



**UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE ODONTOLÓGIA
INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS
ODONTOLÓGICAS
LABORATORIO DE NANOBIO MATERIALES**

**“OPTIMIZACIÓN DE LA PREPARACIÓN DE ANDAMIOS
BIONANOCOMPÓSITOS PARA REGENERACIÓN ÓSEA BASADOS EN
BIOPOLÍMEROS Y NANOPARTÍCULAS BIOCERÁMICAS”**

Montserrat Cádiz Poblete

**TRABAJO DE INVESTIGACIÓN
REQUISITO PARA OPTAR AL TÍTULO DE
CIRUJANO-DENTISTA**

TUTOR PRINCIPAL

Prof. Dr. Cristian Covarrubias Gallardo

TUTORES ASOCIADOS

Prof. Dr. Mario Díaz- Dosque

Adscrito a Proyecto FONDECYT 1130342

Santiago – Chile

2016

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer al Prof. Dr. Cristian Covarrubias por integrarme al laboratorio de nanobiomateriales en segundo año y por guiarme en cada etapa del desarrollo de este trabajo de investigación

Al Prof. Dr. Mario Diaz-Dosque por su gran colaboración y disposición.

A todos los que han formado parte del equipo del Laboratorio de nanobiomateriales tales como Emmanuel Morelli, Gisselle Escobar, Jonathan Pérez, Rocío Orellana, Amaru Agüero y destacándose Carla Cerda.

A mi familia, especialmente a María Verónica Poblete, Guillermo Cádiz y Martín Cádiz, pilares fundamentales de mi vida y quienes han puesto lo mejor de sí mismos para que pueda alcanzar mis objetivos.

A Felipe Robles, mi pololo, quien me ha apoyado incondicionalmente desde el primer momento, tanto en el ámbito personal como profesional.

A mis grandes amigos: Valentina Morales, Carolina Carrasco, Pamela García, Ricardo Villarroel, Rocío Díaz, Estefanía Castro, Pedro Castillo, Daniela Bordagaray e Isaías Campbell por celebrar las alegrías y apoyarme en las dificultades.

ÍNDICE

1. RESUMEN	1
2. INTRODUCCIÓN	3
3. MARCO TEÓRICO.....	5
1. Injertos óseos.....	5
2. Ingeniería de tejidos.....	7
3. Matriz: Biopolímeros	9
4. Señales bioactivas.....	12
5. Nanotecnología y nanopartículas bioactivas.....	13
6. Bionanocompósitos y su optimización	15
4. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	16
1. HIPÓTESIS.....	16
2. OBJETIVO GENERAL	16
3. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	16
5. METODOLOGÍA.....	17
6. RESULTADOS	24
1. Síntesis de Nanopartículas.....	24
2. Preparación de bionanocompósitos.....	25
3. Caracterización de los bionanocompósitos.....	26
4. Propiedades mecánicas.....	33
5. Evaluación de estabilidad en medio celular y ensayos de degradación <i>in vitro</i>	34
6. Ensayos de bioactividad en fluido fisiológico simulado (SBF).....	40
7. Ensayo preliminar de citocompatibilidad celular	50
7. DISCUSIÓN	51

8. CONCLUSIONES.....	60
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	61

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Elementos fundamentales en la ingeniería de tejidos.....	8
Figura 2. Estructura química de Gelatina.....	9
Figura 3. Estructura química de Quitosano.....	10
Figura 4. Esquema de entrecruzamiento de quitosano mediante glutaraldehído. (Biswal y cols., 2016).....	11
Figura 5. Nanopartículas biocerámicas.....	14
Figura 6. Esquema preparación bionanocompuestos.....	19
Figura 7. Protocolo test Alamar Blue.....	23
Figura 8. Imágenes de microscopía TEM de nanopartículas de n-MBG, MBG, nBG y nHA.....	24
Figura 9. Bionanocompuestos de nHA, n-MBG, MBG y nBG al 5% más QG.	25
Figura 10. Patrón DRX de bionanocompuestos de n-MBG, MBG, nBG y nHA al 5% además de la matriz pura (QG).....	26
Figura 11. Patrón DRX de bionanocompuestos de n-MBG, MBG, nBG y nHA al 25% además de la matriz pura (QG).	27
Figura 12. Espectros FTIR-ATR de bionanocompuestos de n-MBG, MBG, nBG. nHA al 5% y QG.....	28
Figura 13. Espectros FTIR-ATR de bionanocompuestos de n-MBG, MBG, nBG. nHA al 25% y QG.....	29
Figura 14. Imágenes de microscopía SEM de bionanocompuestos de n-MBG, MBG, nBG y, nHA al 5%, junto a QG (100x y 500x).	30
Figura 15. Imágenes SEM de nanopartículas de n-MBG, MBG, nBG y nHA incorporadas en los bionanocompuestos. Análisis EDX de los elementos constituyentes.....	32
Figura 16. Módulo de elasticidad de bionanocompuestos de nBG, nHA, n-MBG y MBG al 5% y 25% y matriz pura (QG). Las barras representan el promedio de 3	

muestras en triplicado. Los corchetes simbolizan la desviación estándar. ($p < 0.05$).	33
Figura 17. Degradación en SBF expresado en porcentaje de pérdida de peso de bionanocompuestos de nHA, MBG, nBG y n-MBG al 5% y 25% y matriz pura (QG) en 1, 3 y 7 días de inmersión en SBF a 37°C. Las barras representan el promedio de 3 muestras en triplicado. Los corchetes simbolizan la desviación estándar. Con asterisco negro se indican los grupos de estudio con valores significativamente diferentes en un mismo tiempo de inmersión. Con asterisco rojo se indican los materiales con valores de pérdida de peso significativamente diferentes respecto al tiempo cero. ($p > 0.05$).	34
Figura 18. Gráfico de variación de pH en el tiempo de bionanocompuestos de n-MBG al 5% y 25% respecto a la matriz pura (QG) sumergidos en agua destilada. Se inserta gráfico con aumento en el rango de tiempo 0 a 20 minutos.	35
Figura 19. Gráfico de variación de pH en el tiempo de bionanocompuestos de MBG al 5% y 25% respecto a la matriz pura (QG) en agua destilada. Se inserta gráfico con aumento en el rango de tiempo 0 a 20 minutos.....	36
Figura 20. Gráfico de variación de pH en el tiempo de bionanocompuestos de nBG al 5% y 25% respecto a la matriz pura (QG) en agua destilada. Se inserta gráfico con aumento en el rango de tiempo 0 a 20 minutos.	36
Figura 21. Gráfico de variación de pH en el tiempo de bionanocompuestos de nHA al 5% y 25% respecto a la matriz pura (QG) en agua destilada. Se inserta gráfico con aumento en el rango de tiempo 0 a 20 minutos.	37
Figura 22. Imagen de bionanocompuestos de QG, nBG 5%, MBG 5%, n-MBG 5% y nHA 5%, sin acondicionamiento previo, luego de 30 minutos de inmersión en medio de cultivo celular.....	38
Figura 23. Imagen de bionanocompuestos de QG, nBG 5%, MBG 5%, n-MBG 5% y nHA 5%, con acondicionamiento previo, luego de 30 minutos de inmersión en medio de cultivo celular.....	38
Figura 24. Patrón DRX de los bionanocompuestos de n-MBG, MBG, nBG y nHA al 5% además de andamio puro QG luego de 7 días de inmersión en SBF.	41
Figura 25. Patrón DRX de los bionanocompuestos de n-MBG, MBG, nBG y nHA al 25% además de andamio puro QG luego de 7 días de inmersión en SBF.	42

Figura 26. Espectro FTIR de bionanocompósitos al 5% después de un 1 día de inmersión en SBF.	43
Figura 28. Espectro FTIR de bionanocompósitos al 5% después de 7 días de inmersión en SBF.	44
Figura 27. Espectro FTIR de bionanocompósitos al 5% después de 3 días de inmersión en SBF.	44
Figura 29. Espectro FTIR de bionanocompósitos al 25% después de 1 día de inmersión en SBF.	45
Figura 30. Espectro FTIR de bionanocompósitos al 25% después de un 3 días de inmersión en SBF.	45
Figura 31. Espectro FTIR de bionanocompósitos al 25% después de 7 días de inmersión en SBF.	46
Figura 32. Espectro FTIR de bionanocompósitos de nHA al 5% con inmersión en agua destilada, con inmersión en SBF 7 días y sin inmersión.	47
Figura 33. Imágenes SEM de los bionanocompósitos de n-MBG, MBG, nBG y nHA al 5% además de andamio puro QG luego de 7 días de inmersión en SBF.	48
Figura 34. Imágenes SEM de bionanocompósitos al 25% y QG, luego de 7 días de inmersión en SBF.	49
Figura 35. Ensayo de citocompatibilidad Alamar Blue de fibroblastos cultivados 1 día en presencia de bionanocompósitos al 5%, matriz pura (QG) y control (células sin presencia del material). ($p < 0.05$).....	50

INDICE DE TABLAS

Tabla 1: Valores de tamaño de partícula y área superficial de nanopartículas de n-MBG, MBG, nBG y nHA.	25
Tabla 2. Tabla de valores de porosidad de andamios de n.-MBG, MBG, nBG, nHA al 5% y QG.....	31
Tabla 3: Valores de pH de bionanocompósitos de n-MBG, MBG, nBG, nHA al 5% y QG con y sin acondicionamiento previo, luego de 30 minutos de inmersión en medio de cultivo celular.....	39

1. RESUMEN

Actualmente se requiere el desarrollo de nuevas terapias para reparar tejido óseo. La ingeniería de tejidos es una disciplina que combina un (andamio) o matriz polimérica, células y señales bioactivas para lograr regenerar un tejido.

Los bionanocompósitos son materiales compuestos por partículas biocerámicas nanométricas incorporadas a un andamio polimérico, que combina las propiedades de soporte del andamio con la capacidad osteoconductiva de las nanobiocerámicas. En este trabajo se presenta la preparación de andamios bionanocompósitos a base de una matriz biocompatible de quitosano y gelatina con nanopartículas incorporadas de hidroxapatita (nHA), de vidrio bioactivo (nBG), vidrio bioactivo mesoporoso (MBG) y nanoesferas de vidrio bioactivo nanomesoporoso (n-MBG). Se evaluaron las propiedades estructurales, físicas, químicas y la capacidad bioactiva para la formación de apatita de los bionanocompósitos para su potencial aplicación en ingeniería de tejidos (óseo).

Objetivos: Preparar andamios bionanocompósitos a base de quitosano/gelatina y nanopartículas biocerámicas y evaluar su bioactividad *in vitro*.

Materiales y Métodos: Se sintetizaron biocerámicas de HA y BG (nHA, MBG, nBG y n-MBG) utilizando la técnica Sol-Gel. Se prepararon bionanocompósitos con un contenido de 5% y 25% de partícula. Los materiales fueron caracterizados mediante difracción de rayos-X (DRX), espectroscopia infrarrojo (FTIR-ATR) y microscopía electrónica de barrido equipada con microanálisis elemental de energía dispersiva de rayos X (SEM-EDX). Se evaluó su tasa de degradación *in vitro* y sus propiedades mecánicas en modo compresión. La bioactividad de los bionanocompósitos fue evaluada mediante la capacidad de los bionanocompósitos de inducir apatita tipo ósea en suero fisiológico simulado (SBF). La formación de apatita fue analizada con DRX, FTIR-ATR y SEM. La citocompatibilidad celular fue evaluada preliminarmente mediante el test Alamar Blue utilizando células tipo fibroblastos.

Resultados y discusión: Los bionanocompuestos presentaron diferente porosidad de acuerdo al tipo de nanopartícula y apropiado para conducir la formación de nuevo tejido, destacándose aquellos con nBG por su porosidad más homogénea e interconectada. Las propiedades mecánicas y tasa de degradación *in vitro* de los biopolímeros no fueron alteradas con la incorporación de nanopartículas biocerámicas. Los ensayos en SBF demostraron que bionanocompuestos nBG y n-MBG tienen mejores propiedades bioactivas y el mayor contenido de partícula promueve una mayor y más rápida formación de apatita tipo ósea *in vitro*. Adicionalmente, los bionanocompuestos de nBG no alteraron la citocompatibilidad.

Conclusión: Los materiales bionanocompuestos optimizados presentan adecuadas propiedades bioactivas y estructurales para el estudio de terapias de regeneración ósea, basadas en ingeniería de tejidos.

2. INTRODUCCIÓN

Está bien establecido en la literatura que la pérdida de dientes tiene como consecuencia una reducción del reborde alveolar en sus dimensiones bucolingual y apicocoronal. (Schropp y cols., 2003). La ausencia parcial o total de dientes posee consecuencias que van en desmedro de la calidad de vida de las personas. En nuestro país esta condición tiene una alta prevalencia, ya que según la Encuesta Nacional de Salud del año 2003, el 79,7% de la población adulta entre 35 y 44 años es desdentada parcial, así como el 69,8% de la población entre 65 y 74 años. (Ministerio de salud, 2010)

Dentro de las posibilidades de tratamiento de estos pacientes se encuentra la rehabilitación mediante implantes, sin embargo, la pérdida progresiva del reborde alveolar reduce la posibilidad de la colocación de implantes. (Degidi y cols., 2007). Cuando no existe suficiente tejido óseo en estos pacientes se hace necesaria la utilización de injertos. Los injertos óseos son utilizados en diversas áreas del campo clínico y debido a la compleja y delicada anatomía del esqueleto craneofacial la reparación de estos defectos es un gran desafío (Stephan y cols., 2010).

Existen diversos tipos de injertos óseos como los autoinjertos, aloinjertos y xenoinjertos, siendo los autoinjertos los más utilizados. Estos injertos se caracterizan por poseer excelentes propiedades biocompatibles y osteoconductoras, sin embargo presentan diversas desventajas clínicas para el paciente y el tejido nuevo formado no presenta las mismas características del tejido original. Estos inconvenientes han impulsado la búsqueda de nuevas alternativas en campos multidisciplinarios como es la ingeniería de tejidos y la medicina regenerativa.

Para la síntesis de nuevos materiales, la medicina regenerativa combina tres factores, que corresponden a células, señales y matrices.

La nanotecnología ha aportado en gran medida a la síntesis de materiales en medicina regenerativa, diseñando partículas a escala nanométrica pero con un enorme potencial.

Dentro de las nanopartículas existentes, las nanopartículas biocerámicas se caracterizan por su capacidad bioactiva, es decir, la propiedad de formar hidroxiapatita en suero fisiológico simulado.

La incorporación de nanopartículas biocerámicas a matrices poliméricas ha determinado la formación de materiales llamados bionanocompuestos. Estos materiales poseen la ventaja de formar un tejido con las mismas características que el original, superando a los injertos ya existentes.

3. MARCO TEÓRICO

1. Injertos óseos

Existen distintos tipos de injertos y su capacidad de regeneración de tejidos se mide por su capacidad osteogénica, osteoconductividad y el potencial osteoinductivo. El potencial osteogénico de un injerto de hueso está dado por las células implicadas en la formación de hueso, tales como las células madre mesenquimales, los osteoblastos y los osteocitos. La osteoconductividad se refiere al andamio o matriz que estimula a que las células óseas crezcan en su superficie y la capacidad osteoinductora, que es quizás la más importante y se refiere a la estimulación de las células mesenquimales a diferenciarse en osteoblastos para comenzar el proceso de formación de hueso. (Polo-Corrales y cols., 2014).

Dentro de los distintos tipos de injertos se encuentran en primer lugar los autoinjertos. Los **autoinjertos** son el trasplante de tejido óseo de un sitio a otro en el mismo paciente y se consideran el *gold standard* ya que poseen células osteogénicas y una matriz extracelular mineralizada osteoconductiva. Sin embargo, su uso está limitado por complicaciones como dolor, infección, cicatrices y morbilidad del sitio donante.

Por otra parte, los **aloinjertos** corresponden a tejidos de otro individuo de la misma especie (donantes vivos o cadáveres), su ventaja es que no poseen la morbilidad del sitio donante como los autoinjertos, sin embargo carecen de capacidad osteogénica y conllevan el riesgo de transmisión de agentes infecciosos e incluso rechazo inmunológico (Polo-Corrales y cols., 2014).

Por último se encuentran los **xenoinjertos** que corresponden al hueso esponjoso desproteínizado proveniente de otra especie como bovino o porcino. Sus principales ventajas son su osteoconductividad y disponibilidad, mientras que su principal desventaja es el riesgo de transmisión de enfermedades como la encefalopatía espongiiforme (Sukumar y Drízhal, 2008).

Por lo tanto, los injertos descritos poseen diversas propiedades para la reconstrucción/ reemplazo de defectos óseos, sin embargo también poseen una serie de desventajas que limitan su aplicación clínica. Por lo demás, sus propiedades consiguen generalmente reparar el tejido óseo, no así regenerarlo, entendiéndose la **regeneración** como la formación de un tejido nuevo con características estructurales y funcionales equivalentes al tejido original.

Estos inconvenientes han impulsado la búsqueda de nuevas alternativas. En ese contexto, durante los últimos años, la ingeniería de tejidos y la biotecnología han logrado desarrollar nuevos materiales y métodos para la reparación de tejidos, especialmente del tejido óseo, con el fin de sintetizar materiales con gran potencial para aplicaciones clínicas en distintas áreas de la salud (Saska y cols., 2015).

2. Ingeniería de tejidos

Podemos entender la **ingeniería de tejidos y medicina regenerativa** como una estrategia promisoría que involucra un campo interdisciplinario combinando los principios de cirugía ortopédica con conocimientos de biología, física, ingeniería y la ciencia de los materiales. Esta alternativa de tratamiento, que requiere regeneración ósea, podría superar las limitaciones de las terapias comunes ya descritas (Dimitriou y cols., 2011), ya que incluye terapias celulares y uso de materiales porosos bioactivos en el desarrollo de sustitutos funcionales para la reparación o sustitución de tejidos u órganos dañados (Saska y cols., 2015).

La ingeniería de tejidos ha logrado un gran progreso en el desarrollo de materiales tridimensionales (*scaffolds*) incluyendo materiales aloplásticos (materiales sintéticos de tejido óseo), tales como biocerámicas, vidrios bioactivos y polímeros (Krishnan y Lakshmi, 2013).

