



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE QUÍMICA**

Síntesis y caracterización de materiales híbridos (O/I), obtenidos por las técnicas sol-gel y electrohilado para su aplicación en la ingeniería de tejidos.

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO**

**PRESENTA
BARRÓN DÍAZ DAVID JOSUÉ**



Ciudad de México

2016



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.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Profesor: **MARÍA DE LOURDES CHÁVEZ GARCÍA**
VOCAL: Profesor: **FILIBERTO RIVERA TORRES**
SECRETARIO: Profesor: **ARACELI TOVAR TOVAR**
1er. SUPLENTE: Profesor: **GUILLERMINA YAZMÍN ARELLANO SALAZAR**
2° SUPLENTE: Profesor: **ALFONSO RAMÓN GARCÍA MÁRQUEZ**

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA: INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN MATERIALES, UNAM.

ASESOR DEL TEMA:
Dr. Filiberto Rivera Torres

SUPERVISOR TÉCNICO:
Dr. Ricardo Vera Graziano

SUSTENTANTE (S):
Barrón Díaz David Josué

AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES

A la UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO por ser mi alma mater y el instrumento institucional que me permitió adquirir muchos conocimientos, conocer a mis futuros compañeros de trabajo y a las mejores personas que se han vuelto mis amigos cercanos.

Al Instituto de Investigaciones en Materiales de la UNAM, por que en sus instalaciones encontré grandes conocimientos y excelentes investigadores que no solo realizan su trabajo, sino que también son excelentes personas dedicadas al mejoramiento de nuestra institución.

A DGAPA-UNAM, PROYECTO PAPIT IN108116, por el apoyo recibido para la realización de esta tesis.

Al Doctor Filiberto Rivera Torres por todo su apoyo y sus enseñanzas que a lo largo de mi trabajo, me ayudaron a superar todos los obstáculos académicos y personales.

Al Doctor Ricardo Vera Graziano por su apoyo académico y por permitirme iniciar mi proyecto de investigación en su laboratorio.

Al Doctor Alfredo Maciel Cerda por compartir sus conocimientos y su apoyo a lo largo del tiempo que estuve en el laboratorio.

A la Doctora Rosana Pelayo por permitir realizar las pruebas biológicas necesarias a los biomateriales obtenidos.

Al Doctor Omar Novelo Peralta por su gran apoyo en las micrografías obtenidas en el Laboratorio Universitario de Microscopía Electrónica, del Instituto de Investigaciones en Materiales de la UNAM.

A la I.Q Karla Eriseth Reyes Morales responsable del laboratorio de Análisis Térmico, por su apoyo con los rápidos análisis de las muestras de mi trabajo.

A la M. en C. Adriana Tejeda Cruz responsable del Laboratorio de Rayos X del IIM-UNAM; así como Técnico Académico Titular "A" T. C., y por su apoyo en el análisis de las muestras.

A la Doctora María de Lourdes Chávez García por sus valiosos consejos y su tiempo para la revisión de mi trabajo.

A la Doctora Araceli Tovar Tovar por su tiempo para la revisión de este trabajo.

A la M. en C. Jennifer Enciso, por colaborar conmigo y realizar las pruebas biológicas, así como el análisis de las mismas.

Al M. en C. Juan Carlos Balandrán, por el apoyo con el análisis de las pruebas de viabilidad celular.

A los químicos en proceso Linda Nohemí y Eliseo Angulo Viurcos por su ayuda en la preparación de muestras y las caracterizaciones por FITR de mi trabajo de investigación, sin ellos, este trabajo hubiese llevado más tiempo.

A la M. en C. e Ingeniería de Materiales Alida Ospina Orejarena por sus amplios conocimientos y por iniciarme en el Laboratorio de Polímeros.

AGRADECIMIENTOS PERSONALES

A mi mamá, mejor conocida por las personas que la quieren como “Doña Ángeles”, por ser mi primer maestra, mi primer amiga, pero sobre todo por ser mi mamá, aquella mujer que me brindo fortaleza, entereza y mucho amor, para seguir adelante en la vida, sin ti mamá, esto no sería posible.

A mi papá, “Don Genaro”, por inculcarme la lucha constante, por brindarme esa imagen de fortaleza de hierro, por demostrarme que todo en esta vida se puede, siempre y cuando tengas lo necesario para lograrlo, por darme los medios necesarios para seguir aprendiendo y por brindarme tu propio conocimiento en todas esas charlas nocturnas, que espero sigamos teniendo, por ti papá tengo lo necesario para vivir la “vida real”.

A mis compañeros de la vida, Genaro, Diana, Irving, y mi pequeña Zyanya, por brindarme tantas alegrías y por compartir conmigo este camino, desde el inicio, y hasta el final, por tanto apoyo brindado, gracias hermanitos.

A mis viejitos, Delfino y Petra, por siempre convencerme de que saldríamos adelante, y por siempre brindarme ese cariño que solo un abuelo puede dar.

A mi abuelita Marcelina, que aunque ya partió, nunca dejó de creer en mí, y siempre nos apoyó en todo lo que pudo para poder seguir hacia adelante.

A mis tíos y tías, Esther, Olga, Norma, Guera, Lalo, Jacobo y Rodolfo, por acompañarme a mí y a mi familia durante todo este recorrido, y por apoyarme en todo lo que necesité.

A mis tíos y tías, Flor y Paco, Martha y Sotero, Neri y Andrés, porque en ustedes encontré mucha de la alegría que hoy tengo, motivo por el que siempre sigo hacia adelante.

A mi Jenny, por quedarte a mi lado y ser aquel pilar que me ayudó a salir adelante en mi carrera, por brindarme tu amor y cariño durante todos estos años y por todas aquellas palabras y silencios que aún tenemos por dar.
S.T.S.M.S.A.

A la señora Estela, por apoyar mi camino en la carrera y por aguantar todas nuestras aventuras, gracias por ser tan buena persona.

Al Doctor Filiberto, por apoyarme en todo momento desde que comencé mi proyecto de tesis, por brindarme su conocimiento y sus consejos, por ofrecer siempre un “sí” como respuesta a todas las propuestas que le hacía, por ser además de mi tutor, un buen amigo.

A los amigos de la vida, Mau, Chipy, Bob, Tania y Abraham, por siempre compartir nuestros sueños y con ello, convencernos de que pueden ser posibles. Espero que esta amistad nunca termine.

A los preparatorianos, Edgar, David y Fernando, por estar siempre constantes en este camino y brindar siempre esa mano amiga.

A todas aquellas personas que de alguna manera influenciaron mi vida para estudiar la carrera de química, para orientarme en la ingeniería de tejidos, por compartir conmigo alguna experiencia que me ayudo en este duro camino.

Unos labios hermosos que inventan epigramas y que saben hablar de temas eruditos son deleitosos. S.T.S.M.S.A.

Taylor Cadwell.

<<Tal vez los humanos reconoceremos algún día que realmente poseemos el poder de destruir la Tierra por completo, que podemos traer sobre nosotros un "último día" o algo muy parecido.>>

-Heisenberg, en una carta al historiador H. Heimpel, octubre de 1941.

Índice general

| | |
|---|-----|
| Índice de figuras | I |
| Índice de tablas | X |
| Abreviaturas y símbolos | XII |
| Resumen | 1 |
| Capítulo 1: Introducción | 3 |
| 1.1 Justificación | 3 |
| 1.2 Objetivos | 4 |
| 1.2.1 Objetivo General | 4 |
| 1.2.2 Objetivos Particulares | 4 |
| 1.3 Marco Teórico | 5 |
| 1.3.1 Ingeniería de tejidos | 4 |
| 1.3.2 Biomateriales para aplicaciones en la ingeniería de tejidos | 6 |
| 1.3.2.1 Biomateriales de primera, segunda y tercera generación | 11 |
| 1.3.3 Biomateriales híbridos (O/I) obtenidos por la técnica sol-gel | 15 |
| 1.3.3.1 Biomateriales híbridos (O/I) clase I y clase II | 16 |
| 1.3.4 Biopolímeros | 19 |
| 1.3.4.1 Poliacido láctico | 20 |
| 1.3.4.2 Biocompatibilidad y biodegradabilidad del PLA | 21 |

| | |
|--|-----------|
| 1.3.5 Biocerámicos | 24 |
| 1.3.5.1 Vidrios bioactivos | 27 |
| 1.3.5.2 El Sistema ternario SiO ₂ -CaO-P ₂ O ₅ | 32 |
| 1.3.6 Técnica de Electrohilado | 34 |
| 1.3.6.1 Descripción del equipo de Electrohilado. | 37 |
| 1.3.7 Técnica de Sol-Gel | 39 |
| 1.3.8 Leucemia linfoblástica aguda | 41 |
| 1.3.9 Técnicas de caracterización | 42 |
| 1.3.9.1 Microscopía Electrónica de Barrido y Análisis Químico Dimensional (MEB) y EDS | 42 |
| 1.3.9.2 Espectroscopia de Infrarrojo por Transformada de Fourier (FTIR) -- | 43 |
| 1.3.9.3 Difracción de Rayos X (DRX) | 44 |
| 1.3.9.4 Análisis Termogravimétrico (TGA) | 45 |
| 1.3.9.5 Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC) | 45 |
| 1.3.9.6 Pruebas biológicas con células mesenquimales y de linaje hematopoyético. | 46 |
| Capítulo 2: Materiales, reactivos y procedimiento experimental. | 48 |
| 2.1 Materiales y reactivos | 48 |
| 2.1.1 Reactivos utilizados para la obtención de los andamios electrohilados de poli(ácido L-láctico)/2,2,2-trifluoroetanol | 48 |
| 2.1.2 Reactivos utilizados para la síntesis del biovidrio de SiO ₂ -CaO-P ₂ O ₅ | 48 |

| | |
|---|-----------|
| 2.1.3 Reactivos utilizados para la síntesis de los híbridos O/I de PLLA/SiO ₂ -CaO-P ₂ O ₅ . ----- | 48 |
| 2.2 Procedimiento experimental ----- | 49 |
| 2.2.1 Andamios de poli(ácido L-láctico)/2,2,2-trifluoroetanol. ----- | 49 |
| 2.2.2 Biovidrio SiO ₂ -CaO-P ₂ O ₅ . ----- | 50 |
| 2.2.2.1 Propuesta de reacción del sistema, a partir de los precursores utilizados. ----- | 52 |
| 2.2.2.2 Cálculos para la obtención de 10 gramos de biovidrio. ----- | 52 |
| 2.2.3 Técnicas combinadas de sol-gel y electrohilado para la obtención de andamios híbridos O/I de PLLA/SiO ₂ -CaO-P ₂ O ₅ . ----- | 54 |
| 2.2.3.1 Cálculos para obtener la relación teórica en % m/m del polímero y el biovidrio. ----- | 54 |
| 2.2.3.2 Andamios híbridos O/I de PLA/SiO ₂ -CaO-P ₂ O ₅ , obtenidos por las técnicas sol-gel y electrohilado. ----- | 56 |
| 2.2.3.3 Ruta de síntesis propuesta. ----- | 56 |
| 2.3 Material y reactivos para las caracterizaciones de los biomateriales. ----- | 58 |
| 2.3.1 Identificación del Poli(ácido L-láctico) por Resonancia Magnética Nuclear de Protones (RMN C ¹³). ----- | 58 |
| 2.3.2 Microscopía Electrónica de Barrido MEB y Análisis Químico Elemental. ----- | 58 |
| 2.3.2.1 Andamios de PLA/TFE. ----- | 58 |
| 2.3.2.2 Biovidrios SiO ₂ -CaO-P ₂ O ₅ . ----- | 59 |
| 2.3.2.3 Híbridos (O/I) de PLA/BG. ----- | 59 |

| | |
|--|-----------|
| 2.3.3 Caracterización de Espectroscópica de Infrarrojo por Transformada de Fourier. ----- | 59 |
| 2.3.3.1 Andamios de PLA/TFE. ----- | 60 |
| 2.3.3.2 Biovidrios SiO ₂ -CaO-P ₂ O ₅ . ----- | 60 |
| 2.3.3.3 Híbridos (O/I) de PLA/TFE/BG. ----- | 60 |
| 2.3.4 Caracterización por Análisis Termogravimétrico y Calorimetría Diferencial de Barrido. ----- | 60 |
| 2.3.5 Caracterización por Difracción de Rayos X. ----- | 60 |
| 2.3.6 Evaluación de la capacidad de soporte de la hematopoyesis por el biomaterial híbrido sintetizado con una composición de 84/16 de PLA/SiO ₂ -CaO-P ₂ O ₅ . ----- | 61 |
| 2.3.6.1 Obtención de células troncales y progenitoras hematopoyéticas (HSPC) a partir de muestras de sangre de cordón umbilical (SCU). ----- | 61 |
| 2.3.6.2 Cultivo de células HSPC en presencia de biomaterial híbrido. ----- | 62 |
| 2.3.6.3 Evaluación de la diferenciación mieloide y linfoide por citometría de flujo. ----- | 62 |
| 2.3.6.4 Cálculos y análisis estadístico. ----- | 63 |
| Capítulo 3. ----- | 64 |
| Resultados y análisis de resultados. ----- | 64 |
| 3.1 Resonancia Magnética Nuclear de ¹³C del poli(ácido láctico) disuelto en TFE de concentración al 13% m/v, a uno y dos meses de preparado. - ----- | 64 |
| 3.2 Andamios de PLA/TFE electrohilados. ----- | 67 |
| 3.2.1 MEB de los andamios de PLA/TFE electrohilados. ----- | 68 |

| | |
|--|-----------|
| 3.2.1.1 Andamios al 10% PLA/TFE a 10, 11 y 12 kV. ----- | 69 |
| 3.2.1.2 Andamios al 12% PLA/TFE a 8, 9, 10, 11 y 12 kV. ----- | 71 |
| 3.2.1.3 Andamios al 13% PLA/TFE a 8, 9, 10, 11 y 12 kV. ----- | 74 |
| 3.2.1.4 Andamios al 14% PLA/TFE a 9, 10, 11 y 12 kV. ----- | 78 |
| 3.2.2 FTIR de los andamios al 13% m/v de PLA/TFE. ----- | 82 |
| 3.2.3 DRX de los andamios de PLA/TFE electrohilados. ----- | 85 |
| 3.2.3.1 Difractogramas de los andamios de PLA/TFE al 10, 12, 13 y 14% m/v. ----- | 86 |
| 3.2.4 Análisis Termogravimétrico (TGA) y Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC). ----- | 88 |
| 3.2.4.1 TGA y DSC de los andamios de PLA/TFE electrohilados. ----- | 88 |
| 3.3 Biovidrios en el sistema SiO₂-CaO-P₂O₅. ----- | 91 |
| 3.3.1 MEB del sistema SiO ₂ -CaO-P ₂ O ₅ . ----- | 92 |
| 3.3.1.1 Micrografías de la composición V70P5. ----- | 92 |
| 3.3.1.2 Análisis dimensional de la muestra V70P5. ----- | 93 |
| 3.3.1.3 Espectro IR de la composición V70P5. ----- | 94 |
| 3.3.1.4. Difracción de rayos X de la muestra V70P5. ----- | 95 |
| 3.3.1.5. TGA y DSC del vidrio de la composición V70P5. ----- | 96 |
| 3.4 Biomateriales híbridos O/I de PLA/SiO₂-CaO-P₂O₅. ----- | 97 |
| 3.4.1 Selección de la metodología a emplear, para la síntesis de los andamios híbridos O/I. ----- | 97 |

| | |
|--|-----|
| 3.4.1.1. Caracterización de las muestras 1H, 1HC, 2H, 2HC y 3H por Difracción de Rayos X. ----- | 98 |
| 3.4.1.2 Caracterización por FTIR de las muestras 1H, 1HC, 2H, 2HC y 3H. ----- | 101 |
| 3.4.2 Andamios electrohilados (O/I) de PLA/V70P5. ----- | 104 |
| 3.4.2.1 MEB de los andamios híbridos O/I de PLA/V70P5, obtenidos por las técnicas de electrohilado y sol gel. ----- | 105 |
| 3.4.2.2 DRX de los andamios híbridos obtenidos de PLA/GB. ----- | 110 |
| 3.4.2.3 TGA y DSC de los andamios híbridos de PLA/BG. ----- | 116 |
| 3.5 Pruebas biológicas. ----- | 122 |
| 3.5.1 Cultivos celulares sobre los biomateriales híbridos electrohilados para la Evaluación de la capacidad de soporte de la hematopoyesis por el biomaterial híbrido sintetizado a una concentración 84-16 de PLA/SiO ₂ -CaO-P ₂ O ₅ . ----- | 122 |
| Capítulo 4. ----- | 129 |
| Conclusiones. ----- | 129 |
| Tareas a realizar. ----- | 131 |
| Apéndices. ----- | 132 |
| Referencias. ----- | 146 |

Índice de Figuras.

| | |
|--|----|
| Figura 1.1 Estructura química del poliácido láctico (PLA) [35]. ----- | 20 |
| Figura 1.2. Enantiómeros, L- y D- del ácido láctico. ----- | 23 |
| Figura 1.3. Mecanismos de síntesis para la obtención del PLA [37]. ----- | 23 |
| Figura 1.4. Clasificación, definición y terminología. *Frecuentemente señalado como “cerámica fina” (Japón) o “Hochleistungskeramik”, cerámica de alto rendimiento (Alemania). **Frecuentemente señalado como "Ingeniería de cerámicos" (EEUU, GB) o “Ingenieurkeramik”, Técnicas de cerámicos (Alemania). Esquema obtenido y traducido de [1]. ----- | 25 |
| Figura 1.5. Distribución de zonas de biocompatibilidad de los vidrios bioactivos y vidrios cerámicos. Esquema extraído y traducido de [2]. ----- | 29 |
| Figura 1.6 Dependencia composicional en porcentaje en peso, del enlace óseo y el enlace de tejido suave en vidrios bioactivos y vidrios cerámicos bioactivos. Todas las composiciones en la región A tiene una constante de 6% de P ₂ O ₅ . El vidrio cerámico A/W tiene un alto contenido en P ₂ O ₅ . La región E (unión de tejidos blandos) esta dentro de la línea punteada donde $I_B > 8$ y donde se encuentran los biovidrios Bioglass 45S5® (★), Ceravital® (∇) y 55S4.3 Bioglass® (◆). Extraído y traducido de [3]. ----- | 30 |
| Figura 1.7 Componentes básicos de la técnica de electrohilado. ----- | 36 |
| Figura 1.8 Fotografía del equipo de electrohilado utilizado. ----- | 37 |

Figura 1.9. Descripción general que muestra dos ejemplos de la síntesis por el método sol-gel: (a) películas de un sol coloidal; (B) en polvo de un sol coloidal transformado en un gel [4]. ----- 39

Figura 3.1. Espectro de ^{13}C de PLA/TFE al 13% m/v preparada en diciembre de 2015. ----- 64

Figura 3.2. Espectro de ^{13}C de PLA/TFE al 13% m/v preparada en enero de 2016. ----- 65

Figura 3.3. Desplazamientos en ppm de CO, CH y CH_3 de los oligómeros del PLA [5]. ----- 66

Figura 3.4. Fotografía de la membrana al 15% de PLA/TFE donde se observa que no se obtuvieron buenos resultados, respecto a las otras composiciones en las cuales si se observan membranas bien definidas. ----- 68

Figura 3.5. Micrografías de los andamios obtenidos al 10% PLA/TFE con una ΔV de 10 kV a 50,000, 11,000, 2,500 aumentos. Imágenes a) andamio a 50,000 x, b) andamio a 11,000 x, c) andamio a 2,500 x y d) andamio a 50,000 x, medido con el programa image j. ----- 69

Figura 3.6. Micrografías de los andamios obtenidos al 10% PLA/TFE con una ΔV de 11 kV a 50,000, 10,000 y 2,500 aumentos. Imágenes a) andamio a 50,000 x, b) andamio a 10,000 x, c) andamio a 2,500 x y d) andamio a 50,000 x, medido con el programa image j. ----- 70

Figura 3.7. Micrografías de los andamios obtenidos al 10% PLA/TFE con una ΔV de 12 kV a 50,000, 10,000 y 2,500 aumentos. Imágenes a) andamio

a 50,000 x, b) andamio a 10,000 x, c) andamio a 2,500 x y d) andamio a 50,000 x, medido con el programa image j. ----- 70

Figura 3.8. Micrografías de los andamios obtenidos al 12% PLA/TFE con una ΔV de 8 kV a 50,000, 10,000 y 2,500 aumentos. Imágenes a) andamio a 50,000 x, b) andamio a 10,000 x, c) andamio a 2,500 x y d) andamio a 10,000 x, medido con el programa image j. ----- 71

Figura 3.9. Micrografías de los andamios obtenidos al 12% PLA/TFE con una ΔV de 9 kV a 50,000, 10,000 y 2,500 aumentos. Imágenes a) andamio a 50,000 x, b) andamio a 10,000 x, c) andamio a 2,500 x y d) andamio a 10,000 x, medido con el programa image j. ----- 72

Figura 3.10. Micrografías de los andamios obtenidos al 12% PLA/TFE con una ΔV de 10 kV a 25,000, 10,000 y 2,500 aumentos. Imágenes a) andamio a 25,000 x, b) andamio a 10,000 x, c) andamio a 2,500 x y d) andamio a 10,000 x, medido con el programa image j. ----- 72

Figura 3.11. Micrografías de los andamios obtenidos al 12% PLA/TFE con una ΔV de 11 kV a 10,000, 5,000 y 2,500 aumentos. Imágenes a) andamio a 10,000 x, b) andamio a 5,000 x, c) andamio a 2,500 x y d) andamio a 10,000 x, medido con el programa image j. ----- 73

Figura 3.12. Micrografías de los andamios obtenidos al 12% PLA/TFE con una ΔV de 12 kV a 10,000, 5,000 y 2,500 aumentos. Imágenes a) andamio a 10,000 x, b) andamio a 5,000 x, c) andamio a 2,500 x y d) andamio a 10,000 x, medido con el programa image j. ----- 73

Figura 3.13. Micrografías de los andamios obtenidos al 13% PLA/TFE con una ΔV de 8 kV a 25,000, 10,000 y 1,000 aumentos. Imágenes a) andamio a

25,000 x, b) andamio a 10,000 x, c) andamio a 1,000 x y d) andamio a 25,000 x, medido con el programa image j. ----- 75

Figura 3.14. Micrografías de los andamios obtenidos al 13% PLA/TFE con una ΔV de 9 kV a 25,000, 10,000 y 1,000 aumentos. Imágenes a) andamio a 25,000 x, b) andamio a 10,000 x, c) andamio a 1,000 x y d) andamio a 25,000 x, medido con el programa image j. ----- 75

Figura 3.15. Micrografías de los andamios obtenidos al 13% PLA/TFE con una ΔV de 10 kV a 25,000, 5,000 y 1,000 aumentos. Imágenes a) andamio a 25,000 x, b) andamio a 5,000 x, c) andamio a 1,000 x y d) andamio a 5,000 x, medido con el programa image j. ----- 76

Figura 3.16. Micrografías de los andamios obtenidos al 13% PLA/TFE con una ΔV de 11 kV a 15,000, 10,000 y 1,000 aumentos. Imágenes a) andamio a 15,000 x, b) andamio a 10,000 x, c) andamio a 1,000 x y d) andamio a 15,000 x, medido con el programa image j. ----- 77

Figura 3.17. Micrografías de los andamios obtenidos al 13% PLA/TFE con una ΔV de 12 kV a 15,000, 10,000 y 1,000 aumentos. Imágenes a) andamio a 50,000 x, b) andamio a 10,000 x, c) andamio a 2,500 x y d) andamio a 15,000 x, medido con el programa image j. ----- 77

Figura 3.18. Micrografías de los andamios obtenidos al 14% PLA/TFE con una ΔV de 9 kV a 25,000, 10,000 y 1,000 aumentos. Imágenes a) andamio a 25,000 x, b) andamio a 10,000 x, c) andamio a 1,000 x y d) andamio a 10,000 x, medido con el programa image j. ----- 78

Figura 3.19. Micrografías de los andamios obtenidos al 14% PLA/TFE con una ΔV de 10 kV a 25,000, 10,000 y 1,000 aumentos. Imágenes a) andamio a 25,000 x, b) andamio a 10,000 x, c) andamio a 1,000 x y d) andamio a 10,000 x, medido con el programa image j. ----- 79

Figura 3.20. Micrografías de los andamios obtenidos al 14% PLA/TFE con una ΔV de 11 kV a 15,000, 10,000 y 1,000 aumentos. Imágenes a) andamio a 15,000 x, b) andamio a 10,000 x, c) andamio a 1,000 x y d) andamio a 15,000 x, medido con el programa image j. ----- 79

Figura 3.21. Micrografías de los andamios obtenidos al 14% PLA/TFE con una ΔV de 12 kV a 25,000, 10,000 y 1,000 aumentos. Imágenes a) andamio a 25,000 x, b) andamio a 10,000 x, c) andamio a 1,000 x y d) andamio a 10,000 x, medido con el programa image j. ----- 80

Figura 3.22. Espectro del andamio obtenido al 10% PLA/TFE aplicando 11 kV. ----- 82

Figura 3.23. Espectro del andamio obtenido al 12% PLA/TFE aplicando 11 kV. ----- 83

Figura 3.24. Espectro del andamio obtenido al 13% PLA/TFE aplicando 11 kV. ----- 83

Figura 3.25. Espectro del andamio obtenido al 14% PLA/TFE aplicando 11 kV. ----- 84

Figura 3.26. Difractograma del andamio electrohilado de PLA/TFE al 10% m/v a 10 kV. ----- 86

| | |
|--|----|
| Figura 3.27. Difractograma del andamio electrohilado de PLA/TFE al 12% m/v a 10 kV. ----- | 86 |
| Figura 3.28. Difractograma del andamio electrohilado de PLA/TFE al 13% m/v a 10 kV. ----- | 87 |
| Figura 3.29. Difractograma del andamio electrohilado de PLA/TFE al 14% m/v a 10 kV. ----- | 87 |
| Figura 3.30. TGA y DSC de los andamios electrohilados de PLA/TFE al 10% m/v. ----- | 89 |
| Figura 3.31. TGA y DSC de los andamios electrohilados de PLA/TFE al 12% m/v. ----- | 90 |
| Figura 3.32. TGA y DSC de los andamios electrohilados de PLA/TFE al 13% m/v. ----- | 90 |
| Figura 3.33. TGA y DSC de los andamios electrohilados de PLA/TFE al 14% m/v. ----- | 90 |
| Figura 3.34. Micrografías de la muestra V70P5 de acuerdo con los aumentos: a) 150 x, b) 500 x y c) 1000 x del microscopio. ----- | 92 |
| Figura 3.35 Análisis elemental de la muestra V70P5. ----- | 93 |
| Figura 3.36. Espectro infrarrojo de la muestra V70P5. ----- | 94 |
| Figura 3.37. DRX de la composición de vidrio V70P5. ----- | 95 |

| | |
|--|-----|
| Figura 3.38. TGA y DSC de la composición de vidrio V70P5. ----- | 96 |
| Figura 3.39. DRX de la prueba 1H de síntesis del material híbrido O/I. ---- | 99 |
| Figura 3.40. DRX de la prueba 1HC de síntesis del material híbrido O/I. --- | 99 |
| Figura 3.41. DRX de la prueba 2H de síntesis del material híbrido O/I. ---- | 99 |
| Figura 3.42. DRX de la prueba 2HC de síntesis del material híbrido O/I. - | 100 |
| Figura 3.43. DRX de la prueba 3H de síntesis del material híbrido O/I. ---- | 100 |
| Figura 3.44. Espectro infrarrojo de la muestra 1H. ----- | 102 |
| Figura 3.45. Espectro infrarrojo de la muestra 1HC. ----- | 102 |
| Figura 3.46. Espectro infrarrojo de la muestra 2H. ----- | 103 |
| Figura 3.47. Espectro infrarrojo de la muestra 2HC. ----- | 103 |
| Figura 3.48. Espectro infrarrojo de la muestra 3H. ----- | 104 |
| Figura 3.49. Micrografías de la muestra H17/12/15 con mayor contenido de biovidrio. Micrografías a) con una resolución de 150 aumentos y la b) con una resolución de 500 aumentos. ----- | 105 |
| Figura 3.50. Micrografías de las muestras H221215 y H040116, ambas muestras con un contenido de 50:50 de BG/PLA. Micrografías a) con una resolución de 2500 aumentos y la b) con una resolución de 100,000 aumentos. ----- | 107 |

| | |
|---|-----|
| Figura 3.51 Micrografía de la muestra H290116 a 1, 2 y 3 horas después de la policondensación. Micrografías a) con una resolución de 50,000 aumentos, la b), c) y d) con una resolución de 100,000 aumentos cada una. ----- | 108 |
| Figura 3.52. Difractograma de la muestra H22/12/15, con identificación de fases cristalinas. ----- | 110 |
| Figura 3.53. Difractograma de la muestra H22/12/15, con identificación del porcentaje de fases cristalinas y de fases amorfas. ----- | 111 |
| Figura 3.54. Difractograma de la muestra H4/01/16, con identificación de fases cristalinas. ----- | 112 |
| Figura 3.55. Difractograma de la muestra H4/01/16, con identificación del porcentaje de fases cristalinas y de fases amorfas. ----- | 113 |
| Figura 3.56. Difractograma de la muestra H29/01/16, con identificación de fases cristalinas. ----- | 114 |
| Figura 3.57. Difractograma de la muestra H29/01/16, con identificación del porcentaje de fases cristalinas y de fases amorfas. ----- | 115 |
| Figura 3.58. TGA y DSC de la muestra H22/12/15. ----- | 116 |
| Figura 3.59. TGA y DSC de la muestra H4/01/156. ----- | 118 |
| Figura 3.60. TGA y DSC de la muestra H29/01/16. ----- | 120 |
| Figura 3.61. (a-c) Fotografías de microscopía electrónica del biomaterial en contacto con medio RPMI suplementado con SFB por 19 días. (d-f) | |

Biomaterial en cultivo con células hematopoyéticas en medio RPMI-10%SFB-1%Ab suplementado con citosinas mieloides a los 19 días de cultivo. ---- 122

Figura 3.62 (a). Comparación del rendimiento por progenitor obtenido en ausencia (Control) y presencia de biomaterial (Biomaterial), al cosechar las células de los cultivos con citocinas mieloides (CM, 19 días) y los cultivos con citocinas linfoides (CM, 30 días). 3.62 (b). Comparación del porcentaje de células que expresan el marcador superficial CD34 (células CD43+) obtenidas por el análisis de los cultivos con diferentes condiciones por citometría de flujo. ----- 123

Figura 3.63. Diferenciación de células CD34+ de SCU al linaje mieloides en condiciones linfoides, evaluación de poblaciones precursoras. Las células analizadas fueron cosechadas al día 30 de cultivos en ausencia (control) y presencia de biomaterial. Previo al análisis de expresión de CD14 y CD13, se seleccionó la población de células que mantuvieron la expresión de CD34 a lo largo de los 30 días de cultivo. ----- 124

Figura 3.64. Evaluación de poblaciones de células progenitoras y maduras de linaje mieloides, generadas a partir de cultivos a 30 días con condiciones linfoides, partiendo de células CD34+ de SCU. Se graficó la expresión de CD14 y CD13 (marcadores mieloides) pre-seleccionando la población CD34-. ----- 125

Figura 3.65. Evaluación de la expresión de dos moléculas de superficie características de algunos tipos de células precursoras y maduras linfoides (CD19 para linfocitos y CD56 para células NK). Las células analizadas fueron cosechadas al día 30 a partir de cultivos en presencia y ausencia (control) de biomaterial con citosinas linfoides. La grafica se realizó pre-seleccionando la población de células CD34-. ----- 126

Índice de tablas.

| | |
|--|----|
| Tabla 1.1 Propiedades de las fases orgánica/inorgánica en un biomaterial compuesto. ----- | 8 |
| Tabla 1.2. Propiedades físicas, mecánicas y de degradación de algunos polímeros biodegradables utilizados como andamios. ----- | 9 |
| Tabla 1.3. Variables físicas y químicas que son susceptibles de control, para la obtención de andamios electrohilados. ----- | 37 |
| Tabla 2.1. Descripción de las cantidades de polímero utilizadas para las disoluciones poliméricas a electrohilar. ----- | 49 |
| Tabla 2.2. Parámetros utilizados para el electrohilado de las diferentes concentraciones de PLA/TFE. ----- | 50 |
| Tabla 2.3. Composiciones en porcentaje molar de las diferentes muestras de biovidrios. ----- | 51 |
| Tabla 2.4. Pesos moleculares de los reactivos y productos de vidrio. ----- | 52 |
| Tabla 2.5. Composiciones de las diferentes muestras de los biomateriales híbridos (O/I). ----- | 55 |
| Tabla 2.6. Condiciones de electrohilado de los andamios híbridos a diferentes composiciones. ----- | 57 |
| Tabla 3.1. Señales observadas en los espectros de C ¹³ para las muestra 1 y 2. ----- | 65 |

| | |
|--|----|
| Tabla 3.2. Masas experimentales para la obtención de las disoluciones poliméricas que se electrohilieron. ----- | 67 |
| Tabla 3.3 Lista con los diámetros obtenidos de todas las muestras de PLA electrohiladas. ----- | 81 |
| Tabla 3.4. Principales bandas observadas en las gráficas de los espectros IR del PLA/TFE. ----- | 84 |
| Tabla 3.5. Valores de la Tg, Tm y Tc extraídos de los termogramas y calorimetrías obtenidos de las muestras del PLA. ----- | 95 |
| Tabla 3.6. Porcentajes atómico y en peso de la muestra V70P5. ----- | 93 |
| Tabla 3.7. Señales observadas en los espectros infrarrojo para el vidrio V70P5. ----- | 95 |

Abreviaturas y símbolos.

LA: Ácido Láctico

PLA: Poliácido Láctico

PLGA: Poliácido (láctico-co-glicólico)

PCL: Policaprolactona

PE: Polietileno

PMM: Poli-(metacrilato de metilo)

PDMS: Poli-(dimetoxisilano)

ST: Sistema ternario

BV: Biovidrio

HA: Hidroxiapatita

LLA: Leucemia Linfoblástica Aguda

SFB: Suero Fetal Bovino

O/I: Orgánicos e Inorgánicos

IPTS: 3-isocianatopropiltrietoxisilano

DABCO: 1,4-diazabicyclo[2.2.2]octane (

TEOS: Tetraethyl orthosilicate (Tetraetil ortosilicato)

TEP: Triethyl phosphate (Trietil fosfato)

FTIR: Fourier transform infrared spectroscopy

DRX: Difracción de Rayos X

MEB: Microscopía Electrónica de Barrido

TGA: Thermal gravimetric analysis (Análisis Termogravimétrico)

DSC: Differential Scanning Calorimetry (Calorimetría Diferencial de Barrido)

RAE: Real Academia de la Lengua Española

ROP: Ring opening polycondensation (Policondensación por apertura de anillo)

DMSO: Dimetilsulfóxido

SCU: Sangre de cordón umbilical

Resumen.

A partir de las décadas de los 70's y 80's, la ingeniería de tejidos ha tomado un papel importante, debido al amplio desarrollo en la investigación de nuevas técnicas de síntesis, utilizadas en la obtención de diferentes tipos de materiales que han permitido el avance en la regeneración tisular. Las técnicas de obtención para este tipo de materiales representan una limitante para la ingeniería de tejidos, debido a la creciente necesidad de materiales que posean la capacidad de interactuar de manera amigable con los sistemas biológicos, así como la capacidad de biodegradarse una vez cumplida su función dentro del sistema para el que fue desarrollado.

La combinación de polímeros naturales como el quitosano y la colágena, así como los polímeros sintéticos como la policaprolactona (PCL) y el poliácido láctico (PLA), junto con materiales inorgánicos a base de óxido de silicio (SiO_2), ha dado como resultado la obtención de materiales híbridos, con mayor actividad biológica, con respecto a los materiales convencionales que actualmente se utilizan para la regeneración de tejido óseo y cartilaginoso como el Bioglas 45S5®.

El electrohilado y la síntesis por sol-gel, han demostrado ser dos técnicas con las que se obtienen biomateriales a escalas nanométricas, los cuales al entrar en contacto, con el microambiente celular presentan propiedades de bioactividad, biodegradabilidad y biocompatibilidad.

En el presente trabajo, se sintetizaron diferentes biomateriales híbridos de PLA, acoplados con un sistema ternario (ST), de $\text{SiO}_2\text{-CaO-P}_2\text{O}_5$ a diferentes composiciones. Se utilizó la síntesis por sol-gel para acoplar la matriz polimérica del PLA al proceso de policondensación del sistema ternario a base de silicio, y se electrohilieron diferentes soluciones híbridas a diferentes condiciones, con la finalidad de obtener andamios híbridos de PLA/ST a

escala nanométrica. Los biomateriales híbridos orgánico/inorgánicos de PLA/BV se obtuvieron a diferentes composiciones [1] por la técnica de electrohilado y la síntesis sol-gel, probando la relación polímero/biovidrio en concentraciones m/m de 86PLA:14BV, 50PLA:50BV y 14PLA:86BV.

Los andamios sintetizados se caracterizaron por difracción de rayos X (DRX), espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FTIR), microscopía electrónica de barrido (MEB), análisis termogravimétrico (TGA) y calorimetría diferencial de barrido (DSC).

El biomaterial con la composición 86PLA:14BV fue seleccionado para realizar las pruebas de mantenimiento de células hematopoyéticas y promoción de diferenciación, por ser la única composición con la que se obtuvieron andamios híbridos a escala nanométrica por las técnicas de electrohilado y sol-gel.

Capítulo 1 Introducción.

1.1 Justificación.

El desarrollo e investigación de nuevos materiales aprovechables en la medicina regenerativa, como alternativas de estudio para diferentes patologías, tratamientos ortopédicos, regeneración de tejidos, y liberación controlada de fármacos, es uno de los temas de mayor interés para todas las áreas involucradas en la investigación de la ingeniería de tejidos [6].

Actualmente, el avance en la investigación de la ingeniería de tejidos y de las diversas ciencias que interaccionan entre sí, como la física, la química y la biología, propician el desarrollo de nuevos biomateriales, andamios celulares, dispositivos biomédicos, y sistemas híbridos orgánico-inorgánicos, que son utilizados para la liberación controlada de fármacos, así como para el diseño y operación de sistemas biológicos que permitan investigar de manera *in vivo* e *in vitro*, diferentes y muy variados tipos de patologías [7]. Los materiales híbridos (O/I) representan un interés especial para su posible aplicación, principalmente, en patologías multifactoriales como es en la leucemia linfoblástica aguda (LLA). En la LLA, una de las prioridades es el mejoramiento de las técnicas de cultivo celular, que permitan el estudio *in vitro* de estas células a largo plazo, objetivo que es abordado mediante el desarrollo de biomateriales aptos para el mantenimiento de células hematopoyéticas y blastos leucémicos.

El objetivo principal de este trabajo es estandarizar los métodos de síntesis de biomateriales híbridos (O/I), a través de la combinación de dos rutas diferentes, el electrohilado y la síntesis por sol-gel, con la finalidad de obtener un biomaterial que combine las propiedades bioactivas de los biovidrios; en específico del sistema $\text{SiO}_2\text{-CaO-P}_2\text{O}_5$, así como las propiedades biocompatibles y las propiedades mecánicas que proporciona el PLA. El

objetivo secundario de este trabajo es obtener biomateriales biodegradables y con actividad biológica, que permitan construir un andamio para el estudio *ex vivo* de la LLA.

1.2 Objetivos

1.2.1 Objetivo general.

Obtener un andamio celular híbrido (O/I) a través de las técnicas de sol-gel y electrohilado para su aplicación en el estudio (in vitro) de células troncales y progenitoras hematopoyéticas.

1.2.2 Objetivos particulares.

- Determinar las condiciones óptimas que permitan obtener andamios de PLA, en diferentes concentraciones desde el 10 hasta el 15% m/v por la técnica de electrohilado.
- Sintetizar un biovidrio ternario de $\text{SiO}_2\text{-CaO-P}_2\text{O}_5$, a partir de tetraetilortosilicato (TEOS), trietilfosfato (TEP) y cloruro de calcio dihidratado, disuelto en etanol absoluto, por la técnica de Sol-gel.
- Obtener un biomaterial híbrido de PLA, con un biovidrio ternario de $\text{SiO}_2\text{-CaO-P}_2\text{O}_5$ con diferentes composiciones.
- Caracterizar por microscopía electrónica de barrido (MEB), análisis químico elemental, resonancia magnética nuclear de ^{13}C (RMN ^{13}C), análisis termogravimétrico (TGA), calorimetría diferencial de barrido (DSC) y difracción de rayos X de polvos (DRX) del poli-(ácido láctico) a diferentes concentraciones, las composiciones de biovidrio sintetizadas y las tres composiciones de los biomateriales híbridos (O/I) sintetizados.
- Obtener cultivos con células troncales y progenitoras hematopoyéticas enriquecidas a partir de sangre de cordón umbilical, con los biomateriales híbridos obtenidos por las técnicas de sol-gel y

electrohilado, para demostrar su biocompatibilidad, proliferación y diferenciación celular.

1.3 Marco teórico.

1.3.1 Ingeniería de tejidos.

La ingeniería de tejidos, es una de las razones principales por las cuales el ser humano ha tenido una calidad de vida mejor en los últimos 70 años, aunque su comienzo fuese motivado en tiempos de la segunda guerra mundial [8]. Surge a partir de la idea de mejorar e innovar los materiales que hasta ese momento se utilizaban en la medicina para subsanar necesidades médicas, como la reconstrucción de las partes del cuerpo dañadas, enfermas, longevas o genéticamente deficientes.

La ingeniería de tejidos comienza con las reparaciones anatómicas improvisadas, en las cuales se usaban los órganos propios del individuo para auto-reparar alguna parte no indispensable del cuerpo, y que actualmente siguen siendo motivo de uso en la cirugía médica. Un caso común se da en los pacientes con quemaduras de primer y segundo grado, a los cuales se les retiraban pequeñas porciones de piel de algún miembro saludable que se volvía a implantar en la zona dañada [9].

En sus inicios, y debido a la creciente investigación de una variedad de sistemas bio-sintéticos, orgánicos, inorgánicos e híbridos, la ingeniería de tejidos ha permitido el estudio y desarrollo de biomateriales que promueven respuestas biológicamente activas, que ayudan a mejorar el soporte mecánico de miembros ajenos al cuerpo, permiten la liberación controlada de fármacos, así como la regeneración de casi cualquier tipo de tejido. Esto genera una demanda creciente de materiales que no solamente sean bioactivos, sino que sean biodegradables, biocompatibles y bioabsorbibles.

La ingeniería de tejidos como rama de la bioingeniería, se define como la aplicación de principios científicos para el diseño, la construcción, modificación, el crecimiento y mantenimiento de los tejidos vivos[10]. Para su estudio y desarrollo, se definen dos categorías fundamentales para los que se aplica esta ciencia, los estudios *in vitro* e *in vivo*. En los primeros, su objetivo principal es la construcción de tejidos bio-artificiales, a partir de materiales sintéticos o naturales, con la finalidad de proveer biomateriales que sustituyan algún miembro u órgano dañado, y la capacidad de proporcionar un biomaterial que se utilice para investigar patologías que en condiciones normales, no pueden estudiarse en los pacientes enfermos. Para los estudios *in vivo*, se sabe que son más complicados que los estudios *in vitro*, puesto que en ellos se altera tanto, el crecimiento, como las funciones celulares, para obtener un monitoreo de las respuestas biológicas que generan los biomateriales utilizados para dichos estudios [9].

1.3.2 Biomateriales para aplicaciones en la ingeniería de tejidos.

La fractura de huesos debido a diversos traumas o por envejecimiento natural, es un tipo de fallas típicas que requiere un tratamiento médico adecuado. Para ello, se han desarrollado materiales artificiales, como son los xenoinjertos, autoinjertos y los aloinjertos. Desafortunadamente, la aplicación médica de xenoinjertos (provenientes de hueso de bovino), se asocia con infecciones virales. Adicionalmente, los xenoinjertos poseen una baja osteogénicidad, presentan un incremento en la inmunogénicidad y usualmente, se reabsorben más rápidamente que los autoinjertos. Características similares se presentan en los aloinjertos (tejido trasplantado proveniente de otra persona), donde la limitación se presenta en las diferentes composiciones genéticas, ocasionando riesgos para el paciente al aumentar la probabilidad de trasplantar células tumorales, así como una serie de enfermedades inducidas por bacterias y virus. Para los autoinjertos (huesos endógenos), se conocen sus propiedades osteogénicas,

osteoinductivas y osteoconductoras; además de ser completamente biocompatibles, no tóxicos, y no causan problemas de inmunogenicidad. Además los autoinjertos contienen células osteogénicas, proteínas en la matriz ósea, y un soporte óseo con capacidad de crecimiento. Generalmente, los autoinjertos son aceptados por el hueso y se integran rápidamente. El número limitado de sitios propicios para la donación, restringe la cantidad de autoinjertos cultivados a partir de las células de la cresta iliaca, o de algún otro sitio del cuerpo de los propios pacientes. Este tipo de aplicaciones biomédicas, involucra un doble trauma debido a las cicatrices generadas por las operaciones quirúrgicas que involucran los autoinjertos [11].

Una alternativa para las problemáticas derivadas de la utilización de los xenoinjertos, aloinjertos y el estándar de oro, los autoinjertos, se encuentra en los materiales sintéticos, naturales, en los biomateriales híbridos, que presentan propiedades fisicoquímicas similares a las que caracterizan al hueso natural, por ello, es necesario conocer cuáles son las propiedades mecánicas, químicas, de superficie y biológicas de aquellos materiales que serán utilizados en la manufactura de sustitutos de hueso, dientes y cartílagos, por mencionar aquellos materiales vinculados con el sistema óseo. En este sentido, se han propuesto biomateriales compuestos a base de una fase orgánica y una fase inorgánica, donde cada una de ellas imparte ciertas propiedades al producto final. Estas propiedades del material compuesto deben ser parecidas a las propiedades del tejido natural, en este caso el tejido óseo, dental o cartilaginoso. Por ello, cuando se obtiene un material con estas características se dice que es un material con buenas propiedades biomiméticas. En la tabla 1.1, se presentan las propiedades que en términos generales, imparten las fases orgánica e inorgánica en un material compuesto [11].

Tabla 1.1 Propiedades de las fases orgánica/inorgánica en un biomaterial compuesto.

| Orgánico | Inorgánico |
|--------------------------|--------------------------|
| Elasticidad, Plasticidad | Dureza, fragilidad |
| Baja densidad | Alta densidad |
| Permeabilidad | Estabilidad térmica |
| Hidrofobicidad | Hidrofilicidad |
| Complejación selectiva | Alto índice de reflexión |
| Reactividad Química | Potencial red-ox |
| Bioactividad | Alto esfuerzo mecánico. |

La fase orgánica de un material compuesto se refiere a polímeros de uso biomédico, que muestran propiedades de biocompatibilidad y características inertes, en los microambientes celulares del cuerpo humano. Los polímeros biocompatibles coexisten con el medio biológico sin causar cambios en el medio, ni en sus características físicas, ni en las características químicas, de tal manera que en las células circundantes no se genera toxicidad. Se clasifican de acuerdo a su comportamiento frente a un tejido vivo, en biodegradables y no biodegradables. Este comportamiento depende de las propiedades fisicoquímicas y estructurales de dichos polímeros [12].

Los polímeros se descomponen, se biodegradan y se modifican químicamente cuando entran en contacto con un entorno biológico después de un tiempo determinado. Estas modificaciones físicas y químicas de los polímeros biodegradables, se presenta cuando hay una disminución del peso molecular debido al efecto causado en su estructura por la interacción con las moléculas de agua presentes en cualquier medio biológico, el pH del medio, las proteínas que se encuentran en el microambiente celular, sales y otros elementos biológicos provenientes tanto del metabolismo de las células como de su microambiente [13].

En el desarrollo de nuevos biomateriales compuestos, se busca emplear polímeros biocompatibles y biodegradables, comenzando por polímeros de origen natural, y terminando con polímeros de origen sintético. Desde el

punto de vista de su origen, los polímeros se clasifican en naturales y sintéticos. Dentro de los polímeros naturales se encuentra el colágeno, el ácido hialurónico, el quitosano, y los alginatos, entre otros. En la clasificación de los polímeros sintéticos, se encuentra el ácido poliglicólico (PGA), poliácido láctico en sus diferentes estereoisómeros (PLA), (PLLA), (PDLA), y la épsilon-Policaprolactona (ϵ -PCL), entre otros. La tabla 1.2 presenta una lista de polímeros biocompatibles y biodegradables que se han utilizado a partir de la década de los 70's para la obtención de andamios tisulares [7].

