



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

PROGRAMA DE MESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS MÉDICAS,
ODONTOLÓGICAS Y DE LA SALUD

**PREPARACIÓN DE UN COMPOSITE A PARTIR DE CERÁMICA
MESOPOROSA TIPO SBA-15 Y FIBRAS DE PLA.**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA

OSMAR ALEJANDRO CHANES CUEVAS

TUTOR

Dr. MARCO ANTONIO ÁLVAREZ PÉREZ FACULTAD DE ODONTOLOGÍA

Ciudad de México

Septiembre, 2016.



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

AGRADECIMIENTOS

A Dios, a mis padres Alejandro y Rosalía, por permitirme completar otra etapa en mi vida, por su confianza y apoyo que siempre me han dado para alcanzar mis metas.

A la Familia Chanes Velasco, a mis abuelitos pero sobre todo a mis Tíos Olivia e Ismael por su apoyo, sin ustedes no hubiese podido alcanzar esta meta.

A mi Hermano Yadhira por acompañarme siempre en el camino y apoyarme cuando es necesario.

A Brenda P. Cervantes Garrido por acompañarme en esta etapa, por tu apoyo y comprensión.

A la Universidad Nacional Autónoma de México por ser mi segunda casa y darme la oportunidad de continuar mi formación profesional.

Al Dr. Marco Antonio Álvarez Pérez por aceptar ser mi tutor, por su confianza, apoyo y conducción para este proyecto.

A mis compañeros de Laboratorio de Bioingeniería de Tejidos: José Luis, Vladimir, Iri, Febe, Laura y Gaby gracias por su amistad, convivencia, apoyo y consejos.

Al personal que forma parte del Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Médicas, Odontológicas y de la Salud, en especial a Anita y a Ale por su amable atención.

A todos los profesores del Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Médicas, Odontológicas y de la Salud por sus conocimientos y dedicación.

A la Dra. Elba R. Leyva Huerta por su pasión y entrega a la Universidad, por impulsar a jóvenes a la investigación; gracias por brindarme su apoyo y confianza.

Al Dr. Federico H. Barceló Santana por impulsarme al campo de la investigación, gracias por su confianza.

A la Dra. Nancy Vargas Becerril por su gran apoyo y asesoría en este proyecto.

A la Dra. Lucía Téllez Jurado del IPN-ESIQIE por la ayuda brindada en la caracterización del material.

Al Laboratorio de Materiales Dentales, DEPeI, FO, UNAM en especial al Dr. Carlos A. Álvarez Gayosso por su asesoría en las pruebas mecánicas.

Al Dr. Fernando Suaste Olmos por la asesoría, así como el excelente apoyo técnico que me brindo durante el desarrollo de este trabajo de investigación.

A CONACyT por el apoyo económico con el número de becario 331089 para mis estudios de maestría.

Agradezco el apoyo por parte de DGAPA-UNAM: proyecto PAPIIT IN210815 que me ha permitido la realización de estas investigaciones.

Índice de Abreviaturas

A_{BET}: Área Superficial Específica Calculada por el Método BET (Brunauer, Emmett y Teller)

AJS: Técnica de Hilado por Propulsión a Gas

BET: Modelo Brunauer-Emmett-Teller (por sus siglas en inglés)

EDS: Espectroscopia por Dispersión de Energía de Rayos X (por sus siglas en inglés)

FDA: Administración de Alimentos y Medicamentos

FT-IR: Espectroscopia Infrarroja por Transformada de Fourier (por sus siglas en inglés)

g: gramos

GPa: Giga-Pascales

HA: Hidroxiapatita

HCl: Ácido Clorhídrico

IUPAC: Unión Internacional de Química Pura y Aplicada

KBr: Bromuro de Potasio

MCM: Mobil Composition of Matter

MEC Matriz Extracelular

mL: Mililitro

MMO: Materiales Mesoporosos Ordenados

MPa: Mega-Pascales

nm: Nanómetro

P123: Copolímero tribloque pluronic

PEOnPPOmPEOn: Copolímeros comerciales no iónicos de tres bloques (PEO: óxido de Polietileno, PPO: óxido de Polipropileno)

PLA: Poli(ácido láctico)

PLA-L: Poli(ácido láctico) Levógiro

PLA-D: Poli(ácido láctico) Dextrógiro

SBA: Cerámica Mesoporosa Santa Bárbara

SEM: Microscopía Electrónica de Barrido (por sus siglas en inglés)

TEM: Microscopía Electrónica de Transmisión (por sus siglas en inglés)

TEOS: Tetraetilortosilicato

TGA: Análisis Termogravimétrico (por sus siglas en inglés)

μL: Microlitro

XRD: Difracción de Rayos X (por sus siglas en inglés)

Resumen

El tejido óseo es un nanocompuesto constituido por proteínas (colágena) y por minerales (nanocristales de HA). La Bioingeniería de tejido óseo es vista como un campo para desarrollar alternativas a los injertos óseos convencionales; sin embargo aún no se ha logrado aplicar completamente a la práctica clínica como consecuencia de que no se ha logrado mimetizar por completo la estructura jerárquica del hueso. El objetivo de este trabajo fue desarrollar un andamio composite (PLA/SBA-15) utilizando la técnica Air Jet Spinning tratando de obtener una morfología y propiedades mecánicas similares a las del tejido óseo.

La cerámica mesoporosa tipo SBA-15 sintetizada fue sometida a XRD, FT-IR, BET, SEM, EDS y TEM dando como resultado la confirmación del material. El PLA comercial utilizado (192,000 g/mol, Nature Works D2002) se caracterizó mediante FT-IR y SEM para corroborar que la técnica AJS no modificó su estructura. Posteriormente se llevó a cabo la construcción del Composite PLA/SBA-15 a diferentes concentraciones mediante la técnica AJS y fue caracterizado utilizando las técnicas SEM, TGA, FT-IR, pruebas mecánicas y ensayo de toxicidad. Los resultados obtenidos muestra que los composites a 0.1% y 0.15% presentaron un mejor comportamiento mecánico en, mientras que a concentraciones más elevadas (0.5, 0.7 y 1%) disminuyó. En el ensayo de citotoxicidad se observó que los composites elegidos permitieron una proliferación celular similar a la del PLA, lo que indica que no afecta el reconocimiento celular para su adhesión y proliferación.

ABSTRACT

Bone tissue is a nanocomposite consisting of proteins (collagen) and minerals (HA nanocrystals). Bioengineering of bone tissue is seen as a field to develop alternatives to conventional bone grafts; however still not been achieved fully applied into clinical practice due that has not been achieved completely mimick the hierarchic structure of the bone. The aim of this work was to develop a composite (PLA / SBA-15) using the technique scaffold Air Jet Spinning trying to get a morphology similar to the mechanical properties of bone tissue.

The ceramic mesoporous SBA-15 synthesized was subjected to XRD, FT-IR, BET, SEM, EDS and TEM resulting in the confirmation of the material. The commercial PLA used (192,000 g / mol, Nature Works D2002) was characterized by FT-IR and SEM to confirm that the AJS technique did not change its structure. Subsequently conducted Composite construction PLA / SBA-15 at different concentrations by AJS technique and was characterized using SEM, TGA, FT-IR, mechanical testing and toxicity testing techniques. The results shows that the composites to 0.1% and 0.15% had a better mechanical behavior, whereas at higher concentrations (0.5, 0.7 and 1%) decreased. In the cytotoxicity assay it was observed that composites allowed chosen similar to that of PLA cell proliferation, indicating that does not affect cell recognition for adhesion and proliferation.

Índice

Contenido	Página
Introducción.....	1
Capítulo 1.- Antecedentes	
1.1 Hueso.....	3
1.1.1 Composición y Estructura.....	3
1.1.2 Propiedades Mecánicas.....	5
1.1.3 Injertos para la regeneración ósea.....	8
1.2 Polímeros Biodegradables.....	10
1.2.1 Poli (ácido láctico).....	12
1.3 Generalidades de las Cerámicas Mesoporosas.....	14
1.3.1 Mesoporosos Ordenados.....	15
1.3.2 Cerámica Mesoporosa SBA-15.....	18
1.4 Generalidades de los Andamios.....	20
1.4.1 Síntesis de Andamios.....	21
1.4.2 Técnica de Hilado por Propulsión a Gas.....	21
1.5 Andamios Composites.....	23
1.5.1 Composite PLA/SBA-15.....	23
Capítulo 2.-Diseño Experimental	
2.1 Planteamiento del Problema.....	26
2.2 Pregunta de Investigación.....	26

2.3 Justificación.....	26
2.4 Hipótesis.....	27
2.5 Objetivo General.....	27
2.6 Objetivos Específicos.....	27
 Capítulo 3.- Materiales y Métodos	
3.1 Síntesis de la cerámica SBA-15.....	30
3.2 Técnicas de caracterización de la cerámica SBA-15.....	32
3.3 Síntesis de Andamios de Poli (ácido láctico) mediante la técnica AJS.....	35
3.4 Técnicas de caracterización de los andamios de PLA.....	37
3.5 Síntesis del Andamio Composite PLA/SBA-15 mediante la técnica AJS.....	39
3.6 Técnicas de caracterización del andamio composite PLA/SBA-15.....	39
 Capítulo 4.- Resultados	
4.1 Cerámica SBA-15	
4.1.1 Microscopia Electrónica de Barrido y EDS.....	43
4.1.2 Espectroscopia Infrarroja por Transformada de Fourier.....	44
4.1.3 Difracción de Rayos X.....	45
4.1.4 Microscopia Electrónica de Transmisión.....	45
4.1.5 Análisis de tamaño de poro y área superficial.....	47
4.1.6 Análisis Termogravimétrico.....	48

4.2 Andamios de Poli (ácido Láctico)	
4.2.1 Microscopia Electrónica de Barrido.....	49
4.2.2 Medición del diámetro de Fibras.....	50
4.2.3 Espectroscopia Infrarroja Transformada de Fourier...	51
4.2.4 Pruebas Mecánicas.....	52
4.2.5 Elección del grupo para construir el composite.....	54
4.3 Andamios Composite PLA/SBA-15	
4.3.1 Microscopia Electrónica de Barrido.....	55
4.3.2 Espectroscopia Infrarroja Transformada de Fourier...	56
4.3.3 Análisis Termogravimétrico.....	57
4.3.4 Pruebas Mecánicas.....	58
4.3.4 Ensayo de Citotoxicidad.....	61
Capítulo 5.- Discusión.....	64
Capítulo 6.- Conclusiones.....	68
Referencias Bibliográficas.....	70

Introducción

El tejido óseo es el segundo tejido trasplantado con mayor frecuencia y la demanda de nuevos materiales para la regeneración de defectos óseos en el área médica está en aumento. Estos nuevos materiales deben ser capaces de reemplazar y regenerar el tejido; actualmente se utilizan implantes metálicos y poliméricos para los tratamientos de defectos y fracturas óseas, desafortunadamente, éstos presentan varias deficiencias; por un lado los materiales metálicos utilizados presentan más rigidez que el hueso natural y después de cumplir su propósito tienen que ser retirados del cuerpo mediante una segunda cirugía; por otro lado los materiales polímeros se caracterizan por la pérdida de resistencia mecánica dentro del período de aplicación.⁽¹⁾

Las características que debe presentar un andamio ideal son: ser biocompatible, osteoinductivo, osteoconductor, poroso, así como mecánicamente compatible con el tejido óseo; no obstante los andamios actuales sólo cumplen una parte de estos requisitos, por lo tanto, la búsqueda de mejores materiales continúa. Una de las soluciones propuestas puede ser la fabricación de biomateriales en forma de composites.

Los composites formados de polímeros reabsorbibles y nanocerámicas pueden ser buenos materiales alternativos para la regeneración de tejido óseo, pues se piensa que al unir estos materiales sus propiedades puedan ser superiores en comparación a los materiales convencionales.⁽²⁾

CAPÍTULO 1

ANTECEDENTES

1.1 Hueso

El tejido óseo representa la parte más importante del esqueleto. Desde el punto de vista tecnológico es único en cuanto a compendiar gran dureza y fortaleza con el mínimo peso posible. A pesar de su dureza y resistencia, el tejido óseo posee cierta elasticidad, que en conjunto, todas estas propiedades lo hacen especialmente apto como material esquelético. El tejido óseo, es una forma especializada de tejido conectivo denso. Los componentes extracelulares sufren calcificación, lo que les da la dureza. El tejido óseo provee al esqueleto de su fortaleza necesaria para funcionar como sitio de inserción y sostén de peso para los músculos y dar cierta rigidez al organismo para protegerlo.⁽³⁾

1.1.1 Composición y Estructura

Los huesos son auténticas matrices de nanocompuestos, principalmente nanocristales de hidroxiapatita en una matriz rica de colágena, muy complejos y con formas altamente especializadas para dar soporte mecánico y también sirven de reserva de minerales, en particular de calcio y fosforo.⁽⁴⁾

La matriz del hueso está compuesta por dos fases principales a escala nanométrica: orgánica (proteínas) e inorgánica (minerales), El mineral óseo está compuesto principalmente por hidroxiapatita y la parte proteínica por fibras de colágena.

La colágena actúa como base en la cual diminutos cristales planos de hidroxiapatita se unen para formar el hueso. La colágena del hueso tiene una estructura fibrosa típica, cuyo diámetro varía entre 50 y 500 nm.⁽⁵⁾ De manera

similar, la hidroxiapatita en el mineral del hueso está en forma de nanocristales de dimensiones entre $4 \times 50 \times 50$ nm.⁽⁶⁾

En el mineral del hueso también se encuentran otros elementos que intervienen en funciones metabólicas entre los que están el sodio, magnesio, fluoruros, cloruros y potasio. El principal papel de los minerales es dotar de dureza y rigidez al hueso, mientras que la colágena la dota de resistencia a la tracción y flexibilidad. Se piensa que la clave para la resistencia de los huesos es la compleja estructura jerárquica en la cual se organizan con un auto-ensamblado. Es importante puntualizar que los minerales no están directamente ligados a la colágena, sino ligados a través de las proteínas no colágenas, que conforman entre el 3 % y 5 % de la composición del hueso, y proveen emplazamientos activos para la biomineralización y unión celular.⁽⁷⁾

La cantidad de agua presente en los huesos es un factor importante para determinar su comportamiento mecánico. Los lípidos también son necesarios para las funciones celulares y suponen un 2 % del hueso, además juegan un papel importante en la biomineralización. El grado de biomineralización es el factor más importante para determinar las capacidades mecánicas del hueso.

El hueso puede ser considerado como la unión de varios niveles de unidades estructurales jerárquicas, diseñadas elegantemente en varias escalas, de macro a nano, para cumplir múltiples funciones.⁽⁸⁾

Cuando el hueso se deposita inicialmente es estructuralmente débil y desorganizado. Pero al cabo de pocos días el hueso original se convierte en hueso laminar. A nivel macroestructural el hueso laminar maduro se distingue en

compacto y esponjoso. Como indican sus nombres se diferencian en su densidad y se organizan con poros a múltiples niveles, de macro a nano, para el establecimiento de múltiples funciones, incluido el transporte de nutrientes, oxígeno y fluidos corporales. El hueso esponjoso o trabecular ocupa cerca del 20% del hueso total, es más ligero, tiene mayor porosidad y concentración de vasos sanguíneos que el hueso compacto; el diámetro de los poros puede ser de micrómetros a milímetros. En cambio el hueso compacto es mucho más denso y ocupa el 80% del hueso total, tiene menor porosidad y concentración de vasos sanguíneos.⁽⁸⁾

1.1.2 Propiedades Mecánicas del Hueso

El sistema esquelético tiene como función conferir al cuerpo humano una estructura que por un lado sea rígida, lo que le permite mantener la forma, y por otro esté articulada, facilitándole los movimientos. Así mismo sirve de punto de anclaje al sistema muscular permitiendo que éste realice su función. Está sometido, por tanto, a las fuerzas estáticas del peso del cuerpo y a las dinámicas de la acción muscular y los ligamentos. Compuesto por un elemento fuerte y variado (hidroxiapatita) incrustado en uno débil y flexible (colágena). El sistema esquelético soporta cargas de diferentes tipos debido a las diversas actividades de un individuo, tanto compresivas como de tracción ó de cizalladura. Las propiedades mecánicas difieren en los dos tipos de hueso. El hueso cortical es más rígido que el hueso esponjoso, soportando mayor esfuerzo pero menos deformación antes del colapso. El hueso esponjoso *in vitro* puede soportar hasta un 50% de deformación antes de empezar a deformarse, mientras que el hueso

cortical cede y se fractura cuando la deformación excede de 1.5 a 2.0 %. Debido a su estructura porosa, el hueso esponjoso tiene gran capacidad para el almacenamiento de energía.⁽⁹⁾ La diferencia física entre los dos tipos de tejidos óseos se cuantifica en términos de la densidad aparente del hueso, que se define como la masa de tejido óseo presente en un volumen de hueso (gramos por centímetro cúbico [g/cm^3]). En la Figura 1 se detalla las cualidades típicas de esfuerzo-deformación del hueso cortical y esponjoso con diferentes densidades óseas medidas bajo condiciones similares.⁽³⁾

