigaciones se centraron en el estudio de tejidos y células. A principios de los 70's W.T. Green (28) llevó a cabo una serie de experimentos con el fin de regenerar cartílago usando un cultivo de condrocitos en combinación con un "scaffold de hueso". A pesar de que no tuvo éxito en la generación de cartílago, su experimento sentó las bases teóricas y prácticas al concepto de conectar células con matrices de crecimiento celular.

Las investigaciones de Green dieron lugar a trabajos prometedores en la IT centrándose en la regeneración de piel usando queratinocitos o fibroblastos en matrices sintéticas para así favorecer el crecimiento de nuevo tejido. La primera piel sintética funcional fue desarrollada entre los años 1970 y 1980; esto supuso un punto de partida para lo que hoy se conoce como Ingeniería de Tejidos (25)(26). Siguiendo el estudio sobre regeneración de piel haciendo uso de células en combinación con matrices de crecimiento celular o scaffolds, empiezan a desarrollarse una serie de trabajos en IT teniendo como objetivo la regeneración de diferentes tipos de órganos.



Es el caso del Pro-Osteon desarrollado por Interpore International un derivado de coral usado como material de implante óseo desarrollado en 1993 (25). Pero es en el año 1997 cuando se logra la regeneración completa de tejido cartilaginoso. El experimento desarrollado por Charles Vacanti en 1997 (cultivar células de cartílago en forma de oreja sobre la dermis de un ratón) (29) revolucionó la IT en el sistema musculoesquelético.

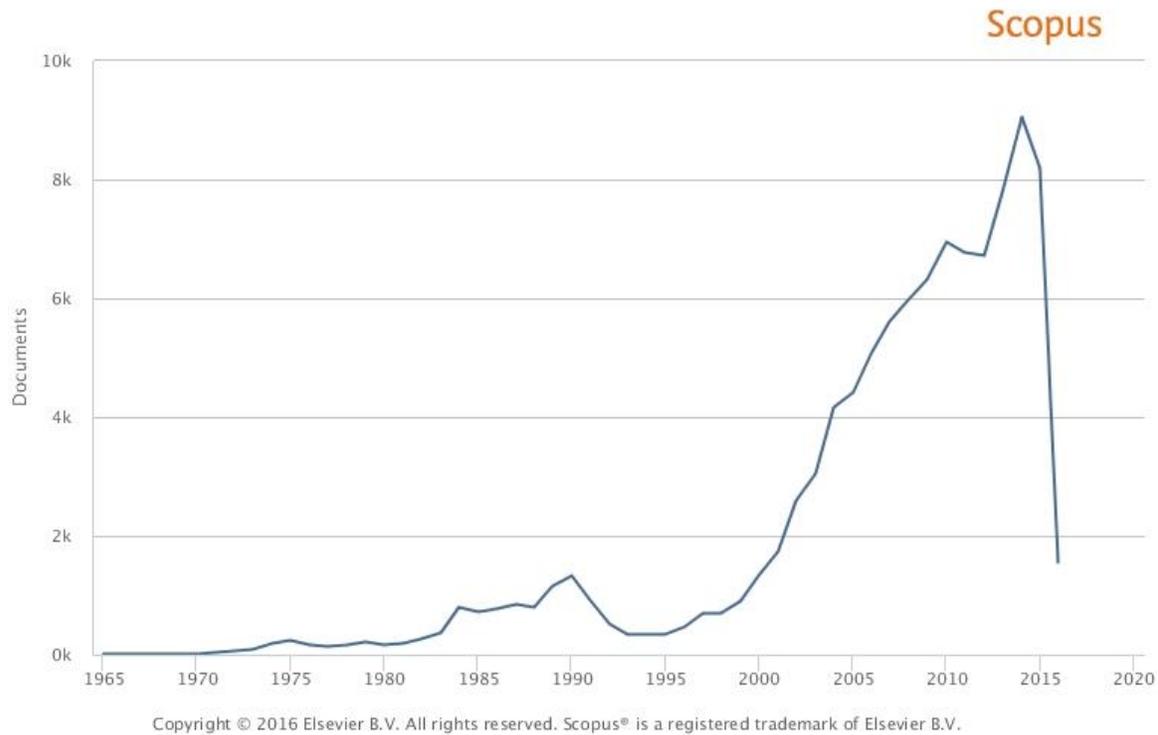


Figura 1. Gráfico de publicaciones sobre IT en función del tiempo en años. Gráfica obtenida usando la base de datos Scopus (30)

Sin embargo, sólo se ha logrado desarrollar productos comerciales que permitan la regeneración de piel y cartílago; como por ejemplo Alloderm, Dermagraft, TransCyte, entre otros (26); mientras que para los demás tejidos aún no se logra avanzar de etapas de laboratorio. La ingeniería de tejido óseo, BTE (por sus siglas en inglés, Bone Tissue Engineering) es de los estudios que más se pretende llevar a prácticas clínicas debido a la cantidad de inconvenientes que presentan los tratamientos actuales (27).

La BTE nació debido a la necesidad de desarrollar e implementar tratamientos más efectivos en la regeneración del tejido óseo en comparación con los tratamientos convencionales (31). Sin embargo, hasta el momento, las prácticas clínicas para la BTE han sido limitadas ya que las matrices que se han logrado desarrollar carecen de propiedades biomiméticas y las propiedades químicas y mecánicas son sub-óptimas para los requerimientos del tejido óseo (32).



Los scaffolds usados en la BTE deben cumplir con ciertas características para considerarse como óptimos en la regeneración del tejido. Biocompatibilidad, propiedades mecánicas comparables a las del hueso, porosidad adecuada para permitir el crecimiento celular, entre otras, son algunas de las propiedades que deben tenerse en cuenta cuando se pretende fabricar scaffolds para uso en BTE (33). Entre los materiales seleccionados para este fin se encuentran los de tipo polimérico y cerámico, dado que estos cumplen con algunas de las propiedades necesarias en un scaffold. Los polímeros se han catalogado en dos grupos los de tipo sintético y los de tipo natural, son muchos los polímeros que debido a su biocompatibilidad (biopolímeros) han sido usados en medicina, entre ellos se encuentran algunos que resaltan más que los demás por sus propiedades sobresalientes, como es el caso del quitosano.

El quitosano es un polisacárido que se encuentra en el caparazón de crustáceos y en la pared celular de algunos hongos. Muchos autores han propuesto el uso de quitosano en ingeniería de tejidos; sin embargo Kong *et al.*, (2006) (9) dicen que éste por sí solo no es el material ideal para esta aplicación debido a que es necesario mejorar su bioactividad. A pesar de esta dificultad, Anitha *et al.*, (2014) (14) plantearon en su estudio las ventajas de usar el quitosano en aplicaciones médicas, ya que es un material que posee buena habilidad para ser hidratado lo que favorece el crecimiento y la adhesión celular. Los scaffolds fabricados con este material presentan canales abiertos e interconectados que lo hacen de gran ayuda para el crecimiento celular, además que es un material que permite obtener una gran variedad de arquitecturas. Es de gran ayuda en ingeniería de tejidos para cartílago ya que posee una estructura similar a la de varios glicosaminoglicanos (GAGs) encontrados en cartílago articular (3).

Sin embargo, el uso de polímeros en fabricación de scaffolds restringe las aplicaciones de estos, debido a que las propiedades mecánicas no son las mejores; además en el caso de la BTE, los polímeros no permiten la mineralización ósea.

El segundo grupo de materiales usados en la fabricación de scaffolds son los materiales cerámicos, estos materiales debido a su similitud química con el hueso son ideales en la aplicación de regeneración ósea. Dentro de los materiales cerámicos más usados encontramos la HA, un cerámico osteofílico que hace parte del hueso como componente inorgánico (4). La HA puede fabricarse en laboratorio como un precipitado de varios precursores como el nitrato de calcio (34). Otro de los cerámicos usados recientemente es el vidrio bioactivo, desarrollado por el profesor Hench quien logró obtener un vidrio biocompatible que cumplía con la relación Ca/P presente en el hueso. Los experimentos lograron mostrar que al incorporar 6% wt de fósforo a la composición de vidrio permitía que se generara una capa bioactiva sobre este material en presencia de fluidos fisiológicos (13).

No obstante, aún no es posible la fabricación de scaffolds sólo con vidrio bioactivo, dado que sus propiedades mecánicas son pobres en comparación a las del hueso. Pero se ha logrado desarrollar la forma de incorporarlo como refuerzo en matrices de tipo poliméricas, logrando



así mejores propiedades en el scaffold dadas tanto por el polímero como por el cerámico, ampliando sus posibles aplicaciones en la IT. Conocidos como scaffolds compuestos, esta unión polímero-cerámico es promisorio en la BTE (35).

Los scaffolds compuestos cerámico/polímero presentan una característica similar a la del hueso, ya que por un lado presentan buenas propiedades biológicas, como biocompatibilidad, otorgadas por la fase polimérica y propiedades mecánicas aportadas por la fase cerámica (5,35). Dentro de estos estudios resaltan materiales como quitosano y colágeno como fase polimérica, y fosfatos de calcio como fase cerámica. Kong *et al.*, (2006) demostraron que al incorporar nanocristales de HA en una matriz de quitosano se mejoraba la mineralización y por lo tanto la bioactividad del compuesto (9). Resultados similares presentaron Depan *et al.*, (2011) al comprobar que se producía una mejora en las propiedades biológicas en un scaffold compuesto por quitosano e HA nanométrica en comparación con scaffolds fabricados únicamente de quitosano (36). No obstante, algunos estudios han demostrado que el uso de HA sintética, si bien aumenta la bioactividad de otro material, la velocidad de unión con el hueso es menor en comparación con el vidrio bioactivo (45S5) como lo demostraron Wheeler *et al.*, (2001) (37). Es en este punto donde materiales poco usados toman fuerza, como es el caso de los vidrios bioactivos que inducen una mineralización ósea adecuada en menor tiempo que la HA como lo demostraron Correia *et al.*, (2015) en su estudio. Ellos comprobaron esta afirmación con un ensayo de bioactividad sobre los scaffolds fabricados; además lograron dar a conocer una habilidad intrínseca del quitosano que no se había estudiado, y es la capacidad de comportarse como un polímero con memoria de forma (38), ampliando así la gama de aplicaciones para los scaffolds compuestos y abriendo las puertas para nuevas investigaciones en el tema.

Sin embargo, la nueva generación de scaffolds debe estar en la capacidad de promover no solo el crecimiento y proliferación de células óseas, sino también la angiogénesis, es decir, inducir la formación de vasos sanguíneos; además, de lograr mimetizar las características del hueso (32,33). Para lograr este objetivo, se ha tomado como estrategia estudiar el efecto combinado no solo de los scaffolds y células de tipo oseoprogenitoras, sino también factores de crecimiento que favorezcan la angiogénesis (39). El desafío para los biomateriales futuros es lograr una liberación controlada de los factores de crecimiento ya que estos tienen un tiempo de vida útil limitado, por lo cual una correcta liberación de tales factores favorecerá el desarrollo de un tejido vascularizado y funcional apto en la regeneración ósea.

6. OBSERVACIONES FINALES

El desarrollo de nuevos materiales para su aplicación en BTE debe estar enfocado en lograr la regeneración de tejido funcional. Como se mencionó previamente para lograr este objetivo es necesario el trabajo combinado de scaffolds, células y factores de crecimiento. Siguiendo



este orden, los scaffolds deben estar en la capacidad de mantener las células vivas; es por ello que es tan imperativo un correcto estudio sobre los biomateriales con los cuales se fabrican tales scaffolds.

Los biomateriales que se usen en la práctica de la BTE deben satisfacer las necesidades de las células en términos de soporte, anclaje, alimentación, proliferación y diferenciación; además de poseer las propiedades nombradas al inicio de este capítulo que permitan la unión con el hueso; es decir, osteoconducción y osteoinducción. Los materiales que cuentan con estas propiedades se encuentran catalogados dentro de los biomateriales de última generación, como lo son los vidrios bioactivos.

Es por lo anterior que el estudio en el desarrollo de scaffolds compuestos de quitosano-vidrio bioactivo es tan importante ya que permite acercarse más en la aplicación de la BTE en la práctica clínica.

7. REFERENCIAS

1. Estrada C, Paz AC, López LE. INGENIERÍA DE TEJIDO ÓSEO : Consideraciones Básicas. Rev EIA. 2006;5:93–100.
2. López R. Producción de materiales híbridos bioreabsorbibles para la regeneración ósea. Universitat Politècnica de València; 2014.
3. Baldino L, Cardea S, De Marco I, Reverchon E. Chitosan scaffolds formation by a supercritical freeze extraction process. J Supercrit Fluids [Internet]. Elsevier B.V.; 2014 Jun [cited 2014 Jul 25];90:27–34. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0896844614000631>
4. Deville S, Saiz E, Tomsia AP. Freeze casting of hydroxyapatite scaffolds for bone tissue engineering. Biomaterials [Internet]. 2006 Nov [cited 2014 Jul 24];27(32):5480–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16857254>
5. Ma PX, Elisseeff J, editors. Scaffolding in Tissue Engineering. CRC Taylor. Boca Raton; 2006. 656 p.
6. Li W, Pastrama M-I, Ding Y, Zheng K, Hellmich C, Boccaccini AR. Ultrasonic elasticity determination of 45S5 Bioglass(®)-based scaffolds: Influence of polymer coating and crosslinking treatment. J Mech Behav Biomed Mater [Internet]. Elsevier; 2014 Aug 21 [cited 2014 Oct 22];40C:85–94. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25215906>
7. Rincón Rincón E, Ros Felip A, Claramunt Alonso R, Arranz Merino F. Caracterización Mecánica del Material Óseo. Tecnol y Desarro Rev Ciencia, Tecnol y Medio Ambient. 2004;2:1–27.
8. Pérez Sepúlveda P. Biomecánica del Hueso [Internet]. [cited 2016 Mar 3]. p. 39.



Available from: <http://biofisicamedica.tripod.com/elast2.pdf>

9. Kong L, Gao Y, Lu G, Gong Y, Zhao N, Zhang X. A study on the bioactivity of chitosan/nano-hydroxyapatite composite scaffolds for bone tissue engineering. *Eur Polym J* [Internet]. 2006 Dec [cited 2014 Jul 22];42(12):3171–9. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0014305706002746>
10. Shalumon KT, Anulekha KH, Chennazhi KP, Tamura H, Nair S V, Jayakumar R. Fabrication of chitosan/poly(caprolactone) nanofibrous scaffold for bone and skin tissue engineering. *Int J Biol Macromol* [Internet]. Elsevier B.V.; 2011 May 1 [cited 2014 Oct 13];48(4):571–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21291908>
11. Posada J, Li W, Escobar D, Ossa C, Pavón JJ, Boccaccini AR. Development and Characterization of a New Scaffold Bio-composite of Chitosan Coated Bioglass® for Bone Tissue Engineering. 2013 Pan Am Heal Care Exch (PAHCE) Conf Work Exhib Coop. 2013;17.
12. Wu M, Wang Q, Liu X, Liu H. Biomimetic synthesis and characterization of carbon nanofiber/hydroxyapatite composite scaffolds. *Carbon N Y* [Internet]. Elsevier Ltd; 2013 Jan [cited 2014 Oct 12];51:335–45. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0008622312007130>
13. Aguiar H, Serra J, González P. Los vidrios bioactivos en el mundo de los biomateriales. *An Quím.* 2011;107(3):237–42.
14. Anitha a., Sowmya S, Kumar PTS, Deepthi S, Chennazhi KP, Ehrlich H, et al. Chitin and chitosan in selected biomedical applications. *Prog Polym Sci* [Internet]. Elsevier Ltd; 2014 Sep [cited 2014 Jul 10];39(9):1644–67. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0079670014000288>
15. Clark P, Chico G, Carlos F, Zamudio F, Pereira RMR, Zanchetta J, et al. Osteoporosis in Latin America: panel expert review. *Medwave* [Internet]. 2013;13(08):e5791–e5791. Available from: <http://www.medwave.cl/link.cgi/Medwave/Enfoques/ProbSP/5791>
16. Fano V, Rodríguez Celin M, Del Pino M, Buceta S, Obregón MG, Primomo C, et al. Osteogénesis imperfecta. Evaluación clínica, funcional y multidisciplinaria de 65 pacientes. *An Pediatr.* 2010;72(5):324–30.
17. Arango N, Bonilla C, Sánchez R. Manejo del osteosarcoma con la terapia Rizzoli en la rutina de los servicios de un país en desarrollo. *Rev Colomb Cancerol* [Internet]. 2014;18(2):69–77. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.rccan.2014.05.001>
18. Peter M, Binulal NS, Nair SV, Selvamurugan N, Tamura H, Jayakumar R. Novel biodegradable chitosan–gelatin/nano-bioactive glass ceramic composite scaffolds for alveolar bone tissue engineering. *Chem Eng J* [Internet]. Elsevier B.V.; 2010 Apr 1 [cited 2014 Sep 26];158(2):353–61. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1385894710000963>



19. Valderrama Molina CO. Jefe de Ortopedia. Hospital Pablo Tobón Uribe. Medellín, Colombia; 2015.
20. INS. Red de donación y trasplantes cumple 10 años [Internet]. Instituto Nacional de Salud. 2014 [cited 2016 Mar 30]. Available from: <http://www.ins.gov.co/noticias/paginas/red-de-donacion-y-trasplantes-cumple-10-a%C3%B1os.aspx#.Vvwjc9LhDIU>
21. Feng K. Bioactive Nano Fibrous Scaffolds for Bone and Cartilage Tissue Engineering. University of Michigan; 2012.
22. Nandakumar A. Towards improved scaffolds for bone tissue engineering [Internet]. [Enschede, The Netherlands]: University of Twente; 2012. Available from: <http://purl.org/utwente/doi/10.3990/1.9789036533416>
23. Norton K. Un breve recorrido por la historia de la protésica. inMotion. 2007;17(7):5.
24. Alvarado LS. Trabajos En Telar manta, Chal, Cartera Y Mucho Más [Internet]. Buenos Aires: G Divisião Libros; 2006. Available from: <http://isbnplus.org/9789879097342>
25. Nature America Inc. Tissue engineering. Nat Biotech. 2000;18.
26. Berthiaume F, Maguire TJ, Yarmush ML. Tissue Engineering and Regenerative Medicine: History, Progress, and Challenges. Annu Rev Chem Biomol Eng [Internet]. Annual Reviews; 2011 Jun 17;2(1):403–30. Available from: <http://dx.doi.org/10.1146/annurev-chembioeng-061010-114257>
27. Vacanti J, Vacanti CA. The History and Scope of Tissue Engineering. Principles of Tissue Engineering. Third Edit. Elsevier Inc.; 2007. p. 3–6.
28. Meyer U. The History of Tissue Engineering and Regenerative Medicine in Perspective. Fundam Tissue Eng Regen Med [Internet]. 2009;5–12. Available from: <http://www.springerlink.com/index/10.1007/978-3-540-77755-7>
29. Cao Y, Vacanti JP, Paige KT, Upton J, Vacanti CA. Transplantation of chondrocytes utilizing a polymer-cell construct to produce tissue-engineered cartilage in the shape of a human ear. Plast Reconstr Surg [Internet]. Boston; 1997 Aug;100(2):297–302; discussion 303–4. Available from: <http://content.wkhealth.com/linkback/openurl?sid=WKPTLP:landingpage&an=00006534-199708000-00001>
30. Analyze search results. Tissue Engineering [Internet]. Base de datos Scopus. 2016 [cited 2016 Apr 6]. Available from: [http://aplicacionesbiblioteca.udea.edu.co:2055/term/analyzer.uri?sid=40CC97A961AF03D178DEEFD1B47D4A44.FZg2ODcJC9ArCe8WOZPvA:10&origin=resultslist&src=s&s=TITLE-ABS-KEY\(tissue+engineering\)&sort=plf-f&sdt=b&sot=b&sl=33&count=101394&analyzeResults=Analyze+re](http://aplicacionesbiblioteca.udea.edu.co:2055/term/analyzer.uri?sid=40CC97A961AF03D178DEEFD1B47D4A44.FZg2ODcJC9ArCe8WOZPvA:10&origin=resultslist&src=s&s=TITLE-ABS-KEY(tissue+engineering)&sort=plf-f&sdt=b&sot=b&sl=33&count=101394&analyzeResults=Analyze+re)



31. Montoro DT, Wan DC, Longaker MT. Skeletal Tissue Engineering. Principles of Tissue Engineering: Fourth Edition [Internet]. Fourth Edi. Elsevier; 2013. p. 1289–302. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-398358-9.00060-4>
32. Fernandez-Yague MA, Abbah SA, McNamara L, Zeugolis DI, Pandit A, Biggs MJ. Biomimetic approaches in bone tissue engineering: Integrating biological and physicommechanical strategies. Adv Drug Deliv Rev [Internet]. Elsevier B.V.; 2015;84:1–29. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.addr.2014.09.005>
33. Bose S, Roy M, Bandyopadhyay A. Recent advances in bone tissue engineering scaffolds. Trends Biotechnol [Internet]. Elsevier Ltd; 2012;30(10):546–54. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tibtech.2012.07.005>
34. Jian D, Zhang J. Calcium phosphate with well controlled nanostructure for tissue engineering. Curr Appl Phys. 2009;9(3):252–6.
35. Hernández Escalona M, Veranes Pantoja Y, Morejón Alonso L, Llópez Yurell JC. TRENDS IN THE DEVELOPMENT OF COMPOSITE MATRIX FOR BONE. Memorias Conv Int Salud Pública La Habana. 2012;11.
36. Depan D, Surya PKCV, Girase B, Misra RDK. Organic/inorganic hybrid network structure nanocomposite scaffolds based on grafted chitosan for tissue engineering. Acta Biomater [Internet]. Acta Materialia Inc.; 2011 May [cited 2014 Oct 22];7(5):2163–75. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21284959>
37. Wheeler DL, Montfort MJ, McLoughlin SW. Differential healing response of bone adjacent to porous implants coated with hydroxyapatite and 45S5 bioactive glass. J Biomed Mater Res [Internet]. 2001 Jun 15;55(4):603–12. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/1097-4636%2820010615%2955%3A4%3C603%3A%3AAID-JBM1054%3E3.0.CO%3B2-N>
38. Mano JF, Correia CO, Leite ÁJ. Chitosan/bioactive glass nanoparticles scaffolds with shape memory properties. Carbohydr Polym [Internet]. Elsevier Ltd.; 2015;123:39–45. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.12.076>
39. Almubarak S, Nethercott H, Freeberg M, Beaudon C, Jha A, Jackson W, et al. Tissue engineering strategies for promoting vascularized bone regeneration. Bone. Elsevier Inc.; 2016;83:197–209.



CAPÍTULO

II

MARCO TEÓRICO

PRÓLOGO

El tejido óseo como cualquier otro sistema del cuerpo también está propenso a sufrir de enfermedades y traumatismos que afectan su funcionalidad. La industria médica en su constante búsqueda por mejorar los tratamientos de recuperación del hueso ha incursionado en la Ingeniería de Tejidos (IT), la cual es una disciplina que busca ayudar en la reparación del tejido por medio de materiales biocompatibles. Dentro de los materiales más usados con este fin se encuentran dos grandes grupos, los polímeros y los cerámicos debido a que se puede lograr una estructura similar a la estructura natural ósea.

En este capítulo se presentan las generalidades del sistema óseo mostrando sus características y las posibles enfermedades que pueden afectarlo. Además se introduce en el tema de la IT y los materiales usados en el reemplazo óseo, haciendo especial énfasis en el quitosano como material polimérico y el vidrio bioactivo como cerámico, las técnicas de fabricación de estructuras porosas usando ambos materiales y la forma en que estas estructuras pueden caracterizarse para asegurar su posible uso en la regeneración ósea.



1. HUESO

1.1. Generalidades del sistema óseo

El sistema óseo de una persona adulta está compuesto por 206 huesos, este contribuye a dar forma al cuerpo además de desempeñar funciones importantes dentro del mismo. Estas funciones son de tres tipos; inicialmente dar estabilidad y estructura al cuerpo lo que permite la locomoción; proteger los tejidos blandos internos como son corazón, pulmones y cerebro; y finalmente cuenta con una función netamente biológica ya que en las cavidades óseas internas se da la hematopoyesis (generación de células sanguíneas) y el almacenamiento y regulación de iones, principalmente de fósforo y calcio (1).

El hueso es un material compuesto, formado de tejido conectivo duro que se caracteriza por poseer gran resistencia a la compresión y a la tracción. Su composición depende del tipo de hueso que se analiza y su morfología. Según el tipo de hueso se hace referencia al grado de madurez del tejido ya sea primitivo o inmaduro, conocido como fibrilar (fibras desordenadas y células al azar), o hueso regenerado a partir del primitivo, conocido como lamelar (fibras de colágeno organizadas y orientadas en la misma dirección) (2). Respecto a la morfología se refiere a la estructura macroscópica del hueso que comprende dos fases, el hueso trabecular o esponjoso correspondiente al 20 % de la totalidad del sistema óseo y el hueso cortical o compacto en un 80 % (3). La diferencia principal entre ambos tipos de hueso es su porosidad, siendo mayor en el hueso trabecular.

El hueso cortical es el que reside en la superficie, debido a su baja porosidad es más fuerte y pesado en comparación con el hueso trabecular. La unidad funcional del hueso cortical es la osteona, la cual posee una estructura cilíndrica de capas concéntricas llamadas lamelas (4)(2). En la Figura 1 se presenta la anatomía del hueso cortical y trabecular, además que se identifica la osteona.

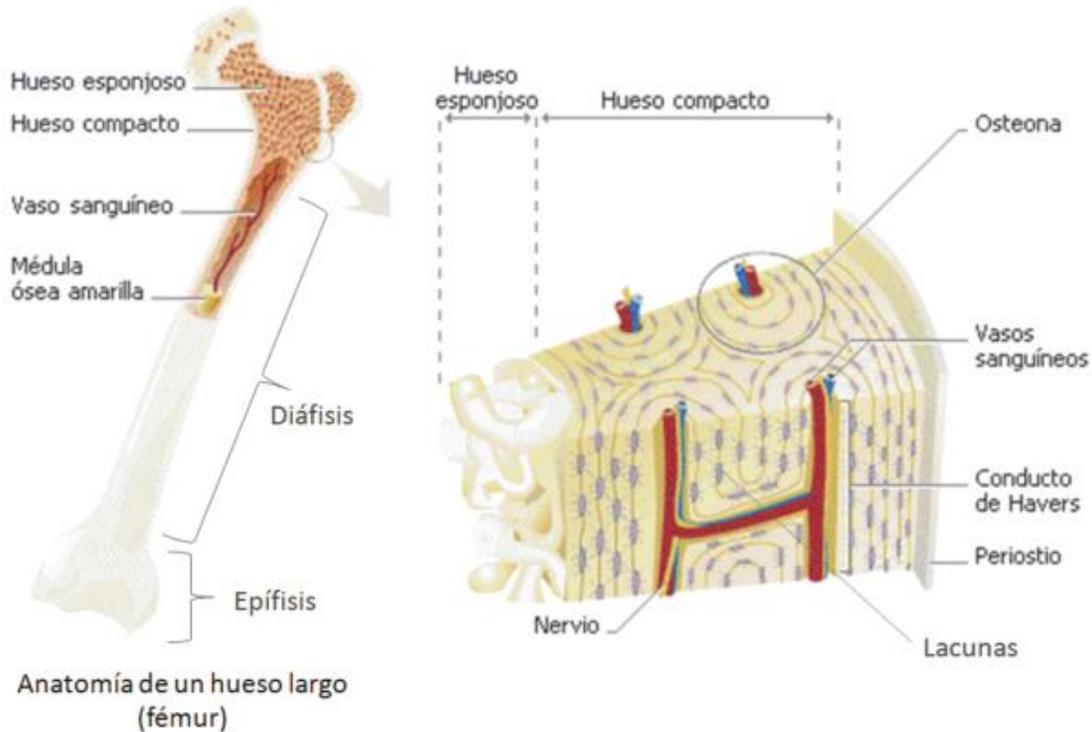


Figura 1. Anatomía hueso cortical y trabecular (3)

Por su parte, el hueso trabecular se encuentra en las vértebras y en los extremos de los huesos largos en la zona articular, tales como el fémur, la tibia y el radio. A diferencia del hueso cortical, la matriz en el hueso trabecular se encuentra organizada en una estructura porosa (90 % o superior de porosidad) tridimensional interconectada conocida como trabéculas; y es debido a esta porosidad que el hueso trabecular posee una menor resistencia mecánica en comparación al hueso cortical. Así como el hueso cortical, el hueso trabecular también tiene una estructura lamelar paralelas a las trabéculas. En la Figura 2 se observa la porción proximal de algunos huesos largos donde contrastan la estructura del hueso trabecular (extremo) y el hueso cortical (diáfisis o zona alargada). Se puede apreciar la transición de hueso cortical a hueso trabecular, además de la orientación de las trabéculas en el fémur que dependen de las trayectorias de los esfuerzos principales (5).



Figura 2. Contraste entre hueso cortical y trabecular en algunos huesos largos (5).

Principalmente el hueso está compuesto por minerales, células, agua y matriz ósea la cual se divide a su vez en sustancia orgánica e inorgánica. La sustancia orgánica comprende primordialmente fibras de colágeno tipo I, proteína blanda y resistente que le confiere propiedades de flexibilidad y elasticidad, además de otros componentes orgánicos en menor cantidad, como son las glicoproteínas o proteínas morfogenéticas. Por su parte, la sustancia inorgánica es una fase mineral compuesta por fosfatos de calcio, en su mayoría Hidroxiapatita (HA) deficiente en calcio, que le otorga al hueso dureza y rigidez (4)(6)(7).

En cuanto al material celular, el hueso se encuentra conformado por cuatro clases de células diferentes; osteoblastos encargados de sintetizar nuevo hueso, osteoclastos causantes principales de la reabsorción ósea, los osteocitos son osteoblastos diferenciados encargados



de mantener la estructura ósea como un tejido vivo y por último se tienen las células de recubrimiento que sirven para recubrir el hueso (periostio), no se conoce su metabolismo aunque se dice que pueden ser precursoras de osteoblastos (1)(5)(8)

En la Figura 3 se esquematiza la proporción de los componentes generales del hueso. Se observa que la fase orgánica corresponde a un 30% del total. De esta cantidad, 2% corresponde a las células óseas (osteoblastos, osteocitos, osteoclastos) y el 98% restante pertenece a la matriz extracelular compuesta por colágeno (95%) y otras proteínas (5%). Por su parte, la fase inorgánica se encuentra compuesta principalmente por HA (95%) y lo restante es apatita carbonatada y pequeñas cantidades de magnesio, sodio, potasio, fluoruro y cloruro (9)(5).

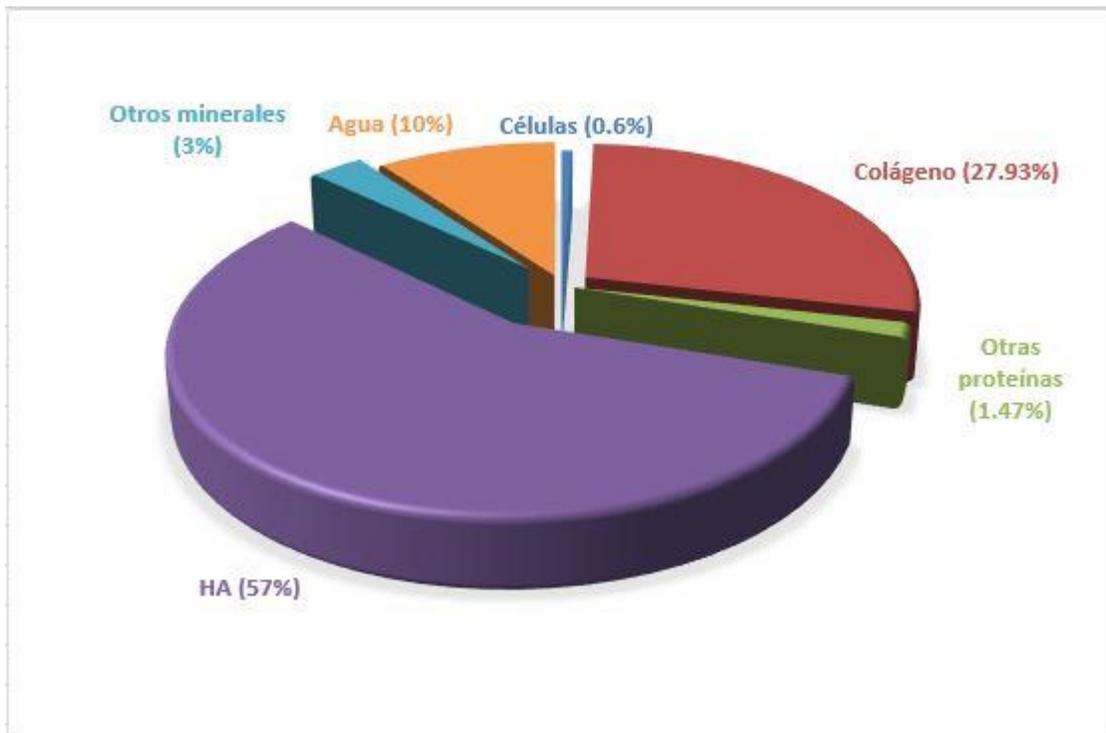


Figura 3. Composición ósea (Edición propia (9))



Las propiedades biomecánicas del hueso están determinadas por su composición y estructura a diferentes escalas. Es decir, posee un comportamiento anisotrópico y viscoelástico, debido a que su comportamiento mecánico es sensible a la velocidad de deformación y al tiempo de aplicación de la carga (5)(10).

Son pocos los estudios que se han realizado sobre las propiedades mecánicas del hueso trabecular en comparación con el hueso cortical, ya que su densidad ósea es muy baja debido a la alta porosidad, por lo cual se presentan altas variaciones en dichas propiedades. Sin embargo, los valores de resistencia mecánica y módulo elástico son similares tanto en tracción como en compresión, presentando una variación para la resistencia mecánica entre 5 y 10 MPa y entre 4 y 17 GPa para el módulo elástico (1)(11)(8). También se ha determinado que el hueso trabecular, gracias a su rica estructura interna, soporta hasta un 7% de deformación, mientras que el hueso cortical logra tan sólo 2 % antes de fracturarse (3).

En la Tabla 1 se presentan las propiedades mecánicas del hueso cortical a tensión y compresión tanto longitudinal como transversal, también el coeficiente de Poisson y la resistencia a cizalladura. Las propiedades mecánicas del hueso varían según el tipo de sollicitud mecánica a las que se vea enfrentado, por lo cual es necesario tener un conocimiento de este comportamiento ya que esto define cómo deben ser los materiales que se usen para el reemplazo óseo cuando se presentan daños que el organismo no pueda reparar por sí mismo.

Tabla 1. Propiedades mecánicas del hueso cortical (5)

Parámetro	Valor
Módulo de Young (GPa)	
Longitudinal	17.0
Transversal	11.5
Cizalladura	3.3
Coeficiente de Poisson	0.3-0.6
Resistencia a la rotura: Longitudinal (MPa)	



Tensión	133
Compresión	193
<hr/>	
Cizalladura	68
<hr/>	
Resistencia a la rotura: Transversal (MPa)	
Tensión	51
Compresión	133
<hr/>	

El sistema óseo es un tejido de tipo conectivo que se desarrolla a través de un proceso llamado osteogénesis. Durante la formación inicial del hueso o reparación de fracturas aparece lo que se conoce como hueso primario o tejido óseo, el cual está caracterizado por ser de tipo esponjoso e inmaduro. Este tejido primario es posteriormente reemplazado por hueso secundario a excepción de las suturas en el cráneo y hueso alveolar en el maxilar y la mandíbula (12). El hueso primario puede desarrollarse por dos métodos, osificación intramembranosa u osificación endocondral (12)(13):

- Osificación intramembranosa: El proceso toma lugar dentro de la membrana como condensaciones mesenquimales (tejido conectivo primario compuesto principalmente por células mesenquimales), estas células empiezan a diferenciarse en osteoblastos los cuales empiezan un proceso de síntesis y secreción de osteoide. Este punto inicial de formación ósea se conoce como centro de osificación primaria. De esta manera, los cristales de fosfato de calcio son posteriormente depositados en el osteoide modificando la matriz ósea. Los osteoblastos entonces se rodean de esta matriz ósea para formar espículas que se fusionaran luego en el entramado esponjoso del hueso primario diferenciándose así en osteocitos y dando lugar a la osteogénesis logrando de esta forma la formación de cavidades para la médula ósea (2)(12). El tejido mesenquimal dentro de las cavidades de las espículas participan a su vez en la formación de médula ósea.



La mayoría de los huesos del cráneo así como otros huesos tales como la escápula y la clavícula son formados a través de la osificación intramembranosa (13).

- **Osificación endocondral:** Este proceso comprende la formación inicial de cartílago hialino y su posterior reemplazo por tejido mineralizado. Este tipo de formación ocurre en todos los huesos excepto en aquellos de tipo membranoso. La osificación endocondral no solo está limitada a ocurrir durante la etapa embrionaria, también se encuentra involucrado en los procesos de reparación ósea. Así como en la osificación intramembranosa, la osificación endocondral inicia con condensaciones mesenquimales; sin embargo, estos no se diferencian en osteoblastos sino en condroblastos. Estos condroblastos forman una matriz cartilaginosa que envolverá las células para su posterior diferenciación en condrocitos (13)(12). De esta forma se genera un tejido cartilaginoso que se conoce como cartílago modelo, el cual servirá como plantilla para la generación de hueso. Una vez formado, el cartílago modelo se verá invadido por una mezcla de células en su centro y posteriormente en los extremos para así establecer los centros de osificación primario y secundario, respectivamente (14). Debido a la formación del centro de osificación primario los condrocitos atraviesan por un estado de hipertrofia hasta calcificarse completamente lo que limita el transporte de nutrientes y desechos provocando así que se vean sometidos por el proceso de apoptosis. Estos condrocitos muertos y parte de la matriz calcificada son removidos por condroclastos (células semejantes a osteoclastos), generando túneles en el centro del hueso que se está formando lo que se convierte en la primera cavidad para la médula ósea. Una pequeña cantidad de vasos sanguíneos y tejido perivascular provenientes del periostio invaden las cavidades de la médula ósea llevando consigo células osteoprogenitoras y células madre de médula ósea para así continuar con la generación del tejido mineralizado. Los centros de osificación van invadiendo gradualmente el cartílago remanente, a excepción de las zonas articulares, hasta reemplazarlo completamente por tejido óseo (12)(14). En la Figura 4 se esquematiza la osificación endocondral durante cada una de las etapas.