Tabla 1.2. Propiedades físicas, mecánicas y de degradación de algunos polímeros biodegradables utilizados como andamios [14], [15], [16], [17] y [18].

| Polímero | Punto de Fusión (°C) | Temperatura de Transición Vítreas (Tg) | Módulo de Tensión (GPa) | Tiempo de degradación (meses) | Productos de degradación |
|--|-----------------------------|--|--------------------------------|--------------------------------------|-------------------------------------|
| Poli ácido L-Láctico (PLLA) | 173-178 | 60-65 | 1.5-1.7 | >24 | Ácido L-Láctico |
| Poli(D,L-ácido láctico) (PDLA) | Amorfo | 55-60 | 1.9 | 12-16 | Ácido D,L Láctico |
| Poli ácido glicólico (PGA) | 225-230 | 35-40 | 5-7 | 3-4 | Ácido Glicólico |
| Poli ϵ -Caprolactona (ϵ -PCL) | 58-63 | -60 | 0.4-0.6 | >24 | Ácido Caproico |
| Poli ácido (D,L-Láctico-co-Glicólico 50/50) | Amorfo | 50-55 | 1.4-2.8 | 3-6 | Ácido D,L Láctico y Ácido Glicólico |
| Poli ácido (D,L-Láctico-co-Glicólico 85/15) | Amorfo | 50-55 | 1.4-2.8 | 3-6 | Ácido D,L Láctico y Ácido Glicólico |
| Poli ácido (D,L-Láctico-co-Glicólico 90/10) | Amorfo | 50-55 | - | <3 | Ácido D,L Láctico y Ácido Glicólico |

El desarrollo y la investigación de la síntesis por sol-gel, ha generado la posibilidad de sintetizar un gran número de materiales con un grado de

homogeneidad alto, pureza a nivel molecular y con propiedades físicas y químicas a escala nanométricas. Estos materiales híbridos, contienen componentes orgánicos e inorgánicos con estructuras a nano-escala y buenas propiedades multifuncionales, condiciones que generan una aplicación creciente en áreas como son la óptica, la electrónica, la medicina, la farmacología y la biotecnología. Con el surgimiento de la biotecnología del silicio como una nueva área revolucionaria de investigación interdisciplinaria, que combina la química del silicio con las ciencias biológicas, surgió un interés en el desarrollo de biomateriales híbridos que atiendan las necesidades de quiescencia y proliferación celular.

Una problemática en la ingeniería de materiales para su aplicación en la regeneración tisular, es la correlación entre la composición del material híbrido, procesos de formación de nano-estructuras, agregación y desarrollo de materiales auto-organizados, nano-estructuras superficiales de silicio y de los materiales híbridos. Por ello, se han propuesto enfoques diferentes para el desarrollo y la investigación de los biomateriales híbridos, que se basan en la combinación de fases orgánicas, junto con los materiales a base de silicio, que representan la fase inorgánica [19].

En la fase inorgánica de un biomaterial híbrido, se identifican diferentes tipos de compuestos, biocerámicos y biovidrios, unidos químicamente por medio de enlaces covalentes (biomateriales de clase tipo II), o simplemente unidos mediante interacciones tipo Van Der Waals (biomateriales de clase tipo I) [20]. Las técnicas de obtención de los biomateriales, están en función de las propiedades físicas, químicas y biológicas deseadas, que van en función del tipo de aplicación biomédica que se requiera. Una propiedad importante que se considera para saber que se ha obtenido un buen biomaterial, es la porosidad, que se relaciona con la geometría, el tamaño y la interconexión de los poros en el biomaterial, ocasionando que sus propiedades se modifiquen de acuerdo a esas características. Las propiedades de superficie de los

biomateriales, son factores importantes vinculados con la bio-adhesión celular, la cual aumenta de acuerdo a la porosidad en los materiales, generando que el biomaterial posea mayor superficie de contacto, cuando se encuentre inmerso en microambientes celulares y con ello, aumenten las propiedades bioactivas de este tipo de biomateriales.

1.3.2.1 Biomateriales de primera, segunda y tercera generación

A pesar de la disponibilidad amplia de materiales con propiedades mecánicas, biológicas y estructurales, es necesario mejorarlas para satisfacer todos los requisitos que se necesiten para la regeneración ósea. Uno de los obstáculos importantes para cumplir con el mejoramiento de las propiedades de un material, es la presencia de una combinación de factores como la incompatibilidad mecánica entre el andamio y el tejido vivo, así como propiedades bioactivas y de biodegradabilidad bajas.

Por lo general, se sabe que los materiales que son mecánicamente resistentes también son bioinertes, mientras que los materiales bioactivos y biodegradables tienden a tener propiedades mecánicas bajas, sobre todo cuando contienen un volumen con porosidad alta [21], [14]. Por lo tanto, la producción de materiales híbridos y nanocompuestos con una combinación de propiedades como su biodegradabilidad, su bioactividad y competencia mecánica, constituyen un desafío en el camino de la obtención de andamios con propiedades biológicas, físicas, químicas y estructurales, adecuadas al campo de aplicación de estos materiales. Los biomateriales híbridos (O/I) presentan diferencias grandes respecto a sus contrapartes, los materiales inorgánicos y los materiales orgánicos que interactúan a través de uniones químicas a nivel molecular, mientras que los biomateriales híbridos, solo se unen mediante interacciones tipo Van Der Wals.

Los biomateriales híbridos (O/I) forman un material de una fase, formada por una mezcla entre los componentes orgánicos y los inorgánicos. Con ello, la naturaleza de la interfaz orgánica-inorgánica en biomateriales híbridos (O/I), genera como resultado propiedades mecánicas superiores a las de sus homólogos.

Desde una perspectiva biológica, los componentes de los biomateriales híbridos (O/I) y de los nanocompuestos, presentan una estructura similar al tejido óseo, donde los biovidrios, imitan a los componentes inorgánicos del tejido óseo cuya función en el cuerpo es la de soporte, y los biopolímeros imitan a los componentes orgánicos de los tejidos como el colágeno de la matriz extracelular.

Los polímeros biodegradables y los biovidrios bioactivos, son candidatos ideales para la elaboración de andamios celulares compuestos, que se degradan gradualmente mientras se inicia el proceso de formación de tejido nuevo. La liberación de subproductos ácidos a partir de los polímeros utilizados en este tipo de biomateriales, causa reacciones inflamatorias, mientras que la degradación de un biovidrio podría amortiguar el ácido generado con los subproductos alcalinos derivados de su naturaleza química. Esta combinación de efectos ayuda a evitar la formación de un ambiente desfavorable para las células, debido a los bajos valores de pH que pueden presentarse.

Desde el punto de vista mecánico, los biocerámicos y biovidrios presentan mejores propiedades de dureza, con respecto a los polímeros, jugando un papel crítico en la estabilidad mecánica de los compuestos antes de la formación de hueso nuevo. Sin embargo, la mayoría de los biovidrios son frágiles y propensos a sufrir fallas mecánicas debido a su fragilidad intrínseca, y a las estructuras amorfas presentes en la totalidad del material.

La síntesis de híbridos (O/I) y nanocompuestos genera de una manera ventajosa, la obtención de propiedades excelentes en ambos tipos de material.

El aumento en el contenido de la fase inorgánica es proporcional a un aumento en la rigidez del material. Por lo general, las nanopartículas que son incompatibles con la matriz de polímero orgánico conducen a un aumento en el número de interfaces que da lugar a más superficies fracturadas, generando una propagación de grietas a lo largo de la superficie del material. Por ello, para optimizar las propiedades mecánicas de los nanocompuestos de la superficie de las nanopartículas inorgánicas, se han modificado a través de un injerto con moléculas orgánicas, que promueve la compatibilidad entre materiales híbridos de polímero/cerámico así como la dispersión de nanopartículas.

Los materiales nanocompuestos se preparan mediante la adición de nanopartículas o nanofibras inorgánicas soportadas en diferentes matrices poliméricas orgánicas. La dimensión de las partículas del material, es un parámetro importante debido a que el tamaño nanométrico tienen una gran superficie de contacto grade en comparación con los tamaños micrométricos convencionales en la escala de las micras. Los compositos de tamaño nanométrico, forman una interfaz más estrecha con la matriz del polímero, esperando un alto rendimiento en las propiedades mecánicas. Las propiedades intrínsecas como lo es el tamaño nanométrico, contribuyen a las diferentes interacciones entre las partículas inorgánicas y la matriz polimérica orgánica. Esto conduce a un aumento en la resistencia mecánica y la rigidez de los materiales compuestos en comparación con las propiedades del polímero sin fase inorgánica y de materiales compuestos de tamaño micrométrico. En particular, el tamaño de las partículas y su morfología tienen influencias medibles sobre la capacidad de un biovidrio, o sobre las partículas de hidroxiapatita (HA) para reforzar materiales con diámetros

menores y sus relaciones de tamaño con diámetro mayor, que tienen el efecto adecuado sobre las propiedades mecánicas de ellos mismos.

El aumento de la bioactividad en la superficie de los biomateriales debida a la adición de nanopartículas inorgánicas, ha mostrado una mejoría en las propiedades bioactivas de estos materiales, en comparación con los materiales a los que se les adicionan partículas de tamaño micrométrico [22]. La adsorción de proteínas y adhesión de osteoblastos, también se ha observado que en materiales cerámicos a nano-escala, promueve una mejor bioactividad en comparación con los materiales y compuestos cerámicos de tamaño micrométrico.

Un caso de lo antes mencionado, es un estudio relacionado con la bioactividad, la tasa de degradación y las propiedades mecánicas del poliácido (láctico-co-glicólico) (PLGA) dopadas con partículas amorfas a nanoescala, en las que se ha observado una fuerte mejoría en dichas propiedades en comparación con las que presenta el polímero puro.

Los problemas asociados con la ausencia de la unión química entre las partículas que se aglomeran, son más pronunciadas cuando éstas son de tamaño nanométrico. Como se destaca en las siguientes secciones, donde las diferentes estrategias que han sido empleadas para mejorar la interacción interfacial entre partículas inorgánicas y la matriz del polímero, incluyendo agentes de acoplamiento además de injertos de polímero sobre la superficie de los materiales obtenidos. Bum Soon Lim y colaboradores, Sang-Hoon Rhee y Vallet-Regí y colaboradores, [23], [24] y [25], han demostrado que el método sol-gel se utiliza para producir materiales híbridos orgánicos-inorgánicos, con excelentes propiedades mecánicas, con un perfil de degradación controlada y la unión interfacial entre la fase inorgánica y la fase orgánica.

Las secciones siguientes se dividen en dos clases separadas y distinguibles de biomateriales: (1) nanocompositos, ya sea (I) convencional o (II) de superficie modificada, que consta de biovidrio (BG) o HA como fases inorgánicas en matrices poliméricas; y (2) derivados híbridos (O/I) de la técnica sol-gel, subdivididos en clase (I) y clase (II).

1.3.3 Biomateriales híbridos (O/I) obtenidos por la técnica sol-gel.

Los materiales híbridos (O/I), son sistemas homogéneos compuestos por diferentes tipos de monómeros y componentes orgánicos e inorgánicos miscibles entre sí, o bien, sistemas heterogéneos (nanocompositos), donde al menos uno de los dominios de los componentes tiene una dimensión que va desde algunos nanómetros hasta los ángstroms (Å). Los materiales híbridos muestran propiedades nuevas como resultado de la naturaleza y el grado de interacción interfacial entre las fases orgánicas e inorgánicas [7].

Las condiciones de procesamiento tradicionales para la síntesis de materiales inorgánicos, por lo general, implican temperaturas altas, en un proceso convencional de obtención de materiales híbridos, la incorporación de compuestos orgánicos es prácticamente imposible debido a sus puntos de fusión bajos. Por lo tanto, la síntesis por sol-gel a temperaturas bajas permite la obtención de materiales híbridos orgánicos-inorgánicos que han demostrado ser más eficaces que los materiales convencionales [26].

La combinación a nivel molecular de los componentes orgánicos e inorgánicos para la formación de un material híbrido, con pequeños tamaños de grano y grandes interfaces entre el polímero y las partículas inorgánicas, dan lugar a un material nuevo con propiedades mecánicas, físicas y químicas que están en función de la zona de aplicación deseada. La reactividad química de estas especies, suele ser diferente a la separación de fases que tiende a ocurrir durante la síntesis. Por lo tanto, es imperativo que los

enlaces químicos se formen entre los componentes orgánicos e inorgánicos con el fin de producir materiales híbridos orgánico-inorgánicos.

La naturaleza del enlace químico interfacial se ha usado para clasificar estos materiales en dos distintas clases, materiales de clase (I) y materiales de clase (II). En los materiales clase I, las fases orgánicas e inorgánicas intercambian interacciones débiles, tipo Van Der Waals y enlaces de tipo puentes de hidrógeno. En los materiales de clase II, las dos fases están vinculadas a través de enlaces covalentes fuertes [27], [28] y [29].

1.3.3.1 Biomateriales híbridos (O/I) clase I y clase II

Los biomateriales híbridos (O/I) clase I o monolítico poroso, consisten en biovidrios (BV) y polímeros solubles en agua que se obtienen por la síntesis sol-gel. Para superar las limitaciones que presentan los biomateriales híbridos a base de polímeros solubles en agua, que se unen a través de un enlace químico con la fase inorgánica, es imprescindible mejorar su estabilidad química y su rendimiento en condiciones fisiológicas del microambiente celular donde sean probados. Para este propósito, se utilizan agentes de acoplamiento con la finalidad de funcionalizar el polímero y formar un enlace covalente con la fase inorgánica y crear un material híbrido de clase II.

Dentro de los biomateriales estudiados con mayor amplitud, es el polidimetoxisilano (PDMS) como fase orgánica en un tipo de biomaterial híbrido [30] y [31]. Estos materiales son descritos estructuralmente como una red de sílice unida covalentemente al PDMS; la capacidad de formación de apatita in vitro en estos híbridos no es satisfactoria a menos que una cantidad considerable de iones Ca^{2+} se incorporen a la red [32] y [33]. Los materiales híbridos muestran una cantidad relativamente grande de apatita que se deposita en la superficie del material en un tiempo estimado de 12 a 24 horas

cuando está inmersa en suero fetal bovino (SFB). A partir de estos estudios, se observó que la capacidad de la formación de la apatita se incrementa de acuerdo al contenido de precursores en la fase inorgánica, mientras que el PDMS en la fase orgánica, proporciona mejores propiedades mecánicas.

Los materiales híbridos derivados de PDMS, en general muestran una ductilidad elevada, no obstante, su resistencia y módulo de Young son bajos con respecto a los de huesos naturales. El PDMS lograr un acoplamiento excelente con el microambiente celular, no se encuentra catalogado como un polímero biodegradable, por ello, es preferible tener un polímero biocompatible y biodegradable con un fuerte potencial de acoplamiento.

Los polímeros biocompatibles y biodegradables se han incorporado en un intento por mejorar la síntesis de biomateriales híbridos (O/I); como los biomateriales híbridos de PCL/sílice, sintetizados con éxito a través de la técnica sol-gel, en el que la policaprolactona (PCL), se mezcla internamente en la red de sílice [34], [35], [36] y [37]. Esta red de sílice se sintetizó utilizando 3-isocianatopropiltriatoxisilano (IPTS) como agente de acoplamiento en presencia de 1,4-diazabicyclo-2.2-octano (DABCO). El agente de acoplamiento sólo reaccionó con los grupos hidroxilo terminales, con ello la cantidad de reticulación en el híbrido estuvo controlada por el peso molecular del polímero [38].

Para aumentar la reticulación en el material híbrido de PCL/sílice, se requiere una reducción en el peso molecular del polímero. Esto se observa en la nucleación y al rápido crecimiento de cristales de apatita en el híbrido cuando se usa PCL de peso molecular inferior.

La hipótesis que sostiene el aumento en la reticulación del material híbrido, es la principal relación con los dominios ricos en sílice uniformemente distribuidos y bien dispersos en el material, que actúan como sitios de

nucleación para la formación de los cristales de apatita. Asimismo, la rápida degradación de la fase de PCL induce la liberación de iones de calcio cuando se encuentra sumergido en SFB [29], [39].

El contenido alto de PCL en el material híbrido, el porcentaje bajo de formación de la apatita y la ductilidad del polímero provoca que difícilmente se muestren fracturas sobre la superficie de los biomateriales híbridos [24]. Por el contrario, el contenido bajo del polímero en el material híbrido, el porcentaje de formación alto de apatita, así como la fragilidad y dureza de los cerámicos, muestran fracturas a lo largo del material híbrido.

Cuando se sintetizan materiales híbridos con un contenido intermedio de PCL se han logrado valores de resistencia a la tensión y módulo de Young alrededor de 20 a 600 MPa, la presencia de fracturas en los materiales es de un 50% [24]. Los perfiles de bioactividad y biodegradabilidad, así como buenas propiedades mecánicas son algunas propiedades que poseen este tipo de materiales, sin embargo, su potencial de aplicación en la ingeniería de tejidos, está limitado por los sitios de acoplamiento que surgen al final de las cadenas poliméricas en los materiales híbridos, así como la falta de liberación de iones Ca^{2+} en el sistema híbrido, que es esencial para comenzar la osteogénesis y con ello presentar una mejor bioactividad del material híbrido.

Experimentalmente, se ha observado que la incorporación de iones Ca^{2+} en el sistema híbrido induce una osteoconductividad buena, debido a que los híbridos están recubiertos con una capa de apatita, que es un componente principal del hueso natural [40].

Los biomateriales híbridos demostraron que algunas de las ventajas de la combinación de polímeros orgánicos con materiales inorgánicos bioactivos, se refleja en muchos de los tejidos del cuerpo humano. Un ejemplo claro se

observa en los composites a nano-escala que se utilizan para una sustitución adecuada de tejidos dañados, siendo lógico que esto se considere en el desarrollo de biomateriales de andamios para la regeneración y reparación ósea. La capacidad de utilizar un material de una sola fase para tales fines es poco práctica, por ello, el utilizar diferentes tipos de materiales compuestos, representa una alternativa más eficaz para obtener resultados que evidencien la mejora que traen consigo estos materiales. Los biomateriales híbridos O/I, exhiben este tipo de mejoras con una gama de bioactividad y reabsorbilidad diferente a la de un material con una sola fase o un biomaterial compuesto, así como diferentes tipos de propiedades mecánicas y adaptaciones de las propiedades químicas y morfológicas de material.

1.3.4 Biopolímeros

Los biomateriales, según la Real Academia de la Lengua Española (RAE), son materiales tolerados por el organismo y utilizados para prótesis, sistemas de liberación controlada de fármacos, así como para la regeneración tisular. Se sabe que cuando los biomateriales están en contacto con tejidos o células vivas no liberan moléculas tóxicas como producto de una disolución o descomposición química. Se clasifican por su naturaleza química en biopolímeros, biocerámicos, biocompuestos y por metales inertes [41].

Específicamente en los biopolímeros, existen varios factores que determinan las características de un biopolímero, como es su naturaleza inerte frente a fluidos corporales, es decir, que no se degradan químicamente y que conservan por mucho tiempo sus propiedades tanto químicas como físicas, tal es el caso del polietileno (PE) y varios poliésteres, entre ellos se encuentra el polimetil-metacrilato (PMM).

No todos los polímeros permanecen inertes frente a un medio biológico, también se encuentran aquellos que se descomponen mediante un mecanismo de degradación química, que generalmente está vinculado con la presencia de agua, que se denomina degradación hidrolítica. A este grupo de biopolímeros se les conoce como polímeros con propiedades biodegradables, requisito indispensable para utilizarlos en aplicaciones biomédicas, esperando que los productos de degradación no representen toxicidad para el medio biológico con el cuál están en contacto. Es natural que la cinética de degradación este relacionada con la pérdida de propiedades físico-mecánicas del polímero, lo que hace de estos materiales un medio idóneo para la elaboración de andamios tisulares [41].

1.3.4.1 Poliácido láctico

En Japón, el 70% de los polímeros utilizados se someten a un proceso de incineración, causando graves consecuencias al medio ambiente. Para resolver esta situación, se han investigado diferentes tipos de biopolímeros como el poli-3-hidroxi-butirato-co-3-hidroxi-valerato, la policaprolactona (PCL), el polivinil alcohol (PVA), el poliácido láctico (PLA), entre otros, debido a que estos polímeros son biodegradables en tierra, agua y composta. Sus propiedades como la poca transparencia y resistencia mínima a ser moldeados por procesos térmicos, los hace materiales de difícil acceso para utilizarse en aplicaciones biomédicas [42].

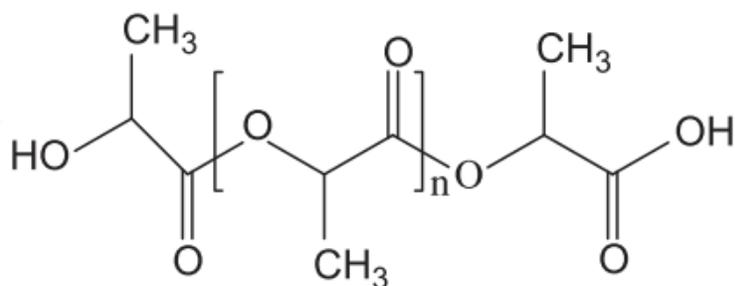


Figura 1.1 Estructura química del poliácido láctico (PLA) [43].

El políácido láctico o poli(láctida) (PLA), es conocido por su potencial de aplicación en empaques biodegradables y productos consumibles, debido a que posee excelentes propiedades, como buena resistencia mecánica, transparencia y compostabilidad alta. Es usado como material bioabsorbible en aplicaciones médicas, ejemplificando la aplicación que se le dio en esta investigación como andamio híbrido utilizado para cultivos con células hematopoyéticas.

El PLA se biodegrada en composta, se hidroliza en solución alcalina y cuando es incinerado, su temperatura de combustión es muy parecida a los plásticos convencionales como el poliestireno o polietileno.

El ácido láctico que es el precursor del polímero, es producido a partir de recursos renovables como los carbohidratos del maíz. Recientemente, la producción de ácido láctico se incrementó y expandió rápidamente, especialmente en USA donde su precio estimado fue de 2 dólares por kilogramo [42].

1.3.4.2 Biodegradabilidad y biocompatibilidad del PLA.

Los biomateriales son sustancias naturales o sintéticas que pueden interactuar con sistemas biológicos de manera temporal o permanente. Lo anterior ofrece una alternativa para el tratamiento y reparación en la pérdida de tejido y órganos debido a traumas o enfermedades. Existe una gama muy amplia para las aplicaciones de los biomateriales, ya que también se pueden utilizar como sistemas de liberación controlada de fármacos, andamios celulares, hilos de sutura en ingeniería de tejidos, prótesis para reemplazamiento de tejidos, lentes intraoculares, implantes dentales, órganos artificiales temporales o permanentes, entre otros.

Los polímeros bioabsorbibles se disuelven gradualmente en el microambiente celular y son eliminados a través de la orina y otros medios de excreción. Entre los polímeros más utilizados en medicina regenerativa, se encuentran los poli(α -hidroxi ácidos), como el PLA que es un polímero muy importante de la familia de los poliésteres debido a sus propiedades ampliamente investigadas como soporte para materiales en regeneración de tejidos.

El mecanismo de reacción para la síntesis del PLA fue investigado para determinar los parámetros cinéticos del proceso. En un proceso de polimerización convencional, se utilizan como condiciones la temperatura, una atmosfera de nitrógeno, alto vacío y tiempos cortos de reacción. Como el ácido láctico (LA) es una molécula quiral que existe con dos enantiómeros, L- y D- ópticamente activos, las propiedades fisicoquímicas de este polímero semi-cristalino, son las siguientes:

- La temperatura de transición vítrea (T_g) se encuentra en intervalos que van desde los 55°C hasta los 50°C .
- La temperatura de fusión T_m , se encuentra en intervalos que van desde los 174°C hasta los 184°C .
- El esfuerzo mecánico aceptable para ser utilizado en regeneración de tejido óseo, dental y cartilaginoso.
- La plasticidad y procesabilidad al ser un poliéster hidrofóbico, presenta inestabilidad en condiciones de humedad alta.
- Cuando el polímero se encuentra en contacto con tejido vivo, los productos químicos de la depolimerización no son tóxicos, tales como el ácido láctico, CO_2 y H_2O que son eliminados a través de ciclo de Krebs y la orina [44].

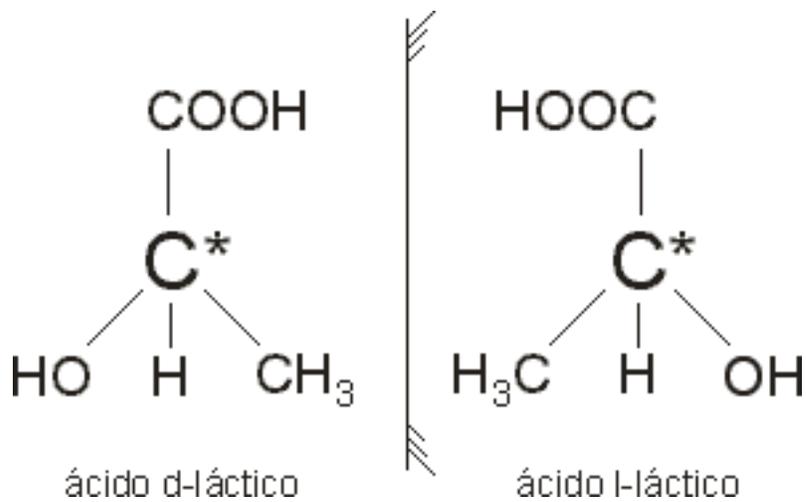


Figura 1.2. Enantiómeros, L- y D- del ácido láctico.

En general, la síntesis del PLA se realiza por dos métodos importantes:

- La policondensación directa del ácido láctico y,
- La apertura de anillo del dímero cíclico de ácido láctico, conocido como láctida [43].

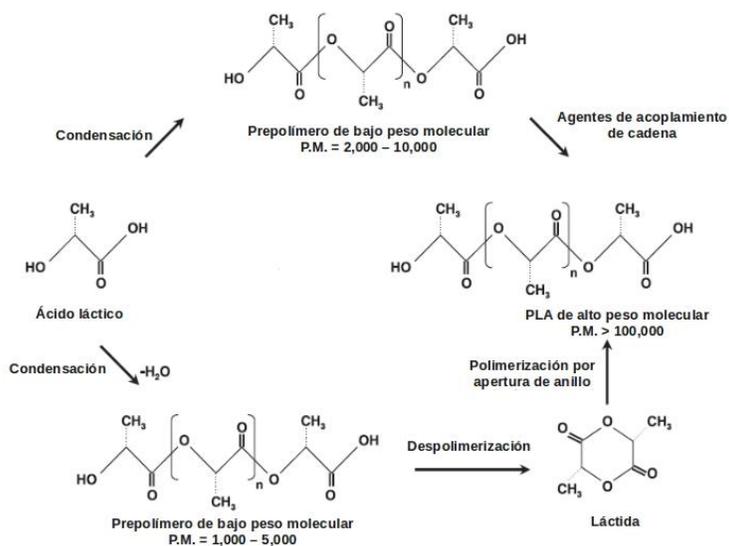


Figura 1.3. Mecanismos de síntesis para la obtención del PLA [45].

En la figura 1.3 se observan los dos mecanismos de reacción de los métodos de síntesis de policondensación directa, en el cual utiliza únicamente un disolvente, y requiere de tiempos grandes de reacción dando como resultado, un polímero de peso molecular bajo a intermedio. La polimerización por apertura de anillo (ROP) de la lactida, requiere de un catalizador para controlar con ello el peso molecular. Dependiendo del monómero utilizado y de las condiciones de reacción es posible controlar la relación y secuencia de las unidades de D y L-láctida en el polímero final [46].

La degradación del PLA, generalmente involucra una hidrólisis al azar en sus enlaces tipo éster, dando como producto de degradación el ácido láctico, el cuál se encuentra presente en el cuerpo humano. La rapidez de degradación está determinada por factores como la configuración de la estructura del polímero, porosidad, peso molecular, morfología, esfuerzos mecánicos a los que esta sometido el material, así como por la cantidad de monómeros residuales. Este comportamiento químico del PLA lo hace ideal para su aplicación en implantes ortopédicos [13].

1.3.5 Biocerámicos.

La historia de los cerámicos comienza con los de una civilización antigua, en la que su uso, representa una medida del progreso tecnológico de la misma, teniendo importantes efectos en la vida práctica de la humanidad así como en su propia historia. Los cerámicos son compuestos inorgánicos, no metálicos, sólidos inertes, sintetizados por la acción de calor y subsecuentes enfriamientos que proporcionan materiales con estructuras cristalinas, semi-cristalinas, o amorfas [47].

Los cerámicos se definen como productos hechos de sustancias inorgánicas no metálicas. Siguiendo la naturaleza de los estándares de la física y la química moderna, los cerámicos se asocian a la noción de lo no metálico, y

su dependencia de síntesis a condiciones como la temperatura y la presión. Esta noción de carácter inorgánico se relaciona con compuestos que no muestran estructuras químicas de hidrocarburos [1].

Los cerámicos modernos se clasifican como cerámicos avanzados o cerámicos finos. Ambos incluyen tres distintas categorías: óxidos, como la alumina y zirconia, no óxidos como los carburos, boruros, nitruros y siliciuros, y los materiales compuestos como partículas y fibras reforzadas de combinaciones de óxidos y no óxidos. Los cerámicos avanzados, son sintetizados a partir de componentes químicos que pueden ser utilizados en campos como la mecánica, la metalurgia, la química, la medicina, la óptica, térmicos, magnéticos, eléctricos y la industria de los electrodomésticos, debido a sus propiedades químicas y físicas [47].

En la figura 1.4 se observa un mapeo completo de los diferentes compuestos que provienen de un material cerámico.

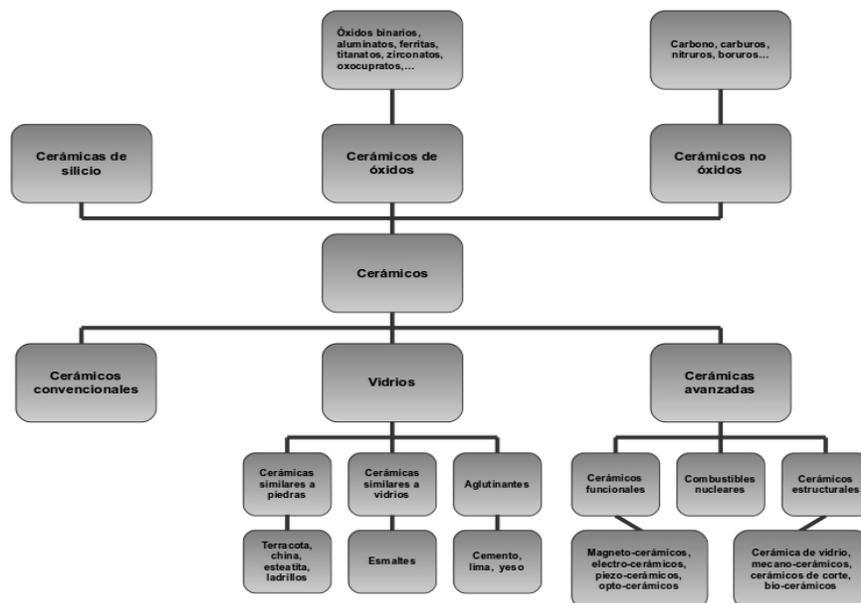


Figura 1.4. Clasificación, definición y terminología de los cerámicos. *Frecuentemente señalado como “cerámica fina” (Japón) o “Hochleistungskeramik”, cerámica de alto rendimiento (Alemania). **Frecuentemente señalado como "Ingeniería de cerámicos" (EEUU, GB) o "Ingenieurkeramik", Técnicas de cerámicos (Alemania). Esquema obtenido y traducido de [1].

Los materiales cerámicos utilizados para aplicaciones médicas, conocidos como materiales biocerámicos, representan un campo amplio en la investigación química. La obtención de biomateriales utilizados en la fijación de implantes biológicos, así como en la búsqueda de posibles soluciones a los problemas de la regeneración tisular, ejercen una demanda fuerte de materiales capaces de sustituir o reparar las deficiencias del cuerpo humano.

Un material bioactivo se define como un material que estimula una respuesta beneficiosa en el cuerpo, en particular, en la unión con tejido huésped. El término “biocerámico” se utiliza, generalmente, con vidrios recubiertos, vitrocerámicos y cerámicos utilizados como materiales para implantes biológicos [48].

En la década de 1970, el fracaso de los biomateriales como fueron el acero, las aleaciones de cobalto y el poli-(metacrilato de metilo) o PMM, se debió a la encapsulación de estos materiales por el tejido vivo, provocando en la mayoría de las ocasiones, rechazo por parte del cuerpo. Por ello, se realizaron investigaciones nuevas con los materiales cerámicos en auge, en un intento de encontrar una integración ósea adecuada entre la superficie de los mismos, con los entes biológicos con los que eran probados [49].

Las propiedades de los materiales biocerámicos son favorables para su uso en implantes biológicos, con la excepción de su rigidez y fragilidad, dos inconvenientes importantes para este tipo de aplicaciones. La fragilidad de los materiales biocerámicos ha restringido severamente su campo de aplicación, dejando a un lado Al_2O_3 y ZrO_2 , que están siendo utilizados para las prótesis de articulación de la cadera.

Los materiales biocerámicos y los fosfatos en particular, son tipos de materiales similares a los componentes minerales que se encuentran en los huesos, como es la hidroxiapatita carbonatada no estequiométrica. Por ello,

una de las ventajas que se deben destacar en el análisis de estos materiales biocerámicos, es su reactividad química baja, que en muchos de estos materiales es casi inerte y, por lo tanto, biocompatible. No todos los materiales biocerámicos son químicamente inertes, de hecho, los materiales cerámicos utilizados en la cirugía reconstructiva, así como en la ingeniería de tejidos pueden ser bioinertes o bioactivos.

La definición de bioactividad propuesta por Hulbert [2], en un material bioactivo, se refiere a aquellos materiales que permiten una respuesta biológica específica en su interfaz, lo que origina la formación de enlaces entre los tejidos y dicho material. Estos fenómenos de bioactividad evidencian la reactividad química del material y el entorno biológico donde es utilizado.

El propósito final de la síntesis de los cerámicos para la reparación ósea, es implantar el material cerámico capaz de regenerar el hueso dañado. Esto, es posible si el material es bioactivo y biocompatible, de otra manera si el material cerámico es inerte, el hueso deberá ser reemplazado por un material que el organismo tolere, y que no se sustituye por medio de la regeneración ósea.

De acuerdo con el modelo de mineralización que se presenta en la naturaleza, en general se acepta que la formación de tejido duro se inicia a partir de fosfato de calcio amorfo que, después de una serie de etapas de equilibrios heterogéneos, alcanza dimensiones críticas hasta llegar a la cristalización de hidroxapatita carbonatada [49].

1.3.5.1 Vidrios bioactivos

Los vidrios se definen como sólidos con desorden estructural. La característica que los diferencia de los cerámicos cristalinos es el balance de

orden-desorden estructural, ya que composicionalmente tienen la misma estructura.

El proceso de obtención de los vidrios, es a través de dos métodos de síntesis, el de fusión y el sol-gel [49]. El primero, consiste en fundir una mezcla de componentes inorgánicos como óxidos, carbonatos, fosfatos, mientras que la síntesis por sol-gel consiste en obtener un “sol”, por medio de la condensación de los precursores utilizados para la formación de un vidrio, para después realizar la gelación del “sol”. Los vidrios que se obtienen con este método, tienen un grado de pureza alto y una variedad más amplia de composiciones [50].

El propósito de los formadores de red es construir enlaces Si-O-Si, y los modificadores de red como el CaO y MgO tratan de romper estos enlaces, permitiendo así que la masa fundida se solidifique con un alto grado de desorden. Su presencia es apta para temperaturas de fusión y valores de viscosidad bajos, lo que reduce los costos económicos de la producción de vidrio, garantizando al mismo tiempo un alto grado de desorden. La estructura desordenada se traduce como una gran posibilidad para facilitar la alta reactividad, es de hecho, la principal ventaja para su aplicación en la reparación de huesos, sistemas dentales o cartilagosos, debido a que los productos de reacción obtenidos a partir de estos tipos de vasos y fluidos fisiológicos, conducen a la cristalización de la fase de apatita [49].

El desarrollo y la evaluación de los biomateriales inertes durante los principios de 1970, dió una nueva dirección en la investigación en biomateriales, que comenzó con el desarrollo del control de los biocerámicos de superficies reactivas, incluyendo el concepto de enlace bioquímico que puede ocurrir entre la materia viva y la no viva [2].

El primer vidrio bioactivo sintetizado fue el sistema $\text{Na}_2\text{O}-\text{CaO}-\text{P}_2\text{O}_5-\text{SiO}_2$, en 1971 por Hench. Este sistema, tiene un contenido alto en calcio y una composición cercana al punto eutéctico del sistema ternario $\text{Na}_2\text{O}-\text{CaO}-\text{SiO}_2$ [51]. Asimismo, confirmó la existencia de la unión interfacial del tejido duro con el implante para concentraciones de vidrio específicas. Con ello, se sentaron las bases en la investigación sobre el enlace del hueso con los biovidrios y los vidrios cerámicos que condujeron a la composición etiquetada con el nombre 45S5 cuya composición porcentual en peso fue de 45% SiO_2 , 24.5% CaO , 24.5% Na_2O and 6% P_2O_5 .

En la figura 1.5 se observan los límites composicionales de los biovidrios en la unión con los tejidos óseos. Con las regiones que representan el llamado “límite de unión óseo”, distribuido en las zonas siguientes:

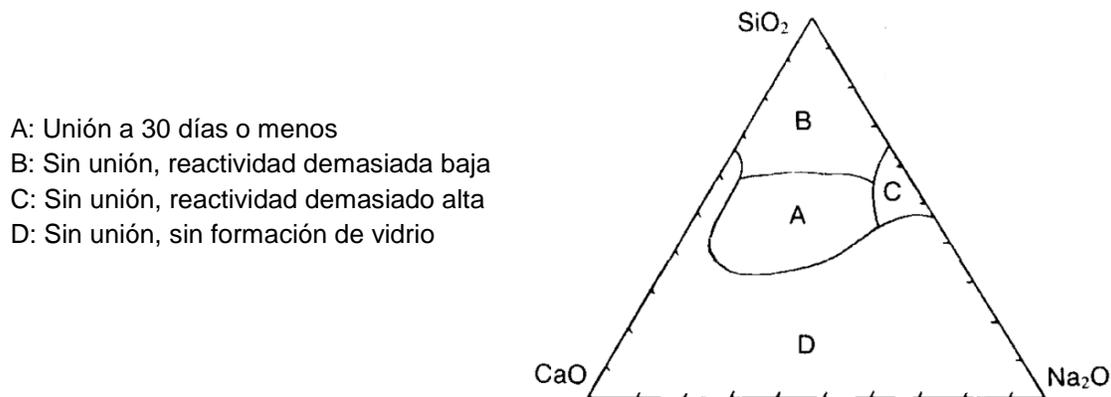


Figura 1.5. Distribución de zonas de biocompatibilidad de los vidrios bioactivos y vidrios cerámicos. Esquema extraído y traducido de [2].

En la figura 1.6 se observa el diagrama ternario del sistema $\text{SiO}_2-\text{Na}_2\text{O}-\text{CaO}$, de las zonas de unión entre el vidrio bioactivo y el hueso, con valores de índices de bioactividad representados con las letras I_B .

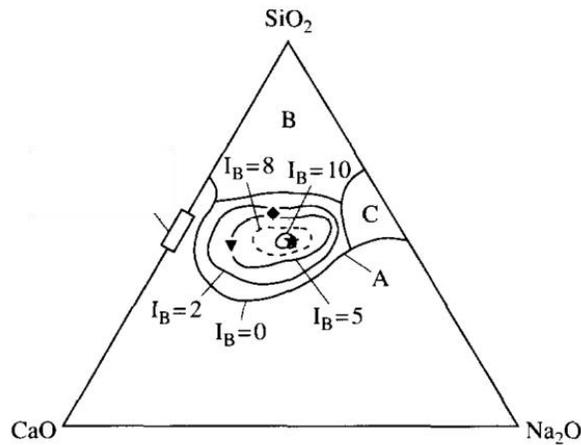


Figura 1.6 Dependencia composicional en porcentaje en peso, del enlace óseo y el enlace de tejido suave en vidrios bioactivos y vidrios cerámicos bioactivos. Todas las composiciones en la región A tiene una constante de 6% de P_2O_5 . El vidrio cerámico A/W tiene un contenido alto en P_2O_5 . La región E (unión de tejidos blandos) está dentro de la línea punteada donde $I_B > 8$ y donde se encuentran los biovidrios Bioglass 45S5® (★), Ceravital® (∇) y 55S4.3 Bioglass® (◆). Extraído y traducido de [3].

Se estudió una serie de vidrios con este sistema de cuatro componentes con una constante de 6% de P_2O_5 . La dependencia composicional de la bioactividad de el límite de unión óseo para este sistema se muestra en la figura 1.6. En la región A los vidrios son bioactivos y están unidos al hueso. Los vidrios en la región B tienen un comportamiento similar a los materiales inertes que resultan en una encapsulación fibrosa de la interfase entre el tejido y el implante. Los vidrios en la región C se reabsorben, en un plazo de 10 a 30 días, en el tejido. Las composiciones en la región D, técnicamente no son bioactivas. En la mitad del región A, en un área pequeña que se representa con una línea punteada, se observa que el componente de colágeno de los tejidos blandos se adhiere a los vidrios bioactivos. Las líneas I_B , muestran la equivalencia de las composiciones del índice de bioactividad.

La fuerza baja de la monofase de un vidrio bioactivo restringe su aplicación clínica a situaciones de soporte de carga bajo. Una forma de resolver este problema, es preparar vidrios cerámicos por un proceso de cristalización del vidrio. Vidrios bioactivos diferentes han sido desarrollados, incluyendo los vidrios bioactivos A/W, el ceravital y los vidrios mecanizables. La fuerza mecánica de los vidrios cerámicos se mejoró y mostró bioactividad mediante

la unión al hueso. Las vitrocerámicas mecanizables tienen niveles altos de mecanización debido a la adición de una mica cristalizada durante el tratamiento térmico [3]. El proceso de síntesis consistió en la fusión de la mezcla precursora (TEOS), y posterior enfriamiento de los vidrios. El análisis de la composición de las fases permitió construir sus diagramas en donde se determinan las áreas que corresponden a los vidrios bioactivos. Se añadieron a los biovidrios, nuevos componentes como K_2O , MgO , CaF_2 , Al_2O_3 , B_2O_3 o Fe_2O_3 , para que actuaran como formadores y/o modificadores de red, así como para disminuir la temperatura de fusión. El propósito principal de su inclusión fue para mejorar las propiedades que se centraron en aplicaciones clínicas, es decir, para aumentar o preservar la bioactividad. La adición de algunos de estos óxidos destruye el comportamiento bioactivo de los vidrios.

El uso de la técnica sol-gel para preparar vidrios permite dejar de lado el Na_2O como agente de fusión y trabajar únicamente con el sistema ternario $CaO-P_2O_5-SiO_2$. Este método hace que sea posible ampliar el intervalo de composición bioactiva estudiado en el diagrama de equilibrio de fase de los vidrios, además a diámetros menores de partícula, los biovidrios contienen un área de superficie mayor, misma que aumenta con los valores de porosidad. Por lo tanto, la aplicación de la técnica sol-gel en la síntesis del biovidrio dio lugar a una composición en el sistema $SiO_2-CaO-Na_2O-P_2O_5$.

La etapa siguiente en la simplificación del sistema ternario era eliminar otro componente. De acuerdo con la información obtenida a partir del estudio de otros sistemas, el SiO_2 parecía muy importante para el comportamiento bioactivo del vidrio; por lo tanto, el candidato para la eliminación era P_2O_5 . Este sistema binario fue probado por Kokubo y colaboradores, así como la producción de vidrios con un sistema binario SiO_2-CaO con un contenido de SiO_2 de menos de o igual a 65% molar. Vallet-Regí y colaboradores,

prepararon vidrios en este sistema con el contenido de SiO_2 de hasta 90% (50-90% SiO_2), por la técnica sol-gel [46].

1.3.5.2 El Sistema ternario $\text{SiO}_2\text{-CaO-P}_2\text{O}_5$

El método sol-gel se ha utilizado para hacer una nueva generación de vidrios bioactivos, siete pasos están involucrados en su fabricación. Los vidrios obtenidos por éste método y desde el punto de vista de su composición corresponden a la formula $\text{SiO}_2\text{-CaO-P}_2\text{O}_5$ los cuales tienen un intervalo de composición ampliada de bioactividad sobre los vidrios o cerámicas hechas por los procesos tradicionales. El proceso de sol-gel tiene la capacidad de controlar la composición química de la superficie del material lo cual se relaciona con la bioactividad. El vidrio obtenido por este método tiene una fracción en volumen grande, debido a su porosidad nanométrica en la superficie, y por lo tanto, con una mayor concentración de silanoles en la superficie, caracterizados porque tienen anillos de siloxano de tres miembros y cuatro miembros meta-estables en la superficie. Por lo tanto, la bioactividad se controla mediante la regulación de la química de la superficie, tales como la velocidad de liberación de silicio soluble y la textura de la superficie. Se predice que el vidrio bioactivo tiene un uso como un sistema de liberación de fármaco para factores de crecimiento óseo, para materiales compuestos bioactivos y como recubrimientos de polímeros [3].

La formación de una capa rica en Si y una capa de fosfato de calcio sobre los vidrios bioactivos es un hecho establecido. El proceso se lleva a cabo a través de la superficie libre del vidrio, por lo que los factores responsables de un aumento de la superficie específica del cristal inicial, implica una aceleración de la cinética de este mecanismo de reactividad química en vidrios bioactivos. Este fue de hecho una de las razones para buscar rutas de síntesis adicionales a estos vidrios, tratando de aumentar la superficie específica y porosidad del producto final. La capa rica en Si se ve en el

cristal, y el fosfato de calcio se ve como una capa superficial sobre el gel rico en Si. La porosidad alta en los vidrios obtenidos por el método sol-gel favorece la formación de la capa de apatita similar, ya que facilita la rápida y masiva liberación de iones de Ca^{2+} desde el cristal en la solución. Esta versión incrementa la saturación Ca^{2+} y el pH en el medio, e induce la formación de los grupos silanol (Si-OH) en la superficie del vidrio de acuerdo con la ecuación siguiente:



La formación de la capa rica en silicio es casi instantánea, y se cubre en cuestión de minutos por una capa de fosfato amorfo, que en 2 o 3 días cristaliza con la estructura de la apatita. Existen otros factores que contribuyen a estas reacciones. El CaO actúa como modificador de red, la inducción de la inestabilidad en el sistema provocando estrés en la red cristalina, por lo tanto, en general, un mayor contenido de CaO en el vidrio implica cinéticas de formación más rápidas de la fase de apatita. La presencia de CaO también se asocia con una porosidad mayor del vidrio

En este trabajo se propone un método para cuantificar y predecir la bioactividad de vidrios de silicato; que se refiere a la degradación de la red de SiO_2 con los factores que causan la formación de grupos silanol en la superficie de los vidrios. Estos factores son la composición (cantidad de modificadores de red, en este caso: CaO), y las propiedades de textura (área superficial y porosidad). La biocompatibilidad de estos vidrios obtenidos por el método sol-gel se ha estudiado por medio de cultivos de células llamados osteoblastos. Se ha observado que estos materiales permiten y favorecen el crecimiento de células óseas. La adición de MgO al sistema $\text{SiO}_2\text{-CaO-P}_2\text{O}_5$ modifica las propiedades de textura y disminuye la bioactividad de los biovidrios obtenidos por sol-gel, y aumenta la complejidad de el sistema [52].

La exclusión de un componente del sistema ternario, tal como el P_2O_5 , podría ayudar a la comprensión del mecanismo de la bioactividad en los vidrios, esto es, con la presencia o la ausencia de tal compuesto, el vidrio resultante puede o no, ser bioactivo. En la literatura se encuentran informes de la bioactividad de SiO_2 -CaO a partir de la fusión de los vidrios con un contenido máximo de SiO_2 de 65% mol. Contenidos de sílice mayores producirían la separación de fases por este método de síntesis. Se ha sintetizado vidrio del tipo CaO- SiO_2 con contenidos de SiO_2 entre 50 y 90% en mol por el método sol-gel. Estudios in vitro de bioactividad, muestran la formación de una capa de apatita similar a la apatita presente en los tejidos óseos. Estos resultados indican que la presencia de P_2O_5 en vidrios de este sistema no es esencial para asegurar la bioactividad, incluso con contenidos muy altos de SiO_2 . Con el P_2O_5 , se observó que la tasa de formación de la nueva capa aumenta con el contenido de CaO en los biovidrios [52].

1.3.6 Técnica de Electrohilado.

Esta técnica data de 1900 con la primer patente de J. F. Gooley (Gooley, J. F. Patent GB 06385, que habla de “Métodos mejorados de un aparato que separa los componentes líquidos volátiles de los que no lo son, a través de cargas eléctricas”). Quien desarrolló la técnica como tal, y la llevó a niveles que comenzaron a marcar un camino para aplicaciones diferentes, desarrollos de materiales y biomateriales obtenidos por esta técnica, fue Anton Formals, en su patente (U. S. Patent 1,975,504), en 1934 con la generación de hilos textiles [53]. Desde entonces, la técnica de electrohilado ha sido estudiada por grupos diferentes de investigación, con la finalidad de desarrollar nuevas rutas de síntesis para la obtención de nanoestructuras, con diferentes propiedades físicas, químicas y mecánicas.