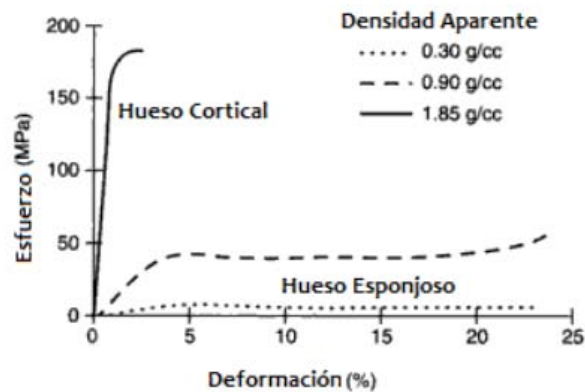


Figura 1.- Curva tensión-deformación del hueso cortical y esponjoso

El hueso cortical humano es considerado como un material ortotrópico, la resistencia mecánica del hueso, depende de la dirección en la cual es cargado el hueso (flexión, compresión o tracción). Por todo esto, no es posible especificar la resistencia o las propiedades elásticas del hueso cortical con un único valor. Una mejor forma es examinar la curva de esfuerzo-deformación para el tejido óseo bajo circunstancias de medición; en la Figura 2 se observa una comparación de las curvas de esfuerzo-deformación entre el metal, cristal y hueso.⁽³⁾

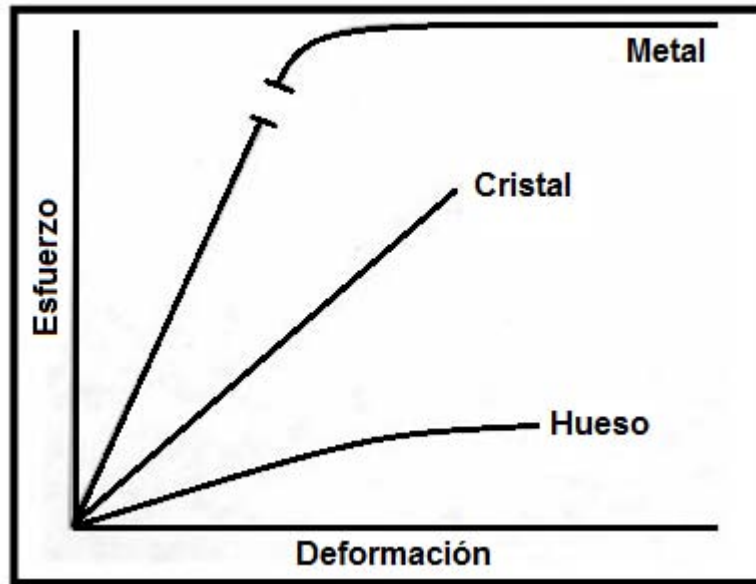


Figura 2.- Curva esquemática de tensión-deformación para tres diferentes materiales en el que se observa el comportamiento mecánico de cada uno.

Las variaciones en la rigidez se reflejan en las diferentes pendientes de las curvas en la región elástica. El metal tiene la pendiente más grande y es por tanto el material más rígido. La porción elástica de la curva para el vidrio y el metal es una línea recta, mostrando un comportamiento linealmente elástico; el hueso prácticamente no cede hasta que se alcanza el límite de elasticidad. En comparación, la medición precisa del hueso cortical muestra que la porción elástica de la curva no es recta sino ligeramente curvada, indicando que el hueso no es linealmente elástico en su comportamiento, si no que se tensa algún punto durante la carga en la región elástica.⁽¹⁰⁾

La tabla 1 detalla las propiedades mecánicas de los biomateriales seleccionados para la comparación.^(3,10)

Tabla 1.- Propiedades mecánicas de diferentes biomateriales

<i>Material</i>	Esfuerzo final (MPa)	Módulo Elástico (GPa)	Elongación (%)
Metales			
Aleaciones Co-Cr			
❖ Férula	600	220	8
❖ Forja	950	220	15
Acero inoxidable	850	210	10
Titanio	900	110	15
Cerámico			
Alúmina	300	350	<2
Biológico			
Hueso cortical	50-150	10-15	1-3
Hueso esponjoso	1.5-50	0.1-0.2	2-4
Tendón, ligamento	20-35	2-4	10-25

1.1.3 Injertos para la regeneración ósea

La regeneración tisular es la respuesta que consigue la restitución íntegra del tejido, a diferencia de la reparación, donde el tejido que se forma es un tejido fibrótico, con características diferentes al original. En este sentido el hueso es el único tejido del organismo, a excepción del tejido embrionario, que se restituye totalmente tras una lesión.⁽¹¹⁾ La regeneración ósea origina una respuesta en la

que están involucrados los vasos sanguíneos, las células y la matriz extracelular. Dentro de los materiales de sustitución ósea se encuentran los autoinjertos, los aloinjertos y los xenoinjertos. El hueso autógeno sigue siendo considerado hoy en día como el estándar de oro ya que éste cumple con todos los requisitos físicos, químicos y biológicos, independientemente de sus inherentes limitaciones (disponibilidad, dolor postoperatorio).⁽¹²⁾ Dentro de las características biológicas que presenta el hueso autógeno se encuentra el potencial osteogénico, donde las células del sitio donante permiten sintetizar nuevo hueso en la zona que se realiza el implante; también presenta la capacidad de osteoinducción, en donde se forma nuevo tejido óseo mediante la utilización de células troncales vecinas del sitio donante, en el que se diferencian en células formadoras como son los osteoblastos, y por último posee la capacidad de osteoconducción, la cual permite guiar la formación del tejido. Todas estas características deben estar presentes en un material de sustitución ósea ideal.⁽¹³⁾

La alternativa más común al material de injerto autógeno son los injertos alogénicos (organismos de la misma especie) y los xenoinjertos (especies distintas por ejemplo bovino). Los aloinjertos presentan la desventaja de su baja disponibilidad y de la posibilidad de transmisión de infecciones mientras que los xenoinjertos las dudas que surgen son: la respuesta inmunológica del huésped que pueda presentar y la posibilidad de transmisión de infecciones.⁽¹⁴⁾

1.2 Polímeros Biodegradables

Los polímeros biodegradables son uno de los biomateriales primarios y comunes que se utilizan para la reparación ósea en la ingeniería de tejidos.

Estos polímeros biodegradables requieren una interacción óptima a nivel celular para obtener un resultado positivo el cual es la formación de un tejido funcional.⁽¹⁵⁾

Existen algunos criterios para polímeros biodegradables con el fin de ser utilizados con éxito para aplicaciones de reparación de hueso y de ingeniería de tejidos:

- (i) La superficie del polímero debe permitir la adhesión celular y el crecimiento del tejido
- (ii) Después de la implantación *in vivo*, no debería haber ninguna respuesta inflamatoria o tóxica hacia el polímero o sus productos de degradación.
- (iii) Tener alta porosidad y que esté interconectado.
- (iv) Tener buena área superficial y un espacio adecuado para la matriz extracelular.
- (v) Ser degradable.
- (vi) El material polimérico debe permitir el procesamiento reproducible de estructuras tridimensionales (3D).^(15,16)

En base a su origen los polímeros biodegradables pueden clasificarse como naturales y sintéticos, Los polímeros biodegradables naturales pueden ser:

- ❖ Polisacáridos: almidón, alginato, quitina / quitosano, derivados de ácido hialurónico.
- ❖ Proteínas: colágena, geles de fibrina, seda, de soja.

No obstante el uso y aplicaciones de estos biopolímeros naturales llegan a

restringirse debido a su elevada actividad fisiológica, tasa de degradación desconocida y bajas propiedades mecánicas.⁽¹⁷⁻¹⁹⁾

Por otro lado, los polímeros sintéticos pueden ser producidos en condiciones controladas y, por tanto, presentan propiedades físicas predecibles y reproducibles, tales como resistencia a la tracción, módulo de elasticidad y tasa de degradación etc.; además de la ventaja de controlar las impurezas del material.

Respecto a su biodegradabilidad, la tasa de degradación controlada es muy beneficiosa para las aplicaciones clínicas.⁽²⁰⁾ La degradación de los materiales poliméricos se puede modificar cambiando su composición estructural y la técnica de fabricación.⁽²¹⁾ El proceso y tiempo de degradación se ve afectado por varios factores: como lo es su composición molecular, peso molecular y la cristalinidad.⁽²²⁾ Los tipos de monómeros que componen el material polimérico también pueden afectar a la sensibilidad de los enlaces hidrolizables. En las cadenas más largas del polímero, que son las cadenas más hidrolíticas, se requieren las rupturas de éstas para obtener la biodegradación. Desde el punto de vista de la cristalinidad, esta propiedad es la que mide la organización, las interacciones y el embalaje del polímero, ya que también afecta a la biodegradación, los polímeros cristalinos poseen una vinculación más fuerte *inter- e intra-* molecular, es por ello que se degradan más lento en comparación con los polímeros amorfos.⁽²³⁾

1.2.1 Poli (ácido láctico)

El Poli (ácido láctico) es un polímero termoplástico que forma parte de los poliésteres α -hidroxiácidos (Figura 3), siendo su precursor el ácido láctico; éste polímero ha sido estudiado por cerca de 50 años y es el polímero biodegradable más utilizado en los últimos años, fue descubierto en 1780 por el químico sueco, Scheele.⁽²⁴⁾

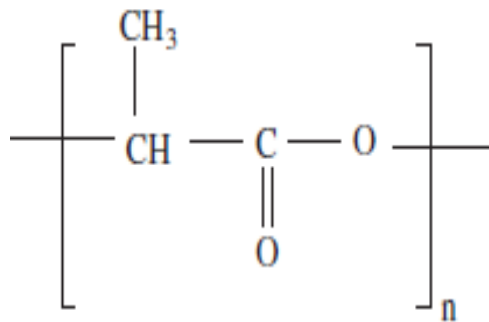


Figura 3.- Estructura química del PLA

Durante la década de los 60's, se documentó por primera vez su uso en aplicación médica ya que fue utilizado como sutura y en varillas para la reparación de fracturas mandibulares en perros.⁽²⁵⁾

Su precursor, el ácido láctico, es una molécula quiral que se encuentra en dos formas esteroisoméricas, el cual puede dar lugar a diferentes tipos poliméricos del PLA, los cuales pueden ser: PLA-L, PLA-D, PLA-D,L y PLA-meso.⁽¹⁵⁾

El PLA-L y el PLA-D son polímeros estereoregulares, el PLA-D,L es un polímero racémico resultante de la mezcla del ácido láctico L y D, mientras que el PLA-meso se obtiene del anillo lactida-D, L.

Las propiedades químicas de estos polímeros permiten que su degradación sea a través de hidrólisis de la des-esterificación de sus enlaces, degradándose a componentes monoméricos que pueden ser convertidos en glucógeno o ser incorporados al ciclo ácido tricarbóxico y ser excretados por los pulmones como agua y dióxido de carbono.⁽²⁶⁾

El PLA-L es un polímero altamente cristalino haciéndolo más resistente a la hidrólisis en sus enlaces, mientras que el PLA-D y el PLA-D,L son polímeros amorfos haciéndolos más sensibles a la hidrólisis en sus enlaces, provocando así que su degradación se realice en poco tiempo.^(27,28)

Por todas estas características, el PLA ha sido aprobado por la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA, por sus siglas en inglés)⁽²⁹⁾ para su uso con aplicaciones médicas, al mismo tiempo de que es una alternativa sostenible a los productos químicos derivados del petróleo y puede ser obtenido a través de recursos renovables.⁽³⁰⁾

1.3 Generalidades de las Cerámicas Mesoporosas

Las cerámicas mesoporosas son importantes debido a sus aplicaciones como catalizadores, adsorbentes, soportes, películas mesoporosas, entre otros. Tal importancia radica en la estabilidad térmica, accesibilidad a los grupos silanol de la superficie y a las características estructurales asociadas con tales medios, es decir, los millones de huecos microscópicos (de muy diversas formas y tamaños) que constituyen al medio poroso, proporcionando el espacio adecuado para que las moléculas puedan transportarse hacia los sitios activos en donde reaccionan o se intercambian con otras moléculas.⁽³¹⁻³⁵⁾

Los materiales porosos se definen en términos de sus propiedades de adsorción. De acuerdo a la definición de la IUPAC⁽³⁶⁾ los sólidos porosos se dividen en 3 clases: microporos (< 2 nm), mesoporos (2-50 nm) y macroporos (> 50 nm) (Figura 4)⁽³⁷⁾

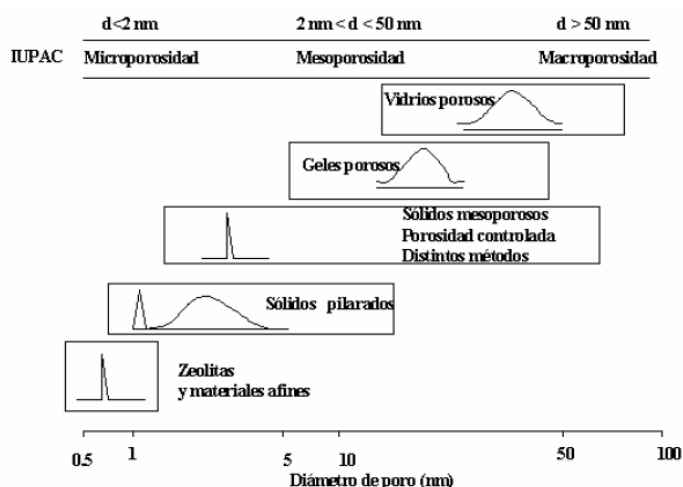


Figura 4.- Clasificación de los sólidos porosos de acuerdo a la IUPAC

El desarrollo de sólidos mesoporosos (poros entre 2 y 50 nm) por Zhao et al.⁽³⁸⁻⁴⁰⁾ en 1998 fue un avance considerable en la obtención y estudio de materiales mesoporosos ordenados (MMO). A partir de plantillas de polímero se han sintetizado sílices ordenadas en muchas formas: como fibras, láminas continuas, varillas, membranas, monolitos, esferas y más.⁽⁴¹⁻⁴³⁾ Usando copolímeros comerciales de tres bloques no iónicos como tensoactivos, se han logrado desarrollar materiales de óxido de silicio (SiO_2) con un arreglo ordenado de mesoporos en un intervalo de 4.5 a 30 nm y paredes con espesores de 3.0 a 7.0 nm. Estos nuevos sólidos se designaron como materiales SBAs, acrónimo de Santa Bárbara, la Universidad donde el grupo de Stucky los desarrolló por primera vez.⁽⁴⁴⁾

1.3.1 Mesoporosos Ordenados

La síntesis del primer material mesoporoso ordenado se describió en una patente archivada en 1969.⁽⁴⁵⁾ Sin embargo, debido a la falta de análisis estos primeros científicos no determinaron apropiadamente las características del material obtenido. En 1992 se obtuvo el mismo material por científicos de la compañía Mobil Corporation.^(46,47) El MCM-41 (Mobil Composition of Matter 41) posee un arreglo hexagonal altamente ordenado de poros cilíndricos unidimensionales con una distribución estrecha de tamaño de poros (Figura 5).

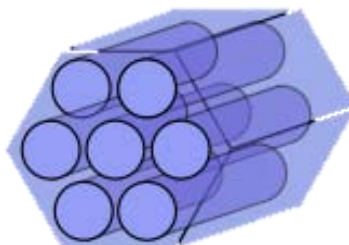


Figura 5.- Imagen esquemática típica de materiales MCM-41, donde se observa la forma hexagonal y los poros cilíndricos.

La familia de M41S consistió originalmente de tres materiales distintos con arreglos regular de canales acomodados en una fase hexagonal (MCM-41), cúbica (MCM-48) o lamelar (MCM-50), con la morfología final determinada por la proporción sílice/tensoactivo de la solución inicial.