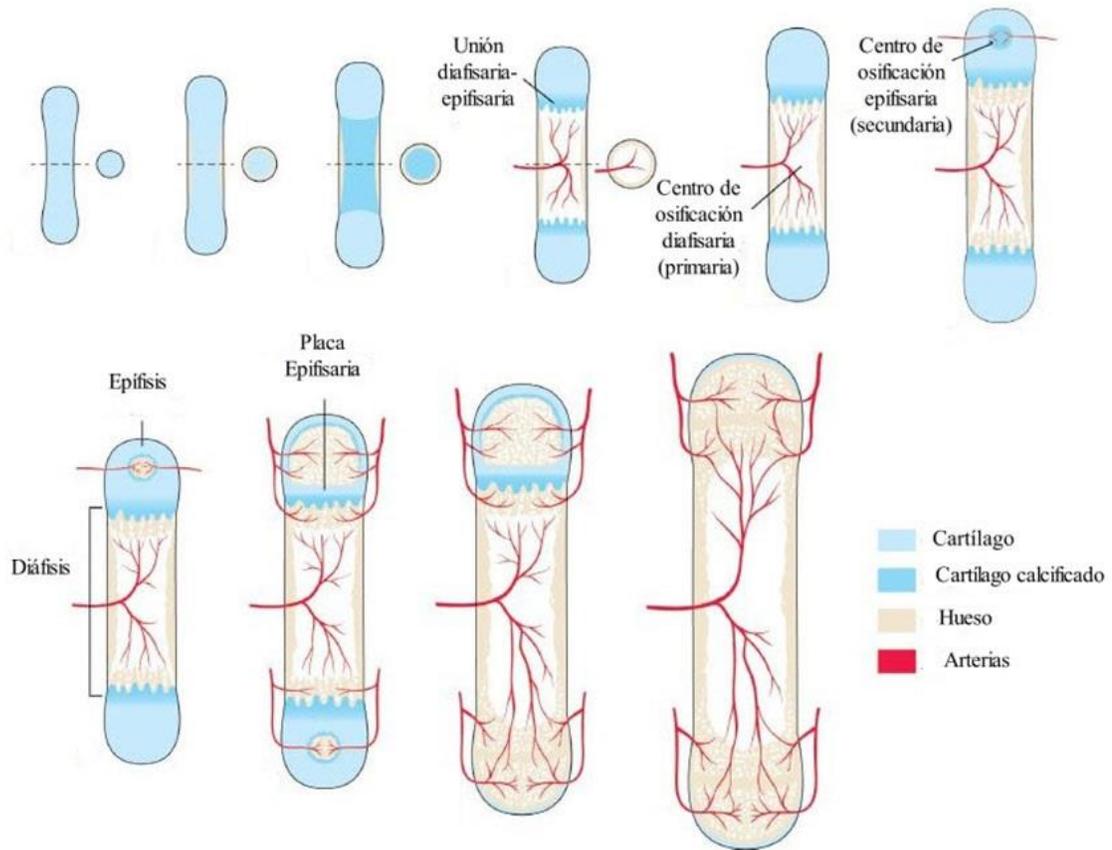


Figura 4. Etapas de la osificación endocondral (Adaptado de (13))

El hueso que se forma sea por vía endocondral o intramembranosa se conoce como hueso primario el cual posteriormente será reemplazado por hueso secundario que es el que finalmente hará parte del sistema óseo adulto. Sin embargo, este hueso secundario no permanece igual durante todo el ciclo de vida de una persona; el sistema óseo, siendo un material vivo, se encuentra en constante cambio. Los cambios que se producen en el hueso son llevados a cabo por dos mecanismos diferentes (13):

- La modelación ósea: Se define como la formación de hueso por los osteoblastos o reabsorción mediada por los osteoclastos de una superficie dada. La modelación ósea busca mantener o alterar la forma del hueso, además de incrementar la masa ósea. Este modelado ocurre en dos etapas, activación y formación o resorción. Durante la activación se reclutan células precursoras que se diferencian en osteoblastos u osteoclastos maduros. Por su parte, las células de revestimiento óseo pueden también

estimularse para diferenciarse en osteoblastos maduros y activos que producirán matriz (13)(15).

La segunda parte que consiste en la formación o resorción ósea está mediada por los osteoblastos los cuales se encargan de agregar nuevo hueso en la superficie endocortical. Por su parte, el modelado por resorción se encuentra dirigido por los osteoclastos los cuales se encargan de remover hueso en la superficie periostial. De este modo, el modelado por formación y el modelado por resorción son localmente independientes y no ocurren al mismo tiempo; aun así, a nivel global debe ocurrir simultáneamente en todo el esqueleto ya que de ello depende la forma final del hueso (13)(15).

En la Figura 5 se ejemplifica la modelación ósea, tanto la modelación por formación como la modelación por resorción.

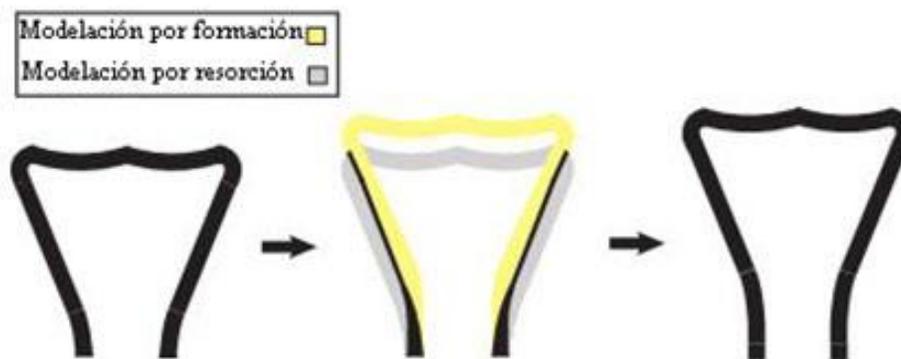


Figura 5. Esquema modelación ósea (Adaptado de (13))

- La remodelación ósea: La modelación ósea ocurre principalmente durante la gestación y la infancia, llegando a ser hasta 200 veces más rápido en un niño que en un adulto (16). En los adultos por su parte, el esqueleto también es regenerado por un proceso conocido como remodelación ósea.

La remodelación involucra las actividades celulares localizadas coordinadas para la resorción y formación de hueso mediadas por osteoclastos y osteoblastos, respectivamente (16)(13). Este es el mecanismo que el cuerpo realiza para reemplazar matriz ósea y la reparación de daños pequeños (microfracturas), lo que permite la renovación del esqueleto en el tiempo. La remodelación ósea se presenta en cualquiera de las cuatro superficies óseas: perióstica, endocortical, trabecular e intracortical (13). Cuando se presenta la remodelación intracortical, grupos de osteoblastos y osteoclastos migran a través de la matriz, juntos con vasos sanguíneos asociados forman estructuras que se conocen como unidad ósea multicelular (BMU

por sus siglas en inglés), dando como producto final una osteona. Por su parte, la remodelación endocortical no incluye vasos sanguíneos por lo que el producto final es una *hemiosteona* (13).

En la Figura 6 se esquematizan las fases por las que atraviesa el tejido óseo durante el proceso de remodelación.

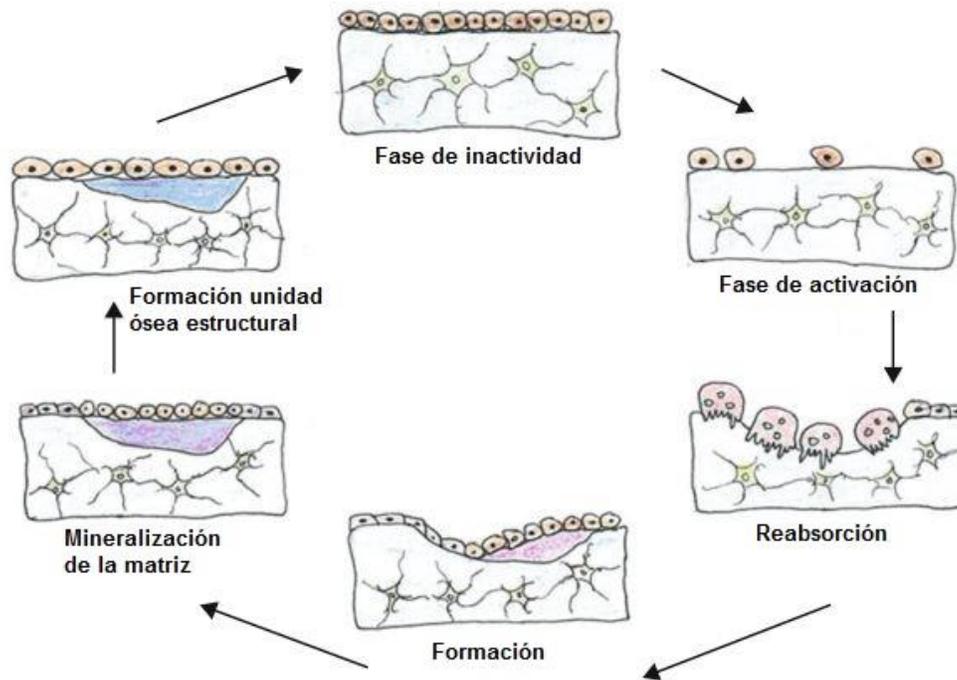


Figura 6. Esquema remodelación ósea (Adaptado de (17))

1.2. Traumatología del hueso

A pesar de su gran resistencia, el hueso como cualquier otro sistema vivo también sufre de traumatismos y enfermedades que disminuyen su funcionalidad. Dentro de las más comunes y más complejas para tratar se encuentra la osteoporosis.

La osteoporosis es una enfermedad degenerativa que se caracteriza por baja masa y deterioro en la estructura ósea, lo que lleva a una fragilidad en el hueso y un aumento en el riesgo de fractura. La relevancia clínica de la osteoporosis radica en las fracturas que resultan cuando el hueso se encuentra deteriorado (18)(19).

En Colombia se estima que se producen entre 8000 y 10000 fracturas de cadera anualmente causadas por osteoporosis (20).

El tejido óseo también puede verse afectado por cáncer e infecciones que pueden provocar fracturas; incluso tumores benignos como el Osteoma Osteoide que deben ser removidos del tejido dejando grandes daños en el tejido sano. Esta enfermedad afecta principalmente los



huesos largos generando dolor e incomodidad; además, afecta a personas de todas las edades pero principalmente a niños y jóvenes (21). Existen muchas otras enfermedades óseas, unas más complejas que otras, pero en su mayoría provocan fracturas y disminución de masa en el hueso, lo que las hacen de mucho cuidado y por lo tanto de difícil recuperación.

Para el tratamiento del tejido óseo convencionalmente se hace uso de trasplantes; estos pueden ser de tipo autólogo, el cual consiste en tomar tejido óseo del paciente de otra zona del cuerpo diferente de dónde se requiere el tratamiento, generalmente de cresta ilíaca, este tejido óseo es luego implantado en la zona afectada. Otro tipo de tratamiento es el alogénico que toma tejido óseo de un cadáver de la misma especie y se trasplanta al paciente. Los implantes de tipo xenogénicos toman tejido óseo de diferente especie y se implantan en el paciente y materiales sustitutos (metales, polímeros, cerámicos) (22).

Sin embargo, todas estas técnicas presentan diferentes riesgos y desventajas, ya que en el caso de los autólogos o xenogénicos se trata de tejido vivo; se corre el riesgo de infecciones en la zona de la cual se extrae el implante (autólogos), o que también se presente rechazo por incompatibilidad. En el caso de los alogénicos, el tejido ya no se encuentra vivo por lo cual no posee células osteoprogenitoras y también puede presentarse rechazo del implante. Finalmente, el uso de materiales en el reemplazo del hueso también presentan varios inconvenientes ya que estos no cambian su forma en respuesta a diferentes cargas y con el tiempo no se remodelan (22)(23).

Es debido a la necesidad de tratamientos que suplan las necesidades en la medicina regenerativa, lo que dio pie para el surgimiento de una nueva disciplina conocida como Ingeniería de Tejidos, ya que combina principios ingenieriles, biológicos y bioquímicos en la producción de nuevos biomateriales que trabajen en conjunto con material biológico natural (células). De este modo, con la ingeniería de tejidos se busca producir matrices de crecimiento celular (scaffolds) altamente porosas y biodegradables (24), que cumplan con la característica de bioabsorbabilidad, para que una vez implantado en la zona de la lesión, permita el crecimiento celular de tejido nuevo y se reabsorba, evitando una nueva cirugía para su extracción.

2. INGENIERÍA DE TEJIDOS

La Ingeniería de Tejidos (IT) es un campo interdisciplinario que emerge a partir del campo de los biomateriales, y se refiere a la práctica de combinar plataformas de crecimiento celular (scaffolds) con células y moléculas biológicas activas con el fin de crear tejidos vivos y funcionales (25). El objetivo de la práctica de IT es de restaurar, mantener o mejorar el daño ocasionado al tejido u órganos. Entre los elementos clave para la IT se tienen los scaffolds, las moléculas de señalización y los diferentes tipos de células; estos tres deben permanecer en un ambiente físico-químico apropiado para favorecer la regeneración del nuevo tejido,

teniendo en cuenta el tiempo de generación que debe ser comparable con el tiempo de degradación del scaffold. Estos elementos se esquematizan en la Figura 7.

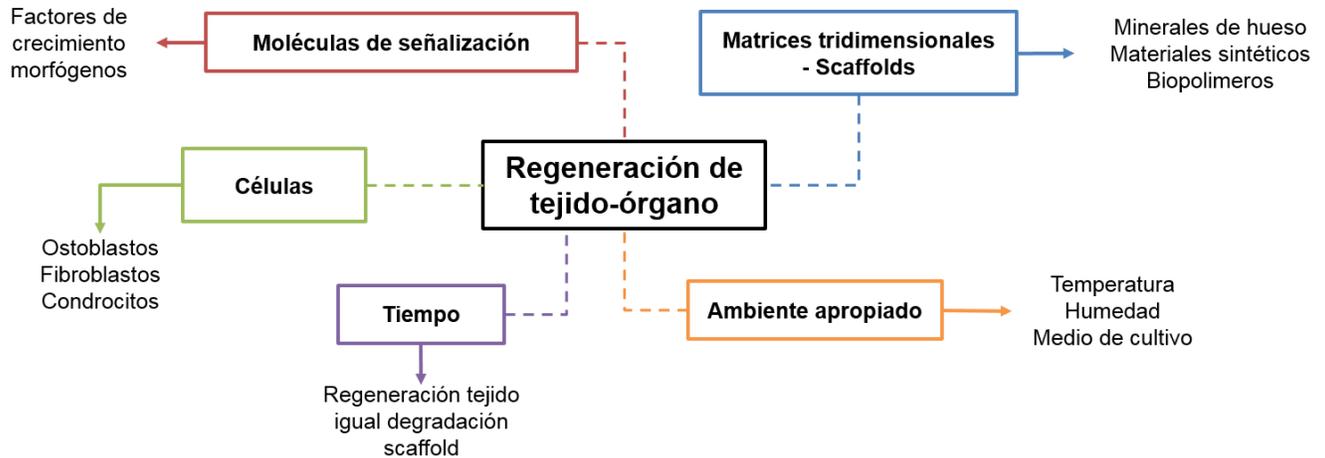


Figura 7. Elementos clave de la IT (Adaptado de (22))

La IT es un campo de estudio que cada vez adquiere mayor importancia, ya que permite ofrecer una alternativa de tratamiento más biocompatible, además que no tiene una disponibilidad limitada. Esta se basa en principios ingenieriles, químicos y biológicos; particularmente la IT del sistema óseo combina el estudio de ingeniería en el hueso y la mecánica de éste, conocida como biomecánica junto con biología celular, molecular y morfogénesis (26). Algunos enfoques de la IT recae en la regeneración guiada de tejidos donde se usan materiales para ayudar a que células huésped y tejidos crezcan, otro de los enfoques es implantar células junto con el material donde éstas están ancladas (27).

2.1. Plataformas de crecimiento celular

Los biomateriales usados en IT pueden presentar distintas morfologías, una de las estructuras más conocidas son las llamadas plataformas de crecimiento celular o scaffolds. Estas plataformas son construcciones tridimensionales que dan soporte a las células para que éstas puedan proliferar, diferenciarse y mantener sus funciones biológicas de forma que pueden llevar a cabo la expresión genética necesaria. Existen dos formas de uso para los scaffolds, la primera es el crecimiento celular en la plataforma *in vivo*, es decir, la plataforma es implantada directamente en la zona de la lesión para que a través de ella se dé el crecimiento celular y se repare el tejido. La segunda se basa en la colonización celular previa del scaffold bajo condiciones *in vitro*, para luego ser trasplantadas al paciente (22).



Los scaffolds proveen una estructura 3D ideal para promover los mecanismos de reparación y formación de nuevo tejido en el hueso (28). Estos deben cumplir con ciertas propiedades según la aplicación para la cual se fabriquen. En el caso de la IT óseo se busca que el scaffold promueva el crecimiento de células osteogénicas en toda la estructura, por lo tanto es necesario que la matriz posea un tamaño de poro con diámetro mínimo de 100 μm (28). Además del tamaño de poro, el porcentaje de porosidad en el scaffold también debe ser apropiado de forma que sea similar al porcentaje de porosidad que presenta el hueso, idealmente la del hueso trabecular (50-90%) (29). Sin embargo, obtener un tamaño de poro y una porosidad adecuadas no es suficiente; esta red porosa debe estar interconectada de forma que permita la difusión de nutrientes a través del scaffold y por consiguiente a través del hueso que se está formando (28).

A parte de las propiedades morfológicas nombradas, los scaffolds deben poseer propiedades mecánicas comparables con las del hueso adyacente, es decir, que soporten las mismas cargas que resiste el hueso natural, deben ser osteoconductores y osteoinductores con el fin de que se favorezca la adhesión de células madre mesenquimales y su posterior diferenciación en células óseas; así mismo, deben ser biodegradables para que una vez formado el tejido el scaffold no deje ningún rastro en el cuerpo humano sin provocar efectos secundarios (30).

Algunas de estas propiedades, especialmente las propiedades mecánicas no solo son aportadas por los materiales seleccionados en la fabricación de los scaffolds sino que son una combinación del material, la geometría del scaffold, la incorporación de compuestos agregados y la técnica de fabricación (31). Es por ello que las técnicas usadas se eligen según el tipo de material y las propiedades que se desean en el scaffold.

Las técnicas de fabricación deben asegurar que no se modifique el material química o físicamente, asegurando que no se vean afectadas sus características como biomaterial. Aunque son varias las técnicas de procesamiento de scaffolds, hay algunas que sobresalen más que otras, tales como el electrospinning, el prototipado rápido, la liofilización, entre otras.

Dentro de los métodos más empleados para la fabricación de scaffolds poliméricos o compuestos se encuentran el electrospinning o electrohilado. A través de esta técnica se consiguen estructuras formadas por fibras con diámetros que van desde los nanómetros hasta los submicrómetros logrando imitar la morfología de la matriz extracelular natural (31).

Otra de las técnicas empleadas es el prototipado rápido, esta técnica permite la fabricación de materiales con estructuras complicadas que son modeladas con CAD y luego creadas capa por capa en una estructura tridimensional (31).

Sin embargo la técnica más empleada para la fabricación de estructuras de matriz polimérica es la liofilización (28–30). Esta técnica emplea soluciones a base del polímero, la cual se deposita en un molde de dimensiones específicas, que se congela siendo una condición necesaria para que permanezcan secas a baja temperatura. Después de la congelación, el

producto es ubicado en un compartimiento donde se hace el vacío. Esto permite al solvente congelado eliminarse por sublimación al aplicarse vacío y bajas temperaturas durante el proceso (29). El material no sublimable queda en un estado seco generando un material poroso, donde el tamaño del poro y su interconectividad pueden ser controlados variando los parámetros de liofilizado (31). En la Figura 8 se esquematiza el proceso de liofilizado, donde la muestra congelada es puesta en un recipiente al cual se le aplica vacío. La solución que es sublimada cae en un recipiente donde se encuentra una trampilla para así evitar su liberación al ambiente (32). Entre las grandes ventajas de la liofilización se encuentra que las sustancias al estar localizadas en una matriz de hielo no interactúan entre sí y el producto final es idéntico al original pero sin contenido líquido, por otro lado, se pueden generar estructuras con una porosidad lamelar similar a la estructura natural del hueso.

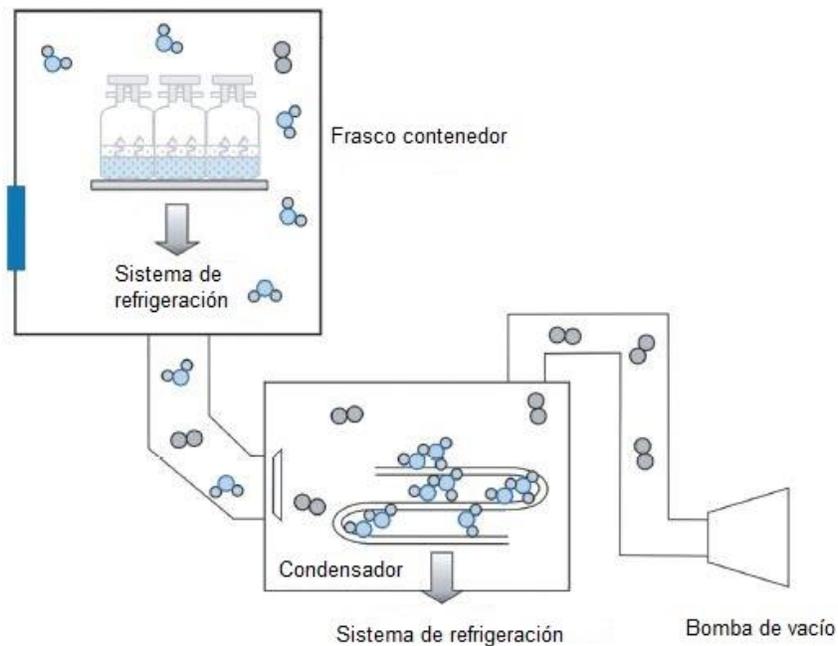


Figura 8. Esquema proceso de liofilizado (Adaptado de (33))

2.2. Biomateriales usados en la fabricación de scaffolds

Los materiales que se usan en la IT deben cumplir con ciertas características como son la biocompatibilidad, porosidad, tamaño de poro adecuado, osteoinductividad, biodegradabilidad, propiedades mecánicas, etc. (22)(26). En la actualidad los biomateriales que hacen parte de la investigación en el campo de la IT son de tipo natural, sintético o híbridos, además que son modificados con el fin de que permitan la compatibilidad con tejido vivo o con células vivas *in vitro* e *in vivo* (27). Principalmente los scaffolds para uso en hueso se fabrican híbridos con el fin de asemejarse mejor a la estructura natural ósea. Estos



scaffolds cuentan con una matriz polimérica como el colágeno o el quitosano, y un refuerzo cerámico como la hidroxiapatita o los vidrios bioactivos.

2.2.1. Vidrio bioactivo

Algunos de los materiales cerámicos presentan una similitud química con el hueso por lo cual son ideales en la aplicación de regeneración ósea. Dentro de los materiales cerámicos más usados encontramos la HA, un cerámico osteofílico que hace parte del hueso como componente inorgánico (34). La HA puede fabricarse como un precipitado de varios precursores como son el nitrato de calcio y el fosfato de amonio (35). Muchos de los estudios en IT se enfocan en el uso de HA sintética debido a su similitud con la fase mineral ósea, además es un material que favorece la osteoconducción, lo que quiere decir que su superficie permite la adhesión de osteoblastos, proliferación y diferenciación (31).

Otro de los cerámicos usados son los vidrios bioactivos. Los vidrios bioactivos son un grupo de materiales cerámicos que nacieron ante la necesidad que un médico y coronel del ejército americano le planteó a L. Hench -un reconocido profesor de la Universidad de Florida que realizaba estudios sobre vidrios resistentes a la radiación gamma- sobre usar vidrios en el reemplazo de tejido óseo debido a los problemas que presentaban los materiales usados hasta el momento. De esta manera fue como Hench logró desarrollar un vidrio biocompatible que cumplía con la relación Ca/P presente en el hueso. Los experimentos lograron mostrar que al incorporar 6% p/p de fósforo a la composición de vidrio permitía que se generara una capa bioactiva sobre este material en presencia de fluidos fisiológicos (36)(37).

Hoy en día según varios estudios, el uso de los vidrios bioactivos resulta ser un avance muy prometedor en comparación con la HA, ya que si bien este material está presente en el hueso, a diferencia de lo que se creía, es la sílice y no el calcio el elemento clave para la mineralización ósea (26).

Los vidrios bioactivos en presencia de fluido simulado (SBF por sus siglas en inglés) generan en su superficie una capa de hidroxiapatita carbonatada (HCA) deficiente en calcio. Hench junto con sus colaboradores sugirieron una reacción en secuencia de cinco pasos que describen la formación de HCA como se observa en la Figura 9 (38). Los primeros tres pasos involucran reacciones entre la superficie del vidrio y el SBF, seguidos por la rotura de los enlaces Si-O-Si lo que favorece la formación de grupos Si-OH y re-polimerización. En la etapa 4 se presenta la formación de un fosfato de calcio amorfo (ACP) seguido por cristalización en la etapa 5 provocando la formación de HCA lo que involucra la adquisición de iones adicionales (38).

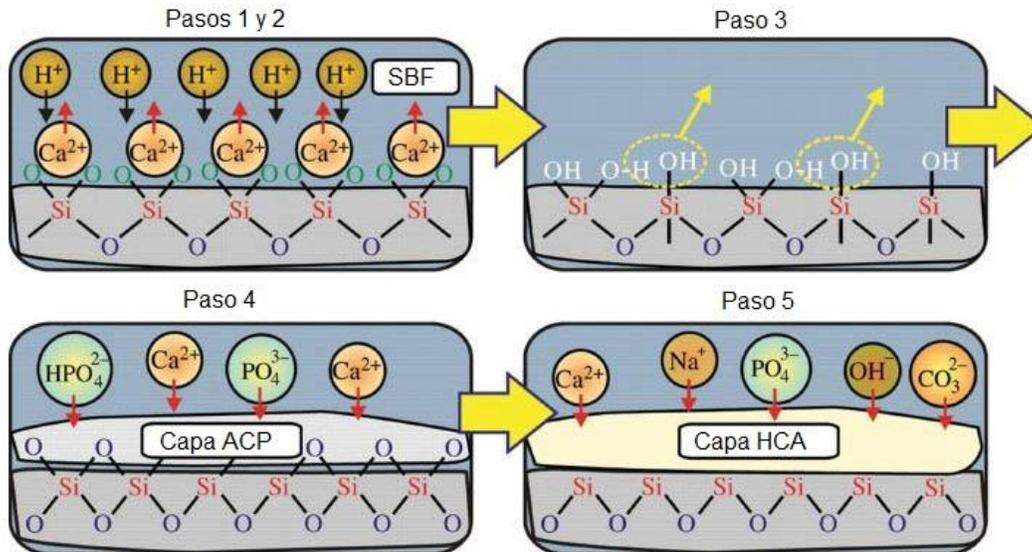


Figura 9. Ilustración esquemática de la secuencia de reacción entre la superficie de vidrio bioactivo y SBF (Adaptado de (38))

Conociendo el hecho de que el vidrio bioactivo favorece la formación de una capa bioactiva en su superficie con características similares a las del hueso, lo que permite su unión con el tejido circundante, se han realizado varios estudios en fabricación de scaffolds con este material para la IT del sistema óseo solo o en compuesto con materiales poliméricos en los recientes años. Dentro de estos trabajos se encuentra el estudio hecho por Li *et al.* (2014) (24) al trabajar con un tipo de biovidrio 45S5 recubiertos por polímeros mejorando la rigidez del scaffold con la ayuda de esos recubrimientos; o el estudio realizado por Cao *et al.* (2008) (39) que combinó el biovidrio con otro cerámico, la wollastonita, además usó quitosano como refuerzo logrando aumentar la resistencia a la compresión.

Sin embargo, todos los estudios hasta el momento usan la formulación original de Hench ya que es la única con la que se logra una mejor bioactividad, por lo cual se está trabajando en nuevas formulaciones con menor precio - por ejemplo en el caso de la técnica de sol-gel que disminuye la temperatura necesaria de formación de vidrio bioactivo disminuyendo el costo de producción del mismo - y que se logre la misma eficiencia que se logra con el biovidrio 45S5.

- Fuentes de suministro de sílice para la síntesis de vidrio bioactivo**

Para lograr nuevas formulaciones de vidrio bioactivo se debe estudiar el uso de diferentes fuentes de silicio. Generalmente los vidrios bioactivos se están produciendo por la técnica de sol-gel ya que es más eficiente y permite obtener tamaños menores de partículas (37). Con esta técnica se suele usar como fuente de silicio el TEOS (tetraetil ortosilicato) y recientemente se usa el TMOS (tetrametil



ortosilicato) como fuente de sílice. Ambos son reactivos que generan un precipitado de SiO_2 lo que con la adición de una fuente de calcio y una de fosfato forma un vidrio bioactivo.

Sin embargo la industria sigue buscando nuevas fuentes de silicio que no sólo tengan como finalidad la producción del cerámico, sino también disminuyan los costos de producción y que posean un mayor impacto ambiental, dentro de estas fuentes se cuenta con las fuentes naturales.

Las fuentes naturales poseen en su estructura cuerpos de SiO_2 puro que pueden ser extraídos por diferentes metodologías. Estas fuentes naturales generalmente son subproductos de distintas industrias, como lo es la obtención de aceite de palma, la producción de arroz o incluso algo tan simple como lo es la comercialización de coco listo para consumir. El uso de estos desechos agroindustriales no solo disminuye los costos en la producción de nuevos materiales sino que genera un impacto positivo sobre el medio ambiente (40)(41).

El raquis o bagazo de palma africana es un material lignocelulósico obtenido como subproducto de desecho de las plantas de producción de aceite de palma. Representa aproximadamente el 45% del total de la palma procesada; de esta cantidad solo alrededor de un 10% es utilizada quedando una gran cantidad como desperdicio con impacto ambiental negativo (42). Se han propuesto varios proyectos para la extracción de materiales orgánicos presentes en el bagazo como son la lignina, la celulosa y la hemi-celulosa, obteniéndose muy buenos resultados en la obtención de dichos polímeros (43)(44), pero en estos procesos queda como residuo una cantidad de óxido de silicio puro que no es aprovechado (45), por lo cual puede ser una buena fuente para la producción de vidrio bioactivo.

Otro de los grandes desechos en agroindustria son las cáscaras de cocos. Inicialmente solo se calcinaba para que su eliminación fuera más sencilla; sin embargo, recientemente se utiliza como fuente de energía en algunas máquinas debido al alto precio en los combustibles (41). Se ha encontrado que estas cáscaras poseen en su estructura grandes cantidades de sílice y alúmina, los cuales son cerámicos con abundantes aplicaciones en la industria.

La cascarilla de arroz por su parte, es un desperdicio de la industria del arroz, la cual solo ha sido usada para aplicaciones de bajo valor a pesar de su alta producción. En años recientes este desperdicio se ha usado como fuente de energía en molinos o incluso para iluminar casas en zonas rurales. Sin embargo, al carbonizar la cascarilla se genera un subproducto conocido como RHA (ceniza de cáscara de arroz) que es dañino para el ser humano debido a las altas concentraciones de sílice, por lo que investigaciones se han enfocado en el aprovechamiento de esta fuente en distintas industrias como lo es la producción de chips de sílice, síntesis de carbón activado y



sílice, captura de carbono, entre otras (46). Es debido a esta alta cantidad de sílice que este material se ve prometedor para la síntesis de vidrio bioactivo.

En la Tabla 2 se muestra una comparación de la cantidad de sílice en las cenizas de raquis de palma africana, cáscara de coco y cascarilla de arroz según varios autores en unidades de porcentaje de masa.

Tabla 2. Porcentaje de sílice en las cenizas de algunas fuentes naturales

Fuente	% SiO ₂	
Raquis de palma	34-50%	(47)
Cascarilla de arroz	80-96%	(48)(46)
Cáscara de coco	± 45%	(41)

▪ **Técnicas de fabricación de vidrio bioactivo**

Existen dos técnicas para la síntesis de vidrios bioactivos, la técnica por fusión sigue una vía de reacción en estado sólido que se consigue llevando los polvos precursores a altas temperaturas (por encima de 1300°C) en crisoles de platino (37). Por su parte la técnica sol-gel se realiza por medios húmedos logrando conformar la red en un vidrio bioactivo a temperatura ambiente. Ambas técnicas no solo difieren en el proceso, sino también en el resultado; con la técnica de sol-gel se obtienen polvos finos y homogéneos, con alta porosidad y rugosidad, aumentando así el área superficial disponible lo que es de gran importancia en aplicaciones biológicas ya que permite una mayor interacción con los fluidos y células (49). Las primeras etapas de la técnica involucran procesos de hidrólisis y policondensación que llevan a la creación de redes inorgánicas en forma de una suspensión de partículas coloidales en un medio líquido (sol) (50). Posteriormente esta solución sufre un proceso de gelación, donde las partículas se unen entre sí formando una red sólida coloidal con una fase líquida (gel). A este proceso puede seguirle una etapa que permite que aquellos aglomerados de crecimiento lento puedan unirse a la red, un proceso conocido como envejecimiento. Finalmente, según cuál sea la finalidad del proceso, es posible realizar un proceso de secado para eliminar el agua remanente dando lugar a la formación de un polvo seco con partículas finas conocido como xerogel (49). Los vidrios bioactivos sintetizados por esta técnica deben pasar por un proceso adicional para estabilizar la estructura, esto se consigue con un calcinado entre 600 y 700°C (51). En la Figura 10 se presenta el esquema general del proceso

por Sol-Gel y los distintos productos que se pueden obtener por medio de esta técnica.

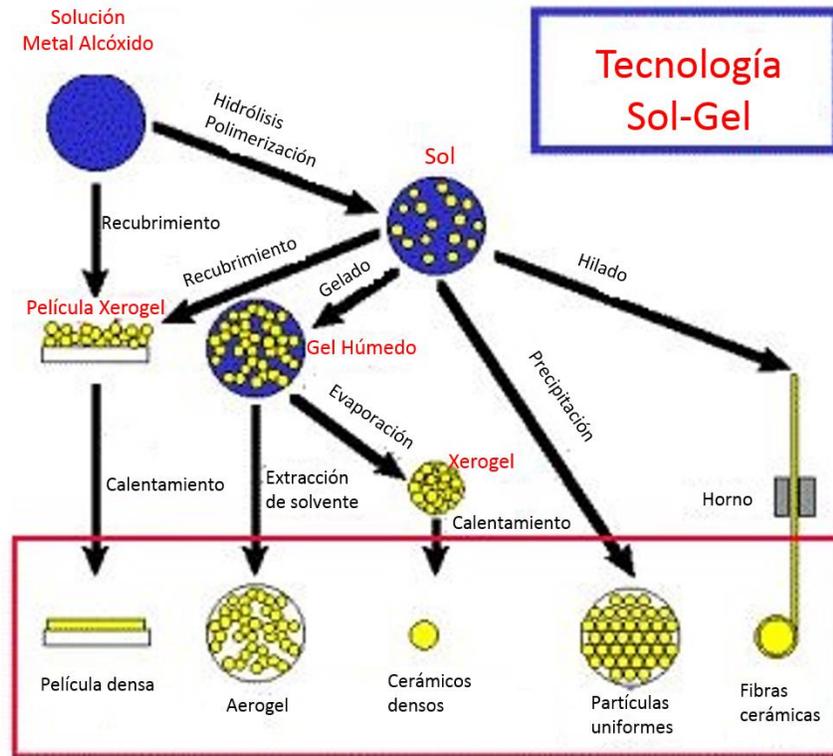


Figura 10. Esquema proceso Sol-Gel (Adaptado de (52))

2.2.2. Quitosano

Un gran grupo de materiales usado en medicina son los polímeros, sin embargo, por sí solos no son muy efectivos en el tratamiento óseo debido a que no poseen resistencia comparable al hueso; pero esa deficiencia no ha impedido que puedan usarse para fortalecer otros materiales. Como se mencionó anteriormente, el hueso cuenta dentro de su composición con fibras de Colágeno tipo I que le confieren propiedades de elasticidad (53). Sin embargo, no es tan fácil el uso de colágeno debido a que para obtenerlo es necesario extraerlo de tejido animal por lo que su disponibilidad es reducida; es por ello que se busca utilizar otro tipo de biopolímeros.

Dentro de los biopolímeros se encuentran los que son sintéticos como la policaprolactona o naturales como la celulosa y el quitosano (26).



El quitosano es un heteropolisacárido lineal compuesto de cadenas distribuidas aleatoriamente, en la Figura 11 se presenta un esquema de la estructura del quitosano. Este material es un biopolímero que se puede obtener a partir de caparazones de crustáceos, del exoesqueleto de algunos insectos y de hongos. Se obtiene a partir de la desacetilación de la quitina, además posee mejores propiedades de reactividad y solubilidad que esta. El quitosano se obtiene al sustituir los grupos acetamido de la quitina por grupos amino a través de un tratamiento con álcalis fuertes (54). Es un material biocompatible, biodegradable y permite la osteoconducción (55); además cuenta con una actividad antibacteriana intrínseca (56). Adicionalmente el quitosano es reconocido por ser un polímero catiónico lineal, de alto peso molecular y amigable con el ambiente. Posee una solubilidad alta en soluciones de ácidos diluidos (54) y se dice que el anclaje de las células y su proliferación sobre este material está relacionada a la estructura química y física que posee el quitosano (57). Además es más económico en comparación con otros biopolímeros como el colágeno debido a su alta disponibilidad (58).

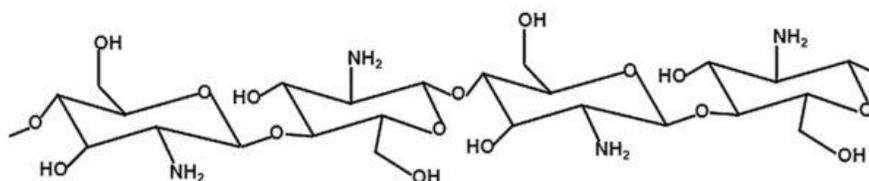


Figura 11. Estructura del quitosano (59)

Muchos autores han propuesto el uso de quitosano en IT en respuesta a las características favorables y propiedades anteriormente descritas; sin embargo Kong *et al.* (2006) (60) dicen que éste por sí solo no es el material ideal para esta aplicación debido a que es necesario mejorar su bioactividad. A pesar de esta dificultad, Anitha *et al.* (2014) (59) plantearon las ventajas de usar el quitosano en aplicaciones médicas, ya que es un material que posee buena habilidad para ser hidratado lo que favorece el crecimiento y la adhesión celular, los scaffolds fabricados con este material presentan canales abiertos con interconectividad variable dependiente de la técnica de fabricación que lo hacen de gran ayuda para el crecimiento celular; además, es un material que permite obtener una gran variedad de arquitecturas. Es de gran ayuda en ingeniería de tejidos para cartílago ya que posee una estructura similar a la de varios glicosaminoglicanos (GAGs) encontrados en cartílago articular (56).

2.3. Técnicas de caracterización

Son distintas las técnicas para la caracterización de scaffolds según el tipo de propiedades que se desean analizar, ya sean de tipo mecánicas, físicas, químicas o biológicas. A



continuación se presentan algunas de éstas técnicas discriminadas según la propiedad que se desea analizar.

