



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIA E INGENIERÍA DE MATERIALES
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN MATERIALES

**“ENCAPSULAMIENTO DE β -WHITLOCKITA-Mg (β -TCMP) EN ÁCIDO
POLILÁCTICO-CO-GLICÓLIGO (PLGA)”**

TESIS
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIA E INGENIERÍA DE MATERIALES

PRESENTA:
I. BIM. GRISELDA VALERIA NÁJERA ROMERO

TUTOR
DRA. MARÍA CRISTINA PIÑA BARBA
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN MATERIALES

COMITÉ TUTOR
DR. LUIS MEDINA TORRES
FACULTAD DE QUÍMICA
DR. ARTURO BARBA PINGARRÓN
FACULTAD DE INGENIERÍA

MÉXICO, D. F.

OCTUBRE 2013



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Dedicatoria

A mis padres: Félix y Valentina,
por su esfuerzo, cuidado y dedicación.

A mis hermanas, Nora, Cinthia y Mary,
mi ejemplo, mi inspiración y mi compañía.

A J.M.
por su apoyo incondicional.

Agradecimientos

A la Dra. Ma. Cristina Piña Barba por su apoyo y asesoría en la realización de este trabajo.

Al Dr. Luis Medina Torres por su paciencia, disposición y sus valiosas aportaciones.

Al M. Jorge Alberto Sánchez Burgos por compartir conmigo sus conocimientos y entusiasmo. Al M. Leonardo Moreno por sus acertadas sugerencias y apoyo. Y al Fís. Hugo A. Lara García porque hemos aprendido juntos durante el transcurso de este trabajo y del posgrado.

A la Dra. Ma. Josefa Bernad Bernad y al Laboratorio de Farmacia en especial a Pedro, Lucía, Jérica, Jazmín y Carlos por las facilidades y ayuda otorgadas.

A la Q.F.B. Damaris Cabrero por su colaboración en la obtención de los termogramas.

Al Dr. Omar Novelo y la Dra. Guillermina González por su cordial disposición en la obtención de los análisis de microscopía electrónica de barrido.

A mis compañeros de maestría y de laboratorio Sandy, Bar, Daniel, Octavio, Burelo, Karla, Lidia, Malu, Gerardo y David por los agradables momentos.

A la Universidad Nacional Autónoma de México y al Instituto de Investigaciones en Materiales por haberme permitido realizar mis estudios de posgrado.

Gracias al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) y al proyecto IT104011 DGAPA por el apoyo económico otorgado.

ÍNDICE

	Pág.
INTRODUCCIÓN	6
1. MARCO TEÓRICO	8
1.1 Generalidades de Hueso	9
1.1.1 Composición	9
1.1.2 Macroestructura del hueso	14
1.1.3 Formación, mantenimiento y remodelación ósea	16
1.2 Hueso y Metabolismo Mineral	19
1.2.1 Homeostasis del Calcio	20
1.2.2 Absorción del Calcio	22
1.2.3 Excreción del Calcio	22
1.3 Materiales Cerámicos para la sustitución ósea: Fosfatos de Calcio	23
1.3.1 Hidroxiapatita	25
1.3.2 β -Fosfato Tricálcico (β -TCP)	26
1.3.3 β -Fosfato Tricálcico con Magnesio (β -TCMP)	27
1.4 Osteoporosis	28
1.4.1 Clasificación y Factores Riesgo	29
1.4.2 Diagnóstico y Valoración	30
1.4.3 Tratamiento	32
1.5 Encapsulamiento de Agentes Terapéuticos con vectores de ácido Poliláctico-co-glicólico, (PLGA)	33
1.5.1 ¿Por qué utilizar un Sistema PLGA?	34
1.5.2. Elaboración de partículas de PLGA	35
1.5.3 Efectos del pH en la degradación del Sistema PLGA	35

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	36
2.1 Hipótesis	37
2.2 Objetivos	37
3. MATERIALES Y MÉTODOS	38
3.1 Materiales	39
3.1.1 Reactivos	39
3.1.2 Equipos	39
3.2 Métodos Experimentales	40
3.2.1 Elaboración de la Películas	40
3.2.2 Caracterización de las Películas	43
1. Caracterización por Potencial Zeta	43
2. Microscopía Electrónica de Barrido, (MEB)	43
3. Análisis Termogravimétrico, (TGA)	44
4. Propiedades Mecánicas: Ensayo de Tensión	45
5. Perfil de Liberación	46
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	49
4.1 Material Elaborado	50
4.2 Caracterización por Potencial Zeta	50
Análisis de la Microestructura	53
4.3 Microscopía Electrónica de Barrido (MEB)	53
4.4 Análisis Termogravimétrico (TGA)	56
4.5 Ensayo de Tensión	66
4.6 Perfil de Liberación	70
5. CONCLUSIONES	72
5.1 Conclusiones	73

6. APÉNDICES	75
Apéndice 1. Técnicas de caracterización	76
6.1.1 Potencial Zeta	76
6.1.2 Microscopía Electrónica de Barrido, (MEB)	79
6.1.3 Análisis Termogravimétrico, (TGA)	81
6.1.4 Prueba de Textura	83
6.1.5 Perfil de Liberación	86
Apéndice 2. Obtención del β -TCP mediante la técnica de sol-gel asistida por ultrasonido	90
Apéndice 3. Características de la goma Xantana y de la κ - Carragenina	92
Apéndice 4. Determinación de la concentración adecuada de Xantana y Carragenina a utilizar	94
Apéndice 5. Comportamiento de las películas elaboradas con β -TCP sin magnesio, (Potencial Zeta y MEB)	96
Apéndice 6. Imágenes de MEB	100
7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	102

INTRODUCCIÓN

La osteoporosis es la enfermedad humana ósea más frecuente. A partir de los 50 años afecta a una de cada cuatro mujeres y a uno de cada ocho varones y su incidencia aumenta de forma significativa en mujeres después de la menopausia, hasta el punto de que al día de hoy se estima que es la enfermedad crónica más prevalente en todo el mundo en mujeres de raza blanca mayores de 65 años ^[94].

La consecuencia más directa de la osteoporosis es el incremento de la incidencia de fracturas por fragilidad, de esta forma los tratamientos para la osteoporosis están enfocados a frenar la resorción ósea o a estimular la formación de hueso, por lo que la adecuada ingesta de calcio es de suma importancia en la prevención y tratamiento de la osteoporosis. La dieta de los pacientes con osteoporosis debe ser equilibrada, con suficiente aporte de calcio y vitamina D. En los adultos se recomienda una ingesta de calcio de entre 1000 y 1300 mg por día (aunque, después de la menopausia los requerimientos de calcio aumentan ligeramente) ^[102], sin embargo, sólo aproximadamente un 50% de la población cumple esta recomendación, y en ocasiones son necesarios suplementos orales con calcio ^[84] (comúnmente disponibles en combinación con compuestos de citrato o carbonato ^[50]). Es importante enfatizar que no se debe consumir toda la ingesta recomendada en una sola toma, dado que sobrecargaría la capacidad de absorción del intestino, por lo que se debe tomar en dosis separadas, que no excedan los 500 a 600 mg por dosis ^[102]. Asimismo se requieren valores adecuados de vitamina D para una óptima absorción intestinal del calcio, así como para un adecuado metabolismo del tejido óseo ^[84].

Los materiales sintéticos más favorecidos para el reemplazo óseo están basados en la química de fosfatos de calcio debido a su que composición química es similar a la fase mineral del hueso ^[50]. El β -Fosfato Tricálcico (β -TCP, $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$) es una cerámica también conocida como whitlockita y es una fase absorbible lentamente, notable por su biocompatibilidad y alta absorción en hueso, razones por las que ha sido utilizada como material biocompatible para reemplazo de hueso y para recubrimientos de prótesis de hueso ^[48, 52]. La sustitución de magnesio

en lugar de calcio estabiliza el TCP, previniendo su conversión en hidroxiapatita al contacto con los fluidos corporales ^[51].

La utilización de β -Fosfato Tricálcico sustituido con magnesio (β -TCMP) encapsulado en partículas de ácido poliláctico-*co*-glicólico (PLGA) representa una opción viable en la utilización de esta cerámica como un complemento en el tratamiento de la osteoporosis (suplemento alimenticio). Los sistemas de liberación con PLGA conjuntan características de encapsulamiento, biocompatibilidad y biodegradación óptimas para utilizarse en el transporte de β -TCMP hasta el tracto gastrointestinal. De acuerdo con Miladi K., *et al.*, (2013) la utilización del PLGA para el encapsulamiento de agentes terapéuticos para el tratamiento de la osteoporosis ya ha sido ampliamente reportado en la literatura, y se han encapsulado en diversos dispositivos agentes tales como: Risodronato de Sodio en microesferas, Calcitonina en nanopartículas y microesferas, Aldronato e hidroxiapatita en microesferas, entre otros ^[67]. Asimismo, autores como Lim *et al.*, (2010), Da-Silva *et al.*, (2007) y Gan & Feng (2006) reportan el uso de *scaffolds* elaborados con carragenina para aplicaciones en ingeniería de tejidos.

En este trabajo se utilizaron los métodos de Evaporación de Disolvente Emulsificado y Vaciado de Disolvente para la formación de películas de Xantana- κ -Carragenina que contengan microesferas de Fosfato Tricálcico sustituido con Magnesio (β -TCMP) o Whitlockita encapsulado en ácido poliláctico-*co*-glicólico PLGA.

1. MARCO TEÓRICO

MARCO TEÓRICO

1.1 GENERALIDADES DEL HUESO

El hueso es un tejido conectivo especializado que juntamente con el cartílago forma el sistema esquelético ^[1]. Este tipo de tejido, como otros tejidos conjuntivos, está compuesto por células y matriz extracelular. La característica que distingue al tejido óseo de los otros tejidos conjuntivos es la mineralización de su matriz ^[88], lo que le confiere características especiales.

Tiene tres funciones principales:

- *Mecánica*: Es zona de unión de la musculatura, sirve de sostén al cuerpo y además permite el desplazamiento y todos los movimientos imprescindibles para la vida de relación ^[94, 112].
- *Protectora*: Proporciona blindaje a los órganos vitales y aloja a la médula ósea que produce y suministra las células hematopoyéticas ^[94, 96, 112].
- *Metabólica*: Como reserva de iones esenciales para el metabolismo, entre ellos sodio, potasio, magnesio, y especialmente calcio y fosfato ^[94, 112].

1.1.1 Composición

La composición y la estructura de los huesos están sujetas a influencias hormonales, metabólicas y nutricionales múltiples ^[110]. De manera general, podemos decir que el hueso es básicamente una matriz orgánica mineralizada por depósitos de sales de calcio ^[112].

Así pues, el hueso está compuesto por una fase orgánica e inorgánica, de la que aproximadamente el 70% de su peso es mineral o materia inorgánica, cerca del 8% es agua, y lo demás es orgánico (Figura 1.1). De la materia inorgánica, aproximadamente 95% está

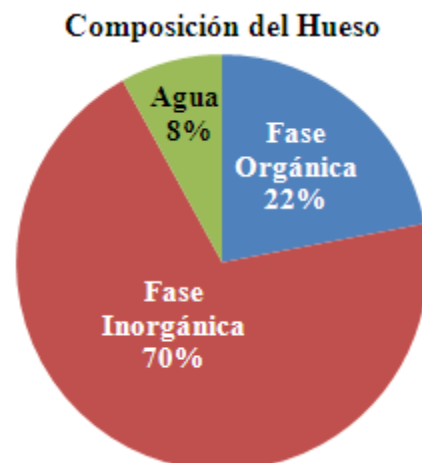


Figura 1.1 Composición del hueso. Adaptado de [85].

compuesto de hidroxiapatita ^[85] y el resto son iones como potasio, magnesio y sodio ^[47]. De la fase orgánica, alrededor del 85% está compuesta de colágeno tipo I, y el restante 15% está compuesto de pequeñas cantidades de otros colágenos, varias proteínas no colágenas, glicoproteínas, y sólo alrededor del 2% está compuesto de células. Algunas de estas proteínas no colágenas son específicas del hueso, como la osteocalcina, mientras que otras como la osteopontina, fibronectina, y varios factores de crecimiento peptídicos, se encuentran también en otros tejidos conectivos. Las proteínas no colágenas del hueso participan en el acoplamiento de las células óseas a la matriz extracelular, y en la regulación de la actividad del hueso durante el proceso de remodelación ósea ^[112].

Matriz Ósea

Es la responsable de las propiedades biomecánicas del tejido óseo ^[96] y tiene diferentes funciones, dado que está calcificada le imparte al hueso gran resistencia a la compresión y a la tracción. Su composición esencialmente consiste en fibrillas colágenas (fase orgánica) y sales minerales (fase inorgánica) ^[110].

Fase inorgánica

Está formada, como ya se mencionó, en su mayoría (95%) por iones de fosfato y de calcio formando cristales parecidos a la hidroxiapatita mineral, con composición $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, de alrededor de 3 nm de espesor y hasta 60 nm de largo. Los iones de la superficie de los cristales de hidroxiapatita están hidratados, formando lo que se llama capa de hidratación. Esta capa facilita el intercambio de iones entre el cristal y el líquido intersticial. La mineralización empieza a lo largo de las fibras de colágeno, donde inicialmente se depositan los cristales de esta apatita paralelamente en intervalos regulares y periódicos, otorgando rigidez al hueso. Se supone que las glicoproteínas óseas (osteocalcina, osteonectina y osteoponina) desempeñan un papel en la formación de los cristales de hidroxiapatita, dado que existen otros tejidos ricos en colágeno tipo I (proteína también presente en el hueso) pero que no contienen estas glicoproteínas específicamente óseas y que normalmente no presentan calcificación. Asimismo, la fase inorgánica presenta pequeñas cantidades de iones carbonato (CO_3), magnesio, potasio, sodio y citrato ^[29, 47, 96, 110].

Fase orgánica

-Proteínas Colágenas

- Colágeno tipo I

Aproximadamente el 85% del material orgánico del hueso está formado por colágeno tipo I, que es una proteína con una compleja conformación jerárquica dividida en cuatro estructuras: estructura primaria (aminoácido triplete), estructura secundaria (α -hélice), estructura terciaria (triple hélice) y estructura cuaternaria (fibrillas) ^[30]. El colágeno tipo I del hueso se diferencia del que está presente en otros tejidos principalmente por sus modificaciones postraslacionales. Por ejemplo, el patrón de hidroxilación de lisinas es distinto en el hueso que en tejidos como la piel ^[112]. El colágeno en el hueso, sintetizado por los osteoblastos, sirve como un patrón y también puede inicializar y propagar la mineralización de manera independiente a las vesículas de la matriz. Esta proteína le confiere al hueso resistencia a la tracción, elasticidad y flexibilidad ^[29, 30].

Aparte del colágeno tipo I, en el hueso se encuentran otras proteínas colágenas en menor abundancia, entre ellas:

- Colágeno tipo III

Presente en pequeñas cantidades, parece regular el diámetro del colágeno fibrilar cuyas mutaciones en humanos explican los diferentes tipos de enfermedad de Ehlers- Danlos ^[13].

- Colágeno tipo V

Se lo encuentra con frecuencia íntimamente asociado con las fibras de colágeno tipo I y controla el diámetro de las fibrillas de éste tipo de colágeno ^[89].

-Proteínas No Colágenas

Asimismo en el tejido óseo se encuentran presentes otras proteínas no colágenas, constituidas por proteoglicanos y glicoproteínas.

- Proteoglicanos

Son macromoléculas compuestas por glicosaminoglicanos (GAGs) unidos de manera covalente a una proteína central de la cual deriva su nombre, por ejemplo decorina, biglicano, versicano o fibromodulina. Estas macromoléculas se encuentran asociadas principalmente a las

fibras colágenas, a las que se fijan en determinados puntos específicos de su estructura (excepto en aquellos que constituyen los puntos de nucleación en la formación de hueso) por lo que se las considera como el elemento de fijación que rellena los espacios entre las fibras colágenas. Este gel de proteoglicanos solidifica la red de fibras colágenas confiriéndoles a los tejidos la turgencia y la resistencia a la presión. Aunque su función no se limita a brindar estabilidad mecánica sino que también constituyen sitios de unión para ciertos factores de crecimiento [7, 38, 80].

- Glicoproteínas

Estas moléculas resultan de la unión de una fracción glucídica con una fracción proteica a través de enlaces covalentes. La fracción hidrocarbonada está representada por una o varias cadenas glucídicas (azúcares), generalmente ramificadas y de pequeño tamaño, unidas a la secuencia polipeptídica. Se producen en diferentes etapas de la maduración del osteoblasto y a diferencia de los glicosaminoglicanos, las glicoproteínas carecen de ácidos urónicos y ésteres sulfatos. La trombospondina, fibronectina, osteopontina y sialoproteína ósea son glicoproteínas que exhiben una secuencia RGD (Arg-Gly-Asp), que constituyen dominios de enlace para receptores de membrana celular de la familia de las integrinas. Por otro lado, la osteocalcina y la proteína Gla matricial se caracterizan por presentar gran afinidad hacia iones minerales como Ca^{2+} [38, 42, 80].

Componente Celular

En el hueso coexisten varios tipos de células que constituyen un sistema celular especializado responsable de la reparación, el mantenimiento y la adaptación del hueso. Podemos hablar de tres tipos de células principalmente: Osteoblastos, Osteocitos y Osteoclastos (ver Figura 1.2); sin embargo, en el hueso también se encuentran presentes los Pre-osteoblastos, Pre-osteoclastos, las Células Linfoides y las de Revestimiento [6, 28].

-Osteoblastos:

Derivan de las células mesénquimales pluripotenciales de la médula ósea, endostio, periostio y pericitos perivasculares [28]. Son las células formadoras de matriz del hueso en crecimiento y maduro, sintetizando sustancia osteoide (matriz no calcificada) a un ritmo de 2 a 3 μm por día [28, 110]. Durante el crecimiento se ubican en la parte superficial de la matriz y su forma es poliédrica. Los osteoblastos realizan diversas tareas: secretan colágeno, proteoglicanos,

osteocalcina, osteopontina, osteonectina y otras proteínas; producen factores de crecimiento paracrinos y autocrinos; tienen receptores para una serie de hormonas, citocinas y vitaminas como la parathormona (PTH), la 1,25 dihidroxivitamina D (1,25D), la prostaglandina E₂, el IGF-I y IGF-II que promueven la proliferación y diferenciación de la célula mesenquimática pluripotencial indiferenciada, que da origen a preosteoblastos y osteoblastos; asimismo, median la reabsorción llevada a cabo por los osteoclastos a través de la síntesis de citoquinas específicas [28, 112]. Finalmente, una vez mineralizada la matriz, algunas de estas células quedan atrapadas dentro y se transforman en osteocitos, o mueren por apoptosis [110].

-Osteocitos:

A diferencia de los osteoblastos y los osteoclastos que se encuentran en la superficie ósea, los osteocitos se hallan en el interior. Son el tipo de células más abundantes del tejido óseo y tienen forma estrellada, sus variadas prolongaciones constituyen conexiones con las prolongaciones de los osteocitos vecinos, permitiendo intercambiar electrolitos y moléculas pequeñas, de la misma manera que habilitan un flujo de sustancias desde los osteoblastos de la superficie [28, 110]. Tienen un tamaño aproximado de 7 µm de diámetro y 2 µm de espesor. Su función aún no está bien definida, pero ciertamente desempeñan un papel fundamental en el transporte de materiales orgánicos e inorgánicos hacia los huesos [6], asimismo, se los ha descrito como sensores de carga mecánica, lo cual genera estímulos que serán transmitidos a través de las células interconectadas, fenómeno llamado mecanotransducción, convirtiéndose así en el sistema de comunicación en el hueso [28, 112], y participando de este modo activamente en el proceso de remodelación ósea (síntesis y mineralización de la matriz osteoide) detectando las variaciones mecánicas de las cargas. Este tipo de célula constituye el estadio final de la línea osteoblástica y son incapaces de renovarse [28].

-Osteoclastos:

Son células polinucleadas de gran tamaño (10 µm) que se localizan en las superficies óseas, ricas en mitocondrias y vacuolas [28]. Sus membranas consisten en numerosos dobleces y los pliegues de este borde rugoso cambian constantemente de forma y realizan movimientos activos [6, 110]. Los osteoclastos son los encargados de resorber (absorber) la matriz calcificada, los osteoclastos se movilizan hacia la zona a reabsorber y luego se adhieren a la superficie ósea

mineralizada a través del borde rugoso mediante las integrinas. A este nivel el pH es ácido, ya que secretan ácidos (H^+) generados por la anhidrasa carbónica II y enzimas proteolíticas como colagenasas, metaloproteasas, etc., que inducen la resorción del hueso mediante la solubilización de la matriz orgánica primero y posteriormente la mineral [6, 28].

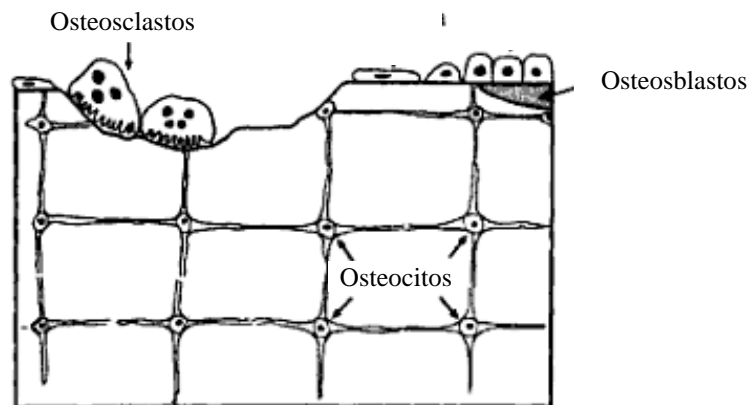


Figura 1.2. Dibujo que muestra las típicas ubicaciones en el hueso de las tres células descritas. *Adaptado de [112].*

1.1.2 Macroestructura del hueso

El hueso tiene principalmente dos funciones mecánicas que cumplir: soportar la carga del cuerpo y al mismo tiempo poseer flexibilidad. Su estructura macroscópica específica es lo que le permite cumplir con estas características [6]. Como se mencionó en el apartado anterior, desde el punto de vista histológico, el hueso es un tejido conjuntivo mineralizado muy vascularizado e innervado, que se estructura en laminillas de matriz osteoide calcificada. La disposición de estas fibrillas determina su macroarquitectura, determinando así dos tipos de hueso: *compacto* y *esponjoso* [28], como se aprecia en la Figura 1.3. Aunque los huesos del esqueleto presentan diversos tamaños y formas, todos poseen una estructura afín, en la que la parte externa está constituida por una compacta capa de tejido calcificado (*hueso compacto*), el interior del hueso está parcial o totalmente ocupado por un entramado de trabéculas finas calcificadas (*hueso esponjoso*); así pues, el 70-85% de la superficie ósea corresponde a la superficie interna o endóstica y sólo el 25-30% corresponde a la superficie externa o perióstica [103].

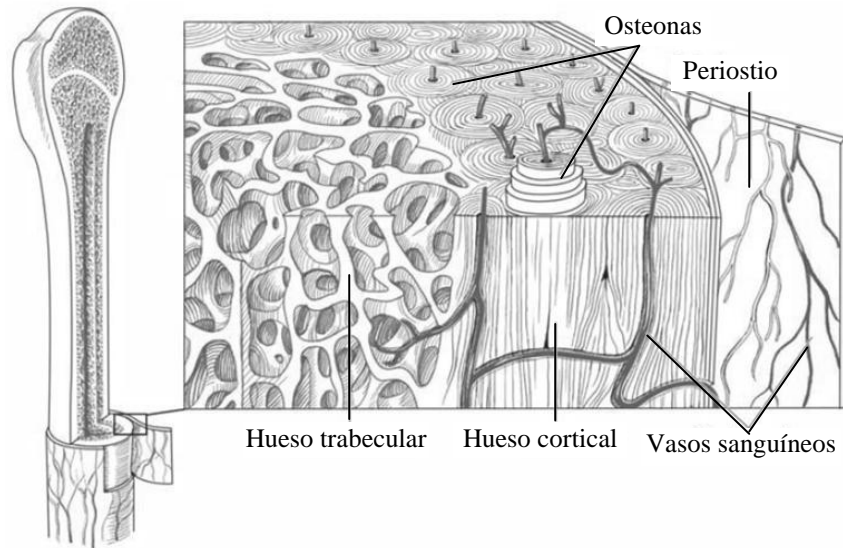


Figura 1.3. Estructura del hueso. Se puede ver el hueso cortical que junto con el sistema vascular rodea el entramado trabecular. *Adaptado de [6].*

- *Hueso cortical o compacto:* Representa alrededor del 80% del volumen total del hueso y aproximadamente el 30% de la superficie disponible para la remodelación ^[94]. El hueso compacto posee una unidad estructural repetitiva denominada *osteona* ^[103] (de entre 10-500 μm de diámetro ^[35]), constituida por un conducto central o de Harvers (de tamaño variable), que está rodeado de láminas concéntricas de matriz ósea calcificada (alrededor de 4-20 láminas ^[35]). Estas osteonas se agrupan densamente y tienen una red de conductos por los cuales atraviesan vasos sanguíneos, linfáticos y nervios. Los osteocitos se sitúan entre las láminas de matriz en espacios denominados lagunas (de tamaño aproximado al de los osteocitos, 7-15 μm de diámetro) comunicados a través de sus características prolongaciones ^[103]. El hueso cortical posee una tasa metabólica lenta ^[6].

- *Hueso esponjoso o trabecular:* Representa cerca del 20% del volumen total del hueso y un poco más del 70% de la superficie disponible para la remodelación ^[94], el esqueleto axial (cráneo, columna vertebral, tórax y pelvis). A primera vista el entramado trabecular pareciera aleatoriamente distribuido, sin embargo una mejor observación nos permite darnos cuenta de que las trabéculas se encuentran orientadas precisamente a lo largo de las líneas de esfuerzo y de soporte, formando una estructura similar a la de una “red

esponjosa”^[6]. En el espesor de las trabéculas, se disponen los osteocitos en el interior de las lagunas^[103].

1.1.3 Formación, Mantenimiento y Remodelación Ósea

El tejido óseo sufre procesos de crecimiento, modelado y remodelado, que representan los recursos biológicos posibles para vehicular cualquiera de los cambios naturales mecánicamente significativos de su estructura resistiva (es decir, que afecten la rigidez intrínseca o la distribución espacial del material calcificado). Siendo este último proceso de gran relevancia, ya que la mayoría de patologías óseas son consecuencia de alguna alteración en este proceso^[94, 112].

Crecimiento (Osteogénesis)

En el desarrollo del esqueleto se hallan involucrados dos eventos principales: el **diseño**, en el que se definen la forma, tamaño y localización de los elementos del esqueleto; y la **diferenciación** que involucra un proceso de varios pasos donde células mesénquimales progenitoras independientes reciben señales que activan la transcripción de genes que controlan la proliferación y diferenciación de osteoblastos, condrocitos y osteoclastos^[38]. En la etapa embrionaria y hasta la juventud, el proceso de osteogénesis con la fase de síntesis de matriz orgánica y la posterior mineralización ocurre donde no había hueso, es lo que se conoce como *osificación primaria*. Es un proceso rápido, el colágeno se distribuye al azar, los osteocitos no tienen una distribución regular el grado de mineralización no es muy alto. Este tipo de hueso se denomina primario, reticular, plexiforme o no laminar. En el adulto sólo aparecerá en circunstancias reparadoras o patológicas. Se conocen dos mecanismos de osificación primaria: 1) intramembranosa, endoconectiva, o directa porque el tejido óseo se origina directamente en una lámina de mesénquima, y 2) endocronal, porque en el mesénquima donde se originará el futuro hueso, aparece primero el cartílago hialino, que sirve de molde o modelo para que ulteriormente se desarrolle, también a partir del mesénquima, el tejido óseo^[27].

Posteriormente hueso esponjoso secundario de tipo lamelar (Haversiano) sustituye ese hueso primario. Alrededor de este hueso se produce luego una aposición de origen perióstico de capas de nuevo hueso lamelar de estructura compacta (proceso antiguamente llamado

“osificación membranosa”) que forma parte del proceso ulterior de modelado para formar la envoltura compacta externa ^[112].

Modelado

Consiste en una combinación de formación ósea osteoblástica de tejido lamelar y resorción osteoclástica, llevados a cabo de forma independiente, no acoplada, y determinan la forma y el tamaño (“crecimiento en ancho”) de los huesos, además de permitir la renovación constante del esqueleto. Además cuando se altera el proceso de modelado pueden generarse deformidades óseas. El modelado está programado genéticamente, pero es probable que los factores mecánicos locales también influyan sobre el mismo, aunque la aposición perióstica tiende a minimizarse hacia la edad madura ^[96, 112].

Remodelado

Cuando un hueso es sometido a fuerzas que superan su resistencia mecánica se origina su fractura, desencadenándose tras ella el proceso de consolidación o reparación ósea, que tiene como objetivo restablecer la estructura tisular y las propiedades mecánicas originales ^[1]. La remodelación del hueso es un proceso muy activo que consiste en la renovación ósea mediante la acción sucesiva y coordinada de osteoclastos (resorción ósea) y osteoblastos (formación ósea) en diminutos focos por todo el esqueleto, denominados unidades de remodelación ósea. Anualmente se renueva el 25% del hueso trabecular y el 3% del cortical y en un período de 10 años, se ha renovado la totalidad de los huesos por lo menos una vez ^[38, 94].

Existen diferentes razones por la que se presenta el proceso de remodelación:

- En una primera etapa (en el embrión y en procesos reparativos reaccionales) sobre el hueso reticular y su reemplazo por el lamelar.
- En la osificación endocondral donde todo hueso que se forma se remodela para ser finalmente hueso lamelar adulto.
- Ciertas zonas del esqueleto están en constante remodelación: zonas en las que una elevada muerte de osteocitos genera un sector que actúa como hueso muerto, por lo que se debe reemplazar; o zonas en las que se presenta un nuevo requerimiento mecánico (nuevos deportes, variaciones de peso, etc.) y el hueso debe adaptarse a ello.

- Lesiones esqueléticas de diversas clases (fracturas, pérdidas de piezas dentarias, etc.) [101].

El ciclo de remodelación toma aproximadamente 120 días, y se pueden distinguir seis fases principalmente: activación, resorción, acoplamiento, formación, mineralización y reposo [6, 94]. Se describen a continuación las fases de remodelado óseo antes mencionadas e ilustradas en la Figura 1.4.

- a) **Activación:** La superficie del hueso inactivo se prepara para la resorción. Lo que involucra una retracción de las células tapizantes y la remoción de la capa delgada de colágeno que cubre la superficie del hueso. Mediante señales quimiotácticas se atraen a los preosteoclastos, los cuales se fijan en la superficie ósea y desplazan a las células tapizantes del hueso. El sitio específico de activación puede ser alcanzado mediante esfuerzo mecánico transmitido a las células tapizantes mediante la red de canales de los osteocitos [1, 6].

