



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIA E INGENIERÍA DE MATERIALES
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN MATERIALES

OBTENCIÓN DE MEMBRANAS DE GELATINA DE PIEL DE BOVINO Y DE PESCADO,
POR LIOFILIZACIÓN, PARA APLICACIÓN EN REGENERACIÓN DE TEJIDO ÓSEO
PERIODONTAL.

TESIS

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

PRESENTA:

I.Q. EDITH CEDILLO CRUZ

TUTOR PRINCIPAL:

DR. ALFREDO MACIEL CERDA
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN MATERIALES

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR:

DRA. MARÍA CRISTINA PIÑA BARBA
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN MATERIALES

DR. DAVID MAURICIO GIRALDO GÓMEZ
FACULTAD DE MEDICINA

CIUDAD DE MÉXICO, junio, 2022



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 mi madre, por siempre apoyarme y confiar en mí.

*Por darme valiosas enseñanzas al ser una gran mujer:
independiente, valiente, muy inteligente, empática, asertiva,
justa, bondadosa, sensible, empoderada, líder, alegre,
caritativa, magnánima, jovial, de gran corazón, justa,
entusiasta, ingeniosa y por ser ejemplo de superación.*

Agradecimientos

A la Universidad Nacional Autónoma de México por todos los recursos, oportunidades y múltiples apoyos que nos brinda a los estudiantes para crecer en nuestra formación académica y realizar proyectos que aporten a las Ciencias.

Al Instituto de Investigaciones en Materiales por todos los recursos, el fomento a la investigación y las oportunidades en beneficio de la ejecución de este proyecto.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca de maestría otorgada.

A los miembros de mi comité tutor:

A mi tutor principal, el Dr. Alfredo Maciel Cerda por su asesoramiento, por todo su apoyo incondicional en lo académico y personal. Asimismo, por su acompañamiento, paciencia, motivación y todos los recursos brindados para la realización de este proyecto.

A la Dra. María Cristina Piña Barba por permitirme hacer uso de las instalaciones de su laboratorio de Biomateriales y utilizar materiales y equipo de ahí. Además, agradezco sus observaciones, recomendaciones, apoyo, empatía y consejos.

Al Dr. David Giraldo por sus valiosas observaciones, recomendaciones y correcciones.

Al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) de la DGAPA-UNAM, a través del proyecto IT 100222.

A los miembros del jurado por sus valiosas aportaciones y correcciones:

Dra. Karla Karina Gómez Lizárraga

Dra. Gertrudis Hortensia González Gómez

Dra. Yareli Rojas Aguirre

M. en C. Miguel Ángel Herrera Enríquez

A los técnicos del IIM por su valiosa contribución en el análisis de las muestras:

Al M. en C. Eliezer Hernández Mecinas por la realización de las pruebas mecánicas de tensión.

A la Dra. Lourdes Soledad Bazán Díaz por la preparación de muestras y la obtención de imágenes por microscopio electrónico de barrido.

A la Ing. Karla Eriseth Reyes Morales por la obtención de termogramas TGA y DSC.

Al Q. Miguel Ángel Canseco Martínez por la espectroscopía FTIR.

Al M. en C. Salvador López Morales por el goniómetro para medición de ángulo de contacto.

A la M. en C. Ana Karla Bobadilla Valencia por el apoyo en obtención de nitrógeno líquido.

A mis compañeros de laboratorio Israel (Biomateriales), Erick, Karina y Emmanuel, por toda su valiosa ayuda y recomendaciones.

A mi familia y amigas por alegrarme la vida y ser fuente de energía positiva para mí.

Índice

1. Resumen	6
2. Introducción.....	7
3. Antecedentes	10
3.1 Estructura periodontal	11
3.2 Composición del hueso alveolar:	14
3.3 Células óseas.....	15
3.4 Remodelado óseo	16
3.5 Reabsorción y defectos óseos que requieren regeneración ósea.....	18
3.6 Regeneración ósea guiada	20
3.7 Estado del arte de las membranas usadas en regeneración ósea guiada... 23	
3.8 Gelatina y colágeno	35
3.9 Técnicas de caracterización.....	41
3.9.1 Espectroscopía de Infrarrojo.....	41
3.9.2 Pruebas mecánicas de tensión.....	44
3.9.3 Análisis termogravimétrico (TGA)	47
3.9.4 Calorimetría de barrido diferencial (DSC)	49
3.9.5 Microscopía electrónica de barrido (SEM)	52
3.9.6 Ángulo de contacto	54
4. Objetivos	57
5. Metodología experimental	58
5.1 Elaboración de membranas	58
5.1.1 Reactivos y Materiales.....	58
5.1.2 Equipos.....	58
5.1.3 Optimización de la concentración de gelatina para la obtención de membranas flexibles.....	59
5.1.4 Membranas de gelatina de piel de bovino y de piel de pescado a diferentes temperaturas de congelación con la concentración seleccionada. 63	
5.2 Caracterización	65
5.2.1. Espectroscopia de Reflectancia Total Atenuada Infrarroja por Transformada de Fourier (ATR-FTIR).....	65

5.2.2. Microscopía electrónica de barrido (SEM)	66
5.2.3. Análisis termogravimétrico (TGA) y calorimetría diferencial de barrido (DSC).....	67
5.2.4. Pruebas mecánicas de tensión	68
5.2.5. Medición de ángulo de contacto	68
6. Resultados y Discusión	69
6.1 Selección de concentraciones de las disoluciones de gelatina	69
6.1.1 Morfología de membranas elaboradas con moldes de silicón y congelación a -40°C.	72
6.1.2. Pruebas de tensión usando moldes de silicón y temperatura de congelación de -40°C	75
6.2 Espectroscopía ATR-FTIR	77
6.2.1. Espectroscopía ATR-FTIR de gelatina pura y de membranas.....	77
6.2.2. Espectroscopía ATR-FTIR de moldes	79
6.3 Microscopía electrónica de barrido (SEM)	81
6.3.1. Morfología de las membranas de gelatina de bovino de la concentración seleccionada obtenidas con moldes de teflón y polietileno a diferentes temperaturas de congelación.....	81
6.3.2. Morfología de las membranas de gelatina de pescado de la concentración seleccionada obtenidas con moldes de teflón y polietileno a diferentes temperaturas de congelación.	87
6.4 Análisis Térmico TGA y DSC	91
6.4.1 TGA	91
6.4.2 DSC	94
6.5 Propiedades mecánicas mediante ensayo de tensión.	98
6.5.1. Pruebas de tensión a membranas de gelatina de bovino obtenidas con moldes de teflón y de polietileno, a tres temperaturas de congelación.....	98
6.5.2. Pruebas de tensión a membranas de gelatina de pescado obtenidas con moldes de teflón y de polietileno, a tres temperaturas de congelación.....	101
6.5.3. Pruebas de tensión en membranas obtenidas de gelatina de bovino y de pescado usando moldes de teflón.	103
6.5.4. Pruebas de tensión en membranas obtenidas de gelatina de bovino y de pescado usando moldes de polietileno.	104
6.6 Medición de ángulo de contacto de los moldes de polietileno y teflón.	105
7. Conclusiones.....	108

8. Anexos	110
9. Referencias	112

1. Resumen

Se elaboraron membranas por la técnica de liofilización a partir de disoluciones de gelatina de piel de pescado y de bovino en agua. El propósito del estudio fue evaluar la influencia de las variables de procesamiento en las propiedades de las membranas. Para ello se utilizaron tres temperaturas de congelación: -10°C , -20°C y -40°C . Además, se emplearon dos tipos de moldes: polietileno y teflón. Los resultados de la espectroscopía infrarroja indican que la gelatina preservó sus bandas características de amidas después de la preparación de la disolución y liofilización. Las mediciones realizadas a partir de las micrografías obtenidas en microscopía electrónica de barrido (SEM) indican que el tamaño de poro disminuye conforme disminuye la temperatura de congelación. En el caso de los moldes, el ángulo de contacto indicó mayor hidrofobicidad para el molde de teflón que para el molde de polietileno. Además, los tamaños de poro son mayores cuando se trata de moldes de teflón, como consecuencia de la diferencia de hidrofobicidad que existe entre los materiales. En cuanto a las propiedades mecánicas, el esfuerzo máximo se presentó con la temperatura de congelación de -10°C , para ambas gelatinas. Se encontró una clara tendencia en la disminución del esfuerzo máximo a la tensión conforme la temperatura de congelación va disminuyendo. La misma tendencia ocurre en el caso del módulo elástico, que disminuye conforme disminuye la temperatura de congelación.

2. Introducción

Las membranas para uso en la regeneración ósea guiada deben mantener aislado el espacio del defecto óseo para evitar la invasión, en la zona de reparación, de células epiteliales y conjuntivas del tejido circundante. Así mismo deben permitir el acceso a las células progenitoras de osteoblastos al sitio deseado [1], soportar la proliferación y la diferenciación en células formadoras de tejido óseo (osteoblastos) y, de esta manera, contar con cantidad y calidad adecuada de hueso, con estabilidad suficiente para la rehabilitación protésica convencional o con implantes dentales óseo integrados [2].

Idealmente, un andamio o estructura de soporte debería tener las siguientes características: 1) alta porosidad con una red de poros interconectados para el crecimiento celular y el flujo de transporte de nutrientes y desechos metabólicos [3]; 2) biocompatibilidad; 3) biorreabsorción con una tasa de degradación y reabsorción controlable para igualar el crecimiento celular y tisular; 4) química superficial adecuada para la unión, proliferación y diferenciación celular; y 5) propiedades mecánicas que coincidan con las de los tejidos en el sitio de implantación, donde la resistencia mecánica es una propiedad importante, ya que los andamios favorecen el desarrollo de la matriz extracelular del tejido que se está formando [3].

Un biopolímero que ha sido propuesto en muchos trabajos para el desarrollo de andamios para regeneración ósea es la gelatina, la cual es el producto de desnaturalizar al colágeno [4]. Numerosos trabajos han indicado que el colágeno es una buena opción para fabricar membranas que son utilizadas como andamios [5], [6] ya que son biodegradables y biocompatibles. Cabe destacar que el colágeno forma parte de la matriz extracelular y es la proteína más abundante del cuerpo que se encuentra en muchos tejidos humanos [7]. Por ello, la gelatina hereda estas propiedades, con la ventaja de que es una materia prima soluble en agua, lo que facilita su procesamiento. En comparación con el colágeno, la gelatina muestra mayor biocompatibilidad, biodegradabilidad, menor costo con alta eficacia, baja

inmunogenicidad y buena biodisponibilidad [8]. Por lo tanto, la gelatina es adecuada para crear andamios que permitan la unión celular.

Existen varios métodos para la elaboración de andamios de gelatina; uno de los más accesibles es por liofilización, que suele generar poros interconectados y altos porcentajes de porosidad sin alterar la estructura de las proteínas. Sin embargo aún no existe suficiente información en la literatura acerca de cómo influyen todas las condiciones implicadas en el procesamiento de liofilización [9], o de la diferenciación entre los tipos de gelatina. Los temas que más se han estudiado al respecto son la concentración de gelatina y la influencia de la temperatura de congelación, y con menor frecuencia se ha estudiado el impacto de la velocidad de congelación en el tamaño de poro [10], y la influencia de los materiales de los que están fabricados los moldes donde se vacía una disolución de gelatina para liofilizar. La composición química de los moldes altera la conformación estructural del andamio resultante debido a las interacciones superficiales disolución-molde. Este aspecto claramente va a tener efecto en las características del andamio, por la diferencia que hay en las interacciones físicas intramolecular e intermolecular de las cadenas que forman la estructura de la gelatina.

La gelatina se obtiene a través de la hidrólisis parcial del colágeno nativo (proteína original). A su vez, la fuente del colágeno original y la severidad de los procedimientos de extracción determinan las propiedades de la gelatina final. El colágeno se encuentra de manera abundante en tejidos animales y está ampliamente distribuida en la piel, huesos, cartílagos, tendones y ligamentos. Hoy en día, las gelatinas se producen principalmente a partir de fuentes bovinas y porcinas, pero la gelatina también se puede extraer del pescado y de las aves. Cada una presenta diferentes propiedades de gelificación, peso molecular y el porcentaje de ciertos aminoácidos en sus cadenas es variable [11], por lo que al formar andamios o membranas con gelatinas de diferentes tipos de fuentes se van a presentar diferentes propiedades en el producto resultante.

La gelatina se ha considerado como una potencial estrategia para el desarrollo de nuevos andamios [12], la técnica de liofilización ha mostrado ser conveniente como

parte del proceso para desarrollar andamios a base de gelatina, con diversas aplicaciones, destacando la regeneración ósea periodontal [13]. Bajo este contexto es relevante estudiar el efecto de las variables operativas en la obtención de andamios de gelatina por medio de liofilización para su óptimo desarrollo y desempeño.

Con el propósito de aportar conocimiento para la obtención de andamios a partir de gelatina, en este trabajo se estudió el efecto de superficie de cada tipo de molde (teflón y polietileno), la temperatura de congelación (-10, -20 y -40 °C) y la fuente de obtención de la gelatina (piel de pescado y piel de bovino) sobre la morfología, propiedades mecánicas y propiedades térmicas de las membranas liofilizadas de gelatina.

Motivación:

A pesar del potencial de la gelatina en el desarrollo de andamios, la información sobre las variables de elaboración por el método de liofilización sigue siendo escasa. Así mismo no existen investigaciones que describan la influencia de los tipos de moldes en la obtención de membranas (por liofilización) a partir de gelatina para regeneración ósea periodontal.

3. Antecedentes

Los dientes cumplen una función esencial en el cuerpo humano que es la deglución y masticación; además cumplen con las funciones de fonación y estética. Para que los dientes puedan conservarse y lleven a cabo sus funciones es necesario que estos se mantengan en buen estado, al igual que los tejidos que les dan soporte y los tejidos que los rodean. Cuando se pierde uno o más de los dientes o hay un daño por enfermedad periodontal en los tejidos circundantes del diente ocurre la reabsorción ósea, que trae como consecuencia la pérdida de hueso y la imposibilidad de sostener a los dientes o colocar nuevos implantes. Es por ello que se han propuesto soluciones como la regeneración ósea guiada, cuyo propósito es la formación de hueso nuevo. A continuación, se presentarán los antecedentes teóricos que están implicados en este proceso y cómo el uso de membranas biodegradables puede ser de gran ayuda.

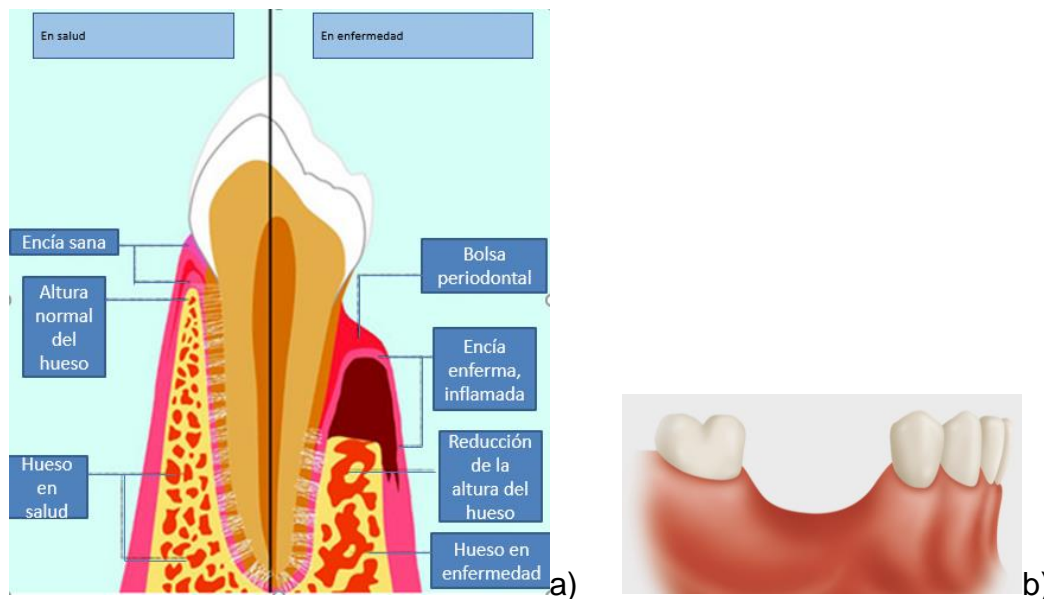


Figura 1. Ejemplos de pérdida de hueso alveolar. a) Debido a enfermedad periodontal, imagen modificada de [14] b) Pérdida de una pieza dental, imagen de [15]

3.1 Estructura periodontal

Los dientes (Figura 3) se encuentran enclavados en los alveolos de los huesos maxilares superior e inferior (mandíbula) como se muestra en Figura 2.

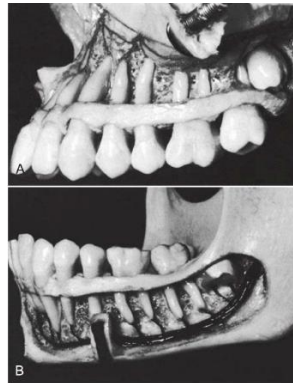


Figura 2. Dientes maxilares (arriba) y dientes mandibulares (abajo). Imagen de [16]

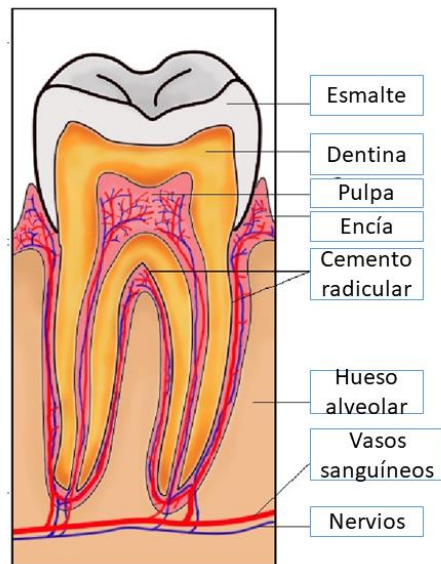


Figura 3. Partes de un diente

El periodonto es la unión de los tejidos que rodean al diente y que le dan sostén. Se compone de (ver Figura 4):

Periodonto de protección: encía.

Periodonto de inserción: ligamento periodontal, cemento dental radicular y hueso alveolar. Su función principal consiste en distribuir y absorber las fuerzas generadas por la masticación y otros contactos dentarios.

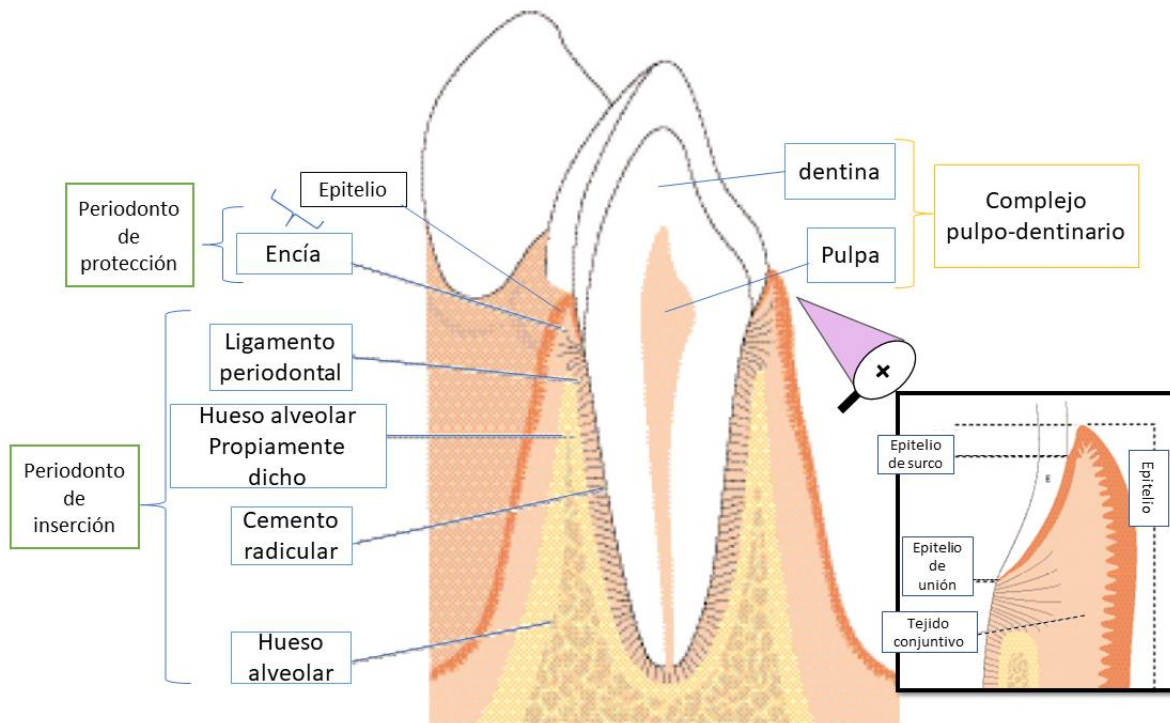


Figura 4. Periodonto. Imagen modificada de (Lindhe, Karring, & Araújo, 2016)

La función del periodonto es unir el diente al tejido óseo de los maxilares y mantener la integridad en la superficie de la mucosa masticatoria de la cavidad bucal [17].

Encía: Es un tejido blando que tiene como papel principal separar el medio externo del medio interno. Está compuesta de tejido epitelial y tejido conjuntivo.

Ligamento periodontal:

Es un tejido conectivo que consiste en un conjunto de fibras colágenas elásticas que se fijan en el hueso alveolar por un extremo y en el cemento del diente por el otro. Estas fibras forman una red que sostiene el diente dentro del hueso, a la vez que se encargan de transmitir las fuerzas que actúan sobre los dientes al hueso maxilar; esto es para amortiguarlos y así protegerlos.

Además, interviene en los procesos de formación y resorción de hueso, así como de cemento y de fibras.

Está vascularizado (arterias) para aportar nutrientes al cemento, hueso y encía; y está innervado (fibras nerviosas sensoriales) para una función sensorial.

Las células del ligamento periodontal en el borde del hueso alveolar son osteoblastos y osteoclastos; dentro del espacio del ligamento hay fibroblastos, células epiteliales, macrófagos, células endoteliales, células mesenquimatosas indiferenciadas y elementos neurales; y sobre la superficie radicular son cementoblastos [18].

Las fibras de colágeno del ligamento periodontal se insertan en el hueso mineralizado (laminar) que reviste la pared del alvéolo dental. Este hueso se denomina hueso alveolar propiamente dicho o hueso fascicular, el cual tiene una alta tasa de recambio.

Hueso alveolar:

El hueso alveolar es la prolongación del maxilar y la mandíbula, se divide en compartimentos llamados alvéolos, quienes contienen a las raíces de los dientes, separados entre sí por un tabique interalveolar óseo. (Figura 5)

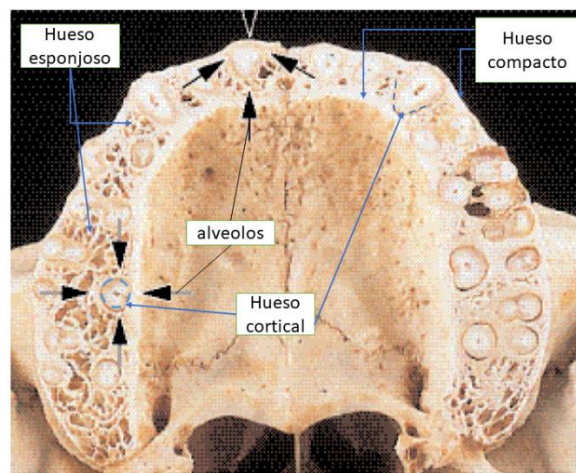
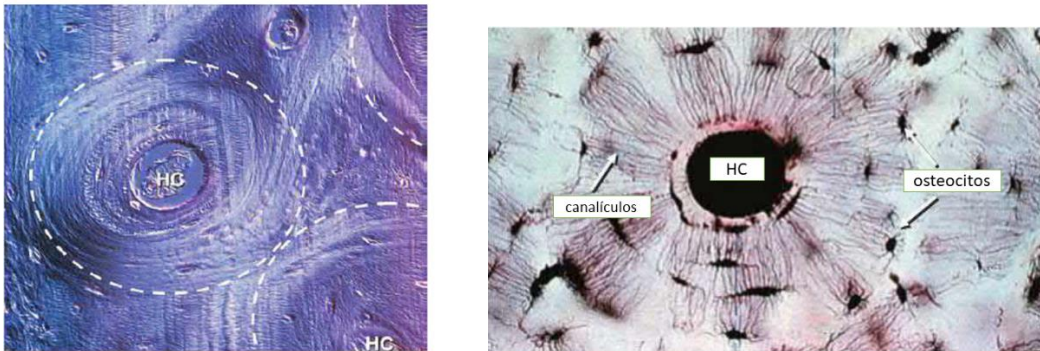


Figura 5. Corte transversal que pasa por la parte alveolar del maxilar superior a nivel central de las raíces dentales. Imagen modificada de [17]

El hueso alveolar consta de tablas corticales externas, formadas por hueso compacto, hueso esponjoso en la porción central y el hueso que limita a los alveolos dentarios denominado hueso alveolar; este último es el hueso que está pegado al ligamento periodontal.

El hueso compacto se compone de hueso laminar; mientras que el hueso esponjoso se compone de hueso laminar y medula ósea. El hueso laminar está constituido por osteonas, también llamadas sistema de Havers, las cuales consisten en laminillas, tanto concéntricas como intersticiales. En el centro de cada osteona se aloja un vaso sanguíneo, por lo que son unidades metabólicas. Además contienen una gran cantidad de osteocitos (ver Figura 6).



*Figura 6. Osteonas. Donde HC es el conducto de Havers en el que se aloja un vaso sanguíneo.
Imagen modificada de [17]*

El hueso alveolar tiene múltiples perforaciones a través de las cuales pasan numerosos vasos sanguíneos, linfáticos y fibras nerviosas hacia el ligamento periodontal.

3.2 Composición del hueso alveolar:

La matriz ósea se compone de una parte orgánica y una inorgánica. La parte orgánica está constituida en un 95% por un componente fibrilar, predominantemente de colágena tipo I y III, y el 5% restante está formado por un componente no fibrilar de proteínas no colagenosas y moléculas regulatorias. Los análisis bioquímicos han

mostrado la presencia de polipéptidos biológicamente activos, como la sialoproteína ósea y osteopontina, así como las glucoproteínas de adhesión osteocalcina, osteonectina, proteínas morfogenéticas óseas (BMP siglas en inglés), también hay presencia de los proteoglicanos decorina, biglicano, fosfoproteínas y algunas seroproteínas [18]. La mayoría de estas moléculas son sintetizadas y secretadas por los osteoblastos durante la deposición ósea y con la mineralización de la matriz osteoide quedan atrapadas en el tejido óseo; otras llegan del torrente sanguíneo como la prostaglandina, el factor de crecimiento derivado de las plaquetas y el factor de crecimiento semejante a la insulina. La parte inorgánica está principalmente formada por cristales de hidroxapatita.

3.3 Células óseas

En el hueso alveolar se encuentran los siguientes tipos de células: Osteoprogenitoras, precursores de osteoblastos, osteoblastos, osteocitos, células de revestimiento y osteoclastos.

Osteoprogenitoras: Son células no especializadas (células mesenquimatosas y monocitos sanguíneos), que primero se diferencian en células pre-osteoblásticas y luego en osteoblastos.

Osteoblastos: son las células que sintetizan la matriz orgánica del hueso y participan en su mineralización. El desarrollo de osteoblastos se ve influido por las hormonas circulantes, los factores de crecimiento y citocinas producidas por ellos mismos o por otras células de la médula ósea. Los osteoblastos son las células que producen y secretan la matriz osteoide, constituida por fibras de colágena y una sustancia fundamental que contiene principalmente proteoglicanos y glicoproteínas; posteriormente secretan fosfatasa alcalina, enzima que contribuye a la mineralización de la matriz. Los osteoblastos presentan receptores para la paratohormona, hormonas sexuales, glucocorticoides, prostaglandinas, citocinas y la dihidroxivitamina D₃.

Osteocitos: células óseas maduras derivadas de los osteoblastos. Durante el proceso de maduración y mineralización del tejido osteoide, algunos osteoblastos quedan atrapados en lagunas, convirtiéndose en osteocitos, los cuales tienen un tamaño menor que los osteoblastos, con un núcleo que ocupa la mayor parte de la célula. Los osteocitos emiten prolongaciones citoplasmáticas dentro de canalículos que se irradian desde las lagunas, comunicándose entre sí y con los osteoblastos o células bordeantes de la superficie ósea. Son los responsables de mantener niveles uniformes de minerales dentro del hueso.

Osteoclastos: son células gigantes multinucleadas, totalmente diferenciadas, que resultan de la fusión de células del linaje de los monocitos de la línea mieloide de la médula ósea y de células mesenquimales. Tienen la capacidad específica de degradar los componentes orgánicos e inorgánicos del hueso. Es decir, se encargan de la resorción ósea; la cual consiste en la liberación de sustancias ácidas que disuelven las sales minerales del tejido óseo, mientras que la sustancia orgánica remanente es eliminada por enzimas osteoclásticas. Los osteoclastos son móviles y capaces de migrar sobre la superficie ósea. Durante la reabsorción (por medio de receptores en la superficie del hueso) se adhieren a las superficies óseas y crean concavidades lagunares denominadas zonas de reabsorción o lagunas de Howship.

3.4 Remodelado óseo

El hueso es un tejido dinámico en constante remodelación. Es decir, que tanto el hueso cortical como el hueso esponjoso alveolar están sometidos a remodelación constante, lo que significa la resorción seguida de formación, debido a que debe responder a las demandas funcionales ejercidas por las fuerzas mecánicas de la masticación y al desplazamiento (menor y constante) de los dientes. El remodelado permite el mantenimiento del volumen óseo, la reparación del daño tisular y la homeostasis del metabolismo fosfocálcico [19]. Las fases del remodelado óseo se describen a continuación (ver Figura 7):

Quiescente: En esta fase el hueso está en condiciones de reposo. Cabe mencionar que la remodelación ocurre de manera diferencial en distintas regiones del tejido óseo, así que mientras en una pequeña zona está en reposo en otra están ocurriendo otras etapas del remodelado óseo.

Activación: Esta fase consiste en la retracción de los osteoblastos maduros, la superficie mineralizada queda expuesta, debido a que las colagenasas se comen la interfase entre células superficiales y hueso mineralizado.

Reabsorción: Osteoclastos llevan a cabo la resorción de la matriz. Este proceso permite la liberación de factores de crecimiento contenidos en la matriz.

Formación: Se da el agrupamiento de pre-osteoblastos que son atraídos por los factores de crecimiento que se liberan de la matriz, luego los pre-osteoblastos sintetizan una sustancia cementante sobre la que se va a adherir el nuevo tejido y expresan BMPs (proteínas morfogenéticas óseas), responsables de la diferenciación. A los pocos días, los osteoblastos ya diferenciados sintetizan la sustancia osteoide que rellenará las zonas perforadas.

Mineralización: A los 30 días del depósito de osteoide comienza la mineralización, que finalizará a los 130 días en el hueso cortical y a 90 días en el trabecular.

