



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS MÉDICAS ODONTOLÓGICAS Y DE LA SALUD

**“CARACTERIZACIÓN FÍSICO-QUÍMICA DE LAS
MEMBRANAS DE COLÁGENA DE ORIGEN ÓSEO”**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA:
M.V.Z. BENJAMÍN HERMINIO LEON MANCILLA

TUTORES PRINCIPALES

DRA. MARÍA CRISTINA PIÑA BARBA, IIM
DR. MIGUEL ÁNGEL ARAIZA TÉLLEZ, Facultad de Odontología

MÉXICO D.F. SEPTIEMBRE 2013



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

DECLARATORIA LEGAL

Cualquier tesis no publicada postulando para el grado de Maestría y depositada en la biblioteca de la Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Odontología, queda abierta para la inspección, y sólo podrá ser usada con la debida autorización. Las referencias bibliográficas pueden ser tomadas pero ser copiadas sólo con el permiso del autor y el crédito se da posteriormente a la escritura y publicación del trabajo.

Esta tesis ha sido utilizada por las siguientes personas, que firman y aceptan las restricciones señaladas.

La biblioteca que presta esta tesis deberá asegurarse de recoger la firma de cada persona que la utilice.

NOMBRE	FIRMA	FECHA
_____	_____	_____
_____	_____	_____
_____	_____	_____
_____	_____	_____
_____	_____	_____
_____	_____	_____
_____	_____	_____
_____	_____	_____
_____	_____	_____
_____	_____	_____
_____	_____	_____
_____	_____	_____
_____	_____	_____
_____	_____	_____
_____	_____	_____
_____	_____	_____
_____	_____	_____
_____	_____	_____
_____	_____	_____
_____	_____	_____
_____	_____	_____
_____	_____	_____
_____	_____	_____
_____	_____	_____
_____	_____	_____

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo lo dedico a mi esposa *Silvia Pineda López* por toda la paciencia y tiempo cedido para la realización y culminación de un sueño más en mi formación profesional. Gracias por permitirme ser parte de su vida.

A mi hijo *Yael*, por darme tantas enseñanzas como padre. Por ser una persona extraordinaria que llena mi vida día con día. Gracias por permitirme vivir tantas cosas contigo.

A mi hijo *Per*, por ser mi gran amigo, que me ha permitido disfrutar todos sus sueños y anhelos, por darme fuerzas para continuar haciendo día con día más y mejores cosas.

A mi *Madre*, por darme la vida y ayudarme a crecer como persona. Por ser un ejemplo de esfuerzo, tenacidad, alegría y sobre todo lealtad.

A mi hermano *Alejandro*, aunque ya no está con nosotros, seguro le daría gusto este logro.

A mis hermanos *Ivonne y Miguel* y cuñados

A mis sobrinos que los quiero con todo mi corazón, esperando poder ser un buen ejemplo.

Aún soy muy joven, pero también para todos mis sobrinos nietos.

A mis cuñados *Quique, Miguel, Alvarito, Chowi, Roberto, Armando* y cuñadas *Liliana, Rosalinda, Elvira, Mónica y Miriam* que siempre han estado con nosotros en todo momento.

A mi **Universidad** por darme la oportunidad de continuar aprendiendo y sobre todo por darme el sustento para mi esposa e hijos. Muchas gracias

A la *Dra. María Cristina Piña Barba*, por darme su confianza y su gran apoyo para continuar con mi formación académica. Gracias por tantas enseñanzas y por todas las que me faltan por aprender.

Al *Dr. Miguel Ángel Araiza Téllez*, por confiar en mí, aún sin conocerme. Por enseñarme a superar los límites y continuar a pesar de las adversidades.

Al *Dr. Jesús Tapia Jurado*, Jefe del Departamento de Cirugía de la Facultad de Medicina de la UNAM por creer en mí proyecto y apoyarme para concluir satisfactoriamente mis estudios.

A todo el *Personal* del Departamento de Cirugía por todo su apoyo incondicional.

Al laboratorio *Biocriss SA de CV* por todas las experiencias que me permitió vivir y darme la oportunidad de continuar trabajando en ella. Mi agradecimiento por la donación de Nukbone.

División de Estudios de Posgrado e Investigación, Facultad de Odontología, UNAM.

- Al *Dr. Federico Barceló Santana* del Laboratorio de Biomateriales Dentales.
- A todo el *Personal Académico* del Laboratorio de Biomateriales Dentales.

Instituto de Investigaciones en Materiales, UNAM

- Al *Dr. Omar Novelo Peralta* del Laboratorio Universitario de Microscopía; *M. en C. Adriana Tejeda Cruz* del Laboratorio de Difracción de Rayos X ambos del Departamento de Metálicos y Cerámicos.
- Al *Q. Miguel Ángel Canseco Martínez* del Laboratorio de Pruebas Térmicas del Departamento de Polímeros.
- Al *Dr. Francisco Sánchez Arévalo* del Laboratorio de Pruebas Micromecánicas del Departamento de Reología y Mecánica de Materiales.

Facultad de Medicina, UNAM

- Al *I.C.E. Jorge García Loya, Enf. Carolina Baños Galeana* y a la *Q.F.B. Carmen Magdalena Peña Jiménez* del Departamento de Cirugía.
- Al *Dr. Armando Pérez Torres*, a la *histotecnóloga Verónica Rodríguez Mata*, a los *Biol. Armando Zepeda Rodríguez* y *Francisco Pasos Nájera* del Departamento de Biología Celular y Tisular.

Centro de Ciencias Aplicada y Desarrollo Tecnológico (CCADET), UNAM

- Al *Dr. José Ocotlán Flores Flores* y a la *I.Q. Viridiana Maturano Rojas* del Departamento de Tecnociencias. Grupo Académico: Materiales y Nanotecnología.

Glosario

Matriz: conjunto de materiales extracelulares que forman parte de un tejido (matriz mineralizada de hueso).

Membrana: lámina delgada de tejido orgánico, generalmente flexible y resistente; entre sus funciones están de recubrir un órgano o un conducto o la de separar o conectar dos cavidades o estructuras adyacentes.

Probeta: pieza sometida a diversos ensayos mecánicos y no mecánicos para estudiar la resistencia de un material.

Adsorbato: sustancia que se pega (adsorbe) en la superficie.

Adsorbente: superficie sobre la que sucede la adsorción.

Adsorción: fenómeno de acumulación de partículas sobre una superficie.

Desorción: proceso inverso de la adsorción.

Isoterma: relación en el equilibrio entre la cantidad de gas adsorbido y la presión del gas a temperatura constante.

MO: Matriz Ósea

MOD: Matriz Ósea Desmineralizada

MOp: Microscopía Óptica

MEB: Microscopía Electrónica de Barrido

ATG: Análisis Térmico Gravimétrico

CDB: Calorimetría Diferencial de Barrido

DRx: Difracción de Rayos X

RTG: Regeneración Tissular Guiada

ROG: Regeneración Ósea Guiada

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	3
CAPITULO 1. MARCO TEÓRICO	
Estado del Arte: Biomateriales	5
<i>El Hueso.</i>	6
<i>Microestructura del hueso.</i>	7
Materiales de Regeneración	
<i>Membranas no absorbibles.</i>	10
<i>Membranas absorbibles</i>	11
<i>Productos naturales.</i>	11
<i>Productos sintéticos.</i>	11
Técnicas de Caracterización	
<i>Microscopia Óptica</i>	13
<i>Histología</i>	14
<i>Microscopia Electrónica de Barrido (MEB)</i>	19
<i>Difracción de Rayos X</i>	21
<i>Espectroscopia Infrarroja (IR)</i>	23
<i>Métodos de Análisis Térmico</i>	25
<i>Calorimetría diferencial de barrido (CDB)</i>	30
<i>Determinación de área superficial por BET.</i>	33
<i>Determinación del tamaño de poros de la muestra.</i>	41
CAPÍTULO 2. METODOLOGÍA	
Planteamiento del problema	44
Justificación	44
Hipótesis	45
Objetivos	46
<i>Objetivo General</i>	46
<i>Objetivos Particulares</i>	46
CAPÍTULO 3. MATERIAL Y MÉTODO	
Recursos	
<i>Materiales empleados</i>	47
<i>Químicos</i>	47
<i>Biológicos</i>	47
<i>Equipos</i>	47
Financiamiento	
<i>Dirección General de Asuntos del Personal Académico, UNAM</i>	48
Método	
<i>Elaboración de MOD para estudios de caracterización.</i>	49

Obtención de muestras (probetas) para estudios de caracterización	50
Difracción de Rayos X	53
Espectroscopia Infrarroja	54
Adsorción de Nitrógeno (BET).....	55
CAPÍTULO 4. RESULTADOS y DISCUSIÓN	56
Técnica de Desmineralización	56
Microscopia	56
<i>Óptica (MOp)</i>	56
<i>Tinción Hematoxilina-Eosina</i>	56
<i>Tinción Tricrómica de Masson</i>	59
<i>Tinción de von Kossa</i>	62
<i>Luz polarizada</i>	65
Microscopía Electrónica de Barrido (MEB)	68
<i>Microscopia Electrónica de Barrido de la MO</i>	69
<i>Microscopia Electrónica de Barrido de la MOD</i>	72
Análisis químico elemental (EDS) de MOD.....	75
Difracción de Rayos X (DRX)	78
Espectroscopia Infrarroja (IR)	80
Análisis Térmico Gravimétrico (ATG)	83
Calorimetría Diferencial de Barrido (CDB)	86
Determinación de área superficial por BET	88
CAPÍTULO 5. CONCLUSIONES	92
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	93
Trabajos presentados en Eventos Académicos	98

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.- C6ndilo femoral	7
Figura 2.- Tinci6n H &-E de tejido 6seo.....	9
Figura 4.- F6rmulas qu6micas del PTFE, PGA y PLA	12
Figura 5.- Procesamiento de la matriz 6sea desmineralizada.....	14
Figura 6.- Concentraciones de alcoholes.....	15
Figura 7.- Efecto del polarizador en la orientaci6n de los rayos luminosos.....	18
Figura 8.- Luz polarizada del hueso. 100X	18
Figura 9.- Electrones y radiaci6n producida en una muestra debido a la incidencia de un haz electr6nico	19
Figura 10.- Componentes del MEB.....	20
Figura 11.- Ley de Bragg.....	21
Figura 12.- Tipos de vibraciones moleculares.....	23
Figura 13.- Esquema de un dise1no de termobalanza	26
Figura 14.- Sistema termogravim6trico t6pico con disposici6n de horno.....	27
Figura 15.- Esquema sobre la manipulaci6n de muestra para situarla en el interior del horno de la balanza termogravim6trica..	28
Figura 16.- Termogramas correspondientes a la descomposici6n de cinco pol6meros.	29
Figura 17.- Esquema de un aparato de DSC.....	31
Figura 18.- Acomodo at6mico de las superficies	33
Figura 19.- Defectos de las superficies.....	34
Figura 20.- Fisisorci6n de las mol6culas sobre la superficie.....	36
Figura 21.- Tipos de Isotermas. Tomada de: IUPAC.....	39
Figura 22.- Capilar.....	40
Figura 23.- M6todo de adsorci6n de N ₂ por el BET.....	42
Figura 24.- Agitador magn6tico.....	49
Figura 25.- Matriz 6sea desmineralizada.....	50
Figura 26.- Centro de inclusi6n de tejidos.....	50
Figura 27.- Microtomo Figura 28.- Montaje de muestra en laminillas.....	51
Figura 29.- Tren de tinci6n.....	51
Figura 30.- Portamuestras del difract6metro	53
Figura 31.- Probetas para espectroscopia Infrarroja.....	54
Figura 32.- Equipo de Adsorci6n de N ₂	55
Figura 33.- Cubos de MOD	55
Figura 34A.- Corte histol6gico de la MOD te1ido con H-E 100X.....	57
Figura 34B.- Corte histol6gico de la MOD te1idos con H-E 100X.	58
Figura 35A.- MOD te1ida con Tricr6mica de Masson 100X.....	60
Figura 35B.- Trab6culas de MOD te1ida con Tricr6mica de Masson 100X.....	61
Figura 35C.- MOD te1ida con Tricr6mica de Masson 100X.....	61

Figura 36 A.- MOD teñida con von Kossa observada a 10X.....	63
Figura 36 B.- MOD teñida con von Kossa. 40X.....	64
Figura 36 C.- MOD teñida con von Kossa. 100X.....	64
Figura 37A.- Vista panorámica de la MOD con luz polarizada 10X.....	65
Figura 37B.- Trabécula de la MOD 40X.....	66
Figura 37C.- Trabécula de la MOD 100X.....	66
Figura 38.- Disposiciones de las fibras de colágena.....	67
Figura 39A.- MEB de la MO 50X.....	69
Figura 39B.- MEB de la matriz ósea mineralizada. 100X.....	70
Figura 39B.- MEB de la MO 100X.....	70
Figura 39C.- MEB de la MO 250X.....	71
Figura 40A.- MEB de la MOD 50X.	73
Figura 40B.- SEM de la MOD 250X.....	73
Figura 40C.- MEB de la MOD 500X.....	74
Figura 41A.- MEB de la MOD 500X.	75
Figura 42A.- Elementos químicos identificados por EDS zona inorgánica de la MOD.....	77
Figura 42B.- Elementos químicos identificados por EDS zona orgánica de la MOD.....	77
Figura 43A.- Difractograma de la MO.....	78
Figura 43B.- Difractograma MOD.....	79
Figura 44.- Espectro IR de la MOD.....	81
Figura 45.- Espectro IR de la membrana COLLATAPE. Identificación de grupos amidas.....	81
Figura 46.-Espectro IR de la membrana ACE.....	82
Figura 47.-Termograma de la MO.....	84
Figura 48.-Termograma DSC de la MO.....	87
Figura 49A.- Isoterma de la MO.....	89
Figura 49B.- Isoterma de la MOD.....	89
Figura 50A-B.- MEB 50X. Mediciones de poros.....	91

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Barreras de colágena comercialmente disponibles.....	5
Tabla 2. Materiales en etapa de investigación.....	6
Tabla 5. Grupos amidas funcionales de colágena identificados por espectroscopia IR.....	24
Tabla 6. Elementos químicos identificados en la MOD.....	76
Tabla 7. Grupos funcionales del componente orgánico de la MOD.....	82
Tabla 8. Análisis termo gravimétrico de la MO y MOD.....	85
Tabla 9. Áreas superficiales y tipos de isothermas de la MO y MOD.....	90

RESUMEN

Los procesos de Regeneración Tisular Guiada (RTG) y de Regeneración Ósea Guiada (ROG) requieren el uso de membranas, estas deben ser biocompatibles, oclusivas y clínicamente manejables. Las membranas para la Regeneración Tisular pueden ser obtenidas de diferentes especies animales, entre las que se encuentran los porcinos, bovinos y equinos; empleando los tejidos de origen pericárdico, hueso, intestino, piel y tendón.

De los materiales de origen óseo utilizados en la clínica, se encuentran los tejidos desmineralizados, los cuales conservan su componente orgánico y porosidad, así como la interconexión de los poros, favoreciendo la invasión celular y la regeneración a través de la osteoinducción. El objetivo principal de este trabajo fue determinar las características físico-químicas de las matrices óseas desmineralizadas con ácido clorhídrico (HCl) al 0.5M, a través de diferentes técnicas de caracterización: Microscopía óptica (MOp), Microscopía Electrónica de Barrido (MEB), Análisis Termogravimétrico (ATG) Calorimetría Diferencial de Barrido (CDB), Difracción de Rayos X (DRx), espectroscopia Infrarroja (IR) y determinación del área superficial por absorción de N₂ (método BET). Los resultados obtenidos mostraron que la desmineralización de la matriz ósea empleando HCl no altero su estructura y conservó el componente orgánico que se identificó como colágena tipo I. La porosidad de la estructura se encontraba en un intervalo entre 100 y 500 μm , la cual no se modificó después de la desmineralización. Sin embargo, un cambio importante ocurrió en los valores del área superficial, ya que por el BET se determinó un incremento en el área superficial del 36.18% de la matriz desmineralizada ($7.34 \text{ m}^2/\text{g}$) con respecto a la matriz mineralizada ($5.39 \text{ m}^2/\text{g}$). La matriz desmineralizada fue analizada para conocer el componente orgánico a través de tinción de H&E, tricrómica de Masson, von Kossa y espectroscopia infrarroja. Esta matriz presenta características físicas y químicas apropiadas que pueden favorecer la RTG y ROG.

ABSTRACT

Processes guided tissue regeneration and guided bone regeneration requires the use of membranes to carry out this process, these membranes must be biocompatible, occlusive and clinically manageable. Membranes for Tissue Regeneration can be obtained from different animal species, among which are the pigs, cattle and horses, using source pericardial tissue, bone, intestine, skin and tendon.

In bone derived materials used in clinical materials are demineralized, which retains its organic component, its porosity and interconnecting pores, promoting regeneration and cell invasion through osteoinduction.

The main objective of this work was to determine the physico-chemical properties of demineralized bone matrix with hydrochloric acid (HCl) to 0.5M, through different characterization techniques: Optical Microscopy (OpM), Scanning Electron Microscopy (SEM), Thermogravimetric Analysis (TGA) Differential Scanning Calorimetry (DSC), X-ray diffraction (XRD), infrared spectroscopy (IR) and surface area determination by adsorption of N₂ (BET method). The results showed that the demineralization of bone matrix using HCl did not alter its structure and retained the organic component was identified as collagen type I. The porosity of the structure was in a range between 100 and 500µm, which was unchanged after demineralization. However, a significant change occurred in the surface area values as determined by BET increased the surface area of 36.18% demineralized matrix (7.34 m² / g) with respect to the mineralized matrix (5.39 m² / g). Demineralized matrix was analyzed to determine the organic component by H & E stain, Masson's trichrome, von Kossa and infrared spectroscopy. This matrix has appropriate physical and chemical characteristics that may favor the GTR and GBR.

INTRODUCCIÓN

Existen antecedentes históricos referentes al uso de materiales en Medicina para la reparación de tejidos perdidos o lesionados. Con el desarrollo de los primeros polímeros durante el siglo XX, se manufacturaron suturas quirúrgicas de origen natural y sintético, capaces de ser degradadas y absorbidas por el organismo. ⁽¹⁾

La interacción de diferentes disciplinas, llevó a la fusión y conceptualización de lo que actualmente conocemos como Ciencia de Materiales, es aquí donde se da el espacio y relación de las ciencias básicas con las ciencias aplicadas. Los materiales ahora se llegan a conocer a partir de sus interacciones con el medio (composición, textura, viscosidad, pH, etc.), además se puede determinar su desempeño cuando los ponemos en contacto con el tejido específico a tratar. En este contexto, surgen áreas del conocimiento científico enfocadas a evaluar la biocompatibilidad de los materiales con fines de regeneración tisular. ⁽¹⁾

Dentro de los materiales utilizados para la regeneración ósea, se encuentran las membranas de origen natural y sintético, las cuales actúan como barrera para poder llevar a cabo los procesos de diferenciación celular que concluyen en la regeneración, sobre todo en odontología en procesos que involucran la pérdida de los tejidos de soporte del órgano dentario por diversas causas, entre los que se encuentran procesos patológicos o traumáticos. ^(1;2)

La función de los materiales de regeneración empleados actualmente como barreras (membranas) permite la diferenciación selectiva de las células que constituyen el medio, de acuerdo al principio de “inhibición por contacto”, lo que se traduce en la exclusión de tejidos bucales con alta capacidad regenerativa, como es el epitelio gingival y favorecer la migración y diferenciación de células pluripotenciales en el sitio del defecto, por ejemplo: el hueso alveolar, cemento radicular y el ligamento periodontal. ⁽²⁾

Dentro de los materiales sintéticos que funcionan como barreras, se encuentra el politetrafluoretileno expandido (PTFE-e GoreTex[®]) en odontología se empezó a utilizar en

la regeneración periodontal y posteriormente en implantología para la Regeneración Ósea Guiada (ROG).⁽³⁾

Las barreras de origen natural, principalmente de colágena, han sido utilizadas debido a su compatibilidad, absorción y capacidad para promover la regeneración. Las membranas o barreras de colágena que en la actualidad se utilizan son de pericardio bovino, válvula aórtica porcina, duramadre, fascia lata, pericardio humano y las manufacturadas a través de procesos de electrodeposición.^(2; 3)

Urist en 1971 reportó la presencia de proteínas óseas morfogénicas (BMP's) en materiales descalcificados, que inducen la diferenciación de osteoblastos y condroblastos a partir de células mesenquimales.^(4; 5) La regeneración del tejido óseo es mucho más lenta que la mucosa, por lo que se han desarrollado biomateriales que favorecen la misma y la aíslan de las células epiteliales.^(2; 6)

Debido a que las membranas sintéticas frecuentemente se mueven (del sitio donde fueron originalmente colocadas) durante el proceso de formación ósea, se ha observado un alto riesgo de infección, además de la necesidad de realizar una segunda cirugía para su extracción una vez logrado el proceso de cicatrización, aumentando los tiempos de recuperación y costos del tratamiento. Por el contrario las barreras de colágena (membranas) absorbibles no requieren de una segunda intervención quirúrgica, e inclusive la degradación (absorción) puede ser hasta de 12 meses para defectos amplios donde se requiere que la separación de los tejidos sea más prolongada que en defectos menores.⁽⁷⁾

Hardwick et al⁽⁷⁾ resumieron en cinco puntos las características que deben reunir las barreras o membranas con fines regenerativos:

- 1.- Ser biocompatibles.
- 2.- Tener capacidad oclusiva para aislar el defecto óseo.
- 3.- Proveer de espacio adecuado para que ocurra la regeneración ósea.
- 4.- Capacidad de integrarse o unirse a los tejidos circundantes.
- 5.- Clínicamente manejables.

CAPITULO 1. MARCO TEÓRICO

Estado del Arte: *Biomateriales.*

La Sociedad Europea de Biomateriales, en septiembre de 1991, definió la palabra biomaterial exclusivamente para aquellos «materiales utilizados para evaluar, tratar, corregir o reemplazar cualquier tejido, órgano o función en el cuerpo humano». ^(8; 9)

Los biomateriales pueden tener origen sintético o natural, los cuales pueden ser modificados químicamente para estar en contacto e interactuar con el sistema biológico del organismo y favorecer la regeneración tisular.

Los materiales propuestos para favorecer la Regeneración Tisular (RT) deben ser completamente seguros para el paciente, garantizando su salud, por lo que es importante caracterizarlos química, física y biológicamente antes de ser empleados en la clínica.

Estos materiales tienen un amplio campo de aplicaciones clínicas; en odontología son empleadas en cirugía maxilo-facial, implantología y periodoncia, entre otras; así como en ortopedia, traumatología, cirugía plástica y reconstructiva, neurocirugía y en áreas como ingeniería de tejidos y medicina regenerativa.

En las siguientes tablas 1 y 2, se muestran las barreras de colágena actualmente disponibles para su uso en regeneración y algunas que se encuentran en etapa de investigación.

Tabla 1.- Barreras de colágena comercialmente disponibles

Nombre	Fabricante	Fuente	Componente principal
BioMend	Sulzer Calcitek, Carlsbad, CA.	Tendón de bovino	100% colágeno tipo I
Periogen	Collagen Inc., Palo Alto, CA.	Dermis de bovino	Colágeno tipos I y III
Paroguide	Coletica, Lyon, France.	Piel de temero	96% colágeno tipo I
Biosite	Coletica, Lyon, France.	Piel de temero	Colágeno e HA
BioGide	Geistlich, Wohlhusen, Switz.	Dermis de cerdo	Colágenos tipos I y III
Tissue guide	Koken Co., Tokyo, Japan.	Dermis y tendón de bovino	Atelocolágeno
SX-COL	Dr. Piaru, Israel.	Tendón y cola de rata	100% colágeno tipo I

Wang HL. ⁽⁵⁵⁾

Tabla 2.- Materiales en etapa de investigación

Nombre	Fabricante	Componente Principal
Periosteum	N/A	Colágeno
Connective tissue graft	N/A	Colágeno
Freeze-dried duramater	University of Miami Tissue Bank, Mi, FL.	Colágeno
Alloderm	Dentsply Implant., Encino, CA.	Matriz dermal acelular
Lambone	Pacific Coast Tissue Bank, Los Ang., CA.	Hojas de hueso líoofilizado
Grafton	Osteotech, Holmdel, NJ.	Aloinjerto gel
Cementum-impregnated gelatine membrabe	En desarrollo por Nishimura, Japan.	Partículas de cemento en gel de gelatina
Emdogain	Biora Inc., Chicago, IL.	Proteína de matriz de esmalte
Surgicel	Johnson&Johnson, Skillman, NJ.	Celulosa oxidada
Gelform	Upjohn Pharmaceuticals, Kalamazoo, MI.	Celulosa
Gengiflex	BioFill Productos Biotecnológicos, Brazil.	Celulosa alcaliza
Capset	Lifecore Biomedical, Curitiba, Brazil.	Sulfato de calcio
Hapset	Lifecore Biomedical, Curitiba, Brazil.	Sulfato de calcio y HA
Cargile membrane	Ethicon Inc., Somerville, NJ.	Intestino de buey
Elastin-fibrin matrix	Etkpatch, OVI SA., Martillac, France.	Elastina, fibrina, fibronectina y colágeno tipo I

Wang HL. ⁽⁵⁵⁾

El Hueso.

El hueso es un material compuesto y es la unidad básica del esqueleto, contiene el 99% de calcio del organismo, además cumple con cinco funciones principales que son: sostén, movimiento, homeostasis del calcio, transmisión de sonido y protección de órganos vitales como el cerebro, corazón y pulmones. ⁽¹⁰⁾

El componente principal del hueso es el tejido óseo, es un tejido conectivo denso muy especializado, posee cierta elasticidad, y al estar calcificado le proporciona rigidez y resistencia a la carga del cuerpo, aunque también son frágiles cuando recibe una carga excesiva en tensión o compresión. ⁽¹⁰⁾

Esta organizado macroscópicamente en tejido cortical (localizado en el exterior del hueso) (Fig. 1A) y esponjoso (localizado en el interior del hueso) (Fig. 1B); el primero se compone por láminas de hueso dispuestas en sistemas de osteonas o de Havers, mientras el segundo se conforma por trabéculas entre las cuales se encuentra la médula ósea.

A su vez, el hueso está cubierto por tejido conectivo laxo vascularizado junto con los osteoblastos y una capa externa fibrosa formando el periostio; mientras que interiormente se recubre por el endostio, una capa interna formada por células endósticas que recubre el espacio medular, los espacios de la sustancia esponjosa y los conductos de Havers y Volkmann.

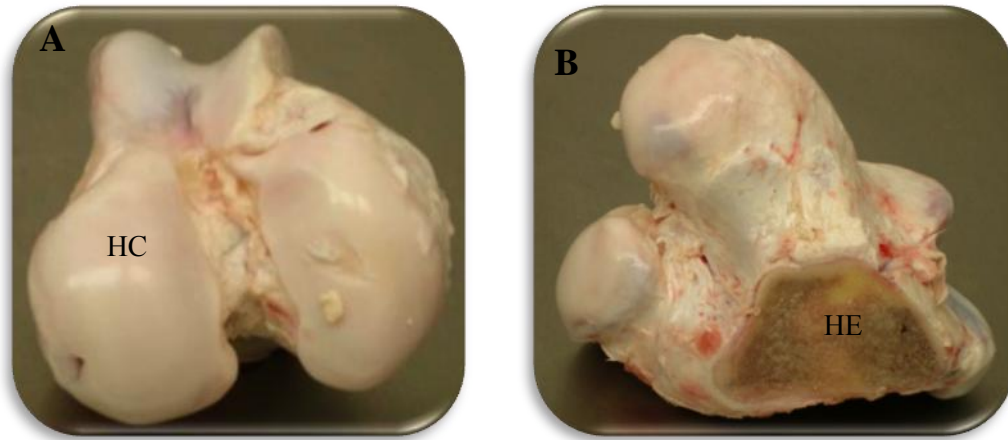


Figura 1A. C6ndilo femoral donde se observa el huso cortical (HC). 1B. C6ndilo femoral hueso esponjoso (HE).

Microestructura del hueso.

El hueso se considera un biomaterial compuesto, debido a que tiene una organizaci6n microsc6pica donde destacan diversos componentes: sustancia intracelular, matriz 6sea org6nica (pol6mero) e inorg6nica (cer6mica), c6lulas 6seas y factores solubles (factores de crecimiento, diferenciaci6n y Prote6nas 6seas Morfogendricas BMP's - por sus siglas en ingl6s).⁽¹¹⁾

La matriz 6sea est6 formada por una parte org6nica (35% del peso total) y una inorg6nica (65% del peso total). La matriz org6nica est6 constituida por fibras de col6gena, agua, electrolitos, prote6nas s6ricas como osteocalcina, osteopontina, osteonectina; mientras que la matriz inorg6nica o extracelular se compone principalmente por hidroxapatita, cuya f6rmula es $[Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2]$, la cual est6 6ntimamente relacionada con las fibras de col6gena y minerales como Ca^{2+} (99%), Mg^{2+} (40%), Na^{1+} (60%), P^{5+} (85%), K^{1+} , CO_3 y as6 como el citrato.^(10; 12)

Por otro lado, la matriz 6sea posee c6lulas con forma y funciones espec6ficas, entre las que se encuentran: c6lulas osteoprogenitoras, osteoblastos, osteocitos y osteoclastos. Los osteoblastos sintetizan la col6gena y la sustancia fundamental 6sea, tambi6n participan en la mineralizaci6n de la matriz org6nica produciendo ves6culas que acumulan Ca^{2+} , PO_4 , fosfatasa alcalina y pirofosfatasa favoreciendo la creaci6n de centros de dep6sito de las sales minerales. La relaci6n Ca/P del hueso en el humano es de 1.70. Un cierto n6mero de

osteoblastos quedan atrapados en las lagunas de la matriz, pasando a ser osteocitos. Los osteocitos están interconectados por un sistema de canaliculos aunque ya no excretan materiales de la matriz. Los osteocitos pasan por varias fases de maduración hasta que quedan completamente rodeados por la matriz y se mantienen en un estado de aparente reposo. Las células responsables de la resorción de la matriz ósea son los osteoclastos, que son células polinucleadas de gran tamaño que se localizan en las superficies óseas. Los osteoclastos se forman por la fusión de varias células mononucleares derivadas de una célula madre sanguínea de la médula ósea mostrando muchas propiedades de los macrófagos. ^(10; 13)

Para poder analizarse la matriz ósea desde el punto de vista histológico, la matriz del hueso esponjoso que es un tejido duro, debe desmineralizarse y posteriormente teñirse, en la cual se observa un comportamiento eosinofílico (Fig. 2), correspondiente a la matriz orgánica, constituida por colágena tipo I; por otro lado, el componente inorgánico, formado por hidroxiapatita, no presenta afinidad por ningún colorante de la tinción Hematoxilina-Eosina (H-E); así mismo se observan lagunas que son ocupadas por los osteocitos. Para resaltar las fibras de colágena tipo I se utiliza la tinción Tricrómica de Masson, donde la matriz orgánica (fibras de colágena) se observan de color azul; al igual que en la tinción H-E, se observan osteoblastos, representados por el número 1, localizados en la periferia de las trabéculas; las lagunas se encuentran ocupadas por los osteocitos, identificados por el número 2. (Fig. 3.)