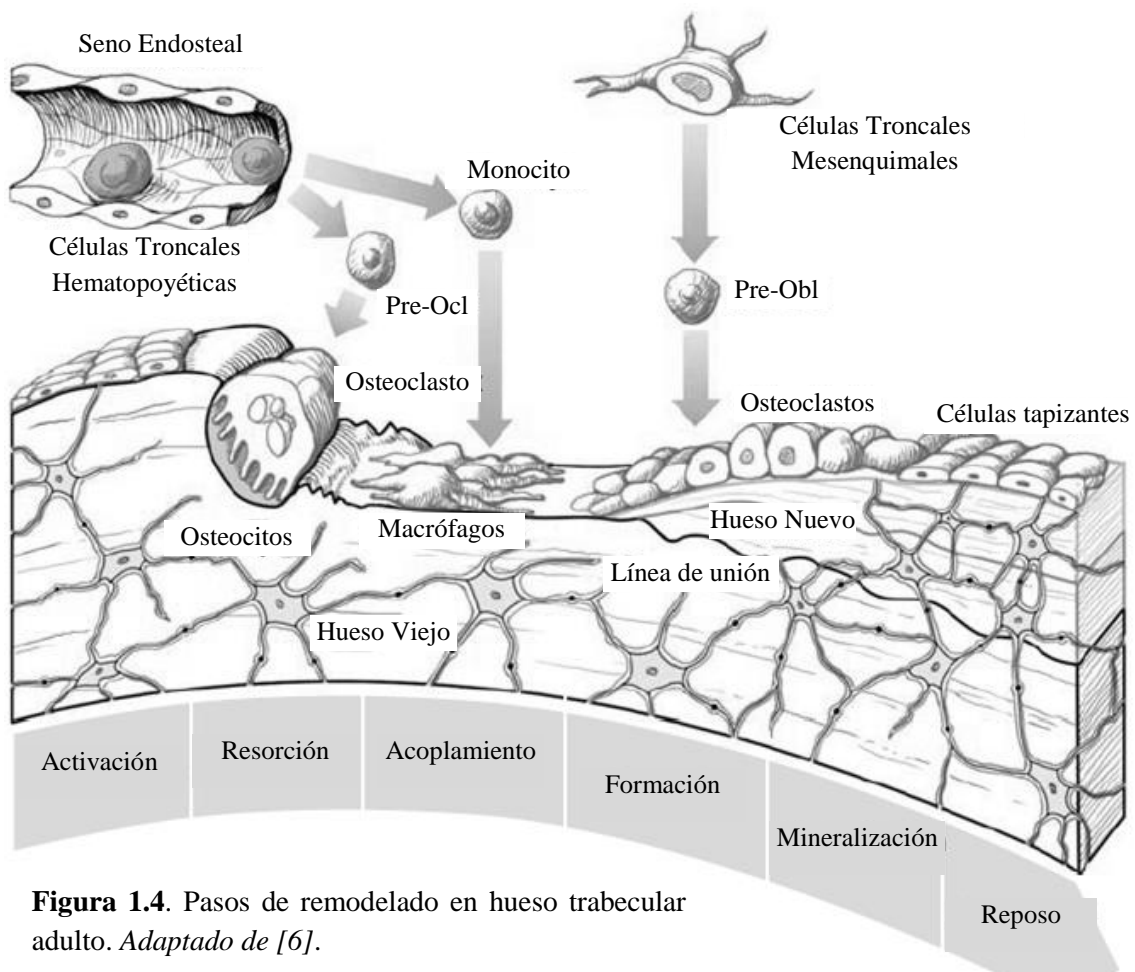


Figura 1.4. Pasos de remodelado en hueso trabecular adulto. Adaptado de [6].

- b) **Resorción:** Durante este proceso se presenta la proliferación y fusión de los precursores osteoclasticos, la preparación de los osteoclastos para la resorción y el desarrollo de la membrana rugosa. Posteriormente, los osteoclastos resorben el hueso, lo que lleva a la formación de lagunas o cavidades, que en el hueso trabecular forman una cavidad en forma de laguna (Laguna de Howship) de alrededor de 50 μm de profundidad, y en el hueso cortical la cavidad tiene forma de túnel (cono penetrante). Este periodo dura entre 1 y 3 semanas. Por último, los osteoclastos migran lentamente o sufren apoptosis ^[1, 6].
- c) **Acoplamiento:** Los osteoblastos progenitores son atraídos a la cavidad de resorción, mientras que los monocitos y las células tapizantes preparan la superficie de la cavidad de resorción para la producción de hueso nuevo mediante la remoción de los restos dejados por los osteoclastos. Este periodo de inactivación dura aproximadamente dos semanas ^[1, 6].
- d) **Formación:** Los osteoblastos activos producen el osteoide. Una vez finalizada esta etapa, aproximadamente un 65% de los osteoblastos sufren apoptosis, mientras que el otro 35% se transforma en osteocitos o en células tapizantes ^[1, 6].
- e) **Mineralización:** Para dar lugar a la mineralización del osteoide, los osteoblastos deben producir previamente vesículas de matriz (las cuales son redondeadas, de tamaño variable y están limitadas por una membrana). Durante la formación del osteoide estas vesículas se separan del osteoblasto por gemación (derivan muy probablemente de la membrana celular) y pasan a la matriz, donde constituyen el centro para la formación de cristales de fosfato de calcio. Esta etapa requiere contar con concentraciones locales normales de iones de calcio y fosfato, de lo contrario los osteoblastos pueden producir una gran cantidad de matriz orgánica en poco tiempo, retrasando la mineralización ^[1].
- f) **Reposo o Inactivación:** Los osteoblastos se transforman en células tapizantes o en osteocitos si permanecen atrapados en el hueso recién formado ^[6].

1.2 HUESO Y METABOLISMO MINERAL

El cuerpo humano contiene en promedio cerca de 1 kg de calcio, más del 99% del cual existe en el hueso y los dientes. En el hueso, el calcio existe en forma de hidroxiapatita $[\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2]$ ^[115]. Dado que la parte mineral del hueso está compuesta esencialmente de

hidroxiapatita, como ya se mencionó, sustancias externas tales como tetraciclinas, polifosfatos, y bifosfonatos pueden ser incorporados de la misma manera con alta afinidad ^[31]. El hueso presenta un importante papel en el metabolismo fosfo-cálcico, actuando como auténtico depósito de calcio. De la cantidad total de calcio contenida en el hueso podemos distinguir dos porciones: una porción inestable, donde se encuentra el calcio absorbido o fijado débilmente, es el calcio intercambiable, que suponemos menos del 1% y una porción estable ^[22].

La concentración de calcio en plasma es de cerca de 10 mg por 100 ml. Cerca del 40% de esta cantidad está enlazada a proteínas y 10% a iones, de modo que aproximadamente sólo la mitad está ionizada, por lo que se denomina calcio ionizado. El nivel de calcio ionizado, y por lo tanto, el calcio plasmático, se determina por la interacción de los tres órganos diana: intestino, hueso y riñón ^[31], los cuales regulan el mantenimiento de los mecanismos homeostáticos encargados de regular las concentraciones extracelulares de calcio y fósforo realizado por dos hormonas polipeptídicas: la hormona paratiroidea (PTH) y la calcitonina. Además, interviene una hormona esteroidea, la vitamina D, fundamentalmente con su metabolismo activo. La actividad de los osteocitos es controlada por la concentración de calcio del líquido extracelular, niveles elevados de calcio y la calcitonina inhiben la desmineralización, mientras que niveles bajos de calcio y la PTH la aumentan ^[22].

1.2.1 Homeostasis del calcio

La Tabla 1.1 muestra las principales hormonas y agentes humorales relacionados con la regulación del metabolismo del calcio, entre los que podemos destacar principalmente:

- ***PTH (Hormona paratiroidea)***: secretada por las glándulas paratiroideas, actúa en respuesta a la disminución del calcio iónico, por lo que se la considera una hormona hipercalcemiente. En un principio la respuesta es mediada por los osteoblastos que aumentan el paso de calcio del hueso al espacio extracelular, luego, si el estímulo es muy intenso se activan los osteoclastos segregando enzimas lisosómicas en el tejido óseo, disolviendo la matriz orgánica ^[12, 16, 75].

- **Calcitonina:** sintetizada en las células parafoliculares o células C de la tiroides, inhibe la liberación de calcio y fósforo. En el riñón ocasiona hipercalciuria o hipofosfaturia, y en el intestino disminuye la absorción de calcio, sin afectar la de fósforo [12, 16, 75].
- **Vitamina D:** El organismo recibe un doble aporte de vitamina D, la vitamina D2 ergocalciferol y vitamina D3 colecalciferol mediante la dieta. Esta vitamina favorece la absorción activa de calcio por el enterocito en el intestino, y en el hueso, su acción es similar a la PTH, remodelando hueso y favoreciendo el aporte de calcio, fósforo y aminoácidos al hueso en formación. Un exceso de vitamina D produce hipercalcemia [12, 16, 75].

Tabla 1.1. HORMONAS Y MARCADORES HUMORALES QUE INTERVIENEN EN LA REMODELACIÓN ÓSEA*

HORMONA	INTERVENCIÓN
Hormona Paratiroidea (PTH)	Estimula la resorción ósea
Calcitonina y h Tiroidea estimulante (TSH)	Inhiben la actividad de los osteoclastos. Disminución de la absorción de calcio en intestino
Vitamina D₃ (Colecalciferol)	Absorción de Calcio. Resorción Ósea
Estrógenos	Maduración del esqueleto. Retarda osteolisis
Glucocorticoides	Reducción del calcio plasmático
Osteoprotegerina (OPG)	Inhibe actividad y producción de osteoclastos

*Adaptado de [12, 16, 75]

Por otro lado, en el esquema de la Figura 1.5 se representa el estrecho equilibrio mantenido por la absorción intestinal, la eliminación renal y la movilización ósea, así como la acción de las hormonas antes mencionadas sobre estos procesos, para mantener la homeostasis del calcio. Así pues, de manera general podemos decir que la homeostasia del calcio se mantiene por el equilibrio entre la absorción neta de calcio y su excreción urinaria [12, 16, 41].

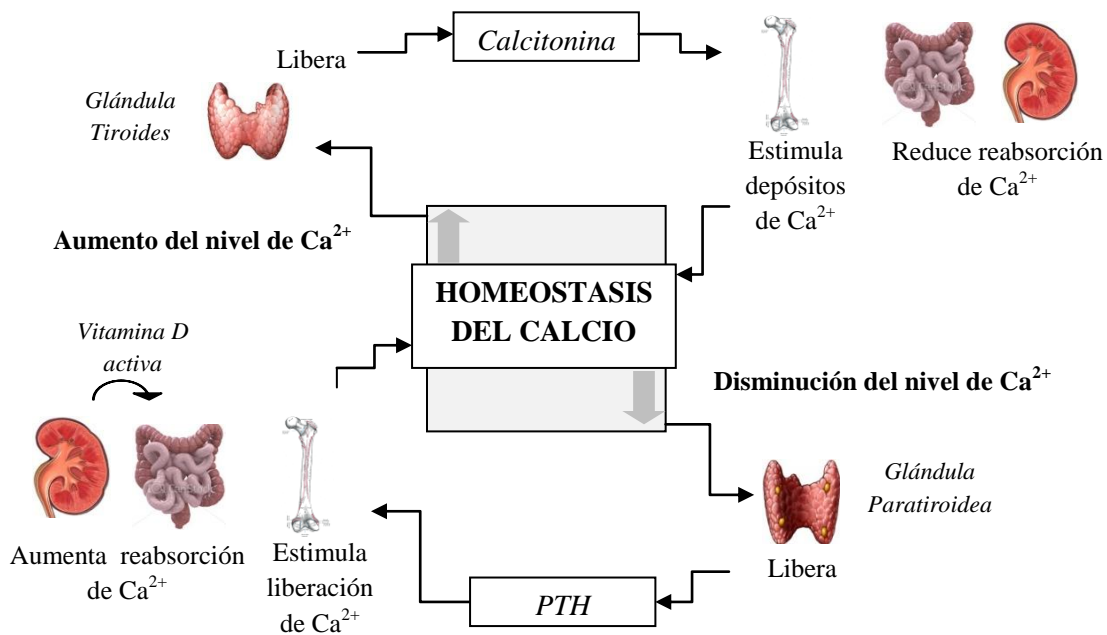


Figura 1.5. Homeostasis del calcio. *Adaptado de [12].*

1.2.2 Absorción del calcio

La absorción del calcio en el intestino es pequeña, porque muchos de los compuestos de calcio ingeridos con la dieta o formados por el propio intestino son insolubles, y porque es difícil la absorción de cationes divalentes en la mucosa intestinal. Del 70 al 80% del calcio de la dieta es excretado por las heces. La fuente más importante de calcio para el organismo es la consumida en la dieta, principalmente con los productos lácteos. En una dieta normal, se ingieren aproximadamente 1000 mg de calcio al día, mismo que se junta en el intestino con el procedente de las secreciones gastrointestinales, alrededor de 600 mg. De estos 1600 mg, en el intestino delgado se absorbe un 45% (700 mg) y el resto se elimina por las heces. Sólo durante periodos de mineralización esquelética acelerada (crecimiento, embarazo y lactancia) el calcio de la dieta es casi totalmente absorbido [12, 16, 41].

1.2.3 Excreción del calcio

Casi todo el calcio del filtrado glomerular se reabsorbe en el túbulo contorneado proximal y en la rama ascendente del asa de Henle. En el túbulo contorneado distal y el túbulo colector la

reabsorción de calcio es muy selectiva, estando bajo el control de la PTH, y por ende, en estrecha relación con la calcemia (niveles del calcio) ^[12, 16, 41]. De esta manera, el nivel de calcio en plasma dependerá de los flujos entre el fluido extracelular y consecuentemente la sangre, y estos tres órganos. Para el hueso, los roles desarrollados por la resorción de hueso y por el equilibrio en la superficie de los cristales de apatita aún se debaten. Dado que el 99% del calcio del cuerpo, se localiza en el esqueleto, este órgano actuará como reserva del ion. En caso de escasez de calcio, los mecanismos homeostáticos trabajarán en el detrimento del hueso (resorción) para mantener el calcio plasmático, el cual parece tener prioridad absoluta ^[31], ya que el calcio interviene en la conducción nerviosa, la contractilidad muscular, el mecanismo de secreción y acción de diversas hormonas y enzimas citosólicas, la permeabilidad de membranas, el proceso de coagulación de la sangre y la mineralización del hueso ^[37].

1.3 MATERIALES CERÁMICOS PARA SUSTITUCIÓN ÓSEA: FOSFATOS DE CALCIO

La formación de hueso, como ya se mencionó, involucra primero la formación del *osteoide* (matriz orgánica), proceso que los osteoblastos llevan a cabo mediante la síntesis y liberación de las fibras de colágeno, con la posterior mineralización del mismo por deposición de fosfato de calcio. Esta mineralización es un procedimiento controlado en el que en los pequeños espacios intersticiales vacíos encontrados entre el arreglo de fibras colágenas que forman el *osteoide*, se depositan nanocristales de apatita, involucrando más de 200 distintas proteínas ácidas. Estas proteínas actúan como inhibidores, nucleadores o patrones para el crecimiento epitaxial de los nanocristales, anclados al colágeno ^[108]. Los componentes inorgánicos del hueso son los principales responsables de conferirle rigidez y resistencia a la compresión, mientras que la parte orgánica lo provee de las correspondientes propiedades de tensión ^[24].

Así pues, la fase mineral de los huesos y los dientes es un fosfato de calcio básico, semejante, mas no idéntico, a la hidroxiapatita sintética [HA, Ca₁₀(PO₄)₆(OH)₂]. Sin embargo, las apatitas biológicas difieren de la HA estequiométrica en varios aspectos tales como menores dimensiones cristalinas y baja cristalinidad ^[9]. Los fosfatos de calcio presentes en tejidos biológicos, comúnmente en calcificaciones patológicas, incluyen Fosfato de Calcio Amorfo

(ACP), Fosfato Dicálcico Dihidratado (DCPD), Fosfato Octacálcico (OCP) y β -Fosfato Tricálcico sustituido con Mg (β -TCMP) ^[9], como se puede observar en la Tabla 1.2.

Tabla 1.2. FOSFATOS DE CALCIO BIOLÓGICAMENTE RELEVANTES**

Acrónimo	Fórmula	Nombre	Relación Ca/P	Presencia en tejidos biológicos
HA	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$	Hidroxiapatita	1.67	Hueso, dentina, calcificaciones del esmalte dental, piedras urinarias, placas arteroscleróticas
β -TCP	$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	β -Fosfato Tricálcico (whitlockita)	1.5	Cálculo dental y urinario, depósitos de tejido blando, cartílago artrítico, presente comúnmente como β -TCMP
OCP	$\text{Ca}_8\text{H}_2(\text{PO}_4)_5 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	Fosfato Octacálcico	1.33	Cálculo dental y urinario
ACP	$\text{Ca}_x(\text{PO}_4)_y \cdot n\text{H}_2\text{O}$	Fosfato de Calcio Amorfo	1.2-2.2	Calcificaciones de tejido blando
DCPD	$\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	Fosfato de Dicálcico Dihidratado (brushita)	1.0	Cálculo dental, piedras urinarias, condrocalcinosis

** Adaptado de [9]

Está claro que el índice de la regeneración ósea depende de varios factores, tales como la porosidad, composición, solubilidad y presencia de ciertos elementos que, liberados durante la resorción del material cerámico, facilitan la regeneración ósea llevada a cabo por los osteoblastos ^[108], así, debido a su similitud con las fases inorgánicas de los tejidos mineralizados, los fosfatos de calcio presentan una excelente biocompatibilidad y bioactividad, lo que justifica su creciente

utilización en el desarrollo de biomateriales para sustitución y reparación de tejido óseo ^[9]. Entre todos los fosfatos de calcio disponibles, o de formulación potencial, es importante conocer la relación Ca/P, así como su acidez y solubilidad, ya que, mientras menor sea la relación Ca/P, mayores son la acidez y solubilidad de la mezcla ^[102], de este modo se puede predecir su tasa de degradación, hecho que es muy relevante puesto que si ésta es muy rápida, puede comprometer la estabilidad (del fosfato) y aumentar la concentración de iones fosfato (PO_4^{3-}) y calcio (Ca^{2+}) extracelular y puede producir muerte celular ^[29]. La reabsorción o biodegradación de las cerámicas de fosfatos de calcio puede presentarse por didisolución físico-química, relacionada estrechamente con el tipo de material y el pH del medio, por desintegración física en forma de pequeñas partículas a causa de un ataque químico y también se ven influidas por factores biológicos, es decir, por el tipo de células que rodeen el sitio donde se implante la cerámica, su localización, la edad, el sexo y las concentraciones hormonales. Entre las variables relacionadas con el aumento de la tasa de biodegradación se incluyen el incremento del área superficial, la disminución de la cristalinidad y la homogeneidad de los cristales, la disminución del tamaño de grano y las sustituciones iónicas; por otro lado, la presencia de fluoruro en la hidroxiapatita y la presencia de Mg^{2+} en el fosfato tricálcico se pueden considerar factores que disminuyen la biodegradación de la cerámica ^[64, 96].

A continuación se describirán aspectos generales acerca de los dos primeros fosfatos presentados en la Tabla 1.2, principales fosfatos utilizados en el campo de los biomateriales.

1.3.1 Hidroxiapatita, (HA)

Entre los fosfatos de calcio, la HA [$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$] cuenta con las propiedades de mayor estabilidad, mayor densidad y mayor insolubilidad, y desde el punto de vista químico y estructural es el material con mayor similitud (aunque no idéntico) al componente mineral de huesos y dientes ^[9], por lo que ha sido objeto de estudio y utilizado como biomaterial en aplicaciones clínicas desde 1981. Esta cerámica en su forma densa es casi inerte y se puede presentar en dos formas cristalinas: monoclinica y hexagonal, siendo la forma hexagonal de interés práctico pues la forma monoclinica no es estable bajo presencia de pequeñas cantidades de iones externos. En la práctica, se comporta fundamentalmente como un material osteoconductor y osteofílico, lo que significa que actúa como un almacén aprovechado por el

tejido huésped para la inserción de células y vasos y para el depósito de hueso neoformado. Asimismo, no presenta características osteogénicas, es decir, que propicie la migración de osteoblastos y preosteoblastos, sin embargo, algunos estudios sugieren que determinadas geometrías podrían aportar capacidad osteoinductiva, esto es, cuando el contacto del material cerámico con células no óseas provoca la transformación de éstas en precursores óseos, característica que presentan materiales como la matriz de hueso mineralizado o las proteínas morfogenéticas óseas [9, 64, 96].

Se han reportado diversos métodos de síntesis, sin embargo, la precipitación acuosa es el más utilizado, haciendo reaccionar una sal de calcio y un fosfato alcalino o bien un hidróxido o un carbonato de calcio y ácido fosfórico, teniendo especial cuidado en el ambiente en que se desarrolla esta reacción, pues se requiere mantener un pH básico (>9) durante la precipitación. Se producen de este modo buenos productos cristalinos a una temperatura de 100 °C, la disminución de esta temperatura deriva en un descenso de la cristalinidad de la hidroxiapatita resultante, otro factor a considerar es el tiempo de reacción, dado que un tiempo corto produce nanocristales o productos amorfos, mientras que el tamaño del cristal y la cristalinidad aumentan con el tiempo de reacción [9, 64].

1.3.2 β -Fosfato tricálcico, (β -TCP)

Los fosfatos de calcio con composición $[\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2]$ existen en diversas fases dependiendo de la temperatura y de la presión parcial del agua, las dos fases más conocidas del fosfato tricálcico son: a) α -TCP [α - $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$], fase estable a altas temperaturas (entre 1120 y 1470 °C), exhibiendo una estructura monoclinica y b) β -TCP [β - $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$] la cual es estable a temperaturas menores a 1120 °C, y posee una estructura hexagonal [9, 46, 48].

Se han reportado varios métodos de síntesis de β -TCP, entre los que destacan la precipitación acuosa mediante la cual se pueden obtener nanopulvos estables y de alta pureza [49, 68, 113], la síntesis por la técnica de mezcla líquida con la que se logran compuestos bifásicos estables de β -TCP e hidroxiapatita [78], la síntesis por sol-gel por medio de la que se pueden conseguir compuestos estables y bioactivos sustituidos con Sr [83], y la síntesis hidrotermal que permite sintetizar de manera rápida y directa β -TCP sustituida con Magnesio [18, 54].

El β -TCP se puede encontrar en tejidos biológicos como piedras en glándulas salivales, o cálculos dentales, considerándose biocompatible, por lo que ha sido gran objeto de estudio y en la actualidad se utiliza en una amplia variedad de aplicaciones protésicas dentales y óseas ^[106, 113]. Esta cerámica no es uno de los componentes naturales del hueso, como la hidroxiapatita (muy similar a la fase inorgánica del tejido óseo) sin embargo, posee la característica de ser más soluble en los fluidos corporales, relación Ca/P menor que la de la hidroxiapatita (ver Tabla 1.2), por lo que su reabsorción es entre 10 a 20 veces más rápida, de modo que el β -TCP muestra una liberación rápida de iones Ca^{2+} y PO_4^{3-} cuando se lo expone a los fluidos fisiológicos ^[51, 93, 96].

1.3.3 β -Fosfato tricálcico con magnesio (β -TCMP)

El β -TCP es uno de los biomateriales más importantes basados en fosfatos. Actualmente se sabe que estimula significativamente la estructura mineral del hueso. Es una cerámica altamente biocompatible y reabsorbible en el tejido óseo ^[59, 68]. Sin embargo, el β -TCP es inestable y mucho más soluble en agua comparado con la hidroxiapatita, por lo que muchas investigaciones señalan que puede degradarse al implantarlo en el huésped. Asimismo, es sabido que se transforma en hidroxiapatita en presencia de agua, por lo que esta inestabilidad hidrolítica hace muy difícil estudiar su interacción con varios tipos de células ^[55, 93]. Sin embargo, sustituyendo magnesio en la red de β -TCP, la estructura se puede estabilizar. La fase se vuelve más resistente a la disolución, a la hidrólisis y a su transformación en hidroxiapatita en presencia de agua bajo condiciones fisiológicas ^[55, 61]. Además, con el magnesio el β -TCP se logra sintetizar bajo condiciones acuosas normales, aunque la solubilidad del compuesto disminuya conforme aumenta el contenido de magnesio ^[55]. En el organismo, el Mg estimula directamente la proliferación de osteoblastos y una disminución de Mg provoca una inhibición en el crecimiento celular debido a la reducción resultante en ADN, ARN y síntesis de proteínas. Asimismo, una disminución en el contenido de Mg en hueso y una alta cristalinidad se relacionan con la osteoporosis senil. Estos efectos adversos asociados a la deficiencia de Mg pueden acarrear crecimiento y mineralización desigual de hueso, reducir la calidad del hueso, su dureza y densidad, así como aumentar su fragilidad, además se ha propuesto que la deficiencia de Mg es un factor de riesgo potencial de osteoporosis ^[59].

1.4 OSTEOPOROSIS

La osteoporosis se define como un trastorno esquelético sistémico, metabólico y multifactorial, caracterizado por una masa ósea baja (menor que la mecánicamente apropiada) y por un deterioro de la microarquitectura del tejido óseo (detrimento de la conectividad y forma trabecular), con el consecuente incremento de la fragilidad ósea. La susceptibilidad a las fracturas se vuelve mayor. Son fracturas que aunque pueden presentarse en cualquier estructura ósea, principalmente se localizan en el antebrazo distal, los cuerpos vertebrales, la zona proximal del húmero y el cuello del fémur [12, 17, 37, 39, 70]. Dada la reducción de la parte mineral del hueso radiológicamente en esta patología, aumenta la translucidez (ver Figura 1.6); así, la densitometría ósea, que mide la mineralización en el hueso, revela la disminución de este parámetro. Recientemente la OMS (*Organización Mundial de la Salud*) ha redefinido la osteoporosis en términos de los valores de masa ósea medidos por medio de densitometría ósea tipo DEXA (por las siglas en inglés para *Dual-energy X-ray Absorptiometry*, Densitometría por Absorción con doble haz de rayos X). Así se ha conseguido estimar la frecuencia de la osteoporosis y proponer la siguiente categorización [2, 5, 112]:

- Osteopenia: Masa ósea ubicada entre 1 y 2.5 DE (desviaciones estándar) por debajo de la media correspondiente al adulto joven de 30 años (máximo de masa ósea) [5].
- Osteoporosis: Los valores de masa ósea se localizan por debajo de las 2.5 DE de masa juvenil [5].
- Osteoporosis grave o complicada: Acompañada de una o más fracturas [5].

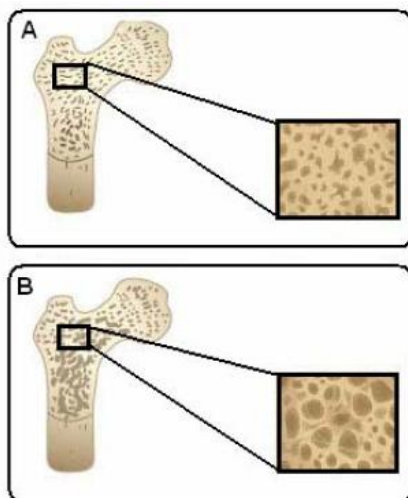


Figura 1.6. Ilustración de la osteoporosis en cabeza de fémur. **A.** Cabeza de fémur normal. **B.** Cabeza de fémur con diagnóstico de osteoporosis [94].

1.4.1 Clasificación y Factores de Riesgo

La Tabla 1.3 muestra una clasificación de la osteoporosis, siendo la primaria y la secundaria los tipos más comunes en la práctica clínica ^[112]. A pesar de la etiología para cada tipo de osteoporosis, cualquier mecanismo de pérdida de mineralización ósea está asociado en esta enfermedad; asimismo, existen factores, tanto preventivos como promotores de riesgo, como los que se mencionan a continuación ^[5, 12]:

Factores de riesgo demostrados ^[5]

Envejecimiento

Baja masa ósea

Menopausia precoz

Años de menopausia

Historia de fractura previas, (cadera particularmente)

Tabaco

Alcohol

Absorción intestinal de calcio disminuida

Alta eliminación urinaria de calcio

Bajo peso corporal

Historial familiar de fracturas

Baja exposición al sol

Poco ejercicio físico

Ciertas medicaciones (corticoesteroides, heparina)

Factores protectores contra la pérdida de masa ósea y/o fracturas ^[5]

Incremento de índice de masa corporal

Terapia hormonal sustitutiva desde la menopausia.

Tabla 1.3. CLASIFICACIÓN DE LOS TIPOS DE OSTEOPOROSIS ***

<i>Tipo</i>	<i>Osteoporosis</i>	<i>Características</i>	
I	Primaria	Postmenopáusica	Pérdida de masa ósea, debida a una resorción ósea elevada durante el periodo posmenopáusico.
II		Involuntaria o senil	Pérdida paulatina de masa ósea, debida a una sustitución ósea baja producida durante el envejecimiento.
III	Secundaria	Producida como consecuencia de una enfermedad o condición preexistente, p. ej. asociada con hipertiroidismo, inmovilización prolongada, etc.	
IV	Idiopática juvenil y del adulto joven	“Baja densidad ósea para la edad cronológica del individuo”. Infrecuente, transitoria con tendencia a la remisión espontánea. Fracturas frecuentes en zonas metafisarias y de columna vertebral. Causas frecuentes: enfermedades genéticas y hereditarias, patologías endócrinas, inmovilización, enfermedades nutricionales, y utilización de fármacos como corticoesteroides, heparina, entre otros.	
V	Localizada	Pérdida de masa ósea confinada a una parte específica del esqueleto. Asociada generalmente con la inmovilización de un miembro resultado de una fractura, inflamación o una parálisis muscular (Atrofia de Sudeck).	

*** Adaptado de [2, 12, 104, 112].

1.4.2 Diagnóstico y valoración

En general la Osteoporosis es asintomática, por lo que suele definirse como “la enfermedad silenciosa”. En ocasiones puede presentarse como una raquialgia insidiosa (dolor en la columna vertebral), progresiva, crónica, que aumenta con los esfuerzos y se calma con el reposo. Cuando se complica con la fractura, el dolor se presenta en forma brusca y espontánea o frente a un esfuerzo o traumatismo mínimo ^[19].

En su diagnóstico y valoración se relacionan distintos procedimientos:

- Anamnesis: que incluya edad, sexo, raza, hábitos alimenticios y de actividad física, enfermedades previas y antecedentes familiares ^[37].

- Exploración física: valorando dolor óseo (agudo y crónico), deformidades (cifosis, disminución de talla) y fracturas, estado de la piel (en los pacientes osteoporóticos con frecuencia se observa una piel fina y transparente, hipopigmentada e inelástica), determinación de talla, peso y envergadura (distancia entre las puntas de los dedos, con los brazos en cruz) ^[37]. (Ver Figura 1.7).