- Caracterización física

La caracterización física se divide en las propiedades correspondientes a la morfología y a las relacionadas con la masa. Para la caracterización morfológica se suele analizar el porcentaje de porosidad, el tamaño de poro y el área superficial. El porcentaje de porosidad se define como la fracción del total del volumen ocupado por un vacío. Las técnicas más usadas para medir el porcentaje de porosidad y demás características morfológicas son las ópticas, como es el uso de micrografía SEM (Microscopía Electrónica de Barrido) y en el caso de porcentaje de porosidad puede hacerse uso también de la porosimetría de mercurio (61); sin embargo, es posible realizar esta medida siguiendo lo reportado por Lou, T. *et al.* (2014 y 2016) (62)(63), donde se usa el principio de Arquímedes usando un solvente que no disuelva el material, en este caso etanol, y se toma la medida del volumen que ingresa en las paredes del scaffold.

Por su parte las características relacionadas con la masa se enfocan en la degradación del material, esta degradación debe darse de tal forma que la tasa en que se degrada el material sea igual o equivalente a la tasa de formación de nuevo tejido, esto es que a medida que se presente proliferación celular a través del scaffold, este se degrada para permitir crecimiento de más cantidad de tejido; por lo tanto es de vital importancia determinar cómo es el comportamiento de degradación de un material, para ello es inmerso en fluido simulado y se controla el cambio en el peso total del material (61).

- Caracterización mecánica

Dentro del diseño de scaffolds, en especial para uso en IT del sistema óseo, las propiedades mecánicas son de vital importancia ya que estas definen la resistencia del tejido que se forma que deben ser similares a las del tejido natural. Para lograr determinar tales propiedades en estructuras porosas se hace uso de técnicas convencionales en biomateriales con equipo apropiado para estas estructuras. Pueden dividirse las pruebas mecánicas en ensayos de fluencia, pruebas de estrés-relajación, pruebas de esfuerzo-deformación y pruebas dinámicas (61), el tipo de prueba se elige según la zona de aplicabilidad del scaffold; sin embargo, como primer acercamiento al análisis de estas propiedades se recomienda pruebas de esfuerzo-deformación por compresión.



○ Caracterización química

Las características químicas del scaffold son determinantes para que se dé el anclaje celular ya que son las que determinan si un material es hidrofóbico o hidrofílico, para analizar las propiedades químicas de un scaffold se lleva a cabo la prueba de mojabilidad sea por métodos estáticos o dinámicos como la prueba de ángulo de contacto con el fin de determinar cómo será su posible comportamiento frente a fluidos fisiológicos, además se analiza la química y carga superficiales usando FTIR y potencial de flujo, respectivamente, para determinar los grupos funcionales que van a interactuar con el cuerpo (61).

○ Caracterización biológica

La caracterización biológica es la determinante si un scaffold puede usarse o no, ya que mide la capacidad de unión del material al hueso, su toxicidad y capacidad de permitir adhesión/proliferación celular. Un primer acercamiento a la caracterización biológica son los ensayos *in vitro*, dentro de estos se encuentra el ensayo de bioactividad que evalúa la capacidad del material en generar una capa mineralizada en su superficie en presencia de una solución fisiológica. La prueba consiste en dejar el material inmerso en solución corporal simulada (SBF) que contiene electrolitos y otros componentes similares a aquellos presentes en el plasma humano, al estar un material inmerso en esta solución formará una capa apatita que indica la capacidad de dicho material en integrarse al hueso. Esta caracterización se determina según el porcentaje de capa apatita formada en la superficie del material en un tiempo determinado, generalmente 7 días (64)(57)(65).

3. REFERENCIAS

1. Cayron M. Nuevas formulaciones de cementos de fosfato de calcio macroporosos para la regeneración ósea. Politécnica de Cataluña; 2005.
2. Navarro Toro M. Desarrollo y caracterización de materiales biodegradables para regeneración ósea [Internet]. Universitat Politècnica de Catalunya; 2005. Available from: <http://hdl.handle.net/10803/6046>
3. Montufar EB. Espumas inyectables de hidroxiapatita obtenidas por el método de espumado de la fase líquida de un cemento de fosfato tricálcico alfa. Politécnica de Cataluña; 2010.
4. Hollinger JO, Einhorn TA, Doll BA, Sfeir C, editors. Bone Tissue Engineering. 1st ed. CRC Press; 2004. 352 p.
5. Ross Ethier C, Simmons CA. Skeletal biomechanics. In: Introductory Biomechanics - From cell to organisms. New York, USA: Cambridge University Press; 2007. p. 379–443.



6. Rincón Rincón E, Ros Felip A, Claramunt Alonso R, Arranz Merino F. Caracterización Mecánica del Material Óseo. *Tecnol y Desarro Rev Ciencia, Tecnol y Medio Ambient.* 2004;2:1–27.
7. Pérez Sepúlveda P. Biomecánica del Hueso [Internet]. [cited 2016 Mar 3]. p. 39. Available from: <http://biofisicamedica.tripod.com/elast2.pdf>
8. Ratner BD, Hoffman AS. *Biomaterials Science: An Introduction to Materials in Medicine.* Elsevier; 1996. 484 p.
9. Saltzman WM. *Biomechanics.* In: *Biomedical Engineering Bridging Medicine and Technology.* First. Cambridge University Press; 2009. p. 656.
10. Peppas N a. *Handbook of Biomaterial Properties.* *J Control Release.* 2000;65(3):439.
11. Swain MV, He L-H. Mechanical properties of bioceramics. In: *Bioceramics and their Clinical Applications* [Internet]. Elsevier; 2008. p. 78–105. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9781845692049500326>
12. Paulsen DF. Chapter 8. Bone. In: *Histology & Cell Biology: Examination & Board Review, 5e* [Internet]. New York, NY: The McGraw-Hill Companies; 2010. Available from: <http://mhmedical.com/content.aspx?aid=57093237>
13. Allen MR, Burr DB. Bone Modeling and Remodeling. In: *Basic and Applied Bone Biology.* 2013. p. 75–90.
14. Mackie EJ, Ahmed YA, Tatarczuch L, Chen KS, Mirams M. Endochondral ossification: How cartilage is converted into bone in the developing skeleton. *Int J Biochem Cell Biol.* 2008;40(1):46–62.
15. Lanyon LE. Osteocytes, strain detection, bone modeling and remodeling. *Calcif Tissue Int* [Internet]. 1993 Feb;53(S1):S102–7. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/BF01673415>
16. Mescher AL. Bone. In: *Junqueira's Basic Histology, 14e* [Internet]. New York, NY: McGraw-Hill Education; 2016. Available from: <http://mhmedical.com/content.aspx?aid=1121526917>
17. Kini U, Nandeesh BN. Physiology of Bone Formation, Remodeling, and Metabolism. In: *Radionuclide and Hybrid Bone Imaging* [Internet]. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2012. p. 29–57. Available from: http://link.springer.com/10.1007/978-3-642-02400-9_2
18. Kanis JA, Melton III LJ, Christiansen C, Johnston CC, Khaltsev N. Perspective. The Diagnosis of Osteoporosis. *J Bone Miner Res.* 1994;9:1137–41.
19. Coyne W C, Cheng C S, Delmez A J. Enfermedad ósea. In: *Manual de Diálisis* [Internet]. 1st ed. Lippincott, Williams & Wilkins; 2007 [cited 2017 Jan 31]. p. 573–95. Available from: <http://www.news-medical.net/health/Bone-Disease-%2528Spanish%2529.aspx>



20. Clark P, Chico G, Carlos F, Zamudio F, Pereira RMR, Zanchetta J, et al. Osteoporosis in Latin America: panel expert review. *Medwave* [Internet]. 2013;13(8):e5791–e5791. Available from: <http://www.medwave.cl/link.cgi/Medwave/Enfoques/ProbSP/5791>
21. American Academy of Orthopaedic Surgeons. Osteoid Osteoma [Internet]. 2014 [cited 2017 Jan 31]. Available from: <http://orthoinfo.aaos.org/topic.cfm?topic=A00507>
22. Estrada C, Paz AC, López LE. INGENIERÍA DE TEJIDO ÓSEO : Consideraciones Básicas. *Rev EIA*. 2006;5:93–100.
23. Rincón M, Rodríguez A, Londoño ME, Echavarría A. Fabricación Y Caracterización De Una Matriz Tridimensional. *Rev Esc Ingeniería Antioquia*. 2007;7:87–95.
24. Li W, Pastrama M-I, Ding Y, Zheng K, Hellmich C, Boccaccini AR. Ultrasonic elasticity determination of 45S5 Bioglass(®)-based scaffolds: Influence of polymer coating and crosslinking treatment. *J Mech Behav Biomed Mater* [Internet]. Elsevier; 2014 Aug 21 [cited 2014 Oct 22];40C:85–94. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25215906>
25. U.S. Department of Health & Human Services. Tissue Engineering and Regenerative Medicine [Internet]. National Institute of Biomedical Imaging and Bioengineering, Creating Biomedical Technologies to Improve Health. 2014 [cited 2016 Feb 17]. Available from: <http://www.nibib.nih.gov/science-education/science-topics/tissue-engineering-and-regenerative-medicin>
26. López R. Producción de materiales híbridos bioreabsorbibles para la regeneración ósea. Universitat Politècnica de València; 2014.
27. Vacanti J, Vacanti CA. The History and Scope of Tissue Engineering. In: *Principles of Tissue Engineering*. Third Edit. Elsevier Inc.; 2007. p. 3–6.
28. Francois E, Dorcenus D, Nukavarapu S. Biomaterials and scaffolds for musculoskeletal tissue engineering [Internet]. *Regenerative Engineering of Musculoskeletal Tissues and Interfaces*. Elsevier Ltd; 2015. 3-23 p. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-1-78242-301-0.00001-X>
29. Karageorgiou V, Kaplan D. Porosity of 3D biomaterial scaffolds and osteogenesis. *Biomaterials*. 2005;26(27):5474–91.
30. Zhang X-Y, Fang G, Zhou J. Additively Manufactured Scaffolds for Bone Tissue Engineering and the Prediction of their Mechanical Behavior: A Review. *Materials (Basel)* [Internet]. 2017;10(1):50. Available from: <http://www.mdpi.com/1996-1944/10/1/50>
31. Sultana N. Biodegradable Polymer-Based Scaffolds for Bone Tissue Engineering [Internet]. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2013. (SpringerBriefs in Applied Sciences and Technology). Available from: <http://link.springer.com/10.1007/978-3-642-34802-0>



32. Ballinger JT, Shugar GJ. GRAVIMETRIC ANALYSIS. In: Chemical Technicians' Ready Reference Handbook, Fifth Edition [Internet]. Fifth. McGraw Hill Professional, Access Engineering; 2011. Available from: <http://accessengineeringlibrary.com/browse/chemical-technicians-ready-reference-handbook-fifth-edition/c9780071745925ch15>
33. Sane SU, Hsu CC, Shay YHM, Sundaram J. Design Space Development for Lyophilization Using DOE and Process Modeling [Internet]. BioPharm International. 2010 [cited 2017 Apr 15]. Available from: <http://www.biopharminternational.com/design-space-development-lyophilization-using-doe-and-process-modeling>
34. Deville S, Saiz E, Tomsia AP. Freeze casting of hydroxyapatite scaffolds for bone tissue engineering. Biomaterials [Internet]. 2006 Nov [cited 2014 Jul 24];27(32):5480–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16857254>
35. Jian D, Zhang J. Calcium phosphate with well controlled nanostructure for tissue engineering. Curr Appl Phys. 2009;9(3):252–6.
36. Hench LL. The story of Bioglass. J Mater Sci Mater Med. 2006;17(11):967–78.
37. Jones JR. Review of bioactive glass: From Hench to hybrids. Acta Biomater [Internet]. Acta Materialia Inc.; 2013;9(1):4457–86. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.actbio.2012.08.023>
38. Yousefi A-M, Oudadesse H, Akbarzadeh R, Wers E, Lucas-Girot A. Physical and biological characteristics of nanohydroxyapatite and bioactive glasses used for bone tissue engineering. Nanotechnol Rev [Internet]. 2014;3(6):527–52. Available from: <http://www.degruyter.com/view/j/ntrev.2014.3.issue-6/ntrev-2014-0013/ntrev-2014-0013.xml>
39. Cao B, Zhou D, Xue M, Li G, Yang W, Long Q, et al. Study on surface modification of porous apatite-wollastonite bioactive glass ceramic scaffold. Appl Surf Sci. 2008;255:505–8.
40. Aigbodion VS, Hassan SB, Ause T, Nyior GB. Potential Utilization of Solid Waste (Bagasse Ash). J Miner Mater Charact Eng. 2010;9(1):67–77.
41. Madakson PB, Yawas DS, Apasi A. Characterization of Coconut Shell Ash for Potential Utilization in Metal Matrix Composites for Automotive Applications. Int J Eng Sci Technol. 2012;4(3):1190–8.
42. Bayona Ayala OL, Sánchez Soledad MJ. Activación física del ráquis de la palma africana (*Elaeis guineensis*) para la obtención de carbón activado. Industrial de Santander; 2006.
43. Nazir MS, Wahjoedi BA, Yussof AW, Abdullah MA. Eco-friendly extraction and characterization of cellulose from oil palm empty fruit bunches. BioResources. 2013;8(2):2161–72.



44. Narapakdeesakul D, Sridach W, Wittaya T. Recovery, characteristics and potential use as linerboard coatings material of lignin from oil palm empty fruit bunches' black liquor. *Ind Crops Prod* [Internet]. Elsevier B.V.; 2013;50:8–14. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2013.07.011>
45. Ghazali A, Ghazali SS, Ridzuan MH, Daud WW. *Silica in Oil Palm Empty Fruit Bunches - An Infinite Amazement*. Negeri Sembilan, MALAYSIA; 2011.
46. Pode R. Potential applications of rice husk ash waste from rice husk biomass power plant. *Renew Sustain Energy Rev* [Internet]. Elsevier; 2016;53:1468–85. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.rser.2015.09.051>
47. Omar R, Idris a., Yunus R, Khalid K, Aida Isma MI. Characterization of empty fruit bunch for microwave-assisted pyrolysis. *Fuel* [Internet]. Elsevier Ltd; 2011;90(4):1536–44. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fuel.2011.01.023>
48. Gad HMH, Hamed MM, Abo Eldahab HMM, Moustafa ME, El-Reefy SA. Radiation-induced grafting copolymerization of resin onto the surface of silica extracted from rice husk ash for adsorption of gadolinium. *J Mol Liq* [Internet]. Elsevier B.V.; 2017;231:45–55. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.molliq.2017.01.088>
49. C. Brinker, Scherer G. *Sol-Gel Science: The Physics and Chemistry of Sol-Gel Processing*. Vol. 3, Advanced Materials. 1990. p. 912.
50. Kessler VG, Seisenbaeva GA, Unell M, Håkansson S. Chemically triggered biodelivery using metal-organic sol-gel synthesis. *Angew Chemie - Int Ed*. 2008;47(44):8506–9.
51. Perez Gonzalez JA. Síntesis de biovidrios por la técnica sol-gel con incorporación de metales y estudio de sus propiedades antibacteriales. de Chile; 2012.
52. Jasiorski M. *Sol-Gel Materials and Nanotechnology Center of Excellence* [Internet]. 2005 [cited 2017 Mar 20]. Available from: http://www.immt.pwr.wroc.pl/~marjas/index_en.php?sub=activity
53. Santos MH, Silva RM, Dumont VC, Neves JS, Mansur HS, Heneine LGD. Extraction and characterization of highly purified collagen from bovine pericardium for potential bioengineering applications. *Mater Sci Eng C*. 2013;33(2):790–800.
54. Mármol Z, Páez G, Rincón M, Araujo K, Aiello C. Quitina y Quitosano polímeros amigables . Una revisión de sus aplicaciones. *Rev Tecnocientífica URU*. 2011;53–8.
55. Fernandez-Yague MA, Abbah SA, McNamara L, Zeugolis DI, Pandit A, Biggs MJ. Biomimetic approaches in bone tissue engineering: Integrating biological and physicommechanical strategies. *Adv Drug Deliv Rev* [Internet]. Elsevier B.V.; 2015;84:1–29. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.addr.2014.09.005>
56. Baldino L, Cardea S, De Marco I, Reverchon E. Chitosan scaffolds formation by a supercritical freeze extraction process. *J Supercrit Fluids* [Internet]. Elsevier B.V.;



- 2014 Jun [cited 2014 Jul 25];90:27–34. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0896844614000631>
57. Depan D, Surya PKCV, Girase B, Misra RDK. Organic/inorganic hybrid network structure nanocomposite scaffolds based on grafted chitosan for tissue engineering. *Acta Biomater* [Internet]. Acta Materialia Inc.; 2011 May [cited 2014 Oct 22];7(5):2163–75. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21284959>
 58. Xian W. *A Laboratory Course in Biomaterials*. 1st ed. Taylor & Francis Group L, editor. CRC Press; 2010. 1-220 p.
 59. Anitha a., Sowmya S, Kumar PTS, Deepthi S, Chennazhi KP, Ehrlich H, et al. Chitin and chitosan in selected biomedical applications. *Prog Polym Sci* [Internet]. Elsevier Ltd; 2014 Sep [cited 2014 Jul 10];39(9):1644–67. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0079670014000288>
 60. Kong L, Gao Y, Lu G, Gong Y, Zhao N, Zhang X. A study on the bioactivity of chitosan/nano-hydroxyapatite composite scaffolds for bone tissue engineering. *Eur Polym J* [Internet]. 2006 Dec [cited 2014 Jul 22];42(12):3171–9. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0014305706002746>
 61. Khang G, Kim MS, Lee HB. *A Manual for Biomaterials/ Scaffold Fabrication Technology*. Vol. 4. Editor J-TS series, editor. Vol. 12. Singapore: World Scientific; 2007. 1-289 p.
 62. Lou T, Wang X, Song G, Gu Z, Yang Z. Fabrication of PLLA/??-TCP nanocomposite scaffolds with hierarchical porosity for bone tissue engineering. *Int J Biol Macromol*. 2014;69:464–70.
 63. Lou T, Wang X, Yan X, Miao Y, Long YZ, Yin HL, et al. Fabrication and biocompatibility of poly(l-lactic acid) and chitosan composite scaffolds with hierarchical microstructures. *Mater Sci Eng C* [Internet]. Elsevier B.V.; 2016;64:341–5. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.msec.2016.03.107>
 64. Li H, Zhou C-R, Zhu M-Y, Tian J-H, Rong J-H. Preparation and Characterization of Homogeneous Hydroxyapatite/Chitosan Composite Scaffolds via In-Situ Hydration. *J Biomater Nanobiotechnol* [Internet]. 2010 [cited 2015 Jan 16];1(1):42–9. Available from: <http://www.scirp.org/journal/PaperDownload.aspx?DOI=10.4236/jbnb.2010.11006>
 65. Caridade SG, Merino EG, Alves NM, Mano JF. Bioactivity and viscoelastic characterization of chitosan/bioglass® composite membranes. *Macromol Biosci* [Internet]. 2012 Aug [cited 2015 Feb 15];12(8):1106–13. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22707301>



CAPÍTULO

III

METODOLOGÍA

PRÓLOGO

En la IT es importante elegir correctamente las técnicas de fabricación de los materiales que se van a emplear como scaffolds ya que estas aportan gran parte de las características finales que tendrá el material. Estas técnicas de fabricación se eligen según el tipo de material y lo que se busca obtener en el producto final.

En este capítulo se exponen las técnicas empleadas para el desarrollo de este trabajo de investigación, haciendo referencia en las etapas de síntesis y caracterización de cada uno de los materiales planteados.

Algunas de las pruebas realizadas para evaluar las propiedades de los materiales se basaron en normas y estándares internacionales, en algunos casos con modificaciones necesarias para el tipo de material que se evaluó.

1 MATERIALES Y PROCESAMIENTO

1.1 Extracción de sílice a partir de fuentes naturales

En la extracción de sílice se usaron tres fuentes naturales diferentes: cascarilla de arroz, raquis de palma africana y cáscara de corozos. Se decidió usar estas fuentes debido a que presentan alto contenido de sílice en su estructura, además son subproductos de distintas industrias en el país, lo que aporta un impacto ambiental positivo en este estudio (1)(2).

Para la obtención de la sílice a partir de cascarilla de arroz se siguió lo reportado por Naghizadeh, F. et. al (2015) (3) el cual reporta el tratamiento previo de la cascarilla y su posterior calcinado a 700°C con algunas modificaciones durante el proceso térmico. Inicialmente se lavó la cascarilla con abundante agua potable en repetidas ocasiones hasta que ésta se aclarara. Luego, la cascarilla lavada se secó en horno por 12 horas a 70°C para su posterior proceso de calcinado. En la Figura 1 se presenta el tratamiento térmico utilizado para obtener la sílice de cascarilla de arroz. Se usó una temperatura final de 700°C para eliminar la fase orgánica aún presente, este proceso se hace en dos rampas de calcinado para evitar la formación de ceniza que contamine el producto final.

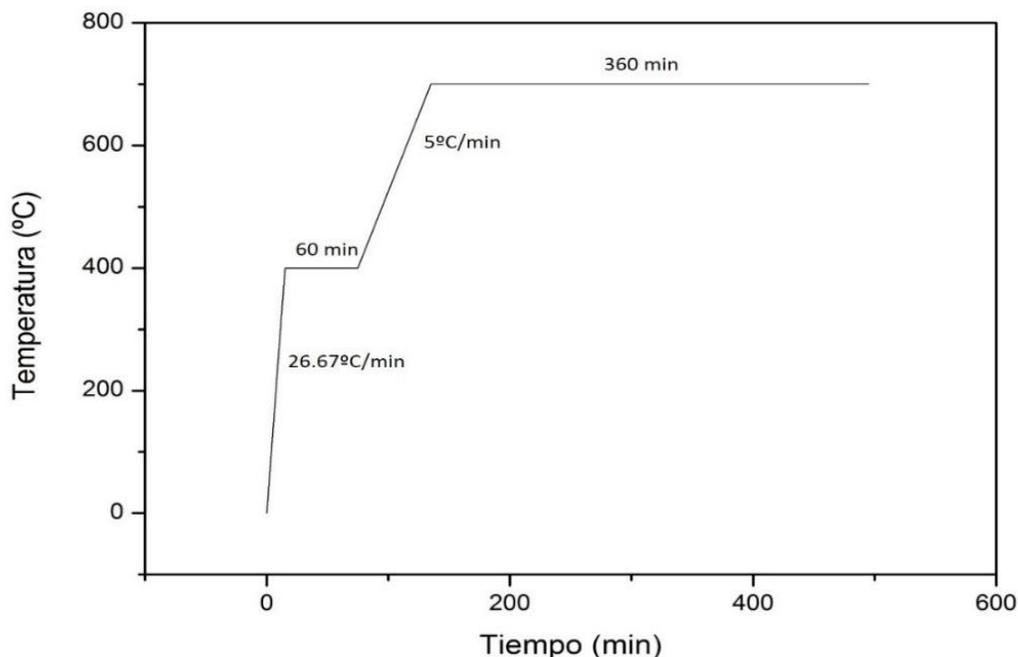


Figura 1. Tratamiento térmico para obtener sílice a partir de cascarilla de arroz.

En la obtención de la sílice desde el raquis de palma y la cáscara de corozo, el proceso exhibe otros retos respecto a la eliminación de la parte orgánica como lo es la lignina. Se ha encontrado que el óxido de silicio o sílice precipita a un pH de 4 (4); para lograr esto es necesario someter la materia prima a un proceso alcalino con precipitación ácida.



Inicialmente se debe preparar una solución de NaOH al 2% p/v, a esta solución se adiciona la materia prima siguiendo la relación (Líquido/sólido) L/S=20. Esto se realiza para disolver la sílice alojada en las paredes del material. Posteriormente se lleva la mezcla a baño maría a 90°C por 2 horas y se baja el pH de la solución con ácido sulfúrico en una concentración del 72%, lo que provoca un cambio de coloración en la mezcla debido a la precipitación de la sílice y una fracción de la lignina. Este proceso fue adaptado a partir de lo reportado por Mussato, S. *et al.* (2007) (5), teniendo en cuenta que el material deseado (sílice) se comporta químicamente diferente al material reportado (lignina).

La mezcla se centrifugó por 30 minutos a 5000 rpm y se conservó el precipitado. Finalmente, el precipitado se recogió y fue secado a 70°C por 12 horas para proceder con una calcinación a 700°C por 16 horas, lo que da como resultado final un polvo blanquecino el cual es dióxido de silicio (SiO₂). En la Figura 2 se observa el tratamiento térmico usado para calcinar el precipitado obtenido a partir del tratamiento alcalino en raquis de palma y cáscara de corozo.

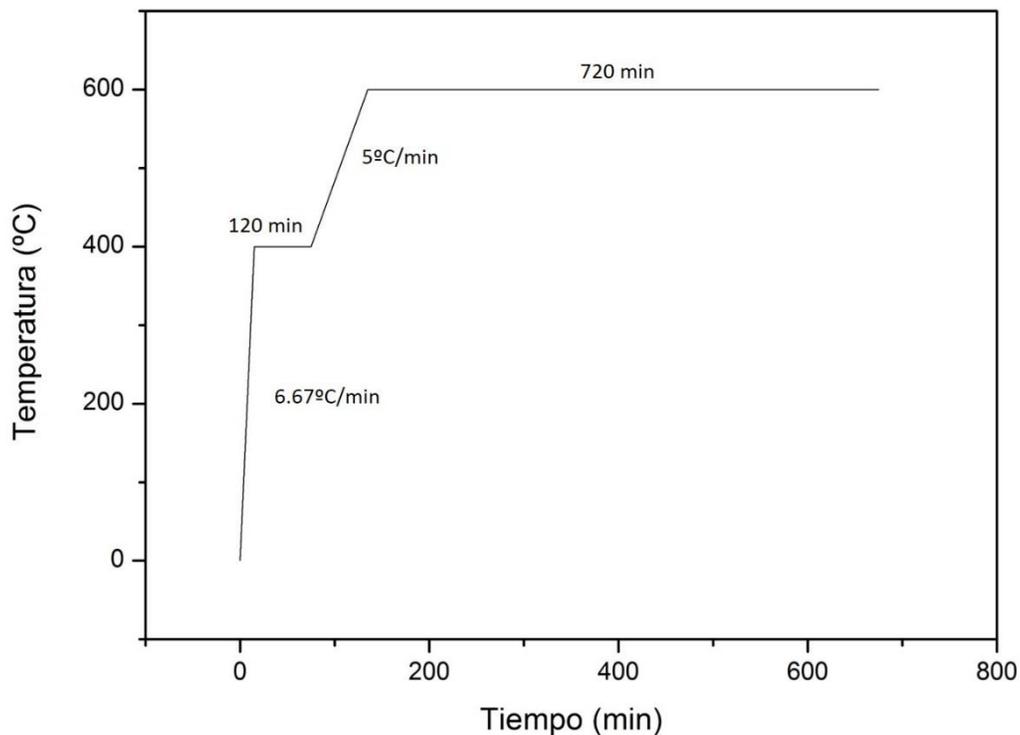


Figura 2. Rampa usada para calcinar la sílice precipitada a partir de raquis y corozo

1.2 Síntesis vidrio bioactivo

El proceso de síntesis del vidrio bioactivo se realizó por la técnica sol-gel siguiendo dos metodologías distintas de acuerdo la fuente de SiO_2 . La primera tenía como fuente tetraetil ortosilicato (TEOS) donde se siguió lo planteado por Grajales, D. (2016) y Vaid, C. *et al.* (2013) (6)(7) con fosfato amonio dihidrógeno ($\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$) como fuente de P_2O_5 y acetato de calcio ($\text{Ca}(\text{CH}_3\text{-CO}_2)_2$) como fuente de CaO . El procedimiento realizado con esta fuente se esquematiza en la Figura 3. Inicialmente se adiciona el TEOS en una solución de agua/etanol con una relación molar 1:4 tanto con el agua (TEOS/agua) como con el etanol (TEOS/etanol) esta solución se deja en agitación por 1 hora. Una vez transcurrido el tiempo, se adiciona fosfato amonio dihidrógeno igualmente en una relación 1:4 con etanol y agua destilada, este proceso se deja reaccionar por 55 min. Luego, El acetato de calcio se adiciona y se deja reaccionar por 11 min para finalmente agregar una mezcla de ácido acético: agua en una relación 6:1 (ácido acético/agua), teniendo en cuenta que la cantidad de agua debe conservarse 1:4 agua/gramos vidrio bioactivo deseado.

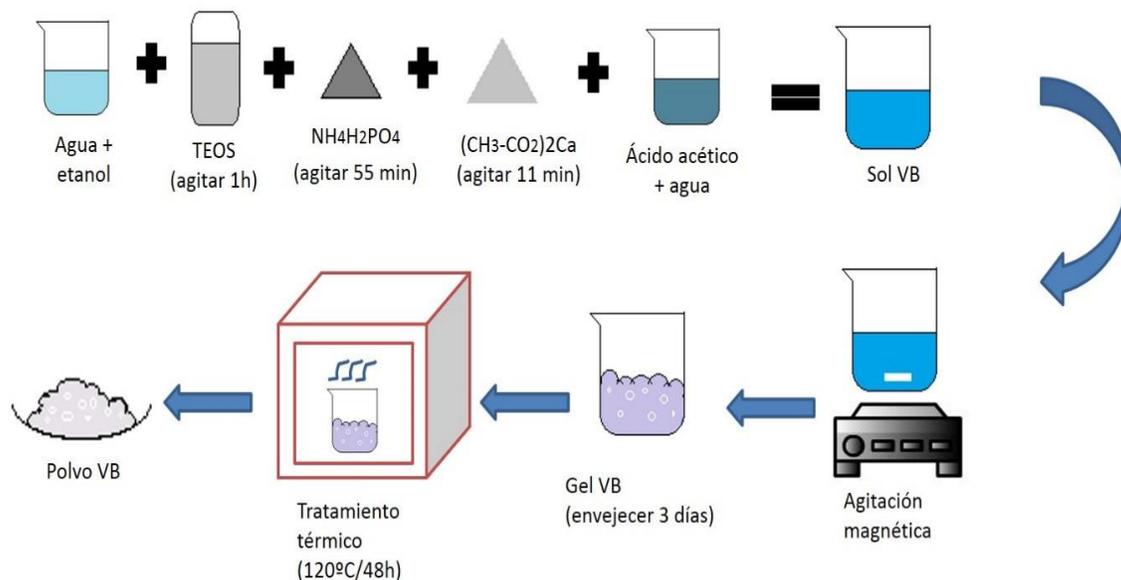


Figura 3. Esquema síntesis vidrio bioactivo por sol-gel

El segundo proceso de sol-gel tuvo como fuente de SiO_2 , la sílice extraída de fuentes naturales. Inicialmente se siguió lo reportado por Nayak, J.P. *et al.* (2010) y Naghizadeh, F. *et al.* (2015) (8)(3) con el fin de conocer las variables del experimento y así poder modificarlas para lograr un vidrio bioactivo en el sistema ternario planteado. Se usó NaOH para disolver la sílice y posteriormente fue adicionado nitrato de calcio disuelto en ácido nítrico gota a gota, este proceso se llevó a cabo con la sílice de raquis debido a que era la materia prima planteada inicialmente. Para lograr sintetizar un VB en un sistema ternario $\text{SiO}_2\text{-CaO-P}_2\text{O}_5$ fue necesario plantear otra metodología donde se incluyera la fuente de



fósforo y se eliminara el uso de hidróxido de sodio como medio para disolver la sílice. Después de varios pre-ensayos se logró determinar que el hidróxido de amonio era el reactivo más apropiado en la disolución de la sílice, ya que permite aumentar el pH lo suficiente pero no genera subproductos en el vidrio bioactivo debido a su bajo punto de fusión. Respecto a la fuente de fósforo, se siguió la misma metodología empleada para la síntesis de VB con TEOS modificando únicamente la primera etapa.

El polvo de vidrio bioactivo sintetizado se debe macerar y lavar varias veces con agua destilada para eliminar las fases orgánicas aún presentes y poder proceder con la estabilización por medio de un tratamiento térmico a 600°C presentado en la Figura 4, esto se realizó con el fin de que la estructura del vidrio estuviera estable a temperatura ambiente, ya que según la literatura los vidrios bioactivos producidos por sol-gel pueden hidratarse. Para ello se usa una temperatura inferior a la temperatura de cristalización del vidrio (9)

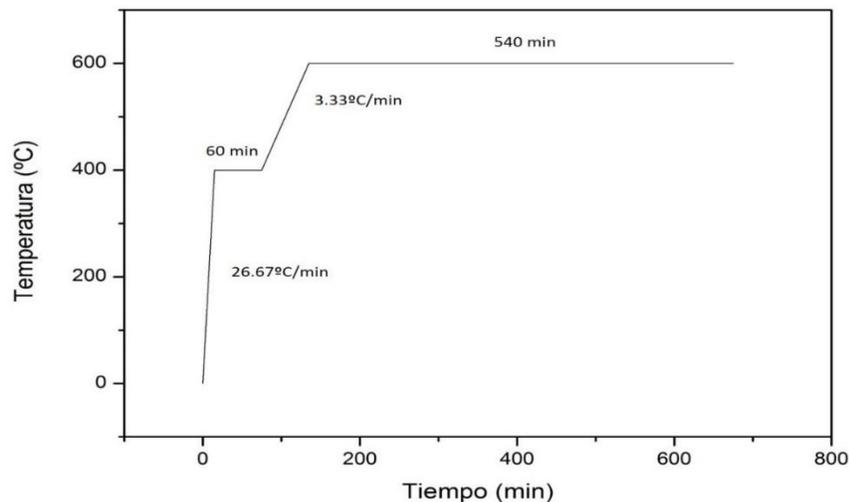


Figura 4. Tratamiento térmico estabilización del polvo sintetizado.

1.3 Fabricación de scaffolds de quitosano/vidrio bioactivo

Los scaffolds quitosano/vidrio bioactivo con sílice proveniente del TEOS y de las fuentes naturales se fabricaron siguiendo lo definido por Pourhaghgouy, M. *et al.* (2016) (10) con algunas modificaciones planteadas por Quintero, L. y Ochoa, M. (2014) (11) para la dilución del quitosano usando ácido láctico debido a que permite dilución completa en menor tiempo. Inicialmente se disuelve el quitosano al 2% (p/v) en una solución de ácido láctico al 1% (v/v) y se deja agitar hasta lograr una consistencia homogénea como se observa en la Figura 5. Una vez se tiene la solución lista se procede a adicionar la cantidad de vidrio bioactivo (VB) en polvo en proporciones CH/VB 1:1 y 2:1. El VB se deja en agitación por 30 minutos.

Transcurrido este tiempo se llevan las soluciones a un proceso de sonicación por 1h para favorecer la dispersión del VB en la solución, para luego retirarlos y adicionar glutaraldehído 25% como entrecruzante en una proporción 1% p/p respecto a la cantidad usada de polímero. El glutaraldehído se agita vigorosamente por 10 min y toda la solución es luego llevada a contenedores poliméricos para proceder con el proceso de congelación con dióxido de carbono en estado sólido por 24 horas, y liofilizada por 48 horas. El proceso de liofilizado se realizó a una temperatura de -88°C y un vacío de 0.120 mbar. Finalmente, se obtienen las estructuras porosas tridimensionales con una morfología cilíndrica igual al contenedor que sirve como molde.

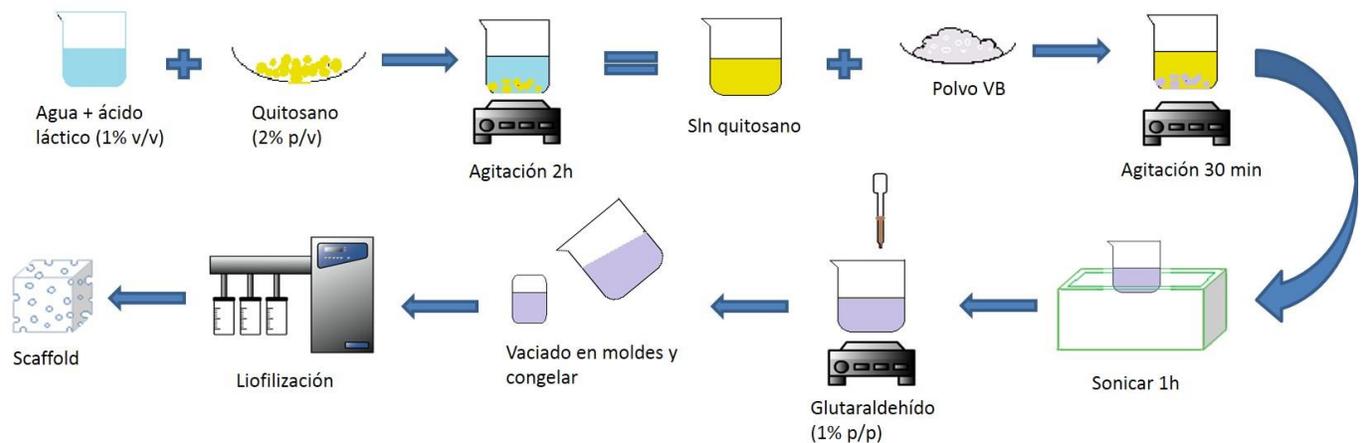


Figura 5. Esquema fabricación de scaffolds por liofilizado

2 CARACTERIZACIÓN DEL SILICIO EXTRAÍDO DE FUENTES NATURALES Y LOS POLVOS DE VIDRIO BIOACTIVO SINTETIZADOS

2.1 Caracterización química

Los polvos obtenidos, tanto la sílice extraída como los VB sintetizados, fueron caracterizados por dos métodos para de esta manera determinar su composición química. Además para complementar la caracterización química, los VB sintetizados se caracterizaron por Raman.

2.1.1. Difracción de Rayos X (DRX)

Se realizó DRX para determinar las fases de los polvos y su cristalinidad. Este ensayo se realizó en un difractómetro de rayos X marca XPert PANalytical Empyrean Series II provisto de una fuente de $\text{Cu-K}\alpha$ (1.5405980 \AA). Este equipo trabaja con niveles de voltaje y corriente de 45 kV y 40 mA, respectivamente. Este ensayo se realizó entre un ángulo 2θ ($^{\circ}$) de 5° y 60° con un paso de $0.02^{\circ}/\text{s}$.



2.1.2. Espectroscopía Infrarroja con Transformada de Fourier (FTIR)

Se realizó FTIR para analizar los grupos funcionales presentes en los polvos, tales como silicatos y fosfatos, con el fin de corroborar la correcta síntesis de los VB sintetizados y la obtención de la sílice. Esto se llevó a cabo en un equipo marca Shimadzu IRTracer-100 por la técnica ATR, trabajado en una longitud de onda entre 400 y 4500 cm^{-1} .

2.1.3. Espectroscopía Raman

Se realizó espectroscopía Raman en los polvos de vidrio bioactivo elegidos en dos puntos con el fin de corroborar la homogeneidad de la muestra, además para complementar las técnicas de DRX y FTIR. Este ensayo se realizó en un espectrómetro Raman confocal marca Horiba Jobin Yvon modelo Labram HR de alta resolución. Se usó un láser He/Ne emitiendo a 633 nm con una potencia de salida hacia la muestra de 17 mW. Los fotones dispersados por la muestra fueron dispersados en rejillas de difracción de 600 líneas/mm y simultáneamente colectados en un detector CCD con resolución de 1024x256 píxeles. Los espectros tomados sobre cada muestra se realizaron por 50 segundos.