Una de las primeras rutas de síntesis propuestas para la obtención de nanoestructuras fue hecha por Reneker y colaboradores durante los 90's, en

donde describían de una manera muy simple la generación de nanoestructuras poliméricas en una dimensión [54].

En el proceso de electrohilado, la solución polimérica se retiene por tensión superficial al final del tubo capilar por la diferencia de potencial al que es sometido el sistema, induciendo una carga eléctrica sobre la superficie de la disolución, y con ello generando un campo eléctrico. Cuando el campo eléctrico aplicado llega a valores críticos sobre la superficie de la disolución, las fuerzas eléctricas repulsivas sobrepasan las fuerzas de tensión superficial generadas en la punta capilar de la aguja o inyector y el jet o chorro de la disolución, es eyectado desde la punta de la aguja, lo que produce consecuentemente un cono, que es conocido con el nombre de cono de Taylor [55].

El cono de Taylor, se forma por el equilibrio entre las fuerzas de tensión superficial asociadas a la concentración de la disolución polimérica, y las fuerzas de repulsión eléctricas, causadas por el campo eléctrico aplicado al sistema. Por ello, cuando se comienza el proceso de electrohilado, entre la punta de la jeringa y el colector, el jet o chorro comienza un viaje inestable y rápido, desde la punta del inyector, hasta la superficie del colector, ocasionando la evaporación del disolvente durante el viaje del jet en el sistema y la consecuente solidificación del polímero en la superficie del colector, en forma de micro y nanofibras [54].

El equipo de electrohilado utilizado consta de tres componentes principales, una fuente de poder que aplica una diferencia de potencial en la escala de los kV en corriente directa, un inyector que normalmente es una jeringa con aguja metálica, y una placa colectora hecha de materiales con propiedades conductoras que se utiliza para cerrar el circuito que se forma con los otros dos componentes del equipo [56]. El proceso de electrohilado, comienza con la inyección de la solución polimérica, híbrida (O/I) o cerámica, cuya

viscosidad es directamente proporcional a la concentración, a la cual se preparan cada una de las soluciones.

En la figura 1.7, se observa un esquema básico del proceso de electrohilado, y la recolección de las micro y nanofibras formadas.

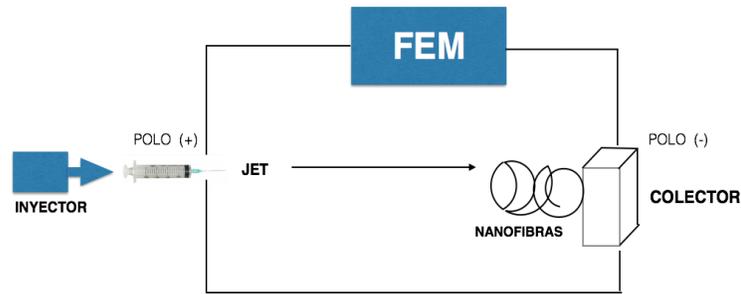


Figura 1.7 Componentes básicos del equipo de electrohilado.

La técnica de electrohilo es un proceso sencillo que incluye materiales comunes, lo cual genera que sea de costo bajo y de acceso fácil, para biomateriales sencillos, ya que al obtener materiales con una mayor complejidad estructural, se necesita una metodología más complicada, debido a la naturaleza de la técnica, que no permite obtener reproducibilidad en los andamios obtenidos.

El equipo de electrohilado contiene una serie de variables físicas por controlar, las que en su mayoría son controladas de manera efectiva, a través de diferentes sistemas físico-mecánicos. En la tabla 1.3, se enlistan las variables más importantes que determinan la morfología, la porosidad y el diámetro de fibra de los andamios electrohilados.

Tabla 1.3. Variables físicas y químicas que son susceptibles de control, para la obtención de andamios electrohilados. Las flechas indican el aumento (↑) o la disminución (↓) de cada una de las variables.

| Variable | | Morfología | Porosidad | Diámetro de fibra |
|------------------|---|------------|-----------|-------------------|
| ΔE (kV) | ↑ | Fibras | ↑ | ↓ |
| [C] (mol/L) | ↑ | Cluster | ↓ | ↑ |
| Distancia (cm) | ↑ | Fibras | ↑ | ↓ |
| %Humedad | ↑ | Cluster | ↑ | ↓ |
| Temperatura (°C) | ↑ | Fibras | - | - |

De la tabla 1.3, se observan las variables importantes para la obtención de andamios electrohilados, siendo estas, la diferencia de potencial aplicada (ΔE); la concentración de la disolución polimérica, que conlleva a aumentar o disminuir la viscosidad de la misma; la distancia inyector-colector; el porcentaje de humedad del sistema, y la temperatura a la cual se realiza el proceso de electrohilado.

1.3.6.1 Descripción del equipo de Electrohilado.



Figura 1.8 Fotografía del equipo de electrohilado utilizado, en el que se observan los componentes del equipo con fuente de poder (FEM), sistema de inyección, y colector.

El equipo de electrohilado de la figura 1.8, consta de una caja de acrílico, que sirve para realizar el proceso de electrohilado bajo condiciones de humedad controlada; un sistema de inyección (bomba) de la marca New Era Pump Systems, Inc NE-1600; así como una fuente de poder con una capacidad de hasta 40 kV, y los utensilios secundarios, como son un higrómetro para medir humedad relativa (%H), y recipientes donde se esparcen agentes desecantes del tipo de la silica gel, con la finalidad de controlar la humedad del sistema.

Al aumentar la diferencia de potencial aplicada a la disolución polimérica, si el disolvente que se utiliza tiene una constante dieléctrica alta, generara una interacción mayor entre el campo eléctrico aplicado y la disolución polimérica de PLA, resultando una evaporación más rápida del disolvente de la disolución, a la par de la generación del jet o chorro, ocasionando finalmente que se formen micro y nanofibras que se colectan de manera aleatoria sobre la superficie del colector.

En los andamios nanométricos una vez electrohilados, su porosidad aumentará conforme el diámetro de la fibra disminuye. Asimismo, si la concentración del polímero aumenta, se sabe que el volumen del disolvente disminuye y por lo tanto habrá una concentración mayor de polímero en el colector, que ocasionará el aumento en el diámetro de fibra, o bien, la formación de bulbos, provocados también por las fuerzas repulsivas insuficientes del campo eléctrico aplicado, que no permitirían la eficiente evaporación del disolvente durante el trayecto del jet desde la punta del inyector, hasta la superficie del colector.

1.3.7 Técnica de Sol-Gel.

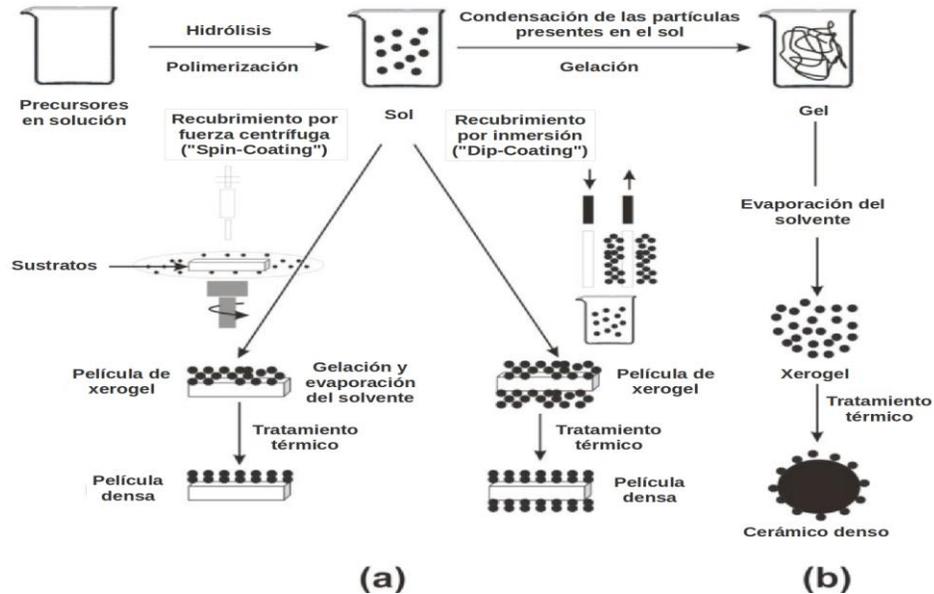


Figura 1.9. Descripción general que muestra dos ejemplos de la síntesis por el método sol-gel: (a) películas de un sol coloidal; (B) en polvo de un sol coloidal transformado en un gel [4].

Hace 40 años, la síntesis y preparación de diferentes materiales cerámicos, seguía siendo por métodos tradicionales y con altos costos energéticos y monetarios, partiendo siempre de materias primas naturales y considerando como factores principales para su obtención, la temperatura de síntesis, el sinterizado y la temperatura de fusión. Derivado de ello, el desarrollo de la técnica sol-gel causó un impacto en los sectores científico e industrial, al representar una alternativa para la obtención de vidrios y cerámicos a temperaturas más bajas que las utilizadas en los métodos de obtención convencionales. La técnica consiste en una serie de pasos experimentales que suceden después de la formación de la llamada fase "sol", que es una suspensión coloidal de partículas sólidas sumergidas en un líquido [57]. Estos pasos experimentales son: la gelación, secado, prensado y el colado, de las que el resultado final, son las transformaciones estructurales, y de fase. El sistema inicial representa una solución en la que diferentes procedimientos de polimerización y policondensación conducen a la

formación gradual de polvos, fibras, recubrimientos, productos a granel monolíticos, entre otros.

Los esquemas de síntesis usados se dividen de acuerdo a su precursor inicial en tres grupos: i) soluciones acuosas de sales metálicas, ii) soluciones de alcóxidos metálicos, y iii) precursores orgánicos e inorgánicos mezclados. Aunque con cada precursor se obtienen los materiales deseados, en las últimas décadas se ha puesto una especial atención en el estudio asociado con la utilización de precursores alcóxidos, que contribuyen de manera sorprendente al desarrollo y popularización de la técnica sol-gel en varias áreas de aplicación [58].

De acuerdo con Sakka, uno de los investigadores pioneros en el estudio y desarrollo de la técnica sol-gel, se sabe que la técnica representa una nueva tecnología que facilita la obtención de productos tipo gel, que son materiales compuestos principalmente por nanopartículas. O bien, biomateriales híbridos compuestos por fases orgánicas e inorgánicas [58].

Ebelman, fue el primero en reportar en 1845, la formación de un material transparente como resultado de una lenta hidrólisis de un éster de un ácido silícico. En 1930, Geffcen y Berger de la compañía Shott, establecieron la manera para mejorar el proceso sol-gel por medio de capas de óxidos sobre los vidrios industriales que utilizan combinaciones de precursores que contiene metales, mediante recubrimiento por inmersión. Una vez conocido este proceso, D. Roy y R. Roy, propusieron un método para la preparación de cerámicos y masas fundidas más homogéneas usando la técnica de sol-gel. Para los años 60's, H. Schrieder depositó recubrimientos transparentes sobre superficies de vidrio con la finalidad de corregir el índice de refracción utilizando butóxido de titanio [58].

1.3.8 Leucemia linfoblástica aguda

En Estados Unidos, alrededor de 6000 casos de leucemia linfoblástica aguda (ALL) por sus siglas en inglés, son diagnosticados anualmente, la mitad de estos casos ocurren en niños y adolescentes que no sobrepasan los 20 años de edad. Los síntomas que se presentan en la LLA incluyen moretones o sangrado por trombocitopenia, palidez y fatiga de anemia y neutropenia causada por la infección, así como infiltración leucémica del hígado, el bazo, los ganglios linfáticos y el mediastino comúnmente al momento del diagnóstico. La leucemia extra-medular en el sistema nervioso central (SNC) o en los testículos puede requerir modificaciones específicas en la terapia convencional. En los últimos 50 años, la utilización de quimioterapias para irradiar a los pacientes leucémicos, causaba una mejoría en casi el 90% de los pacientes. Si esta patología no se detectaba a tiempo, el índice de mortandad en los pacientes leucémicos aumentaba considerablemente. Por ello se han ido mejorando las técnicas de detección, así como los tratamientos utilizados durante las últimas décadas [59].

En niños hispanos, la presencia de la leucemia es diferente respecto a otras poblaciones infantiles a nivel mundial; las características clínicas y los picos de incidencia en edad, así como los factores moleculares son notablemente diferentes [60].

Desde octubre de 1988, fecha en la que por primera vez se trasplanta sangre de cordón umbilical y hasta nuestros días, se tiene cierto escepticismo respecto a las respuestas de este tipo de terapias para el tratamiento de LLA. Hoy en día, alrededor de 600,000 unidades de sangre de cordón umbilical se almacenan en bancos de sangre, así como alrededor de 20,000 unidades se distribuyen alrededor del mundo para niños y adultos que se encuentran en tratamiento con este tipo de terapia. Aunque este tipo de terapia ha resultado satisfactoria para el tratamiento de la LLA, no deja de representar graves

consecuencias debidas a la pre-existencia de comorbilidades en el paciente. Aunque en este tipo de terapias, se utiliza sangre de cordón umbilical de familiares, no deja de representar riesgos inmunológicos para el paciente, por diferencias en los antígenos y anticuerpos de un cuerpo con respecto al otro [61].

Por ello, el desarrollo de nuevas estrategias para la recolección, mantenimiento y consecuente proliferación de células que involucran todo el sistema hematopoyético, es una de las principales metas de estudio de este trabajo.

1.3.9 Técnicas de caracterización.

1.3.9.1 Microscopía Electrónica de Barrido y Análisis químico dimensional (MEB) y EDS.

La microscopía electrónica de barrido, es una técnica de utilidad para la caracterización de muestras orgánicas e inorgánicas, sus principios son propuestos en 1935 por Knoll, y su comienzo en 1965 con el primer equipo comercializado por The Cambridge Instrument Co.

El principio básico de la microscopía electrónica de barrido, consiste en electrones emitidos por un cátodo de tungsteno, que pasan por una columna sometida a alto vacío, donde se concentra el haz de electrones inicial por una serie de lentes con intervalos de diámetro que van desde los 50 hasta los 10 nm, para hacer puntual el haz de electrones emitidos [62]. Este haz, es desplazado por toda la superficie de la muestra a modo de “barrido”, produciendo electrones secundarios que son captados por un detector que ioniza los electrones detectados, lo cual produce fotones que son dirigidos a un fotomultiplicador, con ello se origina un fotoelectrón a través de una serie de dinodos con diferencias de potencial crecientes, esto produce electrones

secundarios que al paso por un video-amplificador, que los dirige a un osciloscopio de rayos catódicos, genera la imagen de la muestra [63].

Cada equipo de microscopía, posee un detector de electrones secundarios, que genera la imagen de la muestra, parecida a la visión del ojo humano y un detector de rayos x que sirve para obtener el espectro de elementos de la muestra, conocido comúnmente como un análisis químico elemental [64].

1.3.9.2 Espectroscopia de Infrarrojo por Transformada de Fourier (FTIR).

La radiación infrarroja fue descubierta en 1800 por el señor William Hersheld. Pero la investigación de la absorción infrarroja de materiales empezó en 1900. Fue a finales de la segunda guerra mundial, cuando se construyó el primer espectrómetro de infrarrojo. La espectroscopia de infrarrojo es, probablemente el método más extensamente estudiado para la investigación de estructuras de polímeros y el análisis de grupos funcionales.

La espectroscopia IR se fundamenta en la absorción de la radiación infrarroja por las moléculas en vibración. Una molécula absorberá la energía de un haz de luz infrarroja cuando dicha energía incidente sea igual a la necesaria, para que se dé una transición vibracional de la molécula. Es decir, la molécula comienza a vibrar de una manera determinada, debido a la energía que se le suministra mediante luz infrarroja.

Se distinguen dos categorías básicas de vibraciones: de tensión y de flexión. Las vibraciones de tensión son cambios en la distancia interatómica a lo largo del eje del enlace entre dos átomos. Las vibraciones de flexión están originadas por cambios en el ángulo que forma dos enlaces.

La espectroscopia de infrarrojo se usa para estudiar muestras en estado gaseoso, líquido y sólido, dependiendo de los tipos de accesorios empleados. Actualmente, existen una multitud de accesorios para la

espectroscopia de IR que han logrado extender notablemente el campo de actuación [65].

1.3.9.3 Difracción de rayos X (DRX).

De acuerdo con la teoría electromagnética clásica una carga eléctrica acelerada es un foco emisor de nuevas ondas electromagnéticas y puesto que el electrón oscila en fase con la radiación X, esta radiación emergente es de igual frecuencia y longitud de onda que la radiación original. El resultado neto es un cambio de dirección. Si un electrón se halla en el camino de un haz de rayos-X polarizado da lugar a una radiación dispersada en un punto P del espacio, situado a una distancia r del electrón, la intensidad del haz dispersado en relación con la del haz original de rayos-X es igual a:

$$I = I_0 \left(\frac{e^2}{mc^2 r} \right)^2 \text{sen}^2 \phi = I_0 K \text{sen}^2 \phi$$

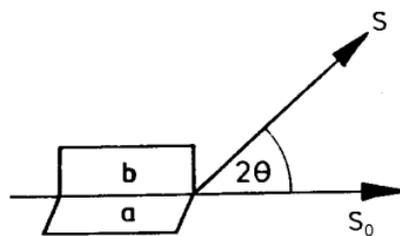
Siendo ϕ el ángulo formado por el vector eléctrico de la radiación incidente y la dirección desde donde se observa la dispersión (la línea que une el electrón y el punto P).

Se consideran dos situaciones extremas donde el haz incidente está polarizado, y su vector eléctrico es a) perpendicular y b) paralelo al plano de los vectores S y S_0 .

La intensidad dispersada equivale:

caso a: $I_{\perp} = KI_0 \text{sen}^2 (90^\circ) = KI_0$

caso b: $I_{\parallel} = KI_0 \text{sen}^2 (90^\circ - 2\theta) = KI_0 \cos^2 (2\theta)$



Si el haz incidente no está polarizado se trata como compuesto de dos componentes perpendiculares de igual intensidad, polarizadas en ángulo

rectos cada una de ellas. La intensidad dispersada se obtiene mediante promedio y equivale a: [66].

$$I = KI_0 \frac{1 + \cos^2 2\theta}{2}$$

1.3.9.4 Análisis Termogravimétrico (TGA).

En un análisis termogravimétrico se registra, de manera continua, la masa de una muestra colocada en una atmósfera controlada, en función de la temperatura, o del tiempo. En el primer caso (experimento dinámico), la temperatura de la muestra aumenta de manera controlada (normalmente de forma lineal con el tiempo), y en el segundo (experimento isoterma), la temperatura se mantiene constante.

La representación de la masa o del porcentaje de masa en función del tiempo o de la temperatura se denomina termograma o curva de descomposición térmica. Existen otros tipos de análisis denominados termogravimetría diferencial, donde se registra o representa la variación de masa o su derivada, con respecto a la temperatura o respecto al tiempo, dependiendo de si el experimento es dinámico o isotérmico, respectivamente [65].

1.3.9.5 Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC).

La técnica de calorimetría diferencial de barrido se basa en registrar la diferencia en el cambio de entalpía, entre la muestra y un material inerte de referencia en función de la temperatura o del tiempo, cuando ambos están sometidos a un programa controlado de temperaturas. La muestra y la referencia se alojan en dos crisoles idénticos, que se calientan mediante resistencias independientes. Esto hace posible emplear el principio de “balance nulo” de temperatura. Cuando en la muestra se produce una transición térmica (un cambio físico o químico que da lugar a una liberación o

absorción de calor), se adiciona energía térmica, bien sea a la muestra, o a la referencia, con objeto de mantener ambas a la misma temperatura. Debido a que la energía térmica es equivalente en magnitud a la energía absorbida o liberada en la transición. El balance de energía proporciona una medición calorimétrica directa de la energía de la transición.

En los materiales poliméricos, las transiciones térmicas más importantes son: la temperatura de transición vítrea (T_g) y la temperatura de fusión (T_f). En los polímeros amorfos, la T_g es la única transición que se registra y aparece como un cambio abrupto de la línea base presente en los difractogramas. Por otra parte, en los polímeros muy cristalinos la T_g es difícil de observar, debido a la baja proporción de la parte amorfa en el polímero. Los procesos de fusión y cristalización, dan información cualitativa sobre el pico de temperatura de fusión y cuantitativa sobre la cristalinidad del polímero (área del pico). La fusión se manifiesta en un pico endotérmico con una subida más o menos gradual y regular, según la naturaleza e historia térmica de la muestra y una bajada brusca hasta recobrar la línea base. Si la línea base se mantiene tras la fusión, puede decirse que el material es estable para ser procesado por fusión. Lo contrario es indicio de descomposición y debe estudiarse con más detalle por análisis termogravimétrico [65].

1.3.9.6 Pruebas biológicas con células mesenquimales y de linaje hematopoyético.

La alteración de los nichos hematopoyéticos ha sido propuesta como un factor contribuyente del origen y/o mantenimiento de patologías hematológicas, entre las que se encuentra la leucemia linfoblástica aguda (LLA). Esta enfermedad constituye el cáncer más frecuente en la infancia a nivel mundial, y representa un problema serio de salud pública en nuestro país. Aunque su etiología es todavía incierta y probablemente multifactorial, los últimos años han registrado un progreso sin precedente en la

identificación de aberraciones genéticas, patrones transcripcionales anormales y factores epigenéticos que pueden influenciar el desarrollo de las células iniciadoras de la leucemia.

La incursión de la ingeniería de tejidos en el desarrollo y aplicación de biomateriales que puedan utilizarse para estudiar patologías como la leucemia linfoblástica aguda, es una de las metas principales de este trabajo de tesis. Por ello, se realizaron pruebas de cultivos biológicos con células de sangre de cordón umbilical, para poder tener una primer respuesta de biocompatibilidad de los biomateriales sintetizados.

Capítulo 2

Materiales, reactivos y procedimiento experimental.

2.1 Materiales y reactivos

2.1.1 Reactivos utilizados para la obtención de los andamios electrohilados de poli(ácido L-láctico)/2,2,2-trifluoroetanol.

Se han utilizado pellets de poli(ácido láctico) (PLA) Sigma-Aldrich® y 2,2,2-trifluoroetanol (TFE) Sigma-Aldrich®, ambos reactivos se utilizaron sin tratamiento previo.

2.1.2 Reactivos utilizados para la síntesis del biovidrio de SiO₂-CaO-P₂O₅.

Se utilizó tetraetilortosilicato (TEOS, Si(OCH₂H₅)₄ Sigma Aldrich® pureza 99.9%), trietilfosfato (TEP, (C₂H₅)₃PO₄ Sigma Aldrich®, pureza 98%), cloruro de calcio dihidratado (CaCl₂·2H₂O) reactivo analítico, Sigma Aldrich®, pureza ≥99%), agua destilada, etanol absoluto (EtOH, (C₂H₆O) y ácido clorhídrico (HCl), 1 M, el cual es obtenido a partir de una dilución de ácido clorhídrico concentrado, de aproximadamente de una concentración 12 M y diluido en agua.

2.1.3 Reactivos utilizados para la síntesis de los híbridos O/I de PLLA/SiO₂-CaO-P₂O₅.

Se utilizaron soluciones de PLA/TFE al 13%, sin tratamiento previo.

Se utilizó tetraetilortosilicato (TEOS, Si(OCH₂H₅)₄ Sigma Aldrich® pureza 99.9%), trietilfosfato (TEP, (C₂H₅)₃PO₄ Sigma Aldrich®, pureza 98%), cloruro de calcio dihidratado (CaCl₂·2H₂O) reactivo analítico, Sigma Aldrich®, pureza ≥99%), agua destilada, etanol absoluto (EtOH, (C₂H₆O) y ácido clorhídrico

(HCl), 1 M, el cual es obtenido a partir de una dilución de ácido clorhídrico concentrado, aproximadamente de una concentración de 12 M.

2.2 Procedimiento experimental

2.2.1 Andamios de poli(ácido L-láctico)/2,2,2-trifluoroetanol.

La técnica de electrohilado, se utilizó para la obtención de andamios poliméricos de diferentes concentraciones de PLA, con la finalidad de encontrar la concentración adecuada para la obtención de fibras en un intervalo de diámetro de 50 a 400nm, con el objetivo de extrapolar la aplicación de esta técnica a la síntesis de compuestos híbridos de BG/PLA, obtenidos por la técnica sol-gel.

Para la obtención de cada uno de los andamios poliméricos a diferentes concentraciones, se disolvió PLA durante 14 horas, bajo agitación constante en TFE. Se realizaron diferentes disoluciones en matraces aforados de 10 mL marca Pyrex®, a concentraciones de acuerdo a la tabla siguiente:

Tabla 2.1. Descripción de las cantidades de polímero utilizadas para las disoluciones poliméricas a electrohilar.

| Concentración (m/v) | 10% | 11% | 12% | 13% | 14% | 15% |
|---------------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|
| Cantidad de PLA (g) | 1.0 | 1.1 | 1.2 | 1.3 | 1.4 | 1.5 |

Cada masa de polímero utilizada para preparar las diferentes concentraciones de las disoluciones poliméricas, se midieron en una balanza Ohaus Pioneer, después se agregó la mitad de las cantidades medidas en los matraces con 5 mL de TFE como disolvente y se agitó durante 2 horas. Concluido el tiempo de agitación, se agregó el resto del polímero y del disolvente hasta la marca del aforo, agitándose durante 12 horas más. Una vez terminado el tiempo de agitación, se tomaron alícuotas de 1 mL de cada una de las concentraciones, se agregaron a jeringas de 5 mL de capacidad, con agujas previamente limadas de las puntas y se comenzaron a electrohilar de acuerdo a los parámetros de la tabla 2.2.

Tabla 2.2. Parámetros utilizados para el electrohilado de las diferentes concentraciones de PLA/TFE.

| Concentración de las disoluciones poliméricas (m/v). | | | | | |
|--|------------|--------------|--------------|------------|-------------------------|
| Parámetros | 10% | 12% | 13% | 14% | 15% |
| Distancia inyector-colector (cm) | 10 | 10 | 10 | 13 | No se pudo electrohilar |
| ΔE (Kv) | 9,10,11,12 | 8,9,10,11,12 | 8,9,10,11,12 | 9,10,11,12 | No se pudo electrohilar |
| Velocidad de flujo (mL/h) | 0.4 | 0.4 | 0.4 | 0.4 | No se pudo electrohilar |
| Volumen inyectado (mL) | 1 | 1 | 1 | 1 | No se pudo electrohilar |
| % Humedad | x | x | x | x | No se pudo electrohilar |
| Temperatura (°C) | x | x | x | x | No se pudo electrohilar |

En la tabla 2.2 se muestran los parámetros utilizados para electrohilar, las diferentes concentraciones de las soluciones poliméricas, notándose que en las columnas de humedad y temperatura, no se fijaron valores, debido a la naturaleza de la técnica, siendo las condiciones más importante para de electrohilado.

Se utilizaron colectores de aluminio, recortados en cuadros de 10 x 10 cm², que previamente fueron limpiados por ambas caras con acetona.

Una vez que los andamios poliméricos de todas las composiciones se electrohilaron, se recortaron con todo y placa colectora en cuadros de 1x1 cm², para caracterizarse por MEB y análisis elemental, por DSC y TGA, FTIR y DRX.

2.2.2 Biovidrio SiO₂-CaO-P₂O₅.

La técnica sol-gel, se utilizó para obtener biovidrios de SiO₂-CaO-P₂O₅ a diferentes composiciones, según la tabla 2.3. En donde se muestran las diferentes composiciones etiquetadas, de acuerdo a la composición de SiO₂ y P₂O₅.

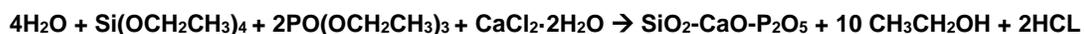
Tabla 2.3. Composiciones en porcentaje molar de las diferentes muestras de biovidrios en % m/m.

| Muestra | SiO₂ | CaO | P₂O₅ |
|--------------------------------|------------------------|------------|-----------------------------------|
| V ₇₀ P | 70 | 26 | 4 |
| V ₆₅ P | 65 | 31 | 4 |
| V ₆₀ P | 60 | 36 | 4 |
| V ₅₅ P | 55 | 41 | 4 |
| V ₇₀ P ₅ | 70 | 25 | 5 |
| V ₇₀ P ₆ | 70 | 24 | 6 |
| V ₆₀ P ₅ | 60 | 35 | 5 |
| V ₆₀ P ₆ | 60 | 34 | 6 |

Al TEOS, se agregó agua destilada en una relación molar 1:4 y 10 gotas de HCL (1M), en un matraz de bola de 250 mL Pyrex® con agitación constante. En intervalos de 30 minutos, se agregó el TEP y CaCl₂•2H₂O previamente disuelto en 5 mL de EtOH absoluto, a la mezcla de TEOS/H₂O/HCl. La reacción se llevó a cabo a una temperatura de 45° C durante 3 días para la hidrólisis y luego se aumentó a 60° C durante 3 días más para la policondensación. Concluido el sexto día, se dejó reposar cada matraz durante 10 días más a temperatura ambiente, tapados con parafilm, para tratar de evitar el aumento de la humedad en la muestra, así como para que terminara el tiempo de gelación y envejecimiento. Después se estabilizó a 70° C durante 3 días y a 120° C 3 días más. Al término del periodo de estabilización, se molió en un mortero de agata, con la finalidad de obtener polvos con micro-partículas que se utilizaron para las correspondientes caracterizaciones por MEB y análisis elemental, DSC y TGA, FTIR) y DRX. Este procedimiento, se llevó a cabo para las muestras de biovidrio sintetizado.

2.2.2.1 Propuesta de reacción a partir de los precursores químicos utilizados.

La reacción propuesta, se considera con una relación molar de TEOS: H₂O de 1:4 moles.



Para las composiciones del sistema ternario SiO₂-CaO-P₂O₅, se realizan cálculos para sintetizar las diferentes composiciones reportadas en la tabla 2.3.

2.2.2.2 Cálculos para la obtención de 10 gramos de biovidrio.

Para preparar 10 gramos de biovidrio a una composición de 70%SiO₂-26%CaO-4%P₂O₅, se tiene que:

Tabla 2.4. Pesos moleculares de los reactivos y productos de vidrio.

| Reactivo | Pm (g/mol) | Reactivo | Pm (g/mol) | |
|-------------------------------|------------|--|------------|-----------------|
| SiO ₂ | 60.0843 | TEOS (Si(OCH ₂ CH ₃) ₄) | 208.33 | 98% de pureza |
| CaO | 56.0773 | (CaCl ₂ ·2H ₂ O) | 147.01 | ml de EtOH |
| P ₂ O ₅ | 141.9446 | TEP (PO(OCH ₂ CH ₃) ₃) | 182.15 | 99.8% de pureza |

Se considera la composición en % mol del biovidrio a sintetizar, con los resultados siguientes:

$$\begin{array}{rcl}
 0.7 \text{ \% mol SiO}_2 & \times 60.0843 \text{ g/mol} & = 42.059 \text{ gT/mol T} \\
 0.26 \text{ \% mol CaO} & \times 56.0773 \text{ g/mol} & = 14.5802 \text{ gT/mol T} \\
 0.04 \text{ \% mol P}_2\text{O}_5 & \times 141.9446 \text{ g/mol} & = \underline{5.6778 \text{ gT/mol T}} \\
 & & \mathbf{62.317 \text{ gT/mol T}}
 \end{array}$$

donde gT/molT se refieren a los gramos y moles totales de los componentes del biovidrio, y se muestran los resultados de la cantidad en gramos necesaria para preparar 1 mol de biovidrio.

Consecuentemente:

Para SiO₂:

$$10gT \left(\frac{1molT}{62.317gT} \right) \left(\frac{42.059gSiO_2}{1molT} \right) \left(\frac{1molSiO_2}{60.0843g} \right) \left(\frac{1molT}{1molSiO_2} \right) \left(\frac{1molTEOS}{1molT} \right) \left(\frac{208.33gTEOS}{1molTEOS} \right) \left(\frac{100gTEOS}{98gTEOS} \right) \left(\frac{1mLTEOS}{0.933gTEOS} \right) =$$

Para P₂O₅:

$$10gT \left(\frac{1molT}{62.317gT} \right) \left(\frac{5.6778gP_2O_5}{1molT} \right) \left(\frac{1molP_2O_5}{141.9446gP_2O_5} \right) \left(\frac{1molT}{1molP_2O_5} \right) \left(\frac{2molTEP}{1molT} \right) \left(\frac{182.15gTEP}{1molTEP} \right) \left(\frac{100gTEP}{99.8gTEP} \right) \left(\frac{1mLTEP}{1.072gTEP} \right) =$$

Para CaO:

$$10gT \left(\frac{1molT}{62.317gT} \right) \left(\frac{14.5802gCaO}{1molT} \right) \left(\frac{1molCaO}{56.0778gCaO} \right) \left(\frac{1molT}{1molCaO} \right) \left(\frac{1molCaCl_2 \cdot 2H_2O}{1molT} \right) \left(\frac{147.01gCaCl_2 \cdot 2H_2O}{1molCaCl_2 \cdot 2H_2O} \right) =$$

Donde gT equivale a gramos totales y molT equivale a moles totales.

Cálculo de la relación molar 4:1 entre el agua y el TEOS:

$$25.5939mLTEOS \left(\frac{0.933gTEOS}{1mLTEOS} \right) \left(\frac{1molTEOS}{208.33gTEOS} \right) \left(\frac{4molH_2O}{1molTEOS} \right) \left(\frac{18gH_2O}{1molH_2O} \right) \left(\frac{1mLH_2O}{1gH_2O} \right) =$$

El volumen de TEOS usado, se obtiene del cálculo realizado con la composición de SiO₂.

Cálculo por regla de tres de la relación EtOH/CaCl₂·2H₂O, solución utilizada como precursor para la síntesis del biovidrio [26].

$$\left(\frac{X g de CaCl_2 \cdot 2H_2O}{XX mL de EtOH} \right) = \left(\frac{5 mL de EtOH}{1.91 g de CaCl_2 \cdot 2H_2O} \right)$$

Donde X g de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ se obtiene de los cálculos teóricos realizados para la obtención de las diferentes composiciones de los biovidrios.

Estos cálculos, también se utilizaron en la síntesis de los biomateriales híbridos de $\text{PLA/SiO}_2\text{-CaO-P}_2\text{O}_5$.

2.2.3 Técnicas combinadas de sol-gel y electrohilado para la obtención de andamios híbridos O/I de $\text{PLA/SiO}_2\text{-CaO-P}_2\text{O}_5$.

2.2.3.1 Cálculos para obtener la relación teórica en m/m del polímero y el biovidrio.

Los cálculos utilizados para la síntesis de los biomateriales híbridos, se realizaron tomando en consideración, la masa del polímero de la disolución polimérica, y la masa teórica del biovidrio, obtenidas de los cálculos realizados para la síntesis de las diferentes composiciones de biovidrios propuestas. Los que se fijaron en función de la concentración en m/v de la disolución polimérica, que proporcione el diámetro de fibra propuesto en los objetivos particulares de este trabajo, y se realizaron en función de la composición de biovidrio seleccionada para la síntesis de los biomateriales híbridos.

Las relaciones propuestas para la síntesis de los biomateriales híbridos se seleccionaron, en función de la predicción del comportamiento celular en el biomaterial. Sosteniendo una de las hipótesis principales, de que en los andamios electrohilados y en la química de nanopartículas, al tener un diámetro de fibra y de partícula, mayor y menor respectivamente, el área de contacto superficial entre los andamios y las células, se incrementaría, generando que las células tengan una adhesión y afinidad mayor con el biomaterial.

En la tabla 2.5, se muestran las composiciones propuestas de los biomateriales híbridos, que se sintetizaron de acuerdo a las hipótesis propuestas.

Tabla 2.5. Composiciones de las diferentes muestras de los biomateriales híbridos (O/I).

| Muestra | Porcentaje en m/m de BG | Porcentaje en m/m de PLA |
|------------|-------------------------|--------------------------|
| H(OI)86:14 | 86% | 14% |
| H(OI)50:50 | 50% | 50% |
| H(OI)14:86 | 14% | 86% |

Los cálculos para la obtención de los valores teóricos de cada composición, son los siguientes:

Para la muestra H(OI)86:14 de BG/PLA, se utilizó una solución de 10 mL al 13% de PLA/TFE, donde se tomó como referencia la masa utilizada de polímero en la solución, esto es:

$$\left(X = \frac{(1.3g \text{ PLA})(86\% \text{ composición})}{14\% \text{ composición}} \right)$$

donde X g de biovidrio es igual a 7.9 g de biovidrio de las composiciones propuestas en la tabla 2.3. Una vez obtenido el valor teórico del biovidrio a sintetizar, se realizan los cálculos de acuerdo con el apartado 2.2.2.2, para después realizar la combinación de las técnicas de sol-gel y electrohilado, con la finalidad de poder obtener los biomateriales híbridos [67].

2.2.3.2 Andamios híbridos O/I de PLA/SiO₂-CaO-P₂O₅, obtenidos por las técnicas sol-gel y electrohilado.

Se proponen tres rutas de síntesis para identificar en cuál de ellas no se precipita el PLA, debido a que una de sus propiedades químicas es la hidrofobicidad.

La primer ruta (1H) consiste en iniciar el procedimiento de síntesis del biovidrio, como se referenció en el apartado 2.1.2.2, hasta la adición del último precursor, para después agregar los 10 mL de la solución polimérica.

La segunda ruta (2H) consistió en iniciar nuevamente la síntesis del biovidrio de acuerdo al procedimiento propuesto en el apartado 2.1.2.2, diferenciándose de la primer ruta, con la adición de la solución polimérica después de haber agregado el TEP.

La tercer ruta (3H), consistió en poner a calentar y en agitación la solución polimérica durante 15 minutos a 60° C, con la finalidad de intentar llegar a su temperatura de transición vítrea y observar si al entrar en contacto con el agua de la mezcla TEOS/H₂O/HCl, se precipitaba.

2.2.3.3 Ruta de síntesis propuesta.

Se colocó la solución polimérica de PLA/TFE al 13% en un matraz de 3 bocas, Pyrex®, bajo agitación constante y a 50° C durante 15 minutos. Al mismo tiempo se agita una mezcla de TEOS/H₂O/HCl, con la finalidad de homogenizar la solución antes de agregarla al matraz con la solución polimérica. Una vez concluidos los 15 minutos de agitación, tanto del polímero como de la mezcla TEOS/H₂O/HCl, se mezclaron. Se colocó un tubo condensador Kimax®, para evitar la pérdida de disolvente en el sistema,

debido a la temperatura a la cual se llevó a cabo la síntesis de cada uno de los biomateriales híbridos.

La acidez de la solución se monitoreo para mantener un pH ácido (1-2). La temperatura inicial fue 45° C, después de 3 días se elevó hasta 60° C y en cada una de las síntesis, se agregó cada reactivo con 30 minutos de separación, comenzando por el TEP y terminando con el CaCl₂·2H₂O.

Una vez que se agregaron todos los reactivos, durante las 8 primeras horas de reacción. Una hora después de agregados todos los reactivos, se tomaron alícuotas de 1 mL y se electrohilaron, de acuerdo a las condiciones experimentales mostradas en la tabla 2.6:

Tabla 2.6. Condiciones de electrohilado de los andamios híbridos a diferentes composiciones. La letra X, corresponde a datos no obtenidos del proceso experimental.

| Parámetros | Composiciones de los materiales híbridos. | | |
|----------------------------------|---|---------------------|---------------------|
| | HOI/86:14 BG/PLA | HOI/50:50 BG/PLA | HOI/14:86 BG/PLA |
| Distancia inyector-colector (cm) | 10 | 10 | 10 |
| ΔE (Kv) | 12 | 12 | 12 |
| Velocidad de flujo (mL/h) | 0.3 | 0.2 | 0.2 |
| Volumen inyectado (mL) | 1 | 1 | 1 |
| % Humedad | X | X | X |
| Temperatura (°C) | X | X | X |

En la tabla 2.6 se muestran los valores de % humedad y temperatura, que son las variables que no se controlan y cambian sus valores en función del día en que se electrohilaron los andamios.

El proceso de electrohilado de cada una de los andamios híbridos, se realiza de acuerdo a los valores de viscosidad de cada una de las disoluciones, esto es, con las mediciones a 1 y 2 horas después de haber concluido la adición

de el $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, siendo estos tiempos de reacción, los utilizados para electrohilar. Se utilizan agujas de calibre **16GB** para evitar que la aguja se tape y se agitan cada 25 minutos para que no se concentren las partículas sólidas en un solo lugar de la jeringa.

Cada una de las reacciones se deja en agitación constante y a 60°C durante 6 días, para las reacciones de hidrólisis y policondensación. Al término de los 6 días, se dejan a temperatura ambiente y tapadas con parafilm, durante 5 días para el proceso de gelación, envejecimiento y secado. Después se someten a proceso de estabilización a 70°C y 120°C por 3 días en cada temperatura obteniéndose al final dos tipos de biomateriales, andamios híbridos electrohilados y polvos del material híbrido.

2.3 Material y reactivos para las caracterizaciones de los biomateriales.

2.3.1 Identificación del Poli(ácido L-láctico) por Resonancia Magnética Nuclear de Protones (RMN C^{13}).

Los espectros se obtuvieron con cloroformo deuterado (CDCl_3), en un equipo de 300 MHz, Bruker Fourier.

2.3.2 Microscopía Electrónica de Barrido MEB y Análisis Químico Elemental.

2.3.2.1 Andamios de PLA/TFE.

Las micrografías de todos los andamios, se obtuvieron en un equipo Field Emission Scanning Electron Microscope JEOL JSM-7600F cargado con un detector para la obtención de los análisis químicos elementales Oxford INCA X-Act.

De cada andamio obtenido, se cortan cuadros de 1 cm² que se someten a un baño de partículas de oro en un aparato # en corriente directa de, las cuales después de aproximadamente 10 minutos en alto vacío, se adsorben en la superficie de las muestras. Obteniendo micrografías con aumentos de 500, 1000, 2500, 5000, 10000, 15000, 20000 para cada muestra.

2.3.2.2 Biovidrios SiO₂-CaO-P₂O₅.

Los biovidrios sintetizados, se molieron en un mortero de ágata con pistilo durante 20 minutos por muestra. Se toma una cantidad traza de cada una de las muestras y se vierte en los colectores utilizados para introducirse en el microscopio, estas muestras no se someten a alto vacío con partículas de oro, puesto que el objetivo de esta metodología es introducir en las muestras no conductoras, partículas que si lo sean, y dado que el biocerámico tiene moléculas conductoras, no fue necesario el baño con partículas de oro.

Una vez obtenidas las micrografías de las muestras, se realizaron las mediciones de diámetro de fibra, con el programa image j.

2.3.2.3 Híbridos (O/I) de PLA/BG

Se realizó el mismo procedimiento que se utilizó para las membranas de PLA/TFE.

2.3.3 Caracterización Espectroscópica de Infrarrojo por Transformada de Fourier (FTIR).

Todas las muestras sintetizadas, incluyendo los andamios de PLA/TFE, las diferentes composiciones de biovidrios y los biomateriales híbridos, se obtuvieron en el intervalo de 4000-400 cm⁻¹, con un espectrómetro ATR-FTIR, Thermo Scientific Nicolet 6700.

2.3.3.1 Andamios de PLA/TFE.

Antes de realizar las mediciones, se realiza una corrida sin material, para obtener el blanco. Después cada andamio se cortó en cuadros de (2x2) cm² y se colocó bajo el sensor del equipo, repitiéndose la operación para cada andamio.

2.3.3.2 Biovidrios SiO₂-CaO-P₂O₅

Se toma una cantidad traza de cada muestra, y se coloca debajo del sensor, asegurándose de que la mayor cantidad de muestra quede por debajo de este.

2.3.3.3 Híbridos (O/I) de PLA/TFE/BG

Para las membranas de los biomateriales híbridos, se repitió la misma metodología que se usó para las membranas de polímero sólo.

2.3.4 Caracterización por Análisis Termogravimétrico y Calorimetría Diferencial de Barrido.

Las caracterizaciones fueron tomadas con un equipo SDT Q600 marca TA Instruments. A los andamios de PLA/TFE, solo se les analizó por análisis termogravimétrico, debido a que su temperatura de fusión no sobrepasa los 450° C, caso contrario en los biovidrios, donde se les practicaron análisis SDT, que son tanto los TGA y los DSC de manera conjunta, para poder observar detalladamente la pérdida de masa por agua residual, intersticial, reactivos sin reaccionar o algún tipo de compuesto no identificado.

2.3.5 Caracterización por Difracción de Rayos X.

Los difractogramas de todas las muestras, fueron obtenidas con un

difractómetro Rigaku Ultima-IV con línea K-alfa1 de Cu (1.5406Angstrom).

2.3.6 Evaluación de la capacidad de soporte de la hematopoyesis por el biomaterial híbrido sintetizado con una composición de 84/16 de PLA/SiO₂-CaO-P₂O₅.

2.3.6.1 Obtención de células troncales y progenitoras hematopoyéticas (HSPC) a partir de muestras de sangre de cordón umbilical (SCU).

A partir de seis muestras de SCU provenientes del Hospital General “Doctor Gaudencio González Garza” del Centro Médico Nacional La Raza y del Hospital General de Zona No. 2-A Troncoso IMSS, se obtuvieron las células mononucleares mediante gradiente de separación con Ficoll-Paque (GE Healthcare Bioscience). La fracción mononuclear contiene linfocitos, monocitos y células hematopoyéticas no diferenciadas y en vía de diferenciación, entre las cuales se encuentran las HSPC. El proceso de obtención de células mononucleares se realizó por separado para cada muestra de SCU el día en que se recibió la muestra y las células fueron criopreservadas en dimetil-sulfóxido (SIGMA®) y suero fetal bovino (SFB, Gibco®) a -80°C para su posterior cultivo en los biomateriales.

Previo al cultivo de células hematopoyéticas con el biomaterial, se descongelaron, lavaron y mezclaron las diferentes fracciones de células mononucleares provenientes de las 6 muestras de SCU y se procedió al enriquecimiento de la población de HSPC empleando columnas y perlas magnéticas (Miltenyi Biotec) para selección positiva de células que expresan el marcador de superficie CD34+, característico de esta población hematopoyética.

2.3.6.2 Cultivo de células HSPC en presencia de biomaterial híbrido.

Fragmentos de 1cm² de biomaterial híbrido y de composición 84/16 de PLA/BG, fueron esterilizados a baja temperatura (50 – 78 °C) en gas formaldehído. Una vez esterilizados, se colocaron en placas de 24 pozos con 1mL de medio RPMI (Gibco®) preparado con 10% de SFB (Gibco®) y 1% de antibióticos penicilina-estreptomina (Ab) (Gibco®). Se mantuvieron 6 días en cultivo a 37°C con la finalidad de verificar esterilidad e hidratar los biomateriales. Cumplido este periodo, se colocaron aproximadamente 20,680 HSPC en cada uno de 4 pozos control sin biomaterial y 8 pozos con biomateriales. En la mitad de los cultivos, 2 pozos control y 4 con biomaterial, se añadieron citocinas promotoras de diferenciación linfóide a una concentración de 1µL/mL de medio: SCF, Flt-3L, IL-7 e IL-15 (PeproTech®). A la mitad restante de pozos, se les añadieron citocinas promotoras de diferenciación mielóide: SCF, Flt-3L, G-CSF, GM-CSF, IL-3 e IL-6. (PeproTech®). Se cultivaron a 37 °C, realizando cambio de medio RPMI-10%SFB-1%Ab suplementado con citocinas linfoides o mieloides cada 7 días.

2.3.6.3 Evaluación de la diferenciación mielóide y linfóide por citometría de flujo.

Los cultivos con citosinas mieloides fueron cosechados a los 19 días de cultivo. Se extrajo 1mL de medio de cada uno de los 6 pozos y se lavaron con 1 mL adicional de buffer de fosfatos, colocando el contenido y lavado de cada pozo en un tubo para citometría. Se obtuvieron los números celulares totales en cada pozo por cuenta en microscopio con tinción de azul de metileno (In Vitro®). El contenido de cada pozo se dividió en tres tubos: el primero y segundo para marcar con anticuerpos (Biolegend®) que reconocen moléculas extracelulares para la identificación de poblaciones celulares de linaje linfóide (CD34, CD19, CD11c, CD56 y CD123) y mielóide (CD34,

CD13, CD14, CD11c y CD123), respectivamente. El tercer tubo se empleó para ajustar las cuantificaciones en el citómetro considerando la autofluorescencia de las células. La fenotipificación por citometría de flujo se realizó en un citómetro FACS Canto (BD Biosciences®) de 8 colores y los datos obtenidos se analizaron empleando el software FlowJo 7.6.1.