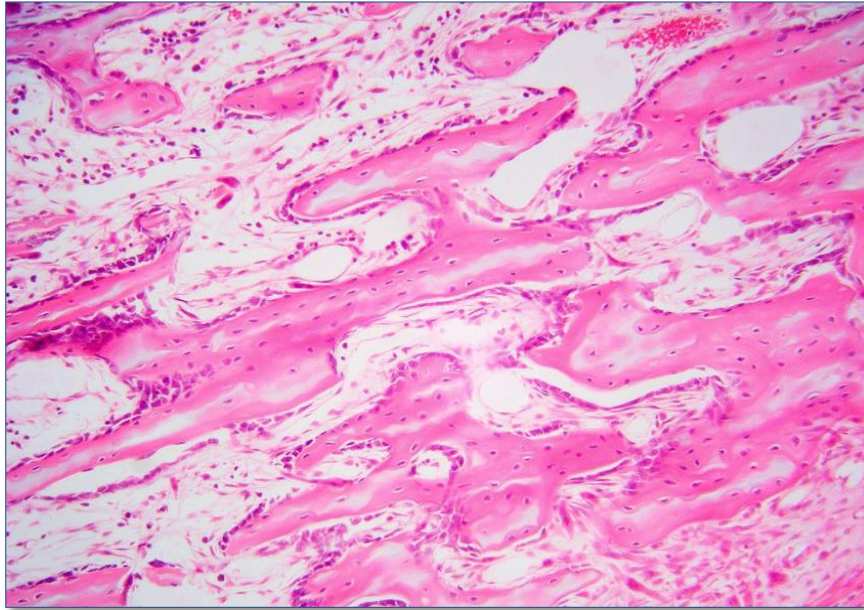


Figura 2. Tinción H &-E de tejido óseo.
(www.wesapiens.org/es/class)

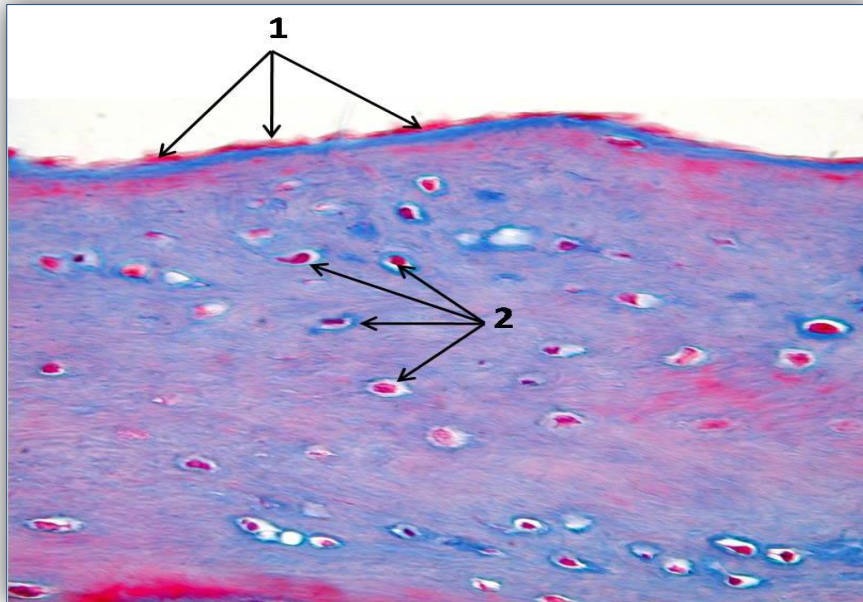


Figura 3. Tinción Tricrómica de Masson de hueso denso.
(www.wesapiens.org/es/class)

Materiales de Regeneración

El concepto de Regeneración Tisular Guiada (RTG) nace de la hipótesis originada por Melcher quien en 1976 sugirió que, dependiendo del fenotipo celular que produzca una repoblación de la superficie radicular después de la cirugía periodontal, se determinará el tipo de inserción que se formará; así, si las poblaciones celulares seleccionadas son las residentes en el ligamento periodontal, se podrá producir nuevo cemento, hueso alveolar y ligamento periodontal.⁽⁶⁾

Años más tarde Nyman, Karring, Lindhe y Plantén trabajaron en modelos animales (primates no humanos y perros) en los cuales evidenciaron diferentes respuestas tisulares con el uso de membranas colocadas en superficies radiculares, estableciendo los principios de la RTG.⁽¹⁴⁾ Este mismo grupo de trabajo, fue el primero en aplicar la técnica de RTG en humanos mediante la utilización de un filtro de acetato de celulosa (papel) millipore de laboratorio, el cual fue interpuesto entre el colgajo mucoperióstico y la superficie radicular tratada, con el objeto de promover la población de células del ligamento periodontal, para facilitar el proceso regenerativo. Esta fue la primera evidencia histológica en humanos de regeneración tisular en respuesta a la RTG. Actualmente la evidencia científica del potencial regenerativo de la RTG en humanos está bien documentada sobre la base de parámetros clínicos e histológicos.⁽¹⁵⁾

Membranas no absorbibles.

Fueron los primeros dispositivos diseñados para RTG y aprobados para su uso clínico. Mantienen su integridad estructural a través del tiempo, facilitando su estabilidad y completo control por parte del operador. La función de la membrana es temporal y, debido a su naturaleza, se requiere de un segundo acto quirúrgico para su remoción. Este segundo procedimiento lleva implícito un costo adicional, consumo de tiempo y la morbilidad asociada con cualquier cirugía.

Una amplia variedad de barreras para regeneración no absorbibles han sido estudiadas *in vitro* e *in vivo*, siendo aprobadas para su uso en el tratamiento de defectos periodontales humanos. La barrera no absorbible, que ha sido evaluada más extensamente en laboratorios

y en la práctica clínica, es la membrana de politetrafluoroetileno (PTFE) ⁽¹⁶⁾ y PTFE expandido (PTFE-e). ⁽¹⁷⁾

Membranas absorbibles

Son dispositivos que no requieren de una cirugía adicional para su remoción, esto reduce el riesgo de infección del sitio quirúrgico, disminuye el tiempo de regeneración y costo relacionado. Su control en el tiempo es limitado, principalmente en aplicaciones a largo plazo, esto debido a que el proceso de absorción depende del estado de salud del paciente. Los materiales absorbibles usados para procedimientos de RTG se pueden clasificar en dos grandes categorías: naturales y sintéticos ⁽⁶⁾

Productos naturales.

Una de las barreras absorbibles más utilizadas son las manufacturadas en base a la colágena, material con propiedades químicas, físicas y biológicas apropiadas para favorecer la regeneración. Biológicamente se caracteriza por su baja inmunogenicidad y elevada actividad tisular, actúa como hemostático, atrae y activa polimorfonucleares neutrófilos y fibroblastos, interactuando positivamente con los distintos tipos celulares durante la remodelación tisular y reparación de la herida periodontal. El potencial regenerativo de las membranas de colágena para RTG ha sido ampliamente evaluado en estudios preclínicos y clínicos. ^(6;7)

La colágena puede ser obtenida de diferentes tejidos, entre los que se encuentran el tendón, piel e incluso de hueso humano y bovino.

Las membranas de colágena obtenidas de tendón de cola de rata y tendón de Aquiles de bovino evidenciaron su capacidad regenerativa, su absorción se observó a las cuatro y ocho semanas respectivamente. ⁽⁶⁾

Productos sintéticos.

Las membranas absorbibles sintéticas diseñadas para uso médico son usualmente manufacturadas de polímeros alifáticos orgánicos termoplásticos. Las más utilizadas son los polímeros poli-a-hidroxiácidos, que incluyen al poli-ácido láctico (PLA), al poli-ácido glicólico (PLG) y su copolímero poli-ácido glicólico-láctico (PLGA) (Fig. 4). Una ventaja

de estos polímeros es su degradación por hidrólisis que da como resultado productos de descomposición que son principalmente metabolizados a CO_2 y H_2O .⁽⁶⁾

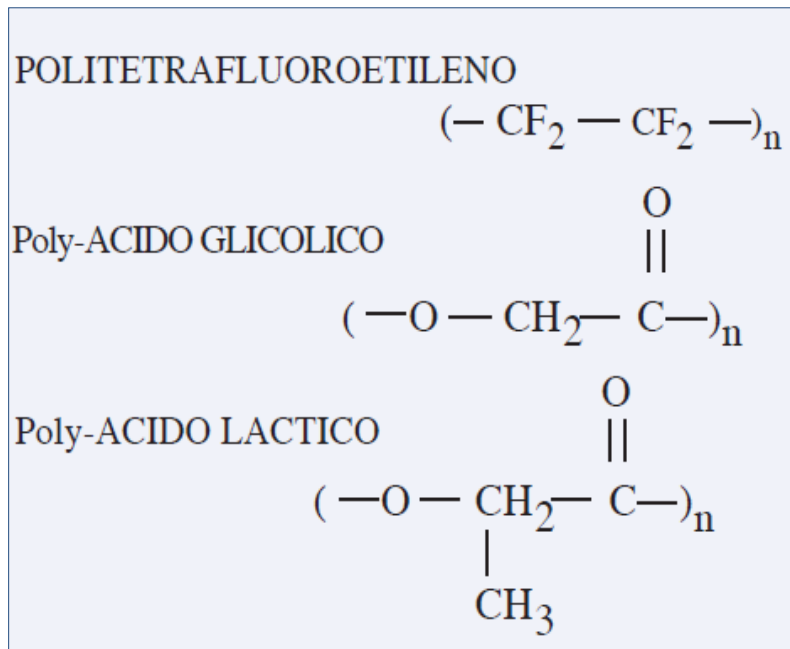


Figura 4. Fórmulas químicas del PTFE, PGA y PLA

Técnicas de Caracterización.

Son técnicas especializadas que permiten determinar las propiedades físicas, químicas y biológicas de un material, permitiendo predecir su comportamiento dentro del organismo una vez implantado.

En este capítulo se presentan las diferentes técnicas de caracterización físicas y químicas empleadas en la matriz ósea (MO) y en la matriz ósea desmineralizada (MOD)

Microscopia Óptica

El microscopio óptico es un aparato capaz de modular la energía luminosa. Debido a sus lentes puede aumentar muchas veces la imagen de un objeto. Este tipo de microscopio está formado por dos lentes principales; estos lentes están separados por un sistema tubular metálico con espejos o prismas en su interior que permiten desviar la luz en ángulos adecuados para agrandar los objetos. Ambas lentes pueden ampliar, en conjunto, más de 2000 veces una imagen. ⁽¹⁸⁾

En el microscopio óptico (MOp) se pueden distinguir tres grandes sistemas que, integrados, permiten una buena observación. ⁽¹⁸⁾

1. Sistema óptico. Formado por una serie de lentes de vidrio en los objetivos y oculares.
2. Sistema mecánico. Formado por una serie de engranes y botones que permiten realizar el movimiento y cambio de las lentes así como el enfoque de la preparación.
3. Sistema de iluminación. Este sistema corresponde a la fuente de luz y sus aditamentos para iluminar eficientemente la preparación.

Los principales aumentos (denominados con la letra X) que se manejan en los oculares y en los objetivos son los siguientes:

Oculares: 6.3X, 8X, 10X, 16X, 20X y 25X

Objetivos: 6.3X, 10X, 16X, 25X, 32X, 40X, 50X, 63X, 80X y 100X.

Histología

La palabra histología significa “el estudio del tejido” y se refiere al estudio del material y sus funciones por medio de microscopía; se estudia su estructura, organización y su disposición con respecto a los tejidos vecinos. ^(10; 19)

Los tejidos deben prepararse correctamente para ser analizados estructural y químicamente con la ayuda de instrumentos ópticos, en el caso de la MOp o electrónicos en el caso de la MEB. La serie de procesos que incluyen la técnica histológica son: fijación, deshidratación, inclusión, corte, tinción y montaje. (Fig. 5) ^(10; 19; 20)

Procesamiento de Muestras

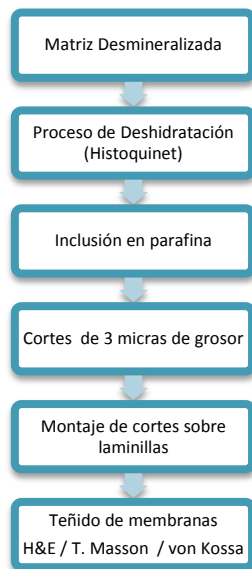


Figura 5. Procesamiento de la matriz ósea desmineralizada.

Fijación. El propósito de este procedimiento, es preservar la estructura y composición química de la célula y del tejido, lo más cercano a su estado vivo; en otras palabras, se trata de utilizar soluciones químicas que minimicen las alteraciones estructurales y químicas que normalmente se producen como consecuencia de la muerte celular. Además, la fijación tiene como finalidad proteger las estructuras celulares contra daños en los procedimientos posteriores (inclusión, corte y tinción). El tiempo aproximado empleado para la fijación de la MOD fue de 12 horas. ⁽²⁰⁾

Deshidratación. Previo a la inclusión en un medio determinado, que generalmente es insoluble en agua, los tejidos deben ser deshidratados. Para esto se introducen en una serie (batería) de alcoholes (Fig. 6) crecientes, como lo siguiente:

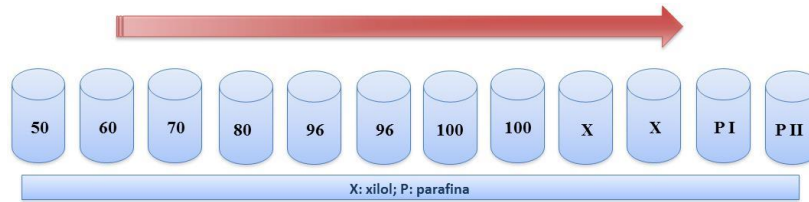


Figura 6. Concentraciones de alcoholes.

Inclusión. Los tejidos biológicos requieren técnicas especiales para ser seccionados en cortes finos, previo a su observación con MO ($\pm 10 \mu\text{m}$ de grosor) o con ME ($\pm 60 \text{ nm}$ de grosor). Para esto, los tejidos deben adquirir una consistencia adecuada, que se logra congelando los tejidos o incluyéndolos en una sustancia que reemplace el agua que contiene. Así, la inclusión es el procedimiento mediante el cual se introducen tejidos previamente fijados y deshidratados en medios líquidos o semifluidos que, al solidificarse, proporcionan al tejido una consistencia tal que permita ser cortado en láminas finas. Además, la inclusión permite que los tejidos puedan ser manipulados con facilidad y almacenarse por tiempo indeterminado. El tiempo empleado para la deshidratación y el paso por las diferentes concentraciones de alcoholes, xilol e inclusión es de 2 horas cada uno, haciendo un total de 24 horas. ⁽²⁰⁾

Corte. Una vez que el tejido embebido en la parafina endurece, se procede a realizar los cortes de 3-4 micras de grosor para facilitar el paso de la luz a través de la muestra. Tiempo empleado para esta etapa es de 10 minutos. ⁽²⁰⁾

Montaje. Para conservar las preparaciones por tiempo indefinido se utilizan resinas sintéticas o bálsamo de Canadá en las preparaciones deshidratadas. Todos estos métodos son hidrófobos, simplemente se coloca una gota de la resina sobre el portaobjetos y se deja caer el cubreobjetos cuidando de que no se formen burbujas; otra manera consiste en poner la gota de la resina sobre el cubreobjetos y sobreponer el portaobjetos. El tiempo empleado para esta etapa del proceso es de 10 minutos. ⁽²⁰⁾

Tinción. Actualmente la técnica histológica utiliza tinciones como método de coloración para distinguir las diferentes estructuras del tejido analizado. Es importante mencionar que dependiendo del tejido estudiado, se puede seleccionar el tipo de tinción para resaltar con mayor detalle las estructuras. Se emplean 30 minutos para cada una tinción Hematoxilina & Eosina, Tricrómica de Masson y von Kossa. ^(10; 21)

Las tinciones empleadas para observar el componente orgánico e inorgánico de la matriz ósea desmineralizada fueron Hematoxilina & Eosina, Tricrómica de Massón y von Kossa.

Tinción Hematoxilina-Eosina (H-E)

La tinción de Hematoxilina-Eosina emplea colorantes básicos que interactúan con estructuras basófilas o acidófilas de la matriz, entre las que se encuentran el hueso propiamente dicho (fase inorgánica) las poblaciones celulares como osteoblastos, osteocitos y osteoclastos y las lagunas óseas. Por el tipo de colorantes empleados con esta técnica, la matriz ósea orgánica se observa eosinófila (roja) debido a la presencia de colágena. ⁽²⁰⁾

Tinción Tricrómica de Masson

Las tinciones tricrómicas persiguen resaltar fibras de colágena del tejido conjuntivo, tiñendo además, el resto de las estructuras tisulares. Las tricrómicas contienen siempre un colorante nuclear y al menos dos colorantes aniónicos que se utilizan en asociación con una molécula de tipo heteropoliácido. Los dos heteropoliácidos usados en las tinciones tricrómicas son el ácido fosfomolibdico (PMA) y el ácido fosfotúngstico (PTA). El efecto de la asociación entre estos dos tipos de moléculas es la coloración selectiva de las fibras de colágena por uno de los colorantes aniónicos. El mecanismo de coloración selectivo de las fibras de colágena tiene un papel crítico en la acción de los heteropoliácidos PMA o PTA, ya que tienen la propiedad de unirse a proteínas y aminoácidos pero no a carbohidratos. ⁽²⁰⁾

Tinción de von Kossa

Esta técnica a menudo se designada como un método histoquímico para calcio, es un método para fosfatos y carbonatos, asociados a tejidos normalmente calcificados o patológicamente calcificados, pudiendo observar la localización precisa del material inorgánico (HA) en la muestra analizada. La reacción se lleva a cabo a la luz brillante, que

promueve la reducción a metal de iones de plata en los cristales de los fosfatos insolubles de plata y carbonato. ⁽²⁰⁾

Luz Polarizada

Esta técnica usa luz polarizada para iluminar la muestra, permite diferenciar detalles debido a las características isotrópicas y anisotrópicas de las estructuras del tejido estudiado.

Con esta técnica se usa luz polarizada (luz que vibra en un solo plano) para iluminar la muestra (Fig. 7). Permite diferenciar detalles debido a las características de las estructuras isotrópicas y anisotrópicas. Cuando se observan materiales celulares o tisulares llamados isotrópicos, los cuales tienen el mismo índice de refracción en todas direcciones (de manera que no modifican la luz polarizada que los atraviesa, cualquiera sea el plano de incidencia), se ven oscuros. Por el contrario, las estructuras anisotrópicas, como las sustancias cristalinas y las moléculas fibrosas orientadas en forma ordenada, modifican el plano de luz polarizada (la velocidad de propagación de la misma varía según la dirección que se considere) y envían rayos luminosos a través del analizador. Estas estructuras aparecen brillantes, con colores que se deben principalmente a las interferencias producidas por diferencias en el espesor de las preparaciones. ⁽²⁰⁾

Los materiales anisotrópicos se denominan también birrefringentes, porque tienen dos índices de refracción distintos, de acuerdo a la dirección de incidencia de la luz. Este tipo de microscopio permite estudiar tejidos duros como hueso y diente (Fig. 8) y estructuras que tengan simetría lineal (tejido muscular, fibras de algodón) y la presencia o deposición de colágena. ⁽²⁰⁾

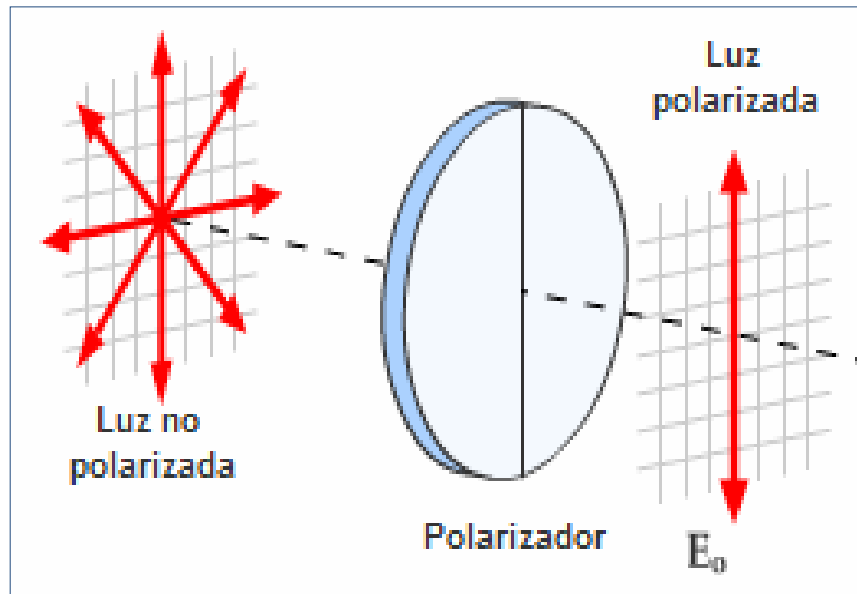


Figura 7. Efecto del polarizador en la orientación de los rayos luminosos.

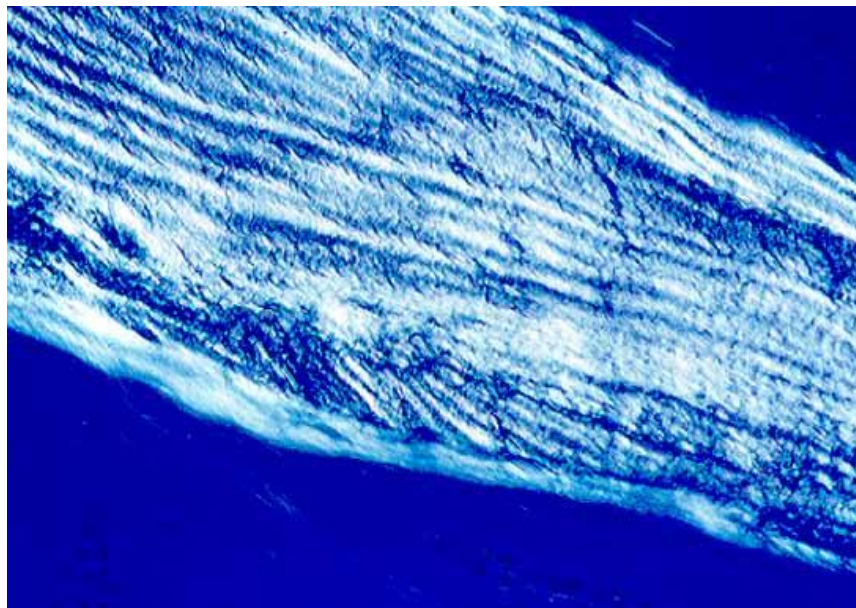


Figura 8. Luz polarizada del hueso. 100X

Microscopia Electrónica de Barrido (MEB)

La microscopia electrónica de barrido (Scanning Electron Microscopy (SEM) por sus siglas en inglés) es una técnica empleada para el estudio de las características superficiales de un material y en particular de materiales porosos. La resolución de este instrumento, va de 10X hasta 180 000X, hace que se puedan observar rasgos muy pequeños e irregulares, los cuales no se pueden analizar bajo el microscopio óptico. ⁽²¹⁾

El principio físico del MEB se basa cuando el haz choca con la superficie de la muestra, algunos electrones son reflejados como retrodispersados (Back Scattered Electrons (BSE)) y otros se liberan como electrones secundarios de baja energía (Secondary Electrons (SE)) como se muestra en la siguiente figura.

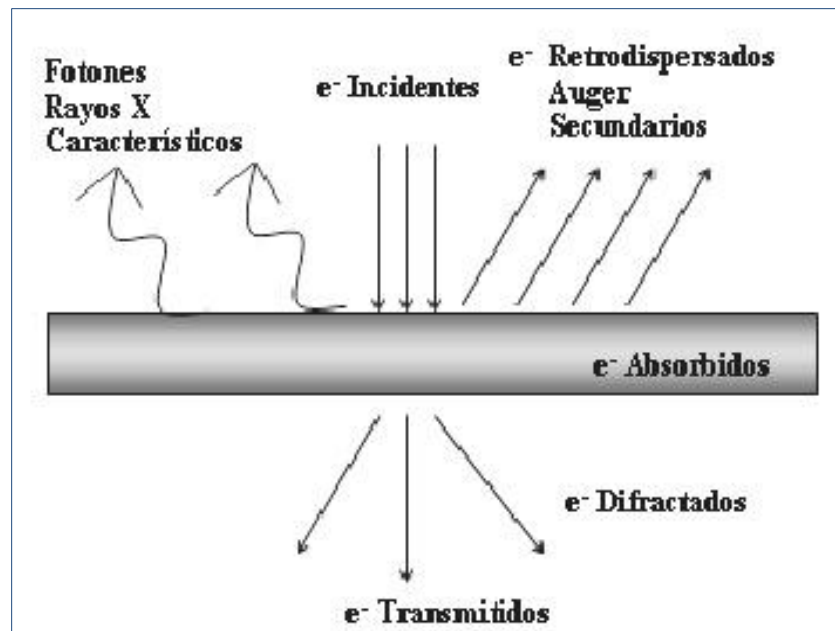


Figura 9. Electrones y radiación producida en una muestra debido a la incidencia de un haz electrónico

Además de los dos tipos de imágenes que se pueden obtener (BSE y SE), el impacto del haz de electrones con la muestra genera rayos X que se pueden utilizar para realizar microanálisis de los componentes de la muestra. Cuando los electrones del haz chocan con los electrones de las capas más internas de los átomos de la muestra, los saltos electrónicos de los electrones de las capas más externas a las internas provocan una radiación de rayos X característica de los átomos irradiados. La radiación pasa por un detector y la señal

mente dispersados por el aire a presión atmosférica. Dos o tres lentes condensadoras disminuyen el tamaño del haz hasta lograr un haz electrónico de sección transversal pequeña y de alta energía. El fino haz de electrones es entonces barrido de un lado a otro de la muestra utilizando bobinas de barrido mientras un detector cuenta el número de electrones secundarios de baja energía o cualquier otra radiación, que proviene de cada punto de la superficie. (22)

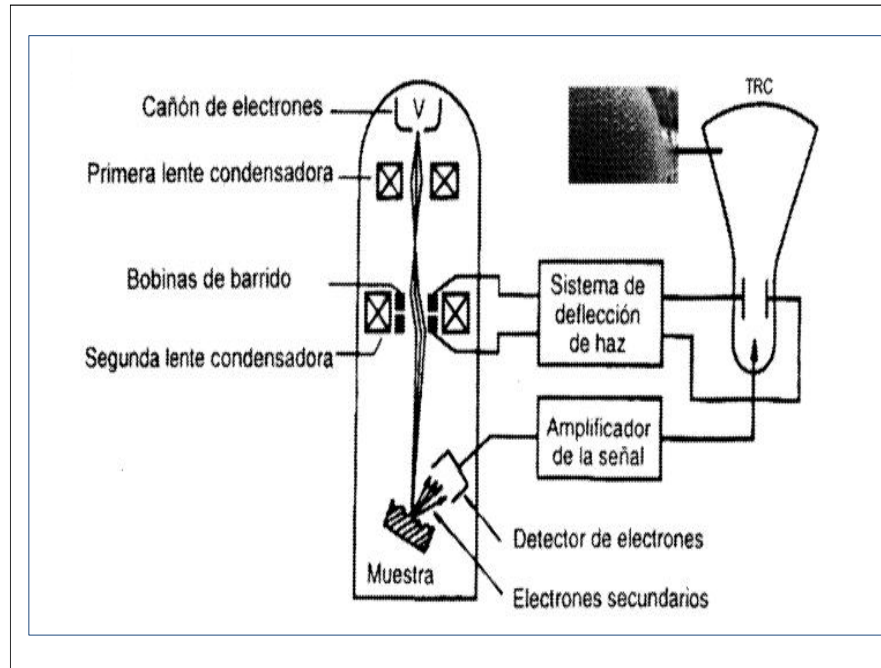


Figura 10. Componentes del MEB. Tomada de: Arenas AJ. Electroquímica y Electroanálisis. Figura 17.13. Esquema mostrando los componentes más importantes de un microscopio electrónico de barrido (SEM).

Instrumentación.

Montaje de las muestras: las muestras desecadas se colocan en soportes de aluminio especialmente diseñados para MEB usando como adherente sustancias conductoras como la plata coloidal. Es importante reiterar que en esta fase del proceso la manipulación de la muestra suele ser extremadamente cuidadosa evitando dañar o manchar la superficie a observar. (22)

Los electrones son colectados por medio de detectores apropiados y son utilizados para modular la polarización de la rejilla de un tubo de rayos catódicos (TRC). De esta manera se establece una correspondencia 1:1 entre la cantidad de electrones detectada y la intensidad del punto de iluminación (*contraste*) correspondiente en la pantalla del TRC.