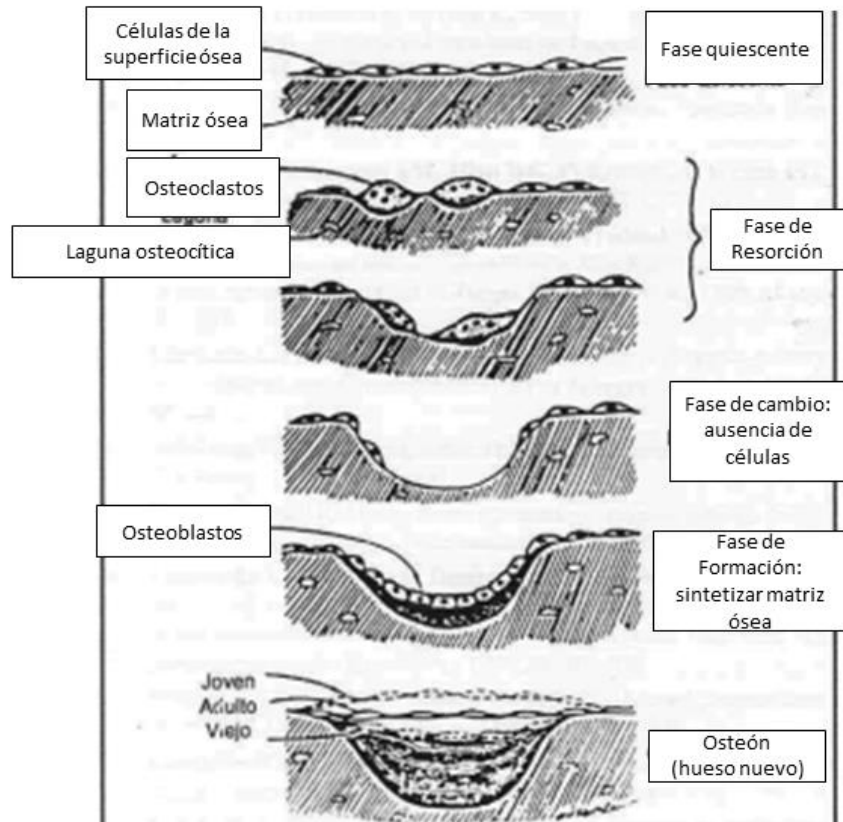


Figura 7. Esquema de las fases del remodelado óseo.

3.5 Reabsorción y defectos óseos que requieren regeneración ósea.

Las tensiones mecánicas, los factores ambientales locales y las hormonas sistémicas influyen en el equilibrio entre la resorción y el depósito del hueso.

Existen varios factores que provocan defectos óseos y además truncan el proceso de remodelado óseo. Puede ser debido a la pérdida de dientes o a enfermedades de tipo patologías congénitas, genéticas, osteofibrosas, metabólicas, inflamatorias infecciosas, de origen quístico [20].

Cuando ocurre la pérdida de dientes se interrumpe este proceso de remodelado, principalmente debido a que el hueso pierde su actividad biomecánica. Las cargas de masticación son imprescindibles para el correcto desarrollo del hueso, esta

acción mecánica transmite al hueso una tensión que es detectada por la red de osteocitos presente en el interior de la matriz ósea, favoreciendo su crecimiento.

También cabe destacar que problemas como la caries dental, las enfermedades periodontales y los traumatismos causan destrucción ósea alrededor del diente y generan defectos óseos importantes de pérdida de hueso alveolar, que deberán ser resueltos para no comprometer a los demás dientes. Posterior a esta destrucción o pérdida le sigue un proceso de reabsorción ósea, que resultará en deformidades en la cresta alveolar. Estos defectos se manifiestan en la disminución de la altura o anchura del reborde alveolar (ver Figura 8).

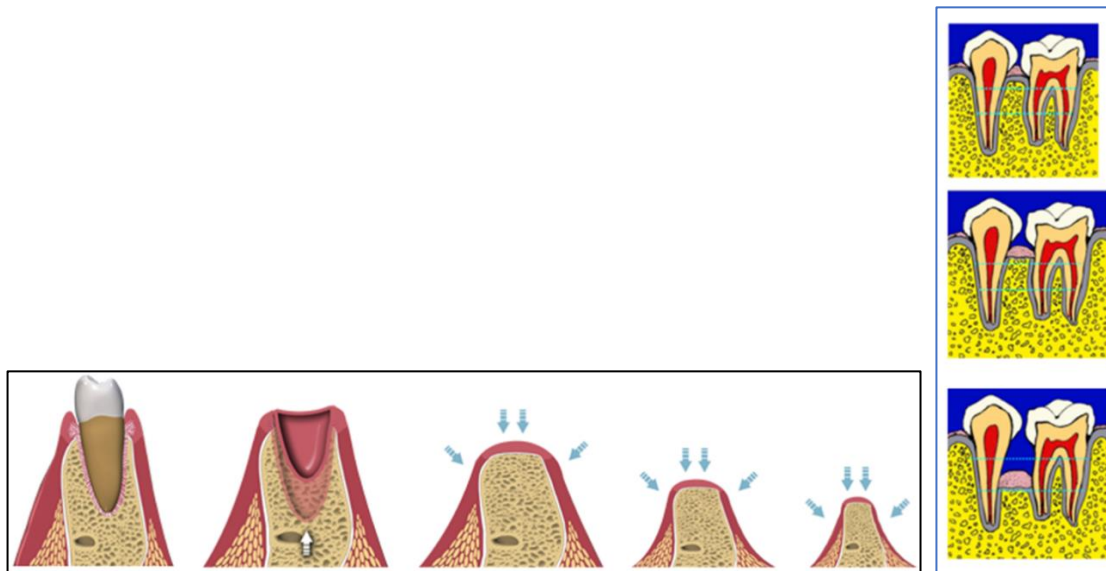


Figura 8. Pérdida de altura o anchura del reborde alveolar. Imágenes modificadas de [21], [22].

La reabsorción ósea se vuelve un problema cuando ha avanzado tanto que impide la colocación de implantes dentales, porque estos requieren que se dé la oseointegración y para ello es necesario que haya suficiente volumen de hueso alveolar.

Para resolver el problema, es decir, aumentar el hueso alveolar se puede recurrir a estimular la neoformación ósea, con las siguientes 3 estrategias: Injertos (injertos óseos onlay o inlay) y fijación con microtornillos; Tornillos de osteosíntesis y Regeneración Ósea Guiada; y Regeneración Ósea Guiada usando una membrana de barrera.

3.6 Regeneración ósea guiada

La Regeneración Ósea Guiada (ROG) es utilizada hoy en día de manera exitosa para tratar diversos tipos de defectos óseos, utilizando membranas con funciones de barrera. Se considera una técnica de estimulación para la formación de hueso nuevo, en donde las membranas mantienen el espacio del defecto óseo aislado para evitar la invasión, en la zona de reparación, de componentes celulares (células epiteliales y conjuntivas) distinto a células osteopromotoras. Las membranas deben permitir el acceso directo a los progenitores de osteoblastos [1] lo que resulta en la diferenciación del coágulo en tejido óseo y, de esta manera, contar con cantidad y calidad adecuada de hueso, con estabilidad suficiente para la rehabilitación protésica convencional o con implantes dentales oseointegrados [2]

Desde un punto de vista biológico, los tres factores que son de vital importancia en la regeneración de los tejidos son las células, el andamio o estructura de soporte y las moléculas que transportan la información entre las diferentes células. También son indispensables las condiciones biológicas adecuadas, que incluyen un aporte sanguíneo suficiente, estabilidad de la herida y suficiente tiempo para que el proceso regenerativo se presente.

El procedimiento de regeneración ósea guiada consiste en colocar un material de relleno granulado (llamado injerto) en el defecto óseo, después colocar una membrana para cubrir el injerto y finalmente la sutura del colgajo, como se puede ver en la Figura 9.

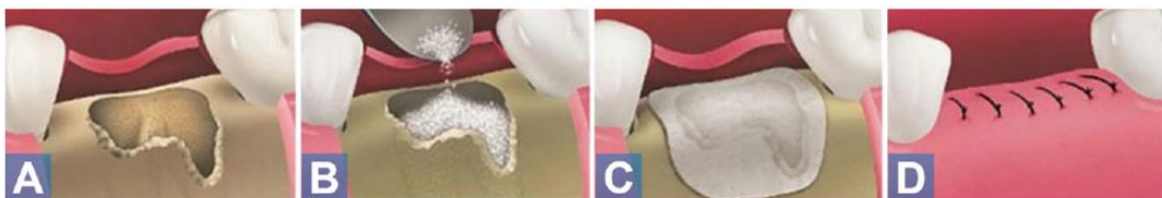


Figura 9. Pasos de la ROG: A) Defecto óseo, B) colocar injerto, C) cubrir el injerto con una membrana, D) suturar colgajos. Imagen modificada de [23]

Los injertos se utilizan para promover la formación de hueso y la regeneración periodontal. Los injertos óseos funcionan, en parte, como andamios estructurales y matrices para la inserción y proliferación de los osteoblastos (ver Figura 10)

Materiales usados en ROG

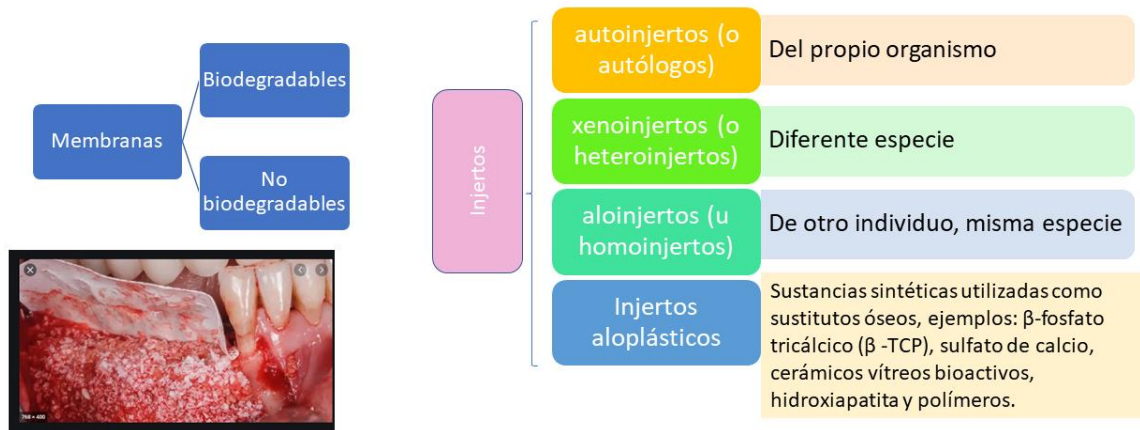


Figura 10. Biomateriales usados en ROG. [24]

Existen dos tipos de membranas: biodegradables y no biodegradables. Las primeras no necesitan ser removidas ya que con el tiempo son degradadas por degradación osmótica, son más afines a los tejidos y se integran a ellos y son las que en la actualidad se usan más. Las membranas no biodegradables fueron las primeras en ser diseñadas; estas no se degradan por lo que se requiere de una segunda cirugía para removerlas.



Figura 11. Ilustración del uso de membrana ROG para cubrir el injerto que se coloca en la zona del defecto óseo [25].

Los materiales para la elaboración de las membranas no biodegradables (o no reabsorbibles) son: politetrafluoroetileno expandido (PTFE), politetrafluoroetileno de

alta densidad y malla de titanio. Los materiales para elaborar membranas biodegradables (o reabsorbibles) o que pueden serlo parcialmente son: colágeno, quitosano, alginato, ácido hialurónico, poli (ácido láctico), poli (ácido glicólico), poli (etilenglicol), poli-DL-lactida, poli-L-lactida, poli (ácido láctico-co-glicólico) y poli (DL-lactida- ϵ -caprolactona) (PLCL). [26]–[32]

Las membranas para ROG deben cumplir todas o la mayoría de las siguientes características [33], [34]:

a) Biocompatibilidad, que permitirá la integración de la barrera con los tejidos del huésped sin provocar respuestas inflamatorias, o que presente respuestas inmunes inflamatorias mínimas.

(b) Un perfil de tiempo de degradación adecuado para igualar el de la formación de tejido nuevo, esto en el caso de las biodegradables, que evitan una segunda cirugía para su extracción, lo cual es una desventaja de las no biodegradables.

(c) Propiedades mecánicas y físicas apropiadas para permitir su colocación in vivo. Además, deben hacer la conservación del espacio. Es decir que deben ser lo suficientemente rígidas para mantener el espacio alveolar, pero lo suficientemente flexibles para adaptarse a la forma del defecto óseo.

(d) Resistencia sostenida suficiente para evitar el colapso de la membrana (suficiente soporte mecánico contra las fuerzas de compresión ejercidas por el tejido blando suprayacente durante el proceso de regeneración) y funcionar como barrera.

(e) Oclusividad celular para la capacidad de actuar como una barrera celular. Es decir, para evitar que los tejidos de crecimiento rápido (fibroblastos, células epiteliales) invadan el espacio del defecto; pero favorecer la proliferación de osteoblastos y células ligamentosas periodontales y permitir que las células óseas rellenen y regeneren el defecto.

3.7 Estado del arte de las membranas usadas en regeneración ósea guiada.

Las membranas de barrera que son usadas en la regeneración ósea guiada deben cumplir con ciertas características, por ejemplo, ser biocompatibles, no inmunogénicas, no tóxicas, que mantengan el espacio del defecto y además se prefiere que sean biodegradables, para evitar una segunda cirugía para su extracción [33]. Por lo cual las membranas de colágeno han sido una buena opción al tener todas estas características [35]–[38].

También se ha demostrado que las membranas de colágeno estimulan la síntesis de ADN y de fibroblastos. En el trabajo de Locci et al [39] se comparó el grado de biocompatibilidad entre el colágeno y el PTFE. Usando 3H-timidina, se encontró que la membrana de PTFE inhibía la síntesis de ADN de fibroblasto gingival, mientras que la membrana que constaba de 95% de colágeno y 5% de condroitina-4-sulfato mejoraba la proliferación celular. Además, la membrana de PTFE provocó una marcada disminución en la síntesis de colágeno extracelular y glicosaminoglicano, los componentes principales de la matriz extracelular (MEC). La matriz de colágeno resultó en una producción significativamente mayor de estos componentes. Dado que la MEC juega un papel importante en la cicatrización de heridas, los autores propusieron que el colágeno puede ser más adecuado que la barrera de PTFE para lograr la regeneración periodontal. Además, los osteoblastos muestran altos niveles de adherencia a las superficies de las membranas de colágeno, como lo exponen Colangelo et al. [40] en su estudio, en el cual aplicaron regeneración ósea guiada en defectos de mandíbulas de conejo, estos defectos se trataron con una membrana de colágeno o con un control sin tratamiento. La evaluación histológica a los 30 días demostró una capa continua casi completa de hueso laminar con actividad osteoblástica en el grupo tratado con membrana de colágeno, en comparación con solo tejido conectivo fibroso en el grupo de control. La osificación progresiva ocurre debido al incremento de osteoblastos, comparado con el de osteoclastos y el colágeno induce la proliferación de osteoblastos. En otro estudio realizado por El-

Jawhari et al. [41] se puede observar que las membranas de colágeno pueden apoyar en las funciones osteogénicas (en la osteogénesis las células osteogénicas forman depósitos de matriz mineralizada) de células estromales multipotentes de la médula ósea humana.

A pesar de las ventajas mostradas por las membranas de colágeno, estas se caracterizan por su baja resistencia mecánica [42]. Por otro lado, su costo es alto en comparación con polímeros sintéticos reabsorbibles, es por ello que los polímeros sintéticos reabsorbibles se han posicionado entre los principales materiales comerciales para las membranas en la regeneración ósea guiada, tales como poli (ácido glicólico) (PGA), poli (ácido láctico) (PLA) y poli (ácido láctico-co-glicólico) (PLGA) [43].

Comercialmente existen varias opciones de membranas de colágeno usadas para regeneración ósea; son elaboradas con diferentes fuentes de colágeno, principalmente porcino, bovino y equino, provenientes de partes del cuerpo de esos animales como lo son tendón (usado en mayor porcentaje), dermis, peritoneo, pericardio y submucosa. Esto se observa en la Tabla 1, del trabajo publicado por Sbricoli et al. [5] en 2020, donde se incluyen membranas producidas por 11 empresas, de las cuales 55.5% son entrecruzadas y 44.5% son no entrecruzadas. Los tiempos de resorción son muy variados y van desde 4 hasta 38 semanas [5], [44], para lo cual influyen las características que presenta el colágeno usado como materia prima, ya que las diferencias en la estructura del tejido de colágeno conducen a diferentes respuestas biológicas [45].

Tabla 1. Lista de membranas comerciales para uso clínico. Adaptada de [5].

Nombre comercial	Producida por:	Origen	Entrecruzamiento	Efecto de barrera (semanas)
Biomend	Collagen Matrix Inc.	Tendón bovino	Sí	8
Biomend Extend	Collagen Matrix Inc.	Tendón bovino	SÍ	18
Copios Extend	Collagen Matrix Inc.	Dermis porcina	No	24-36
Osseoguard	Collagen Matrix Inc.	Tendón bovino	Sí	26-38
Bio Gide	Geistlich Farma Ag	Dermis Porcina	No	24
Mem-Lok RCM	Collagen Matrix Inc.	Tendón bovino	Sí	26-38
Mem-Lok Pliable	Collagen Matrix Inc.	Peritoneo porcino	Sí	12-16
Ossix Plus	Datum Dental Ltd.	Tendón porcino	Sí	16-24
Creos Xenoprotect	Nobel Biocare	Porcino	No	12-16
Biocollagen	Bioteck S.P.A.	Tendón equino Colágeno tipo I	No	4-6
Heart	Bioteck S.P.A.	Pericardio equino	No	12-16
Cytoplast	Collagen Matrix Inc.	Tendón bovino tipo I	Sí	26-38
Collatape	Zimmer-Biomet	Colágeno bovino	No	1-2
Jason	MBP GmbH-Botiss Biomaterials	Pericardio porcino	No	8-12
Collprotect	Botiss Biomaterials	Dermis porcina	Sí	4-8
Dynamatrix	Keystone Dental	Submucosa porcina	No	n.d.
Ez Cure	Biomatlante	Colágeno tipo I y III basado en porcino purificado	Sí	12
Conform	Ace Surgical Supply Company	Colágeno de bovino tipo I	Sí	12-16

Las membranas compuestas de colágeno sin entrecruzar tienen el principal inconveniente de la rápida degradación in vivo que no proporciona la integridad estructural necesaria para todo el proceso de regeneración ósea. Los beneficios de una membrana de colágeno entrecruzada dan como resultado una barrera de mayor

resistencia mecánica y a la degradación, en comparación con la aplicación de una membrana de colágeno no reticulada.

Las desventajas de las membranas de colágeno (y de las biodegradables en general) son sus propiedades mecánicas insuficientes para cubrir el espacio en defectos óseos grandes, perfiles de degradación impredecibles para igualar la velocidad de formación de hueso nuevo y pérdida rápida de propiedades estructurales y mecánicas durante la degradación [46].

Las membranas de colágeno tienen ventajas comparadas con otros materiales respecto a las propiedades biológicas [47]. Pero aún hay varios desafíos a los que se enfrentan las membranas para regeneración ósea actuales, de los cuales destacan: el equilibrio entre la degradabilidad y el rendimiento mecánico; la funcionalización de la superficie de las membranas; y el uso de la membrana para actuar como un depósito para liberar fármacos [46]. Estos tres desafíos en el desarrollo de membranas se han tratado de abarcar en investigaciones recientes sobre membranas, por ejemplo, al proponer la combinación del colágeno con otros biomateriales. Algunos de estos trabajos de investigación con nuevas propuestas para membranas ROG se enlistan en los siguientes párrafos.

Guo et al. [29] fabricaron por electrohilado membranas de colágeno combinado con quitosano y evaluaron sus propiedades físicas y químicas, encontrando que en comparación con las membranas de colágeno electrohiladas, las membranas de colágeno-quitosano electrohiladas presentaron mejores características, incluida una mayor resistencia a la tracción y una tasa de degradación más estable. También en el trabajo de Indrani et al. [28] se prepararon membranas de mezclas de quitosano-colágeno, pero en este caso utilizando el método de evaporación del disolvente. Los resultados mostraron que el colágeno influye más y de mejor manera en las propiedades mecánicas de las membranas en comparación con el quitosano.

Valenzuela-Rojo et al. [27] elaboraron, por liofilización, esponjas de colágeno y quitosano y como material coadyuvante se añadió alginato. Las esponjas con base en colágeno / quitosano / alginato exhibieron la mayor capacidad de absorción en agua a 25 ° C, con valores de hasta 28.38%. Las esponjas de colágeno-quitosano

tienen menos rigidez y resistencia mecánica que las esponjas de colágeno-alginato. Las esponjas de colágeno-alginato contenían la tensión máxima y el módulo de Young más altos, con valores de 0.5463 MPa y 0.0086 MPa, respectivamente. Las esponjas de colágeno con quitosano tienen un mayor alargamiento a la rotura (6.1566%). Las esponjas con mayor actividad antimicrobiana fueron las mezclas de colágeno-quitosano, con zonas de inhibición de hasta el 46.62% frente a *Staphylococcus aureus*. En conclusión, se propone que las esponjas con base en colágeno de pescado y quitosano de camarón pueden servir como alternativa de biomaterial para la cicatrización de heridas cutáneas por sus propiedades mecánicas y antibacterianas.

En la investigación de Park et al. [48] se fabricaron matrices porosas que contenían colágeno y ácido hialurónico mediante liofilización. Las membranas porosas fabricadas se reticularon utilizando 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC) en un rango de concentraciones de 1 a 100 mM, para mejorar la estabilidad mecánica de la matriz compuesta. Las observaciones en SEM de las matrices demostraron que las matrices obtenidas antes del proceso de reticulación tenían poros interconectados con diámetros medios de 40, 90 o 230 μm y una porosidad de 58 a 66% según la temperatura de congelación. Las estructuras porosas se conservaron después del proceso de reticulación. La prueba de hinchamiento y la medición espectroscópica por IR de diferentes membranas reticuladas se llevaron a cabo como una medida del grado de reticulación. El hinchamiento de las membranas reticuladas no mostró diferencias significativas a medida que aumentaba el grado de reticulación. En la prueba de degradación enzimática, las membranas tratadas con EDC mostraron una mejora significativa de la resistencia a la actividad colagenasa, en comparación con las membranas tratadas con glutaraldehído al 0.625%. En la prueba de citotoxicidad con células fibroblásticas L929, las membranas reticuladas con EDC no demostraron toxicidad significativa.

Zhang et al. [49] prepararon una membrana compuesta de mezclas de PLA / PLGA para la barrera periodontal y probaron sus propiedades físicas, mecánicas y biológicas. Cuando la proporción PLA / PLGA = 2: 1 (p / p), la tasa de degradación

de la membrana fue del 63,7% en 32 semanas. La membrana presentaba poros de apertura de 2 a 5 μm , resistencia mínima a la tracción de 5.75MPa y porosidad superior al 90%, lo que favorecía la entrada de nutrientes y la eliminación de desechos metabólicos. Mediante SEM se observó que los fibroblastos gingivales solo crecían en la superficie requerida y no en el otro lado, lo que indica que la membrana desempeñaba un buen papel de barrera mecánica.

En el trabajo de Chen et al. [50] se recubrió una membrana comercial con nanopartículas de plata. Se evaluaron dos métodos de recubrimiento de plata y se encontró un recubrimiento controlable y preciso logrado por sonicación, en comparación con la pulverización catódica. La membrana de colágeno optimizada recubierta de nanopartículas de plata (AgNP) exhibió excelentes efectos antibacterianos contra *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) y *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) con toxicidad celular limitada. También mostró efectos antiinflamatorios efectivos al reducir la expresión y liberación de citocinas inflamatorias, incluidas IL-6 y TNF-alfa. Además, las membranas de colágeno recubiertas de AgNP pudieron inducir la diferenciación osteogénica de las células madre mesenquimales que guían la regeneración ósea. Estos hallazgos demuestran la posible aplicación de membranas de colágeno recubiertas de AgNP, para prevenir infecciones después de la introducción del injerto óseo en la reconstrucción de la cresta alveolar.

Ratiu et al. [51] evaluaron las propiedades de diferentes membranas disponibles comercialmente de colágeno reabsorbible para la regeneración ósea guiada, tras la adición de plasma rico en factores de crecimiento (PRFC). Los detalles estructurales y morfológicos, las propiedades mecánicas y la degradación enzimática se investigaron con un nuevo enfoque, proporcionando a los médicos nuevos datos para ayudarlos en una comparación exitosa y una mejor selección de membranas, con respecto a su ubicación y condiciones de trabajo. Características particulares como la porosidad, la densidad de la fibra y la topografía de la superficie pueden influir en el comportamiento mecánico y el rendimiento de las membranas, como lo revelan las mediciones de SEM / microscopía de fuerza atómica (AFM) y

nanopenetración. Las propiedades mecánicas y la degradación enzimática de las membranas se analizaron de manera comparativa, antes y después de la modificación del PRFC. Los cambios en los valores del módulo de Young se correlacionan con las propiedades ultraestructurales de cada tipo de membrana. La prueba de degradación enzimática (tripsina) también enfatizó que las membranas modificadas con PRFC exhiben una degradación más lenta en comparación con las nativas.

En el estudio de Ansarizadeh et al. [30] se utilizó fibrina rica en plaquetas liofilizada (FRP-A) en combinación con una membrana (por liofilización, entrecruzada con EDC y NHS) de colágeno-quitosano por primera vez para combinar las ventajas de las membranas de colágeno y FRP-A. Se utilizó la metodología de superficie de respuesta para diseñar la condición experimental y correlacionar los efectos de los parámetros, incluida la relación en peso de quitosano-colágeno y la concentración de FRP-A en el módulo de Young, la viabilidad de las células madre mesenquimales (CMM) y la tasa de degradación de las membranas. Los resultados mostraron que el módulo de Young de las membranas aumentó con el incremento en la relación en peso quitosano-colágeno y al disminuir la concentración de FRP-A. La viabilidad celular de las CMM se mejoró aumentando tanto la relación en peso quitosano-colágeno como la concentración de FRP-A. Además, a medida que la relación en peso quitosano-colágeno aumentó de 0 a 4 y la concentración de FRP-A disminuyó de 5 a 0, la tasa de degradación de las membranas disminuyó de 90 a 20% después de cuatro semanas de incubación. Finalmente, con base en el cálculo del software Design Expert para minimizar la tasa de degradación y maximizar tanto el módulo de Young como la viabilidad celular, se sugirió que los valores de la relación de peso quitosano-colágeno y la concentración de FRP-A fueran 4 y 0,58 mg/mL, específicamente. El análisis de la actividad de la fosfatasa alcalina mostró que la adición de FRP-A provocó una mayor diferenciación osteogénica.

En el trabajo de Wang et al. [52] se aplicó un proceso de precursor líquido inducido por polímeros para fabricar películas de colágeno con un grado variable de mineralización y se probó su rendimiento. Se adicionaron iones Ca^{2+} como

estimulador de biomineralización. Los resultados mostraron que las membranas biomineralizadas preparadas son biocompatibles, tienen una alta resistencia al estrés y pueden promover la proliferación de células MC3T3-e1. Esto indicó que las membranas que presentaron un mayor grado de mineralización se pueden aplicar potencialmente en la regeneración ósea guiada.

Por otro lado, también se han realizado investigaciones con la incorporación de materiales osteoconductores (osteoconducción es la formación de hueso sobre la superficie de un soporte estructural, que puede ser la matriz colágena fisiológica o un andamio implantado) relacionados con el fosfato de calcio como la hidroxiapatita. Así se han patentado el método de fabricación de un compuesto de colágeno mineralizado / biocerámica [53] y el método para producir una membrana compuesta de colágeno / apatita [54]

También en el trabajo de Antoniac et al. [55] se ocupó colágeno e hidroxiapatita (HAp), además se incluyeron nanopartículas de magnesio (Mg). Se desarrollaron andamios compuestos de 10% de colágeno – 90% de hidroxiapatita (HAp) y 10% de colágeno – 80% de HAp - 10% de Mg. Para su preparación se utilizó liofilización. Se realizó un estudio de la naturaleza nanoestructural de los andamios desarrollados mediante SEM, en conjunto con las técnicas de dispersión de energía por rayos X (EDS) y microscopía electrónica de transmisión (TEM). Los grupos de nanocristalitos de HAp y nanopartículas de Mg se distribuyeron homogéneamente dentro de los andamios y se adhirieron a las fibrillas de colágeno. Las muestras se analizaron para determinar su degradación en una solución de fluido corporal simulado, para lo cual se sumergieron durante un máximo de 28 días. Se atestiguó la liberación de Mg del compuesto colágeno (10%) - HAp (80%) - Mg (10%) durante el período de hasta 21 días, caracterizándose este compuesto por una menor tasa de degradación con respecto al compuesto sin Mg. Los materiales compuestos desarrollados son prometedores para aplicaciones como materiales sustitutos óseos que favorecen la cicatrización y regeneración óseas.

Se ha demostrado que la estructura de poros de los andamios tridimensionales utilizados en la ingeniería de tejidos influye significativamente en la actividad celular.

Como el tamaño de poro óptimo depende de las características específicas de la aplicación de ingeniería de tejidos, la capacidad de alterar el tamaño de poro en un amplio rango es esencial para que un andamio particular sea adecuado para múltiples aplicaciones. Esto se toma en cuenta en el trabajo de Haugh et al. [56], cuyo objetivo fue desarrollar metodologías para producir una gama de andamios de colágeno-glicosaminoglicano (GC) con tamaños de poro medios personalizados. El tamaño de poro de los andamios GC se establece durante el proceso de fabricación de liofilización. En este estudio se varió la temperatura de congelación (-10 ° C a -70 ° C) y se introdujo un paso de recocido en el proceso para determinar sus efectos sobre el tamaño de los poros. Los resultados muestran que el tamaño de los poros de los andamios disminuyó a medida que se redujo la temperatura de congelación. Además, se encontró que la introducción de una etapa de recocido durante la liofilización da como resultado un aumento significativo (40%) en el tamaño de los poros. Tomados en conjunto, estos resultados demuestran que las metodologías desarrolladas en este estudio se pueden utilizar para producir una gama de andamios GC con tamaños medios de poros de 85 a 325 μm . Esta es una mejora sustancial en la gama de tamaños de poros que era posible producir anteriormente (96 –150 μm). Los métodos desarrollados en este estudio proporcionan una base para la investigación de los efectos del tamaño de los poros en la actividad celular tanto in vitro como in vivo y para la determinación de la estructura de poros óptima para aplicaciones específicas de ingeniería de tejidos.

Cabe destacar que la gelatina podría también utilizarse como alternativa al colágeno [57], ya que presenta similitudes en su composición, sin embargo, existen muy pocos trabajos de investigación acerca de su desarrollo y aún no se han producido membranas con base en gelatina de manera comercial.

La mayoría de las veces el método utilizado para elaborar membranas o andamios a partir de gelatina es por electrohilado. De entre los trabajos de este tipo de investigación tenemos como ejemplo el de Ji et al. [58]. Varias investigaciones se han centrado en el desarrollo de una membrana de ROG bioactiva, que ejerza

actividad biológica para estimular la regeneración in situ en el lugar del defecto óseo. Un enfoque utilizado con frecuencia es incorporar factores osteogénicos (de crecimiento) en las membranas ROG, para fomentar la diferenciación de los tipos de células progenitoras osteogénicas en el espacio aislado debajo de la membrana. El objetivo de este trabajo [58] fue evaluar el efecto de la funcionalización de la membrana con un factor quimiotáctico en el reclutamiento de células y la formación de hueso, con el fin de desarrollar una membrana bioactiva para aplicaciones de ROG. Con este fin se prepararon membranas mediante electrohilado usando poli(ϵ -caprolactona) (PCL) mezclada con gelatina de tipo B y funcionalizadas con factor 1α derivado de células estromales (SDF- 1α) mediante adsorción física. En primer lugar, las membranas obtenidas se evaluaron in vitro en la liberación de SDF- 1α y el efecto quimiotáctico sobre las células estromales de la médula ósea (CEMOs). Posteriormente se evaluaron el reclutamiento de CEMOs in vivo y la regeneración ósea en respuesta a las membranas electrohiladas PCL/gelatina cargadas con SDF- 1α en defectos craneales de rata. Los resultados mostraron que las membranas electrohiladas de PCL/gelatina proporcionaron un perfil de liberación de SDF- 1α de difusión controlada. Además, las membranas cargadas con diferentes cantidades de SDF- 1α (50-400 ng) indujeron significativamente la migración quimiotáctica estimulada de CEMOs in vitro sin efectos dependientes de la dosis. Ocho semanas después de la implantación en defectos craneales de rata, las membranas cargadas con SDF- 1α produjeron un aumento de 6 veces en la cantidad de formación ósea, en comparación con las membranas solas, aunque no se pudo determinar la contribución del reclutamiento de CEMOs in vivo a la regeneración ósea. En conclusión, los resultados del estudio indicaron la posibilidad de utilizar la membrana electrohilada de gelatina/PCL con SDF- 1α como membrana bioactiva, lo que es beneficioso para optimizar la aplicación clínica de las estrategias de ROG.