El mismo procedimiento de marcaje, fenotipificación y análisis se realizó con los pozos en condiciones linfoides, cosechados a los 30 días de cultivo.

2.3.6.4 Cálculos y análisis estadístico.

Para la cuantificación de rendimiento por progenitor se divide el número total de células cosechadas al finalizar los cultivos entre el número de células colocadas al inicio del experimento (20,680 células). Este dato sugiere que tanto se mantuvieron y proliferaron las células a lo largo de la duración del cultivo, en función de las condiciones: de presencia y de ausencia del biomaterial.

La comparación entre grupos fue realizada aplicando la prueba t de student no pareada de dos colas y se consideró como diferencia significativa cuando el p-value fue menor a 0.05.

Capítulo 3

Resultados y análisis de resultados.

3.1 Resonancia Magnética Nuclear de ^{13}C del poli(ácido láctico) disuelto en TFE de concentración al 13% m/v, a uno y dos meses de preparado.

Se conocen dos tipos de estereoisómeros del PLA, el poli(ácido L-láctico) (PLLA), el poli(ácido D-láctico) (PDLA) o la mezcla racémica de ambos poliésteres poli(D,L-ácido láctico). Para identificar qué tipo de PLA se utilizó en la síntesis de las membranas y en los biomateriales híbridos, así como para tener una prueba cualitativa de la descomposición del polímero en disolución a través del tiempo, se prepararon dos disoluciones poliméricas al 13% m/v de PLA/TFE, con una diferencia de un mes de preparación entre cada una de las disoluciones y se caracterizaron por RMN ^{13}C .

La figura 3.1 corresponde al RMN de ^{13}C de la primera muestra preparada (MA) de PLA/TFE al 13% m/v, y en la figura 3.2 se presenta el correspondiente espectro de RMN de ^{13}C de la solución preparada 1 mes después (MB), en ellos se evidencian los desplazamientos principales de los carbonos del PLA.

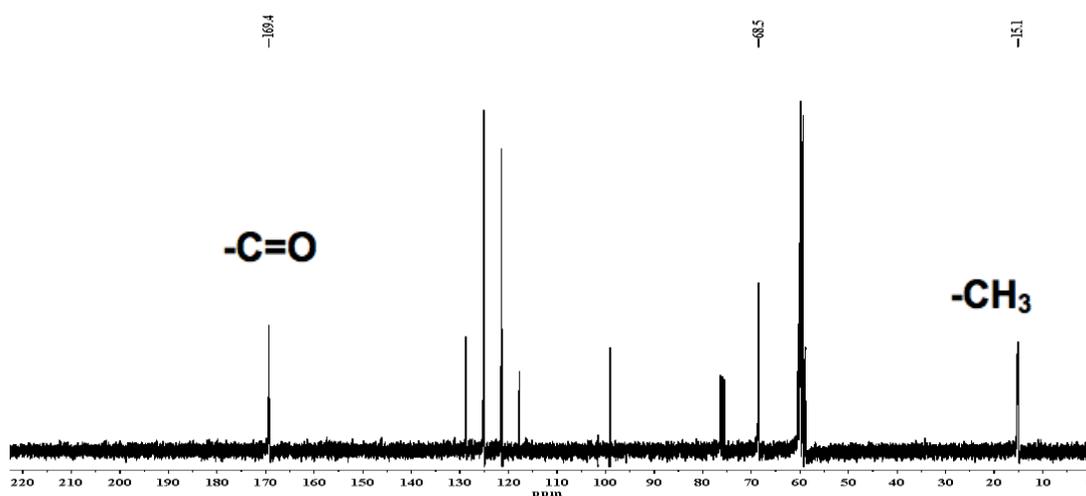


Figura 3.1. Espectro de ^{13}C de PLA/TFE al 13% m/v de la muestra MA.

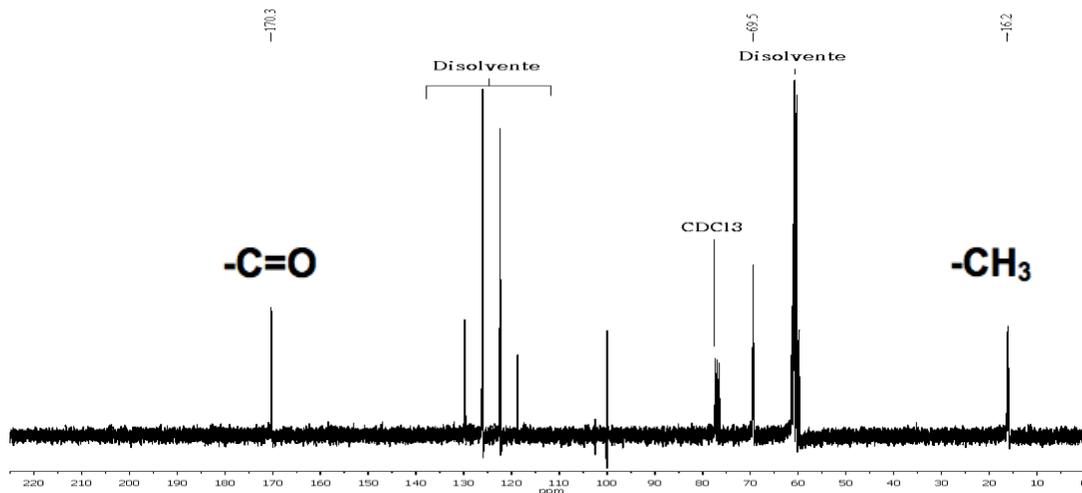


Figura 3.2. Espectro de ^{13}C de PLA/TFE al 13% m/v preparada de la muestra MB.

En los espectros 3.1 y 3.2, se observan las tres señales importantes de los carbonos asociados al PLA. En la tabla 3.1, se observan los desplazamientos de los carbonos, y del disolvente utilizado en las soluciones poliméricas, y el utilizado en los espectros.

Tabla 3.1. Señales observadas en los espectros de C^{13} para las muestras MA y MB.

| Muestra | 1) MA | 2) MB |
|-------------------------------------|---------|---------|
| Tiempo de síntesis (mes) | 2 | 1 |
| Desplazamiento (cm^{-1}) | | |
| CH ₃ | 16.2 | 15.1 |
| C-H | 69.5 | 68.5 |
| C=O | 170.3 | 169.4 |
| CDCl ₃ | 76.2 | 76.5 |
| TFE | 117-130 | 117-130 |
| TFE | 60 | 59.5 |

En la tabla 3.1, se observan la señales de los desplazamientos de los carbonos del carbonilo (C=O), con valores de longitud de onda de 169.4 y 170.3 ppm. Para el carbono del metino (CH), los desplazamientos encontrados se encuentran en 68.5 y 69.5 ppm, y para el carbono del metilo (CH₃), los valores de los desplazamientos son 16.2 y 15.1 ppm, para los espectros MB y MA, respectivamente. Las señales de los desplazamientos correspondientes al TFE, que fue el disolvente utilizado para disolver el PLA en el intervalo de 117-130 ppm, los valores de los desplazamientos del cloroformo deuterado (CDCl₃) son 59.5-60 ppm, utilizado como disolvente

para el corrimiento de la disolución polimérica en el equipo de resonancia [68].

En la figura 3.3, en el espectro de RMN ^{13}C en DMSO, del PLA de bajo peso molecular, donde se distinguen los desplazamientos principales de cada uno de los carbonos de los oligómeros del PLA y del L-ácido láctico.

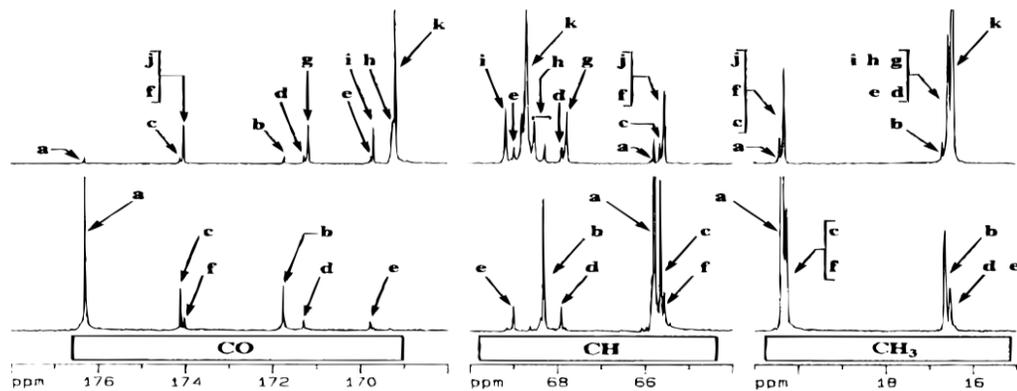


Figura 3.3. Desplazamientos en ppm de CO, CH y CH₃ de los oligómeros del PLA [5].

El espectro de la figura 3.3, fue obtenido en DMSO como disolvente, el que sirve para identificar las señales de los carbonos del polímero que se preparó en este trabajo, para con ello corroborar que efectivamente se obtuvo el PLA como polímero y que en los dos meses que tenía de preparada la disolución polimérica, no se degradó, ni se depolimerizó. Siendo confiables cada una de las disoluciones preparadas y utilizadas para la síntesis de los andamios híbridos.

El peso molecular del PLA oscila entre los 190,000 y 200,000 g/mol (Nature Work,).

Con los espectros infrarrojo se podrá corroborar la estructura química del polímero y los cambios químicos presentes, si es que los hay, debidos al

tiempo de preparación y a las diferencias de potencial aplicadas en cada uno de los andamios electrohilados.

3.2 Andamios de PLA/TFE electrohilados.

Los andamios de PLA/TFE obtenidos por la técnica de electrohilado a concentraciones diferentes, se prepararon de acuerdo a la tabla 2.1, y se electrohilaron de acuerdo a la tabla 2.2 mostradas en el capítulo 2.

Durante el proceso de electrohilado de las disoluciones poliméricas, se propusieron seis concentraciones diferentes, con diferencias de potencial variables que van desde los 8 hasta los 12 kv, con el objetivo de observar el aumento o la disminución del diámetro de fibra obtenidos con cada una de las disoluciones. Con la finalidad de no extender la obtención de los andamios debido al control de varios de los parámetros de la técnica, se fijó un valor de 10 cm de distancia entre la punta de la aguja (inyector) y la placa de aluminio (colector).

En la tabla 3.2 se muestran las cantidades experimentales para cada una de las concentraciones de las soluciones poliméricas preparadas.

Tabla 3.2. Masas empleadas en la obtención de las disoluciones poliméricas que se electrohilaron.

| Concentración m/v | Masa de PLLA Experimental (g) | Volumen del matraz (mL) |
|-------------------|-------------------------------|-------------------------|
| 10% | 1.045 | 10 |
| 11% | 1.099 | 10 |
| 12% | 1.199 | 10 |
| 13% | 1.314 | 10 |
| 14% | 1.409 | 10 |
| 15% | 1.512 | 10 |

La solución polimérica al 15% no se logró electrohilar, debido a su viscosidad alta, respecto a las demás disoluciones, y a que la distancia entre el inyector

y el colector fue fija, provocando que la diferencia de potencial aplicada en cada una de las membranas, así como la poca cantidad de disolvente respecto a las otras disoluciones, no fuera lo suficiente para generar un equilibrio entre las fuerzas de atracción, las fuerzas eléctricas generadas por la fuente de poder, así como las gravitacionales presentes en el sistema, de tal manera que se pudiera formar el cono de Taylor, y consecuentemente el jet o chorro que permitió el electrohilado.



Figura 3.4. Fotografía de la membrana al 15% de PLA/TFE donde se observa que no se obtuvieron buenos resultados, respecto a las otras composiciones en las cuales si se observan membranas bien definidas.

3.2.1 MEB de los andamios de PLA/TFE electrohilados.

En las micrográficas siguientes, se muestran los andamios electrohilados cuyas concentraciones corresponden al 10, 12, 13 y 14 % en m/v de PLA/TFE, obtenidos variando la diferencia de potencial aplicada. Las imágenes 3.5 a y 3.5 d se utilizan para medir el diámetro de fibra a través del programa computacional Image j.

3.2.1.1 Andamios al 10% PLA/TFE a 10, 11 y 12 kilovolts (kV).

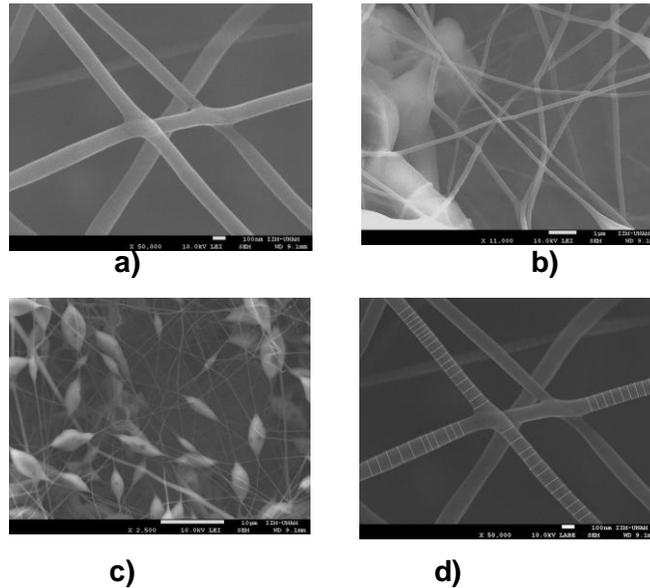


Figura 3.5. Micrografías de los andamios obtenidos al 10% PLA/TFE con una ΔV de 10 kV. Imágenes a) 50,000 x, b) 11,000 x, c) 2,500 x y d) 50,000 x.

En la figura 3.5, se observa la morfología de las fibras obtenidas con una composición de 10% m/v de PLA/TFE y una ΔV de 10kV. En la imagen 3.5 (a), se observa que el diámetro promedio de fibra es de 100 nm, con una morfología homogénea. En las imágenes (b) y (c), se observa una gran cantidad de bulbos de polímero en el volumen del andamio. La formación de bulbos se debe a que la distancia, entre el inyector y el colector es pequeña, por lo que el tiempo de vuelo de la fibra, entre la jeringa y el colector, no es suficiente para evaporar el disolvente de la disolución, evitando que con ello se formen las fibras que se colectarían sobre la superficie de la placa de aluminio (colector). El efecto se debe al aumento o disminución de la concentración de PLA en el disolvente TFE.

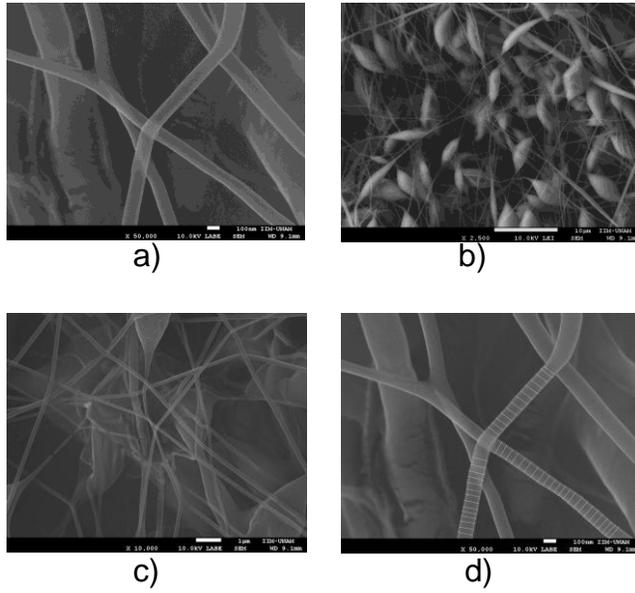


Figura 3.6. Micrografías de los andamios obtenidos al 10% PLA/TFE con una ΔV de 11 kV. Imágenes a) 50,000 x, b) 10,000 x, c) 2,500 x y d) 50,000 x.

En la figura 3.6, se muestran los andamios al 10% m/v PLA/TFE, con una ΔV de 11 kV. Las micrografías mostraron la formación de bulbos, en algunas zonas, debidos a la corta distancia entre el inyector y el colector, insuficiente para evitar la formación de dichos bulbos.

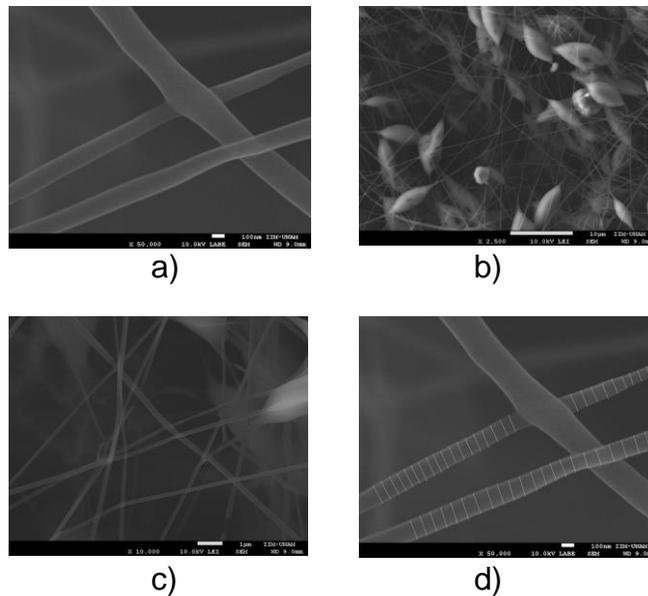


Figura 3.7. Micrografías de los andamios obtenidos al 10% PLA/TFE con una ΔV de 12 kV. Imágenes a) 50,000 x, b) 10,000 x, c) 2,500 x y d) 50,000 x.

En la figura 3.7, las imágenes correspondientes a los andamios al 10% m/v de PLA/TFE con una ΔV de 12 kV. Muestran la presencia de los bulbos del polímero, percibiéndose una cantidad menor de estos sobre la superficie del andamio.

3.2.1.2 Andamios al 12% PLA/TFE a 8, 9, 10, 11 y 12 kilo volts (kV).

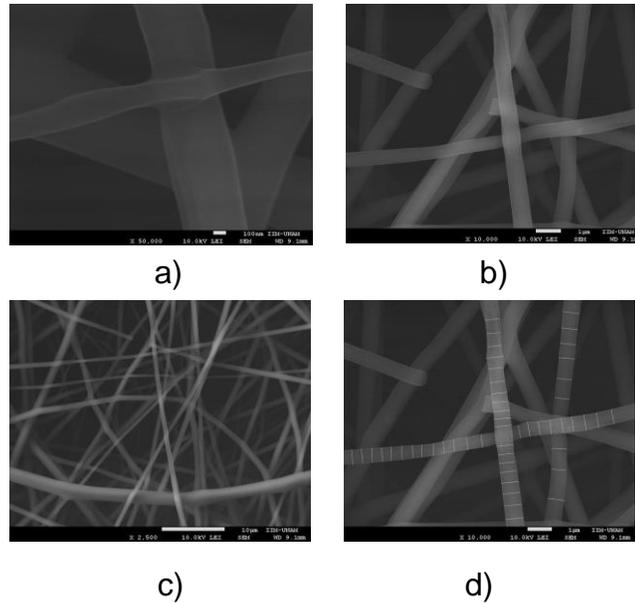


Figura 3.8. Micrografías de los andamios obtenidos al 12% PLA/TFE con una ΔV de 8 kV. Imágenes a) 50,000 x, b) 10,000 x, c) 2,500 x y d) 10,000 x.

Para los andamios al 12% m/v de PLA/TFE, mostrados en la figura 3.8 y obtenidos con una ΔV de 8 kV, desaparecen los bulbos de polímero, sin embargo, la morfología de las fibras no es homogénea. Los diámetros de fibras obtenidos a esta concentración, están en el intervalo de 400 a 700 nm (figura 3.8-d). La desaparición de los bulbos se debe al aumento en la concentración de la disolución, que se presenta más viscosa y con menos disolvente. Tanto la ΔV aplicada, como la distancia entre el inyector y el colector de 10 cm, es suficiente para que el disolvente se evapore rápido, y con ello se permita la deformación del polímero y la consecuente formación y colección de las fibras.

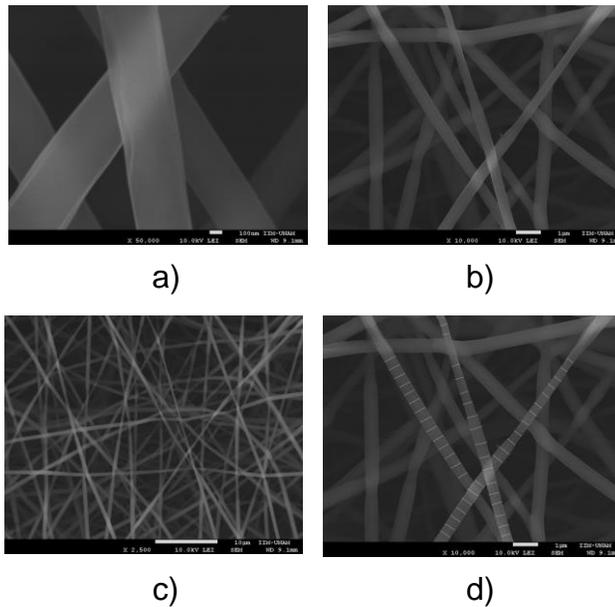


Figura 3.9. Micrografías de los andamios obtenidos al 12% PLA/TFE con una ΔV de 9 kV. Imágenes a) 50,000 x, b) 10,000 x, c) 2,500 x y d) 10,000 x. En las micrografías de la figura 3.9 se observa que las fibras obtenidas a 9 kV, poseen una morfología con mayor homogeneidad, diámetros de fibra alrededor de los 450 nanómetros, y la ausencia total de bulbos de polímero. Con esto se comprueba que el aumento en la concentración del polímero y la disminución del disolvente en la disolución polimérica, provoca que la diferencia de potencial aplicada, evapore el disolvente eficientemente a la distancia fija de 10 cm.

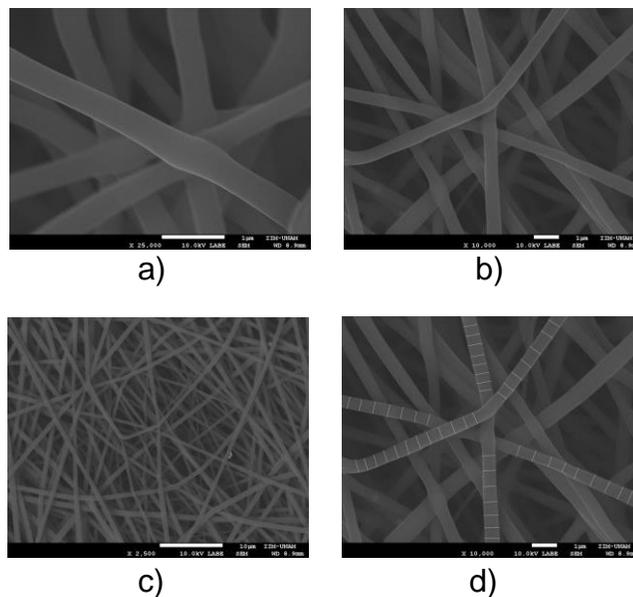


Figura 3.10. Micrografías de los andamios obtenidos al 12% PLA/TFE con una ΔV de 10 kV. Imágenes a) 25,000 x, b) 10,000 x, c) 2,500 x y d) 10,000 x.

En los andamios de la figura 3.10, a 10 kV, se observa una densidad mayor de fibras sobre la superficie del colector, donde es evidente la homogeneidad en los diámetros de las fibras obtenidas. Con diámetros alrededor de los 550 nanómetros. Al aumentar la diferencia de potencial aplicada, junto con el aumento en la concentración de la disolución, la producción de fibras sin la presencia de bulbos es efectiva.

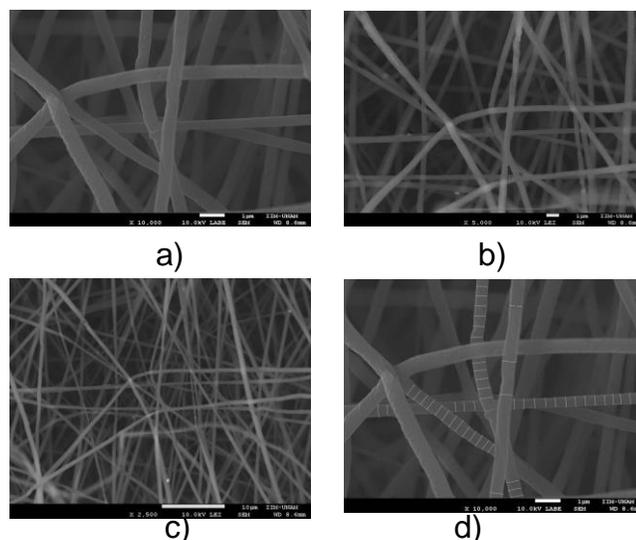


Figura 3.11. Micrografías de los andamios obtenidos al 12% PLA/TFE con una ΔV de 11 kV. Imágenes a) 10,000 x, b) 5,000 x, c) 2,500 x y d) 10,000 x.

En las micrografías de la figura 3.11, con 11 kV, contrario a lo que sucedió en las imágenes de la figura 3.10, la morfología de las fibras, cambio hasta notarse rugosidad en la superficie. Ello podría deberse a que la ΔV aplicada provoca la elongación de la fibra en ciertas secciones, por las fuerzas de repulsión eléctricas generadas con esta diferencia de potencial aplicada en el interior del jet o chorro, la que es aleatoria y con ello ocasiona la distorsión de las fibras. Los diámetros de fibra obtenidos, estuvieron en el intervalo de los 450 – 500 nanómetros.

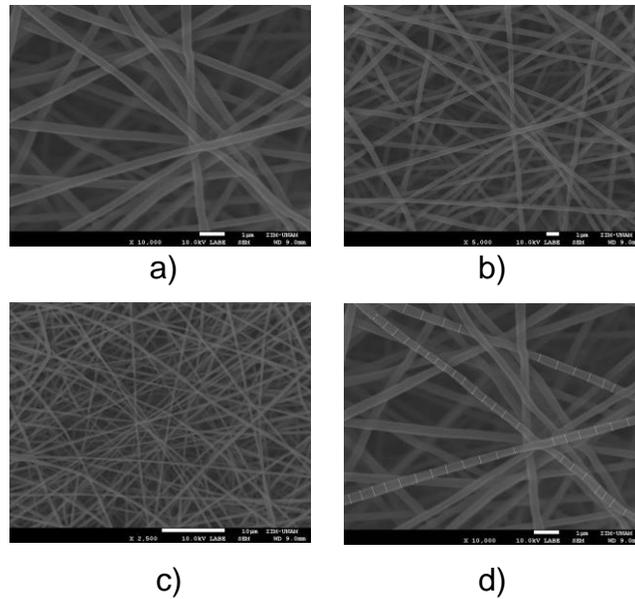
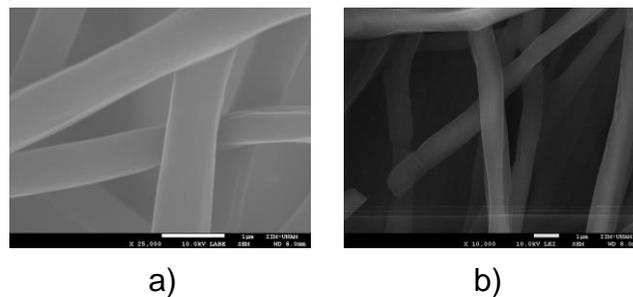


Figura 3.12. Micrografías de los andamios obtenidos al 12% PLA/TFE con una ΔV de 12 kV. Imágenes a) 10,000 x, b) 5,000 x, c) 2,500 x y d) 10,000 x.

En las micrografías mostradas en la figura 3.12 para los andamios al 12% m/v de PLA/TFE con una ΔV de 12, se observa la rugosidad superficial de las fibras, y diámetros de fibra entre los 300 – 400 nanómetros. Se confirma que cuando la diferencia de potencial aplicada al sistema aumenta, y la concentración de la disolución permanece constante, los diámetros de fibra tienden a disminuir y la homogeneidad superficial de las fibras se ve afectada.

3.2.1.3 Andamios al 13% PLA/TFE a 8, 9, 10, 11 y 12 kilo volts (kV).



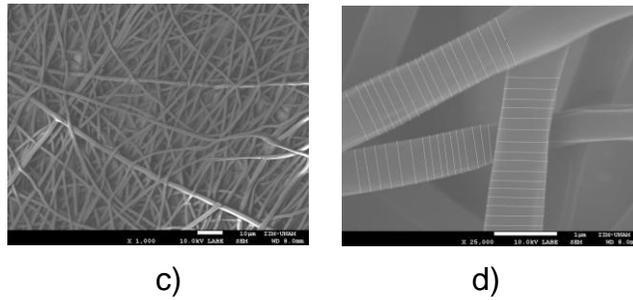


Figura 3.13. Micrografías de los andamios obtenidos al 13% PLA/TFE con una ΔV de 8 kV. Imágenes a) 25,000 x, b) 10,000 x, c) 1,000 x y d) 25,000 x.

En las micrografías de la figura 3.13, en los andamios al 13% m/v de PLA/TFE obtenidos a 8 kV, se nota un cambio significativo en cuanto a morfología de las fibras, y en los diámetros obtenidos. Mientras en la micrografía 3.13 (a), hay homogeneidad superficial de la fibra; en la figura 3.13 (b) se observan fracturas aisladas en el andamio, lo que proporcionará propiedades mecánicas bajas. Sin embargo, la densidad de fibras es abundante con respecto a los andamios procedentes de concentraciones de la disolución menores. El diámetro de fibra se encontró en el intervalo de 750 a 810 nanómetros.

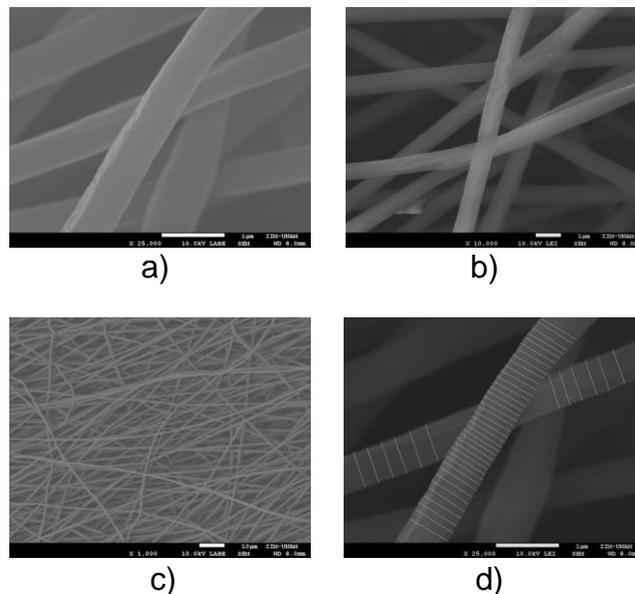


Figura 3.14. Micrografías de los andamios obtenidos al 13% PLA/TFE con una ΔV de 9 kV. Imágenes a) 25,000 x, b) 10,000 x, c) 1,000 x y d) 25,000 x.

En las imágenes de la figura 3.14, el andamio con una diferencia de potencial de 9 kV, no se nota diferencia morfológica, con respecto a la figura 3.13, a excepción del diámetro de fibra obtenido que fue en el intervalo de 600 a 700 nanómetros.

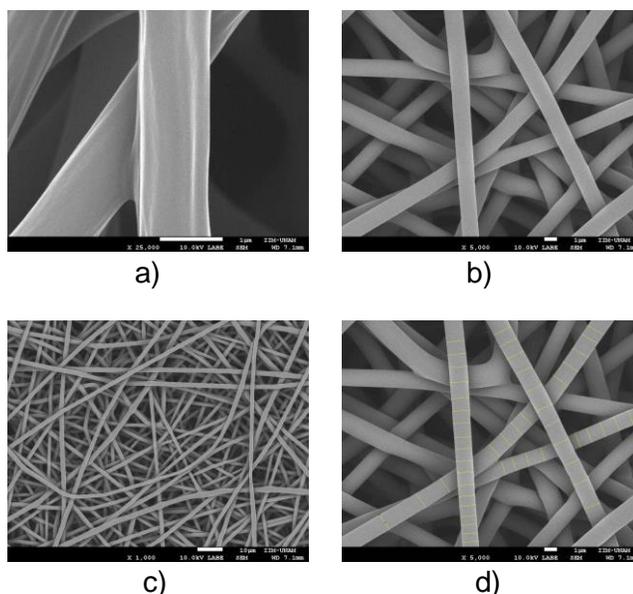
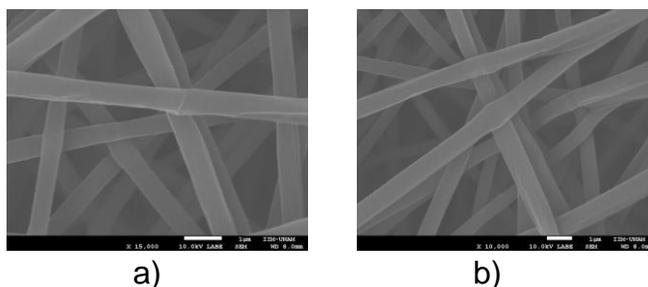


Figura 3.15. Micrografías de los andamios obtenidos al 13% PLA/TFE con una ΔV de 10 kV. Imágenes a) 25,000 x, b) 5,000 x, c) 1,000 x y d) 5,000 x.

En el andamio mostrado en la figura 3.15, a 10 kV, se observa una densidad de fibra mayor, una homogeneidad superficial de las fibras mayor, así como un aumento en el diámetro de fibra obtenido, que se encontró en el intervalo de los 1,200 – 1,300 nanómetros, sobrepasando los diámetros obtenidos con las disoluciones anteriores.



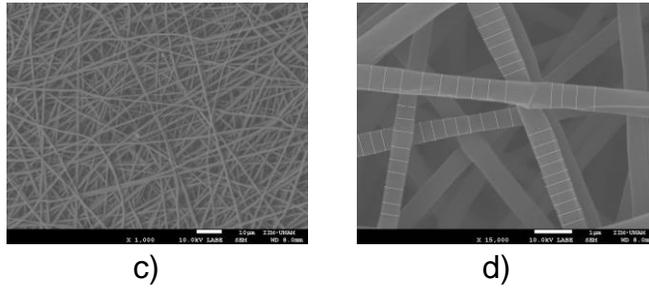


Figura 3.16. Micrografías de los andamios obtenidos al 13% PLA/TFE con una ΔV de 11 kV. Imágenes a) 15,000 x, b) 10,000 x, c) 1,000 x y d) 15,000 x.

En las micrografías de la figura 3.16, a 11 kV las fibras presentan una superficie homogénea, con respecto a las obtenidas en la figura 3.15, los diámetros de fibra se encuentran entre los 550 – 650 nanómetros, prácticamente la mitad de diámetro de fibra respecto a los andamios al 13% m/v de PLA/TFE electrohilados a 10 kV.

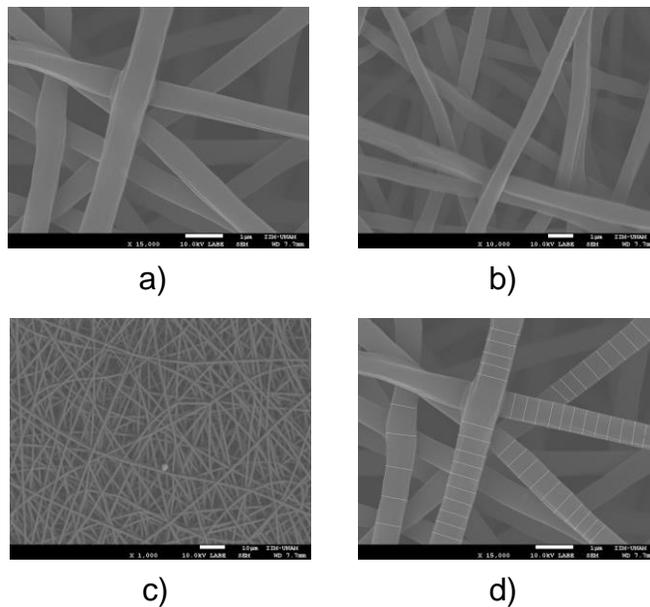


Figura 3.17. Micrografías de los andamios obtenidos al 13% PLA/TFE con una ΔV de 12 kV. Imágenes a) 50,000 x, b) 10,000 x, c) 2,500 x y d) 15,000 x.

En las micrografías de la figura 3.17, a 12 kV, se observa una homogeneidad en la superficie y en la densidad de las fibras. El diámetro de fibra, se calculó entre los 700 - 800 nanómetros. Estos andamios presentan la mejor morfología de fibra, con respecto a las otras composiciones .

3.2.1.4 Andamios al 14% PLA/TFE a 9, 10, 11 y 12 kilovolts (kV).

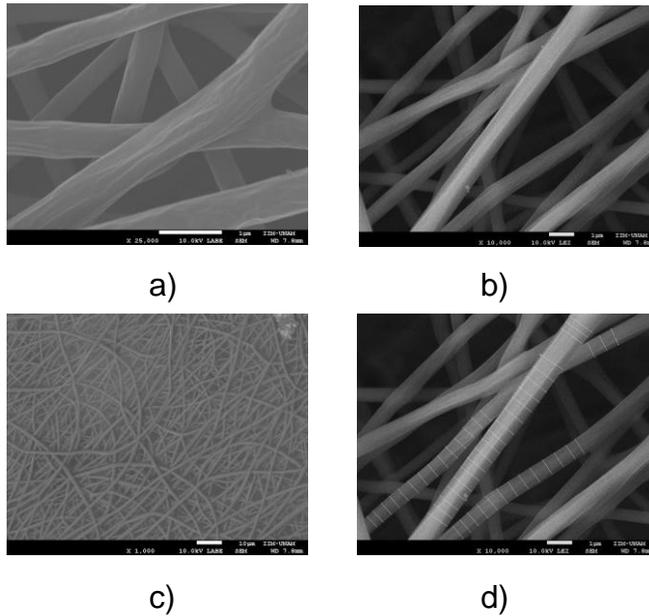


Figura 3.18. Micrografías de los andamios obtenidos al 14% PLA/TFE con una ΔV de 9 kV. Imágenes a) 25,000 x, b) 10,000 x, c) 1,000 x y d) 10,000 x.

En los andamios de la figura 3.18, al 14% m/v de PLA/TFE, aplicándoles una diferencia de potencial de 9 kV, se observa que la superficie de las fibras se rugosa y heterogénea respecto a las fibras obtenidas con la concentración al 13%. Esto se debe al desequilibrio de los parámetros utilizados para la técnica de electrohilado, es decir; que el aumento en la concentración y la disminución de la diferencia de potencial aplicada al sistema, no son suficientes para encontrar el equilibrio cinético entre la evaporación del disolvente y la formación y posterior recolección de las fibras obtenidas. El diámetro de fibra obtenido para estos andamios se encuentra alrededor de los 800 nanómetros.

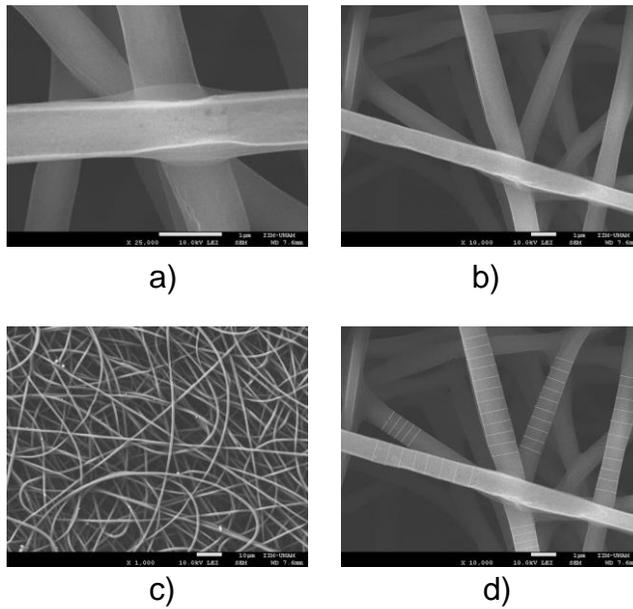


Figura 3.19. Micrografías de los andamios obtenidos al 14% PLA/TFE con una ΔV de 10 kV. Imágenes a) 25,000 x, b) 10,000 x, c) 1,000 x y d) 10,000 x.

En la figura 3.19 se muestra un andamio a 10 kV, en el que se observa que el aumento en la diferencia de potencial aplicada al sistema, no generó cambios drásticos en la morfología de las fibras; ni en las propiedades físicas del andamios, ni en la rugosidad y heterogeneidad de la superficie de las fibras, mostradas en la figura 3.18. Estas fibras tienen un diámetro alrededor de los 880 nanómetros.

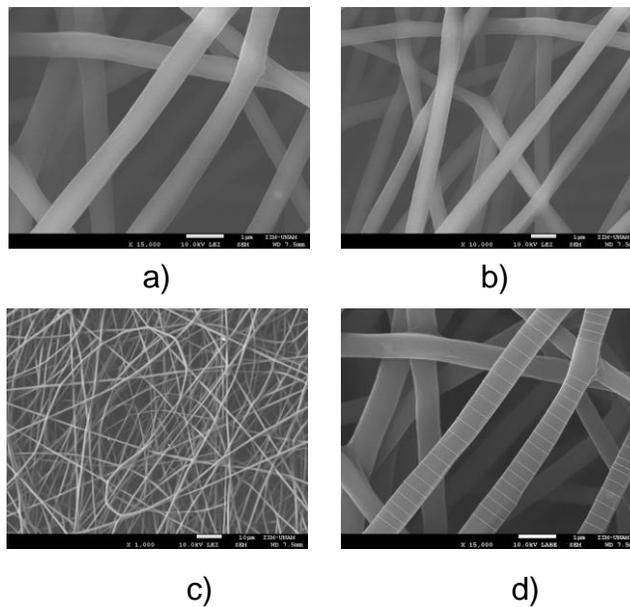


Figura 3.20. Micrografías de los andamios obtenidos al 14% PLA/TFE con una ΔV de 11 kV. Imágenes a) 15,000 x, b) 10,000 x, c) 1,000 x y d) 15,000 x.

En las fibras obtenidas a 11 kV y mostradas en la figura 3.20, se observa homogeneidad superficial. Debido al aumento en la diferencia de potencial aplicada, que somete a una mayor elongación al polímero cuando la magnitud del campo eléctrico aplicado, es alto. El diámetro de fibra obtenido fue de 689 nanómetros en promedio.

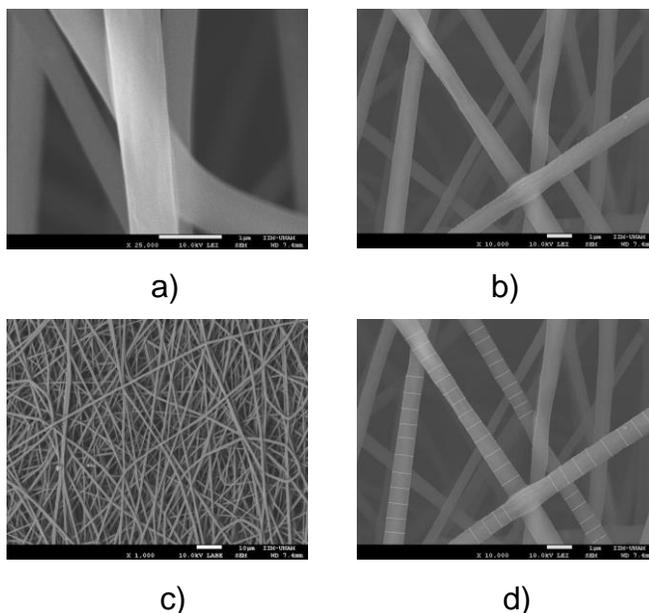


Figura 3.21. Micrografías de los andamios obtenidos al 14% PLA/TFE con una ΔV de 12 kV. Imágenes a) 25,000 x, b) 10,000 x, c) 1,000 x y d) 10,000 x.

Las fibras obtenidas a 12 kV se muestran en la figura 3.21, éstas no mostraron diferencia en sus características morfológicas, respecto a las obtenidas a esta misma concentración con menor ΔV . Para esta concentración, el diámetro de fibra es de 725 nanómetros.

En la tabla 3.3, se observa el resumen de los diámetros de las fibras obtenidos para cada concentración y diferencia de potencial aplicado.

Tabla 3.3 Diámetros de fibra obtenidos de todas las muestras electrohiladas.

| Muestra | Diámetro (nm) | Muestra | Diámetro (nm) |
|-----------------|----------------------|-----------------|----------------------|
| 10% 10kV | 128±8.8 | 13% 9kV | 652±41.0 |
| 10% 11kv | 119±9.0 | 13% 10kV | 1339±104.0 |
| 10% 12kV | 148±19.2 | 13% 11kV | 613±89.0 |
| 12% 8kV | 623±70.0 | 13% 12kV | 743±74.0 |
| 12% 9kV | 434±66.0 | 14% 9kV | 795±162.0 |
| 12% 10kV | 536±45.0 | 14% 10kV | 872±103.0 |
| 12% 11kv | 490±53.0 | 14% 11kV | 689±62.0 |
| 12% 12kV | 352±40.0 | 14% 12kV | 725±58.0 |
| 13% 8kV | 802±82.0 | | |

Con los diámetros de fibra obtenidos en función de las concentraciones y sus correspondientes diferencias de potencial aplicadas, se hace un análisis respecto a las variables utilizadas para la obtención de los andamios por la técnica de electrohilado.

El diámetro menor se obtuvo con la concentración al 10% m/v, con 119±9.0 nanómetros, mientras que el mayor diámetro se obtuvo con la concentración al 13% m/v, con 1339±104 nanómetros. Se encontró que a concentración mayor, el diámetro de fibra aumenta. Esta condición cambia cuando se aplica una diferencia de potencial de magnitud mayor, lo que ocasiona que ese diámetro de fibra varíe.

Con estos resultados, y con la hipótesis de que las micro y nanopartículas de los biovidrios a sintetizar, tendrán una influencia eléctrica fuerte, cuando se combinen durante la síntesis del biomaterial híbrido, de tal manera que cuando se electrohilen, habrá una tendencia a aumentar la magnitud del campo eléctrico aplicado en la disolución híbrida, generando una mayor elongación de la matriz polimérica en el la disolución, lo que probablemente genere nanofibras del biomaterial híbrido con una distribución de fase orgánica e inorgánica similar a las nanofibras obtenidas a diferente concentración, así como una fuerte disminución en los diámetros de fibras.

Por ello, la concentración seleccionada para sintetizar los biomateriales híbridos O/I, es al 13% m/v. Partiendo de que con esta concentración se obtuvo el diámetro de fibra mayor, aplicando una diferencia de potencial de 10 kV, razón que permitirá un equilibrio en los diámetros de las fibras en la disolución híbrida, generando andamios con diámetros de fibra en el intervalo de los nanómetros.

3.2.2 FTIR de los andamios al 13% m/v de PLA/TFE.

En las figuras 3.22 a 3.25, se muestran los espectros infrarrojo de los andamios electrohilados de PLA/TFE, de las concentraciones de 10, 12, 13 y 14 % m/v, y con una diferencia de potencial aplicada de 11 kV.

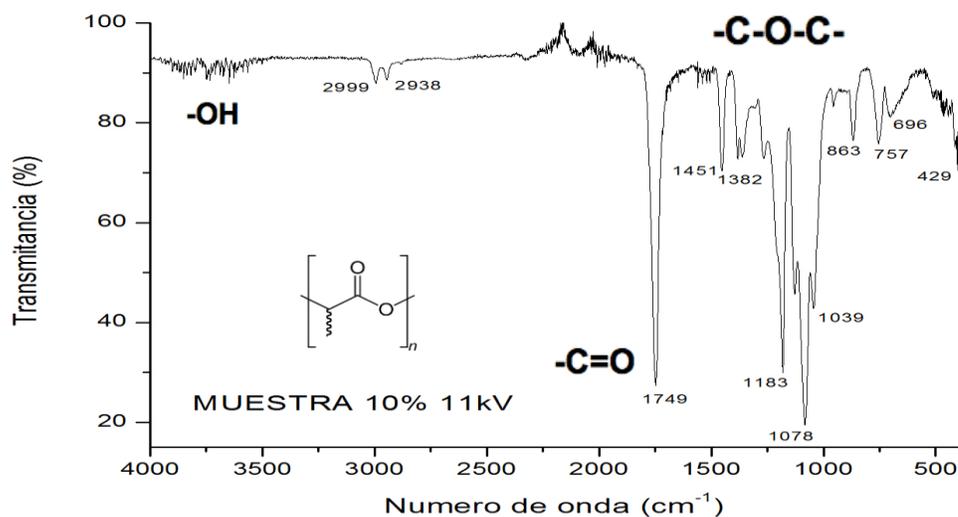


Figura 3.22. Espectro del andamio obtenido al 10% PLA/TFE aplicando 11 kV.