Recubrimiento: esta última fase consiste en proveer a las muestras de una superficie conductora de la electricidad y del calor que facilite el barrido, para lo cual es necesario usar carbón o metales pesados como oro, platino y aluminio. (22)

Difracción de Rayos X

La técnica de difracción de rayos X se fundamenta en la incidencia, con un determinado ángulo θ , de un haz de rayos X sobre una muestra plana. Al incidir en el material, parte de este haz se dispersa en todas las direcciones a causa de los electrones asociados a los átomos o iones que encuentra en el trayecto. Sin embargo, el resto del haz puede dar lugar al fenómeno de difracción de rayos X, que tiene lugar si existe una disposición ordenada de átomos y si se cumplen las condiciones establecidas por la Ley de Bragg.⁽²³⁾

Ley de Bragg

Cuando un haz de rayos X choca contra la superficie de un cristal formando un ángulo θ , una porción del haz es difundida por la capa de átomo de la superficie. La porción del haz no dispersa penetra la segunda capa de átomo donde, de nuevo, una fracción es difundida, y la que queda pasa a la tercera capa, y así sucesivamente.⁽²³⁾

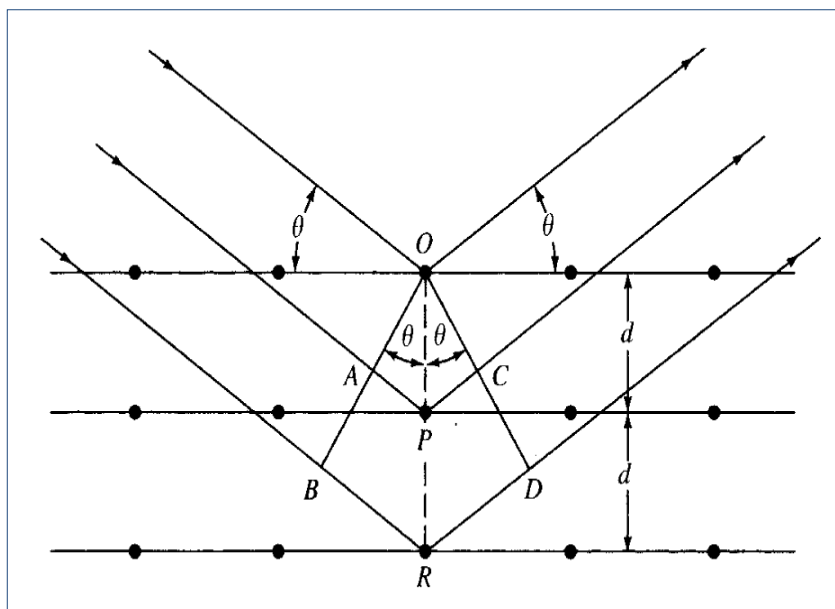


Figura 11. Ley de Bragg ($n\lambda=2d \text{ sen } \theta$). Tomada de: Skoog DA. Análisis Instrumental.

Instrumentación.

Existen diferentes técnicas para el estudio cristalográfico de los materiales, entre los que se encuentran: polvo fino (monocristal) y policristalinos.

Para estudios de difracción de rayos X, la muestra cristalina se muele hasta obtener un polvo fino homogéneo. De esta manera, el enorme número de pequeños cristales está orientado en todas las direcciones posibles; y por tanto, cuando un haz de rayos X atraviesa el material, se puede esperar que un número significativo de partículas esté orientado de tal manera que cumpla la condición de la Ley de Bragg para la reflexión de todos los espaciados interplanares posibles.⁽²³⁾

Espectroscopia Infrarroja (IR)

Debido a que la radiación infrarroja no tiene la suficiente energía para producir la clase de transiciones electrónicas que se encuentran entre las radiaciones ultravioleta y visible; la absorción de la radiación infrarroja se limita en gran parte a especies moleculares para las cuales existen pequeñas diferencias de energía entre los distintos estados vibracionales y rotacionales.⁽²³⁾

Tipos de vibraciones moleculares. Se distinguen dos categorías básicas de vibraciones: de estiramiento y deflexión. En una vibración de estiramiento hay un cambio continuo en la distancia interatómica a lo largo del eje del enlace entre dos átomos.⁽²³⁾

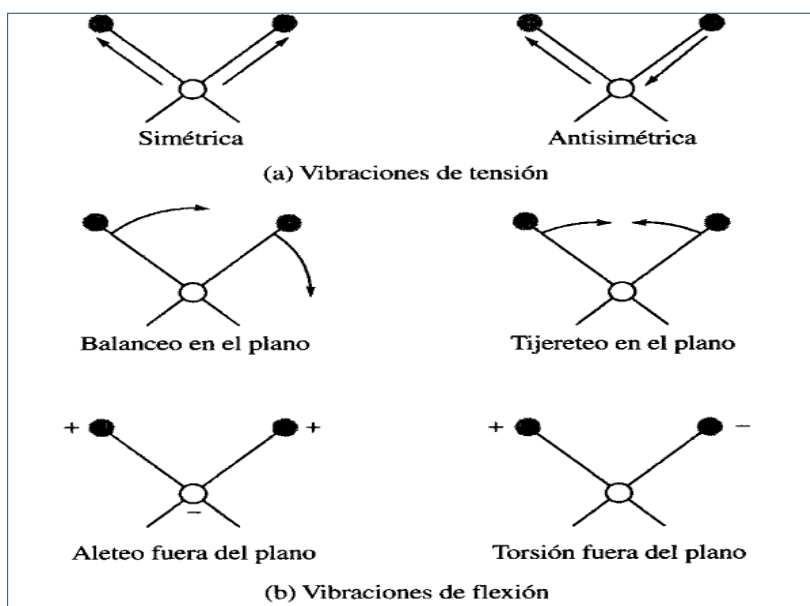


Figura 12. Tipos de vibraciones moleculares. Tomada de: Skoog DA. Análisis Instrumental

Las vibraciones de flexión se caracterizan por un cambio en el ángulo entre dos enlaces y son de cuatro tipos: de tijera, balanceo, aleteo y torsión. Las proteínas pueden ser caracterizadas a través de la espectroscopia infrarroja identificando las bandas correspondientes los grupos funcionales amidas.⁽²³⁾

A continuación se mencionan las amidas observadas en la colágena de origen tendinoso.

Tabla 5.- Grupos amidas funcionales de colágena identificados por espectroscopia IR

Grupo Funcional	IR (cm ⁻¹)
CH ₃	2956
CH ₂	2924
Amida I (C=O)	1650-1665
Amida II δ (N-H) + ν (C-N)	1530-1550
Amida III δ (N-H) + ν (C-N)	1239
Amida A (N-H)	3325-3330
Amida B (CH ₂)	3080
<i>Sionkowska A. Int J Biolog Macromol. 2012</i>	

Las aplicaciones de la espectroscopia en el infrarrojo se dividen en tres grandes categorías relacionadas con tres regiones espectrales. La región más ampliamente utilizada es la región del infrarrojo medio, que se extiende desde casi 670 hasta 4000 cm⁻¹ (2.5 y 14.9 μm). La región del infrarrojo cercano, comprendida entre 4000 y 14 000 cm⁻¹ (0.74 y 2.5 μm); y el infrarrojo lejano se encuentra entre 400 hasta 650 cm⁻¹ (15 a 1000 μm).⁽²³⁾

Métodos de Análisis Térmico

La definición generalmente aceptada de análisis térmico abarca al grupo de técnicas en las que se mide una propiedad física de un sistema (sustancia o un material) en función de la temperatura mientras se le somete a un programa de temperatura controlado. Se pueden distinguir más de una docena de métodos térmicos que difieren en las propiedades medidas y en los programas de temperatura. Estos métodos encuentran una amplia aplicación tanto en el control de calidad como en investigación de productos farmacéuticos, arcillas y minerales, metales y aleaciones, polímeros y plásticos. ⁽²⁴⁾

Instrumentación

Los instrumentos comerciales modernos empleados en termogravimetría constan de: i) una balanza analítica sensible; ii) un horno; iii) un sistema de gas de purga para proporcionar una atmósfera inerte (o algunas veces reactiva) y iv) un microprocesador/microordenador para el control del instrumento y la adquisición y visualización de datos. Además, existe la opción de añadir un sistema para cambiar el gas de purga en las aplicaciones en las que este gas debe cambiarse durante el experimento. ⁽²⁴⁾

Balanza

Son asequibles comercialmente diversos diseños de termobalanzas que son capaces de proporcionar información cuantitativa sobre muestras cuyas masas van desde 1g hasta 100g. Sin embargo, el tipo de balanza más común tiene tan sólo un intervalo entre 5 y 20mg. Si bien, el soporte de la muestra debe estar situado en el horno, el resto de la balanza debe estar aislado térmicamente del horno. La Figura 13 muestra el esquema de un diseño de termobalanza. Un cambio en la masa de la muestra provoca una desviación del brazo, que se interpone al paso de la luz entre una lámpara y uno de los dos fotodiodos. ⁽²⁴⁾

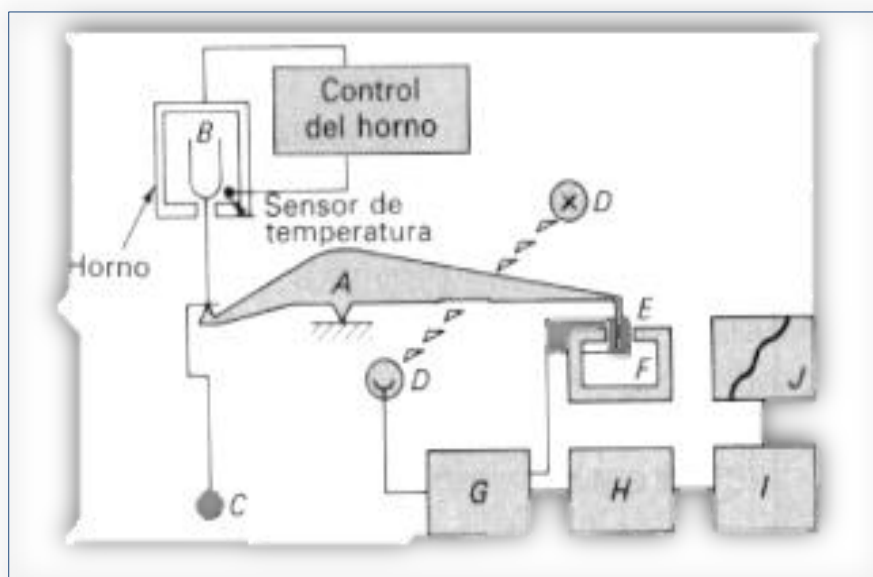


Figura13. Esquema de un diseño de termobalanza. Tomada de: Willard HB, et al. Métodos instrumentales de Análisis.

Horno

En la Figura 14 se muestra una serie de fotografías de un sistema termogravimétrico típico donde se observa la disposición del horno. El intervalo de temperaturas de la mayoría de los hornos que se usan en termogravimetría va desde la temperatura ambiente hasta 1500°C . A menudo se pueden variar las velocidades de calentamiento o enfriamiento del horno desde aproximadamente cero hasta valores tan elevados como $200^{\circ}\text{C}/\text{min}$. Para evitar la transferencia de calor a la balanza es necesario aislar y refrigerar el exterior del horno. Normalmente se utiliza nitrógeno y argón para purgar el horno y prevenir la oxidación de la muestra. En algunos análisis es deseable cambiar los gases de purga a lo largo del análisis.

(24)

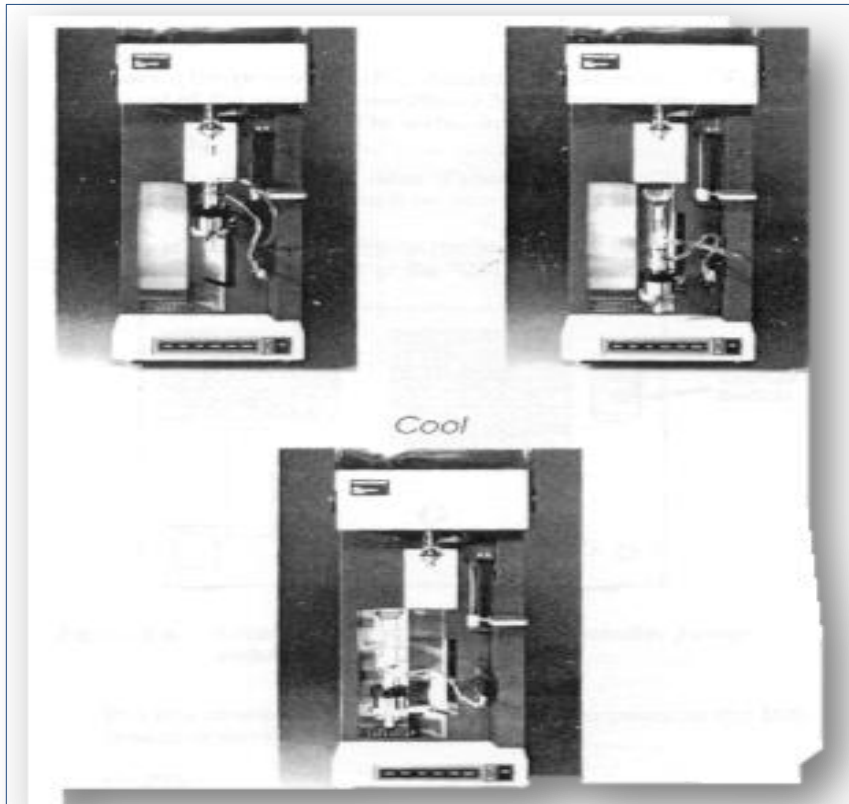


Figura 14. Sistema termogravimétrico típico con disposición de horno. Tomada de: Manual de DSC-7 de Perkin-Elmer.

Preparación de muestra

En general, la preparación de una muestra para realizar análisis termogravimétrico no conlleva dificultades. La Figura 15 muestra un esquema sobre la manipulación de muestra para situarla en el interior del horno de la balanza termogravimétrica. Se adiciona una cantidad relativamente pequeña de muestra sobre una cápsula de platino y ésta se suspende, mediante un soporte, de un alambre en forma de gancho quedando finalmente en el interior del horno que a su vez está aislado del exterior mediante un tubo de vidrio. La propia termobalanza se utiliza para pesar la masa inicial de muestra. ⁽²⁴⁾

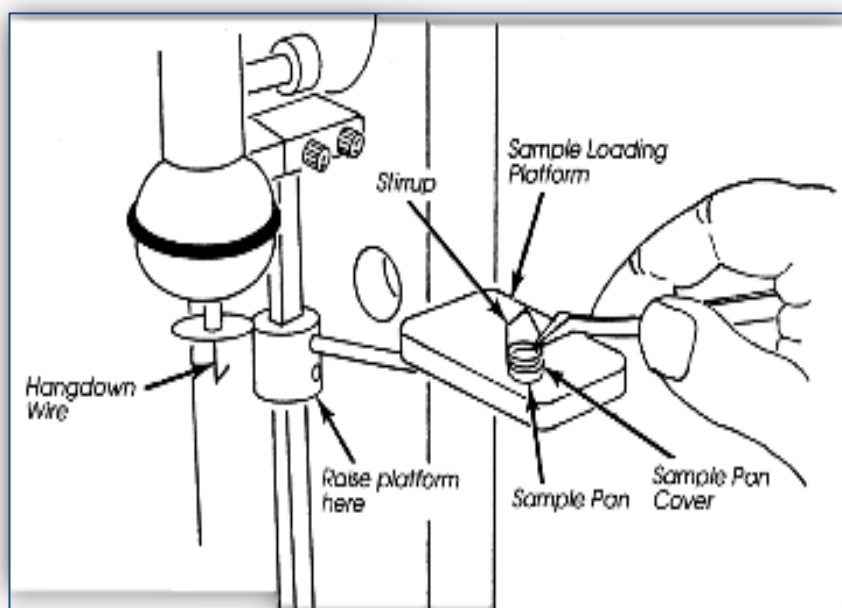


Figura 15. Esquema sobre la manipulación de muestra para situarla en el interior del horno de la balanza termogravimétrica. Tomada de: Manual de DSC-7 de Perkin- Elmer.

Aplicaciones

Los métodos termogravimétricos están limitados por las reacciones de descomposición y de oxidación y por procesos tales como la vaporización, la sublimación y la desorción.

Quizás, entre las aplicaciones más importantes de los métodos termogravimétricos se encuentre el estudio de polímeros. Los termogramas proporcionan información sobre los mecanismos de descomposición de diversas preparaciones poliméricas. Además, los

modelos de descomposición son característicos de cada tipo de polímero y, en algunos casos, pueden ser utilizados con finalidades de identificación. La Figura 16 muestra los modelos de descomposición de cinco polímeros obtenidos por termogravimetría. ^(24; 23)

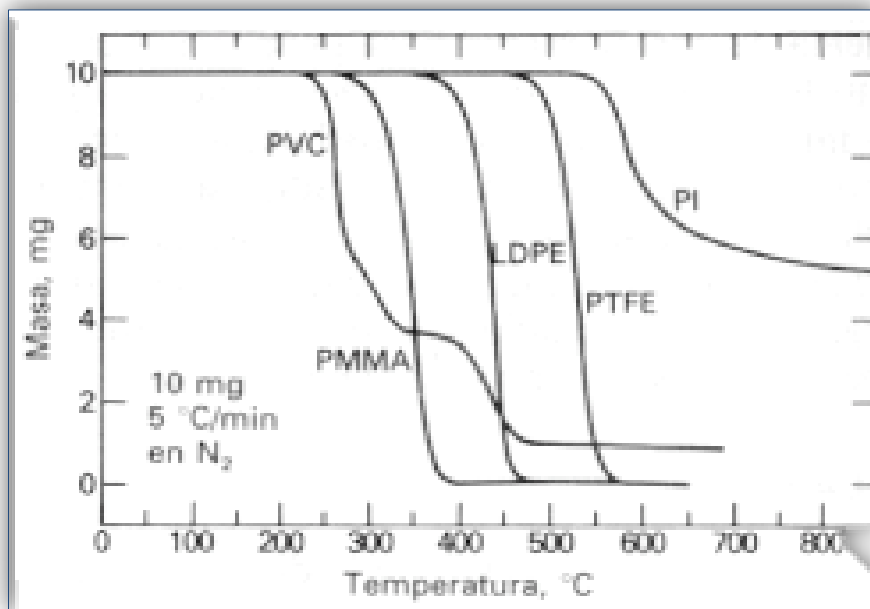


Figura 16. Termogramas correspondientes a la descomposición de cinco polímeros. Tomada de: Skoog DA et al. Principios de Análisis Instrumental.
(PVC: policloruro de vinilo; PMMA: metacrilato de polimetilo; LDPE: polietileno de baja densidad; PTFE: politetrafluoroetileno; PI: polipiromelitimida)

Calorimetría diferencial de barrido (CDB)

Las técnicas termo analíticas han sido y siguen siendo en la actualidad ampliamente utilizadas en la caracterización de materiales. El análisis térmico abarca todos los métodos de medida basados en el cambio, con la temperatura, de una propiedad física o mecánica del material. Las condiciones de fabricación de un producto, así como su historia y tratamientos térmicos, son decisivas en las propiedades finales del material, por lo que las técnicas termo analíticas son imprescindibles en cualquier proceso de control sobre la fabricación de un material. ^(26; 27)

La calorimetría diferencial de barrido (Differential Scanning Calorimetry (DSC) por sus siglas en inglés) permite el estudio de aquellos procesos en los que se produce una variación entálpica, por ejemplo determinación de calores específicos, puntos de ebullición y fusión, pureza de compuestos cristalinos, entalpías de reacción y determinación de otras transiciones de primer y segundo orden. ^(26; 27)

En general, el DSC puede trabajar en un intervalo de temperaturas que va desde la temperatura del nitrógeno líquido hasta unos 600°C. Por esta razón esta técnica de análisis se emplea para caracterizar aquellos materiales que sufren transiciones térmicas en dicho intervalo de temperaturas. La familia de materiales que precisamente presenta todas sus transiciones térmicas en ese intervalo es la de los polímeros. Por esta razón, el DSC se emplea fundamentalmente para la caracterización de estos materiales y es por lo que, de aquí en adelante, nos centraremos fundamentalmente en transiciones térmicas en polímeros estudiadas por DSC. ^(26; 27)

En el campo de polímeros pueden determinarse transiciones térmicas como la temperatura de transición vítrea T_g , temperatura de fusión T_m ; se pueden hacer estudios de compatibilidad de polímeros, reacciones de polimerización y procesos de curado. ^(26; 27)

Instrumentación.

Existen dos tipos de métodos para obtener datos en DSC: i) DSC de potencia compensada y ii) DSC de flujo de calor. En el primero, la muestra y el material de referencia se calientan mediante calentadores separados aunque sus temperaturas se mantienen iguales mientras las temperaturas se aumentan (o disminuyen) linealmente. En el segundo, se mide la diferencia

de cantidad de calor de la muestra y de la referencia cuando la temperatura de la muestra se aumenta (o disminuye) linealmente. A pesar que los dos métodos proporcionan la misma información, sólo nos centraremos en el primero. ^(26; 27)

El DSC mide el flujo de calor en la muestra a estudiar y en un material inerte de referencia de forma independiente. En la figura 17 se muestra un esquema de un aparato de DSC. Ambas células que contienen la muestra y la referencia, están equipadas con un sensor para la medida de su temperatura, y una resistencia de calentamiento independiente para cada una de ellas.

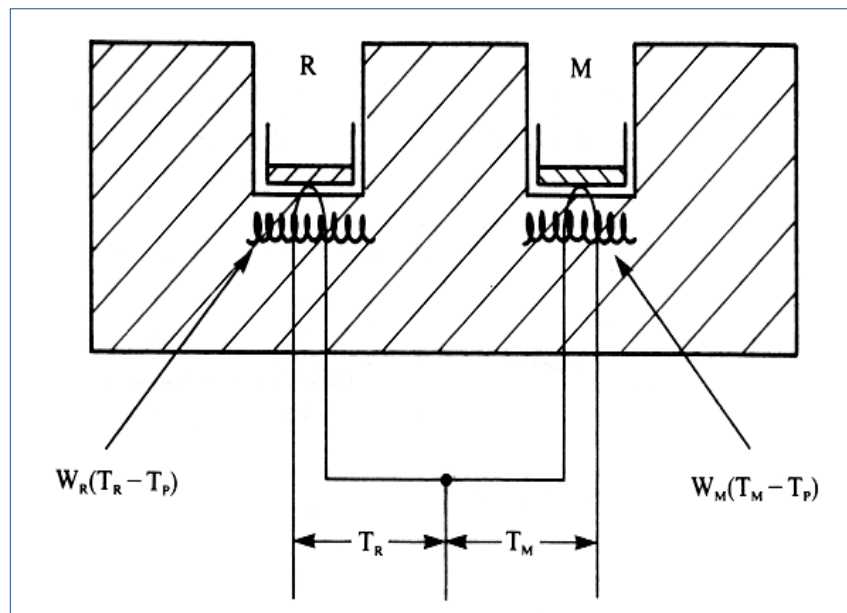


Figura 17. Esquema de un aparato de DSC. Tomada de: Albella, JM, et al. Introducción a la Ciencia de Materiales.

En DSC las temperaturas que se miden son las de las propias células metálicas donde se introducen ambas muestras. Esto hace que sea necesario un calibrado previo, que generalmente, es diferente para cada velocidad de calentamiento o enfriamiento.

Preparación de muestras.

Las muestras se cargan en cápsulas (células) de aluminio con una capacidad entre 10–50 μ l. Normalmente estas cápsulas se sellan con una tapa de aluminio para impedir que por

problemas de dilatación o descomposición de la muestra, ésta se proyecte fuera de la cápsula contaminando el pocillo. Existen casos en los que las cápsulas de aluminio no se sellan o bien se utilizan tapas especiales de cuarzo o de oro y platino en aquellos casos en que se detecten interacciones no deseables entre la sustancia problema y la superficie de la cápsula de aluminio. ^(26; 27)

La cantidad de muestra utilizada puede ser variable, desde varios miligramos hasta máximo 30mg, así como el estado y forma de la misma. No obstante, la cantidad y forma de la muestra influyen bastante en la calidad y precisión de la medida. Debido a la baja conductividad térmica de la muestra, cuanto mayor sea la superficie de contacto entre la misma y el foco calefactor, más rápidamente se difundirá el calor a toda la masa de la muestra. Para mejorar la conductividad térmica de la muestra se emplean tapas de platino sobre los pocillos. En el pocillo de referencia se suele colocar una cápsula vacía de igual tipo y forma que la que contiene la muestra a analizar. ^(26; 27)

Aplicaciones comunes de DSC

- Calor específico y propiedades en las que varía el calor específico como la temperatura de transición vítrea o la transición de Curie
- Transiciones de fase
- Polimorfismos
- Determinación de puntos de fusión
- Determinación de parte amorfa y cristalina
- Cinéticas de reacción
- Tiempo e inducción a la oxidación
- Descomposición

Determinación de área superficial por BET.

Estructura y Composición de Superficies Sólidas

En la estructura de los materiales, es importante el estudio las características de la superficie, ya que de ellas se puede conocer la textura, porosidad y área superficial, entre otras. Para que esto suceda, se considera que en los fenómenos de superficie cuando la fase condensada es un sólido y la otra es, normalmente, una fase gaseosa. ⁽²⁸⁾

En el estudio de estos fenómenos, en concreto la adsorción y la reactividad (catálisis heterogénea) se deben describir las superficies sólidas. Estas superficies presentan diferencias importantes respecto a su estructura. Normalmente podemos pensar en la superficie de un sólido como una estructura homogénea donde los átomos ocupan posiciones bien definidas y por tanto se repiten regularmente (Fig. 18). ⁽²⁷⁾

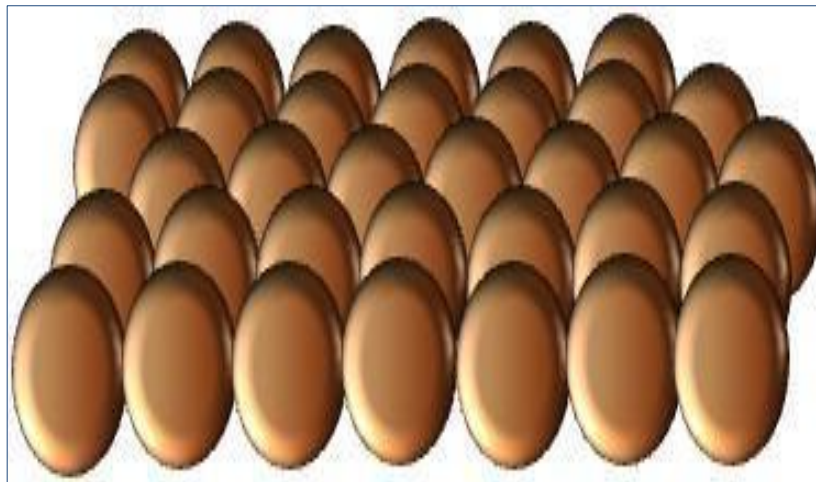


Figura 18. Acomodo atómico de las superficies

Sin embargo, esto corresponde a una situación ideal muy difícil de conseguir en la práctica. La superficie de un sólido puede estar llena de defectos debido al proceso de crecimiento del cristal o bien a procesos sufridos una vez formado. Estos defectos pueden clasificarse según su topología y la siguiente figura muestra algunos de ellos (Fig. 19).

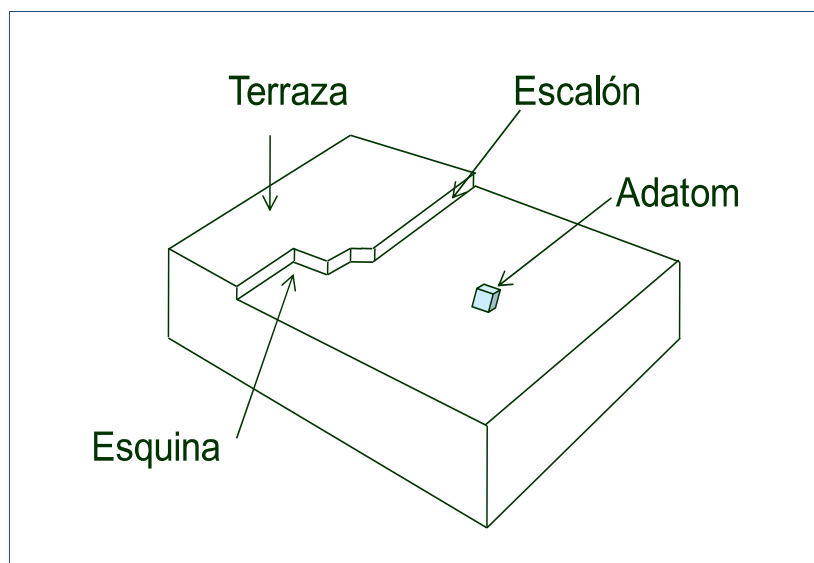


Figura 19. Defectos de las superficies.

Estos defectos suelen ser importantes en el estudio de los procesos superficiales ya que los átomos implicados en ellos son más reactivos, al tener menos valencias cubiertas que el resto.

Adsorción de gases sobre sólidos

Cuando una molécula de gas golpea una superficie sólida, puede rebotar o quedar fijada sobre la superficie, es decir, sufrir adsorción. En ese último caso a continuación, la molécula adsorbida puede difundirse (moverse) sobre la superficie, quedarse fija, sufrir una reacción química o disolverse en el interior del sólido (proceso conocido como absorción y del que es un conocido ejemplo el empleo de CaCl_2 anhidro como desecador: el agua de la atmósfera es adsorbida y a continuación absorbida para formar un hidrato). En este tema vamos a centrar nuestro estudio en el proceso de adsorción y a continuación los procesos de reacción (catálisis heterogénea) que pueden derivarse.⁽²³⁾

Podemos definir el primero de estos procesos como:

- adsorción: proceso de unión de una molécula procedente de otra fase sobre la superficie de un sólido.
 - desorción: proceso inverso a la adsorción.
- Podemos distinguir dos comportamientos límites de adsorción, fisisorción y

quimisorción, aunque es frecuente observar comportamientos intermedios.