En el trabajo de Bottino et al [59] se diseñó y fabricó una nueva membrana funcionalmente graduada (MFG) mediante electrohilado secuencial de múltiples capas. La MFG consta de una capa central (CC) y dos capas superficiales funcionales (CS) que interactúan con tejidos óseos (nanohidroxiapatita, n-HAp) y epiteliales (metronidazol, MET). La CC comprende una capa pura de poli (dl-lactida-

co- ϵ -caprolactona) (PLCL) rodeada por dos capas compuestas por una mezcla ternaria de proteína / polímero (PLCL: PLA: GEL). Se determinó la morfología, estructura y propiedades mecánicas en cada capa electrohilada. La morfología de las fibras individuales y la rugosidad de los CS funcionales, que son las capas que contienen n-HAp y que incorporan el fármaco, se evaluaron mediante AFM. La estructura CC demostró mayor resistencia (8.7 MPa) y mayor deformación a la rotura (357%) en comparación con la MFG (3.5 MPa, 297%). La incorporación de n-HAp para mejorar el comportamiento osteoconductor y MET para combatir los patógenos periodontales condujo a una nueva MFG que promete resolver los inconvenientes de las membranas actualmente disponibles.

Otro ejemplo de gelatina en regeneración periodontal es el estudio de Münchow et al. [60], el cual informa sobre la síntesis, caracterización de materiales, capacidad antimicrobiana y citocompatibilidad de membranas nuevas cargadas con ZnO para la regeneración guiada. Se disolvieron PCL y PCL / gelatina (PCL / GEL) en hexafluoropropanol y se cargaron con ZnO en distintas concentraciones. La gelatina usada fue de piel de bovino. Se realizó electrohilado utilizando parámetros optimizados y las fibras se caracterizaron mediante SEM y TEM, espectroscopia EDS, espectroscopia FTIR, ángulo de contacto (AC), pruebas mecánicas, actividad antimicrobiana contra periodontopatógenos y prueba de citotoxicidad utilizando células madre de la pulpa dental humana (hDPSC). Las nanopartículas de ZnO se incorporaron con éxito a las submicrofibras, que mostraron una microestructura adecuada. Tras la incorporación de las nanopartículas de ZnO, las fibras PCL y PCL / GEL se volvieron más gruesas y más delgadas, respectivamente. Todas las membranas que contenían GEL mostraron un AC más bajo que las membranas basadas en PCL, que eran altamente hidrófobas. En general, las propiedades mecánicas de las membranas se redujeron con la incorporación de ZnO, excepto para las membranas basadas en PCL que contenían ZnO al 30% en peso. La presencia de GEL mejoró la capacidad de estiramiento de las membranas en condiciones de humedad. Todas las membranas que contienen ZnO mostraron actividad antibacteriana contra las bacterias probadas, que en general fue más pronunciada con un mayor contenido de ZnO. Todas las membranas sintetizadas

en este estudio demostraron una citocompatibilidad satisfactoria, aunque la presencia de ZnO al 30% en peso condujo a una menor viabilidad.

En el trabajo de Zhang et al. [61] se fabricó una estructura tipo sándwich de quitosano / policaprolactona / gelatina mediante electrohilado y liofilización. Estos armazones compuestos mostraron propiedades fisicoquímicas favorables, incluyendo: porosidad adecuada (<50%), tamaño de poro (alrededor de 10 μm) y estabilidad mecánica (aumentando con mayor cantidad de PCL), óptimo hinchamiento e hidrofiliidad. Se aprobaron tasas de degradación apropiadas mediante análisis de degradabilidad in vitro e in vivo, que se asemejaba más al proceso de regeneración de tejidos. En los ensayos de viabilidad celular, de unión celular y de tinción con rojo Sirius, se mostró que los andamios tenían una buena biocompatibilidad, no afectaban negativamente la capacidad de adhesión celular e inducían altos niveles de secreción de colágeno. Los resultados de la implantación subcutánea revelaron que los andamios tenían fuertes efectos de barrera celular y protección contra la invasión celular externa. En resumen, esos andamios compuestos multifuncionales mostraron una estructura optimizada, capacidades regenerativas mejoradas y sirven como base para mejorar los diseños de RTG en la regeneración periodontal.

En la investigación de Alizadeh et al. [62] se obtuvo que un método combinado de liofilización y lixiviación de partículas para la fabricación de andamios mostró una mejora en la microestructura horizontal de los andamios de gelatina / quitosano. El tipo y concentración del agente de reticulación, la temperatura de congelación, la concentración de la solución polimérica y la relación en peso de gelatina / quitosano fueron las variables que afectaron las propiedades del andamio. La evaluación de las propiedades de tracción de los andamios reveló que, para un andamio con 50% de quitosano, el glutaraldehído como agente reticulante creaba una red polimérica mucho más firme en comparación con la N, N- (3-dimetilaminopropil) -N'-etil carbodiimida (EDC). Sin embargo, en el caso de los andamios de gelatina, el EDC se identificó como el reticulante más efectivo. El comportamiento a la compresión de los andamios satisfizo las formulaciones obtenidas del modelado teórico de las

espumas elastoméricas de baja densidad. La investigación de la degradación del andamio indicó que el aumento en la resistencia mecánica de los andamios no siempre reduciría su tasa de degradación.

Uno de los componentes principales para tener éxito en la ingeniería de tejidos es desarrollar un andamio con una arquitectura adecuada para permitir la migración, la proliferación celular y la diferenciación. Por lo cual en el trabajo de Angulo et al. [63] se desarrolló un andamio de gelatina-quitosano mediante liofilización. Se investigaron los efectos de la concentración de sólidos y el procesamiento de congelación sobre la morfología del andamio y el tamaño de poros. A medida que se incrementó el contenido de quitosano, se modificaron las propiedades viscoelásticas de la gelatina de piel de cerdo; los valores máximos del módulo de almacenamiento (G') fueron menores que los valores de la solución de gelatina pura, y las transiciones térmicas también ocurrieron a temperaturas más bajas, así como una disminución de la tendencia al tamaño de los poros. Se observó que el andamio aumentó visiblemente la porosidad, con una matriz de poros interconectada y más homogénea. Los tamaños de los poros se vuelven más pequeños y las paredes de los poros más delgadas, mientras que la interconectividad aumenta junto con la disminución de la temperatura de precongelación.

3.8 Gelatina y colágeno

La gelatina es un biopolímero muy versátil que tiene un gran número de aplicaciones en productos alimenticios, farmacéuticos, médicos, cosméticos y tecnológicos. Las gelatinas se derivan del colágeno, que es la proteína original, mediante procesos que rompen la estructura secundaria y superiores con diversos grados de hidrólisis de la estructura polipeptídica. Las proporciones y secuencias relativas de los

aminoácidos constituyentes del colágeno y la gelatina son sustancialmente las mismas, pero las propiedades físicas de las dos difieren notablemente [64].

El colágeno es el componente principal de todos los tejidos conectivos fibrosos que se encuentran en los cuerpos de los animales, tales como huesos, cartílagos, tendones, fibras musculares, piel, matriz ósea, paredes de los vasos sanguíneos, córnea del ojo, etc.

El colágeno es una proteína constituida por tres cadenas polipeptídicas, denominadas cadenas α , que están super enrolladas una alrededor de la otra formando una triple hélice, como se ve en Figura 12. Existen más de 30 tipos de colágeno en los vertebrados [65], cada tipo de colágeno dependerá la composición de aminoácidos característica y cómo serán en las tres hélices que se enrollan, ya que pueden tener las siguientes combinaciones: las tres diferentes, dos iguales y una diferente, o las tres iguales. Por ejemplo, para el colágeno tipo I, que es uno de los más comunes, está formado por dos cadenas α idénticas designadas como $\alpha 1(I)$ y una cadena α diferente $\alpha 2(I)$ que se enrollan sobre sí mismas formando una super hélice con una longitud de 300 nm [66]. En cambio, el colágeno tipo II está formado por 3 cadenas α idénticas $\alpha 1(II)$. El estrecho empaquetamiento de las cadenas α proporciona gran fuerza de tensión a las moléculas de colágeno.

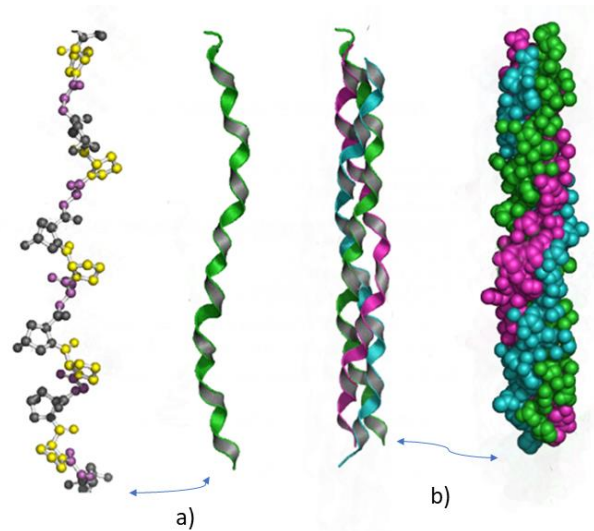


Figura 12. Dos tipos de representaciones de: a) Cadena α de colágeno. La secuencia tripeptídica Gly-X-Pro o Gly-X-4-Hyp adopta una estructura helicoidal con tres aminoácidos por vuelta (donde Gly=glicina, Pro=prolina, Hyp=hidroxiprolina); b) tres de estas hélices se enrollan entre sí.

Cada cadena polipeptídica está formada por cierto número de aminoácidos diferentes (la mayoría de las cadenas α contiene los 20 tipos de aminoácidos), sin embargo, tienen en mayor porcentaje glicina, prolina e hidroxiprolina. La secuencia de aminoácidos de las cadenas de colágeno es una repetición de un tripéptido del tipo Gly-X-Y, donde X es a menudo prolina y donde Y es a menudo 4-hidroxiprolina [65].

Las fibrillas de colágeno son entramados supramoleculares constituidos por un enrollamiento de moléculas de colágeno. Para formar fibrillas, las triples hélices se alinean de manera escalonada (como se ve en Figura 13), se ensamblan y se establecen enlaces covalentes entre las cadenas y las hélices. El alineamiento específico y grado de entrecruzamiento varían para cada tejido.

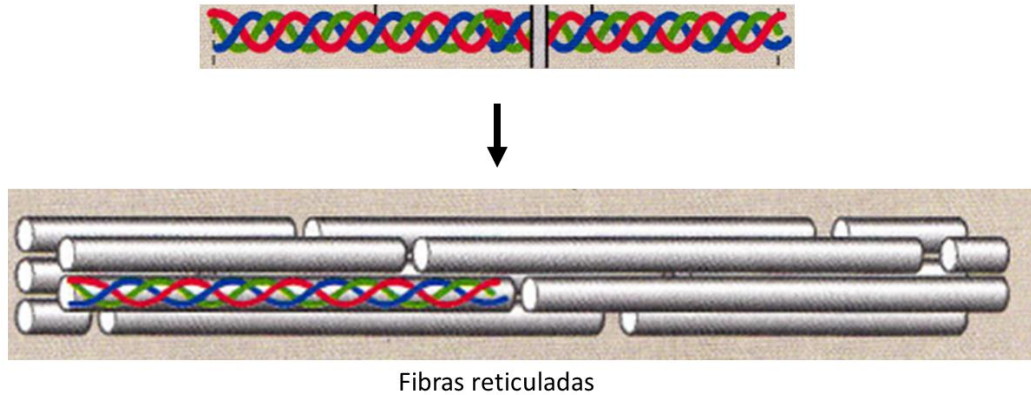


Figura 13. Autoensamblaje de las moléculas de colágeno en fibrillas, con el posterior establecimiento de enlaces cruzados para formar las fibras de colágeno maduras [67].

El colágeno es insoluble en agua, pero la gelatina se disuelve fácilmente en agua al calentarla a temperaturas superiores a la temperatura de desnaturalización del colágeno nativo. Para producir gelatina se usa como materia prima cualquier tejido que contenga colágeno, pero es más común obtenerla de mamíferos o de pescados, de los cuales resultan propiedades físicas diferentes para cada gelatina. También estas propiedades van a depender del proceso de obtención de la gelatina.

La gelatina se obtiene mediante hidrólisis parcial del colágeno nativo (cuya molécula tiene un peso molecular de alrededor de 300kDa). La solubilización térmica del colágeno (en presencia de ácido o álcali) se debe a la ruptura de una serie de enlaces covalentes intra e intermoleculares que están presentes en el colágeno, a la destrucción de los puentes de hidrógeno, y, además, algunos enlaces amida en las cadenas elementales de moléculas de colágeno se someten a hidrólisis. Todo esto provoca la pérdida de la conformación de triple hélice. El proceso de extracción puede influir en la longitud de las cadenas polipeptídicas y las propiedades funcionales de la gelatina. Esto depende de los parámetros de procesamiento (temperatura, tiempo y pH), el pretratamiento y las propiedades y método de conservación de la materia prima de partida.

La combinación de pretratamiento y extracción hace que el producto de gelatina final sea una mezcla de cadenas polipeptídicas con diferentes composiciones y pesos moleculares, como puede verse en la Figura 14. La figura muestra los tres

fragmentos dominantes que se encuentran en la gelatina: cadenas α libres; cadenas β donde dos cadenas α están unidas covalentemente; y cadenas γ cuando tres cadenas α están unidas covalentemente. Las cadenas α libres también se pueden despolimerizar en subcadenas α ; polipéptidos con un peso molecular promedio en peso M_w más bajo que una cadena α . Esto significa que la gelatina no es una proteína monodispersa y que todos los parámetros que describen las propiedades químicas y físicas de las gelatinas son valores promedios [64].

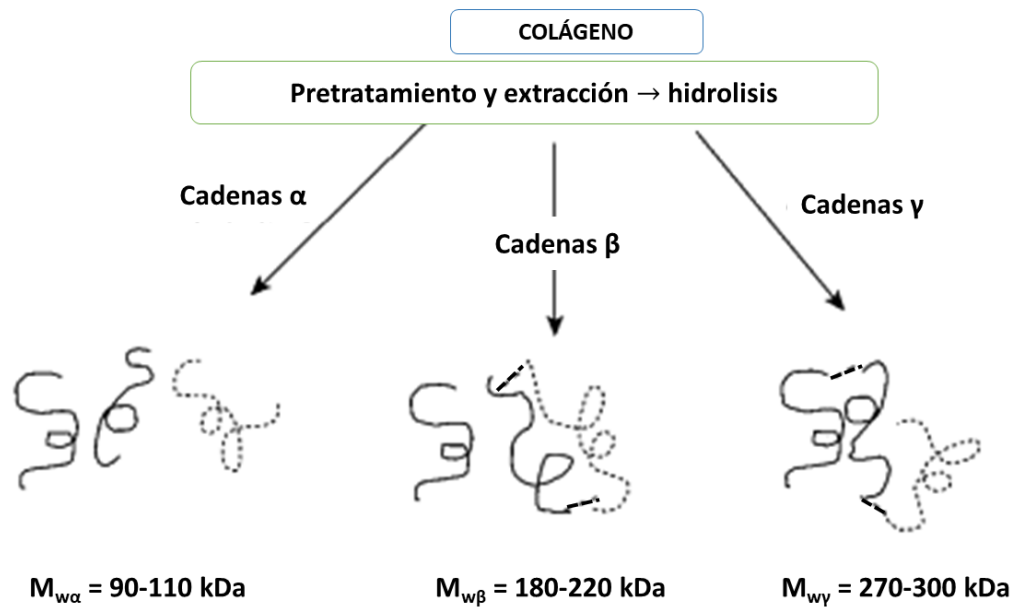


Figura 14. La gelatina es una mezcla de diferentes tipos de cadenas con diferentes pesos moleculares que dan como resultado una polidispersidad [64].

El proceso de fabricación de gelatina consta de las siguientes etapas: limpieza de los tejidos de origen, pretratamiento, extracción de gelatina, filtración, purificación, esterilización, concentración, secado y finalmente molienda.

Dependiendo del método de pretratamiento que se les dé a los colágenos, se pueden producir dos tipos diferentes de gelatina. La gelatina tipo A se produce a partir de colágeno tratado con ácido, y la gelatina tipo B se produce a partir de colágeno tratado con álcali. El tratamiento ácido es más adecuado para los colágenos menos reticulados covalentemente que se encuentran en las pieles de

cerdo o pescado, mientras que el tratamiento alcalino es adecuado para los colágenos más complejos que se encuentran en las pieles bovinas [11].

Entre las propiedades más importantes que caracterizan a la gelatina se encuentran la fuerza del gel, la viscosidad, la gelificación y los puntos de fusión. Estas propiedades se ven afectadas por muchos factores, como el peso molecular promedio y la distribución del peso molecular, la concentración de la solución de gelatina, el tiempo de maduración del gel, la temperatura de maduración del gel, el pH y el contenido de sal. El método estándar para determinar la fuerza del gel se llama prueba de Bloom, que es la fuerza en gramos requerida para comprimir la superficie de un gel de gelatina 4 mm usando un émbolo cilíndrico de fondo plano de 12,5 mm de diámetro, deben ser 112 g de un gel de gelatina estándar 62/3 % p/v a 10 °C [68]. Esta característica se llama fuerza Bloom, que es esencialmente la rigidez de un gel de gelatina formado y medido en condiciones estándar. En la actualidad no existe una buena correlación entre los valores de Bloom, el peso molecular medio y la distribución del peso molecular de las gelatinas [64].

En comparación con el colágeno, la gelatina muestra mayor biocompatibilidad, biodegradabilidad, menor costo con alta eficacia, baja inmunogenicidad y buena biodisponibilidad [8]. Todas esas propiedades atractivas de la gelatina a las que se le suman la plasticidad, la promoción de la adhesión y el crecimiento celular y el bajo costo, la hacen ideal como biomaterial para la ingeniería de tejidos en regeneración ósea guiada [69]. Sin embargo, la gelatina exhibe malas propiedades mecánicas y una rápida degradación, por lo que se han desarrollado diversos métodos para mejorar estas propiedades por medio de entrecruzamientos y/o por la combinación con otros biomateriales, como ya se ha mencionado en la sección 3.7 Estado del arte.

3.9 Técnicas de caracterización

3.9.1 Espectroscopía de Infrarrojo

Es una técnica de análisis que permite obtener información estructural de la materia, en la cual un haz de luz infrarroja incide sobre la materia y provoca vibraciones de los átomos de la molécula. Las vibraciones son específicas a determinadas frecuencias de los enlaces químicos, que corresponden a niveles de energía de la molécula [70]. Esto hace posible la asignación de picos de absorción a grupos funcionales específicos para así poder identificar a las moléculas que los contienen.

El espectrofotómetro produce un espectro de absorción infrarrojo que se puede visualizar en un gráfico de absorbancia o transmitancia en el eje vertical contra longitud de onda o frecuencia en el eje horizontal. Los espectrofotómetros hacen un barrido desde los 4000 cm^{-1} hasta los 400 cm^{-1} . Las bandas de absorción que se presentan en los espectros van a adquirir un significado que es determinado por la información concerniente a la función de la molécula y el ambiente químico en que se rodea; el tipo de vibración, y la cantidad presente del enlace.

La frecuencia ν es inversamente proporcional a la longitud de onda:

$\nu = \frac{c}{\lambda}$, donde λ es la longitud de onda y c es la velocidad de la luz.

El número de onda $\bar{\nu}$ es el inverso de la longitud de onda:

$$\bar{\nu} = \frac{1}{\lambda} \quad (1)$$

La transmitancia es la fracción de luz incidente, a una longitud de onda especificada, que pasa a través de una muestra.

$$T = \frac{I}{I_0} \quad (2)$$

Donde I_0 es la intensidad de luz del rayo incidente e I es la intensidad de la luz que viene de la muestra, es decir la intensidad de luz transmitida.

La transmitancia se suele expresar como el porcentaje de luz incidente que pasa a través de la muestra:

$$\%Transmitancia = \left(\frac{I}{I_0}\right) * 100\% \quad (3)$$

La absorbancia se relaciona con la transmitancia de la siguiente manera:

$$Absorbancia = -\log_{10} T = -\log_{10} \left(\frac{I}{I_0}\right) \quad (4)$$

La absorción de la luz es una función de la concentración de las moléculas absorbidas. Una más precisa forma de reportar la intensidad de la absorción es por el uso de la Ley de Beer-Lambert:

$$Absorbancia = -\log_{10} \left(\frac{I}{I_0}\right) = e c l \quad (5)$$

Donde e = absortividad molar, c =concentración molar de soluto y l = longitud de la celda de muestra (cm)

La radiación electromagnética que incide en un material es absorbida únicamente en frecuencias correspondientes a las vibraciones moleculares. La espectroscopia IR permite medir los niveles de energía vibracional de las moléculas [71].

Los tipos de movimientos que puede tener una molécula son: traslación, rotación y vibración. Dentro de las formas de vibración de una molécula se encuentran los siguientes modos clasificados en la Figura 15 e ilustrados en Figura 16.

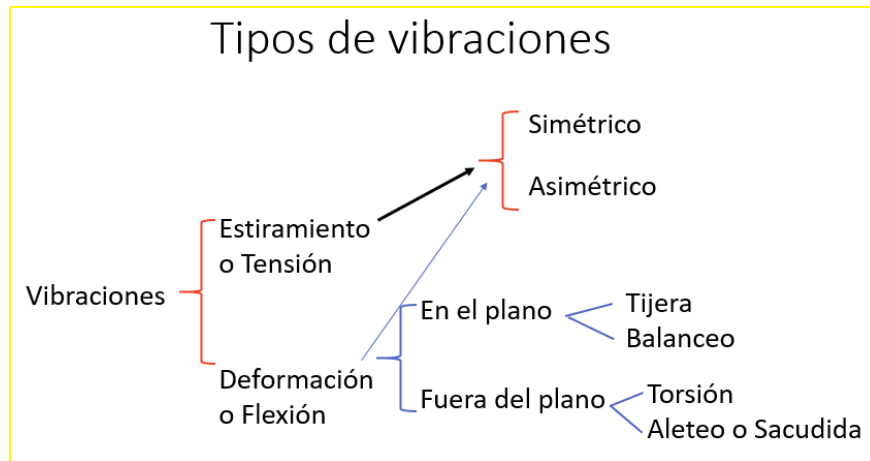


Figura 15. Modos vibracionales

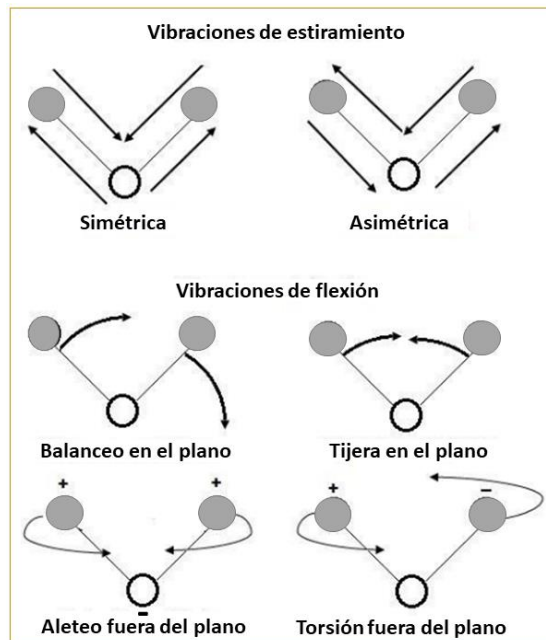


Figura 16. Ilustración de los tipos de vibraciones moleculares. El signo - indica un movimiento desde el plano de la página alejándose del lector y + indica un movimiento desde el plano de la página hacia el lector [72].

Aplicaciones de espectroscopía IR

-El uso más común: análisis comparativo del espectro de un compuesto desconocido u obtenido con el espectro del compuesto que se sospecha o se espera que sea.

Un espectro IR puede ser considerado como una huella digital de la molécula. No hay dos moléculas con el mismo IR (excepto isómeros ópticos). Cada una de ellas tendrá un espectro característico dependiendo de los enlaces entre los átomos que las constituyen.

-Monitorear la desaparición o aparición de una señal de absorción IR. Usando la ley de Beer Lambert, se puede determinar la tasa de desaparición de reactivo con el tiempo durante la reacción.

-Para determinar las energías de disociación de un enlace específico por determinación de la frecuencia de absorción precisa y asumiendo que la vibración imita las dos masas de un resorte

En la actualidad, los espectrofotómetros infrarrojos con Transformada de Fourier (FT-IR, por sus siglas en inglés) son los más utilizados y su nombre se debe al hecho de que a la señal que llega al detector del espectrofotómetro se les efectúa un proceso matemático llamado Transformada de Fourier.

3.9.2 Pruebas mecánicas de tensión

Para las aplicaciones de los biomateriales que se pretenden desarrollar en este trabajo son muy importantes las propiedades mecánicas. Cabe señalar que la dependencia de las propiedades mecánicas de la microestructura es tan grande que uno de los objetivos fundamentales de la ciencia de los materiales es controlar las propiedades mecánicas modificando la microestructura [73].

El ensayo de tensión mide la resistencia de un material al aplicar gradualmente una deformación [74]. Una muestra se deforma uniaxialmente a lo largo del eje longitudinal, generalmente hasta fracturarse, como respuesta, el material se opone a la deformación mediante una fuerza (F) de tracción que aumenta gradualmente [75]. Un esquema de este ensayo aparece en la Figura 17. Para medir el alargamiento del material causado por la aplicación de la deformación se utiliza un extensómetro [74].

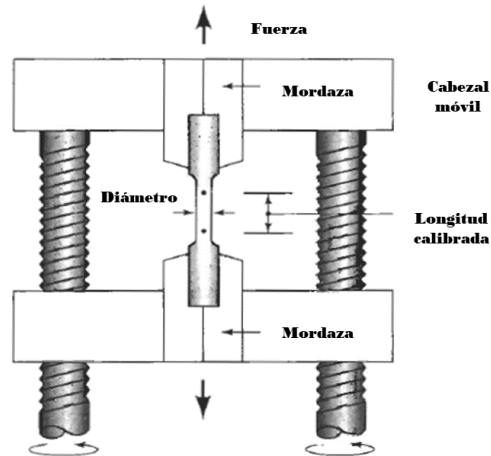


Figura 17. Representación esquemática de un dispositivo de ensayo de tensión [74].

La fuerza para una deformación dada varía con la geometría del espécimen, así como con su composición. Por lo tanto es difícil comparar la rigidez relativa de diferentes materiales o predecir la capacidad de carga de estructuras que tengan formas complejas. Para resolver esta confusión, se pueden normalizar la fuerza y la deformación. Para hacer esto, la fuerza se divide por el área de la sección transversal disponible para soportar la carga y la extensión se divide por la longitud original de la muestra. Entonces, la carga se puede informar como fuerza por unidad de área de sección transversal, y la deformación se puede informar como el alargamiento por unidad de la longitud original sobre la cual ocurrió el alargamiento (ver Figura 18: normalmente, la sección transversal es circular, pero también se utilizan probetas rectangulares). De esta forma se pueden normalizar los efectos de la geometría de la muestra. La carga normalizada ($\frac{\text{fuerza}}{\text{área}}$) es el esfuerzo σ y la deformación normalizada ($\frac{\text{cambio en la longitud}}{\text{longitud original}}$) es la deformación ϵ [73].

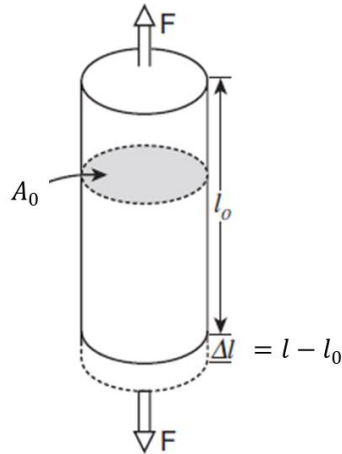


Figura 18. Esquema de los elementos considerados en el ensayo de tensión, es el caso donde la sección transversal es circular.

En resumen, para un material dado, los resultados de un solo ensayo son aplicables a todo tamaño y formas de la muestra, si se convierte la fuerza en esfuerzo y la distancia entre marcas calibradas en deformación. El esfuerzo y la deformación ingenieriles se definen mediante las ecuaciones (6) y (7):

$$\sigma = \frac{F}{A_0} \quad (6)$$

$$\varepsilon = \frac{l - l_0}{l_0} = \frac{\Delta l}{l_0} \quad (7)$$

Donde A_0 es el área original de la sección transversal de la probeta antes de iniciarse el ensayo, l_0 es la distancia original entre marcas calibradas y l es la distancia entre las mismas, después de haberse aplicado la fuerza F .

Los resultados de un ensayo de tensión se registran en una curva de esfuerzo-deformación. Las unidades de esfuerzo son *psi* o N/m^2 , esta última unidad es conocida como *Pa*.

Una de las propiedades que se pueden obtener del ensayo de tensión es el módulo de elasticidad o módulo de Young, que es la pendiente de la curva esfuerzo-deformación en su región elástica:

$$\text{Módulo de elasticidad} = \frac{\Delta\sigma}{\Delta\varepsilon} \quad (8)$$

3.9.3 Análisis termogravimétrico (TGA)

Análisis térmico

Al calentar o enfriar un material su estado físico y/o su composición química pueden sufrir varios cambios importantes:

- Transiciones de fase: Fusión, vaporización, sublimación, cristalización, amorfización, etc.
- Reacciones químicas: Oxidación, alteración, descomposición, entre otras.
- Dilatación o compresión térmica: Cambio de dimensiones reversible o irreversible
- Cambios texturales: Morfología de la superficie, sinterización, recristalización, etc.
- Otros: Grado de cristalinidad, propiedades termomecánicas, propiedades eléctricas y magnéticas, etc.

El análisis térmico es un grupo de técnicas (definiciones ASTM E473-11a) en las cuales las propiedades físicas de una sustancia son medidas en función de la temperatura o del tiempo durante el cual la sustancia es sometida a un aumento de temperatura controlada.

Una de las técnicas más usadas es el análisis termogravimétrico (TGA), la cual mide cambio de masa en función de la temperatura.

En un TGA se registra continuamente la masa de una muestra colocada en una atmósfera controlada en función de la temperatura o del tiempo en que aumenta su temperatura (por lo general en forma lineal con el tiempo). La representación de la masa o del porcentaje de masa en función del tiempo se denomina termograma o curva de descomposición térmica [72]. El TGA permite detectar cambios en la masa de la muestra (ganada o perdida por descomposición o reacción con otras especies), evaluar paso a paso los cambios en la masa (usualmente como un porcentaje de la muestra inicial de masa), y determinar temperaturas que caracterizan un paso en la curva de pérdida o ganancia de masa.

Los instrumentos comerciales empleados en termogravimetría constan de (ver Figura 19): una microbalanza sensible, también llamada termobalanza; un horno infrarrojo; un sistema de gas de purga para proporcionar una atmosfera inerte o, a veces, reactiva o de presión reducida y un sistema computarizado para el control del instrumento y la adquisición y el proceso de los datos.

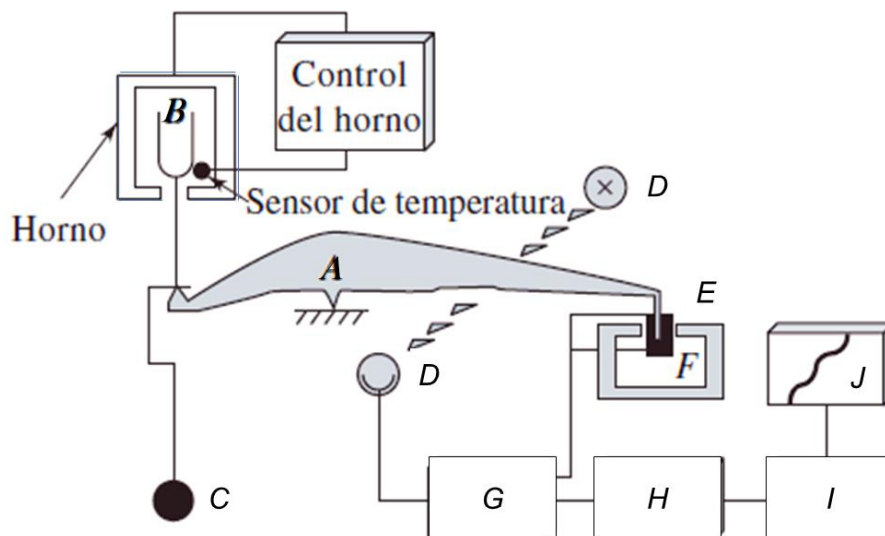


Figura 19. Elementos importantes en TGA y componentes de una Termobalanza. Donde A es el brazo de la balanza, B es la copa y el portamuestra; C es un contrapeso, D es la lámpara y los fotodiodos, E es una bobina magnética y F es un imán permanente. Los sistemas de adquisición de datos, de proceso de datos y de control de la temperatura son G, H e I. El componente J es la impresora y la pantalla.[72]

Causas de pérdida de masa:

-- Reacciones de descomposición (por ejemplo, descomposición y separación del agua de cristalización)

- Reacciones de oxidación
- Vaporización
- Sublimación
- Desorción

Aplicaciones de la termogravimetría:

- a) estabilidad térmica de muestras
- b) degradación térmica de muestras de materiales (cinética y mecanismo) y degradación oxidativa
- c) reacciones de estado sólido
- d) determinación de humedad, volátiles, cenizas
- e) procesos de absorción, adsorción y desorción
- f) identificación de compuestos (por análisis de sus termogramas).