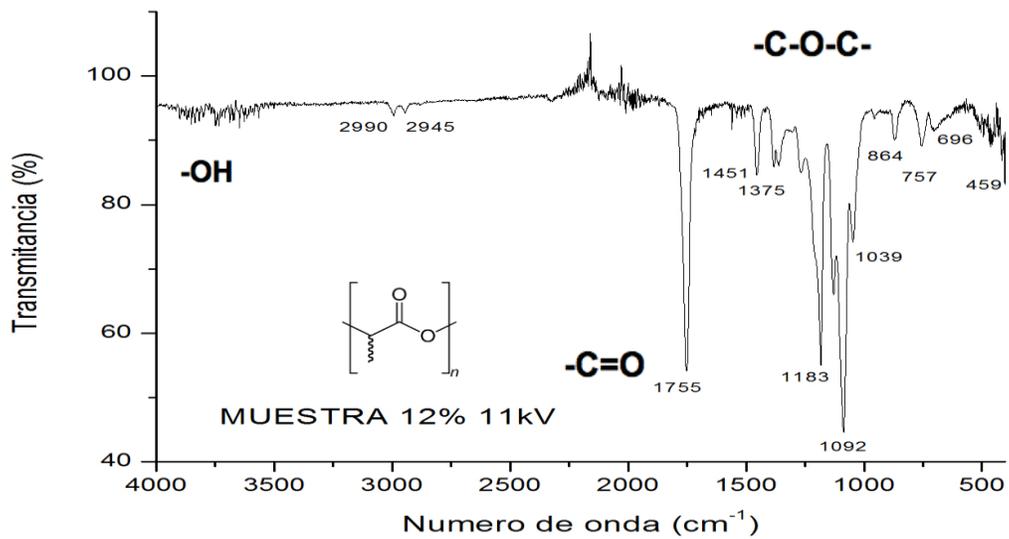


Figura 3.23. Espectro del andamio obtenido al 12% PLAT/TFE aplicando 11 kV.

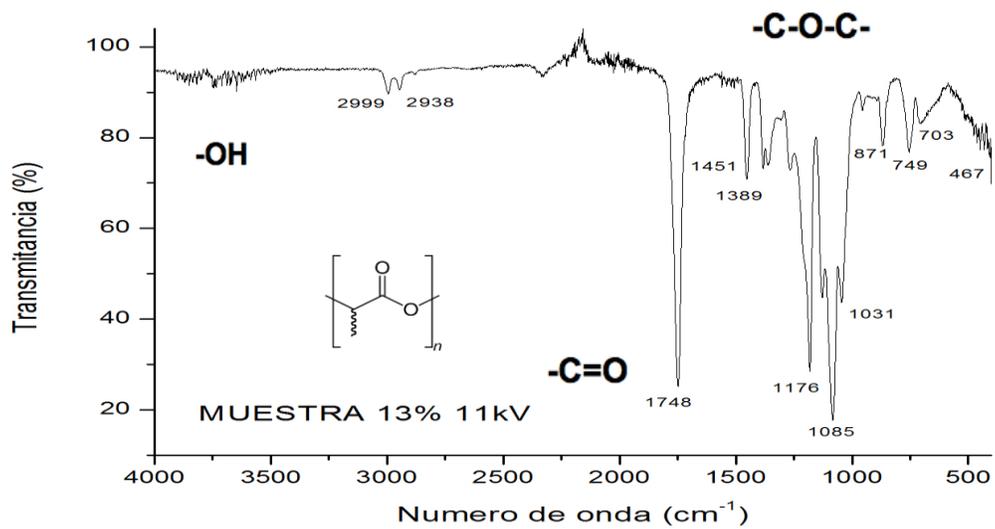


Figura 3.24. Espectro del andamio obtenido al 13% PLAT/TFE aplicando 11 kV.

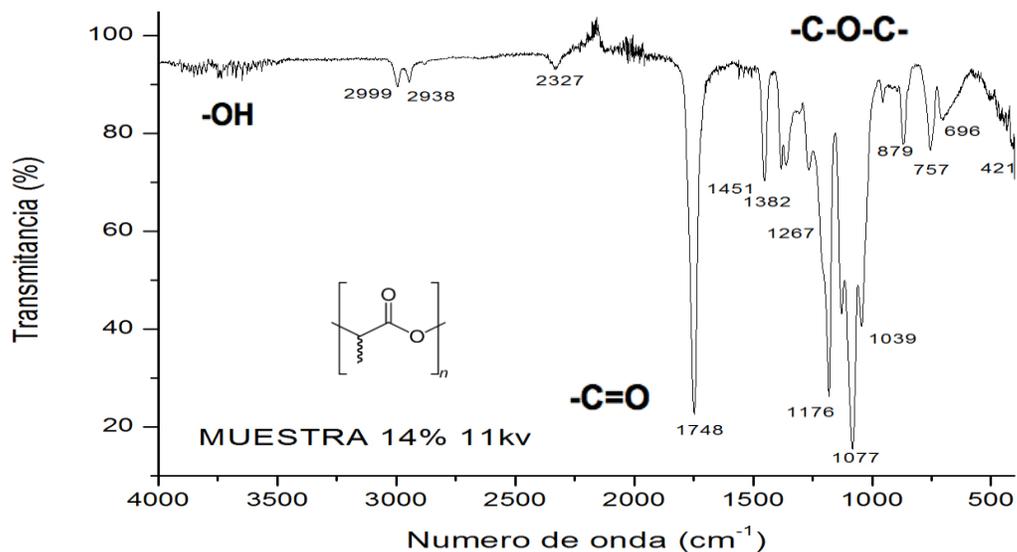


Figura 3.25. Espectro del andamio obtenido al 14% PLA/TFE aplicando 11 kV.

Con la finalidad de analizar los resultados de los FTIR de las figuras 3.22-3.25, en la tabla 3.4, se resumen las señales principales del sistema PLA/TFE.

Tabla 3.4. Principales bandas observadas en las gráficas de los espectros IR del PLA/TFE.

| Muestra | Principales señales en cm^{-1} | | | | |
|--------------|---|------|------|-----------|------|
| | -CH ₃ | -CH | -C=O | -C-O-C- | -OH |
| PLA 10% 11kV | 2991 | 2938 | 1749 | 1375-1069 | 3750 |
| PLA 12% 11kV | 2991 | 2938 | 1755 | 1382-1085 | 3750 |
| PLA 13% 11kV | 2999 | 2938 | 1748 | 1389-1085 | 3750 |
| PLA 14% 11kV | 2999 | 2938 | 1748 | 1382-1077 | 3750 |

En la tabla 3.4, se muestra una señal a una longitud de onda de 2991 cm^{-1} correspondientes a los estiramientos de los enlaces C-H de los grupos metilo y ($2938\text{-}2945 \text{ cm}^{-1}$) de los grupos metino. Las bandas en ($1748\text{-}17569 \text{ cm}^{-1}$) se relacionan al carbonilo del grupo ester. La banda en la región que va desde los 1300 cm^{-1} hasta los 1050 cm^{-1} se debe a la secuencia de estiramiento del ester (-C-O-C-). Y una señal fuerte en los 3750 cm^{-1} se

asigna a los grupos OH terminales, que se usan como indicador del bajo peso molecular del polímero [46].

Las bandas encontradas para cada una de las concentraciones, indican que el polímero no cambia químicamente al aumentar la concentración, ni cuando se aumenta la diferencia de potencial aplicada, así como, por el tiempo de preparación de cada una de las concentraciones. Con esta técnica de caracterización y con los estudios de resonancia magnética nuclear, se comprueba la composición molecular del polímero y la ausencia de degradación del mismo. El tipo de isómero que se tiene, se determinará mediante difracción de rayos X.

Cabe destacar que no se observan las señales correspondientes al disolvente TFE, puesto que estas muestras son de los andamios obtenidos, donde prácticamente el disolvente se evaporó en el proceso de electrohilado.

3.2.3 DRX de los andamios de PLA/TFE electrohilados.

Los difractogramas de cada uno de los andamios de PLA/TFE electrohilados, se obtuvieron del análisis de DRX, que permite identificar si el polímero presentaba fases cristalinas o amorfas, debidas a las mezclas racémicas de los estereoisómeros (PDLA, PLLA o PDLLA), que se presentan químicamente y que están en función del tipo de síntesis, por el cual se obtuvo el polímero utilizado. Cada difractograma se tomó de las muestras a diferentes concentraciones de polímero/solvente y a una diferencia de potencial aplicada de 10 kV.

3.2.3.1 Difractogramas de los andamios de PLA/TFE al 10, 12, 13 y 14% m/v.

Los difractogramas correspondientes a las muestras con una concentración de 10, 12, 13 y 14 % m/v de PLS/TFE obtenidos a 10 kV.

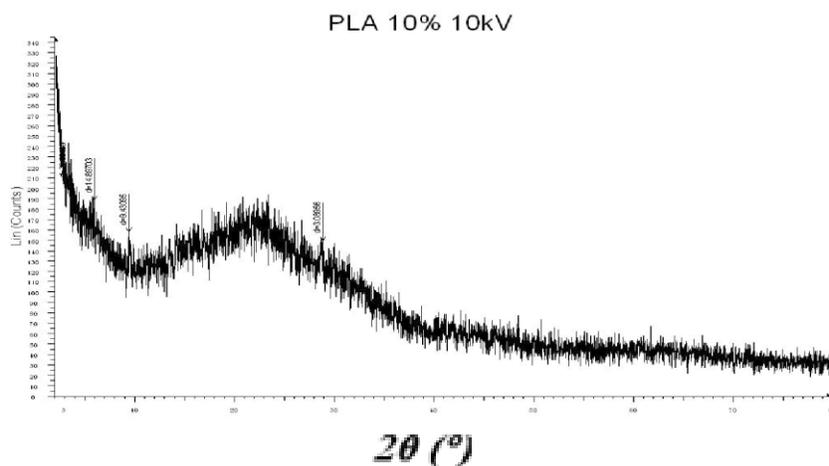


Figura 3.26. Difractograma del andamio electrohilado de PLA/TFE al 10% m/v a 10 kV.

En el difractograma de la figura 3.26, se observa que la muestra polimérica de PLA al 10 % m/v, es amorfa, con tres señales que relacionadas a alguna fase cristalina no identificada.

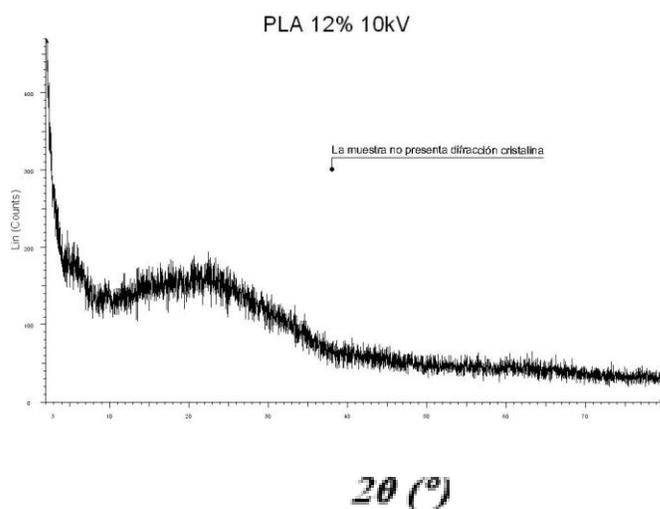


Figura 3.27. Difractograma del andamio electrohilado de PLA/TFE al 12% m/v a 10 kV.

El difractograma de la figura 3.27, de la muestra de PLA al 12% m/v, presenta ausencia de difracción cristalina.

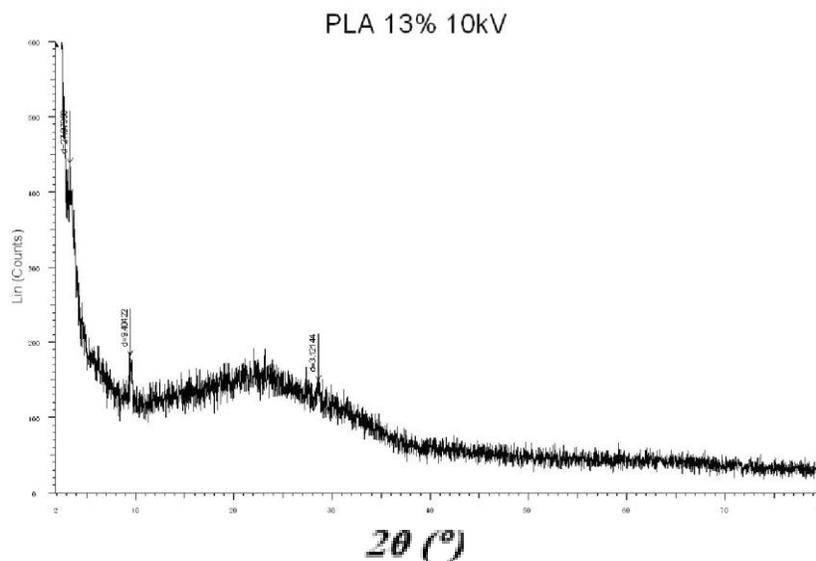


Figura 3.28. Difractograma del andamio electrohilado de PLA/TFE al 13% m/v a 10 kV.

En el difractograma de la figura 3.28 de PLA al 13% m/v, se identificaron señales similares a los de la figura 3.26. La muestra presenta una fase amorfa.

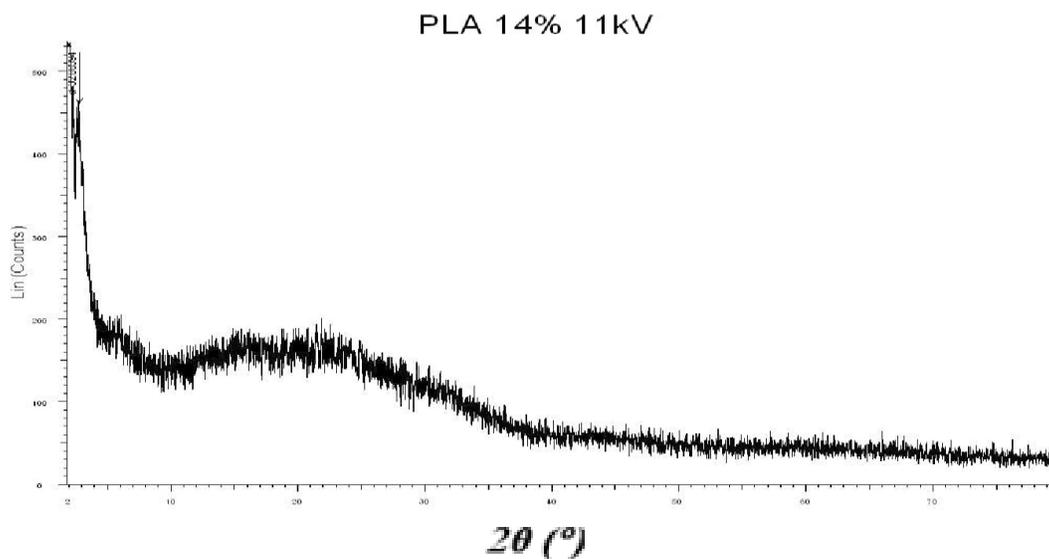


Figura 3.29. Difractograma del andamio electrohilado de PLA/TFE al 14% m/v a 11 kv.

En la figura 3.29 se observa el difractograma de la muestra de PLA al 14% m/v, se identifican las mismas señales presentes en los difractogramas de las figuras 3.26-3.28.

Del estudio de DRX, se corrobora que el polímero no presenta señales asociadas a alguna fase cristalina presente en las fibras de PLA electrohiladas. Esto lleva a proponer que el isómero del PLA con el que se trabajó, es el PDLLA debido a que se sabe que su estructura es amorfa. El PLA es un polímero que presenta mezclas racémicas de los estereoisómeros PLLA que es un material semi-cristalino y PDLA que es un material cristalino con una estructura de cadenas regulares [69], lo cual explicaría la presencia de fases cristalográficas no identificadas.

En resumen, el aumento en la concentración del PLA, de la misma manera no implica cambios en la composición estructural del polímero. Si se trabaja con un polímero con alto peso molecular, sus propiedades mecánicas y físicas del polímero se verán modificadas, ya que si el polímero es de peso molecular alto, sus propiedades mecánicas aumentarían, y si su peso molecular es bajo, estas propiedades mecánicas se verán disminuidas.

3.2.4 Análisis Termogravimétrico (TGA) y Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC)

3.2.4.1 TGA y DSC de los andamios de PLA/TFE electrohilados.

Los análisis termogravimétricos para cada uno de los andamios de PLA/TFE se señalan en la tabla 3.3, los cuales muestran su estabilidad térmica. Con las calorimetrías diferenciales de barrido se determinó las temperaturas de transición vítrea (T_g), de fusión (T_m) y de cristalización (T_c), si es que la muestra presentaba fases cristalinas.

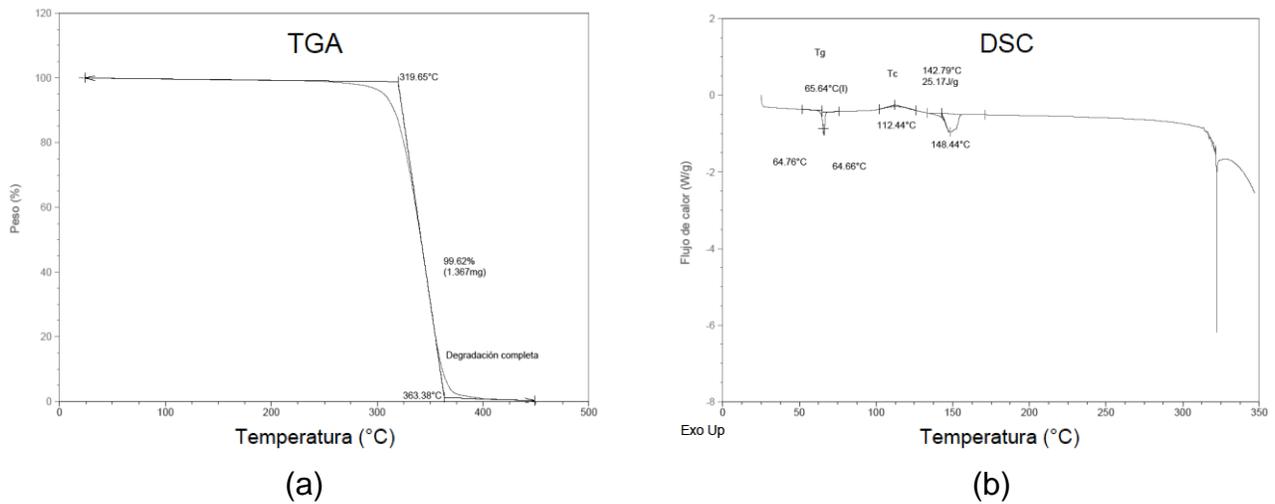


Figura 3.30. TGA (a) y DSC (b) del andamio electrohilado de PLA/TFE al 10% m/v.

En el TGA (a) de la figura 3.30, se observa que el intervalo de temperaturas para la descomposición completa del PLA, va desde 319.72 a 363.37 °C, con un porcentaje de descomposición del 99.67%, que equivale a una masa de PLA de 1.367 gramos. Esta temperatura de descomposición corrobora la estabilidad térmica del PLA.

En el DSC (b) de la figura 3.30, se obtienen las temperaturas de transición vítrea a 64°C y de fusión a 148.74 °C, valores similares a los publicados en la literatura [42]. La temperatura de cristalización se observó a 112.44 °C, valor que corresponde con lo publicado en la literatura [46]. Este resultado es un indicador de la presencia de los estereoisómeros cristalinos o semi-cristalinos del polímero en el andamio.

En las figuras 3.31, 3.32 y 3.33, se observan los termogramas y las calorimetrías, obtenidas de los andamios de PLA/TFE electrohilados a concentraciones de 12, 13 y 14 % m/v.

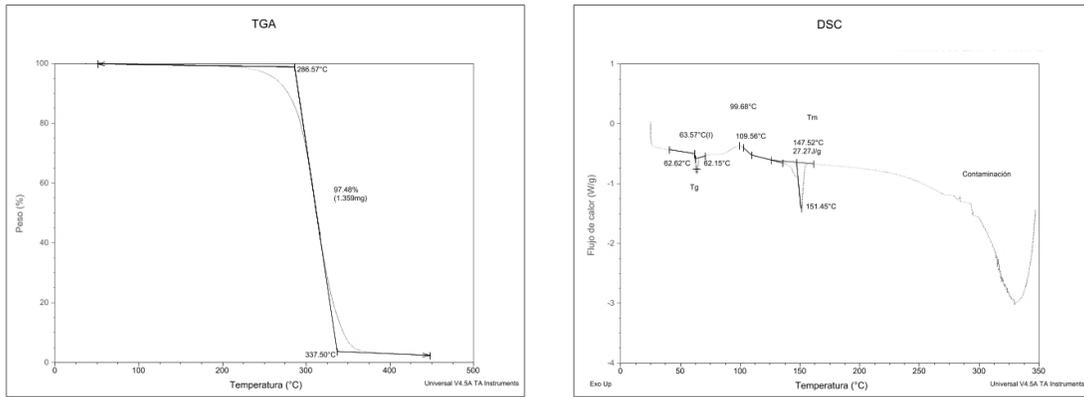


Figura 3.31. TGA y DSC de los andamios electrohilados de PLA/TFE al 12% m/v.

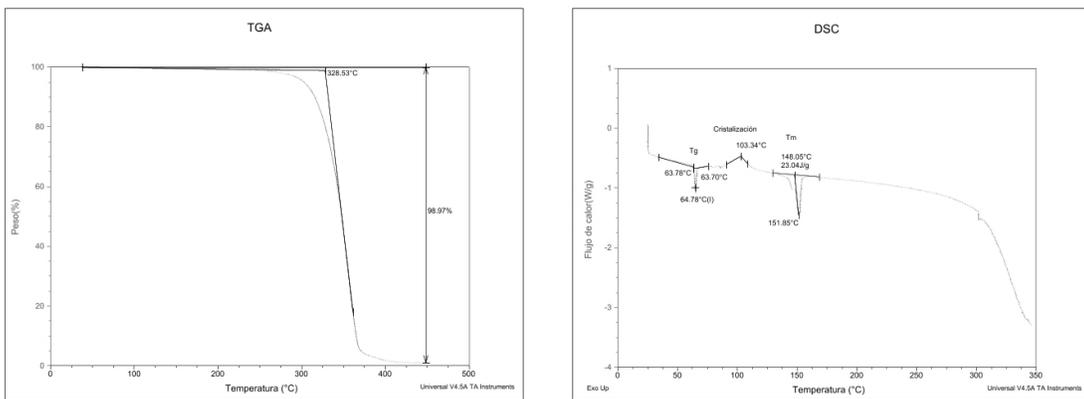


Figura 3.32. TGA y DSC de los andamios electrohilados de PLA/TFE al 13% m/v.

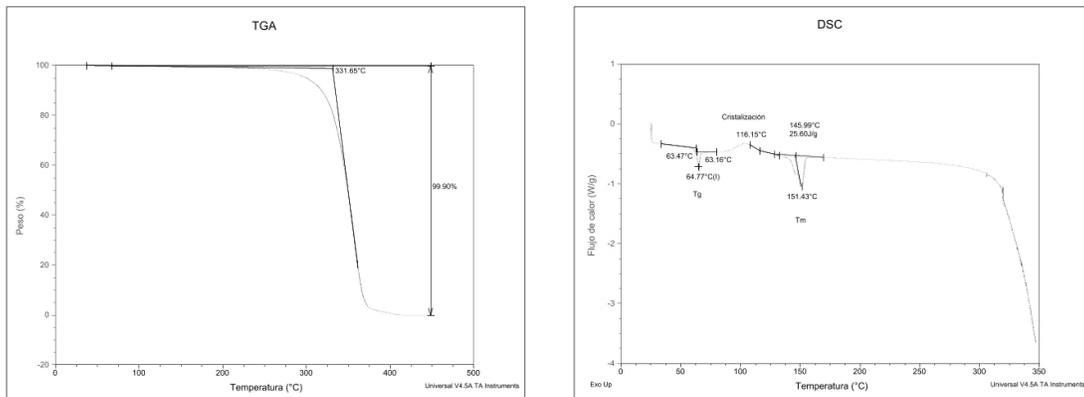


Figura 3.33. TGA y DSC de los andamios electrohilados de PLA/TFE al 14% m/v.

En la tabla 3.5, los valores extraídos de los termogramas, y de las calorimetrías para cada concentración de PLA, se resumen.

Tabla 3.5. Valores de la Tg, Tm y Tc extraídos de los termogramas y calorimetrías obtenidos de las muestras del PLA.

| MUESTRA % (m/v) | TGA | DSC | | |
|--------------------|---------------------------------------|------------|------------|------------|
| | Temperatura de descomposición (°C) | Tg (°C) | Tm (°C) | Tc (°C) |
| 10 | 319.72 - 363.37 | 64.00 | 148.74 | 112.44 |
| 12 | 286.50 - 337.50 | 63.57 | 151.45 | 109.56 |
| 13 | 328.53 – 368.50 | 64.58 | 151.85 | 103.34 |
| 14 | 331.48 – 370.78 | 64.77 | 151.43 | 116.15 |

De acuerdo a la tabla 3.5, los valores de temperatura de descomposición del PLA, mantienen intervalos de descomposición de temperaturas hasta los 370°C, comprobando que el polímero es estable térmicamente, sin que el aumento en la concentración sea un parámetro que modifique su estabilidad térmica. Y se observa que las transiciones vítreas son iguales en todas las concentraciones, y las temperaturas de cristalización se mantienen en valores muy cercanos entre sí. Lo anterior, pone de manifiesto la hipótesis de que aunque la concentración del PLA aumente en los andamios, sus propiedades térmicas no se verán afectadas por tal variable.

Un pequeño cambio en la muestra al 12% de PLA/TFE, en la cual la temperatura de descomposición disminuyó respecto a la de las otras composiciones, lo que se atribuye a la ausencia de fases cristalinas y a la estructura amorfa, evidenciada en el difractograma de la figura 3.27.

3.3 Biovidrios en el sistema SiO₂-CaO-P₂O₅

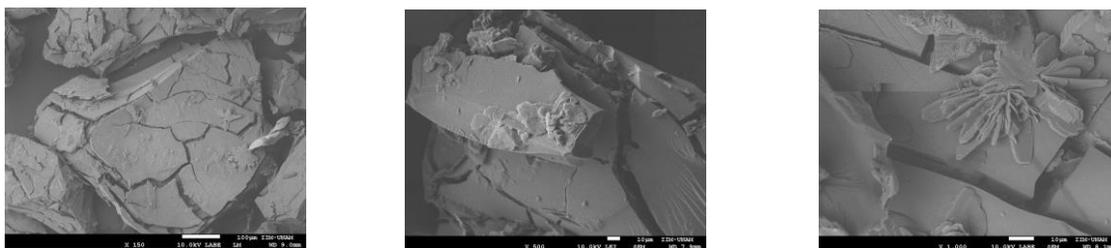
Se sintetizaron ocho composiciones de biovidrio, propuestas en la tabla 2.3 del capítulo 2, con la finalidad de observar los cambios estructurales de acuerdo a las composiciones propuestas, y con ello, seleccionar la

composición, con el porcentaje mayor de amorficidad, debido a que dicho perfil, aumenta la bioactividad superficial de los biomateriales en cultivos celulares. Por ello, para la síntesis de los materiales híbridos O/I, se seleccionó la composición V70P5, debido a su ausencia de fases cristalinas. Los análisis de la muestra V70P5 se describen a continuación. Las caracterizaciones para las demás composiciones de la tabla 2.3, se encuentran en el apéndice de este trabajo.

En la descripción de la composición V70P5, se muestran las micrografías electrónicas con su correspondiente análisis químico, obtenido por la técnica de MEB, el correspondiente FTIR, el DRX, el TGA y el DSC con su correspondiente análisis.

3.3.1 MEB del sistema $\text{SiO}_2\text{-CaO-P}_2\text{O}_5$.

3.3.1.1 Micrografías de la composición V70P5.



a)

b)

c)

Figura 3.34. Micrografías de la muestra V70P5 de acuerdo con los aumentos: a) 150 x, b) 500 x y c) 1000 x del microscopio.

En la figura 3.34, están las micrografías referentes a la composición $70\%\text{SiO}_2\text{-}25\%\text{CaO}\text{-}5\%\text{P}_2\text{O}_5$, obtenida por el método sol-gel convencional.

Las micrografías muestran aglomerados homogéneos procedentes de la evaporación del agua a $120\text{ }^\circ\text{C}$. Es notoria la presencia de grietas, que son producto de la contracción del sólido al perder agua. En la figura 3.34 (c), se

observa que el biomaterial es estructuralmente amorfas con presencia mínima de cristales. En el análisis químico realizado al vidrio se detalla la composición química.

3.3.1.2 Análisis dimensional de la muestra V70P5.

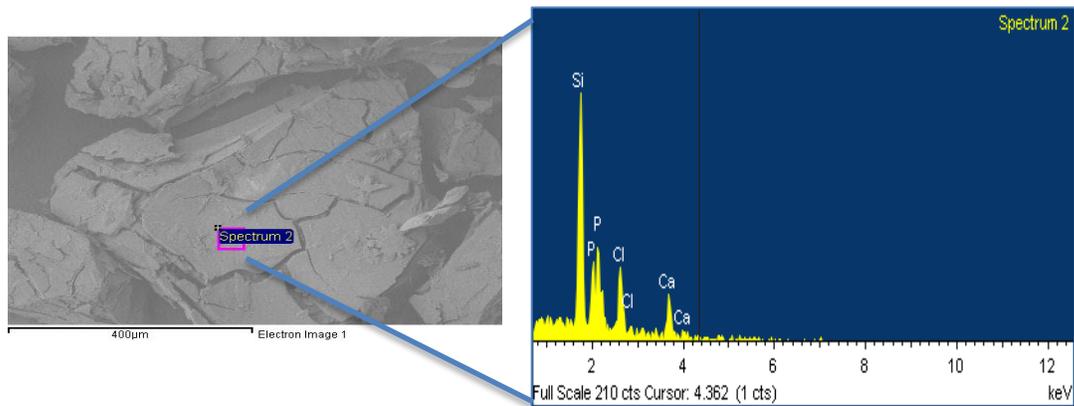


Figura 3.35 Análisis elemental de la muestra V70P5.

| Elemento | Peso % | Atómico % |
|----------|--------|-----------|
| C K | 29.01 | 20.15 |
| O K | 111.86 | 58.32 |
| Si K | 37.49 | 11.13 |
| P K | 6.73 | 1.81 |
| Cl K | 19.30 | 4.54 |
| Ca K | 19.44 | 4.05 |
| Total | 223.82 | |

Tabla 3.6. Porcentajes atómico y en peso de la muestra V70P5.

En la figura 3.35, el análisis químico se realizó a la partícula de biovidrio. En la tabla 3.6 se muestran los elementos presentes en ese punto de muestreo, siendo el de mayor cantidad en % peso el átomo de Si, debido a que este átomo se encuentra en proporción mayor en la composición del vidrio seleccionada.

En general se observa que las composiciones porcentuales en peso de cada átomo se encuentran cercanas a lo propuesto en la composición seleccionada de vidrio.

Con la caracterización por MEB, no se concluye que se obtuvo la composición deseada, si se asegura que se encuentran las composiciones propuestas. Se observa una cantidad de Cl, que es atribuido al uso de HCl como catalizador en la reacción y a la adición de este ácido para mantener la síntesis en valores de pH en el intervalo de 2-3, y al uso de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ como precursor en la síntesis por sol-gel. La presencia de este elemento en los biovidrios o en los materiales híbridos, no representa una consecuencia negativa para la biocompatibilidad de los biomateriales, debido a que se encuentra en cantidades traza y/o en forma de cloruros.

3.3.1.3 Espectro IR de la composición V70P5.

Confirmada la relación atómica del vidrio a sintetizar, se caracterizó por FTIR, obteniéndose el resultado siguiente.

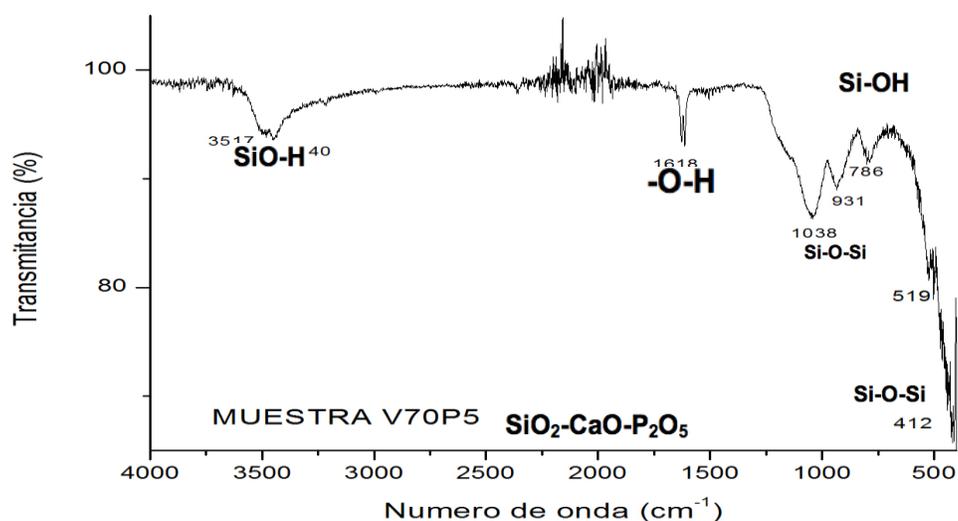


Figura 3.36. Espectro infrarrojo de la muestra V70P5.

En la figura 3.36 se observan señales asociadas a la estructura composicional de la muestra V70P5. Las principales señales se detallan en la tabla 3.7.

Tabla 3.7. Señales observadas en los espectros infrarrojo para el vidrio V70P5.

| Número de onda (cm ⁻¹) | Señales asignadas |
|------------------------------------|--|
| 931-1038 | Si-O-Si estiramiento asimétrico |
| 786 | Si-OH estiramiento |
| 1618 | -O-H flexión |
| 3440-3517 | SiO-H estiramiento |
| 412 | Si-O-Si doblamiento |

Las señales de IR, corroboran la presencia de los estiramientos asimétricos de los enlaces Si-O-Si, así como los estiramientos y flexiones de los grupos silanoles (Si-OH) presentes en el biovidrio. La señal en el valor de 3440 cm⁻¹, es asignada a las vibraciones de los estiramientos de los grupos hidroxilo, auto-asociados con los grupos silanoles y el ancho refleja la distribución amplia de frecuencias del hidrógeno unido a los grupos –OH.

3.3.1.4. Difracción de rayos X de la muestra V70P5.

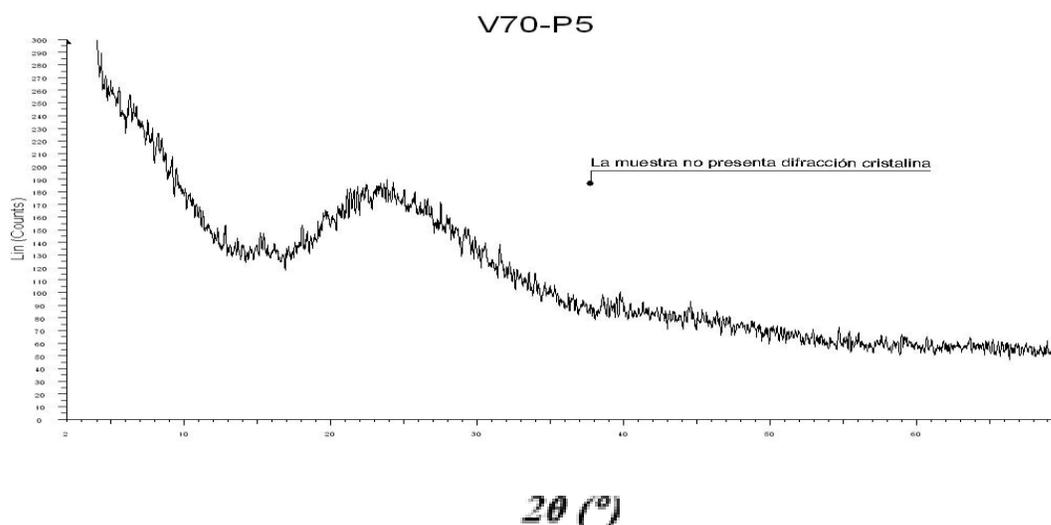


Figura 3.37. DRX de la composición de vidrio V70P5.

En la figura 3.37 se observa la ausencia de difracción cristalina de la muestra V70P5, lo que indica que es amorfa, característica indispensable para su aplicación en la síntesis de biomateriales híbridos, debido a que entre mayor

perfil de amorficidad presenten los materiales, mayor será la afinidad de las células a la superficie del material.

3.3.1.5. TGA y DSC del vidrio de la composición V70P5

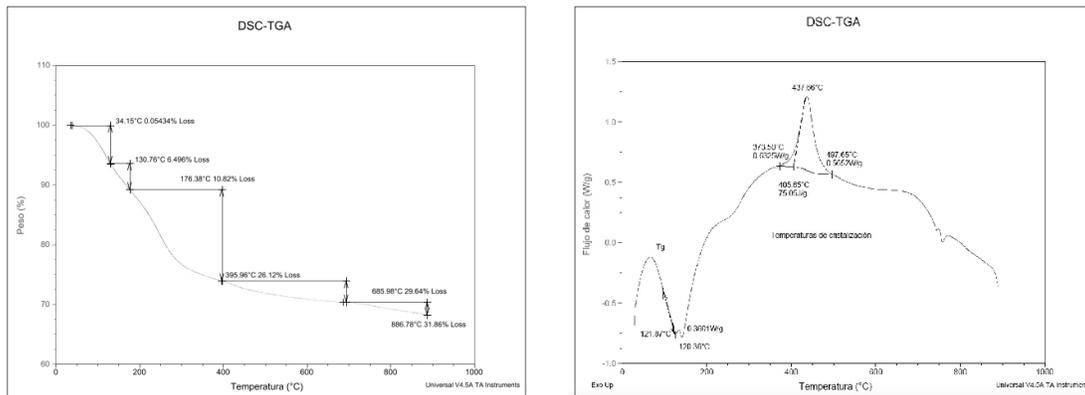


Figura 3.38. TGA y DSC de la composición de vidrio V70P5.

En la figura 3.38, se observa el TGA y el DSC de la muestra V70P5. En el primero, se observa una primera pérdida gradual de masa de 10.86% debido a la evaporación de agua superficial, solventes y componentes sin reaccionar como el TEOS o el TEP presentes en dicho material a una temperatura de 176.38 °C, y una segunda pérdida significativa de 26.12% de masa debida a la presencia de agua inter e intra molecular en la muestra a una temperatura de 395.96 °C. Después de los 400 °C, la muestra prácticamente no perdió masa, lo que indica que es estable térmicamente.

En el DSC no se observa una línea base para comenzar un análisis de la temperatura de transición vítrea (Tg) o la temperatura de cristalización (Tc) observada en el diagrama, sin embargo, se observa una probable temperatura de transición vítrea en 121.87 °C y una temperatura de cristalización en 437.66 °C, lo que corrobora la hipótesis observada en las temperaturas de estabilización.

3.4 Biomateriales híbridos O/I de PLA/SiO₂-CaO-P₂O₅.

Para la síntesis de los andamios híbridos (O/I) de PLA/SiO₂-CaO-P₂O₅, para la fase orgánica se utilizó la disolución de PLA al 13% m/v, por ser esta la concentración a la cual se obtuvo el diámetro de fibra más grande (1399 ±104.0 nanómetros). Para el biovidrio correspondiente a la fase inorgánica, se realizaron los cálculos para obtener una composición de 70%SiO₂-25%CaO-5%P₂O₅ (V70P5), en el biomaterial híbrido, por ser la composición más amorfa con respecto a las mostradas en el apéndice, y de acuerdo a la caracterización de rayos X.

3.4.1 Selección de la metodología a emplear, para la síntesis de los andamios híbridos O/I.

El objetivo de probar tres rutas de síntesis diferentes para la obtención del biomaterial híbrido, es la determinación del mejor proceso de síntesis para los andamios híbridos (O/I), por las técnicas de sol-gel y electrohilado.

Debido a la naturaleza de la síntesis sol-gel y de los reactivos que se utilizan para obtener un vidrio convencional, fue necesario proponer tres rutas de síntesis, dado que una de las propiedades químicas del PLA es la hidrofobicidad, que representaba la limitante en el proceso, ya que los precursores del sistema a utilizar, incluyen como reactivo al agua que genera la insolubilidad del polímero en el sistema híbrido.

Las metodologías propuestas son diferentes entre sí, con respecto al orden en el que la disolución polimérica fue agregada en el sistema donde se llevó a cabo la síntesis del biomaterial híbrido, así como el calentamiento al cual fue sometido el PLA, para probar si al llegar a su temperatura de transición vítrea (tg), se podía evitar su precipitación al entrar en contacto con la mezcla de TEOS/H₂O/HCL. Las rutas de síntesis fueron propuestas en el apartado

2.2.3.2. La mitad de los productos obtenidos, se sometieron a procesos de estabilización a 70 y 120 °C con espacios de 3 días entre cada temperatura, y la otra mitad se mantuvieron a temperatura ambiente, con la finalidad de observar los cambios estructurales que son provocados por el agua presente en los biomateriales, por la obtención y determinación de fases cristalinas en caso de que el biovidrio sintetizado las presente.

En las figuras 3.39, 3.41 y 3.43, se observan los difractogramas de las composiciones sintetizadas, sin proceso térmico de estabilización (1H, 2H y 3H) y las figuras 3.40 y 3.42 las composiciones sometidas a estabilización por temperatura (1HC y 2HC). Cabe destacar que la última ruta de síntesis (3H), no se sometió a calentamiento debido a que se logró mantener el polímero soluble en el sistema. Las caracterizaciones de los productos obtenidos se molieron en un mortero de agata, durante 20 minutos y los polvos obtenidos se guardaron en frascos sellados para evitar su hidratación con la humedad circundante.

3.4.1.1. Caracterización de las muestras 1H, 1HC, 2H, 2HC y 3H por Difracción de Rayos X.

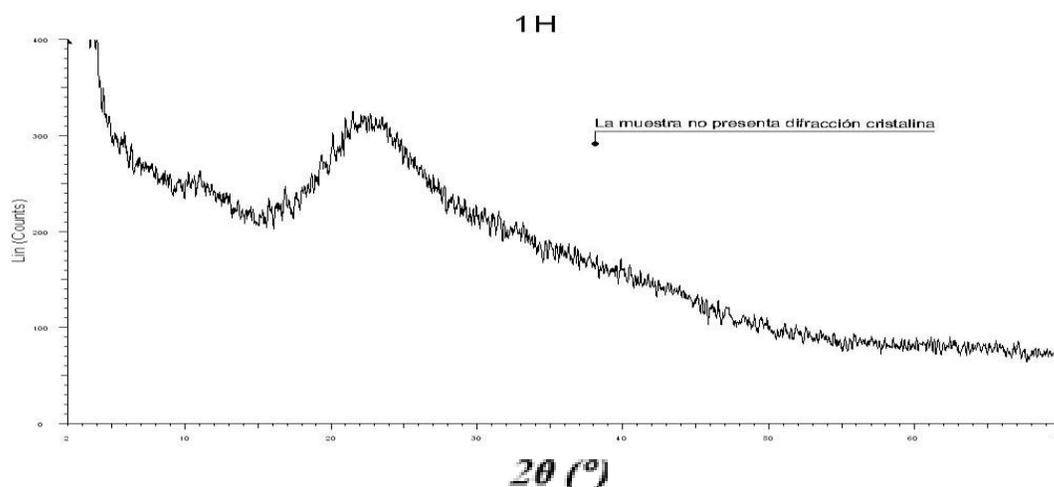


Figura 3.39. DRX de la prueba 1H de síntesis del material híbrido O/I.

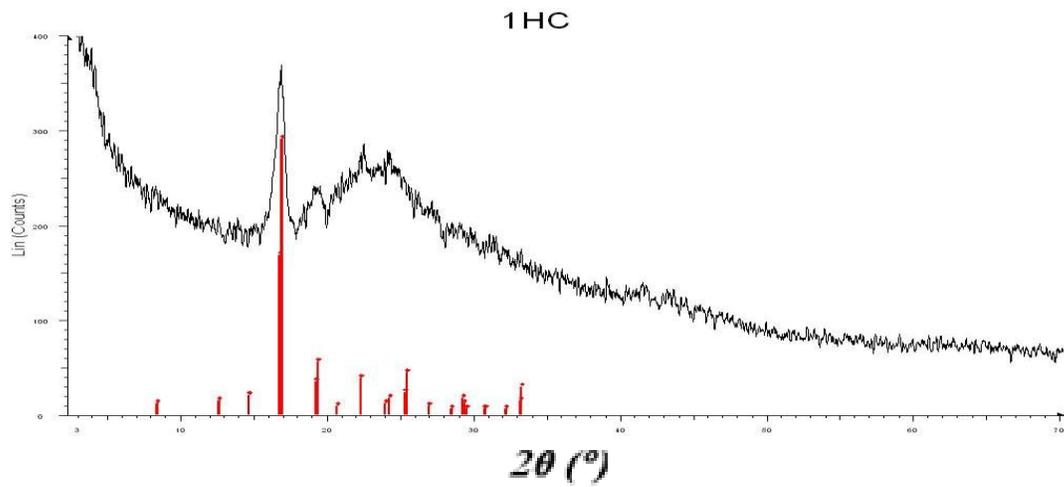


Figura 3.40. DRX de la prueba 1HC de síntesis del material híbrido O/I .

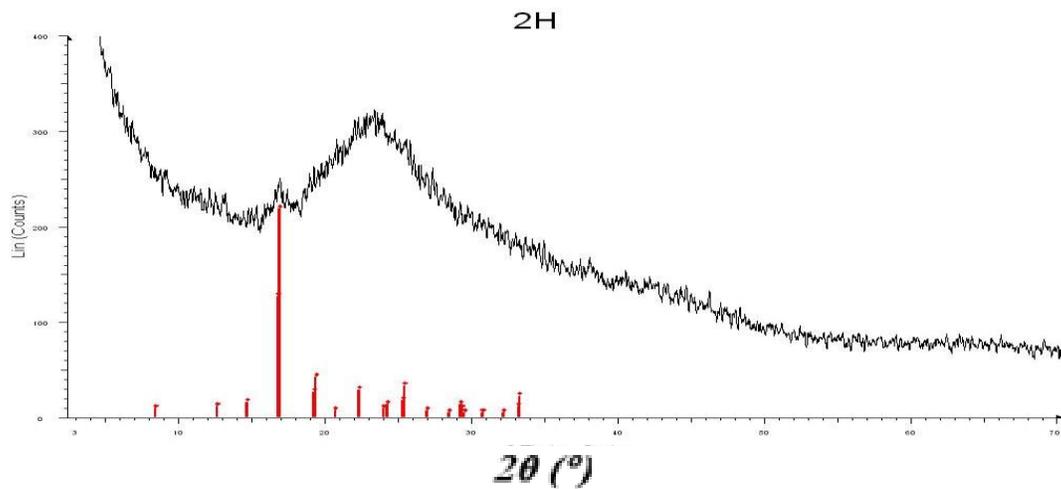


Figura 3.41. DRX de la prueba 2H de síntesis del material híbrido O/I.

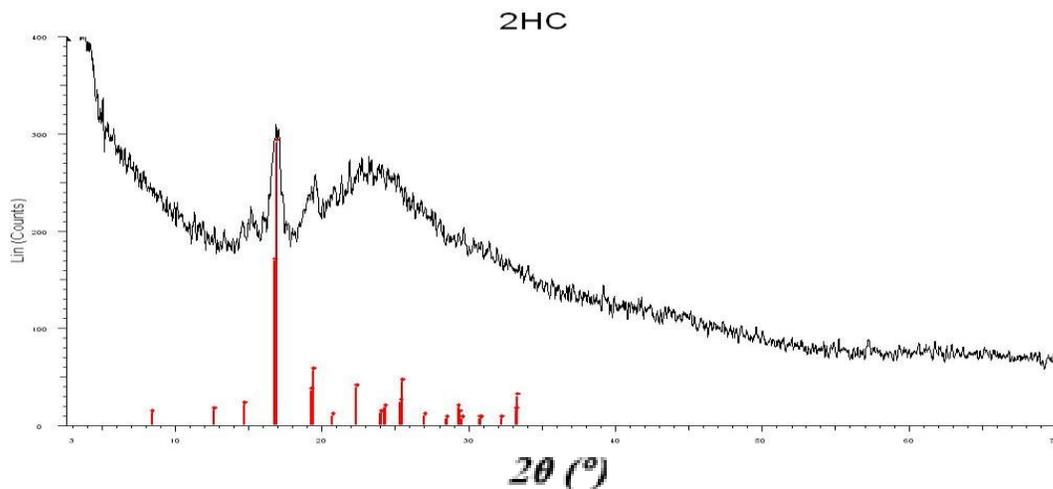


Figura 3.42. DRX de la prueba 2HC de síntesis del material híbrido O/I.