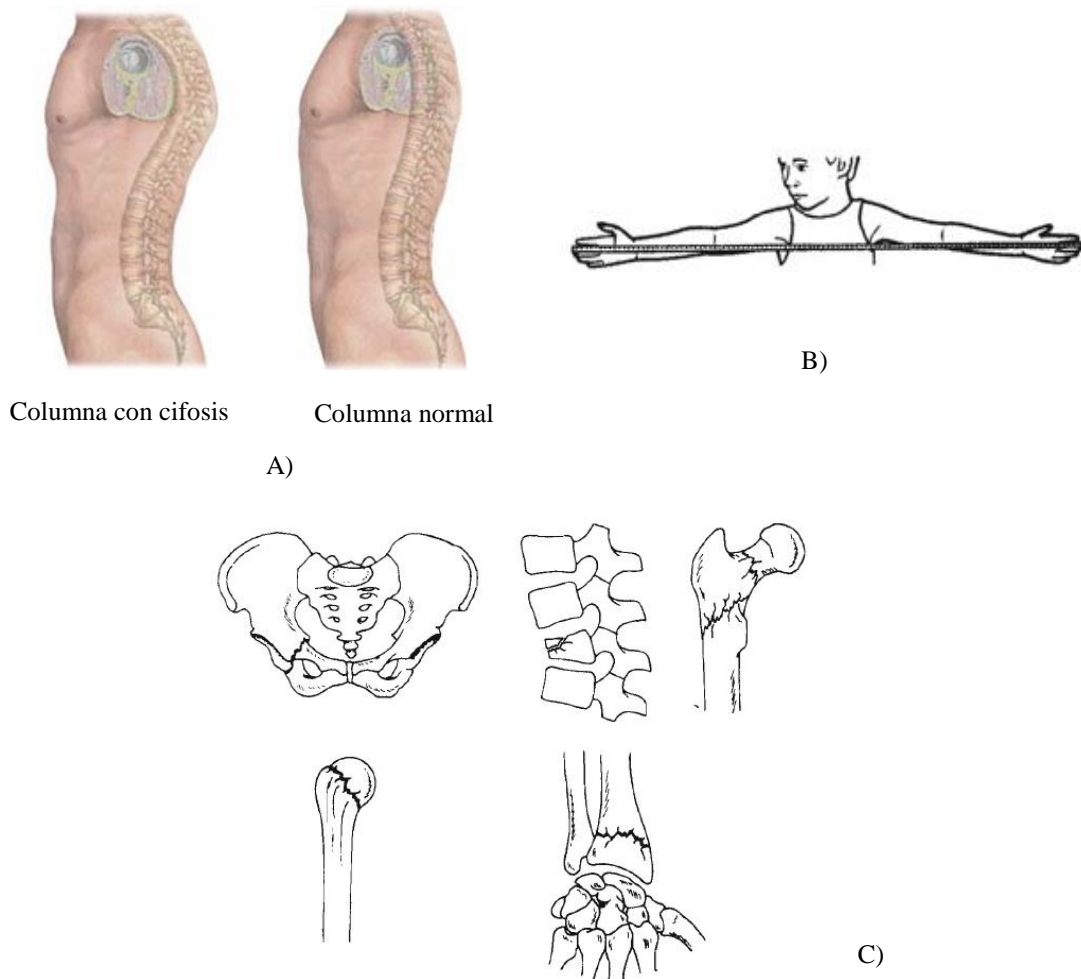


Figura 1.7. Algunos de los factores a valorar en la exploración física. A) Comparación entre una columna normal y una con cifosis. *Adaptado de [43]*, B) Medición de la envergadura en un infante, C) Ilustración de las fracturas más comunes en la osteoporosis (en la zona pélvica, en los cuerpos vertebrales, en el cuello del fémur, en la zona proximal del húmero, en el antebrazo distal) *Adaptado de [101]*.

- Actividad Sérica: con determinaciones de calcio, fósforo, fosfatasa alcalina total (indicador de formación de hueso, actividad osteoblástica), fosfatasa ácida (indicador de

resorción ósea, actividad osteoblástica), y PTH. Actualmente también se han desarrollado nuevos marcadores bioquímicos de formación ósea, como la determinación de osteocalcina, isoenzima de la fosfatasa alcalina, propéptido carboxitermial del procolágeno tipo I, entre otros ^[12, 37].

- Biopsia Ósea: Estudio histológico de biopsia ósea tranilíaca (que incluya hueso cortical y trabecular) para evaluar las alteraciones del recambio óseo ^[37].
- Estudios radiológicos: entre los que se incluyen la radiología convencional (debe tomarse en cuenta que hace falta una pérdida del 30% del calcio óseo para que se pueda identificar la osteopenia con esta técnica), tomografía axial computarizada TAC (capaz de evaluar la masa trabecular y cortical por separado, propiedades geométricas y densidad mineral del hueso, entre otros), y microresonancia magnética (μ RM) y microtomografía computarizada (μ TC), con los que ha sido posible un análisis tridimensional de la arquitectura ósea y su relación con la fuerza del hueso ^[12, 37, 39, 103].
- Densitometría ósea: Técnica de diagnóstico esencial en la valoración de esta enfermedad, basada en el uso de rayos X, aunque también se utilicen los ultrasonidos. Puede ser de cuerpo entero (Densitometría por Absorción con doble haz de rayos X, DEXA) o de regiones específicas (fotodensitometría radiográfica, ultrasonidos QUS, TAC para columna y antebrazo) ^[37, 39, 103].

1.4.3 Tratamiento

Aunque no existe una terapia individual óptima para el manejo de la osteoporosis, el tratamiento se centra en inhibir la resorción ósea o estimular la formación ósea. Las opciones de tratamiento farmacológico de primera línea aprobadas por la FDA (*Food and Drug Administration*), seguras y efectivas para el tratamiento de la osteoporosis son bifosfonatos (alendronato, risendronato), raloxifeno, calcitonina y hormona paratiroidea. Un aporte suficiente de calcio y vitamina D administrados juntos, a través de la dieta o de suplementos, es esencial para la prevención de la osteoporosis. El aporte de 1000 mg de calcio en la dieta permite una reducción de fractura de cadera de 24%. La suplementación con calcio (1000 mg/d) y Vitamina D3 (800 UI/d) debe indicarse aunado con el tratamiento farmacológico ^[37, 39].

1.5 ENCAPSULAMIENTO DE AGENTES TERAPÉUTICOS CON VECTORES DE ÁCIDO POLILÁCTICO-CO-GLICÓLICO, (PLGA)

Los polímeros se han utilizado ampliamente como biomateriales para la fabricación de dispositivos médicos, así como de materiales tridimensionales (*andamios*) y bidimensionales (películas) para la ingeniería de tejidos ^[98]. Del mismo modo, se han desarrollado varios sistemas de liberación controlada a partir de polímeros biodegradables utilizados como portadores para la liberación de agentes farmacéuticos de una amplia variedad, incluyendo antibióticos, fármacos anticancerígenos, esteroides, péptidos, proteínas y muchos otros agentes terapéuticos ^[25].

El ácido poliglicólico es un polímero biocompatible cristalino de alto peso molecular que se hidroliza lentamente en agua, dando como resultado moléculas de ácido glicólico que se convierten por acción enzimática en glicina, misma que participa en la síntesis proteica o de serina y que transformada en piruvato se incorpora al ciclo de Krebs. En este polímero destaca su resistencia a la flexión y a la torsión, y con él se confeccionó la primera sutura reabsorbible aprobada para su uso en la clínica, y se han elaborado implantes para el tratamiento de fracturas. Por otro lado, el ácido poliláctico también ha sido utilizado en el campo de los biomateriales como material de sutura, este polímero se transforma por desesterificación hidrolítica en ácido láctico, que también se incorpora al ciclo de Krebs y se excreta como CO₂ a nivel pulmonar. Los implantes de ácido poliláctico son menos rígidos que los de ácido poliglicólico, pero su período de degradación es más prolongado ^[96]. Se han elaborado copolímeros de estos ácidos con el objetivo de combinar y mejorar las propiedades mecánicas y el tiempo de degradación ^[96], obteniendo copolímeros PLGA (ácido poliláctico-co-glicólico), cuya estructura química se puede apreciar en la Figura 1.8.

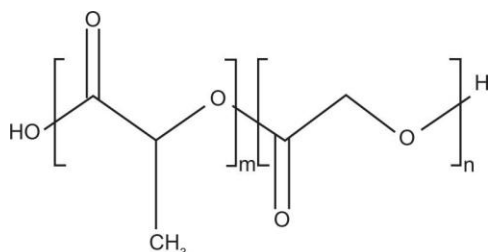


Figura 1.8. Estructura química del ácido poliláctico-co-glicólico ^[116].

El grado de cristalinidad y el punto de fusión de los polímeros están directamente relacionados con su peso molecular. De este modo, la fuerza mecánica, el comportamiento de

hinchado, la capacidad para soportar la hidrólisis, y subsecuentemente, la tasa de biodegradación, están directamente influenciadas por la cristalinidad del copolímero PLGA, misma que depende del tipo y de la estequiometría de los componentes monómeros individuales (láctida y glicolida) de la cadena polimérica. Así, los polímeros PLGA con una relación molar 50:50 de ácido láctico y glicólico respectivamente se hidrolizan mucho más rápido que aquellos que contienen una mayor proporción de cualquiera de los dos monómeros ^[45, 116].

1.5.1 ¿Por qué utilizar un sistema PLGA?

Actualmente el PLGA ha despertado un gran interés debido a su excelente biocompatibilidad, biodegradabilidad y fuerza mecánica, dado que con el PLGA es fácil desarrollar sistemas de liberación para transportar una gran variedad de agentes activos, como vacunas, péptidos, proteínas y micromoléculas, algunos de los cuales están aprobados por la FDA (*Food and Drug Administration*) para su uso en administración de fármacos ^[23]. La importancia y relevancia de la utilización del PLGA como método de liberación (mediante la formación de nanopartículas y microesferas usualmente) radica de manera primordial en los siguientes aspectos:

- La liberación se produce por degradación hidrolítica, y los productos de biodegradación (vía segmentación hidrolítica del enlace éster entre ácido láctico y glicólico, ver Figura 1.9) se forman a una velocidad muy lenta, y por lo tanto, no afecta las funciones celulares normales. Además estos monómeros se metabolizan fácilmente en el cuerpo vía ciclo de Krebs y se eliminan como dióxido de carbono y agua ^[45, 77, 116].

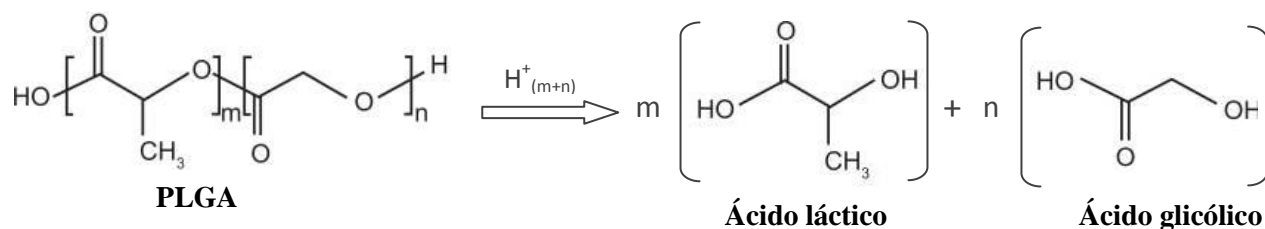


Figura 1.9. Degradación del ácido poliláctico-co-glicólico en ácido láctico y ácido glicólico. Adaptado de ^[116].

- Al encapsularlo en PLGA, el agente terapéutico se dispersa por toda la matriz polimérica, permitiendo una liberación uniforme en el medio ^[116].

- c) El principio activo envuelto en la matriz de PLGA se libera de manera constante mediante, la degradación de la matriz. Esta degradación puede controlarse de acuerdo con la composición del copolímero y su peso molecular, pudiendo modificar los tiempos de liberación de acuerdo con las necesidades ^[45, 53, 77].

1.5.2 Elaboración de partículas de PLGA

Las partículas de PLGA generalmente se elaboran por la técnica de evaporación de disolvente emulsificado (*emulsion solvent evaporation*) o por técnicas de desplazamiento (*solvent displacement*). Al elegir un método de elaboración de las partículas es importante considerar que la estabilidad y la actividad biológicas del principio no se deben ver afectadas durante el encapsulamiento, igualmente, la calidad de las partículas y su eficiencia de liberación deben ser reproducibles ^[45, 77]. Asimismo, hay que tomar en cuenta las propiedades fisicoquímicas del principio activo a incorporarse ya que afectan significativamente el resultado de los patrones de liberación de las partículas resultantes, además las interacciones atractivas principio activo-polímero pueden reducir las velocidades de liberación ^[77].

1.5.3 Efectos del pH en la degradación del sistema PLGA

Dado que la degradación de las partículas de PLGA se efectúa de adentro hacia afuera, se han llevado a cabo investigaciones sobre el pH dentro de las partículas, mediante microscopía confocal utilizando tinciones fluorescentes sensibles al pH, potenciometría, resonancia magnética nuclear, entre otros métodos. Los valores reportados oscilan en el rango de 1.5 a 6.4, hecho que se atribuye a las diferencias en las formulaciones de las micropartículas de PLGA investigadas ^[116]. De modo que el medio en el cual se desarrolla la liberación influirá notablemente en la velocidad a la que se lleve a cabo ésta. De acuerdo con Banu S. Zolnik *et al.*, (2007) se pueden utilizar condiciones ácidas para acelerar la liberación desde las microesferas de PLGA. Los datos demuestran que la morfología de las microesferas durante la degradación a pH ácido es considerablemente diferente comparada con la exhibida a un pH de 7.4, mostrándose más frágiles y erosionadas en pH ácido. Por otro lado, algunos autores como K. Makino *et al.*, (1986), utilizan un pH alcalino para optimizar la degradación de las microesferas de PLGA, aunque los cambios morfológicos antes mencionados no se presenten en pH alcalino ^[116].

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

HIPÓTESIS

El fosfato tricálcico con magnesio (β -TCMP) encapsulado en ácido poliláctico-co-glicólico (PLGA) funciona como sistema de transporte de calcio hasta el intestino donde se absorbe, ayudando en el tratamiento de la osteoporosis.

OBJETIVOS

Objetivo General

Obtención de un sistema de ingestión para el compuesto β -Fosfato Tricálcico con Magnesio (β -TCMP), encapsulado en polilactida-co-glicolida (PLGA).

Objetivos Particulares

- Formar películas de biopolímero estables termomecánicamente.
- Encapsular el compuesto β -TCMP en las películas elaboradas, construyendo un medio de distribución del fosfato hasta su sitio de absorción en el intestino delgado.
- Determinar si la concentración del fosfato es la adecuada para que se mantengan estables mecánicamente las películas.
- Determinar las propiedades de textura de las películas mediante pruebas de tensión.
- Comprobar si hay encapsulamiento y liberación del fosfato de calcio de las películas, en un fluido biológico simulado.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 MATERIALES

3.1.1 Reactivos

- Ácido poliláctico-co-glicólico [Poli (D,L lactida-co-glicolida)], relación lactida-glicolida 50:50 (PLGA, Sigma-Aldrich, 50:50 peso molecular de 40, 000-75, 000)
- Ácido poliláctico-co-glicólico [Poli (D,L lactida-co-glicolida)], relación lactida-glicolida 75:25 (PLGA, Sigma-Aldrich, 75:25 peso molecular de 66, 000-107, 000)
- Goma Xantana (Droguería Cosmopolita S. A. de C. V). Ver Apéndice 3.
- κ - Carragenina (Fluka BioChemika). Ver Apéndice 3.
- β -Fosfato tricálcico con magnesio (β -TCMP). Se utilizó β -TCMP, fosfato tricálcico con magnesio, β -(Ca_{1.5}Mg_{1.5})(PO₄)₂, obtenido mediante síntesis hidrotermal ^[54]. Y para comparar el efecto de la sustitución en las películas (Apéndice 5), se utilizó también β -TCP sintetizado mediante la técnica de sol-gel asistida por ultrasonido (Apéndice 2).
- Etanol 99%
- Acetona
- Agua destilada

3.1.2 Equipo

- Homogeneizador Ultraturrax (IKA® T18 basic, de 6,000-24,000 rpm)
- Zetasizer, Nano Zs (Malvern Instruments)
- Baño Ultrasónico (Cole-Parner® 8890)
- Liofilizadora (Labconco, Triad™)
- Baño agitador (Heto® MaxiShaker)
- Multitest 1i (Mecmesin®)
- Espectrómetro de Fibra Óptica S2000, Ocean Optics, Inc.
- Equipo TGA, SDT Q600 de TA Instruments.

3.2 MÉTODOS EXPERIMENTALES

3.2.1 Elaboración de las Películas

Para la formación de las películas se combinaron y adaptaron dos de los métodos de obtención de partículas de PLGA más efectivos y usados actualmente: Evaporación de disolvente emulsificado (*Emulsion Solvent Evaporation*) [76, 107] y Vaciado de Disolvente (*Solvent Casting*) [56, 74]; el primer procedimiento se utiliza principalmente en la microencapsulación de fármacos con PLGA y el segundo se suele emplear recientemente en la elaboración de estructuras que funcionen como andamios con fosfatos de calcio para la reparación de cartílago y de hueso en ingeniería de tejidos.

Dado que el Fosfato Tricálcico y el Fosfato Tricálcico con Magnesio (whitlockita) no son solubles en agua, acetona u otro disolvente utilizado en la disolución del PLGA, se utiliza la goma Xantana como medio para poder suspender la whitlockita. Por otro lado, la κ -Carragenina brinda la forma a la película, formando un medio en el cual se dispersa la suspensión de whitlockita.

El procedimiento llevado a cabo se describe en los párrafos siguientes, y se esquematiza en la Figura 3.4. Primero se disuelve el PLGA en acetona; al mismo tiempo, se disuelven en agua destilada la goma Xantana y separadamente se disuelve la κ -Carragenina, ambos procesos a una temperatura de 35 °C y agitación a 250 rpm. Esto, dado que el Fosfato Tricálcico y el Fosfato Tricálcico sustituido con Magnesio (whitlockita) no son solubles en agua, acetona u otro disolvente utilizado en la disolución del PLGA, la goma Xantana actuará como medio para poder suspender la whitlockita, mientras que la κ -Carragenina brindará la forma a la película, y proporcionará un medio en el cual dispersar la suspensión de whitlockita. Ambas gomas se utilizan en una concentración de 0.25% del volumen la disolución final. Cuando se encuentra disuelta la Xantana, se disminuye la velocidad de agitación y se agrega la proporción deseada de whitlockita, aumentando la velocidad de agitación lentamente permitiendo una incorporación y dispersión completa del fosfato en la goma Xantana. Se trabajaron concentraciones de whitlockita de 0.5, 1 y 2% (p/v). Una vez que se observa la whitlockita completamente dispersa en la goma Xantana, se disminuye nuevamente la velocidad de agitación y se agrega la disolución de κ -

Carragenina, aumentando gradualmente la velocidad de agitación permitiendo de este modo una incorporación homogénea de ambas disoluciones.

Después de haber obtenido una mezcla uniforme de ambas gomas disueltas y la whitlockita, se agrega el PLGA completamente disuelto en acetona, y esta disolución se emulsifica mediante el homogeneizador Ultraturax® durante 5 minutos a 13,000 rpm, como se muestra en la Figura 3.1. Posteriormente, esta emulsión se somete a sonicación, para eliminar el disolvente (acetona), durante 20 minutos.

Una vez sonicada, la emulsión se vierte en contenedores planos y antiadherentes (Figura 3.2), y se coloca a la intemperie durante 20 minutos aproximadamente para continuar la eliminación del disolvente. Finalmente se liofiliza a $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 20 horas (Figura 3.3).



Figura 3.1. Emulsificación de la mezcla.

Las películas secas se retiran de los contenedores y se almacenan en refrigeración.



Figura 3.2. Vertido de la emulsión.



Figura 3.3. Liofilización.

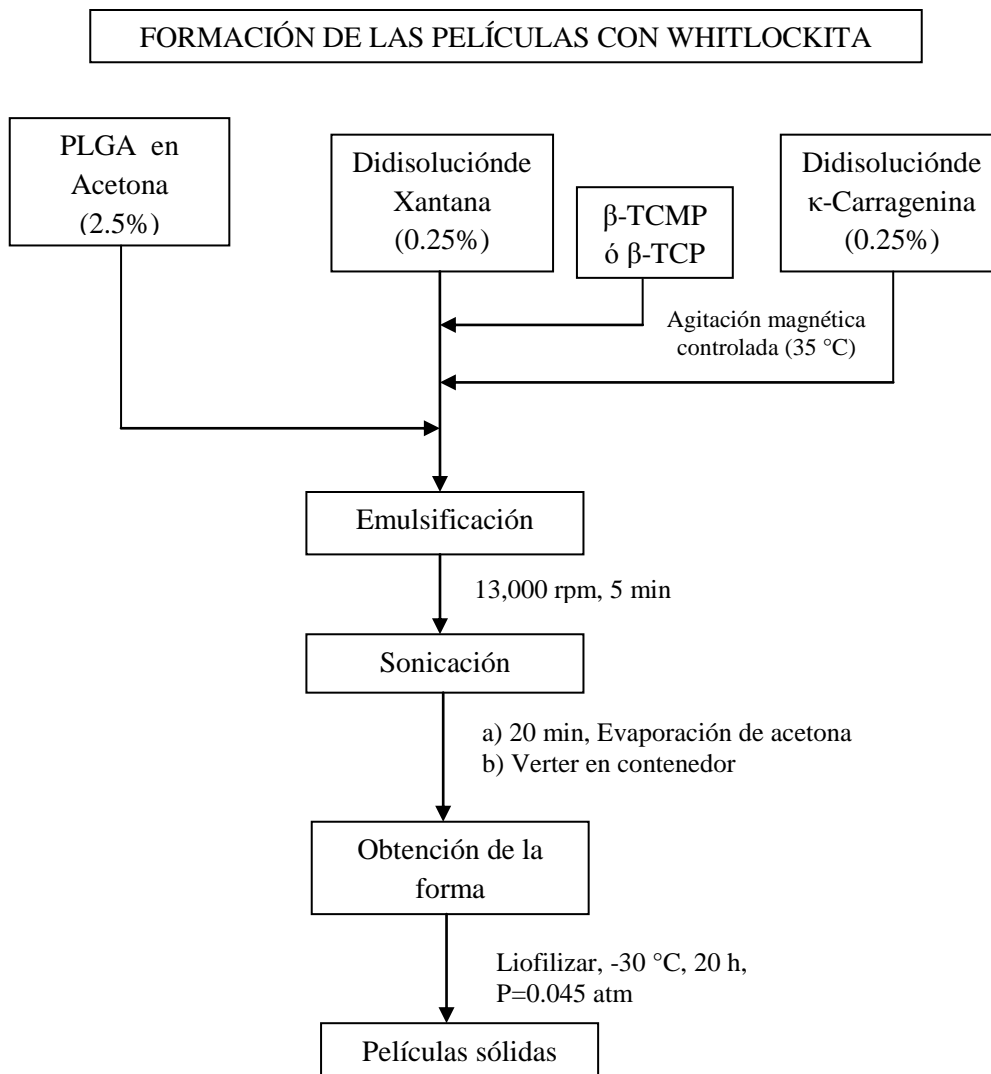


Figura 3.4. Esquema del proceso de formación de las películas.

Las películas a elaborar se etiquetaron cómo se muestra en la Tabla 3.1 para su identificación, de acuerdo con su contenido nominal de polímeros y/o fosfatos. Una vez determinada la concentración de Xantana y Carragenina (Apéndice 4), se variaron las concentraciones de fosfato y la relación lactida:glicolida del PLGA. Las primeras tres constituyen las películas referencia (o control), y con ellas se comparan los efectos de la adición de las distintas concentraciones de fosfato. (Los efectos sobre las películas con fosfato tricálcico sin magnesio se presentan en el Apéndice 5).

Tabla 3.1. NOMENCLATURA DE LAS PELÍCULAS ELABORADAS DE ACUERDO CON SU CONTENIDO DE POLÍMERO Y FOSFATO

Película	Contenido (porcentaje de la disolución vertida)					
	Xantana	Carragenina	PLGA		β -TCP	β -TCMP
			50:50	75:25		
XanCarr	0.25%	0.25%	-	-	-	-
XanCarrPLGA50:50	0.25%	0.25%	2.5%	-	-	-
XanCarrPLGA75:25	0.25%	0.25%	-	2.5%	-	-
XanCarrPLGA50:50BTCP0.5	0.25%	0.25%	2.5%	-	0.5%	-
XanCarrPLGA75:25BTCP0.5	0.25%	0.25%	-	2.5%	0.5%	-
XanCarrPLGA50:50BTCMP0.5	0.25%	0.25%	2.5%	-	-	0.5%
XanCarrPLGA75:25BTCMP0.5	0.25%	0.25%	-	2.5%	-	0.5%
XanCarrPLGA50:50BTCMP1	0.25%	0.25%	2.5%	-	-	1%
XanCarrPLGA75:25BTCMP1	0.25%	0.25%	-	2.5%	-	1%
XanCarrPLGA50:50BTCMP2	0.25%	0.25%	2.5%	-	-	2%
XanCarrPLGA75:25BTCMP2	0.25%	0.25%	-	2.5%	-	2%

3.2.2 CARACTERIZACIÓN DE LAS PELÍCULAS

1. Caracterización por Potencial Zeta

Se midieron los potenciales zeta de las películas utilizando un equipo Zetasizer Nano Zs (Malvern Instruments), empleando como dispersante agua destilada. Las películas fueron disueltas en agua destilada desionizada en una concentración de 1 mg/mL, a 30 °C. Una vez disuelta la película, se colocó dentro de la celda correspondiente. Se programó la medición a 25 °C.

2. Microscopía electrónica de barrido

Las películas obtenidas se analizaron mediante un microscopio electrónico de barrido de emisión de campo Jeol JSM-7600F, obteniendo imágenes a 500X y 10 kV. No se requirió recubrimiento para la observación de las películas.

3. Análisis Térmico

Para la obtención de los termogramas se utilizó un equipo SDT Q600 de TA Instruments, en una atmósfera de nitrógeno. La temperatura se aumentó a una velocidad de 10 °C/min, de 20 °C a 500 °C.

4. Propiedades mecánicas: ensayo de tensión

La *textura* se analizó mediante un ensayo de tensión llevado a cabo en un texturómetro Multitest 1i de Mecmesin®. Se cortó la película en porciones rectangulares de 1.8 cm por 4.7 cm, al colocarse en la celda de carga se reduce 1 cm de cada extremo por sujeción, por lo que el área efectiva de 4.86 cm². Utilizando una celda de carga de 10 N, a una velocidad de 5 mm/min, hasta 6 N o un porcentaje de ruptura de 50% (ver Figura 3.5).

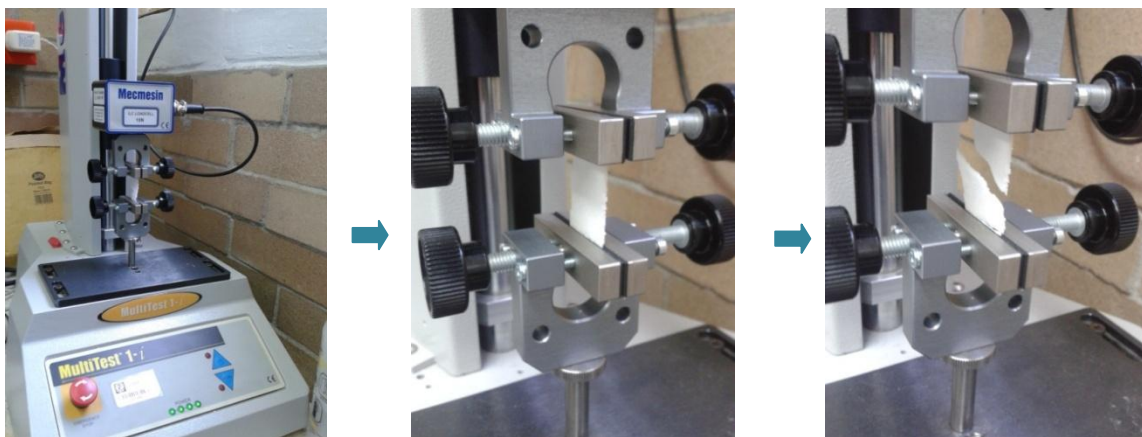


Figura 3.5. Ensayo de Tensión

Con los valores obtenidos en este ensayo se calcularon los valores de fuerza de fractura, cohesividad y rigidez para cada una de las películas evaluadas. En una gráfica fuerza-desplazamiento, como la de la Figura 3.6, se estimó la fuerza máxima soportada por la película (h) que nos indica la fuerza de fractura y el desplazamiento (d) al cual se presenta esta fuerza máxima que representa la cohesividad; la rigidez del material está dada por el cociente de estas cantidades (h/d) [66]. Posteriormente, calculando la deformación (ε_{eng}) y el esfuerzo ingenieril (σ_{eng}) a partir de los datos del ensayo, se emplearon las ecuaciones de deformación de Hencky (ε_h) y el esfuerzo corregido (σ_c), por medio de las siguientes ecuaciones [66]:

$$\varepsilon_h = -\ln(1 - \varepsilon_{eng}) \quad \text{y} \quad \sigma_c = \sigma_{eng}(1 - \varepsilon_{eng})$$

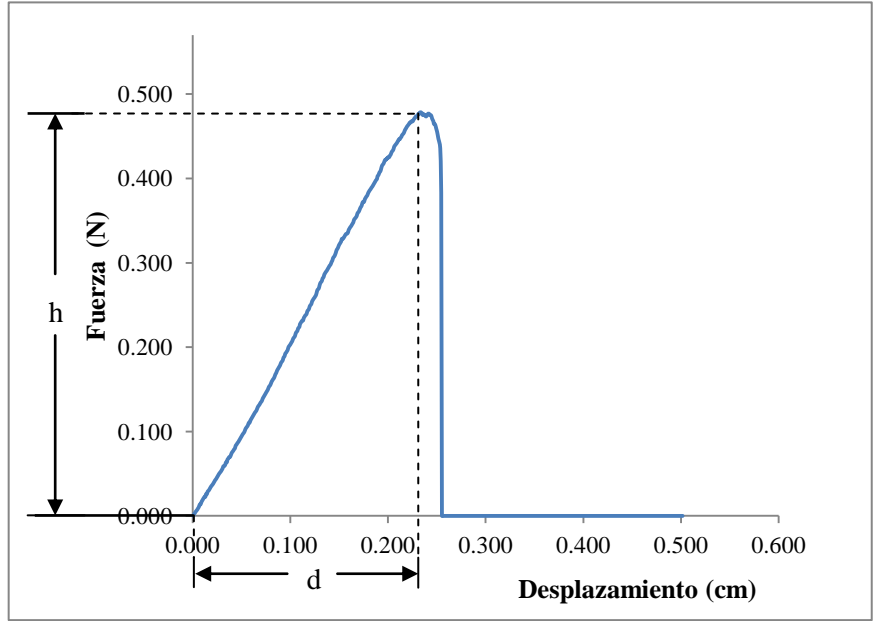


Figura 3.6. Gráfica de la fuerza aplicada vs el desplazamiento del material, donde la distancia (d) es la cohesividad y (h) es la fuerza de fractura.

Finalmente, se obtuvieron los valores del módulo de Young, calculando la pendiente de la porción lineal de la gráfica esfuerzo corregido contra deformación de Hencky. Se presenta en la Figura 3.7 una gráfica a manera de ejemplo:

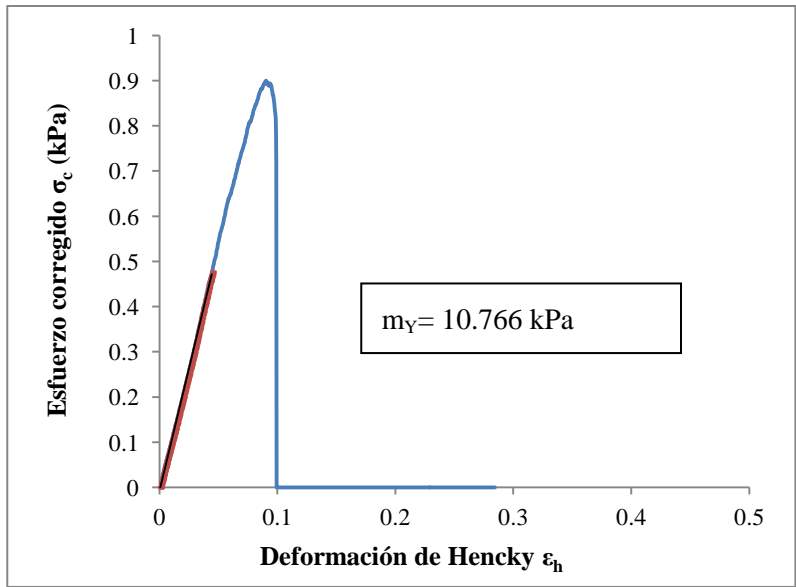


Figura 3.7. Gráfica esfuerzo corregido vs deformación de Hencky, la pendiente en la porción lineal (rojo) representa el módulo elástico (m_Y).