3.9.4 Calorimetría de barrido diferencial (DSC)

La calorimetría de barrido diferencial (DSC) mide cambio en flujo de calor en función de la temperatura.

En la DSC, la muestra y la referencia se colocan en recipientes especiales en el instrumento; los calentadores suben la temperatura a una tasa específica, o bien, mantienen la DSC a una temperatura determinada. El instrumento mide la diferencia en el flujo de calor entre la muestra y la referencia.

Hay tres tipos distintos de instrumentos para DSC: instrumentos para DSC de potencia compensada, DSC de flujo de calor y DSC modulada. Cada una genera una gráfica de potencia o flujo de calor contra temperatura, que se denomina termograma.

Instrumentos para DSC de flujo de calor:

En esta técnica se mide la diferencia en el flujo de calor en la muestra y en la referencia mientras la temperatura de la muestra cambia a un ritmo constante. Tanto la muestra como la referencia se calientan con una misma unidad calefactora. El

calor fluye tanto hacia la muestra como hacia el material de referencia a través de un disco termoelectrico de constantán calentado eléctricamente, como se puede ver en la Figura 20. Los platillos pequeños de aluminio para la muestra y la referencia se colocan sobre plataformas elevadas formadas en el disco de constantán. El calor se transfiere a través de los discos hacia los materiales por medio de los dos platillos. El flujo de calor diferencial de la muestra y de la referencia se controla mediante unos termopares de superficie de Cromel-constantán formados por la unión entre la plataforma de constantán y los discos de Cromel unidos a la parte inferior de la plataforma. La diferencia entre la cantidad de calor que fluye hacia los dos platillos es directamente proporcional a la diferencia en las salidas de las dos uniones del termopar. La temperatura de la muestra se calcula por la unión de Cromel-alumel colocada debajo del disco de la muestra [72].

En la calorimetría de barrido diferencial con flujo de calor es posible expresar el flujo total de calor $\frac{dH}{dt}$ como:

$$\frac{dH}{dt} = C_p \frac{dT}{dt} + f(T, t) \quad (9)$$

donde H es la entalpía en J mol^{-1} , C_p es la capacidad calorífica específica (capacidad calorífica por mol) en $\text{J K}^{-1} \text{mol}^{-1}$ y $f(T, t)$ es la respuesta cinética de la muestra en J mol^{-1} . Por consiguiente, se observa que el flujo de calor es la suma de dos términos: uno relacionado con la capacidad calorífica y otro relacionado con la respuesta cinética.

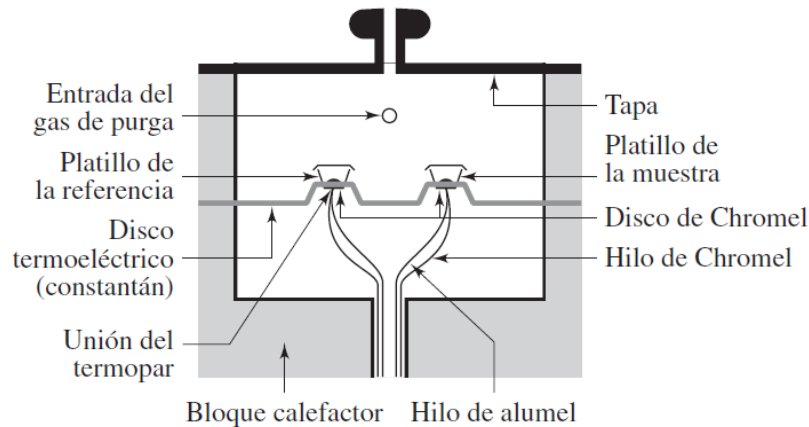


Figura 20. Calorimetría de barrido diferencial de flujo de calor [72].

La calorimetría de barrido diferencial tiene muchas aplicaciones para determinar las características de los materiales:

- Entre las aplicaciones cuantitativas están la determinación de los calores de fusión y el grado de cristalización de materiales cristalinos.

- Determinación de las temperaturas de transición vítrea y los puntos de fusión. Ambos son útiles en la clasificación cualitativa de materiales, aunque los métodos térmicos no se pueden usar solos para la identificación. Asimismo, los puntos de fusión son muy útiles para establecer la pureza de varias preparaciones.

- Con DSC se pueden seguir la tasa de liberación de calor y, por consiguiente, los procesos cinéticos de la cristalización.

- La determinación de la tasa de liberación de calor, dH/dt , se utiliza para determinar el grado de reacción en función del tiempo.

Por tanto, los métodos térmicos se aplican a menudo en el control de calidad.

3.9.5 Microscopía electrónica de barrido (SEM)

El microscopio electrónico de barrido proporciona imágenes y datos físicos y químicos de la superficie de cuerpos generalmente opacos a los electrones, por medio de un haz de electrones que recorre dicha superficie y de detectores que transducen las señales que de ella emanan. Estas señales se originan como resultado de que incida el haz sobre la superficie; esto da lugar a la emisión de diferentes señales (electrones secundarios, electrones retrodispersados, rayos X, entre otras) que son captadas por distintos detectores, transformándolas en corrientes eléctricas que se emplean en formar una imagen en un monitor [76].

Los electrones secundarios (SE en Figura 21) son electrones de baja energía originados por colisiones inelásticas y se usan como señal para el estudio tridimensional de la superficie de la muestra. Los electrones retrodispersados o reflejados (BSE en Figura 21) son electrones del haz primario que salen de la superficie de la muestra sin una significativa pérdida de energía por colisiones elásticas. También los rayos X pueden ser analizados para determinar la presencia cualitativa y/o cuantitativa de los elementos químicos de la muestra. Cada señal obtenida del SEM es captada con un detector apropiado [77].



Figura 21 Detectores de las señales originadas por la interacción del haz con la muestra, donde SE son los electrones secundarios y los electrones retrodispersados son BSE. Imagen modificada de *Microscopio electrónico virtual (Observatorio Ixtli UNAM)* [78].

Los componentes básicos del SEM son los siguientes (Ver Figura 22):

- Cañón de electrones, que genera y acelera electrones, produce un haz con energía entre 5 y 30kV, con un diámetro efectivo entre 0.1 y 10 μ m.
- Lentes electromagnéticas condensadoras que reducen el diámetro del haz, de manera que en la superficie de la muestra se tiene un diámetro apropiado al aumentar la imagen.
- Lentes magnéticas del objetivo que enfocan el haz en la superficie de la muestra.
- Sistema de barrido que permite la construcción de la imagen en el monitor por el barrido del haz en la superficie de la muestra.
- Detectores de señales emitidas por la muestra.

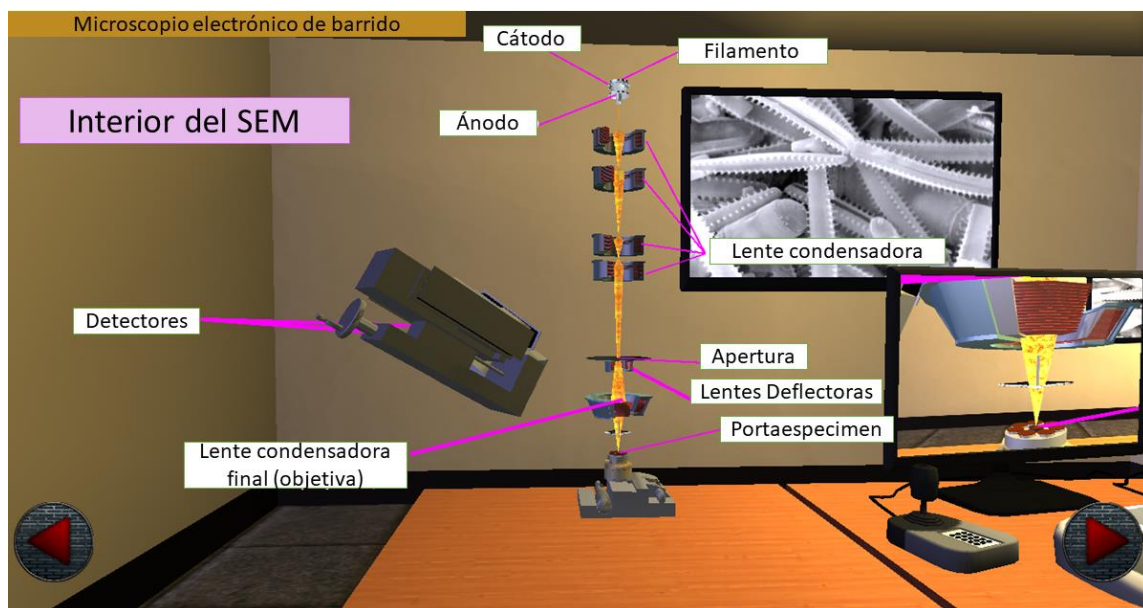


Figura 22 Esquema de las partes del interior del SEM. Imagen modificada de Microscopio electrónico virtual (Observatorio Ixtli UNAM) [78].

3.9.6 Ángulo de contacto

El ángulo de contacto es el ángulo que forma la gota de un líquido al entrar en contacto con la superficie de un sustrato. Esta medición se hace trazando una línea que inicie en el punto donde coinciden las tres fases (interfase sólido-líquido-gas) y que sea tangente al borde de la curvatura de la gota, comenzando a medir el ángulo desde dentro de la gota (ver Figura 23, donde θ es el ángulo de contacto).

El valor del ángulo de contacto indica la capacidad de mojado o humectación que tiene un líquido sobre una superficie. El mojado es la capacidad de un líquido para esparcirse sobre una superficie, que puede ser una superficie sólida u otro líquido con el que la gota sea inmiscible. El grado de mojado, a menudo denominado mojabilidad, depende de la naturaleza tanto de la gota como de la superficie. La mojabilidad se rige por la relación entre las fuerzas adhesivas entre las moléculas en la gota y la superficie, que favorecen el mojado, y las fuerzas cohesivas dentro de la gota, que trabajan en contra del mojado.

Una gota de líquido colocada sobre una superficie sólida puede extenderse para aumentar las áreas interfaciales líquido-sólido y líquido-gas. Simultáneamente, el área interfacial sólido-gas disminuye y el ángulo de contacto (θ) entre la gota y el sólido se reduce. Si una gota de agua se esparce fácilmente sobre una superficie, es decir, si el valor de θ es bajo, es una señal de que la superficie es hidrófila. Si el valor de θ es de alrededor de 90° o superior, la superficie es hidrófoba. Una superficie superhidrófoba es una superficie en la que el ángulo de contacto del agua es $>150^\circ$ [79]. En la Figura 23 se ilustran diferentes grados de mojado de una gota de agua sobre una superficie.

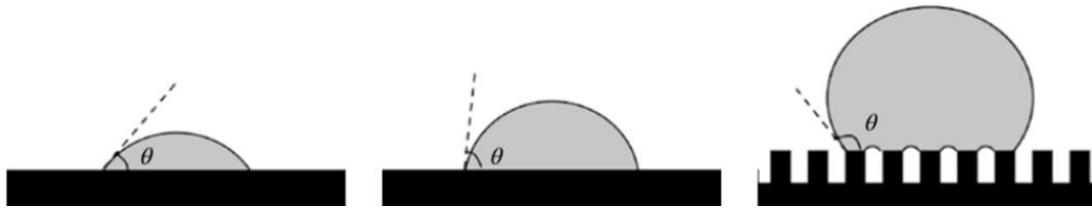


Figura 23. Una gota de agua en (a) una superficie hidrofílica dando un ángulo de contacto bajo, (b) en una superficie hidrofóbica da un ángulo de contacto alrededor de 90° , (c) en una superficie superhidrofóbica con rugosidad controlada da un ángulo muy grande de contacto [79].

El esparcimiento continúa hasta que el sistema alcanza el equilibrio. El grado de propagación se rige por la tensión superficial del líquido (γ_{LG}), la tensión superficial (generalmente denominada energía libre superficial) del sólido (γ_{SG}) y la tensión interfacial entre el sólido y el líquido (γ_{SL}) [80]. Las fuerzas de superficie implicadas en el esparcimiento o extensión de una gota se muestran en la Figura 24.

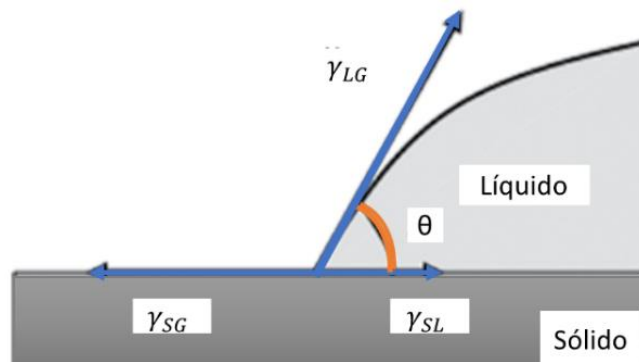


Figura 24. Fuerzas de superficie implicadas en el esparcimiento o extensión de una gota donde θ es el ángulo de contacto.

Tradicionalmente, el ángulo de contacto de una gota de líquido sobre una superficie plana sólida se ha medido directamente sobre una gota que descansa sobre un plano horizontal o sobre una burbuja de gas adherida capturada en una interfaz sólido-líquido, en ambos casos utilizando un goniómetro. El ángulo de contacto se lee con la ayuda de un objetivo de microscopio para ver el ángulo directamente. Para gotas más grandes, la forma ya no es esférica porque entran en juego las fuerzas gravitatorias. Esto se puede aprovechar como un método para determinar la tensión superficial. La forma de la gota es una medida de la tensión superficial; las gotas que están cerca de la forma de esferas se forman a partir de líquidos con

una tensión superficial alta, mientras que las gotas alargadas se forman a partir de líquidos con una tensión superficial baja.

Para la medición existen equipos que constan de goniómetros adaptados a sistemas ópticos. Las partes principales del equipo son: cámara, jeringa, fuente de luz y un plato o caja porta muestras (ver Figura 25). El equipo debe garantizar la deposición de gotas de forma simétrica y que la cámara siempre esté alineada con la superficie que se ensaya. Además, la iluminación ayuda a conseguir un correcto contraste y la regulación propia de enfoque de la lupa permite realizar fotografías nítidas para su post-procesado. En general, la determinación del ángulo de contacto se realiza ya sea de manera manual o automática mediante software [81].

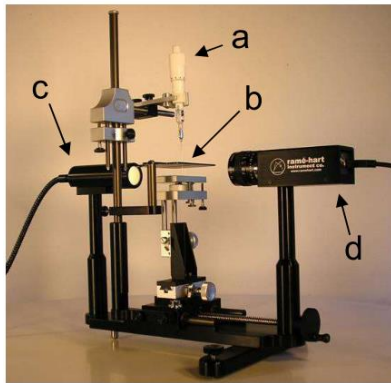


Figura 25. Partes de un dispositivo para medir ángulo de contacto: a) jeringa, b) plato portamuestras, c) fuente de luz, d) cámara [81].

4. Objetivos

General:

-Desarrollar membranas de gelatina obtenida a partir de piel de pescado y de piel de bovino, mediante liofilización, en moldes de polietileno y teflón y estudiar el efecto de los moldes y las temperaturas de congelación para la liofilización en la morfología, resistencia a la tensión y propiedades térmicas, para ser usadas en regeneración ósea guiada periodontal.

Particulares:

-Determinar la influencia del tipo de gelatina y concentración de la disolución en la morfología de las membranas.

-Evaluar el efecto del material del molde en las dimensiones de los poros de las membranas y en sus propiedades mecánicas.

-Determinar la influencia de la temperatura de congelación en las propiedades mecánicas y en las dimensiones de las membranas.

-Caracterizar la morfología de las membranas mediante microscopía electrónica de barrido, el comportamiento mecánico mediante pruebas de tensión, el comportamiento térmico mediante análisis termogravimétrico y calorimetría diferencial de barrido, así como la hidrofobicidad de los moldes mediante medición de ángulo de contacto y relacionar las propiedades de las membranas con las condiciones de obtención.

5. Metodología experimental

5.1 Elaboración de membranas

5.1.1 Reactivos y Materiales

-Gelatina de piel de bovino, tipo B (se produce a partir de colágeno tratado con álcali), suministrada por Sigma-Aldrich con número de catálogo G9391.

-Gelatina de piel de pescado de agua fría, generalmente es con extracción ácida [11] suministrada por Sigma-Aldrich con número de catálogo G7041.

-Agua destilada

-Moldes de silicón, teflón y polietileno.

5.1.2 Equipos

Parrilla de calentamiento con agitación magnética Guardian 5000 marca Ohaus.

Tres congeladores con temperaturas de: -10°C (marca Hamilton Beach), -20°C (marca Forma Thermo Scientific) y -40°C (marca Haier Biomedica)

Liofilizadora FreeZone 1 Liter Benchtop marca LABCONCO (Figura 26), que se estabiliza con temperatura del serpentín colector de -46°C y un vacío de 0.046 mBar.



Figura 26 Liofilizadora Labconco

5.1.3 Optimización de la concentración de gelatina para la obtención de membranas flexibles.

La metodología utilizada en la elaboración de las membranas de gelatina de piel de bovino y de piel de pescado se resume en el siguiente diagrama en la Figura 27

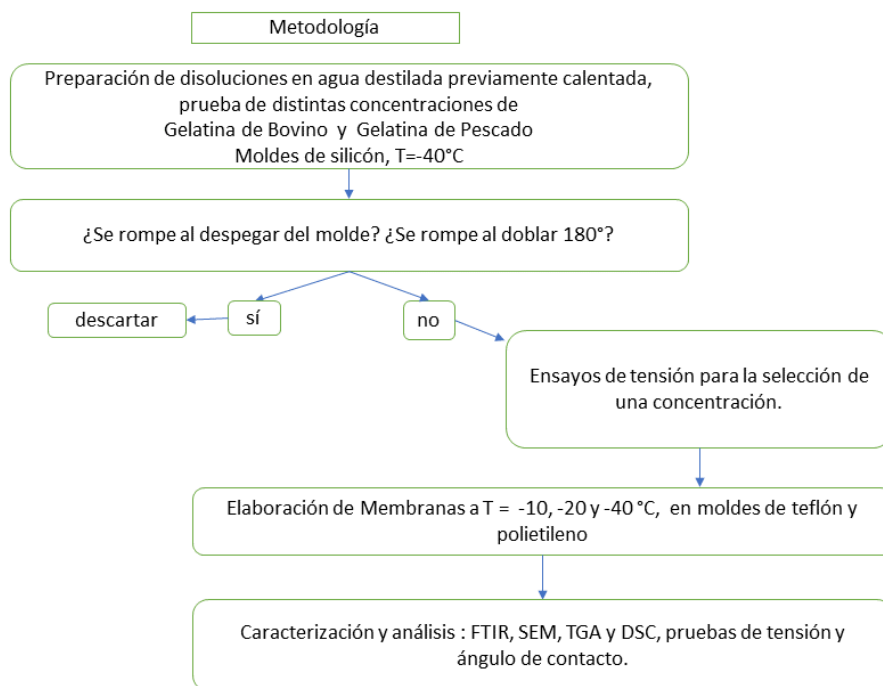


Figura 27. Diagrama del proceso utilizado en la elaboración de las membranas de gelatina de bovino y pescado.

Se prepararon disoluciones de gelatina de piel de bovino y de piel de pescado en agua en diferentes condiciones. En primer lugar, se varió la concentración de la gelatina, además, debido a la falta de información se fueron probando distintos valores de: temperaturas de agitación al preparar la disolución, tiempo de agitación, tiempo de congelación y temperatura de congelación.



Figura 28 Moldes de silicón utilizados con muestras liofilizadas.

Las primeras condiciones de procesamiento utilizadas fueron determinadas de manera empírica. El tiempo de agitación fue de 3 minutos a 350 rpm. Las concentraciones de gelatina disueltas en agua caliente fueron desde 0.42% a 24.11%, como se muestra en las Tabla 2 y Tabla 3. Posteriormente se vaciaron en moldes de silicón (Figura 28) e inmediatamente se congelaron a una temperatura de -40°C , con un tiempo de congelación de 2 días (al final se determinó que con un día de congelación era suficiente y en etapas posteriores se liofilizó por un día). Las condiciones finales de liofilización en promedio fueron 0.046 mBar y -45°C .

En las primeras pruebas se encontró que era importante cuidar el traslado de las muestras del congelador a la liofilizadora, ya que a temperatura ambiente su descongelación se da muy rápido y eso provoca la destrucción de la morfología al liofilizar.

Tabla 2. Concentración de gelatina de pescado para la elaboración de membranas.

Número de muestra	Gelatina de pescado (g) en 5 mL de agua	Concentración de gelatina de pescado (% m/m)
1	0.02	0.42
2	0.04	0.84
3	0.06	1.25
4	0.08	1.67

5	0.1	2.07
6	0.2	4.06
7	0.3	5.97
8	0.4	7.81
9	0.5	9.57
10	0.6	11.27
11	0.7	12.91
12	0.8	14.49
13	0.9	16.01
14	1.0	17.48
15	1.1	18.89
16	1.2	20.26
17	1.3	21.59
18	1.4	22.87
19	1.5	24.11

Para la gelatina de bovino ya no se elaboraron todas las concentraciones que se usaron inicialmente para las de gelatina de pescado, solo se usaron 9 concentraciones para corroborar que tenían una tendencia parecida en cuanto al aumento de rigidez al tacto.

Tabla 3. Concentración de gelatina de bovino.

Número de muestra	Gelatina de bovino (g) en 5 mL de agua	Concentración de gelatina de bovino (% m/m)
20	0.02	0.42
21	0.04	0.84
22	0.06	1.25
23	0.08	1.67
24	0.1	2.07
25	0.2	4.06
26	0.3	5.97
27	0.4	7.81
28	0.5	9.57

A continuación, con base en los resultados de la etapa anterior, se elaboraron membranas con el fin de realizar pruebas mecánicas. Se cortaron probetas con suaje (5 probetas de cada tipo de muestra según la Norma ASTM D1708) con las concentraciones de la Tabla 4 y las siguientes variables de procesamiento fijas:

Temperatura de agitación: 58°C a 56°C

Tiempo agitación: 3 minutos

Temperatura de congelación: -40°C

Tiempo de congelación: 1 día

Condiciones finales de liofilizadora: 0.042 mBar y -46°C

Tabla 4. Concentraciones de membranas a las que se les realizaron pruebas de tensión.

Gelatina (g) en 5 mL de agua	Gelatina de pescado Concentración (% m/m)	Gelatina de bovino Concentración (% m/m)
0.04	0.84	0.84
0.06	1.25	1.25
0.08	1.67	1.67
0.1	2.07	2.07

También se les realizó observación por microscopia electrónica de barrido a las menores concentraciones, 0.84% y 1.25%. Se eligieron estas dos concentraciones porque en los resultados de las pruebas de tensión son las que presentaron módulos elásticos menores, que significa que presentan menor rigidez.

Finalmente, con base en los ensayos de tensión se seleccionó a la concentración de mayor porcentaje a la deformación para elaborar membranas en moldes de teflón y polietileno, a diferentes temperaturas de congelación.

5.1.4 Membranas de gelatina de piel de bovino y de piel de pescado a diferentes temperaturas de congelación con la concentración seleccionada.

Se elaboraron membranas por liofilización utilizando dos tipos de molde: de polietileno y de teflón, debido a que estos moldes son más rígidos y no se deforman las membranas al ser extraídas, y en los de silicón si lo hacen.

Utilización de moldes de teflón y polietileno:

Debido a que los moldes de silicón son muy suaves, al liofilizar las membranas se desprenden en las orillas y en el centro se mantienen adheridas al molde, por lo que forma una superficie convexa, que no es uniforme al terminar la liofilización. Además, al sacar las membranas del molde se ejerce presión y flexión sobre ellas que ocasionan deformación y fractura de las muestras, por lo cual se elaboraron moldes más rígidos de teflón y de polietileno (Figura 29 y Figura 30). Estos moldes tienen dos piezas, las cuales ayudan a desmoldar sin flexionar la membrana (ver Figura 31). Fueron elaborados en el taller del Instituto de Investigaciones en Materiales de acuerdo con las dimensiones de la Figura 29, con un diámetro interno de 110.8 mm.

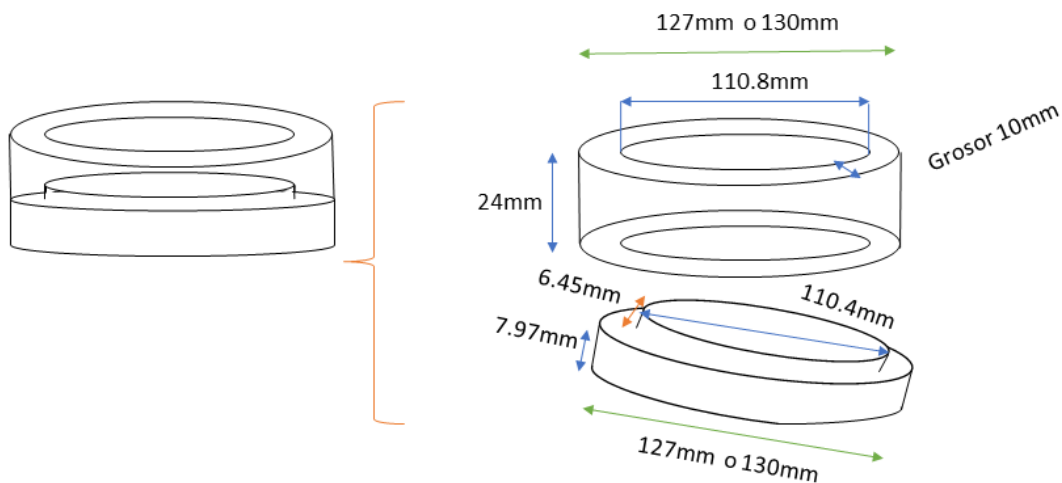


Figura 29. Medidas usadas para la manufactura de los moldes de teflón y polietileno.



Figura 30. Molde de polietileno (izquierda) y molde de teflón (derecha).



Figura 31. Moldes que se solicitaron a elaborar en el Taller del IIM, conformados por dos partes desarmables.

Para la elaboración de membranas a diferentes temperaturas de congelación se eligió una concentración con base en los ensayos de tensión. Se eligió de 1.2%, debido a que el porcentaje de deformación a la ruptura fue máximo a esa concentración; esta propiedad es muy importante para las membranas porque es necesario que tengan la capacidad de doblarse al manipularlas cuando se coloquen quirúrgicamente sin que se rompan. Ambos tipos de gelatina (bovino y pescado) presentaron el máximo de deformación a esa concentración (ver Tabla 8).

Las condiciones que se utilizaron en cada paso del proceso se enlistan en la Figura 32. Además cabe resaltar que para todas las membranas se vertió en los moldes un volumen de disolución de 30 mL.

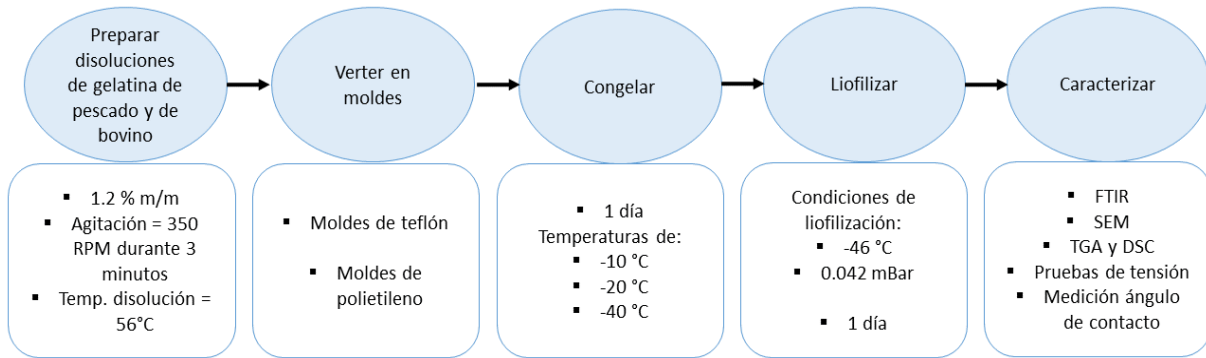


Figura 32. Diagrama de proceso con las condiciones en la elaboración de membranas.

5.2 Caracterización

5.2.1. Espectroscopia de Reflectancia Total Atenuada Infrarroja por Transformada de Fourier (ATR-FTIR)

Para la identificación de los grupos funcionales de la estructura molecular de las cadenas de la gelatina de las membranas se utilizó un espectrofotómetro de infrarrojo (ATR-FTIR) modelo Nicolet 6700, marca Thermo Scientific (Figura 33).



Figura 33. Espectrómetro FTIR modelo Nicolet 6700, marca Thermo Scientific.

5.2.2. Microscopía electrónica de barrido (SEM)

La observación de la microestructura en la sección transversal de las membranas se realizó con el microscopio electrónico de barrido (SEM) LEICA Stereoscan 440 (Figura 34, derecha), el cual trabaja a un sistema de vacío de 2.30×10^{-5} Torr, un voltaje de aceleración de 20 kV y una intensidad de corriente de 200 pA. Para ello, antes de la observación en SEM, las membranas se sumergieron en nitrógeno líquido durante un minuto, posteriormente se extrajeron y se cortaron con un bisturí. Las membranas se recubrieron con oro para hacerlas conductoras por medio del proceso de pulverización catódica (Sputtering) con una Evaporadora Fine Coat Ion sputter JFC-1100 (Figura 34, izquierda). Las mediciones de los poros se hicieron por medio del software ImageJ, tomando mediciones sobre las imágenes obtenidas a diferentes aumentos. Se tomaron 5 diámetros en 5 poros de cada tipo de membrana ($n=25$).



Figura 34. Evaporadora Fine Coat Ion sputter JFC-1100 (izquierda) y microscopio electrónico de barrido LEICA Stereoscan 440 (derecha).

5.2.3. Análisis termogravimétrico (TGA) y calorimetría diferencial de barrido (DSC).

La pérdida de masa de las membranas en función de la temperatura se determinó en un equipo termogravimétrico TGA Q5000, marca TA Instruments. (Figura 35, derecha). Estas mediciones se realizaron desde temperatura ambiente hasta 500°C, con una rampa de calentamiento de 10°C/min, bajo atmósfera de N₂.

Por otro lado, a su vez se realizó el estudio térmico mediante calorimetría diferencial de barrido (DSC, por sus siglas en inglés). Los termogramas por DSC se obtuvieron en un equipo de calorimetría diferencial de barrido DSC Q2000, marca TA Instruments (Figura 35, izquierda), se utilizó un ciclo de calentamiento desde -50°C a 170°C, seguido de un enfriamiento para calentar nuevamente desde -50°C a 170°C, con una rampa de calentamiento de 10°C/min, bajo atmósfera de N₂. El procesamiento de las curvas obtenidas se llevó a cabo utilizando el software TA Universal Analysis.



Figura 35. Equipo DSC Q2000 (izquierda) y equipo TGA Q5000 (derecha), ambos marca TA Instruments.

5.2.4. Pruebas mecánicas de tensión

Las pruebas de tensión se realizaron utilizando probetas dimensionadas de acuerdo a la norma ASTM D1708 (Figura 36, a), con una máquina de ensayos universal AGS-X, marca Shimadzu (Figura 36, b). El ensayo de tracción se llevó a cabo a una velocidad de 1 mm/min. Se utilizaron 5 probetas para cada tipo de muestra y se reportaron los promedios.