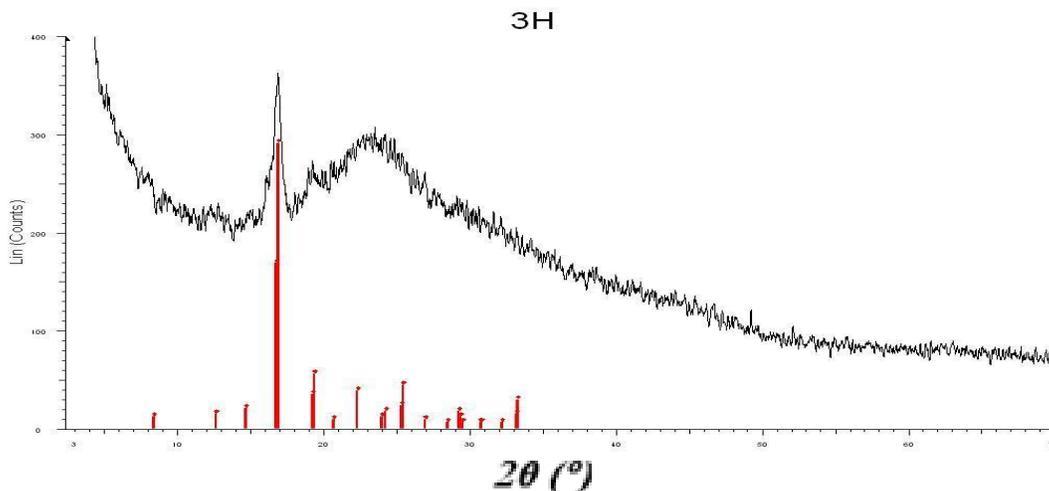


Figura 3.43. DRX de la prueba 3H de síntesis del material híbrido O/I.

En las figuras 3.39 y 3.41, los difractogramas de las muestras 1H y 2H, evidencian que por esas rutas de síntesis propuestas, no se obtiene el biomaterial híbrido, debido a que en el difractograma 3.39 de la muestra 1H, es amorfa sin presencia de fases cristalinas. Lo que confirma la observación visual de la muestra, en la que el polímero se precipita, dando lugar a dos tipos de materiales diferentes y no el biomaterial híbrido esperado. En el difractograma de la figura 3.41, 2H se observa un resultado diferente respecto al obtenido en el difractograma de la muestra 1H, debido a que en esta muestra si se identificó una fase cristalina relacionada con la alfa-poli(D-

láctona), proveniente del PLA. El resultado para esta ruta de síntesis mostró que el polímero siguió precipitándose. Los difractogramas de 1HC y 2HC, muestran la fase cristalina asociada a la alfa-poli(D-láctona), y una estructura amorfa asociada con el vidrio. En éstas, la única diferencia con respecto a 1H y 2H, es la estabilización térmica a la cual se sometieron ambos productos. En los difractogramas de 1HC Y 2HC se observa una combinación de fases cristalinas y amorfas. Debido a que, el volumen total del material obtenido, se molió en un mortero de ágata, para su caracterización por DRX. Esto no significa que la matriz polimérica se haya acoplado con la matriz del vidrio, sino una combinación física debida a la molienda previa.

En el difractograma de la tercer ruta de síntesis, la muestra 3H presentó fases cristalinas, sin que se sometiera al mismo proceso de estabilización térmica a las que fueron sometidas las muestras 1H y 2H. Durante la síntesis, se observó que el polímero no se precipito cuando entró en contacto con la mezcla del TEOS/H₂O/HCL, motivo por el cual se tomó como ruta de síntesis del híbrido.

3.4.1.2 Caracterización por FTIR de las muestras 1H, 1HC, 2H, 2HC y 3H.

En las figuras 3.44, 3.45, 3.46, 3.47 y 3.48, se muestran cada uno de los espectros infrarrojo de las tres rutas de síntesis probadas para la obtención de los andamios híbridos.

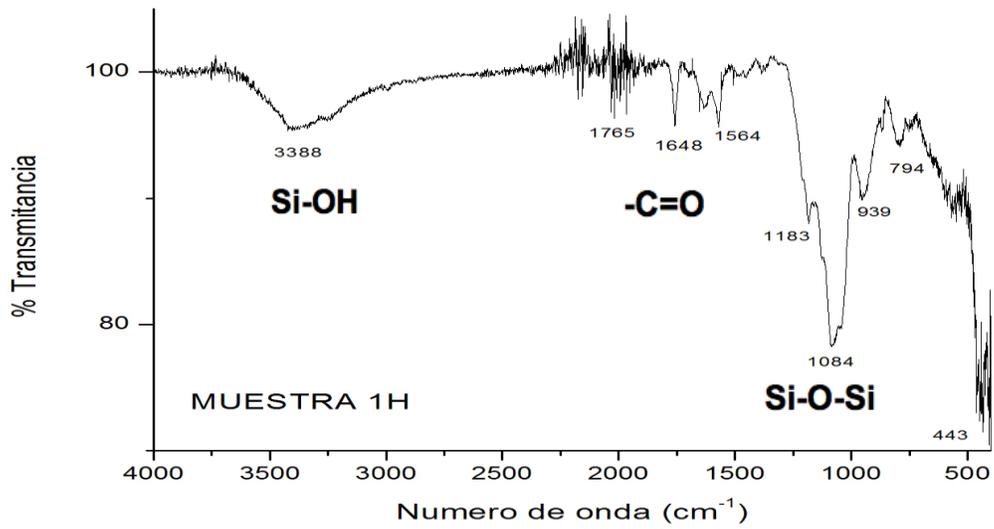


Figura 3.44. Espectro infrarrojo de la muestra 1H

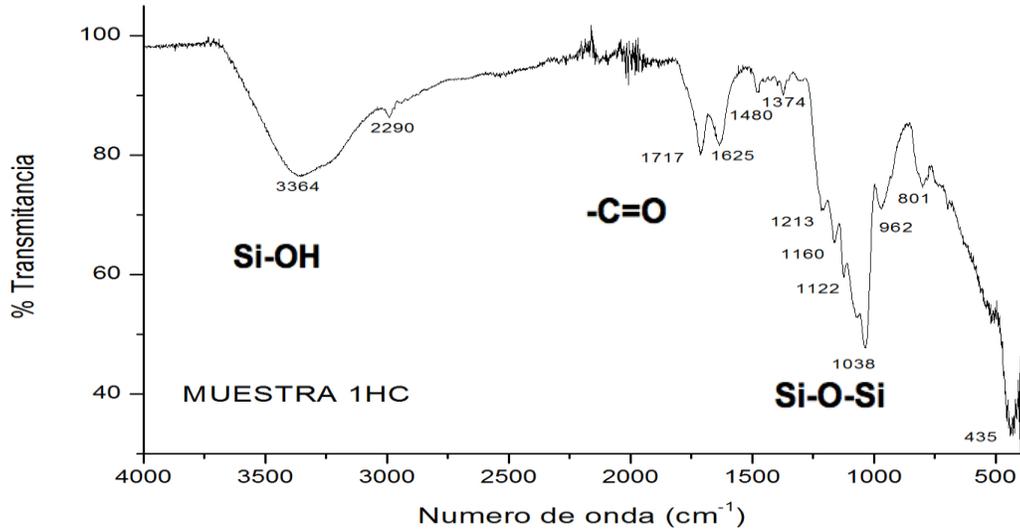


Figura 3.45. Espectro infrarrojo de la muestra 1HC

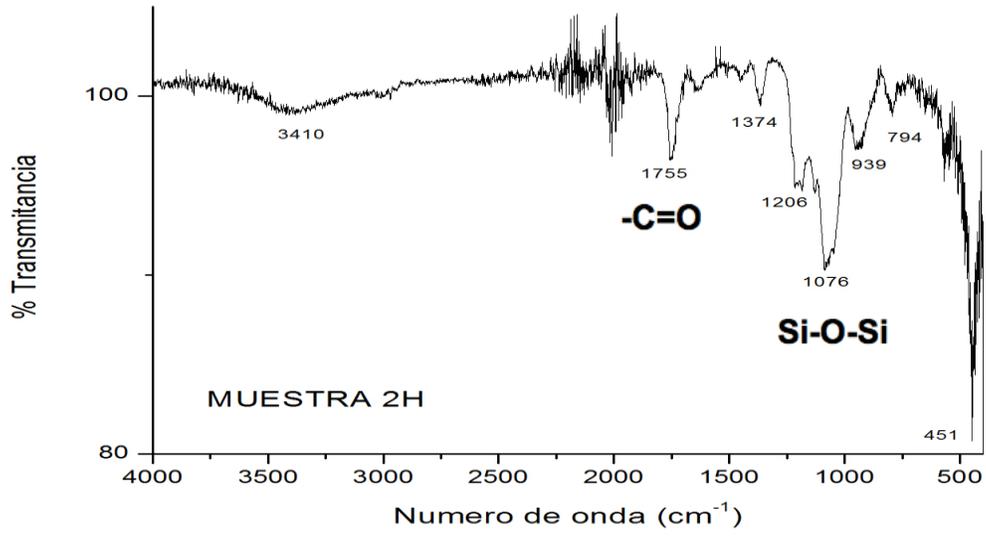


Figura 3.46. Espectro infrarrojo de la muestra 2H

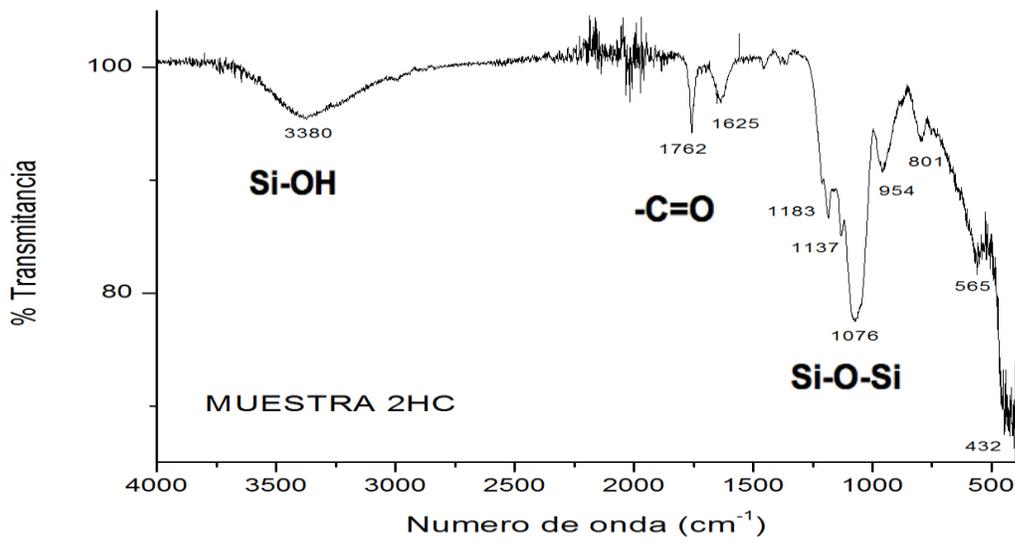


Figura 3.47. Espectro infrarrojo de la muestra 2HC

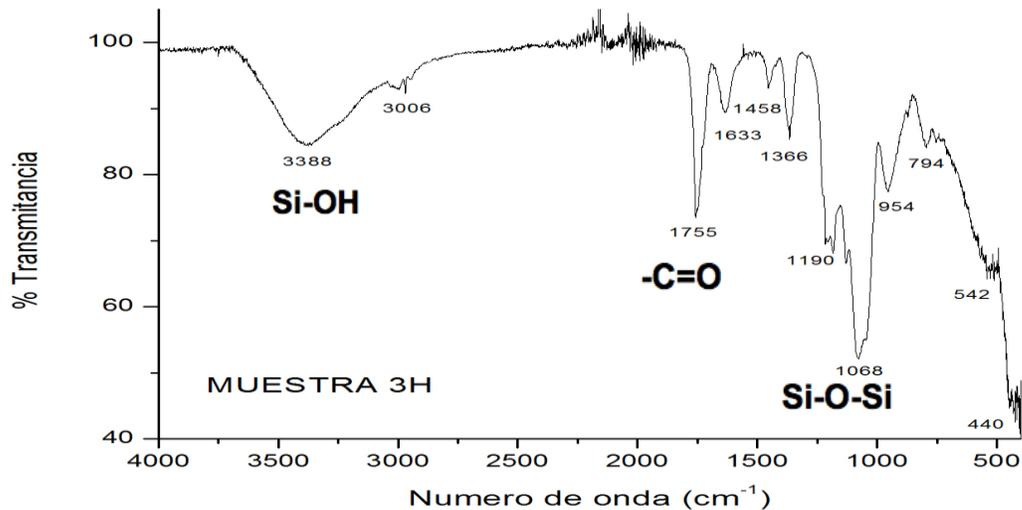


Figura 3.48. Espectro infrarrojo de la muestra 3H

En los espectros de las muestras 1H y 2H no se observa la señal del enlace Si-O-Si, de los vidrios sintetizados y analizada en la tabla 3.6, sin embargo si se nota la señal del enlace carbonilo, relacionada con el PLA y analizada en la tabla 3.4.

En los espectros de las muestras 1HC, 2HC y 3H, se observan las bandas asociadas a los grupos silanoles y los enlaces Si-O-Si, las señales del grupo carbonilo, los grupos metilo, metino y el enlace tipo éster del polímero.

Al obtener que la muestra 3H, fue la única ruta de síntesis donde el polímero no se precipitó con los precursores del vidrio agregados. Por ello se tomó como ruta a seguir para la obtención de los biomateriales híbridos.

3.4.2 Andamios electrohilados (O/I) de PLA/V70P5.

Una vez determinada la ruta de obtención para los biomateriales híbridos, se comenzó la síntesis con una disolución de PLA/TFE al 13% m/v y con las

cantidades propuestas de los precursores utilizados para la síntesis del vidrio V70P5, como se manifestó en la tabla 2.4 del capítulo 2.

Con la identificación de los procesos de hidrólisis, policondensación, envejecimiento y estabilización estructural que se llevan a cabo en la síntesis sol-gel, se pudo proponer la toma de alícuotas de 1 mL de la solución en el momento del paso del proceso de policondensación a la formación del sol, esto con la finalidad de poder electrohilar la solución con los mismos parámetros estandarizados y publicados para los andamios con la mezcla polimérica al 13% m/v.

3.4.2.1 MEB de los andamios híbridos O/I de PLA/V70P5, obtenidos por las técnicas de electrohilado y sol gel.

En las siguientes micrografías se muestran las tres composiciones de los biomateriales híbridos obtenidos mediante la síntesis sol gel y la técnica de electrohilado, con la finalidad de obtener andamios porosos con fibras a escala nanométrica. Cada una de las muestras lleva por nombre la fecha de síntesis, y en los pies de figura, se explicaran las condiciones y el porqué se obtuvieron esos resultados.

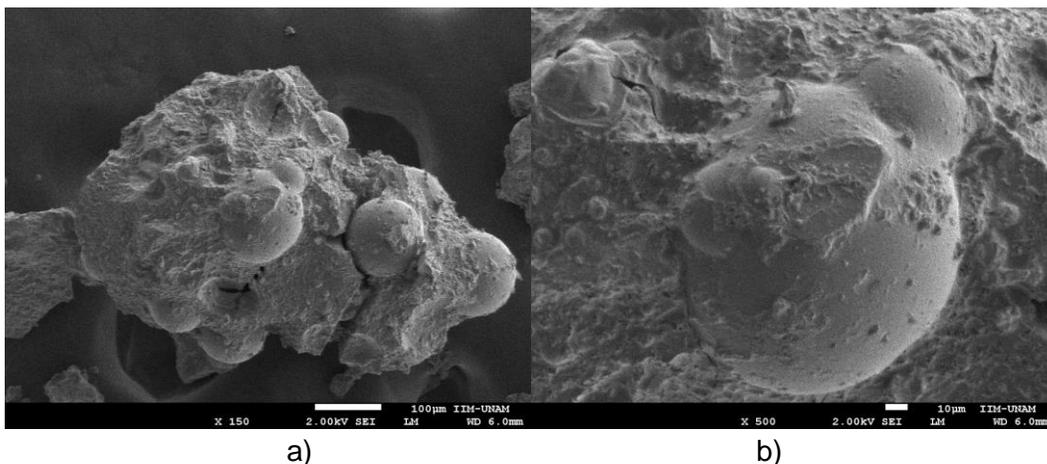


Figura 3.49. Micrografías de la muestra H17/12/15 con mayor contenido de biovidrio. Micrografías a) 150 aumentos y la b) 500 aumentos.

En la micrografía 3.49 se observa una partícula de biomaterial híbrido con una composición calculada de 86BG:PLA14 % en p/p a diferentes escalas 3.49 (a) y 3.49 (b). En la micrografía 3.49 (a), se observan estructuras amorfas y algunas esferas de material híbrido. La razón principal por la que esta composición de BG:PLA no pudo electrohilarse, se debe a la baja concentración de la disolución polimérica, así como a la naturaleza de la técnica, ya que el electrohilado toma como parámetro principal un medio polar, con alta capacidad de difusión y transporte de energía eléctrica o diferencia de potencial. Esto no se observa en una muestra cuya composición mayoritaria es el sol de un vidrio, y al tener la fase inorgánica en una concentración alta, no se tenía suficiente disolvente que distribuyera la carga aplicada en la disolución, que permitiera la formación del jet o chorro y con ello, la formación de las fibras.

La forma y tipo de la estructura, tiene un perfil de amorficidad alto, debido a la fase polimérica que interfiere en el proceso de la formación del biomaterial.

Al extraer las alícuotas de la solución híbrida, se observó que se encontraba en un equilibrio térmico, lo que provocó un choque térmico en la solución que ocasionó el aumento en la cinética de gelación en la solución y en las alícuotas extraídas, formándose un asiento de vidrio en las jeringas utilizadas en el electrohilado de la solución. Por ello, la mezcla híbrida de esta composición, no se logró electrohilar y únicamente se completó la síntesis para obtener membranas.

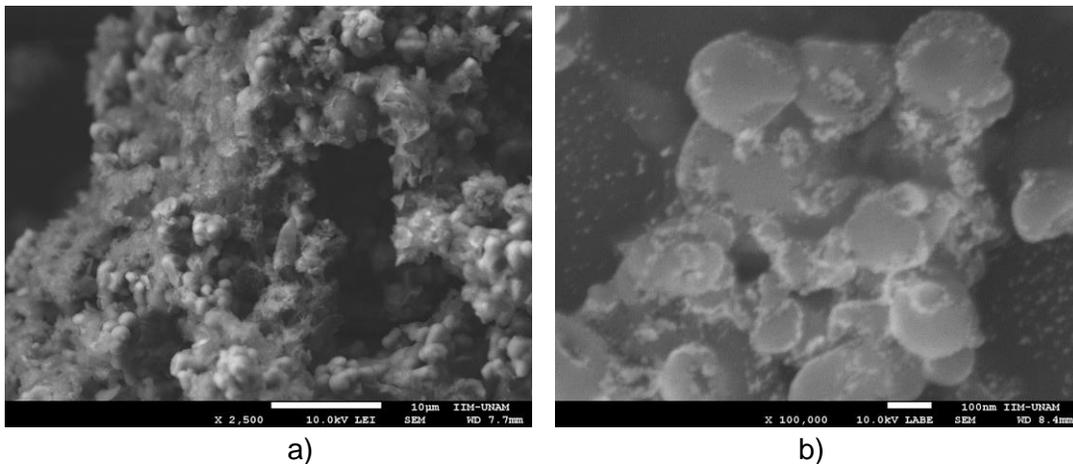


Figura 3.50. Micrografías de las muestras H221215 y H040116, ambas muestras con un contenido de 50:50 de BG/PLA. Micrografías a) con 2500 aumentos y la b) con 100,000 aumentos.

En la figura 3.50 se observan las micrografías de las muestras H22/12/15 y H04/01/16 correspondientes a la composición 50BG:PLA50, sintetizadas con las mismas condiciones manifestadas en la tabla 2.5. Para estas muestras, se logró llevar a cabo el proceso de electrohilado, aunque de manera visual, los andamios obtenidos se mostraban más frágiles y menos densos que los andamios obtenidos con la solución polimérica de PLA/TFE.

En la figura 3.50 (a) se observa un aglomerado de partículas híbridas a escala micrométrica. La forma y el tamaño de las partículas obtenidas, es la que se presenta en la síntesis convencional de los vidrios. Cuando se presentar una concentración equivalente en peso del polímero dentro de la muestra, sucede el fenómeno observado en la figura 3.50 (b).

En la figura 3.50 (b), se muestran aglomerados del material híbrido a escala nanométrica, y se observa un fenómeno interesante al someterse a la diferencia de potencial del sistema de electrohilado, esto es, la formación de esferas híbridas nanométricas recubiertas superficialmente de partículas de vidrio con un diámetro no mayor a los 500 nanómetros. Lo cual se explica por

el contenido del porcentaje en masa del polímero, con respecto al contenido en masa del vidrio.

La muestra con mayor contenido de vidrio, a diferencia de la mostrada en la figura 3.49, contiene una cantidad mayor de polímero y de disolvente (TFE), que físicamente produce un incremento en el contenido sobre el cual la diferencia de potencial aplicada mantendrá un flujo continuo de corriente eléctrica, componente fundamental de la técnica de electrohilado. Por ello, se obtienen andamios con nano-esferas de material híbrido, sin homogeneidad con respecto a la superficie del andamio obtenido, por lo que no fue seleccionado para probarlo en los cultivos celulares.

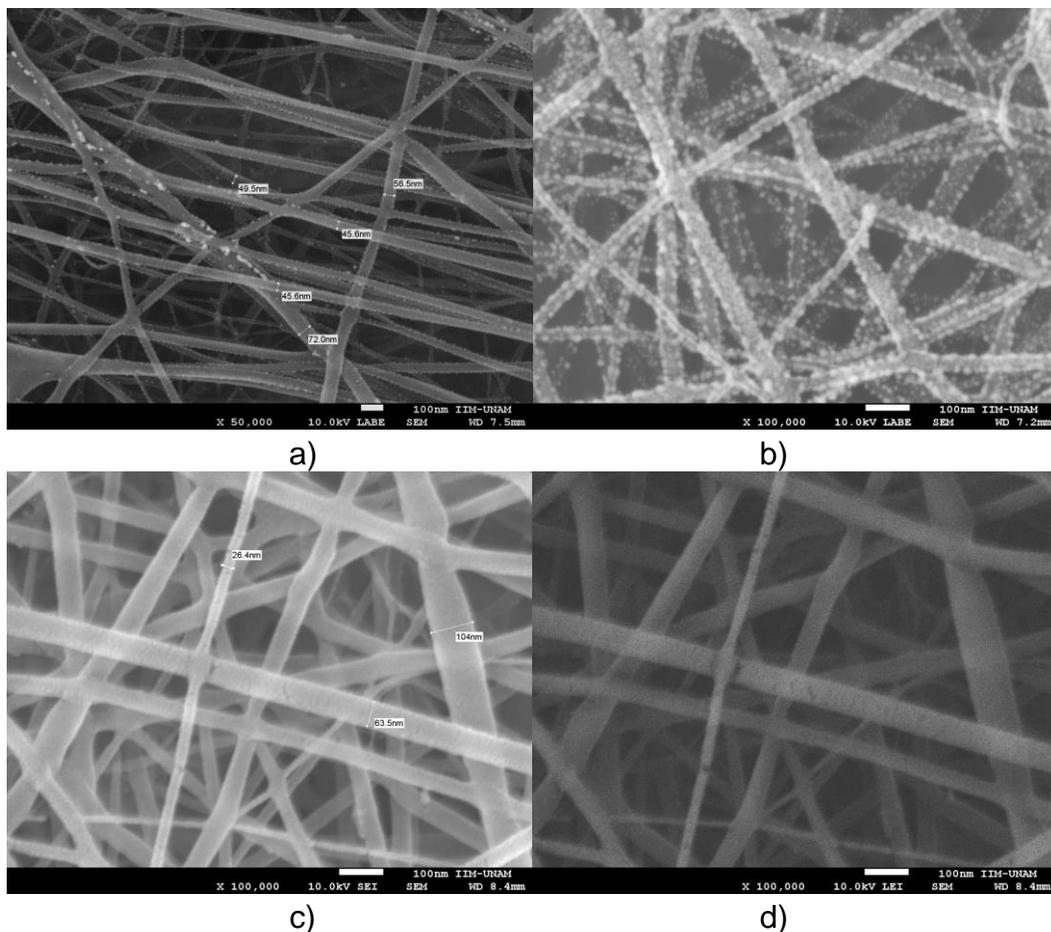


Figura 3.51 Micrografía de la muestra H29/01/16 a 1, 2 y 3 horas después de la policondensación. Micrografías a) con 50,000 aumentos, la b), c) y d) con 100,000 aumentos cada una.

En las micrografías 3.51 (a), 3.51 (b), 3.51 (c) y 3.51 (d), se observa la muestra del biomaterial híbrido con una composición mayor de polímero 14BG:PLA86. Cada una de las imágenes demuestran la obtención de nanofibras de material híbrido PLA/BG con diámetros hasta de 26 nm. Estos andamios se lograron obtener, por la cantidad mayor de polímero presente en la solución híbrida. Las condiciones de electrohilado fueron según las dadas en la tabla 2.5 del capítulo 2.

Las micrografías 3.51 (a) y 3.51 (b) se refieren a los andamios obtenidos a 1 y 2 horas, después de terminada la adición de los reactivos para la síntesis de los biomateriales híbridos por la técnica sol gel. Las micrografías c) y d) pertenecen al andamio obtenido a 3 horas después de terminada la adición de los reactivos.

En la micrografía 3.51 (a), se observa la presencia de nanopartículas embebidas de manera superficial sobre las fibras del polímero. Al ser electrohilado este andamio al tiempo en el que se estaba llevando a cabo la policondensación, se plantea que la presencia de dichas partículas, se debe a que la matriz polimérica funciona como un medio que disminuye las interacciones químicas que suceden en la compactación y consecuente formación del vidrio, ocasionando que se formen nanopartículas sobre la superficie del PLA.

En la figura 3.51 (b), se muestra un andamio con una presencia alta de nanopartículas de manera superficial, aunque no se descarta la posibilidad de que, existan adentro de las fibras obtenidas. Con estos resultados, se cree que al aumentar la cantidad de polímero y disolvente, y el hecho de que se aplique la diferencia de potencial a tal solución, se logra el objetivo principal de la síntesis, que es obtener un andamio.

En las figuras 3.51 (c) y 3.51 (d) se observa la misma muestra, con la diferencia de que la micrografía 3.51 (c), se obtuvo con electrones retro dispersados, con la finalidad de observar la concentración de partículas de vidrio sobre la superficie de las fibras.

En todas las micrografías se muestran andamios en los que el diámetro de fibra promedio es de 50 nanómetros, escala que indica que podemos hablar de andamios a escala nanométrica.

3.4.2.2 DRX de los andamios híbridos obtenidos de PLA/GB.

Con la finalidad de poder observar un cambio en las propiedades estructurales de los biomateriales híbridos, se realizaron las caracterizaciones por difracción de rayos X a una sola muestra representativa de las composiciones de los vidrios.

En las figuras que van de 3.52 hasta 3.57, se observan dos difractogramas, uno que contiene fases amorfas y cristalinas presente en la muestra, y el otro que identifica el tipo de difracción de fases cristalinas que se encuentran presentes en cada una de las muestras.

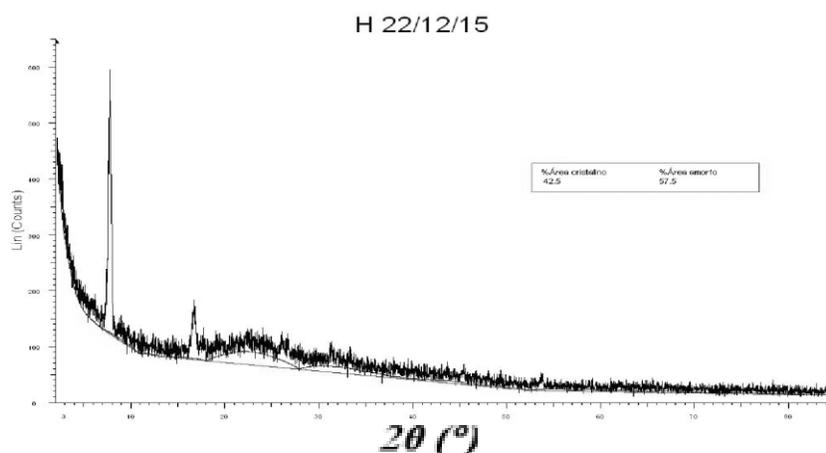


Figura 3.52. Difractograma de la muestra H25/11/15, con identificación de fases cristalinas.

El difractograma de la figura 3.52 corresponde al biomaterial híbrido con alto contenido de vidrio 86BG:PLA14. En donde se observan señales que se identificaron con la alfa-poli(D-láctona) un estereoisomero del PLA. En el difractograma se indica el porcentaje de amorficidad y de cristalinidad de la muestra. Los porcentajes de amorficidad y cristalinidad de la muestra son 42.5 % y 57.5 %. Estos datos, corroboran la mayor cantidad de vidrio presente en la muestra, ya que la composición utilizada se comprobó que era completamente amorfa. Sin embargo desconocemos porque solamente apareció el isómero D de la láctida.

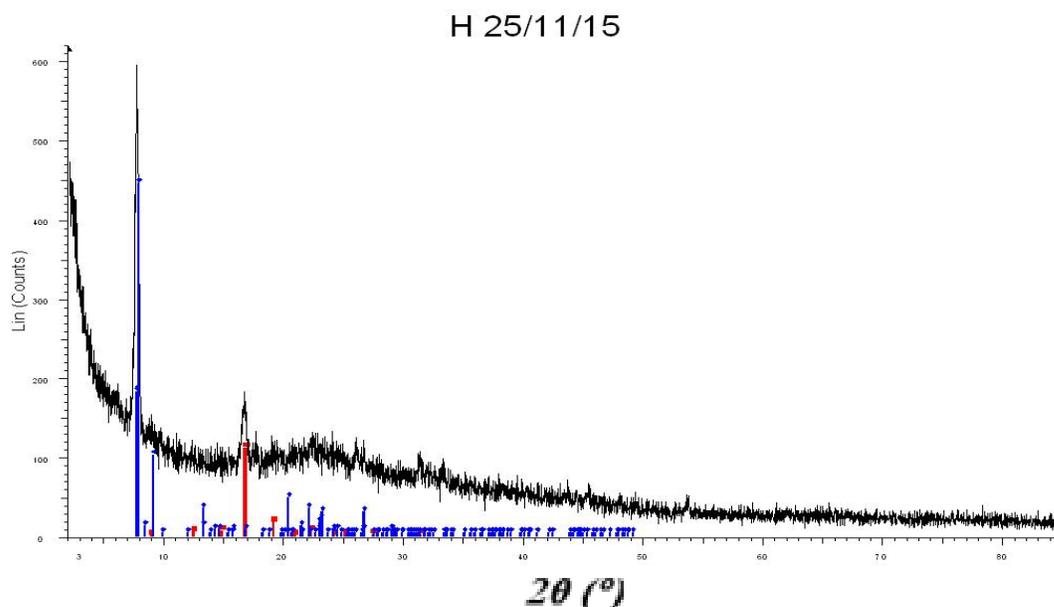


Figura 3.53. Difractograma de la muestra H25/11/15, con identificación del porcentaje de fases cristalinas y de fases amorfas

En el difractograma de la figura 3.53, se observan las señales cristalinas asociadas con el estereoisómero alfa-poli(D-láctona), y las señales amorfas del vidrio. Lo que confirma que no hay reacción química, mientras se realiza la síntesis sol-gel y el electrohilado de la solución híbrida.

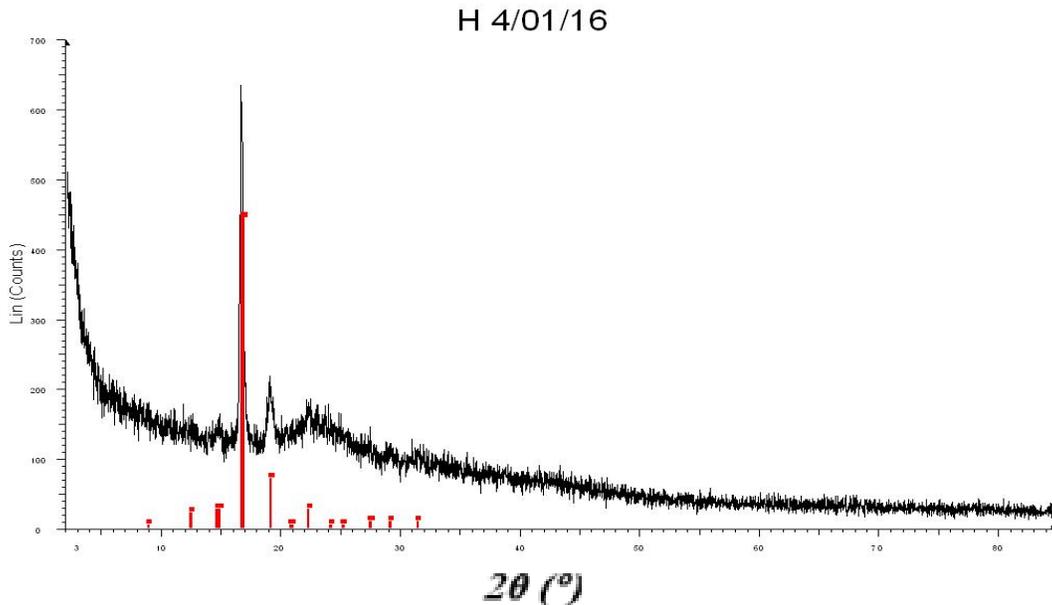


Figura 3.54. Difractograma de la muestra H4/01/16, con identificación de fases cristalinas.

En la figura 3.54, el difractograma de H4/01/16 muestra para una composición en masa del 50% en peso del PLA y 50% en peso del biovidrio, las mismas señales presentes en el difractograma de 3.53, que corresponden a la fase de alfa-poli(D-láctona). Estos resultados indican que la fibra esta compuesta de una matriz polimérica de PLA semi-cristalina y con nanopartículas de vidrio amorfas embebidas en las fibras del andamio. La cristalinidad de las fibras de PLA, se debe a la estructura de núcleo-coraza, en donde el núcleo es amorfo y la coraza es cristalina [70].

H 4/01/16

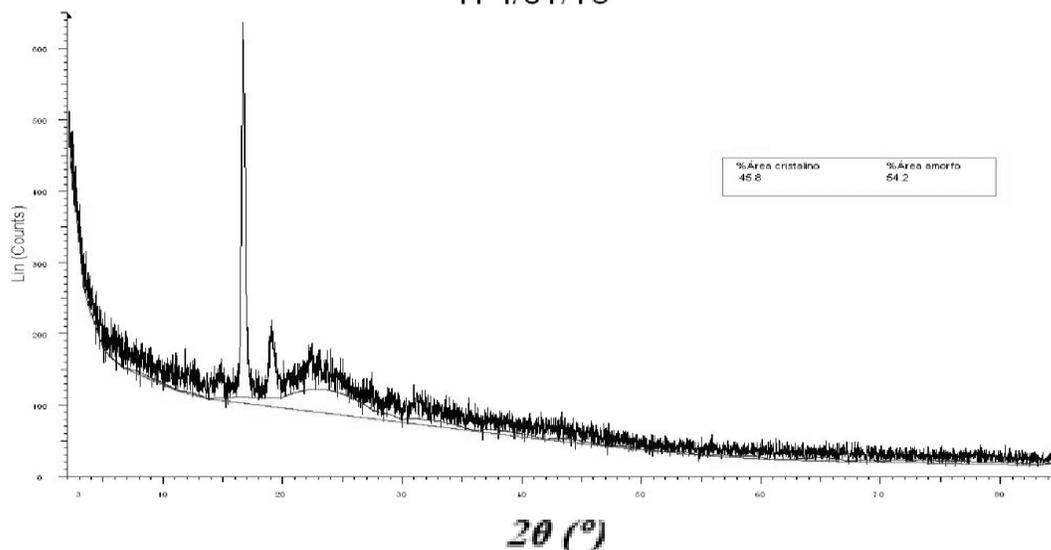


Figura 3.55. Difractograma de la muestra H4/01/16, con identificación del porcentaje de fases cristalinas y de fases amorfas.

El difractograma de la figura 3.55 muestra el porcentaje de la fase cristalina, debida al estereoisómero del PLA, y la fase amorfa, consecuencia de la composición del vidrio. La composición en peso teórica de este biomaterial es de 50%BG:PLA%50. El porcentaje que se observa en el difractograma es de 45.8 para la fase cristalina y 54.2 para la fase amorfa, lo que indica que estamos muy cercanos a las concentraciones con que se calculó que teníamos que trabajar.

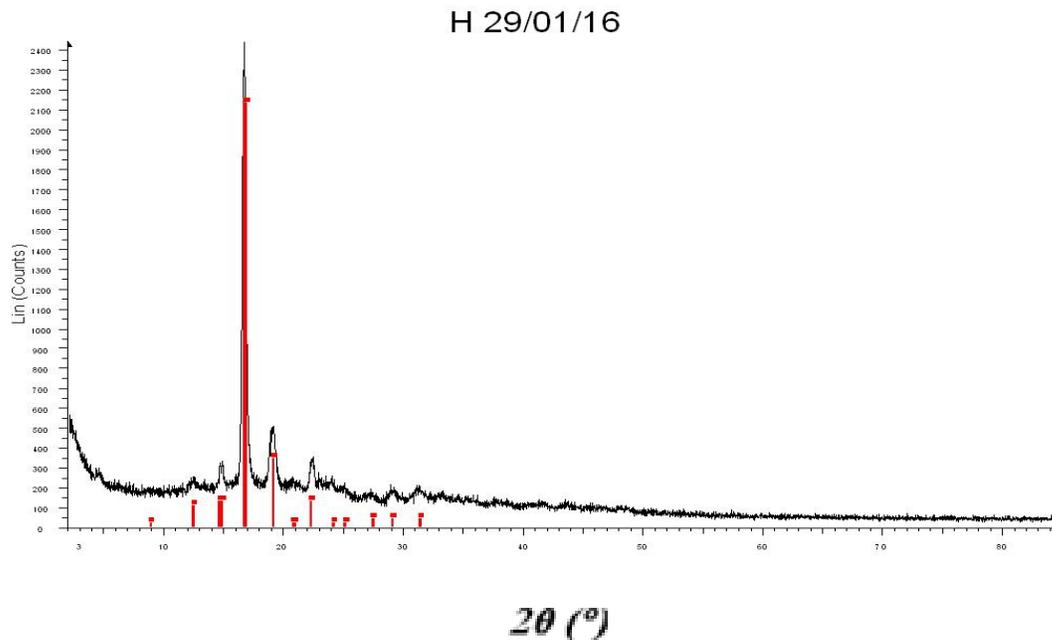


Figura 3.56. Difractograma de la muestra H29/01/16, con identificación de fases cristalinas.

En la figura 3.56 se observa el difractograma de la composición 14%BG:PLA86%, en la que se comprueba que el polímero es el que proporciona la fase cristalina en el material híbrido, ya que al aumentar la composición en peso durante la síntesis, en las caracterizaciones se reflejan los puntos intensos que hay en el difractograma, adjuntados a cristales de biovidrio de la composición V70P5.

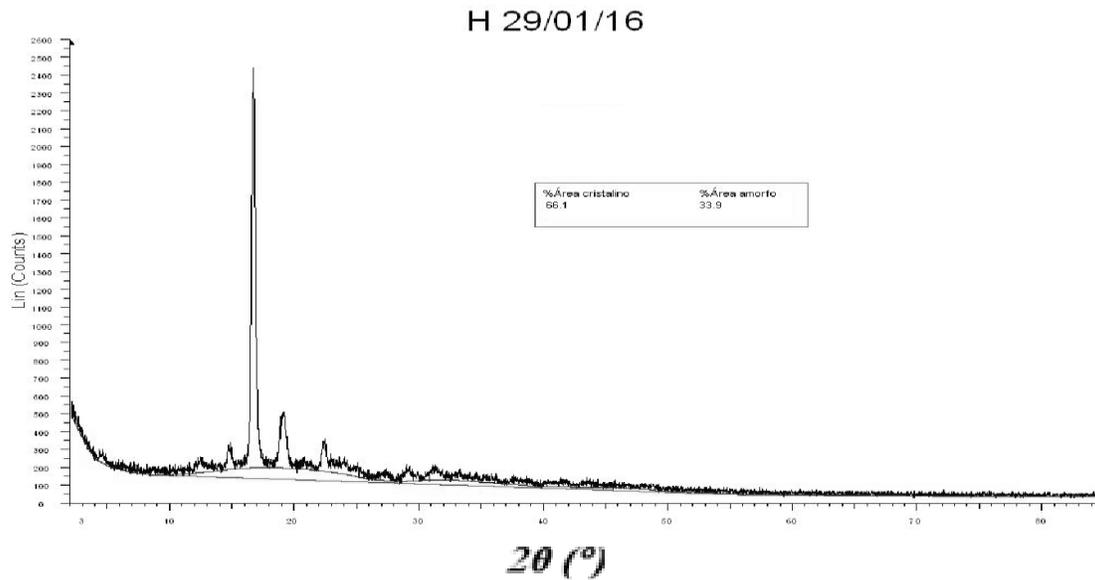


Figura 3.57. Difractograma de la muestra H29/01/16, con identificación del porcentaje de fases cristalinas y de fases amorfas.

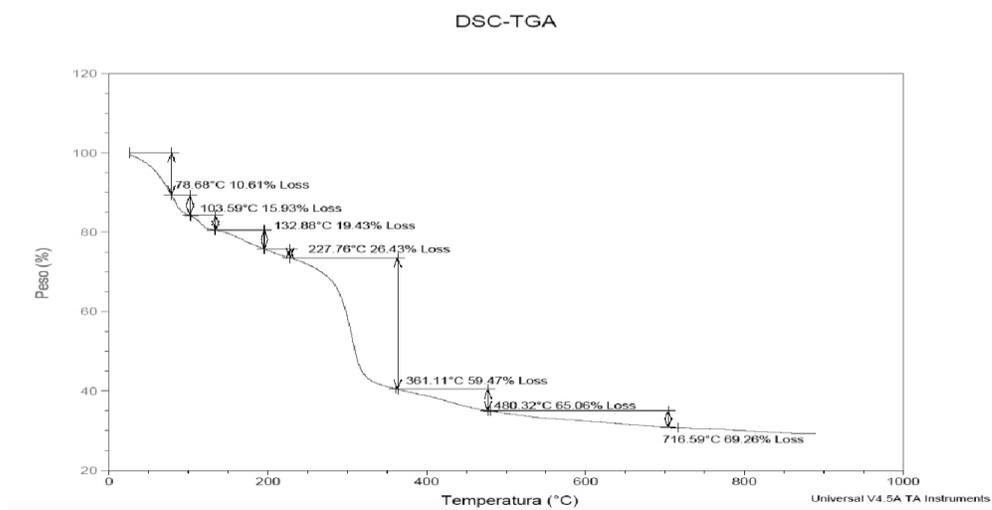
En la figura 3.57, el difractograma de la composición con mayor contenido de polímero, muestra que los porcentajes de cristalinidad de 66.1% y de fase amorfa de 33.9%, comprueban el hecho de que en el biomaterial existe una cantidad de polímero mayor a la del vidrio.

En general, el análisis de los difractogramas comprueban los cálculos teóricos de las composiciones de los biomateriales híbridos obtenidos por la síntesis sol gel y la técnica de electrohilado. En cada uno se observa la señal característica del grupo carbonilo proveniente del PLA, así como los porcentajes diferentes de amorficidad asociados a cada composición.

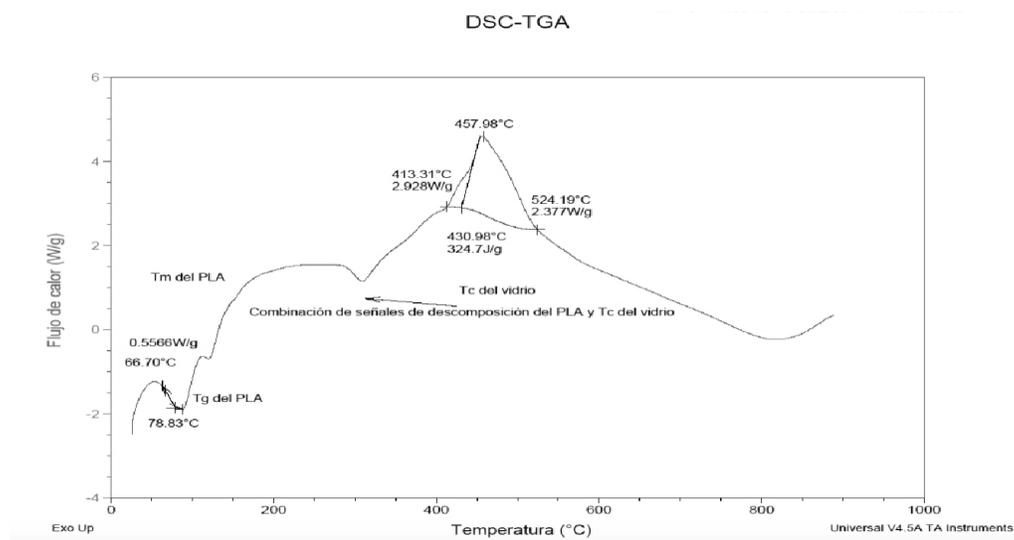
Con la caracterización estructural, y con los analisis termicos y termogravimetricos se complementará la información de la estabilidad del biomaterial seleccionado para su consecuente prueba de viabilidad celular y biocompatibilidad con las células hematopoyéticas.

3.4.2.3 TGA y DSC de los andamios híbridos de PLA/BG.

Se realizaron los análisis térmicos correspondientes a las muestras presentadas en la sección 3.4.2.2, con la finalidad de mostrar las propiedades térmicas de los andamios híbridos electrohilados.



a)



b)

Figura 3.58. TGA (a) y DSC (b) de la muestra H22/12/15

En la figura 3.58 se muestran los esquemas (a) TGA y (b) DSC del biomaterial híbrido 86:14 de BG/PLA, con la finalidad de determinar su estabilidad térmica y en su caso, determinar la Tg, Tc y Tm del biomaterial híbrido.

En la figura 3.58 (a), se observan pérdidas de peso, conforme aumenta la temperatura. Las dos pérdidas de peso para el biomaterial corresponden a la temperatura de fusión del polímero y a la temperatura de cristalización del vidrio, señal que se traslapa con la temperatura de degradación del polímero. La primer pérdida de peso importante se da a los 132.88 °C con 19.43%. Esta pérdida involucra la evaporación de agua residual en la reacción, una vez que se han electrohilado los andamios y reactivos en cantidades traza que hayan quedado sin reaccionar como TEOS, TEP o CaCl₂.

La segunda pérdida de peso se presenta, una vez que el polímero se degrada alrededor de los 361.11 °C con una pérdida de 59.47% en peso. Después de esas temperaturas, las pérdidas de peso no son representativas.

En la figura 3.58 (b), no se logra identificar una línea base en el DSC, para determinar las Tg, Tm y Tc del biomaterial híbrido, debido a que se traslapan las señales. Sin embargo, algunas señales si se perciben corroborándose la información, con los DSC de cada material por separado, esto es, se observa la Tg del PLA a 66.70 °C; una combinación de señales a temperaturas donde el polímero está siendo degradado, y el comienzo de la Tc del vidrio. Esta temperatura se encuentra en el intervalo de (200 – 600 °C).