5. Perfil de Liberación

Considerando que durante su paso por el tracto gastrointestinal el material estará en contacto con un medio fisiológico de pH variable que oscila entre 2 y 7.5 (aproximadamente, dependiendo la región GI) se realizaron dos perfiles: uno a pH ácido (pH 2.8) y el otro a pH básico (pH 7.2). El medio utilizado se basó en una disolución de medio salival simulado (Marques, *et al.*, 2011) cuya composición se muestra en la siguiente tabla:

Tabla 3.2 COMPOSICIÓN DEL MEDIO SALIVAL SIMULADO⁺

Composición	(g/L)
Cloruro de Potasio	0.149
Cloruro de Sodio	0.117
Bicarbonato de Sodio	2.100
Alfa-amilasa*	2.000
Mucina gástrica*	1.000

⁺ Adaptado de [65]

*Las enzimas mencionadas (mucina gástrica, alfa amilasa) se incorporaron mediante la agregación de 100 μ L de saliva (de pH conocido) por cada mL de medio salival elaborada.

Primero se valoró el perfil con el medio simulado a pH ácido, para lo cual se agregó al medio salival simulado la cantidad suficiente de disolución de HCl 1 M hasta alcanzar el pH ácido requerido. Se elaboró la curva de calibración (absorbancia contra concentración) con alícuotas de concentración conocida de β -TCMP dispersas en el medio simulado que se muestra en la Figura 3.8.

Posteriormente, se elaboraron dos perfiles de disolución uno con la película sin fosfato (sólo Xantana, κ -Carragenina y PLGA) y otro con la película con concentración de β -TCMP 2% (máxima concentración elaborada). Para lo cual se prepararon 7 viales (por perfil) en los que se agregaron 2 mg de película/2 mL de medio simulado, estos viales se colocaron dentro de un baño agitador (Heto® MaxiShaker) a una temperatura de 37 °C y en agitación constante. Se tomaron muestras a diversos tiempos: 7, 15, 30, 45, 60, 90 y 120 minutos, retirando el vial del baño al tiempo indicado y midiendo su absorbancia mediante un equipo de espectrofotometría UV-Vis,

espectrómetro de Fibra Óptica S2000, Ocean Optics, Inc. La longitud de onda seleccionada se determinó de manera experimental.

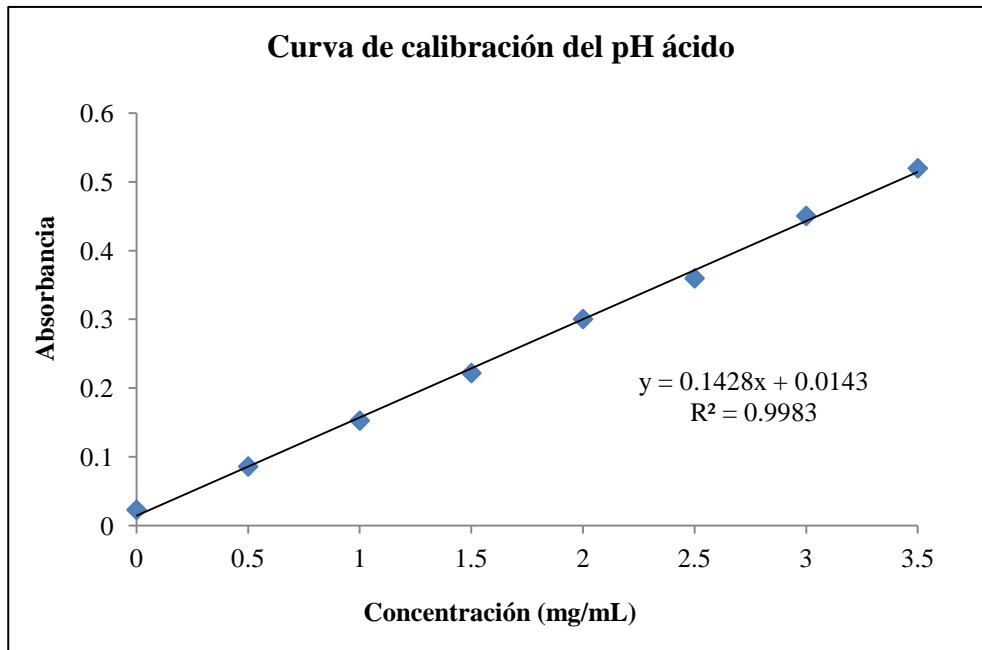


Figura 3.8. Curva de calibración para un medio simulado con pH ácido.

Posteriormente la absorbancia del perfil de la película sin fosfato se restó a la absorbancia de la película con fosfato, y utilizando la ley de Lambert-Beer (ver Apéndice 6.1.5, *Perfil de Liberación*) se determinó la concentración de fosfato en esta diferencia. Para la valoración del perfil con medio simulado a pH básico se agregó al medio salival simulado la cantidad suficiente de disolución de HCl 1M hasta alcanzar este pH. Y del mismo modo que el perfil antes descrito, se elaboró la curva de calibración (absorbancia contra concentración) con alícuotas de concentración conocida de β -TCMP dispersa en este medio simulado, obteniendo la curva que se muestra en la Figura 3.9.

Finalmente, se elaboraron los perfiles de disolución de la misma forma que para aquellos en los que se utilizó el medio simulado de pH ácido: Preparando 7 viales por perfil (el de la película con fosfato y aquella que no contiene fosfato) conteniendo 2 mg de película/2 mL de medio simulado, colocando los viales en el baño agitador a 37 °C y en agitación constante. Se tomaron muestras a los tiempos de: 7, 15, 30, 45, 60, 90 y 120 minutos, y se midió la absorbancia

de dichas muestras mediante espectrofotometría UV-Vis. Para determinar la concentración de fosfato (fosfato liberado), se utilizó la Ley de Lambert-Beer, midiendo la absorbancia a partir de la diferencia entre la absorbancia del perfil de la película con fosfato menos la de la película sin fosfato.

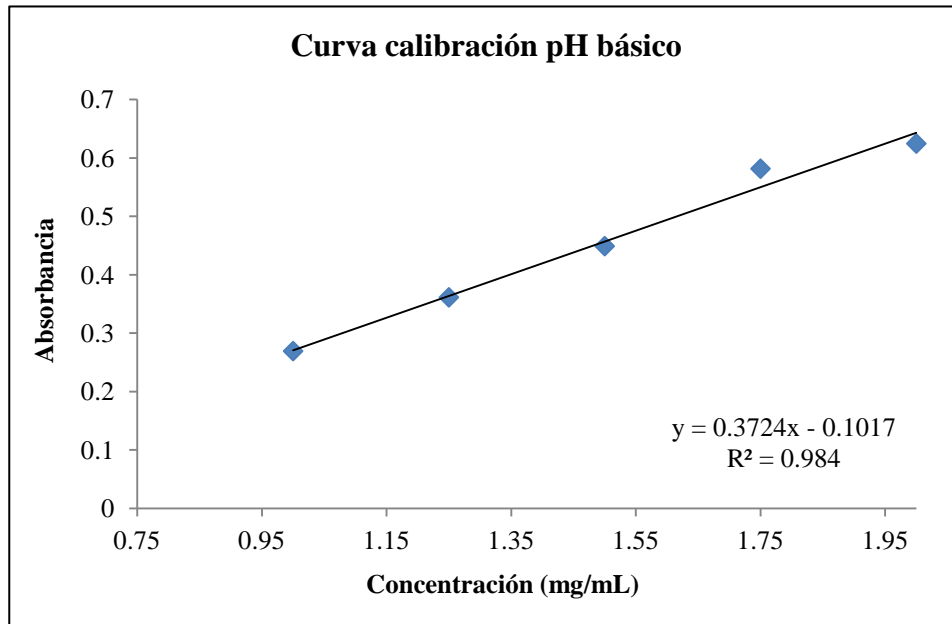


Figura 3.9. Curva de calibración para medio simulado con pH básico.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 MATERIAL ELABORADO

Se obtuvieron películas uniformes de un espesor aproximado de 2 mm, y un diámetro de 7 cm (equivalente al del contenedor en el que se vertieron), tal y como se muestra en la Figura 4.1.

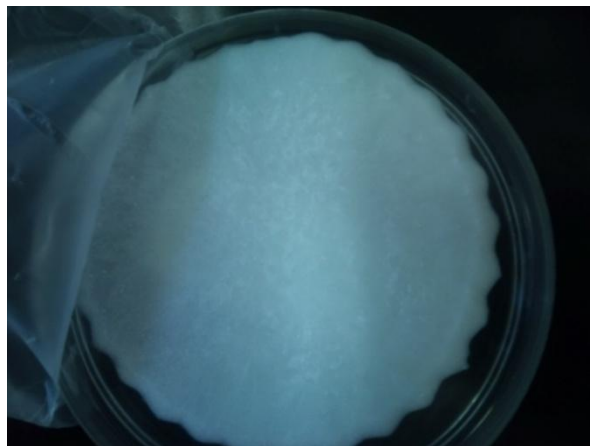


Figura 4.1. Películas resultantes del proceso de formación.

4.2 CARACTERIZACIÓN POR POTENCIAL ZETA

Como se observa en el gráfico de la Figura 4.2 las películas de control presentaron potenciales zeta negativos entre los -70 y los -85.1 mV, dada la presencia de la Xantana y de la κ -Carragenina, que al ser polisacáridos de carga negativa, originan repulsiones entre las partículas presentes provocando que éstas no floculen en suspensión. Así se logra una mayor estabilidad en el sistema formado. También se puede observar que la adición del PLGA provoca un ligero aumento del potencial zeta en la película (potencial zeta menos negativo). El PLGA presenta una ligera carga negativa, característica debida a los grupos carboxilos (ácidos débiles) presentes en la superficie de las partículas ^[95], y es la relación lactida:glicolida 75:25, la que presenta potenciales más negativos.

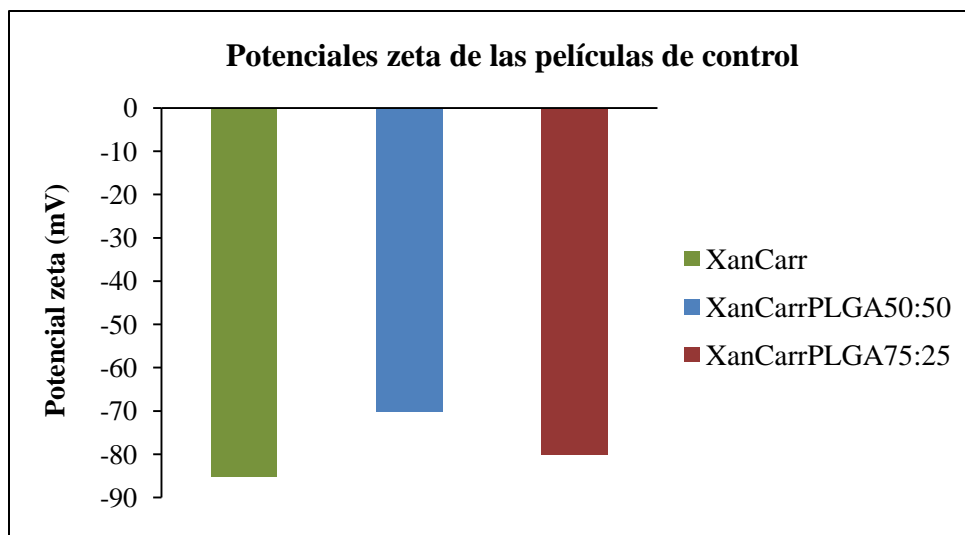


Figura 4.2. Potenciales zeta de las películas de control. Se observa que la relación 75:25 presenta potenciales más negativos.

Por otro lado, los gráficos siguientes muestran el efecto de agregar el fosfato tricálcico con magnesio (β -TCMP), en primer lugar en una concentración de 0.5% (p/v), se provoca un aumento en el potencial zeta, dada la aparición del calcio y el magnesio en el fosfato. La presencia de estos cationes, provoca una disminución de las repulsiones entre partículas aniónicas de los biopolímeros. Además, debido al aumento de la concentración de iones, se presenta una disminución en el espesor de la doble capa, lo que conlleva a un aumento del potencial zeta (Apéndice 6.1.1, *Potencial zeta*). Del mismo modo, se presentan potenciales más negativos en las películas formadas con la relación lactida:glicolida igual a 75:25.

Asimismo, en las concentraciones de 1% y 2% (p/v) de fosfato sustituido con magnesio, se presenta un aumento considerable del potencial zeta, con referencia a las películas control, siendo mayor este aumento en las películas con relación lactida:glicolida 75:25. (Figuras 4.3 y 4.4)

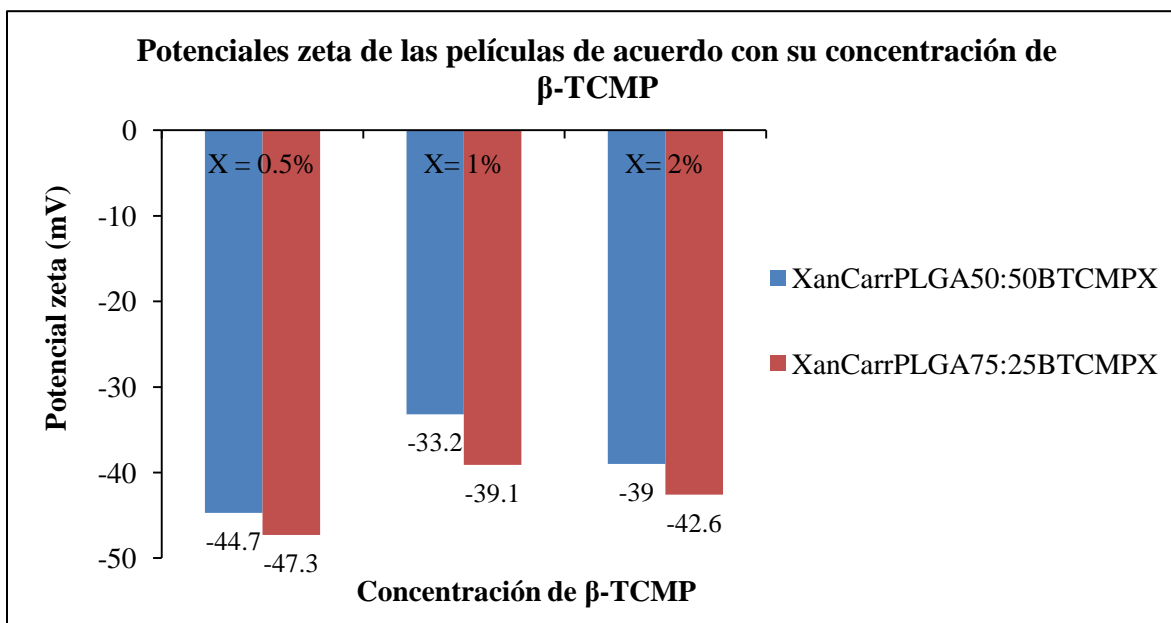


Figura 4.3. Potenciales zeta de las películas de acuerdo con su concentración de Fosfato tricálcico con magnesio.

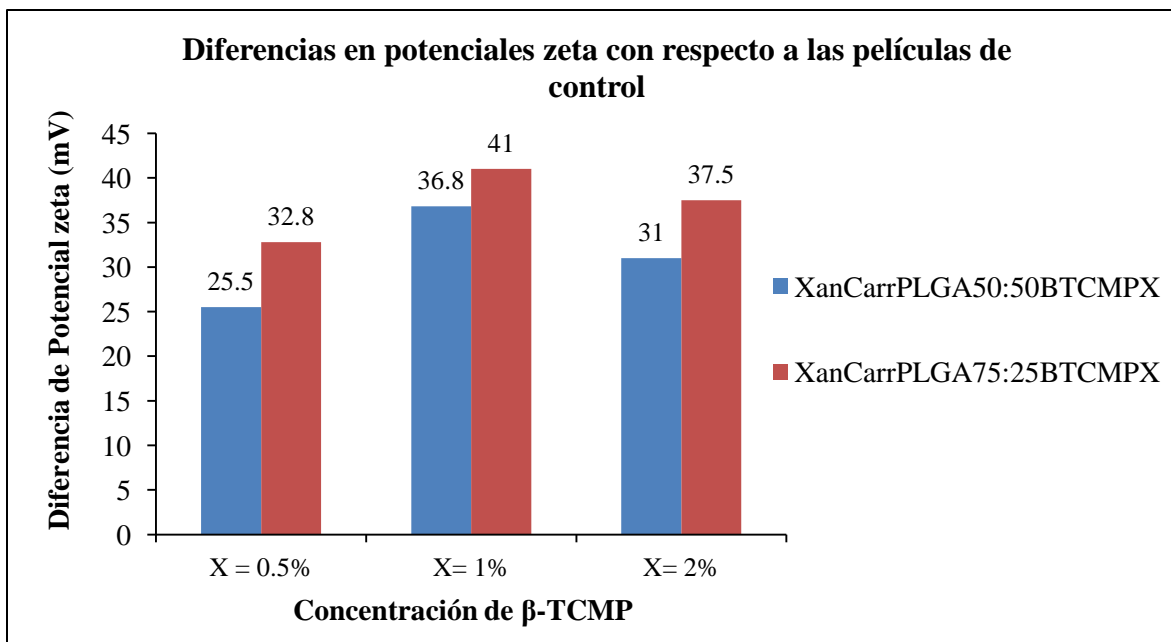


Figura 4.4. Diferencias de los potenciales zeta de las películas con fosfato tricálcico con magnesio con respecto a las películas control elaboradas. Se observa que las películas con PLGA presentaron potenciales menos negativos conforme aumenta la concentración de fosfato.

Los valores de potencial zeta exhibidos por las películas son negativos, para ambas relaciones lactida:glicolida, 75:25 y 50:50, lo que significa que las películas formadas no sedimentan en disolución dadas las repulsiones electrostáticas presentes. Como se aprecia en los resultados en las películas con relación lactida:glicolida 75:25 la adición de β -TCMP registró diferencias con su película control considerablemente mayores que las observadas con películas con relación lactida:glicolida 50:50.

ANÁLISIS DE LA MICROESTRUCTURA

4.3 Microscopía Electrónica De Barrido

La morfología de las películas con contenido de β -TCMP de 1% (p/v) presentan una distribución uniforme (en el Apéndice 6, se pueden observar las imágenes de MEB de las películas de control elaboradas). Cabe destacar que se utilizó la técnica LABE (del inglés *low-angle backscattering electrons*, electrones restrodispersados de ángulo bajo) para obtener las siguientes imágenes de MEB. Así pues, la Figura 4.5 presenta la película elaborada con β -TCMP y PLGA relación lactida:glicolida 50:50 en concentraciones de fosfato 1%, misma que mostró una morfología típica de las películas formadas con κ -Carragenina [44, 92, 60] y se notan en ella cúmulos (como los encerrados en los recuadros en la Figura 4.5) seguramente de fosfato tricálcico con magnesio (β -TCMP) distribuido de manera uniforme a través de toda la estructura porosa de la película.

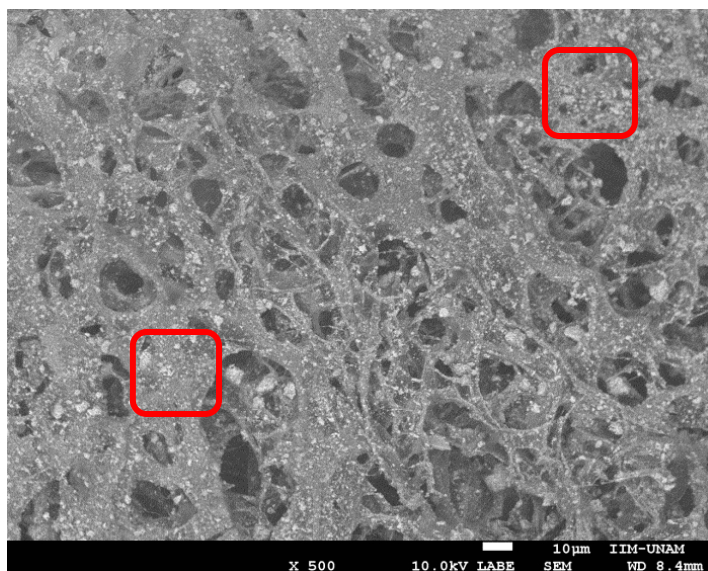
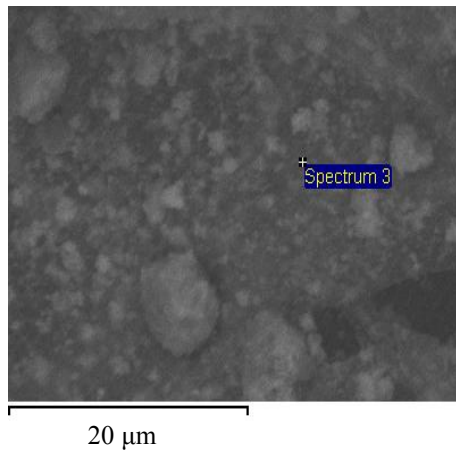


Figura 4.5. Imagen de MEB de la película XanCarrPLGA50:50BTCMP1 (500X, 10kV). Las partículas de contraste claro son de fosfato tricálcico con magnesio (recuadros).

En la Figura 4.6 se comprobó mediante análisis EDS que las partículas señaladas en la película contienen al fosfato. En efecto la relación atómica de (Ca+Mg)/P es de 1.42 y la de Ca/P es de 1.24.



Elemento	% Peso	% Atómico
C	47.98	63.69
O	23.41	23.33
Mg	1.47	0.97
P	10.42	5.37
Ca	16.72	6.65
Total	100.00	

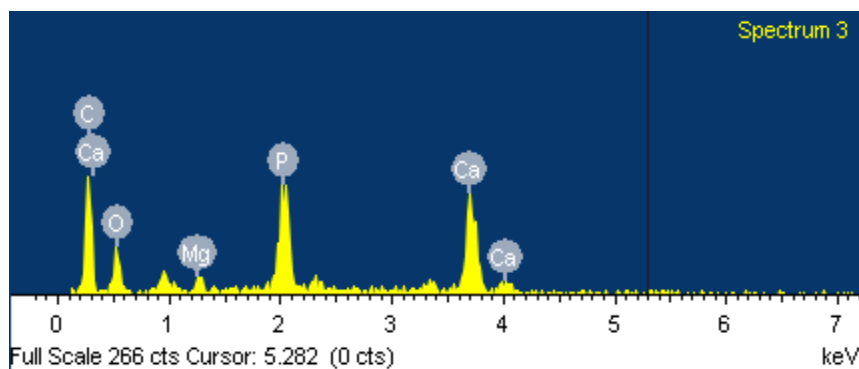


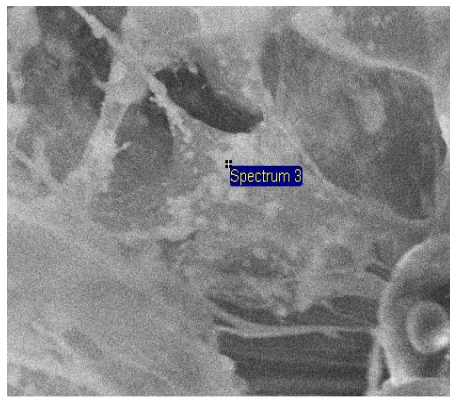
Figura 4.6 Resultados de EDS realizado a la zona señalada de la película XanCarrPLGA50:50BTCMP1, mostrando la presencia de β -TCMP.

Por otro lado, la adición del β -TCMP en películas con relación lactida:glicolida 75:25, Figura 4.7, mostró películas con cúmulos más irregulares de β -TCMP (recuadros en la Figura 4.7), también su distribución es más desordenada, comparada con la mostrada en las películas con PLGA50:50, y la película luce saturada de estas partículas, y en principio son menos estables mecánicamente al flujo.



Figura 4.7. Imagen de MEB de la película XanCarrPLGA75:25BTCMP1 (500X, 10kV). Las partículas de contraste claro son de fosfato tricálcico con magnesio (recuadros).

Del mismo modo, en la Figura 4.8 se comprobó mediante análisis EDS que las partículas señaladas en la película contienen al fosfato. Mostrando una relación atómica (Ca+Mg)/P de 1.56 y la de Ca/P es de 1.4.



Elemento	% Peso	% Atómico
C	19.81	30.52
O	43.59	50.42
Mg	1.59	1.21
P	12.39	7.40
Ca	22.62	10.45
Total	100.00	

6 µm

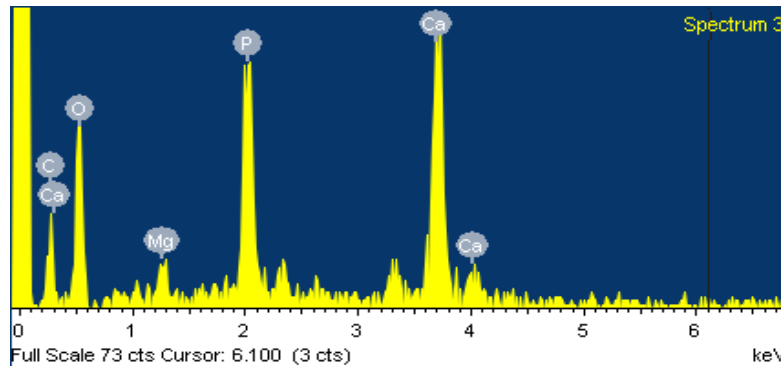


Figura 4.8. Resultados del EDS realizado a la zona señalada de la película XanCarrPLGA75:25BTCMP1, mostrando la presencia de β -TCMP.

Las imágenes de MEB, permiten afirmar que las películas con relación lactida:glicolida 50:50 son las más adecuadas para uso como vector de transporte del β -TCMP, dado que muestran una distribución de β -TCMP ordenada, lo que significa que la interacción entre las partículas no afecta su distribución y brinda una ordenación uniforme del fosfato de calcio con magnesio encapsulado en el vector de PLGA. Las partículas se encuentran dispersas uniformemente entre los poros de la película, y no en su superficie, tal como lo reporta Da-Silva D. *et al.*, (2007) en la elaboración de nanocompositos porosos preparados mediante la coprecipitación de fosfatos de calcio en una matriz de κ -Carragenina ^[20].

4.4 Análisis Termogravimétrico, (TGA)

Esta técnica se utilizó para caracterizar térmicamente los materiales, en primer lugar, el efecto de la adición de PLGA en las películas formadas por los polisacáridos, y en segundo lugar, el resultado de la variación del porcentaje de fosfato de calcio en el sistema de biopolímeros. En la degradación térmica de las macromoléculas el aumento de la agitación molecular, provocada por la absorción de energía calorífica, disminuye la fuerza de los enlaces que pueden llegar a romperse. En algunos casos, los polímeros experimentan reacciones químicas que producen especies gaseosas. Estas reacciones se evidencian por la pérdida de peso del material, por lo que en general, la estabilidad térmica de los polímeros es una medida de su resistencia a esta descomposición ^[11]. Las siguientes figuras nos muestran los análisis de los termogramas de 0 a 500 °C de los compuestos:

- 1) PLGA,
- 2) XanCarr,
- 3) XanCarrPLGA,
- 4) β -TCMP,
- 5) XanCarrPLGABTCMP0.5,
- 6) XanCarrPLGABTCMP1, y
- 7) XanCarrPLGABTCMP2.

La tabla 4.1 describe los procesos presentes en el termograma ilustrado en la Figura 4.9. que muestra la curva del PLGA (curva 1).

Tabla 4.1 ANÁLISIS DEL TERMOGRAMA DEL PLGA			
	Temperatura	% Peso perdido	Proceso
1	52.84 °C	0.83%	Evaporación del disolvente utilizado (acetona).
2	96 °C	0.71%	Eliminación de agua fisisorbida.
3	163 °C	1.40%	Pérdida de agua quimisorbida.
4	263-325 °C	28.25%	Degradación del PLGA. A partir de los 263 °C, similar a la temperatura reportada por Leung <i>et al.</i> , (2008). 1ª etapa. Asociada a la degradación del PGA, reportada alrededor de 271 °C por Mohamaddi-Rovshandeh, <i>et al.</i> , (2001).
5	325-369 °C	63.00%	2ª etapa. Correspondiente a la descomposición del PLA, reportado por Nakayama, <i>et al.</i> , (2007) a los 320 °C.
6	369-494.24 °C	2.31%	Culminación de la descomposición.
Remanente			
1.35%			

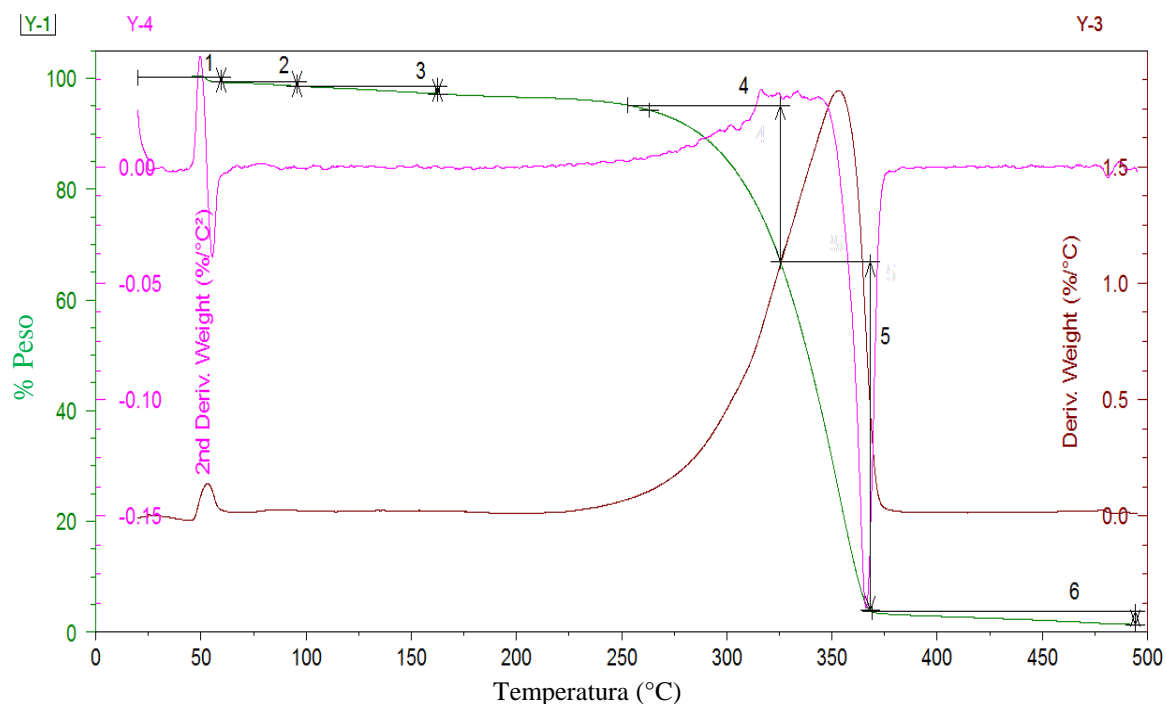


Figura 4.9. Análisis del termograma del PLGA con relación molar 50:50.

Por su parte la curva 2 presentada en la Figura 4.10, que contiene la mezcla los polisacáridos Xantana y κ - Carragenina se describe en la Tabla 4.2.