La ingeniería de tejidos se basa en tres elementos que deben estar en sinergia: una **matriz** (andamio), **células** (células progenitoras como células madre mesenquimales) y **señales** (factores de crecimiento, moléculas bioactivas) (Saska y cols., 2015). De esta forma las células deben estar dispuestas en matrices biocompatibles y tridimensionales como los tejidos (para una favorable osteoconducción y crecimiento vascular) con apropiadas señales como factores de crecimiento (para osteoinducción) para así regenerar y mantener tejido óseo. (Jones y Yang, 2005)

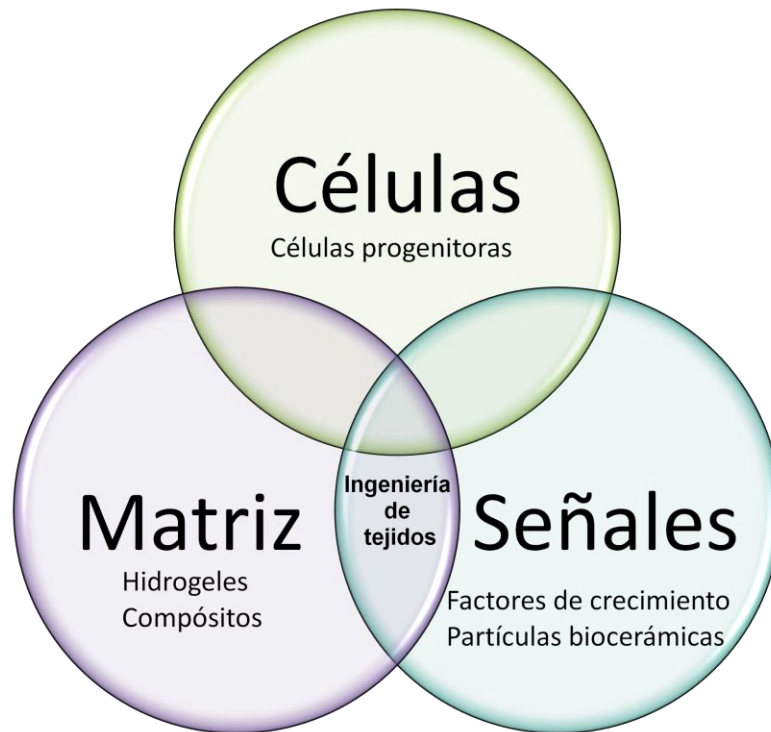


Figura 1. Elementos fundamentales en la ingeniería de tejidos.

En la ingeniería de tejidos una **matriz** extracelular artificial, es decir, un andamio temporal, actúa como sustrato para promover la adhesión celular sin obstaculizar la proliferación, y como una plantilla para guiar la formación del nuevo tejido. El andamio puede ser desarrollado utilizando polímeros naturales o sintéticos. Las macromoléculas naturales poseen propiedades atractivas como facilitar la unión celular y el mantenimiento de la función de diferenciación. Por lo tanto, los polímeros biomiméticos naturales pueden ser ampliamente utilizados como medio de andamiaje para la regeneración tisular (Mao y cols., 2003).

Los materiales ideales desarrollados por la ingeniería de tejidos deberían ser no reactivos, no inmunogénicos, fácilmente liberados y producir hueso estructural de larga duración. Dentro de las estrategias en el desarrollo de estos materiales está el uso de polímeros biodegradables como andamio tridimensional para permitir la entrega de materiales bioactivos y células progenitoras para una regeneración ósea organizada (Stephan y cols., 2010).

Cabe señalar que cuando este andamio posee en su interior partículas menores a 100 nm, es decir, en escala nanométrica, se conoce como nanocompósito y si este libera moléculas bioactivas se denomina **Bionanocompósito**.

3. Matriz: Biopolímeros

El colágeno es un importante componente natural de la matriz extracelular y posee una estructura fibrosa con haces de fibras que varían en diámetro de 50 a 500 nm. Se han realizado grandes esfuerzos para encontrar un andamio alternativo con características fisicoquímicas y biológicas similares a las de la matriz extracelular. (Jayakumar y cols., 2010). Dentro de este contexto se encuentra la **gelatina**. La gelatina es un compuesto de proteína soluble obtenida por hidrólisis parcial del colágeno, la principal proteína constituyente en hueso, cartílago y piel (Gómez-Guillén y cols., 2011). Por lo tanto, la gelatina a base de colágeno tiene un alto grado de grupos funcionales biológicos y tiene potencial para aplicaciones en andamios de tejidos. La gelatina se utiliza actualmente en productos farmacéuticos, apósitos y adhesivos debido a su buena viabilidad celular y baja antigenicidad (Hae-Won Kim y cols., 2005). Además es no inmunogénica, conserva su capacidad de señalización y es completamente reabsorbible *in vivo* (Dainiak y cols., 2010.) Sin embargo, debido a sus bajas propiedades mecánicas generalmente se utiliza en combinación con otros materiales formadores de andamios. (Enrione y cols., 2010).

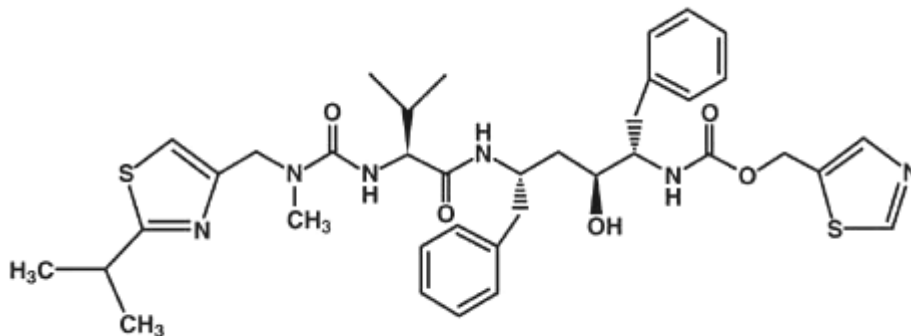


Figura 2. Estructura química de Gelatina.

El **quitosano** es un producto natural derivado de la quitina (aminopolisacárido), un biopolímero natural que se encuentra en abundancia en los exoesqueletos de crustáceos como camarones, cangrejos y langostas, entre otros (Nandi y cols. 2010). La estructura del polisacárido del quitosano es similar a la de los glicosaminoglicanos (GAGs), y constituye un componente esencial de la matriz extracelular del hueso y el cartílago. Se ha descrito que el quitosano es un biopolímero biodegradable, biocompatible, antibacteriano, con baja inmunogenicidad, y ha probado ser bacterio-fungiestático y no tóxico *in vivo* (Shi y cols., 2006). Debido a estas propiedades, es ampliamente utilizado en aplicaciones biomédicas como administración de fármacos, apósitos para heridas, membranas de separación, recubrimientos antibacterianos y como andamio en ingeniería de tejidos (Jayakumar y cols., 2009). Además, posee propiedades químicas favorables como capacidad de formar geles, alta capacidad de adsorción y versatilidad en términos de modificación y combinación con otros polímeros, lo que ha permitido su uso para el desarrollo de una amplia gama de tejidos como injertos vasculares, hueso y cartílago (Shi y cols., 2006). Desde el punto de vista odontológico, las propiedades antibacterianas del quitosano hacen que este sea un material adecuado para el diseño de andamios para la regeneración del hueso alveolar, una vez que estas áreas son altamente susceptibles a la infección bacteriana. Debido a sus propiedades químicas el quitosano también tiene la capacidad de contribuir a la adhesión y proliferación celular.

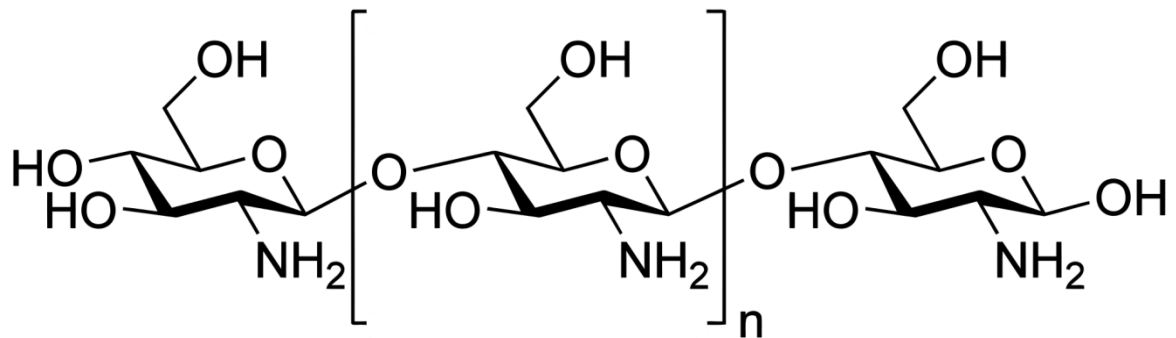


Figura 3. Estructura química de Quitosano.

En una tesis anterior desarrollada en el marco del mismo proyecto se utilizó la combinación de gelatina con alginato (Celhay., 2014), sin embargo este tipo de matriz presentó baja estabilidad química en medio fisiológico simulado. En este contexto, el quitosano surgió como una alternativa con mejores propiedades químicas y mecánicas que las del alginato. Existen algunos reportes en la literatura que describen la combinación de quitosano con gelatina para sintetizar andamios, los cuales se han caracterizado por una excelente capacidad para ser procesados en andamios porosos para su uso en trasplante de fibroblastos y queratinocitos y regeneración de piel (Mao y cols. 2003).

Para la formación de andamios a base de biopolímeros es necesaria la síntesis de geles mediante reacciones de entrecruzamiento. El glutaraldehído es el agente entrecruzante más utilizado para formar hidrogeles de gelatina y quitosano. Sin embargo, dependiendo de la concentración utilizada de glutaraldehído, puede producir cierta citotoxicidad (Yoo y cols., 2011). Por lo anterior, se hace necesario el estudio de nuevas alternativas de agentes entrecruzantes con propiedades más citocompatibles.

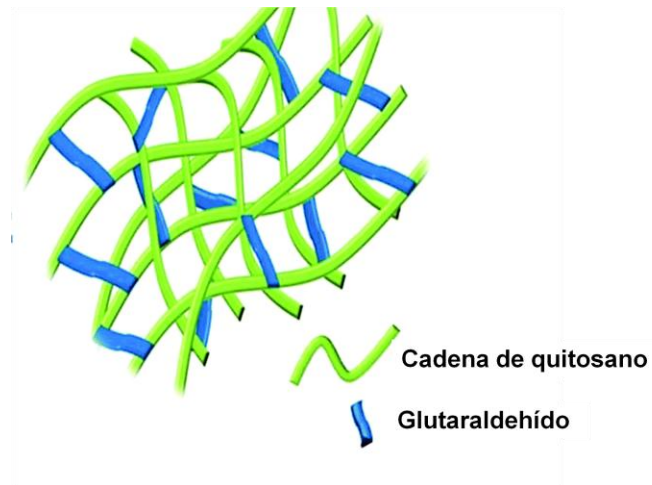


Figura 4. Esquema de entrecruzamiento de quitosano mediante glutaraldehído. (Biswal y cols., 2016).

El polimetafosfato es un agente citocompatible que ha sido probado en estudios anteriores para el entrecruzamiento de quitosano (González., 2013). Sin embargo no ha sido estudiado para la mezcla quitosano-gelatina ni para la preparación de andamios para regeneración ósea, como se ha planteado en el presente trabajo de tesis.

4. Señales bioactivas

En cuanto a las **señales** o componentes bioactivos requeridos en ingeniería de tejidos, las biocerámicas aparecen últimamente como atractivos materiales. Entre este grupo se encuentran la hidroxiapatita y el vidrio bioactivo, y son especialmente utilizados en dimensiones nanométricas.

La **hidroxiapatita (HA, $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$)**, comprende el principal componente inorgánico de los tejidos duros, tiene una variedad de aplicaciones en rellenos óseos y reemplazos debido a su excelente bioactividad y osteoconductividad (Hae-Won Kim y cols., 2005).

En 1969, Hench y cols. descubrieron que ciertas composiciones de vidrio tenían una excelente biocompatibilidad, así como la capacidad de unión al hueso. El **vidrio bioactivo (BG, $\text{CaO-SiO}_2\text{-PO}_4\text{-NaO}$)** forma una capa superficial de fosfato carbonatada deficiente en calcio que le permite unirse químicamente al hueso, este comportamiento se conoce como **bioactividad** y se ha asociado a la formación de hidroxiapatita carbonatada sobre la superficie del BG cuando está en contacto con fluidos biológicos (Rezwana y cols., 2006). Asimismo, se ha descrito que el BG ayuda a la actividad enzimática, vascularización (Keshaw y cols., 2005), además de promover la adhesión, crecimiento y diferenciación de los osteoblastos. También se ha comprobado que es capaz de inducir la diferenciación de células mesenquimales en osteoblastos (Roether y cols., 2002). Los vidrios bioactivos son considerados como un importante material de regeneración ósea debido a su excelente osteoconductividad y osteoestimulación.

5. Nanotecnología y nanopartículas bioactivas

La **nanotecnología**, que actualmente se encuentra en casi todas las facetas de la vida cotidiana, desde la seguridad hasta la medicina, es una disciplina que ha estado contribuyendo significativamente a la ingeniería de tejidos. La nanociencia se puede definir como la investigación y el control de la materia a una escala nanométrica, en el rango 1-100 nm. En cuanto a su aplicación en Ingeniería de tejidos, los andamios con arquitectura a nanoescala poseen la ventaja de presentar una mayor área superficial para la adsorción de proteínas y unión de ligandos, lo que se traduce en un mayor número de sitios de unión y señales presentadas a los receptores celulares, por lo que estos andamios podrían biomimetizar la matriz extracelular (Lim EH y cols., 2014). En cuando a las biocerámicas, estos materiales están siendo también sintetizados con dimensiones nanométricas.

Mediante técnica sol-gel se ha logrado sintetizar cristales de hidroxiapatita de aprox. 40 nm (nHA), asimismo es posible preparar nanopartículas de BG de alrededor de 70 nm (nBG). Hace algunos años, fue desarrollada una nueva clase de vidrio bioactivo, denominado **vidrio bioactivo mesoporoso (MBG)**, el que posee una estructura de canal mesoporoso altamente ordenada de tamaños nanométricos y una alta área superficial (Wu, C y cols., 2013). El término "mesoporoso" se refiere a los tamaños entre 2 y 50 nm (Selvam P y cols., 2001).

En comparación con los BG micrométricos y no porosos, el MBG posee un área superficial y volumen de poros óptimos, junto con la habilidad de inducir mineralización de apatita *in vitro* en SBF y una excelente citocompatibilidad (Alcaide M y cols. 2010). El estudio del MBG en ingeniería de tejidos óseos ha sido un área de gran interés en los últimos cinco años y se ha descrito que estos materiales se pueden emplear como administradores de fármacos y para el desarrollo de tecnologías de regeneración de tejido óseo (Vallet-Regí, 2010).

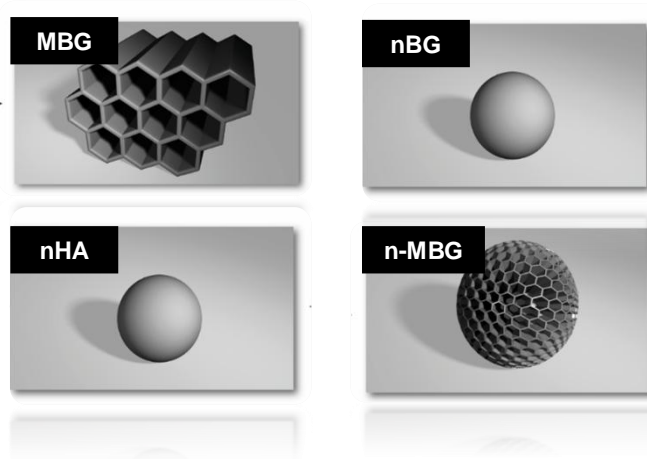


Figura 5. Nanopartículas biocerámicas.

Más recientemente, Wu C y cols. (2013) han sintetizado **nanoesferas de MBG (n- MBG)** con una morfología esférica y microestructura mesoporosa interna. Los preparados que sintetizaron tenían una alta superficie específica y volumen de mesoporos, además de una excelente capacidad de mineralización de apatita.

6. Bionanocompósitos y su optimización

Debido a las mejoradas propiedades de bioactividad de biocerámicas nanométricas, su incorporación en un andamio polimérico podría conducir a la obtención un material **bionanocompósito**, que combine las propiedades de soporte del andamio con la capacidad osteoinductiva de las nanobiocerámicas.

En una tesis previa de este proyecto de investigación, se encontró que estas nanopartículas en forma de polvo estimulaban la formación de apatita y la diferenciación osteogénica de células madres. Sin embargo, las posibilidades de aplicación clínica de estas partículas requiere que se encuentren incorporadas dentro de una matriz o andamio polimérico.

En el presente trabajo de investigación se propone optimizar la preparación de un andamio de quitosano/gelatina (QG) para posteriormente producir bionanocompósitos cargados con nanocerámicas de hidroxiapatita (n-HA), vidrio bioactivo (n-BG), vidrio bioactivo mesoporoso (MBG) y nanoesferas de vidrio bioactivo mesoporoso (n-MBG) y evaluar su bioactividad *in vitro*.

4. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

1. HIPÓTESIS

Andamios bionanocompuestos a base de quitosano/gelatina cargados con nanopartículas biocerámicas presentan bioactividad *in vitro*.

2. OBJETIVO GENERAL

Preparar andamios bionanocompuestos a base de quitosano/gelatina y nanopartículas biocerámicas y evaluar su bioactividad *in vitro*.

3. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.

1. Optimizar la preparación de bionanocompuestos de quitosano/gelatina cargados con nanopartículas biocerámicas en función de su estabilidad química y propiedades mecánicas.
2. Evaluar la bioactividad *in vitro* de los bionanocompuestos en suero fisiológico simulado (SBF).
3. Evaluar preliminarmente la citocompatibilidad de los materiales bionanocompositos en presencia de fibroblastos.

5. METODOLOGÍA

4.1 Síntesis de Nanopartículas.

4.1.1 Síntesis de nanopartículas de hidroxiapatita

La síntesis de n-HA se llevó a cabo a través del método de precipitación sol-gel (Sanosh y cols., 2009).

Para su preparación 50 mL de potasio dihidrógeno fosfato 0.6M o KH_2PO_4 (May & Baker) fueron agregados a un igual volumen de nitrato de calcio 1M ($\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$; Sigma-Aldrich). Esta solución se mantuvo bajo agitación constante. Amonio acuoso (NH_3) fue adicionado por goteo a la solución resultante hasta que se alcanzó un pH de 11. La solución precipitante fue agitada por 1 hora y envejecida por 24 horas. El sólido obtenido fue separado y lavado por centrifugación y redispersión con agua destilada. Posteriormente fue secado a 40°C por 24 horas y calcinado a un ritmo de 10°C/ min a 200°C por 1 hora.

4.1.2 Síntesis de nanopartículas de vidrio bioactivo

Las partículas de n-BG fueron sintetizadas mediante una modificación del método sol-gel reportado inicialmente por Hong y cols., 2009. Valenzuela, Covarrubias y cols., 2012, reportaron la síntesis de n-BG utilizando la siguiente composición molar en la mezcla reaccionante: 58SiO₂:40CaO:5P₂O₅. Se preparó una solución de 7,7 g de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (Sigma- Aldrich) en 117 mL de agua destilada. Una segunda solución fue preparada diluyendo 9,7 mL de tetraetil orto silicato (TEOS; Aldrich) en 63,5 mL de etanol, la cual fue adicionada a la primera solución. El pH se ajustó a 1-2 con ácido cítrico. La solución resultante fue goteada bajo agitación sobre una solución de 1,2 g de $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ (May & Becker) en 1500 mL de agua destilada y el pH se mantuvo a 10 adicionando amonio acuoso. La mezcla resultante se agitó por 48 horas y se dejó envejeciendo por 24 horas.