2.2 Caracterización morfológica

2.2.1. Microscopía Electrónica de Barrido (SEM)

Se utilizó la técnica SEM para analizar la morfología y tamaño de las partículas de los VB y la sílice. Se usó un microscopio JOEL-JSM 6490 LV que trabaja con una aceleración de voltaje de 20 kV.

2.3 Caracterización física

2.3.1. Método del picnómetro

Se utilizó el método del picnómetro para conocer la densidad de los polvos sintetizados. Esto se hizo siguiendo el estándar ASTM D2320-98. Se usó un picnómetro de 10 mL con agua destilada como agente humectante.

2.4 Caracterización biológica



2.4.1. Ensayo de bioactividad

El ensayo de bioactividad se realizó para determinar la habilidad de los VB en formar una capa de apatita en presencia de fluido corporal simulado (SBF). El ensayo se realizó siguiendo lo reportado por Kokubo, T. y Takadama, H. (2006) (12) analizando las muestras a 7 y 14 días de reacción en SBF a 37°C. Para mayor facilidad en el desarrollo de esta prueba, los polvos se conformaron en probetas cilíndricas comprimidas uniaxialmente a 30 MPa por 2 min. Para analizar la capa de apatita formada y su relación Ca/P, las muestras se analizaron a través de SEM y EDS (Microanálisis por Dispersión de Energías por Rayos X) acoplado al mismo equipo. Esto se realizó tomando varios puntos en la muestra con morfología similar y con voltaje constante para que los resultados sean comparables. Para definir el volumen de SBF a usar para el ensayo, se siguió lo definido por Faure, J. *et al.* (2015) (13) deteniendo la reacción con agua destilada y posteriormente secadas en desecador.

3 CARACTERIZACIÓN DE LOS SCAFFOLDS PRODUCIDOS

3.1 Caracterización química

3.1.1. Difracción de Rayos X (DRX)

Los scaffolds fabricados se analizaron a través de DRX para determinar la presencia de los VB en la estructura. Esto se hizo en un difractómetro de rayos X marca XPert PANalytical Empyrean Series II provisto de una fuente de Cu-K α (1.5405980 Å). El cual trabaja con niveles de voltaje y corriente de 45 kV y 40 mA, respectivamente. Se evaluaron las muestras entre un ángulo 2θ (°) de 5° y 60° con un paso de 0.02°/s.

3.1.2. Espectroscopía Infrarroja con Transformada de Fourier (FTIR)

Se realizaron ensayos por FTIR a los scaffolds para confirmar la presencia tanto del polímero como del cerámico en las muestras, además para identificar posibles interacciones químicas entre ambos materiales. Para llevar a cabo este estudio se utilizó un equipo marca Shimadzu IRTracer-100, por la técnica ATR. Las muestras se analizaron entre una longitud de onda de 400 y 4500 cm^{-1} .

3.2 Caracterización morfológica



3.2.1. Microscopía Electrónica de Barrido (SEM)

Para estudiar la morfología y tamaño de los poros formados en los scaffolds se utilizó la técnica SEM, además se usó EDS para identificar los elementos químicos presentes en los scaffolds.

3.3 Caracterización física

3.3.1. Pruebas de compresión

Las pruebas de compresión se llevaron a cabo adaptando la norma ASTM D695-15 para “Propiedades a la compresión de plásticos rígidos (Standard Test Method for Compressive Properties of Rigid Plastics)”, debido a que los scaffolds son materiales compuestos porosos, en una máquina universal para ensayos marca Digimes® , adicionando una carga secuencial a una velocidad de 5 mm/min con una capacidad máxima de 4904 N hasta alcanzar 75% de deformación. Las muestras tenían forma cilíndrica con alturas promedio de 22 mm y radios promedio de 9 mm. Aunque la norma indica que el número de réplicas debe ser de 5 muestras, para esta prueba fue de 3 muestras por formulación debido a la limitación del material; sin embargo, se cumple con la cantidad mínima para que el resultado sea estadísticamente confiable.

3.3.2. Porcentaje de porosidad

El porcentaje de porosidad de los scaffolds se analizó siguiendo lo reportado por Lou, T. *et al.* (2014 y 2016) (14)(15). El ensayo consistió en pesar en seco (W) los scaffolds, posteriormente éstos fueron sumergidos en etanol al 70% y llevados a vacío por 15min. Se usa etanol como líquido de desplazamiento ya que no disuelve el quitosano y puede ingresar fácilmente a través de los poros de la estructura. Una vez se retiraron los scaffolds del etanol, se llevaron a una probeta con volumen (V_1) y peso (W_1) conocido de etanol puro, se toma el peso del sistema (W_2) y el volumen desplazado (V_2) al sumergir el scaffold. Estos datos se llevan a la Ecuación 1 para así determinar el valor de porcentaje de porosidad (ε), teniendo en cuenta la densidad del etanol (ρ).

$$\varepsilon = \frac{(W_2 - W_1 - W)}{\rho (V_2 - V_1)}$$

Ecuación 1. Ecuación para determinar el porcentaje de porosidad (14)(15).

3.4 Pruebas de estabilidad



3.4.1. Pruebas de degradación en SBF

El estudio de degradación de los scaffolds se siguió según el estándar ASTM F1635-11 según el Test A por pérdida de peso. Las muestras secas se pesaron y se sumergieron en SBF. Estas fueron incubadas a 37°C por 7, 14, 21 y 28 días. Se utilizaron 3 muestras para cada día con el fin de evitar la constante deposición de sales que pudiera afectar la medida de degradación. Una vez las muestras terminaban su período de incubación, se retiraban de la solución, se lavaron con abundante agua destilada y nuevamente se secaron por liofilización para proceder con el pesaje.

El valor del pH de la solución de SBF también se midió con el fin de determinar si el fenómeno de degradación de las muestras tiene algún efecto sobre este valor.

3.4.2. Termogravimetría

La estabilidad térmica de los scaffolds se evaluó por TGA en un equipo marca Universal V4.5A Instruments modelo Q500 V20.13 Build 39 utilizando atmósfera de nitrógeno dinámica con tasa de flujo de 35mL/min, con una tasa de calentamiento de 10°/min entre un rango de temperatura de 30 a 800°C, según lo reportado por Corazzari, I. *et al.* (2015) (16) para quitosano. Esto se realizó para determinar las temperaturas de transformación de los materiales fabricados.

3.5 Caracterización biológica

3.5.1. Ensayo de bioactividad

El ensayo de bioactividad en los scaffolds siguió los mismos parámetros definidos para el ensayo en los VB sintetizados. Las muestras se tomaron por duplicado y se analizó la formación de apatita en SEM y EDS.

3.5.2. Análisis antimicrobiano

El estudio antimicrobiano en los scaffolds se realizó para identificar el grado fungicida y bactericida de las muestras, con el fin de que sirva como protección ante posibles infecciones durante su implante. Este estudio se realizó siguiendo el método Kirby-Bauer o método por difusión en agar, esto se realizó siguiendo lo recomendado en USP Antimicrobial Effectiveness Testing Chapter 51 (17) para materiales líquidos en uso farmacéutico. Las cepas seleccionadas fueron *Escherichia coli* (ATCC 25922) y *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) como cepas bacterianas y *Fusarium oxysporum* como hongo filamentoso. La *E. coli* se sembró en agar EMB, la *S. aureus* en Baird-Parker y el *Fusarium* en PDA, para todos los



microorganismos se tomaron 100 μL de la solución madre y se homogenizó con haza de vidrio sobre el agar para posteriormente poner discos cortados de los scaffolds con diámetro de 6.35 mm. Se tomaron los 5 scaffolds en una sola caja con inóculo, esto se hizo por duplicado y se tomó una caja por separado sin scaffolds como control.

4 DISEÑO ESTADÍSTICO

Debido a que el procedimiento experimental se dividió en dos grandes etapas (síntesis de VB y fabricación de scaffolds) fue necesario para cada una establecer un diseño de experimentos individual.

4.1 Diseño de mezclas

Para la síntesis del vidrio bioactivo usando TEOS como fuente de silicio se planteó un diseño de mezclas con restricciones aumentadas para conocer la influencia de cada uno de los componentes en la respuesta bioactiva del polvo y así definir la mejor composición. Un diseño de mezclas se caracteriza porque se evalúa la respuesta en el material final como una combinación de todos los componentes que intervienen (factores).

De este modo, un diseño de mezclas simplex evalúa las componentes puras o en combinaciones dobles. Cuando se realizan restricciones sobre los límites de las componentes en un diseño simplex se pueden generar 3 tipos de diseños, uno *upper bounds* donde se trabaja con límites superiores para uno o más componentes de la mezcla. En el caso de *lower bounds*, los límites son inferiores o un diseño completamente restringido donde se utilizan límites inferiores y superiores en todos los factores.

El diseño usado en la síntesis de vidrio bioactivo con TEOS fue entonces un diseño de mezclas completamente restringido (DMR) con 3 componentes correspondientes a cada uno de los óxidos que hace parte del VB (SiO_2 , CaO , P_2O_5). Los límites para estos óxidos se definieron respecto a los valores que más se reportan en la literatura (7)(18) obteniendo para cada óxido las restricciones definidas en la Tabla 1.

Tabla 1. Restricciones definidas en el diseño de mezclas.

	Restricción inferior (%)	Restricción superior (%)
SiO_2	58	70
P_2O_5	6	9
CaO	24	34



Con estas restricciones se obtuvo un diseño con 5 vértices además los puntos de diseño se aumentaron con punto al centro y centros de borde. La Tabla 2 muestra los puntos del diseño generado por el software R. Además de la nomenclatura empleada para definir cada una de las combinaciones.

Tabla 2. Nomenclatura y fracción molecular de cada combinación empleada en el diseño de mezclas.

Nomenclatura	Fracción Molecular		
	SiO ₂	P ₂ O ₅	CaO
VB1	0.67	0.09	0.24
VB2	0.68	0.08	0.24
VB3	0.58	0.09	0.33
VB4	0.64	0.07	0.29
VB5	0.58	0.08	0.34
VB6	0.70	0.06	0.24
VB7	0.60	0.06	0.34
VB8	0.63	0.09	0.28
VB9	0.59	0.07	0.34
VB10	0.65	0.06	0.29

El modelo seleccionado para el análisis estadístico por test ANOVA (análisis de varianza) fue un modelo cúbico especial presentado en la Ecuación 2, donde Y es la respuesta, β_i son las constantes para cada interacción y X_i son las variables.

$$Y = \beta_1X_1 + \beta_2X_2 + \beta_3X_3 + \beta_{12}X_1X_2 + \beta_{13}X_1X_3 + \beta_{23}X_2X_3 + \beta_{123}X_1X_2X_3$$

Ecuación 2. Modelo cúbico especial para el análisis del diseño de mezclas

Para determinar la significancia de los efectos de las variables se usó el test Fisher's Least Significance Difference (LSD). El nivel de significancia seleccionado fue de 5%, lo que



equivale a un valor- p de 0.05; valores por debajo del nivel seleccionado indican que el factor es estadísticamente significativo.

4.2 Diseño experimental factorial 2^2

Para la fabricación de los scaffolds se planteó un segundo diseño experimental debido a que ya la respuesta no se evalúa sobre una mezcla sino sobre una combinación de elementos individuales llamados factores es el efecto de estos factores lo que se desea conocer.. Se planteó un diseño factorial 2^2 donde se busca analizar la influencia de cada uno de los factores analizados en la variable respuesta. En la Tabla 3 se presentan los factores que se analizaron y las distintas variables respuesta

Tabla 3. Diseño factorial para la fabricación de los scaffolds

Punto de diseño	Factores		Respuestas				
	Relación (CH/VB)	Fuente	Resistencia compresión	Comportamiento antimicrobiano	Pérdida de masa	Bioactividad	Tamaño de poro
1	2:1	TEOS	Y11	Y21	Y31	Y41	Y51
2	2:1	TEOS	Y12	Y22	Y32	Y42	Y52
3	2:1	TEOS	Y13	Y23	Y33	Y43	Y53
4	2:1	Sílice	Y14	Y24	Y34	Y44	Y54
5	2:1	Sílice	Y15	Y25	Y35	Y45	Y55
6	2:1	Sílice	Y16	Y26	Y36	Y46	Y56
7	1:1	TEOS	Y17	Y27	Y37	Y47	Y57
8	1:1	TEOS	Y18	Y28	Y38	Y48	Y58
9	1:1	TEOS	Y19	Y29	Y39	Y49	Y59
10	1:1	Sílice	Y110	Y210	Y310	Y410	Y510
11	1:1	Sílice	Y111	Y211	Y311	Y411	Y511
12	1:1	Sílice	Y112	Y212	Y312	Y412	Y512

El porcentaje de quitosano usado, como el del glutaraldehído se mantuvo constante durante todos los experimentos. Igualmente, el método de congelamiento empleado fue el mismo, esto se logró con hielo seco adquirido del mismo lugar



Los resultados se analizaron en el software libre R, realizando un test ANOVA para determinar la significancia de los factores sobre las respuestas y la desviación experimental del modelo determinado. Para este diseño también se empleó un nivel de significancia de 5%, ya que las decisiones que se tomen a partir de estos resultados no tienen influencia directa sobre la vida de las personas.

5 REFERENCIAS

1. Aigbodion VS, Hassan SB, Ause T, Nyior GB. Potential Utilization of Solid Waste (Bagasse Ash). *J Miner Mater Charact Eng*. 2010;9(1):67–77.
2. Madakson PB, Yawas DS, Apasi A. Characterization of Coconut Shell Ash for Potential Utilization in Metal Matrix Composites for Automotive Applications. *Int J Eng Sci Technol*. 2012;4(3):1190–8.
3. Naghizadeh F, Abdul Kadir MR, Doostmohammadi A, Roozbahani F, Iqbal N, Taheri MM, et al. Rice husk derived bioactive glass-ceramic as a functional bioceramic: Synthesis, characterization and biological testing. *J Non Cryst Solids*. 2015;427:54–61.
4. Barana D, Salanti A, Orlandi M, Ali DS, Zoia L. Biorefinery process for the simultaneous recovery of lignin, hemicelluloses, cellulose nanocrystals and silica from rice husk and *Arundo donax*. *Ind Crops Prod* [Internet]. Elsevier B.V.; 2016;86:31–9. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0926669016301753>
5. Mussatto SI, Fernandes M, Roberto IC. Lignin recovery from brewer's spent grain black liquor. *Carbohydr Polym*. 2007;70:218–23.
6. Grajales DO. Síntesis de vidrio bioactivo por la técnica sol-gel con aplicación en ingeniería de tejidos. University of Antioquia; 2016.
7. Vaid C, Murugavel S. Alkali oxide containing mesoporous bioactive glasses: Synthesis, characterization and in vitro bioactivity. *Mater Sci Eng C* [Internet]. Elsevier B.V.; 2013;33(2):959–68. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.msec.2012.11.028>
8. Nayak JP, Kumar S, Bera J. Sol-gel synthesis of bioglass-ceramics using rice husk ash as a source for silica and its characterization. *J Non Cryst Solids* [Internet]. Elsevier B.V.; 2010;356(28–30):1447–51. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jnoncrysol.2010.04.041>
9. Lucas-Girot A, Mezahi FZ, Mami M, Oudadesse H, Harabi A, Le Floch M. Sol-gel synthesis of a new composition of bioactive glass in the quaternary system SiO₂–CaO–Na₂O–P₂O₅. *J Non Cryst Solids*. 2011;357:3322–7.
10. Pourhaghgouy M, Zamanian A, Shahrezaee M, Masouleh MP. Physicochemical properties and bioactivity of freeze-cast chitosan nanocomposite scaffolds reinforced with bioactive glass. *Mater Sci Eng C*. 2016;58:180–6.



11. Quintero L, Marin M. Evaluación de la eficiencia y análisis antimicrobiano de las biopelículas de quitosano obtenido por métodos biotecnológicos, usados en la conservación del banano. University of Antioquia; 2014.
12. Kokubo T, Takadama H. How useful is SBF in predicting in vivo bone bioactivity? *Biomaterials*. 2006;27(15):2907–15.
13. Faure J, Drevet R, Lemelle A, Ben Jaber N, Tara A, El Btaouri H, et al. A new sol-gel synthesis of 45S5 bioactive glass using an organic acid as catalyst. *Mater Sci Eng C* [Internet]. Elsevier B.V.; 2015;47:407–12. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.msec.2014.11.045>
14. Lou T, Wang X, Song G, Gu Z, Yang Z. Fabrication of PLLA/??-TCP nanocomposite scaffolds with hierarchical porosity for bone tissue engineering. *Int J Biol Macromol*. 2014;69:464–70.
15. Lou T, Wang X, Yan X, Miao Y, Long YZ, Yin HL, et al. Fabrication and biocompatibility of poly(l-lactic acid) and chitosan composite scaffolds with hierarchical microstructures. *Mater Sci Eng C* [Internet]. Elsevier B.V.; 2016;64:341–5. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.msec.2016.03.107>
16. Corazzari I, Nisticò R, Turci F, Faga MG, Franzoso F, Tabasso S, et al. Advanced physico-chemical characterization of chitosan by means of TGA coupled on-line with FTIR and GCMS: Thermal degradation and water adsorption capacity. *Polym Degrad Stab*. 2015;112:1–9.
17. USP. Antimicrobial Effectiveness Testing 51 [Internet]. [cited 2017 Apr 24]. Available from: http://www.pharmacopeia.cn/v29240/usp29nf24s0_c51.html
18. Siqueira RL, Zanotto ED. The influence of phosphorus precursors on the synthesis and bioactivity of SiO₂-CaO-P₂O₅ sol-gel glasses and glass-ceramics. *J Mater Sci Mater Med*. 2013;24(2):365–79.



CAPÍTULO

IV

RESULTADOS Y ANÁLISIS

PRÓLOGO

En la fabricación de scaffolds para uso en Ingeniería de Tejidos (ITO) es necesario realizar un estudio inicial exhaustivo, donde se evalúan las propiedades mecánicas, morfológicas, químicas y estructurales con el fin de definir si el material fabricado coincide con estas mismas propiedades en el hueso.

En este capítulo se presentan los resultados obtenidos para las pruebas realizadas en los vidrio bioactivos sintetizados y en los scaffolds fabricados con los materiales cerámicos obtenidos.

En conjunto con los resultados, se realiza una comparación con las propiedades naturales del hueso para así definir si el material fabricado es aceptable en el ITO y por lo tanto puede continuar con las etapas definidas para materiales de uso médico, es decir, la posibilidad de realizar estudios *in vitro* e *in vivo* de aquellos materiales que cumplan con las propiedades más adecuadas para la aplicación.



1. SÍLICE OBTENIDA DE FUENTES NATURALES

La sílice obtenida a partir de fuentes naturales fue caracterizada por Espectroscopía Infrarroja por Transformada de Fourier (FTIR) y Difracción de Rayos X (DRX) con el fin de identificar si presenta los picos y bandas característicos de SiO_2 sin presencia de otros elementos que puedan afectar la correcta síntesis de vidrio bioactivo con las diferentes fuentes.

1.1. Extracción de sílice desde raquis de palma

Inicialmente la fuente elegida para la obtención de sílice fue el raquis de palma africano. Este fue sometido a tratamiento alcalino con precipitación de la sílice al cambiar de pH, el polvo obtenido fue sometido a tratamiento térmico para lograr purificar la sílice. Se plantearon dos tratamientos térmicos por debajo de 800°C ya que a esta temperatura inicia el proceso de cristalización del polvo. En la Figura 1 se comparan los dos espectros de infrarrojo de sílice de raquis al someterla a los dos tratamientos térmicos diferentes. El primero se realizó a una temperatura final de 600°C por un tiempo máximo de 10 horas, mientras que el segundo se realizó a 700°C por 6 horas. En el gráfico se observa que ambos espectros presentan bandas características para la sílice identificados con puntos naranja en la figura, donde la banda principal (entre 1100 y 1150 cm^{-1}) (1) se ve solapada por la banda principal de la lignina que vibra en la misma longitud (2). Se observa cómo esta banda disminuye en intensidad al aumentar la temperatura de calcinación debido a la volatilización de los componentes orgánicos; sin embargo, otras bandas que pertenecen a la lignina (en color verde) siguen apareciendo, por lo cual la temperatura usada en el tratamiento térmico fue aumentada hasta 800°C , pero con esto se cristalizó la estructura lo que afectó su correcta recuperación de los crisoles usados.

Las bandas que se encuentran en 1500 y 2000 cm^{-1} pertenecen a ruido del equipo, por lo que no son tenidas en cuenta durante el análisis.

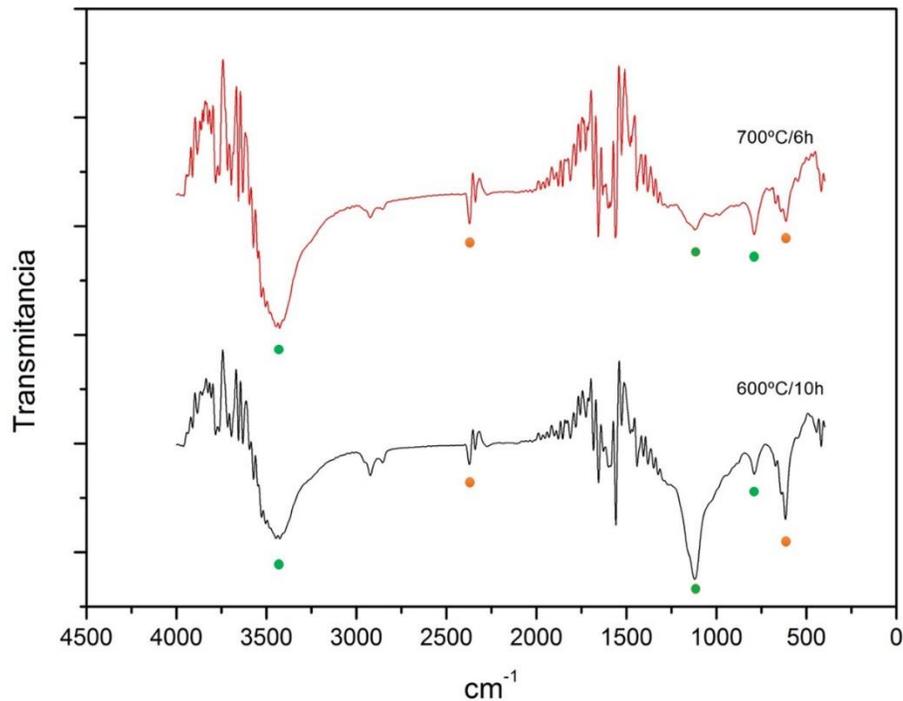


Figura 1. FTIR para sílice obtenida de raquis con dos tratamientos térmicos

1.2. Extracción de sílice desde cáscara de corozo

Debido a la poca disponibilidad del raquis de palma en esta región del país, se opta por utilizar otras fuentes de más fácil acceso. Se decide usar cáscara de corozo. Debido a su morfología, ésta debe ser tratada igual que el raquis de palma; es decir, se debe proceder con un tratamiento alcalino seguido de una precipitación por cambios de pH. En la Figura 2 se presenta el espectro para el FTIR realizado en la sílice extraída a partir de la cáscara del corozo. Se puede observar que, igual que el raquis, presenta las bandas características para la sílice que se observan en 1097 y 608 cm^{-1} aproximadamente (3). Aun así, presenta dos bandas de intensidad considerable que no pertenecen a la sílice y que pueden deberse al tratamiento realizado para la obtención del polvo puro. Estas bandas pueden deberse a la posible formación de sulfato de sodio durante el proceso de extracción que cuenta con un pico por encima de 1500 cm^{-1} y otras bandas que se solapan con las de la sílice como se encuentra en el espectro obtenido para la cáscara de corozo (4).

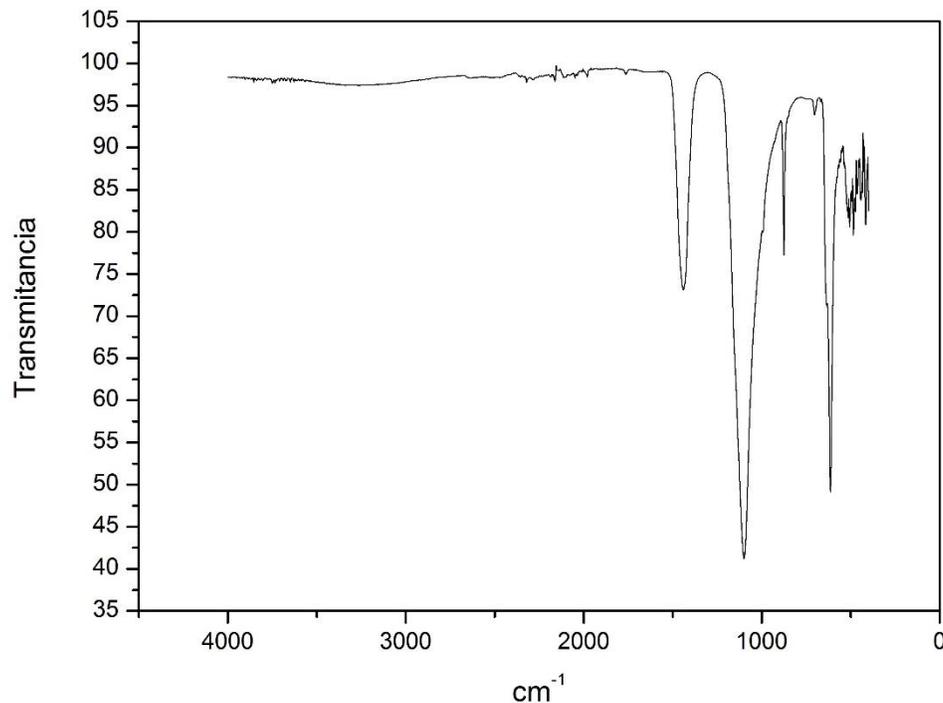


Figura 2. FTIR sílice extraída de la cáscara de corozos

El tratamiento térmico usado en la sílice de la cáscara de corozos también fue utilizado para purificar la sílice extraída del raquis de palma. A este polvo se le realizó un DRX para identificar las fases presentes. Se puede observar en la Figura 3 que el espectro de difracción presenta picos para SiO_2 en aproximadamente $2\theta = 21$ y 30° (5), estos picos están muy pronunciados lo que da indicio de la cristalinidad del material. Por otro lado, se evidencia la presencia de otros picos igual de importantes a los de la sílice y que son debido a la formación de cristales de sulfato de sodio (Na_2SO_4 , código de referencia # 01-070-1541, HighScore Plus) que se atribuyen al tratamiento realizado para la extracción de la sílice. Por lo cual este método no es confiable ya que deja residuos potencialmente peligrosos para la salud humana y por lo tanto no es posible el uso de este material en la síntesis de materiales con fines médicos.

Debido a la presencia del sulfato se intentó proceder con lavados de la sílice obtenido para lograr purificar el material; sin embargo, esto no fue posible ya que el sulfato se encuentra en una forma cristalina que no solubiliza en agua. Es por esto que el proceso de extracción de sílice por tratamiento alcalino debe ser descartado.

Por otro lado, la cantidad de sílice que puede ser extraída a partir del raquis de palma y la cáscara de corozo por otro método diferente al planteado es muy baja, de esta manera no es viable usar estos dos desechos como materia prima en la obtención de sílice.

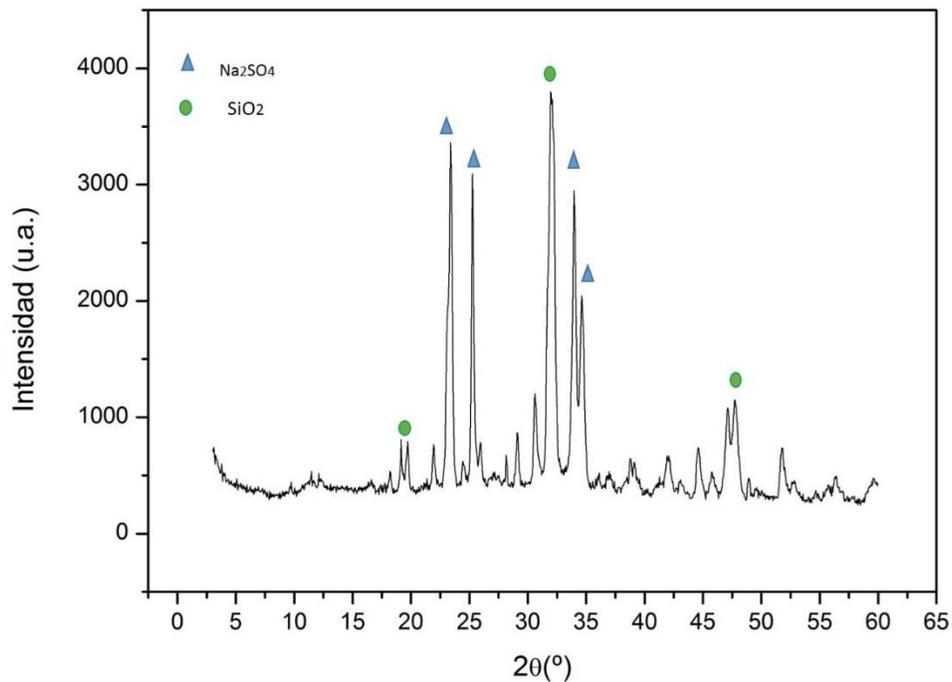


Figura 3. DRX sílice extraída a partir de raquis de palma africana

1.3. Extracción de sílice desde cascarilla de arroz

La cascarilla de arroz es conocida por sus altos niveles de sílice en su estructura. Para la obtención de SiO₂ pura se debe someter la fuente a un tratamiento térmico con el fin de eliminar las fases orgánicas presentes.

El polvo resultante presentaba una coloración rosada muy clara como se aprecia en la Figura 4. Este material fue caracterizado por DRX y FTIR para comprobar si lo que se obtuvo fue sílice pura, o hay presencia de otras fases que puedan influir en el desempeño del material.



Figura 4. Polvo de sílice obtenido de la calcinación de cáscara de arroz

En la Figura 5 se presenta el espectro del FTIR realizado en la sílice, donde se pueden identificar las bandas en 1049 y 792 cm^{-1} correspondientes a sílice pura. Además, el espectro tiene una forma similar al espectro correspondiente para SiO_2 que se encuentra en la base de datos del equipo usado en el análisis (3).

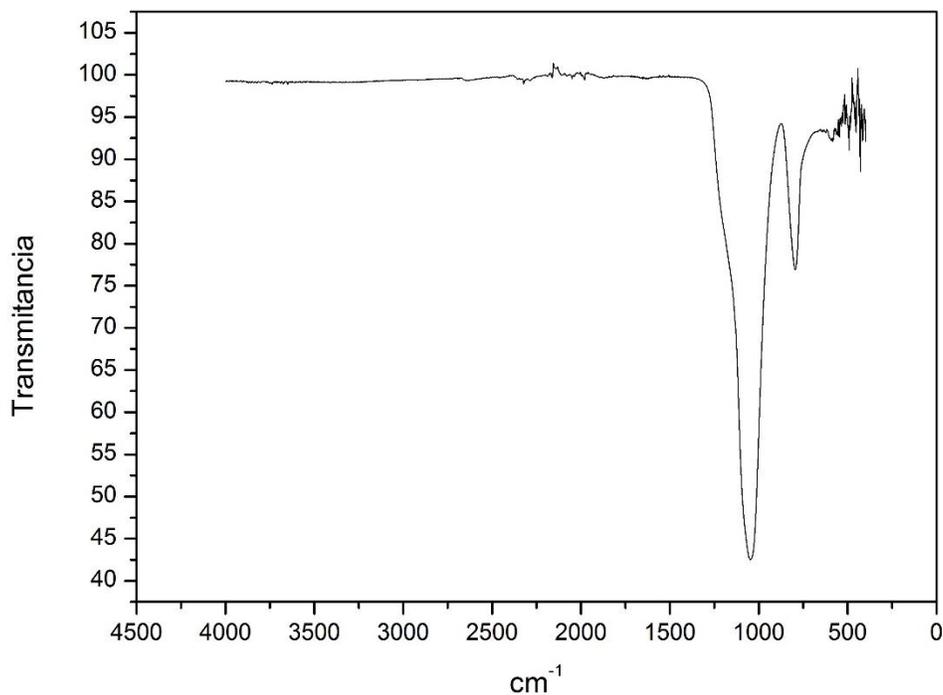


Figura 5. FTIR sílice extraída a partir de cascarilla de arroz

Para complementar la información sobre la sílice se realizó un DRX en el polvo. La Figura 6 muestra el espectro obtenido para este polvo donde se ve que el material es amorfo como es de esperarse en la cascarilla de arroz como lo reportan Virajini, R. *et al.* (2013) (6). El espectro también muestra un pico amplio alrededor de $2\theta=21^\circ$ lo cual es característico para este tipo de material.

Por lo tanto la fuente de sílice seleccionada para proceder con la síntesis de vidrio bioactivo fue la sílice extraída de la cascarilla de arroz, por ser la única en presentar la composición química adecuada sin presencia de otros elementos que puedan causar errores en los procesos subsiguientes. Lo que se pudo comprobar con el resultado del EDS-SEM (imagen no mostrada) donde se evidenció la presencia de óxido de silicio en la muestra sin ningún otro tipo de elemento. Esta prueba se realizó en distintas zonas del material para comprobar la homogeneidad del mismo.

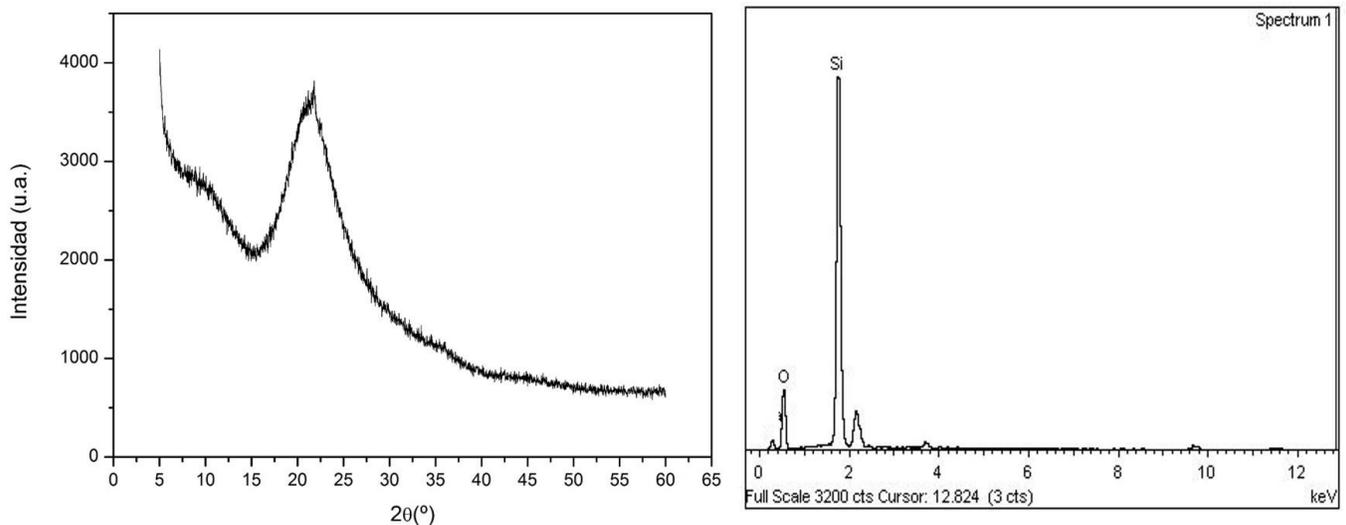


Figura 6. DRX y EDS polvo de sílice extraído de cáscara de arroz

2. CARACTERIZACIÓN DE LOS POLVOS DE VIDRIO BIOACTIVO SINTETIZADOS

2.1. Vidrio bioactivo sintetizado con TEOS

Para definir la composición que presentara un mejor comportamiento bioactivo, se siguió el diseño de mezclas únicamente para los vidrios bioactivos sintetizados con TEOS como fuente de sílice, debido a que al usar fuentes naturales requería tiempo adicional en el proceso. Por otro lado, la metodología empleada en esta síntesis ya se encuentra reportada, mientras que para el uso de fuentes naturales era necesario definir la metodología a emplear, por lo que para efectos de comparación era preferible tener establecida la composición a sintetizar.



En el diseño de mezclas planteado se establecieron 10 diferentes formulaciones, estas fueron sintetizadas de forma aleatoria y caracterizadas inicialmente por DRX para conocer si presentaban los picos característicos de los vidrios bioactivos en un sistema ternario y posteriormente se les hizo un ensayo de bioactividad.

2.1.1. Difracción de Rayos X (DRX)

Debido a su baja cristalinidad, los polvos se sometieron a un proceso térmico alcanzando una temperatura de 1050°C con el fin de obtener picos agudos y diferenciables en el espectro. En la Figura 7 se presentan los resultados para las 10 formulaciones de VB, en la Figura 7a se encuentran los espectros para VB1 hasta VB5 y en la Figura 7b se encuentran los espectros para VB6 hasta VB10. Los picos primarios y secundarios en todos los VB sintetizados son consistentes tanto en ángulo como en intensidad según lo reportado para sistemas similares (7)(8). Se logran identificar los picos primario y secundario característicos para el SiO₂ a $2\theta=30.9$ y 21.3 , respectivamente.