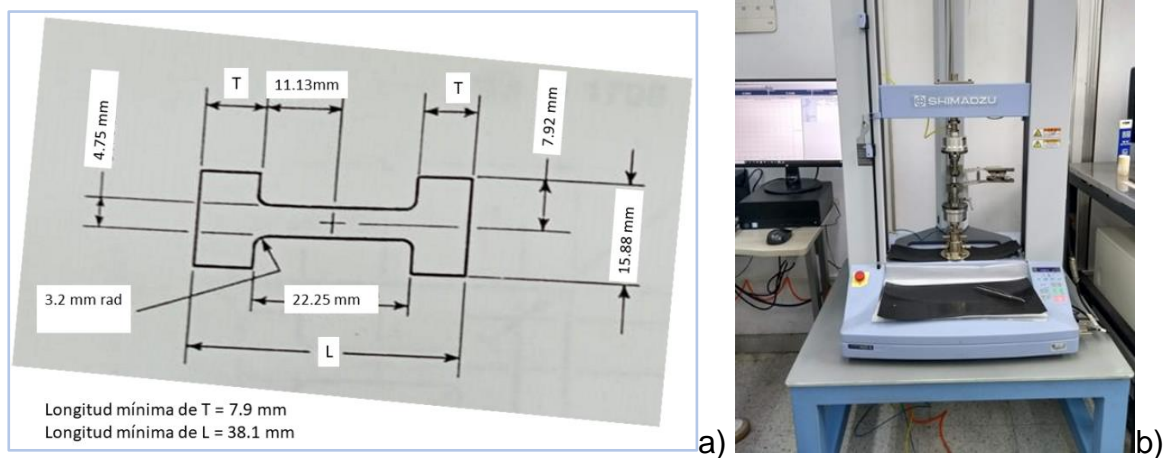


Figura 36. Medidas de la probeta según norma ASTM D1708 (a) y equipo de pruebas de tensión AGS-X Shimadzu (b).

5.2.5. Medición de ángulo de contacto

La medición de ángulo de contacto se utilizó para conocer el carácter hidrofóbico de los moldes que se utilizaron en la elaboración de membranas. Para ello se recortaron cubos de 1 cm³ de polietileno y de teflón.

La determinación de ángulo de contacto de los moldes de teflón y polietileno se llevó a cabo en un goniómetro Ramehart, inc. Modelo 100-07-00. Las imágenes fueron obtenidas con una cámara externa Nikon Coolpix que se niveló sobre un tripié (Figura 37). A partir de las fotografías de una gota de agua sobre la superficie del

material del molde se realizaron mediciones con el uso el plugin Contact angle dentro del software ImageJ, el cual es un programa de procesamiento de imágenes escrito en Java y de código abierto. Se tomaron los promedios de mediciones en 3 gotas en cada superficie de molde.



Figura 37. Equipo de medición de ángulo de contacto Ramehart, inc. con una cámara Nikon Coolpix adaptada sobre un tripié.

6. Resultados y Discusión

6.1 Selección de concentraciones de las disoluciones de gelatina

Para elegir cuales membranas podían tener los criterios de flexibilidad necesarios se aplicaron pruebas de simple doblez de 180° para economizar recursos de SEM, y además ver cuáles membranas sí se podían despegar del molde de silicón (ver Tabla 5 y Tabla 6). Las que cumplieron para ambos tipos de gelatina fueron 0.84, 1.25, 1.67 y 2.07 % m/m.

Tabla 5. Características de flexibilidad en función de la concentración de gelatina de pescado.

Número de muestra	Gelatina de pescado Concentración de disolución (% m/m)	¿Se rompe al despegar del molde (de silicón)?	¿Se rompe al doblar?
1	0.42	Sí	No
2	0.84	No	No
3	1.25	No	No
4	1.67	No	No
5	2.07	No	No
6	4.06	No	No
7	5.97	No	Sí
8	7.81	No	Sí
9	9.57	No	Sí
10	11.27	No	Sí
11	12.91	No	Sí
12	14.49	No	Sí
13	16.01	No	Sí
14	17.48	No	Sí
15	18.89	No	Sí
16	20.26	No	Sí
17	21.59	No	Sí
18	22.87	No	Sí
19	24.11	No	Sí

Tabla 6. Características de flexibilidad en función de la concentración de gelatina de bovino.

Número de muestra	Gelatina de bovino Concentración de disolución (% m/m)	¿Se rompe al despegar del molde (de silicón)?	¿Se rompe al doblar?
20	0.42	Sí	No
21	0.84	No	No
22	1.25	No	No

23	1.67	No	No
24	2.07	No	No
25	4.06	No	Sí
26	5.97	No	Sí
27	7.81	No	Sí
28	9.57	No	Sí

En la Figura 38 se ejemplifica como va cambiando el color y textura de las membranas con el aumento de la concentración en las membranas de gelatina de pescado, en donde la muestra 1 es la de menor concentración y la 15 la de mayor, de acuerdo con la Tabla 5. Se puede ver que las membranas se van volviendo más rígidas y adquieren una coloración más oscura conforme aumenta la concentración de gelatina. De aquí (Tabla 5 y Figura 38) se encontró que las concentraciones que daban una mejor textura y comportamiento al doblar fueron desde 0.84% hasta 2.07%.



Figura 38. Cara anterior (izquierda) y posterior (derecha) de las membranas obtenidas de concentraciones de gelatina de pescado que van desde 0.42% a 17.48 % m/m.









Además, en la Figura 38 se observa que el aspecto de la superficie de las membranas es diferente para la cara anterior y posterior, ya que la cara anterior fue la que se encontraba en la parte de arriba y sólo estaba en contacto con aire, mientras que la cara posterior fue la que estaba en contacto con el molde. Esto se explica con la diferencia de transferencia de calor que presenta cada cara en la etapa de congelación, tal como lo encuentran en las investigaciones de Pawelec y col. [82] y Brougham y col. [83].

De manera general, en todas las membranas elaboradas se encontró que, a la misma concentración, la membrana de gelatina de pescado es más flexible (fácil de doblar) y se percibe más suave al tacto que una de bovino, esta última se siente más rígida. De estos resultados se concluye, para los dos tipos de gelatinas, descartar concentraciones inferiores a 0.84% y superiores a 2.07% debido a que en el primer caso era muy difícil despegar las membranas de los moldes y en el segundo caso se obtenían membranas muy rígidas y quebradizas.

6.1.1 Morfología de membranas elaboradas con moldes de silicón y congelación a -40°C.

Se eligieron las membranas de 0.84% y 1.25% de gelatina de pescado y de bovino (formadas con moldes de silicón) para observarlas por SEM. En la Tabla 7 se muestran fotografías de estas membranas en las que se observó que es diferente la superficie de cada concentración de gelatina.

Tabla 7. Imágenes de la cara frontal y revés de las membranas de gelatina de pescado y bovino, de concentraciones 0.84% y 1.25%, elaboradas con moldes de silicón y temperatura de congelación = -40°C. Fotos obtenidas con un celular.

Membranas de pescado Concentración de gelatina de pescado (%m/m)		Membranas de bovino Concentración de gelatina de bovino (%m/m)	
<p>Frente:</p>  <p>Revés:</p> 	0.84%	<p>Frente:</p>  <p>Revés:</p> 	0.84%
<p>Frente:</p>  <p>Revés:</p> 	1.25%	<p>Frente:</p>  <p>Revés:</p> 	1.25%

En las fotografías de la Tabla 7 se observa que la parte frontal de cada membrana es más rugosa que el reverso, esto es porque el reverso es la parte de la disolución que quedó en contacto con la base del molde y la parte de arriba es la superficie que quedó en contacto con el aire, por lo cual la parte de arriba fue la primera en sentir los efectos de la congelación y de la liofilización. Dentro de la disolución en el molde la velocidad de enfriamiento fue diferente para la cara que estaba en contacto con el molde (base) y el nivel superior de la disolución, de acuerdo con los resultados obtenidos por Pawelec y col. [82] y por Brougham y col. [83]. Además señalan que la transferencia de calor influye en el perfil de temperaturas en la disolución durante el congelamiento que a su vez influye en la microarquitectura de los poros [82], [83].

Las imágenes de SEM con magnificación a 500x correspondientes a las membranas de la Tabla 7 se muestran a continuación en la Figura 39 y en la Figura 40

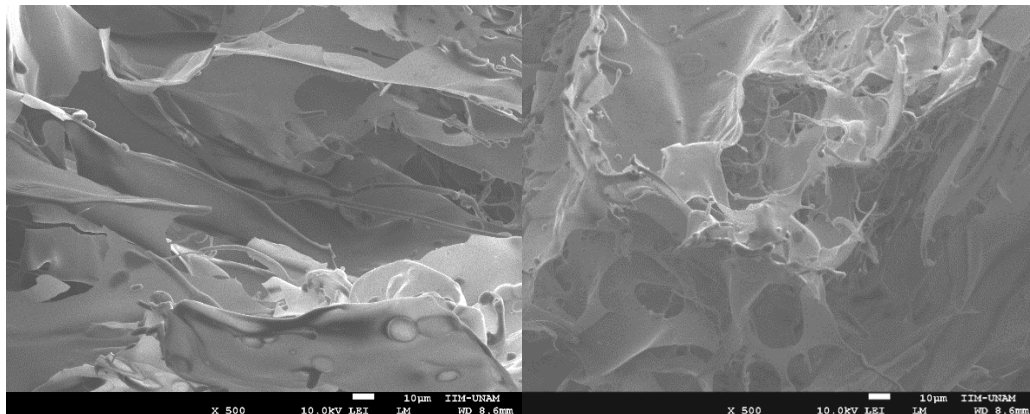


Figura 39. Micrografía de vista transversal de membranas de gelatina de pescado de concentración 0.84% (Izquierda) y de concentración 1.25% (Derecha). Magnificación de 500x

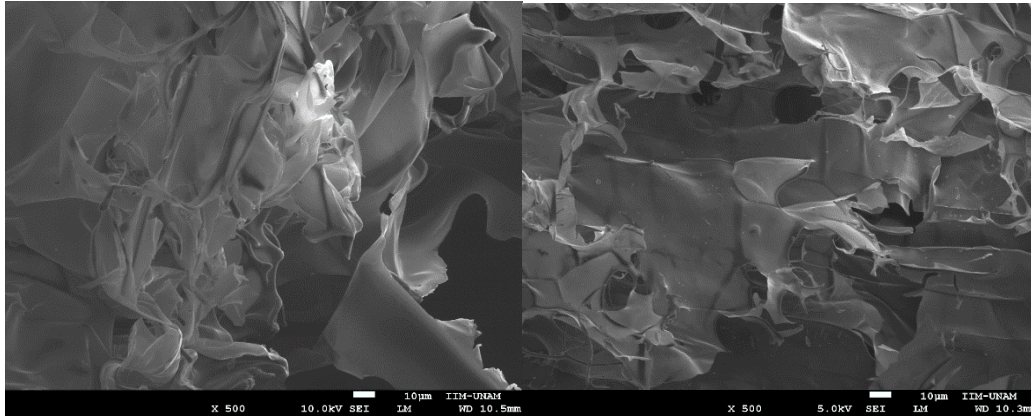


Figura 40. Vista transversal de membranas de gelatina de bovino con concentración 0.84% (Izquierda) y concentración 1.25% (Derecha). Magnificación de 500x.

En las micrografías de membranas de pescado y bovino se observa que cuando la concentración de gelatina es de 1.25% se ve mejor definición en los poros que cuando es de 0.84%, pero los poros son de tamaño más pequeño cuando hay mayor concentración, esto coincide con los resultados de Suesca y col. [84] que encontraron una mejor definición de la estructura de poros a mayor concentración y además mostraron una relación inversa entre el tamaño de poro y la concentración de colágeno, esta misma relación fue encontrada en los trabajos de López-Angulo y col. y por Arabi y col. [63], [85], donde el tamaño de poro es inversamente proporcional a la concentración de gelatina de los andamios.

6.1.2. Pruebas de tensión usando moldes de silicón y temperatura de congelación de -40°C

De acuerdo con la selección de concentraciones basada en el comportamiento de las membranas al retirar del molde y su facilidad de doblarse, se procedió a realizar ensayos de tensión a las membranas con concentraciones de 0.84, 1.25, 1.67 y 2.07 % m/m; cabe recordar que se obtuvieron en moldes de silicón, a la temperatura de congelación de -40°C, durante 1 día de congelación y un día de liofilización.

En la Tabla 8 se muestran los resultados de esfuerzo máximo, módulo elástico y porcentaje de deformación a la ruptura obtenidos para probetas de las membranas de gelatina de pescado y bovino.

Tabla 8. Resultados de pruebas de tensión usando moldes de silicón y temperatura de congelación de -40°C.

	Gelatina de piel de pescado				Gelatina de piel de bovino			
Concentración % m/m	0.84%	1.25%	1.67%	2.07%	0.84%	1.25%	1.67%	2.07%
Esfuerzo (Valor máximo) Resistencia a la tensión MPa	0.007	0.017	0.018	0.017	0.009	0.062	0.084	0.1265
Módulo elástico MPa	0.00110	0.00220	0.00365	0.00420	0.00210	0.01035	0.02385	0.03240
% deformación a la ruptura	3.8	4.50	3.3	4.1	3.5	5	3.1	4

Se observa en la Tabla 8 que el máximo porcentaje de deformación a la ruptura para ambos tipos de gelatina se presentó a la concentración de 1.25%. Esta propiedad mecánica es muy importante durante la colocación para la regeneración ósea en el maxilar. Por lo cual se seleccionó a la concentración de 1.25% para la elaboración de las membranas a diferentes temperaturas de congelación, utilizando moldes de teflón y polietileno. Estos dos moldes son más rígidos que los de silicón y conservan la forma de la membrana durante la fabricación, como ya se mencionó en la sección de metodología.

6.2 Espectroscopía ATR-FTIR

6.2.1. Espectroscopía ATR-FTIR de gelatina pura y de membranas

Se analizaron las muestras de gelatinas de bovino y de pescado y las membranas elaboradas con estos dos tipos de gelatina usando espectroscopia ATR-FTIR. Se observó que los espectros de las dos gelatinas usadas, así como las de sus correspondientes membranas son muy parecidos, ya que todas mostraron las bandas correspondientes a los grupos funcionales de las gelatinas (ver 3.8 Gelatina y colágeno), en la Figura 41 se muestran los espectros de los dos tipos de gelatinas utilizadas, así como de las membranas obtenidas con ellas.

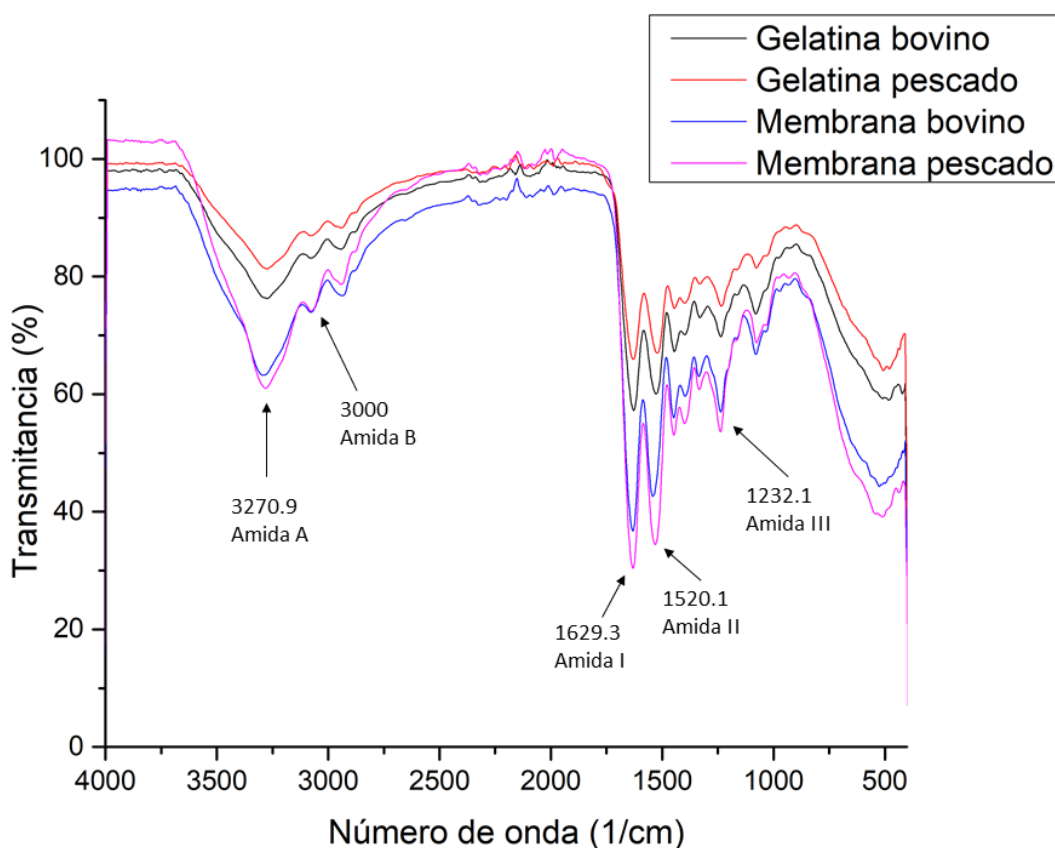


Figura 41. Espectros FTIR de las gelatinas de bovino y de pescado, y las membranas elaboradas con ellas.

Se observa que las gelatinas y las membranas tienen las mismas bandas características, en la Tabla 9 se muestra la asignación de sus señales del espectro infrarrojo.

Tabla 9. Asignación de señales en el espectro IR de las gelatinas.

Número de onda (1/cm)	Grupo funcional	Formas de vibración
3270.9	Amida A	Estiramiento asimétrico N-H y estiramiento O-H
3000	Amida B	Estiramiento simétrico N-H
1629.3	Amida I	Estiramiento C=O Estiramiento C-N Flexión N-H
1520.1	Amida II	Flexión N-H y estiramiento C-N
1232.1	Amida III	Estiramiento C-N y flexión N-H

Se observa que las señales presentadas coinciden con las vibraciones de los enlaces de las amidas [86], las cuales son grupos funcionales que se encuentran en las cadenas polipeptídicas que forman a la gelatina. Las amidas A, B, I, II y III son bandas típicas de gelatina y colágeno de acuerdo con la literatura [52], [87]–[90].

6.2.2. Espectroscopía ATR-FTIR de moldes

El espectro de infrarrojo obtenido al analizar por ATR-FTIR al molde de polietileno se muestra en Figura 42.

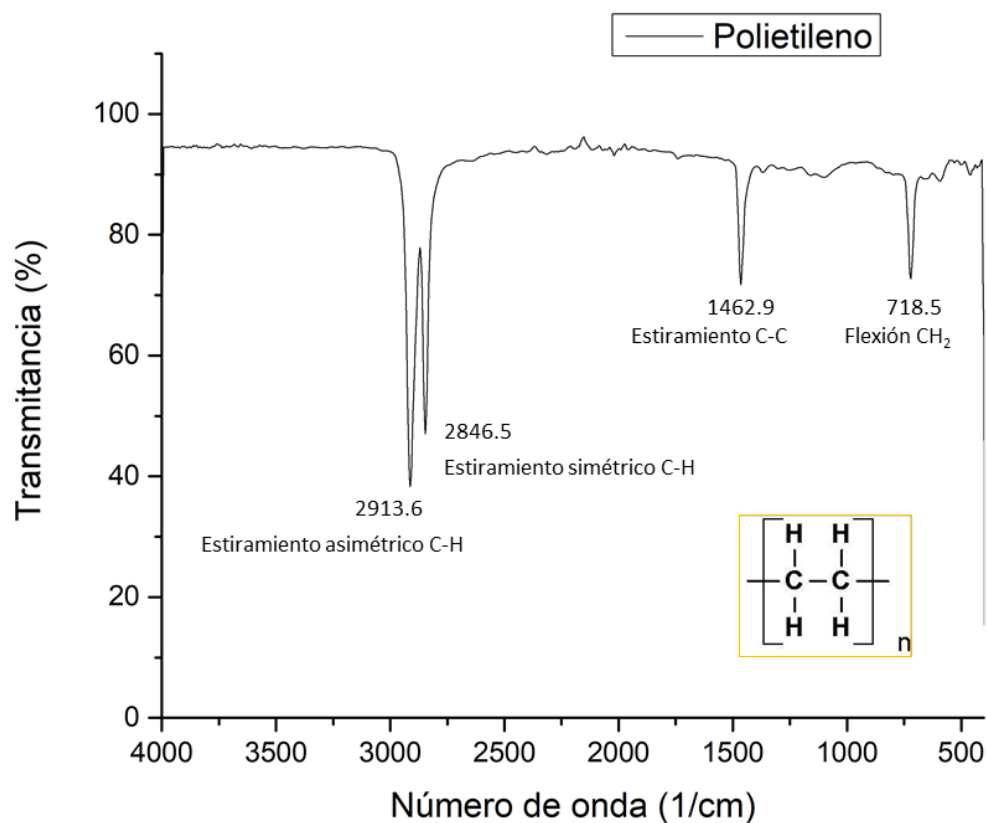


Figura 42. Espectro infrarrojo del molde de polietileno y su asignación de señales.

En la Figura 42 se encuentra la asignación de las señales, las cuales coinciden con las vibraciones de enlaces característicos en sus átomos, los cuales concuerdan con la literatura [91].

En el caso del molde de poli (tetrafluoro etileno) (conocido como teflón), su espectro infrarrojo obtenido al analizarlo por ATR-FTIR se muestra en Figura 43.

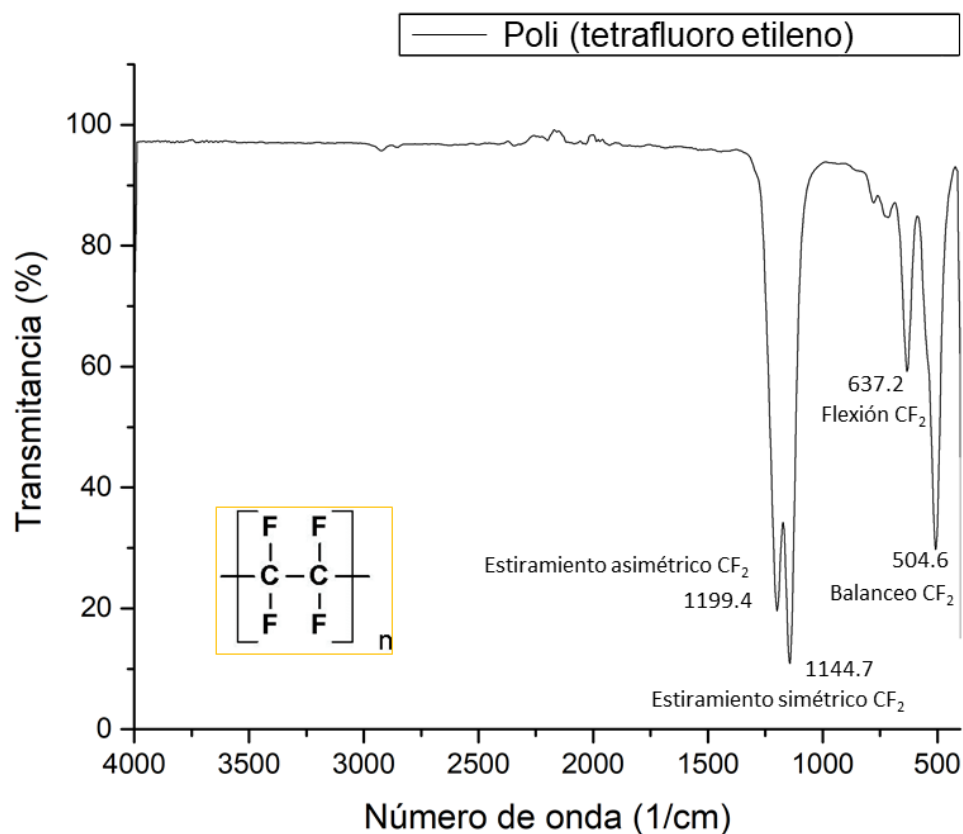


Figura 43. Espectro infrarrojo del molde de teflón, poli (tetrafluoro etileno), y su asignación de señales.

En la Figura 43 se encuentra la asignación de las señales del espectro del teflón, los cuales coinciden con las vibraciones de sus enlaces característicos, como se puede corroborar en la literatura [92], [93].

6.3 Microscopía electrónica de barrido (SEM)

6.3.1. Morfología de las membranas de gelatina de bovino de la concentración seleccionada obtenidas con moldes de teflón y polietileno a diferentes temperaturas de congelación.

Se obtuvieron micrografías de las membranas de concentración seleccionada obtenidas usando microscopia electrónica de barrido (SEM). Cabe recordar que las membranas fueron elaboradas con gelatina de piel de bovino 1.2 % m/m y agua, las cuales se obtuvieron por liofilización: antes de liofilizar se requiere hacer las disoluciones, colocar las disoluciones en un molde y congelar. Así que la diferencia en las membranas radica en su temperatura de congelación y en el polímero del molde utilizado.

Las observaciones por SEM se realizaron en la sección transversal de las membranas, ya que si se hubiera elegido la superficie de arriba (en contacto con el aire) o de abajo (en contacto con el molde) de la membrana no se verían los poros del centro de ella. Esto se debe a que en el proceso de congelación el cambio de transferencia de calor es diferente para ambas superficies de la membrana y para el centro de ellas, según Alizadeh et al [62] la transferencia de calor es más rápida en las superficies de los andamios y ahí origina cristales de hielo más pequeños, lo que da lugar a poros más pequeños. Pero la transferencia de calor se hace más lenta cerca del centro del andamio, lo que resulta en una disminución del número de cristales de hielo a medida que aumenta el tamaño del cristal, los poros se hacen más grandes y anchos en distribución de tamaño. Esto crea una morfología con diferentes secciones de poros a lo largo del área de la sección transversal vertical de la membrana.

250 X

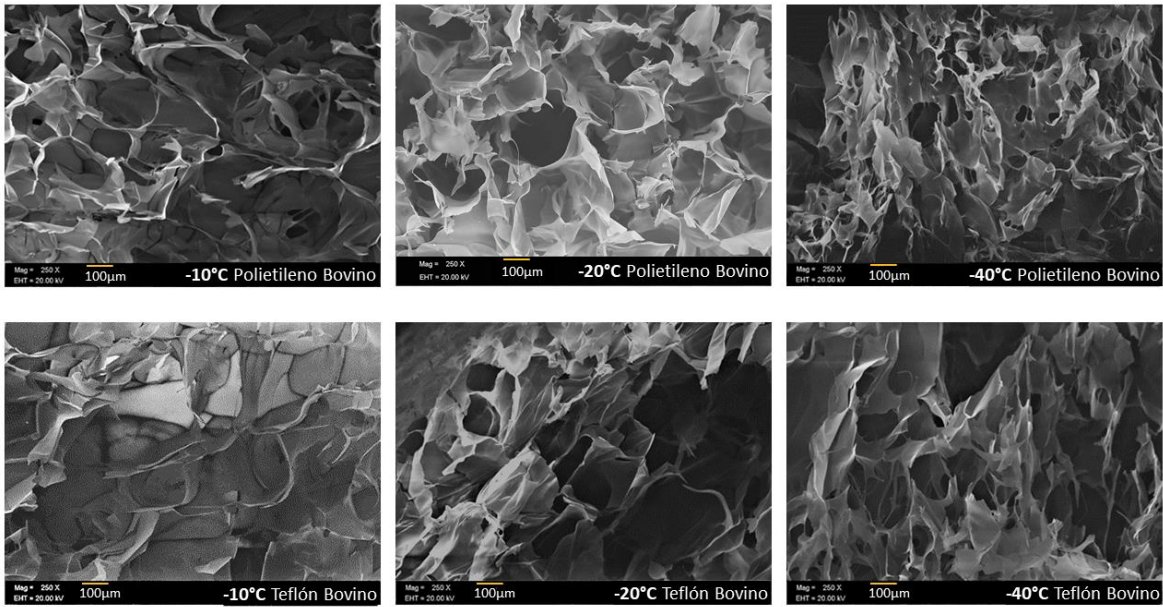


Figura 44. Imágenes de sección transversal de membranas de gelatina de bovino con temperaturas de congelación de -10°C , -20°C y -40°C , los moldes utilizados para su elaboración fueron polietileno (arriba) y teflón (abajo). Magnificación de 250x.

500 X

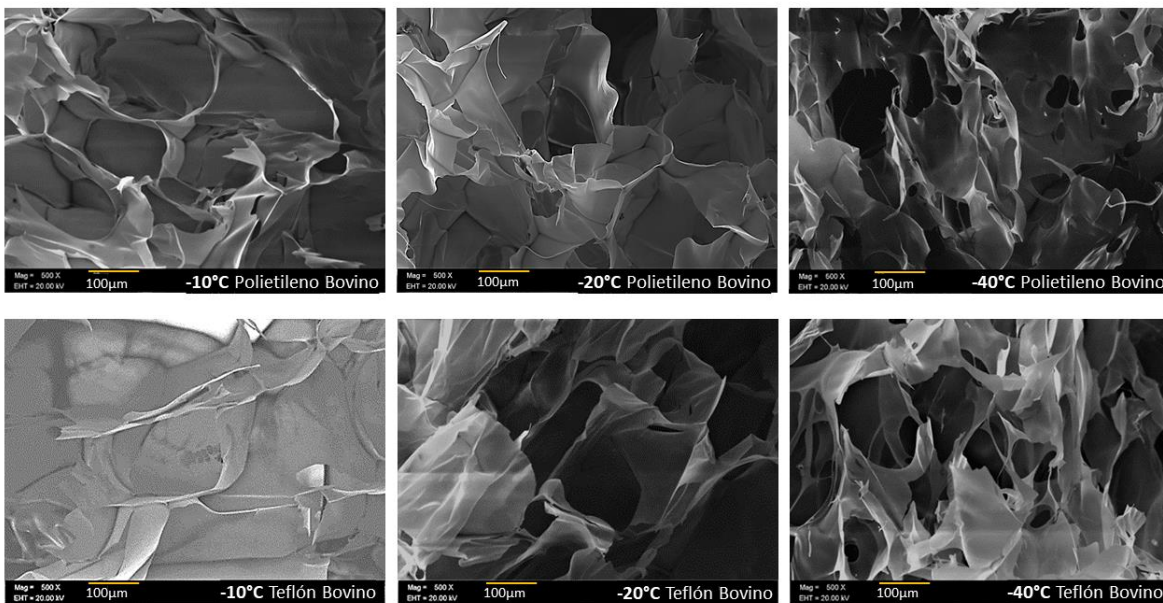


Figura 45. Imágenes de sección transversal de membranas de gelatina de bovino con temperaturas de congelación de -10°C , -20°C y -40°C , los moldes utilizados para su elaboración fueron polietileno (arriba) y teflón (abajo). Magnificación de 500x.

Las membranas liofilizadas siempre cumplen con ser porosas y esto es un punto que favorece la creación de andamios. Se espera que los andamios óseos tengan porosidad para favorecer a la osteoconducción, que es el crecimiento interno de tejido óseo nuevo [3].

En la estructura de las membranas se observan capas que van formando los espacios que corresponden al lugar que ocupaban los cristales de hielo antes de la liofilización. Estos cristales de disolución congelada estaban dispuestos en diferentes orientaciones, por eso no se observa una porosidad homogénea. Los poros tienen formas irregulares que asemejan a cilindros con caras elipsoides.

Además, se observa que los poros están interconectados. Los poros interconectados son necesarios para la regeneración del tejido óseo porque permiten la migración y proliferación de osteoblastos y células mesenquimales, además de la vascularización [94].

En las imágenes de la Figura 44 y de la Figura 45 es posible notar por simple inspección visual que el tamaño de poros se va haciendo cada vez más grande conforme aumenta la temperatura de congelación. Por ejemplo, para el caso de las membranas elaboradas a $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$, los poros son más pequeños que para las membranas elaboradas a $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$.