El precipitado obtenido fue lavado mediante tres ciclos de centrifugación-redispersión con agua destilada. Esta solución fue congelada a -80°C por 2 horas, liofilizada y finalmente sometida a calcinación a 700°C por 3 horas.

4.1.3 Síntesis de vidrio bioactivo mesoporoso

Las partículas de MBG fueron sintetizadas usando el método sol-gel/autoensamblaje por evaporación inducida (EISA) (García A. y cols, 2009). En la primera solución preparada se hidrolizaron 4 ml de TEOS en 20 ml de etanol con 0.5 ml de HCl, ajustando de esta forma el pH a 2, esta solución se mantuvo en agitación constante por 20 minutos. Posteriormente esta solución fue adicionada sobre una solución de 2 g de Pluronic123 en 20 ml de etanol. Una vez que ambas soluciones se mezclaron, se agregaron 0.34 g de trietil fosfato (TEP) y 0.49 g de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$. El sol incoloro resultante fue agitado por 3 horas y luego fue transferido a placas Petri, en pequeñas cantidades. El solvente se evaporará a 35°C por 24 horas. Posteriormente, el gel seco se removió y se calcinó a un ritmo de $1^{\circ}\text{C}/\text{min}$ hasta llegar a los 400°C y se mantuvo esta temperatura por 3 horas.

5.1.4 Síntesis de nanoesferas de vidrio bioactivo nano-mesoporoso

Para la síntesis de estas nanopartículas se utilizó el método descrito por Wu C y cols., 2013.

Las partículas de n-MBG fueron sintetizadas a base de una solución que se preparará disolviendo 0,46 g de NaOH en 120 ml de agua destilada. Sobre esta solución se adicionó 1 gr de Polivinilpirrolidona (PVP; CALBIOCHEM) y luego 1,4 gr de Bromuro de Hexadeciltrimetil- amonio (CTABr; Sigma-Aldrich) y la solución resultante se dejó en agitación constante por 1 hora. Luego, se agregaron 1,38 gr de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 7ml de TEOS y 0,332 ml de TEP, bajo agitación constante y vigorosa que se mantuvo por 24 horas. La solución obtenida se transfirió a un reactor de teflón, se llevó a secado en estufa a 80°C y finalmente se calcinó en un crisol a 550°C por 5 horas a una velocidad de $10^{\circ}\text{C}/\text{min}$.

4.2 Preparación de bionanocompuestos

Los bionanocompuestos fueron preparados utilizando Quitosano (QUIT) y Gelatina (GEL) como matrices poliméricas naturales. Se prepararon mezclas con proporciones en peso de 75:25 de QUIT-GEL y un 4% p/v final de polímero.

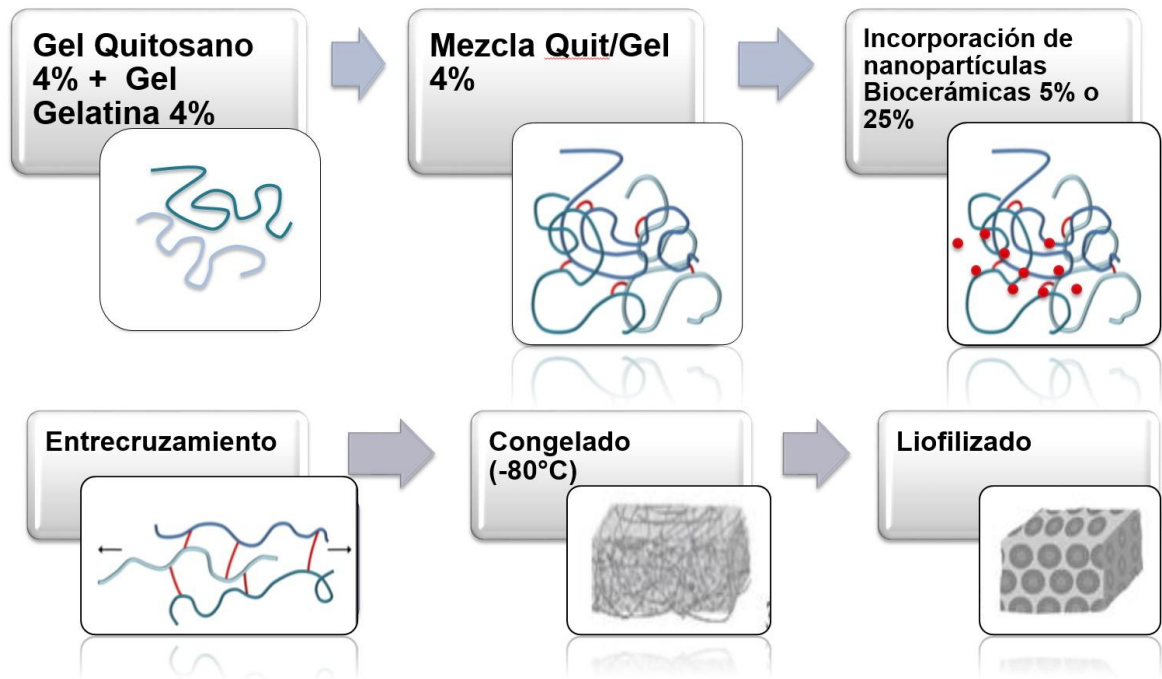


Figura 6. Esquema preparación bionanocompuestos.

La mezcla QUIT-GEL fue formada combinando soluciones acuosas de QUIT y GEL, preparadas a base de polvo de Quitosano (Sigma-Aldrich) y polvo de Gelatina derivado de piel bovina tipo B (Sigma-Aldrich), respectivamente. A las mezclas obtenidas se incorporaron nanopartículas cerámicas de n-BG, MBG, n-MBG y n-HA al 5% y al 25% p/p, proceso que fue realizado bajo agitación constante y de forma paulatina. Posteriormente, las mezclas se sometieron a ultrasonido por 10 minutos para lograr una dispersión homogénea. Luego, se agregó gota a gota una solución de polimetafosfato de sodio al 0,25% p/v, cuyo volumen es igual al de la mezcla QUIT-GEL. La incorporación fue gota a gota para producir una adecuada reacción de entrecruzamiento de las cadenas de polímero. El gel formado fue depositado en placas de 48 pozos, congelado a -80°C por 12

horas y liofilizado por 48 horas. Los materiales resultantes fueron bionanocompósitos porosos cuya estructura corresponde a esponjas cilíndricas. Este mismo procedimiento se realizó para la preparación de andamios de polímero puro (QUIT-GEL).

4.3 Caracterización de los bionanocompósitos

La caracterización de la estructura química de los bionanocompósitos se realizó mediante espectroscopia de infrarrojo con reflectancia atenuada (FTIR-ATR) (Cary 630). La estructura porosa de los andamios y sus nanopartículas se analizaron mediante microscopia electrónica de barrido (SEM), equipada con microanálisis elemental de energía dispersiva de rayos X (EDX), para identificar los elementos constituyentes de cada material (microscopio electrónico de barrido (Jeol modelo JSM-IT300LV). La estructura cristalina de los materiales se caracterizó por medio de difracción de rayos-X (DRX) (Difractómetro de rayos-X de polvo, SIEMES D 5000 con radiación $\text{CuK}\alpha$).

4.4 Propiedades mecánicas

La evaluación de las propiedades mecánicas de los bionanocompósitos se realizó con la máquina Microtest 200 (Deben) con fuerzas aplicadas desde los 2N hasta los 200N, en modo Compresión. Para esto, se utilizaron muestras de los bionanocompósitos de medidas 5 x 4 x 4 mm.

4.5 Evaluación de estabilidad en medio celular y ensayos de degradación *in vitro*

La degradación *in vitro* de los bionanocompuestos fue medida en función del porcentaje de pérdida de peso en los tiempos de 1, 3 y 7 días luego se estar sumergidos en SBF. Las muestras fueron retiradas de la solución, se congelaron a -80°C por 12 horas y se liofilizaron por 48 horas más, finalmente se pesaron y se registraron los valores correspondientes a cada muestra.

Para evaluar su estabilidad química se midió el pH de las muestras sumergidas en agua destilada a distintos tiempos: 0,5, 1, 6, 24, 48, 72, y 168 horas. Para la medición de pH se utilizó un pH metro (modelo Oakton® 510 series) y se procedió a sumergir el electrodo en las distintas soluciones registrando el pH correspondiente,

Con el propósito de mejorar la estabilidad química de los bionanocompuestos se seleccionó un grupo de muestras al 5% y se sometieron a un acondicionamiento con polimetafosfato de sodio al 0,25% p/v. El acondicionamiento se realizó sumergiendo cada muestra por 20 minutos en 5 ml de solución de polimetafosfato de sodio al 0,25% p/v de pH 10. Luego, las muestras fueron retiradas y sumergidas por 5 minutos en 5 ml de solución de polimetafosfato de sodio al 0,25% p/v de pH 7. Finalmente las muestras fueron retiradas y sumergidas en 5 ml de solución de polimetafosfato de sodio al 0,25% p/v de pH 7 por 20 minutos.

Para evaluar el efecto del acondicionamiento en su estabilidad en medio de cultivo celular, las muestras con y sin acondicionamiento fueron sumergidas en 50 mL de cultivo celular (alfa-MEM) por 30 minutos. Luego se midió el pH resultante de cada medio. Paralelamente se evaluó el efecto del acondicionamiento mediante inspección visual de la morfología y consistencia de los materiales bionanocómpositos.

4.6 Ensayos de bioactividad en fluido fisiológico simulado (SBF)

La bioactividad de los bionanocompósitos se evaluó *in vitro* mediante la capacidad de estos de inducir la formación de apatita tipo ósea en fluido fisiológico simulado (SBF), el cual posee concentraciones iónicas similares a las del fluido extracelular humano. La solución de SBF se preparó de acuerdo a la composición iónica estándar (Na^+ 142.0, K^+ 5.0, Ca^{2+} 2.5, Mg^{2+} 1.5, Cl^- 148.0, HCO_3^{-2} 4.2, HPO_4^{-2} 1.0, SO_4^{-2} 0.5 mM) (Kokubo y Takadama, 2006). El fluido fue neutralizado, ajustándolo al pH fisiológico 7.4 con tri-(hidroximetil) aminometano y ácido hidroclicórico.

Los bionanocompósitos cilíndricos de dimensiones 1,8 x 1 x 1 cm fueron sumergidos en 50 ml de SBF en contenedores de polietileno, bajo agitación leve y constante y a una temperatura de 36.5°C, simulando las condiciones fisiológicas del fluido extracelular humano. Los bionanocompósitos fueron removidos a distintos tiempos (1 día, 3 días y 7 días), lavados con abundante agua destilada, congelados a -80° C por 12 horas y finalmente liofilizados por 48 horas. La formación de apatita tipo ósea sobre los bionanocompósitos se identificó mediante análisis de DRX, espectroscopia FTIR-ATR y microscopía electrónica de barrido con microanálisis elemental (SEM-EDX).

4.7 Ensayo preliminar de citocompatibilidad celular

Debido al considerable tiempo que involucró la optimización de las propiedades químicas y físicas de los bionanocompósitos y la evaluación de su bioactividad en SBF, se efectuaron sólo ensayos preliminares de citocompatibilidad para el nanocompósito de características más óptimas.

Para este propósito se realizó un ensayo de citocompatibilidad mediante fluorescencia con Alamar blue.

Se ajustó el conteo de fibroblastos a 1×10^4 células/ml, se depositaron en una placa y se expusieron al agente de estudio (bionanocompósitos). Se realizó un triplicado por cada muestra además de un control sin células. Se procedió a mezclar la solución de AlamarBlue® y se agregó en una cantidad igual al 10% del volumen de cada pocillo de la placa y incubaron las células con esta solución por

24 horas. Luego se midió la citocompatibilidad usando espectrofotometría de fluorescencia y se registraron los datos.

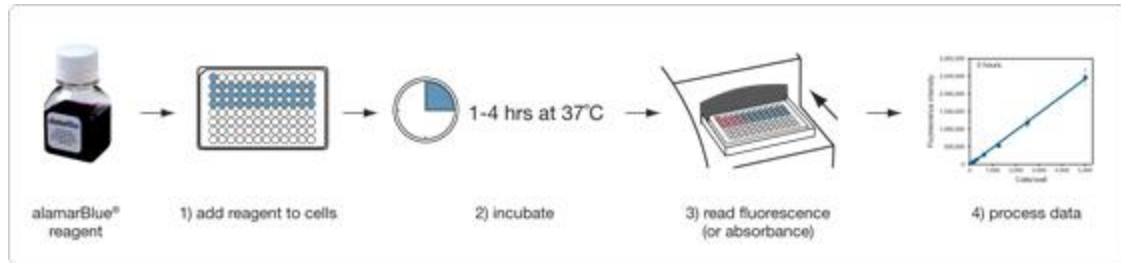


Figura 7. Protocolo test Alamar Blue.

4.8 Análisis estadístico

Los datos obtenidos en los ensayos de degradación *in vitro*, propiedades mecánicas y ensayo preliminar de citocompatibilidad fueron analizados mediante el programa estadístico Spss.

Para comprobar la normalidad de la distribución de los datos, se realizó la prueba estadística de Shapiro Wilk.

Para aquellos grupos en que hubo normalidad en la distribución de datos se realizó la prueba estadística ANOVA para analizar las varianzas. De acuerdo a la igualdad o no de las varianzas, se realizó el test HSD de Tukey.

Para aquellos grupos en que no hubo normalidad en la distribución de datos, se realizó la prueba estadística Kruskal-Wallis. En todas las pruebas estadísticas se utilizó un nivel de significancia de 95% ($p < 0.05$).

6. RESULTADOS

1. Síntesis de Nanopartículas.

En la **Figura 8** se presentan las distintas nanopartículas mediante imágenes de microscopía electrónica de transmisión (TEM). En relación a su morfología se puede apreciar que n-MBG presenta una morfología esférica y agrupaciones tipo racimo, similar a nBG. Por otra parte, MBG posee una morfología amorfa y nHA posee una estructura altamente cristalina con nanocristales de forma alargada tipo aguja.

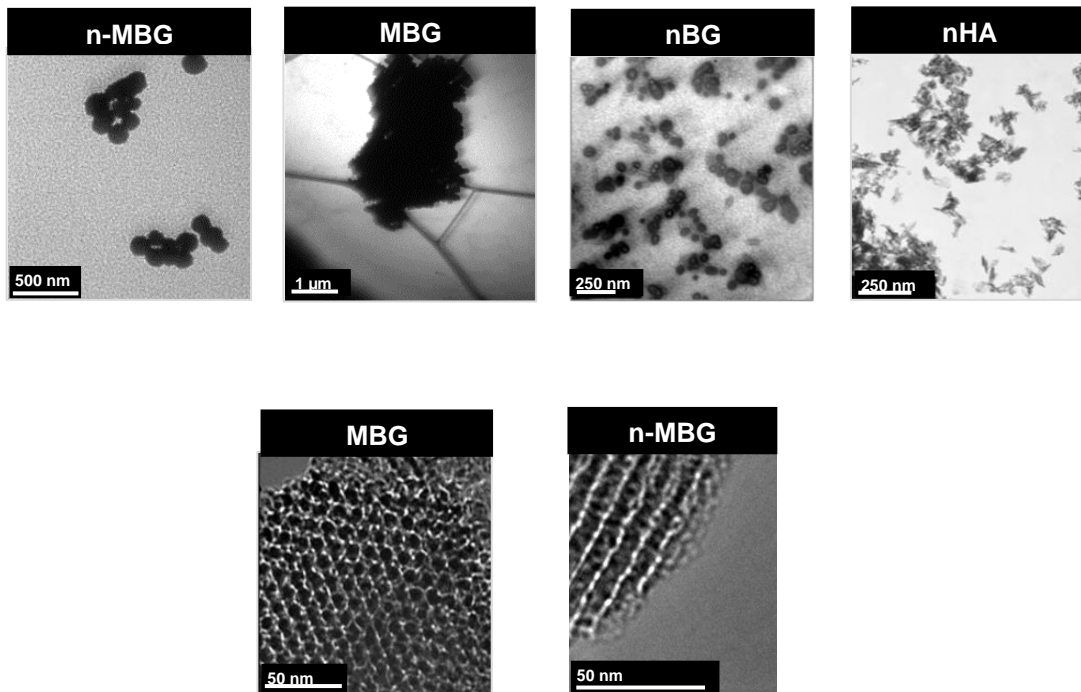


Figura 8. Imágenes de microscopía TEM de nanopartículas de n-MBG, MBG, nBG y nHA.

Tabla 1: Valores de tamaño de partícula y área superficial de nanopartículas de n-MBG, MBG, nBG y nHA.

	n-MBG	MBG	nBG	nHA
Tamaño de partícula (nm)	100	25.000	70	40
Área superficial (m ² /g)	443	488	77	67

En la **Tabla 1** se presentan los distintos tamaños de partícula y área superficial de cada nanopartícula. Se puede observar que aquellas nanopartículas de mayor tamaño y área superficial son las de MBG, mientras que las de menor tamaño y menos área superficial son las de nHA.

2. Preparación de bionanocompuestos.

En la **Figura 9** se presentan fotografías de los distintos bionanocompuestos. Se puede apreciar su forma cilíndrica y su porosidad a nivel macroscópico.

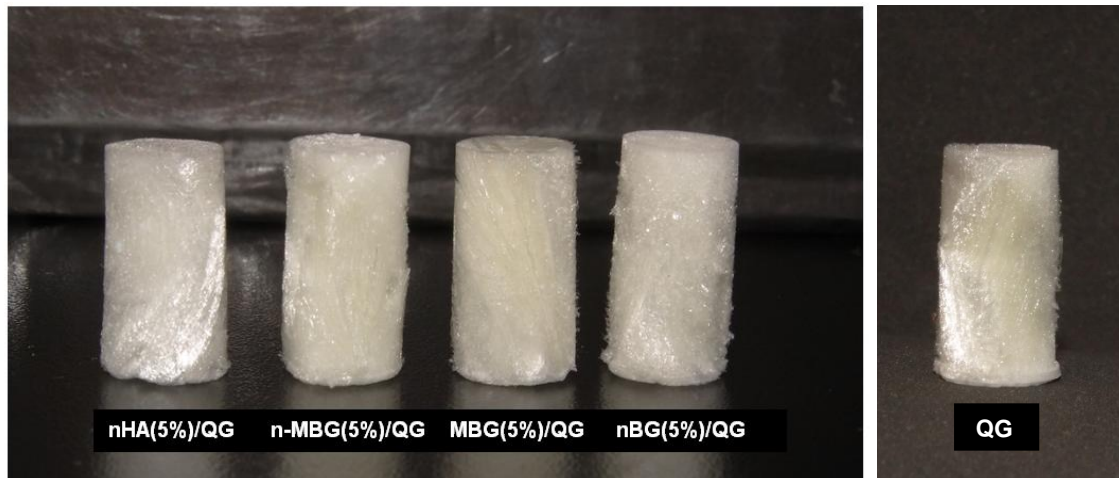


Figura 9. Bionanocompuestos de nHA, n-MBG, MBG y nBG al 5% más QG.