Estos materiales fueron preparados por hidrólisis de una fuente de sílice adecuada en la presencia de agentes tensoactivos catiónicos, tales como alquiltrimetilamonios, seguido por la eliminación cuidadosa de la plantilla por tratamiento térmico.⁽⁴⁶⁾

El arreglo hexagonal de poros uniformes puede visualizarse por MET, como se muestra en la Figura 6.⁽⁴⁷⁾ Los tamaños del poro varían normalmente entre 2 y 10 nm dependiendo de la longitud de cadena de tensoactivo, aunque también se pueden obtener tamaños de poro más grandes con la expansión del tamaño de la micela de tensoactivo por la adición de moléculas orgánicas expansoras tales como 2, 4, 6-trimetilbenceno (mesitileno) o bien pos tratamientos. Además, el espesor de pared de poro normalmente oscila entre 0.7 y 1.1 nm.⁽⁴⁷⁾

Los materiales mesoporosos de óxido de silicio en ocasiones se describen en la literatura como sólidos cristalinos debido a su gran periodicidad de alcance; sin embargo, esta idea no es muy correcta debido a que las paredes del poro de los materiales consisten en sílice amorfa, con orden de corto alcance. No obstante, el arreglo regular de los poros puede ser considerado como un tipo de "súper estructura" con gran alcance de ordenamiento. El MCM-41 exhibe gran intervalo de periodicidad en dos direcciones. El grado de ordenamiento puede ponerse en evidencia por Difracción de Rayos X donde las reflexiones de Bragg pueden ser detectadas a bajo ángulo de 2θ , como se puede observar en la Figura 6.⁽⁴⁸⁾

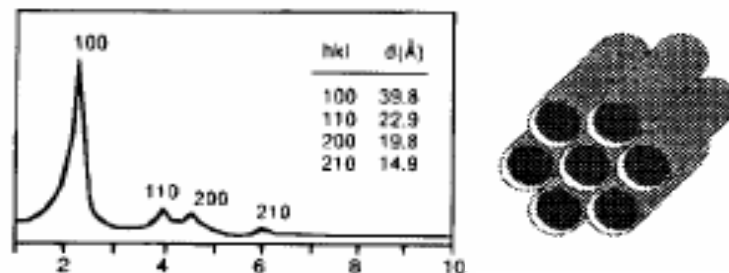


Figura 6.- Patrón de Difracción de Rayos X, en el que puede observarse las reflexiones características de un arreglo hexagonal

Las reflexiones observadas en los materiales MCM-41 son debido al arreglo hexagonal ordenado de las paredes de los poros paralelos y pueden ser indexadas en una celda unitaria hexagonal $p6mm$. Los conceptos de materiales mesoporosos se extienden también a redes diferentes a las de sílice, tales como las de los óxidos de titanio, zirconio y estaño, entre otros Sin embargo, la eliminación de la plantilla y la estabilidad de las redes inorgánicas representan, en este último caso, problemas no triviales.⁽⁴⁹⁾

1.3.2 Cerámica Mesoporosa SBA-15

Zhao y cols.^(38,39) fueron los primeros en sintetizar el SBA-15 donde utilizaron como tensoactivos copolímeros tribloque del tipo PEO_nPPOmPEO_n para preparar materiales mesoporosos. Sobre estos materiales las unidades de PEO y las especies catiónicas de la sílice son ensambladas por medio de interacciones electrostáticas en medio ácido. Dependiendo del tamaño del grupo PEO, se obtienen estructuras sea de tipo hexagonal (SBA-15) o cúbico (SBA-16) y que en comparación con el MCM-41, el SBA-15 tiene un espesor de pared mayor (2 a 6 nm) y su diámetro de poro puede variar de 3 a 30 nm dependiendo de las condiciones de síntesis.^(38,39)

Se sabe que para la formación de SBA-15 utilizando como tensoactivo P123, las cadenas de PEO a temperatura ambiente son hidrofílicas mientras que las cadenas de PPO son hidrofóbicas por lo que conducen a la formación de micelas cilíndricas directas con la cadena de PEO por fuera. Por esta razón, los materiales calcinados no sólo tienen mesoporos (diámetro de 2 a 50 nm), sino que hay también microporos (< 2nm), generados por las cadenas de PEO, interaccionando entre ellas mismas (Figura 7).⁽⁵⁰⁾

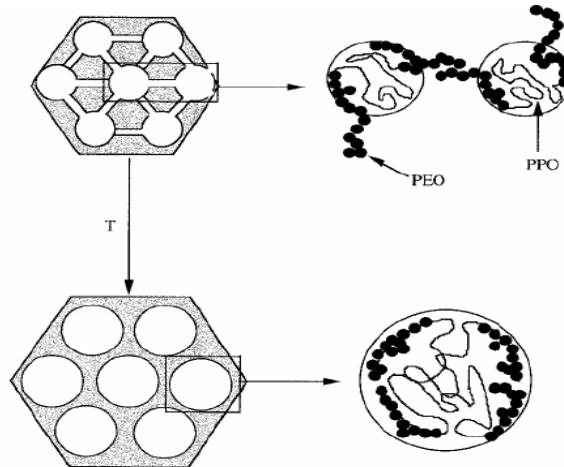


Figura 7.- Tensioactivo P123 en donde se observa la formación de micelas cilíndricas.

Las características del sólido mesoporoso SBA-15 son:

- i) ordenamiento hexagonal de mesoporos cilíndricos ($\approx 6\text{nm}$)
- ii) presencia de poros ($< 2\text{ nm}$) que conectan los canales mesoporosos entre sí.
- iii) superficie con actividad química, que depende de la concentración y la distribución sobre la superficie sólida de los diferentes tipos de grupos silanoles y siloxano (Figura 8).^(51,52)

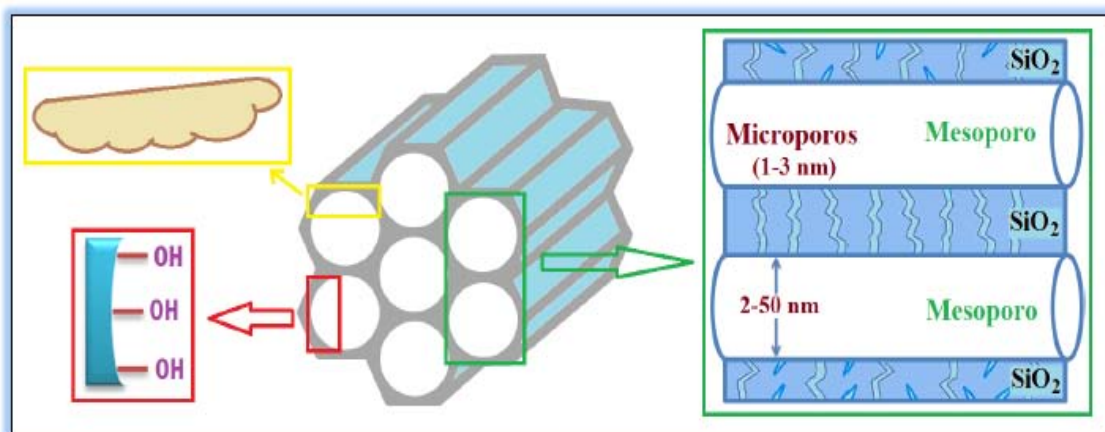


Figura 8.- Estructura del SBA-15 en el que se muestra el arreglo hexagonal ordenado de poros cilíndricos.

1.4 Generalidades de los Andamios

La finalidad de los andamios en el campo de la ingeniería de tejidos es servir de soporte a las células para que proliferen y diferencien, por lo tanto su diseño y desarrollo debe considerar factores biológicos y físicos, entre los cuales se encuentran las propiedades estructurales. La arquitectura de los andamios debe:

- ❖ Proporcionar a las células suficiente espacio para cumplir su función de generar nuevo tejido.
- ❖ Permitir el paso de fluido para transportar células, nutrientes, oxígeno, y para eliminar desechos.
- ❖ Soportar las cargas mecánicas necesarias para estimular a las células.^(53,54)

Entre las propiedades estructurales más importantes se encuentran la porosidad, interconectividad entre los poros, el área superficial específica y la distribución del tamaño de poro. A mayor porosidad, mayor espacio disponible para que las células formen nuevo tejido y menor cantidad de material extraño introducido en el organismo. La interconectividad entre los poros es necesaria para permitir el paso de fluido que como se dijo anteriormente permitir la quimiotaxis, los nutrientes y oxígeno. Todos los poros deberían estar abiertos e interconectados. El área superficial específica representa el área por unidad de volumen disponible para que las células se adhieran y formen nuevo tejido.⁽⁵⁵⁾

1.4.1 Síntesis de Andamios

La Matriz Extracelular (MEC) proporciona soporte estructural a las células, además de cumplir otras funciones importantes. Muchas proteínas extracelulares tienen estructuras fibrilares con diámetro a escalas nano o sub-micrométricas. Por ejemplo, la colágena que es la proteína de la MEC más abundante de nuestro cuerpo, posee una estructura fibrilar con diámetros de fibra que oscilan entre 50 a 500 nm. Para que los andamios en el campo de la ingeniería de tejidos puedan funcionar, éstos deben mimetizar la estructura y función biológica de la MEC nativa así como la composición química y señalización física.⁽⁵⁾

Es por ello que los investigadores han enfocado sus esfuerzos en desarrollar andamios que mimeticen la estructura fibrilar de la MEC nativa. Actualmente existen diferentes métodos para generar andamios nanofibrilares: autoensamblaje molecular, separación de fases, electrospinning, air jet spinning (AJS).^(5,56)

1.4.2 Técnica de Hilado por Propulsión a Gas

La técnica de hilado por propulsión a gas (AJS, por sus siglas en inglés) es un método que permite la producción de nano/micro-fibras. Se basa totalmente en el uso de gas inerte (ej. Argón) a presión en el cual, una solución polimérica es eyectada a través de un atomizador, (Figura 9).⁽⁵⁷⁾



Figura 9.- Atomizador utilizado para la técnica AJS

Esto le permite hilar (estirar) dicha solución para crear fibras finas y al mismo tiempo que están siendo eyectadas el disolvente comienza a evaporarse y continúa haciéndolo después de que las fibras se depositan sobre el colector, (Figura 10).⁽⁵⁸⁾

A diferencia del electrospinning que es otro método que permite obtener fibras a nano- y micro- escala, el AJS no requiere un equipo sofisticado para la fabricación de fibras, es un método que permite obtenerlas de manera rápida, en un solo paso y a bajo costo.⁽⁵⁷⁻⁵⁹⁾

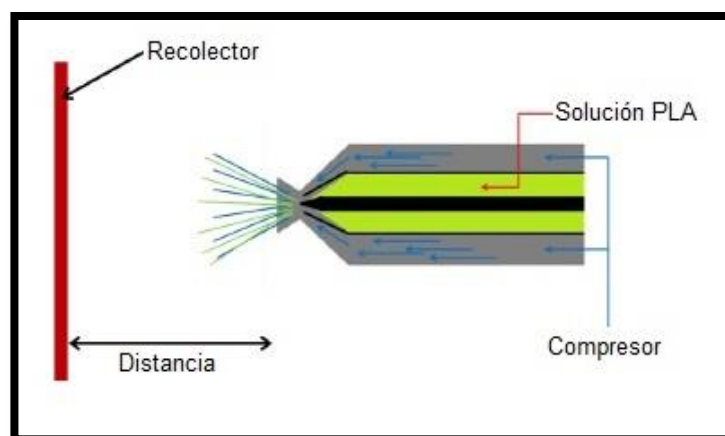


Figura 10.- Imagen esquemática del funcionamiento de la técnica AJS, en el que se observa la eyección del polímero a través de la presión del gas.

1.5 Andamios Composites

El incremento en la investigación del campo en regeneración ósea ha llevado a tratar de reparar los defectos óseos resultados de infecciones, tumores y/o traumas. Aunque varios tipos de materiales como los metálicos, polímeros y cerámicos han sido evaluados por su potencial para ser sustitutos óseos; sus propiedades se encuentran aún lejos de las características del hueso natural.

En los últimos años los composites polímero/cerámica han sido atractivos por la cercanía mimética al del hueso real.⁽¹⁾

1.5.1 Composite PLA/SBA-15

El poli (ácido láctico) (PLA) es un poliéster alifático lineal ampliamente utilizado en aplicaciones biomédicas, ya que es biodegradable, biocompatible, y no tóxico para el cuerpo humano. También está aprobado por la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA) para aplicaciones en dispositivos ortopédicos.⁽⁶⁰⁾

Por otro lado, también se utiliza como andamio para la regeneración del tejido óseo.⁽⁶¹⁻⁶⁵⁾ Sin embargo, su lenta cristalización, su lenta degradación, su baja estabilidad durante la degradación, y sus propiedades mecánicas relativamente bajas han limitado las aplicaciones de este polímero, en particular como material de soporte.⁽⁶⁶⁾

Es por ello que las nuevas direcciones en investigación de este polímero han propuesto la preparación de composites con refuerzos inorgánicos como una alternativa conveniente.^(67,68)

Los cerámicos mesoporosos son materiales sintéticos con disposiciones

ordenadas de canales y cavidades de diferentes geometrías. Un ejemplo es el SBA-15, un material mesoporoso sintetizado utilizando tensoactivo de copolímero tribloque como una plantilla en condiciones ácidas⁽³⁹⁾; poseen grandes diámetros de poro (5-30 nm), área de superficie alta (600-1000 m² / g) y exhibición altamente ordenadas mesoestructuras hexagonales 2D con canales cilíndricos uniformes. Estas características representan una ventaja en comparación con otros compuestos inorgánicos no porosos. Además, los poros se pueden llenar con las macromoléculas poliméricas, que promueven las interacciones íntimas y estabilidad física entre el polímero y la fase inorgánica.⁽⁶⁹⁾

Vallet-Regí *et al* informó de los estudios *in vitro* que compararon el comportamiento bioactivo de SBA-15 con otros materiales mesoporosos.⁽⁷⁰⁾ Este comportamiento fue asignado a la presencia de grupos silanol en la superficie SBA-15, que actuó como sitios de nucleación para la formación de apatita;⁽⁷¹⁾ la apatita formada fue evaluada y se consideró que era adecuado para aplicaciones biomédicas tales como la regeneración de tejido óseo.

En términos generales, los composites resultantes presentarán propiedades mecánicas y térmicas mejoradas, así como el grado de cristalización y la resistencia a la degradación hidrolítica.⁽⁷²⁾

CAPÍTULO 2

DISEÑO

EXPERIMENTAL

2.1 Planteamiento del problema

La creciente incidencia de trastornos óseos se ha traducido en la necesidad de terapias más eficaces para satisfacer esta demanda, agravada por el aumento de una población que envejece. En la actualidad los tratamientos más utilizados para la reparación de fracturas de hueso incluyen autoinjertos, aloinjertos, xenoinjertos. Sin embargo en muchas ocasiones debido a la naturaleza del defecto se encuentra limitado su uso; por otro lado, existen varios materiales sintéticos como son los metálicos, poliméricos y biocerámicos que se han evaluado para la regeneración ósea; pero, su comportamiento individual se encuentran aún muy lejos al del hueso natural.

2.2 Pregunta de Investigación

¿La técnica de hilado por propulsión a gas permitirá el diseño y construcción de un andamio composite de PLA/SBA-15 como uso potencial en la ingeniería de tejidos mineralizados?

2.3 Justificación

El tejido óseo puede categorizarse como un nanocompuesto constituido por proteínas (colágena, laminina, fibronectina) y por una fase inorgánica (nanocristales de HA). La ingeniería de tejido óseo es vista como un campo para desarrollar alternativas a los injertos óseos convencionales para la reparación o reconstrucción de defectos óseos mediante el desarrollo de biomateriales; sin

embargo, aún no ha logrado la traducción completa en la práctica clínica como consecuencia de que no se ha logrado mimetizar por completo la estructura jerárquica del hueso. Es por ello que se pretende desarrollar un andamio composite polímero/cerámica (PLA/SBA-15) que permita utilizar tanto las características de este polímero como las de la cerámica a la vez, pretendiendo así obtener un andamio con morfología y propiedades mecánicas similares a las del tejido óseo, y con ello, tratar de mimetizar la función y composición jerárquica de este tejido.

2.4 Hipótesis

La técnica de propulsión a gas permite la síntesis de un andamio composite de SBA-15/PLA como uso potencial en la ingeniería tisular de tejido óseo.

2.5 Objetivo General

Sintetizar un andamio composite fibrilar a partir de Poli (ácido láctico) y cerámica mesoporosa tipo SBA-15 por medio de la técnica de hilado por propulsión de gas.

2.6 Objetivos Específicos

- Sintetizar la cerámica mesoporosa del tipo SBA-15.
- Caracterizar mediante SEM, EDS, FT-IR, XRD, TEM, BET y TGA la cerámica SBA-15 sintetizada.
- Determinar los parámetros de distancia del Poli (ácido láctico) a diferentes

concentraciones con el fin de estudiar su morfología; organización y diámetro de fibras; para diseñar y fabricar posteriormente el andamio composite de PLA/SBA-15.

- Caracterizar el andamio composite PLA/SBA-15 mediante las técnicas de SEM, FT-IR y TGA.
- Evaluar las propiedades mecánicas del andamio composite PLA/SBA15.
- Evaluar la citotoxicidad al andamio composite PLA/SBA-15 mediante la prueba CCK-8.

CAPÍTULO 3

MATERIALES Y

MÉTODOS

3.1 Síntesis del SBA-15

El material SBA-15 se sintetizó siguiendo el procedimiento descrito por Zhao y cols.^(38,39) En una botella de vidrio con tapón sellador marca SIMAX de 500 mL se pesaron 8 g de Pluronic 123 a los que posteriormente se le añadieron 276 mL de agua. La mezcla se colocó en un baño de glicerina a 45 °C, para que en el interior de la botella la temperatura aproximada fuera de 35 °C, bajo agitación magnética vigorosa y se adicionaron 20.6 mL de HCl al 37 %. A continuación se cerró la botella y se dejó agitando hasta la disolución del surfactante (24 h aproximadamente), se adicionó 1.0 mL de etanol para facilitar el proceso de disolución del surfactante. Una vez disuelto el surfactante, se añadieron 16.4 mL de TEOS. Transcurridos unos minutos, se tapó el recipiente y se dejó reaccionar durante 24 h a 35 °C. Concluido este tiempo, la botella se sacó del baño y se introdujo en una estufa a 100 °C durante otras 24 h. Finalmente, el material se filtró y se dejó secar 24 h a 60 °C.