Los picos que se encuentran en $2\theta=34.4$ y 31.3 son los primario y secundario para CaO, respectivamente; y los picos que se encuentran en $2\theta=27.7$ y 25.7 son los primario y secundario para P₂O₅. Estos picos se encuentran presentes en los espectros de todas las formulaciones; sin embargo, los espectros de VB1, VB2, VB3, VB4, VB8 y VB10 muestran otros picos (más de dos) que puedan ser posiblemente debido a la formación de fases indeseables en la estructura, mientras que los espectros de VB5, VB6 y VB9 presentan uno o dos picos de otras fases; posiblemente estas fases se deben a la formación de pseudo-wollastonitas que tienden a formarse con los mismos óxidos usados en la síntesis de vidrio bioactivo (9). Por su parte el espectro para VB7 no presenta ningún pico diferente a los característicos de cada óxido

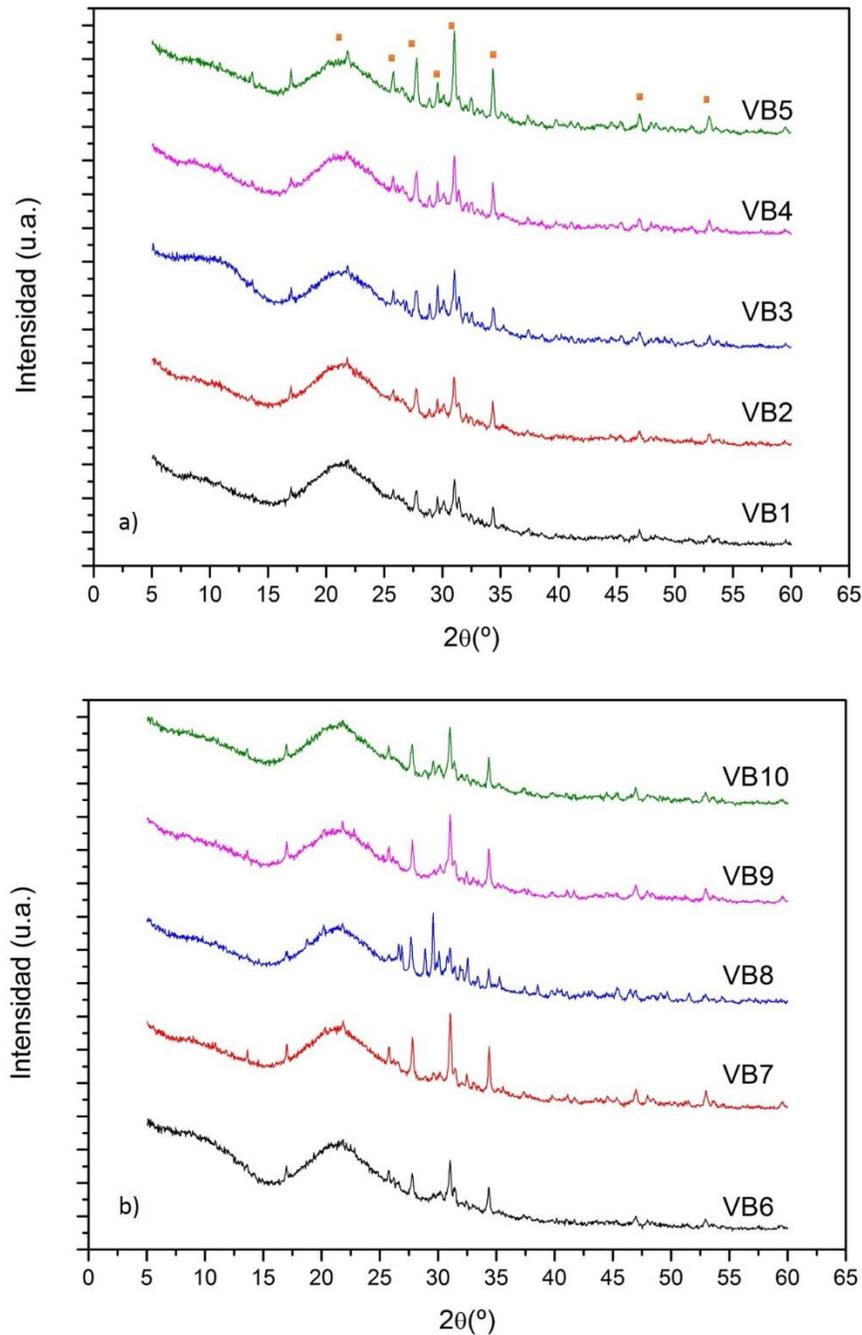


Figura 7. Espectros de DRX para los VB sintetizados después de un tratamiento a 1050°C. a) VB1 a VB5; b) VB6 a VB10

2.1.2. Caracterización posterior a los ensayos *in vitro*

La capa de apatita formada en la superficie de los cilindros realizados con los polvos sintetizados después de ser sometidos a pruebas *in vitro* en SBF se analizaron por SEM y EDS a 7 y 14 días de exposición. En la Figura 8 se encuentran las imágenes SEM para los

10 VB analizados a 7 y 14 días de inmersión en SBF, se puede observar la capa de apatita en la superficie de los cilindros de VB. Se logra evidenciar que el comportamiento no es igual en cada una de las formulaciones, ya que para algunas la capa de apatita disminuye con el tiempo, lo que puede indicar la poca estabilidad de esta capa en esas formulaciones lo que no es deseable en materiales para futuras aplicaciones en ingeniería de tejido óseo. Mientras que para otras formulaciones dicha capa aumenta con el tiempo de exposición en SBF.

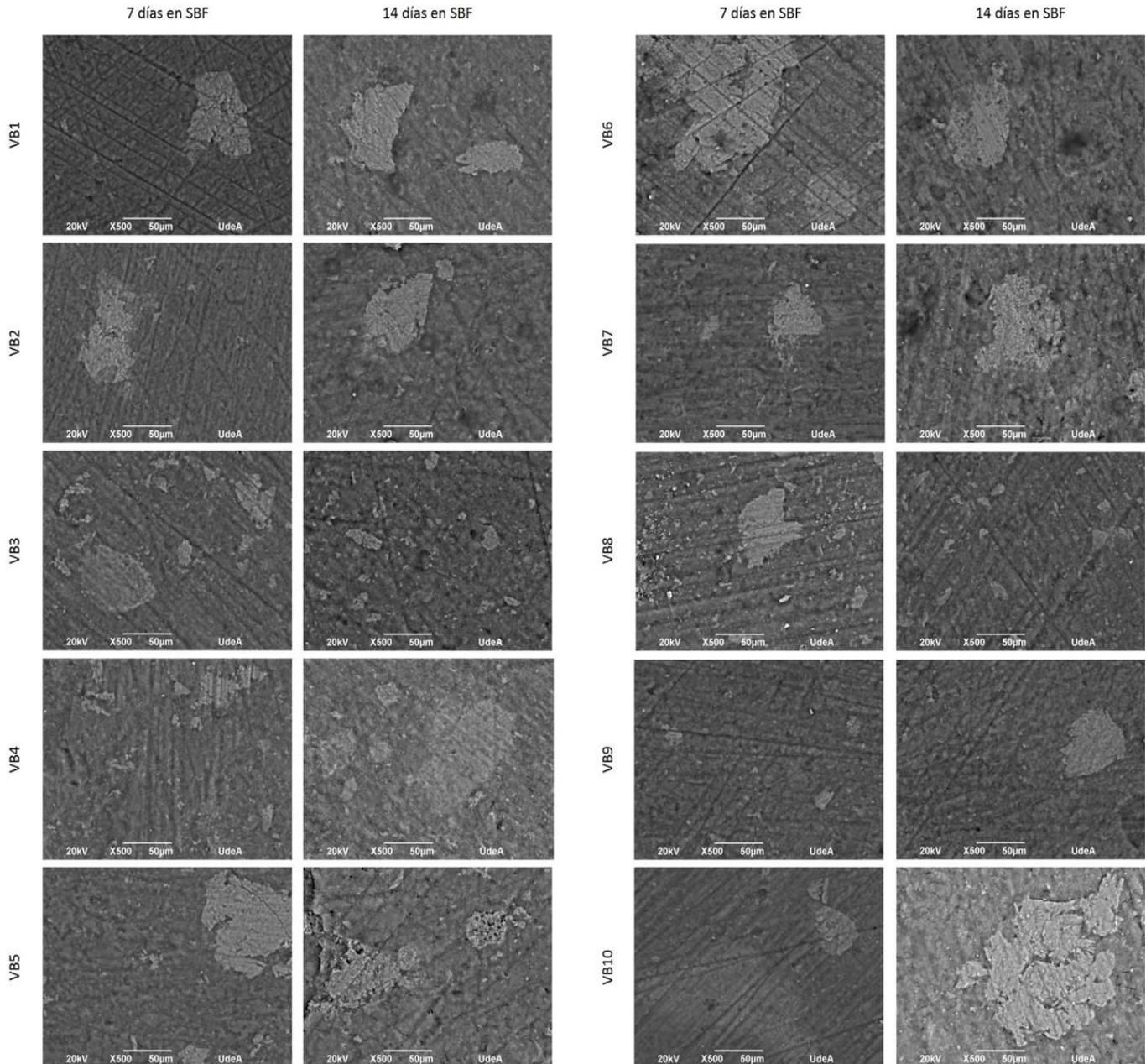


Figura 8. Imágenes SEM de la capa de apatita formada en la superficie de cada uno de los VB sintetizados

La capa de apatita fue analizada usando el software libre ImageJ para así conocer cuánto porcentaje de vidrio bioactivo se encontraba recubierto. Este análisis se realizó en tres



imágenes de cada formulación para así tomar el valor promedio además proceder con el análisis estadístico. El software hace un análisis por diferencia de color en la imagen, donde la zona más clara es la apatita formada. Con esto calcula el porcentaje de zona clara respecto a la zona oscura.

En la Figura 9 se encuentran los resultados promedios con su respectiva desviación para el porcentaje de apatita formada (PAF) en cada formulación a 7 (en color gris) y a 14 (en color oliva) días de exposición en SBF. De esta gráfica se logran observar dos grandes tendencias, por un lado se observa un decaimiento en el PAF en algunos de los VB (VB1, VB2, VB3, VB5 y VB6) con el tiempo de exposición en SBF; mientras que para los VB restantes (VB4, VB7, VB8, VB9 y VB10) se presenta un comportamiento opuesto, es decir, hay un aumento en el PAF con el tiempo. Estas tendencias pueden ser atribuidas a las diferencias composicionales usadas en la síntesis de los VB. A partir de los resultados estadísticos obtenidos del Diseño de Mezclas Restringido (DMR) se logró obtener un valor- $p < 0.05$ para el componente SiO_2 , lo que indica que la cantidad de sílice es la variable con mayor significancia en la respuesta (PAF), este resultado es concordante con lo reportado por Hench (10)(11). Esto quiere decir que a mayores concentraciones de sílice cualquier tipo de unión con tejido se ve limitada, mientras que bajas concentraciones promueven la unión con tejido blando (10). En este sentido, se observa el aumento de la capa de apatita en aquellas combinaciones del DMR con valores intermedios de sílice y la disminución de esta capa en los puntos de borde en el diseño experimental.

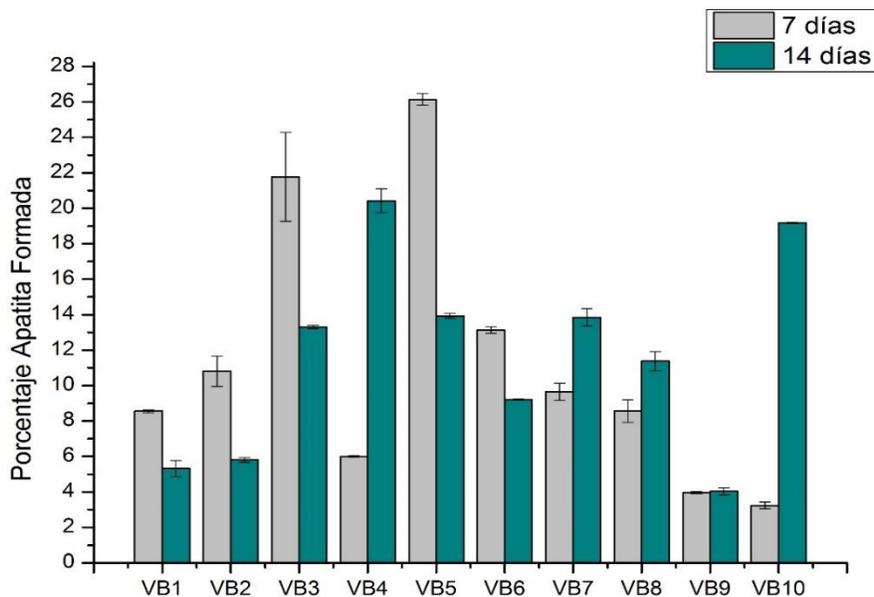


Figura 9. Porcentaje de apatita formada en los VB sintetizados a 7 y 14 días en SBF



Las capas formadas también fueron analizadas por EDS para conocer la relación calcio/fósforo (Ca/P), para ello se tomaron varios puntos con morfología igual usando un mismo voltaje de trabajo con el fin de asegurar que el valor obtenido fuera válido. Los valores promedio obtenidos con su respectiva desviación se encuentran en la Figura 10 donde se presentan los resultados para cada una de las formulaciones a 7 y 14 días en SBF.

Los resultados demuestran que de acuerdo a la composición en el VB la capa de apatita formada puede ser igual a la hidroxiapatita natural, la cual cuenta con una relación Ca/P que varía entre 1.37 y 1.87 (12), lo que indica que las formulaciones VB5 y VB7 obtuvieron los resultados más apropiados después de 14 días de inmersión.

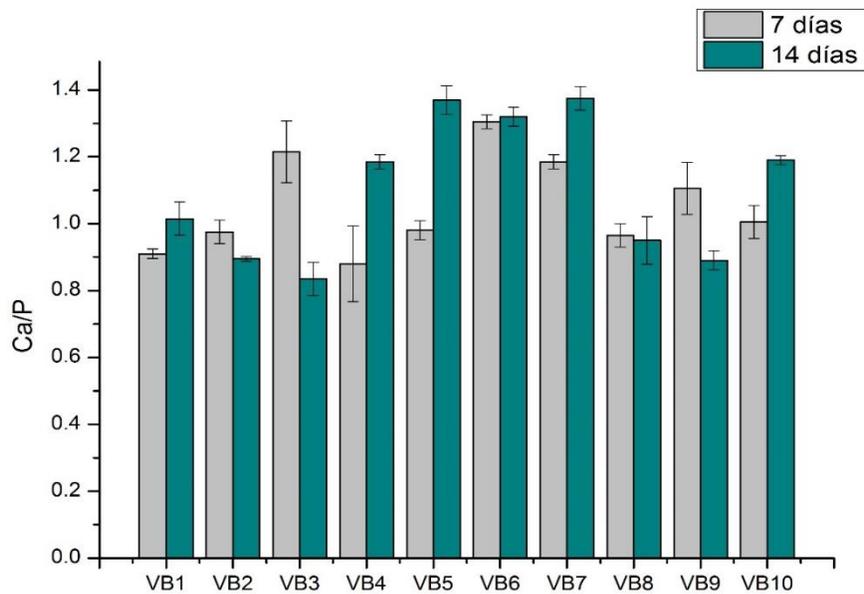


Figura 10. Valor Ca/P para cada uno de los VB después de 7 y 14 días en SBF

El estudio estadístico se realizó teniendo en cuenta tanto los resultados de PAF como los resultados de Ca/P. Con esto se logró definir que el modelo seleccionado (modelo cúbico especial) fue el adecuado y que se ajusta a los datos en un 98% por lo que es posible conocer cómo será el porcentaje de apatita y la relación Ca/P de un vidrio bioactivo conociendo su composición. Además los resultados cumplieron con las características de diseño de normalidad, varianza constante e independencia con lo cual se valida el modelo usado y por lo tanto es posible comparar los datos y así seleccionar la combinación más apropiada para aplicación en ITO.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos para PAF las formulaciones con mejor comportamiento fueron VB4, VB7, VB8, VB9 y VB10; mientras que aquellas con un valor Ca/P más cercano al natural fueron VB5 y VB7, lo que permite identificar la formulación VB7 como aquella con respuestas más apropiadas según la aplicación que se busca que es en ITO. Por otro lado, esta formulación fue la única que no presentó otras fases en el DRX por lo tanto es la composición seleccionada para usar como refuerzo en scaffolds de quitosano.

A la capa de apatita formada en la superficie de VB7 se le analizó la morfología a través de SEM y se identificaron los grupos funcionales por medio de FTIR a 7 y 14 días en SBF. En la Figura 11 se muestra cómo esta capa presenta una estructura pequeña (tamaño de partícula pequeño) y muy aglomerada por lo que es complejo medir el tamaño real. Este resultado demuestra que la capa formada es ventajosa ya que morfologías pequeñas son preferibles en aplicaciones óseas debido a que la apatita natural presenta tamaños micro y nanométricos (13)(12).

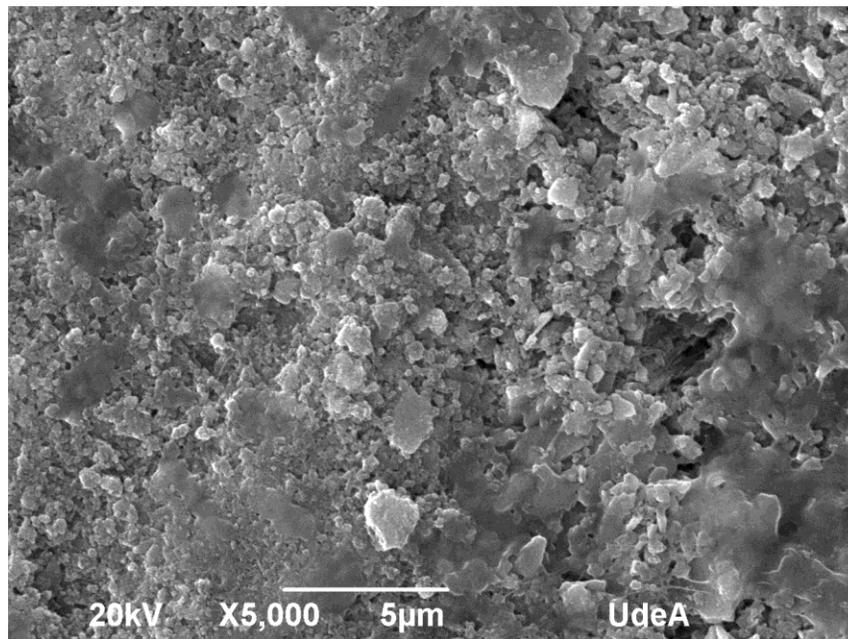


Figura 11. SEM de la capa de apatita formada sobre VB7 a 14 días en SBF

En la Figura 12 se encuentran los espectros de FTIR para VB7 a 0, 7 y 14 días de exposición en SBF donde se puede observar en los tres espectros una banda intensa entre 1400 y 840 cm^{-1} , el cual se encuentra centrado en aproximadamente 1097 cm^{-1} relacionada a la formación de una red de silicato. Esta banda presenta dos hombros en 1396.23 y 947.69 cm^{-1} . Según la literatura las bandas a 1396 y 1097 cm^{-1} corresponden a los modos de estiramiento asimétrico de los grupos Si-O-Si; mientras que la banda a 947 cm^{-1} corresponde a las vibraciones de los grupos Si-O⁻ (14).

Además, los espectros correspondientes para 7 y 14 días de exposición en SBF presentan bandas en 568 y 601 cm^{-1} que son debido a las vibraciones del enlace P - O en los grupos PO_4^{3-} , igualmente una banda en 792 cm^{-1} relacionada con el estiramiento del enlace P-O, lo que indica la presencia de fases cristalinas de fosfatos de calcio relacionados con la formación de una capa de apatita en la superficie (15). Estas bandas aumentan en intensidad a medida que aumenta el tiempo de exposición en SBF, lo que está de acuerdo con el análisis por SEM al ver el aumento de deposiciones en la superficie de la pastilla de vidrio bioactivo.

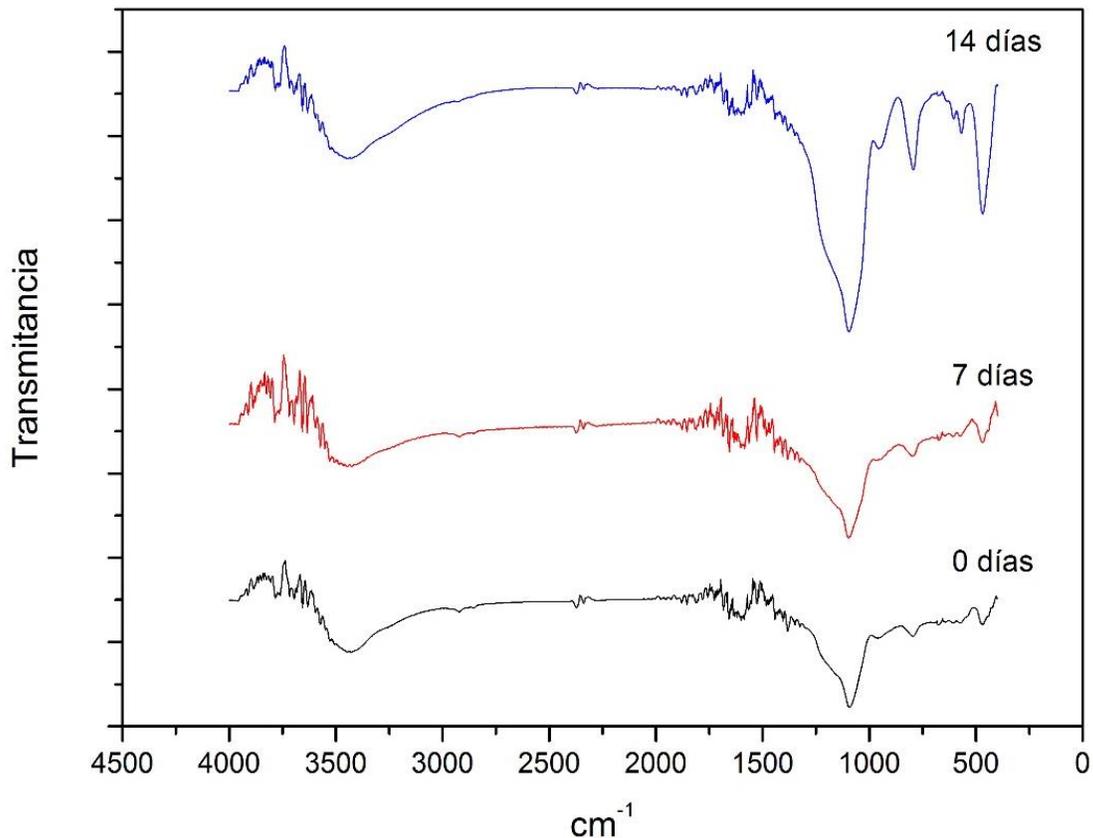


Figura 12. Espectro FTIR en VB7 para 0, 7 y 14 días de exposición en SBF

2.1.3. Espectroscopía Raman

El vidrio bioactivo seleccionado (VB7) fue caracterizado por medio de Espectroscopía Raman para evaluar fases que tal vez no fueron perceptibles en DRX o en FTIR. En la Figura 13 se encuentra el espectro obtenido para VB7 donde se evidencia que falta una banda entre $643\text{-}654\text{ cm}^{-1}$ lo que indica la hidrólisis del TEOS durante la síntesis. Adicionalmente la presencia de las bandas en aproximadamente 424 y 489 cm^{-1} indican la condensación de silanol en siloxano con el enlace Si-O-Si. En general las bandas entre 800 y 1450 cm^{-1} son

debidas al enlace Si-O-Si en silicatos con configuración tetraédrica. Por otro lado, el pico intenso en 958 cm^{-1} es debido a la vibración del grupo PO_4 . Este es el pico más intenso y puede enmascarar también un pico alrededor de 920 cm^{-1} perteneciente a la sílice. Con esta prueba se logra comprobar que se logró una correcta síntesis del polvo, además todos los puntos elegidos para realizar el estudio mostraron el mismo espectro indicando la homogeneidad de la muestra (14)(16).

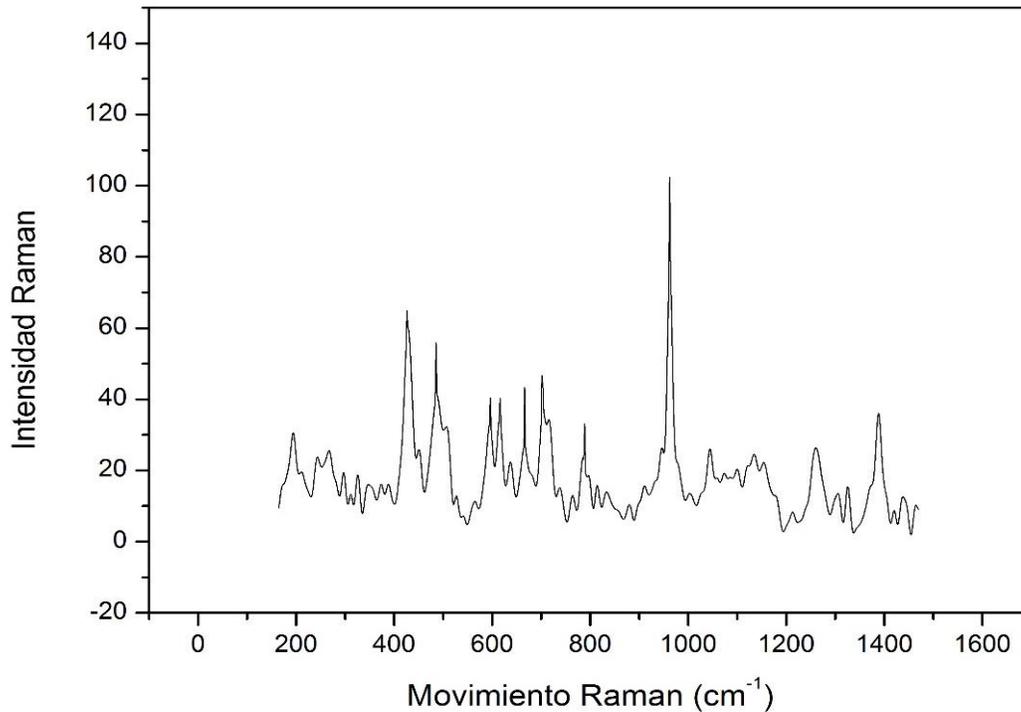


Figura 13. Espectroscopía Raman en VB sintetizado con TEOS

2.1.4. Microscopía Electrónica de Barrido (SEM)

El polvo sintetizado se analizó por Microscopía Electrónica de Barrido con el fin de conocer su morfología, homogeneidad y tamaño de partícula. En la Figura 14 se muestran las imágenes SEM para VB7 a diferentes aumentos. Se logra evidenciar que el polvo se encuentra muy aglomerado aún en altos aumentos, lo que no permite definir correctamente la morfología ni el tamaño de partícula, por lo que es posible que el tamaño esté en el rango sub-micrométrico o incluso nanométrico. Por otro lado, al observar toda la muestra a las mismas magnificaciones se puede decir que el polvo permanece homogéneo en su estructura, lo que es deseable para que las propiedades bioactivas se mantengan en todo el material.

Al observar la imagen a 30000X, es posible hacer una aproximación en la morfología del polvo, el cual aparentemente es en forma alargada; sin embargo no es posible medir su longitud para lograr definir si se trata de barras o de whiskers.

Adicionalmente se midió la densidad del polvo como otra característica física del mismo; esta medida se realizó con la técnica del picnómetro. Se determinó que la densidad para VB7 fue de $1.80407 \pm 0.01 \text{ g/cm}^3$ (25°C). Este valor de densidad es comparable con el valor de densidad aparente en el hueso cortical (1.85 g/cm^3) (17)(18).

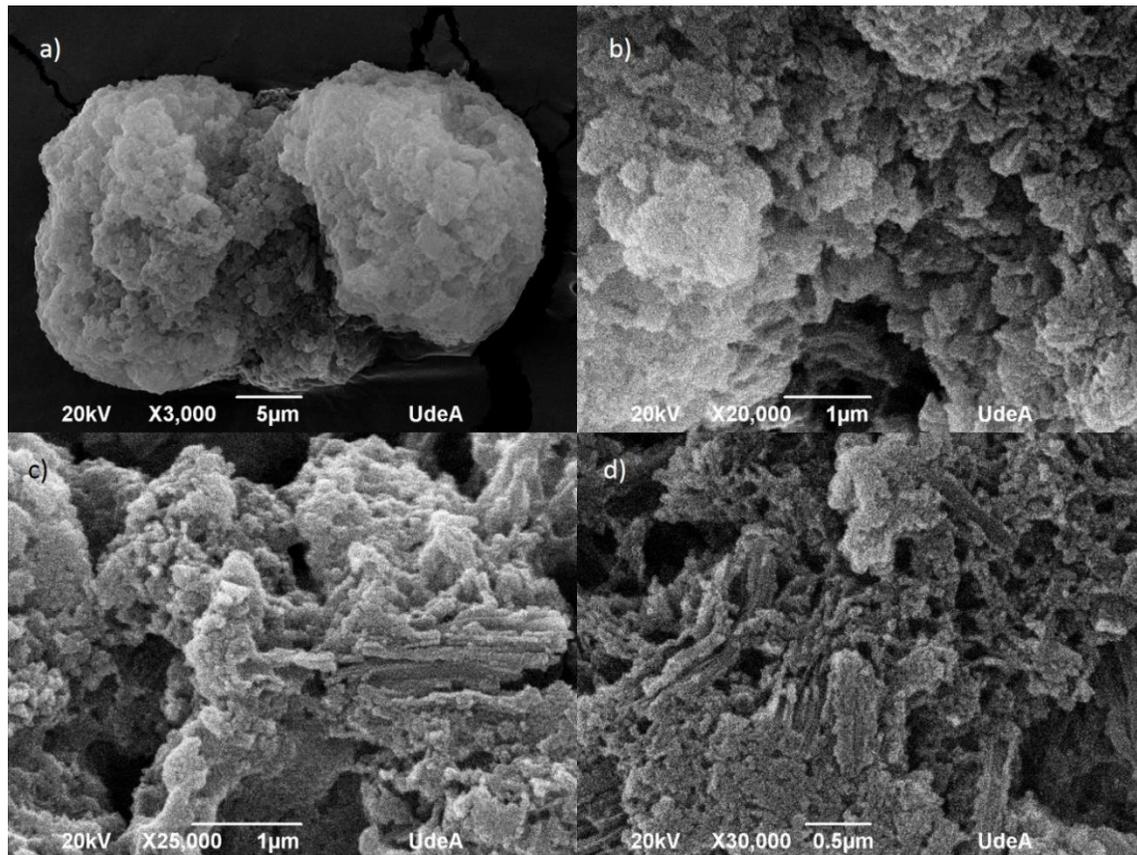


Figura 14. Imágenes SEM para VB sintetizado con TEOS, a) aumento a 3000X, b) aumento a 20000X, c) aumento a 25000X y d) aumento a 30000X

2.2. Vidrio bioactivo sintetizado con sílice de fuente natural

Como se mencionó anteriormente, la fuente de sílice usada fue la cascarilla de arroz ya que fue la que permitió obtener sílice pura sin remanentes del proceso de extracción. Sin embargo, la sílice obtenida de raquis de palma y de cáscara de corozos fue usada en la síntesis de vidrio bioactivo para comprobar si era posible realizar el proceso con estos materiales.



2.2.1. Difracción de Rayos X (DRX)

El VB sintetizado con sílice de raquis de palma no logró alcanzar una fase de gel a pesar de dejarse en agitación constante por aproximadamente 6 horas, por lo que fue necesario forzar el gelado por medio de un tratamiento térmico a 70°C por 24 horas y posteriormente se sometió a calcinado a 1050°C para cristalizar la estructura y caracterizar por DRX.

En la Figura 15 se presenta el DRX realizado en el VB sintetizado, se observan los picos característicos para SiO₂, CaO y NaO; aun así, también se observan picos que pertenecen a sulfato de sodio correspondiente al proceso de precipitación de la sílice a partir del raquis de palma como se esperaba de la caracterización realizada en la sílice. Estas fases se comprobaron usando el software HighScore Plus con el cual se logró identificar tres fases como sulfato de sodio (Na₂SO₄, código de referencia # 01-070-1541), silicato de sodio y calcio (Na₄Ca₄Si₆O₁₈, código de referencia # 01-078-0364) y silicato de sodio y calcio (Na₂Ca₃Si₆O₁₇, código de referencia # 00-016-06-90).

Por lo tanto, el método empleado es descartado ya que no se obtiene un sistema comparable con el realizado para el VB sintetizado con TEOS debido al contenido de sodio y la falta de una fuente de fósforo. Por otro lado, la fuente de sílice (raquis de palma) también se descarta del proceso por la poca disponibilidad del producto y porque con la metodología empleada en la extracción de la sílice quedan remanentes que pueden afectar la bioactividad del producto final.

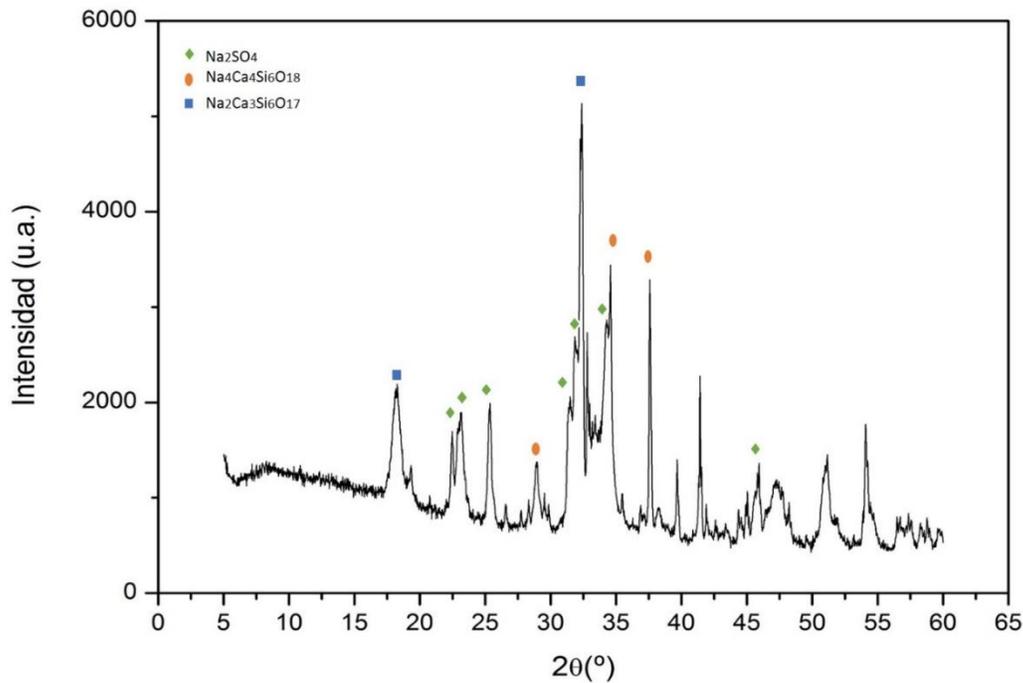


Figura 15. DRX para VB sintetizado usando sílice obtenida de raquis de palma africana

El procedimiento definido se realizó con la sílice extraída de la cáscara de corozos y de la cascarilla de arroz. Durante el proceso experimental con la cáscara de corozo no se logró obtener un gel por lo que fue necesario forzar el proceso con temperatura. Mientras que para la cascarilla de arroz esto se logró después de aproximadamente 5 horas de agitación.

En la Figura 16 se muestran los espectros obtenidos por DRX para ambos polvos sometidos a calcinación hasta temperatura de estabilización (600°C) comparados con el espectro realizado en VB7 sintetizado con TEOS también sometido a 600°C. Se observa como el VB sintetizado con la cascarilla de arroz es similar al realizado con TEOS; mientras que, el VB con cáscara de corozo se asemeja al sintetizado con raquis de palma teniendo en cuenta que también presenta los picos propios del fósforo indicando la presencia de sulfato de sodio en la estructura.

De esta manera se comprueba que la cáscara de corozo y el raquis de palma no son buena fuente de sílice para la síntesis de vidrio bioactivo. Por el contrario, la cascarilla de arroz es fácil de procesar y permite obtener un VB en el sistema ternario planteado comparable con el sintetizado con TEOS.

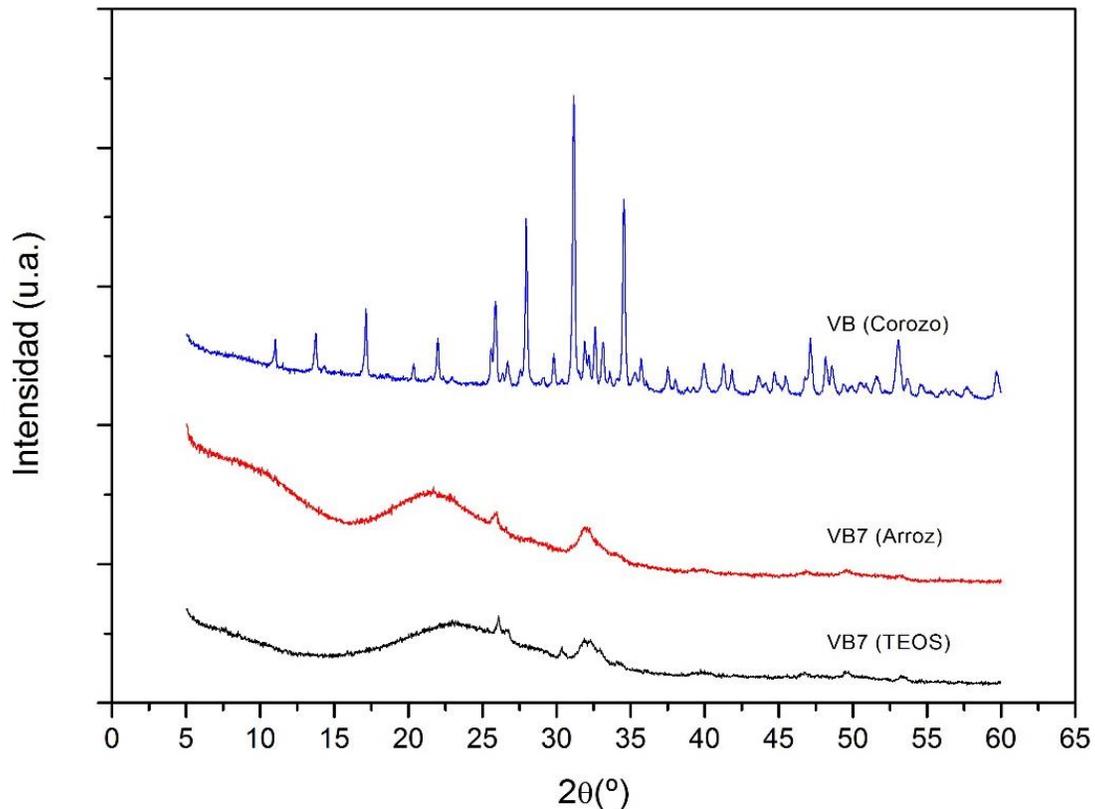


Figura 16. DRX comparativo para VB de TEOS, cascarilla de arroz y cáscara de corozo

2.2.2. Caracterización posterior a los ensayos *in vitro*

El VB sintetizado con la sílice extraída de la cascarilla de arroz fue sometido a ensayo *in vitro* en SBF. Para ello el polvo se conformó en discos usando la misma técnica con la que se hicieron los discos usados en el ensayo de bioactividad para los VB sintetizados con TEOS. Los discos fueron sumergidos en la solución por 7 y 14 días para analizar la formación de capa de apatita en la superficie. En la Figura 17 se muestran las imágenes SEM obtenidas al mismo aumento para las pastillas expuestas a 7 y 14 días en SBF. En las imágenes se observan fracturas en las pastillas, lo que indica la poca estabilidad del polvo en la solución lo que provoca debilitamiento en la estructura provocando fragmentaciones. Sin embargo, se logra evidenciar la presencia de capa de apatita en la superficie, y que la cantidad de estas deposiciones aumenta con el tiempo de exposición en SBF; con lo cual se evidencia la bioactividad del polvo sintetizado. Aun así, no es posible realizar una cuantificación del porcentaje de superficie de VB recubierta.