3. Caracterización de los bionanocompuestos.

En la **Figuras 10 y 11** se presenta el análisis de difracción de rayos-X (DRX) cuyo objetivo es identificar el ordenamiento estructural de los materiales. Los patrones obtenidos de todos los bionanocompuestos muestran un halo amorfo debido a la estructura amorfa de los biopolímeros de quitosano y gelatina.

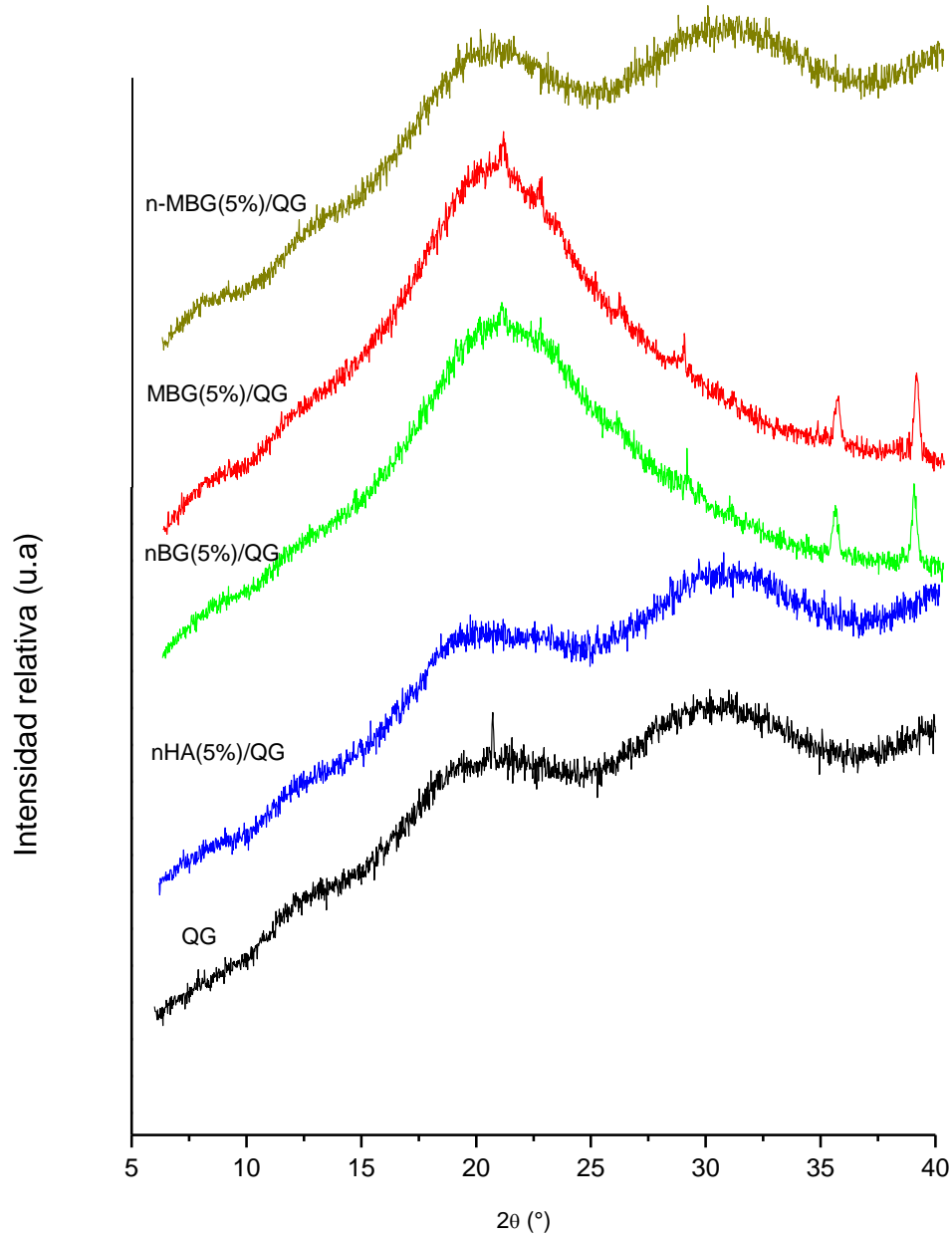


Figura 10. Patrón DRX de bionanocompuestos de n-MBG, MBG, nBG y nHA al 5% además de la matriz pura (QG).

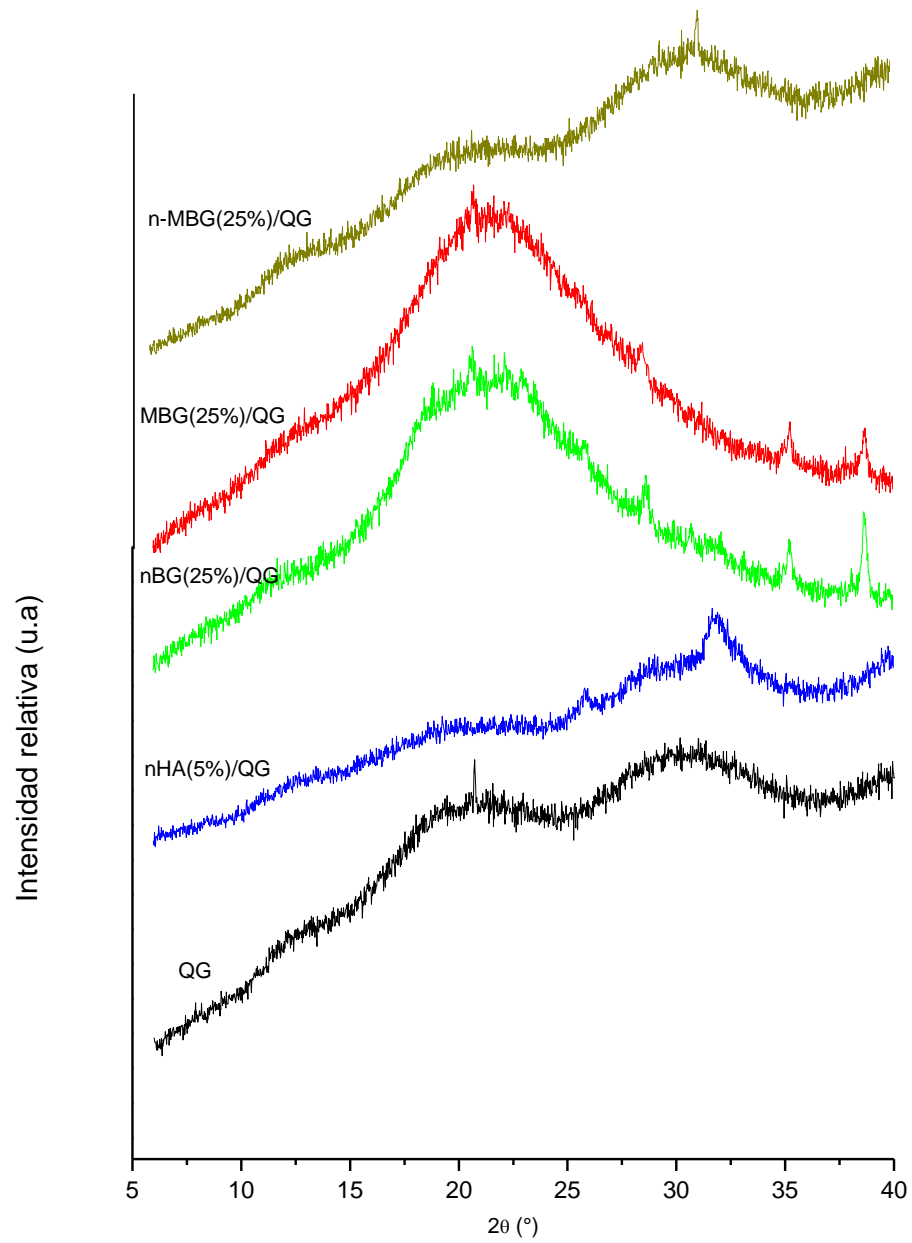


Figura 11. Patrón DRX de bionanocompuestos de n-MBG, MBG, nBG y nHA al 25% además de la matriz pura (QG).

Los andamios nanocompuestos fueron caracterizados mediante espectroscopia infrarrojo (FTIR) (**Figuras 12 y 13**) que permite caracterizar la estructura química de los materiales. En los espectros se pueden observar las bandas vibratorias características de la estructura de los polímeros. El quitosano presenta bandas en las regiones de $1375\text{-}1423\text{ cm}^{-1}$, $1000\text{-}1240\text{ cm}^{-1}$, 1561 cm^{-1} , 1648 cm^{-1} , correspondiente a los grupos CH, CO, NH y C=O respectivamente (El-Hefian y cols., 2010). La gelatina presenta bandas ubicadas a 1250 cm^{-1} , 1550 cm^{-1} y 1650 cm^{-1} características del enlace amida (-CONH-) de su estructura. No se aprecian diferencias significativas en las bandas correspondientes a los enlaces de los polímeros.

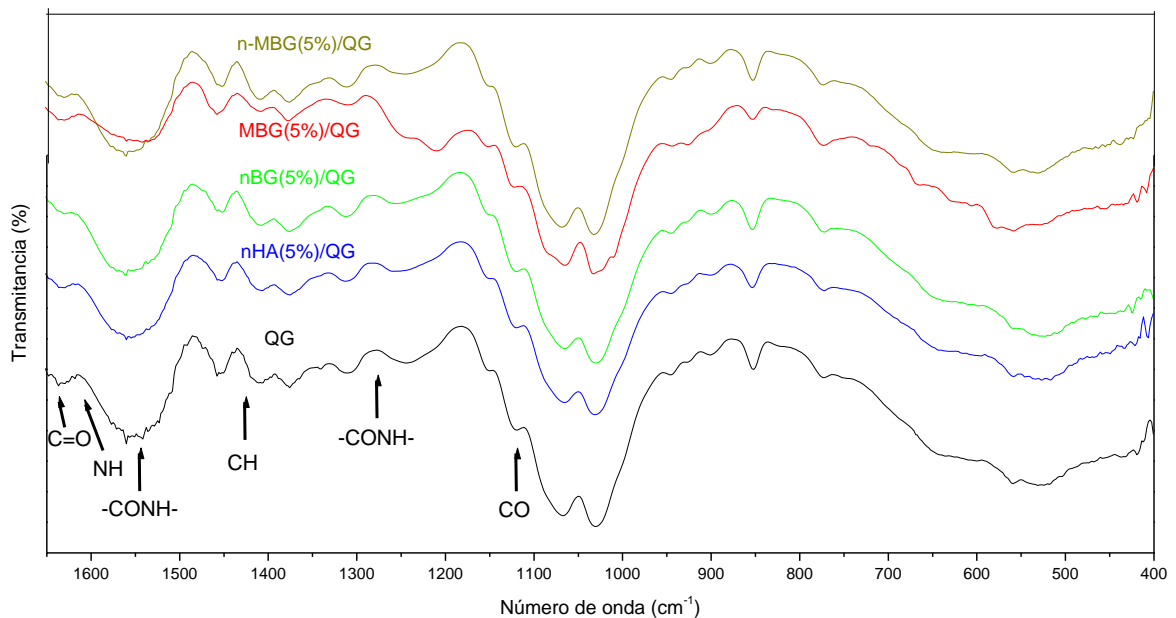


Figura 12. Espectros FTIR-ATR de bionanocompuestos de n-MBG, MBG, nBG, nHA al 5% y QG.

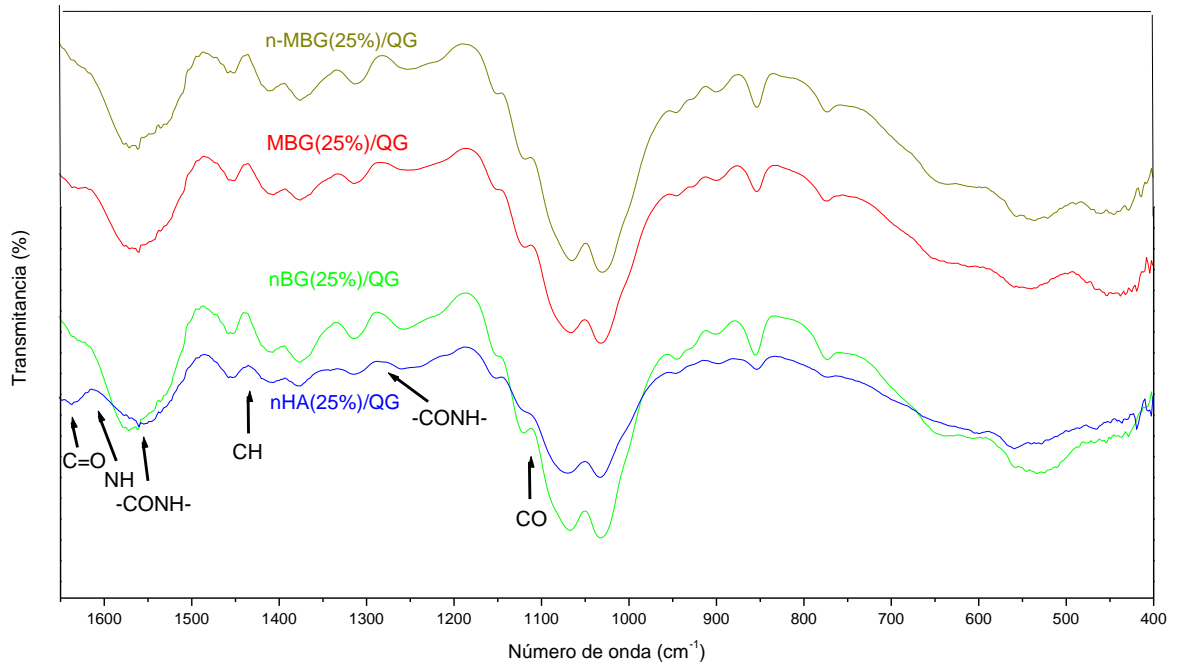


Figura 13. Espectros FTIR-ATR de bionanocompuestos de n-MBG, MBG, nBG, nHA al 25% y QG.

La estructura porosa de los andamios nanocompuestos fue analizada mediante microscopía SEM (**Figura 14**). Los resultados fueron variables en cuanto a tamaño promedio y morfología de los poros y en cuanto a su distribución.

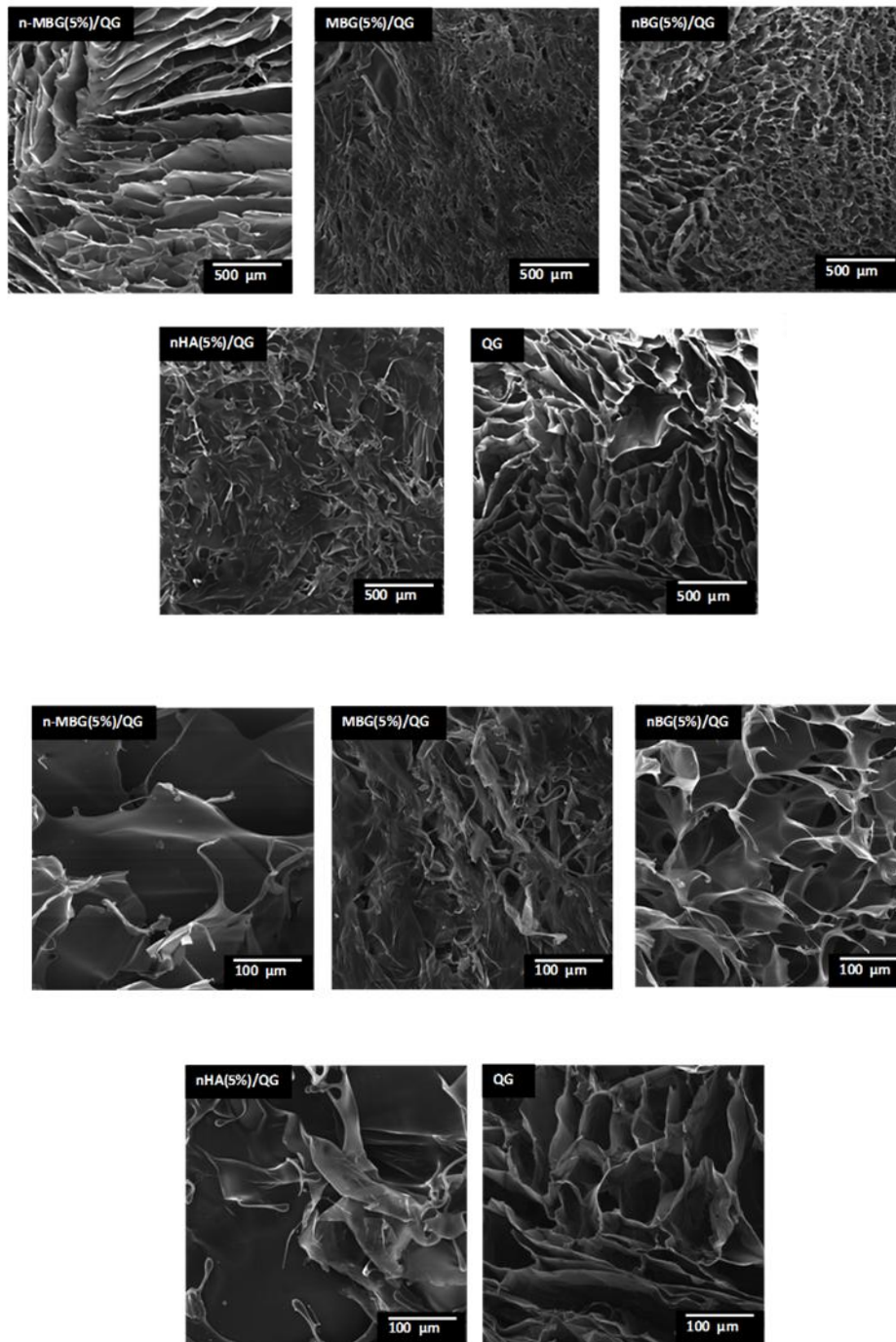


Figura 14. Imágenes de microscopía SEM de bionanocompuestos de n-MBG, MBG, nBG y, nHA al 5%, junto a QG (100x y 500x).

En la **Figura 14** se puede observar la distinta morfología de los bionanocompuestos. Andamios n-MBG presentaron poros alargados tipo rendija, mientras que andamios con nBG presentaron poros de morfología ovalada similares a los de matriz pura. En lo que respecta a su distribución, los bionanocompuestos con nHA y MBG poseen menor densidad de poros y presentan paredes más gruesas que el resto de los andamios. Todos los bionanocompuestos presentaron poros interconectados, especialmente aquellos con n-MBG y nBG.