En las imágenes obtenidas por SEM se midieron los diámetros de poros utilizando el programa *ImageJ*. Para las mediciones se usaron 5 poros de cada tipo de membrana, de los cuales se tomaron 25 mediciones de diámetros a lo largo de todas las direcciones de los poros y luego se obtuvo un promedio y se determinó su incertidumbre.

Tabla 10. Diámetros de poros de membranas de gelatina de bovino.

Gelatina de bovino	Temperatura y material del molde					
	-40°C		-20°C		-10°C	
	Polietileno	Teflón	Polietileno	Teflón	Polietileno	Teflón
Diámetro (µm)	55.83 ± 3.88	88.34 ± 6.57	167.86 ± 15.12	196.84 ± 14.38	244.22 ± 15.94	317.01 ± 25.69

También se midió el espesor de la membrana y el espesor de la pared del poro (celda) de las membranas.

Tabla 11. Espesores de membranas de gelatina de bovino y sus paredes de celdas.

	Temperatura y material del molde					
	-40°C		-20°C		-10°C	
	Polietileno	Teflón	Polietileno	Teflón	Polietileno	Teflón
Promedio Espesor membrana (µm)	1597.07	2199.91	1626.08	1744.16	2232.69	2592.65
% Desviación	4.6631	4.7468	3.7867	3.5686	2.3559	4.9
Promedio Espesor pared de celda (poro) (µm)	0.948	0.887	1.1680	0.7632	1.011	0.8433
% Desviación	12.7110	41.4166	21.5325	28.91	22.5755	28.7130

En la Tabla 11 se observa que la membrana tiene espesores ligeramente mayores cuando se ocupa en su elaboración el molde de teflón que cuando se ocupa el de polietileno.

Para el largo y el ancho se tomaron las longitudes mayores que presentaba cada poro, luego se obtuvo el cociente entre ellas, que es la relación largo ancho. Así, se obtuvo el promedio de los siguientes valores que se muestran en la Tabla 11 y en la Tabla 12.

En la sección transversal de la membrana se observan poros de diferentes tamaños con forma de elipsoides, es por eso que el largo y el ancho varían mucho debido a que estas longitudes van a depender del plano de la celda donde se realizó el corte de la sección transversal, ya que la longitud no será la misma si se cortó en los extremos que si se cortó en la parte media. Esta variación de tamaño de poros se observa en la siguiente Tabla 12, donde se muestran los promedios de largos, anchos y su porcentaje de desviación. En la Tabla 12 se presentan porcentajes de desviación de la relación largo/ancho arriba del 10%; esto tiene que ver con que hay una amplia variedad de distribución de tamaños de poros.

En la Tabla 12 solo se presentan los promedios de las longitudes de largo y ancho, sin embargo, en los datos de mediciones individuales se tienen longitudes de los ejes mayor y menor en los poros que van desde los 20 μm hasta los 471 μm .

Los promedios de la relación entre la longitud más larga y la longitud del ancho se encuentran entre 1.77 y 1.93, esto tiene que ver con su forma ovalada casi como un poro elipsoide.

Tabla 12. Longitudes de poros de membranas de gelatina de bovino.

	Temperatura y material del molde					
	-40°C		-20°C		-10°C	
	Polietileno	Teflón	Polietileno	Teflón	Polietileno	Teflón
Promedio largo (µm)	68.582	145.238	106.669	156.297	213.5832	327.2309
% Desviación	34.205	34.903	34.808	18.1	27.1389	35.5890
Promedio ancho (µm)	35.949	85.844	58.417	94.416	118.9964	179.4904
% Desviación	31.713	37.565	36.725	34.596	36.0564	35.5440
Promedio de Relación (largo/ ancho)	1.9043	1.7655	1.8315	1.7613	1.9262	1.8401
% Desviación	13.9249	14.8134	15.4306	19.4957	21.7851	10.0786

En la Tabla 12 se observa que la temperatura a la que fueron congeladas las disoluciones antes de la liofilización influye mucho en el tamaño de poro, a menores temperaturas de congelación los promedios del largo y del ancho son menores, y conforme se incrementa la temperatura de congelación también lo hacen estas longitudes de poro. Esto concuerda con los resultados de las investigaciones previas [10], [48], [56], [62], [63], [95], [96]: el tamaño de los poros de los andamios disminuyó a medida que se redujo la temperatura de congelación, al usar el método de liofilización.

La etapa de congelación fue determinante para la forma de los poros porque es donde los cristales de hielo crecen, y esta etapa es importante porque determina el tamaño final de las características del andamio [82].

Además, en la Tabla 12 se ve que los tamaños de poros son mayores cuando se usan moldes de teflón que cuando se usan moldes de polietileno.

Los tamaños de poros coinciden dentro de los rangos esperados para las membranas de gelatina que se obtiene de un mamífero, incluso cuando se usan entrecruzantes para elaborar membranas [97].

6.3.2. Morfología de las membranas de gelatina de pescado de la concentración seleccionada obtenidas con moldes de teflón y polietileno a diferentes temperaturas de congelación.

Se utilizó el mismo procedimiento que para las membranas de gelatina de bovino, mediante SEM se obtuvieron las imágenes que se presentan a continuación.

250 X

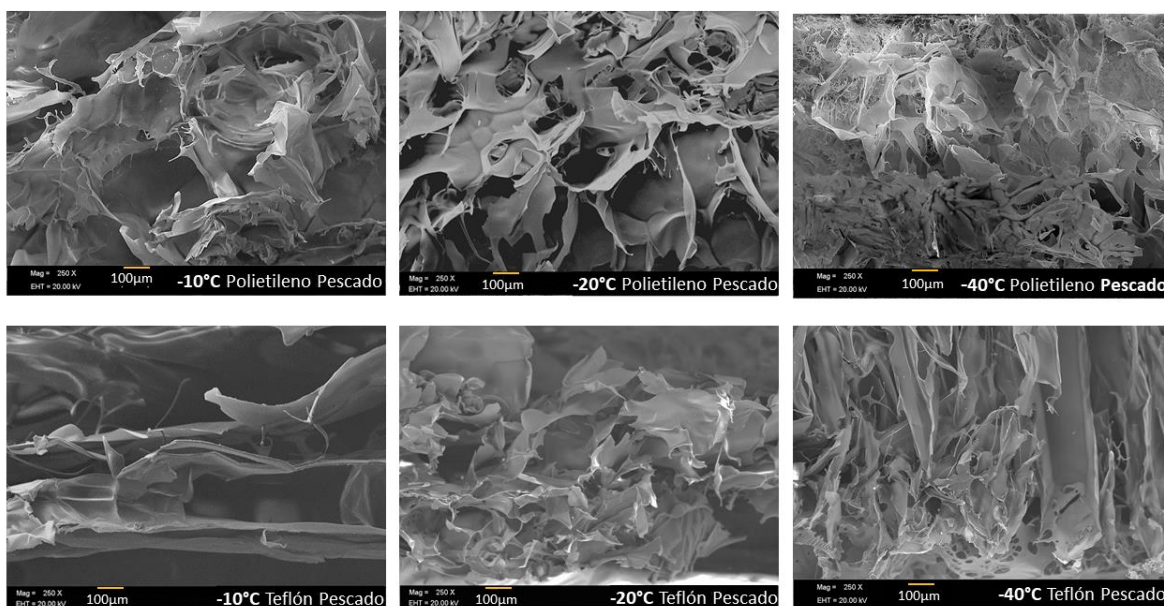


Figura 46. Imágenes de sección transversal de membranas de gelatina de pescado con temperaturas de congelación de -10°C, -20°C y -40°C, los moldes utilizados para su elaboración fueron polietileno (fila de arriba) y teflón (fila de abajo). Magnificación de 250x.

500 X

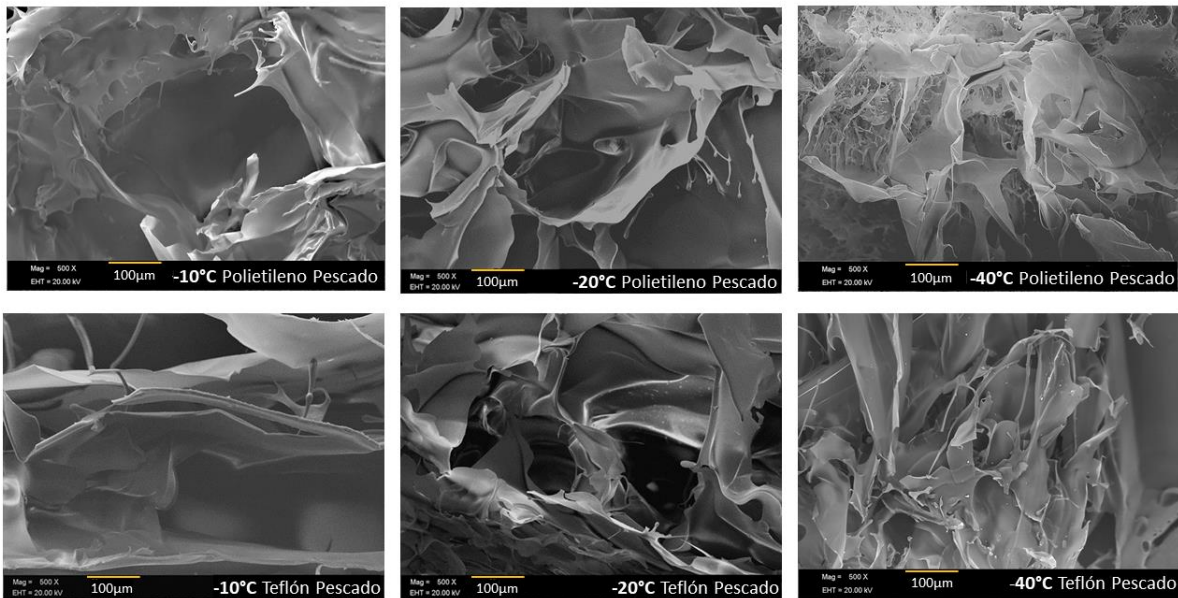


Figura 47. Imágenes de sección transversal de membranas de gelatina de pescado con temperaturas de congelación de -10°C , -20°C y -40°C , los moldes utilizados para su elaboración fueron polietileno (fila de arriba) y teflón (fila de abajo). Magnificación de 500x.

En la Figura 46 y Figura 47 se observa que las membranas de pescado presentan poros interconectados, con formas y distribución de tamaños diferentes. Es posible ver que el mayor tamaño de poro se da a -10°C , lo cual coincide con lo observado en las membranas de bovino. Hay poros que tienden a verse circulares en la temperatura de -20°C , pero en las temperaturas de -10°C y -40°C tienden más a verse poros alargados, angostos y asemejar la formación de canales o capas.

En las imágenes por SEM las tendencias de los tamaños de poro para las membranas de pescado se observan no tan claramente como para el caso de las de bovino. Para capturar claramente esta tendencia es necesario tener mucho cuidado para tomar las imágenes y orientar la muestra en la misma dirección, además de evitar deformar la muestra al manipularla. Las tendencias de tamaños se podrán corroborar a continuación con la medición de tamaño de poro.

Se realizaron las mediciones de diámetros de poros en las imágenes obtenidas por SEM utilizando el programa *ImageJ*. Para las mediciones se usaron 5 poros de cada tipo de membrana, de los cuales se tomaron 25 mediciones de diámetros a lo largo

de todas las direcciones de los poros y luego se obtuvo un promedio y se determinó su incertidumbre.

Tabla 13. Diámetros de poros de membranas de gelatina de pescado.

Gelatina de pescado	Temperatura y material del molde					
	-40°C		-20°C		-10°C	
	Polietileno	Teflón	Polietileno	Teflón	Polietileno	Teflón
Diámetro (µm)	73.98 ± 7.18	104.47 ± 14.19	188.22 ± 17.05	192.51 ± 17.41	306.67 ± 37.14	584.48 ± 117.72

En la Tabla 14 y Tabla 15 se muestran los promedios de las longitudes medidas para cada tipo de membrana de gelatina de pescado, obtenidas de la misma manera que para las membranas de gelatina bovina, con el software *ImageJ*, fueron usadas 5 micrografías de cada tipo de membrana para hacer 5 mediciones y luego obtener el promedio para cada variable.

Tabla 14. Espesores de membranas de gelatina de pescado y sus paredes de celdas.

	Temperatura y material del molde					
	-40°C		-20°C		-10°C	
	Polietileno	Teflón	Polietileno	Teflón	Polietileno	Teflón
Promedio Espesor membrana (µm)	1501.0633	1431.7428	2154.4562	1573.9494	1533.2318	1334.5958
% Desviación	3.9168	4.1645	4.6029	2.7583	8.3527	6.4358
Promedio Espesor pared de celda (poro) (µm)	1.030	1.5363	1.3535	1.3694	1.0039	1.7438
% Desviación	36.5401	22.5576	26.3345	33.4859	27.4746	33.29

Tabla 15. Longitudes de poros de membranas de gelatina de pescado.

	Temperatura y material del molde					
	-40°C		-20°C		-10°C	
	Polietileno	Teflón	Polietileno	Teflón	Polietileno	Teflón
Promedio largo (µm)	211.8940	291.8636	250.0938	420.7660	329.3036	979.1023
% Desviación	66.4861	34.5473	15.1422	66.3486	43.0320	62.5622
Promedio ancho (µm)	89.1705	125.7710	94.8150	208.1934	139.6294	210.9906
% Desviación	67.5441	46.3110	31.4212	63.7294	73.4150	35.6060
Promedio de Relación (largo/ ancho)	2.4423	2.5559	2.9490	2.0154	3.3796	4.0948
% Desviación	22.3636	19.1315	30.61	21.6896	45.2601	39.1813

En la Tabla 15 se observa que, al igual que para las membranas de bovino, el promedio del largo de los poros está relacionado con la temperatura de congelación, disminuye conforme disminuye la temperatura de congelación y lo mismo pasa con el promedio del ancho de los poros. Esta tendencia está de acuerdo con los trabajos de: [10], [56], [62], [95], [96], ya que la etapa de congelación donde los cristales de hielo crecen es importante en la microarquitectura de los poros del andamio [82].

En los casos donde se presentan porcentajes de desviación altos es porque hay mucha variación en el tamaño de los poros, ya que debido al método de obtención por liofilización es difícil controlar esta variable.

También en Tabla 15 se muestra que el tamaño de poro fue mayor cuando se usó un molde de teflón que un molde de polietileno. Esto es probable que se deba a que al ser más hidrofóbico el molde de teflón habrá menor adherencia de las moléculas

de agua hacia el molde, y cuando crecen los cristales de hielo ocupan mayor volumen que para el caso del polietileno, en el cual habrá mayor adherencia de las moléculas del agua hacia el molde y por lo tanto las moléculas adheridas estarán disminuyendo el volumen de los cristales de hielo.

6.4 Análisis Térmico TGA y DSC

Se realizaron análisis de TGA y DSC para las membranas que fueron preparadas con 1.2 % de gelatina de pescado o gelatina de bovino usando moldes de teflón y polietileno para su elaboración.

6.4.1 TGA

Las curvas de TGA obtenidas para todas las membranas de gelatina 1.2% de pescado o de bovino son muy parecidas, y quedan casi superpuestas, como se muestra en las Figura 48, Figura 49, Figura 50 y Figura 51.

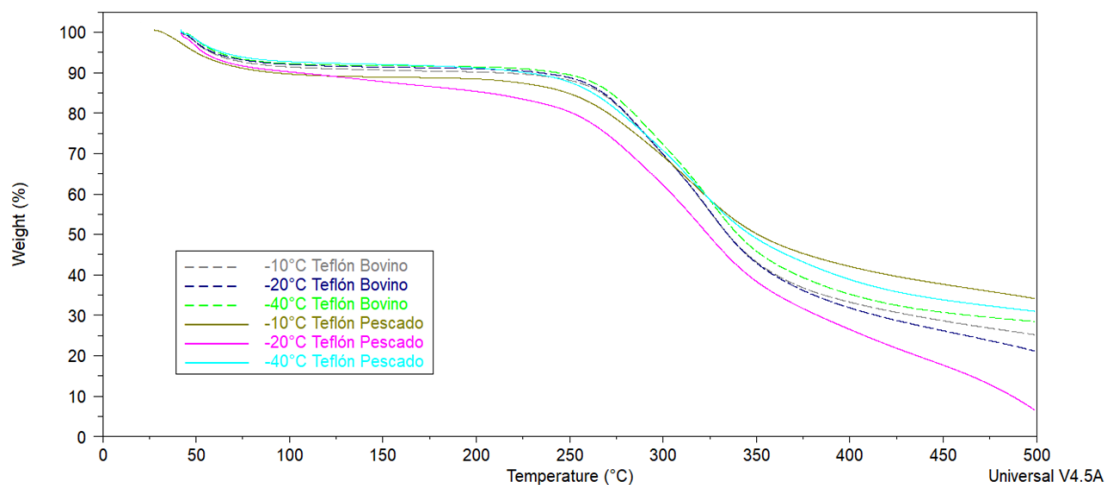


Figura 48. TGA Termograma de las membranas de gelatina de pescado y de bovino elaboradas con moldes de teflón.

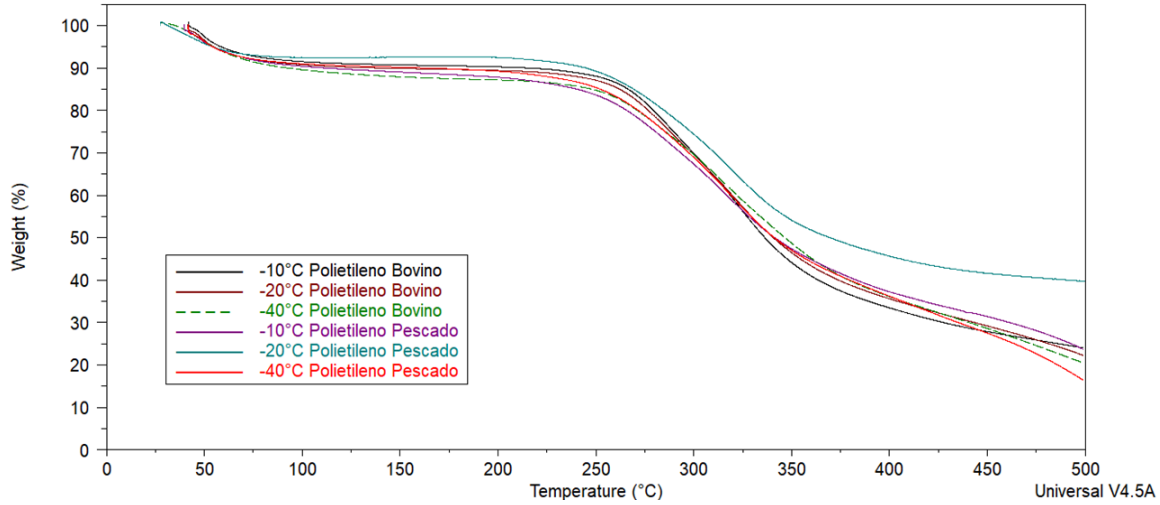


Figura 49. TGA Termograma de las membranas de gelatina de pescado y de bovino elaboradas con moldes de polietileno.

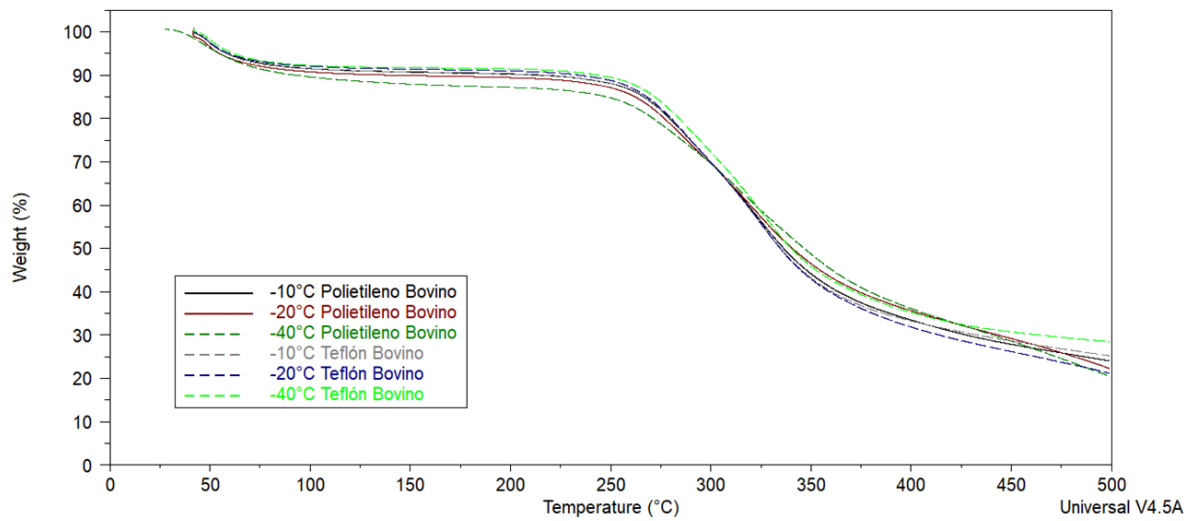


Figura 50. TGA termograma de las membranas elaboradas con gelatina de bovino, en moldes de teflón y polietileno.

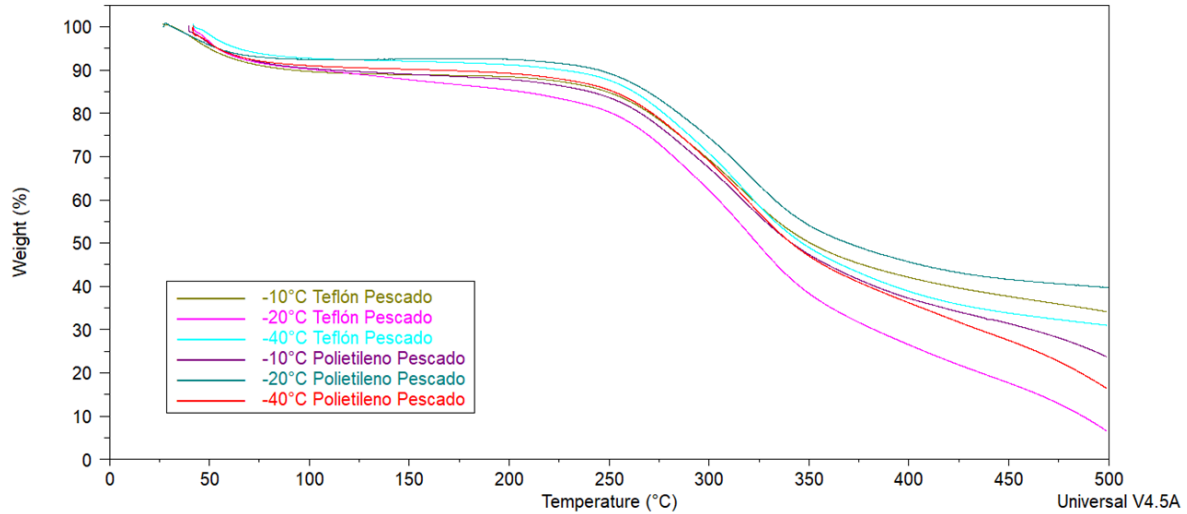


Figura 51. TGA termograma de las membranas elaboradas con gelatina de pescado, en moldes de teflón y polietileno.

Se muestra en la Figura 52 la pérdida de masa en un TGA característico de las membranas de gelatina. La primera etapa de pérdida de masa se debe a la pérdida de agua, tanto el agua absorbida por la membrana como el agua que se encontraba enlazada a las cadenas polipeptídicas de gelatina [98] corresponde a una pérdida de masa de 12.264%. En la segunda etapa ocurre la degradación de la gelatina, a partir de 250°C dando un porcentaje de pérdida de masa de 64% [98], [99].

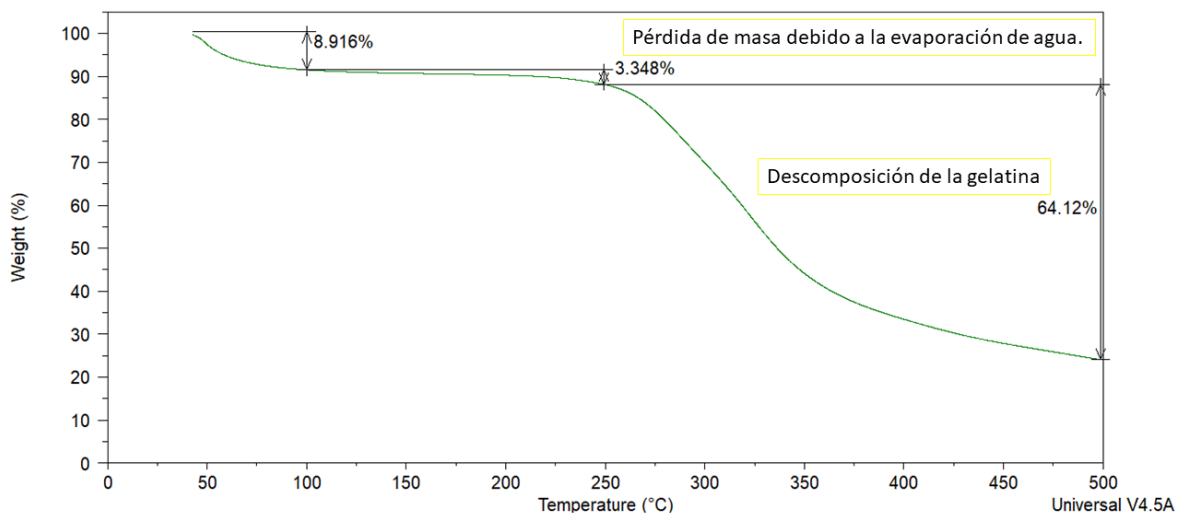


Figura 52. Termograma TGA característico de las membranas de gelatina, donde se señalan los porcentajes de pérdida de masa.

Según Mukherjee y col. [100] en el TGA la pérdida de agua se da de manera gradual en un intervalo amplio cuando las concentraciones de agua son menores y a menores temperaturas, y rápidamente cuando las concentraciones de agua son superiores. Eso quiere decir que las formas de las curvas de TGA dependerá del porcentaje de agua que esté presente en la gelatina o membrana, y el comportamiento de las curvas obtenidas en el presente trabajo coincide con la literatura.

En la sección 8. Anexos se incluyen los termogramas TGA para la comparación de las membranas separándolas por temperaturas de congelación.

6.4.2 DSC

Los resultados del análisis de DSC de las membranas elaboradas se muestran en las Figura 53, Figura 54, Figura 55 y Figura 56, se observa un comportamiento parecido entre ellas.

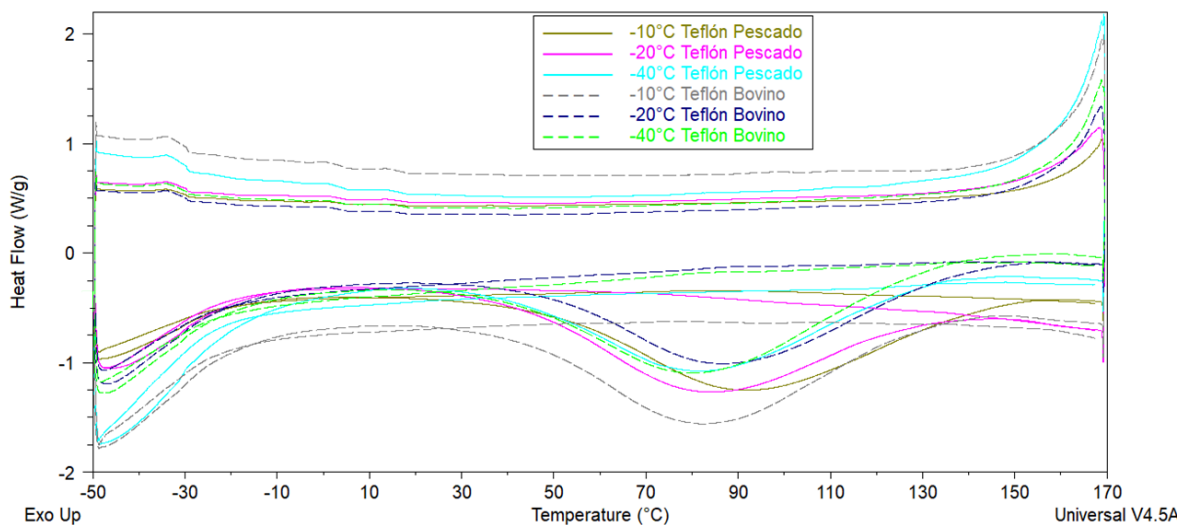


Figura 53. Termograma DSC de membranas elaboradas con gelatina de bovino y de pescado usando moldes de teflón.

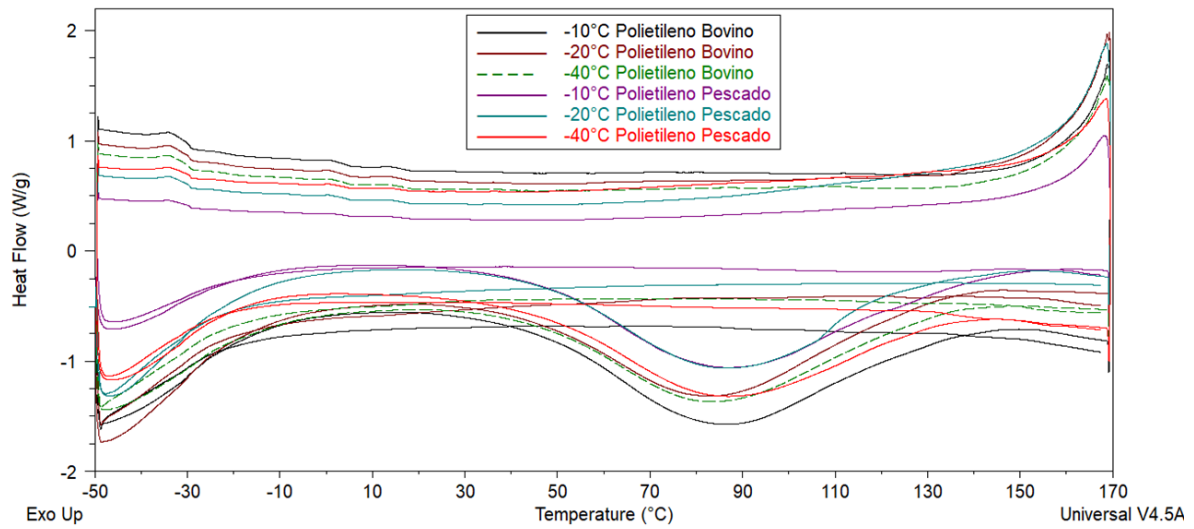


Figura 54. Termograma DSC de las membranas elaboradas usando moldes de polietileno.

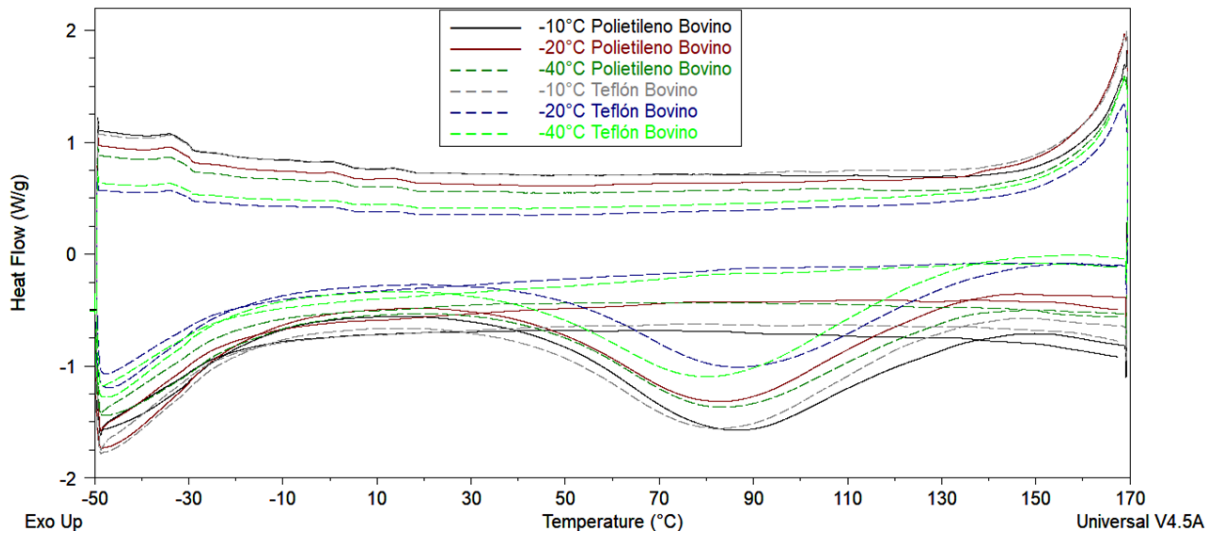


Figura 55. Termograma DSC de membranas de gelatina de bovino, elaboradas a las temperaturas de congelación de -10°C , -20°C y -40°C , en moldes de polietileno y teflón.