Sobre estos puntos de capa de apatita se tomaron varios EDS con el fin de conocer aproximadamente el valor de la relación Ca/P de la apatita formada. El valor de Ca/P para la apatita formada a 7 días en SBF fue de 2.35 ± 0.07 debido a que aún había presencia del Ca

perteneciente a la formulación del VB. Mientras que para la apatita formada a 14 días fue de 1.96 ± 0.6 , lo que indica una reacción completa de los componentes del VB con el medio provocando la formación de una capa estable con una composición similar a la del hueso.

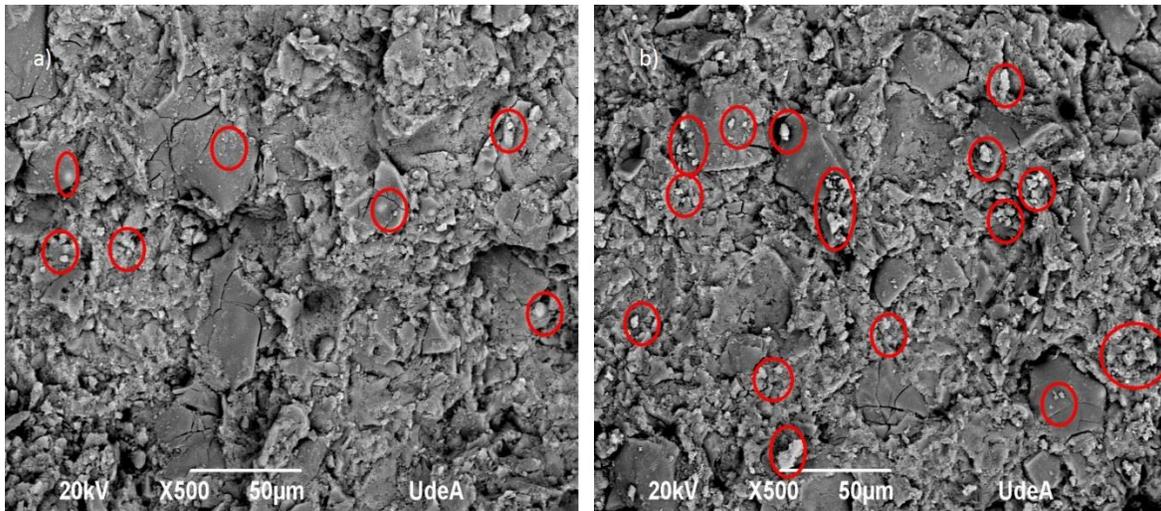


Figura 17. Imágenes SEM capa de apatita en VB sintetizado con sílice extraída de cascarilla de arroz, a) 7 días en SBF y b) 14 días en SBF

Por otro lado, se tomó una imagen de la capa de apatita formada después de 14 días en SBF. En la Figura 18 se encuentra una imagen a 5000X de la capa, donde se observa una morfología en partículas aglomeradas con diámetros menores a $1\mu\text{m}$, lo que es deseable para una aplicación en ITO, ya que puede asemejarse a la estructura de la apatita natural. Además, se logra observar que esta morfología es similar a la de la apatita formada sobre el VB sintetizado con TEOS después de 14 días en SBF.

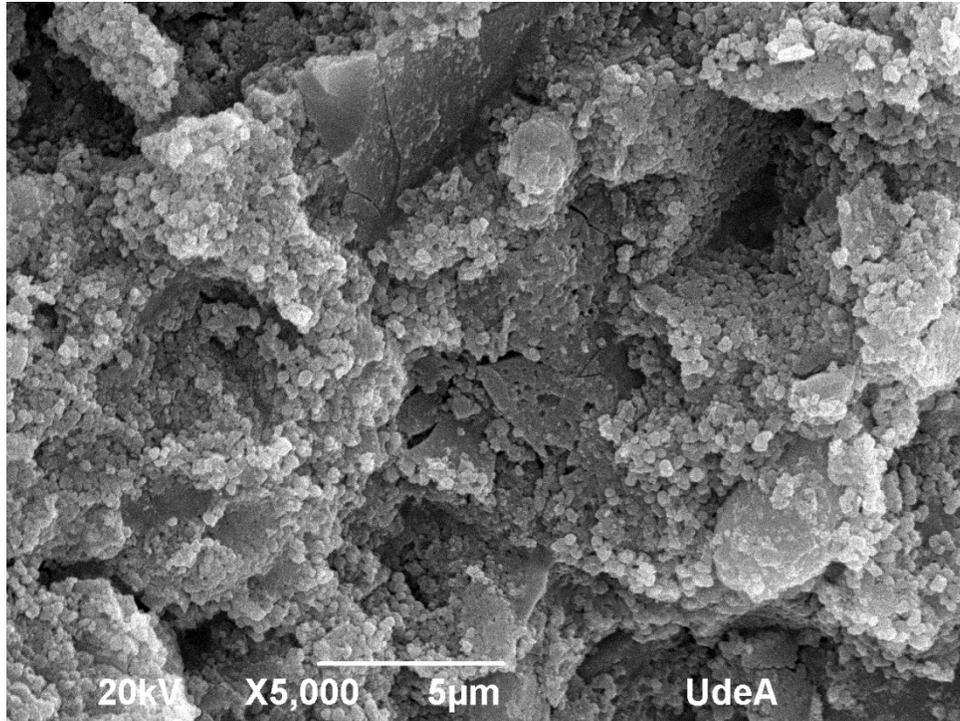


Figura 18. SEM en capa de apatita formada sobre VB después de 14 días de exposición en SBF

Para corroborar la formación de apatita en la superficie de las pastillas de VB sintetizado con la sílice extraída, se realizó un FTIR antes y después de 7 y 14 días de exposición en SBF. En la Figura 19 se presentan los espectros obtenidos, se observa que todos presentan una forma similar; sin embargo, se evidencia el aumento en intensidad de la banda en aproximadamente 798 cm^{-1} , lo que indica que hay un aumento en la cantidad de fosfatos, debido a que en esta banda se da el estiramiento del enlace P-O indicando la presencia de fases cristalinas de fosfatos de calcio. Por otro lado, la banda centrada en 1029 cm^{-1} está relacionada con la formación de una red de silicatos, con lo que se corrobora la presencia de la red de vidrio bioactivo en la estructura.

Las demás bandas relacionadas con la presencia de apatita en el material no son fácilmente identificables, ya que la pastilla de VB no se encontraba muy estable estructuralmente después de retirada del SBF; además la capa formada se desprendía de la pastilla, por lo tanto la medición no era muy precisa.

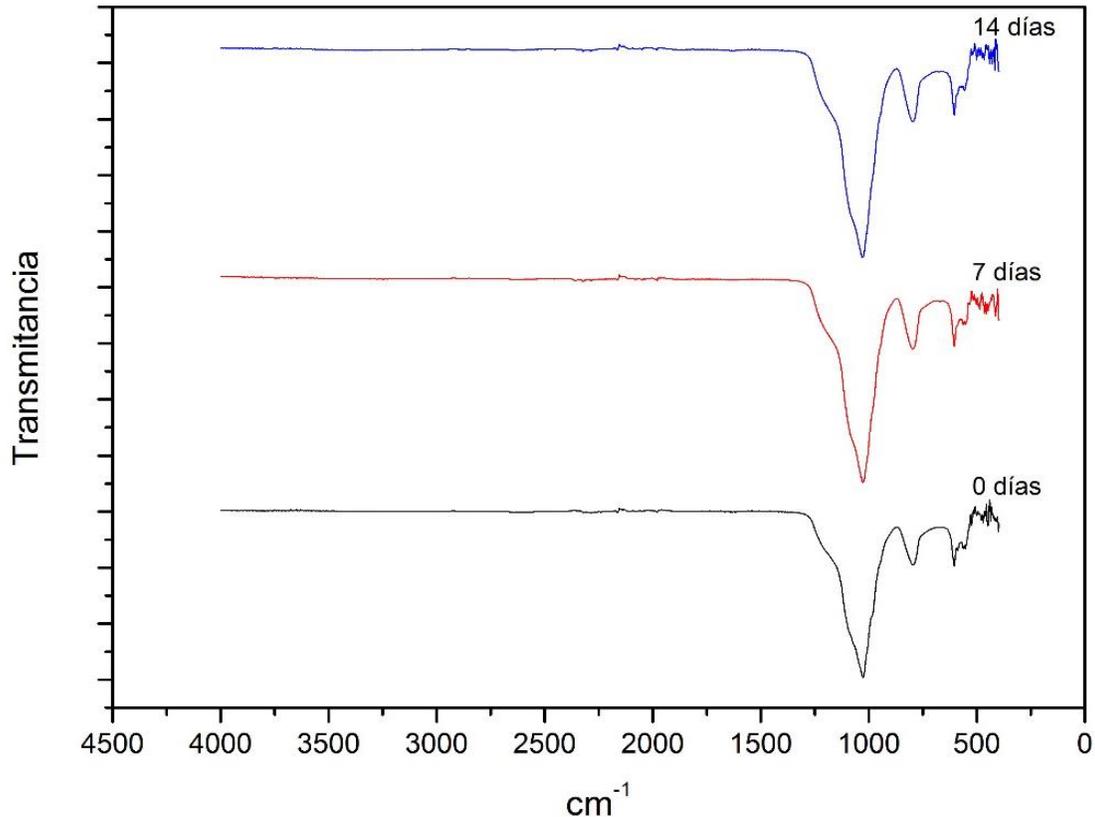


Figura 19. FTIR para VB sintetizado con la sílice extraída a 0, 7 y 14 días de exposición en SBF

2.2.3. Espectroscopía Raman

Para completar la caracterización del polvo y complementar la información obtenida a partir del DRX y el FTIR se realizó un Raman. En la Figura 20 se encuentra uno de los espectros obtenidos para VB sintetizado con sílice de cascarilla de arroz; en este se pueden observar una serie de bandas entre 800 y 1450 cm^{-1} debidas al enlace Si-O-Si en silicatos con configuración tetraédrica. Por otro lado, se evidencia que el pico más intenso se encuentra en 958 cm^{-1} lo que indica la vibración del grupo PO_4 , el cual puede enmascarar también un pico perteneciente a la sílice (14)(16). De esta manera se logra evidenciar que la metodología empleada para la síntesis de vidrio bioactivo usando sílice extraída de fuente natural fue la adecuada y se logró obtener un polvo similar al obtenido con TEOS. Adicionalmente, las distintas medidas realizadas en el polvo mostraron un espectro similar en todas demostrando la homogeneidad del material sintetizado.

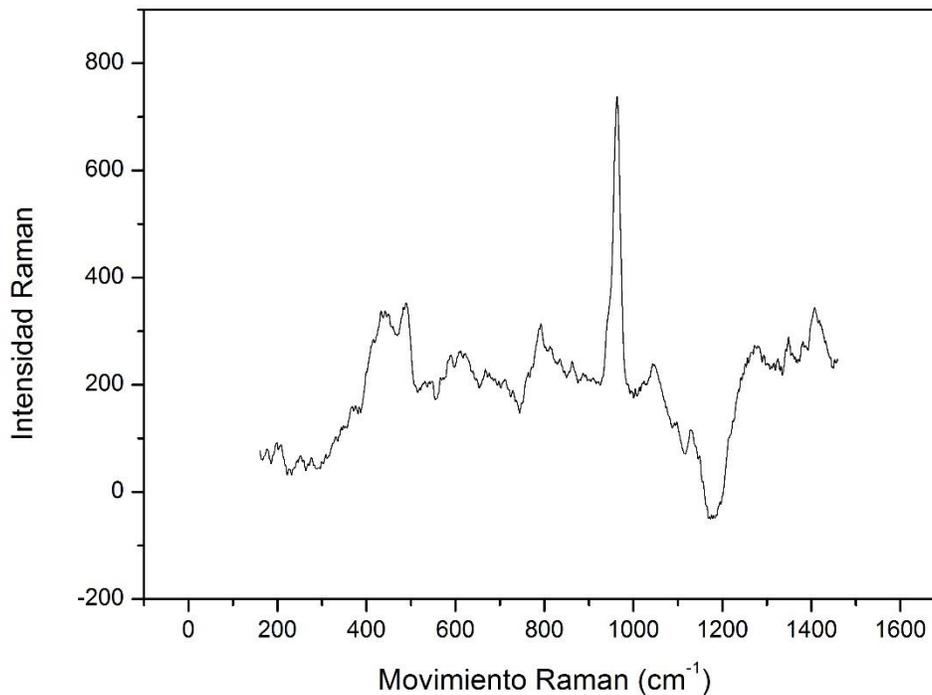


Figura 20. Espectroscopía Raman en VB sintetizado con cascarilla de arroz

2.2.4. Microscopía Electrónica de Barrido (SEM)

Para identificar las propiedades físicas del polvo, se realizó microscopía con el fin de conocer la morfología, homogeneidad y tamaño de partícula. En la Figura 21 se muestran las imágenes SEM tomadas en el polvo sintetizado usando la sílice extraída. Se observa que el tamaño de partícula de este polvo es pequeño, alrededor de $0.34 \mu\text{m}$; posee una morfología en partícula homogénea en todo el polvo. El tamaño de partícula es mayor para este VB en comparación con el obtenido con TEOS; sin embargo, el tamaño es apropiado para la aplicación, ya que el polvo servirá de refuerzo en una estructura porosa tridimensional por lo que no se exigen tamaños de partícula definidos.

Finalmente, se midió la densidad del polvo por la técnica del picnómetro, el resultado fue de $1.9772 \pm 0.01 \text{ g/cm}^3$ (25°C). Este valor, así como el obtenido para el VB sintetizado con TEOS, es comparable con la densidad del hueso cortical.

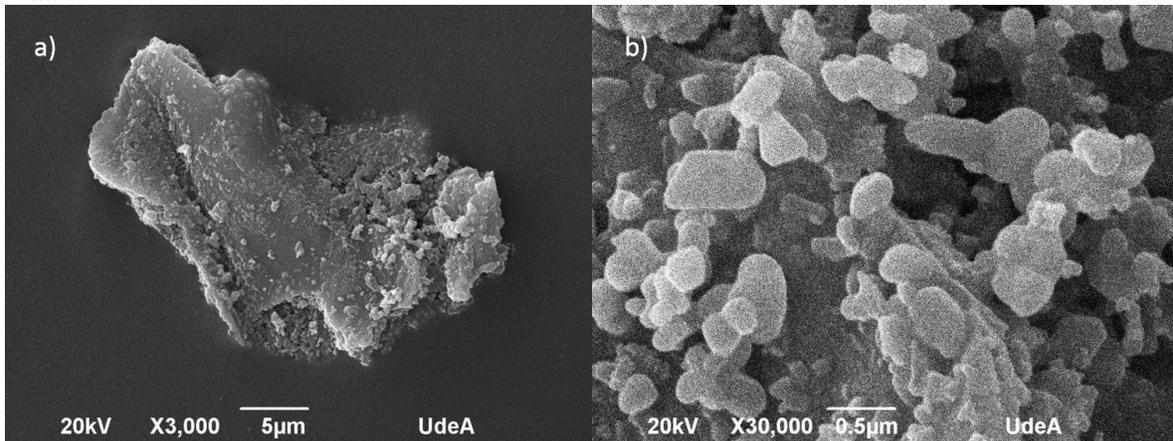


Figura 21. Imágenes SEM para VB sintetizado con cascarilla de arroz, a) aumento de 3000X y b) aumento de 30000X

3. CARACTERIZACIÓN DE LOS SCAFFOLDS PREPARADOS CON LOS VIDRIOS BIOACTIVOS OBTENIDOS

3.1. Caracterización Química

Los scaffolds fabricados fueron caracterizados químicamente por medio de dos técnicas para conocer su composición y hacer una aproximación a la posible unión entre el quitosano y los VB sintetizados por medio de DRX y FTIR; ya que si se presentan corrimientos en las bandas características de cada material, cabe la posibilidad de que entre los materiales existe una unión química.

3.1.1. Difracción por Rayos X (DRX)

Inicialmente se realizó un DRX en los scaffolds para analizar la porción cristalina y amorfa de los scaffolds, además con el fin de analizar interacciones químicas entre el quitosano y los VB sintetizados. En la Figura 22 se muestran los espectros obtenidos para los scaffolds comparados con los espectros de cada uno de los VB usados. Se observa que el gráfico para el quitosano presenta un alto grado de amorficidad, lo que es de esperarse en un polímero; aun así, se observa un pico característico para este material alrededor de $2\theta=20^\circ$ lo que demuestra una cristalización ortorrómbica tipo II del quitosano (19). En la Figura 22b se presentan los espectros para los scaffolds fabricados con el VB sintetizado con TEOS, en estos se puede observar como el pico característico del quitosano presenta un corrimiento hacia la derecha y disminuye en intensidad igualmente los picos del VB, lo que indica que es muy posible que haya una interacción química entre ambos materiales y que esta aumenta a



medida que aumenta la cantidad de VB en la estructura como se puede ver en el gráfico para CH/VB con relación 1:1 (19).

Por su parte, la figura a muestra los espectros de los scaffolds fabricados con VB sintetizado con sílice extraída. De la misma manera como se observó con el TEOS, se logra evidenciar el corrimiento y disminución del pico del quitosano, pero se ve como en el scaffold con relación CH/VB 2:1 se observan muy definidos los picos del VB lo que puede indicar que en este scaffold la interacción química no parece ser la adecuada.

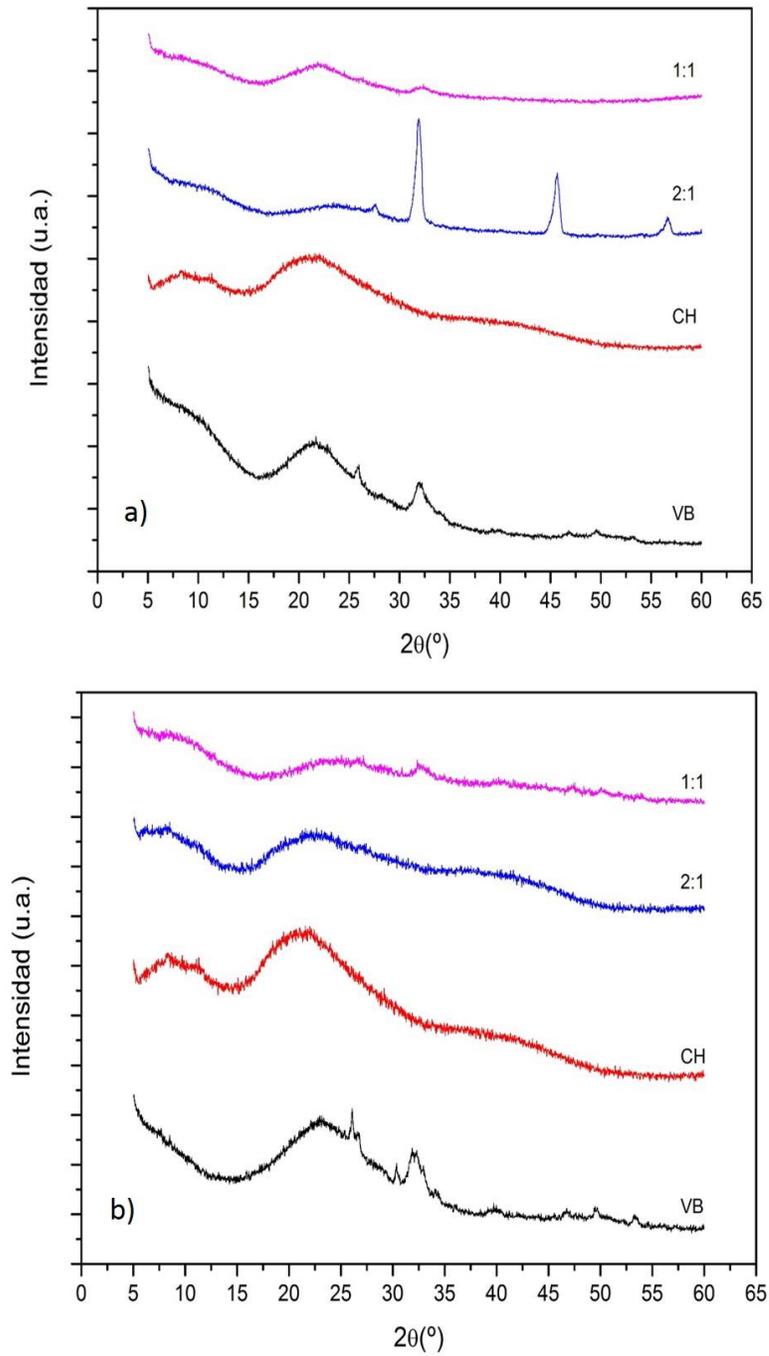


Figura 22. DRX scaffolds fabricados con quitosano y VB sintetizado con a) sílice extraída y b) TEOS



3.1.2. Espectroscopía Infrarroja con Transformada de Fourier (FTIR-ATR)

Para corroborar si se presentó una interacción química entre el quitosano y los VB sintetizados, se realizó un FTIR en cada uno de los scaffolds. Los resultados se presentan en la Figura 23. Se logran identificar las bandas características para el quitosano, la banda a 2930 cm^{-1} es debida al estiramiento del enlace C-H, por su parte, la banda en aproximadamente 1700 cm^{-1} hace referencia al estiramiento del enlace C=O en la Amida I, en 1375 cm^{-1} se presenta la deformación C-CH₃. La banda perteneciente a la Amida II puede observarse en el rango de 1586 cm^{-1} y se encuentra relacionada con la vibración del enlace N-H, en el rango de 1278 cm^{-1} se puede encontrar la vibración de la Amida III relacionada con el grupo NHCOCH₃; finalmente en 895 cm^{-1} puede encontrarse el estiramiento del enlace C-O-C en la estructura sacárida y en aproximadamente 1029 cm^{-1} la banda del enlace cíclico C-O (19)(20).

Al observar los espectros de los scaffolds fabricados con VB sintetizado con TEOS, se observa que ambas formulaciones cuentan con las bandas características del quitosano y del VB, pero con movimiento hacia la izquierda y disminución de la intensidad lo que evidencia nuevamente posible interacción química entre ambos materiales. Este cambio es más notorio en el scaffold con la mayor concentración de VB en la estructura (CH/VB 1:1). Al realizar este mismo análisis en los scaffolds fabricados con VB sintetizado con sílice extraída, se evidencia que sucede el mismo comportamiento; sin embargo, en este caso el cambio es más notorio en el scaffold con menor concentración de VB (CH/VB 2:1).

Teniendo en cuenta los DRX para los scaffolds fabricados con ambos VB y los FTIR es posible decir que ambos polvos presentaron una posible interacción química con el quitosano debido a la posible generación de puentes de hidrógeno entre los materiales, lo cual es deseable ya que esto se traduce en un mejoramiento de las propiedades mecánicas en comparación con scaffolds únicamente de quitosano.

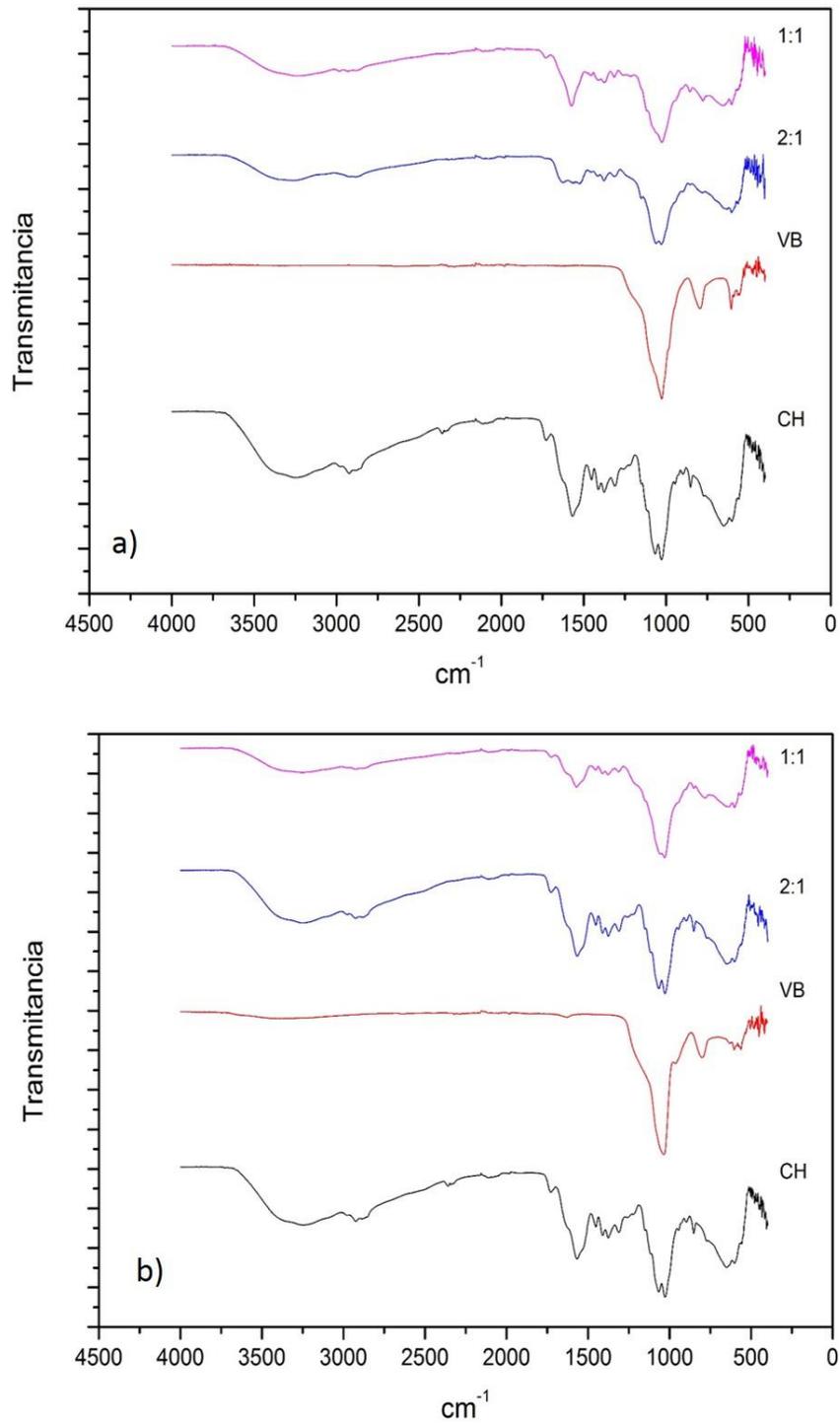


Figura 23. FTIR en los scaffolds fabricados con los VB sintetizados de a) sílice extraída y b) TEOS

3.2. Caracterización Morfológica

3.2.1. Microscopía Electrónica de Barrido (SEM)

Con el fin de evaluar la porosidad de los scaffolds fabricados y el tamaño de poro se tomaron distintas imágenes SEM en cada una de las estructuras fabricadas. En la Figura 24 se encuentran las imágenes obtenidas para el scaffold de quitosano en dos vistas, transversal en las imágenes a y b, y superior en las imágenes c y d con dos distintas magnificaciones. Se observa una estructura lamelar con el crecimiento de poros en una dirección. Estos poros presentan tamaños muy diversos que van desde los 300 μm hasta los 900 μm aproximadamente, con un promedio de $678.837 \pm 229.59 \mu\text{m}$ (valor obtenido luego de analizar las imágenes con el software ImageJ).

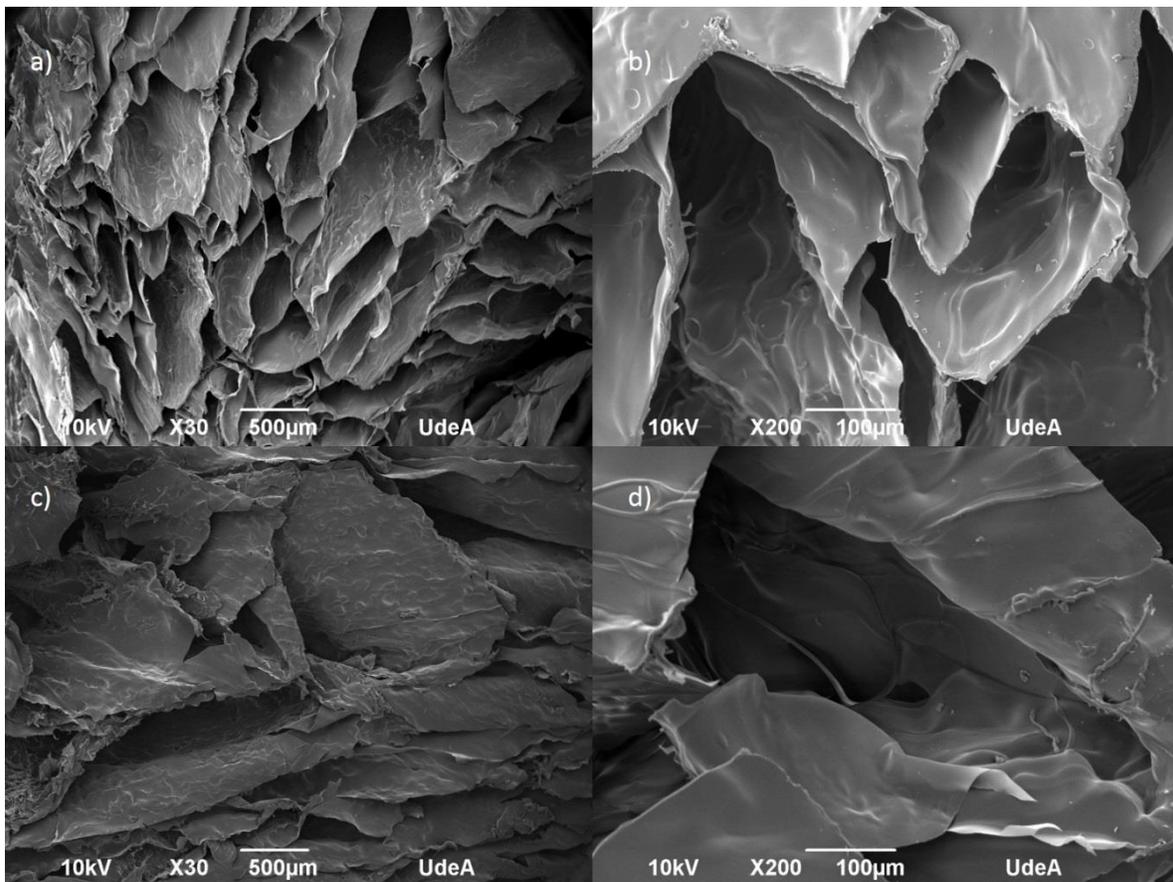


Figura 24. Imágenes SEM en scaffold de quitosano en vista transversal a) 30X y b) 200X y vista superior c) 30X y d) 200X

En la Figura 25 se encuentran las imágenes para el scaffold fabricado con CH/VB en relación 2:1 con el VB sintetizado con TEOS. En las imágenes obtenidas del corte transversal se puede

observar el mismo tipo de estructura lamelar además se pueden ver en las paredes de los poros la presencia de las partículas de VB. Sin embargo, en el corte superior ya no se evidencia tanta porosidad lo que quiere decir que las partículas cerámicas obstruyen los poros en esta dirección. Al analizar las imágenes con el software ImageJ se obtienen una distribución de tamaño de poro que va desde 360 hasta 620 μm , donde el promedio es de $512.49 \pm 82.85 \mu\text{m}$, lo que se traduce en una porosidad más homogénea sin perder la estructura otorgada por el quitosano.

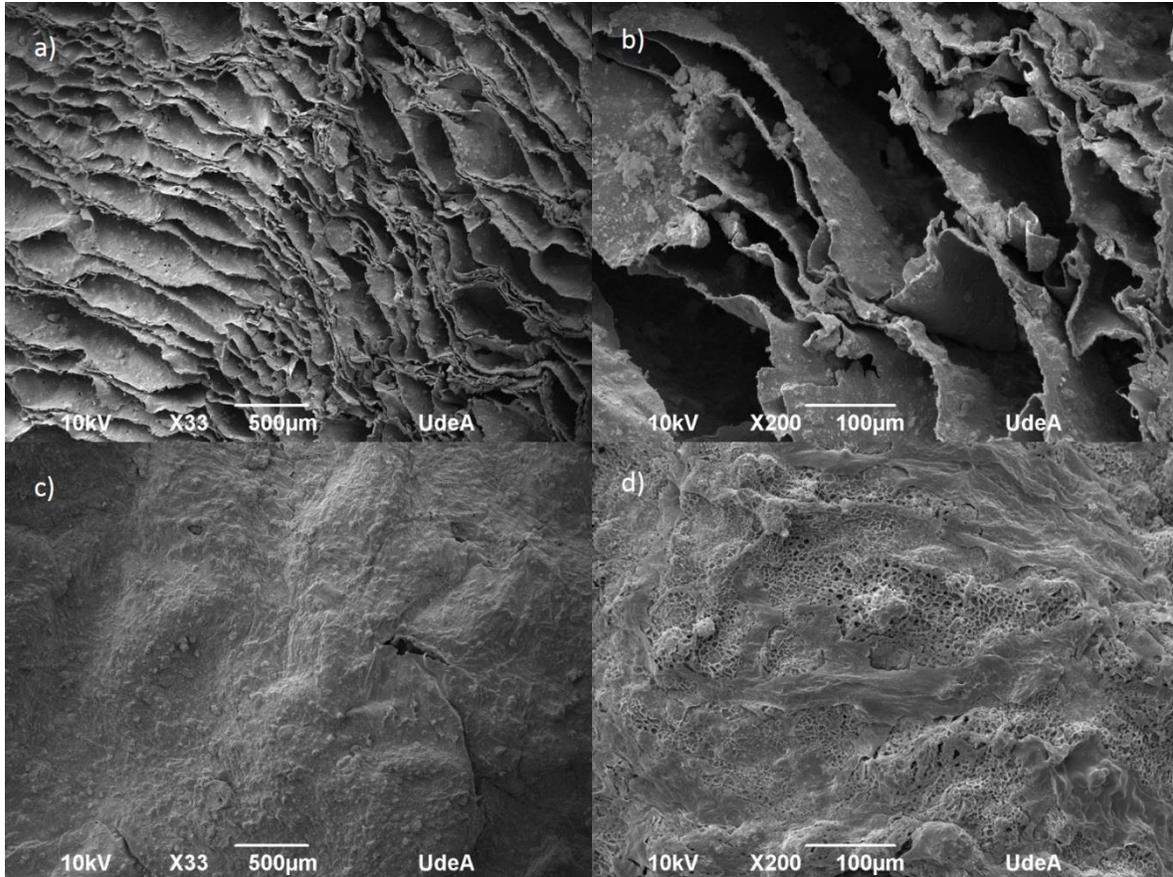


Figura 25. Imágenes SEM en scaffold CH/VB (2:1) sintetizado con TEOS en vista transversal a) 33X y b) 200X y vista superior c) 33X y d) 200X

Igualmente, en la Figura 26 se encuentran las imágenes para el scaffold fabricado con CH/VB (2:1) sintetizado con la sílice extraída de la cascarrilla de arroz. Se evidencia que la estructura lamelar se conserva; sin embargo, en este caso los poros son más alargados con un tamaño promedio de $954.73 \pm 292.29 \mu\text{m}$ pero más estrechos con un ancho promedio de $116.44 \pm 58.79 \mu\text{m}$. Por su parte, a diferencia del scaffold 2:1 con VB de TEOS, este scaffold presenta porosidad en el corte superior por lo que es probable que el VB usado no obstruye los poros en esta dirección.

También se observa que el VB logra impregnar todo el scaffold, a pesar de que no es posible medir si la distribución de las partículas es homogénea.

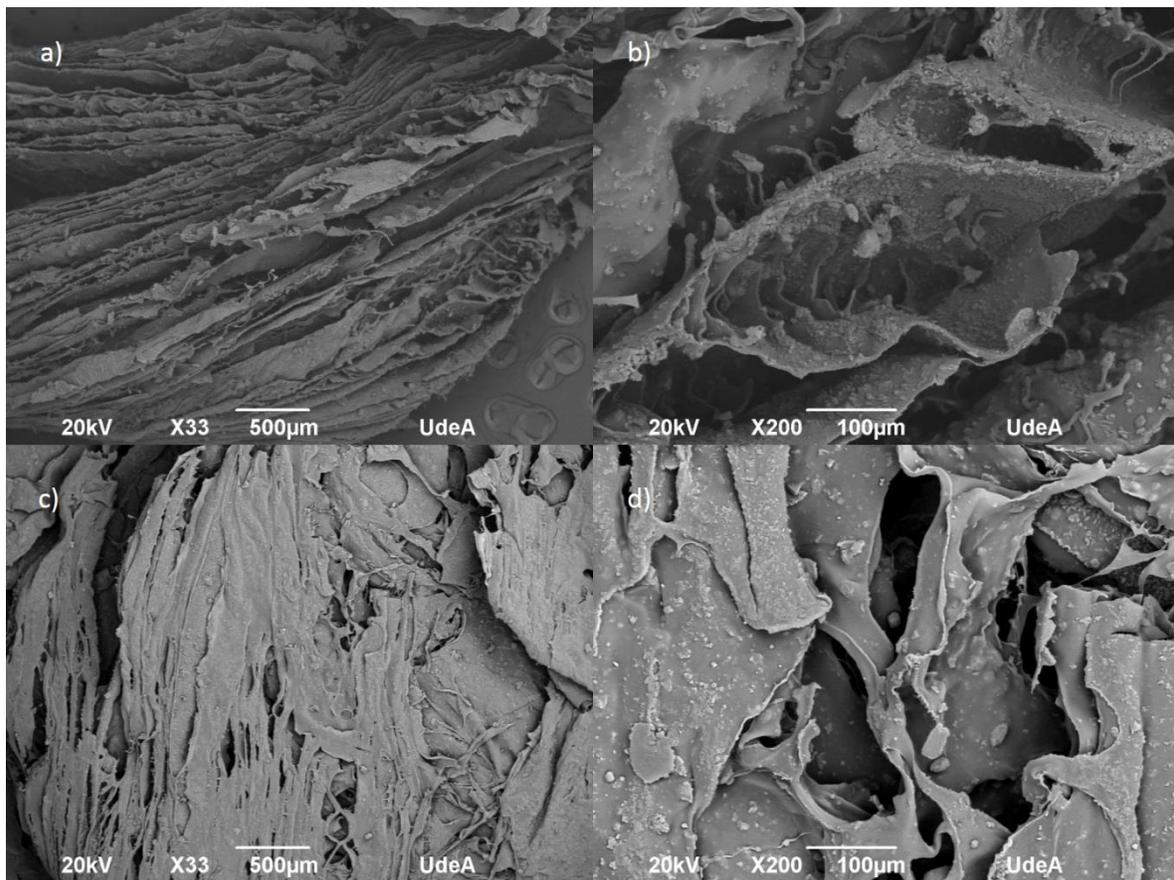


Figura 26. Imágenes SEM en scaffold de CH/VB (2:1) sintetizado con sílice extraída en vista transversal a) 33X y b) 200X y vista superior c) 33X y d) 200X

En la Figura 27 se encuentran las imágenes tomadas en el scaffold fabricado CH/VB (1:1) sintetizado con TEOS. En esta figura se evidencia igualmente la estructura en forma de lamelas característica del quitosano, además que se hace más evidente la presencia de las partículas de VB en la estructura. Cabe destacar que en el corte superior también presenta alta porosidad lo que no se encontró en el scaffold 2:1 con VB sintetizado con TEOS, lo que puede atribuirse a una mejor distribución de las partículas de VB en la estructura. Es posible que durante la fabricación del scaffold 2:1 se hayan presentado errores imperceptibles pero que finalmente pudieron afectar la porosidad del material. En el caso del scaffold 1:1 se aprecia muy buena porosidad con diámetros promedio de $489.49 \pm 130.94 \mu\text{m}$.