Tabla 2. Tabla de valores de porosidad de andamios de n.-MBG, MBG, nBG, nHA al 5% y QG

Andamio	Tamaño de Poro (μm)
n-MBG/QG	70-120
MBG/QG	20-250
nBG/QG	50-100
nHA/QG	50-150
QG	50-400

La **Figura 15** corresponde a imágenes de microscopía SEM de los distintos bionanocompuestos y sus nanopartículas incorporadas, además se presenta el análisis EDX de los componentes característicos de cada tipo de nanopartícula. En el caso del vidrio bioactivo (BG) posee oxígeno, silicio, calcio y fósforo, mientras que la hidroxiapatita (HA) posee oxígeno, calcio y fósforo.

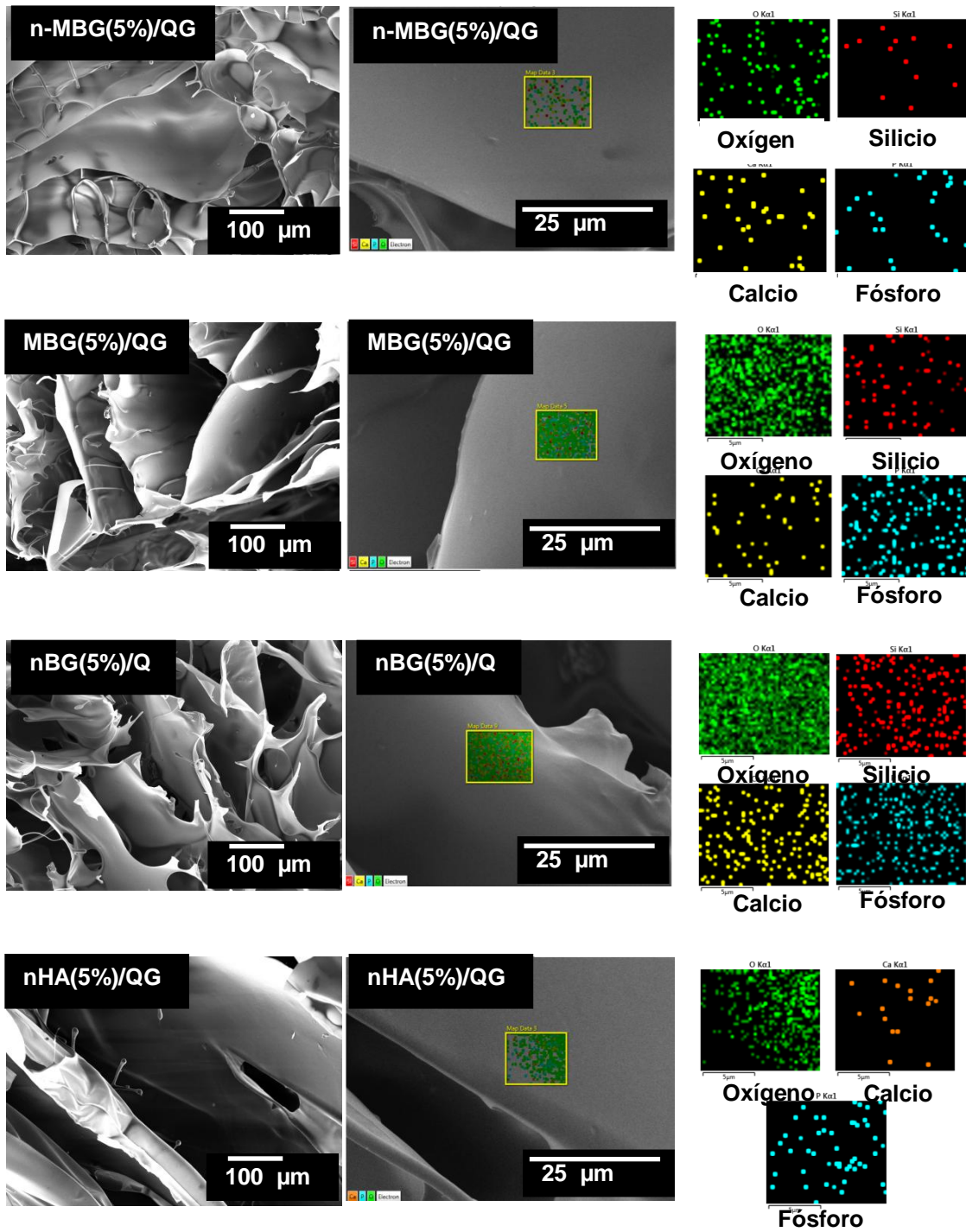


Figura 15. Imágenes SEM de nanopartículas de n-MBG, MBG, nBG y nHA incorporadas en los bionanocompuestos. Análisis EDX de los elementos constituyentes.

4. Propiedades mecánicas

La evaluación de las propiedades mecánicas de los bionanocompuestos se presenta en la **Figura 16**.

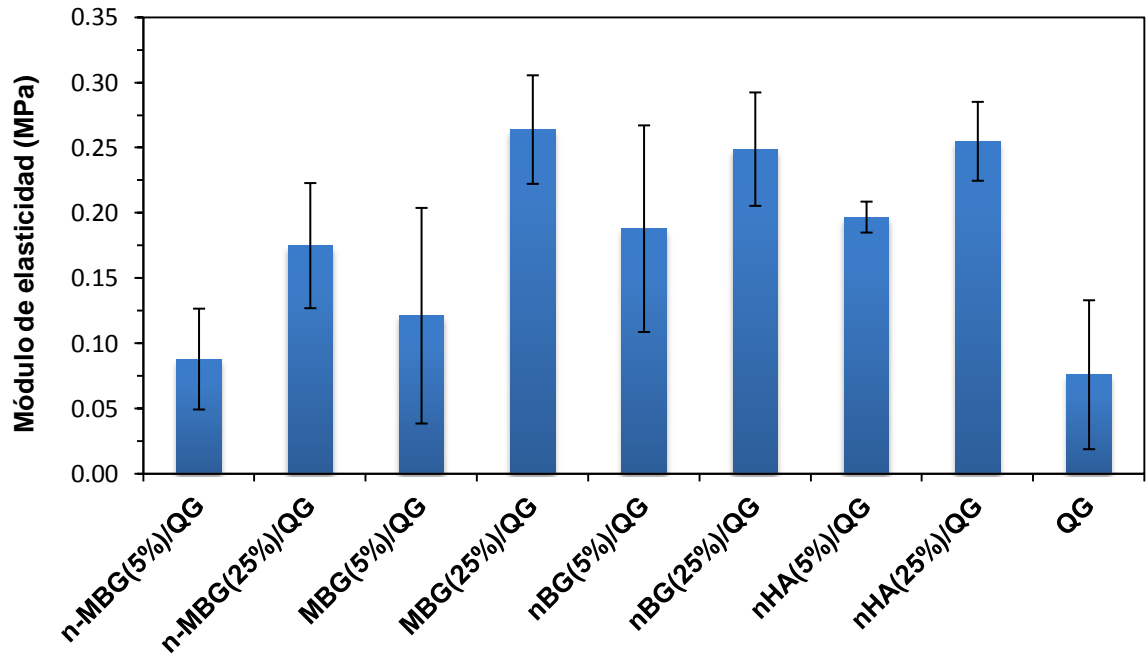


Figura 16. Módulo de elasticidad de bionanocompuestos de nBG, nHA, n-MBG y MBG al 5% y 25% y matriz pura (QG). Las barras representan el promedio de 3 muestras en triplicado. Los corchetes simbolizan la desviación estándar. ($p < 0.05$).

El análisis Saphiro-Wilk arrojó una normalidad en la distribución de datos. El análisis de varianza ANOVA arrojó que no hubo diferencias estadísticamente significativas entre los diferentes grupos de estudio.

5. Evaluación de estabilidad en medio celular y ensayos de degradación *in vitro*

La degradación *in vitro* de los bionanocompuestos fue medida en función del porcentaje de pérdida de peso luego de estar sumergidos en SBF por 1, 3 y 7 días (Figura 17)

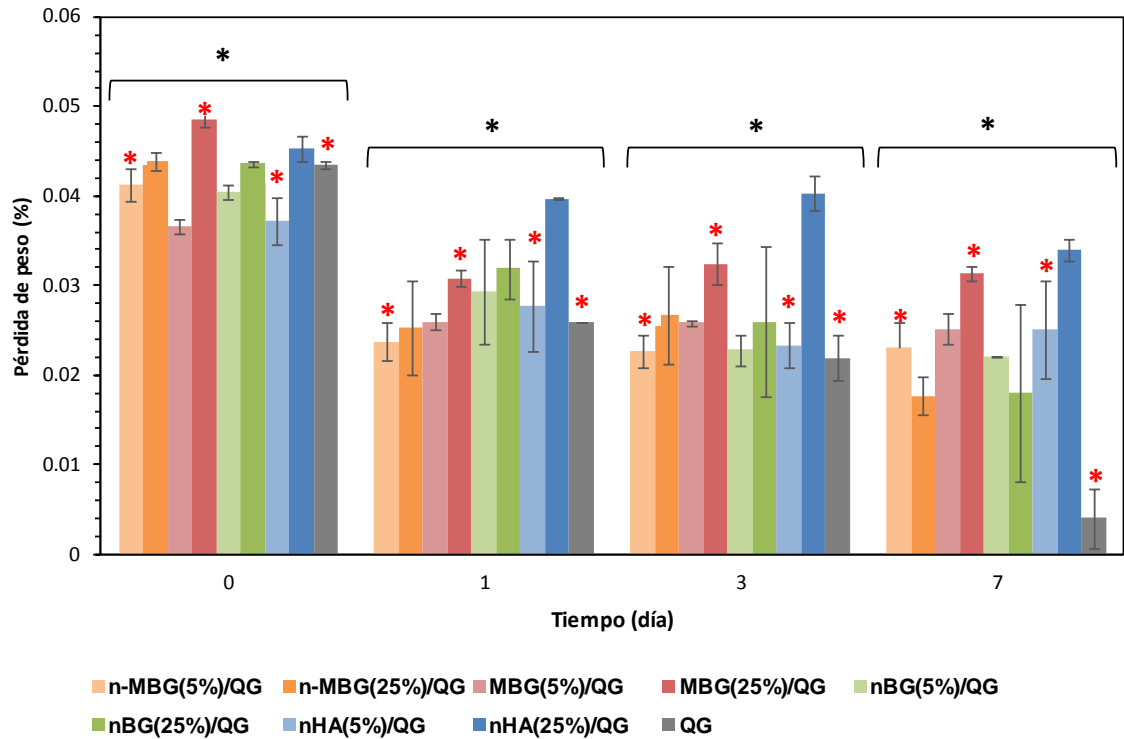


Figura 17. Degradación en SBF expresado en porcentaje de pérdida de peso de bionanocompuestos de nHA, MBG, nBG y n-MBG al 5% y 25% y matriz pura (QG) en 1, 3 y 7 días de inmersión en SBF a 37°C. Las barras representan el promedio de 3 muestras en triplicado. Los corchetes simbolizan la desviación estándar. Con asterisco negro se indican los grupos de estudio con valores significativamente diferentes en un mismo tiempo de inmersión. Con asterisco rojo se indican los materiales con valores de pérdida de peso significativamente diferentes respecto al tiempo cero. ($p > 0.05$).

El test Saphiro-Wilk indicó que hay una normalidad en la distribución de los datos al comparar los grupos de estudio en un mismo día de incubación. El test ANOVA junto con el test HSD de Tukey indicaron que existen diferencias estadísticamente significativas entre los materiales en un mismo día tal como se observa con los asteriscos.

Al comparar la variación de pérdida de peso de cada material a través del tiempo se comprueba que no hay normalidad en la distribución de los datos.

Posteriormente, al aplicar el test Kruskal-Willis se observa que casi todos los materiales poseen diferencias estadísticamente significativas respecto al tiempo cero, a excepción de n-MBG 5%/QG, MBG 25%/QG, nHA 5%/QG y QG.

En las **Figuras 18 a 21** se presentan los gráficos de pH en función del tiempo de los bionanocompuestos después de estar sumergidos en agua destilada.

En todos los bionanocompuestos se observa una disminución abrupta de pH en los primeros minutos de inmersión y una estabilización del pH a las 48 hrs.

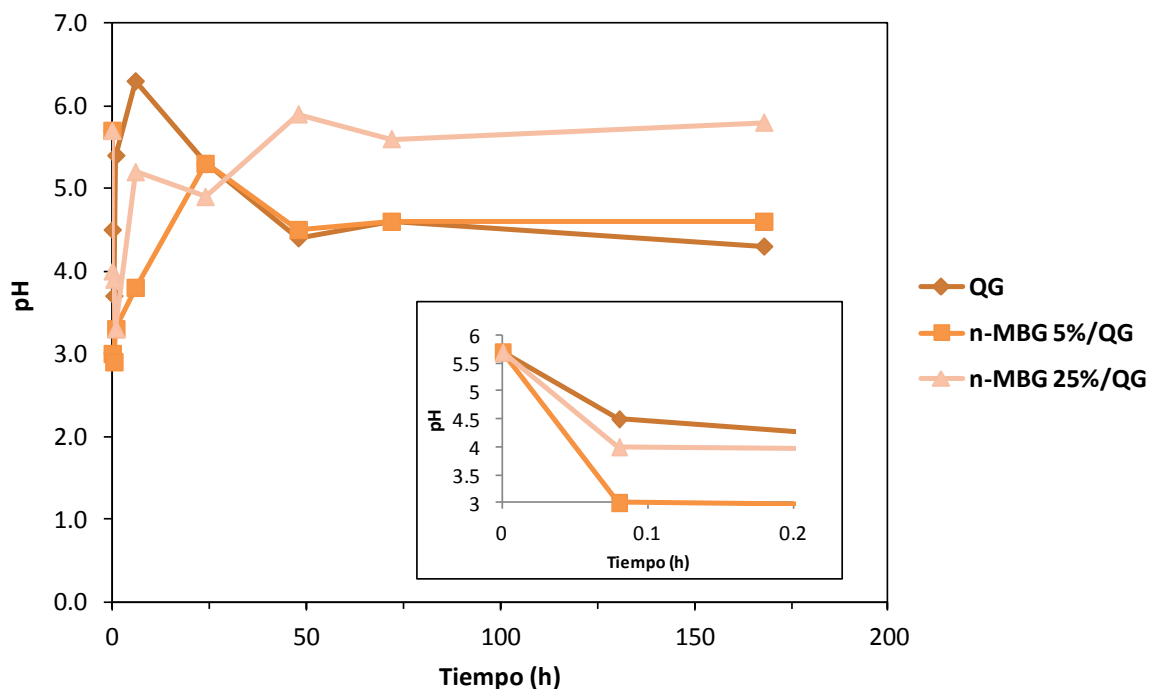


Figura 18. Gráfico de variación de pH en el tiempo de bionanocompuestos de n-MBG al 5% y 25% respecto a la matriz pura (QG) sumergidos en agua destilada. Se inserta gráfico con aumento en el rango de tiempo 0 a 20 minutos.

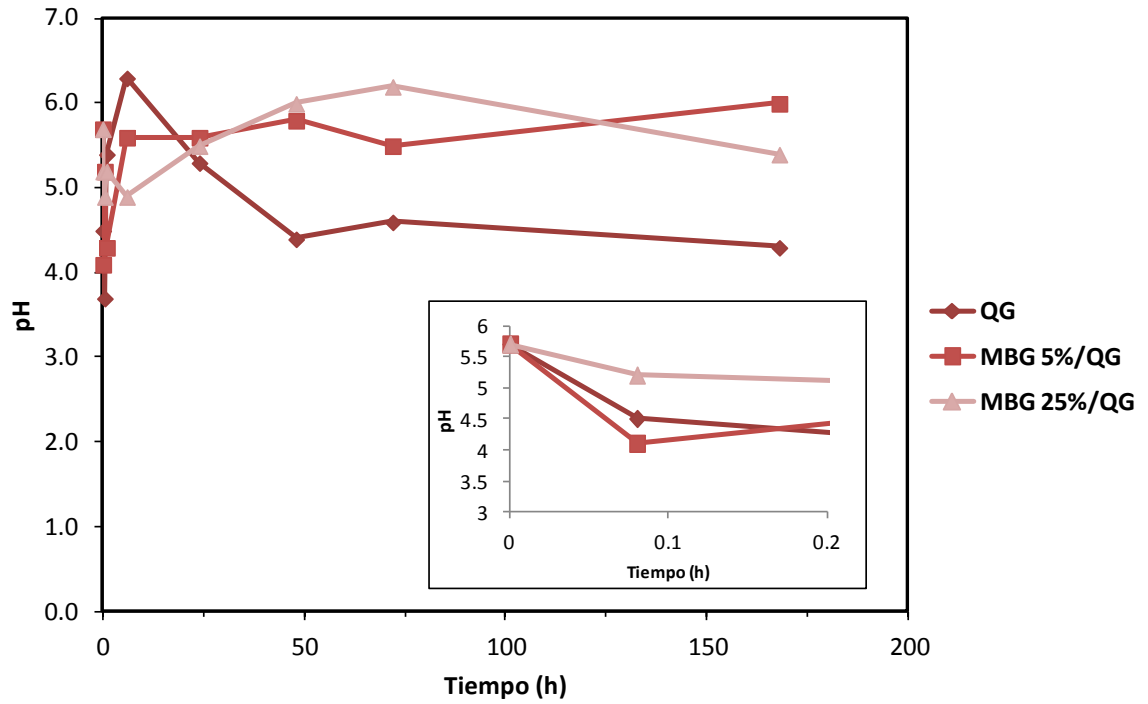


Figura 19. Gráfico de variación de pH en el tiempo de bionanocompuestos de MBG al 5% y 25% respecto a la matriz pura (QG) en agua destilada. Se inserta gráfico con aumento en el rango de tiempo 0 a 20 minutos.