Para la eliminación del surfactante (Pluronic 123) se realizaron 10 extracciones mediante lavados con soluciones, las extracciones se llevaron a cabo cada 24 h como lo muestra la tabla 2.

Tabla 2.- Secuencia de lavados para la eliminación del surfactante

Extracción	Solución	Relación	Descripción
1	Isoctano/Etanol	70:30	<p>Se agrega la solución a la botella de vidrio que contiene la cerámica, se deja en agitación magnética durante 8 h, una vez transcurrido este tiempo se lleva a cabo la filtración del material y se coloca en una estufa a 60 °C.</p>
2	Acetona/H ₂ O ionizada	60:40	
3	Isoctano/Etanol	50:50	
4	Acetona/H ₂ O ionizada	40:60	
5	Isoctano/Etanol	60:40	
6	Acetona/H ₂ O ionizada	50:50	
7	Isoctano/Etanol	60:40	
8	Acetona/H ₂ O ionizada	50:50	
9	H ₂ O ionizada	100%	
10	H ₂ O ionizada	100%	

3.2 Técnicas de Caracterización

Una vez sintetizado la cerámica SBA-15 se procedió a caracterizarla utilizando diferentes técnicas: microscopía electrónica de barrido, espectroscopia por dispersión de energía de rayos X, espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier, difracción de rayos X, microscopía electrónica de transmisión, porosimetría de adsorción de N₂ y análisis termogravimétrico.

3.2.1 Microscopía Electrónica de Barrido y EDS

Se utilizó un microscopio electrónico de barrido marca JOEL JSM 7600F para obtener las micrográficas SEM y poder observar la morfología de la cerámica SBA-15, así mismo se realizó un análisis químico utilizando espectroscopia por dispersión de energía de Rayos X (EDS), el cual permitió analizar semicuantitativamente los elementos presentes. El voltaje de operación fue de 10 kV; las muestras se prepararon previamente con un recubrimiento de película de oro mediante la pulverización catódica asistida por plasma para favorecer la conductividad.

3.2.2 Espectroscopia Infrarroja por Transformada de Fourier

Se realizaron pastillas al 1% del material mezclando con bromuro de potasio (KBr). Tanto el KBr como la cerámica SBA-15 fueron pesados en una balanza analítica y posteriormente molidos en un mortero de ágata para homogenizar ambos materiales. Las pastillas se realizaron colocando el polvo previamente homogenizado en una pastilladora que fue sometido a una prensa hidráulica,

realizando una precarga de 100 psi por 30s y después de 3000 psi por 90s.

Después se colocó en un portapastillas del equipo Nicolet Nexus FTIR 760 para poder realizar la lectura de 400 a 4000 cm^{-1} .

3.2.3 Difracción de Rayos X

La cerámica SBA-15 fue colocada en un portamuestra y analizada en un difractómetro de Rayos X Philips X'Pert con geometría Bragg-Brentano, operando la radiación $\text{CuK}\alpha$ ($\lambda=1.5406 \text{ \AA}$) El difractograma se obtuvo a bajo ángulo (0.6-10.0°).

3.2.4 Microscopía Electrónica de Transmisión

La preparación se llevó a cabo diluyendo una cantidad muy pequeña de muestra en un disolvente (acetona); posteriormente se buscó la máxima dispersión sumergiendo la solución en un baño de ultrasonido por 30 minutos, a continuación se depositó una gota sobre una rejilla filmada con carbono y se dejó secar. La muestra fue analizada en un microscopio electrónico de transmisión marca JOEL JEM-2100.

3.2.5 Análisis de tamaño de poro y área superficial

Para conocer las propiedades texturales (superficie específica y diámetro de poro) de la cerámica SBA-15 se recurre a la adsorción y desorción de gases inertes, en este caso N_2 . Para realizar estas medidas se empleó un porosímetro de adsorción de N_2 Quantachrome Autosorb IQ2 operado desde 10 a 127 kPa a la temperatura

del N₂ líquido (-196°C). Antes de realizar las medidas se desgasificó a vacío a una temperatura de 60°C durante 10 horas; con esta técnica fue posible obtener el parámetro de área superficial calculada con la ecuación de Brunauer-Emmett-Tiller (BET); a partir de las isothermas de adsorción y desorción se pudo conocer el tamaño de poro de la cerámica SBA-15, para ello se empleó la ecuación Barret-Joyner-Halenda (BJH).

3.2.6 Análisis Termogravimétrico

El análisis se realizó en un equipo Hi-Res TGA 2950 TA Instruments entre 20 y 500°C con un flujo constante de Nitrógeno de 100mL/min, y una rampa de calentamiento de 10°C/min, para este ensayo se utilizó un crisol de α -alúmina como referencia.

3.3 Síntesis de andamios de Poli (ácido láctico) mediante la técnica AJS

3.3.1.- Preparación de Soluciones del PLA.

Se utilizó PLA comercial (192,000 g/mol, Nature Works D2002) para la construcción de andamios fibrilares, se prepararon concentraciones de 6, 7, 10, y 15% (peso/volumen) que fueron evaluadas posteriormente y se seleccionó una sola concentración para usarla en la construcción del andamio composite.

El proceso de elaboración de los andamios fibrilares de PLA consistió como se mencionó anteriormente, en la preparación de cuatro soluciones poliméricas 6, 7, 10, y 15% (peso/volumen) utilizando como solvente una combinación de 3:1 cloroformo-etanol; una vez pesado los 6, 7, 10, y 15 g de PLA y contenidos cada uno en un frasco de 200 mL con barra magnética, se agregó 75 mL de cloroformo y se dejó en agitación magnética por 12h para que se disolvieran los gránulos del PLA, una vez transcurrido este tiempo se adicionaron 25 mL de etanol, repitiendo la agitación por 60 minutos.

3.3.2 Síntesis de andamios de PLA mediante la técnica AJS

La técnica AJS se basa totalmente en el uso de gas inerte (Argón) a presión que está siendo dispensado a una velocidad extrema con el fin de estirar (hilar) la solución de polímero en fibras ultrafinas en la salida de la boquilla de un atomizador (Figura 10); al mismo instante en que se eyecta la solución del polímero el disolvente comienza a evaporarse y continúa haciéndolo después de que las fibras se depositan sobre un sustrato.

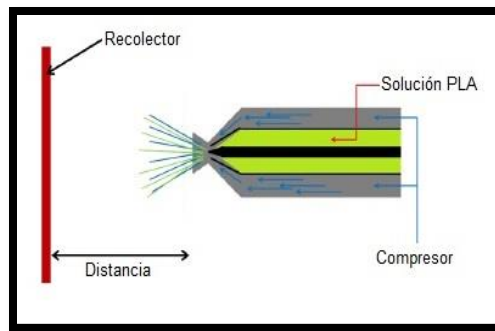


Figura 10.- Imagen esquemática del funcionamiento de la técnica AJS que consiste en la eyección del polímero mediante la presión a gas.

El equipo necesario para realizar esta técnica consiste en:

- Un atomizador
- Un recolector
- Un tanque de gas comprimido
- Solución del polimérica

En la tabla 3 se observa las condiciones necesarias para obtener andamios de PLA utilizando la técnica de AJS.

Tabla 3.- Condiciones estandarizadas para la obtención de nanofibras

Polímero	Concentración % (Peso/Vol)	Solvente	Presión (PSI)	Distancia (cm)
PLA	6	CHCl₃:ETOH (3:1)	30	11
PLA	7	CHCl₃:ETOH (3:1)	30	11
PLA	10	CHCl₃:ETOH (3:1)	30	11
PLA	15	CHCl₃:ETOH (3:1)	30	11

3.4 Técnicas de Caracterización

3.4.1 Microscopía Electrónica de Barrido

Las muestras obtenidas de los andamios de PLA fueron recortadas en forma cuadrada (0.5 cm x 0.5cm) y colocadas sobre barriles de aluminio y cinta carbón para la toma de micrografías en un microscopio electrónico de barrido marca JOEL JSM 7600F.

3.4.2 Medición del diámetro de fibras

Las micrografías SEM de los andamios de PLA fueron insertadas en el software “Image J” el cual permitió analizar el diámetro de las fibras. En total se llevaron a cabo 150 mediciones por cada porcentaje de PLA.

3.4.3 Espectroscopia Infrarroja por Transformada de Fourier

La identificación de grupos funcionales presentes en los andamios de PLA se realizó mediante FT-IR en un espectrofotómetro PerkinElmer GladiATR™, el cual posee un sistema de reflectancia total atenuada (ATR), que dispone de un soporte con cristal de diamante, permitiendo realizar las mediciones de manera fácil, rápida y directa, pues no se requiere una preparación previo al análisis.

3.4.4 Pruebas Mecánicas

Se cortaron quince especímenes de acuerdo a las medidas especificadas en la norma ASTM-D1708, se realizaron tres subgrupos (diferentes tiempos de depósito) por cada porcentaje de PLA (grupo) como se muestra en la tabla 4:

Tabla 4.-Grupos y Subgrupos del PLA

Concentración de PLA (Grupos)	Tiempo de depósito (Subgrupos)		
6%	15 minutos	30 minutos	45 minutos
7%	15 minutos	30 minutos	45 minutos
10%	15 minutos	30 minutos	45 minutos

Para evaluar la resistencia a la tensión y módulo elástico se utilizó una máquina universal de pruebas mecánicas INSTRON® en condiciones ambientales, a una velocidad de prueba de 1 mm/min.

3.5 Síntesis del Andamio Composite PLA/SBA-15 mediante la técnica de AJS

Por las características presentadas se eligió el PLA al 10%, a partir de esta concentración se mezclaron diferentes porcentajes (peso/peso) de SBA-15 como se describe en la tabla 5:

Tabla 5.- Condiciones para la obtención del composite

	% (p/p) SBA-15 agregado	Tiempo Agitación Ultrasónica (h)	Tiempo Agitación Magnética (h)	Tiempo de Depósito AJS (min)
PLA 10%	0.1	2	1	15
PLA 10%	0.15	2	1	15
PLA 10%	0.5	2	1	15
PLA 10%	0.7	2	1	15
PLA 10%	1	2	1	15

Una vez realizada la combinación de cada porcentaje se obtuvieron los andamios composites utilizando la técnica de AJS descrita en el punto 3.2.

3.6 Técnica de Caracterización

3.6.1 Microscopia Electrónica de Barrido

Las muestras obtenidas de los andamios de PLA fueron recortadas en forma de cuadrado (0.5 cm x 0.5cm) y colocadas sobre barriles de aluminio y cinta carbón para la toma de micrografías en un microscopio electrónico de barrido marca JOEL JSM 7600F.

3.6.2 Espectroscopia Infrarroja por Transformada de Fourier

La identificación de grupos funcionales presentes en los andamios composites se realizó mediante FT-IR en un espectrofotómetro PerkinElmer GladiATR™, el cual posee un sistema de reflectancia total atenuada (ATR), que dispone de un soporte con cristal de diamante, permitiendo realizar las mediciones de manera fácil, rápida y directa, pues no se requiere una preparación previo al análisis.

3.6.3 Análisis Termogravimétrico

El análisis se realizó en un equipo Hi-Res TGA 2950 TA Instruments entre 20 y 500°C con un flujo constante de nitrógeno de 100mL/min, y una rampa de calentamiento de 10°C/min, para este ensayo se utilizó crisol de α -alúmina como referencia.

3.6.4 Pruebas Mecánicas

Para evaluar la resistencia a la tensión y módulo elástico del composite se utilizó una máquina universal de pruebas mecánicas INSTRON® en condiciones ambientales, a una velocidad de prueba de 1mm/min. Se cortaron quince especímenes de acuerdo a las medidas especificadas en la norma ASTM-D1708, se realizaron cinco grupos del composite como se muestra en la tabla 7:

Tabla 7.-Grupos del composite

Grupo	No de muestras
PLA (10%-15 minutos)	15
Composite (0.1%)	15
Composite (0.15%)	15
Composite (0.5%)	15
Composite (0.7%)	15
Composite (1%)	15

3.6.5 Ensayo de Citotoxicidad

Para realizar el ensayo se utilizaron células osteoblásticas humanas fetales; inicialmente en una caja de 48 pozos se colocaron 5×10^3 células por pozo junto con 200 mL de medio de cultivo (DMEM), el cual fue suplementado previamente con 10% de suero fetal bovino. Las células se mantuvieron a 37°C en una incubadora bajo una atmósfera con 5% CO₂ y 100% de humedad. El medio de cultivo fue cambiado cada dos días.

Se utilizó el kit CCK-8 y la medición de absorbancia se realizó a 1, 3, 5, y 7 días en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 450 nm. El ensayo se realizó por triplicado.

CAPÍTULO 4

RESULTADOS

4.1 Cerámica SBA-15

4.1.1 Microscopia Electrónica de Barrido y EDS

En la Figura 11(a) se presenta la micrografía SEM de la cerámica SBA-15, en el cual, se observa el arreglo superficial a manera de láminas organizadas, así mismo para observar la morfología que presenta la cerámica de este tipo se caracterizó mediante TEM (Figura 14).

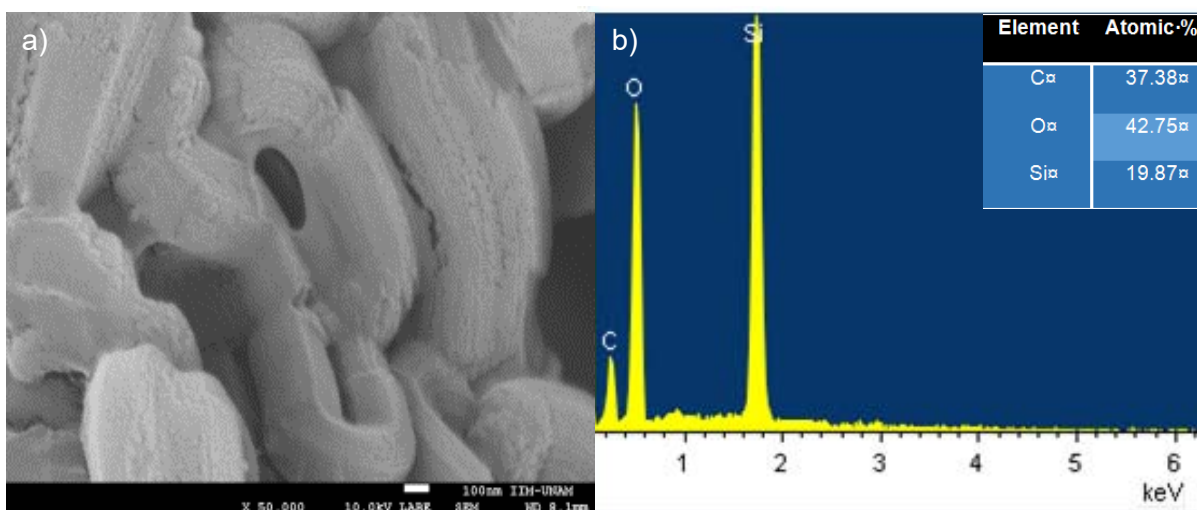


Figura 11.- (a) micrografía SEM del SBA-15 donde se observa arreglo superficial a manera de láminas; (b) Espectroscopia por Dispersión de Energía de Rayos X de la cerámica SBA-15 donde se identificaron los elementos Silicio, oxígeno y carbono.

La caracterización por EDS permitió realizar un análisis semicuantitativo de los elementos presentes en la cerámica, en la Figura 11 (b) se observa la identificación de los elementos de silicio, oxígeno y carbono.

4.1.2 Espectroscopia Infrarroja por Transformada de Fourier

En el espectro observado en la Figura 12 se puede apreciar una banda ancha alrededor de 3400 cm^{-1} típica de vibraciones de alargamiento del enlace OH de los grupos silanol (Si-OH) y del agua que aún se encuentra incluido en la cerámica. Aproximadamente a 1600 cm^{-1} aparece una banda correspondiente a la vibración de flexión del enlace OH.