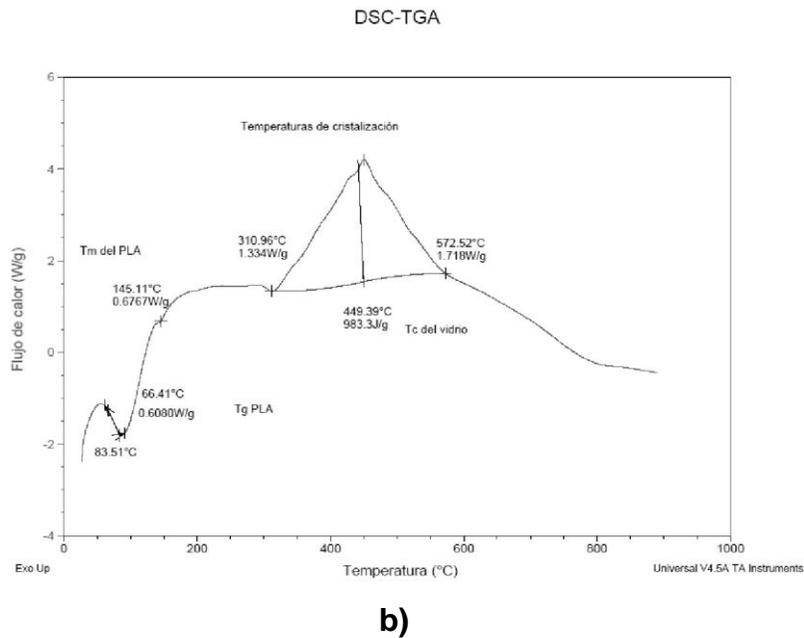
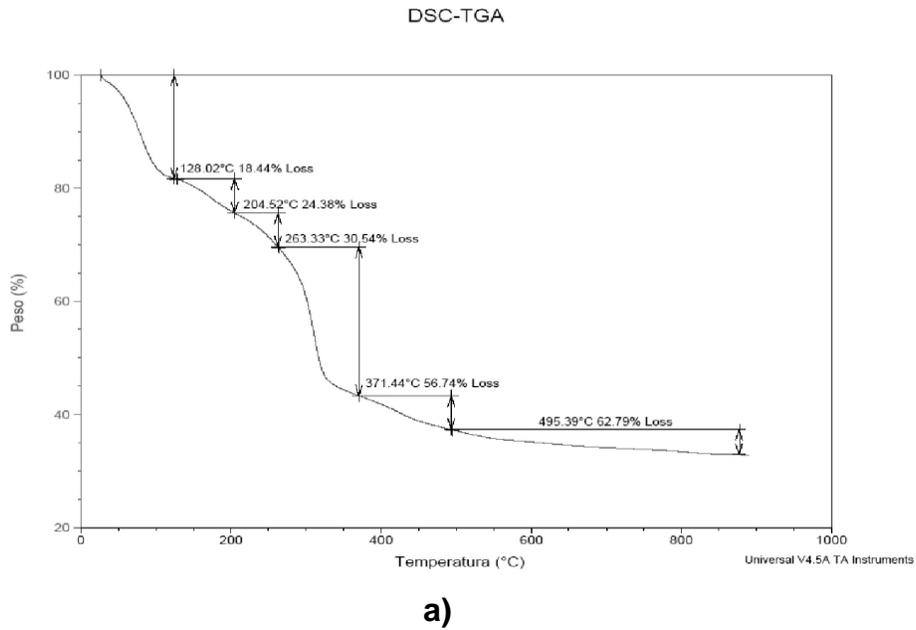
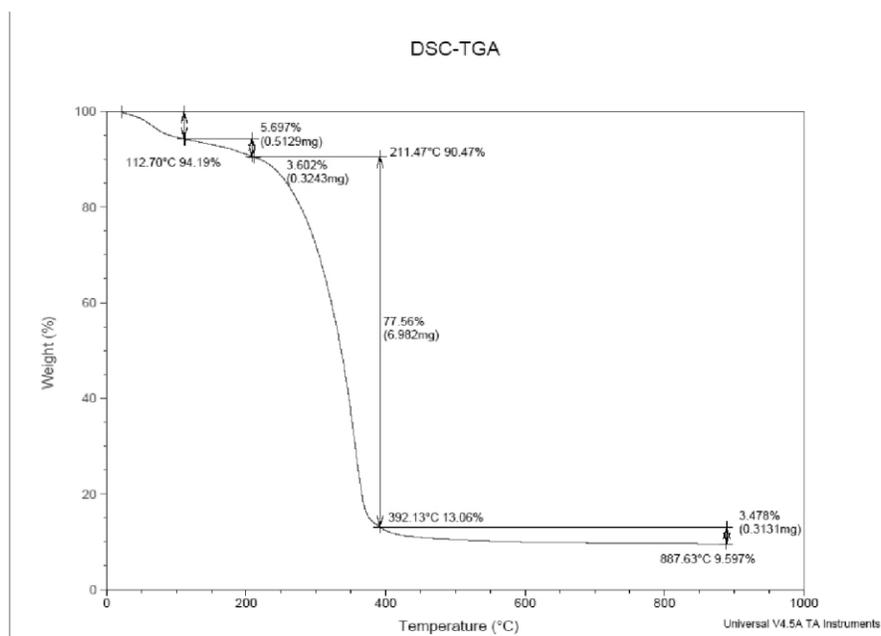


Figura 3.59. TGA y DSC de la muestra H4/01/156

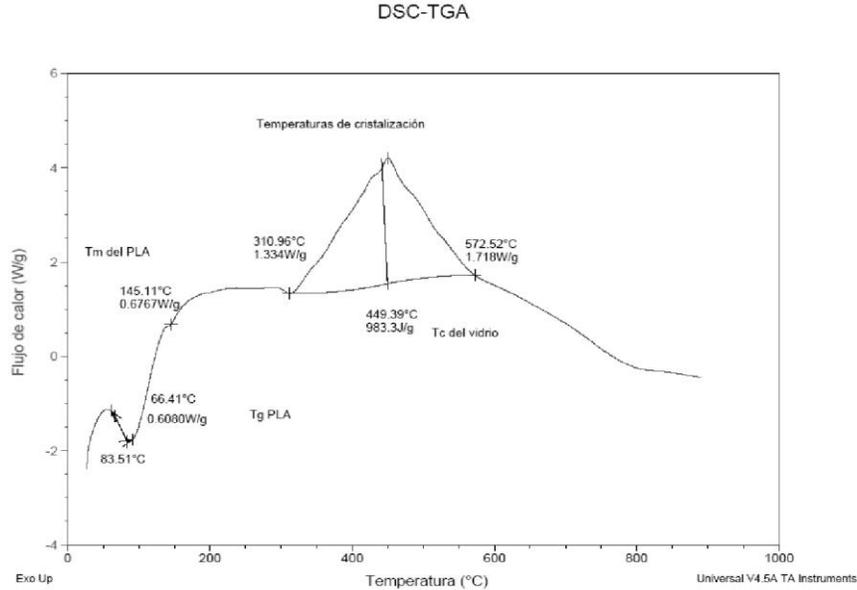
En la figura 3.59 se muestran los esquemas a) TGA y b) DSC del biomaterial híbrido con una composición 50:50 en peso de PLA/BG, con la finalidad de determinar sus propiedades de estabilidad térmica y en su caso, determinar la Tg, Tc y Tm del biomaterial híbrido.

En la figura 3.59 (a) se observan señales similares a los de la figura 3.58, variando por poco los valores determinados en los esquemas de TGA y DSC.

En la figura 3.60, se observa el TGA y el DSC de la composición 14%BG:PLA86%. En el esquema de TGA, se pierde alrededor de 5.6% en peso en los primeros 150 °C, pudiéndose deber a reactivos en cantidades traza sin reaccionar (TEOS, TEP, CaCl₂) y H₂O, presentes en las nanopartículas del biovidrio, lo que demostraría que cuando existe una concentración mayor de polímero, la pérdida de peso durante los primeros 250 °C no es la misma que en el biovidrio convencional, debido a la concentración menor de el biovidrio en el biomaterial híbrido. La segunda pérdida de peso, se observa a los 392.13 °C, temperatura a la cual pierde un 77.62% de peso, que corrobora el hecho de que esta muestra contiene una cantidad mayor de polímero, puesto que esta temperatura se encuentra en el intervalo en el cual el polímero se degrada.



a)



b)

Figura 3.60. TGA y DSC de la muestra H29/01/16

La concentración de la solución polimérica que se utilizó para los andamios híbridos fue de PLA al 13% m/v, debido al intervalo de diámetro de fibra que se obtuvo, con las condiciones de electrohilado para estos andamios.

La composición de biovidrio que se seleccionó para la síntesis de los biomateriales híbridos, fue **70%SiO₂-25%CaO-5%P₂O₅**, obtenido a partir de los resultados de difracción de rayos X de cada una de las composiciones sintetizadas, donde se encontró que a mayor contenido de SiO₂, hay una formación en la red más estable que cuando se aumentan los modificadores de red como el CaO o el P₂O₅.

La tercer ruta de síntesis 3H, fue la mejor opción para la obtención de los biomateriales híbridos, primero por la técnica de sol-gel y después para la obtención de los andamios obtenidos por la técnica de electrohilado. Con esta ruta de síntesis, se logró pasar la barrera de insolubilidad del PLA llevándolo a su temperatura de transición vítrea lo que permitió que la mezcla hidrolizada del TEOS/HCl no ocasionara la precipitación del polímero y por el

contrario, se observara una mezcla homogénea y un poco turbia, pero con una viscosidad baja.

Los polímeros son insolubles en medios acuosos, pero se busca encontrar o mejorar su solubilidad mediante precursores de poliamidas o disolventes próticos. En el caso del poliácido láctico, se llevo a una temperatura de 60 °C y agitación durante 15 minutos, para después agregarle la mezcla con agua, se noto una turbidez inicial, que después derivó en una mezcla física homogénea del compuesto híbrido.

Una vez obtenida la ruta a seguir para evitar la insolubilidad del PLA y obtener un andamio híbrido, se sintetizaron tres composiciones diferentes en donde se llevaba a una concentración mayor de biovidrio, una concentración igual de biovidrio y polímero y una concentración mayor de polímero. En cada uno de estos andamios se observó que la mejor composición para obtener andamios electrohilados a escala nanométrica, es cuando se encuentra una mayor composición de polímero, ya que éste, al encontrarse disuelto en un disolvente polar, mejora la capacidad de conducción.

Se sintetizaron andamios híbridos de composición 14%BG:PLA86%, que luego se probaron en cultivos celulares de células hematopoyéticas para evaluar su biocompatibilidad y viabilidad celular.

3.5 Pruebas biológicas

3.5.1 Cultivos celulares sobre los biomateriales híbridos electrohilados para la evaluación de la capacidad de soporte de la hematopoyesis por el biomaterial híbrido sintetizado a una concentración 84-16 de PLA/SiO₂-CaO-P₂O₅.

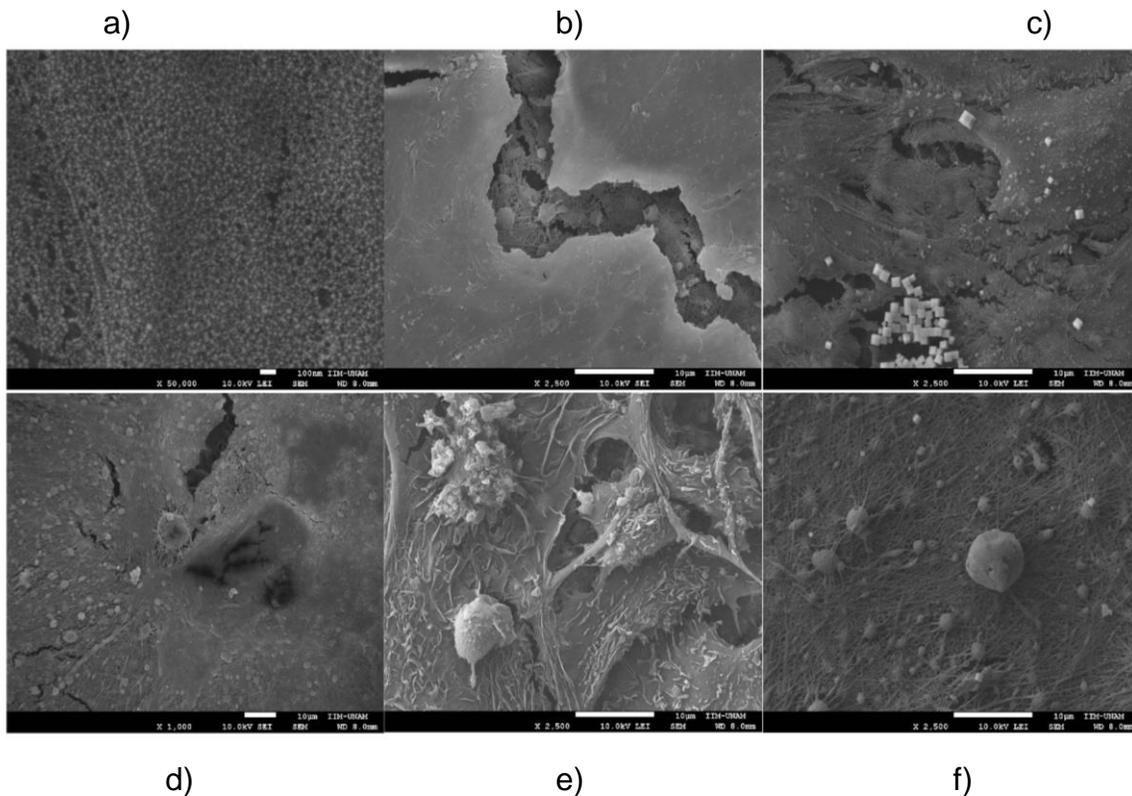


Figura 3.61. (a-c) Fotografías de microscopía electrónica del biomaterial en contacto con medio RPMI suplementado con SFB por 19 días. (d-f) Biomaterial en cultivo con células hematopoyéticas en medio RPMI-10%SFB-1%Ab suplementado con citosinas mieloides a los 19 días de cultivo.

Las figuras 3.61a-c, muestran que al estar en contacto el biomaterial con medio al 10%SFB-1%Ab, da la apariencia que se forma una especie de recubrimiento superficial sobre el biomaterial, posiblemente debido al depósito de proteínas, compuestos lipídicos y/o glucosa contenida en el medio RPMI-10%SGB-1%Ab (Fig. 3.61b) y cristales de alguna de las sales

que componen el medio RPMI, entre las cuales se encuentra cloruro de sodio y bicarbonato de sodio (Fig. 3.61c). En las figuras 3.61d-f se observa la superficie de biomaterial con lo que se sugiere, por el tamaño aproximado de 8-10 μm , podría ser una célula mielóide.

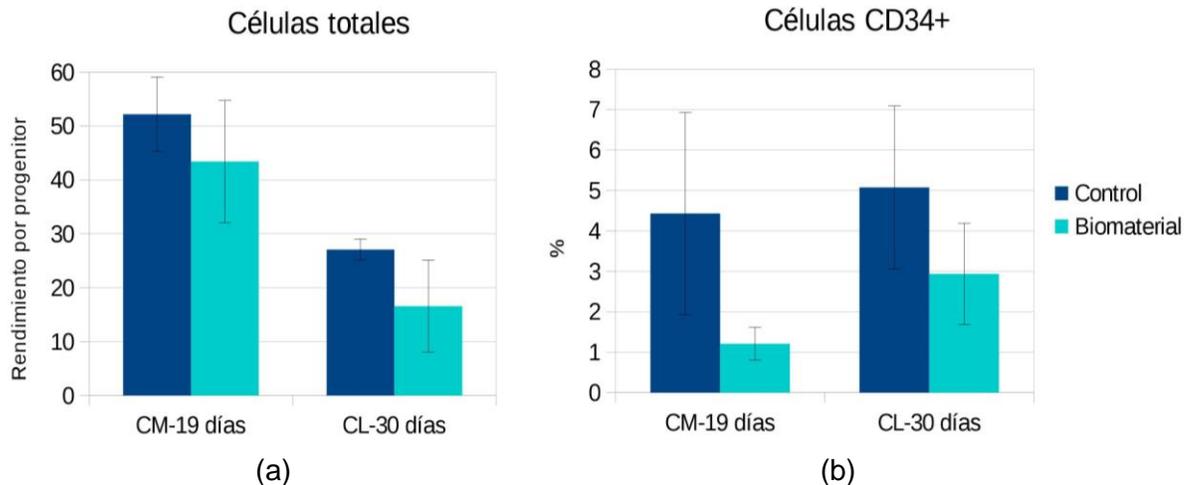


Figura 3.62 (a). Comparación del rendimiento por progenitor obtenido en ausencia (Control) y presencia de biomaterial (Biomaterial), al cosechar las células de los cultivos con citocinas mieloides (CM, 19 días) y los cultivos con citocinas linfoides (CL, 30 días). 3.62 (b). Comparación del porcentaje de células que expresan el marcador superficial CD34 (células CD34+) obtenidas por el análisis de los cultivos con diferentes condiciones por citometría de flujo.

El análisis gráfico y estadístico del rendimiento por progenitor indican que no hay una diferencia significativa en presencia y ausencia del biomaterial. La pregunta a responder fue si el biomaterial influye en la diferenciación hematopoyética favoreciendo la diferenciación a algún linaje maduro específico o quizá favoreciendo el mantenimiento de las células más primitivas. El análisis de la población celular CD34+ indica que el biomaterial no favorece el mantenimiento ni expansión de esta población respecto a los controles.

Al igual que en la comparación de rendimientos por progenitor, a pesar de que la gráfica de barras sugiere que hay una disminución en el porcentaje de estas células, el análisis estadístico indica que no hay una diferencia significativa.

Cultivo con citocinas linfoides (30 días)

Células analizadas: CD34⁺

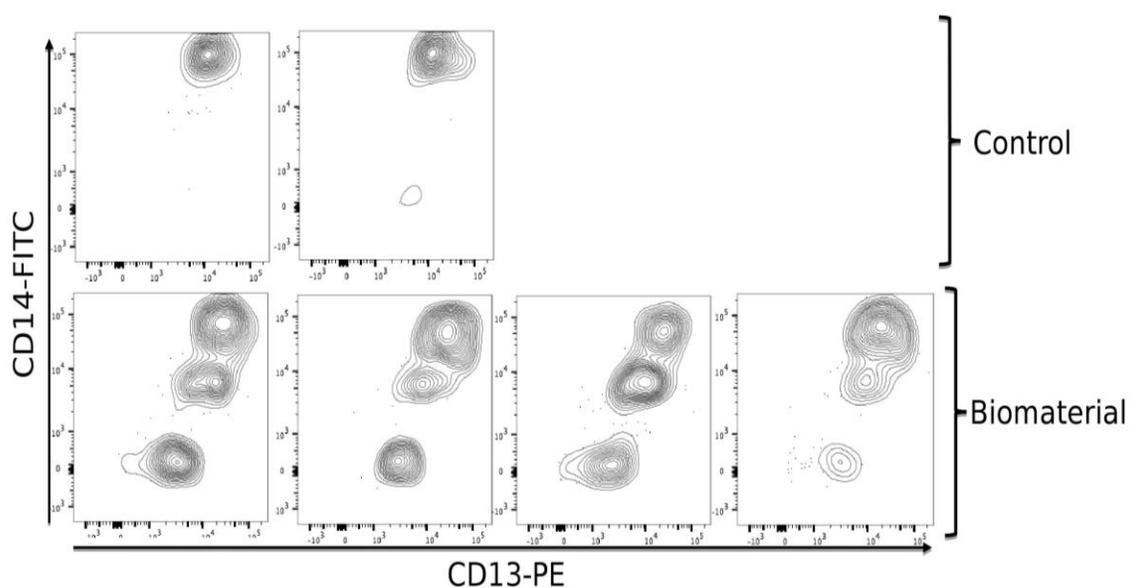


Figura 3.63. Diferenciación de células CD34⁺ de SCU al linaje mielóide en condiciones linfoides, evaluación de poblaciones precursoras. Las células analizadas fueron cosechadas al día 30 de cultivos en ausencia (control) y presencia de biomaterial. Previo al análisis de expresión de CD14 y CD13, se seleccionó la población de células que mantuvieron la expresión de CD34 a lo largo de los 30 días de cultivo.

Cultivo con citocinas linfoides (30 días)

Células analizadas: CD34⁻

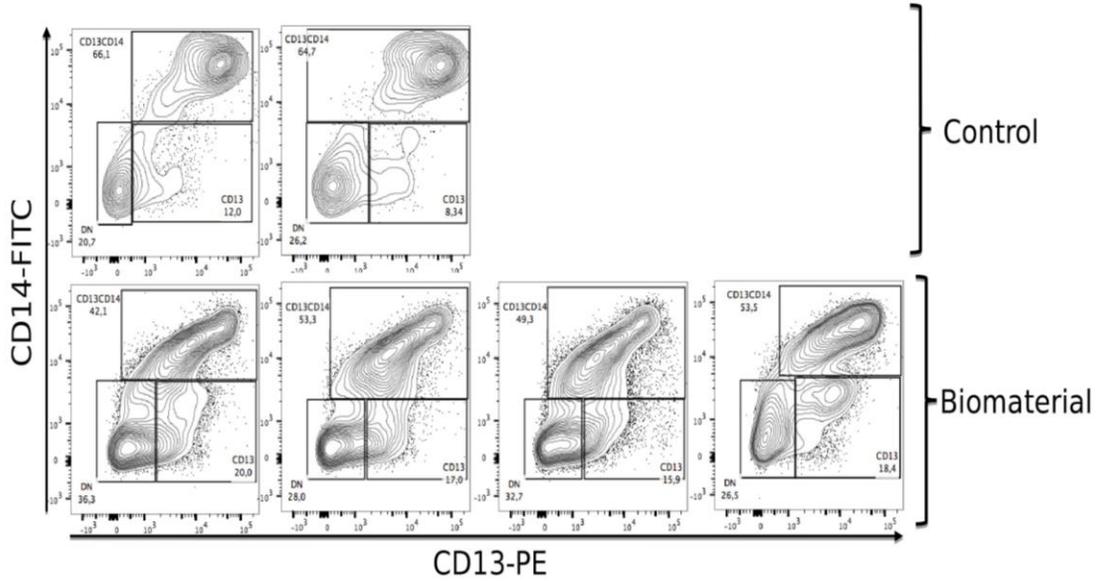


Figura 3.64. Evaluación de poblaciones de células progenitoras y maduras de linaje mielode, generadas a partir de cultivos a 30 días con condiciones linfoides, partiendo de células CD34⁺ de SCU. Se graficó la expresión de CD14 y CD13 (marcadores mieloides) pre-seleccionando la población CD34⁻.

Cultivo con citocinas linfoides (30 días)

Células analizadas: CD34⁻

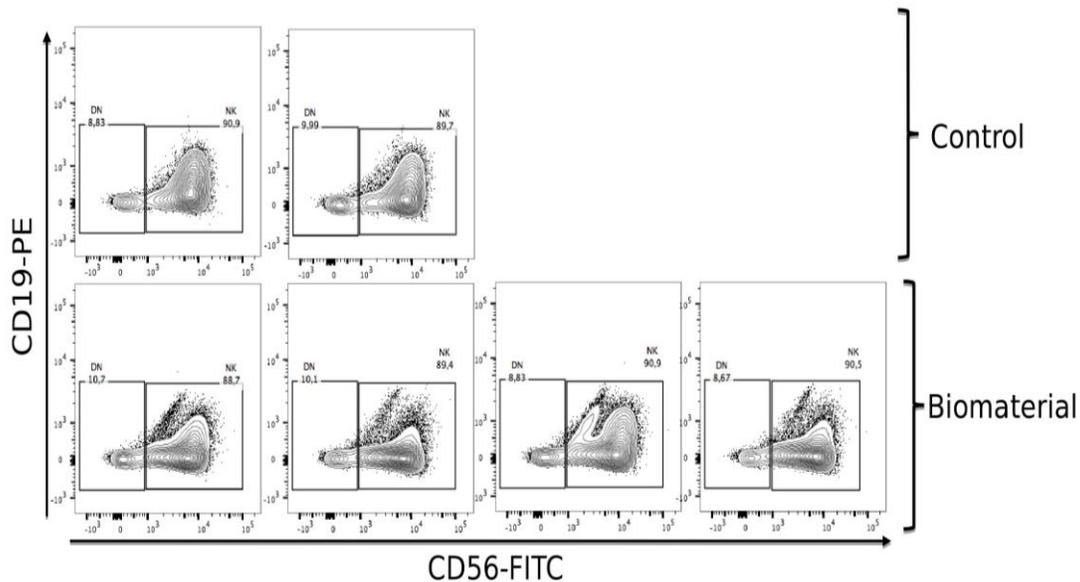


Figura 3.65. Evaluación de la expresión de dos moléculas de superficie características de algunos tipos de células precursoras y maduras linfoides (CD19 para linfocitos y CD56 para células NK). Las células analizadas fueron cosechadas al día 30 a partir de cultivos en presencia y ausencia (control) de biomaterial con citocinas linfoides. La graficación se realizó pre-seleccionando la población de células CD34⁻.

En las figuras 3.63, 3.64 y 3.65 se muestran los resultados sobresalientes del análisis de citometría de flujo, seleccionados para mostrar cambios en la diferenciación hematopoyética en función de la presencia del biomaterial en cultivo con las células de SCU. Tanto en el análisis de células CD34⁺ (Figura 3.63), como en el de células CD34⁻, se observa que en presencia del biomaterial, hay células en estados transitorios de diferenciación, considerando que para la generación de monocitos y granulocitos, los monoblastos y mieloblastos transitan hacia la adquisición de CD13, pierden progresivamente el CD34 y es posible que adquieran o no la expresión de la molécula CD14. La figura 3.63 estaría representando la primera etapa de diferenciación mieloide en donde las células aún expresan CD34, van

adquiriendo los marcadores de linaje. Adicionalmente, la población CD34+ CD14+, podría corresponder a la presencia de un subtipo de células dendríticas publicadas por Ferrero y colaboradores (Ferrero et al, 1998). En la figura 3.64 están representadas las etapas tardías de diferenciación en las cuales las células ya no expresan CD34, van adquiriendo CD13 y generan dos poblaciones, una que expresa CD14 y otra que no la expresa. Estos pasos transitorios se observan en los cultivos con biomaterial sugiriendo que la velocidad de diferenciación se ve disminuida.

En el análisis citométrico se evaluó la expresión de las moléculas CD19 y CD56. En la figura 3.64, se observa que en presencia del biomaterial se genera una población de expresión alta de CD56 y otra de baja expresión de CD56. La población de expresión baja de CD56, ausente en los análisis de los cultivos sin biomaterial, podría corresponder a células NK citotóxicas (Cooper et al, 2001).

La presencia de biomaterial en el cultivo de células troncales y progenitoras provenientes de SCU, no influye en los números de células totales, sugiriendo que no altera el equilibrio de proliferación/apoptosis respecto a los cultivos control independientemente de si el cultivo se encuentra en presencia de citosinas que favorecen la diferenciación mieloide o linfoide. Este resultado sugiere que el biomaterial electrohilado es aparentemente biocompatible con células hematopoyéticas.

Los resultados del análisis de citometría de flujo muestran que hay diferencias en las poblaciones de células mieloides precursoras y maduras, aparentemente inducidas por el cultivo con el biomaterial. Las diferencias, a pesar de tratarse de cultivos con citosinas linfoides, se observaron en la generación de células mieloides. Esto se explica si consideramos que las células CD34+ que se cultivaron inicialmente, contiene poblaciones de precursores que ya están predeterminados para un linaje específico, es decir

que sólo una proporción baja de éstas células son células troncales que pudieran aún mantener el potencial para generar tanto el linaje mieloide como el linaje linfoide.

Se requieren una cantidad mayor de experimentos para determinar que condiciones está proporcionando el biomaterial para inducir estos cambios en la diferenciación hematopoyética de células de SCU. Sin embargo podemos concluir que el biomaterial es biocompatible y un buen soporte para la generación de poblaciones de precursores mieloides, así como de células NK citotóxicas.

Capítulo 4

Conclusiones

Se obtuvieron andamios de PLA/TFE para concentraciones diferentes por la técnica de electrohilado, modificando parámetros como la diferencia de potencial aplicada en el sistema (10 kV) y la concentración de la disolución polimérica (13% m/v).

Se obtuvieron vidrios para composiciones diferentes en el sistema **SiO₂-CaO-P₂O₅**, por método sol gel, utilizando como precursor el TEOS y como modificadores de red el TEP y CaCl₂·2H₂O, seleccionando la composición V70P5 (**70%SiO₂-25%CaO-5%P₂O₅**), por su estructura amorfa debido a que esta característica aumenta la bioactividad del material cuando se encuentra en contacto con medios biológicos.

Se obtuvieron los biomateriales híbridos O/I de PLA/**BG** con relaciones en peso de mayor cantidad de vidrio **83.33BG:PLA16.66**, cantidades en peso iguales **50BG:PLA50** y cantidades en peso de vidrio menores, **16.66BG:PLA83.33**, por la técnica de electrohilado y la síntesis por sol gel. La composición seleccionada para sintetizar los biomateriales híbridos (O/I), fue **16.66BG:PLA83.33**.

Se realizaron las caracterizaciones de FTIR, MEB, EDS, DRX, TGA y DSC de los andamios poliméricos obtenidos por electrohilado y de los biovidrios sintetizados a composiciones diferentes por la síntesis sol-gel.

Los biomateriales híbridos (O/I), se caracterizaron por MEB, FTIR y DRX.

Se obtuvieron andamios híbridos electrohilados con diámetros de fibra de hasta 26 nanómetros, los cuales se probaron en cultivos con células

troncales y progenitoras provenientes de sangre de cordón umbilical (SCU), en los cuales se evaluó la biocompatibilidad de los andamios mediante citometrías de flujo.

Se probó la biocompatibilidad y viabilidad para la generación de poblaciones de precursores mieloides, así como de células NK citotóxicas.

Tareas a realizar

Medir los ángulos de contacto de los biomateriales con la finalidad de conocer su energía superficial.

Continuar con la síntesis de diferentes composiciones de vidrios y lograr su inclusión en matrices poliméricas para poder lograr los objetivos de bioactividad.

Realizar cultivos biológicos con los biomateriales, con la finalidad de brindar un soporte para el estudio in vitro de la leucemia linfoblástica aguda.

Determinar los tipos de interacciones químicas presentes en los biomateriales cuando se encuentren en contacto con los líquidos biológicos provenientes del cuerpo humano.

Obtener los andamios híbridos O/I clase II, con sus correspondientes caracterizaciones.

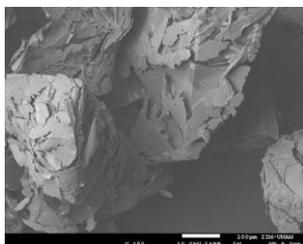
Determinar la porosidad relativa de los andamios obtenidos, en función de la diferencia de potencial aplicada, distancia inyector-colector, concentración y humedad relativa.

Apéndices.

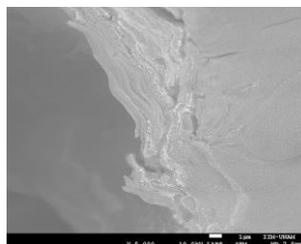
Biovidrios

Caracterización por MEB y Análisis Químico Dimensional de la composición de biovidrio V70P.

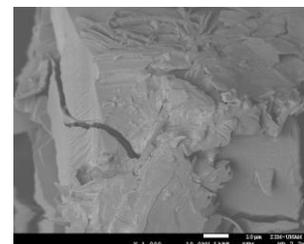
Micrografías del biovidrio V70P



a)



b)



c)

Figura 3.7. Micrografías de la muestra V70P, de acuerdo con los aumentos: a) 150, b) 5000 y c) 1000.

EDS de la muestra V70P.

Standard :

C CaCO₃ 1-Jun-1999 12:00 AM

O SiO₂ 1-Jun-1999 12:00 AM

Si SiO₂ 1-Jun-1999 12:00 AM

P GaP 1-Jun-1999 12:00 AM

| Element | Weight% | Atomic% |
|---------|---------|---------|
| C K | 13.77 | 48.81 |
| O K | 16.46 | 43.78 |
| Si K | 2.22 | 3.36 |
| P K | 2.94 | 4.04 |
| Totals | 35.39 | |

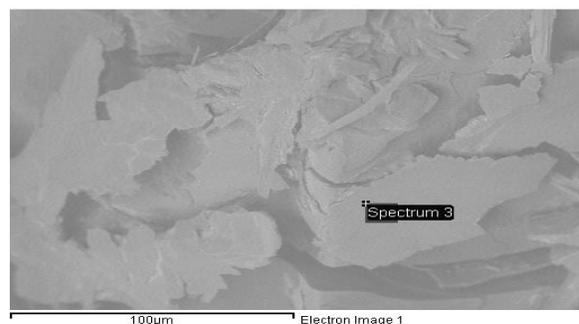
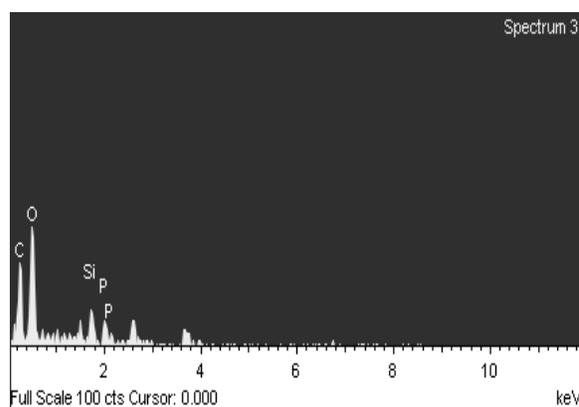


Figura 3.8. Análisis elemental de la muestra V70P.

Micrografías del biovidrio V65P.

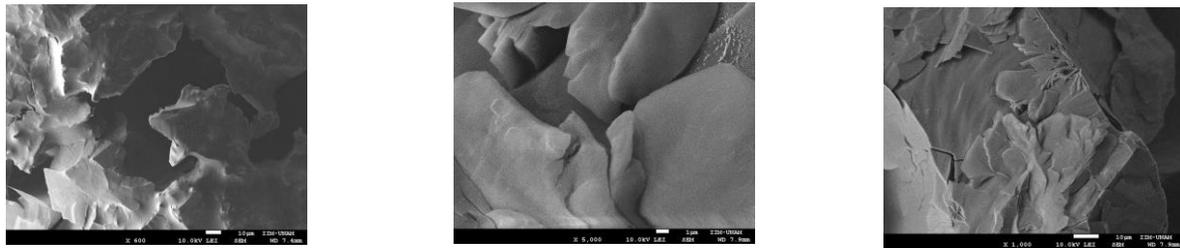


Figura 3.5. Micrografías de la muestra de acuerdo con los aumentos:
a) 600 x, b)5,000 x y c) 1000.

EDS de la muestra V65P.

Standard :

C CaCO₃ 1-Jun-1999 12:00 AM
 O SiO₂ 1-Jun-1999 12:00 AM
 Si SiO₂ 1-Jun-1999 12:00 AM
 P GaP 1-Jun-1999 12:00 AM
 Cl KCl 1-Jun-1999 12:00 AM
 Ca Wollastonite 1-Jun-1999 12:00 AM

| Element | Weight% | Atomic% |
|---------|---------|---------|
| C K | 34.99 | 20.48 |
| O K | 122.73 | 53.94 |
| Si K | 19.55 | 4.89 |
| P K | 32.26 | 7.32 |
| Cl K | 23.98 | 4.75 |
| Ca K | 49.08 | 8.61 |
| Totals | 282.58 | |

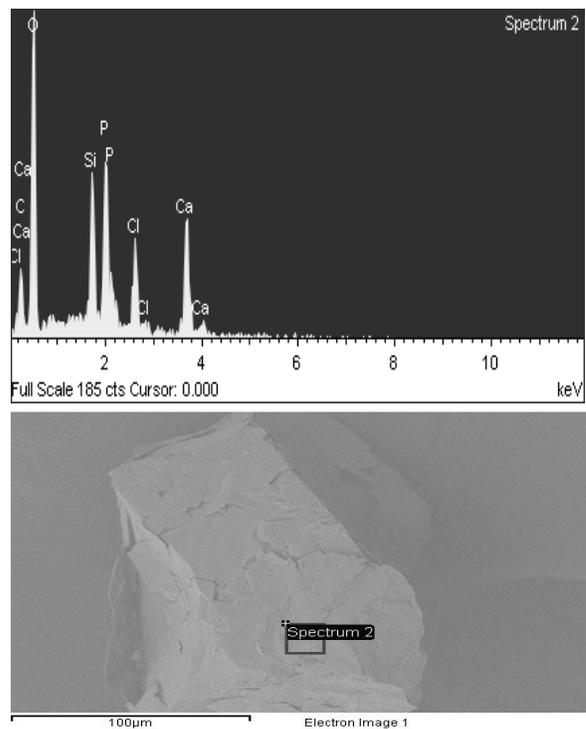


Figura 3.6. Análisis elemental de la muestra V65P.

Micrografías del biovidrio V60P.



Figura 3.3. Micrografías de la muestra V60P de acuerdo con los aumentos:
a) 600 x, b)10,000 x y c) 1000.

EDS de la muestra V60P.

Standard :

C CaCO3 1-Jun-1999 12:00 AM
 O SiO2 1-Jun-1999 12:00 AM
 Si SiO2 1-Jun-1999 12:00 AM
 P GaP 1-Jun-1999 12:00 AM
 Cl KCl 1-Jun-1999 12:00 AM
 Ca Wollastonite 1-Jun-1999 12:00 A

| Element | Weight% | Atomic% |
|---------|---------|---------|
| C K | 21.16 | 20.14 |
| O K | 66.26 | 47.32 |
| Si K | 16.73 | 6.81 |
| P K | 23.01 | 8.49 |
| Cl K | 23.60 | 7.61 |
| Ca K | 33.81 | 9.64 |
| Totals | 184.57 | |

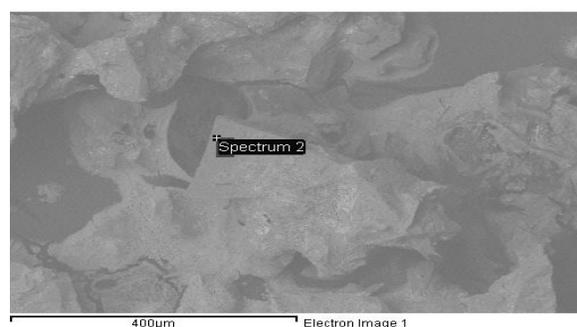
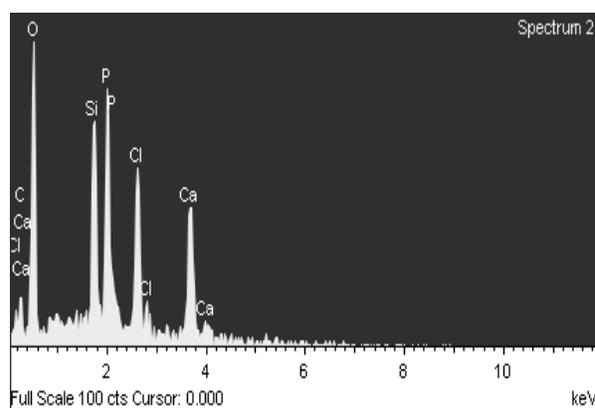


Figura 3.4 Análisis elemental de la muestra V60P.

Micrografías del biovidrio V55P

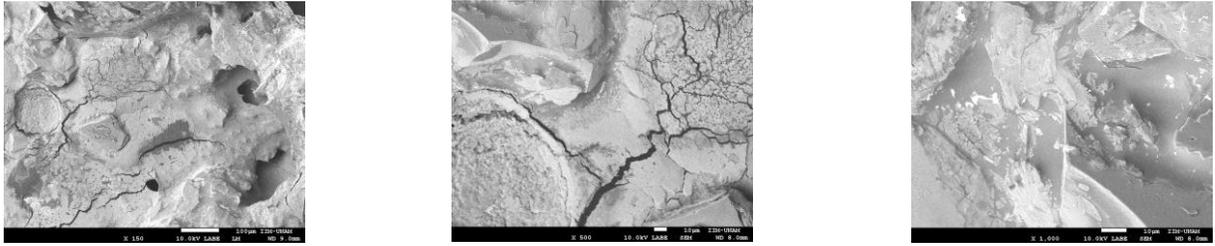


Figura 3.8. Micrografías de la muestra V55P de acuerdo con los aumentos:
a) 150 , b) 600 y c) 1000

EDS de la muestra V55P.

Standard :

O SiO₂ 1-Jun-1999 12:00 AM

Si SiO₂ 1-Jun-1999 12:00 AM

Cl KCl 1-Jun-1999 12:00 AM

Ca Wollastonite 1-Jun-1999 12:00 AM

| Element | Weight% | Atomic% |
|---------|---------|---------|
| O K | 0.00 | 0.00 |
| Si K | 31.04 | 50.35 |
| Cl K | 19.31 | 24.82 |
| Ca K | 21.84 | 24.83 |
| Totals | 72.19 | |

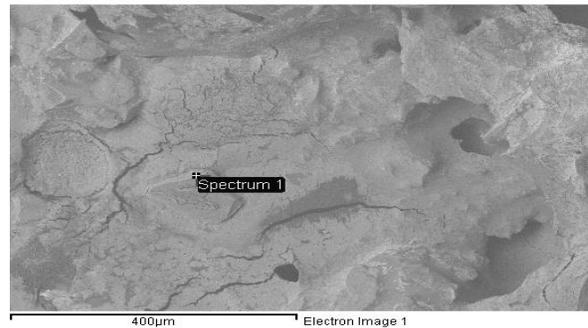
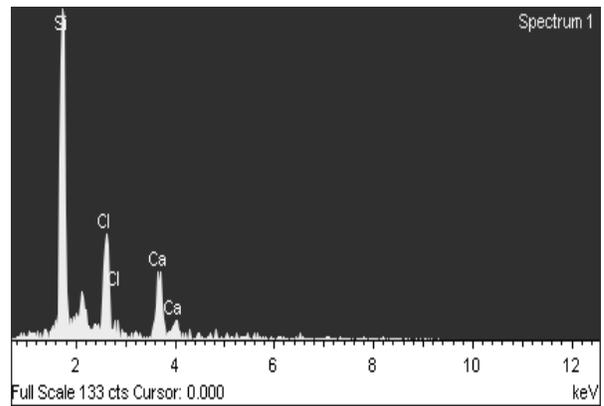


Figura 3.4 Análisis elemental de la muestra V55P.

Micrografías del biovidrio V70P6.

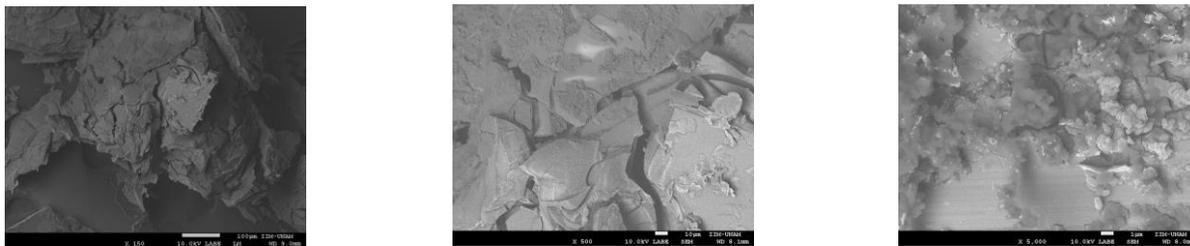


Figura 3.8. Micrografías de la muestra V70P6 de acuerdo con los aumentos:
a) 150, b) 500 y c) 5000.

Micrografías del biovidrio V60P5.

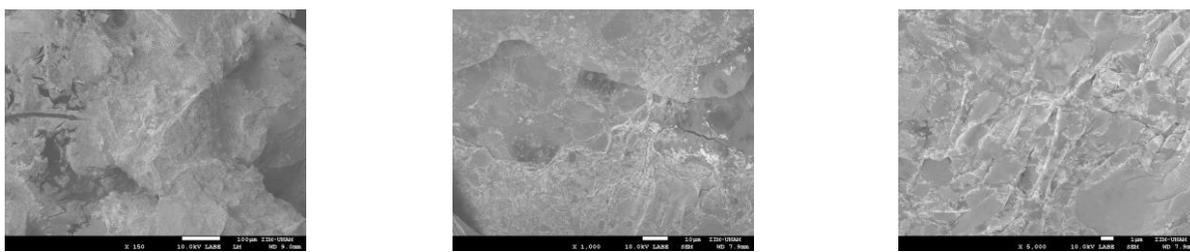


Figura 3.8. Micrografías de la muestra V60P5 de acuerdo con los aumentos:
a) 150, b) 1,000 y c) 5000.

EDS de la muestra V60P5.

Standard :
 O SiO₂ 1-Jun-1999 12:00 AM
 Si SiO₂ 1-Jun-1999 12:00 AM
 Cl KCl 1-Jun-1999 12:00 AM
 Ca Wollastonite 1-Jun-1999 12:00 AM

| Element | Weight% | Atomic% |
|---------|---------|---------|
| O K | 76.56 | 54.45 |
| Si K | 53.36 | 21.62 |
| Cl K | 47.09 | 15.11 |
| Ca K | 31.09 | 8.83 |
| Totals | 208.10 | |

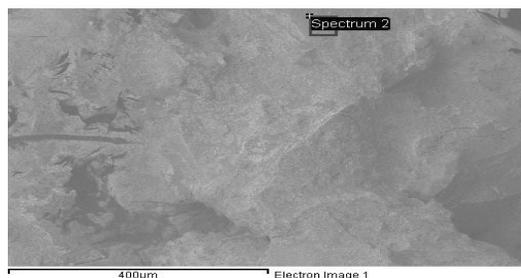


Figura 3.4 Análisis elemental de la muestra V60P5.

Micrografías del biovidrio V60P6.

Standard :

C CaCO3 1-Jun-1999 12:00 AM

O SiO2 1-Jun-1999 12:00 AM

Si SiO2 1-Jun-1999 12:00 AM

Cl KCl 1-Jun-1999 12:00 AM

Ca Wollastonite 1-Jun-1999 12:00 AM

| Element | Weight% | Atomic% |
|---------|---------|---------|
| C K | 30.54 | 21.40 |
| O K | 105.24 | 55.37 |
| Si K | 44.67 | 13.39 |
| Cl K | 29.46 | 6.99 |
| Ca K | 13.58 | 2.85 |
| Totals | 223.49 | |

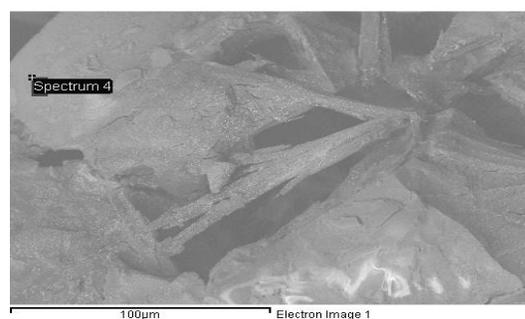
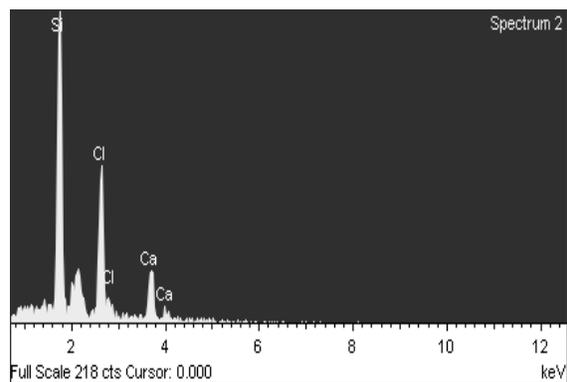
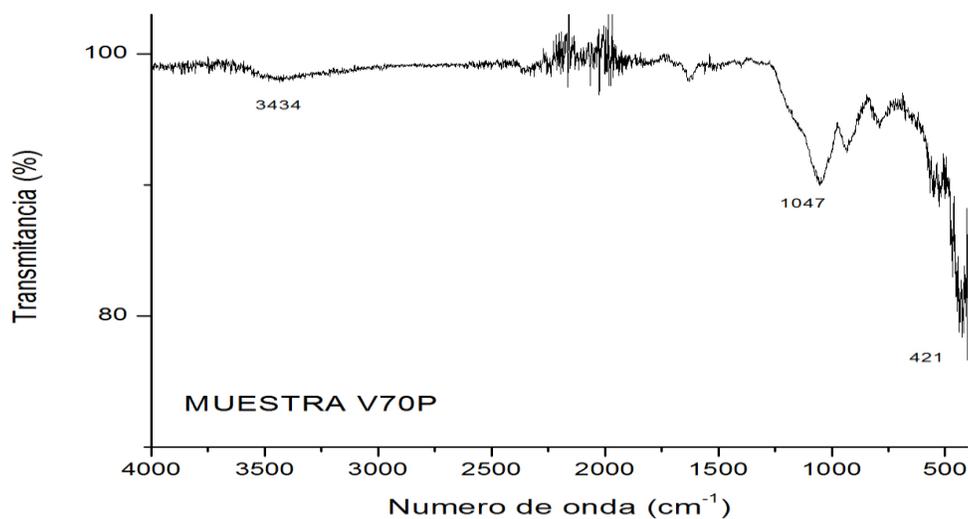


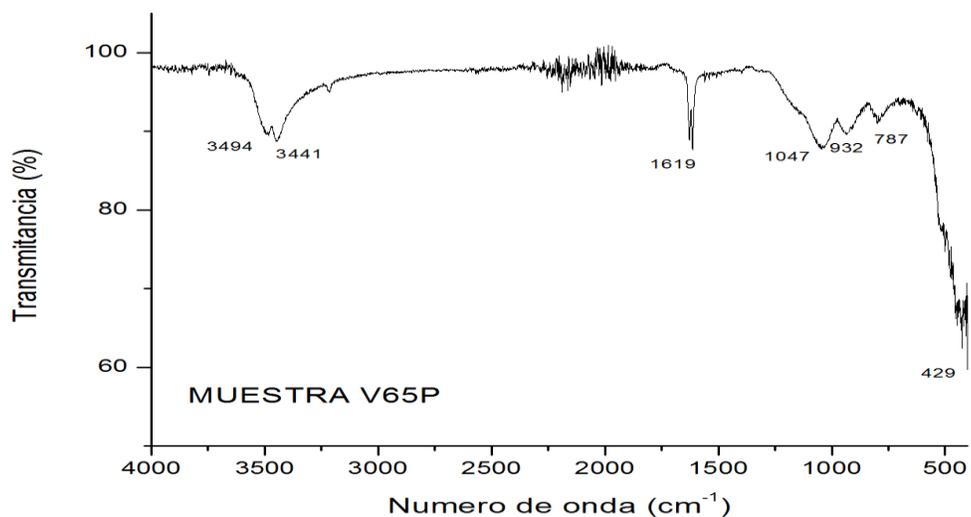
Figura 3.4 Análisis elemental de la muestra V60P6.