Tabla 4.2 ANÁLISIS DEL TERMOGRAMA DE LA PELÍCULA QUE CONTIENE XANTANA Y K- CARRAGENINA			
	Temperatura	% Peso perdido	Proceso
1	91.44 °C	13.16%	Pérdida de agua fisisorbida.
2	233.7-253 °C	5.69%	Inicio de la degradación de la κ - Carragenina. Temperatura cercana a la reportada por Sadeghi, (2012). Asociados ambos detrimentos a la pérdida de sulfatos en la estructura ^[32] .
3	253-281 °C	17.20%	
4	281-305 °C	19.58%	Comienzo de la degradación de la goma Xantana. Esta temperatura es similar a la descrita por Darzi <i>et al.</i> , (2012).
5	305-406.7 °C	17.40%	Progresiva fragmentación de estructura de carbohidratos tanto de la Xantana como de la κ -Carragenina ^[32] .
6	406.7-498.6 °C	8.90%	
Remanente			
13.80%			

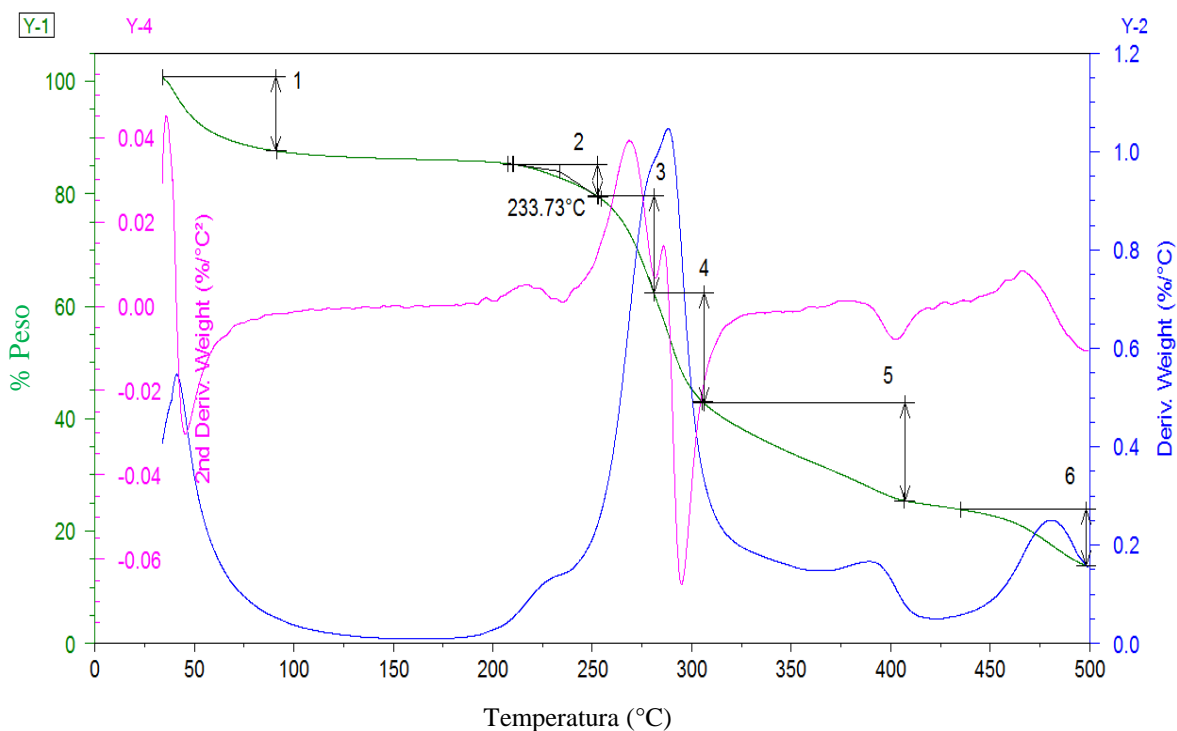


Figura 4.10. Análisis del termograma de la película que contiene Xantana y κ - Carragenina.

El efecto de agregar el PLGA a los polisacáridos se observa en el termograma de la Figura 4.11. Este sistema conjunta las temperaturas de degradación de la goma Xantana (alrededor de los 280 °C ^[21]), de la κ -Carragenina (cerca de los de 230 °C ^[90]), y del PLGA cuya descomposición se reporta a partir de los 260 °C ^[58], como se detalla en la Tabla 4.3.

Tabla 4.3 ANÁLISIS DEL TERMOGRAMA DE LA PELÍCULA ELABORADA CON XANTANA, K- CARRAGENINA Y PLGA			
	Temperatura	% Peso perdido	Proceso
1	69 °C	6.50%	Evaporación del disolvente del PLGA (acetona).
2	102 °C	1.59%	Pérdida de agua fisisorbida del compuesto.
3	267.78 °C	12.46%	Inicio de la descomposición de la κ - Carragenina ^[90] y también de la degradación del copolímero PLGA ^[58] .
4	267.78-321 °C	37%	Continuación de la degradación de los biopolímeros y con el comienzo de este mismo proceso en la goma Xantana ^[21] .
5	357.24 °C	7%	Final de la degradación del copolímero.
6	357.24-442.7 °C	8.15%	Progresiva fragmentación de estructura de carbohidratos tanto de la Xantana como de la κ -Carragenina ^[32] .
7	442.7-494.4 °C	4.29%	
Remanente			
21.49%			

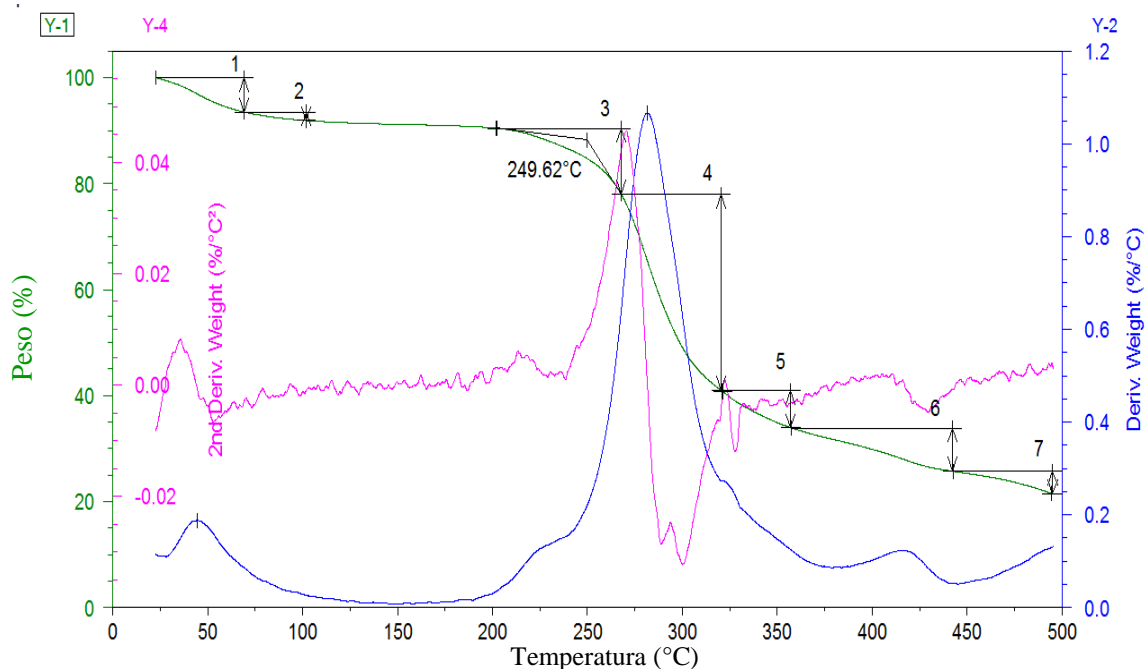


Figura 4.11. Análisis del termograma de la película elaborada con Xantana, κ - Carragenina y PLGA.

La Figura 4.12 es un gráfico comparativo entre las curvas antes descritas. Se observa que el efecto de agregar PLGA en la película con polisacáridos proporciona a ésta una estabilidad térmica ligeramente mayor.

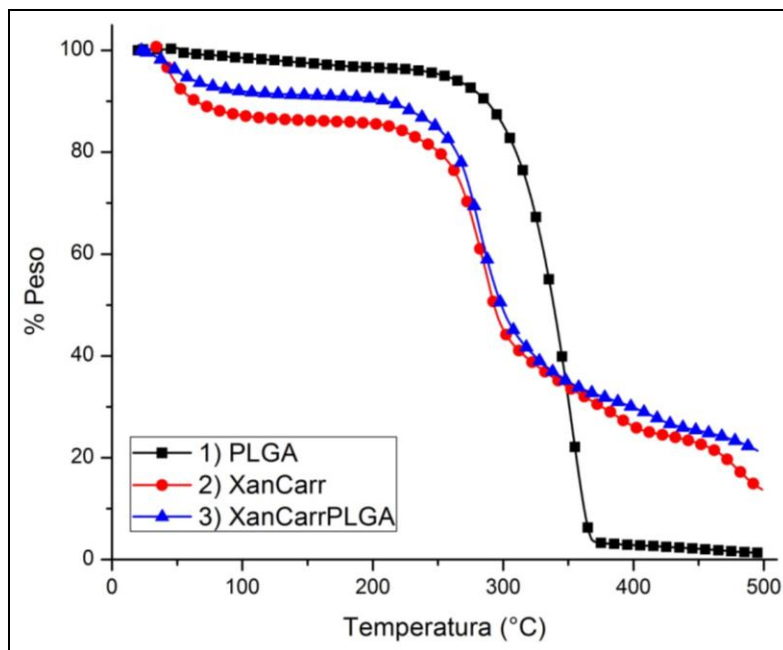


Figura 4.12. Termograma comparativo de las películas 1, 2 y 3.

La Figura 4.13 presenta el análisis del termograma del fosfato tricálcico con magnesio ^[54]. Los procesos térmicos de esta curva (4) se describen en la Tabla 4.4.

Tabla 4.4 ANÁLISIS DEL TERMOGRAMA DEL FOSFATO TRICÁLCICO CON MAGNESIO β-TCMP			
	Temperatura	% Peso perdido	Proceso
1	98.96 °C	4.03%	Pérdida de agua fisisorbida.
2	181.24 °C	2.56%	Eliminación de agua quimisorbida.
3	260.19 °C	8.20%	Pérdida los nitratos presentes en la fase después de su síntesis ^[54] .
4	260.19-499.58 °C	2.93%	Pérdida de carbonatos presentes ^[54] .
Remanente			
82.25%			

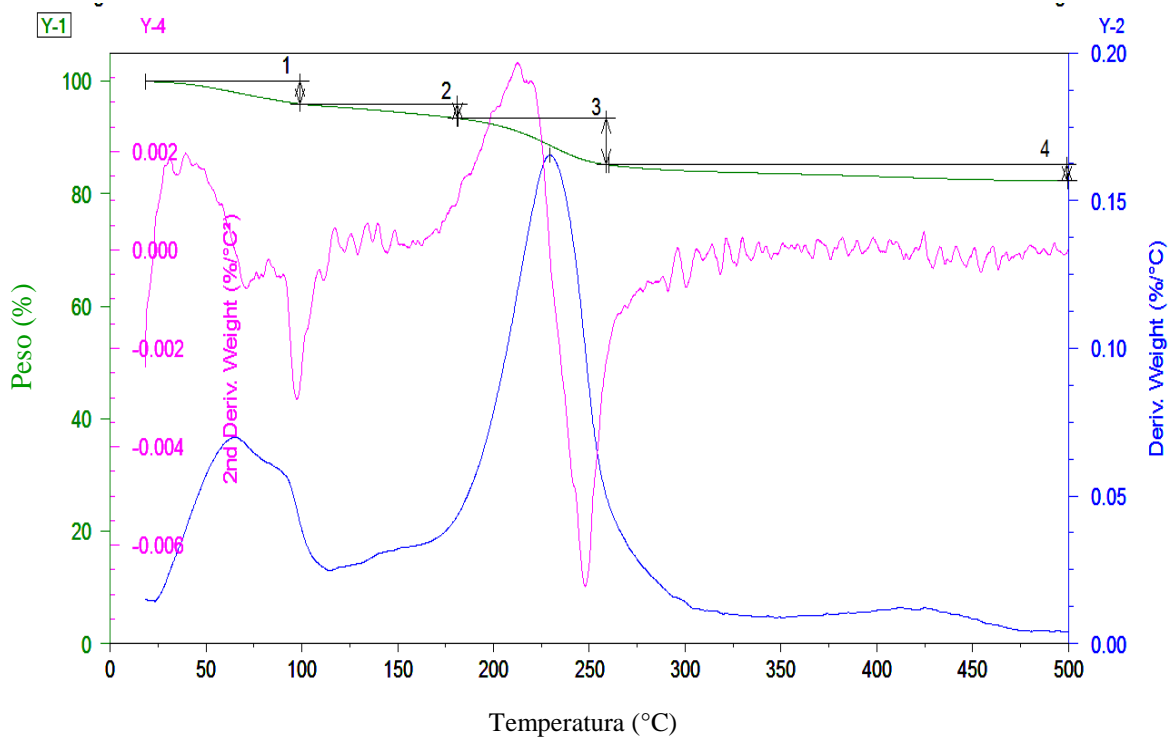


Figura 4.13. Análisis del termograma del fosfato tricálcico con magnesio β -TCMP Adaptado de ^[54].

A continuación se describen los termogramas de las películas 5, 6 y 7 correspondientes al sistema Xantana-Carragenina-PLGA, con la adición del fosfato de calcio con magnesio en distintas concentraciones (0.5%, 1% y 2% (p/v), respectivamente). En la Figura 4.14 se presenta la película con menor concentración de fosfato (0.5%) y su análisis se detalla en la Tabla 4.5.

Tabla 4.5 ANÁLISIS DEL TERMOGRAMA DE LA PELÍCULA XANCARRBTCMP0.5			
	Temperatura	% Peso perdido	Proceso
1	50.9 °C	1.65%	Evaporación del disolvente del PLGA (acetona).
2	101.39 °C	2.01%	Pérdida de agua fisisorbida del compuesto.
3	151 °C	0.85%	Eliminación de agua quimisorbida.
4	218 °C	7.54%	Pérdida los nitratos presentes en la whitlockita sintetizada ^[54] .
5	218- 280.8 °C	11.8%	Inicio de la descomposición de la κ - Carragenina ^[90] y también de la degradación del copolímero PLGA ^[58] .
6	280.8- 323 °C	15.31%	Continuación de la degradación de los biopolímeros y con el comienzo de este mismo proceso en la goma Xantana ^[21] .
7	364.48 °C	12.74%	Final de la degradación del copolímero.
8	494.9 °C	8.43%	Última etapa de descomposición de los polisacáridos y la pérdida carbonatos del β -TCMP
Remanente			
39.69%			

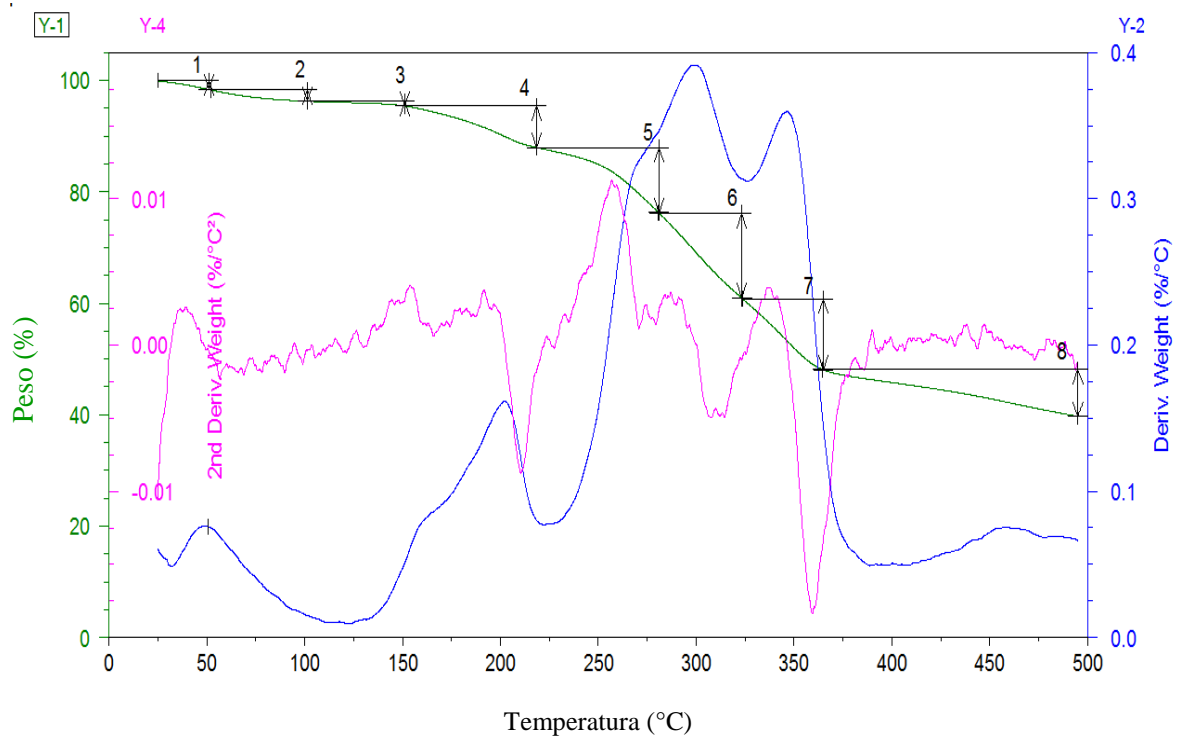


Figura 4.14. Análisis del termograma de la película XanCarrBTCMP0.5, que contiene una concentración de fosfato tricálcico con magnesio de 0.5% (p/v).

En la tabla 4.6 se describe el termograma de la Figura 4.15. En esta figura se muestra la curva 6, correspondiente a la película con concentración de fosfato del 1% (p/v).

Tabla 4.6 ANÁLISIS DEL TERMOGRAMA DE LA PELÍCULA XANCARRBTCMP1			
	Temperatura	% Peso perdido	Proceso
1	50.9 °C	2.14%	Evaporación del disolvente del PLGA (acetona).
2	97.81 °C	1.91%	Pérdida de agua fisisorbida del compuesto.
3	173 °C	3.62%	Eliminación de agua quimisorbida.
4	217.3 °C	7.45%	Pérdida los nitratos presentes en la whitlockita sintetizada ^[54] .
5	252.74 °C	3.1%	Inicio de la descomposición de la κ - Carragenina ^[90] .
6	252.74-310.05 °C	13.74%	Inicio de la degradación del copolímero PLGA ^[58] y comienzo de este mismo proceso en la goma Xantana ^[21] .
7	358.11 °C	8.45%	Final de la degradación del copolímero.
8	494.9 °C	6.77%	Última etapa de descomposición de los polisacáridos y la pérdida carbonatos del β -TCMP
Remanente			
52.93%			

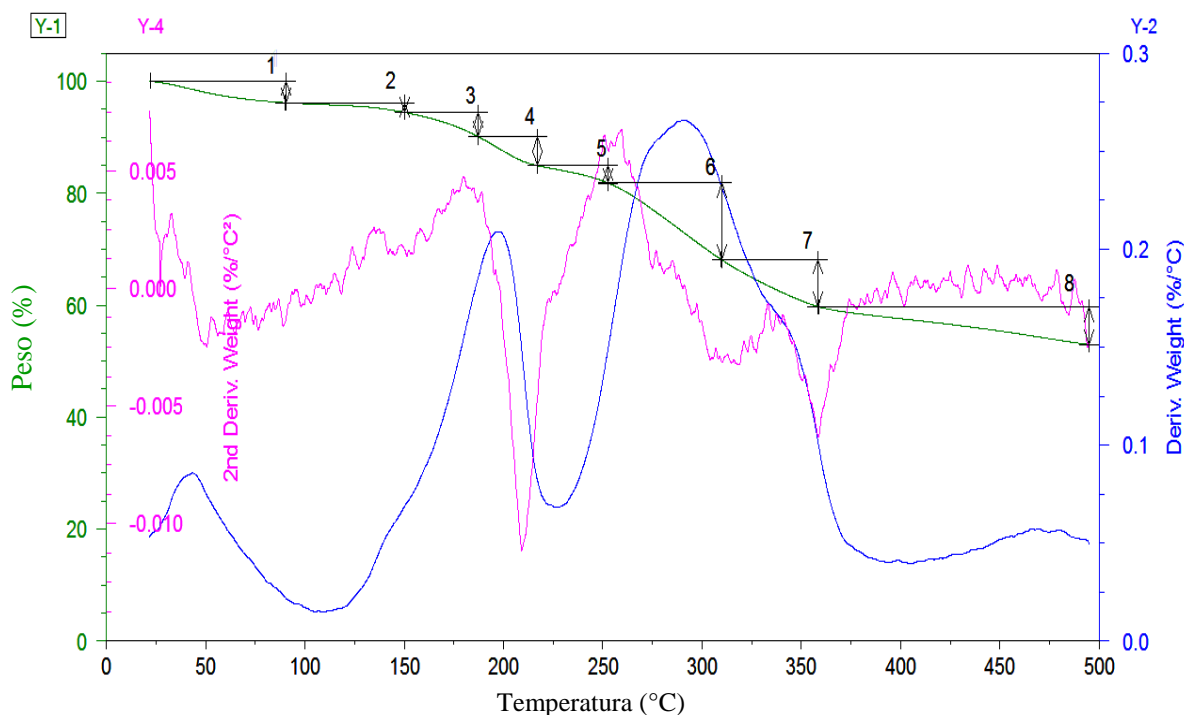


Figura 4.15. Análisis del termograma de la película XanCarrBTCMP1, que contiene una concentración de fosfato tricálcico con magnesio de 1% (p/v).

Finalmente, la Figura 4.16 corresponde a la película con una concentración de fosfato del 2% (p/v). La Tabla 4.7 describe los procesos presentes en este gráfico.

Tabla 4.7 ANÁLISIS DEL TERMOGRAMA DE LA PELÍCULA XANCARRBTCMP2			
	Temperatura	% Peso perdido	Proceso
1	49 °C	2.01%	Evaporación del disolvente del PLGA (acetona).
2	99.97 °C	2.2%	Pérdida de agua fisisorbida del compuesto.
3	160.2 °C	2.7%	Eliminación de agua quimisorbida.
4	217 °C	10.2%	Pérdida los nitratos presentes en la whitlockita sintetizada ^[54] .
5	217- 271 °C	4.7%	Inicio de la descomposición de la κ - Carragenina ^[90] y también de la degradación del copolímero PLGA ^[58] .
6	270- 326 °C	8.57%	Comienzo de este mismo proceso en la goma Xantana ^[21] .
7	373.9 °C	4.86%	Culminación de la degradación del PLGA.
8	494.9 °C	3.45%	Última etapa de descomposición de los polisacáridos y la pérdida carbonatos del β -TCMP
Remanente			
61.32%			

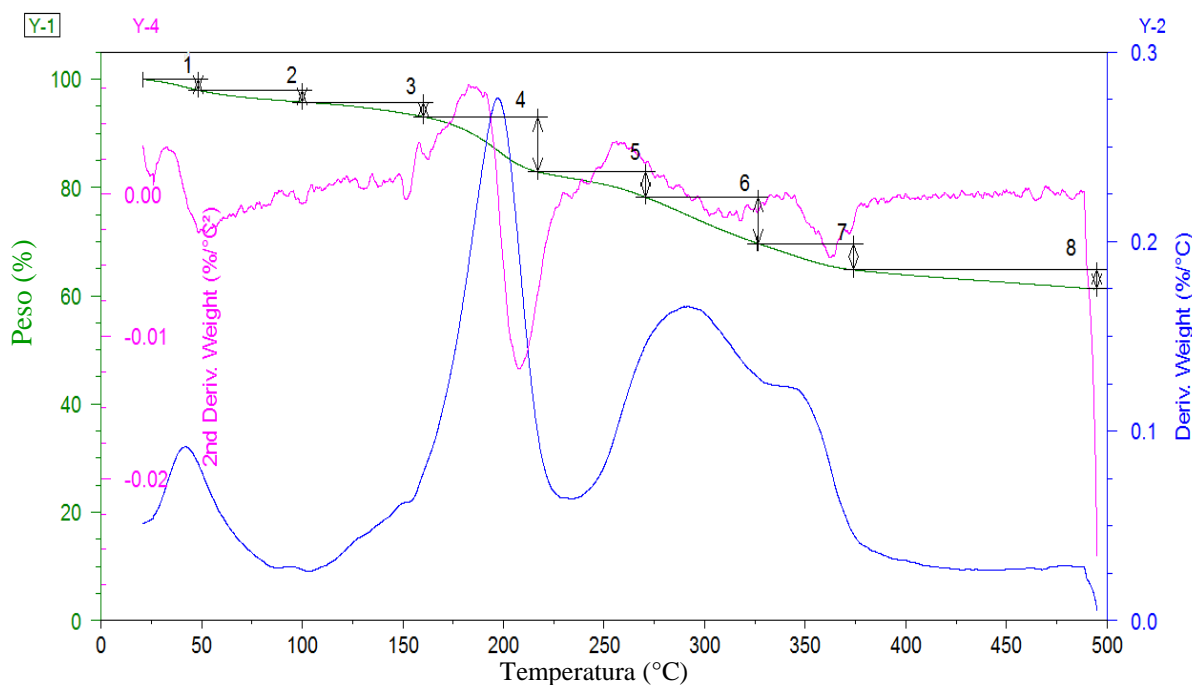


Figura 4.16. Análisis del termograma de la película XanCarrBTCMP2, que contiene una concentración de fosfato tricálcico con magnesio de 2% (p/v).

La siguiente tabla presenta la concentración teórica, en porcentaje de peso, de cada uno de los componentes de las películas, calculados tomando en consideración sus densidades.

TABLA 4.8 CONCENTRACIÓN TEÓRICA			
Porcentaje teórico de:	Película		
	XanCarrBTCMP0.5	XanCarrBTCMP1	XanCarrBTCMP2
Xantana	6.59%	5.19%	3.64%
κ - Carragenina	7.47%	5.88%	4.13%
PLGA	58.92%	46.39%	32.55%
β -TCMP	27%	42.52%	59.66%

En la Figura 4.17 se presenta un gráfico comparativo de las curvas 4, 5, 6, y 7. Se observa que de 0 a aproximadamente 290 °C el descenso en el porcentaje de peso de la película es mayor conforme la cantidad de fosfato aumenta. Sin embargo, a partir de los 290 °C tiene lugar una inflexión en el comportamiento de las curvas, presentándose una mayor disminución del peso en la película que tiene la menor concentración. Esta inversión puede atribuirse a que a esta temperatura los biopolímeros se han degradado en su mayoría. Además se observa una concordancia con el remanente de las películas 5, 6, y 7 y el porcentaje teórico de β -TCMP, dado que estos restos son en su mayoría fosfato, es estable a esta temperatura ^[54].

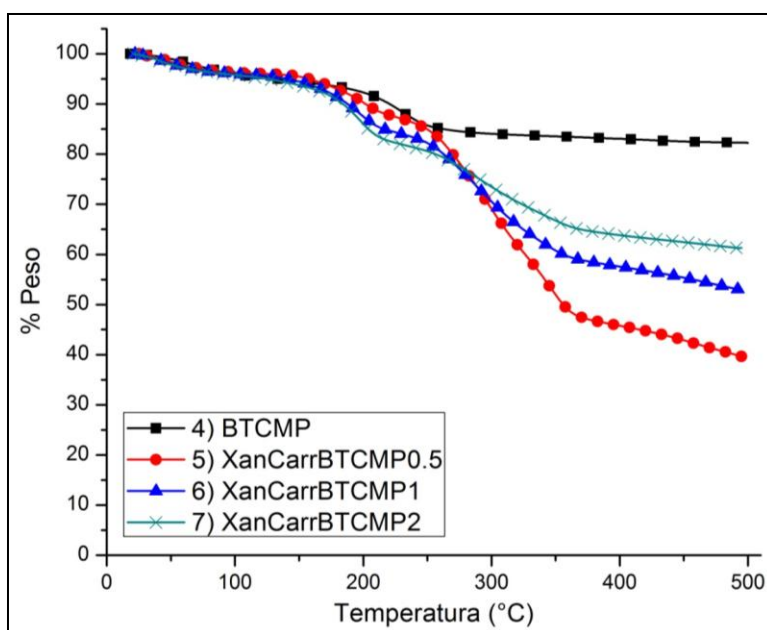


Figura 4.17. Termograma comparativo de las películas 4, 5, 6 y 7.

4.5 Ensayo de Tensión

Esta prueba presenta parte del comportamiento mecánico mostrado por las películas elaboradas, mismo que dará cuenta de las características estructurales de las mismas. A continuación se exponen dos gráficas que indican la respuesta de las películas a un esfuerzo de tensión. En la Figura 4.18 se observa una disminución en el valor del esfuerzo máximo soportado por las películas con relación lactida: glicolida 50:50 conforme aumenta la concentración de fosfato, lo que indica que se fragilizan con el incremento de la concentración de whitlockita. Un comportamiento similar reportan Da-Silva *et al.*, (2007) y Lee *et al.*, (2008), en *scaffolds* elaborados de κ -Carragenina/fosfato de calcio y de PLGA/HA, respectivamente. Los datos demuestran que la integridad estructural del compuesto y su resistencia mecánica se ven considerablemente disminuidas conforme se aumenta la cantidad de fosfato en el mismo [20, 56]. Esto concuerda con el aumento de los valores de los potenciales zeta, y la disminución de la temperatura de degradación de acuerdo con cada concentración; sin embargo, los valores de sus módulos elásticos conservan una relación considerablemente estrecha.

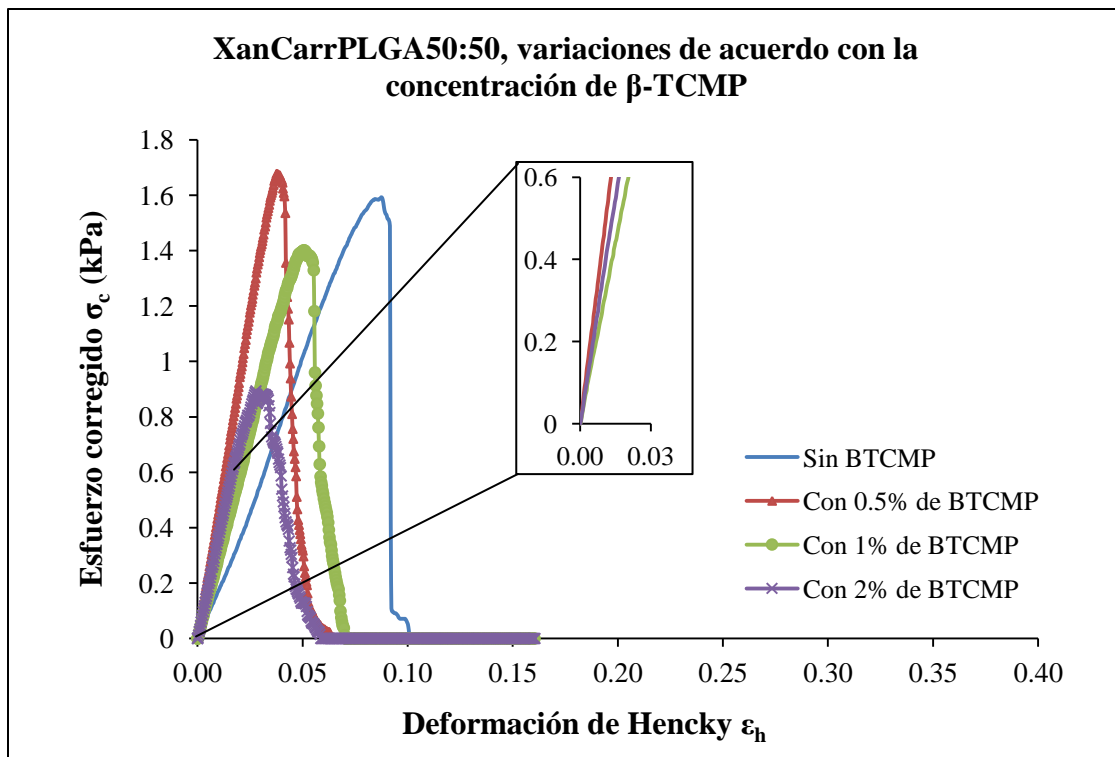


Figura 4.18 Gráfica del esfuerzo corregido vs la deformación de Hencky, para las películas compuestas con PLGA 50:50 en las diferentes concentraciones de fosfato estudiadas. Se observa que las pendientes en las porciones lineales ($0.0 < \epsilon_h < 0.03$) son cercanas.