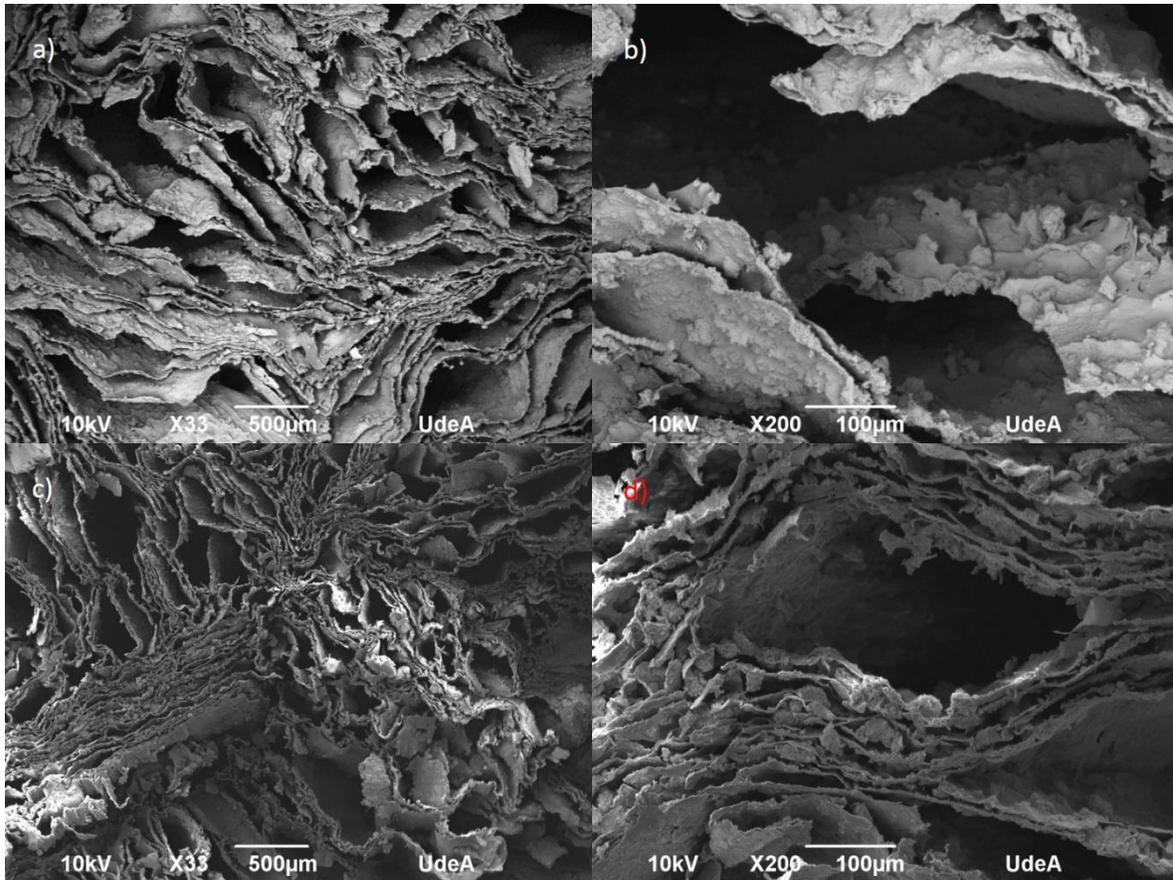


Figura 27. Imágenes SEM en scaffold CH/VB (1:1) sintetizado con TEOS en vista transversal a) 33X y b) 200X y vista superior c) 33X y d) 200X

Finalmente, en la Figura 28 se encuentran las imágenes obtenidas para el scaffold CH/VB (1:1) sintetizado con sílice extraída de cascarilla de arroz. En este caso se observa una estructura un poco más desordenada con poros interconectados en la vista transversal y poca porosidad en la vista superior. Aun así, se observan algunos poros en la vista superior que presentan interconexión lo cual es algo favorable para scaffolds con aplicación en ITO. Este scaffold presenta diámetros promedio de poros de $249.23 \pm 111.14 \mu\text{m}$, lo que quiere decir que, en comparación con el scaffold 2:1 con el VB de sílice extraída, este scaffold presenta un menor tamaño de poro probablemente porque la cantidad de VB obstruye la porosidad del material. También se observa que en todos los cortes analizados la presencia del VB es constante, lo que indica que este se distribuyó por todo el scaffold.

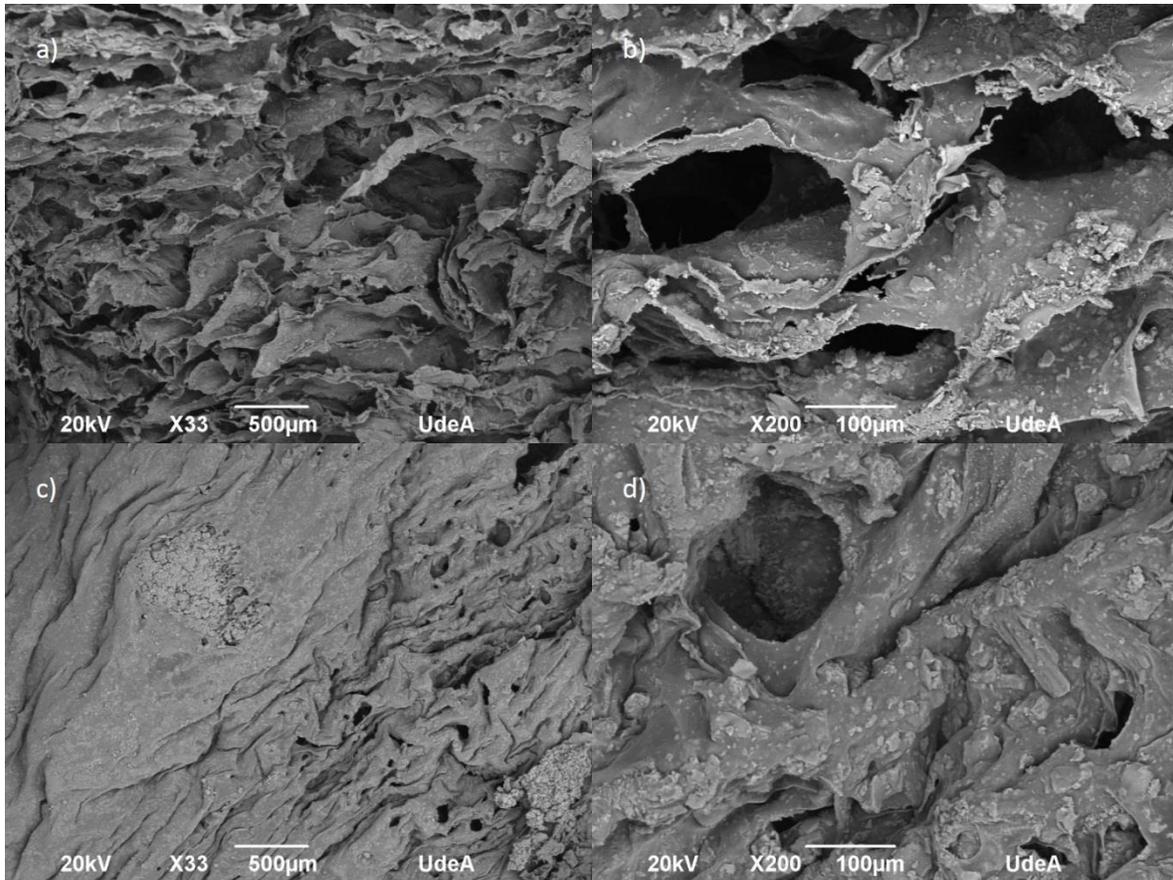


Figura 28. Imágenes SEM en scaffold de CH/VB (1:1) sintetizado con sílice extraída en vista transversal a) 33X y b) 200X y vista superior c) 33X y d) 200X

A pesar de las notables diferencias entre los tamaños de poro de los scaffolds fabricados, todos ellos presentan valores deseables para la ITO. Ya que se busca que mínimamente estas estructuras tengan un tamaño de poro superior a 100 μm (21), por lo que todos los scaffolds cumplen con esta característica.

3.3. Caracterización Mecánica

3.3.1. Compresión

Los scaffolds fabricados fueron sometidos a pruebas de compresión para conocer su resistencia mecánica, ya que es un valor de alta importancia en materiales que serán usados en la regeneración del tejido óseo debido a las cargas a las que es sometido constantemente.

Para este ensayo se tomaron tres probetas de cada uno de los scaffolds y se sometieron al ensayo en una máquina universal. En la Figura 29 se muestran los gráficos obtenidos para



una de las probetas de cada formulado, en el cual se aprecia la baja resistencia mecánica que presenta el quitosano sin ningún refuerzo. Por otro lado, el comportamiento mecánico para los scaffolds fabricados con el VB sintetizado con TEOS es mucho mejor que las del quitosano solo, siendo mayor en aquel con la más alta cantidad de cerámico. Por su parte, el comportamiento de los scaffolds fabricados con VB sintetizado con sílice de arroz es superior a los demás scaffolds, mostrando una alta resistencia a la compresión lo que se traduce en mayor rigidez del material. Esto quiere decir que los scaffolds fabricados con el VB de la sílice extraída se ven más influenciados por el comportamiento del cerámico disminuyendo así la plasticidad y por ende el módulo de Young.

El aumento de la resistencia mecánica de los scaffolds reforzados con VB está acorde a lo reportado por Martins, T. et al. (2017) (20), debido a que a mayor cristalinidad y menor tamaño de poro, la resistencia a la compresión se aumenta; el quitosano como material polimérico es poco cristalino en comparación con el VB como ya se vio en los resultados de DRX, además durante su conformación genera poros de gran diámetro, por ello su resistencia es tan baja. Al aumentar la cristalinidad de los scaffolds adicionando un refuerzo cerámico, la resistencia mecánica se eleva; sin embargo, es posible que con ello se pierdan propiedades elásticas otorgadas por el quitosano que son necesarias en la ITO, como se observa en los scaffolds fabricados con VB sintetizado con sílice de arroz.

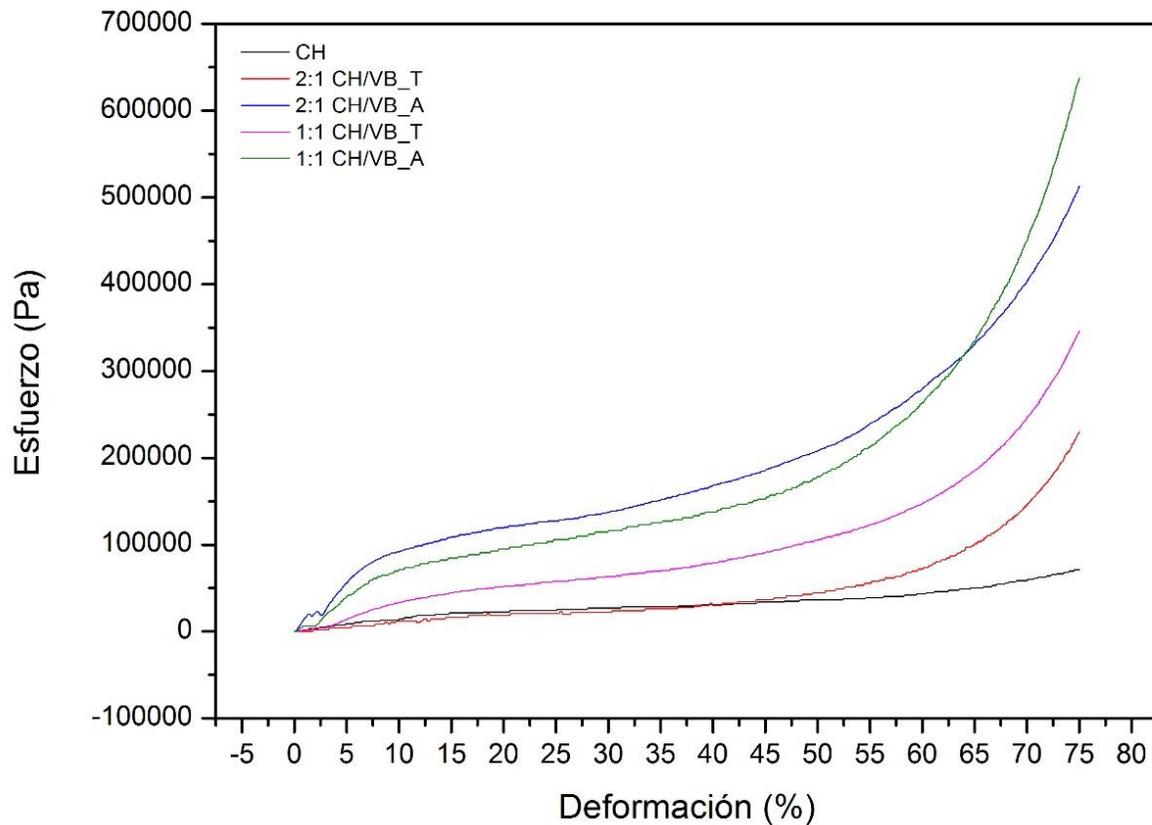


Figura 29. Comportamiento mecánico a compresión de los scaffolds fabricados con TEOS (T) y cascarilla de arroz (A)

En la Tabla 1 se presentan los valores promedio del módulo de elasticidad o módulo de Young calculados para cada uno de los scaffolds durante el ensayo a compresión. Los resultados obtenidos están acordes a lo antes mencionado a partir de la Figura 29, donde los scaffolds fabricados con el VB sintetizado con la sílice de arroz presentan mayor rigidez por lo que su módulo elástico es menor que aquellos fabricados con VB sintetizado con TEOS. Se evidencia también que la presencia del refuerzo aumenta el módulo de Young, siendo más elevado para el scaffold con mayor cantidad de VB. No obstante, todos los scaffolds presentaron valores inferiores a los reportados para el hueso (22)(23), esto pudo ser debido a que las probetas no eran homogéneas por lo que la distribución de las partículas cerámicas generaban puntos de tensión que afectaban la medida

Tabla 1. Valores promedio módulo de Young en los scaffolds fabricados

Scaffold	Módulo de Young (Pa)
CH	2496 ± 402.70
2:1 CH/VB_T	13948 ± 545.18



2:1 CH/VB_A	3842 ± 1087.16
1:1 CH/VB_T	18015 ± 7763.33
1:1 CH/VB_A	6509 ± 3115.51

3.3.2. Porcentaje de porosidad en los scaffolds fabricados

El porcentaje de porosidad de los scaffolds se realizó con el fin de conocer la porción de poroso abiertos e interconectados que se encuentran en la estructura. En la Tabla 2 se encuentran los valores de porosidad promedio de los scaffolds fabricados. Se presenta una codificación en el nombre donde la letra T después de las siglas VB identifica los scaffold fabricados con VB sintetizado con TEOS; mientras que la letra A identifica a aquellos sintetizados con la sílice extraída.

Como es de esperarse, el scaffold de quitosano es el que presenta mayor porcentaje de porosidad y a medida que se aumenta la cantidad de refuerzo este porcentaje disminuye. Se puede observar que aquellos scaffolds con relación 2:1 presentan una porosidad superior al 80%, en cambio aquellos con relación 1:1 cuentan con una porosidad menor. Sin embargo, todos los scaffolds cuentan con una porosidad en el rango de la porosidad del hueso trabecular (50-90%) (24), por lo que todos los scaffolds fabricados son apropiados en la regeneración de tejido óseo.

En los datos es notorio como para la misma formulación el porcentaje de porosidad es menor en los scaffolds con el VB sintetizado con TEOS, lo que puede ser debido a que este polvo cuenta con un tamaño de partícula menor y que tiende a generar grandes aglomerados lo que probablemente obstruye los poros disminuyendo así la porosidad.

Tabla 2. Porcentaje de porosidad de los scaffolds fabricados

Scaffold	Porcentaje de porosidad
CH	87.105 ± 1.18%
2:1 CH/VB_T	80.22 ± 3.06%
2:1 CH/VB_A	85.71 ± 0.17%
1:1 CH/VB_T	71.63 ± 1.12%
1:1 CH/VB_A	76.28 ± 0.86%



3.4. Pruebas de estabilidad

3.4.1. Ensayo de degradación

El ensayo de degradación se llevó a cabo por un máximo de 28 días, con puntos de evaluación a 7, 14, 21 y 28 días. Para cada día a analizar se tuvieron 3 muestras de cada formulación. Una vez la muestra cumplía el tiempo establecido se retiraba del SBF y no volvía a ser usada ya que eso influye en la medida debido a que el peso inicial varía. Además no se realizó cambio de SBF porque eso implica que se presenten deposiciones adicionales de fosfatos que influyen en la medida del peso final del scaffold.

En la Tabla 3 se presentan los promedios del porcentaje de scaffold degradado para cada una de las formulaciones en los 4 días evaluados. Se utilizan los mismos nombres codificados usados para el análisis de porosidad. Se observa como para la mayoría de los scaffolds el porcentaje de porosidad disminuye para el día 14 en comparación con el día 7, lo que puede deberse a que en la toma del peso final también se incluye el peso de la capa de apatita formada en el material. Pero al observar el día 28 se aprecia que casi todos los scaffolds se han degradado por completo, lo que indica que estos scaffolds no son adecuados en la ingeniería de tejidos si el tiempo de generación de nuevo tejido es superior a 28 días, el cual depende de distintos factores como el tipo de hueso, la localización y la capacidad del material en inducir la formación de nuevo tejido. Sin embargo, como la generación de nuevo tejido puede verse afectada por la composición del scaffold, aumentando o disminuyendo la velocidad, por lo que es necesario evaluar los scaffolds fabricados en conjunto con células oseoprogenitoras para determinar la influencia de la degradación en el crecimiento celular.

Tabla 3. Promedios de porcentajes de degradación en cada scaffold fabricado a diferentes días de exposición en SBF

Scaffold	Porcentaje de degradación			
	7 días	14 días	21 días	28 días
CH	27.52 ± 0.019%	18.72 ± 1.72%	34.50 ± 1.43%	100%
2:1 CH/VB_T	34.25 ± 1.15%	22.44 ± 0.35%	17.67 ± 1.56%	93.23 ± 9.46%
2:1 CH/VB_A	76.34 ± 18.55%	92.66 ± 6.12%	91.07 ± 1.86%	87.002 ± 0.67%
1:1 CH/VB_T	37.72 ± 0.89%	24.75 ± 0.64%	26.09 ± 2.59%	100%
1:1 CH/VB_A	71.92 ± 0.21%	67.45 ± 10.44%	90.71 ± 0.57%	95.49 ± 0.09%



Adicionalmente, se midió el pH de la solución de SBF en cada una de las muestras. Esto se hizo para comprobar si la degradación del scaffold modifica el pH de la solución, lo que eventualmente puede afectar el crecimiento celular. En la Tabla 4 se encuentran los valores promedio del pH en cada uno de los scaffolds en los distintos días que duró el ensayo de degradación. Al observar estos valores, para los scaffolds de quitosano se ve que hay una disminución considerable del pH, mientras que para los scaffolds reforzados con los VB sintetizados la disminución no es tan alta. Cabe resaltar, que en los scaffolds fabricados con VB sintetizado con TEOS disminuyen más el pH en comparación con los scaffolds fabricados con el VB sintetizado con sílice extraída. La disminución en el pH o acidosis aumenta la actividad de los osteoclastos mientras inhibe la actividad de los osteoblastos, provocando mayor resorción ósea sin remodelación (25); lo cual no es deseable en la ITO. No obstante, como las condiciones en el cuerpo no son constantes, sino que la sangre se mantiene en movimiento, es posible que el pH no disminuya tan abruptamente con la presencia del scaffold. Por lo que es necesario evaluar el material en condiciones *in vitro* e *in vivo*.

Tabla 4. Valores promedio del pH en la solución de SBF usada en el ensayo de degradación

Valores promedio de pH en la solución de SBF				
Scaffold	7 días	14 días	21 días	28 días
CH	4.64 ± 0.43	4.58 ± 0.46	5.26 ± 0.72	5.71 ± 0.27
2:1 CH/VB_T	5.07 ± 0.31	5.32 ± 0.35	5.43 ± 0.27	6.15 ± 0.59
2:1 CH/VB_A	6.11 ± 0.22	6.54 ± 0.48	6.75 ± 0.07	6.9 ± 0.23
1:1 CH/VB_T	5.12 ± 0.36	5.57 ± 0.02	5.46 ± 0.26	5.90 ± 0.12
1:1 CH/VB_A	6.04 ± 0.16	6.45 ± 0.58	6.83 ± 0.21	6.88 ± 0.19

3.4.2. Análisis Termogravimétrico (TGA)

Los scaffolds fabricados fueron analizados termogravimétricamente con el fin de evaluar la estabilidad térmica de estos. El estudio se realizó en los scaffolds reforzados con la mayor cantidad de VB, es decir, 1:1 CH/VB_T y 1:1 CH/VB_A. En la Figura 30 se observa el análisis termogravimétrico realizado en el scaffold fabricado con el VB sintetizado con la sílice extraída. En esta grafica se observan cuatro regiones principales de porcentaje de masa perdida (62.04%) conforme aumenta la temperatura de 25 a 800 °C. En la primera etapa que se encuentra en el rango de temperatura de 25 a 150 °C un único proceso de descomposición térmica causó una pérdida de masa de 5.9%. De acuerdo con los resultados del FTIR (Figura



23) se identificaron anchos de bandas correspondientes a hidratación ($3500-3000\text{ cm}^{-1}$) que se encuentran relacionados con el enlace CH, lo cual permite sugerir, que la desorción de humedad haya sido la única fuente de pérdida de masa en esta etapa.

En la etapa siguiente, hay presencia de un compuesto menos volátil que la humedad remanente presente en el scaffold que puede estar relacionado con el entrecruzante empleado (glutaraldehído). A pesar que la identificación en FTIR no fue muy evidente debido a solapamiento con las bandas del quitosano, su funcionamiento revela una participación en la composición de este material (26)(27). De esta manera, como resultado de un punto de ebullición del glutaraldehído de 187 °C (28) y la tasa más rápida reportada sobre la curva de la derivada (mínimo ancho de banda a 182.75 °C), se propone una pérdida de peso de 7.17% en un rango de temperatura de $150 - 250\text{ °C}$. Luego de esto, una vertiginosa pendiente mostró una pérdida entre 250 y 460 °C para describir la degradación del quitosano (30.83%), mientras que procesos termogravimétricos posteriores a este rango de temperatura mostraron un fenómeno adicional de pirolisis hasta la estabilización en 800 °C perdiendo un porcentaje de masa cercano al 18%. Aunque en ningún FTIR fueron identificados compuestos asociados con la síntesis de VB usando la sílice extraída, la pirolisis podría estar relacionada con pérdidas por la liberación de gases de compuestos remanentes de la síntesis. En el espectro de FTIR (Figura 23) para CH se pudieron identificar vibraciones asociadas al enlace N-H, a los de la amida III y C-O lo que sugiere una posible formación de gases de carbono (CO , CO_2) y amoníaco durante el proceso de degradación térmica final del quitosano (29).

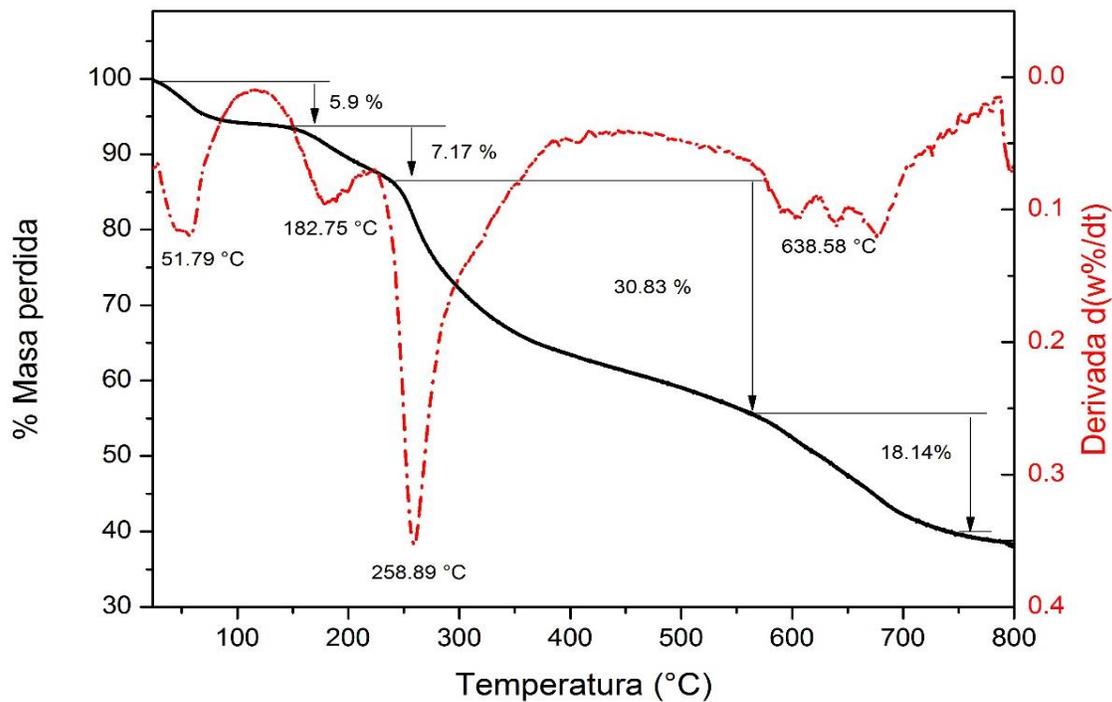


Figura 30. Análisis TGA en el scaffold 1:1 CH/VB_A

Por otro lado, en la Figura 31 se observa el comportamiento térmico de degradación del scaffold fabricado con la mayor cantidad de VB sintetizado con TEOS (1:1 CH/VB_T). En esta curva se observan tres comportamientos de degradación térmica similares a los encontrados en el scaffold 1:1 CH/VB_A. En un rango de temperatura de 25 a 250 el calentamiento dio lugar a la pérdida de peso de 6.30 y 7.17% para la primera y segunda etapa, respectivamente. Eliminándose inicialmente la humedad remanente, seguida de la pérdida de peso del entrecruzante. A diferencia de la Figura 30, en la Figura 31 representa el comportamiento del scaffold fabricado con el VB sintetizado con TEOS indicando la ausencia de posibles contaminantes que dan lugar a la formación de altas tasas de degradación por pirolisis a 638.58 °C. Por su parte, en la porción final de la curva termogravimétrica se presenta un 41.66% de pérdida de peso paulatina del quitosano junto a la formación de gases de carbono y amoníaco (29).

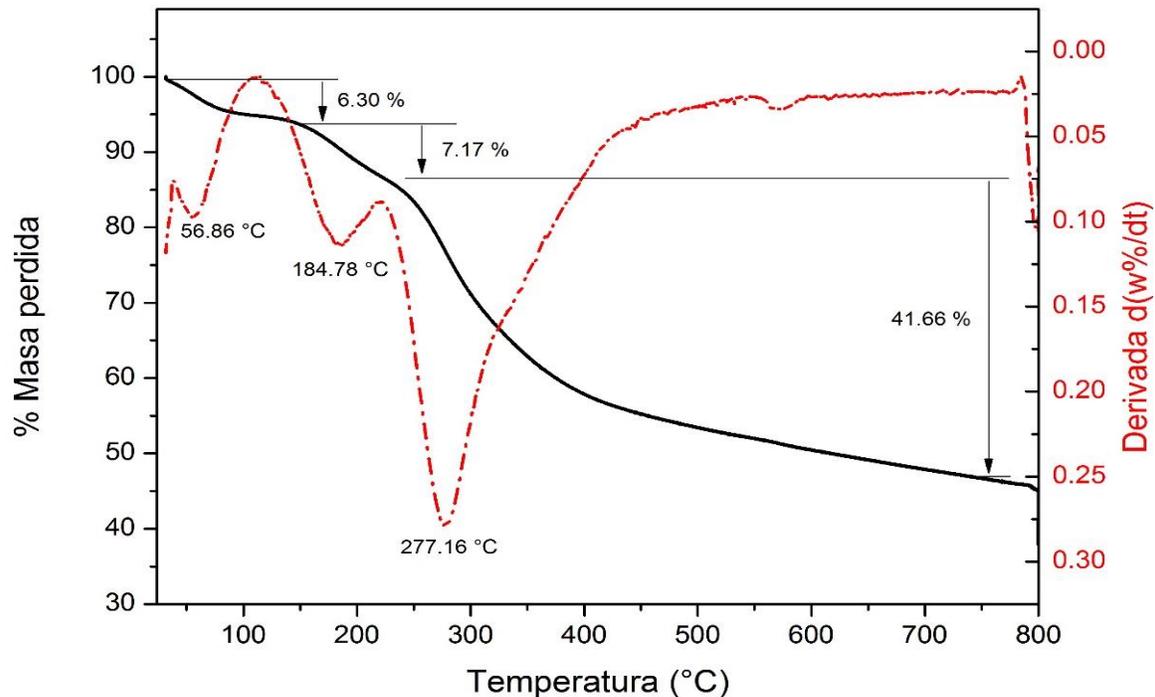


Figura 31. Análisis TGA en el scaffold 1:1 CH/VB_T

3.5. Caracterización biológica

3.5.1. Ensayo de bioactividad

Los scaffolds fabricados fueron sometidos al ensayo de bioactividad, para evaluar su interacción con SBF y así conocer si permiten la formación de una capa de apatita en la superficie. Se tomaron 2 scaffolds de cada formulación para cada uno de los días evaluados (7, 14 y 21 días), estos se evaluaron por SEM con vista transversal y EDS en las deposiciones que se lograron observar en las imágenes. En la Figura 32 se encuentran las imágenes SEM obtenidas en los distintos scaffolds fabricados sometidos a ensayos de bioactividad por 7, 14 y 21 días en vista transversal a un aumento de 30X. Se observa que a medida que aumenta el tiempo de exposición en SBF las paredes de los scaffolds se ven más colapsadas, lo que indica la degradación de estos, pero igualmente se aprecian más deposiciones en la superficie de los scaffolds con el aumento del tiempo lo que puede deberse a la formación de apatitas. Se evidencia que a medida que el scaffold cuenta con mayor cantidad de VB en su estructura, la cantidad de deposiciones en su superficie es mayor. Al comparar las imágenes de los scaffolds sometidos a 7 días de evaluación se aprecia que mientras que para los 4 scaffolds fabricados con VB ya se observa una capa de apatita, en el scaffold de CH este comportamiento no es evidente, lo cual es consistente con la teoría de que el CH por sí solo



no tiene efecto bioactivo por lo que es necesario usar un refuerzo cerámico que otorgue dicha propiedad.

Durante el día 14 se aprecia mayor cantidad de deposiciones, incluso en el scaffold de CH, esto es debido a que se presentan precipitaciones de los compuestos que hacen parte de la solución de SBF y que se evidencian en el EDS. Los resultados del EDS se resumen en la Tabla 5, en la cual se presentan los compuestos encontrados en las zonas evaluadas con el porcentaje de peso determinado por el equipo para cada uno de los scaffolds según los días de estudio.

En las imágenes tomadas durante el último día de estudio se observa una elevada degradación, especialmente en los scaffolds fabricados con el VB sintetizado con sílice extraída. No obstante, son estos mismos scaffolds los que presentan mayor capa en la superficie, lo que indica que el VB sintetizado con la sílice de arroz otorga mayor efecto bioactivo en la estructura.

De acuerdo a los resultados del EDS las deposiciones que se observan en las imágenes SEM son debido a precipitaciones de las sales presentes en la solución de SBF. Sin embargo, hay que considerar que los elementos que generan una capa de apatita (Ca y P) no se encuentran en muy altas proporciones por lo que no son fácilmente detectables por el equipo.

Aun así, en los scaffolds fabricados con el VB sintetizado con la sílice de arroz se logra detectar una pequeña cantidad de fósforo, por lo que la probabilidad de formación de una capa de apatita en estas estructuras es mayor, siendo mejor el scaffold con la menor cantidad de VB.

Sin embargo, los resultados para los scaffolds fabricados con VB sintetizado con TEOS no son desfavorables, porque al no encontrarse tampoco en los espectros presencia de sílice indica que hay formación de una capa en su superficie lo que oculta el cerámico en la estructura del scaffold; además, es necesario tener en cuenta que la formación de una apatita requiere de intercambio iónico entre el material y la solución de SBF, ese intercambio no solo es con el calcio y el fósforo de la estructura del VB, sino también con la sílice presente.

CH
2:1 CH/VB_T
2:1 CH/VB_A
1:1 CH/VB_T
1:1 CH/VB_A

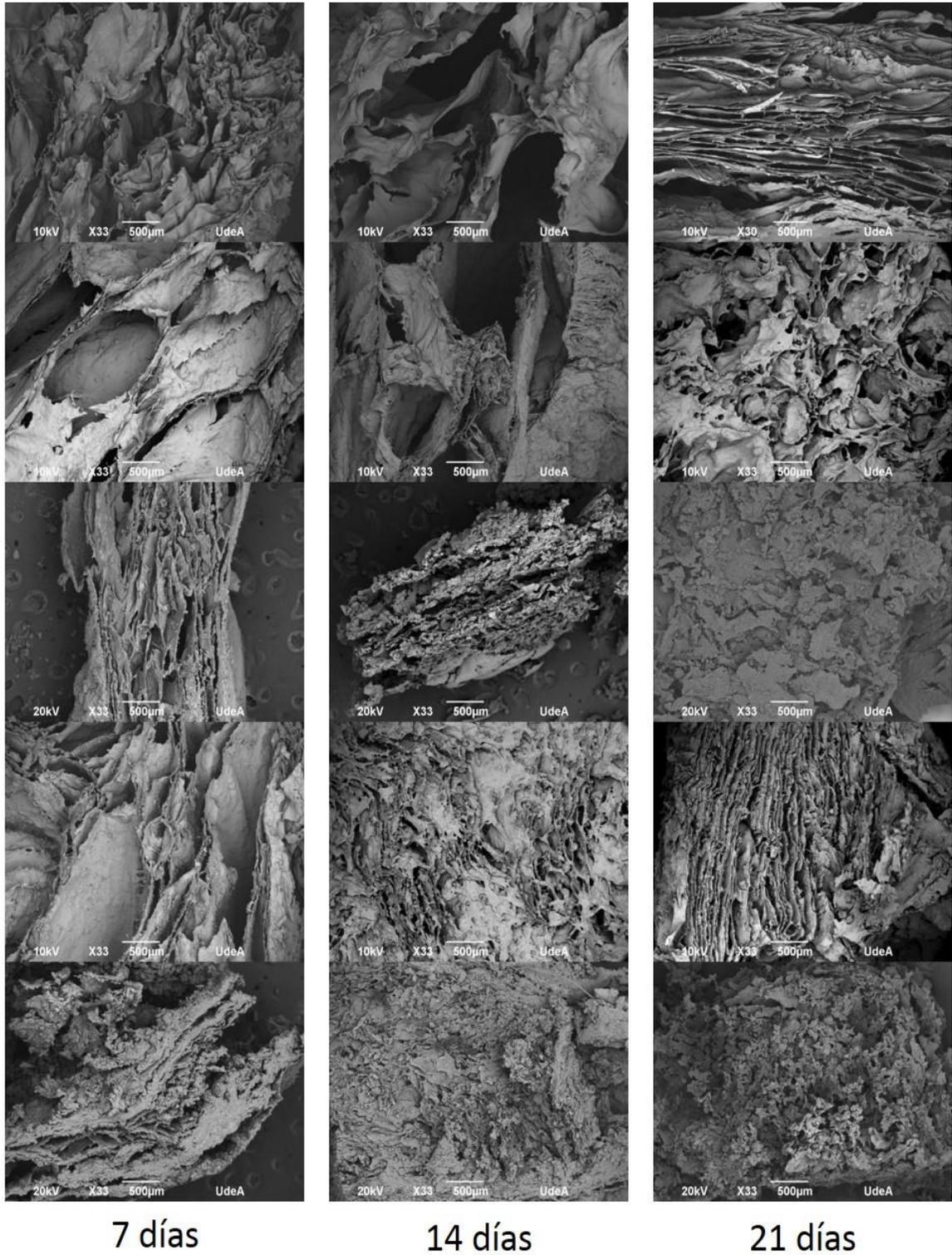


Figura 32. Imágenes SEM ensayo de bioactividad en los scaffolds a distintos días, vista transversal a 33X



Tabla 5. Composición de las deposiciones sobre los scaffolds después de ser sometidos en ensayo de bioactividad en diferentes intervalos de tiempo

Scaffold	Elemento	Composición (%peso) según EDS de acuerdo al día de ensayo		
		7 días	14 días	21 días
CH	C	48.36 ± 7.46	48.27 ± 4.09	45.43 ± 10.18
	O	17.15 ± 12.95	5.2 ± 0.88	10.63 ± 8.95
	Na	8.82 ± 6.37	7.89 ± 4.04	6.62 ± 1.52
	Cl	25.66 ± 14.04	38.64 ± 0.83	37.32 ± 19.77
2:1 CH/VB_T	C	42.67 ± 0.40	43.56 ± 9.08	30.46 ± 14.19
	O	15.24 ± 5.63	8.18 ± 1.00	22.75 ± 6.41
	Na	4.91 ± 1.92	16.11 ± 3.41	4.24 ± 0.78
	Cl	23.49 ± 4.26	32.15 ± 6.67	15.06 ± 4.98
	Si	13.69 ± 0.13	--	27.49 ± 13.37
2:1 CH/VB_A	C	28.89 ± 16.17	37.43 ± 1.41	37.2 ± 0.31
	O	31.74 ± 16.36	32.24 ± 1.73	33.94 ± 0.26
	Na	2.66 ± 0.18	2.43 ± 0.49	2.97 ± 0.35
	Cl	19.04 ± 17.97	5.2 ± 1.13	6.69 ± 0.01
	Si	13.04 ± 13.53	8.96 ± 8.19	16.82 ± 0.06
	Ca	4.63 ± 4.44	10.75 ± 2.86	2.38 ± 0.37
	P	--	2.99 ± 3.40	--
1:1 CH/VB_T	C	45.85 ± 1.17	37.71 ± 6.94	43.93 ± 11.89
	O	--	30.03 ± 1.37	21.7 ± 4.17
	Na	--	4.15 ± 0.18	4.10 ± 1.77
	Cl	27.49 ± 0.41	7.51 ± 1.87	16.60 ± 2.94

	Si	26.66 ± 1.58	20.59 ± 3.53	13.66 ± 8.92
1:1 CH/VB_A	C	27.76 ± 9.66	42.64 ± 3.08	37.86 ± 1.88
	O	36.33 ± 5.99	29.39 ± 1.53	31.51 ± 2.39
	Na	1.26 ± 0.01	3.68 ± 1.58	3.47 ± 0.34
	Cl	4.24 ± 0.54	10.27 ± 0.54	7.53 ± 1.39
	Si	19.5 ± 8.57	9.64 ± 0.89	15.44 ± 2.21
	Ca	9.88 ± 3.32	3.36 ± 0.16	4.19 ± 1.04
	P	1.03 ± 1.02	1.04 ± 0.22	--

Al realizar una comparación entre los dos scaffolds fabricados con el VB sintetizado con la sílice de arroz a una magnificación más alta durante el último día de ensayo (Figura 33) se observa que, aunque en el scaffold con menor cantidad de VB se haya determinado mayor cantidad de fósforo con el EDS, en el scaffold con mayor cantidad (Figura 33b) hay mayor porcentaje de scaffold cubierto por capa de apatita, por lo que el resultado de EDS para el scaffold 2:1 pudo verse influenciado por la composición original del VB y no por la capa depositada. Además se observa que el scaffold 1:1 conserva mejor la estructura tridimensional porosa, lo que es deseable para un material que será usado en la regeneración de tejido óseo.