▪ Adsorción física o fisisorción ⁽²⁹⁾: las moléculas del gas se mantienen unidas a la superficie del sólido por medio de fuerzas de Van der Waals (interacciones dipolares, dispersión y/o inducción). Este hecho define todas las características propias de la fisisorción:

- i) Es una interacción débil.
- ii) Es un proceso exotérmico (las fuerzas de van der Waals son atractivas) en el que los calores liberados, ΔH_{ads} (aprox. 20-40 kJ/mol) son semejantes a las entalpías de condensación de la sustancia adsorbida.
- iii) La energía liberada es adsorbida en forma de vibración por la red del sólido y ΔH_{ads} se puede medir por el aumento de temperatura de la muestra.
- iv) La molécula fisisorbida mantiene su identidad ya que la energía es insuficiente para romper el enlace aunque su geometría puede estar distorsionada.
- v) La fisisorción es un proceso no específico ya que las fuerzas que intervienen no lo son y no existe una selectividad marcada entre adsorbato y adsorbente. En general, los gases muy polarizables son adsorbidos más fácilmente.
- vi) La fisisorción se produce en multicapas. Sobre una capa de gas fisisorbida puede adsorberse otra. La ΔH_{ads} para la primera capa viene determinada por las fuerzas entre adsorbente (M) y adsorbato (A), mientras que la ΔH_{ads} para las capas siguientes depende de las interacciones A-A y por tanto es similar a la entalpía de condensación. (Fig. 20)

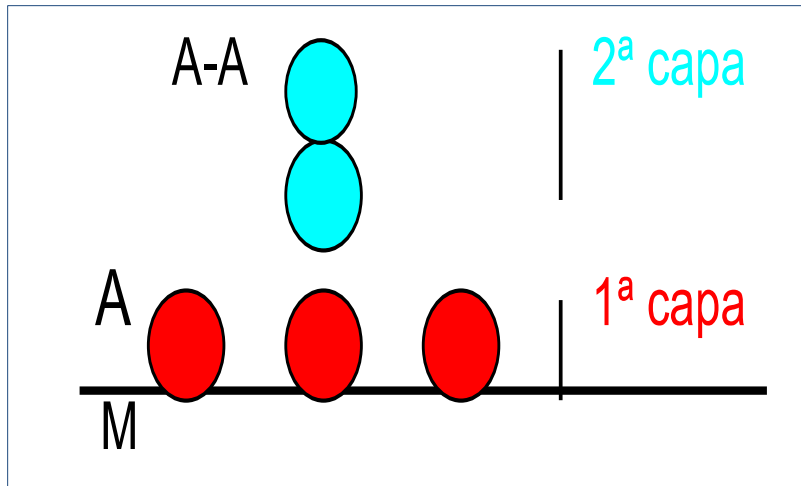
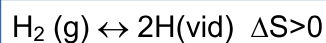


Figura 20. Fisisorción de las moléculas sobre la superficie.

Adsorción química o quimisorción: fue propuesta por Langmuir (*Met Chem Eng*, 1916).⁽²⁵⁾ En este caso las moléculas de gas se mantienen unidas a la superficie formando un enlace químico fuerte. Este hecho define las características propias de la quimisorción:

- i) Se trata de una interacción más fuerte que la fisisorción.
- ii) las entalpías de quimisorción son mucho mayores que las de fisisorción y del orden de las que se liberan en la formación de enlaces químicos, $\Delta H^{\circ}_{\text{ads}} = - (100-500)$ kJ/mol. Si en la quimisorción se produce formación y rotura de enlaces podrían esperarse valores de $\Delta H^{\circ}_{\text{ads}}$ tanto positivos como negativos (al igual que en las reacciones químicas ordinarias). Sin embargo, la quimisorción es exotérmica normalmente. La razón es que un proceso espontáneo requiere $\Delta G < 0$ y dado que la libertad de traslación del adsorbato se reduce, ΔS es menor que cero y necesariamente ΔH debe ser menor que cero. Puede haber excepciones si el adsorbato se disocia y/o tiene una movilidad elevada sobre la superficie. Ejemplo: el H_2 se adsorbe endotérmicamente sobre vidrio ya que aumenta la entropía, como se muestra a continuación:



- iii) La quimisorción es específica. Por ejemplo el N_2 es quimiadsorbido a temperatura ambiente sobre Fe, W, Ca y Ti, pero no sobre Ni, Zn, Ag, Cu o Pb. El Au(s)

quimisorbe O_2 , C_2H_2 y CO pero no H_2 , CO_2 o N_2 .

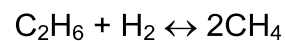
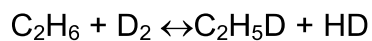
- iv) Dado que implica la formación de un enlace entre adsorbato y el adsorbente, el proceso se detiene tras la formación de una monocapa sobre la superficie. Aunque sólo una capa puede estar quimisorbida puede producirse adsorción física de nuevas capas de adsorbato sobre la primera.
- v) En general, la quimisorción implica la rotura y formación de enlaces, por lo que la molécula quimisorbida no mantiene la misma estructura electrónica (enlaces) que en fase gaseosa.

Isotermas de adsorción ⁽²⁸⁾

En el caso de los líquidos, la adsorción de una sustancia en la interfase se estudia a través de la variación de la tensión superficial con la concentración de tensoactivo:

$$d\gamma = -\Gamma_{2(1)}d\mu_2$$

En el caso de los sólidos la tensión superficial no es una magnitud fácilmente determinable. Resulta mucho más sencillo medir directamente la cantidad de gas adsorbido a una temperatura dada en función de la presión P del gas en equilibrio con el sólido.



De manera que experimentalmente, esta medida requiere que la superficie de encuentre inicialmente limpia, para lo que se calienta el sólido en alto vacío. Alternativamente puede evaporarse y recondensar el sólido en alto vacío, bombardear la superficie con iones o romper el cristal sólido en el vacío generando así una superficie limpia. El sólido se introduce entonces en un recipiente con una cantidad conocida de gas (a través de la presión por ejemplo) y se deja que se alcance el equilibrio. ⁽²⁷⁾

La cantidad adsorbida puede ser conocida de acuerdo a los siguientes criterios:

- por la diferencia de presión del gas en ausencia o presencia de la superficie
- por gravimetría
- desorción en flash: se calienta rápidamente la superficie, desorbiendo el gas y midiendo el aumento de la presión
- mediante trazadores radiactivos
- métodos de flujo: se hace circular un gas y se determina la diferencia entre lo que entra y lo que sale.

Repitiendo el experimento a distintas presiones se obtienen datos de cantidad de gas adsorbido frente a la presión en equilibrio a una temperatura dada. Estos datos de cantidad de gas adsorbido frente a la presión de gas que queda en equilibrio tomados a una misma temperatura constituyen la Isoterma de adsorción. En las isotermas de adsorción de sólido se representa la presión de gas en equilibrio (P) en el eje X, mientras que en el eje Y se representa la cantidad adsorbida. Esta magnitud puede darse de diferentes formas:

- moles adsorbidos/gramos de adsorbente (n/m).

- Volumen de gas adsorbido/gramos de adsorbente (v), que es proporcional a la cantidad anterior:

$$v = \frac{V}{m} = \frac{nRT}{mP} = \frac{RT}{P} \frac{n}{m}$$

(por cuestiones históricas el volumen suele expresarse como el volumen que ocuparía el gas adsorbido si estuviese en condiciones normales $T=273,15\text{ K}$, $P=1\text{ atm}$).

Con muy pocas excepciones las isothermas experimentales pueden clasificarse en cinco tipos de acuerdo con S. Brunauer (J Am Chem Soc, 1940) ⁽²⁶⁾. (Fig. 21)

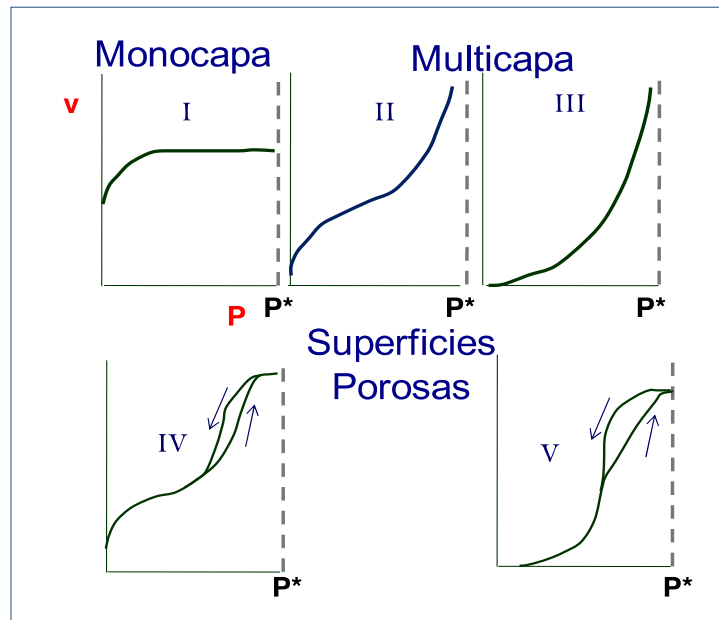


Figura 21. Tipos de Isothermas. Tomada de: IUPAC.

Antes de entrar en la descripción de cada una de ellas, hemos de darnos cuenta que las isothermas se detienen cuando se llega a la presión de vapor (P^* en la figura). A esta presión, cualquier pequeño aumento en la cantidad de gas produciría su condensación, aumentando entonces verticalmente la cantidad de gas “adsorbida” sobre el sólido (la presión en equilibrio sería siempre igual).

Tipo I: denominado isoterma de Langmuir, corresponde a una adsorción en monocapa. La cantidad adsorbida aumenta con P hasta alcanzar un valor límite correspondiente al recubrimiento de la superficie por una monocapa. Es la isoterma característica de un proceso únicamente de quimisorción.

Tipo II: es indicativo de una adsorción física en multicapa. El rápido ascenso inicial corresponde a la formación de la primera capa, que tiene en este caso una constante de formación mayor que para el resto de capas (la entalpía de formación de la primera capa es

más negativa que para el resto de capas). Al seguir aumentando la presión se forma la segunda capa de moléculas adsorbidas, seguida de otras más.

Tipo III: corresponde también a una adsorción física en multicapas pero donde la constante de equilibrio de formación de la primera capa es igual que para las siguientes (no se observa diferencia entre el llenado de la primera capa y del resto).

Tipos IV y V: corresponde a adsorción en multicapas sobre materiales porosos. Difieren del Tipo II y III por la presencia de una rama horizontal (saturación) y un ciclo de histéresis (las curvas de adsorción y desorción difieren). El ciclo de histéresis es debido a la condensación por la forma irregular de los capilares. Supongamos un capilar según la figura siguiente (Fig. 22) con un diámetro variable. El sitio donde primeramente aparece la condensación capilar será donde, de acuerdo a la ecuación de Kelvin, el radio sea menor, es decir en **a**. El poro queda taponado, pero al aumentar la presión, este tapón es empujado hacia dentro, se igualan las presiones en todo el capilar y vuelve a aparecer condensación en **a** y en aquellos otros puntos que les corresponda según la ecuación de Kelvin. Este proceso de equilibrio tendrá lugar hasta que el capilar este lleno. En cambio para la desorción el proceso es completamente diferente. Supongamos que el capilar se ha vaciado hasta **a** y tenemos una P de equilibrio según la ecuación de Kelvin. A esta presión debería haberse ya evaporado el líquido situado en el punto **b**, ya que el radio es mayor. Sin embargo, el sitio por donde puede evaporarse el líquido es por **a**. Pero en **a** la presión de vapor es menor ($r_a < r_b$) y, por consiguiente, no habrá evaporación. Así, hasta que la presión exterior disminuya al valor apropiado no se producirá el vaciado de golpe de todo el capilar. El proceso de desorción no es de equilibrio mientras que el de adsorción si, de ahí la histéresis.

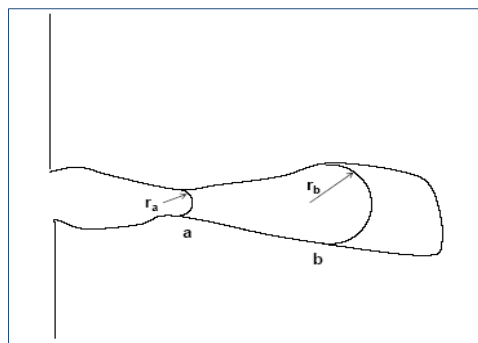


Figura 22. Capilar

Determinación del tamaño de poros de la muestra.

El porosímetro de mercurio y métodos de adsorción de gas (MAG) son comúnmente usados para medir el tamaño y distribución del tamaño de poro. El MAG es aplicado generalmente para microporos < 200 nm de diámetro, es una técnica no destructiva, segura y limpia comparada con la del Hg.

Este método es usado para medir tamaño de poro y su distribución en la superficie de una muestra. La cantidad de gas adsorbido de la superficie de un cuerpo poroso depende de su microestructura, de la presión y temperatura empleadas. La estructura de poro de un cuerpo poroso puede ser evaluada desde la isoterma de adsorción, la cual es la cantidad de gas absorbido a una temperatura dada. ^(22; 27)

Asumiendo la teoría de adsorción de Brunauer-Emmett-Teller BET, el área de superficie de un material poroso puede ser medida usando la isoterma de adsorción obtenida. Este método complementa las observaciones de estructura de poro observados por microscopía electrónica.

Por otra parte, el área de superficie específica se puede medir también con el método de adsorción de gas (Fig. 23 a-d). El método BET es el más común para determinar las áreas de superficie desde adsorción de gas. La mono capa de gas adsorbido es calculada desde la isoterma de adsorción a varias presiones con la teoría BET.

El nitrógeno es generalmente usado porque tiene baja reactividad con la mayoría de los sólidos y está fácilmente disponible como gas puro o líquido.

La Teoría (**BET**) ^(22; 27) asume que un gas, como por ejemplo el nitrógeno al licuarse y adsorberse sobre superficies sólidas limpias llenará toda la superficie disponible formando capas múltiples como la mostrada en la figura 23.

Diversos autores han realizado clasificaciones tratando de agrupar los tipos de poros según su tamaño. Generalmente los límites entre cada grupo, aunque parezcan arbitrarios, suelen deberse a límites específicos de una técnica o campo de estudio, o bien a propiedades químicas y físicas. ⁽²²⁾

La International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC, 1994) ⁽²⁸⁾, basándose en las características de las isothermas de adsorción de gases, establece los siguientes límites:

- *Macroporos*: poros que tienen un diámetro mayor de 50 nm (0.05 μm).
- *Mesoporos*: poros que tienen un diámetro de poro que varía entre 50 nm y 2 nm.
- *Microporos*: poros que tienen un diámetro menor de 2 nm (0.002 μm).

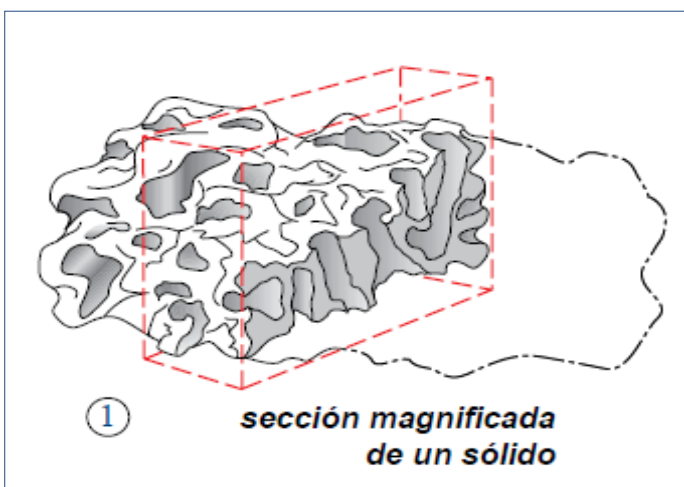
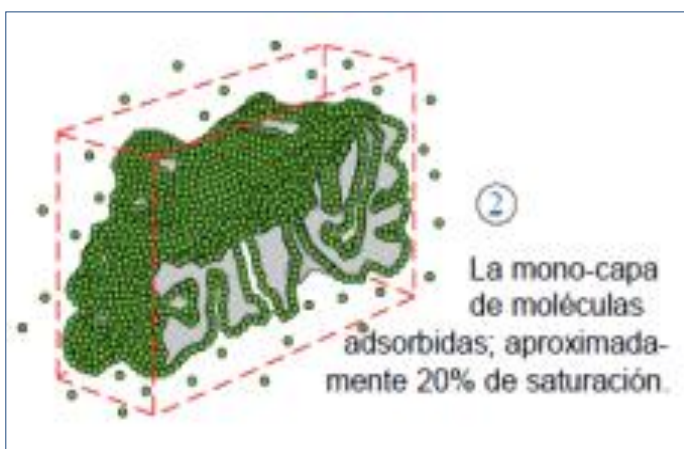


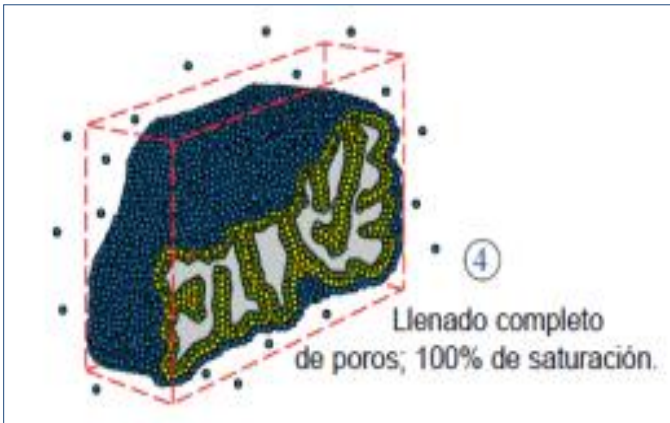
Figura 23.- Método de adsorción de N_2 por el BET
El primer paso es limpieza de la muestra con la finalidad de eliminar impurezas superficiales del material.



Formación de monocapa de N_2 , el cual se deposita en toda el área superficial del material.



Una vez saturada la muestra con la monocapa, empieza a agregarse el N_2 a través de la formación de multicapas (adsorción).



Una vez saturado todo el material analizado con el N_2 , se presenta la desorción del gas.

Capítulo 2. METODOLOGÍA

Planteamiento del problema:

La pérdida de tejido óseo en odontología y otras áreas médicas (traumatología, ortopedia, cirugía plástica) se presenta por múltiples causas, entre las que se encuentran los procesos tumorales, degenerativos y traumáticos, principalmente. La Regeneración Ósea Guiada, es un procedimiento terapéutico empleado para restablecer el tejido óseo, en la cual, es indispensable el uso de membranas con el objeto de separar los diferentes compartimientos de los tejidos involucrados en este proceso (epitelio, músculo).

Las membranas empleadas para este fin, pueden ser de origen sintético, entre las que se encuentran las de PTFE-e, utilizadas ampliamente en la clínica odontológica, sin embargo tienen la desventaja de que deben ser retiradas en un segundo evento quirúrgico, una vez regenerado el tejido óseo, aumentando la morbilidad de infección en el sitio regenerado; por otro lado, las membranas de origen natural son manufacturadas a partir de colágena de origen animal en combinación con otros polímeros naturales o sintéticos que le dan estabilidad y retardan el tiempo de absorción en el sitio de implantación entre 4 y 12 semanas dependiendo del grado y sitio de lesión ósea.

Las diferentes técnicas de caracterización físicas y químicas permiten determinar los principales componentes y la estructura de los diferentes materiales utilizados en regeneración ósea guiada.

Justificación:

Las membranas de colágena caracterizadas en este trabajo, fueron obtenidas a partir de Nukbone[®], una matriz ósea esponjosa de origen bovino, la cual se emplea actualmente como injerto óseo en tratamientos odontológicos y ortopédicos debido a su propiedad osteoconductiva.

La capacidad osteoconductiva de la matriz ósea, está determinada por dos factores importantes que son el tamaño de poros y sus interconexiones, favoreciendo la migración celular, secreción de factores de crecimiento y la formación de nuevos vasos sanguíneos como lo observado con el injerto Nukbone[®].

Aprovechando las propiedades de Nukbone[®] como matriz ósea mineralizada, se modificó la composición química mediante el uso de ácido clorhídrico (HCl), para posteriormente establecer las características estructurales y composicionales de la matriz ósea desmineralizada obtenida después de su tratamiento.

Esta idea surge debido a que las membranas sintéticas y naturales actualmente empleadas en las clínicas de especialidades del Posgrado de Odontología de la UNAM, son de manufactura extranjera, limitando su uso por los altos costos de importación, dependencia científica y tecnológica, limitando su disponibilidad, retardando el tratamiento odontológico y en algunos casos pudiendo llegar a la pérdida definitiva de tejido óseo causando, entre otras alteraciones, una mala oclusión.

Por lo antes expuesto, es importante contar con biomateriales de manufactura nacional que incentiven la vinculación entre la investigación básica y clínica a través de proyectos de alto impacto que beneficien a la sociedad.

Hipótesis

H₁: La matriz ósea desmineralizada del cóndilo de bovino tiene características físicas y químicas que hacen posible considerarla como un material para regeneración ósea guiada.

H₂: La matriz ósea desmineralizada del cóndilo de bovino no tiene características físicas y químicas que hacen posible considerarla como un material para regeneración ósea guiada.

Objetivos

Objetivo General

Obtener una matriz ósea desmineralizada (MOD) de origen bovino y determinar sus propiedades físico-químicas.

Objetivos Particulares

1. Conocer la estructura y el tipo de colágena presente en la matriz ósea desmineralizada (MOD) por medio de microscopía óptica (MOp).
2. Determinar la microestructura de la matriz ósea (MO) y MOD mediante Microscopía Electrónica de Barrido (MEB).
3. Determinar los grupos funcionales presentes en la MOD por medio de espectroscopia infrarroja (IR).
4. Determinar el comportamiento térmico de la MO y de la MOD por Análisis Térmico Gravimétrico (ATG) y Calorimetría Diferencial de Barrido (CDB).
5. Determinar la cristalinidad del material obtenido por medio de Difracción de Rayos X (DRx).
6. Determinar el área superficial de la MO y de la MOD mediante la técnica de Adsorción de N₂ Brunauer-Emett-Teller (BET).

Capítulo 3. MATERIAL Y MÉTODO

Recursos

Materiales empleados

- Vasos de precipitado de 100 ml (Pyrex, Estados Unidos de América)
- Pipetas graduadas de 1, 5 y 10 ml
- Pinzas de disección con dientes
- Laminilla (Lauka, China)
- Aros de inclusión (Simport, Thermo Scientific, USA)
- Parafina (Paraplast, McCormick Scientific, USA)
- Tren de inclusión (Wheaton Scientific Products, USA)
- Vasos Coplin (Wheaton Scientific Products, USA)

Químicos

- Ácido clorhídrico fumante al 37% (Merck 100317, Alemania)
- Agua bidestilada
- Tinción de Hematoxilina-Eosina (Reactivo preparado en el laboratorio)
- Tinción para Tricrómica de Masson (Reactivo preparado en el laboratorio)
- Tinción para von Kossa (Reactivo preparado en el laboratorio)

Biológicos

- Bloques de MO de 2.5x2.5x0.5cm, obtenida a partir del cóndilo femoral de bovino, proporcionadas por el laboratorio Biocriss S.A. de C.V.

Equipos

- Plancha de calentamiento con agitación (Simarec, modelo SP131325, USA)
- Agitador magnético
- Cronómetro
- Histoquinet (Tissu tek II, Sakura finetechnical Co., Japón)
- Centro de inclusión de tejidos (KD-BM, China)
- Microtomo (Leica, USA)
- Microscopio óptico (Fotomicroscopio Zeiss, Alemania)
- Microscopio Electrónico de Barrido (JEOL JSM 7600F, Japón)
- Equipo de análisis térmico simultáneo TGA/DSC (TA Instruments SDTQ600, USA)
- Equipo de Espectroscopia Infrarroja (Scientific Nicolet 6700 FT-IR, USA)
- Potenciómetro (Hanna H1223, USA)
- Equipo de Adsorción de Nitrógeno (Quantachrome Instruments autosorb-1, USA)
- Equipo de Difracción de Rayos (Bruker D8 Advance, Alemania)

Financiamiento

Dirección General de Asuntos del Personal Académico, UNAM

- * Comisión con Goce de Sueldo para estudios de Maestría, Consejo Técnico de la Facultad de Medicina, UNAM.
- * Proyectos PAPIIT: IN 104011, IN 113108, IT 119111

Método

Elaboración de MOD para estudios de caracterización.

Se emplearon 40 bloques de MO denominada Nukbone®⁽²⁹⁾ de 2.5x2.5x0.5cm. Posteriormente cada uno fue colocado en un vaso de precipitado, se le agregó una disolución de ácido clorhídrico (Merck, Alemania) en una concentración de 0.5M en 50ml de agua bidestilada. Posteriormente se llevaron a un agitador magnético para mantenerlos en agitación constante durante 10 minutos. (Fig. 24)



Figura 24.- Agitador magnético. (Cimarec)

Los materiales fueron recuperados (Fig. 25) y se les enjuagó con agua bidestilada con la finalidad de eliminar residuos del HCl, y se colocaron en cajas de Petri para que se secan a temperatura ambiente durante 48 horas. Para cada técnica de caracterización se emplearon 5 MOD; en algunas técnicas se emplearon también MO.

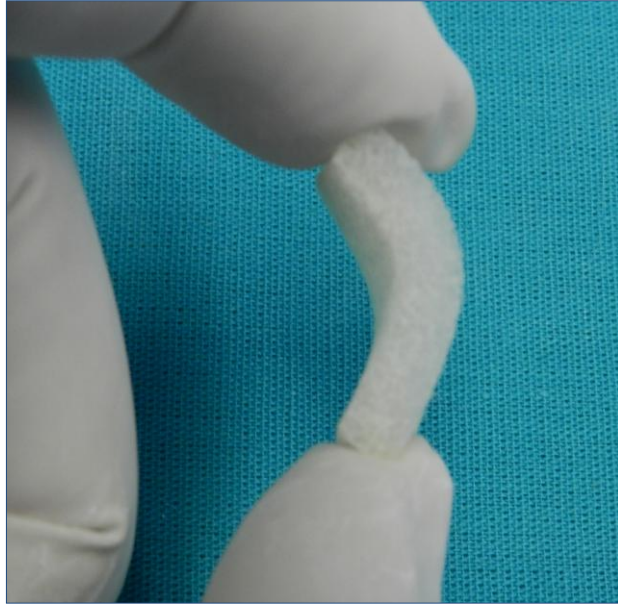


Figura 25.- Matriz ósea desmineralizada.

Obtención de muestras (probetas) para estudios de caracterización.

Probetas para microscopia óptica (técnica histológica) empleadas para tinciones Hematoxilina-Eosina, Tricrómica de Masson, von Kossa, y luz polarizada.

Se emplearon 5 MOD de 1x1x0.5cm, las cuales fueron colocadas en los aros de inclusión y deshidratadas en alcoholes a diferentes concentraciones (50, 60, 70, 80, 96, 96, 100, 100%, X, X, PI, PII) en el equipo Histoquinet Tissu tek II durante 2 horas en cada concentración, posteriormente fueron incluidas en parafina, utilizando la estación de inclusión de tejidos (Figura 26).



Figura 26-. Centro de inclusión de tejidos (KD-BM)

Posteriormente se realizaron cortes histológicos de 3 micras de grosor, utilizando el micrótopo Leica (Fig. 27); los cortes fueron colocados en porta objetos (Fig. 28) para posteriormente (Fig. 29) teñirlos con Hematoxilina & Eosina, Tricrómica de Masson y von Kossa. Estos procedimientos fueron realizados en el laboratorio de histología del Departamento de Biología Celular y Tisular de la Facultad de Medicina de la UNAM.



Figura 27.- Microtomo

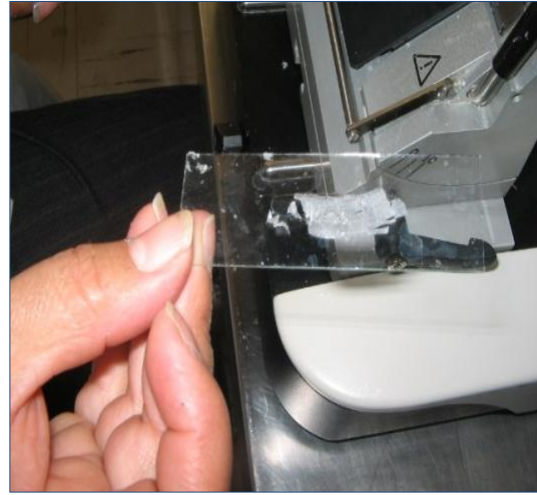


Figura 28.- Montaje de muestra en laminillas



Figura 29.- Tren de tinción.

Microscopía Electrónica de Barrido (SEM) y Espectroscopia de Dispersión de Rayos X (EDS)

Las probetas empleadas para la obtención de imágenes de MEB y EDS fueron de 20mm² analizando MO y MOD.

Debido a las características de alto vacío del equipo de MEB no fue necesario el tratamiento de recubrimiento de ninguna de las probetas, posteriormente, las muestras fueron colocadas en los porta muestras con cinta de cobre (Cu), para evitar su movimiento.

Durante la obtención de las imágenes de MEB, se realizó de manera simultánea, el análisis de espectroscopia de Rayos X; este procedimiento, únicamente se realizó a la matriz ósea desmineralizada.

La técnica microscópica empleada para observar las muestras fue de electrones secundarios con un voltaje de 5Kv.

Este análisis se realizó en el Laboratorio Universitario de Microscopia Electrónica (LUME) del Instituto de Investigaciones en Materiales de la UNAM.

Difracción de Rayos X

Se utilizó el equipo Bruker D8 Advance, para esta técnica se emplearon 5 MO y 5 MOD de 1x1x0.5cm, las cuales se colocaron directamente en el portamuestras del equipo de difracción de Rayos X. (Fig. 30) La técnica empleada para la obtención de los difractogramas fue con radiación $\text{Cu K}\alpha_1$ ($\lambda=0.154 \text{ nm}$). Cada muestra fue corrida a 2θ de 15 a 80° . El equipo empleado se encuentra ubicado en el Departamento de Materiales Metálicos y Cerámicos del Instituto de Investigaciones en Materiales.

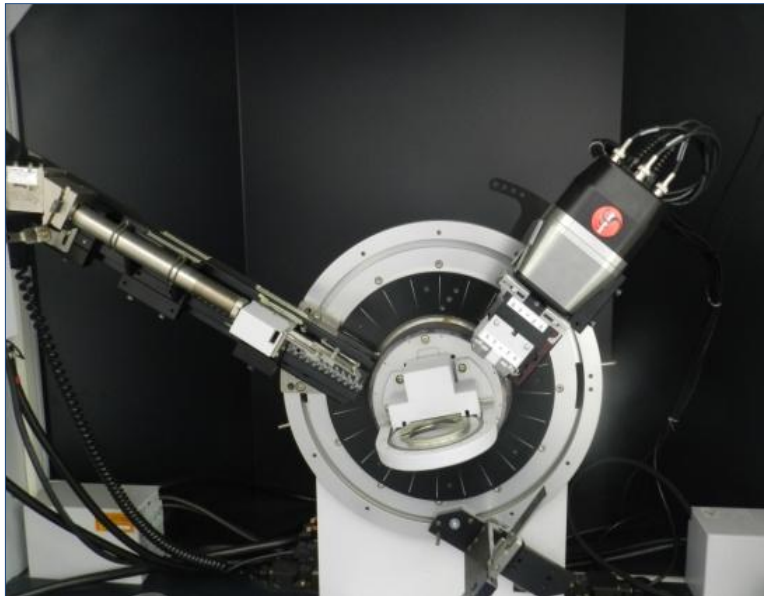


Figura 30.- Portamuestras del difractómetro

Espectroscopia Infrarroja

A partir de la MOD se obtuvieron “rebanadas” de 0.2cm con la ayuda de un bisturí (Fig. 31) para ser empleadas como probetas, las cuales fueron colocadas directamente en el equipo Scientific Nicolet 6700 FT-IR. La lectura del infrarrojo fue $500-3500\text{cm}^{-1}$. El equipo empleado se ubica en el Departamento de Polímeros del Instituto de Investigaciones en Materiales.