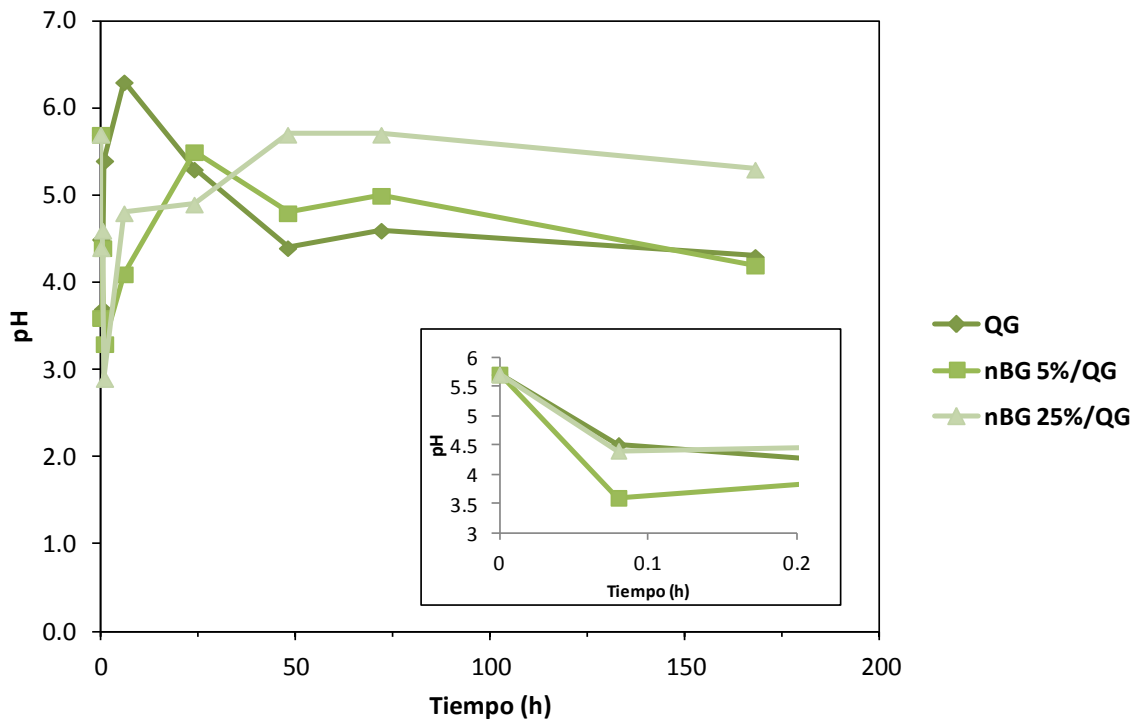


Figura 20. Gráfico de variación de pH en el tiempo de bionanocompuestos de nBG al 5% y 25% respecto a la matriz pura (QG) en agua destilada. Se inserta gráfico con aumento en el rango de tiempo 0 a 20 minutos.

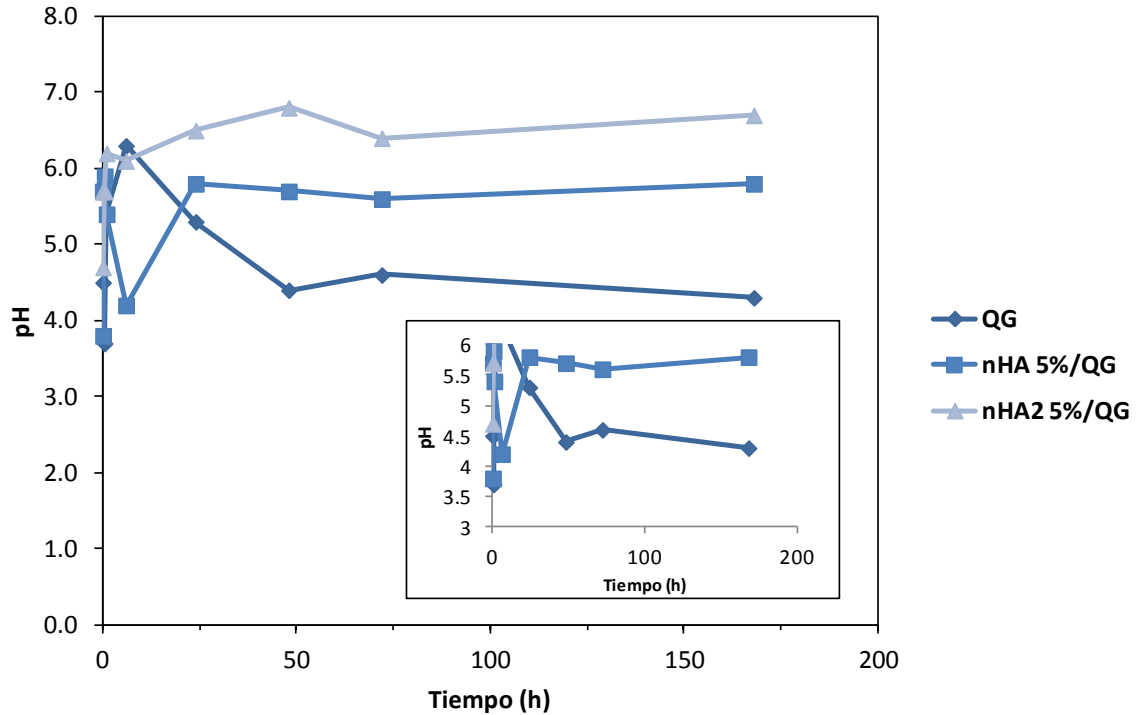


Figura 21. Gráfico de variación de pH en el tiempo de bionanocompuestos de nHA al 5% y 25% respecto a la matriz pura (QG) en agua destilada. Se inserta gráfico con aumento en el rango de tiempo 0 a 20 minutos.

La estabilidad física de los bionanocompuestos se evaluó mediante inspección visual en medio de cultivo celular luego de 30 minutos de inmersión en materiales con y sin acondicionamiento previo con polimetafosfato de sodio. Como se puede apreciar en las **Figuras 22 y 23**, el medio de cultivo celular presentó un cambio evidente de color a los 30 minutos de inmersión en los bionanocompuestos sin acondicionamiento previo, a diferencia de aquellos con acondicionamiento. Además, los bionanocompuestos que fueron acondicionados mantuvieron su forma, en cambio los sin acondicionamiento presentaron un notorio cambio, perdiendo su forma original.

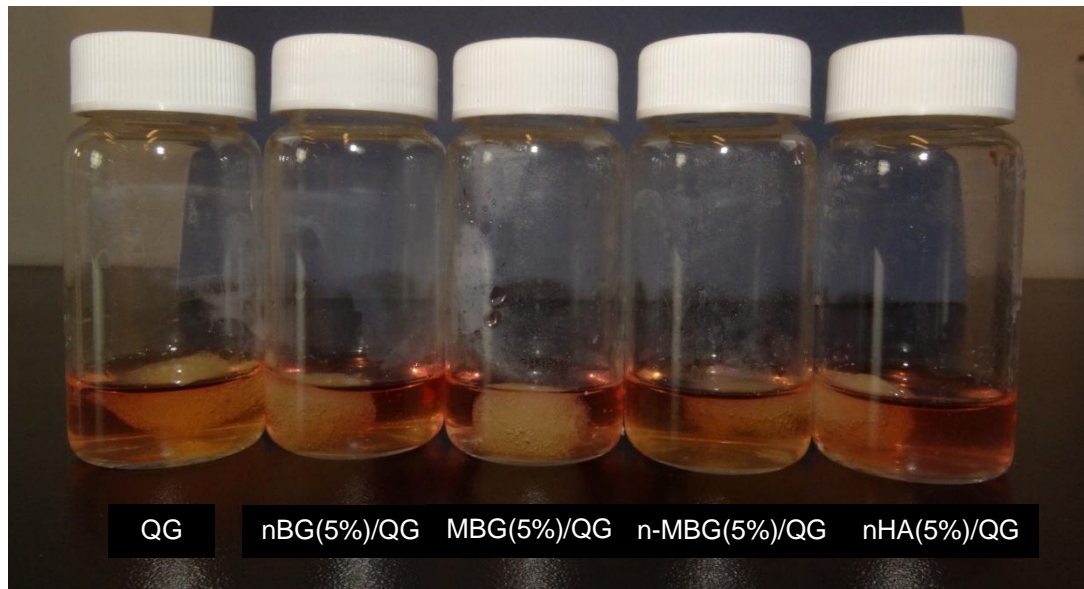


Figura 22. Imagen de bionanocompósitos de QG, nBG 5%, MBG 5%, n-MBG 5% y nHA 5%, sin acondicionamiento previo, luego de 30 minutos de inmersión en medio de cultivo celular.

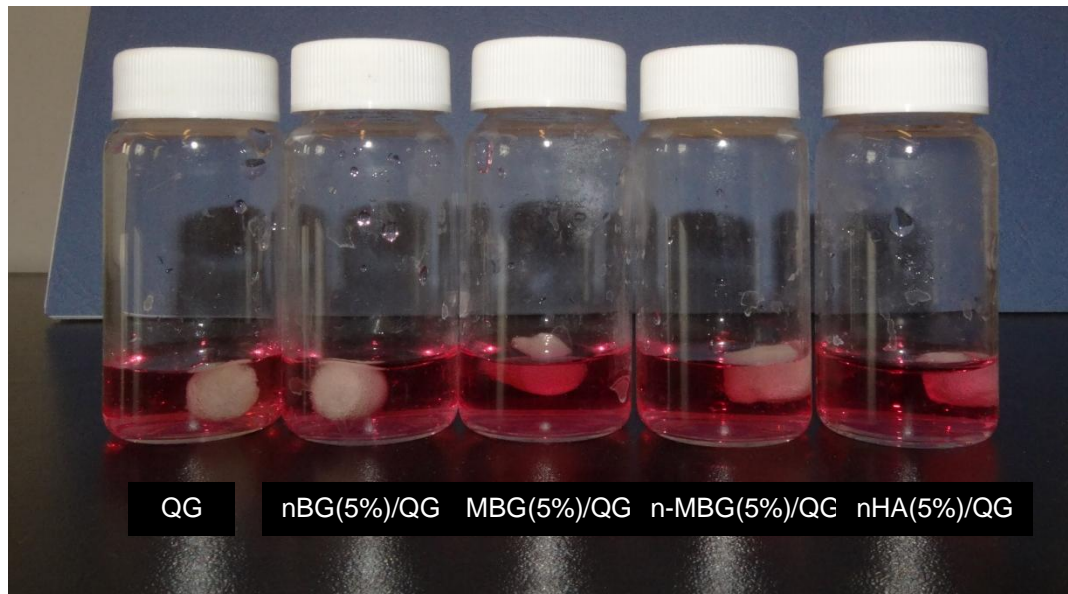


Figura 23. Imagen de bionanocompósitos de QG, nBG 5%, MBG 5%, n-MBG 5% y nHA 5%, con acondicionamiento previo, luego de 30 minutos de inmersión en medio de cultivo celular.

Luego del acondicionamiento de los materiales se procedió a evaluar la estabilidad química de los materiales mediante la evaluación de variación de pH a los 30 minutos de inmersión en medio de cultivo celular (**Tabla 3**):

Tabla 3: Valores de pH de bionanocompuestos de n-MBG, MBG, nBG, nHA al 5% y QG con y sin acondicionamiento previo, luego de 30 minutos de inmersión en medio de cultivo celular.

Bionanocompuesto	pH materiales sin acondicionamiento ($\pm 0,01$)	pH materiales con acondicionamiento ($\pm 0,01$)
n-MBG(5%)/QG	6,76	7,55
MBG(5%)/QG	6,65	7,47
nBG(5%)/QG	5,95	7,15
nHA(5%)/QG	6,27	7,15
QG	6,2	6,63

En la figura se observa que el pH bajó considerablemente en los bionanocompuestos sin acondicionamiento previo, mientras que los que fueron acondicionados presentaron un pH que sobre 6,5. Los materiales con n-MBG y MBG alcanzaron un mayor pH y la matriz pura el más bajo, coincidiendo con los resultados de la curva de pH en agua destilada.

6. Ensayos de bioactividad en fluido fisiológico simulado (SBF)

En las **Figuras 24** y **25** se presentan los patrones de DRX de los bionanocompósitos luego de siete días de inmersión en SBF. Los patrones presentan peaks entre los 27° y $31,7^\circ$, correspondiente a la estructura de la hidroxiapatita cristalina.

En la **Figura 24** se muestran los patrones de difracción de bionanocompósitos con 5% de contenido de partícula. Todos los biomateriales presentaron formación de apatita de los cuales destacan aquellos cargados con nBG y n-MBG al presentar peaks más agudos e intensos. Al aumentar el contenido de partícula (25%), los bionanocompósitos presentaron peaks de similar intensidad como se puede apreciar en la **Figura 25**, de la misma forma que en la figura anterior, destacan aquellos cargados con nBG y n-MBG.

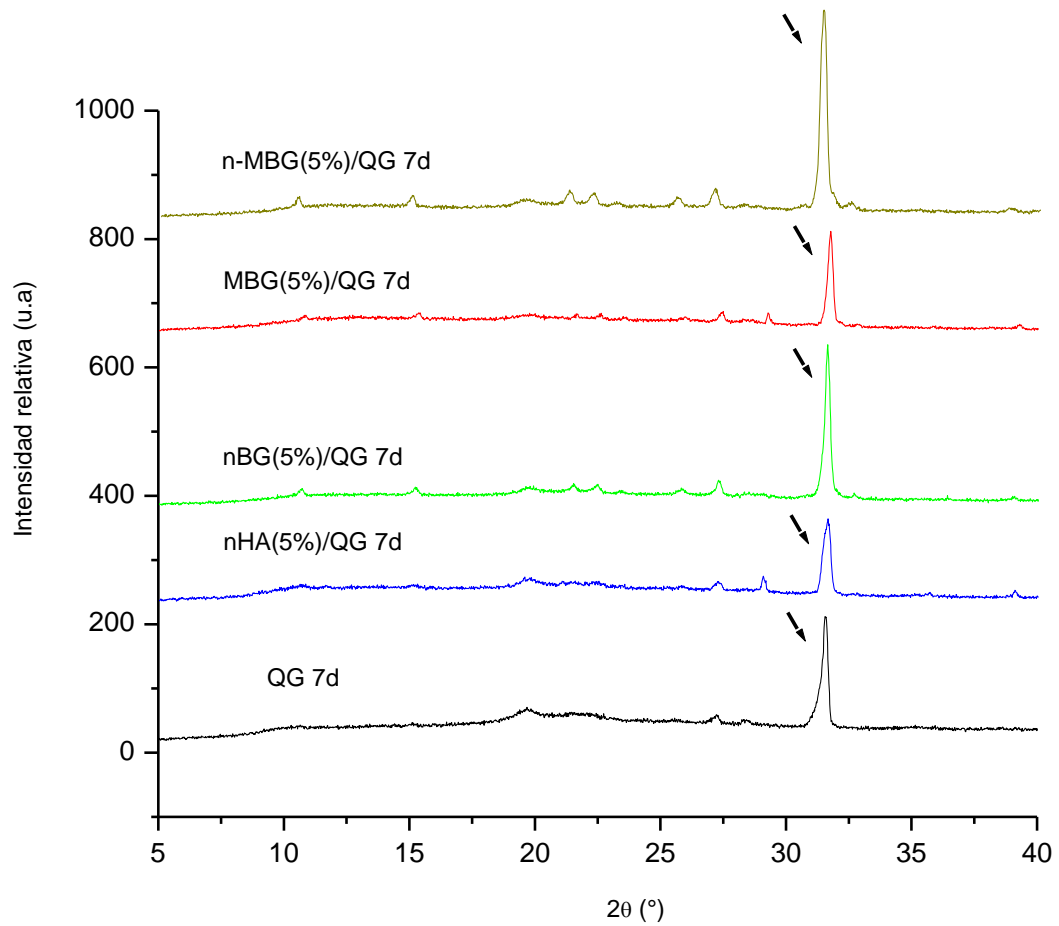


Figura 24. Patrón DRX de los bionanocopósitos de n-MBG, MBG, nBG y nHA al 5% además de andamio puro QG luego de 7 días de inmersión en SBF.

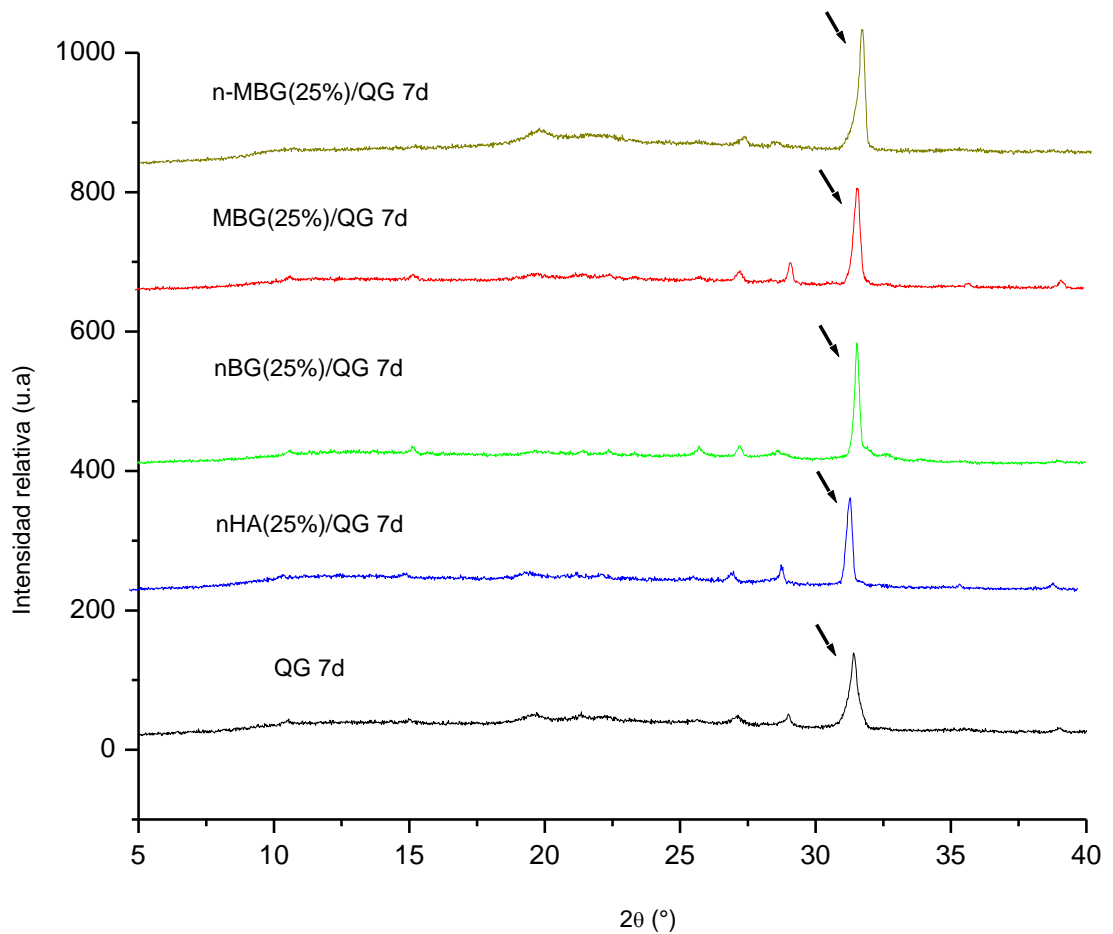


Figura 25. Patrón DRX de los bionanocopósitos de n-MBG, MBG, nBG y nHA al 25% además de andamio puro QG luego de 7 días de inmersión en SBF.