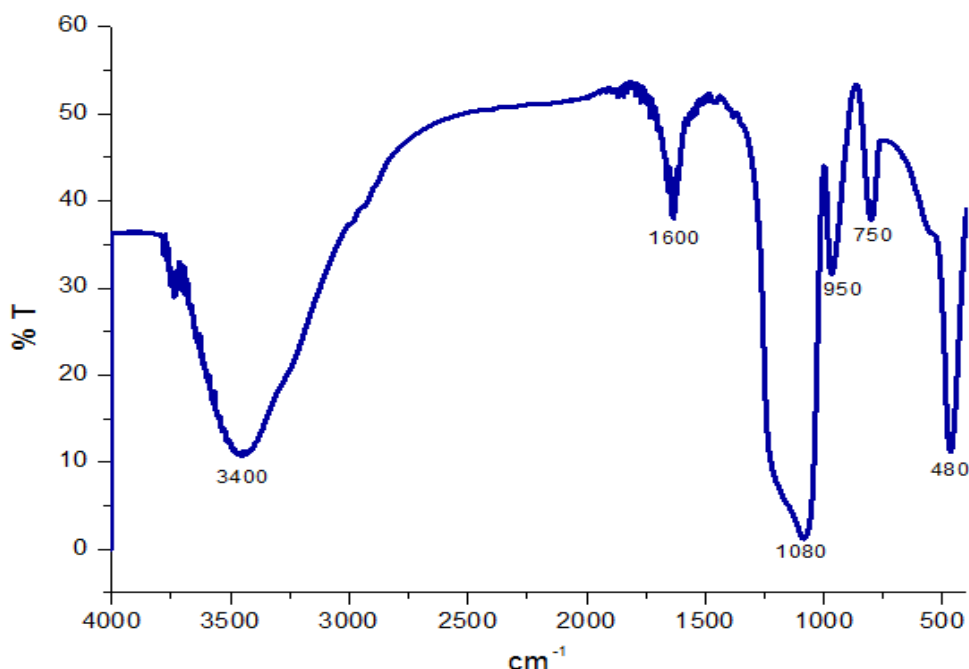


Figura 12.- FT-IR de la cerámica SBA-15, donde se observa las bandas características OH a 3400 cm^{-1} , Si-O a 1080 cm^{-1} , Si-OH a 950 cm^{-1} , O-Si-O a 750 y 480 cm^{-1}

La banda a 1080 cm^{-1} se atribuye a la vibración de alargamiento de los enlaces Si-O, mientras que las bandas observadas en 950 cm^{-1} se deben a vibraciones simétricas y antisimétricas de los enlaces Si-OH. Finalmente, las bandas observadas a 750 y 480 cm^{-1} corresponden a la vibración de flexión del enlace O-Si-O, estos resultados concuerdan con otros estudios reportados por Zhang y cols. (73)

4.1.3 Difracción de Rayos X

En la Figura 13 se puede observar el XRD del SBA-15 donde sólo se obtuvo una reflexión a bajo ángulo, el cual correspondió al plano (1-0-0).

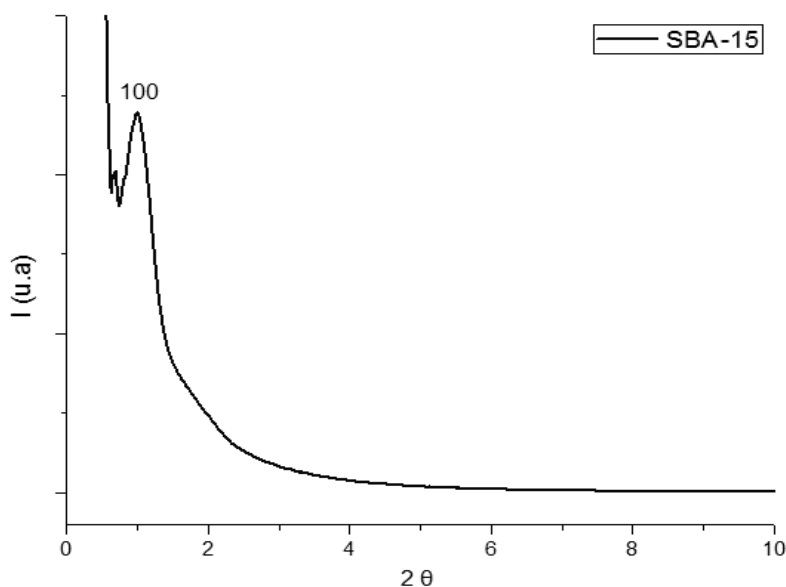


Figura 13.- XRD del SBA-15 en el que se observa la reflexión del plano (1 0 0)

4.1.4 Microscopia Electrónica de Transmisión de Alta Resolución

Las imágenes de microscopia electrónica de transmisión de alta resolución para el material SBA-15 se muestran en la Figura 14; en la imagen de la Figura 14 (a) puede observarse un arreglo hexagonal bien ordenado debido a que el haz de electrones fue paralelo al eje principal de los cilindros; mientras que en la Figura 14 (b), se observa una imagen de canales puesto que el haz de electrones fue perpendicular al eje principal de los poros.

Con estas micrografías se confirma la estructura hexagonal que posee la cerámica SBA-15.

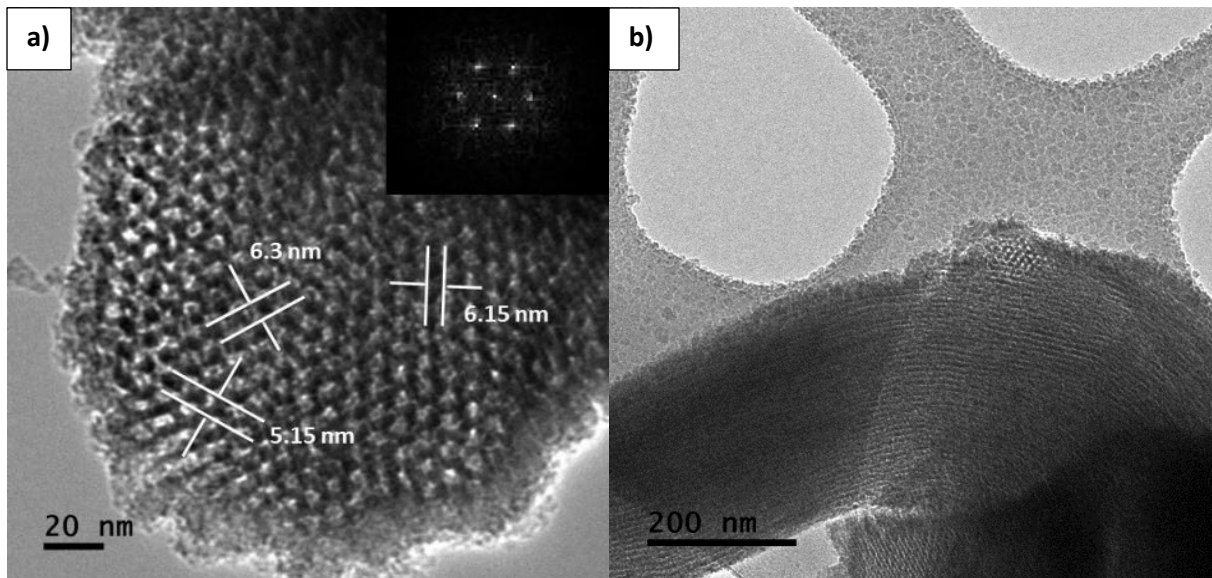


Figura 14.- Microscopía electrónica de transmisión de la cerámica SBA-15; (a) Se observa el arreglo hexagonal del SBA-15 y en el recuadro superior derecho se muestra la inversa de la Transformada de Fourier, (b) Se observa los canales del SBA-15

4.1.5 Análisis de tamaño de poro y área superficial

La Figura 15 muestra las isotermas de adsorción/desorción de N₂ y en la parte inferior derecha la distribución de tamaño de poro de la cerámica SBA-15 sintetizado. El comportamiento del ciclo muestra que es una isoterma tipo IV; que de acuerdo con la clasificación de la IUPAC este tipo de isoterma pertenece a los materiales mesoporosos.

El SBA-15 sintetizado obtuvo un área superficial BET de 820 m²/g y un tamaño de poro obtenido por el método BJH de entre 3.5 nm y 5 nm. Estos resultados concuerdan con otros estudios reportados por Balas y cols. (74)

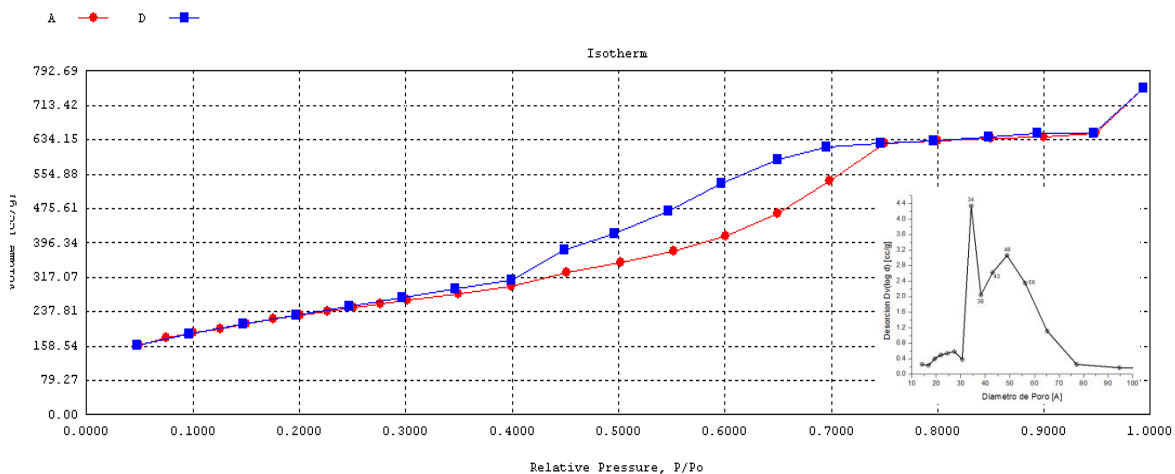


Figura 15.- Isotherma de N₂ del SBA-15 en donde se puede observar una isoterma tipo IV característico de las cerámicas mesoporosas y un tamaño de poro que va de 3.5 a 5 nm.

4.1.6 Análisis Termogravimétrico de la cerámica SBA-15

En la Figura 16 se presenta el TGA de la cerámica SBA-15; puede observarse que en el intervalo de 20 a 125 °C tiene lugar una pérdida de peso correspondiente a la evaporación de agua absorbida por la cerámica; dentro de este intervalo se encuentra la temperatura corporal (37°C) en donde, el termograma muestra una pérdida aproximada del 2%, la cual debe considerarse si esta evaporación de agua pudiese afectar o no al organismo en el momento de estar en contacto con él; y en un segundo intervalo de 125 a 300 °C muestra otra pérdida de peso atribuido a la eliminación del tensoactivo (Pluronic 123[®]) utilizado para la síntesis del SBA-15.

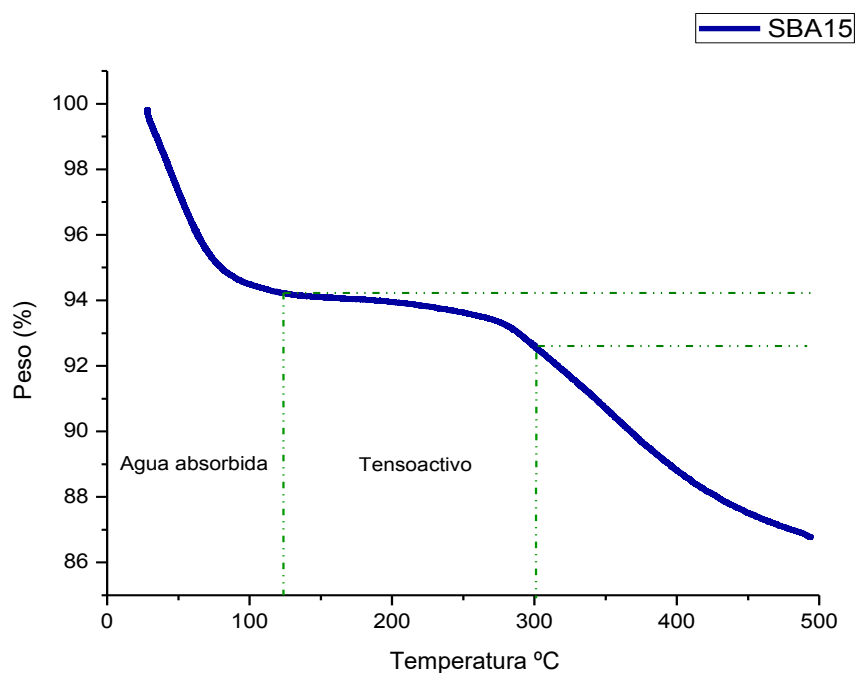


Figura 16.- TGA de la cerámica SBA-15, se observa una pérdida de peso a partir de 20°C por el agua absorbida durante la síntesis y una segunda pérdida a 125°C por la eliminación del tensoactivo.

4.2 Elaboración de Andamios de PLA

4.2.1 Microscopia Electrónica de Barrido

En la Figura 17 (a-d) se pueden observar las micrografías de SEM de los 4 diferentes porcentajes (15, 10, 7, y 6 %) que se utilizaron para evaluar la morfología y distribución de fibras. En la Figura 17 (a) muestra la morfología y distribución de fibras del PLA al 15% donde se observa que no se encuentran bien definidas a diferencia de los porcentajes 10, 7 y 6%.

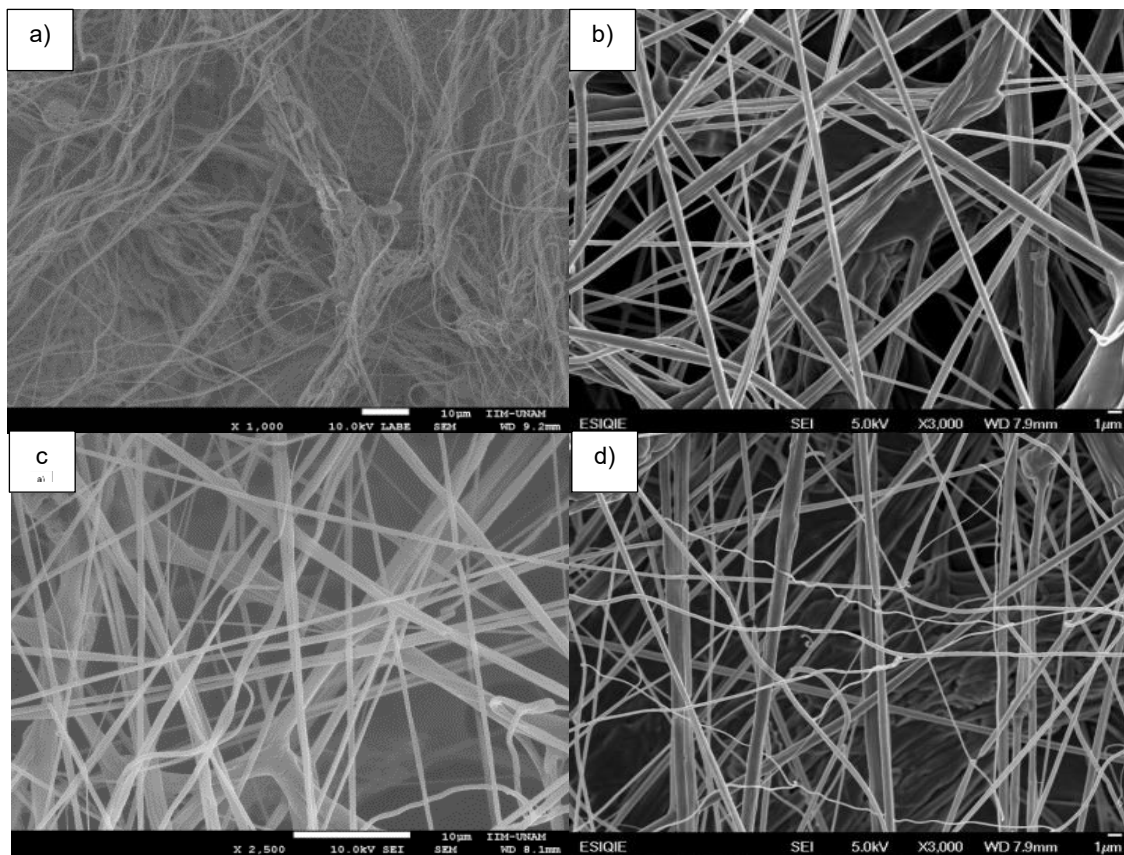


Figura 17.- Microscopia electrónica de barrido de fibras a diferentes porcentajes del PLA; (a) PLA al 15%, (b) PLA al 10%, (c) PLA a l 7% y (d) PLA al 6%

4.2.2 Medición del Diámetro de Fibras

Se realizaron 150 mediciones al diámetro de fibra por cada porcentaje de PLA utilizando el software “Image J”. La Figura 18 (a-c) representa los histogramas del diámetro de fibras al 6, 7, y 10% respectivamente, en donde se observa que, a medida que aumenta el porcentaje del PLA, aumenta también el diámetro de fibra.