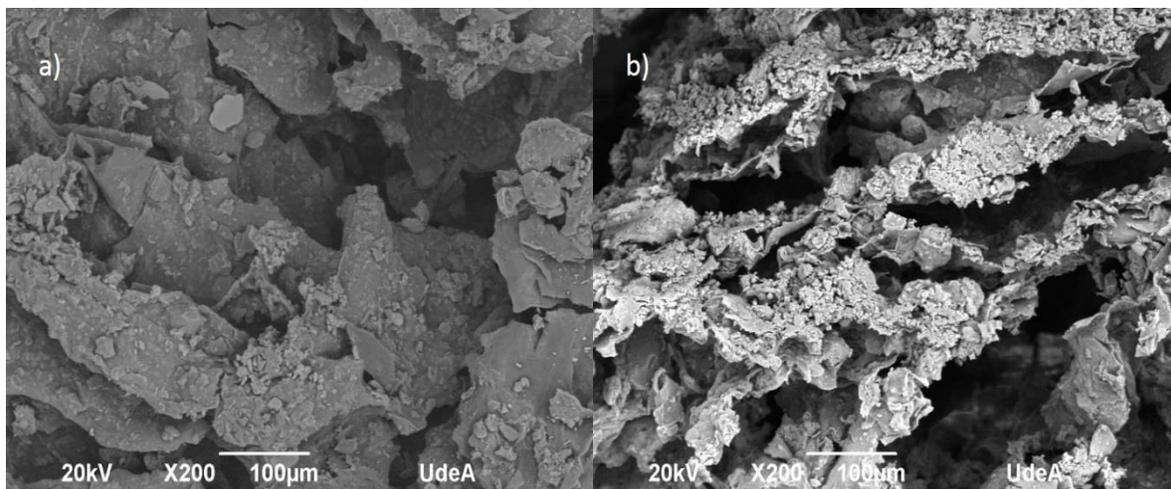


Figura 33. Imágenes SEM a 21 días en SBF de scaffolds fabricados con a) 2:1 CH/VB_A y b) 1:1 CH/VB_A



3.5.2. Análisis de efecto antimicrobiano en los scaffolds

Los ensayos antimicrobianos en los scaffolds se llevaron a cabo con dos cepas bacterianas, *E. coli* y *S. aureus*; ambas cepas se cultivaron a 36°C por 5 días para hacer un seguimiento de comportamiento bactericida. El ensayo se realizó por duplicado para cada uno de los formulados fabricados con el fin de obtener valores estadísticamente confiables. Durante los días de estudio se evidenció un comportamiento inesperado en los scaffolds y fue su capacidad de absorción.

En la Figura 34 se presentan las fotografías después de 24 horas de incubación para el *E. coli* en agar EMB donde ya es evidente el hinchamiento de los scaffolds lo que dificulta la medida del halo de inhibición. En la imagen los números corresponden a cada una de las formulaciones de los scaffolds, los cuales se presentan en la Tabla 6. Se puede observar que los scaffolds no solo aumentan de tamaño, sino que también toman una coloración similar a la del agar lo que permite concluir que el scaffold absorbió parte del medio de cultivo lo que podría contribuir a crecimiento bacteriano en el interior del mismo.

Tabla 6. Codificación usada en ensayos antimicrobianos

Scaffold	Número en caja
CH	1
2:1 CH/VB_T	2
1:1 CH/VB_T	3
2:1 CH/VB_A	4
1:1 CH/VB_A	5

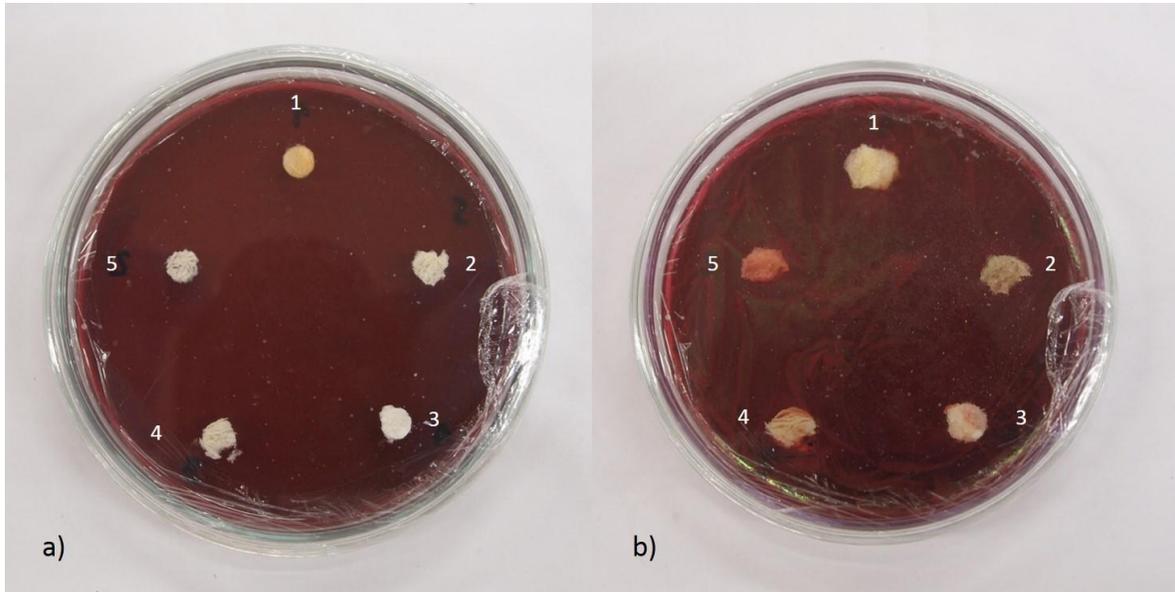


Figura 34. Fotos ensayo con *E. coli* en a) momento del cultivo y b) después de 24 h de incubación

Un comportamiento similar se observa en las cajas cultivadas con *S.aureus*; sin embargo, el hinchamiento de los scaffolds no es tan pronunciado. En la Figura 35 se encuentra las fotos para esta bacteria cultivada en agar Bair-Parker donde se observa un leve hinchamiento de los scaffolds, pero no un cambio en su coloración.

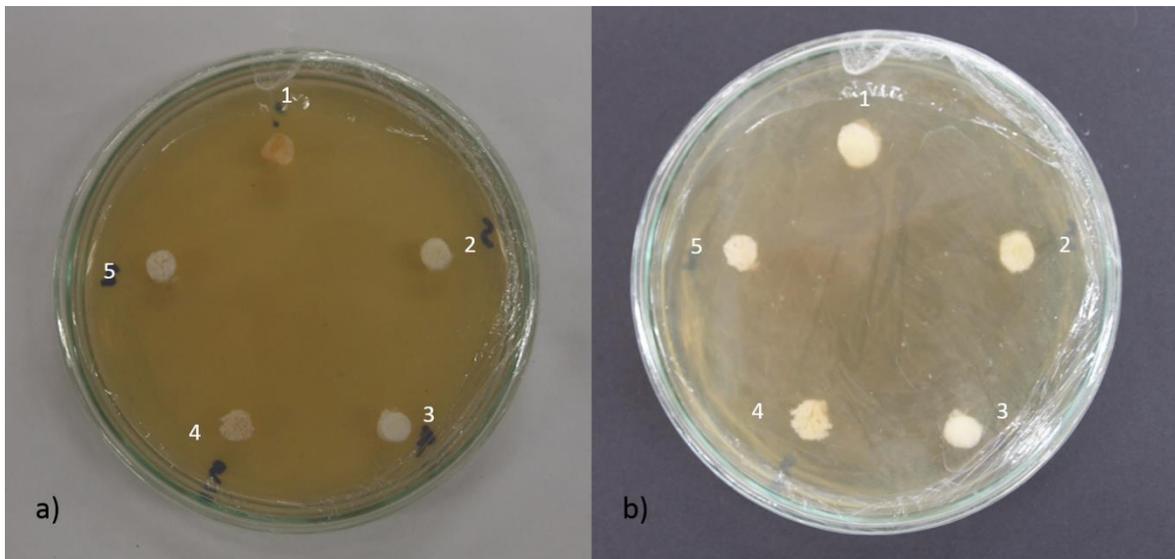


Figura 35. Fotos ensayo con *S. aureus* en a) al momento del cultivo y b) después de 24 h de incubación

Los cultivos bacterianos se cultivaron en cajas de Petri selladas por 5 días. En la Figura 36 se encuentra una de las cajas usadas para el ensayo antimicrobiano con los scaffolds sobre la cepa *S. aureus* y se compara con el cultivo control. Para este tipo de bacteria no es visible un halo de inhibición; sin embargo, se analiza la distancia entre el scaffold y la colonia de bacterias más cercana, ya que esto funciona como un halo inhibitorio. Al observar las imágenes se puede observar que mientras en el cultivo control las colonias se encuentran distribuidas por toda la caja, en el cultivo con los scaffolds se presenta mayor crecimiento en las zonas donde no hay presencia del material. Esto indica que todos los formulados ensayados presentan un efecto inhibitorio sobre esta cepa, siendo mayor en los scaffolds fabricados con el VB sintetizado con TEOS, especialmente el de mayor concentración, lo que puede indicar que no solo el quitosano posee un efecto antibacteriano intrínseco según lo reportado (29) sino también los VB sintetizados, como ha sido reportado para algunos vidrios bioactivos (20).

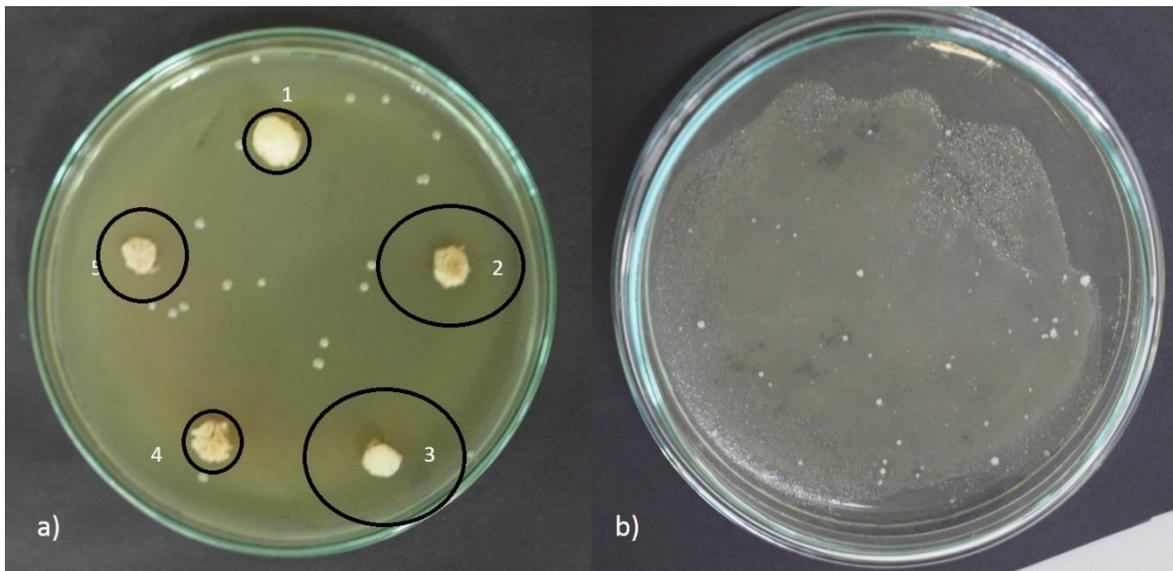


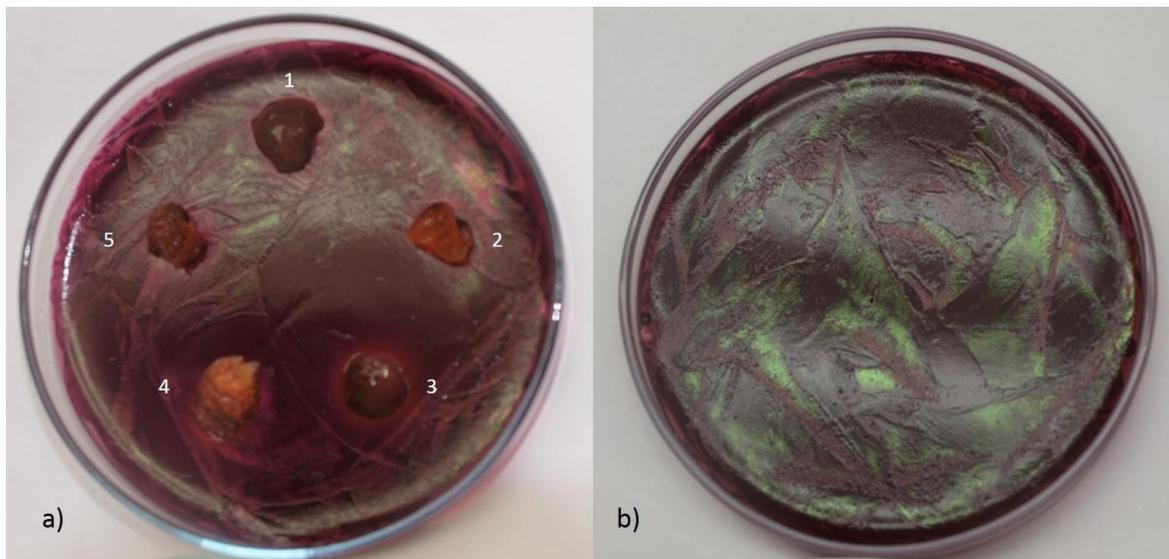
Figura 36. Fotografía ensayo antimicrobiano con *S. aureus* después de 5 días en incubación, a) scaffolds ensayados y b) control

El diámetro promedio del halo de inhibición formado junto con el diámetro final de los scaffolds se presenta en la Tabla 7, donde hay que tener en cuenta que como el scaffold aumentó su tamaño, el halo de inhibición se tomó desde el centro original del scaffold. El resultado se reporta como diámetro del halo formado en mm de acuerdo a lo reportado por Savioli, R. et al. (2006) y Gomes, B. et al. (2002) (30)(31). Los resultados son consistentes con los vistos en las imágenes mostrando un halo mayor en los scaffolds reforzados por VB, especialmente los fabricados con el VB sintetizado con TEOS. Estos resultados indican no solo un efecto antibacteriano sino un efecto bactericida con *S. aureus* ya que el halo se mantuvo durante los 5 días de ensayo.

Tabla 7. Diámetro promedio del halo de inhibición de los scaffolds contra *S. aureus*

	Diámetro inicial (mm)	Diámetro final (mm)	Diámetro halo (mm)
CH		8.78 ± 0.71	12.02 ± 1.31
2:1 CH/VB_T		9.1 ± 2.6	13.29 ± 0.69
2:1 CH/VB_A	6.30	7.25 ± 0.99	16 ± 9.35
1:1 CH/VB_T		9.48 ± 2.21	11.73 ± 2.03
1:1 CH/VB_A		8.66 ± 2.04	15.08 ± 3.61

Igualmente, el ensayo realizado con *E. coli* se presenta en la Figura 37, donde se presenta también una de las cajas usadas en el ensayo con los scaffolds y el control. En las fotos la tonalidad verde la da la presencia de la bacteria, la cual genera ese tipo de fluorescencia en el medio usado. Se observa como en los scaffolds se evidencia la aparición del halo inhibitorio, especialmente en el scaffold 1:1 CH/VB_T marcado con el número 3.


 Figura 37. Fotografías ensayo antimicrobiano con *E. coli* después de 5 días de incubación sobre a) los scaffolds fabricados y b) control

Para esta cepa bacteriana se logró medir correctamente el halo alrededor de los scaffolds, los datos se presentan en la Tabla 8. Se observa nuevamente como hay mayor inhibición en los



scaffolds fabricados con VB sintetizado con TEOS, además este halo también se conserva en el tiempo indicando un efecto bactericida del material evaluado.

Tabla 8. Diámetro promedio del halo de inhibición de los scaffolds fabricados contra *E. coli*

	Diámetro inicial (mm)	Diámetro final (mm)	Diámetro halo (mm)
CH		10.49 ± 0.79	11.28 ± 1.31
2:1 CH/VB_T		11.53 ± 0.96	13.67 ± 2.52
2:1 CH/VB_A	6.30	8.96 ± 1.42	11.72 ± 3.17
1:1 CH/VB_T		12.18 ± 1.3	14.39 ± 0.08
1:1 CH/VB_A		11.2 ± 0.18	13.27 ± 0.47

Estos ensayos indican que los scaffolds fabricados inactivan el crecimiento de las bacterias evaluadas, lo que es de gran importancia ya que en caso de que los scaffolds sean implantados en una persona, estos no solo actuarán en la regeneración del tejido sino que también evitarán infecciones por bacterias oportunistas durante la cirugía.

En cuanto al estudio antifúngico, el ensayo se realizó por 3 días incubando el hongo a 30°C. Igualmente se presentó hinchamiento de los scaffolds al absorber el medio. No obstante, esto no influyó en el efecto inhibitorio de los materiales. En la Figura 38 se encuentra la imagen de una de las cajas usadas en el ensayo con los scaffolds y el cultivo control. Se observa un pequeño halo alrededor de todos los scaffolds, indicando el efecto antifúngico de los materiales fabricados.

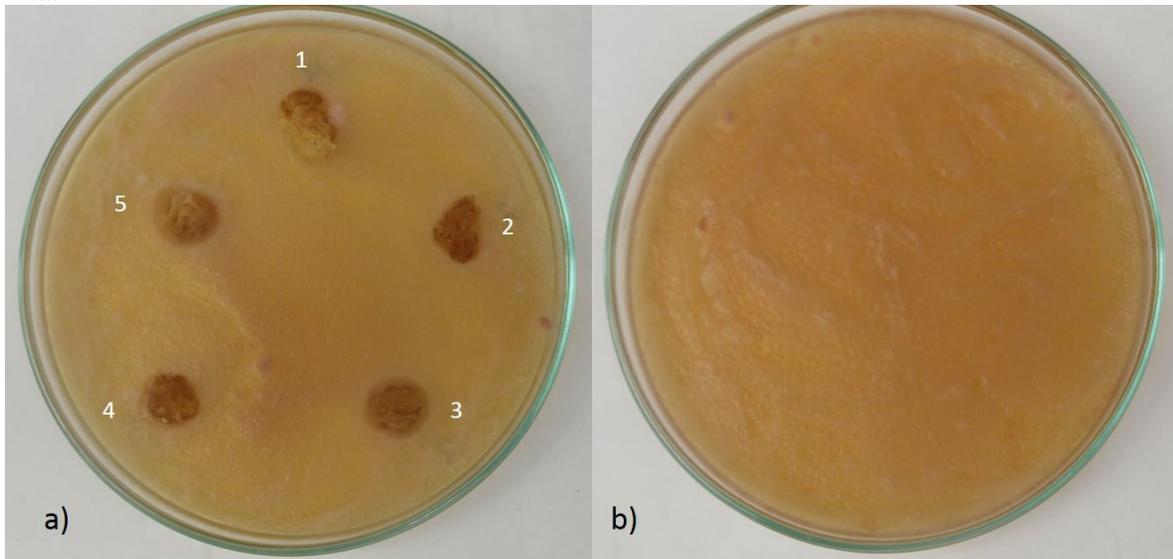


Figura 38. Ensayo antimicrobiano realizado sobre *Fusarium oxysporum* con a) los scaffolds fabricados y b) control

En la Tabla 9 se encuentran los valores de los diámetro promedio de los halos de inhibición resultantes del ensayo de los scaffolds con el hongo *Fusarium oxysporum*. En este ensayo también se logra observar una cierta inhibición de cada uno de los formulados con el hongo ensayado, cabe resaltar que aunque el promedio del halo para el CH es menor que el promedio del diámetro del scaffold, se debe tener en cuenta que todos los scaffolds sufrieron de hinchamiento por lo que el halo se ve solapado por el diámetro final del material.

Tabla 9. Diámetros promedio halo de inhibición de los scaffolds sobre *Fusarium oxysporum*

	Diámetro inicial (mm)	Diámetro final (mm)	Diámetro halo (mm)
CH		10.31 ± 0.83	10.05 ± 0.38
2:1 CH/VB_T		7.59 ± 0.23	10.22 ± 0.98
2:1 CH/VB_A	6.30	8.52 ± 1.25	10.66 ± 0.42
1:1 CH/VB_T		9.48 ± 1.77	10.18 ± 0.91
1:1 CH/VB_A		9.59 ± 1.53	10.09 ± 1.19

Estos resultados demuestran el efecto antimicrobiano de los scaffolds fabricados, potencializándose este efecto con la adición de VB. Por otro lado, se logró identificar que el VB sintetizado con TEOS ejerce mejor comportamiento antibacteriano y antifúngico, lo cual es deseable en un material con aplicación en ITO.



Según los análisis estadísticos realizados con el software libre R se infiere que, si bien los resultados con todas las respuestas tienen una distribución normal y son independientes entre sí, las medias son estadísticamente iguales por lo que es necesario realizar más pruebas para concluir apropiadamente sobre cuál de los materiales fabricados tiene un comportamiento superior en comparación con los demás sobre las respuestas evaluadas. Sin embargo, hay que tener en cuenta que este tipo de materiales no suelen evaluarse estadísticamente, por lo cual con estas pruebas se abre una nueva oportunidad para evaluar el comportamiento de los scaffolds fabricados ante las pruebas planteadas. Además para poder obtener resultados más aproximados se deben realizar una mayor cantidad de pruebas para cada respuesta, lo que se sale del alcance de este proyecto.

No obstante, es interesante analizar las tendencias de los resultados, los cuales permiten inferir cuál de los scaffolds fabricados presentan comportamiento superior durante todas las pruebas. En este punto resalta el comportamiento del scaffold 1:1 CH/VB_T, el cual demostró conservar un comportamiento más estable y superior en comparación con los demás materiales ensayados.

4. REFERENCIAS

1. Naghizadeh F, Abdul Kadir MR, Doostmohammadi A, Roozbahani F, Iqbal N, Taheri MM, et al. Rice husk derived bioactive glass-ceramic as a functional bioceramic: Synthesis, characterization and biological testing. *J Non Cryst Solids*. 2015;427:54–61.
2. Monteil-Rivera F, Phuong M, Ye M, Halasz A, Hawari J. Isolation and characterization of herbaceous lignins for applications in biomaterials. *Ind Crops Prod* [Internet]. Elsevier B.V.; 2013;41(1):356–64. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2012.04.049>
3. NIST. Dioxosilane [Internet]. [cited 2017 May 24]. Available from: <http://webbook.nist.gov/cgi/cbook.cgi?ID=C7631869&Type=IR-SPEC&Index=1>
4. Kanhong. Sodium Sulphate [Internet]. [cited 2017 May 24]. Available from: http://www.hanhonggroup.com/ir/ir_en/RE01010262.html
5. Gonçalves GE, Sabioni ACS, Ferraz WB, Costa GM da, Brito W de, Dias JA, et al. Síntese e caracterização de mulita utilizando sílica obtida da casca de arroz. *Rem Rev Esc Minas* [Internet]. 2009 Sep;62(3):367–72. Available from: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0370-44672009000300016&lng=pt&tlng=pt
6. Virajini RMS, Perera VPS, Rajendra JCN. Characterization of silica extracted from



- post harvest residue. 2013;1–4.
7. Dziadek M, Zagrajczuk B, Menaszek E, Wegrzynowicz A, Pawlik J, Cholewa-Kowalska K. Gel-derived SiO₂–CaO–P₂O₅ bioactive glasses and glass-ceramics modified by SrO addition. *Ceram Int* [Internet]. 2016;42(5):5842–57. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0272884215024268>
 8. Desogus L, Cuccu A, Montinaro S, Orrù R, Cao G, Bellucci D, et al. Classical Bioglass® and innovative CaO-rich bioglass powders processed by Spark Plasma Sintering: A comparative study. *J Eur Ceram Soc* [Internet]. Elsevier Ltd; 2015;35(15):4277–85. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jeurceramsoc.2015.07.023>
 9. Catauro M, Dell’Era A, Vecchio Cipriotti S. Synthesis, structural, spectroscopic and thermoanalytical study of sol–gel derived SiO₂–CaO–P₂O₅ gel and ceramic materials. *Thermochim Acta* [Internet]. 2016 Feb;625:20–7. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0040603115004918>
 10. Hench LL. The story of Bioglass. *J Mater Sci Mater Med*. 2006;17(11):967–78.
 11. Hench LL, Splinter RJ, Allen WC, Greenlee TK. Bonding mechanisms at the interface of ceramic prosthetic materials. *J Biomed Mater Res* [Internet]. Interscience Publishers, a division of John Wiley & Sons, Inc.; 1971;5(6):117–41. Available from: <http://dx.doi.org/10.1002/jbm.820050611>
 12. Wu S, Liu X, Yeung KWK, Liu C, Yang X. Biomimetic porous scaffolds for bone tissue engineering. *Mater Sci Eng R Reports* [Internet]. Elsevier B.V.; 2014;80(1):1–36. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.mser.2014.04.001>
 13. Saltzman WM. Biomechanics. In: *Biomedical Engineering Bridging Medicine and Technology*. First. Cambridge University Press; 2009. p. 656.
 14. Atkinson I, Anghel EM, Predoana L, Mocioiu OC, Jecu L, Raut I, et al. Influence of ZnO addition on the structural, in vitro behavior and antimicrobial activity of sol–gel derived CaO–P₂O₅–SiO₂ bioactive glasses. *Ceram Int* [Internet]. Elsevier; 2016;42(2):3033–45. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0272884215019926>
 15. Luz GM, Boesel L, Campo A Del, Mano JF. Micropatterning of bioactive glass nanoparticles on chitosan membranes for spatial controlled biomineralization. *Langmuir*. 2012;28(17):6970–7.
 16. Bellucci D, Bolelli G, Cannillo V, Cattini A, Sola A. In situ Raman spectroscopy investigation of bioactive glass reactivity: Simulated body fluid solution vs TRIS-buffered solution. *Mater Charact* [Internet]. Elsevier Inc.; 2011;62(10):1021–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.matchar.2011.07.008>
 17. Nist. Composition of Bone, Cortical (ICRP) [Internet]. [cited 2017 May 15]. Available from: <http://physics.nist.gov/cgi-bin/Star/compos.pl?refer=ap&matno=120>



18. Zioupos P, Cook RB, Hutchinson JR. Some basic relationships between density values in cancellous and cortical bone. *J Biomech* [Internet]. 2008 Jan;41(9):1961–8. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021929008001577>
19. Pourhaghgouy M, Zamanian A, Shahrezaee M, Masouleh MP. Physicochemical properties and bioactivity of freeze-cast chitosan nanocomposite scaffolds reinforced with bioactive glass. *Mater Sci Eng C*. 2016;58:180–6.
20. Martins T, Oliveira AAR, Oliveira AC, Boaventura TP, Barrioni BR, Costa-Júnior ES, et al. Novel 3D composites with highly flexible behavior based on chitosan and bioactive glass for biomedical applications. *Mater Chem Phys* [Internet]. Elsevier B.V; 2017;189:1–11. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.matchemphys.2016.12.012>
21. Francois E, Dorcemus D, Nukavarapu S. Biomaterials and scaffolds for musculoskeletal tissue engineering [Internet]. *Regenerative Engineering of Musculoskeletal Tissues and Interfaces*. Elsevier Ltd; 2015. 3-23 p. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-1-78242-301-0.00001-X>
22. Ross Ethier C, Simmons CA. Skeletal biomechanics. In: *Introductory Biomechanics - From cell to organisms*. New York, USA: Cambridge University Press; 2007. p. 379–443.
23. Swain MV, He L-H. Mechanical properties of bioceramics. In: *Bioceramics and their Clinical Applications* [Internet]. Elsevier; 2008. p. 78–105. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9781845692049500326>
24. Karageorgiou V, Kaplan D. Porosity of 3D biomaterial scaffolds and osteogenesis. *Biomaterials*. 2005;26(27):5474–91.
25. Blue M-L. The effects on cells because on changes in pH of body fluids [Internet]. [cited 2017 May 19]. Available from: <http://education.seattlepi.com/effects-cells-because-changes-ph-body-fluids-5851.html>
26. Zeimaran E, Pourshahrestani S, Djordjevic I, Pingguan-Murphy B, Kadri NA, Towler MR. Bioactive glass reinforced elastomer composites for skeletal regeneration: A review. *Mater Sci Eng C* [Internet]. Elsevier B.V.; 2015; Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0928493115300370>
27. Nazemi K, Azadpour P, Moztafzadeh F, Urbanska a. M, Mozafari M. Tissue-engineered chitosan/bioactive glass bone scaffolds integrated with PLGA nanoparticles: A therapeutic design for on-demand drug delivery. *Mater Lett* [Internet]. Elsevier; 2015;138:16–20. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0167577X14017339>
28. Materials Information. Glutaraldehyde datasheet [Internet]. [cited 2017 May 20]. Available from: <http://www.matweb.com/errorUser.aspx?msgid=2&ckck=nocheck>
29. Corazzari I, Nisticò R, Turci F, Faga MG, Franzoso F, Tabasso S, et al. Advanced



physico-chemical characterization of chitosan by means of TGA coupled on-line with FTIR and GCMS: Thermal degradation and water adsorption capacity. *Polym Degrad Stab.* 2015;112:1–9.

30. Savioli R, Pecora J. Evaluation of the antimicrobial activity of each component in Grossman ' s sealer. *Braz Oral Res* [Internet]. 2006;20(2):127–31. Available from: http://www.revistasusp.sibi.usp.br/scielo_links.php?link=http://www.revistasusp.sibi.usp.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1806-83242006000200007&lng=es&nrm=iso
31. Gomes BPF de A, Ferraz CCR, Vianna ME, Rosalen PL, Zaia AA, Teixeira FB, et al. In vitro antimicrobial activity of calcium hydroxide pastes and their vehicles against selected microorganisms. *Braz Dent J.* 2002;13(3):155–61.



CAPÍTULO

V

CONCLUSIONES Y PROSPECTIVAS

PRÓLOGO

En la Ingeniería de Tejidos es de vital importancia tomar las decisiones adecuadas respecto a los materiales que se pretenden usar para la regeneración de un tejido. Estas decisiones se basan en los procesos metodológicos usados y las pruebas realizadas para comprobar su funcionamiento.

En los capítulos anteriores se expusieron las bases teóricas para el desarrollo de este proyecto; además se presentaron las metodologías empleadas para fabricar y evaluar materiales para aplicaciones, y los resultados obtenidos de esas evaluaciones.

En este último capítulo se pretende concluir sobre la información presentada y dar respuestas claras sobre cuál fue el material más adecuado de aquellos fabricados para aplicación en Ingeniería de Tejido Óseo.

Por otro lado, se busca dar a conocer las prospectivas que se tienen respecto a los materiales fabricados, presentando otros posibles métodos de evaluación.



1. CONCLUSIONES

La extracción de sílice a partir de fuentes naturales demostró los efectos que genera el uso de ácido sulfúrico en la precipitación del polvo de sílice, provocando la aparición de otras fases que influyen en el comportamiento de este material durante la síntesis de vidrio bioactivo. Por su parte, el uso de la cascarilla de arroz para la extracción de la sílice resultó ser una fuente apropiada, debido a que el material extraído contó con las fases características para este compuesto sin presencia de contaminantes externos que pudieran afectar su funcionalidad.

Con dicha sílice se logró definir una metodología apropiada para la síntesis de vidrio bioactivo eliminando el uso de NaOH como se ha reportado en otros trabajos.

Se definió una metodología para la síntesis de vidrio bioactivo usando TEOS como fuente de sílice donde se emplean reactivos de bajo costo y que no son higroscópicos, lo que permitió la obtención de un polvo fino y estable. Además, esta metodología permitió obtener una morfología sub-micrométrica apropiada para la regeneración del tejido óseo. A través de las imágenes SEM se logró determinar que estas partículas se encontraban en aglomerados con formas esféricas que pudieron influenciar el comportamiento del material al ser usado como refuerzo en los scaffolds de quitosano.

El uso de las herramientas computacionales (Diseño de Mezclas Restringido con el software R) para definir las mejores condiciones de síntesis de vidrio bioactivo fue de gran ayuda, ya que de esta manera se pueden hacer simulaciones modificando las concentraciones molares de cada uno de los óxidos involucrados en la síntesis para conocer su efecto en la bioactividad del material cerámico. De esta manera se puede disminuir la fase experimental inicial, que corresponde a definir la mejor condición; y se puede avanzar directamente a las etapas de optimización y aplicación.

Los dos tipos de vidrios bioactivos sintetizados mostraron un comportamiento bioactivo adecuado para un material con aplicación en el tejido óseo, permitiendo la formación de una capa de apatita en la superficie de ambos materiales con una relación Ca/P cercana a la relación de la apatita natural en el hueso, lo que haría posible que se dé una unión adecuada entre el cerámico sintetizado y la superficie ósea una vez sea implantado el biocompuesto. Por otro lado, el uso de los vidrios bioactivos utilizados como refuerzo en scaffolds de quitosano demostró una mejora en el comportamiento mecánico, bioactivo y antimicrobiano del compuesto, sin afectar la formación de poros y el tamaño de los mismos, lo que es deseable en materiales compuestos donde se busca combinar las propiedades individuales de cada material usado.



Se logró identificar que el diámetro promedio de los poros generados durante la fabricación de los scaffolds se encontraba en el rango establecido para estructuras porosas usadas en regeneración de tejidos. Esto es de vital importancia, ya que un tamaño de poro adecuado permitirá la migración celular en el interior del scaffold promoviendo la colonización completa de la estructura.

Los ensayos mecánicos demostraron que el uso de un refuerzo cerámico aumenta la resistencia de los scaffolds con matriz polimérica; sin embargo, el uso de los vidrios bioactivos sintetizados no logra aumentar el módulo elástico lo suficiente para obtener un resultado similar al del hueso. No obstante, este resultado pudo verse afectado por la heterogeneidad de la estructura porosa que genera puntos de tensión durante el ensayo a compresión.

Durante las pruebas *in vitro* se logró determinar que los scaffolds fabricados presentan una degradación casi total luego de ser sometidos en SBF por 28 días. Esta respuesta indica el tiempo de vida útil del material cuando se encuentra en condiciones corporales simuladas. Es necesario tener en cuenta que el ensayo se realizó bajo condiciones estáticas del fluido, por lo que la respuesta es sólo parcial, siendo necesario establecer condiciones dinámicas que permitan acercarse al comportamiento real del tejido el cual está influenciado por la circulación sanguínea. Por su parte, se estudió el pH de la solución de SBF después de los ensayos *in vitro* con el fin de definir si los scaffolds afectan este valor y en qué medida lo afecta. Los valores obtenidos de pH resultaron ser inferiores al pH necesario para el correcto funcionamiento de las células óseas; sin embargo, la diferencia no es muy alta y se mantiene aproximadamente constante en el tiempo, por lo que es posible que este cambio no se genere si se establecen condiciones dinámicas en las que se simule el torrente sanguíneo.

Con los ensayos *in vitro* también se logró determinar la bioactividad de los scaffolds lo que se puede observar en las imágenes SEM, donde se evidencia la presencia de agregados en la superficie que no hacen parte de la estructura original de los scaffolds. Estas deposiciones demuestran la generación de capas, posiblemente apatitas, sobre los materiales. A pesar de que no se pudo medir correctamente la composición de la capa formada, es posible que esta capa fuese de apatita en aquellos scaffolds reforzados con vidrio bioactivo lo que indica el aumento en la bioactividad con la adición de material cerámico en la estructura.

Los resultados mostraron un efecto antimicrobiano de todos los scaffolds, lo que está de acuerdo con la literatura acerca del efecto inhibitorio del quitosano. Aunque, el mayor efecto se vio en aquellos scaffolds que contaban en su estructura con vidrio bioactivo, especialmente el sintetizado con TEOS, permitiendo inferir que los polvos sintetizados también poseen un efecto antimicrobiano intrínseco.



Con lo anterior se puede concluir que durante el desarrollo de este trabajo se lograron sintetizar vidrios bioactivos adecuados para la regeneración del tejido óseo. Además, estos otorgaron buenas propiedades en scaffolds de quitosano al ser usados como refuerzo en los mismos, lográndose respuestas similares a las del hueso. Específicamente el scaffold que presentó una mejor respuesta fue el fabricado con iguales proporciones de quitosano y el vidrio bioactivo sintetizado con TEOS, por lo tanto esta estructura es favorable como plataforma de crecimiento celular en la regeneración de tejido óseo.

2. PROSPECTIVAS FUTURAS

Este proyecto propuso la extracción de sílice a partir de distintas fuentes naturales usando dos metodologías, una de estas consistía en un tratamiento alcalino seguido por una precipitación de la sílice usando ácido sulfúrico. El uso de este ácido genera compuestos que afectan el correcto funcionamiento de la sílice, por lo cual es necesario usar otro tipo de ácido fuerte que permita precipitar la sílice pero que los compuestos alternos que se formen puedan ser eliminados fácilmente con lavados para así obtener sílice pura.

Para lograr comprender mejor el comportamiento de los scaffolds fabricados, una aproximación inicial es realizar los estudios de degradación y formación de apatitas en un sistema dinámico, donde se puede simular adecuadamente el flujo del fluido sinovial. Además puede considerarse adicionar un sistema que ejerza compresión constante en la estructura mientras se encuentra sumergido en SBF. Todo esto con el fin de simular las condiciones reales del tejido.

Por otro lado, ya que los resultados obtenidos son comparables con el comportamiento óseo, se hace necesario evaluar los materiales fabricados en condiciones *in vitro*. Donde se investiguen la citotoxicidad, la adhesión celular, la proliferación y diferenciación para conocer el funcionamiento de los scaffolds en contacto con las células propias del tejido.



AVALES:

Estudiante:

Lindsey Alejandra Quintero

Asesora:

Diana Marcela Escobar Sierra

Aval: Grupo de Investigación en Biomateriales- BIOMAT

Diana Marcela Escobar Sierra
C.C. 43537065
Grupo de Investigación en Biomateriales
Directora