En la Tabla 4.9, se comparan los valores de módulo elástico y esfuerzo máximo soportado. Se observa cómo, a medida que la concentración de fosfato se eleva, el esfuerzo máximo soportado por la película disminuye.

Tabla 4.9 Valores de Módulo elástico y Esfuerzo máximo para las películas compuestas por PLGA50:50

Película	Módulo elástico (kPa)	Esfuerzo máximo (kPa)
XanCarrPLGA50:50	20.711	1.592
XanCarrPLGA50:50BTCMP0.5%	46.071	1.67
XanCarrPLGA50:50BTCMP1%	29.364	1.4
XanCarrPLGA50:50BTCMP2%	37.064	0.89

Las películas formadas con una relación lactida:glicolida 75:25, presentan una tendencia similar, es decir, el esfuerzo máximo soportado disminuye conforme aumenta la concentración de fosfato en la película; sin embargo, estos compuestos exhiben módulos elásticos notablemente distintos (cada vez menores) a los de las películas con relación lactida:glicolida 50:50, tal y como se aprecia en la Figura 4.19. La película con la concentración más elevada de β -TCMP presenta el módulo menor, lo que indica una menor deformación elástica (es menos maleable), comparada con las demás películas.

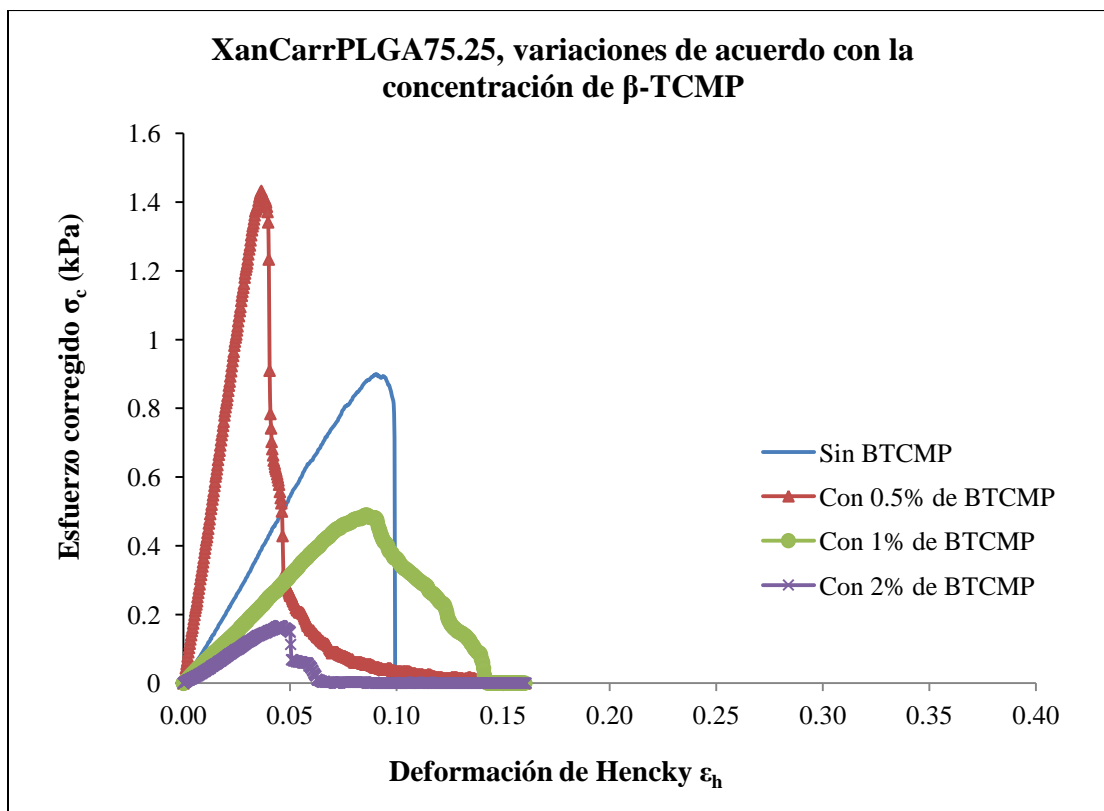


Figura 4.19 Gráfica del esfuerzo corregido vs la deformación de Hencky, para las películas compuestas con PLGA 75:25 en las diferentes concentraciones de fosfato estudiadas. Se observa que las pendientes en las porciones lineales disminuyen al aumentar la concentración de fosfato.

En la Tabla 4.10, se presentan los valores de módulo elástico y esfuerzo máximo soportado, y se advierte que a medida que aumenta el contenido de fosfato en la película disminuye su resistencia a la tensión, lo que significa que es más deformable.

Tabla 4.10 Valores de Módulo elástico y Esfuerzo máximo para las películas compuestas por PLGA75:25

Película	Módulo elástico (kPa)	Esfuerzo máximo (kPa)
XanCarrPLGA75:25	10.766	0.899
XanCarrPLGA75:25BTCMP0.5%	39.127	1.432
XanCarrPLGA75:25BTCMP1%	6.022	0.489
XanCarrPLGA75:25BTCMP2%	3.745	0.166

Las propiedades mecánicas de rigidez, cohesividad y fuerza de fractura, se presentan en la Tabla 4.11. Estos resultados explican las características de las películas al retirarlas del contenedor. En las películas de β -TCMP con PLGA 50:50, los valores de rigidez (oposición a la deformación), módulo elástico y fuerza de fractura son mayores, lo que indica que resisten una mayor carga antes de fracturarse o deformarse, aún a la más alta concentración de fosfato trabajada. También queda claro el por qué de la casi nula maleabilidad y lo quebradizas que se mostraban las películas de β -TCMP con PLGA 75:25, dados los bajos valores del módulo elástico, rigidez y fuerza de fractura exhibidos.

Tabla 4.11 VALORES OBTENIDOS A PARTIR DEL ENSAYO DE TENSIÓN

Película	Módulo elástico (kPa)	Esfuerzo máximo (kPa)	Fuerza de fractura (N)	Cohesividad (cm)	Rigidez (N/cm)
XanCarr	28.82	1.18	0.60	0.12	4.93
Películas con PLGA 50:50					
XanCarrPLGA50:50	20.71	1.59	0.85	0.23	3.73
XanCarrPLGA50:50BTCMP0.5%	46.07	1.67	0.85	0.10	8.50
XanCarrPLGA50:50BTCMP1%	29.36	1.40	0.72	0.13	5.39
XanCarrPLGA50:50BTCMP2%	37.06	0.89	0.45	0.07	6.03
Películas con PLGA 75:25					
XanCarrPLGA75:25	10.77	0.90	0.48	0.23	2.05
XanCarrPLGA75:25BTCMP0.5%	39.13	1.43	0.72	0.10	7.44
XanCarrPLGA75:25BTCMP1%	6.02	0.49	0.26	0.22	1.17
XanCarrPLGA75:25BTCMP2%	3.75	0.16	0.09	0.12	0.72

Como se mencionó antes, al agregar fosfato tricálcico con magnesio se presenta una disminución de las repulsiones entre partículas aniónicas de los biopolímeros debido a los cationes presentes en el fosfato. Esto provoca que las películas alteren su estructura y por tanto su comportamiento mecánico sea distinto.

4.6 Perfiles de Liberación

En general el tiempo de tránsito desde la boca a la primera porción del intestino delgado en un humano adulto saludable es de 0.5-2 horas, pero puede retrasarse y ser de 3-6 y de 5-8 horas después del consumo de comidas ligeras o pesadas, respectivamente. Este tiempo es mayor para alimentos sólidos que para líquidos. Asimismo, la edad, las enfermedades y otras condiciones fisiológicas pueden alterar estos tiempos ^[105]. En la Figura 4.20 se presenta el comportamiento de liberación resultante del perfil de disolución llevado a cabo hasta un tiempo máximo de dos horas (ver sección 3.2.2, *Perfil de Liberación*). Este gráfico indica que es un pH básico el que potencia la liberación del fosfato presentándose la máxima liberación a los 60 minutos, mientras que en el pH ácido la máxima liberación se presentó hasta los 90 minutos de exposición. Una vez que el material se pone en contacto con el medio, los polisacáridos se hidratan y se hinchan (dado su carácter hidrofílico) para de este modo acabar por disolverse, dejando expuestas las partículas de PLGA con β -TCMP. En ese momento comienza la degradación de las partículas.

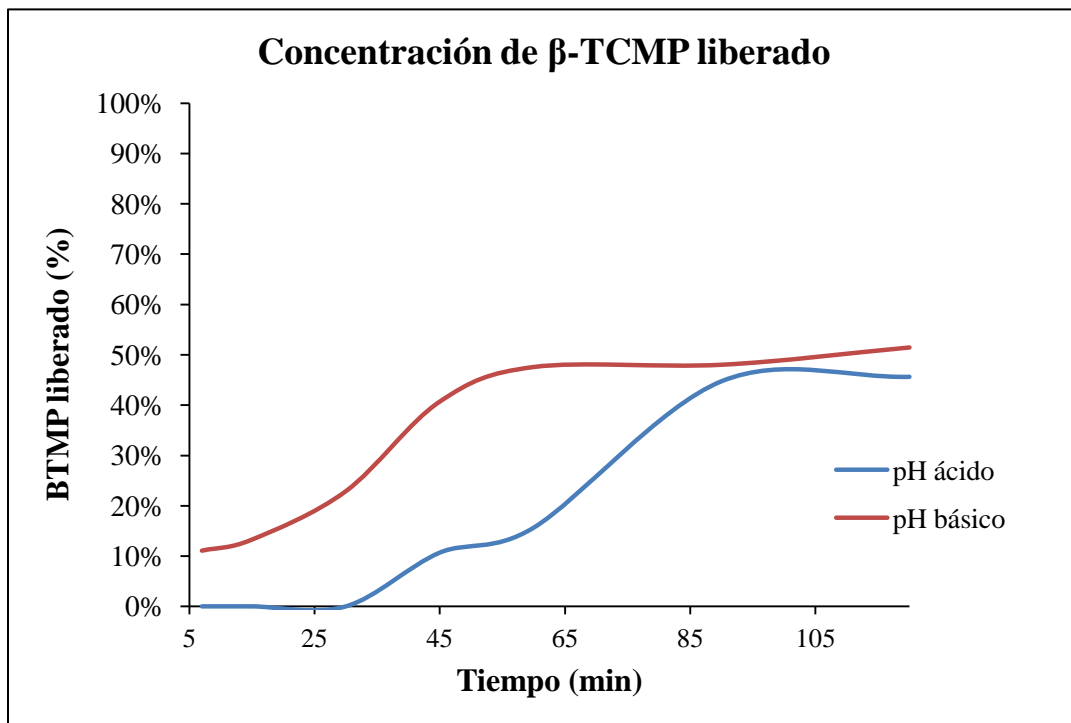


Figura 4.20 Gráfica que presenta la concentración (porcentual) de β -TCMP liberado de la película, con respecto al tiempo que estuvo expuesta al medio.

La degradación del PLGA se debe a la hidrólisis simple del esqueleto éster en disolución acuosa. De manera general esta degradación puede acelerarse mediante una mayor hidrofiliidad, un aumento en las interacciones químicas entre los grupos hidrolizables, menor cristalinidad y un volumen mayor a la relación superficial del dispositivo ^[45]. Asimismo, de acuerdo con K. Makino *et al.*, (1986), la degradación se ve afectada por la concentración de sales en las soluciones buffer, sugiriendo que la reacción de escisión del enlace éster se acelera por la conversión de los productos de degradación ácidos en sales neutras ^[62]. La disolución salival utilizada contiene sales como cloruro de sodio, cloruro de potasio, y en mayor cantidad, bicarbonato de sodio (y el pH de esta disolución fue regulado mediante la adición de HCl), de modo que en el pH básico, al ser más determinante la presencia de estos compuestos, se presenta una aceleración de la degradación del PLGA tal y como lo reportan Makino *et al.*, (1986). Por lo tanto se consigue una liberación más pronta del fosfato. Estos resultados indican que tomando en consideración el tiempo de tránsito de la boca al intestino delgado (que es donde se absorbe el calcio consumido en la dieta), el vector generado mediante la película de biopolímeros representa una opción adecuada para el transporte del fosfato de calcio.

5. CONCLUSIONES

5.1 CONCLUSIONES

Con la metodología empleada se pudieron elaborar películas de biopolímeros con posible aplicación en el transporte de sustancias encapsuladas, brindando un ambiente estable y de fácil manipulación. El proceso de obtención se basa en la elaboración de micropartículas de PLGA actualmente utilizadas con el propósito de distribuir fármacos. Asimismo, el proceso combina la obtención de una película de biopolímeros en la cual estas partículas pueden ser ingeridas.

Las películas elaboradas con el PLGA relación lactida:glicolida 50:50 presentaron tanto características mecánicas como morfología adecuadas para elegir las como vectores de transporte del β -TCMP. En efecto, la disposición del fosfato encapsulado en PLGA presentó una mejor distribución en de la película, y se localiza no sólo en su superficie, sino en los poros formados por la estructura del material.

La desventaja de este vector es que al aumentar la concentración de fosfato, se deteriora la calidad mecánica de la película, además de su microestructura, ya que se acelera la degradación térmica de los biopolímeros y se modifica la morfología de las películas.

Mediante la prueba de liberación se pudo determinar que el β -TCMP, en efecto, se encuentra encapsulado en las partículas de PLGA. En esta prueba se verifica que si un agente terapéutico se encuentra dentro de un vector debe primero ser liberado de dicho producto y generalmente debe ser disuelto en los fluidos con los que entre en contacto para producir su efecto. Por lo tanto, la detección de dicho agente se ve determinada por la disolución del vector. En este caso el β -TCMP no se detectó de inmediato, lo que indica que se debe producir la degradación del PLGA para poder libelarlo al medio. Además, el porcentaje de detección (porcentaje de fosfato liberado) fue aumentando gradualmente conforme el vector estuvo en contacto con el medio.

Finalmente, con base en los resultados obtenidos, se puede afirmar que este tipo de películas presentan características favorables para utilizarlas como sistema de ingestión del β -

TCMP, representando un vector interesante y una alternativa que se puede conservar estable al transportarle, y además, permite su liberación en los sitios de absorción deseados.

Los resultados obtenidos son favorables, sin embargo, se recomienda continuar el estudio del comportamiento del material obtenido en un medio simulado gástrico e intestinal para de este modo, estimar las propiedades de disolución de manera precisa. Igualmente, es de interés observar la interacción de la película y del fosfato en un ambiente fisiológico real, para conocer las características de liberación y de absorción del fosfato, así como realizar una medición adecuada de la degradación de los biopolímeros y de la eficiencia de encapsulamiento.

6. APÉNDICES

Apéndice 1. Técnicas de Caracterización

6.1.1 Potencial Zeta

Las suspensiones coloidales (emulsiones) deben su estabilidad a la carga eléctrica del mismo signo existente entre las partículas coloidales que la forman, de este modo la superficie de la partícula cargada atrae a los iones de la disolución y provoca repulsiones con las otras partículas evitando su asociación y precipitación. Existe una teoría sobre la distribución de los iones en la suspensión, denominada Teoría de la Doble Capa Eléctrica, que considera la disposición de una capa eléctrica formada por la carga superficial fija sobre las partículas (por los contraiones atraídos) y otra en la parte del líquido próxima a la interfase, formada por los iones de carga similar (co-iones) mismos que la superficie repele; sin embargo, en esta distribución de iones también influye la agitación térmica, que tiende a redispersar los iones en la disolución, dando como resultado la formación de una doble capa eléctrica, constituida por la superficie cargada y por un exceso neutralizador de contraiones sobre coiones (el sistema debe ser eléctricamente neutro) distribuidos difusamente en el medio acuoso ^[4, 40, 82], (Figura 6.1).

La teoría de la doble capa eléctrica hace referencia a la distribución de los iones, y por consiguiente, a la magnitud de los potenciales eléctricos que se encuentran en las proximidades de la superficie cargada ^[4]. El potencial eléctrico de un plano es igual al trabajo contra las fuerzas electrostáticas necesario para llevar una unidad de carga eléctrica desde el infinito (desde la masa de la disolución, en este caso) hasta ese plano ^[82]. Como se observa en la Figura 6.1, la capa doble se encuentra dividida en dos partes: la interna (capa de Stern), que puede incluir iones adsorbidos, y la difusa (capa de Gouy-Chapman) en la que los iones se distribuyen por efecto de las fuerzas eléctricas y en movimiento térmico aleatorio. Un plano separa las dos partes de la capa doble, éste se denomina plano de Stern, y las mantiene separadas de la superficie una distancia aproximada de un radio de ion hidratado: de modo que los contraiones pueden mantenerse en la superficie debido a la atracción electrostática y el centro de estos iones hidratados forma el plano de Stern (línea punteada en la Figura 6.1) ^[4]. Alejándose de la superficie de la partícula hacia el cuerpo de la disolución, en dirección al eje horizontal, el potencial cambia de manera lineal entre el V_0 (potencial superficial) y el V_s (potencial de Stern) en la capa de Stern y desciende de manera gradual exponencialmente entre V_s y cero en la capa

difusa. La capa difusa llega gradualmente a su fin a medida que la composición se aproxima a la del líquido, donde la concentración de aniones se iguala con la de cationes y el potencial se aproxima asintóticamente a cero. Considerando el punto final indefinido, de manera arbitraria se le asigna al espesor δ de la capa difusa el valor de la distancia a lo largo de la cual el potencial, en el límite entre las capas de Stern y Gouy-Chapman, cae a $1/e = 0.37$ de su valor ^[4, 82].

Además de los iones presentes en la capa de Stern, una determinada cantidad de didisolvente se unirá a los iones y la superficie cargada. Esta capa solvatante, conocida como superficie o plano de deslizamiento, se mantiene junto a la superficie y el borde de la capa, y representa el límite del movimiento relativo entre el sólido (y el material adherido) y el líquido. El potencial existente en el plano de deslizamiento recibe el nombre de potencial zeta (V_z) o potencial electrocinético, no incluye la capa de Stern e incluye sólo la parte de la capa difusa que se encuentra por fuera de la cubierta de hidratación, este potencial electrocinético corresponde entonces al de la zona en la que la velocidad es cero, pero donde el gradiente no es nulo: todas las moléculas que están más cerca de la superficie no se mueven, ya sea porque están absorbidas, o porque son moléculas de soluto que solvatan iones adsorbidos. Si hay poca adsorción y si la doble capa es bastante extendida el potencial zeta es aproximadamente igual al potencial de la superficie; sin embargo, en otros casos el potencial zeta puede ser considerablemente diferente del potencial de superficie ^[4, 82, 91].

El potencial es importante dado que se puede medir su magnitud mediante la microelectroforesis o cualquier otro de los fenómenos electrocinéticos ^[4, 82]. El potencial zeta puede ser una manera efectiva de monitorear el comportamiento del coloide, puesto que indica cambios en el potencial de la superficie y en las fuerzas de repulsión de los coloides ^[63]. La repulsión electrostática depende de:

- V_0 , es decir, de la densidad de la carga en la superficie de la partícula.
- El espesor de la doble capa.

Estos factores gobiernan la magnitud del potencial zeta. Añadiéndole aditivos al sistema acuoso, mismos que pueden reducir o aumentar el potencial de Stern, se puede por lo tanto, variar el potencial zeta ^[82]. Si las partículas en suspensión tienen un potencial zeta alto (negativo o positivo) tenderán a repelerse unas a otras y no habrá tendencia a unirse; sin embargo, si las

partículas tienen un valor de potencial zeta bajo, tenderán a unirse (agregándose o floculando). Generalmente la línea divisoria entre suspensiones estables e inestables se toma ya sea entre +30mV o -30mV, de modo que, partículas con potenciales zeta más positivos que +30mV o más negativas que -30mV son usualmente consideradas estables ^[63].

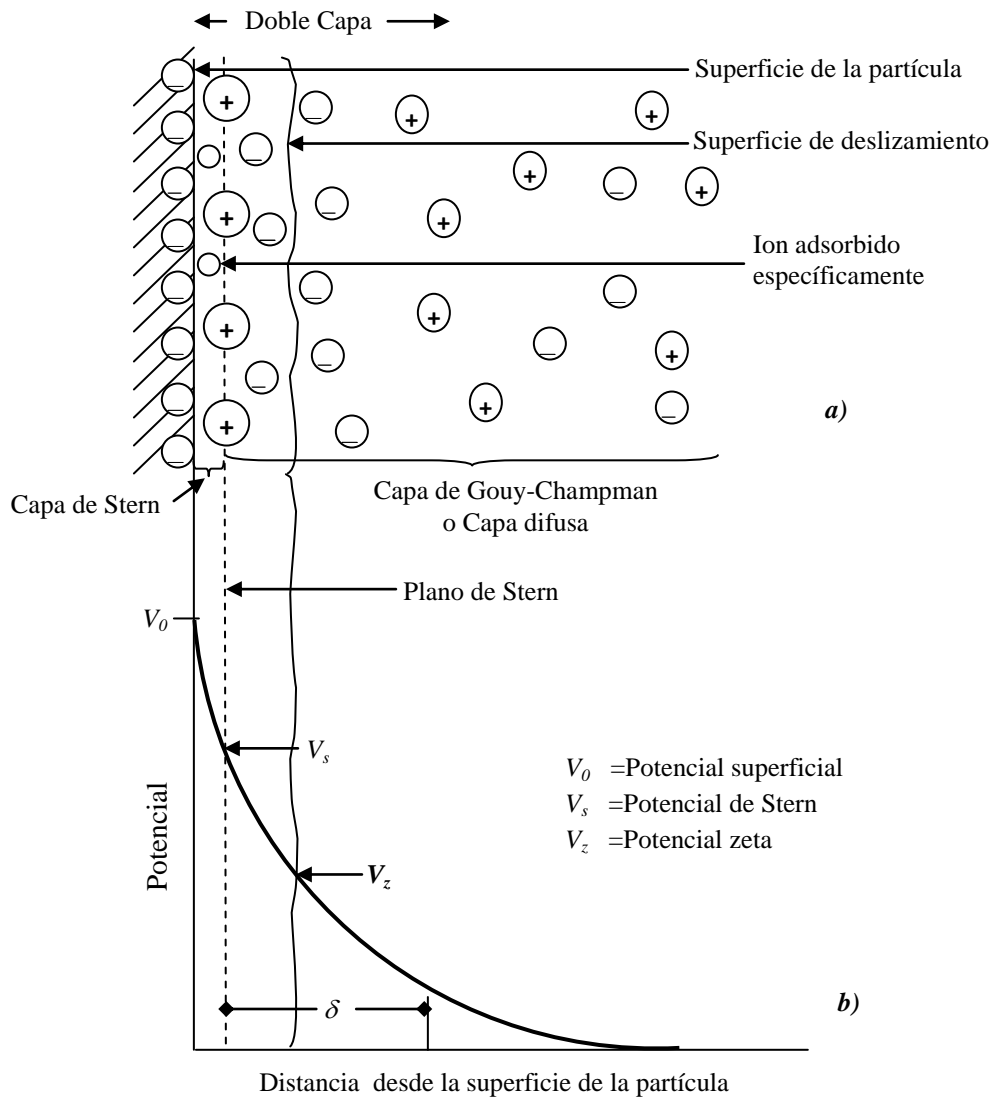


Figura 6.1 a) Representación esquemática de la Teoría de la Doble Capa, b) Variaciones en el potencial con la distancia a la superficie de la partícula. Adaptado de [4, 82].

6.1.2 Microscopía Electrónica de Barrido, (MEB)

El microscopio electrónico de barrido es uno de los instrumentos más versátiles disponibles para la examinación y análisis de las características microestructurales de objetos sólidos. Su principio de funcionamiento consiste en enfocar sobre una muestra electrodensa (opaca a los electrones) un fino haz de electrones acelerado con energías de excitación desde 0.1kV hasta 50kV. El haz se desplaza sobre la superficie de la muestra realizando un barrido que obedece a una trayectoria de líneas paralelas, se crea una zona tridimensional donde interaccionan los electrones del haz y los átomos de la muestra: zona de excitación primaria. En esta zona se pueden emitir siete tipos de señales fundamentales:

- | | |
|--------------------------------|---|
| a) ELECTRONES TRANSMITIDOS | Electrones que atraviesan la muestra y emergen por su cara inferior, cuando el haz logra atravesar el espesor de la muestra. |
| b) ELECTRONES RETRODISPERSADOS | Electrones incidentes que chocan con los núcleos o con los electrones de los átomos de la muestra, rebotan y escapan de ella (interacción elástica). |
| c) ELECTRONES SECUNDARIOS | Alguno de los electrones incidentes o retrodispersados colisionan con un electrón de los átomos que constituyen la muestra (colisión inelástica), el átomo se ioniza y puede emitir estos electrones. Tipo 1: producidos por electrones incidentes. Tipo 2: producidos por electrones retrodispersados. Escapan en diferentes direcciones y pueden recogerse para formar una imagen tridimensional del espécimen. |
| d) FOTONES | Debidos a colisiones inelásticas. |
| e) ELECTRONES AUGER | Emitidos cuando un electrón de la capa externa de un átomo de la muestra “salta” a una capa más profunda por efecto de la interacción del átomo con los electrones incidentes o retrodispersados. Proporcionan información muy precisa de la superficie. |

f) RAYOS X

El choque de un electrón con un átomo de la muestra produce la emisión de un electrón, el “hueco” dejado es ocupado por otro electrón situado en la capa más externa al electrón desalojado, el exceso de energía es liberada en forma de rayos X característicos utilizados para determinar composición elemental

g) CORRIENTE DE ESPÉCIMEN

El balance resultante entre los electrones incidentes y los emitidos da lugar a una corriente.

Las señales generadas como resultado de la interacción del haz de electrones con el espécimen se utilizan para obtener distintos tipos de información ^[10]. Las imágenes de MEB se producen colectando los electrones transmitidos en un tubo de rayos catódicos. A continuación se describe una de las técnicas de MEB más utilizada y dos de los principales imágenes producidas:

- *Análisis elemental por rayos X.* La energía liberada en formar los rayos X es característica del átomo que es excitado, formando de este modo, diversos picos en el espectro de energía de acuerdo con la composición del material (cada elemento químico tiene una estructura electrónica única, y una respuesta particular a las ondas electromagnéticas). Por lo tanto, ésta es una técnica analítica para determinar la composición elemental de un compuesto ^[72], llamada Espectroscopía por Dispersión de Energía de Rayos X, (EDS, del inglés Energy Dispersive Spectroscopy).
- *Imágenes por electrones secundarios.* Utilizadas principalmente para contraste topográfico, para la visualización de la superficie del espécimen, su textura y rugosidad ^[114].
- *Imágenes por electrones retrodispersados.* Usados para la diferenciación de elementos en un espécimen basándose en el contraste de acuerdo con el número atómico ^[10].

El microscopio electrónico de barrido puede subdividirse en varios sistemas de componentes que llevan a cabo diferentes funciones:

- Elemento productor del haz de electrones o cañón electrónico (Filamento de tungsteno, de hexaboruro de lantano o de emisión de campo).
- Conjunto de lentes electromagnéticas y diafragmas.

- Sistema generador de barrido (permite explorar la muestra).
- Platina que permite sujetar y orientar la muestra respecto al haz de electrones.
- Detector que permite recoger y amplificar la señal de interacción electrones-muestra.
- Sistema productor de vacío.

Esta técnica no es destructiva, y los análisis se pueden obtener con una resolución del orden de 1 μm .

6.1.3 Termogravimetría, (TGA)

Se conoce como *análisis térmico* al conjunto de técnicas en las que se monitorea una propiedad física de una sustancia y/o de sus productos de reacción en función de la variación de la temperatura en una atmósfera controlada. La sustancia se somete a un programa de temperatura controlado. El resultado gráfico obtenido se denomina *curva de análisis térmico* ^[99]. El Análisis Termogravimétrico (TGA) es una técnica analítica en la que se monitorea el peso de una sustancia en función de la temperatura o del tiempo, siguiendo un programa de temperatura controlado ^[26, 79]. Se pueden distinguir tres tipos básicos de análisis ^[99]:

- TGA isotérmico: Se mantiene la temperatura constante registrando los cambios de peso.
- TGA *cuasi* isotérmico: La muestra a analizar se calienta mientras el peso es constante y se estabiliza la temperatura mientras se van produciendo los cambios de peso.
- TGA dinámico: La muestra se calienta en una atmósfera controlada con una rampa de temperatura establecida.

Los datos se presentan en forma de una curva térmica TG (conocida también como *termograma*), del peso contra la temperatura, o del peso porcentual de la muestra remanente contra la temperatura o el tiempo ^[26], (ver la Figura 1.11). Las curvas termogravimétricas son características de un compuesto o material dado debido a la secuencia única de las transiciones físicas y las reacciones químicas que ocurren en intervalos definidos de temperatura ^[111].

Un analizador TG consiste principalmente en un platillo o crisol, también conocido como portamuestras, donde la muestra se coloca. Este portamuestras se encuentra en contacto o próximo a un sensor que detecta la temperatura y sus variaciones durante el experimento,

asimismo consta de una balanza de precisión (termobalanza) que permite la medida continua del peso de la muestra en función de la temperatura o tiempo. El portamuestras yace en un horno que se calienta o se enfría durante el proceso. El sistema también cuenta con una purga de gas que permite el control del ambiente en el que se desarrolla el experimento y un procesador para el control y programación de la temperatura [26, 79, 99]. Para una muestra dada, la variación del peso en función de la temperatura suministra información sobre la estabilidad térmica y la composición de la misma, la estabilidad térmica y la composición de los intermedios que puedan formarse durante el análisis y de la composición del residuo que queda al final del experimento [99]. El trazo de la primera derivada, con respecto al tiempo o de la temperatura, corresponde a una técnica conocida como “temogravimetría derivada (DTG)”, la curva térmica resultante se debe a la variación de la pérdida de masa contra la temperatura. La curva DTG representa el resultado del mismo experimento que la curva TG (variación del peso frente a la temperatura o el tiempo), pero de forma diferente. Una curva TG de un compuesto puro puede considerarse como característica del compuesto, debido a la secuencia de procesos fisicoquímicos que experimenta en determinadas condiciones en un intervalo de temperaturas. Si se representa el porcentaje de peso en función de la temperatura, podemos relacionar las variaciones de peso con las estequiometrias de las reacciones, lo cual nos conduce directamente al análisis cuantitativo de muestras cuya composición cualitativa se desconoce. La mayoría de los autores están de acuerdo en reconocer que el uso de las curvas DTG en lugar de las TG es mejor, puesto que un pequeño cambio en la curva de TG se ve mejor definido en la DTG [14].

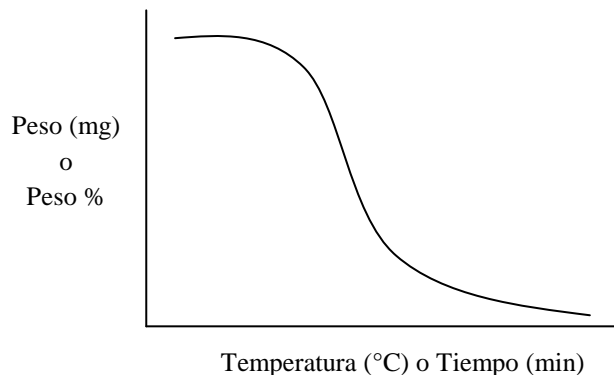


Figura 6.2 Típica presentación de los datos de una curva térmica TGA. Las abscisas pueden ser tiempo o temperatura, y las ordenadas pueden ser el peso o el peso porcentual. *Adaptado de [79].*

6.1.4 Prueba de Textura

La aplicación de un material depende de su comportamiento bajo ciertas condiciones, es decir, su funcionamiento está críticamente definido por sus propiedades mecánicas, dado que éstas reflejan directamente la naturaleza y la microestructura del material, así como los posibles efectos que sobre él puedan tener la temperatura, la aplicación de esfuerzos y los cambios químicos, entre otros factores ^[3]. Tomando en cuenta que la finalidad de las películas formadas es ser utilizadas como suplemento de calcio, la aplicación final de este material será un producto alimenticio.