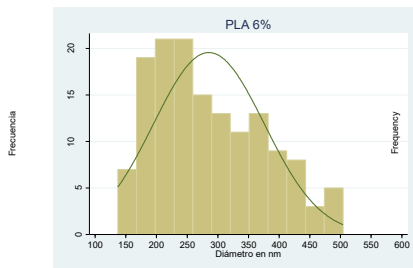


Figura 18 (a).- Histograma PLA 6%

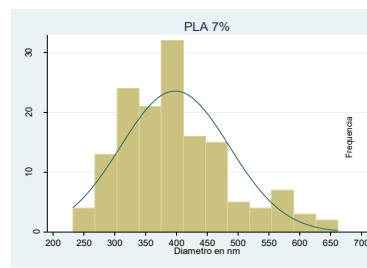


Figura 18 (b).- Histograma PLA 7 %

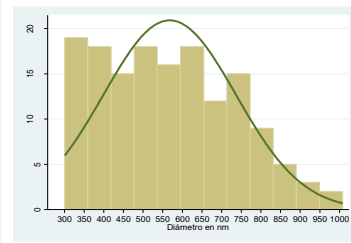


Figura 18 (c).- Histograma PLA 10%

Observaciones	150
Tamaño	285.4065 nm
Promedio	
Sesgo	0.49245
Kurtosis	2.30446
Rango	137.002-504.294 nm

Observaciones	150
Tamaño	397.7014 nm
Promedio	
Sesgo	.6906392
Kurtosis	3.211871
Rango	232.254-661.802 nm

Observaciones	150
Tamaño	567.7869 nm
Promedio	
Sesgo	0.364523
Kurtosis	2.271414
Rango	300.46-1008 nm

4.2.3 Espectroscopia Infrarroja por Transformada de Fourier

En la Figura 19 se presenta tres espectros infrarrojos que corresponden a los diferentes porcentajes de PLA con las que se trabajó (6, 7, y 10%). En los tres espectros se observan las mismas curvas, únicamente varía la concentración, siendo la del 10% la más concentrada. En todas las muestras se observan curvas características presentes del PLA como son la banda del hidroxilo en 3000 cm^{-1} , las bandas en 2920 cm^{-1} , 2850 cm^{-1} pertenecientes a los enlaces CH_3 , C-H; así como la banda del carbonilo (C=O) a 1749 cm^{-1} y los enlaces C-O-C a 1080 cm^{-1} .

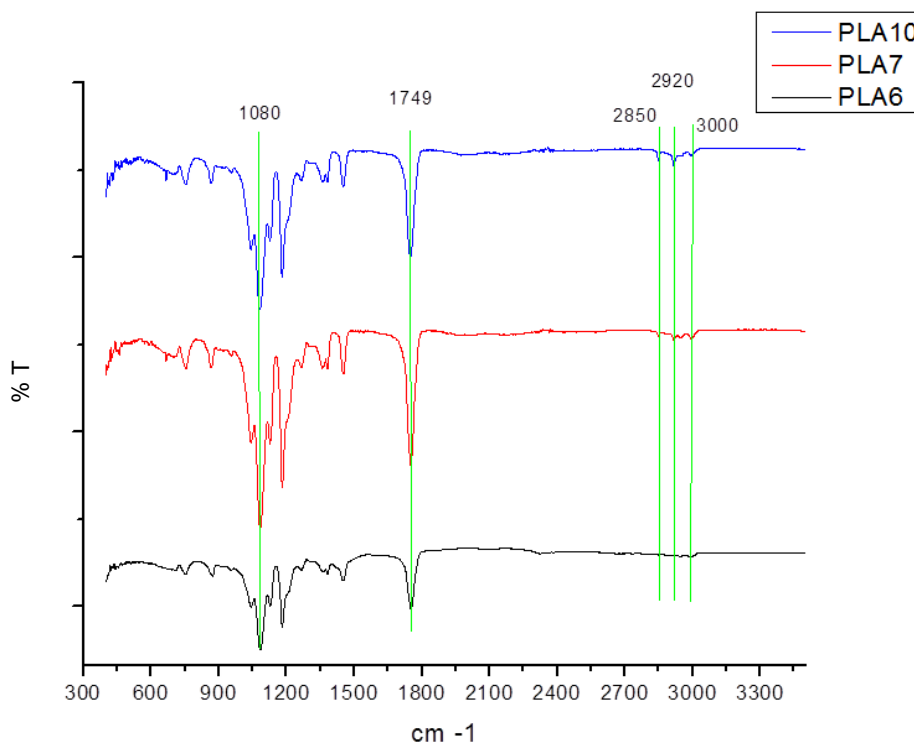
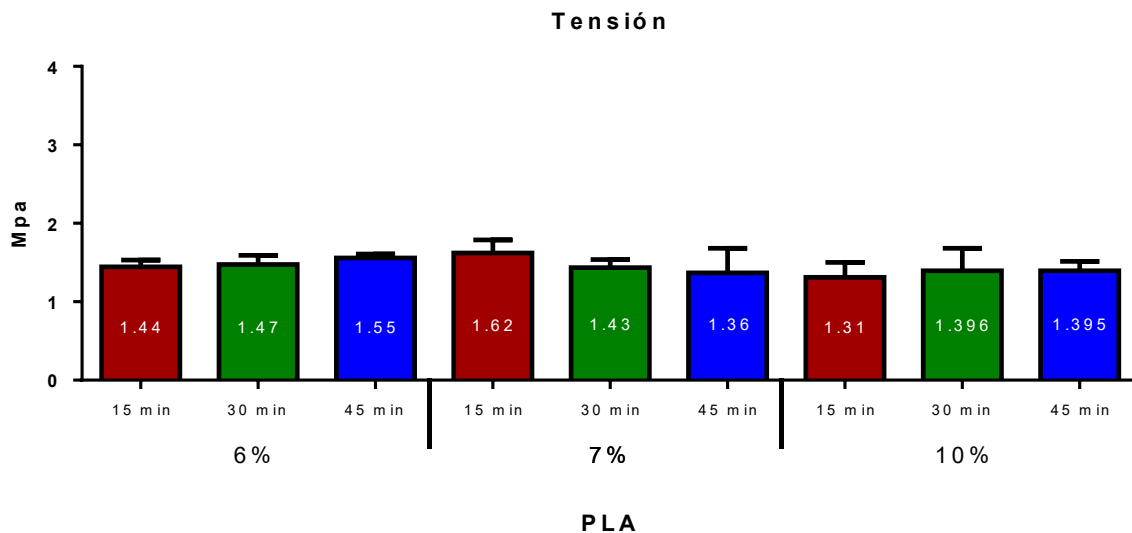


Figura 19.- Espectroscopia Infrarroja por Transformada de Fourier en el que se observa los espectros característicos del PLA al 10, 7 y 6%.

4.2.4 Pruebas Mecánicas

4.2.4.1 Resistencia a la Tensión

Los resultados de resistencia a la tensión se muestran en la gráfica 1. A los datos obtenidos se le emplearon una prueba de normalidad, mostrando una distribución normal y se le aplicó la prueba estadística ANOVA no encontrándose diferencias estadísticamente significativas a cada grupo ($p=0.09$).



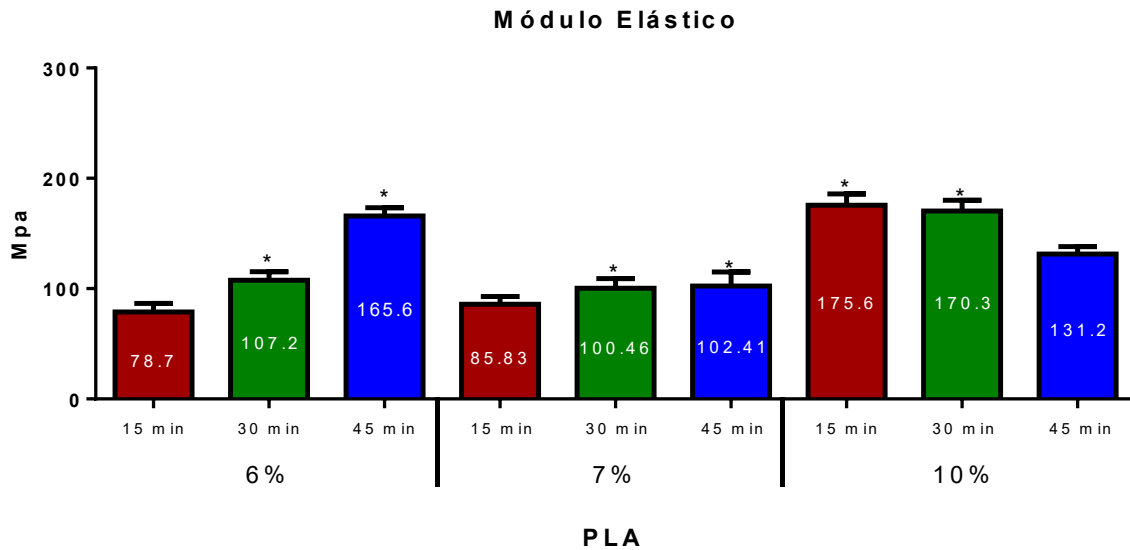
Gráfica 1.- Resistencia a la tensión del PLA al 6, 7 y 10 % por cada tiempo depositado

La media esta expresada en el centro de las barras. (ANOVA $p=0.09$)

Aunque no hubo diferencias estadísticamente significativas se puede observar que el grupo que presentó mayor resistencia a la tensión fue el PLA 7% a 15 min, los grupos del PLA 6% a diferentes tiempos presentaron resultados similares al igual que los grupos del PLA 10%; no obstante, se debe tomar en cuenta otras características como el módulo elástico y diámetro de fibra para llevar a cabo la construcción del composite.

4.2.4.2 Módulo Elástico

Los resultados del módulo de elasticidad se muestran en la gráfica 2. Los datos obtenidos presentan una distribución normal por lo que se aplicó una prueba de ANOVA, donde se encontraron diferencias estadísticamente significativas.



Gráfica 2.- Módulo de elasticidad del PLA 6, 7 y 10 % a diferentes tiempos (ANOVA, $p < 0.001$)

La tabla 6 muestra la comparación de los grupos que presentaron diferencias estadísticamente significativas.

Tabla 6.- Resultados de la prueba Tukey ($p \leq 0.05$) para módulo de elasticidad

grupos	p	grupos	p
PLA6-45min con PLA6-15min	<0.001	PLA10-15min con PLA10-45min	<0.001
PLA6-45min con PLA6-30min	0.005	PLA10-30min con PLA10-45min	0.003

4.2.4.3 Elección de grupo para realizar el composite

A pesar de que existieron varios grupos con buen comportamiento mecánico, se eligió el PLA 10% a 15 minutos para la construcción del composite; esta elección se tomó con base a las características que presentó así como el tiempo de depósito. Como pudo observarse en los resultados anteriormente descritos, este grupo presentó un diámetro de fibra de 568 nm en promedio, con un rango de 300 a 1000 nm, una resistencia a la tensión de 1.31 MPa y un módulo elástico de 176 MPa. Este fue el grupo que presentó características cercanas al de hueso trabecular con el menor tiempo de depósito.

4.3 Andamios Composite (PLA/SBA-15)

4.3.1 Microscopia Electrónica de Barrido

En la Figura 20 (a) puede observarse las micrográficas SEM del composite donde muestra la distribución que tiene la cerámica SBA-15 dentro de las fibras del PLA. Como puede apreciarse en la Figura 20 (b-d), la cerámica no queda completamente dentro de la fibra del PLA; esto debido al tamaño de partícula que presenta la cerámica SBA-15.

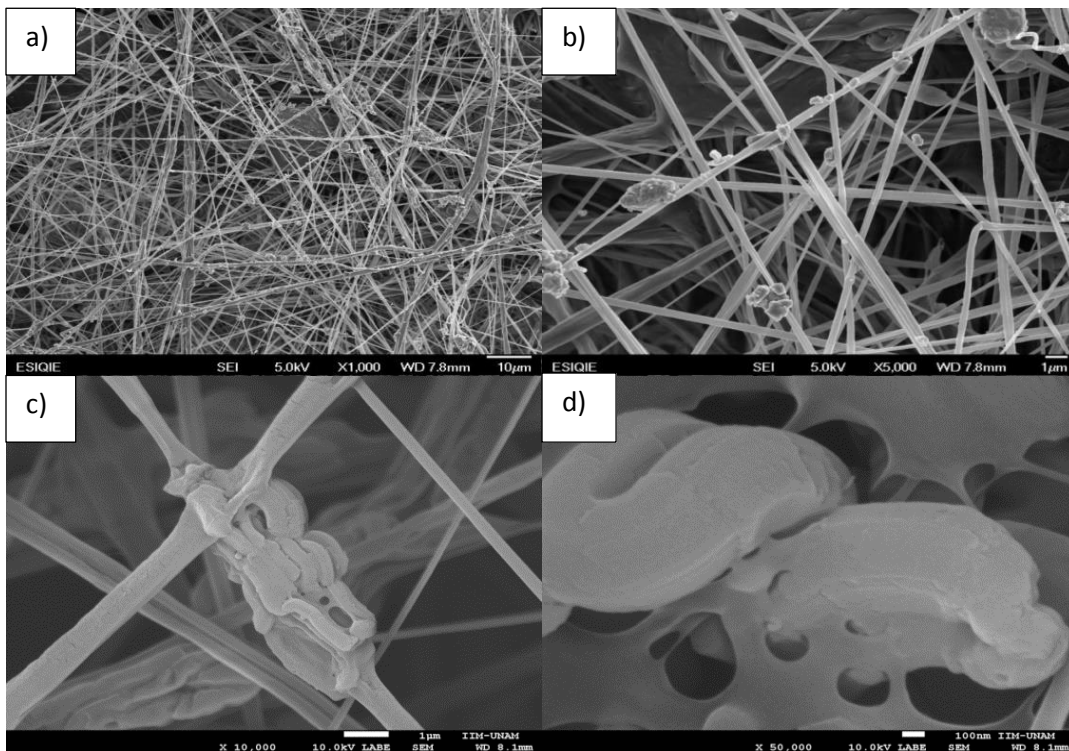


Figura 20.- Microscopia electrónica de barrido del Composite, donde se observa la distribución de la cerámica dentro de las fibras del PLA a diferentes aumentos.

4.3.2 Espectroscopia Infrarroja por Transformada de Fourier

En la Figura 21 se observan los espectros infrarrojos del composite, SBA-15 y del PLA con el fin de comparar las bandas que presentan. Como puede observarse el espectro del composite es muy similar al de PLA, se observan la banda del carbonilo (C=O) a 1749 cm^{-1} , los enlaces C-O-C a 1080 cm^{-1} y de una pequeña banda a 3000 cm^{-1} correspondiente al grupo O-H, asimismo se observa una banda cerca 480 cm^{-1} atribuida al enlace Si-O de la cerámica SBA-15.

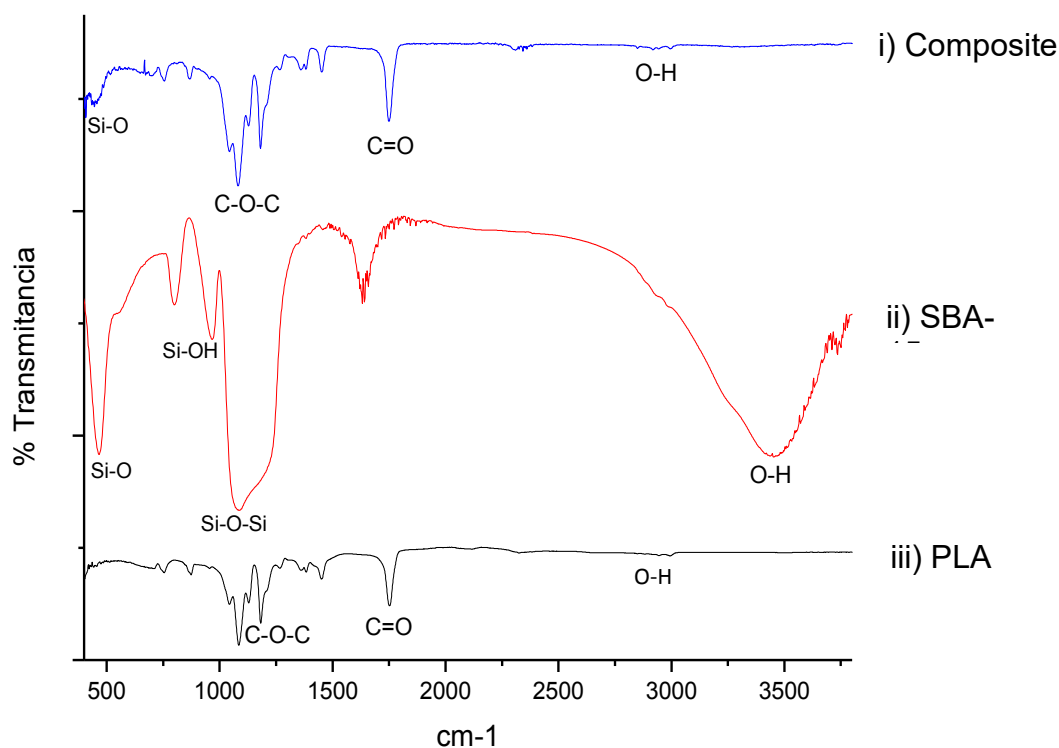


Figura 21.- Espectroscopia Infrarroja por Transformada de Fourier del composite, SBA-15 y PLA, donde se hace un comparativo de las bandas de los tres materiales.

4.3.3 Análisis Termogravimétrico

La Figura 22 muestra el TGA del PLA y del composite; debido a que el PLA utilizado fue de la forma esteroisomérica PLA-L, éste presenta una sola curva de degradación que se desplaza hacia la derecha del termograma hasta aproximadamente 340°C; estudios realizados por Ho y cols (75) reportan un comportamiento similar. Por otro lado se observa la curva del composite que sufre una degradación en un solo paso hasta aproximadamente 300°C; comparado con el TGA de la cerámica SBA-15 (Figura 16) se puede apreciar que el PLA funcionó como matriz polimérica protectora ayudándola a ser estable térmicamente hasta aproximadamente 300°C.