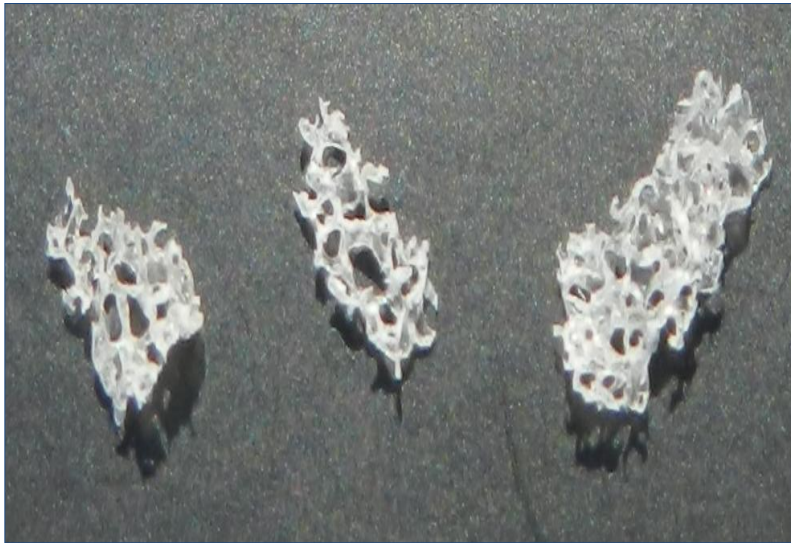


Figura 31.- Probetas para espectroscopia Infrarroja

Adsorción de Nitrógeno (BET)

En esta técnica de caracterización se utilizó el equipo Quantachrome Instruments autosorb (Fig. 32), empleando cubos de 20 mm² (Fig. 33) de MO y MOD. El análisis se llevó a cabo empleando nitrógeno líquido, previa limpieza de la muestra a 77°K. La finalidad de analizar la MO fue determinar el área antes de ser desmineralizada. El equipo empleado se encuentra en el Centro de Ciencias Aplicadas y Desarrollo Tecnológico (CCADET).



Figura 32.- Equipo de Adsorción de N₂.



Figura 33.- Cubos de MOD

CAPÍTULO 4. RESULTADOS y DISCUSIÓN

Técnica de Desmineralización

Actualmente, se emplea el HCl para la desmineralización de tejidos duros (hueso y dientes) con fines de trasplante alogénico como lo reportado por Gruskin (*Adv Drug Delivery Rev*, 2012)⁽³⁰⁾ o para la obtención de matrices desmineralizadas a partir de hueso de humano y bovino para ser empleados en ingeniería de tejidos como lo descrito por Chen et. al. (*Calcif Tissue Int*, 2011).⁽¹²⁾

Murugan (*J Mater Sci: Mater Med*, 2008)⁽³¹⁾ reportó tres días de tratamiento de desmineralización con HCl en muestras de 10 mm³ a temperatura ambiente, comparado con nuestro tratamiento, que únicamente fue de 10 minutos.

Es importante mencionar que existen otras técnicas de desmineralización con fines de diagnóstico para hueso, diente y tejidos patológicamente mineralizados; estas técnicas emplean ácidos como EDTA, Fórmico, Acético y Nítrico, así como microondas (Pitol, *Int J Morph*, 2007; Cho, *Open Den J*, 2010).^(32; 33)

Microscopia

Óptica (MOp)

Tinción Hematoxilina-Eosina

La primera técnica de caracterización empleada en el trabajo consistió en la observación de los cortes seriados en laminillas de 3µm de espesor, preparados con tinción de Hematoxilina y Eosina (H&E), para ser observados en campo claro de microscopia de luz en el laboratorio de Histología del Departamento de Biología Celular y Tisular de la Facultad de Medicina de la UNAM.

Las figuras 34A y B corresponden a cortes de la MOD, en ellas se observa la morfología y disposición de las trabéculas (T) óseas con pigmentación eosinofílica (rojo), expresando su afinidad por las estructuras orgánicas, en este caso son las fibras de colágena lo que permiten la fijación del pigmento; por otra parte, en color basofílico (azul) se pigmentaron las lagunas óseas (L), las cuales son espacios ocupados por los osteocitos. Las trabéculas forman los poros (P), los cuales se observan redondeados, sin datos de desgaste de la

superficie por efecto del HCl, así también estas trabéculas se encuentran sin pérdida de la arquitectura original, es decir la que presenta la MO. Estos hallazgos coinciden con la descripción reportada por Domínguez-Torres (*Inv Univer Multidisc*, 2007).⁽³⁴⁾ En ambas imágenes también se puede observar las diferencias en el grosor de las trabéculas.

En la figura 34A, el recuadro azul enmarca la única zona con pérdida de la arquitectura en la trabécula, que puede presentarse por defecto de la técnica histológica (corte con el microtomo) o por efecto directo del HCl.

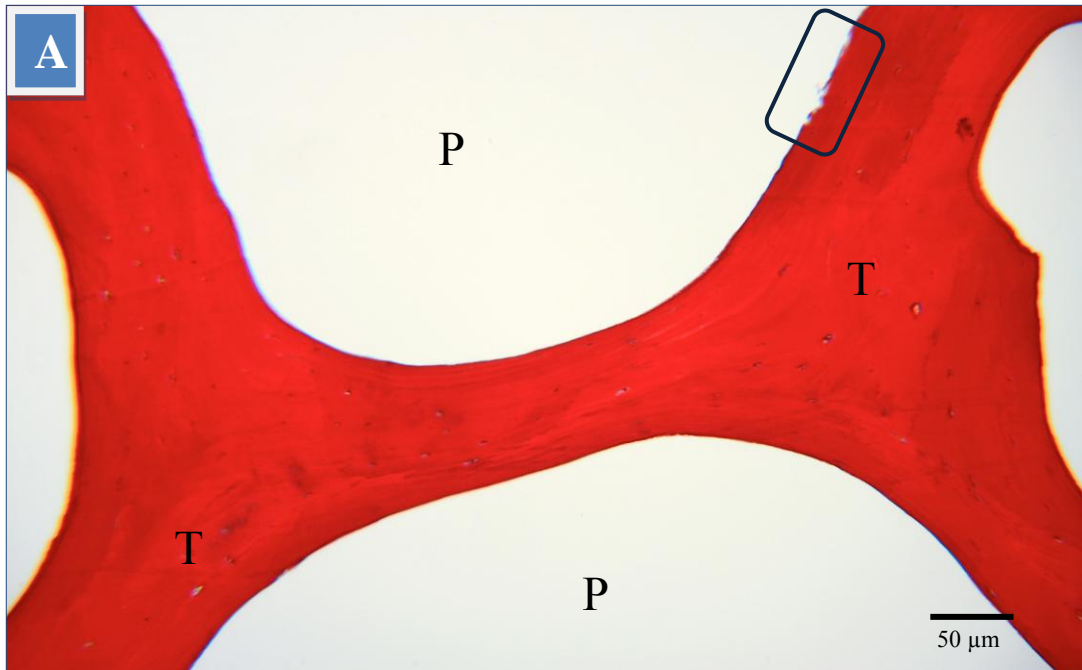


Figura 34A. Corte histológico de la MOD teñido con H-E 100X. P (poros), T (trabéculas). Recuadro azul pérdida de la arquitectura. (Fuente: directa)

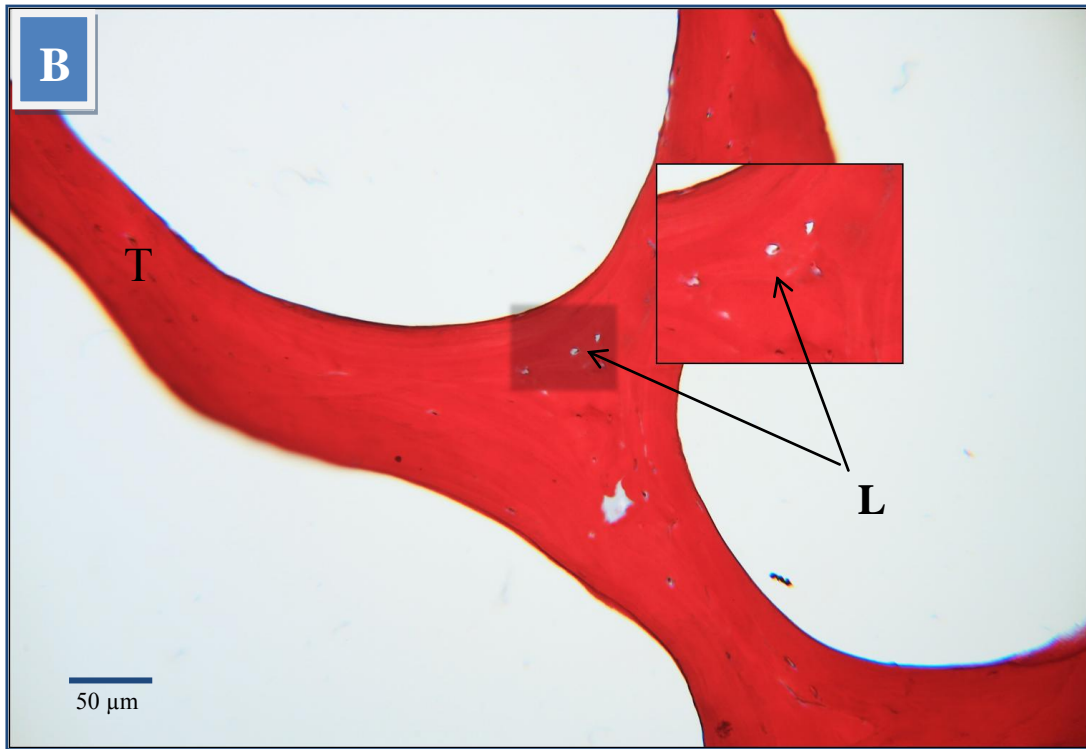


Figura 34B. Corte histológico de la MOD teñidos con H-E 100X. L (lagunas), T (trabéculas).
(Fuente: directa)

Tinción Tricrómica de Masson.

La tinción tricrómica de Masson se implementó para identificar la presencia de las fibras de colágena y orientación de las mismas; observando su disposición en las trabéculas (figura 35A), las cuales forman parte de la estructura porosa de la MOD. La organización de los haces de fibras de colágena que rodean al poro (*P*) se encuentran dispuestas como lo descrito por Weiner (*Annu Rev Mater Sci*, 1998) ⁽³⁵⁾ recuadro externo, representando esquemáticamente la organización de los haces de fibras de colágena dependiendo del sitio anatómico donde se localicen.

Existe una zona de mayor densidad, correspondiente a una condensación del colorante (rectángulo amarillo), donde no se logra observar la orientación de los haces de colágena.

La figura 35B, corresponde a otra zona de la matriz desmineralizada, observando zonas de color rojo (HA+col) correspondientes a sitios no desmineralizados; es importante mencionar que a diferencia de las zonas de mayor condensación del colorante (Fig. 35A), aquí sí se observan los haces de fibras de colágena, así como su orientación con respecto a la trabécula. El resto de las trabéculas (Col) y lagunas (L) se observan igual que la figura 35A.

En la figura 35C, se observan trabéculas más delgadas, comparadas con las trabéculas observadas en las imágenes 35A y B. Al igual que las zonas rojas observadas en la imagen 34B, corresponden a zonas no desmineralizadas (ZP) y que en algunos sitios, también se observa la orientación de los haces de las fibras de colágena (elipse amarillo).

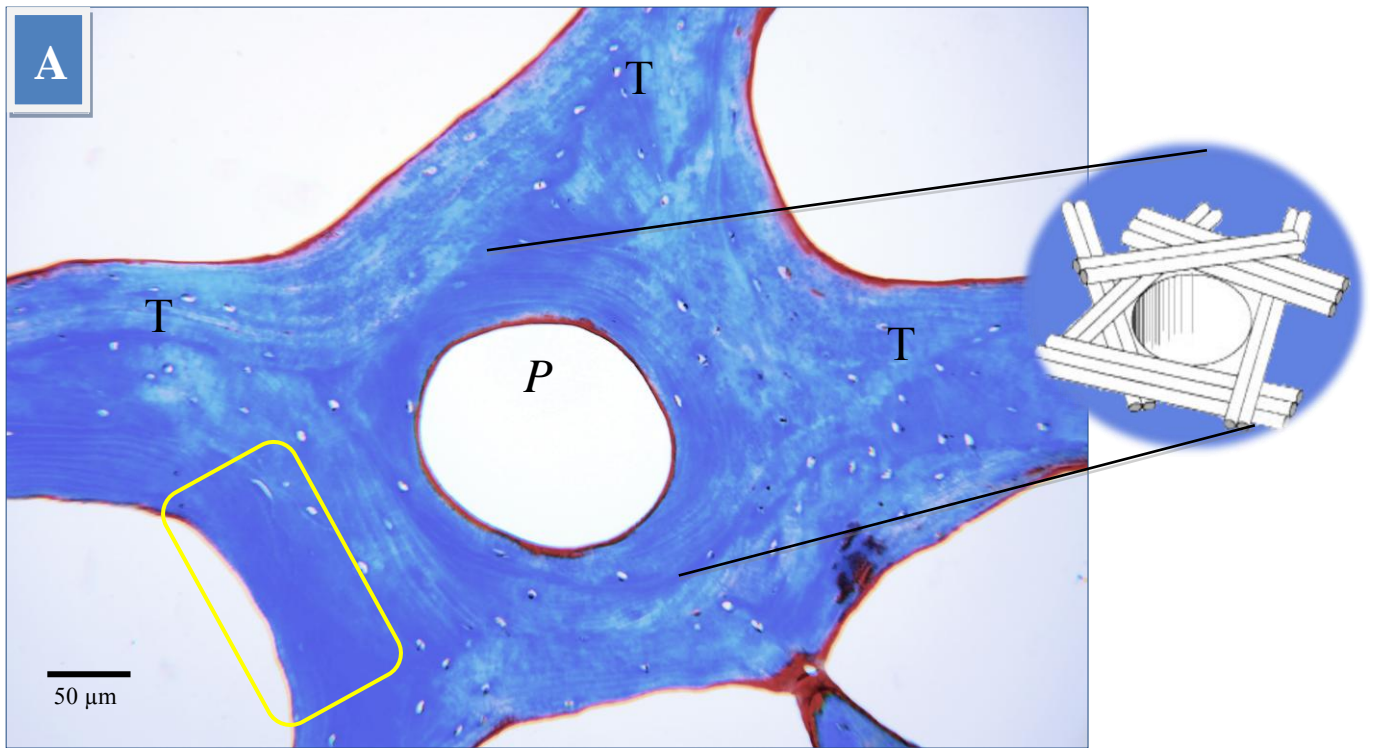


Figura 35A. MOD teñida con Tricrómica de Masson 100X. P (poro), T (trabéculas); recuadro amarillo corresponde a una mayor condensación de la colágena. (Fuente: directa)

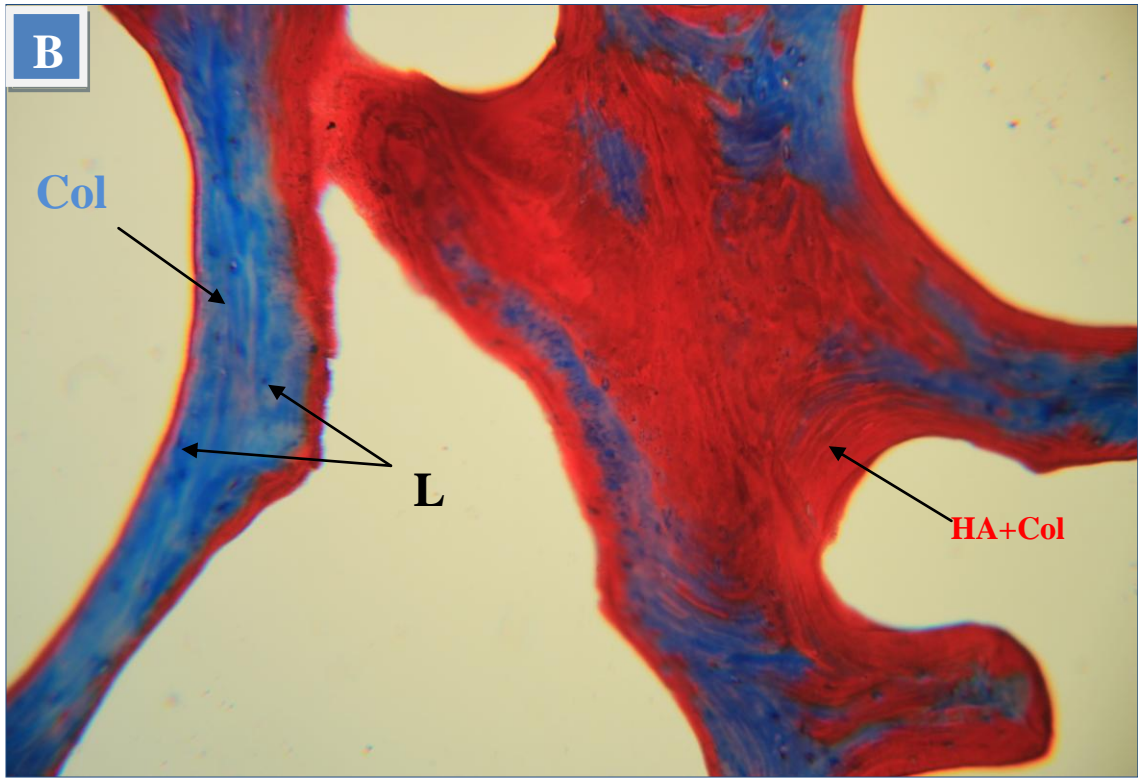


Figura 35B. Trabéculas de MOD teñida con Tricrómica de Masson 100X. HA+Col (Hidroxipatita asociada con colágena), Col (colágena), L (lagunas). (Fuente: directa)

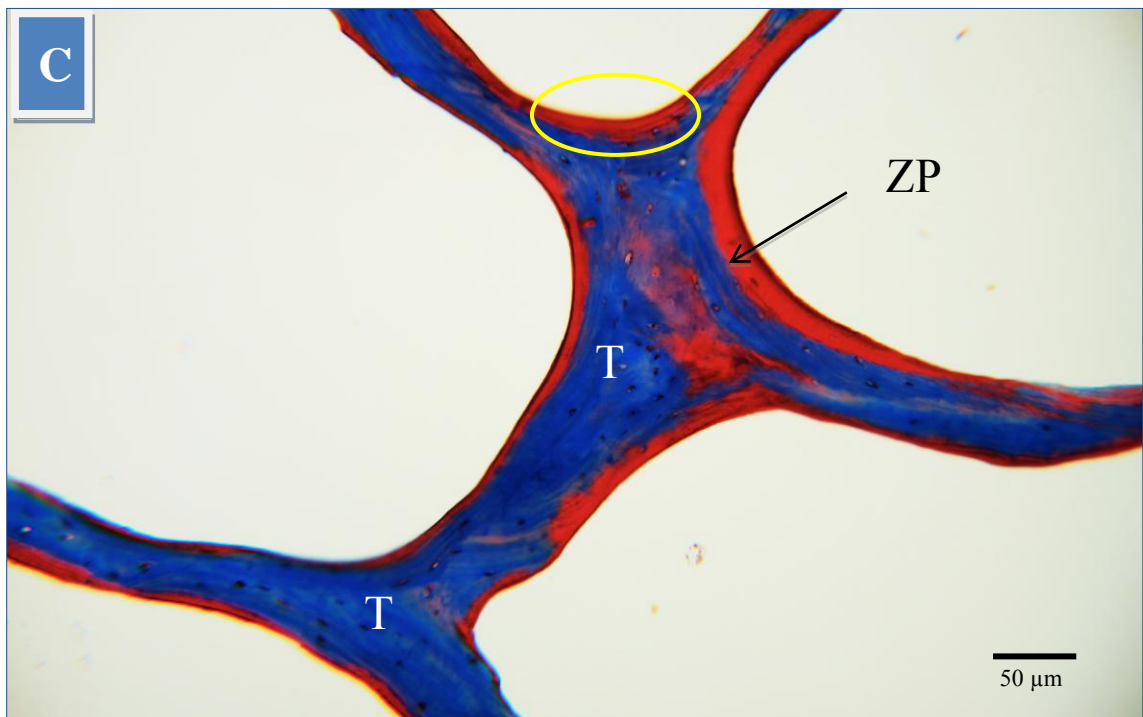


Figura 35C. MOD teñida con Tricrómica de Masson 100X. ZP (zona no desmineralizada), T (trabécula), elipse amarillo (haces de fibras de colágena). (Fuente: directa)

Tinción de von Kossa

Actualmente esta técnica histológica se emplea para demostrar la deposición de Ca^{2+} en tejidos de nueva formación, como lo demostrado por Zong (*Bio Medical Eng Online*, 2013) ⁽³⁶⁾ quien determino la formación de osteoide en un explante cultivado y posteriormente colocado en conejo; por lo que esta técnica se emplea con fines diagnósticos y de investigación en biomateriales.

En específico en nuestra MOD, esta tinción permitió observar los sitios con deposición de Ca^{2+} ; estos sitios observados se relacionan con los hallazgos de la tinción Tricrómica de Masson, donde la hidroxiapatita está asociada a la colágena (Ha+Col) (Fig. 35B), impidiendo observar las fibras de colágena de las trabéculas.

Analizando los cortes histológicos se puede observar en la imagen 36A (círculos rojos) únicamente dos zonas oscuras, correspondientes al Ca^{2+} . El resto de la MOD se observa íntegra, pudiendo identificar las trabéculas (T).

La imagen 36B corresponde a un mayor aumento de la zona (línea roja punteada) con presencia de Ca^{2+} en menor cantidad que la otra trabécula con mayor deposición (línea roja continua). No hay pérdida de la arquitectura periférica de la trabécula, al igual que las otras zonas de las trabéculas desmineralizadas. En algunos trayectos de las trabéculas se observan pigmentos que presentaron afinidad al colorante empleado, pudiendo estar relacionado con cristales de Ca^{2+} remanentes. La figura 36C demuestra, con mayor detalle la zona con deposición de Ca^{2+} , incluso se aprecia el trayecto circular de la trabécula.

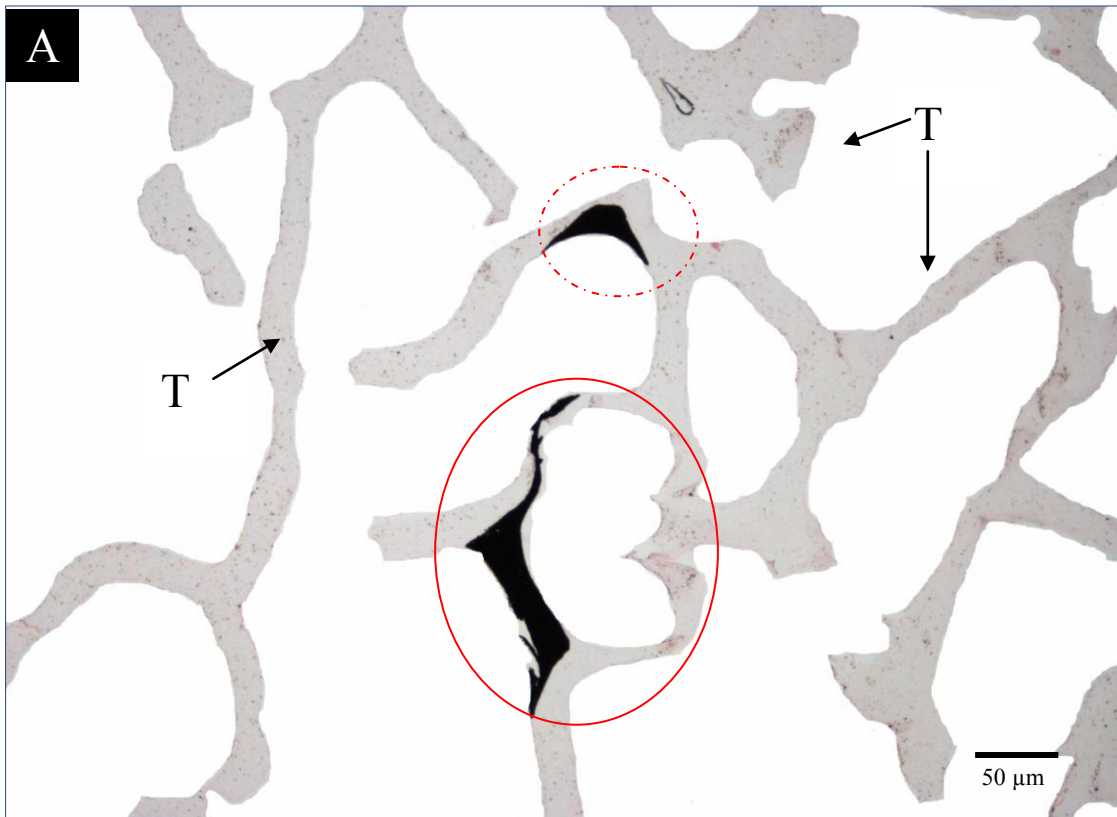


Figura 36 A. MOD teñida con von Kossa observada a 10X. T (trabécula). Círculo línea continua (mayor cantidad de Ca^+ en trabécula), círculo línea punteada (deposición de Ca^+ en menor cantidad) (Fuente: directa)

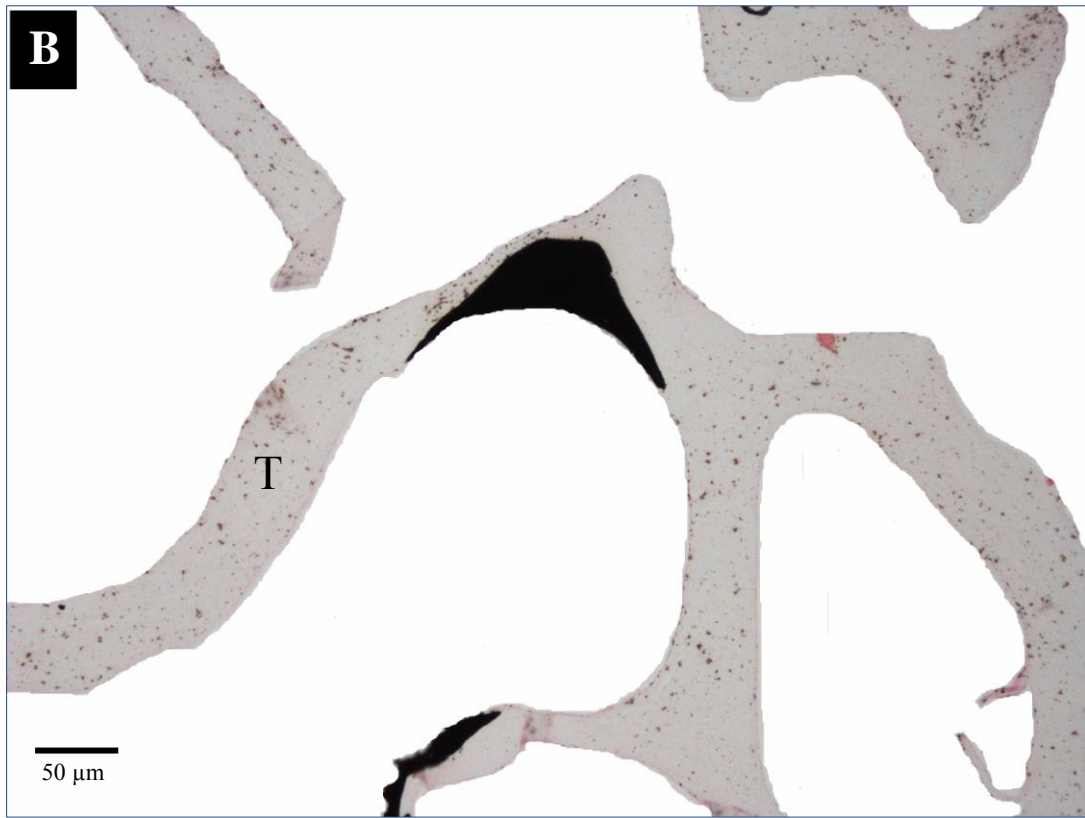


Figura 36 B. MOD teñida con von Kossa. 40X. T (trabécula) (Fuente: directa)

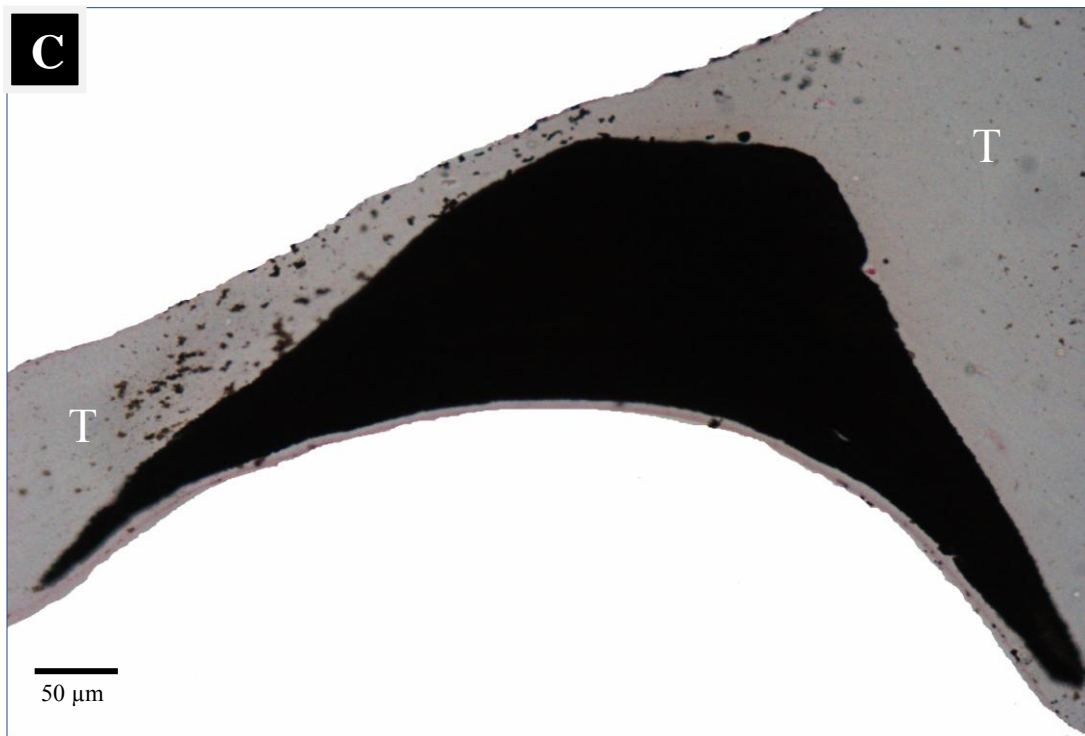


Figura 36 C. MOD teñida con von Kossa. 100X. T (trabécula) (Fuente: directa)

Luz polarizada.