La *textura*, se define como el conjunto de atributos: mecánicos, geométricos y superficiales que de modo subjetivo son apreciados por los sentidos (vista, tacto, oído), y que hacen referencia a la impresión percibida de su peculiaridad física, en cuanto resultado de una deformación sufrida por el alimento ^[8, 87]. De este modo, la *textura* siempre se manifiesta como una consecuencia externa de un cambio en la disposición de los elementos estructurales, o de los diversos componentes químicos, así como de sus combinaciones ^[8]. Los alimentos exhiben una amplia variedad de texturas y propiedades reológicas, por lo que se emplean diversos métodos para estimar dichas propiedades, entre los que destacamos tres clases:

- *Métodos Fundamentales*: En ellos se estiman las propiedades que son útiles para cálculos en ingeniería, por ejemplo elasticidad, relación de Poisson y varios módulos como rigidez, compresión y módulo de Young.
- *Métodos Empíricos*: En estos métodos se evalúan las variables generalmente no muy bien definidas, pero que están relacionadas con algunos atributos mecánicos, como rigidez, punción y extrusión. En el pasado, la mayoría de los atributos de textura de alimentos fueron estimados por este tipo de métodos.
- *Métodos Imitativos*: En estos métodos, se intenta imitar con instrumentos mecánicos las condiciones de masticación del alimento en la boca ^[66].

Actualmente existe un gran número de instrumentos para medir el comportamiento mecánico de los alimentos sólidos, cuyas características principales son:

- Pueden realizar diferentes tipos de prueba con un mismo equipo, adaptando celdas de carga o de diversas geometrías.

- Registran la variación de la resistencia que opone el alimento a la fuerza aplicada y mediante este registro obtienen información más amplia sobre el comportamiento mecánico del alimento durante los procesos de deformación y de rotura.

Estos instrumentos, denominados de manera general *Texturómetros Universales* constan de tres partes esenciales:

1. La celda de carga, con la que se aplica la fuerza.
2. El sistema motriz, que produce el desplazamiento de la celda de carga.
3. El sistema que mide y registra la respuesta mecánica de la muestra ^[66] (Programa de PC en nuestro caso).

La *textura* está gobernada por una combinación de las propiedades mecánicas y de fractura y su modificación y expresión durante el proceso de masticación. Es probablemente imposible medir la *textura* en una máquina, aunque es posible identificar los factores principales que rigen la *textura* de un material alimentario y medirlos, estimando una parte de su *textura*. Existen diferentes tipos de ensayos aplicables sobre los alimentos. Ensayos de materiales y su interacción con las variables estructurales y de proceso que permiten determinar un atributo particular. Se debe seleccionar el que mejor contribuya a estudiar la característica de *textura* que se está considerando ^[87]. De este modo, utilizando un *Texturómetro Universal* se puede analizar la *textura* mediante un ensayo de tensión. Este tipo de ensayos determinan una gran variedad de propiedades mecánicas de los materiales. En este trabajo con los datos obtenidos a partir de este ensayo se estimaron:

- El **módulo elástico** o módulo de Young es un parámetro característico de cada material que indica la relación existente en la zona de comportamiento elástico de dicho material entre los incrementos de tensión aplicados en el ensayo de tracción y los incrementos de deformación relativa producidos. El módulo de elasticidad es constante durante la zona elástica del material, indicando un comportamiento lineal en el mismo (ley de Hooke). Se puede entonces determinar el módulo elástico de un material mediante la relación $E = \frac{\sigma}{\varepsilon}$, donde σ es el esfuerzo aplicado y ε es la deformación producida. En un diagrama esfuerzo-deformación el módulo elástico es la pendiente en la región elástica ^[3]. La

deformación ingenieril o de Cauchy, que se expresa como la razón de cambio dimensional entre la dimensión inicial: $\varepsilon_{eng} = \frac{\Delta l}{l_0}$, es suficiente para la mayoría de los materiales que

soportan cargas. Sin embargo, muchos materiales alimenticios muestran deformaciones muy grandes, que no se pueden describir adecuadamente por la deformación ingenieril, por lo que la deformación de Hencky es más adecuada debido a que considera los cambios de dimensión instantáneos durante el estiramiento ^[87]. Esta deformación se expresa como el logaritmo natural de la longitud extendida dividida por la longitud

original: $\varepsilon_h = \int_{l_0}^l \frac{dl}{l} = \ln\left(\frac{l}{l_0}\right)$ ^[87], a valores de deformación pequeños (<10%), estos

números no son muy diferentes, pero más allá, se desvían considerablemente. Asimismo, dadas las limitaciones analíticas del esfuerzo ingenieril (σ_{eng}), que sólo ofrece cálculos basados en el área original, se considera más adecuado el esfuerzo corregido (σ_c), que permite establecer una relación entre el esfuerzo constante aplicado y el área de la sección instantánea sobre la que ocurre la deformación durante el estiramiento.

- La **cohesividad** se puede definir como la tendencia de un material a mantenerse unido ^[87], caracterizada por la resistencia presentada por las uniones internas de un alimento al ser deformado ^[8]. Expresada como el desplazamiento en la muestra provocado por la aplicación de la fuerza hasta el momento de su fractura ^[66].
- **Fuerza de fractura**, el máximo valor de carga soportado por el material antes de romperse.
- La **rigidez** es la capacidad de un material para conservar su forma ante la aplicación de un esfuerzo. El módulo de elasticidad proporciona una medida de la rigidez intrínseca del material sometido a esfuerzos de tensión (o compresión). Mientras más alto sea el módulo de elasticidad de un material más elevada la rigidez de éste, y ello significa que ante las tensiones de trabajo se deforma muy poco ^[3], (ver Figura 1.13). Se expresa como la razón de la fuerza de fractura entre el valor de la cohesividad ^[66].

La Figura 6.3, ilustra la relación entre el módulo de Young y la rigidez. En el inciso a) se muestra una gráfica esfuerzo-deformación en la que podemos observar claramente que la muestra B tiene un módulo de Young mayor que el presentado por la muestra A (su pendiente es mayor).

Por otro lado, en el inciso b) se presenta una gráfica fuerza-desplazamiento en la que mediante el cociente de la fuerza de fractura entre la cohesividad podemos determinar el valor de rigidez, de modo que se observa que el valor de rigidez para la muestra B es mayor que el de la muestra A. Así se puede constatar que mientras más alto sea el módulo de Young de un material más elevada la rigidez de éste, lo que indica que ante esfuerzos de tensión el material se deforma poco.

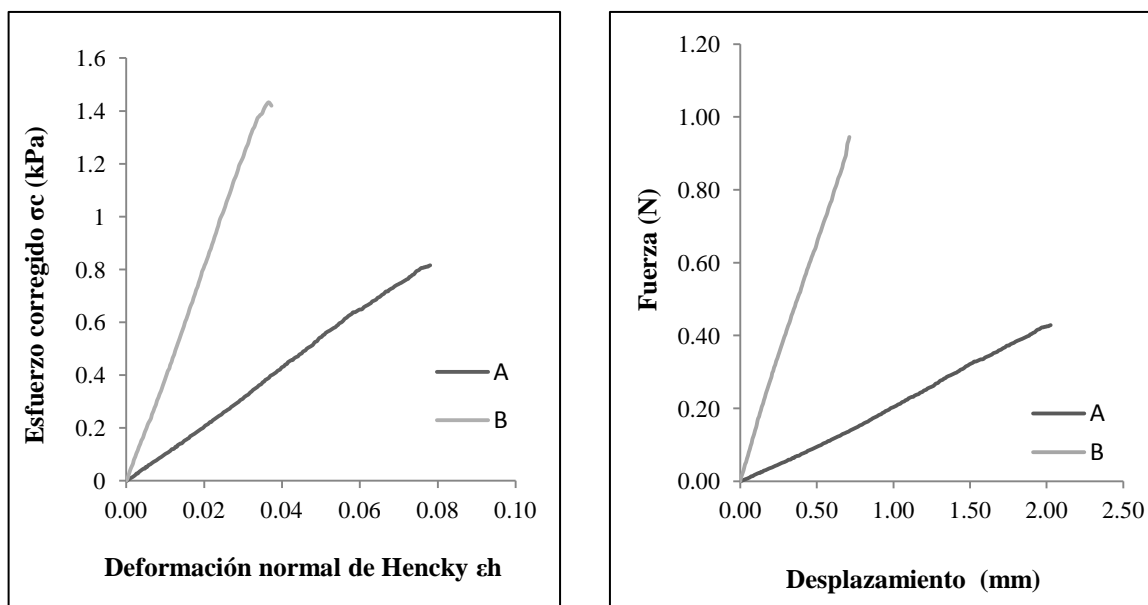


Figura 6.3. Relación entre el módulo de Young y la rigidez.

6.1.5 Perfiles de Liberación

Las películas a elaborar constituirán un sistema de ingestión que contenga el fosfato de calcio, bajo esta premisa, la determinación preliminar del encapsulamiento y de la liberación del fosfato se realizó mediante la elaboración de perfiles de disolución de la película, adaptando este modelo de liberación de fármacos muy utilizado actualmente ^[81, 86]. Los perfiles de disolución se utilizan cada vez más para evaluar las características de liberación de diversos productos farmacéuticos. La importancia de este método radica en el hecho de que si un agente terapéutico debe producir su efecto a partir de un producto, debe liberarse de dicho producto y generalmente debe disolverse en los fluidos del tracto gastrointestinal (GI). Por lo que la prueba de disolución debe considerarse como indicador de la liberación potencial del agente y de las características de absorción de un producto tanto en humanos, como en animales ^[81]. Además, la disolución es un

requerimiento para la aprobación reglamentaria de un producto para su comercialización y es un componente vital del programa general de control de calidad ^[73]. Esta técnica nos ayuda a estimar la velocidad (cantidad/tiempo) y la extensión (cantidad total) según las cuales el agente se libera a partir de nuestro sistema. Es importante mencionar la diferencia entre una prueba de disolución, en la cual se analiza la muestra a un solo tiempo, y un perfil de disolución en el que se cuantifica el agente a partir de muestras a diferentes tiempos.

De manera general, en estos perfiles el ambiente del tracto gastrointestinal (GI) se representa mediante un medio simulado (agitado suavemente) que cumpla con las especificaciones de pH (en un rango entre 4-7.5). Se determina el porcentaje acumulativo de agente disuelto en un número de puntos (muestras tomadas en distinto tiempos) y se puede reportar como una gráfica comparativa del porcentaje de agente disuelto contra puntos blanco a los mismos tiempos. La gráfica resultante es conocida como “Perfil de Disolución” ^[81].

El método adaptado en este trabajo es el conocido como técnica de tubos de diálisis (Rojas-Oviedo, *et al.*, 2012), que en resumen se describe a continuación ^[86]:

- Se disuelve el material en el medio simulado.
- La disolución se vierte en un tubo de diálisis, manteniendo el sistema agitado lentamente, a una temperatura constante (37 °C).
- Se realiza toma de muestras de la disolución a diferentes tiempos.
- Se mide la absorbancia de las muestras adquiridas en un espectrofotómetro UV-Vis.
- Se establece la concentración utilizando una curva de calibración de una disolución de agente de concentración conocida.

• *Espectrofotometría UV-Vis (Ultravioleta y Visible)*

La espectrofotometría se basa en la medida de la absorción por las diferentes sustancias, de una radiación electromagnética de longitudes de onda situadas en una banda definida y estrecha, esencialmente *monocromática*. La banda espectral empleada en las mediciones se extiende desde las longitudes de onda corta de la zona ultravioleta hasta la visible del espectro (UV de 190 nm a 380 nm y la visible de 380 nm a 780 nm). En general, los espectros ultravioleta y visible de una sustancia, no tienen un alto grado de especificidad, sin embargo, son muy

adecuados para las valoraciones cuantitativas y en el caso de muchas sustancias constituyen un medio útil de identificación adicional. La energía de un haz radiante disminuye con la distancia que viaja a través de un medio absorbente. También disminuye en relación con la concentración de iones o moléculas absorbentes presentes en el medio. Estos dos factores determinan la proporción de la energía incidente total que se transmite ^[97]. La relación entre la absorción de luz por una disolución diluida o por un gas y la concentración de la fase absorbente viene dada por la ley de Beer. Mientras que la relación entre la absorción de la luz y la trayectoria recorrida por ésta, viene dada por la ley de Lambert, es conveniente considerar ambas leyes conjuntamente ^[109] en la que conocemos como Ley de Lambert-Beer. Esta ley es una ecuación fundamental en los métodos espectrométricos de análisis, ya que permite calcular la concentración de una sustancia a partir de la radiación absorbida por una didisolución de la misma ^[99].

$$A = a \cdot b \cdot C$$

Donde:

A, es la *absorbancia*. $A = \log_{10}\left(\frac{1}{T}\right)$, logaritmo base 10 del inverso de la transmitancia (*T*) ^[97].

a, es la *absortividad* ^[99], que es una constante de proporcionalidad independiente de la concentración, paso de luz e intensidad de la radiación incidente. La absortividad depende de la temperatura, del disolvente, de la estructura molecular y de la longitud de onda de la radiación, y sus unidades dependen de *b* y de *C*. También es conocida como *coeficiente de extinción* (específica o molar, dependiendo de sus unidades) ^[15].

b, es la trayectoria del haz incidente (camino óptico) ^[99].

C, es la concentración de la disolución ^[99].

De manera general, todos los tipos de espectrofotómetros están diseñados de modo que permitan el paso de la energía radiante esencialmente monocromática a través de la sustancia de prueba (contenida en una celda portadora) y hagan posible la medición de la fracción de la intensidad de la radiación transmitida. El espectrofotómetro consta de una fuente de energía, de un dispositivo dispersante, por ejemplo un prisma o una grátícula (rejilla de difracción), de rendijas para seleccionar la banda de longitudes de onda (monocromador), de una celda o portador de la sustancia de prueba, de un detector de la energía radiante, amplificadores asociados y dispositivos de medición y registro ^[97].

El procedimiento experimental para el análisis cuantitativo utilizando la Ley de Lambert-Beer implica la preparación de una curva de calibración que permita relacionar el valor de la absorbancia del analito que queremos determinar con su concentración ^[99], para obtener esta curva se deben graficar las lecturas de las absorbancias obtenidas con las disoluciones de referencia contra sus respectivas concentraciones y trazar la curva patrón. Para determinar la concentración de la disolución de la muestra, se interpola en la curva patrón la absorbancia obtenida con la disolución de muestra, y sobre esta base, se calcula el resultado de la valoración. Es posible hacer el cálculo del resultado de la valoración utilizando el análisis de regresión lineal ^[97].

Apéndice 2. Obtención del Fosfato Tricálcico (β -TCP) mediante la técnica sol-gel asistida con ultrasonido.

Para la obtención del fosfato tricálcico sin magnesio, se adaptó el método síntesis por sol-gel utilizado por Gomes S., *et al.*, (2009). Modificando el proceso de modo que para favorecer la nucleación y proporcionar energía para la condensación se asistió la técnica mediante ultrasonido. El procedimiento seguido se describe a continuación.

Se utilizaron nitrato de calcio tetrahidratado [$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$] (Fermont S.A. de C.V.) y pentaóxido de difósforo [P_2O_5] (Sigma-Aldrich) en relación molar Ca/P de 1.5. Se diluyeron estos compuestos en la proporción mencionada mediante Etanol 99%, a 40 °C y agitación constante. Posteriormente, esta disolución se colocó en un baño ultrasónico (Branson 1510, 70W, 42KHz) durante 18 horas. Luego, se calentó la disolución a 60 °C durante 5 horas para evaporar el etanol. Se concluyó el secado en una estufa a 85 °C durante 10 horas, hasta obtener un polvo blanco que finalmente se calcinó a 1100 °C durante 10 horas. Teniendo un proceso de 43 horas en total.

Mediante esta técnica fue posible obtener la fase de fosfato tricálcico deseada β -TCP [$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$], lo cual se puede ver a través del difractograma obtenido (Figura 6.4).

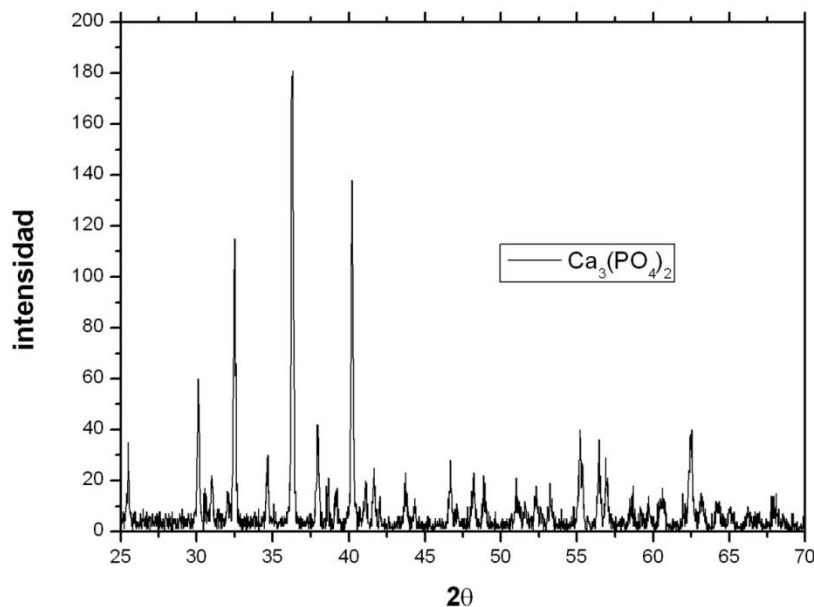


Figura 6.4 Difractograma del fosfato obtenido, mostrando la fase de $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$.

Asimismo, se observaron los cristales obtenidos mediante MEB. La Figura 6.5 muestra una región característica del β -Fosfato Tricálcico. Se puede observar que presentan una estructura geométrica regular con pequeños poros alternados. La amplificación empleada fue de 2500X y la barra de la figura muestra la escala correspondiente a 10 μm .

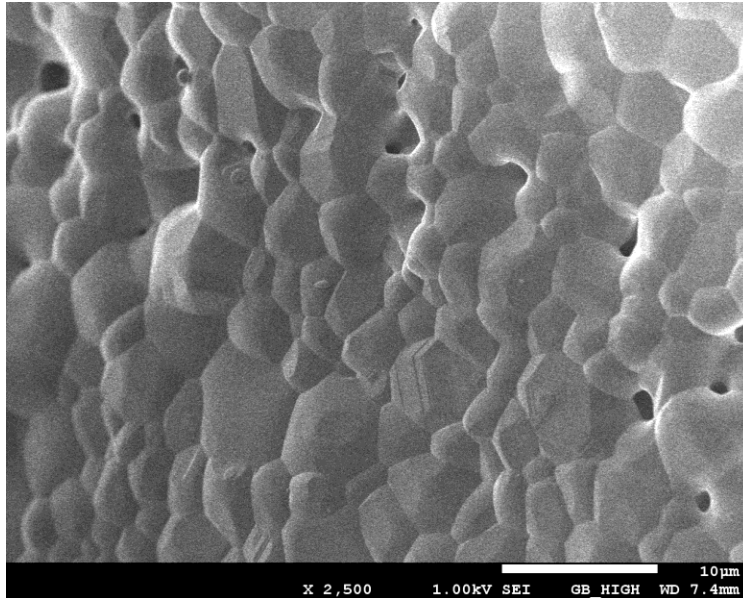


Figura 6.5 Imagen de MEB de una región característica de la fase de $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$.

Mediante la implementación de este método se redujo el tiempo de obtención de β -TCP (por la técnica de sol-gel) de 73 horas^[36] a 43 horas. Permitiendo así un ahorro de tiempo y energía considerables en la obtención de esta fase.

Apendice 3. Características de la goma Xantana y de la κ -Carragenina

6.3.1 Goma Xantana

Es un heteropolisacárido con una estructura primaria consistente en unidades repetidas de pentasacáridos formada por dos unidades glucosa, dos unidades manosa, y una unidad de ácido glucurónico, en relación molar 2.0:2.8:2.0 (ver Figura 6.6). Las disoluciones de xantana obtenidas mediante disolución a temperatura moderada tienden a ser altamente viscosas. Este polisacárido no es tóxico y no inhibe el crecimiento, tampoco es sensibilizante ni provoca irritación ocular o en la piel, de modo que la xantana ha sido aprobada por la FDA (*Food and Drug Administration*) en los Estados Unidos de América para su utilización como aditivo alimenticio sin ninguna limitación específica. Así pues la goma xantana es utilizada como espesante de disoluciones acuosas, estabilizador de emulsiones y suspensiones, tanto en la industria farmacéutica como en la alimenticia, agrícola y cosmética ^[34].

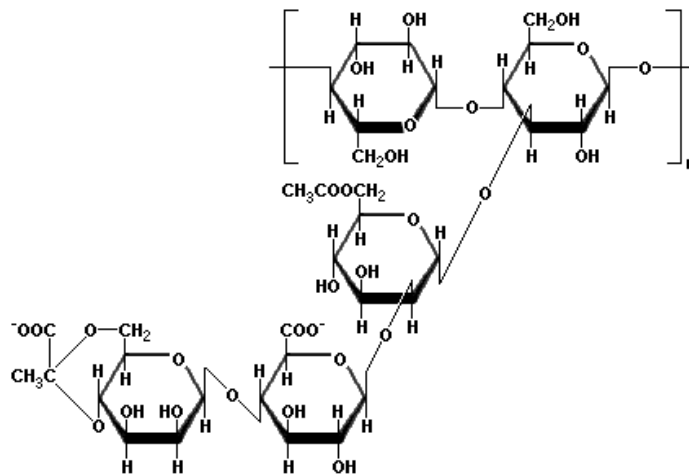


Figura 6.6. Estructura de la goma Xantana (polisacárido de la *X. campestris*). Adaptado de [34].

6.3.2 κ -Carragenina

Carragenina es el nombre genérico con el que se conoce a una familia de polisacáridos obtenidos mediante extracción a partir de ciertas especies de algas marinas rojas (*Rhodophyta*). Estos polisacáridos usualmente se dividen en seis formas básicas: Iota (ι -), Kappa (κ -), Lambda (λ -), Mu (μ -), Nu (ν -) y Theta (θ -) carragenina, y forman parte de una familia de galactanos

sulfatados hidrofílicos, podemos observar la estructura de la κ -carragenina en la Figura 6.7. El código de letras asignado a los residuos corresponde a la denominación simplificada desarrollada por Knutsen y colaboradores. Todas las carrageninas son solubles en agua, e insolubles en disolventes orgánicos, aceites o grasas. Son utilizados en varios productos tales como fármacos, cosméticos textiles, entre otros. Este

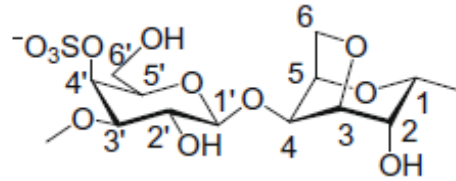


Figura 6.7. Representación esquemática de la estructura de la unidad dimérica repetitiva de la κ -carragenina. Adaptado de [57].

polisacárido estabiliza dentífricos, absorbe fluidos corporales cuando se lo formula en vendajes, mientras que en lociones y shampoos es utilizado ya que interacciona con el caroteno humano para brindar piel suave y cabello más sedoso. Se ha probado que es muy útil como excipiente en tabletas debido a la buena compatibilidad, gran solidez y viscoelasticidad persistente de las tabletas durante su compresión. En el área de la biomedicina se han elaborado nanocompuestos porosos mediante la coprecipitación de fosfatos de calcio dentro de matrices de κ -carragenina, viables para ingeniería de tejido óseo [57].

Apéndice 4. Determinación de la concentración adecuada de Xantana y Carragenina

En la siguiente tabla se muestran seis películas elaboradas con distintas concentraciones de Xantana y Carragenina, con el objetivo de obtener la concentración de polímeros más adecuada para utilizar en el sistema, utilizando como referencia el fosfato sin magnesio y el PLGA 50:50.

Tabla 6.1. PELÍCULAS ELABORADAS CON DISTINTAS CONCENTRACIONES DE XANTANA Y CARRAGENINA

Película	Contenido (porcentaje de la disoluciónvertida, p/v)			
	Xantana	Carragenina	PLGA 50:50	β -TCP
XanCarr0.13PLGA50:50	0.13%	0.13%	2.5%	-
XanCarr0.13PLGA50:50BTCP	0.13%	0.13%	2.5%	0.5%
XanCarr0.25PLGA50:50	0.25%	0.25%	2.5%	-
XanCarr0.25PLGA50:50BTCP	0.25%	0.25%	2.5%	0.5%
XanCarr0.38PLGA50:50	0.38%	0.38%	2.5%	-
XanCarr0.38PLGA50:5BTCP0	0.38%	0.38%	2.5%	0.5%

Las películas elaboradas para determinar la concentración adecuada de Xantana y Carragenina, presentaron los potenciales zeta mostrados en la Tabla 6.2. Con base en los valores del potencial zeta y la diferencia entre el potencial de la película control (sin fosfato) y el potencial de la película con fosfato, las películas con concentración de Xantana y Carragenina al 0.25% respectivamente, conservan mayor estabilidad que las demás concentraciones (potencial zeta más negativo). Además, la diferencia entre los potenciales es menor, lo que señala que se desestabilizan menos al agregar el fosfato. Por lo tanto, se concluyó que dicha concentración de Xantana y Carragenina sería la adecuada para elaborar las películas posteriores.

Tabla 6.2. POTENCIALES DE LAS PELÍCULAS ELABORADAS PARA DETERMINAR LA CONCENTRACIÓN DE XANTANA Y CARRAGENINA A UTILIZAR

Película	Potencial Zeta (mV)	Diferencia
XanCarr0.13PLGA50:50	-74.3	15.5 mV
XanCarr0.13PLGA50:50BTCP	-58.8	
XanCarr0.25PLGA50:50	-70	10.3 mV
XanCarr0.25PLGA50:50BTCP	-59.7	
XanCarr0.38PLGA50:50	-75.9	16.4 mV
XanCarr0.38PLGA50:5BTCP0	-59.5	

Apéndice 5. Comportamiento de las películas elaboradas con fosfato tricálcico sin Mg (β -TCP)

Se elaboraron las películas con β -TCP (fosfato tricálcico sin magnesio) con el propósito de determinar de manera preliminar las variaciones estructurales apreciables al agregar el fosfato. De modo que sólo se caracterizaron por potencial zeta y MEB.

Los potenciales zeta presentados por las películas elaboradas con fosfato tricálcico sin magnesio fueron de valores negativos, de 59.6 mV para la película con PLGA 50:50 y de 66.1 mV para la película con PLGA 75:25, de acuerdo a estos resultados la película más estable sería entonces aquella con el potencial menor (ver Apéndice 1, *Potencial Zeta*), por lo que se decidió trabajar con ella en la caracterización estructural por MEB.

Tabla 6. 3. VALORES DE LOS POTENCIALES ZETA DE LAS PELÍCULAS CON β -TCP

Película	Potencial Zeta (mV)	Diferencia con la película control
XanCarrPLGA50:50BTCP0.5	-59.7	+10.3 mV
XanCarrPLGA75:25BTCP0.5	-66.1	+14 mV

Como se mencionó, estas películas control fueron elaboradas para determinar las variaciones estructurales apreciables al agregar el fosfato sin magnesio, de este modo, en la Figura 6.8 se muestra la micrografía de la película compuesta por Xantana y κ -Carragenina y PLGA (75:25) al 0.25%, respectivamente y 0.5% de β -TCP. Se eligió trabajar con la relación lactida:glicolida 75:25 basado en los resultados arrojados por lo potenciales zeta obtenidos, que nos indican que esta relación ofrecerá películas más estables (potencial zeta más negativo). Se observan en la imagen las partículas del β -TCP organizadas en cúmulos distribuidos por toda la película de acuerdo con el EDS realizado a la zona señalada, (Figura 6.9), cabe destacar que se utilizó una energía de 10kV para observar con mayor definición la distribución de las partículas de PLGA encapsulando al fosfato tricálcico, dado que a una menor energía de interacción, no se observan estos cúmulos pues se hallan entre los pliegues de la película formada, lo que nos indica

que el fosfato no se encuentra simplemente adsorbido en la superficie de la película, sino a través de su estructura. El material conserva la forma típica de las películas formadas por el biopolímero κ -Carragenina, sin embargo, como se puede observar claramente la distribución de los cúmulos no es uniforme, a pesar de que se presentan a través de toda la película, no son de formas o tamaños regulares, lo que indica una distribución poco uniforme del fosfato, hecho también fue apreciable con el fosfato de calcio sustituido con magnesio (ver Apéndice 1, *Microscopía Electrónica de Barrido*) utilizando el PLGA con esta relación lactida:glicolida.

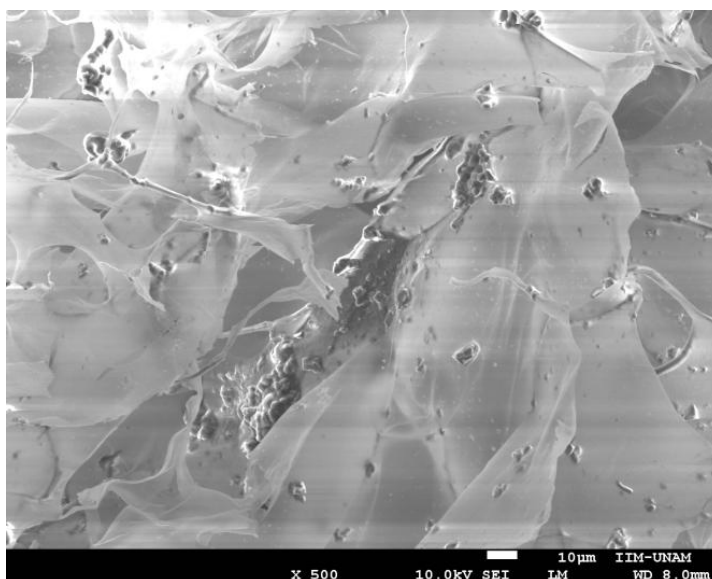
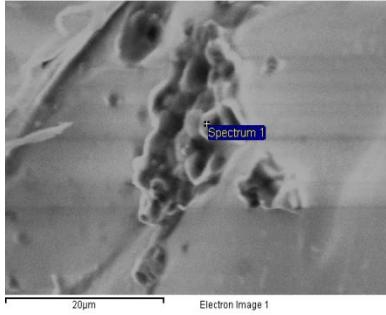


Figura 6.8. Imagen de MEB de la película XanCarrPLGA75:25BTCP0.5 (500X, 10kV).

En la Figura 6.9 se muestran los resultados del EDS realizado, para comprobar que los cúmulos contienen al fosfato de calcio.



Elemento	%Peso	%Atómico
C K	27.14	41.34
O K	34.14	39.04
P K	14.45	8.54
Ca K	24.27	11.08
Totals	100.00	

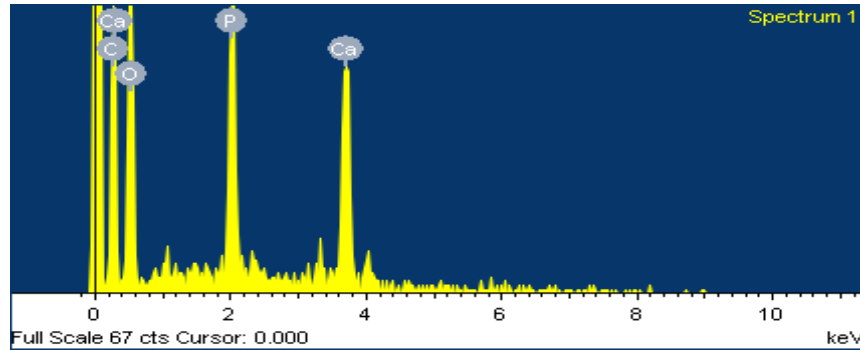


Figura 6. 9. Resultados del EDS realizado a la zona señalada de la película XanCarrPLGA75:25BTCP0.5, mostrando la presencia de β -TCP.