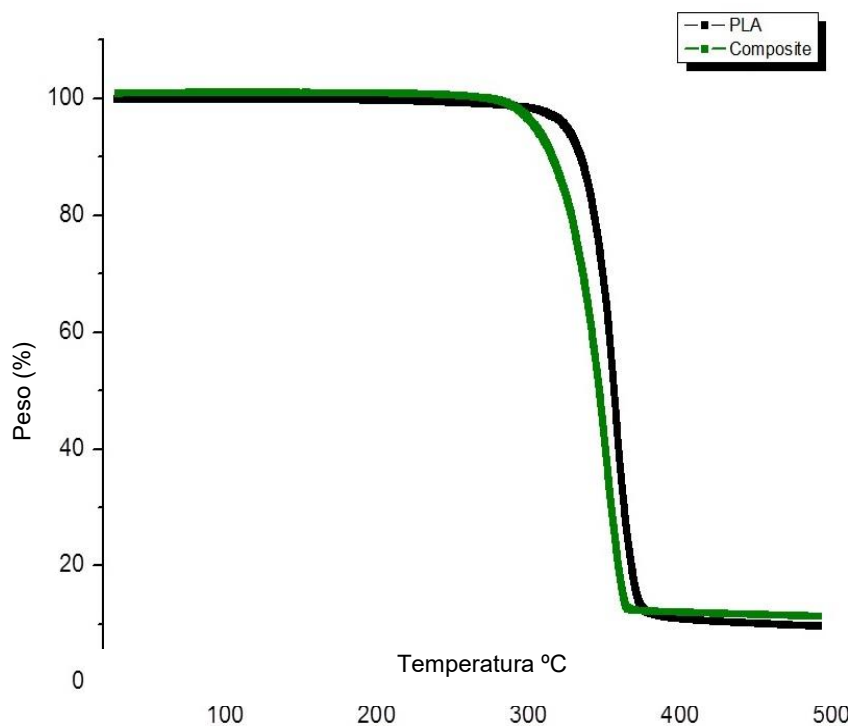
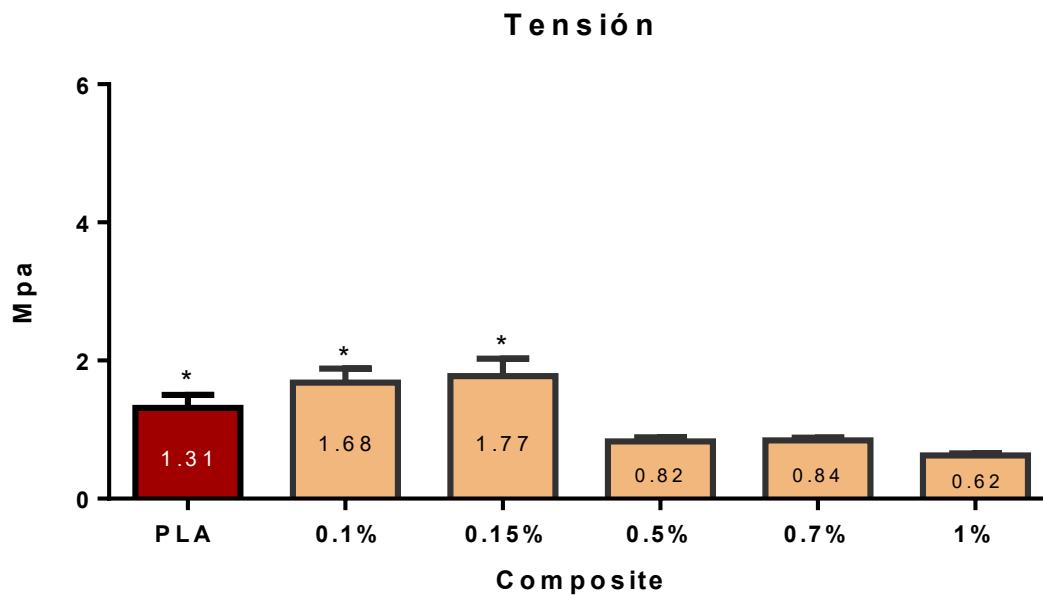


Figura 22.- TGA del PLA y composite, donde se observa una degradación del PLA a ~340°C y una degradación del composite a ~300°C.

4.3.4 Pruebas Mecánicas

4.3.4.1 Resistencia a la tensión

Los resultados de resistencia a la tensión se muestran en la gráfica 3. Los datos obtenidos presentan una distribución normal por lo que se analizaron por ANOVA, y se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.001$).



Gráfica 3.- Resistencia a la Tensión del Composite a diferentes porcentajes

La Media esta expresada en el centro de las barras (ANOVA, $p = < 0.001$)

La tabla 7 muestra la comparación de los grupos que presentaron diferencias estadísticamente significativas.

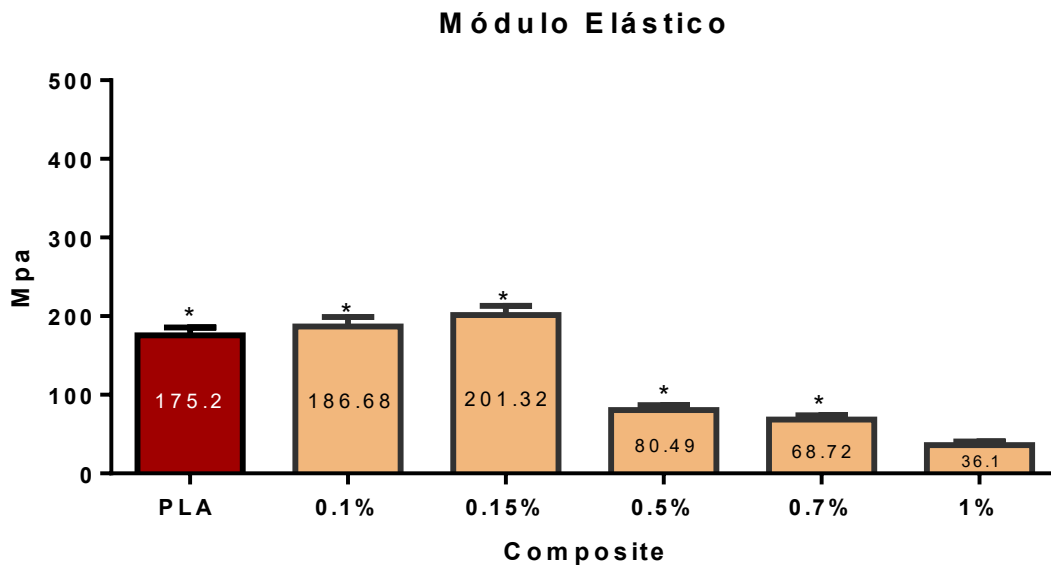
Tabla 7.- Resultados de la prueba Tukey ($p \leq 0.05$) para la resistencia a la tensión

Grupos	P	Grupos	P
PLA con 0.5% Composite	<0.001	PLA con 1% Composite	<0.001
PLA con 0.7% Composite	<0.001	PLA con 0.1% Composite	<0.001

PLA con 0.15% Composite	<0.001	Composite 0.15% con 0.5%	<0.001
Composite 0.1% con 0.5%	<0.001	Composite 0.15% con 0.7%	<0.001
Composite 0.1% con 0.7%	<0.001	Composite 0.15% con 1%	<0.001
Composite 0.1% con 1%	<0.001		

4.3.4.2 Módulo Elástico

Los resultados del módulo de elasticidad se muestran en la gráfica 4. Los datos obtenidos presentan una distribución normal por lo que se aplicó una prueba de ANOVA, donde se encontraron diferencias estadísticamente significativas.



Gráfica 4.- Módulo elástico del Composite a diferentes porcentajes

La Media esta expresada en el centro de las barras (ANOVA, p <0.001)

La tabla 8 muestra la comparación de los grupos que presentaron diferencias estadísticamente significativas.

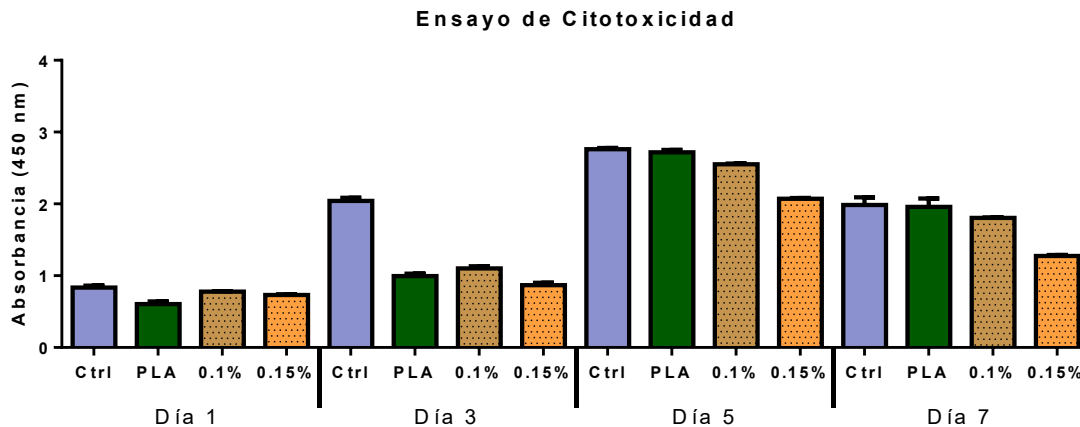
Tabla 8.- Resultados de la prueba Tukey ($p \leq 0.05$) para el módulo elástico

Grupos	P	Grupos	P
PLA con 0.5% Composite	<0.001	Composite 0.15% con 0.5%	<0.001
PLA con 0.7% Composite	<0.001	Composite 0.15% con 0.7%	<0.001
PLA con 1% Composite	<0.001	Composite 0.15% con 1%	<0.001
Composite 0.1% con 0.5%	<0.001	Composite 0.15% con PLA	<0.01
Composite 0.1% con 0.7%	<0.001	Composite 0.5% con 1%	<0.001
Composite 0.1% con 1%	<0.001	Composite 0.7% con 1%	<0.001

Se observa que los composites con bajas concentraciones de cerámica (0.1% y 0.15%) presentan un aumento en las propiedades mecánicas tanto de tensión como módulo elástico, sin embargo no se presenta el mismo comportamiento a mayores concentraciones (0.5%, 0.7% y 1%).

4.3.5 Ensayo de Citotoxicidad

La gráfica 5 muestra los resultados obtenidos del ensayo de citotoxicidad a diferentes días



Gráfica 5.-Ensayo de citotoxicidad del PLA, composite 0.1% y composite 0.15%, ANOVA, $p < 0.001$

Se observa que los composites elegidos permiten una proliferación celular similar a la del PLA, lo que indica que no afecta el reconocimiento celular para la adhesión y proliferación de los osteoblastos.

La tabla 9 muestra la comparación de los grupos que presentaron diferencias estadísticamente significativas.

Tabla 9.- Resultados de la prueba Tukey ($p \leq 0.05$) para el ensayo de Citotoxicidad

Grupos	P	Grupos	P
PLA día 1 con PLA día 3	<0.001	PLA día 1 con 0.15% día 5	<0.001
PLA día 1 con PLA día 5	<0.001	PLA día 1 con 0.1% día 7	<0.001

PLA día 1 con PLA día 7	<0.001	PLA día 1 con 0.15% día 7	<0.001
PLA día 1 con 0.1% día 3	<0.001	0.1% día 1 con 0.1% día 3	<0.001
PLA día 1 con 0.15% día 3	<0.001	0.1% día 1 con PLA día 5	<0.001
PLA día 1 con 0.1% día 5	<0.001	0.1% día 1 con 0.1% día 5	<0.001
0.1% día 1 con 0.15% día 5	<0.001	PLA día 3 con PLA día 5	<0.001
0.1% día 1 con PLA día 7	<0.001	PLA día 3 con 0.1% día 5	<0.001
0.1% día 1 con 0.1% día 7	<0.001	PLA día 3 con 0.15% día 5	<0.001
0.1% día 1 con 0.15% día 7	<0.001	PLA día 3 con PLA día 7	<0.001
0.15% día 1 con PLA día 3	<0.001	PLA día 3 con 0.1% día 7	<0.001
0.15% día 1 con 0.1% día 3	<0.001	PLA día 3 con 0.15% día 7	<0.001
0.15% día 1 con 0.15% día 3	<0.001	0.1% día 3 con PLA día 5	<0.001
0.15% día 1 con PLA día 5	<0.001	0.1% día 3 con 0.1% día 5	<0.001
0.15% día 1 con 0.1% día 5	<0.001	0.1% día 3 con 0.15% día 5	<0.001
0.15% día 1 con 0.15% día 5	<0.001	0.1% día 3 con PLA día 7	<0.001
0.15% día 1 con PLA día 7	<0.001	0.1% día 3 con 0.1% día 7	<0.001
0.15% día 1 con 0.1% día 7	<0.001	0.1% día 3 con 0.15% día 7	<0.001
0.15% día 1 con 0.15% día 7	<0.001	0.15% día 3 con PLA día 5	<0.001
0.15% día 3 con PLA día 7	<0.001	0.15% día 3 con 0.1% día 5	<0.001
0.15% día 3 con 0.1% día 7	<0.001	0.15% día 3 con 0.15% día 5	<0.001
0.15% día 3 con 0.15% día 7	<0.001	PLA día 5 con 0.15% día 5	<0.001
PLA día 5 con PLA día 7	<0.001	PLA día 5 con 0.1% día 7	<0.001
PLA día 5 con 0.15% día 7	<0.001	0.1% día 5 con 0.15% día 5	<0.001

0.1% día 5 con PLA día 7	<0.001	0.1% día 5 con 0.1% día 7	<0.001
0.1% día 5 con 0.15% día 7	<0.001	0.15 día 5 con 0.15 día 7	<0.001
PLA día 7 con 0.15% día 7	<0.001	0.1% día 7 con 0.15% día 7	<0.001

CAPÍTULO 5

DISCUSIÓN

El andamio es una plantilla que actúa como una matriz temporal para la proliferación celular; proporcionando soporte mecánico mientras las células depositan los componentes de su matriz extracelular. Un andamio ideal debe mimetizar el tejido a reemplazar, así como funcionar de reservorio de agua, nutrientes, y elementos que permitan el crecimiento celular,^(53,54) sin embargo, a pesar de los avances importantes que se han introducido en el campo de la ingeniería de tejidos aún no se logra obtener un biomaterial que mimetice la MEC del hueso.

Por ello, en los últimos años se ha propuesto la preparación de composites (polímero/cerámica) donde se sustituye la fase orgánica de la MEC ósea con el polímero y la fase inorgánica con la cerámica,^(67,68) además de que, al combinar estos dos materiales (polímero-cerámico) se pretenden mejorar las propiedades tanto mecánicas como térmicas en comparación a las que presentan los materiales de manera individual.⁽⁷²⁾

Actualmente existen varias técnicas que permiten la formación de andamios entre las cuales están: auto-ensamblado, separación de fases, electrospinning, air jet spinning. Aunque cada técnica es diferente una con otra, cada método posee sus ventajas y desventajas.⁽⁵⁾ En este proyecto se utilizó la técnica air jet spinning debido a que diversos estudios han demostrado que produce nanofibras con un rango amplio en la escala desde microfibras hasta nanofibras y que, a comparación de otras técnicas convencionales como el electrospinning, ésta permite obtener las nanofibras diez veces más rápido debido a que es una técnica de un solo paso, además de que su equipo es de bajo costo.⁽⁵⁷⁻⁵⁹⁾

El andamio composite utilizado en este trabajo estuvo constituido por una matriz polimérica de PLA mezclado con nanocerámica de SBA-15, el PLA que se utilizó fue comercial (192,000 g/mol, Nature Works D2002) y la cerámica SBA-15 se sintetizó mediante el protocolo de Zhao y cols.⁽³⁸⁾ la cual fue caracterizada por SEM, FT-IR, XRD, TEM, BET y TGA. De acuerdo con otros estudios reportados, la cerámica sintetizada concuerda con una cerámica hexagonal característica del SBA-15.^(39,50,52,70,71)

Las técnicas utilizadas para la generación de andamios pueden alterar la composición de las mismas, por ello es de gran importancia caracterizarlos. Las fibras obtenidas del PLA utilizando AJS se encontraron en un rango micrométrico, la elección del grupo PLA 10%-15 minutos se debió a las características de fibras que presentó (diámetro promedio de 568 nm con un rango de 300 a 1000 nm), estos valores se encuentran dentro de los parámetros reportados de la MEC ósea, además de que las propiedades mecánicas que presentó este grupo (resistencia a la tensión 1.31 MPa, modulo elástico 175 MPa), fueron las más cercanas a las que presenta el hueso trabecular en el menor tiempo de depósito.⁽¹⁰⁾

Se demostró que agregar cerámica SBA-15 a concentraciones de 0.5%, 0.7% y 1% disminuyen las propiedades mecánicas del andamio composite; sin embargo se observó un efecto contrario al agregar cerámica SBA-15 a concentraciones de 0.1% y 0.15%, donde las propiedades de resistencia a la tensión y módulo elástico del andamio composite aumentan significativamente acercándose aún más a los

valores del hueso trabecular, por lo que se eligieron estos dos últimos porcentajes para evaluar el ensayo de citotoxicidad.