La luz polarizada es un método empleado para la observación de los haces de fibras en tejidos formados por proteínas fibrosas, como por ejemplo músculo, permitiendo determinar la organización y grado de polimerización de las fibras de colágena en el tejido conectivo. (37) Para la observación de las fibras de colágena, las muestras no son teñidas.

La imagen 37A, corresponde a un aumento panorámico (10X) de la matriz ósea desmineralizada, observando las trabéculas que forman los poros, los cuales se observan heterogéneos en tamaño y forma. Los haces de fibras de colágena se pueden observar con mayor detalle en las imágenes 37B y C, donde la orientación observada depende del sitio donde se ubica, por lo que presenta un comportamiento anisotrópico, ya que permitió el paso de la luz a través de los haces de fibras de colágena, por lo que este material se puede considerar birrefringente.

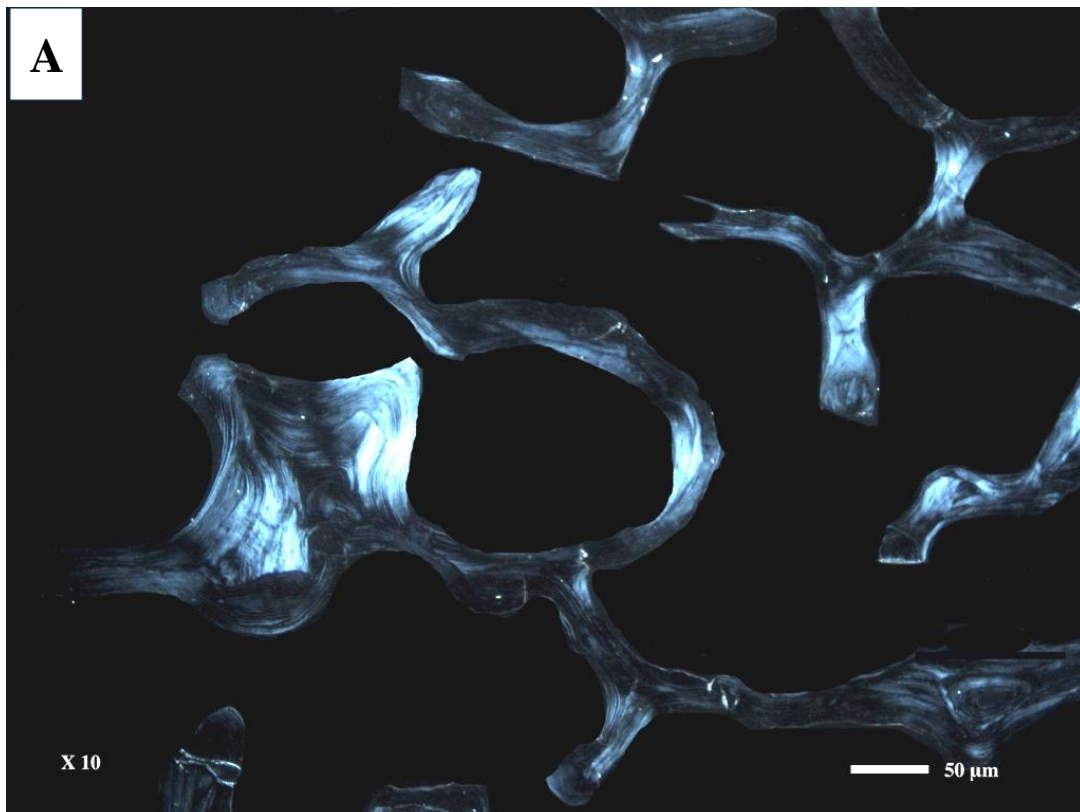


Figura 37A. Vista panorámica de la MOD con luz polarizada 10X. (Fuente: directa)

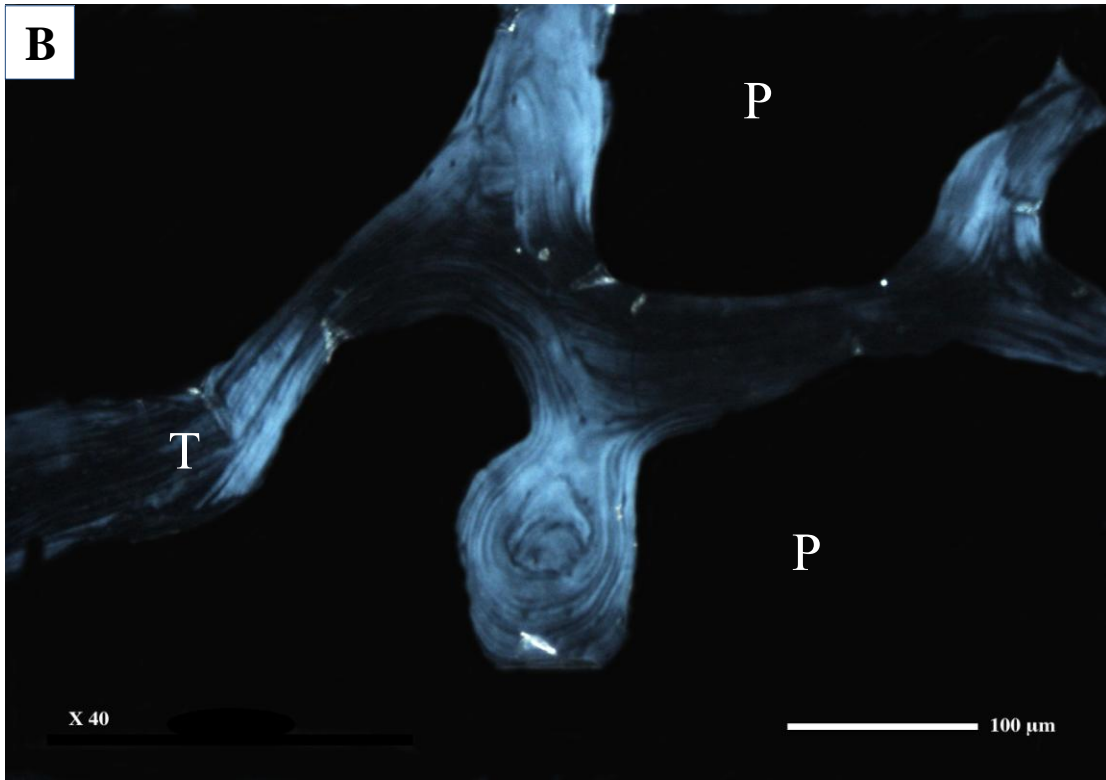


Figura 37B. Trabécula de la MOD 40X. T(trabécula) P (poro) (Fuente: directa)

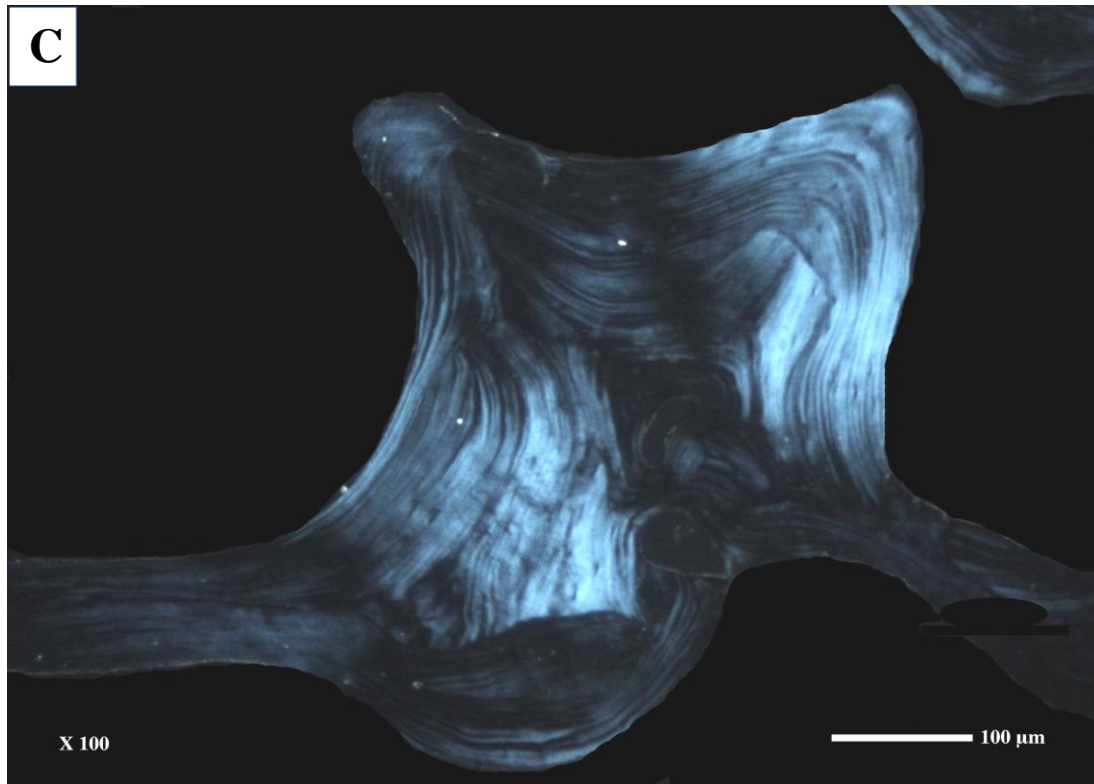


Figura 37C. Trabécula de la MOD 100X. (Fuente: directa)

La disposición (orientación) de los haces de fibras de colágena de las trabéculas observadas en la matriz desmineralizada utilizando la tinción de Masson y luz polarizada, coinciden con el trabajo presentado por Weiner (*Annu Rev Mater Sci*, 1998) ⁽³⁵⁾, donde propone las diferentes disposiciones de las fibras de colágena dependiendo de su ubicación anatómica en el tejido óseo, de acuerdo a la función que desempeñe en el cuerpo (Fig. 38). También se observó el mismo patrón de disposición tipo “a” (cuadro superior) de las fibras de colágena en la MEB de la zona orgánica de la MOD demostrada en la figura 40C.

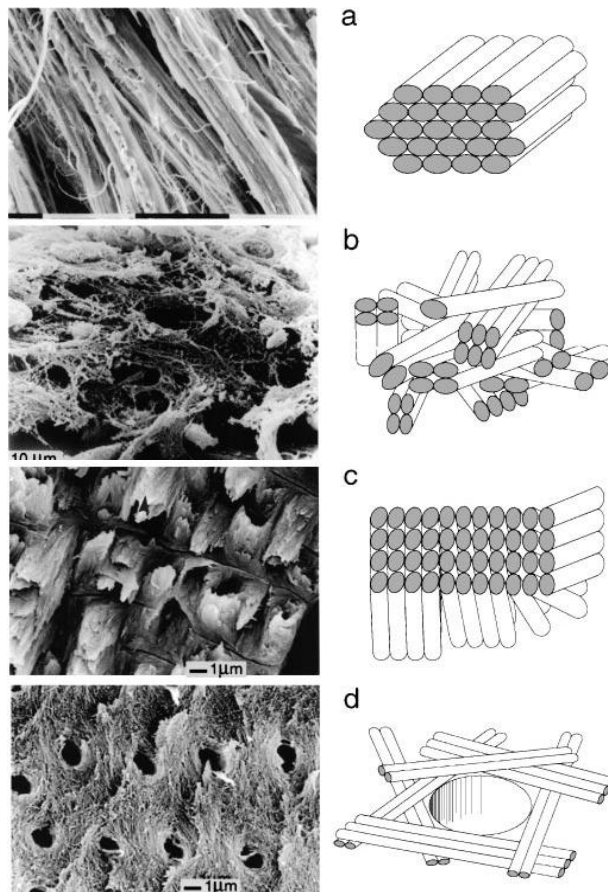


Figura 38.- Disposiciones de las fibras de colágena. Imagen tomada de: Weiner S.
a: arreglo paralelo de fibras (tendón mineralizado de pavo); **b:** fibras de colágena con arreglo, tamaño y grosor diferentes (fémur de feto de 19 semanas de edad); **c:** estructura parecida a la madera presente en el hueso lamelar (superficie de fractura de tibia de mandril); **d:** formación de fibras radiales (fractura de pulpa dentaria).

Microscopía Electrónica de Barrido (MEB)

La MEB permitió observar las características topográficas de la MO y la MOD, permitiendo establecer diferencias en las superficiales de ambos materiales.

La figura 39A, correspondiente a la MO se observan poros y una superficie lisa en la mayoría de la muestra analizada (★), estas observaciones son similares a las reportadas por Chen (*J Mechanical Beh Biomed Mat*, 2011) ⁽³⁸⁾ en hueso femoral de bovino. Existe otra zona con una superficie rugosa (*) al resto de la matriz.

La figura 39BA, con un mayor aumento (100X) se pueden distinguir con mayor detalle las diferencias en las superficies presentes en la muestra analizada. Estas dos topografías, pueden corresponder, en el caso de las regiones lisas a la HA (cerámica del hueso) y para la región rugosa corresponde a la porción orgánica (colágena del hueso). Los poros observados en esta figura tienen un tamaño aproximado de 100-200 μm . En el análisis de esta imagen, también se observó una zona de fractura en la región superior (círculo rojo), defecto característico en materiales cerámicos que han recibido una carga excesiva por compresión.

A un mayor aumento (250X), en la figura 39C se observa con mejor detalle los dos tipos de superficies presentes en la matriz ósea, incluso, se puede determinar que la superficie lisa cubre parcialmente la zona rugosa, lo cual puede relacionarse con los hallazgos encontrados en las zonas de las trabéculas no tenidas con la técnica tricrómica de Masson.

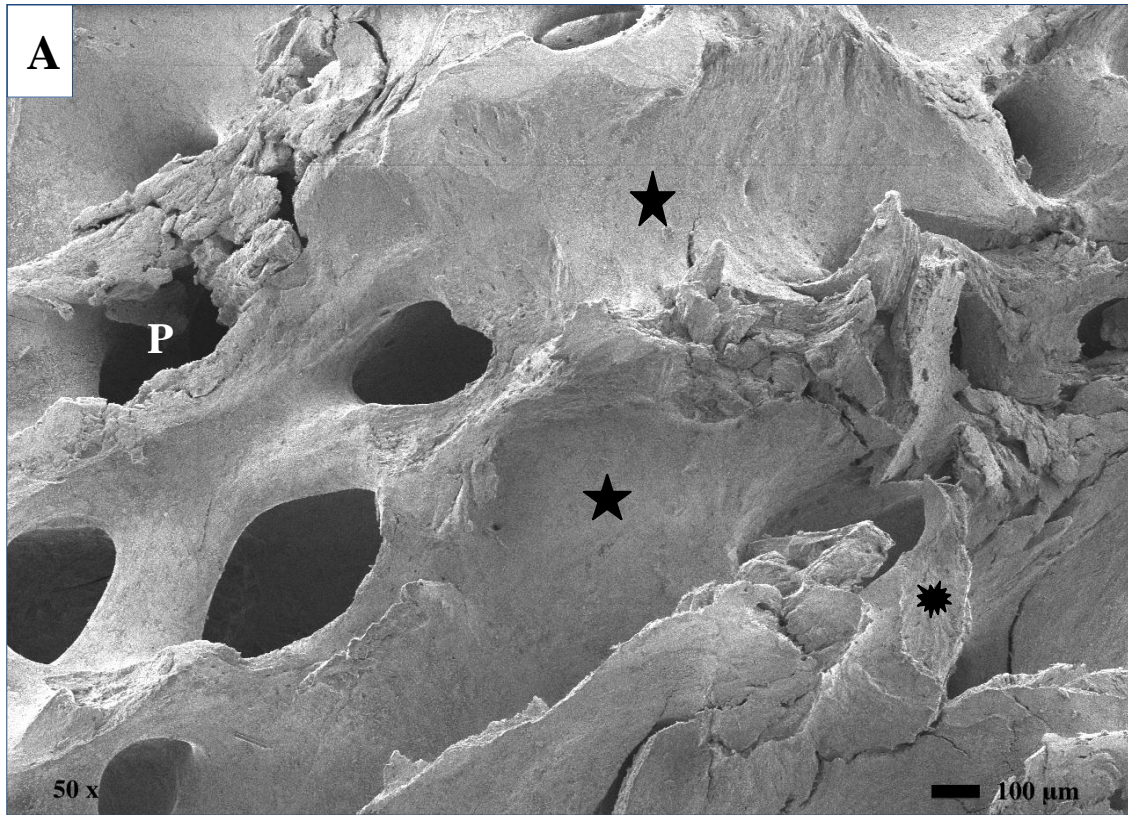


Figura 39A. MEB de la MO 50X. P (poro), ★(superficie lisa), ✱(superficie rugosa)
(Fuente: directa)

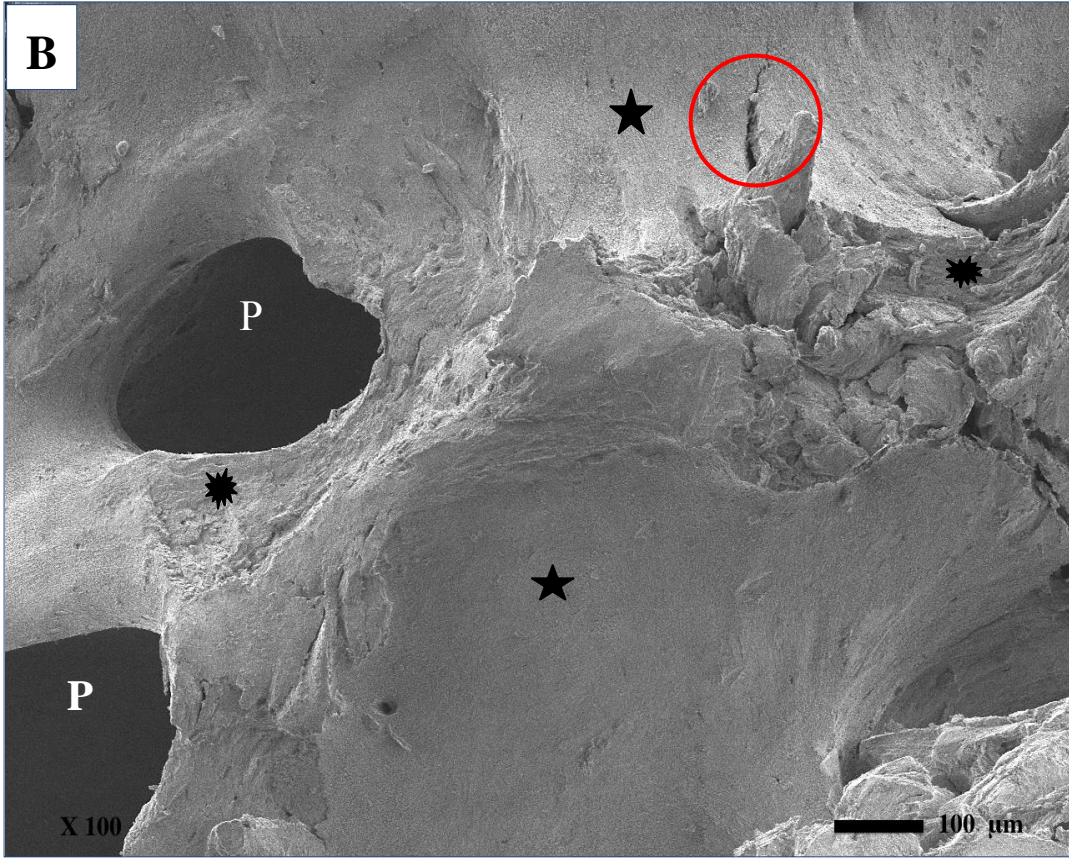


Figura 39B. MEB de la MO 100X. P (poro), ★(superficie lisa) ✱superficie rugosa)
Círculo rojo: zona de fractura (Fuente: directa)

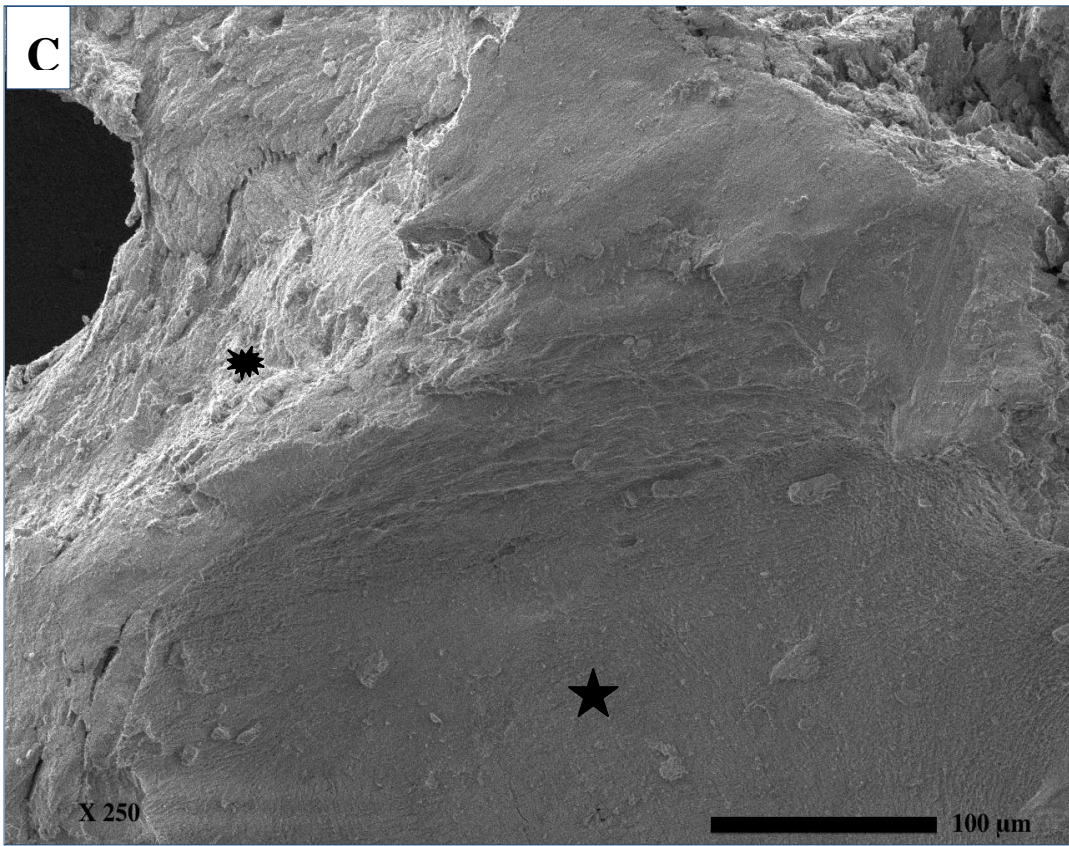


Figura 39C. MEB de la MO 250X.★ (superficie lisa), ★(superficie rugosa) (Fuente: directa)

Microscopia Electrónica de Barrido de la MOD

La figura 40A corresponde a una vista de 50X de la MOD, donde se puede observar un mayor número de poros, los cuales se observan interconectados, como una red trabecular. Debido a la técnica empleada de Electrones Secundarios (ES) se pudo observar una estructura tridimensional.

Los poros (P) tienen un tamaño en promedio de 100-500 μm . No se observa un patrón definido del trayecto ni del grosor de las trabéculas que forman los poros, los cuales se observan con diferentes formas geométricas.

Con mayor detalle de observación (250X) de la MOD, en la figura 40B ya se pueden distinguir dos superficies. La zona superficial (lisa) que cubre algunas zonas (rugosas), estos sitios analizados corresponden a las trabéculas de la MOD, determinando que las trabéculas están conformadas en su interior por haces de fibras de colágena y recubiertas por una capa de HA; esta misma disposición se presenta en tres trabéculas (rectángulo amarillo, círculo rojo y azul).

Con un mayor aumento de la zona observada (figura 40C) se corroboran los hallazgos del tipo de superficie en las trabéculas. Así mismo, la zona rugosa identificada (*) corresponde a la descripción realizada por Weiner (*Annu Rev Mater Sci*, 1998) ⁽³⁵⁾, con respecto a la organización de los haces de fibras de colágena.

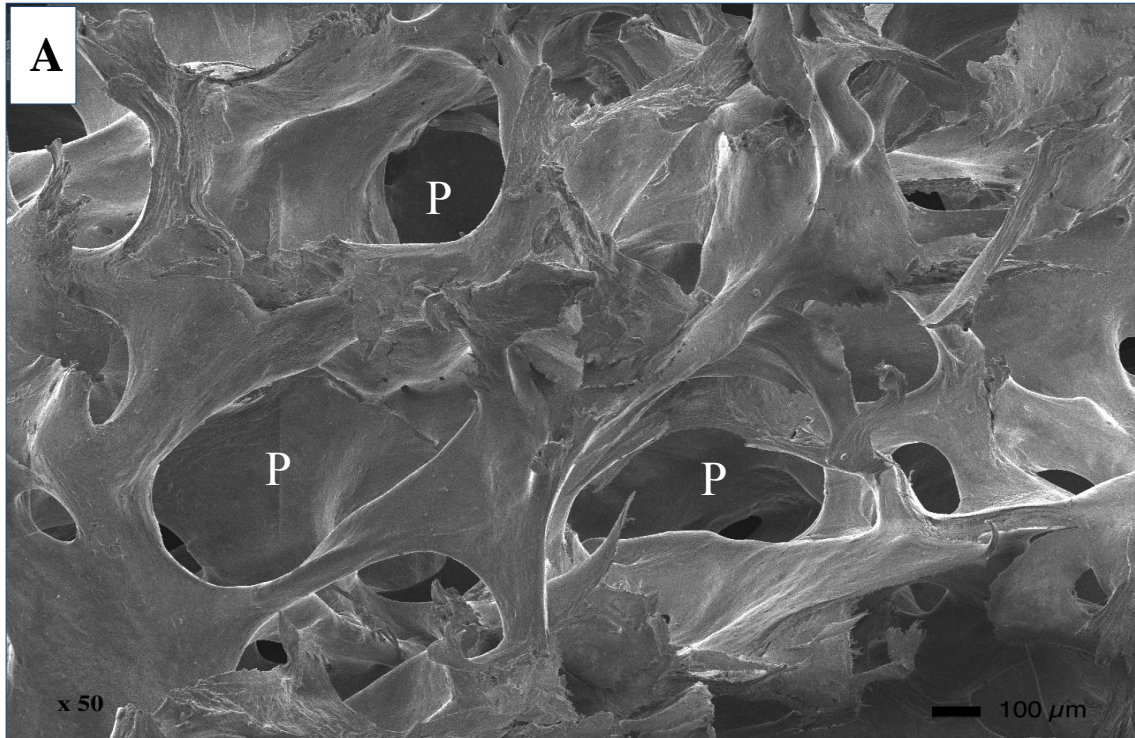


Figura 40A. MEB de la MOD. 50X. P (poro). (Fuente: directa)

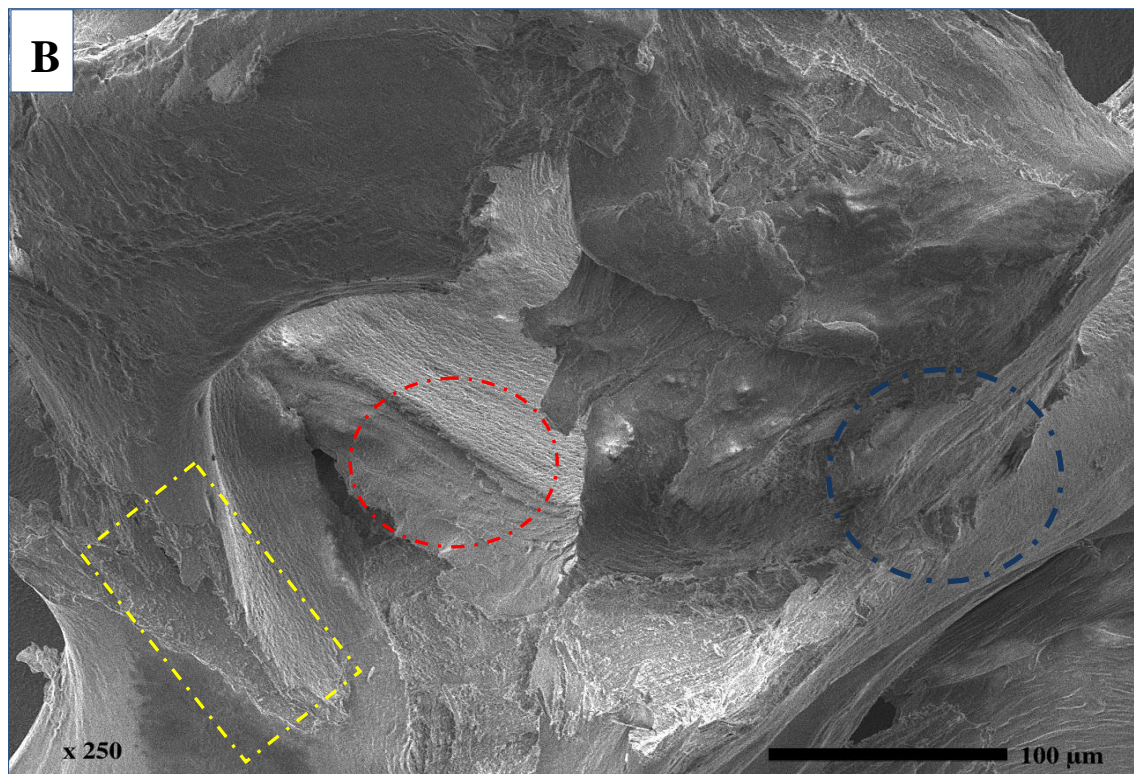


Figura 40B. SEM de la MOD 250X. Cubierta lisa sobre una superficie rugosa (rectángulo y círculos) (Fuente: directa)

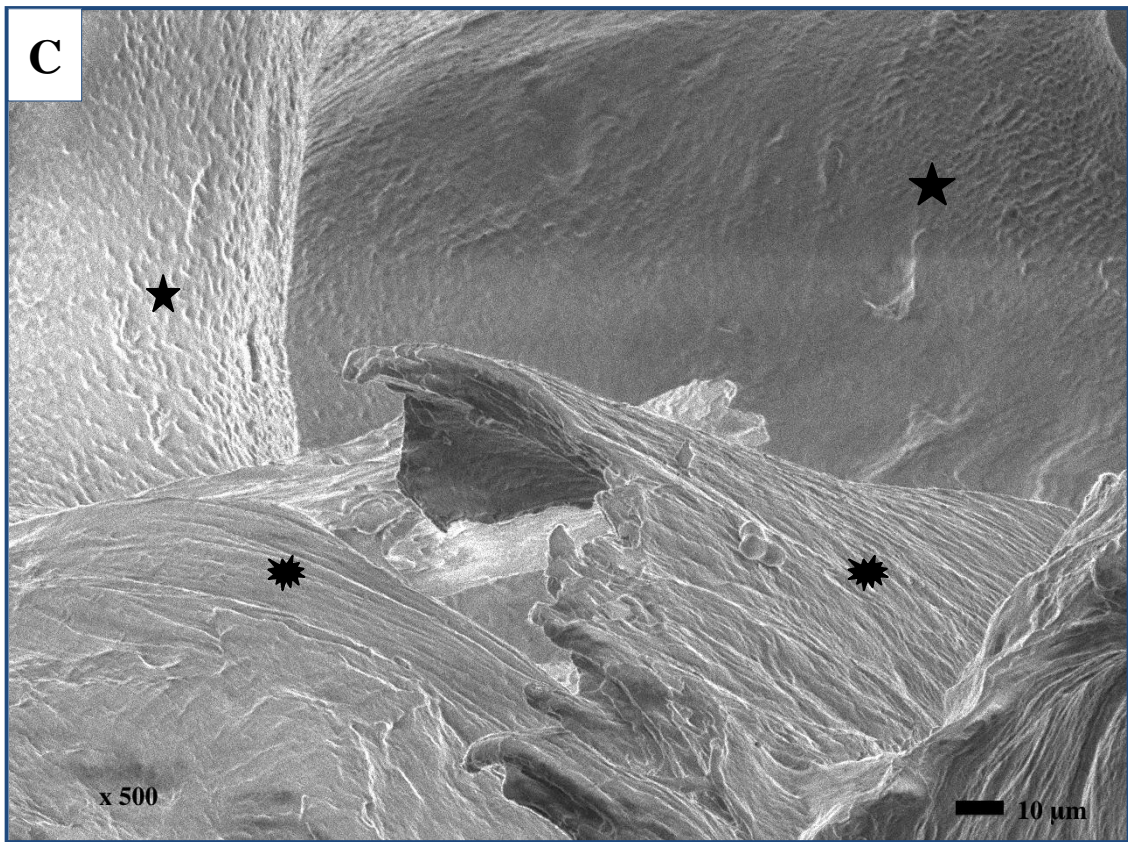


Figura 40C. MEB de la MOD 500X.★ (superficie lisa) ✱superficie rugosa)
(Fuente: directa)

Análisis químico elemental (EDS) de MOD.