En el análisis FTIR-ATR se analizaron en primer lugar los bionanocompósitos al 5% de contenido de nanopartícula a distintos tiempos de inmersión en SBF: 1, 3 y 7 días. En las **Figuras 26, 27 y 28** se pueden observar los diferentes espectros de los bionanocompósitos. El carácter bioactivo de los materiales se hace evidente con la formación de apatita cristalina que se puede comprobar con la presencia de dos bandas características: Una entre $567\text{-}610\text{ cm}^{-1}$, atribuida a la vibración de flexión del enlace P-O del PO_4 y otra entre $960\text{-}1100\text{ cm}^{-1}$, banda más marcada y que corresponde a la vibración de estiramiento simétrico del PO_4 .

En la **Figura 26** se observa la formación inicial de apatita en el primer día de inmersión, con la aparición de un peak entre 960-1100 cm^{-1} en bionanocompuestos cargados con n-MBG y nHA.

En el tercer día de inmersión (**Figura 27**) todos los bionanocompuestos presentaron los dos peaks de apatita en sus bandas características.

Al séptimo día de inmersión (**Figura 28**) todos los materiales cargados con nanopartículas presentaron formación de apatita en su superficie.

Por lo tanto, a medida que aumentó el tiempo de inmersión en SBF se fue depositando una mayor capa de apatita sobre la superficie de los bionanocompuestos, fenómeno que se hace evidente con la intensificación del peak de estiramiento del PO_4 , tal como se puede apreciar en la **Figuras 26, 27 y 28**.

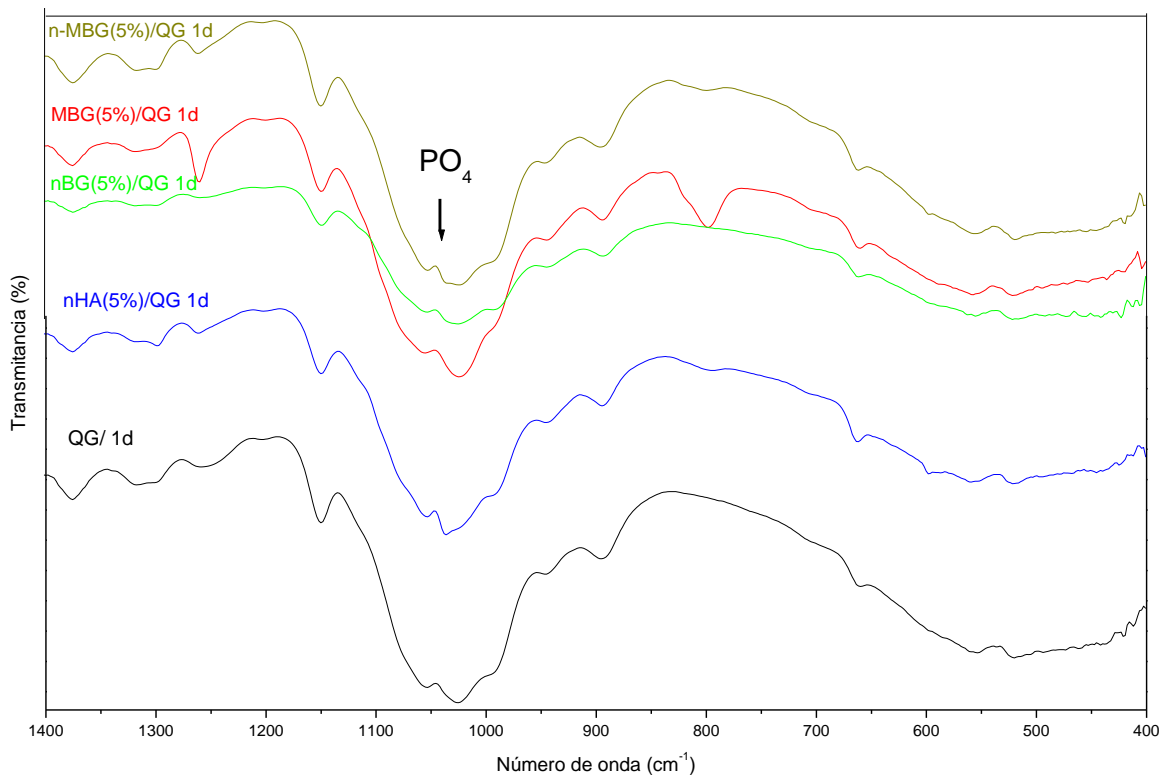


Figura 26. Espectro FTIR de bionanocompuestos al 5% después de un 1 día de inmersión en SBF.

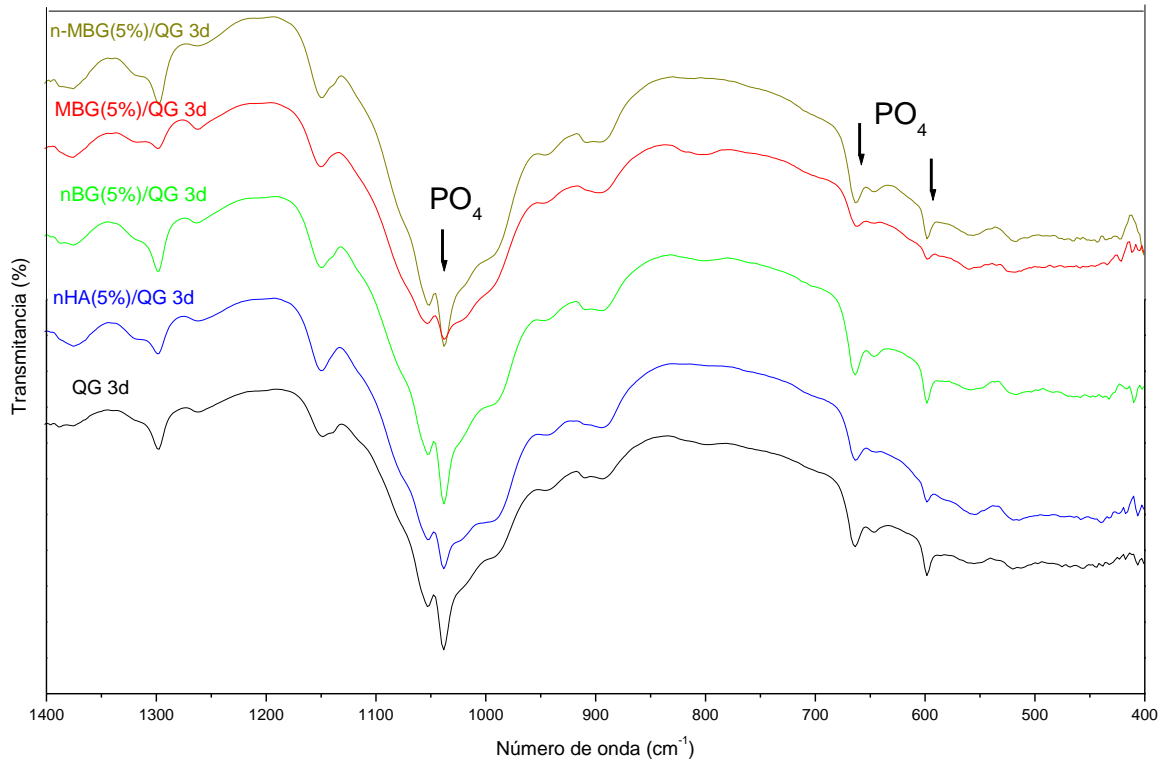


Figura 27. Espectro FTIR de bionanocompuestos al 5% después de 3 días de inmersión en SBF.

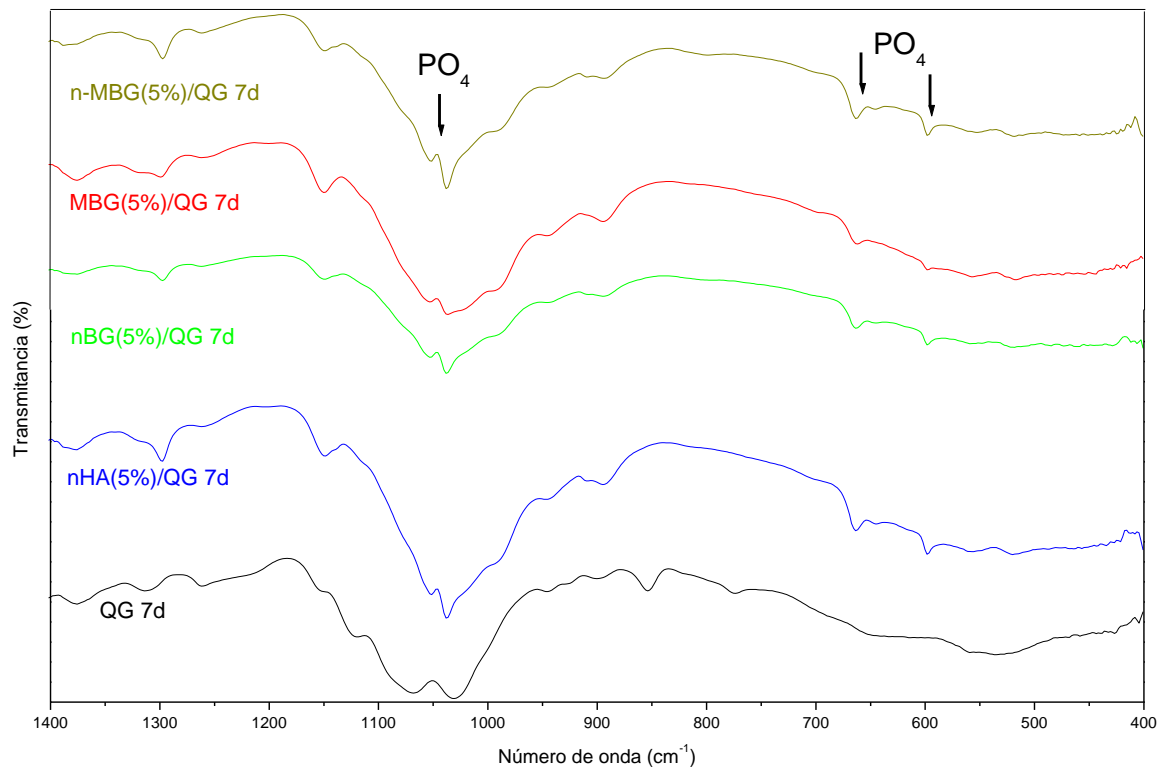


Figura 28. Espectro FTIR de bionanocompuestos al 5% después de 7 días de inmersión en SBF.

Posteriormente, mediante este mismo análisis, se evaluaron bionanocompuestos al 25% de contenido de nanopartícula con 1, 3 y 7 días de inmersión en SBF.

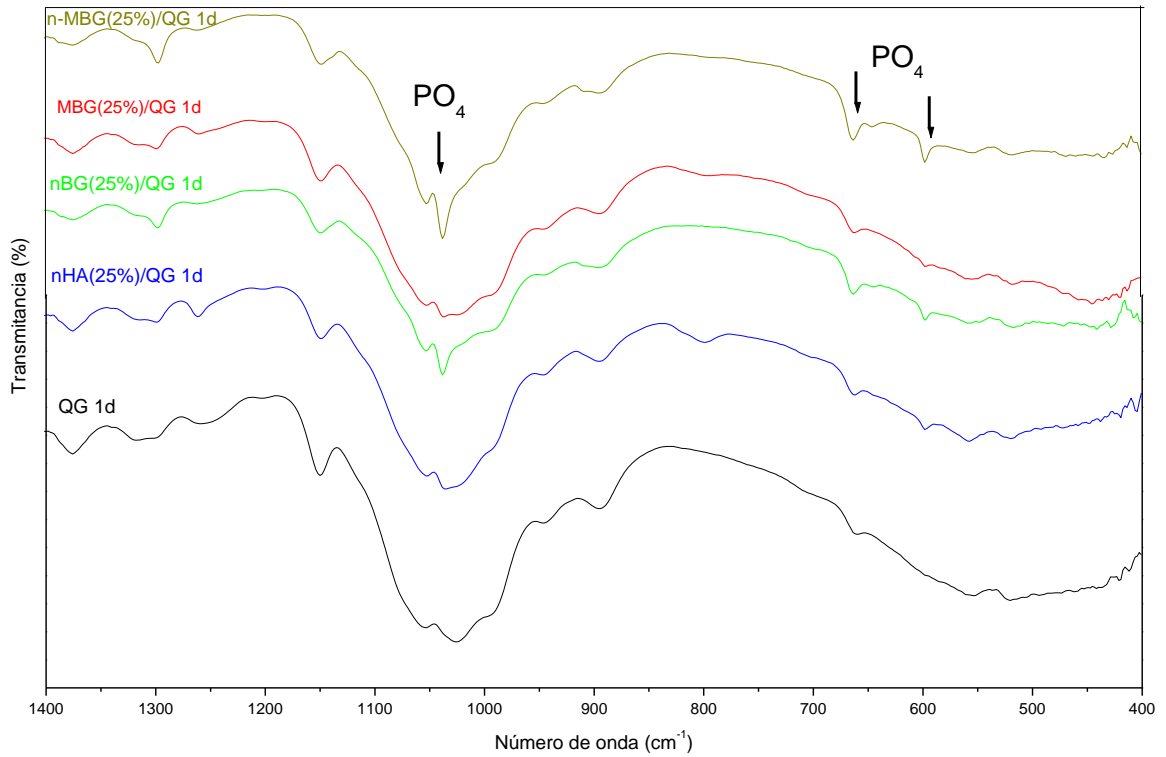


Figura 29. Espectro FTIR de bionanocompuestos al 25% después de 1 día de inmersión en SBF.

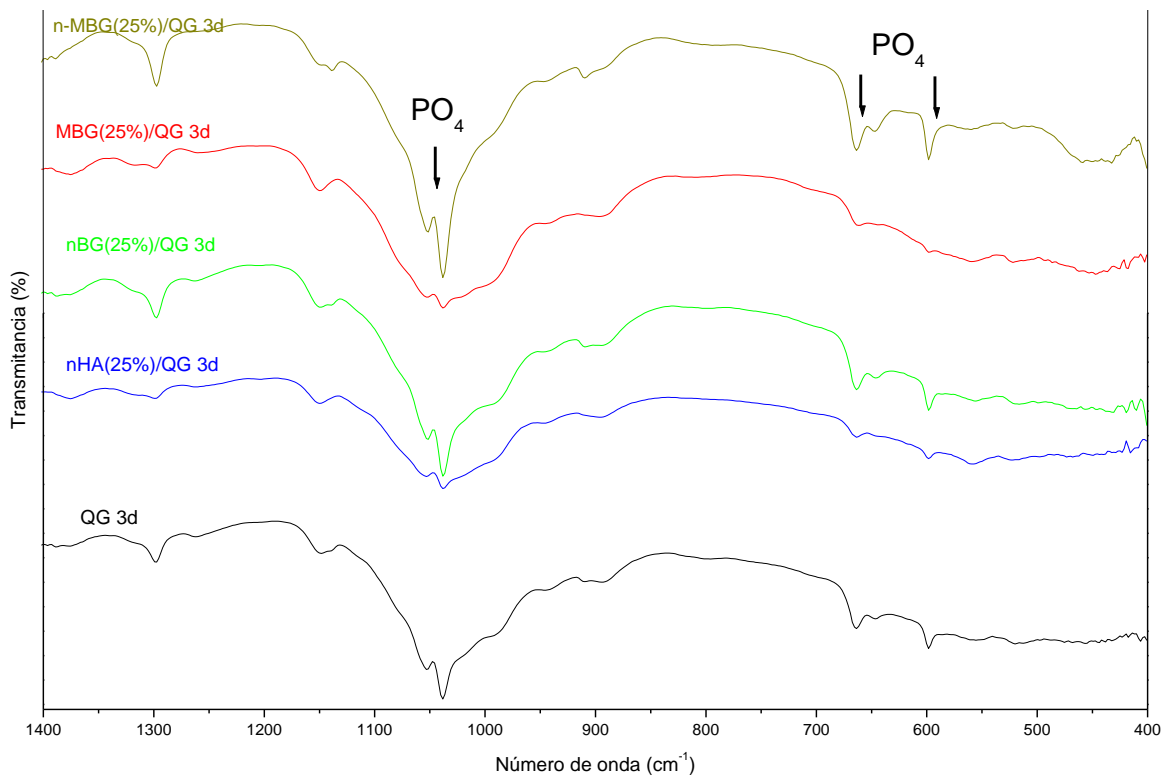


Figura 30. Espectro FTIR de bionanocompuestos al 25% después de un 3 días de inmersión en SBF.

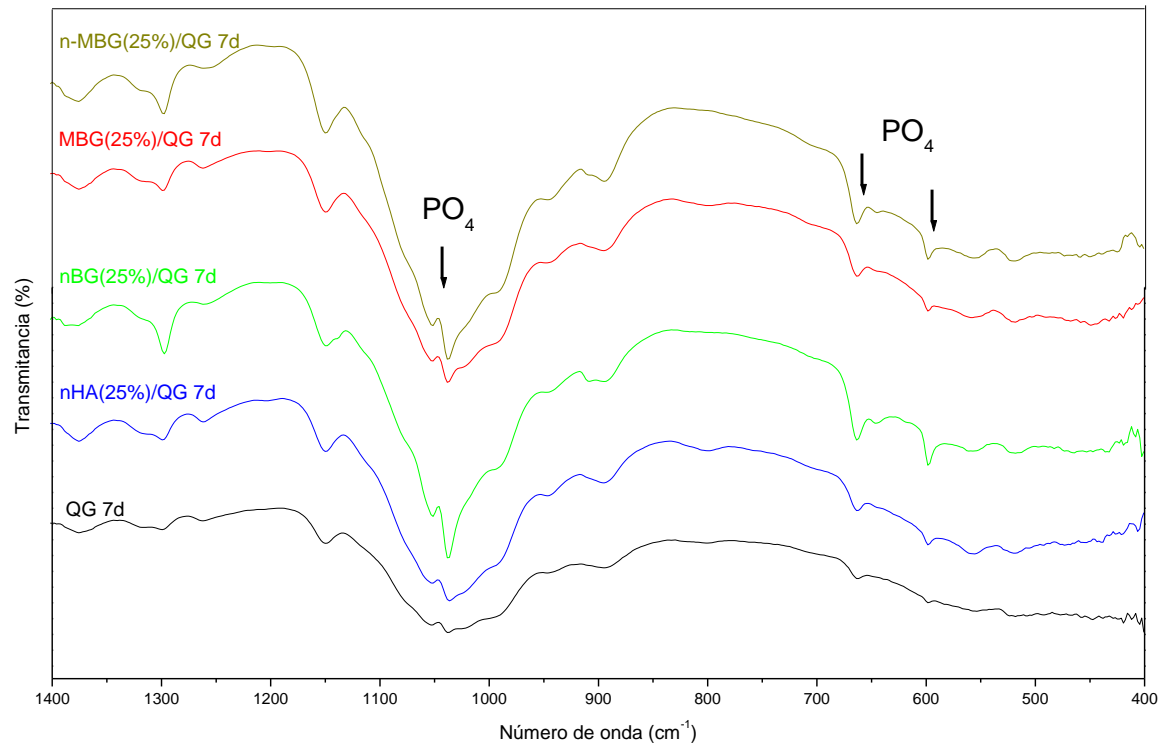


Figura 31. Espectro FTIR de bionanocompuestos al 25% después de 7 días de inmersión en SBF.