FTIR de los biovidrios a diferentes composiciones.

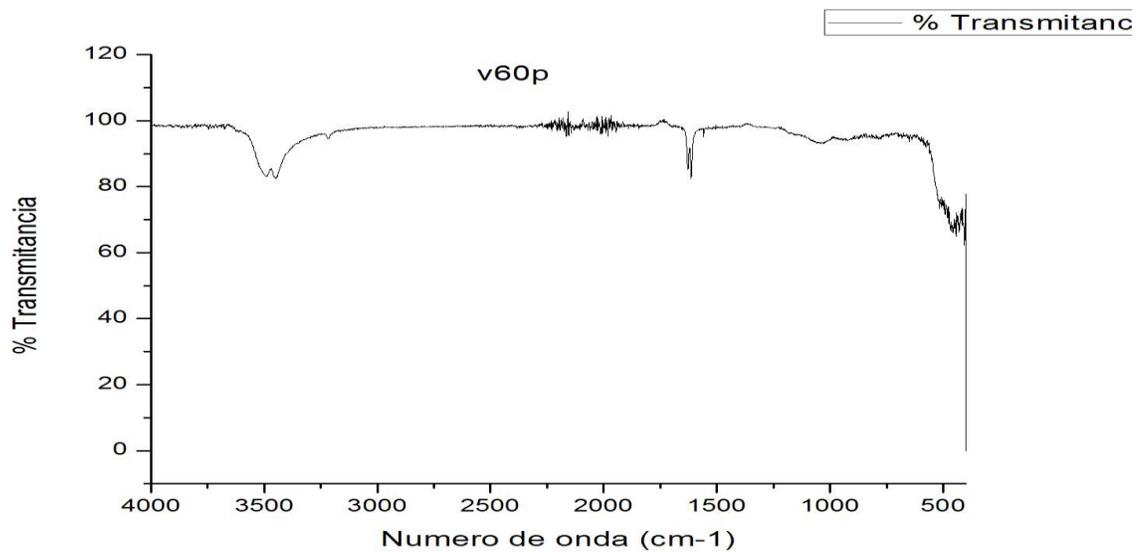
Espectro IR de la composición V70P



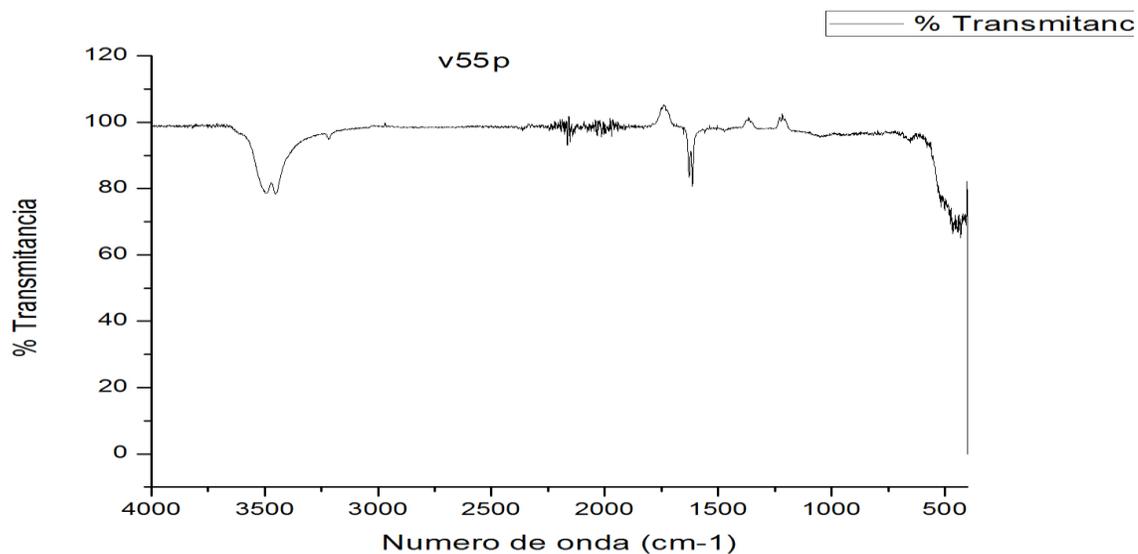
Espectro IR de la composición V65P



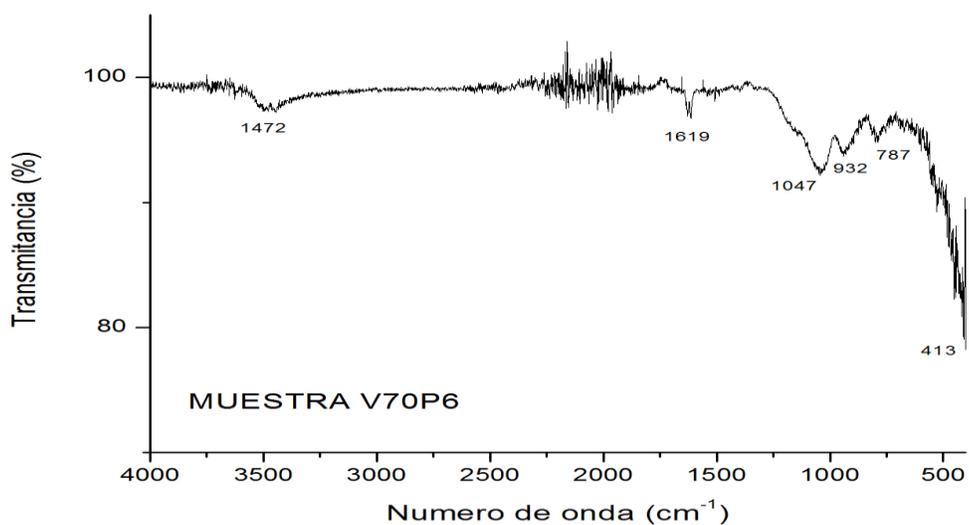
Espectro IR de la composición V60P



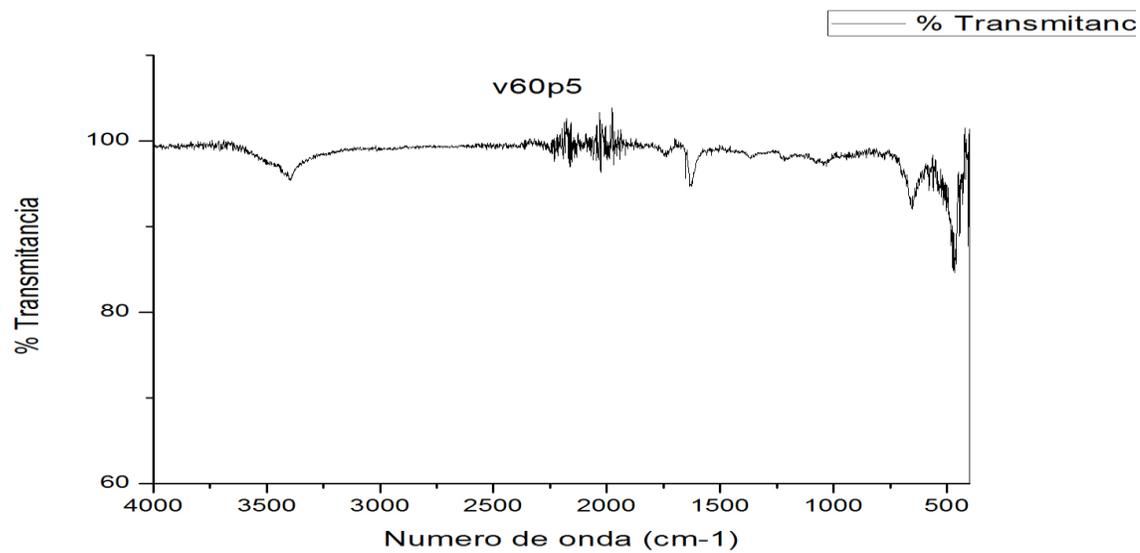
Espectro IR de la composición V55P.



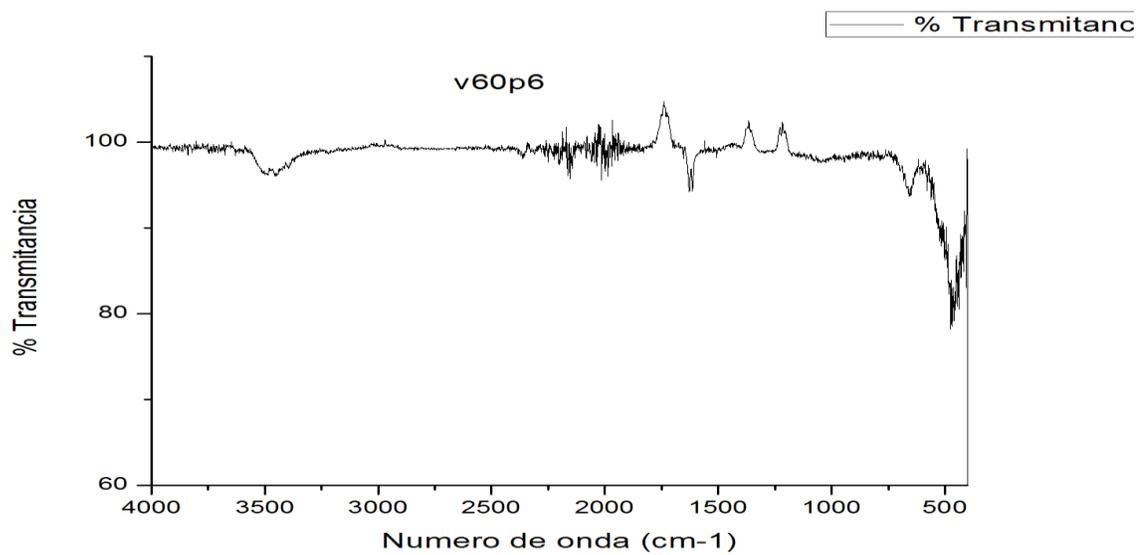
Espectro IR de la composición V70P6.



Espectro IR de la composición V60P5.

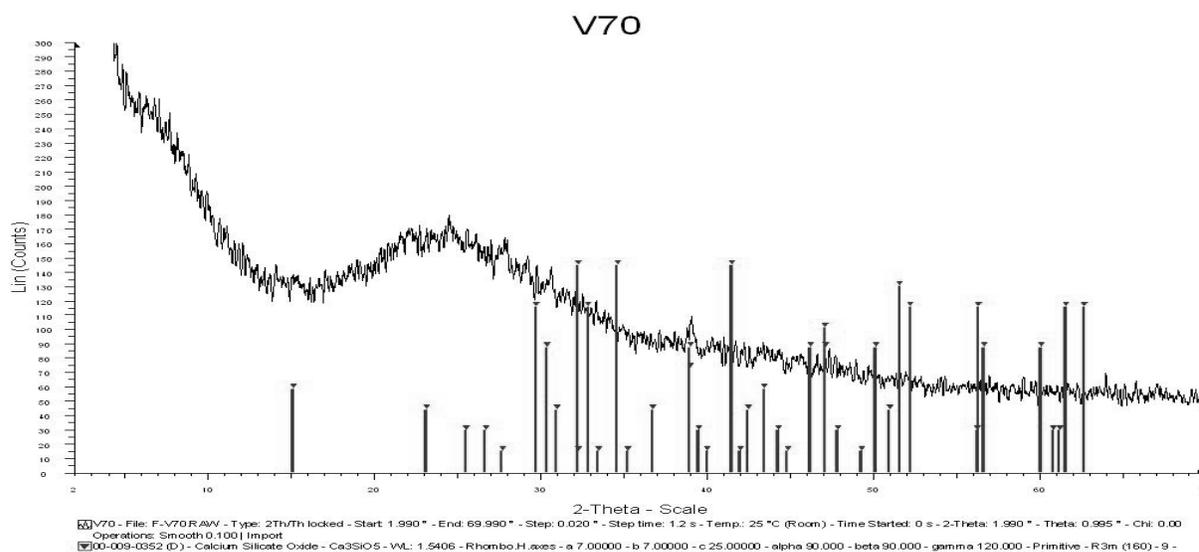


Espectro IR de la composición V60P6.

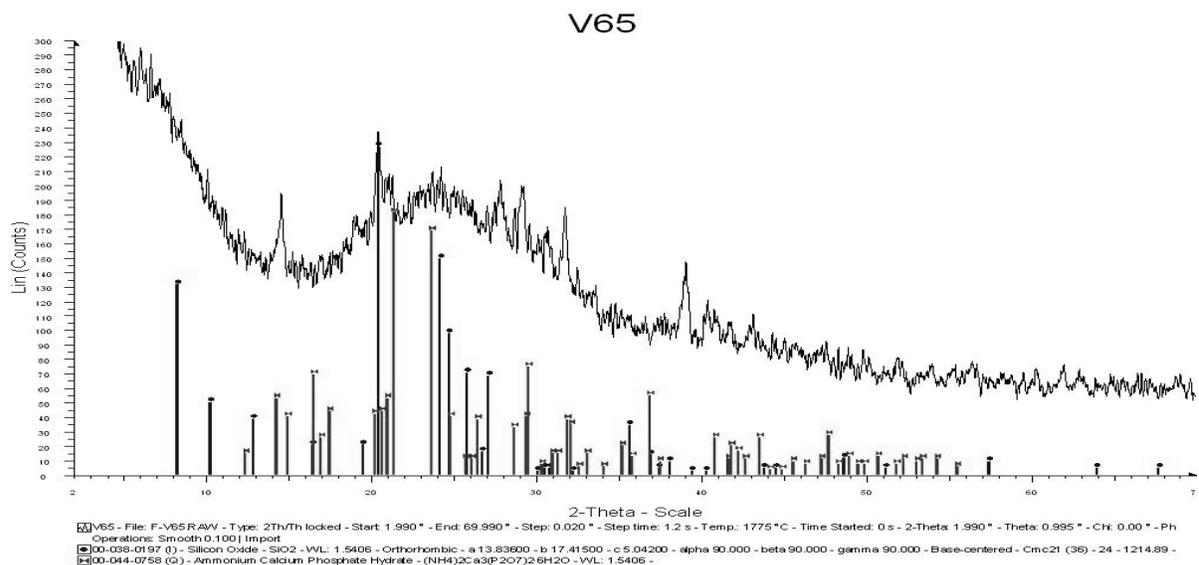


3.3.3 DRX de los biovidrios a diferentes composiciones.

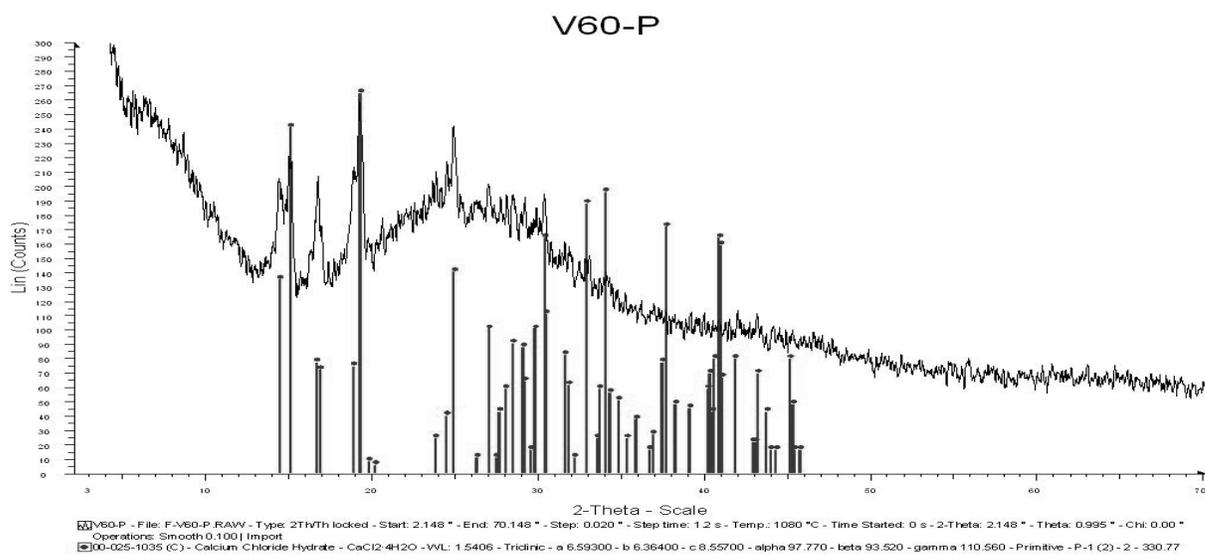
Espectro de rayos X de la muestra V70P.



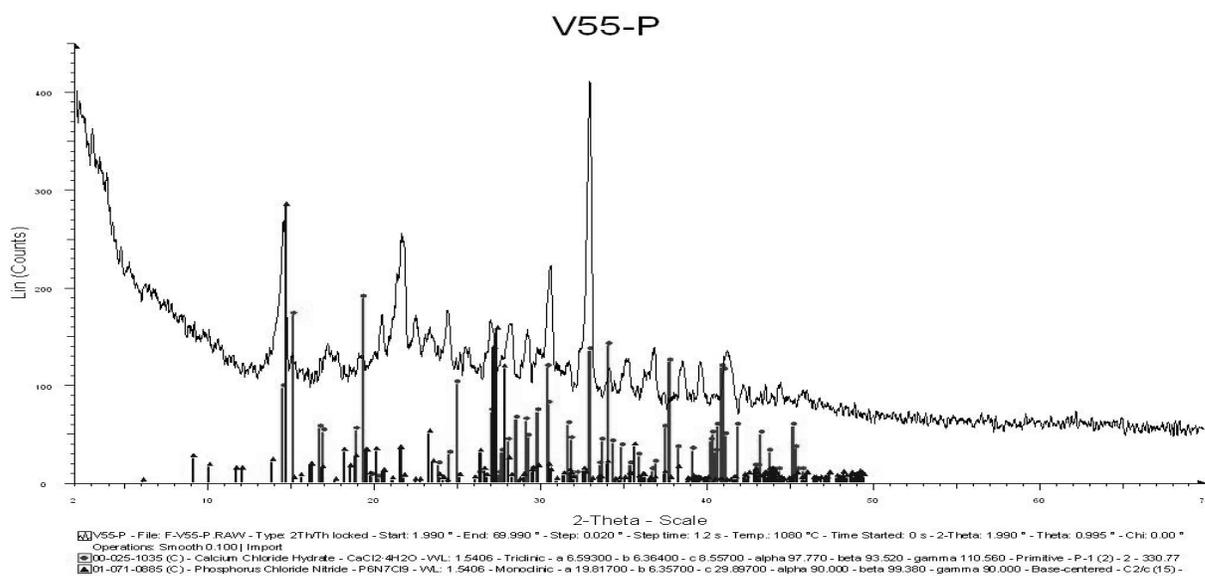
Espectro de rayos X de la muestra V65P.



Espectro de rayos X de la muestra V60P.

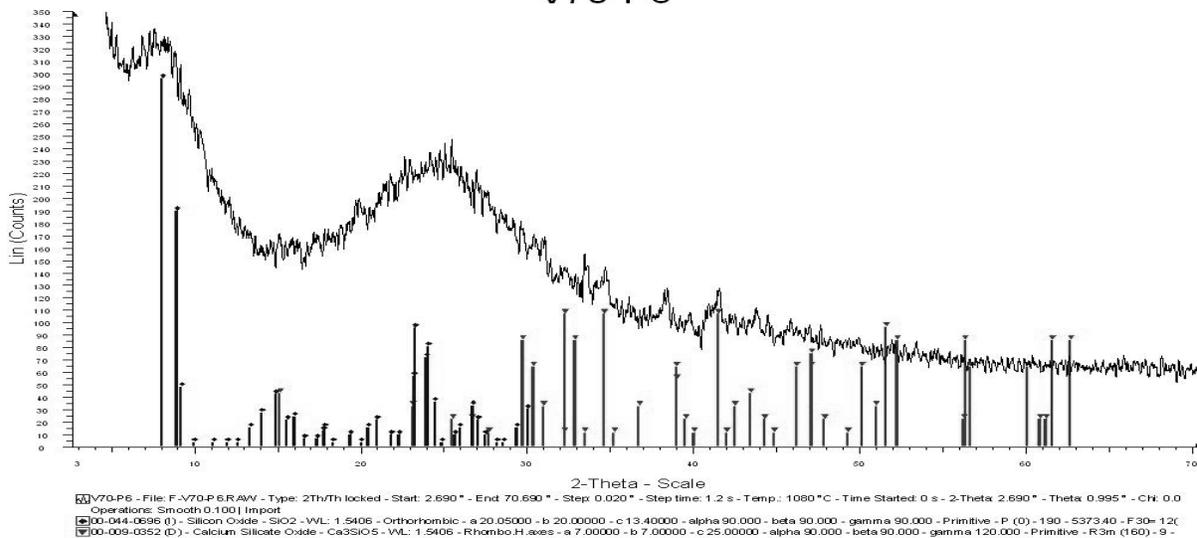


Espectro de rayos X de la muestra V55P.



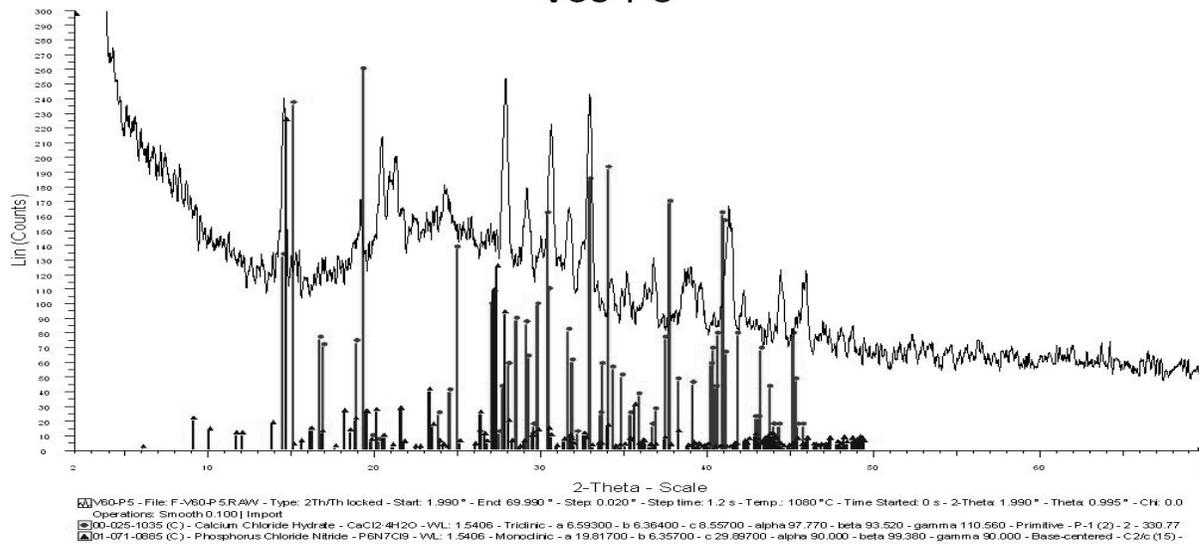
Espectro de rayos X de la muestra V70P6.

V70-P6



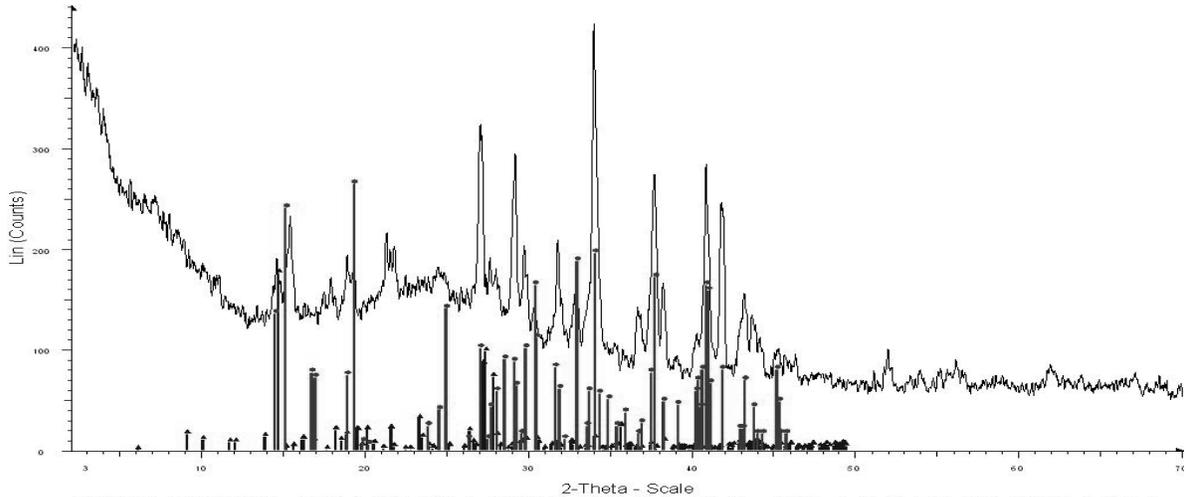
Espectro de rayos X de la muestra V60P5.

V60-P5



Espectro de rayos X de la muestra V60P6.

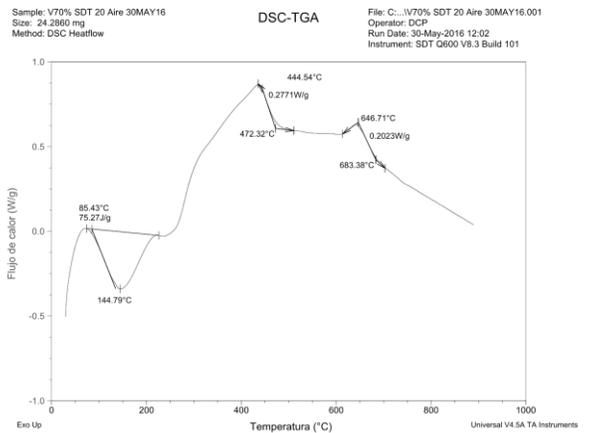
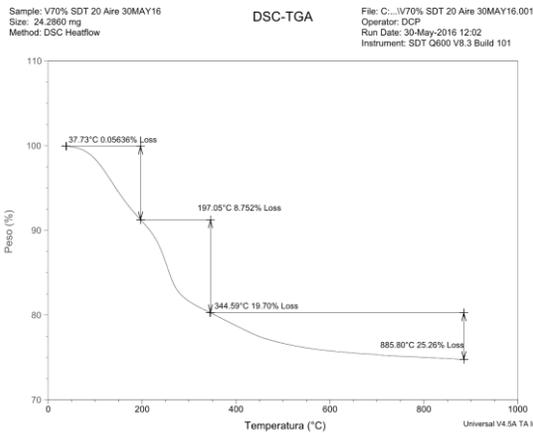
V60-P6



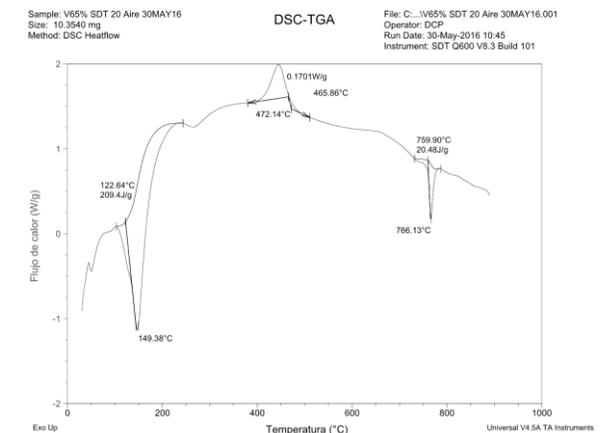
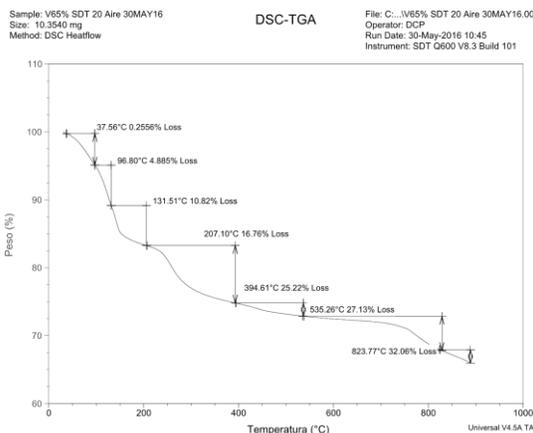
V60-P6 - File: F:\V60-P6\RAW - Type: 2Th/Th locked - Start: 2.062° - End: 70.062° - Step: 0.020° - Step time: 1.2 s - Temp.: 25 °C (Room) - Time Started: 0 s - 2-Theta: 2.062° - Theta: 0.995° - C
 Operations: Smooth 0.1001 Impoint
 00-025-1035 (C) - Calcium Chloride Hydrate - CaCl₂·4H₂O - VL: 1.5406 - Triclinic - a 6.59300 - b 6.36400 - c 6.55700 - alpha 97.770 - beta 93.520 - gamma 110.560 - Primitive - P-1 (2) - 2 - 330.77
 01-071-0885 (C) - Phosphorus Chloride Nitride - P6N7Cl9 - VL: 1.5406 - Monoclinic - a 19.81700 - b 6.35700 - c 29.89700 - alpha 90.000 - beta 99.380 - gamma 90.000 - Base-centered - C2/c (15) -

3.3.4 TGA y DSC de los biovidrios de las diferentes composiciones.

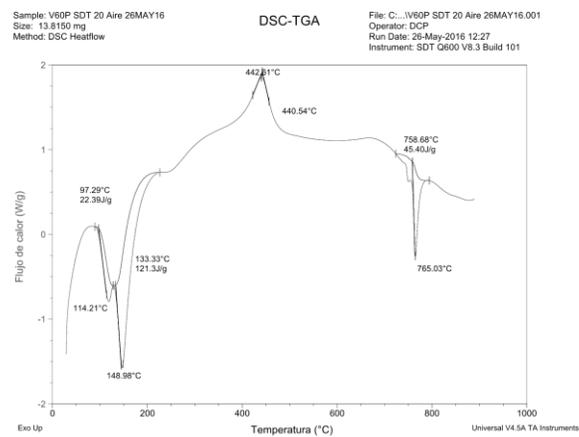
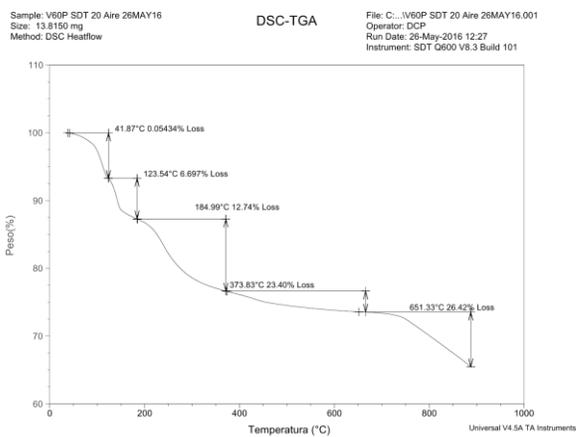
TGA y DSC del vidrio de la composición V70P.



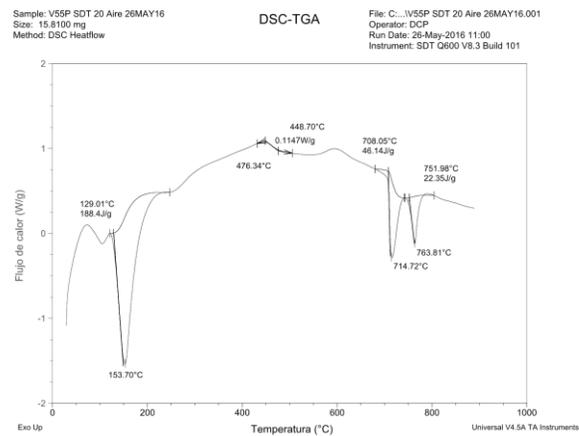
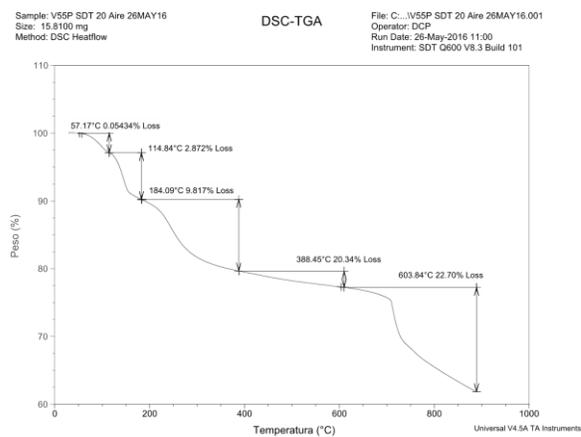
TGA y DSC del vidrio de la composición V65P.



TGA y DSC del vidrio de la composición V60P.



TGA y DSC del vidrio de la composición V55P.



Referencias.

- [1] R. B. Heimann, "Defining Ceramics," *Class. Adv. Ceram. From Fundam. to Appl.*, pp. 1–592, 2010.
- [2] S. F. Hulbert, L. L. Hench, D. Forbers, and L. S. Bowman, "History of bioceramics," *Ceram. Int.*, vol. 8, no. 4, pp. 131–140, 1982.
- [3] W. Cao and L. L. Hench, "Bioactive materials," *Ceram. Int.*, vol. 22, no. 6, pp. 493–507, Jan. 1996.
- [4] A. Kołodziejczak-Radzimska and T. Jesionowski, "Zinc Oxide—From Synthesis to Application: A Review," *Materials (Basel)*, vol. 7, pp. 2833–2881, 2014.
- [5] J. L. Espartero, I. Rashkov, S. M. Li, N. Manolova, and M. Vert, "NMR Analysis of Low Molecular Weight Poly (lactic acid) s," vol. 9297, no. 95, pp. 3535–3539, 1996.
- [6] H. Davis and J. Leach, "Hybrid and Composite Biomaterials in Tissue Engineering," *Top. Multifunct. Biomater. devices*, no. 530, pp. 1–26, 2008.
- [7] B. A. Allo, D. O. Costa, S. J. Dixon, K. Mequanint, and A. S. Rizkalla, "Bioactive and Biodegradable Nanocomposites and Hybrid Biomaterials for Bone Regeneration," *J. Funct. Biomater.*, vol. 3, no. 4, pp. 432–463, 2012.
- [8] M. E. Furth and A. Atala, *Principles of Tissue Engineering*. 2014.
- [9] W. M. Saltzman, *Tissue engineering: engineering principles for the design of replacement organs and tissues*. 2004.
- [10] B. P. J. a. H. R. P. J. D. Bronzino, *Tissue Engineering*. 2003.
- [11] S. V. Dorozhkin, "Biocomposites and hybrid biomaterials based on calcium orthophosphates.," *Biomatter*. 2011.
- [12] S. V. Dorozhkin, "Biocomposites and hybrid biomaterials based on calcium orthophosphates.," *Biomatter*, vol. 1, no. 1, pp. 3–56, 2011.
- [13] P. A. Gunatillake, "BIODEGRADABLE SYNTHETIC POLYMERS FOR TISSUE ENGINEERING," *Eur. Cells Mater.*, vol. 5, pp. 1–16, 2003.
- [14] K. Rezwani, Q. Z. Chen, J. J. Blaker, and A. R. Boccaccini, "Biodegradable and bioactive porous polymer/inorganic composite scaffolds for bone tissue engineering," *Biomaterials*. 2006.
- [15] D. Puppi, F. Chiellini, A. M. Piras, and E. Chiellini, "Polymeric materials for bone and cartilage repair," *Prog. Polym. Sci.*, vol. 35, no. 4, pp. 403–440, 2010.
- [16] B. D. Ulery, L. S. Nair, and C. T. Laurencin, "Biomedical applications of biodegradable polymers," *Journal of Polymer Science, Part B: Polymer Physics*. 2011.
- [17] K. A. Athanasiou, C. M. Agrawal, F. A. Barber, and S. S. Burkhart, "Orthopaedic applications for PLA-PGA biodegradable polymers," *Arthroscopy*, vol. 14, no. 7, pp. 726–737, 1998.
- [18] D. Bendix, "Chemical synthesis of polylactide and its copolymers for medical applications," *Polym. Degrad. Stab.*, vol. 59, no. 1–3, pp. 129–135, 1998.
- [19] B. Samuneva, P. Djambaski, E. Kashchieva, G. Chernev, L.

- Kabaivanova, E. Emanuilova, I. M. M. Salvado, M. H. V Fernandes, and A. Wu, "Sol-gel synthesis and structure of silica hybrid biomaterials," *J. Non. Cryst. Solids*, vol. 354, no. 2–9, pp. 733–740, 2008.
- [20] J. A. Hubbell, "Synthetic biodegradable polymers for tissue engineering and drug delivery," *Curr. Opin. Solid State Mater. Sci.*, vol. 3, pp. 246–251, 1998.
- [21] L. L. Hench and J. M. Polak, "Third-Generation Biomedical Materials," vol. 1014, 2002.
- [22] T. J. Webster, C. Ergun, R. H. Doremus, R. W. Siegel, and R. Bizios, "Specific proteins mediate enhanced osteoblast adhesion on nanophase ceramics," *J. Biomed. Mater. Res.*, vol. 51, no. 3, pp. 475–483, 2000.
- [23] S. H. Rhee, Y. K. Lee, B. S. Lim, J. J. Yoo, and H. J. Kim, "Evaluation of a novel poly(ϵ -caprolactone)-organosiloxane hybrid materials for the potential application as a bioactive and degradable bone substitute," *Biomacromolecules*, vol. 5, no. 4, pp. 1575–1579, 2004.
- [24] S.-H. Rhee, "Bone-like apatite-forming ability and mechanical properties of poly(ϵ -caprolactone)/silica hybrid as a function of poly(ϵ -caprolactone) content," *Biomaterials*, vol. 25, no. 7–8, pp. 1167–1175, 2004.
- [25] A. I. Martín, A. J. Salinas, and M. Vallet-Regí, "Bioactive and degradable organic-inorganic hybrids," *J. Eur. Ceram. Soc.*, vol. 25, no. 16, pp. 3533–3538, 2005.
- [26] B. A. Allo, "Sol-Gel derived biodegradable and bioactive organic-inorganic hybrid biomaterials for bone tissue engineering," 2013.
- [27] C. J. Sanchez B. Belleville, P. Popall, M., "Applications of hybrid organic-inorganic nanocomposites," *J. Mater. Chem.*, vol. 15, pp. 3559–3592, 2005.
- [28] J. R. Jones, "New trends in bioactive scaffolds: The importance of nanostructure," *J. Eur. Ceram. Soc.*, vol. 29, no. 7, pp. 1275–1281, 2009.
- [29] K. Nie, W. Pang, Y. Wang, F. Lu, and Q. Zhu, "Effects of specific bonding interactions in poly(ϵ -caprolactone)/silica hybrid materials on optical transparency and melting behavior," *Mater. Lett.*, vol. 59, no. 11, pp. 1325–1328, 2005.
- [30] Q. Chen, M. Kamitakahara, N. Miyata, T. Kokubo, and T. Nakamura, "Preparation of bioactive PDMS-modified CaO-SiO₂-TiO₂ hybrids by the sol-gel method," *J. Sol-Gel Sci. Technol.*, vol. 19, no. 1–3, pp. 101–105, 2000.
- [31] "154 Microstructure and Macroscopic Properties of Bioactive CaO-SiO₂-PDMS Hybrids."
- [32] Q. Chen, N. Miyata, T. Kokubo, and T. Nakamura, "Bioactivity and mechanical properties of PDMS-modified CaO-SiO₂-TiO₂ hybrids prepared by sol-gel process," *J. Biomed. Mater. Res.*, 2000.
- [33] "156 Bioactivity and Mechanical Properties of Poly(dimethylsiloxane)-Modified Calcium-Silica Hybrids with Added Titania."

- [34] D. Tian, S. Blacher, P. Dubois, and R. Jérôme, "Biodegradable and biocompatible inorganic-organic hybrid materials. 2. Dynamic mechanical properties, structure and morphology," *Polymer (Guildf)*., vol. 39, no. 4, pp. 855–864, 1998.
- [35] D. Tian, S. Blacher, J.-P. Pirard, and R. Jérôme, "Biodegradable and biocompatible inorganic-organic hybrid materials. 3. A valuable route to the control of the silica porosity," *Langmuir*, vol. 14, no. 7, pp. 1905–1910, 1998.
- [36] D. Tian, P. H. Dubois, and R. Je, "Biodegradable and Biocompatible Inorganic – Organic Hybrid Materials . I . Synthesis and Characterization," pp. 2295–2309, 1997.
- [37] S. H. Rhee, J. Y. Choi, and H. M. Kim, "Preparation of a bioactive and degradable poly(ε-caprolactone)/silica hybrid through a sol-gel method," *Biomaterials*, vol. 23, no. 24, pp. 4915–4921, 2002.
- [38] S.-H. Rhee, "Effect of molecular weight of poly(ε-caprolactone) on interpenetrating network structure, apatite-forming ability, and degradability of poly(ε-caprolactone)/silica nano-hybrid materials," *Biomaterials*, vol. 24, no. 10, pp. 1721–1727, 2003.
- [39] K. Nie, S. Zheng, F. Lu, and Q. Zhu, "Inorganic-organic hybrids involving poly(ε-caprolactone) and silica network: Hydrogen-bonding interactions and isothermal crystallization kinetics," *J. Polym. Sci. Part B Polym. Phys.*, vol. 43, no. 18, pp. 2594–2603, Sep. 2005.
- [40] S.-H. Rhee, "Effect of calcium salt content in the poly(ε-caprolactone)/silica nanocomposite on the nucleation and growth behavior of apatite layer.," *J. Biomed. Mater. Res. A*, vol. 67, no. 4, pp. 1131–8, 2003.
- [41] S. Ramakrishna, J. Mayer, E. Wintermantel, and K. W. Leong, "Biomedical applications of polymer-composite materials: A review," *Compos. Sci. Technol.*, vol. 61, no. 9, pp. 1189–1224, 2001.
- [42] M. Ajioka, K. Enomoto, and S. K., "The basic properties of poly lactic acid produced by the direct condensation polymerisation of lactic acid," *J. Environ. Polym. Degrad.*, vol. 3, no. 4, pp. 225–234, 1995.
- [43] J. Ahmed and S. K. Varshney, "Polylactides—Chemistry, Properties and Green Packaging Technology: A Review," *Int. J. Food Prop.*, vol. 14, no. 1, pp. 37–58, 2011.
- [44] J. R. Dorgan, H. Lehermeier, and M. Mang, "Thermal and Rheological Properties of Commercial-Grade Poly (Lactic Acid)s," *J. Polym. Environ.*, vol. 8, no. 1, pp. 1–9, 2000.
- [45] V. H. Sangeetha, H. Deka, T. O. Varghese, and S. K. Nayak, "State of the art and future prospectives of poly(lactic acid) based blends and composites," *Polymer Composites*, 2016.
- [46] A. J. R. Lasprilla, A. G. R. Martinez, B. H. Lunelli, J. E. J. Figueroa, A. L. Jardini, and R. M. Filho, "Synthesis and Characterization of Poly (Lactic Acid) for Use in Biomedical Field," *Chem. Eng. Trans.*, vol. 24, pp. 985–990, 2010.
- [47] F. Shi, *Ceramic Materials – Progress in Modern Ceramics*. 2012.

- [48] J. R. Jones, "Review of bioactive glass: from Hench to hybrids.," *Acta Biomater.*, vol. 9, no. 1, pp. 4457–86, 2013.
- [49] M. Vallet-Regí, "Ceramics for medical applications," *J. Chem. Soc. Dalt. Trans.*, no. 2, pp. 97–108, 2001.
- [50] A. R??mila, F. Balas, and M. Vallet-Reg??, "Synthesis routes for bioactive sol-gel glasses: Alkoxides versus nitrates," *Chem. Mater.*, vol. 14, no. 2, pp. 542–548, 2002.
- [51] J. R. Jones, "Reprint of: Review of bioactive glass: From Hench to hybrids," *Acta Biomaterialia*, vol. 23, no. S. pp. S53–S82, 2015.
- [52] M. Vallet-Regí, C. V. Ragel, and A. J. Salinas, "Glasses with Medical Applications," *Eur. J. Inorg. Chem.*, vol. 2003, no. 6, pp. 1029–1042, Mar. 2003.
- [53] T. Subbiah, G. S. Bhat, R. W. Tock, S. Parameswaran, and S. S. Ramkumar, "Electrospinning of nanofibers," *J. Appl. Polym. Sci.*, vol. 96, no. 2, pp. 557–569, 2005.
- [54] N. Bhardwaj and S. C. Kundu, "Electrospinning: A fascinating fiber fabrication technique," *Biotechnol. Adv.*, vol. 28, no. 3, pp. 325–347, 2010.
- [55] B. Ghorani and N. Tucker, "Fundamentals of electrospinning as a novel delivery vehicle for bioactive compounds in food nanotechnology," *Food Hydrocoll.*, vol. 51, pp. 227–240, 2015.
- [56] T. Han and A. Introduction, *Electrospinning and Nanofibers*. 2007.
- [57] G. W. S. C. Jeffrey Brinker, *Sol-Gel Science The physics and chemistry of sol-gel processing*. 1990.
- [58] Y. Dimitriev, Y. Ivanova, and R. Iordanova, "History of Sol-Gel Science and Technology (Review)," *Glas. Ceram.*, vol. 43, pp. 181–192, 2008.
- [59] D. G. Rao, N. Sabu, R. Jayanna, and P. Nagar, "Acute Lymphoblastic Leukemia in Children," *J Indian Aca Oral Med Radiol*, vol. 25, no. 3, pp. 178–183, 2013.
- [60] J. M. Mejía-Aranguré and R. J. Q. McNally, "Acute Leukemia in Children," *Biomed Res. Int.*, vol. 2015, no. JUNE 2015, pp. 1–2, 2015.
- [61] J. E. Wagner and E. Gluckman, "Umbilical Cord Blood Transplantation: The First 20 Years," *Semin. Hematol.*, vol. 47, no. 1, pp. 3–12, 2010.
- [62] a Carrassi and S. Abati, "[Introduction to scanning electron microscopy].," *Mondo Odontostomatol.*, vol. 29, no. 2, pp. 29–36, 2007.
- [63] J. Renau-piqueras and M. Faura, "Principios básicos del Microscopio Electrónico de Barrido," *Cent. Investig. Hosp. "La Fé,"* pp. 73–92, 1965.
- [64] "Microscopio electrónico de barrido (SEM)," *Chem. ...*, p. 5, 2004.
- [65] A. Ospina-Orejarena, "Obtención y caracterización de nanofibras de poli (ácido láctico) modificado con colágeno mediante la técnica de electrohilado," UNiversidad Nacional Autónoma de México, 2011.
- [66] I. D. Por and E. Y. Por, "Tema 3 : Difracción De Rayos-X y Estructura Cristalina," pp. 1–15.
- [67] B. a. Allo, A. S. Rizkalla, and K. Mequanint, "Synthesis and electrospinning of ??-polycaprolactone-bioactive glass hybrid biomaterials via a sol-gel process," *Langmuir*, vol. 26, no. 23, pp.

- 18340–18348, 2010.
- [68] Y. F. Luo, Y. L. Wang, X. F. Niu, J. Pan, and L. P. Shi, “Synthesis and Characterization of a Novel Biomaterial : Maleic Anhydride-modified Poly (dl-lactic acid),” vol. 15, no. 5, pp. 521–524, 2004.
- [69] K. Hamad, M. Kaseem, H. W. Yang, F. Deri, and Y. G. Ko, “Properties and medical applications of polylactic acid: A review,” *Express Polym. Lett.*, vol. 9, no. 5, pp. 435–455, 2015.
- [70] E. Y. Gómez-Pachón, F. M. Sánchez-Arévalo, F. J. Sabina, A. Maciel-Cerda, R. M. Campos, N. Batina, I. Morales-Reyes, and R. Vera-Graziano, “Characterisation and modelling of the elastic properties of poly(lactic acid) nanofibre scaffolds,” *J. Mater. Sci.*, vol. 48, no. 23, pp. 8308–8319, 2013.