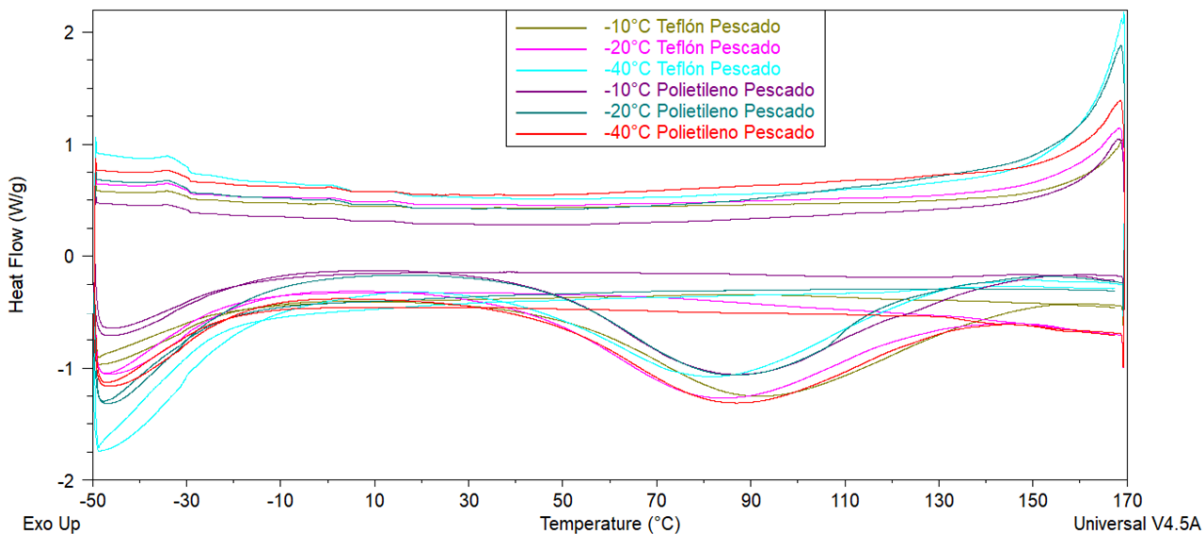


Figura 56. Termograma DSC de membranas de gelatina de pescado, elaboradas a las temperaturas de congelación de -10°C , -20°C y -40°C , en moldes de polietileno y teflón.

El termograma obtenido por DSC representativo de las membranas se muestra en la Figura 57. En la curva del primer calentamiento (en dirección de -50 a 170°C), Figura 57, se observa un pico endotérmico a la temperatura de aproximadamente 86.68°C que corresponde a la pérdida de agua. La segunda curva (parte superior, dirección de 170° a -50°C) es el enfriamiento, al volver a calentar desde -50°C a 170°C la curva ya no presenta el pico de deshidratación, lo que indica que ya no tenía agua.

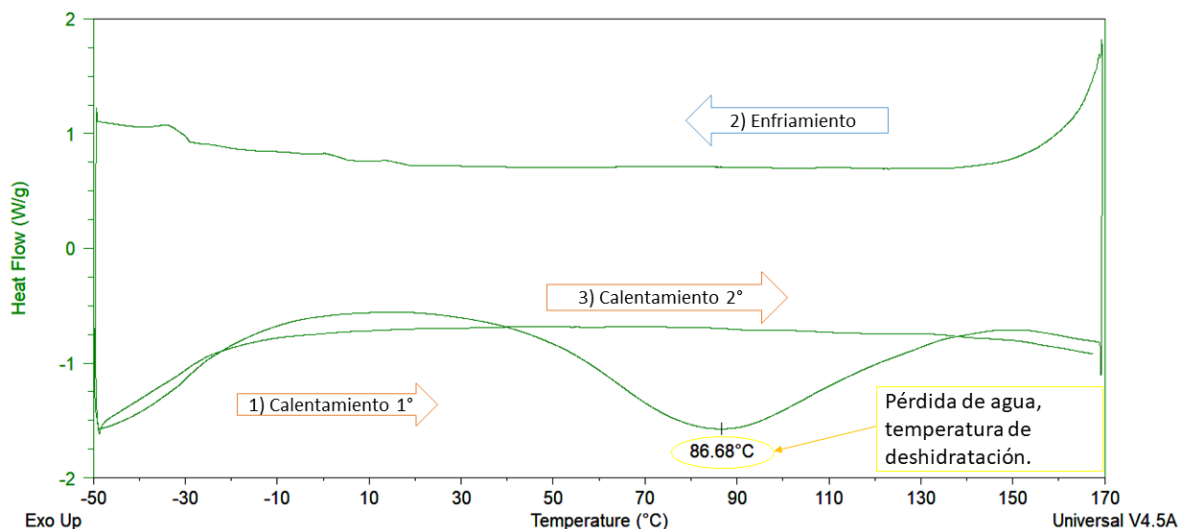


Figura 57. Termograma DSC representativo de las membranas obtenidas.

No se pueden ver las transiciones de la gelatina, su T_g y T_m , porque son apantalladas / ocultas por el efecto de la evaporación del agua, cristalizada y no cristalizada [100]. Según la literatura la T_g de gelatina de pescado se encuentra entre 43 y 61 °C [99], [101], mientras que para la gelatina de bovino su T_g se encuentra entre 76 y 79°C [100], [101]. La T_m es de 164 °C para gelatina de pescado [101] y en el caso de bovino se encuentra entre 101 y 153 °C [100], [101]. La amplia variación de los valores de estas temperaturas de transición van a depender mucho de la cantidad de humedad que contenga la muestra de gelatina a analizar, así como del origen y forma de extracción de la gelatina [101].

Las diferencias en las curvas de los termogramas se pueden deber a la variación en el tamaño de muestra (hubo variaciones de 1 a 5 mg) que se introdujo al equipo [102]. El tamaño de la muestra afecta en la sensibilidad, resolución y por lo tanto la forma de los picos. Por ejemplo, con un aumento en el tamaño de muestra hay un ensanchamiento del pico, y la subsiguiente disminución en la resolución [102], [103].

En la sección 8. Anexos se incluyen los termogramas por DSC para la comparación de las membranas separándolas por temperaturas de congelación.

6.5 Propiedades mecánicas mediante ensayo de tensión.

6.5.1. Pruebas de tensión a membranas de gelatina de bovino obtenidas con moldes de teflón y de polietileno, a tres temperaturas de congelación.

Se realizaron pruebas de tensión a las membranas de gelatina de bovino 1.2% obtenidas con moldes de teflón y polietileno a las temperaturas de congelación de -10, -20 y -40 °C. El resumen de estas pruebas se muestra en la Figura 58.

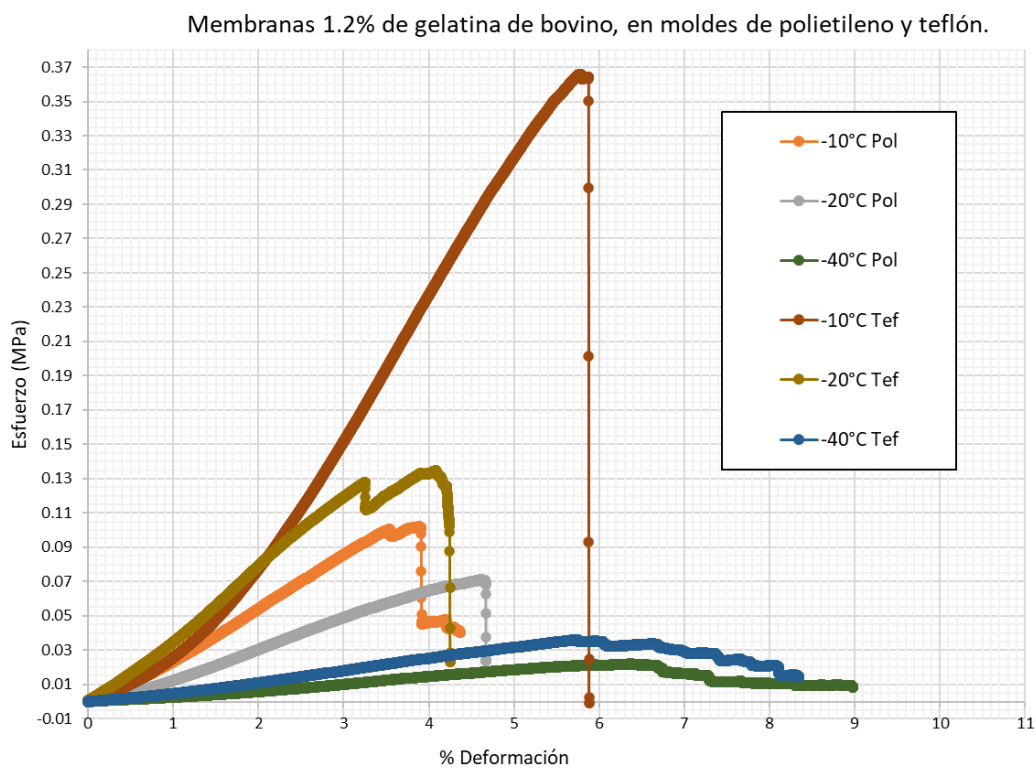


Figura 58. Curva esfuerzo-deformación para membranas de gelatina de bovino elaboradas con moldes de polietileno (Pol) y de teflón (Tef) a diferentes temperaturas de congelación.

Las curvas de esfuerzo-deformación encontradas para todas las membranas tienen una gráfica del mismo tipo de comportamiento que las membranas de colágeno comerciales utilizadas para odontología. Las membranas no presentan deformación plástica, ya que rompen en el punto máximo de resistencia a la tensión. La diferencia entre las membranas de colágeno y gelatina es que las membranas de gelatina

presentan valores menores en el esfuerzo máximo a la tensión (cuya diferencia se encuentra desde 4.434 MPa a 12.734 MPa) y en la deformación (con una diferencia desde 9.8% hasta 40.3%) [104]. Sin embargo, los valores de esfuerzo máximo a la tensión se encuentran dentro del rango reportado por Suesca et al [84], quienes obtuvieron valores promedio desde 0.1 hasta 0.5 MPa al analizar membranas de colágeno tipo I entrecruzadas con diferentes tipos de entrecruzantes, lo cual es un buen indicador para las membranas obtenidas de gelatina, ya que se supone que los entrecruzantes mejoran las propiedades mecánicas de la gelatina y el colágeno.

Se encontró que al emplear el molde de teflón, las membranas de gelatina de bovino presentan mayor resistencia a la tensión que con el molde de polietileno, superándolo 3.55, 1.92 y 1.64 veces, para -10, -20 y -40 °C respectivamente, como se ve en Figura 58. La resistencia a la tensión mostró un máximo a la temperatura de congelación de -10°C, y fue disminuyendo con la temperatura. Así, las que fueron congeladas a -40°C mostraron menor resistencia a la tensión para ambos moldes.

Para las membranas de gelatina de bovino, los valores de esfuerzo máximo, el módulo elástico y el porcentaje de deformación a la ruptura se muestran en la Tabla 16.

Tabla 16. Análisis del ensayo de tensión para las membranas de gelatina bovina

Membranas de gelatina de piel de bovino						
Concentración % m/m	1.2%					
Característica de membranas	-10 °C Pol	-20°C Pol	-40 °C Pol	-10 °C Tef	-20°C Tef	-40 °C Tef
Esfuerzo (valor máximo en gráficas) Tensión MPa	0.103	0.0704	0.0220	0.3660	0.1350	0.0360
Módulo elástico MPa	3.158	1.7	0.405	8.635	4.604	0.686
% deformación a la ruptura	3.54	4.67	6.5	5.79	3.25	6

De la Tabla 16 se puede ver que el módulo elástico es mayor para las membranas obtenidas en el molde de teflón, comparadas con las de polietileno a la misma temperatura. Además, presenta una tendencia similar a los valores de esfuerzo, va disminuyendo en el siguiente orden de temperatura de congelación: -10, -20 y -40 °C. Los valores más altos de módulo elástico se presentaron -10°C para ambos tipos de moldes, esto fue debido a que el espesor de las probetas fue menor, ya que en el proceso de elaboración se formó una membrana con un espumado muy ligero y delicado, este espumado se perdió al cortar la probeta ya que era muy frágil, quedando una película superficial. Está película es más rígida y resistente.

En cuanto al porcentaje de deformación a la ruptura, los valores más grandes lo presentan las membranas elaboradas a -40°C, quienes también presentan el menor esfuerzo a la tensión.

6.5.2. Pruebas de tensión a membranas de gelatina de pescado obtenidas con moldes de teflón y de polietileno, a tres temperaturas de congelación.

Se realizaron pruebas de tensión a las membranas de gelatina de pescado 1.2% obtenidas con moldes de teflón y polietileno a las temperaturas de congelación de -10, -20 y -40 °C, en la Figura 59 se presenta su curva esfuerzo-deformación.

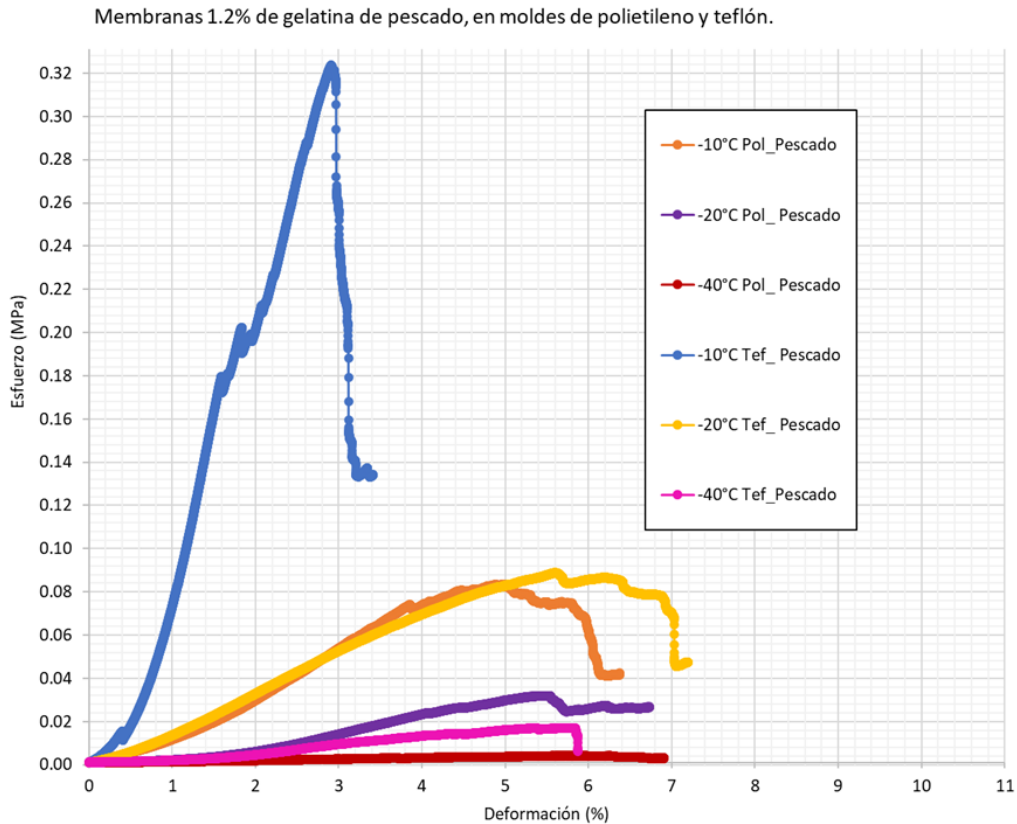


Figura 59. Curva esfuerzo-deformación para membranas de gelatina de pescado elaboradas con moldes de polietileno (Pol) y de teflón (Tef) a diferentes temperaturas de congelación.

En los resultados obtenidos (Figura 59) de las pruebas de tensión para las membranas de gelatina de pescado se encontró que al emplear el molde de teflón presentan mayor resistencia a la tensión que con el molde de polietileno, siendo 3.89, 2.84 y 5.3 veces superior, para las temperaturas de -10, -20 y -40 °C respectivamente.

Además se observa una clara tendencia en la disminución del esfuerzo máximo a la tensión conforme la temperatura de congelación va disminuyendo (mismo comportamiento fue para las gelatinas de bovino), esto coincide con la disminución del tamaño de poro, ya que a menor temperatura menor tamaño de poro. Tal efecto del tamaño de poro en el valor de esfuerzo máximo a la tensión se obtuvo en los resultados de Al-Munajjed et al [105], donde obtienen que el aumento del tamaño de los poros mostró valores significativamente mayores para la tensión de ruptura.

Para las membranas de gelatina de pescado, los valores de esfuerzo máximo, módulo elástico y porcentaje de deformación a la ruptura se muestran en la Tabla 17.

Tabla 17. Análisis del ensayo de tensión para las membranas de gelatina de pescado.

Membranas de gelatina de piel de pescado						
Concentración % m/m	1.2%					
Característica de membranas	-10°C Pol	-20 °C Pol	-40 °C Pol	-10°C Tef	-20 °C Tef	-40 °C Tef
Esfuerzo (valor máximo en gráficas) Tensión MPa	0.083	0.031	0.003	0.323	0.088	0.016
Módulo elástico MPa	2.450	0.922	0.072	7.402	1.866	0.379
% deformación a la ruptura	4.899	5.5	5.872	2.9	5.617	5.831

De la Tabla 17 se puede ver que el módulo elástico es mayor para las membranas obtenidas a las temperaturas de -10°C, y el mayor valor se presenta para teflón y -10°C. Al igual que para las membranas de gelatina de bovino, estos valores tan altos de módulo elástico se presentan debido a que tienen un menor espesor las probetas.

En cuanto al porcentaje de deformación a la ruptura el valor más alto lo presentan las membranas elaboradas a -40°C en ambos tipos de molde, quienes también presentan los menores valores de esfuerzo a la tensión.

La tendencia del módulo elástico de las membranas de gelatina de pescado es que disminuye conforme disminuye la temperatura de congelación (Tabla 17).

6.5.3. Pruebas de tensión en membranas obtenidas de gelatina de bovino y de pescado usando moldes de teflón.

Las curvas esfuerzo-deformación para todas las membranas elaboradas con moldes de teflón se presentan en la Figura 60.

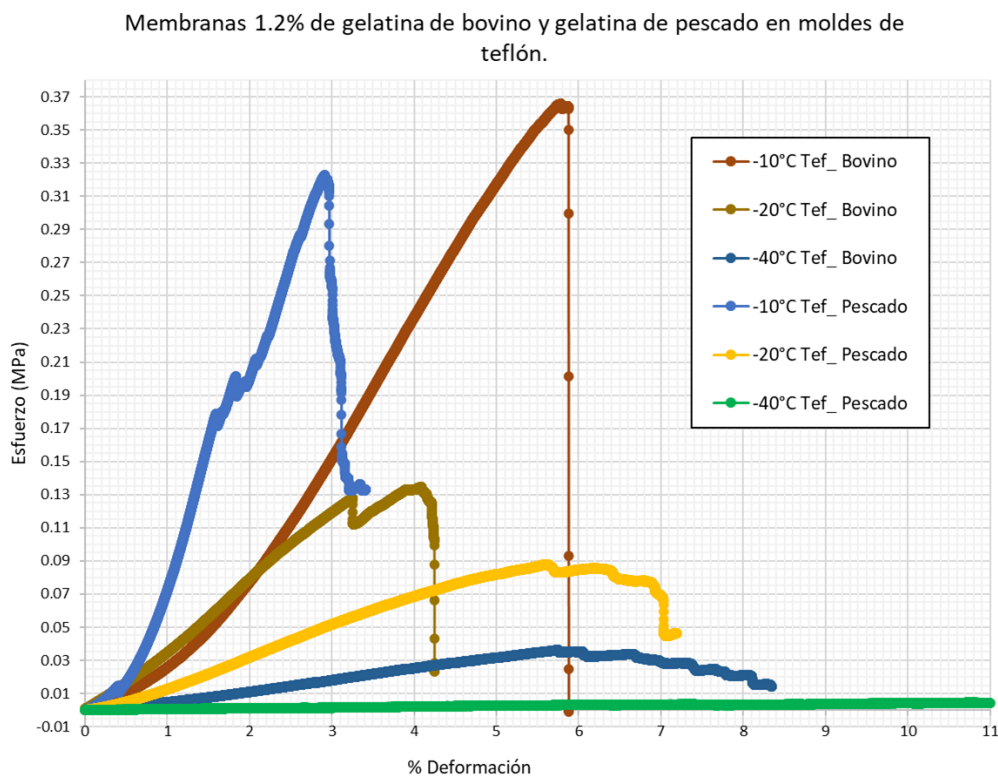


Figura 60. Curva esfuerzo-deformación de las membranas elaboradas con gelatina de bovino y de pescado, empleando moldes de teflón (Tef), a -10 , -20 y -40°C .

Se visualiza, en la Figura 60, que el más alto esfuerzo máximo a la tensión lo presentan las membranas de gelatinas de bovino, cuyos valores son 1.13, 1.53 y 2.25 veces superiores a las de gelatina de pescado.

También es posible observar que el porcentaje de deformación a la ruptura aumenta conforme disminuye la temperatura de congelación para los moldes de teflón, para los dos tipos de gelatina utilizados, esto se puede corroborar con los valores de las Tabla 16 y Tabla 17.

6.5.4. Pruebas de tensión en membranas obtenidas de gelatina de bovino y de pescado usando moldes de polietileno.

En la Figura 61 se presentan las gráficas esfuerzo-deformación para todas las membranas obtenidas con moldes de polietileno.

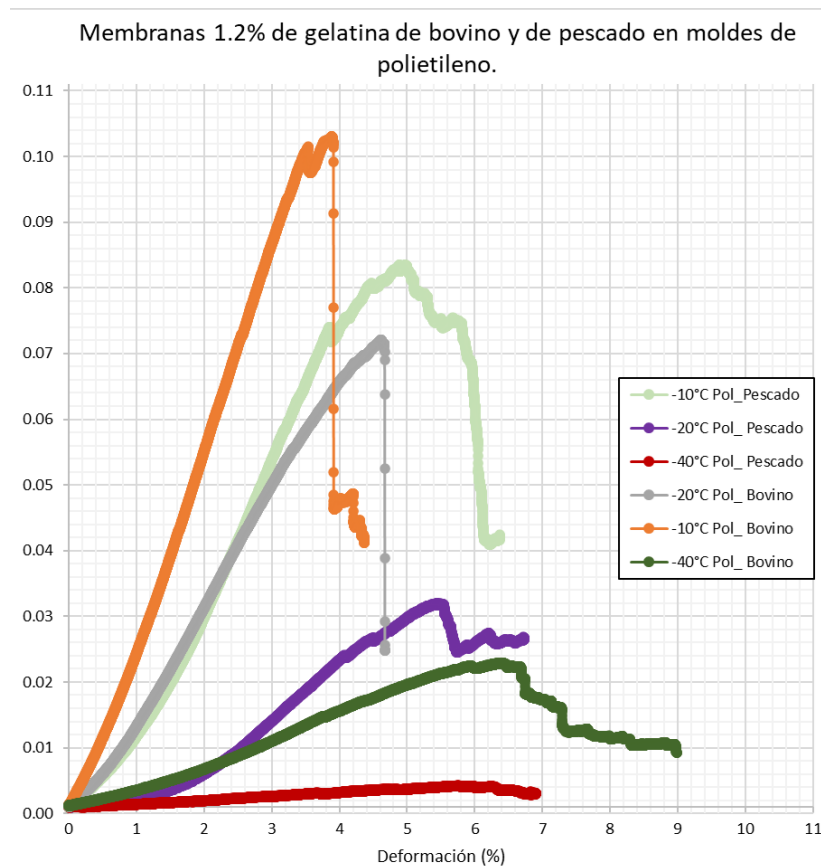


Figura 61. Curva esfuerzo-deformación de las membranas de gelatina de bovino y de pescado, empleando moldes de polietileno (Pol), a -10, -20 y -40 °C.

Se observa, en la Figura 61, que las curvas de -10°C de membranas de pescado y de membranas de bovino presentan el mayor esfuerzo a la tensión. Además, las membranas de bovino elaboradas en moldes de polietileno presentan un esfuerzo a la tensión superior a las de pescado, para todas las temperaturas de congelación.

De todos los resultados anteriores para las membranas de ambos tipos de gelatina se deduce que es necesario desarrollar membranas optimizadas en el aspecto mecánico para su aplicación en regeneración ósea guiada, a fin de cumplir con su función mecánica después de su implantación, ya que soporta carga. De la misma manera, las propiedades mecánicas están relacionados con la biorreabsorción, porque la variación de las propiedades mecánicas debido al proceso de degradación debe ser compatible con el proceso de regeneración ósea [94].

6.6 Medición de ángulo de contacto de los moldes de polietileno y teflón.

El ángulo de contacto se midió con ImageJ (ver Figura 62 y Figura 63) a partir de las imágenes tomadas a la gota sobre la superficie de teflón y polietileno. Se realizaron 5 mediciones de cada ángulo, sobre las imágenes de 3 gotas en cada superficie y se obtuvo el promedio. El ángulo de contacto para la superficie de teflón, poli (tetrafluoro etileno), fue de 103.75° . El ángulo de contacto para la superficie de polietileno fue de 93.2° .

Estos valores indican que los dos polímeros son hidrofóbicos, que es cuando el ángulo de contacto de una gota de agua con la superficie en cuestión es de valores alrededor de 90° o superior, esta clasificación se le confiere dado que un ángulo $\geq 90^{\circ}$ no moja a la superficie y por lo tanto tiene un carácter hidrofóbico. Además, se observa que el teflón es más hidrofóbico que el polietileno porque tiene un ángulo de contacto mayor. Esto coincide con el procedimiento introducido por Zisman en los años 1950, que evalúa la mojabilidad de los sólidos de baja energía superficial,

Zisman demostró que el ángulo de contacto de una gota de un líquido sobre una superficie disminuye al disminuir la tensión superficial del líquido para una amplia gama de superficies y la energía de superficie de un líquido debe ser menor que la del sólido para esparcirse [79]. Cabe destacar que el poli (tetrafluoro etileno), y el polietileno se clasifican como sólidos de baja energía superficial [106]. El politetrafluoroetileno puede considerarse como el material de referencia de baja energía superficial, es decir uno de los más hidrófobos, esto tiene que ver con sus interacciones moleculares entre sus cadenas poliméricas y sus átomos de flúor (F).

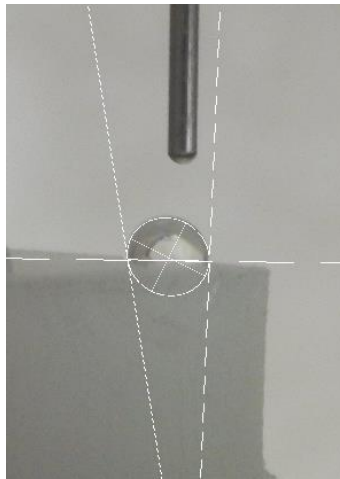


Figura 62. Gota de agua sobre la superficie de un cubo de teflón, en la parte superior se ve la punta de la jeringa. Las líneas son la representación gráfica del programa ImageJ al hacer la medición de ángulo de contacto.

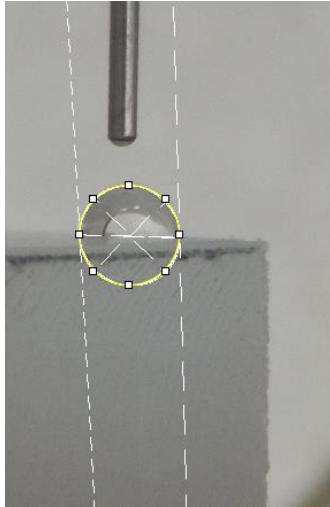


Figura 63. Gota de agua sobre la superficie de un cubo de polietileno, en la parte superior se ve la punta de la jeringa. Las líneas son la representación gráfica del programa ImageJ al hacer la medición de ángulo de contacto.

Esta mayor hidrofobicidad del poli (tetrafluoro etileno) se ve reflejada en la diferencia que hay en las características morfológicas de las membranas de gelatina, comparadas con las que se hicieron en moldes de polietileno, que tienen propiedades diferentes de porosidad y mecánicas, como ya se mencionó en capítulos previos.

7. Conclusiones

La morfología de las membranas dependió de la concentración y tipo de gelatina usada, del material con que está fabricado el molde empleado para su fabricación y de la temperatura de congelación.

A menor temperatura de congelación, la longitud de los poros es menor para los dos tipos de gelatina en ambas superficies de moldes.

El tamaño de poro fue mayor cuando se usó un molde de teflón respecto a los obtenidos en un molde de polietileno, para los dos tipos de gelatina y las tres temperaturas de congelación. Al mismo tiempo, las membranas obtenidas en moldes de teflón presentaron mayor resistencia a la tensión (con valores que van desde 1.6 veces hasta 5 veces superior) que las obtenidas en moldes de polietileno, para ambos tipos de gelatina.

Las membranas de gelatina de bovino presentaron un máximo de esfuerzo a la tensión a la temperatura de -10°C , lo mismo ocurrió para el caso de las membranas de gelatina de pescado. El esfuerzo a la tensión disminuyó al reducir la temperatura de congelación.

Las membranas de gelatina de bovino presentaron valores de esfuerzo máximo a la tensión y de módulo elástico superiores a los valores de las membranas de gelatina de pescado. Tal que, el esfuerzo a la tensión de membranas de gelatina de bovino en moldes de polietileno fue de 1.24, 2.27 y 7.33 veces superior al que presentaron las de pescado, y para moldes de teflón el esfuerzo de gelatina de bovino superó 1.13, 1.53 y 2.25 veces a las de pescado.

El molde de teflón presenta mayor hidrofobicidad que el de polietileno, lo cual se manifiesta en su mayor ángulo de contacto.

Los estudios térmicos en los dos tipos de gelatinas y membranas indican comportamientos similares entre la gelatina como materia prima y como parte de una membrana cuyo disolvente fue agua. EL TGA indica la pérdida de masa debido

a la pérdida de agua y el pico endotérmico que presenta el DSC también se debe a la deshidratación.

Por todo ello se puede concluir que la estructura y propiedades de las membranas liofilizadas de gelatina están influenciadas por el tipo de gelatina, tipo de molde y temperatura de congelación en su procesamiento de obtención.

Para la elaboración de membranas, para aplicación en regeneración ósea guiada, por el método de liofilización se recomienda optimizar la selección de molde, temperatura de congelación y tipo de gelatina a usar, ya que como se mostró en este trabajo, tiene una importante influencia en sus propiedades resultantes. Así mismo es importante investigar los aspectos del siguiente apartado Perspectivas.

Perspectivas

A raíz de los resultados obtenidos en este trabajo se proponen los siguientes temas para estudiar posteriormente:

Determinar el efecto del pH en la disolución para cada tipo de gelatina, debido a que las cargas pueden influir en cómo interactúan las cadenas de la gelatina en la disolución acuosa.

Determinar el efecto del volumen de la disolución en diferentes tipos de moldes.

Determinar las concentraciones adecuadas de distintos tipos de entrecruzantes, para mejorar las propiedades mecánicas de las membranas de gelatina y las características biológicas adecuadas a la compatibilidad celular.

Estudiar el efecto de un reactivo entrecruzante de gelatina sobre las propiedades físicas y químicas de las membranas de distintos tipos de gelatinas, empleando los dos tipos de moldes y los dos tipos de gelatina: bovino y pescado.