En las siguientes imágenes se muestra cómo al incrementar la concentración del fosfato en estas películas, el tamaño de los cúmulos fue aumentando también (señalados con las flechas), sin embargo, su distribución se sigue conservando poco uniforme en la película, Figuras 6.10 y 6.11.

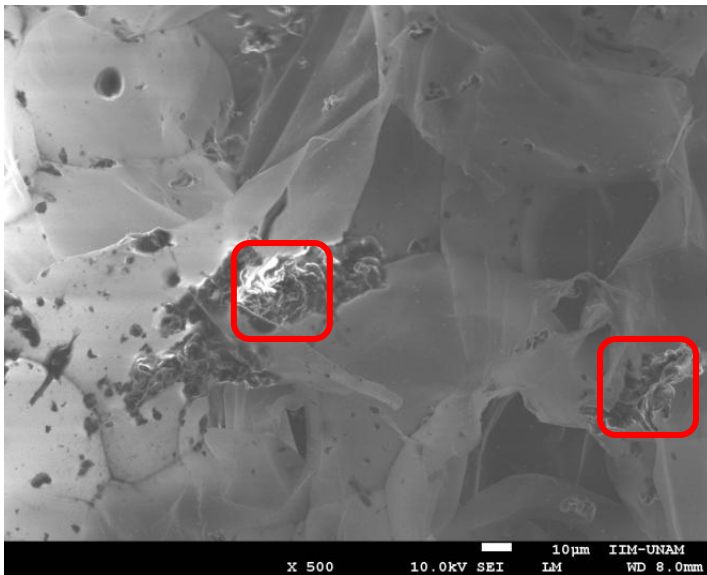


Figura 6.10. Imagen de MEB de la película XanCarrPLGA75:25BTCP1 (500X, 10kV), compuesta por los polímeros Xantana y κ -Carragenina y PLGA (75:25).

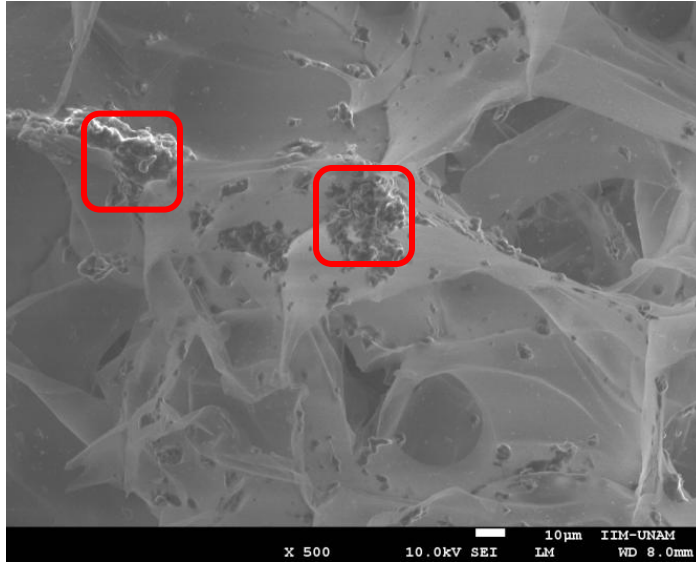


Figura 6.11. Imagen de MEB de la película XanCarrPLGA75:25BTCP2 (500X, 10kV), compuesta por los polímeros Xantana y κ -Carragenina y PLGA (75:25) .

Apéndice 6. Imágenes de MEB

En esta sección se presentan las imágenes de Microscopía Electrónica de Barrido de las películas control elaboradas, con el fin de mostrar cómo el PLGA se distribuye en la película. Así como para mostrar las micrografías de las películas elaboradas con concentración de β -TCMP diferente del 0.5% y 2% p/v.

En primer lugar, la Figura 6.12 muestra la película formada solamente con los polímeros Xantana y κ -Carragenina, donde se aprecia la forma característica que exhiben las películas formadas por κ -Carragenina [44, 60, 92].

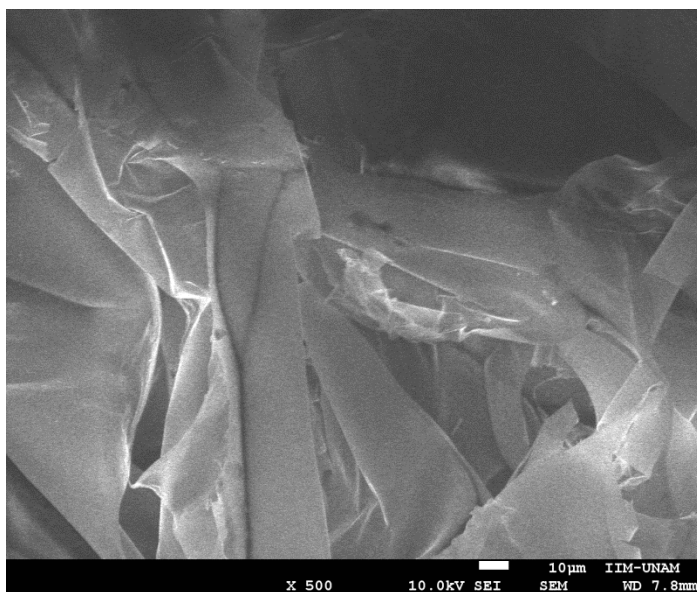


Figura 6.12. Imagen de MEB de la película XanCarr (500X, 10kV), compuesta por los polímeros Xantana y κ -Carragenina 0.25%, respectivamente.

Por otro lado, en las Figuras 6.13 y 6.14 se observan las películas control (sin fosfato) formadas por los polisacáridos y además el PLGA, relación 50:50 y 75:25 respectivamente, se puede ver cómo las partículas formadas por el PLGA se hallan dispersas a lo largo de toda la película por entre los pliegues formados por la película de κ -Carragenina. Aún en la distribución del PLGA sin fosfato se observa que en la películas elaboradas con la relación lactida:glicolida

75:25, la distribución de este copolímero no es homogénea, y que se forman cúmulos de partículas, (círculo de la Figura 6.14), no observándose este comportamiento en la micrografía de la Figura 6.13.

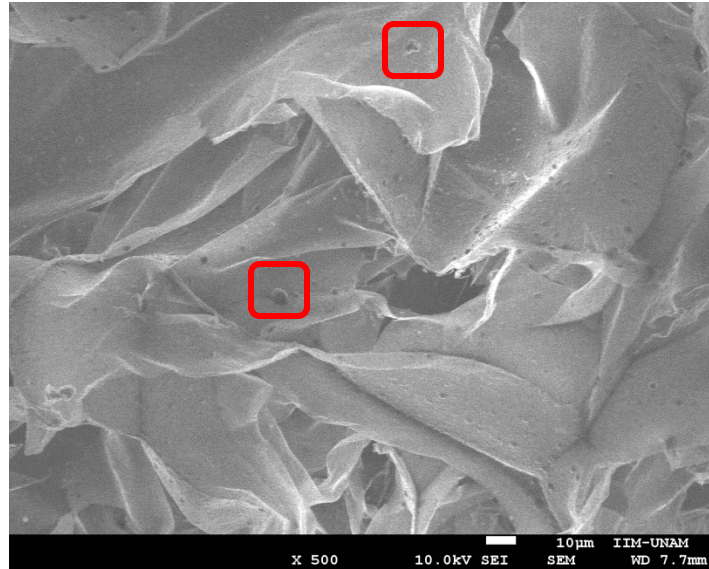


Figura 6.13. Imagen de MEB de la película XanCarrPLGA50:50 (500X, 10kV), compuesta por los polímeros Xantana y κ -Carragenina y PLGA (50:50).

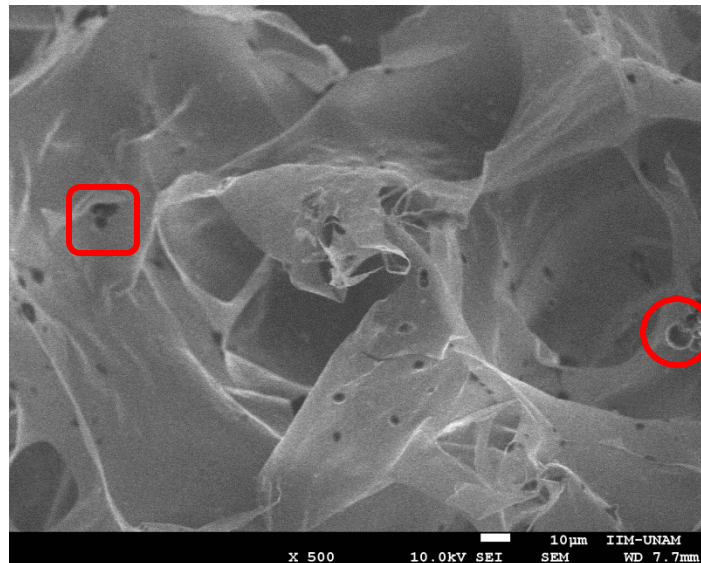


Figura 6.14. Imagen de MEB de la película XanCarrPLGA75:25 (500X, 10kV), compuesta por los polímeros Xantana y κ -Carragenina y PLGA (75:25).

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Abarrategui López A. *Estudio del quitosano como biomaterial portador de rhBMP-2: Desarrollo, caracterización y aplicabilidad en regeneración de tejido óseo*. Tesis Doctoral. Universidad Complutense de Madrid. Facultad de Ciencias Biológicas. Madrid. 2008.
2. Adler C. *Bone diseases: Macroscopic, histological and radiological diagnosis of structural changes in the skeleton*. Editorial Springer. Freiburg. 2000.
3. Askeland, D. R., Phulé, P. P. *Ciencia e ingeniería de los materiales*, 4ª Edición. Editorial Cengage Learning Latin America. Canadá. 2004.
4. Aulton M. E. *Farmacología: la ciencia del diseño de las formas farmacéuticas*, 2ª Edición. Elsevier. España. Madrid. 2004.
5. Barrera R. E. *Actitud ante la osteoporosis. Revisión*. Medicina General; 2002, **46**: 601-612.
6. Bartl R., Frisch B. *Biology of bone*, en *Osteoporosis: Diagnosis, prevention, therapy*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. Berlin. 2004.
7. Battaner A. E. *Biomoléculas. Volumen 51 de Manuales Universitarios*. Universidad de Salamanca. Salamanca. 1993.
8. Bello G. J. *Ciencia bromatológica: Principios generales de los alimentos*. Ediciones Díaz de Santos. Madrid. 2000.
9. Boanini E., Gazzano M., Bigi A. *Ionic substitutions in calcium phosphates synthesized at low temperature*. Acta Biomaterialia; 2010, **6**: 1882-1894.
10. Bozzola J. J., Russell L. D. *Electron microscopy: Principles and techniques for biologists*, 2ª Edición. Editorial Jones & Bartlett Learning. India. 1999.
11. Callister W. D. *Introducción a la ciencia e ingeniería de los materiales*, Volumen 1, 3ª Edición. Editorial Reverté. España. 1995.
12. Castaño L., Díaz P., Paredes S. *Bioquímica clínica: De la patología al laboratorio*. Editorial Ergon. Madrid. 2008.
13. Castelo-Branco C. *Osteoporosis y menopausia*. 2ª Edición. Editorial Médica Panamericana. Madrid. 2009.
14. Conesa F. J. *Curso básico de análisis térmico*. Editorial Club Universitario. España. 2000.
15. Connors K. A. *Curso de análisis farmacéutico (ensayo del medicamento)*, 2ª Edición. Editorial Reverté. España 1981.
16. Contreras F. O., Blanco G. M. *Fisiopatología*. Editorial McGrawHill Interamericana. Venezuela. 1997.
17. Cornellana P. M. *La Menopausia al inicio del siglo XXI*. Editorial Glosa, S. L. Barcelona. 2009.
18. Chaundhry A. A., Goodall J., Vickers M., Cockcroft J. K., Rehman I., Knowles J., Darr J. A. *Synthesis and characterization of magnesium substituted calcium phosphate bioceramic nanoparticles made via continuous hydrothermal flow synthesis*. Journal of Materials Chemistry; 2008, **18**: 5900-5908.

19. Chijani V., Hernández J. *Guía práctica de diagnóstico, prevención y tratamiento de la osteoporosis*. Grupo de estudio de Osteopatía de la Sociedad Uruguaya de Reumatología (GEOSUR). www.reumauruguay.org
20. Da-Silva D., Lopes A. B., Correia R. N. *Synthesis and characterization of porous kappa-carrageenan/calcium phosphate nanocomposite scaffolds*. *Journal of Material Science*; 2007, **42**: 8581-8591.
21. Darzi H. H., Larimi S. G., Darzi G. N. *Synthesis, characterization and physical properties of a novel xanthan gum/polypyrrole nanocomposite*. *Synthetic Metals*; 2012, **162**: 236-239.
22. Díaz P., Paredes S. *Aspectos básicos de bioquímica clínica*. Ediciones Díaz de Santos. Madrid. 1997.
23. Dinarvand R., Sepehri N., Manoochehri S., Rouhani H., Atyabi F. *Poly lactide-co-glycolide nanoparticles for controlled delivery of anticancer agents*. *International Journal of Nanomedicine*; 2012, **6**: 877-895.
24. Doblaré M., García J. M., Gómez M. J. *Modelling bone tissue fracture and healing: a review*. *Engineering Fracture Mechanics*; 2004, **7**: 1809-1840.
25. Dorta M. J., Santoveña A., Llabrés M., Fariña J. B. *Potential applications of PLGA film-implants in modulating in vitro drug release*. *International Journal of Pharmaceutics*; 2002, **248**: 149-156.
26. Earnest C. M., ASTM. *Compositional analysis by thermogravimetry. Número 997*. Editado por ASTM International. Baltimore. 1998.
27. Eynard A. R., Valentich M. A., Rovasio R. A. *Histología y embriología del ser humano: Bases celulares y moleculares*, 4ª Edición. Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires. 2008.
28. Fernández-Tresguerres I., Alobera M. A., Del Canto M., Blanco J. L. *Bases fisiológicas de la regeneración ósea I. Histología y fisiología del tejido óseo*. *Medicina Oral*; 2006, **11**: E47-E51.
29. Fernández J. M. *Estudios de biocompatibilidad de polímeros sintéticos y su aplicación en Ingeniería de Tejido Óseo*. Tesis Doctoral. Universidad Nacional de la Plata. Facultad de Ciencias Exactas. Buenos Aires. 2011.
30. Ferreira A. M., Gentile P., Chiono V., Ciardelly G. *Collagen for bone tissue regeneration*. *Acta Biomaterialia*; 2012, **8**: 3191-3200.
31. Fleisch H. *Biophosphonates in bone disease: From the laboratory to the patient*, 4a Edición. Editorial academic Press. USA. 2000.
32. Freile-Peigrín Y., Azamar J. A., Robledo D. *Preliminary characterization of carrageenan from the red seaweed *Halymenia floresii**. *Journal of Aquatic Food Product Technology*; 2011, **20**: 73-83.
33. Gan S. L., Feng Q. L. *Preparation and characterization of a new injectable of bone substitute-carrageenan/nano-hydroxiapatite/collagen*. *Acta Academiae Medicinae Snicae*; 2006, **28** (5): 710-3.

34. García-Ochoa F., Santos V. E., Casas J. A., Gómez E. *Xanthan gum: production, recovery, and properties*. *Biotechnology Advances*; 2000, **18**: 549-579.
35. Giner M. E., Vercher M. A., Tur V. M. *Simulación del crecimiento de microgrietas en una osteona mediante elementos finitos*. XIX Congreso Nacional de Ingeniería Mecánica, Asociación Española de Ingeniería Mecánica. 2012. Castellón, España.
36. Gomes S., Renaudin G., Jallot E., Nedelec J. M. *Structural characterization and biological fluid interaction of Sol-Gel-derived Mg-substituted biphasic calcium phosphate ceramics*. *ACS Applied Material & Interfaces*; 2009, **1** (2): 505-513.
37. Gómez A., Rodríguez G. M., Cannata J. B. *Metabolismo del calcio, fósforo y del magnesio*, en *Manual práctico de osteoporosis y enfermedades del metabolismo mineral*. Universidad de Cantabria. Santander. 2004.
38. Gruber R., Pietschmann P., Peterlik M. *Introduction to bone development, remodeling and repair*. En *Radiology of Osteoporosis*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. Berlin. 2008.
39. *Guía de Práctica Clínica: Diagnóstico y Tratamiento de Osteoporosis en el Adulto*. México: Secretaría de Salud; 2008.
40. Gutiérrez R. E. *Química*. Editorial Reverté. Barcelona. 1984.
41. Guyton A. C., Hall J. E. *Tratado de Fisiología Médica*, 12ª Edición. Editorial Elsevier Health Sciences. Madrid. 2011.
42. Hernández R. M., Sastre G. A. *Tratado de nutrición*. Ediciones Díaz de Santos. Madrid. 1999.
43. Herrera S. P. *Columna vertebral*. En *Apuntes de anatomía*. Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México. 2007. <http://www.facmed.unam.mx/deptos/anatomia/computo/cv/cifosis.html>
44. Infante R. J., Campos T. V., Guerrero S. C., Sepúlveda G. S. *Bionanocompuestos de carragenina κ con nanopartículas metálicas*. *Ingenierías*, Universidad Autónoma de Nuevo León; 2012, **XV**: 66-73.
45. Jain R. A. *The manufacturing techniques of various drug loaded biodegradable poly(lactide-coglycolide) (PLGA) devices*. *Biomaterials*; 2000, **21**: 2475-2490.
46. Jay E. E., Michie E. M., Parfitt D., Rushton M. J. D., Fong S. K., Mallison P. M., Metcalf B. L., Grimes R. W. *Predicted energies and structures of β - $Ca_3(PO_4)_2$* . *Journal of Solid State Chemistry*; 2010, **183**: 2261-2267.
47. Junqueira L. C., Carneiro J. *Histología Básica*. 6ª Edición. Editorial Masson. Barcelona. 2005.
48. Kalita S. J., Fleming R., Bhatt H., Schanen B., Chakrabarti R. *Development of controlled strength-loss resorbable beta-tricalcium phosphate bioceramic structures*. *Materials Science and Engineering*; 2008, **C28**: 392-398.
49. Kannan S., Ventura J. M., Ferreira J. M. F. *Aqueous precipitation method for the formation of Mg-stabilized β -tricalcium phosphate: An X-ray diffraction study*. *Ceramics International*; 2006, **33**: 637-641.

50. Kessenich C. R. *Alternative choices for calcium supplementation*. The Journal of Nurse Practitioners-JNP; 2008, **8**: 36-39.
51. Klammert U., Ignatius A., Wolfram U., Reuther T., Gbureck U. *In vivo degradation of low temperature calcium and magnesium, phosphate ceramics in a heterotopic model*. Acta Biomaterialia; 2011, **7**: 3469-3475.
52. Klammert U., Reuther, Blank M., Reske I., Barralet J. E., Grover L. M., Kübler A. C., Gbureck U. *Phase composition, mechanical performance an in vitro biocompatibility of hydraulic setting calcium magnesium phosphate cement*. Acta Biomaterialia; 2010, **6** (4): 1529-1535.
53. Klose D., Siepmann F., Elkharraz K., Siepmann J. *PLGA-based drug delivery systems: Importance of the type of drug and device geometry*. International Journal of Pharmaceutics; 2008, **354**: 95-103.
54. Lara García H. A. *Síntesis y caracterización de whitlockita con magnesio*. Tesis de Maestría (en revisión). Universidad Nacional Autónoma de México. Instituto de Investigaciones en Materiales. México, D. F. 2013.
55. Lee D., Sfeir C., Kumta P. N. *Novel in-situ synthesis and characterization of nanostructured magnesium substituted β -tricalcium phosphate (β -TCMP)*. Materials Science and Engineering C; 2009, **29**: 69-77.
56. Lee J. B., Lee S. H., Yu S. M., Park J., Choi J. B., Kim J. K. *PLGA scaffold incorporated with hydroxyapatite for cartilage regeneration*. Surface & Coating Technology; 2008, **202**: 5757-5761.
57. Leiria V., Kawano D. F., Da Silva Jr. D. B., Carvalho I. *Carrageenans: Biological properties, chemical modifications and structural analysis- A review*. Carbohydrate Polymers; 2009, **77**: 167-180.
58. Leung L., Chan C., Baek S., Hani Naguib. *Comparison of morphology and mechanical properties of PLGA bioscaffolds*. Biomedical Material; 2008, **3**: 025006.
59. Li X., Ito A., Sogo Y., Wang X., LeGeros R. Z. *Solubility of Mg-containing β -tricalcium phosphate at 25°C*. Acta Biomaterialia; 2009, **5**: 508-517.
60. Lim Y.-M., Gwon H.-J., Choi J.-H., Shin J., Nho Y.-C., Jeong S. I., Chong M. S. Lee Y.-M., Kwon I. K., Kim S. E. *Preparation and biocompatibility study of gelatin/kappa-carrageenan scaffolds*. Macromolecular Research; 2010, **18**: 29-34.
61. Lin F., Liao C., Chen K., Sun J., Lin C. *Petal-like apatite formed on the surface of tricalcium phosphate ceramic after soaking in distilled water*. Biomaterials; 2001, **22**: 2981-2992.
62. Makino K., Ohshima H., Kondo T. *Mechanism of hydrolytic degradation of poly(lactide) microcapsules: effects of pH, ionic strength and buffer concentration*. Journal of Microencapsulation; 1986, **3**: 203-212.
63. Malvern Instruments ®. *Zeta Nano Series technical note*, www.malvern.co.uk
64. Marchetti E., May O., Girard J., Hildebrand H. F., Migaud H., Pasquier G. *Biomateriales en cirugía ortopédica*. Técnicas quirúrgicas en Ortopedia y Traumatología. EMC (Elsevier Masson SAS, Paris). 2010. E-44-102.

65. Marques M. R., Loebenberg R., Almukainzi M. *Simulated biological fluids with possible application in dissolution testing*. Dissolution Technologies; 2010, **18**: 15-28.
66. Medina Torres L. *Estudio reológico de mucílago de nopal y su efecto sinérgico con otros hidrocoloides de uso alimenticio*. Tesis Doctoral. Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Química. 2005.
67. Miladi K., Sfar S., Fessi H., Elaissari A. *Drug carriers in osteoporosis: Preparation, drug encapsulation and applications*. International Journal of Pharmaceutics; 2013, **445**: 181-195.
68. Mirhadi B., Mehdikhani B., Askari N. *Synthesis of nano-sized β -tricalcium phosphate via wet precipitation*. Processing and Application of Ceramics; 2011, **5**: 193-198.
69. Mohammadi-Rovshandeh J., Nabi-Sarboluki M. *Synthesis and in vitro hydrolytic degradation of polyglycolide and its L-Lactide copolymer*. Iranian Polymer Journal; 2001, **10** (1): 53-58.
70. Muñoz-Torres N., Varsavsky M., Avilés-Pérez M. D. *Osteoporosis. Definición. Epidemiología*. Revista de Osteoporosis y Metabolismo Mineral; 2010, **2** (Supl 3): S5-S7.
71. Nakayama N., Hayashi T. *Preparation and characterization of poly(L-lactic acid)/TiO₂ nanoparticle nanocomposite films with high transparency and efficient photodegradability*. Polymer Degradation and Stability; 2007, **92**: 1255-1264.
72. Naranjo A. C., Osswald T. A., Sierra J., Roldán-Alzate A., Sierra J. D. *Plastics, testing and characterization: industrial applications*. Editorial Hanser Verlag. Munich. 2008.
73. Narkhede S. P., Raval H. V., Bendale A. R., Jadhav A. G., Vidyasagar G. *A discriminatory UV-Spectrophotometric method for in-vitro dissolution study of sertraline hydrochloride in tablet dosage form*. Journal of Chemical and Pharmaceutical Research; 2011, **3** (6): 361-368.
74. Olah L., Borbas L. *Properties of calcium carbonate-containing composite scaffolds*. Acta of Bioengineering and Biomechanics; 2008, **10** (1): 61-66.
75. Ondarza R. N. *Bioquímica Médica*. Editorial Trillas. México, D. F. 2010.
76. Palmieri G. F., Grifantini R., Di Martino P., Martelli S. *Emulsion/Solvent Evaporation as an alternative technique in pellet preparation*. Drug Development and Industrial Pharmacy; 2000, **26**: 1151-1158.
77. Panyam J., Labhasetwar V. *Biodegradable nanoparticles for drug and gene delivery to cells and tissue*. Advanced Drug Delivery Reviews; 2003, **55**: 329-347.
78. Peña J., Vallet-Regí M. *Hydroxyapatite, tricalcium phosphate and biphasic materials prepared by liquid mix technique*. Journal of European Ceramic Society; 2002, **23**: 1687-1696.
79. Perkin Elmer. *Guía de Análisis Termogravimétrico*. Manual de Usuario.
80. Quintero M., Monfort J., Mitrovic D. R. *Osteoartritis: Biología, fisiopatología, clínica y tratamiento*. Editorial Médica Panamericana. Madrid. 2010.

81. Qureshi S. A. *Developing discriminatory drug dissolution tests and profiles: some thoughts for consideration on the concept and its interpretation*. Dissolution Technologies; 2006, **13**: 18-23.
82. R. Gennaro A. *Remington farmacia*, 20^a Edición. Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires. 2003.
83. Renaudin G., Laquerrière P., Filinchuk Y., Jallot E., Nedelec J. M. *Structural characterization of sol-gel derived Sr-substituted calcium phosphates with anti-osteoporotic and anti-inflammatory properties*. Journal of Materials Chemistry; 2008, **18**: 3593-3600.
84. Riancho J. A., González J. *Manual práctico de osteoporosis y metabolismo mineral*. Universidad de Cantabria. Santander. 2004.
85. Rizzoli R. *Atlas of postmenopausal osteoporosis*, 3^a Edición. Current Medicine Group. UK. 2010.
86. Rojas-Oviedo I., López T. A., Quirino B. C., Cárdenas R. H., García G. R. *Perfil de liberación de indometacina desde acuosomas utilizando el método de diálisis*. Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas; 2012, **43**: 61-65.
87. Rosenthal A. J. *Textura de los alimentos: Medida y percepción*. Editorial Acribia, S. A. España. 2002.
88. Ross M. H. *Histología: Texto y atlas color con biología celular y molecular*, 5^a Edición. Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires. 2008.
89. Royce P. M., Steinmann B. *Connective tissue and its heritable disorders: molecular, genetic and medical aspects*, 2^a Edición. Editorial John Wiley & Sons. USA. 2003.
90. Sadeghi M. *Synthesis of a biocopolymer carrageenan-g-poly(AAm-co-IA)/montmorillonite superabsorbent hydrogel composite*. Brazilian Journal of Chemical Engineering; 2012, **29** (2): 295-305.
91. Salager J.-L. *Fenómenos electrocinéticos. Cuaderno de laboratorio de formulación, interfases, reología y procesos, 1^a Versión*. Universidad de los Andes. Mérida, Venezuela. 1988.
92. Salgueiro A. M., Daniel-da-Silva A. L., Fateixa S., Trindade T. *κ -Carrageenan hydrogel nanocomposites with release behavior mediated by morphological distinct Au nanofillers*. Carbohydrate Polymers; 2013, **91**: 100-109.
93. Sánchez-Salcedo S., Balas F., Izquierdo-Barba I., Vallet-Regí M. *In vitro structural changes in porous HA/ β -TCP scaffolds in simulated body fluid*. Acta Biomaterialia; 2009, **5**: 2738-2751.
94. Sanchis C. P. *Estudio de los procesos patológicos de cristalización: Litiasis renal, calcificaciones cardiovasculares y osteoporosis*. Tesis Doctoral. Universitat de les Illes Balears. Palma de Mallorca. 2008.
95. Santander-Ortega M. J., Csaba N., Alonso M. J., Ortega-Vinuesa J. L., Bastos González D. *Stability and physicochemical characteristics of PLGA, PLGA:poloxamer and PLGA:poloxamine blend nanoparticles. A comparative study*. Coloids and Surfaces A; 2007, **296**: 132-140.

96. Sanzana S. E. *Estudio comparativo de la utilidad de los cementos y vidrios basados en fosfatos de calcio como sustitutivos óseos en defectos cavitarios experimentales*. Tesis Doctoral. Universidad de Barcelona. Barcelona. 2004.
97. Secretaría de Salud. *Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos*, 9ª Edición. México. 2009.
98. Serrato M. Ricardo. *Desarrollo de hidrogeles de quitosano vía hidrólisis enzimática para aplicaciones biomédicas*. Tesis de Maestría. Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional. Unidad Querétaro. Santiago de Querétaro. 2011.
99. Sierra A. I., Gómez R. S., Pérez Q. D., Morante Z. S. *Análisis instrumental: Algunas herramientas de enseñanza-aprendizaje adaptadas al EEES*, Volumen 1. Editorial Netblío. España. 2010.
100. Sigma Aldrich ® Products, www.sigmaaldrich.com [online]
101. Silberman F., Varanona O. *Ortopedia y traumatología*, 3ª Edición. Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires. 2011.
102. Silver S. *Calcium and vitamin D controversies*. *Rheumatic Disease Clinics*; 2011, **37**: 351-363.
103. Sociedad Española de Reumatología. *Manual de enfermedades óseas*, 2ª Edición. Editorial Médica Panamericana. Madrid. 2010.
104. Sociedad Española de Reumatología. *Reumatología pediátrica*. Editorial Médica Panamericana. Madrid. 2007.
105. Stella V. J. *Prodrugs: challenges and rewards*, P1. Editorial Springer. USA. 2007.
106. Tamimi F., Le Nihouannen D., Bassett D. C., Ibasco S., Gbureck U., Knowles J., Wright A., Flynn A., Svetlana V. K., Barralet J. E. *Biocompatibility of magnesium phosphate minerals and their stability under physiological conditions*. *Acta Biomaterialia*; 2011, **7**: 2678-2685.
107. Tiwari S., Verma P. *Microencapsulation technique by solvent evaporation method (study of effect of process variables)*. *International Journal of Pharmacy & Life Sciences*; 2011, **2**: 998-1005.
108. Vallet-Regí M., González Calbet J. M. *Calcium phosphates as substitution of bone tissues*. *Progress in Solid State Chemistry*; 2004, **32**: 1-31.
109. Walton H. F., Reyes J. *Análisis químico e instrumental moderno*. Editorial Reverté. España. 1983.
110. Welsch U., Sobotta J. *Histología*, 2ª Edición. Editorial Médica Panamericana. Madrid. 2009.
111. Wilches M., Ruiz L.F., Hernández M. *Bioingeniería. Tomo VI*. Editorial Universidad de Antioquia. Colombia. 2007.
112. Zanchetta J. R., Talbot J. R. *Osteoporosis: Fisiología, diagnóstico, prevención y tratamiento*. Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires. 2001.

113. Zhang X., Jiang F., Groth T., Vecchio K. S. *Preparation, characterization and mechanical performance of dense β -TCP ceramics with/without magnesium substitution.* Journal of Material Science: Mater Med; 2008, **19**: 3063-3070.
114. Zhou W., Wang Z. L. *Scanning microscopy for nanotechnology. Techniques and Applications.* Editorial Springer. New York. 2007.
115. Zhu K., Prince R. L. *Calcium and bone.* Clinical Biochemistry; 2012, **45**: 936-942.
116. Zolnik B. S., Burgess D. J. *Effect of acidic pH of PLGA microsphere degradation and release.* Journal of Controlled Release; 2007, **122**: 338-344.