La espectroscopia de dispersión de rayos X (EDS) permitió determinar los componentes principales de las dos zonas identificadas a través de MEB. Este tipo de análisis es puntual, por lo que se considera un análisis semicuantitativo, a pesar de analizar un sitio específico, se pudo identificar los elementos presentes en la superficie analizada.

Los elementos identificados de mayor porcentaje en la zona inorgánica (superficial), fueron: O (41.34%), Ca (29.36%), C (16.08%), P (12.16%), Mg (0.66%) y Na (0.39%) pudiendo estar asociado a cerámicas de fosfatos de calcio en particular al de HA [$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$] (Fig. 42A).

En la zona orgánica (interior) los elementos identificados de mayor porcentaje fueron: C (43.92%), N (23.87%) y O (23.87%) correspondientes a los grupos funcionales amidas (N-H, C=O), formados por los enlaces peptídicos de la colágena del componente orgánico (Fig. 42B).

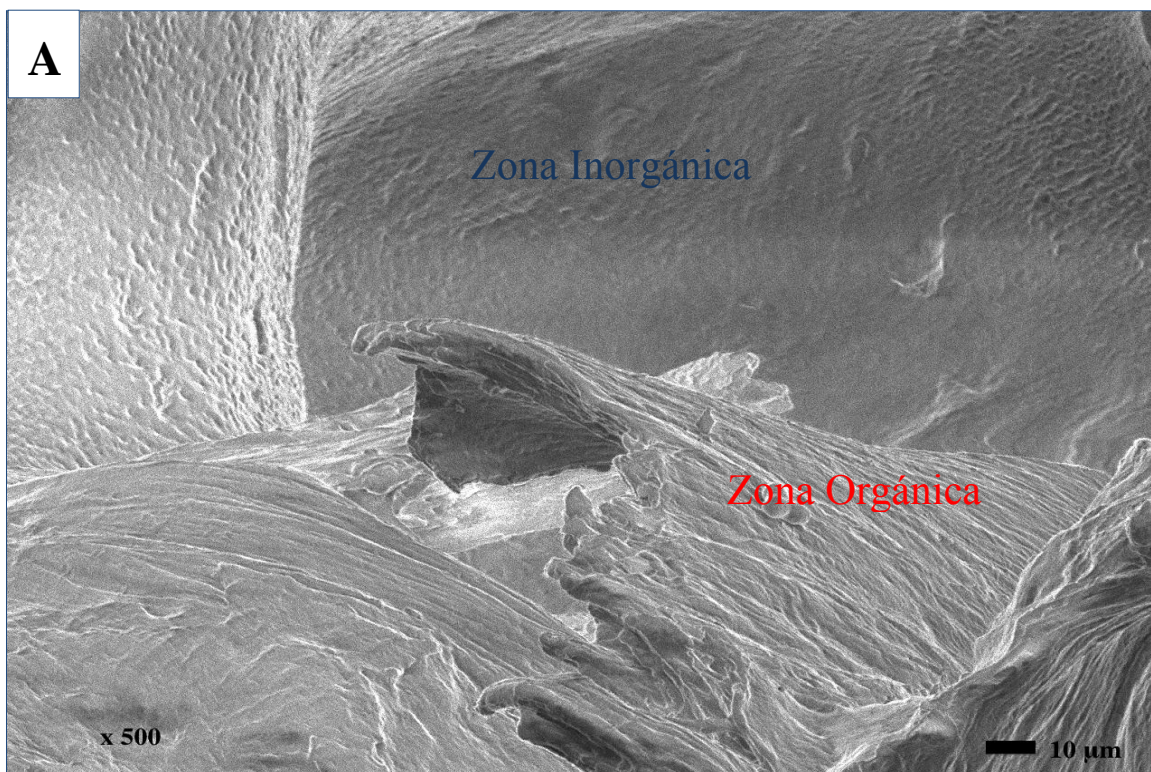


Figura 41A. MEB de la MOD 500X. (Fuente: directa)

Tabla 6. Elementos químicos identificados en la MOD

Matriz Ósea Desmineralizada		
ELEMENTO	Zona Inorgánica	Zona Orgánica
	Peso %	Peso %
C	16.08	43.92
O	41.34	31.41
P	12.16	ND
Na	0.39	ND
Mg	0.66	ND
Ca	29.36	ND
N	ND	23.87

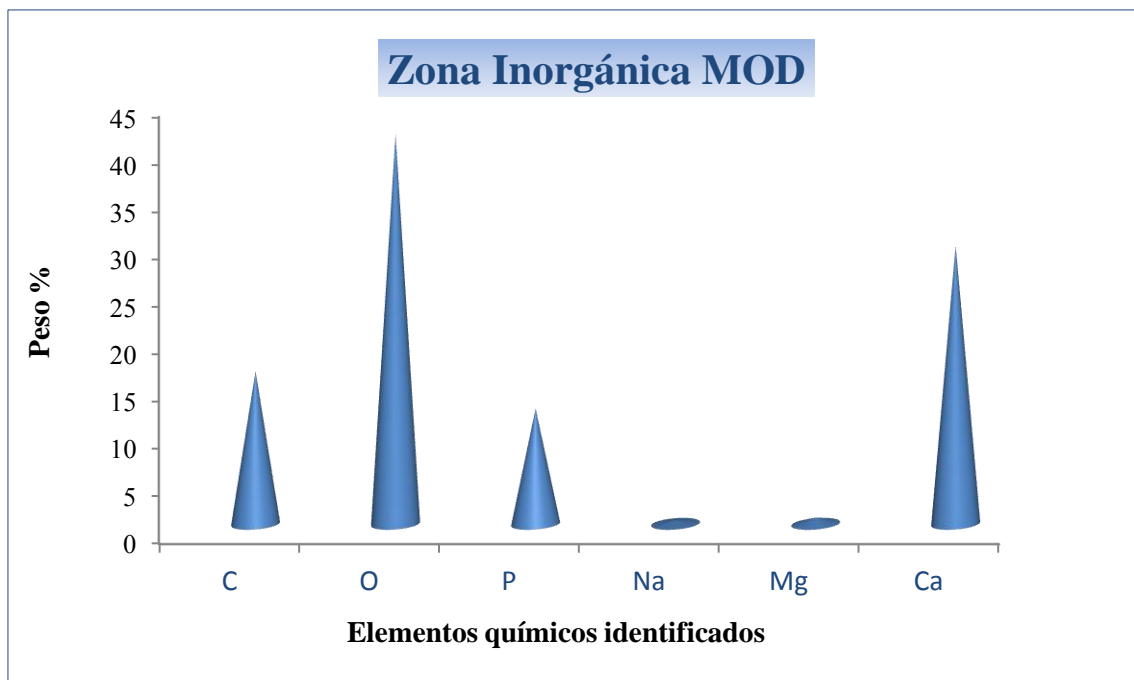


Figura 42A.- Elementos químicos identificados por EDS en la zona inorgánica de la MOD

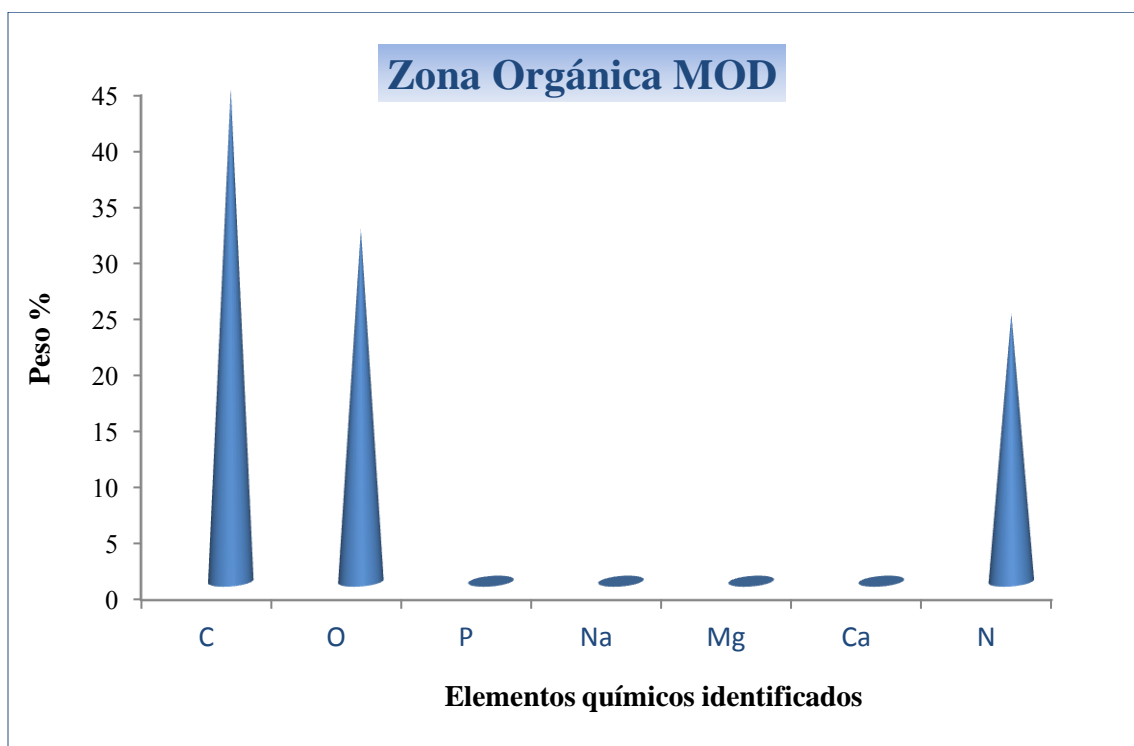


Figura 42B.- Elementos químicos identificados por EDS de la zona orgánica de la MOD

Difracción de Rayos X (DRX)

La difracción de rayos X permitió identificar los índices de Miller (hkl) de las matrices mineralizada (figura 43A) y desmineralizada (figura 43B), los difractogramas obtenidos fueron comparados con el archivo número 09-432 de la Joint Committee Powder Diffraction (JCPD) correspondiente a hidroxiapatita sintética.

En los difractogramas, tanto de la MO como de la MOD (figura 43A-B) se observan los picos $2\theta = 25.8^\circ$ (002), 31° (121), 32° (112) y 33° (300) respectivamente.

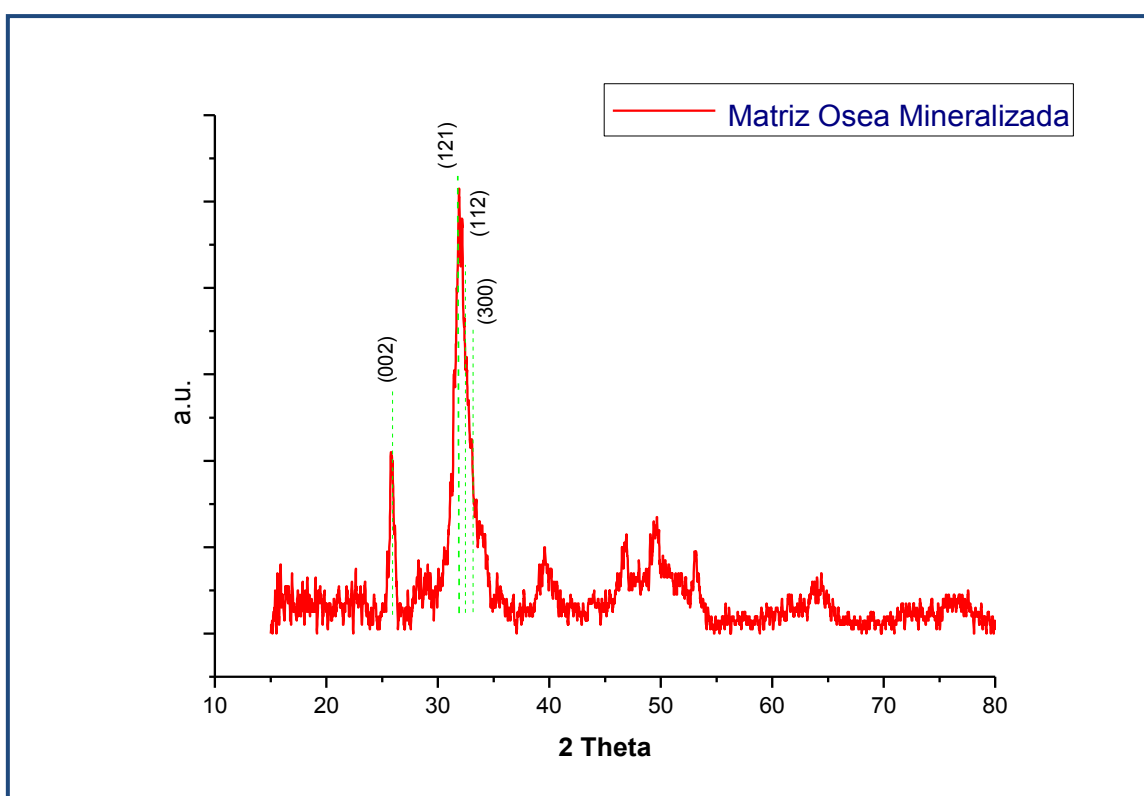


Figura 43A.- Difractograma de la MO. Línea roja: difractograma; línea punteada verde: Índices de Miller (Fuente: directa)

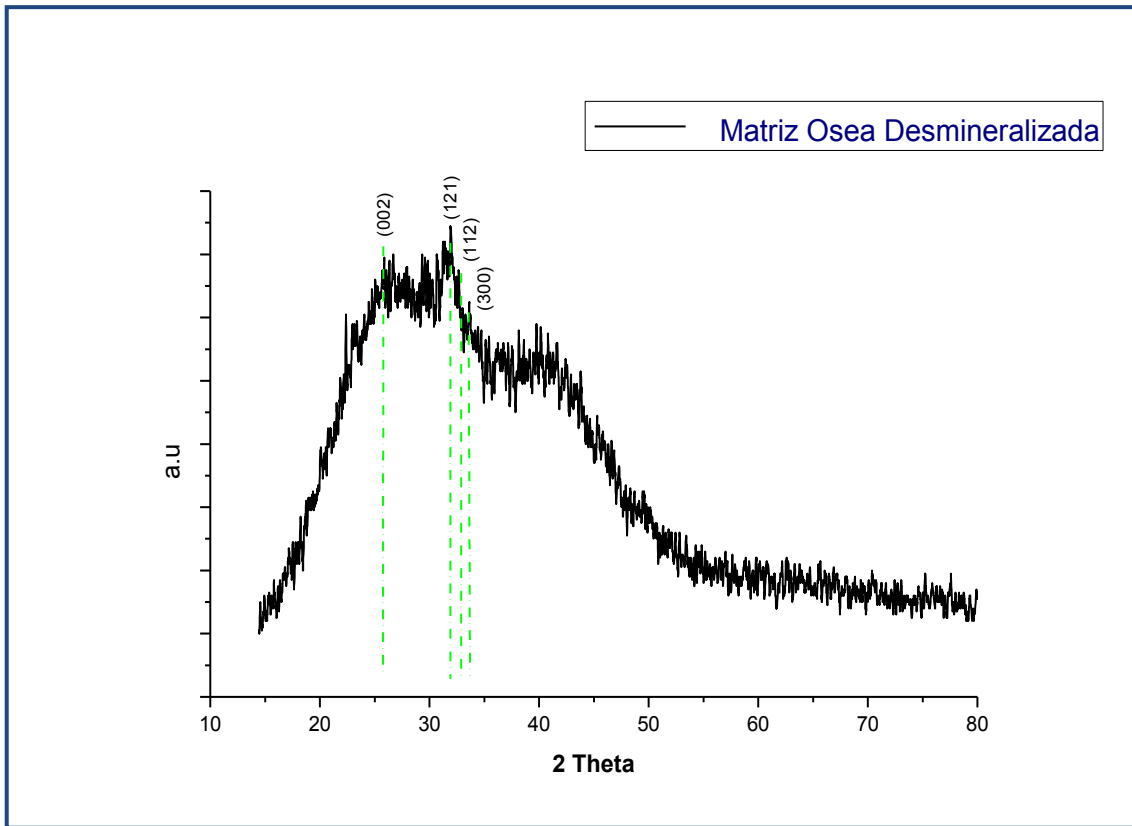


Figura 43B.-Difractograma MOD. Línea negra: difractograma; línea punteada verde: índices de Miller (Fuente directa)

Espectroscopia Infrarroja (IR)

Los resultados obtenidos a través de esta técnica permitieron identificar los grupos funcionales de la parte orgánica de la MOD como se observan en la figura 44, incluso existe una banda correspondiente al grupo PO_4 (1076cm^{-1}). Estos hallazgos coinciden con lo reportado por Coman (*J Optoelect Adv Mater*, 2007) ⁽³⁹⁾ quien analizó comparativamente los huesos de bovino, de cráneo humano, de cuerno de ciervo, de cerdo y de pez.

Sionkowska (*Int J Biol Macro*, 2010) ⁽⁴⁰⁾, reportó también las bandas características de la colágena obtenida de tendón de cola de rata, la cual es 99% colágena; así como el grupo PO_4 de la hidroxiapatita sintética (1085cm^{-1})

Los grupos funcionales identificados tanto en la MOD como en los reportes de Coman y Sionkowska, fueron: amida A, B, I, II y III (grupos funcionales de los enlaces peptídicos de la proteína colágena)

La tabla 7 resume los espectros observados en la MOD, de las membranas comerciales de la marca Collatape (Fig. 45) y ACE (Fig. 46).

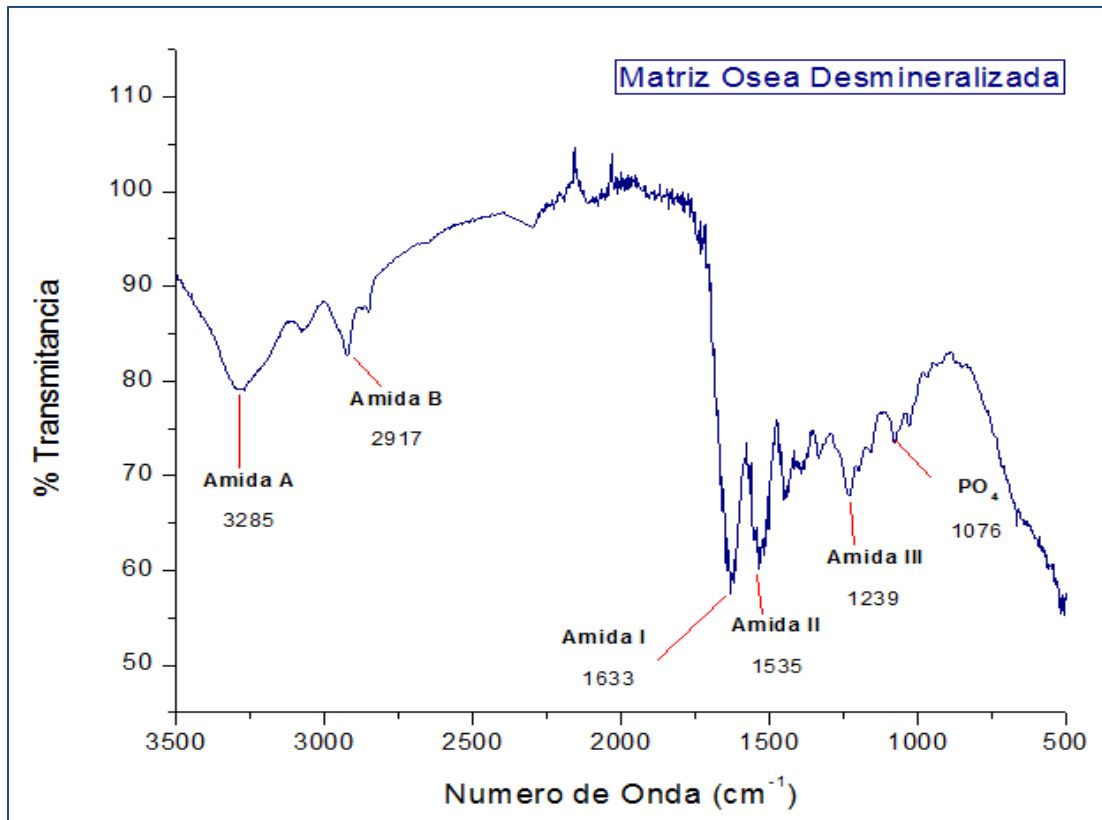


Figura 44. Espectro IR de la MOD. Identificación de los grupos amidas y fosfatos. (Fuente: directa)

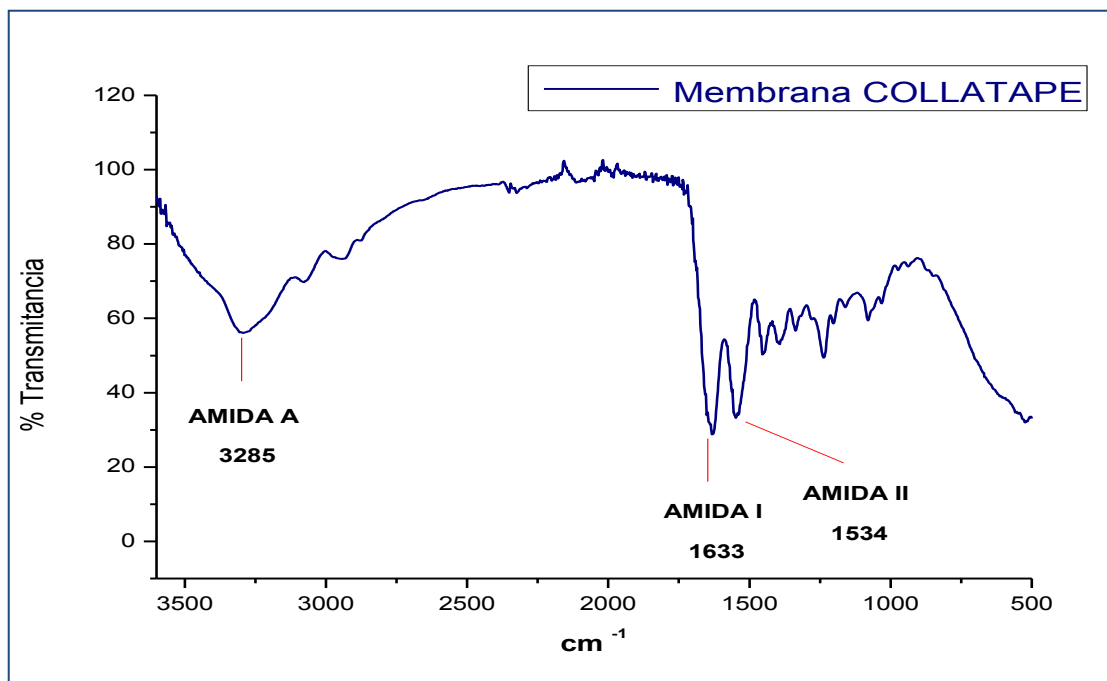


Figura 45. Espectro IR de la membrana COLLATAPE. Identificación de grupos amidas. (Fuente: directa)

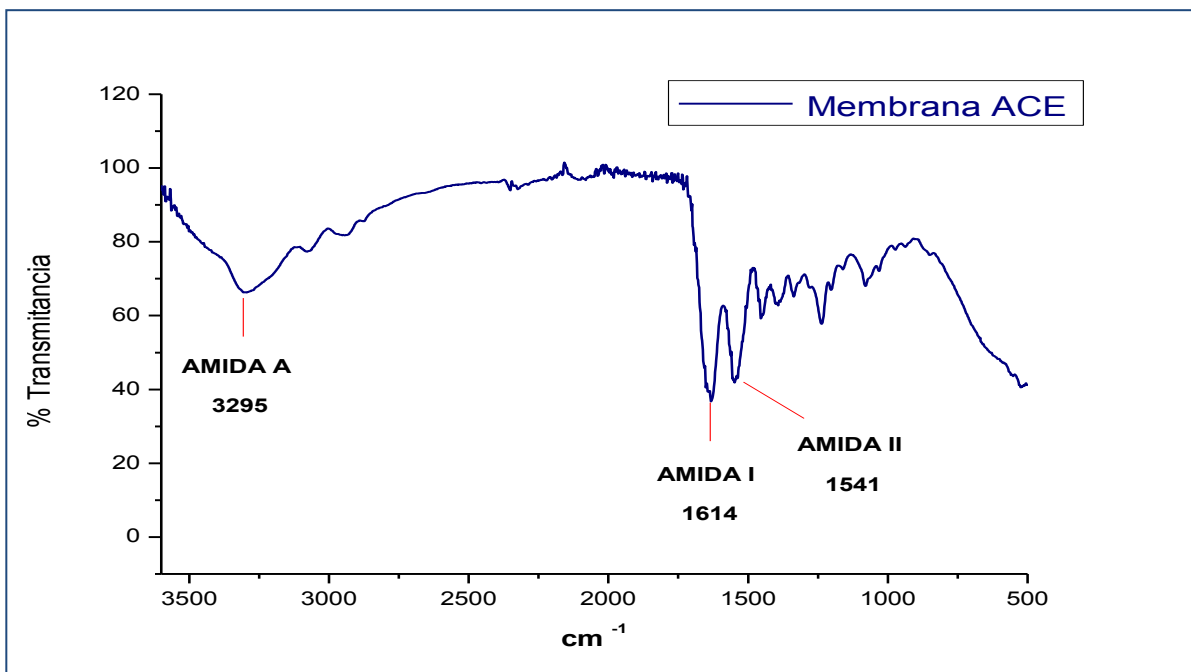


Figura 46. Espectro IR de la membrana ACE. Identificación de grupos amidas. (Fuente: directa)

Tabla 7. Grupos funcionales del componente orgánico de la MOD

Grupo funcional	IR (cm ⁻¹)*	Nuestro estudio		
		MOD	Collatape	ACE
CH ₃	2956 sh	-	-	-
CH ₂	2924 m	-	-	-
Amida I (C=O)	1650-1665 s	1633	1633	1614
Amida II δ (N-H) + ν (C-N)	1530-1550 m	1535	1534	1541
Amida III δ (N-H) + ν (C-N)	1239 w	1239	-	-
Amida A (N-H)	3325-3330 st	3285	3285	3295
Amida B (CH ₂)	3080	2917	-	-

Intensidad relativa: vs=muy fuerte, s=fuerte, m=medio, w=débil, sh=hombro, st=estrecho

* Coman V. et al. *J Optoelec Adv Mat.* 2007

Análisis Térmico Gravimétrico (ATG)

El análisis térmico gravimétrico proporcionó información referente al comportamiento que presentó la MO en comparación con la MOD.

Las principales pérdidas se presentaron en tres diferentes intervalos de temperatura, divididas en área A (50°C-200°C), B (200°C-450°C) y C (450°C-700°C).

El área A se identificó como la primera pérdida correspondiente al agua fisisorbida localizada en la superficie del material; en la MO fue de 6.07% a los 79 °C Vs la MOD que perdió 9.6% a los 114.74 °C, como se puede observar en la figura 47; estos hallazgos son similares a los reportados por Lozano et al (*J Mater Sci*, 2003) ⁽⁴¹⁾ quienes analizaron muestras de hueso humano, extractos de colágena ósea tipo I (obtenida por el método de desmineralización con EDTA) y colágena comercial de tendón de Aquiles de la especie bovina.