El ensayo biológico permitió de manera “*in vitro*” observar el posible comportamiento que puedan tener los osteoblastos “*in vivo*”. Se utilizaron tres grupos para la evaluación del ensayo de citotoxicidad: PLA, composite 0.1% y composite 0.15%; donde se pudo monitorear el comportamiento celular a 1, 3, 5 y 7 días. El comportamiento del PLA, composite 0.1% y composite 0.15% fue similar en el día 1 y 3; para el día 5 se alcanza el punto máximo de los tres materiales, no obstante en el día 7 se observa una disminución en la proliferación, que puede corresponder a que las células se hayan despegado, que presenten un cambio en su metabolismo debido a que están formando su MEC o que se estén diferenciando.⁽⁷⁶⁻⁷⁹⁾

Como perspectivas a futuro se recomienda realizar estudios de mineralización al andamio composite para evaluar la bioactividad que pueda presentar, así como pruebas de degradación.

CAPÍTULO 6

CONCLUSIONES

6.- Conclusiones

- i) Se sintetizó un material mesoporoso, en este caso del tipo SBA-15 el cual fue caracterizado mediante SEM, EDS, TEM, FT-IR, BET, XRD.
- ii) La técnica AJS es una técnica sencilla, económica, rápida y de un solo paso que permite obtener nanofibras de PLA sin modificar su estructura química.
- iii) La adición de la cerámica SBA-15 al 0.1% y 0.15% muestra un aumento en las propiedades mecánicas de tensión y módulo elástico de las fibras de PLA, a diferencia de los porcentajes de 0.5%, 0.7% y 1% donde se observó una disminución de dichas propiedades, por lo que a bajas concentraciones la cerámica SBA-15 actúa como refuerzo a la matriz polimérica.
- iv) Los datos indican que los composites a 0.1% y 0.15% permiten una proliferación celular similar a la del PLA, lo que indica que el agregado de la cerámica SBA-15 no afecta el reconocimiento celular para la adhesión y proliferación de los osteoblastos.

Referencias Bibliográficas

1. Kotela I, Blazewicz M. Polymer nanocomposites for bone tissue substitutes. *Ceramics International*. 2009; 35: p. 2475-2480.
2. Tanodekaew S, Channasanon S. PLA-HA scaffolds: preparation and bioactivity. *Procedia Engineering*. 2013; 59: p. 144-149.
3. Nordin M. *Biomecánica Básica del Sistema Musculoesquelético*. 3rd ed. New York: Mc Graw-Hill; 2004.
4. Murugan R, Ramakrishna A. Development of nanocomposites for bone grafting. *Composites Science and Technology*. 2005; 65: p. 2385-2406.
5. Chen H, Truckenmuller R. *Fabrication of nanofibrous scaffolds for tissue engineering applications*. Netherlands: Woodhead Publishing Limited; 2013.
6. Ritchie R, Zimmermann E. Bone as Structural Material. *Materials Views*. 2015; 4: p. 1287-1304.
7. McMahon R, Wang L. Development of nanomaterials for bone repair and regeneration. *J Biomed Mater Res*. 2013; 101: p. 387-397.
8. Wiesman HP, Meyer U. Biological and biophysical principles in extracorporeal bone tissue engineering Part II. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2004; 33: p. 523-530.
9. Robling AG, Castillo AG, Turner CH. Biomechanical and Molecular Regulation of Bone. *Annu. Rev. Biomed. Eng*. 2006; 8: p. 455-498.
10. Zeeshan S, Shariq N. *Biodegradable Materials for Bone Repair and Tissue Engineering Applications*. *Materials*. 2015; 8: p. 5744-5794.
11. Davies JE, Hosseini MM. Histodynamics of endosseous wound healing. In Davies JE, Hosseini MM. *Bone Engineering*.: Davies, J.E; 2000. p. 1-14.
12. Rueger JM. Bone replacement materials—state of the art and the way ahead. *Orthopäde*. 1998; 27(1): p. 72-79.
13. den Boer FC, Haarman HJTM. Healing of segmental bone defects with granular porous hydroxyapatite augmented with recombinant human osteogenic protein-1 or autologous bone marrow. *J Orthopaed Res*. 2003; 21: p. 521-528.
14. Kenley RA, Yim K, Hollinger JO. Biotechnology and bone graft substitutes. *Pharmaceut Res*. 1993; 10: p. 1393-1401.
15. Razak S, Sharif N, Rahman W. Biodegradable polymers and their bone applications: A review. *Int. J. Basic Appl. Sci*. 2012; 12: p. 31-49.

16. Lloyd A. Interfacial bioengineering to enhance surface biocompatibility. *Med. Device Technol.* 2001; 13: p. 18-21.
17. Schaschke C, Audic JL. Biodegradable Materials. *Int. J. Mol. Sci.* 2014; 15: p. 21468–21475.
18. Yeung KW, Wong KH. Biodegradable metallic materials for orthopaedic implantations: A review. *Technol. Health Care.* 2012; 20: p. 345–362.
19. Tevlin R, McArdle A, Wan DC. Biomaterials for craniofacial bone engineering. *J. Dent. Res.* 2014; 93: p. 1187–1195.
20. Ulery BD, Nair LS, Laurencin CT. Biomedical applications of biodegradable polymers. *J. Polymer Sci. Part B Polymer Phys.* 2011; 49: p. 832–864.
21. Miller RA, Brady JM, Cutright DE. Degradation rates of oral resorbable implants (polylactates and polyglycolates): Rate modification with changes in PLA/PGA copolymer ratios. *J. Biomed. Mater. Res.* 1977; 11: p. 711-719.
22. Li S, Garreau H, Vert M. Structure-property relationships in the case of the degradation of massive poly (α -hydroxy acids) in aqueous media. *J. Mater. Sci.* 1990; 1: p. 198-206.
23. Hutmacher D, Hurzeler MB, Schliephake HA. A review of material properties of biodegradable and bioresorbable polymers and devices for GTR and GBR applications. *Int. J. Oral Maxillofac. Implants.* 1996; 11: p. 667-678.
24. Garlotta D. A Literature Review of Poly (Lactic Acid). *J. Polym. Environ.* 2001; 9(2): p. 63-84.
25. Kulkarni R, Moore E, Hegyeli A, Leonard F. Biodegradable Poly(lactic acid) polymers. *J. Biomed. Mater. Res.* 1971; 5: p. 169-181.
26. Eglin D, Alini M. Degradable polymeric materials for osteosynthesis: Tutorial. *Eur. Cell Mater.* 2008; 16: p. 80–91.
27. Sabir MI, Xu X, Li L. A review on biodegradable polymeric materials for bone tissue engineering applications. *J. Mater. Sci.* 2009; 44: p. 5713–5724.
28. Andersson SR, Hakkarainen M, Albertsson A. Polylactide stereocomplexation leads to higher hydrolytic stability but more acidic hydrolysis product pattern. *Biomacromolecules.* 2010; 11: p. 1067–1073.
29. Mano JF, Sousa RA, Reis RL. Bioinert, biodegradable and injectable polymeric matrix composites for hard tissue replacement: state of the art and recent developments. *Compos. Sci. Technol.* 2004; 64: p. 789-817.

30. Jonoobi M, Harun J, Mathew AP, Oksman K. Mechanical properties of cellulose nanofiber (CNF) reinforced polylactic acid (PLA) prepared by twin screw extrusion. *Compos. Sci. Technol.* 2010; 70: p. 1742–1747.
31. Iler RK. *The Chemistry of Silica: Solubility, Polymerisation, Colloid and Surface Properties and Biochemistry* Wiley, New York; 1979.
32. Landmesser H. Interior surface hydroxyl groups in ordered mesoporous silicates; 1997.
33. Bronnimann CE. Proton NMR Study of Dehydration of the Silica Gel Surface. *Journal of the American Chemical Society.* 1988; 110: p. 2023-2026.
34. Melero JA. Direct syntheses of ordered SBA-15 mesoporous materials containing arenesulfonic acid groups. *J. Mater. Chem.* 2002; 12: p. 1664-1670.
35. Grieken RV. Supercritical Fluid Extraction of a Nonionic Surfactant Template from SBA-15 Materials and Consequences on the Porous Structure. *Langmuir.* 2003; 19: p. 3966-3973.
36. Sing KSW. *Pure and Applied Chemistry.* 1985; Volume 57(Issue 4).
37. Soler-Illia G, Sánchez C. Chemical Strategies To Design Textured Materials: from Microporous and Mesoporous Oxides to Nanonetworks and Hierarchical Structures. *Chem. Rev.* 2002; 102(11): p. 4093-4138.
38. Zhao DY, Stucky D. Triblock copolymer synthesis of mesoporous silica with periodic 50 to 300 angstrom pores. *Science.* 1998; 279: p. 548-552.
39. Zhao DY, Stucky D. Nonionic Triblock and Star Diblock Copolymer and Oligomeric Surfactant Syntheses of Highly Ordered, Hydrothermally Stable, Mesoporous Silica Structures. *J. Am. Chem. Soc.* 1998; 120: p. 6024-6036.
40. Zhao DY, Stucky D. Morphological Control of Highly Ordered Mesoporous Silica SBA-15. *Chem. Mater.* 2000; 12: p. 275-279.
41. Yang P, Zhao DY, Stucky D. Triblock–Copolymer–Directed Syntheses of Large–Pore Mesoporous Silica Fibers. *Chem. Mater.* 1998; 10: p. 2033-2036.
42. Zhao DY, Stucky D. Continuous Mesoporous Silica Films with Highly Ordered Large Pore Structures. *Adv. Mater.* 1998; 10: p. 1380-1385.
43. Zhao DY, Stucky D. Multiphase Assembly of Mesoporous-Macroporous Membranes. *Chem. Mater.* 1999; 11: p. 1174-1178.
44. Zhao DY, Stucky D. Nonionic Triblock and Star Diblock Copolymer and Oligomeric Surfactant Syntheses of Highly Ordered, Hydrothermally Stable, Mesoporous Silica Structures. *J. Am. Chem. Soc.* 1998; 120: p. 6024-6036.

45. Chiola V, Ritsko JE, Vanderpool CD. US Patent No 3556725. 1971.
46. KRESGE CT, LEONOWICZ ME, ROTH WJ, VARTUL JC, BECK JS. Ordered mesoporous molecular sieves synthesized by a liquid-crystal template mechanism. *Nature*. 1992; 359: p. 710-712.
47. Beck JS, Vartuli JC, Roth WJ. A New Family of Mesoporous Molecular Sieves Prepared with Liquid Crystal Templates. *J. Am. Chem. Soc.* 1992; 114(27): p. 10834-10842.
48. Barton TJ, Bull LM, Klemperer WG, Loy DA, Yaghi M. Tailored Porous Materials. *Chemistry of Materials*. 1999; 11(10): p. 2633-2656.
49. Cassiers K, Linssen T, Mathieu M, Vansant EF. A detailed study of thermal, hydrothermal and mechanical stabilities of a wide range of surfactant assembled mesoporous silicas. *Chem. Mater.* 2002; 14: p. 2317-2324.
50. Galarneau A, Cambon H, Di Renzo F, Fajula F. True Microporosity and Surface Area of Mesoporous SBA-15 Silicas as a Function of Synthesis Temperature. *Langmuir*. 2001; 17(26): p. 8328-8335.
51. Kruk M, Jaroniec M, Ryoo R. Characterization of the Porous Structure of SBA-15. *Chem. Mater.* 2000; 12: p. 1961-1968.
52. Ryoo R, Ko CH, Jaroniec M. Block-Copolymer-Templated Ordered Mesoporous Silica: Array of Uniform Mesopores or Mesopore-Micropore Network? *J. Phys. Chem.* 2000; 104: p. 11465-11471.
53. Lanza R, Langer R, Vacanti J. *Principles of Tissue Engineering*. 2nd ed.: Academic Press; 2000.
54. Ratner BD, Hoffman AS, Schoen FJ. *Biomaterials Science: an introduction to materials in medicine*. 2nd ed.: Academic Press; 2004.
55. Van Cleynenbreugel T, Schrooten J, Vander Floten J. Micro-CT-based screening of biomechanical and structural properties of bone tissue engineering scaffolds. 2006; 44: p. 517-525.
56. Watari S, Hayashi K, Genetos DC. Modulation of osteogenic differentiation in hMSCs cells by submicron topographically-patterned ridges and grooves. *Biomaterials*. 2011; 33: p. 128-136.
57. Wojtek T, Sumona S. The support of bone marrow stromal cell differentiation by airbrushed nanofiber scaffolds. *Biomaterials*. 2013; 34: p. 2389-2398.
58. Abdal-hay A, Salam Hamdy A, Hyum Lim J. Facile preparation of titanium dioxide micro/nanofibers and tubular structures by air jet spinning. *Ceramis International*. 2014; 40: p. 15403-15409.

59. Tutak W, Sumona S. The support of bone marrow stromal cell differentiation by airbrushed nanofiber scaffolds. *Biomaterials*. 2013; 34: p. 2389-2398.
60. Middleton JC, Tipton AJ. Synthetic biodegradable polymers as orthopedic devices. *Biomaterials*. 2000; 21(23): p. 2335–2346.
61. Gunatillake PA, Adhikari , Gadegaard. Biodegradable synthetic polymers for tissue engineering. *European Cells and Materials*. 2003; 5: p. 1-16.
62. Liu , X. Ma P. Polymeric scaffolds for bone tissue engineering. *Annals of Biomedical Engineering*. 2004; 32(3): p. 477-486.
63. Salgado AJ, Coutinho OP, Reis RL. Bone tissue engineering: state of the art and future trends. *Macromolecular Bioscience*. 2004; 4(8): p. 743–765.
64. Mistry A, Mikos A. Advances in biochemical engineering. *Regenerative Medicine II*. 2005; 94: p. 1-22.
65. Van Dijkhuizen-Randersma R, Moroni L, Grijpma. *Degradable polymers for tissue engineering* London: Elsevier Academic Press; 2008.
66. Van de Velde K, Kiekens P. Biopolymers: overview of several properties and consequences on their applications. *Polymer Testing*. 2002; 21(4): p. 433-442.
67. Hussain F, Hojjati , Gorga RE. Review article: polymer-matrix nanocomposites, processing, manufacturing, and application: an overview. *Journal of Composite Materials*. 2006; 40(17): p. 1511–1575.
68. Armentano I, Dottori M, Kenny JM. Biodegradable polymer matrix nanocomposites for tissue engineering: a review. *Polymer Degradation and Stability*. 2010; 95(11): p. 2126–2146.
69. Wei L, Hu N, Zhang Y. Synthesis of polymer-mesoporous silica nanocomposites. *Materials*. 2010; 3(7): p. 4066–4079.
70. Vallet-Regí M, Ruiz-González L, González-Calbet JM. Revisiting silica based ordered mesoporous materials: medical applications. *Journal of Materials Chemistry*. 2006; 16: p. 26–31.
71. Vallet-Regí M, Colilla M, Izquierdo-Barba I. Bioactive mesoporous silicas as controlled delivery systems: application in bone tissue regeneration. *Journal of Biomedical Nanotechnology*. 2008; 4(1): p. 1–15.
72. Zhao Y, Qiu Z, Yang W. Effect of functionalization of multiwalled nanotubes on the crystallization and hydrolytic degradation of Biodegradable poly(L-lactide). *Journal of Physical Chemistry B*. 2008; 112(51): p. 16461–16468.

73. Zhang D, Li J. Ordered SBA-15 mesoporous silica with high amino-functionalization for adsorption of heavy metal ions. *Chinese Science Bulletin*. 2013; 58(8): p. 879-883.
74. Balas F, Vallet-Regí M. L-Trp adsorption into silica mesoporous materials to promote bone formation. *Acta Biomaterialia*. 2008; 4: p. 514-522.
75. Ho M, Lau K. Improvement on the properties of polylactic acid (PLA) using bamboo charcoal particles. *Composites Part B*. 2015; 81: p. 14-25.
76. Hadjicharalambous C, Buyakov A. Porous alumina, zirconia and alumina/zirconia for bone repair: fabrication, mechanical and in vitro biological response. *Biomed Mater*. 2015; 10(2).
77. Webster T, Ergun C. Enhanced functions of osteoblasts on nanophase ceramics. *Biomaterials*. 2000; 21(17): p. 1803-1810.
78. Ito H, Sasaki H. Response of osteoblast-like cells to zirconia with different surface topography. *Dent Mater J*. 2013; 32(1): p. 122-129.
79. Huang X, Qi Y. Enhanced integrin-mediated human osteoblastic adhesion to porous amorphous calcium phosphate/poly (L-lactic acid) composite. *Chin Med J*. 2014; 127(19): p. 3443-3448.