8. Anexos

Termogramas:

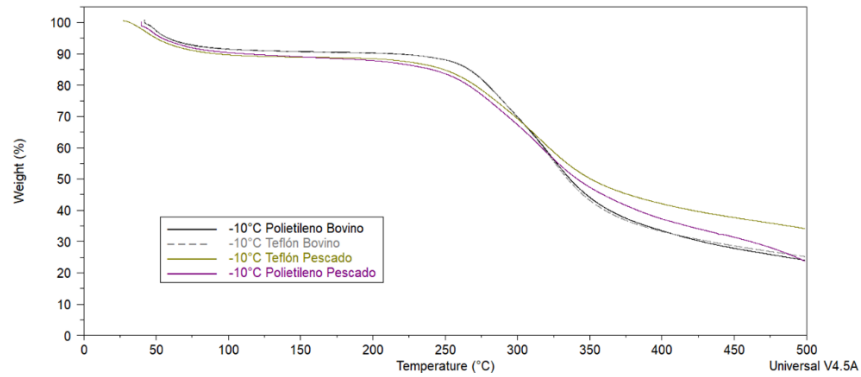


Figura 64. Termogramas de TGA para todas las membranas elaboradas con una temperatura de congelación de -10°C.

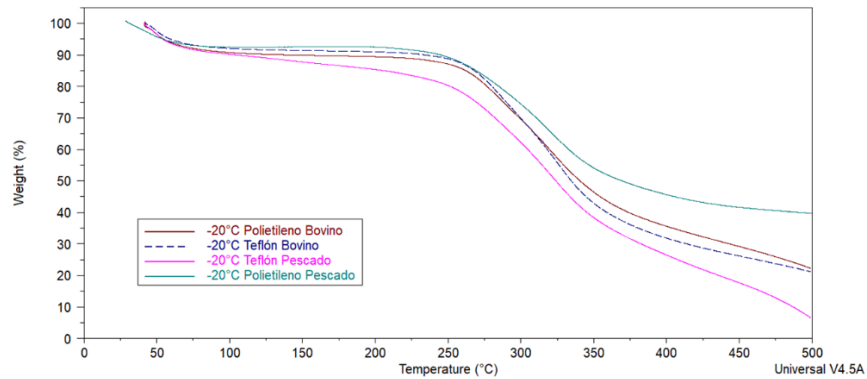


Figura 65. Termogramas de TGA para todas las membranas elaboradas con una temperatura de congelación de -20°C.

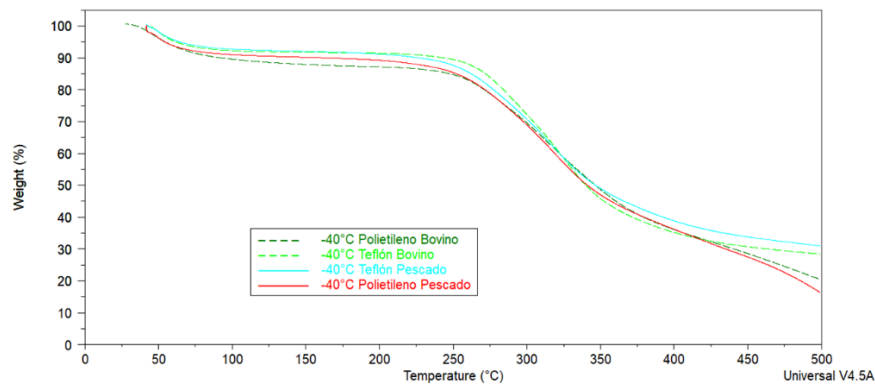


Figura 66. Termogramas de TGA para todas las membranas elaboradas con una temperatura de congelación de -40°C.

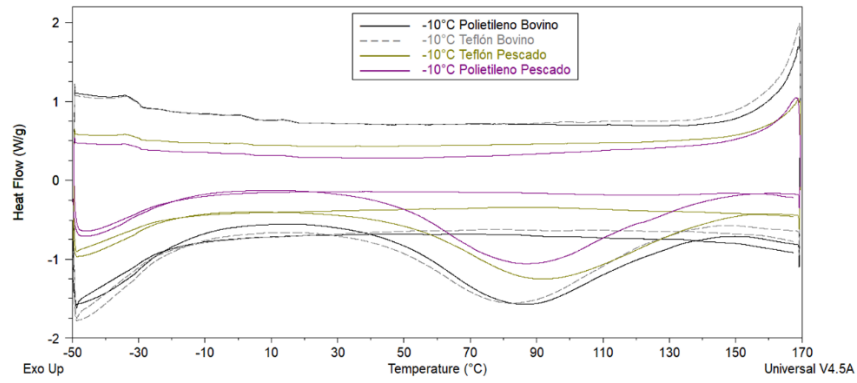


Figura 67. Termogramas de DSC para todas las membranas elaboradas con una temperatura de congelación de -10°C .

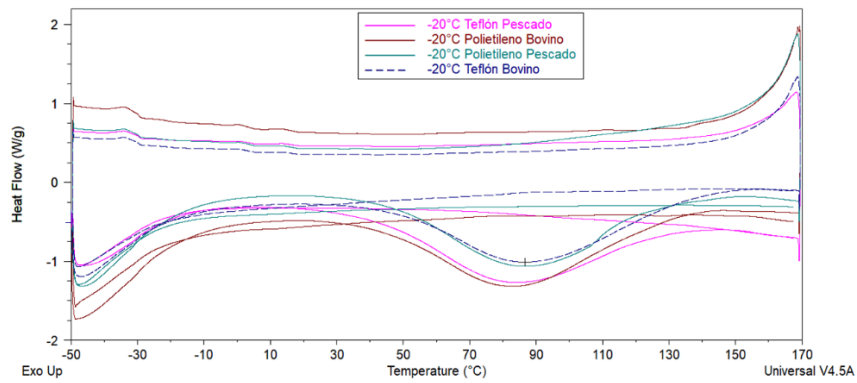


Figura 68. Termogramas DSC para todas las membranas elaboradas con una temperatura de congelación de -20°C .

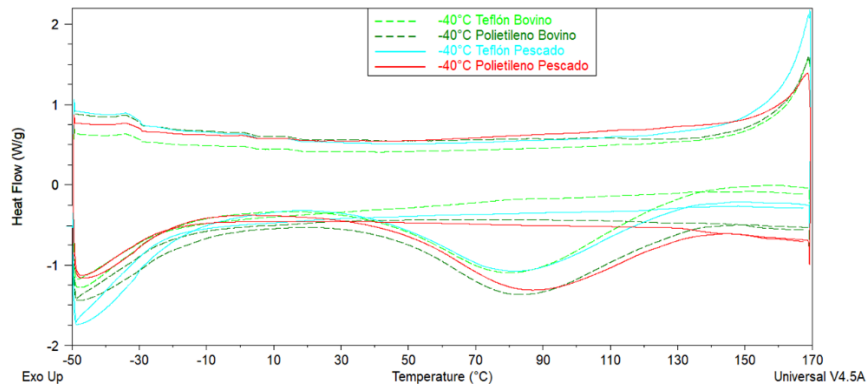


Figura 69. Termogramas DSC para todas las membranas elaboradas a una temperatura de congelación de -40°C .

9. Referencias

- [1] C. Ratiu, M. Brocks, T. Costea, L. Moldovan, y S. Cavalu, “PRGF-modified collagen membranes for guided bone regeneration: Spectroscopic, microscopic and nano-mechanical investigations”, *Appl. Sci.*, vol. 9, núm. 5, 2019.
- [2] V. Gómez Arcila, G. Benedetti Angulo, C. Castellar Mendoza, L. Fang Mercado, y A. Díaz Caballero, “Regeneración ósea guiada: nuevos avances en la terapéutica de los defectos óseos.”, *Rev. Cubana Estomatol.*, vol. 51, núm. 2, pp. 187–194, 2014.
- [3] J. O. Hollinger, *An Introduction to biomaterials*, Second., vol. 3, núm. February 2004. New York USA: CRC Press Taylor & Francis Group, 2012.
- [4] T. Huang *et al.*, “Fish gelatin modifications: A comprehensive review”, *Trends Food Sci. Technol.*, vol. 89, pp. 260–269, 2019.
- [5] L. Sbricoli, R. Guazzo, M. Annunziata, L. Gobbato, E. Bressan, y L. Nastri, “Selection of Collagen Membranes for Bone Regeneration: A Literature Review”, *Materials (Basel)*., vol. 13, núm. 3, p. 786, feb. 2020.
- [6] J. B. Park y J. D. Bronzino, *Biomaterials Principles and Applications*, vol. 4, núm. 1. USA: CRC Press LLC, 2003.
- [7] G. P. Anderson *et al.*, “Collagen Biosynthesis, Processing, and Maturation in Lung Ageing”, *Front. Med. | www.frontiersin.org*, vol. 1, p. 593874, 2021.
- [8] Y. Gao *et al.*, “Advances in Modification Methods Based on Biodegradable Membranes in Guided Bone/Tissue Regeneration: A Review”, 2022.
- [9] V. Perez-Puyana, M. Felix, A. Romero, y A. Guerrero, “Influence of the processing variables on the microstructure and properties of gelatin-based scaffolds by freeze-drying”, *Journal of Applied Polymer Science*, vol. 136, núm. 25. 2019.

- [10] J. C. Kasper y W. Friess, "The freezing step in lyophilization: Physico-chemical fundamentals, freezing methods and consequences on process performance and quality attributes of biopharmaceuticals", *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, vol. 78, núm. 2, pp. 248–263, 2011.
- [11] A. A. Karim y R. Bhat, "Fish gelatin: properties, challenges, and prospects as an alternative to mammalian gelatins", *Food Hydrocoll.*, vol. 23, núm. 3, pp. 563–576, may 2009.
- [12] P. Jaipan, A. Nguyen, y R. J. Narayan, "Gelatin-based hydrogels for biomedical applications", *Mater. Res. Soc. Commun.*, vol. 7, pp. 416–426, 2017.
- [13] Y. Liang, X. Luan, y X. Liu, "Recent advances in periodontal regeneration: A biomaterial perspective", *Bioact. Mater.*, vol. 5, núm. 2, pp. 297–308, jun. 2020.
- [14] C. B. Hungría, "Mantener sano tu periodonto", 2016. [En línea]. Disponible en: <https://www.clinicablancohungria.es/revision-periodonto-en-cordoba/>. [Consultado: 28-feb-2021].
- [15] A. Quintana-López, "¿Por qué necesito un injerto de hueso?", 2017. [En línea]. Disponible en: <http://www.arielquintana.es/2017/01/26/injerto-de-hueso/>. [Consultado: 28-feb-2021].
- [16] S. J. Nelson y M. M. Ash, *Wheeler Anatomía, fisiología y oclusión dental*, Novena Edi. España: Elsevier, 2010.
- [17] J. Lindhe, T. Karring, y M. Araújo, "Anatomía de los tejidos periodontales", en *Periodontología clínica e implantología odontológica*, Sexta., Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana, 2016, pp. 3–46.
- [18] A. P. Vargas-Casillas, B. R. Yáñez-Ocampo, y C. A. Monteagudo-Arrieta, *Periodontología e Implantología*. México: Editorial Médica Panamericana, 2016.
- [19] I. Fernández-Tresguerres Hernández-Gil, M. A. Alobera Gracia, M. del Canto

- Pingarrón, y L. Blanco Jerez, “Bases fisiológicas de la regeneración ósea II: El proceso de remodelado”, *Med. Oral Patol. Oral Cir. Bucal*, vol. 11, núm. 2, pp. 151–157, 2006.
- [20] D. Suarez, “Principios básicos en regeneración ósea guiada.”, *Acta Bioclínica*, vol. 2, núm. 3, pp. 89–116, 2012.
- [21] C. López-Soto, “¿Qué sucede cuando se pierde un diente?”, 2019. [En línea]. Disponible en: <https://clincasmilodon.com/que-sucede-cuando-se-pierde-diente/>. [Consultado: 27-mar-2021].
- [22] Universidad Peruana Cayetano Heredia, “Diagnóstico de enfermedades bucales prevalentes”. [En línea]. Disponible en: <https://sites.google.com/site/debpximena/interpretacion-radiologica-en-enfermedad-periodontal/evaluacion-radiologica/reabsorcion-osea-por-grados>. [Consultado: 27-mar-2021].
- [23] Procini periodontics, “Procedimiento para aplicar ROG en una herida alveolar”, 2012. [En línea]. Disponible en: <http://www.procini.com/images/gbr.jpg>. [Consultado: 12-feb-2021].
- [24] E. Fernández-Bodereau *et al.*, “Comparison of different bone filling materials and resorbable membranes by means of micro-tomography. A preliminary study in Rabbits”, *Materials (Basel)*, vol. 12, núm. 8, 2019.
- [25] G. Navarro-Boto, “Dental Navarro odontología avanzada”, *Regeneración ósea guiada (Guided Bone Regeneration – GBR)*, 2020. [En línea]. Disponible en: <https://www.dentalnavarro.com/blog/regeneracion-osea-guiada-rog/>. [Consultado: 01-jun-2022].
- [26] J. J. El-Jawhari, K. Moisley, E. Jones, y P. V. Giannoudis, “A crosslinked collagen membrane versus a non-crosslinked bilayer collagen membrane for supporting osteogenic functions of human bone marrow-multipotent stromal cells”, *Eur. Cell. Mater.*, vol. 37, pp. 292–309, abr. 2019.
- [27] R. D. Valenzuela-Rojo, J. López-Cervantes, D. I. Sánchez-Machado, A. A.

- Escárcega-Galaz, y M. del R. Martínez-Macias, "Antibacterial, mechanical and physical properties of collagen - chitosan sponges from aquatic source", *Sustain. Chem. Pharm.*, vol. 15, núm. February, 2020.
- [28] D. J. Indrani, F. Lukitowati, y Y. Yulizar, "Preparation of Chitosan/Collagen Blend Membranes for Wound Dressing: A Study on FTIR Spectroscopy and Mechanical Properties", en *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering*, 2017, vol. 202, núm. 1.
- [29] S. Guo *et al.*, "Enhanced effects of electrospun collagen-chitosan nanofiber membranes on guided bone regeneration", *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.*, vol. 31, núm. 2, pp. 155–168, ene. 2020.
- [30] M. Ansarizadeh, S. Mashayekhan, y M. Saadatmand, "Fabrication, modeling and optimization of lyophilized advanced platelet rich fibrin in combination with collagen-chitosan as a guided bone regeneration membrane", *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 125, pp. 383–391, mar. 2019.
- [31] P. Gentile, V. Chiono, C. Tonda-Turo, A. M. Ferreira, y G. Ciardelli, "Polymeric membranes for guided bone regeneration", *Biotechnol. J.*, vol. 6, núm. 10, pp. 1187–1197, 2011.
- [32] J. Vargas, "Membranas de uso en regeneración ósea guiada", *Rev. Odontol. Vital*, vol. 1, núm. 24, pp. 35–42, 2016.
- [33] P. Raz, T. Brosh, G. Ronen, y H. Tal, "Tensile Properties of Three Selected Collagen Membranes", *Biomed Res. Int.*, vol. 2019, núm. ID 5163603, pp. 1–8, dic. 2019.
- [34] D. M. Bernales, F. Caride, A. Lewis, y L. Martin, "Membranas de colágeno polimerizado: consideraciones sobre su uso en técnicas de regeneración tisular y ósea guiadas.", *Rev. Cuba. Investig. Biomédicas*, vol. 23, núm. 2, pp. 65–74, 2004.
- [35] J. Jiménez Garcia, S. Berghezan, J. M. M. Caramês, M. M. Dard, y D. N. S. Marques, "Effect of cross-linked vs non-cross-linked collagen membranes on

bone: A systematic review”, *Journal of Periodontal Research*, vol. 52, núm. 6. Blackwell Munksgaard, pp. 955–964, 01-dic-2017.

- [36] B. Wessing, S. Lettner, y W. Zechner, “Guided Bone Regeneration with Collagen Membranes and Particulate Graft Materials: A Systematic Review and Meta-Analysis”, *Int. J. Oral Maxillofac. Implants*, vol. 33, núm. 1, pp. 87–100, ene. 2018.
- [37] I. T. Todorov y W. Smith, *The DL-POLY Classic User Manual*, Version 1. United Kingdom: Daresbury Laboratory, 2012.
- [38] P. Bunyaratavej y H.-L. Wang, “Collagen Membranes: A Review”, *J. Periodontol.*, vol. 72, núm. 2, feb. 2001.
- [39] P. Locci *et al.*, “Phenotype Expression of Gingival Fibroblasts Cultured on Membranes Used in Guided Tissue Regeneration”, *J. Periodontol.*, vol. 68, núm. 9, pp. 857–863, sep. 1997.
- [40] C. P, P. A, B. S, T. P, F. G, y C. S, “Bone regeneration guided by resorbable collagen membranes in rabbits”, *Implant Dentistry*, vol. 2, núm. 2. p. 134, 1993.
- [41] J. J. El-Jawhari, K. Moisley, E. Jones, y P. V. Giannoudis, “A crosslinked collagen membrane versus a non-crosslinked bilayer collagen membrane for supporting osteogenic functions of human bone marrow-multipotent stromal cells”, *Eur. Cell. Mater.*, vol. 37, pp. 292–309, 2019.
- [42] Y. Y. Ha, Y. W. Park, H. Y. Kweon, Y. Y. Jo, y S. G. Kim, “Comparison of the physical properties and in vivo bioactivities of silkworm-cocoon-derived silk membrane, collagen membrane, and polytetrafluoroethylene membrane for guided bone regeneration”, *Macromol. Res.*, vol. 22, núm. 9, pp. 1018–1023, 2014.
- [43] Y. Cai *et al.*, “Silk fibroin membrane used for guided bone tissue regeneration”, *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 70, pp. 148–154, ene. 2017.
- [44] Z. Sheikh *et al.*, “Collagen based barrier membranes for periodontal guided

- bone regeneration applications”, *Odontology*, vol. 105, núm. 1, ene. 2017.
- [45] T. Maurer *et al.*, “Structural characterization of four different naturally occurring porcine collagen membranes suitable for medical applications”, *PLoS One*, vol. 13, núm. 10, pp. 1–17, 2018.
- [46] X. Cheng y F. Yang, “More Than Just a Barrier—Challenges in the Development of Guided Bone Regeneration Membranes”, *Matter*, vol. 1, núm. 3, pp. 558–560, sep. 2019.
- [47] P. Gentile, V. Chiono, C. Tonda-Turo, A. M. Ferreira, y G. Ciardelli, “Polymeric membranes for guided bone regeneration”, *Biotechnol. J.*, vol. 6, núm. 10, pp. 1187–1197, oct. 2011.
- [48] S. N. Park, J. C. Park, H. O. Kim, M. J. Song, y H. Suh, “Characterization of porous collagen/hyaluronic acid scaffold modified by 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide cross-linking”, *Biomaterials*, vol. 23, núm. 4, pp. 1205–1212, 2002.
- [49] X. Zhang, X. Cai, H. Zhao, Z. Jin, y M. Hu, “The preparation of PLA/PLGA composite membrane and its application as periodontal barrier membrane”, en *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 2020, vol. 453, núm. 1.
- [50] P. Chen *et al.*, “Fabrication of a silver nanoparticle-coated collagen membrane with anti-bacterial and anti-inflammatory activities for guided bone regeneration”, *Biomed. Mater.*, vol. 13, núm. 6, 2018.
- [51] C. Ratiu, M. Brocks, T. Costea, L. Moldovan, y S. Cavalu, “PRGF-modified collagen membranes for guided bone regeneration: Spectroscopic, microscopic and nano-mechanical investigations”, *Appl. Sci.*, vol. 9, núm. 5, 2019.
- [52] J. Wang *et al.*, “Fabrication of collagen membranes with different intrafibrillar mineralization degree as a potential use for GBR”, *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 104, núm. March 2018, 2019.

- [53] S.-T. Liu, S.-C. Chen, y W.-C. Hsu, "Mineralized collagen/bioceramic composite and manufacturing method thereof", US 2012/0207839 A1, 2012.
- [54] H.-E. Kim, H.-W. Kim, J.-H. Song, y S.-M. Chung, "Method for producing collagen/apatite composite membrane for guided bone regeneration", US 2012/0114763 A1, 2012.
- [55] I. V. Antoniac *et al.*, "In vitro characterization of novel nanostructured collagen-hydroxyapatite composite scaffolds doped with magnesium with improved biodegradation rate for hard tissue regeneration", *Bioact. Mater.*, vol. 6, núm. 10, pp. 3383–3395, oct. 2021.
- [56] M. G. Haugh, C. M. Murphy, y F. J. O'brien, "Novel Freeze-Drying Methods to Produce a Range of Collagen-Glycosaminoglycan Scaffolds with Tailored Mean Pore Sizes", *Tissue Eng. Part C Methods*, vol. 16, núm. 5, pp. 887–894, 2010.
- [57] W. P. Lu y Y. Guo, "Electrospinning of Collagen and Its Derivatives for Biomedical Applications", en *Novel Aspects of Nanofibers*, InTech, 2018.
- [58] W. Ji *et al.*, "Incorporation of stromal cell-derived factor-1 α in PCL/gelatin electrospun membranes for guided bone regeneration", *Biomaterials*, vol. 34, núm. 3, pp. 735–745, ene. 2013.
- [59] M. C. Bottino, V. Thomas, y G. M. Janowski, "A novel spatially designed and functionally graded electrospun membrane for periodontal regeneration", *Acta Biomater.*, vol. 7, núm. 1, pp. 216–224, ene. 2011.
- [60] E. A. Münchow *et al.*, "Development and characterization of novel ZnO-loaded electrospun membranes for periodontal regeneration", *Dent. Mater.*, vol. 31, núm. 9, pp. 1038–1051, sep. 2015.
- [61] L. Zhang *et al.*, "Potentials of sandwich-like chitosan/polycaprolactone/gelatin scaffolds for guided tissue regeneration membrane", *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 109, núm. 110618, 2020.
- [62] M. Alizadeh, F. Abbasi, A. B. Khoshfetrat, y H. Ghaleh, "Microstructure and

characteristic properties of gelatin/chitosan scaffold prepared by a combined freeze-drying/leaching method”, *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 33, núm. 7, pp. 3958–3967, oct. 2013.

- [63] D. E. López-Angulo y P. J. do Amaral-Sobral, “The Effect of Processing Parameters and Solid Concentration on the Microstructure and Pore Architecture of Gelatin-Chitosan Scaffolds Produced by Freeze-Drying”, *Mater. Res.*, vol. 19, núm. 4, pp. 839–845, jul. 2016.
- [64] I. J. Haung y Draget K.I., “Gelatin | Enhanced Reader”, en *Handbook of food proteins*, G.O. Phillips P.A. Williams, Ed. Woodhead Publishing Series, 2011, pp. 92–115.
- [65] D. L. Nelson y M. M. Cox, *Lehninger Principios de Bioquímica*, Quinta. Barcelona: Ediciones Omega, 2009.
- [66] Elsevier Connect, “Colágenos: tipos, composición, características y distribución en tejidos”, 2019. [En línea]. Disponible en: <https://www.elsevier.com/es-es/connect/medicina/colagenos-tipos-composicion-distribucion-tejidos>. [Consultado: 10-abr-2021].
- [67] R. A. Harvey y D. R. Ferrier, *Bioquímica*, Quinta. United States of America: Lippincott Williams & Wilkins, 2011.
- [68] F. A. Osorio, E. Bilbao, R. Bustos, y F. Alvarez, “Effects of Concentration, Bloom Degree, and pH on Gelatin Melting and Gelling Temperatures Using Small Amplitude Oscillatory Rheology”, *Int. J. Food Prop.*, vol. 10, núm. 4, pp. 841–851, oct. 2007.
- [69] J. Wang *et al.*, “Biodegradable Polymer Membranes Applied in Guided Bone/Tissue Regeneration: A Review”, 2016.
- [70] J. R. Velandia Cabra, “Identificación de polímeros por espectroscopía infrarroja”, *Rev. Ontare*, vol. 5, núm. February, pp. 0–25, 2017.
- [71] F. López-Serrano-Ramos y P. Mendizábal-Mijarez, Eduardo Ortega-Gudiño, *Introducción a la Ciencia de los Polímeros*, Primera. México: Universidad de

Guadalajara, 2015.

- [72] Douglas A. Skoog, F. J. Holler, y S. R. Crouch, *Principios de análisis instrumental*, Sexta edic. México: Cengage Learning, 2008.
- [73] B. D. Ratner, A. S. Hoffman, F. J. Schoen, y J. E. Lemons, Eds., *Biomaterials Science: an introduction to materials in medicine.*, Second. Oxford: Elsevier, 2004.
- [74] D. R. Askeland, *Ciencia e Ingeniería de los materiales*, Tercera ed. International Thomson Editores, 1998.
- [75] C. J. William D. y D. G. Rethwisch, *Materials Science and Engineering An Introduction*, 9th ed. United States of America: John Wiley & Sons, 2014.
- [76] G. Vázquez Nin y O. Echeverría, *Introducción a la microscopía electrónica aplicada a las ciencias biológicas*, Primera. México: Fondo de Cultura Económica / UNAM FC, 2000.
- [77] H. Hernandez y E. Espejo, *Mecánica de fractura y análisis de falla*. Colombia: Colección Sede, 2002.
- [78] D. G. de C. y de T. de I. y C. UNAM, D. Departamento de Visualización y Realidad Virtual (Observatorio Ixtli), y F. de M. Departamento de Biología Celular y Tisular, "Microscopio electrónico virtual", 2015. [En línea]. Disponible en: <https://ixtli.unam.mx/microscopio-electronico/>. [Consultado: 17-jun-2021].
- [79] B. Kronberg, K. Holmberg, y B. Lindman, *Surface Chemistry of Surfactants and Polymers*, First. Sweden: John Wiley & Sons, 2014.
- [80] M. J. Rosen y J. T. Kunjappu, *Surfactants and Interfacial Phenomena*, Fourth. New Jersey: John Wiley & Sons, 2012.
- [81] B. J. Zorzon y J. O. Vitti, "Desarrollo de un instrumento de medición de ángulo de contacto.", *Actas Jornadas y Eventos Académicos Univ. Tecnológica Nac.*, núm. 1, feb. 2019.

- [82] K. M. Pawelec, A. Husmann, S. M. Best, y R. E. Cameron, "Altering crystal growth and annealing in ice-templated scaffolds", *J. Mater. Sci.*, vol. 50, núm. 23, pp. 7537–7543, 2015.
- [83] C. M. Brougham *et al.*, "Freeze-Drying as a Novel Biofabrication Method for Achieving a Controlled Microarchitecture within Large, Complex Natural Biomaterial Scaffolds", *Adv. Healthc. Mater.*, vol. 6, núm. 21, p. 1700598, nov. 2017.
- [84] E. Suesca, A. M. A. Dias, M. E. M. Braga, H. C. de Sousa, y M. R. Fontanilla, "Multifactor analysis on the effect of collagen concentration, cross-linking and fiber/pore orientation on chemical, microstructural, mechanical and biological properties of collagen type I scaffolds", *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 77, pp. 333–341, ago. 2017.
- [85] N. Arabi y A. Zamanian, "Effect of cooling rate and gelatin concentration on the microstructural and mechanical properties of ice template gelatin scaffolds", *Biotechnol. Appl. Biochem.*, vol. 60, núm. 6, pp. 573–579, nov. 2013.
- [86] Robert M. Silverstein, Francis X. Webster, y David Kiemle, *Spectrometric Identification of Organic Compounds, Seventh Edition*, Seventh. United States of America: John Wiley & Sons, 2005.
- [87] X. Liu *et al.*, "A biodegradable multifunctional nanofibrous membrane for periodontal tissue regeneration", *Acta Biomater.*, vol. 108, pp. 207–222, 2020.
- [88] M.-L. Del-Prado-Audelo *et al.*, "Development of collagen-EDC scaffolds for skin tissue engineering : physicochemical and biological characterization", *Int. J. Eng. Res. Sci.*, vol. 2, núm. 4, pp. 73–83, 2016.
- [89] S. A. Poursamar, A. N. Lehner, M. Azami, S. Ebrahimi-Barough, A. Samadikuchaksaraei, y A. P. M. Antunes, "The effects of crosslinkers on physical, mechanical, and cytotoxic properties of gelatin sponge prepared via in-situ gas foaming method as a tissue engineering scaffold", *Mater. Sci.*

Eng. C, vol. 63, pp. 1–9, 2016.

- [90] R. D. Valenzuela-Rojo, J. López-Cervantes, D. I. Sánchez-Machado, A. A. Escárcega-Galaz, y M. del R. Martínez-Macias, “Antibacterial, mechanical and physical properties of collagen - chitosan sponges from aquatic source”, *Sustain. Chem. Pharm.*, vol. 15, mar. 2020.
- [91] J. Brandrup, E. H. Immergut, y E. A. Grulke, *Polymer Handbook*, Fourth. USA: John Wiley, 1998.
- [92] J. Mihály *et al.*, “FTIR and FT-Raman spectroscopic study on polymer based high pressure digestion vessels”, *Croat. Chem. Acta*, vol. 79, núm. 3, pp. 497–501, 2006.
- [93] H. Wang *et al.*, “Grafting polytetrafluoroethylene micropowder via in situ electron beam irradiation-induced polymerization”, *Polymers (Basel)*, vol. 10, núm. 5, 2018.
- [94] M. A. Velasco, C. A. Narváez-Tovar, y D. A. Garzón-Alvarado, “Design, materials, and mechanobiology of biodegradable scaffolds for bone tissue engineering”, *Biomed Res. Int.*, vol. 2015, 2015.
- [95] Q. Lu, X. Zhang, X. Hu, y D. L. Kaplan, “Green process to prepare silk fibroin/gelatin biomaterial scaffolds”, *Macromol. Biosci.*, vol. 10, núm. 3, pp. 289–298, 2010.
- [96] L. Yang *et al.*, “Influence of lyophilization factors and gelatin concentration on pore structures of atelocollagen/gelatin sponge biomaterial”, *Dent. Mater. J.*, vol. 36, núm. 4, pp. 429–437, 2017.
- [97] M. Muhammad *et al.*, “Fabrication of Bio-Based Gelatin Sponge for Potential Use as A Functional Acellular Skin Substitute”, *Polymers (Basel)*, vol. 12, p. 2678, 2020.
- [98] J. J. Lim y M. H. Shamos, “Evaluation of Kinetic Parameters of Thermal Decomposition of Native Collagen by Thermogravimetric Analysis”, *Biopolymers*, vol. 13, pp. 1791–1807, 1974.

- [99] N. Benbettaïeb, T. Karbowiak, C. H. Brachais, y F. Debeaufort, "Impact of electron beam irradiation on fish gelatin film properties", *Food Chem.*, vol. 195, núm. 2016, pp. 11–18, 2016.
- [100] I. Mukherjee y M. Rosolen, "Thermal transitions of gelatin evaluated using DSC sample pans of various seal integrities", *J. Therm. Anal. Calorim.*, vol. 114, núm. 3, pp. 1161–1166, 2013.
- [101] M. S. Rahman, G. S. Al-Saidi, y N. Guizani, "Thermal characterisation of gelatin extracted from yellowfin tuna skin and commercial mammalian gelatin", *Food Chem.*, vol. 108, núm. 2, pp. 472–481, may 2008.
- [102] T. Instruments, "Conceptos básicos de los instrumentos y preparación de muestras.", *Estrategias de mejores datos*, 2022. [En línea]. Disponible en: <https://www.tainstruments.com/capacitacion/strategies-for-better-data/?lang=es>. [Consultado: 13-jun-2022].
- [103] S. Roy, A. T. Riga, y K. S. Alexander, "Experimental design aids the development of a differential scanning calorimetry standard test procedure for pharmaceuticals", *Thermochim. Acta*, vol. 392–393, pp. 399–404, 2002.
- [104] E. Ortolani, F. Quadrini, D. Bellisario, L. Santo, A. Polimeni, y A. Santarsiero, "Mechanical qualification of collagen membranes used in dentistry", *Ann Ist Super Sanità*, vol. 51, núm. 3, pp. 229–235, 2015.
- [105] Amir A. Al-Munajjed, Matthias Hien, Richard Kujat, John P. Gleeson, y Joachim Hammer, "Influence of pore size on tensile strength, permeability and porosity of hyaluronan-collagen scaffolds", *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, vol. 19, pp. 2859–2864, 2008.
- [106] J. Tsibouklis y T. G. Nevell, "Ultra-low surface energy polymers: The molecular design requirements", *Adv. Mater.*, vol. 15, núm. 7–8, pp. 647–650, abr. 2003.