La siguiente pérdida, identificada como área B en el termograma, se observó en la MO entre los 341-493 °C correspondiente al 30.34% comparado con la MOD correspondiente a 67.76% a los 311.63 °C; estas pérdidas se relacionaron a la combustión de la colágena de ambas muestras. Las diferencias en la segunda pérdida de masa en la MOD pudieron ser debidas a la estructura de las trabéculas (confirmado por MOp y MEB) desprovistas de la fase mineral (HA), por lo que la combustión se presentó a una menor temperatura.

Por último, el área C, correspondió al intervalo entre 450°C y 700°C, observando un cambio mínimo en la pérdida de la masa; quedando un residuo del 63.59% en la MO Vs 25.64% en la MOD.

Los datos obtenidos de los termogramas correspondientes de la MO y MOD se resumen en la tabla 8.

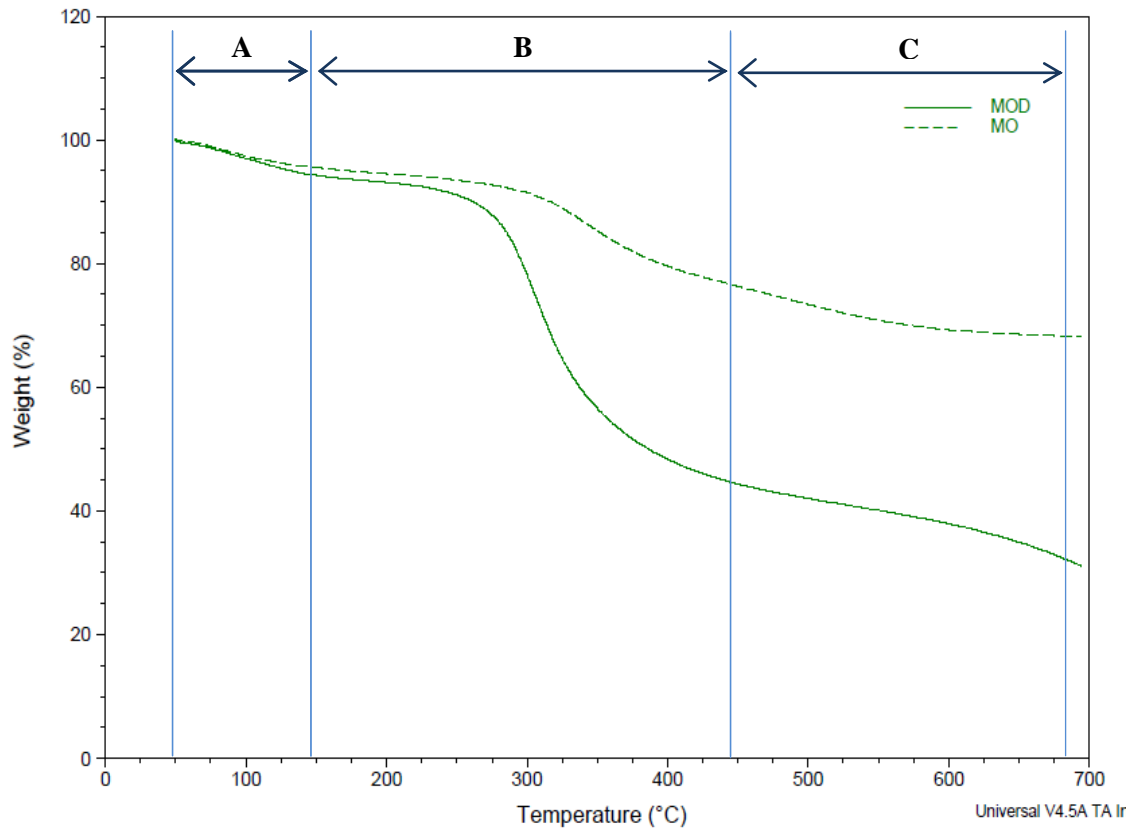


Figura 47. Análisis térmico gravimétrico de la MOD y MO. Línea verde continua corresponde a la MOD; línea verde discontinua corresponde a la MO. (Fuente: directa)

Tabla 8. Análisis termo gravimétrico de la MO y MOD

Análisis Termo Gravimétrico				
	MO		MOD	
	Pérdida de masa (%)	°C	Pérdida de masa (%)	°C
Pérdida de Agua Desnaturalización de la colágena	6.07	79.69	9.6	114.76
Combustión de las fibras de colágena	30.34	341/493	64.76	311.63
Residuo	63.59	700	25.64	700

Calorimetría Diferencial de Barrido (CDB)

Esta técnica permitió identificar los cambios en las variables termodinámicas ocurridas durante las transformaciones físico-químicas inducidas por el calentamiento o enfriamiento de la MO y de la MOD.

El primer pico endotérmico observado en ambas matrices se presentó entre los 85-90 °C, correspondiente al proceso de deshidratación del agua superficial (Fig. 48); este resultado también se presentó en el estudio realizado por Lozano et. al. (*J Mater Sci*, 2003)⁽⁴¹⁾

El segundo fenómeno endotérmico observado en la MOD y en la MO fue en el intervalo entre los 275°C y 325°C; esto se relaciona a la pérdida de los puentes de hidrógeno, por lo que pudiera iniciar el fenómeno de desnaturalización de la proteína, en la cual se perdería la estructura terciaria correspondiente a la triple hélice; este fenómeno es reversible si se cumplen nuevamente con las condiciones de hidratación de la proteína.

En la figura 48, se identificó el proceso exotérmico en ambas muestras (MOD y MO) observado en un intervalo entre 350°C y 425°C, la cual corresponde a la combustión de las fibras de colágena.

Los resultados obtenidos con la técnica CDB se complementaron con los ATG, donde se infiere que MO y MOD está constituida básicamente por tres componentes que son agua, colágena e hidroxiapatita.

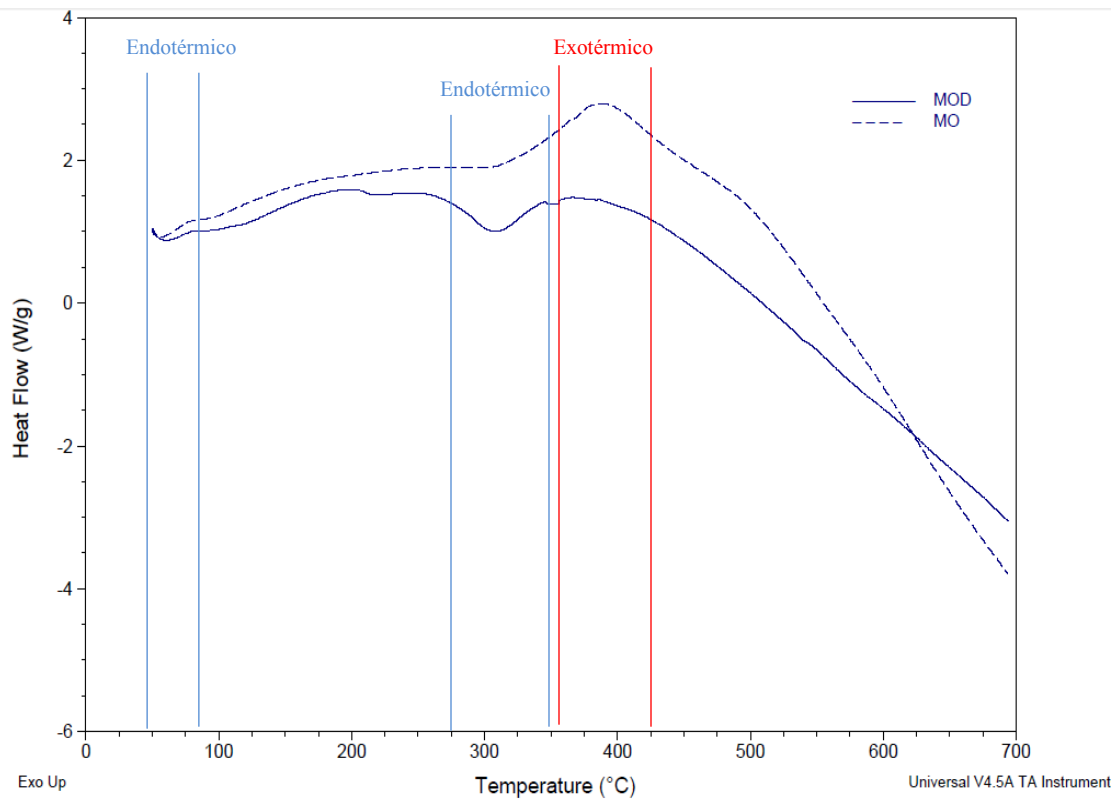


Figura 48. Termograma DSC de la MOD y MO. Línea azul continua corresponde a la MOD; línea azul discontinua corresponde a la MO. (Fuente: directa)

Determinación de área superficial por BET

Este método determinó el área superficial total de la MO, en comparación con la MOD. Los resultados obtenidos con esta técnica fueron: 5.39 m²/g para la MO fue y 7.34 m²/g para la MOD. Estos resultados son similares a los obtenidos por Bosch et al (J Archeolog Sci, 2011) ⁽⁴²⁾ que analizó hueso de la era Neolítica y contemporánea, encontrando un área superficial entre 2 y 7 m²/g.

La diferencia del área superficial total entre la MO y la MOD determinada por este método fue de 36.18 %; este resultado obtenido puede ser utilizado en estudios in vitro para conocer con más aproximación, cuál es el área efectiva que estará en contacto con células.

La figura 49A muestra la isoterma que presentó la MO, en la cual se observa que no hubieron cambios (histéresis) entre la adsorción representada por la línea roja punteada y la desorción, línea azul.

La isoterma de la MOD se muestra en la figura 49B, observando un diferencia mínima entre la adsorción y desorción del gas.

Las isotermas observadas en ambos materiales (MO y MOD) corresponden al tipo II que de acuerdo con la clasificación de la IUPAC, corresponde a macroporoso de tipo abierto.

La tabla 9 resume todos los datos obtenidos.

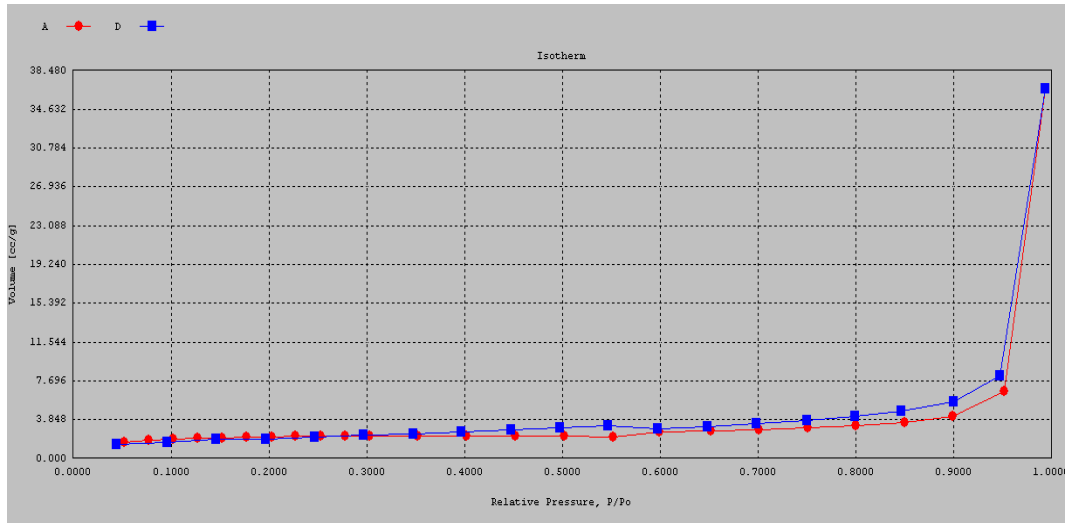


Figura 49A. Isotherma de la MO. Línea roja: adsorción; línea azul: desorción. (Fuente: directa)

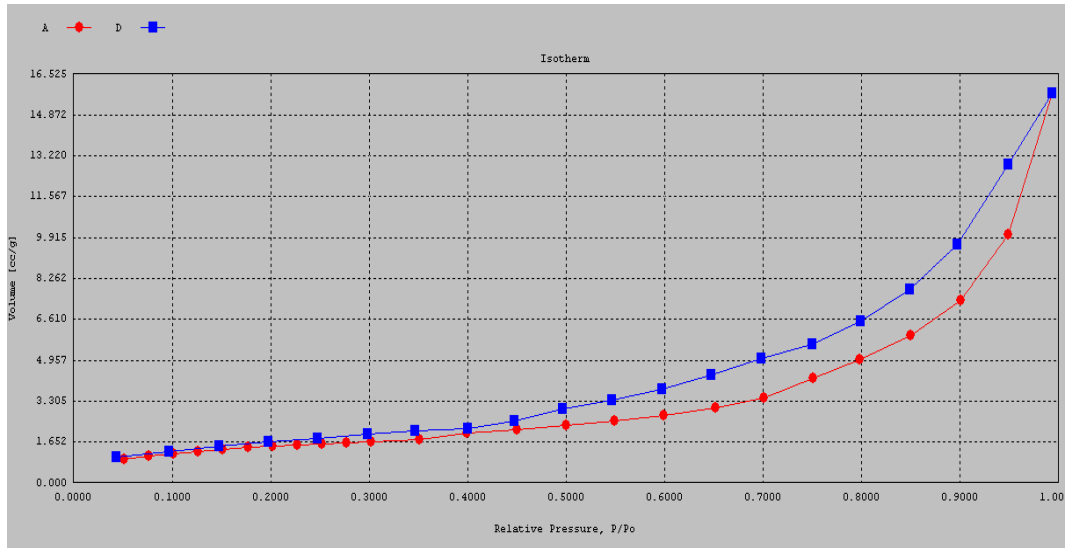


Figura 49B. Isotherma de la MOD. Línea roja: adsorción; línea azul: desorción (Fuente directa)

Tabla 9. Áreas superficiales y tipos de isothermas de la MO y MOD

	Área Superficial (m ² /g)	Isoterma	Tamaño de Poros*	Forma del poro*
MO	5.39	Tipo II	Macroporo	Abierto
MOD	7.34	Tipo II	Macroporo	Abierto
Diferencia	36.18 %			

* Clasificación de poros según la IUPAC ⁽²⁸⁾

Macroporos medidos por SEM

A través de MEB se comparó el tamaño de los poros antes y después de la desmineralización. Las imágenes (50 A-B) de MEB permitieron realizar mediciones a la matriz mineralizada, para posteriormente desmineralizarla y obtener una MOD; se observa que en los sitios (poros) donde se realizaron las mediciones, no hubo diferencia en las medidas realizadas. Observando poros de diferentes tamaños entre 180-350 μ m. En un estudio publicado por Murphy (*Biomaterials*, 2010) ⁽⁴³⁾ reportó que el tamaño óptimo de poro para favorecer la proliferación y migración celular en ingeniería de tejido óseo es de 325 μ m.

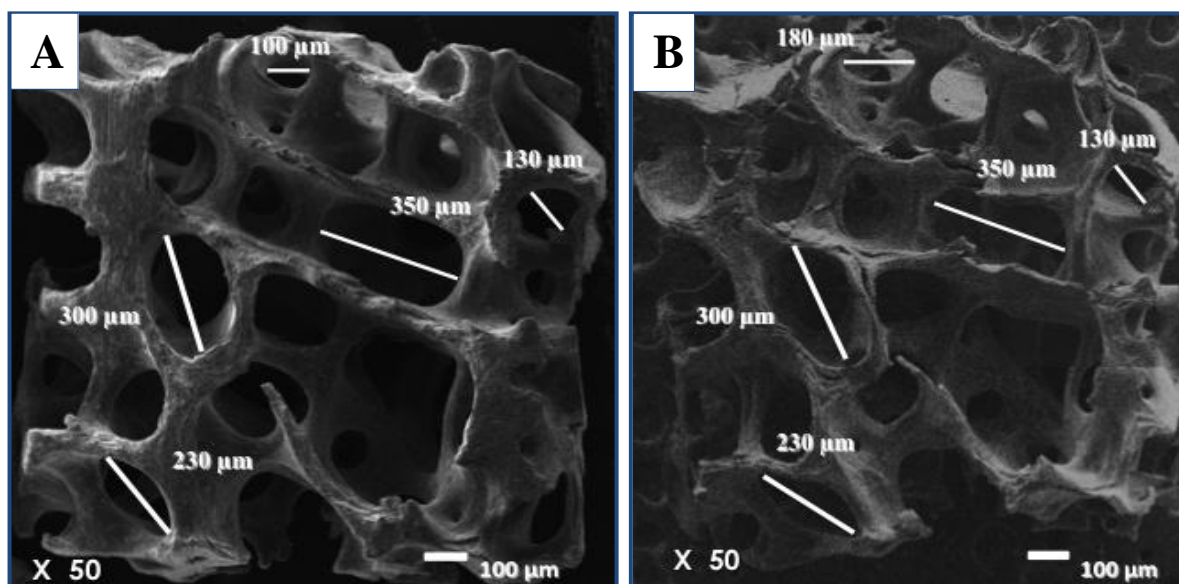


Figura 50 A-B MEB 50X. Mediciones de poros
A) MO B) MOD (Fuente: directa).

CAPÍTULO 5. CONCLUSIONES

Se logró obtener una matriz ósea desmineralizada a partir de una matriz mineralizada con el uso de HCl, la cual conservó la porosidad e interconexión; también se preservó el componente orgánico (colágena) corroborado a través de microscopia óptica con la tinción tricrómica de Masson. La presencia y orientación de las fibras de colágena se determinó a través de luz polarizada.

Mediante microscopia electrónica de barrio se determinó la disposición de la fase inorgánica (hidroxiapatita) con respecto a la fase orgánica (colágena) como componentes esenciales de las trabéculas de la MOD. Estas trabéculas están formadas en su interior por los haces de las fibras de colágena, las cuales están cubiertas completamente por la hidroxiapatita.

Los grupos amidas funcionales de la colágena como proteína están presentes en la MOD, determinados mediante espectroscopia infrarroja.

Las técnicas de análisis térmico permitieron establecer que la MOD está parcialmente desmineralizada, con un remanente inorgánico aproximado del 25%. Así mismo, mediante los procesos exotérmicos y endotérmicos se establece que la MO es más estable térmicamente que la MOD.

Mediante difracción de Rayos X, se confirmó la desmineralización parcial de la MOD, ya que en la difracción de Rx se observan picos característicos de la fase mineral del hueso.

El área superficial total de la MO y MOD ya fue determinada mediante la técnica de adsorción de N₂, datos que servirán para investigaciones futuras relacionadas con ingeniería de tejidos.

El tamaño y forma de los poros de la MOD en comparación con la MO analizados por microscopia electrónica de barrio no se modificaron.

Finalmente, este biomaterial se propone para ser empleado como andamio en la regeneración tisular a través de los fenómenos de inducción y conducción en el sitio colocado.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. **Lizarde, MA.** Sustitutos de tejidos: de los biomateriales a la ingeniería tisular. *Rev R Acad Cienc Exact Fis Nat (Esp)*. 2007, Vol. 101, 1, pp. 227-249.
2. **Bargiela P, Torres D, Gutierrez JL.** Regeneración Ósea Guiada (ROG). *SECIB*. 2009, Vol. 4, pp. 1-8.
3. **Pagliari, GA.** *Diplome D'Universite D'Implantologie Oral et Mxilo-Faciale*. Italia : s.n., 2001.
4. **Urist MR, Strates BS.** Bone morphogenetic protein. *J Dent Res*. 1971, Vol. 35, pp. 505-520.
5. **Kim, YK.** A clinical of bone formation using a demineralized bone matrix and resorbable membrane. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2010, Vol. 109, pp. e6-e11.
6. **Dinatale E, Guercio E.** Regeneración ósea guiada (GRB). Revisión de la literatura. *Acta Odontológica Venezolana*. 2008, Vol. 46, 4, pp. 1-10.
7. **Decco OA, Engelke W, Barreiro J, Cura A, Ruscio ML.** Regeneración ósea guiada con membranas de PLA/PGA microfijadas en un modelo experimental. *Ciencia, Docencia y Tecnología*. 2009, Vol. XX, 38, pp. 191-203.
8. **Williams, FD.** On the mechanisms of biocompatibility. *Biomaterials*. 2008, Vol. 29, pp. 2941-2953.
9. **Park J, Bronzino J.** *Biomaterials Principles and Applications*. Boca Raton, Florida : CRC Press, 2003.
10. **Geneser, F.** *Histología*. 3a . Buenos Aires, Argentina : Médica Panamericana, 2000.
11. **Lynch SE, Genco R, Marx R.** *Tissue engineering: Applications in maxillofacial surgery and periodontic*. s.l. : Quintessence, 1999.
12. **Chen PY, Torian D, Price PA, McKittrick J.** Minerals form a continuum in mature cancellous bone. *Calcif Tissue Int*. 2011, Vol. 88, pp. 351-361.
13. **Ross MH, Pawlina W.** *Histología. Texto y atlas a color con biología celular y molecular*. s.l. : Médica Panamericana, 2007.
14. **Nyman S, Karring T, Lindhe J, Plantén S.** Healing following implantation of periodontitis-affected roots into gingival connective tissue. *J Clin Periodontol*. oct 1980, Vol. 7, 5, pp. 394-401.

15. **Nyman S, Lindhe J, Karring T, Rylander H.** New attachment following surgical treatment of human periodontal disease. *J Clin Periodontol.* jul 1982, Vol. 9, 4, pp. 290-296.
16. **Campbell CD, Goldfarb D, Roe R.** A small artery substitute, expanded microporous polytetrafluoroethylene: patency versus porosity. *Ann Surg.* August 1975, Vol. 182, 2, pp. 138-143.
17. **Stahl S, Froum S, Tarnow D.** Human histologic responses to guided tissue regenerative technique in intrabony lesions. *J Clin Periodontol.* 1990, Vol. 17, pp. 191-198.
18. **Barrera EH, Cárdenas RR.** *El Microscopio óptico.* México D.F. : UNAM, 1997.
19. **Giraldo, GD.** *Obtención de un andamio acelular para substitución de tráquea.* México DF : UNAM. Tesis de Maestría en Ciencia e Ingeniería de Materiales., 2011.
20. **Montuenga BL, Esteban RF, Calvo GA.** *Técnica en Histología y Biología Celular.* Barcelona, España : Elsevier Masson, 2009.
21. **Vázquez NG, Echeverría O.** *Introducción a la Microscopia Electrónica aplicada a las Ciencias Biológicas.* México D.F. : Fondo de Cultura Económica, 2000.
22. **Benavente, GD.** *Modelización y estimación de la durabilidad de materiales pétreos porosos frente a la cristalinización de sales.* Alicante, España : Tesis Doctoral, 2002.
23. **Skoog DA, Holler FJ, Crouch SR.** *Análisis Instrumental.* 6a . México : CENGAGE Learning, 2008.
24. **Albella JM, Cintas AM, Miranda T, Serratosa JM.** *Introducción a la Ciencia de Materiales. Técnicas de Preparación y Caracterización.* Madrid : Consejo Superior de Investigaciones Científicas, 1993.
25. **Langmuir, I.** The constitution and fundamental properties of solid and liquids. *Met Chem Eng.* 1916, Vol. 15, p. 468.
26. **Brunauer S, Deming L, Deming W, Teller E.** 1940, Vol. 62, p. 1723.
27. **Bosch P, Alemán I, Moreno C, Botella M.** Boiled versus unboiled: a study on Neolithic and contemporary human bones. *Journal of Archaeological Science.* 2011, Vol. 38, pp. 2561-2570.
28. **IUPAC.** Recommendations. *Pure Appl Chem.* 1994, Vol. 66, p. 1739.
29. **Piña BM, Munguía NA, Palma CR, Lima R.** Caracterización de hueso de bovino anorgánico: Nukbone. *Acta Ortopédica Mexicana.* jul-ago 2006, Vol. 20, 4, pp. 150-155.

30. **Gruskin E, Doll B, Futrell W, Schmitz J, Hollinger J.** Demineralized bone matrix in bone repair: History and use. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2012, Vol. 64, 12, pp. 1063-1077.
31. **Murugan R, Ramakrishna S, Panduranga K.** Analysis of bovine-derived demineralized bone extracts. *J Mater Sci: Mater Med*. 2008, Vol. 19, pp. 2423-2426.
32. **Pitol D, Mardegan J, Caetano F, Lunardi L.** Decalcification dynamic of dog mineralized tissue by microwaves. *International Journal of Morphology*. 2007, Vol. 25, 2, pp. 309-313.
33. **Cho A, Suzuki S, Hatakeyama J, Haruyama N, Kulkarni A.** A method for rapid demineralization of teeth and bone. *The Open Dentistry Journal*. 2010, Vol. 4, pp. 223-229.
34. **Dominguez AA, Torres VK.** Descripción histológica de la regeneración ósea en conejos implantados con hueso de bovino liofilizado (NUKBONE). *Investigación Universitaria Multidisciplinaria*. Diciembre 2006, Vol. 5, 5, pp. 27-35.
35. **Weiner S, Wagner HD.** The Material Bone: Structure-Mechanical function relations. *Annu Rev Mater Sci*. 1998, Vol. 28, pp. 271-298.
36. **Zong W, Jian L, Rui L, Hao L, Yong G.** Bone formation in rabbit cancellous bone explant culture model is enhance by mechanical load. *bioMedical Engineering OnLine*. 2013, Vol. 12, 35, pp. 1-15.
37. **Borges RL, Montagner F, Souza CE, Farinazzo VR, Motohiro TO.** Polarized light microscopic analysis of bone formation after inhibition of cyclooxygenase 1 and 2. *The Anatomic Record*. 2010, Vol. 293, pp. 195-199.
38. **Chen P, Mckittrick J.** Compressive mechanical properties of demineralized and deproteinized cancellous bone. *Journal Mechanical Behavior of Biomedical Materials*. 2011, Vol. 4, pp. 961-973.
39. **Coman V, Grecu R, Báciut M, Báciut P, Prodan P, Simon V.** Investigation of different bone matrices by vibrational spectroscopy. *Journal of Optoelectronics and Advanced Materials*. 2007, Vol. 9, 11, pp. 3372-3375.
40. **Sionkowska A, Kozłowska J.** Characterization of collagen/hydroxyapatite composite sponge as a potential bone substitute. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2010, Vol. 47, pp. 483-487.
41. **Lozano LF, Peña RM, Heredia A.** Thermal analysis study of human bone. *Journal of Materials Science*. 2003, Vol. 38, pp. 4777-4782.

42. **Bosch P, Alemán I, Moreno C, Botella M.** Boiled versus unboiled: a study on Neolithic and contemporary human bones. *Journal of Archaeological Science*. 2011, Vol. 38, pp. 2561-2570.
43. **Murphy CM, Haugh MG, O'Brien F.** The effect of mean pore size on cell attachment, proliferation and migration in collagen-glycosaminoglycan scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials*. 2010, Vol. 31, pp. 461-466.
44. **Callister, W.** *Introducción a la ciencia e ingeniería de los materiales*. Barcelona, España : Reverté SA, 2004.
45. **Dinatale E, Guercio E.** Regeneración ósea guiada (GRB). revisión de la literatura. *Acta Odontológica Venezolana*. 2008, Vol. 46, 4, pp. 1-10.
46. **Willard HB, Merrit LL, Dean JA, Settle FA.** *Métodos instrumentales de Análisis*. México : Iberoamericana, 1991.
47. **Trebacz H, Wójtowicz K.** Thermal stabilization of collagen molecules in bone tissue. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2005, Vol. 37, pp. 257-262.
48. **Kronick PL, Cooke P.** Thermal stabilization of collagen fiber by calcification. *Connect Tissue Res*. 1996, Vol. 33, 4, pp. 275-282.
49. **Hardwick R, Hayes BK, Flynn C.** *Journal of Periodontology*. 1995, Vol. 66, 6, pp. 495-505.
50. **Koide T, Nagata K.** Collagen biosynthesis. *Top Curre Chem*. 2005, Vol. 247, pp. 85-114.
51. **Gelse K, Pöschl E, Aigner T.** Collagen-structure, function, and biosynthesis. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2003, Vol. 55, pp. 1531-1546.
52. **Spink, CH.** Differential Scanning Calorimetry. *Methods in Cell Biology*. 2008, Vol. 84, pp. 115-141.
53. **Khor, E.** Methods for the treatment of collagen tissues for bioprotheses. *Biomaterials*. 1997, Vol. 18, 2, pp. 95-105.
54. **Park, J y Bronzino, J.** *Biomaterials Principles and Applications*. Boca Raton Florida : CRC Press, 2003.
55. **Miles CA, Avery NC.** Thermal stabilization of collagen in skin and decalcified bone. *Phys Biol*. 2011, Vol. 8, 2, pp. 1-13.
56. **Wang HL, MacNeil RL.** Guided tissue regeneration. Absorbible barriers. *Dent Clin North Am*. jul 1998, Vol. 42, 3, págs. 505-22.

57. **Arenas, A.J.** *Electroquímica y electroanálisis. Técnica e investigación aplicada a sistemas electroquímicos in situ y ex situ.* Buenos Aires: e-libro.net, 2003. Vol. IIB. ISBN 1-4135-0100-1.

Trabajos presentados en eventos académicos.

Se presentaron los resultados más relevantes en los siguientes eventos:

1. Primer Congreso de Biomateriales Dentales. Facultad de Odontología, División de Estudios de Posgrado e Investigación. Octubre-2010. Título del trabajo: **"Termoanálisis (TGAY DSC) de la matriz ósea desmineralizada bovina"**.
2. Primer Congreso de Alumnos de Posgrado de la UNAM. Coordinación de Estudios de Posgrado. Mayo-2011. Título del trabajo: **"Caracterización físico-química de las membranas de colágena de origen óseo"**.
3. Encuentro Académico de la División Mexicana de la International Association for Dental Research (IADR). Cancún, México. Junio-2012 Título: **"Caracterización físico-química de la matriz orgánica del cóndilo bovino desmineralizado"**.
4. General Session of International Congress of Association for Dental Research (IADR) Iguazu Falls, Brazil. June-2012 Title: **"Physico-chemical characterization of Bone Demineralized matrix"**.
5. Segundo Congreso de Alumnos de Posgrado de la UNAM. Coordinación de Estudios de Posgrado. Abril-2012. Título del trabajo: **"Caracterización físico-química de las membranas de colágena de origen óseo"**.
6. XXI International Materials Research Congress / Sociedad Mexicana de Materiales A.C. August-2012. Cancún, QR, México. **"Cellular scaffolds of collagen from nukbone"**.
7. 25th European Conference on Biomaterials 2013. Madrid, España. September-2013. Title: **"Collagen scaffolds for tissue engineering"**