Tal como en las figuras anteriores, existe un aumento de formación de apatita cristalina a medida que aumentan los días de inmersión en SBF.

En el primer día de inmersión (**Figura 29**) todos los materiales presentaron los peaks característicos de la apatita.

A los tres días de inmersión (**Figura 30**) los peaks de apatita se intensifican, particularmente los bionanocompuestos de n-MBG y nBG.

A los siete días de inmersión (**Figura 31**) todos los bionanocompuestos presentaron las bandas características de la apatita, pero de forma más aguda e intensa que a los tres días, nuevamente los bionanocompuestos con n-MBG y nBG presentaron los mejores resultados.

En un último ensayo de FTIR (**Figura 32**) se compararon nanocompuestos cargados con nHA sin inmersión, con inmersión en SBF y con inmersión en agua destilada, a modo de verificar si la presencia de apatita en los resultados anteriores correspondía a las nanopartículas del mismo material o bien, el nanocompuesto poseía capacidad bioactiva. En la figura se aprecia que sólo aquellos nanocompuestos inmersos en SBF presentan los peaks característicos de la apatita cristalina.

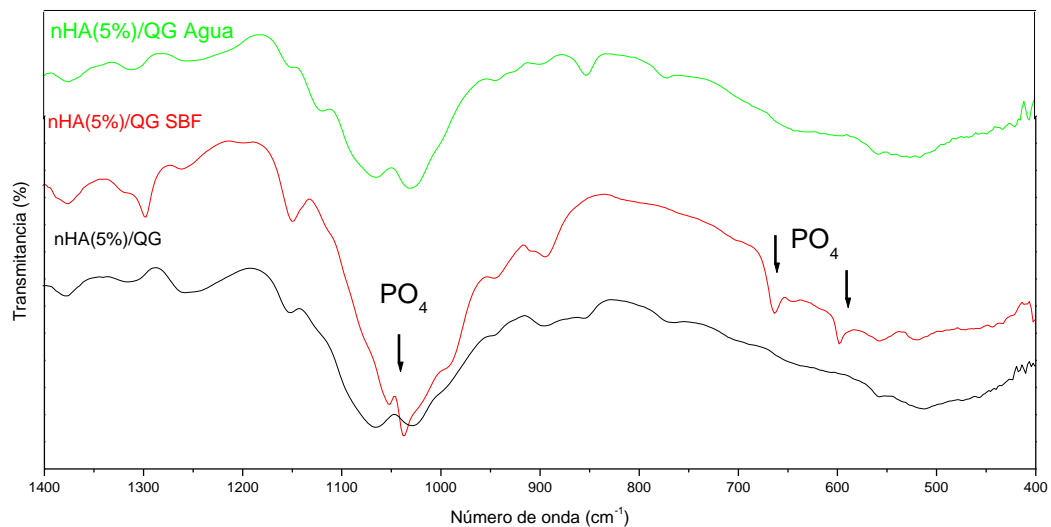


Figura 32. Espectro FTIR de bionanocompuestos de nHA al 5% con inmersión en agua destilada, con inmersión en SBF 7 días y sin inmersión.

Luego de los análisis de DRX y FTIR se procedió a confirmar la formación de apatita sobre la superficie de los bionanocompuestos mediante microscopía SEM (**Figuras 33 y 34**).

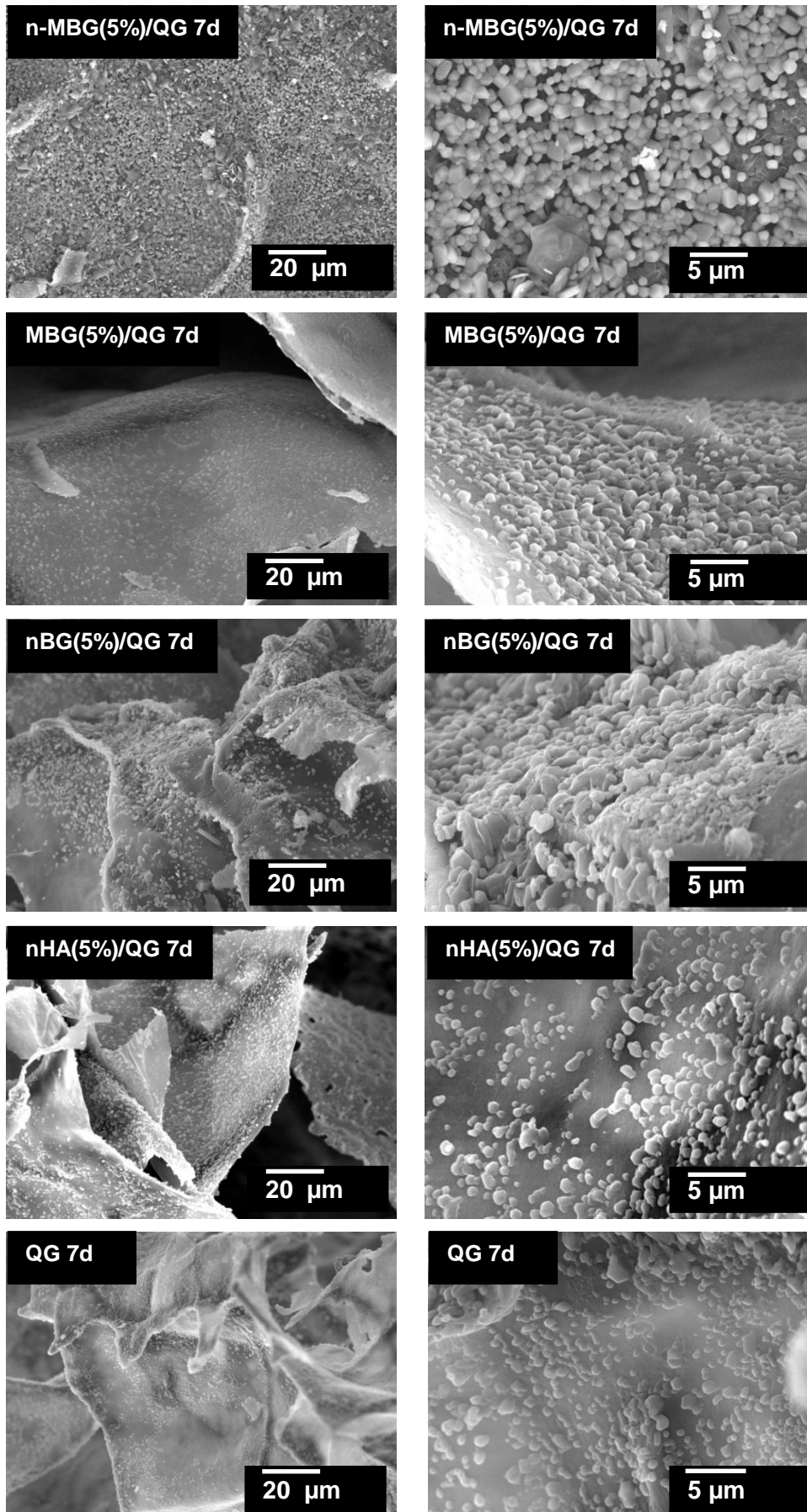


Figura 33. Imágenes SEM de los bionanocópositos de n-MBG, MBG, nBG y nHA al 5% además de andamio puro QG luego de 7 días de inmersión en SBF.

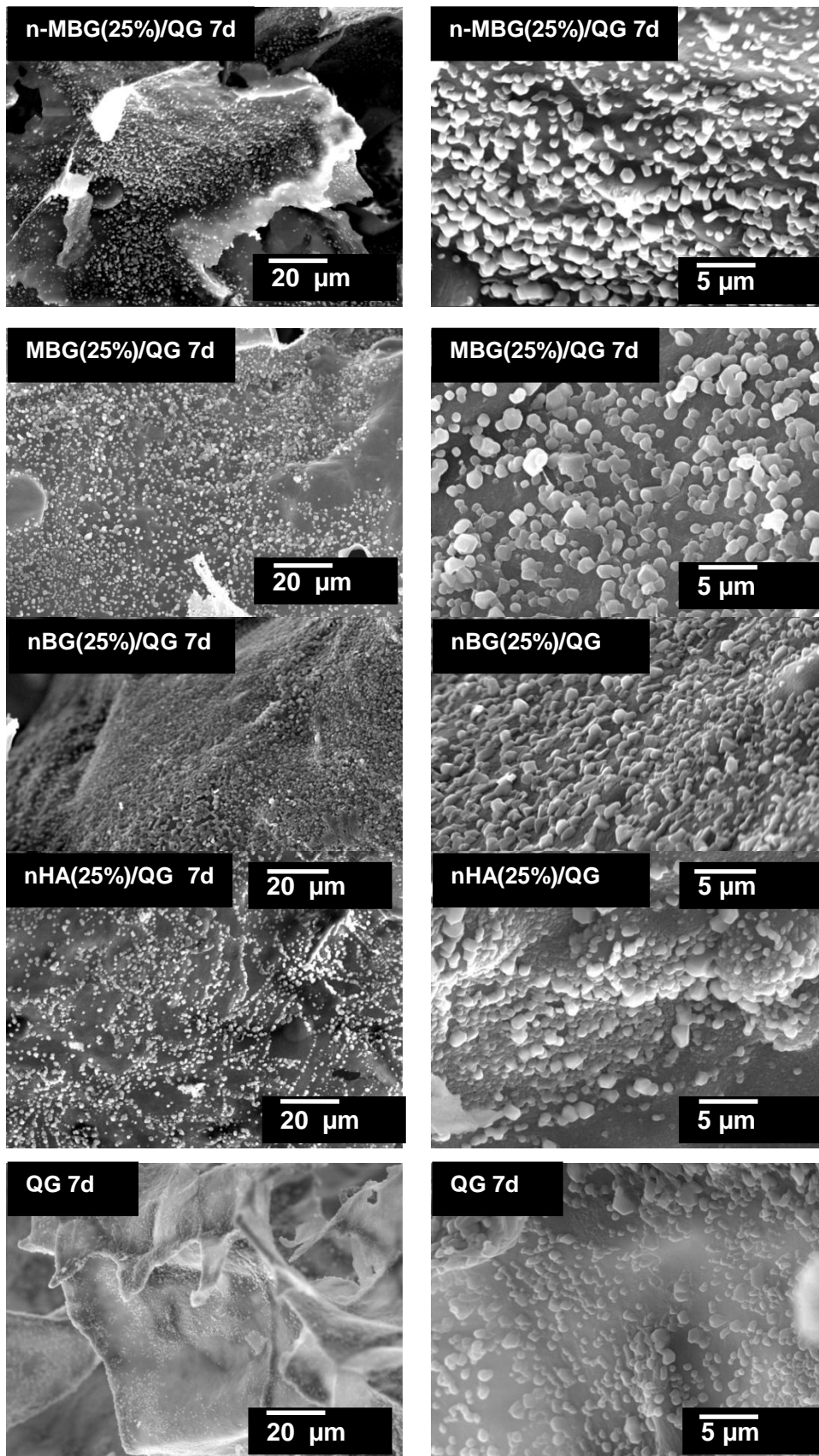


Figura 34. Imágenes SEM de bionanocompuestos al 25% y QG, luego de 7 días de inmersión en SBF.

Las imágenes obtenidas muestran la formación de depósitos de apatita en la superficie de todos los bionanocompuestos tras 7 días de inmersión en SBF. En todos los bionanocompuestos al 25% (**Figura 34**) se observa una mayor cantidad de depósitos de apatita que en aquellos al 5% (**Figura 33**), a su vez todos los bionanocompuestos cargados con nanopartículas presentaron mayor cantidad de apatita que la matriz pura. Particularmente, aquellos bionanocompuestos cargados con nBG y n-MBG indujeron la formación de una capa de apatita más densa y continua que aquellos con MBG y nHA. Los resultados de FTIR y microscopía SEM concuerdan con lo obtenido mediante análisis DRX.

7. Ensayo preliminar de citocompatibilidad celular

Se realizó en un ensayo preliminar de citocompatibilidad celular Alamar Blue con fibroblastos cultivados 1 día sobre bionanocompuestos al 5% y matriz pura. En la **Figura 35** se pueden apreciar los niveles de fluorescencia en relación a los andamios. Los resultados indican que existe proliferación celular tipo fibroblasto en presencia de los distintos bionanocompuestos. La prueba Shapiro-Wilk indicó que existe una normalidad en la distribución de los datos. El test ANOVA arrojó que no se presentan diferencias estadísticamente significativas entre los grupos de estudio.

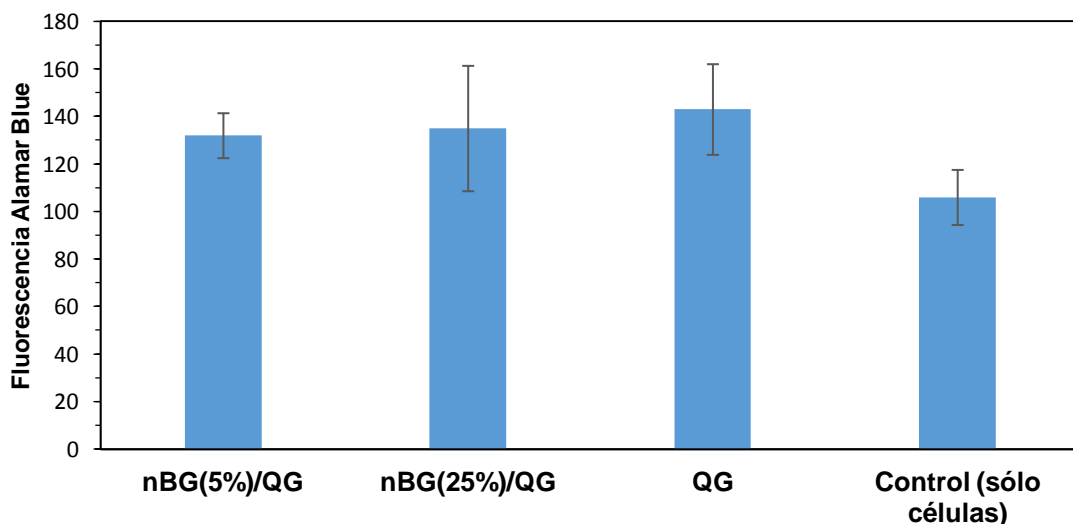


Figura 35. Ensayo de citocompatibilidad Alamar Blue de fibroblastos cultivados 1 día en presencia de bionanocompuestos al 5%, matriz pura (QG) y control (células sin presencia del material). ($p < 0.05$)

7. DISCUSIÓN

Mediante técnica sol gel se sintetizaron partículas biocerámicas con diferente estructura nanométrica. Mediante microscopía TEM se verificó que **n-MBG** es una partícula de morfología externa esférica que combina un tamaño de orden nanométrico con una estructura interna altamente ordenada conformada por nanoporos, lo cual le confiere una gran área superficial interna. El **MBG** posee un tamaño micrométrico y es de carácter amorfo, sin embargo su estructura interna es altamente ordenada debido a un sistema de poros de dimensiones nanométricas (4-7nm) (Covarrubias y cols., 2015), lo que explica su gran área superficial al igual que la de n-MBG. Las imágenes de microscopía TEM confirman la estructura interna de las nanopartículas de n-MBG y MBG la cual consiste en nanoporos hexagonales similar al de un panal de abeja. También se observa que **nBG** presenta un tamaño nanométrico y forma esférica. Por otro lado, **nHA** es una partícula de tamaño nanométrico y estructura cristalina, la cual determina su morfología alargada tipo aguja como se puede apreciar en las imágenes de microscopía TEM. El área superficial de las nanopartículas de nBG y nHA está dada principalmente por su superficie externa al ser partículas no porosas.

En los resultados correspondientes a la caracterización de los andamios bionanocompuestos mediante FITR-ATR se pueden observar las bandas típicas de los enlaces que presentan los biopolímeros de quitosano y gelatina. En los gráficos de DRX se puede apreciar el halo amorfo característico de los biopolímeros. Estos resultados indicarían que la incorporación de nanopartículas durante su preparación no altera su estructura química del biopolímeros. Las imágenes SEM de los bionanocompuestos con nanopartículas corroboran la incorporación de las distintas biocerámicas en las paredes del andamio, en estas imágenes se observaron clusters de las biocerámicas de tamaño micrométrico que indicarían cierto grado de aglomeración durante la formación de los bionanocompuestos.

Los bionanocompuestos sintetizados presentaron distinta porosidad de acuerdo al tipo de nanopartícula incorporada como puede apreciarse en los resultados de

microscopía SEM. La estructura del andamio juega un rol importante en la determinación del grado y tasa de crecimiento de nuevo hueso (Bignon y cols., 2003; Hing y cols., 2005), algunos parámetros utilizados para la preparación de andamios en regeneración ósea son la porosidad, tamaño, morfología e interconexión de poros. La porosidad de los bionanocompuestos es necesaria para la migración y proliferación de células mesenquimales y osteoblastos así como para la vascularización. El **tamaño de poro** y la presencia de **interconexiones** tiene un gran impacto sobre la vascularización (Xiao y cols., 2015) ya que permiten que los nutrientes infiltren y promuevan el crecimiento de nuevos vasos (Mastrogiacomo y cols., 2006). En un estudio (Peter y cols., 2010) se concluyó que un tamaño de poro entre 150 a 300 μm apropiado para una adecuada migración celular hacia el interior de los andamios. Otros estudios sugieren que la presencia de macroporos ($>50 \mu\text{m}$) contribuye a la osteogénesis facilitando el transporte celular, mientras que la presencia de microporos ($<20 \mu\text{m}$) aumenta el crecimiento óseo debido a un incremento del área superficial del andamio y además proveen puntos de unión a osteoblastos (Woodard y cols., 2007). En las imágenes SEM se observa la estructura porosa relativamente uniforme de los materiales nanocompuestos, con un rango de 20-400 μm , lo que demuestra que la porosidad de los andamios es adecuada y que al poseer tanto macroporos como microporos, promueven el crecimiento de nuevo tejido óseo. El tamaño de poro difiere entre los andamios puros y los cargados con nanopartículas, lo que sugiere un efecto de las nanopartículas de BG y HA en la porosidad del andamio. En la literatura (Lee y cols., 2010) se ha señalado que los distintos tamaños y tipos de nanopartículas pueden inducir un cambio en las estructuras de hielo durante el congelamiento, afectando por ende el tamaño y forma de los poros de la matriz resultantes de la liofilización. Esto se explica por su energía superficial, la que puede causar un comportamiento de segregación distinto para cada partícula. Además del tamaño de poro, se ha descrito que la presencia de interconexiones también es favorable para el andamio ya que estas funcionan como vías para el crecimiento de los vasos sanguíneos, ejercen un efecto positivo en la tasa de deposición ósea y en la profundidad de infiltración tanto *in vitro* como *in vivo* (Hing y cols., 2002). En las imágenes de microscopía SEM de los bionanocompuestos se

encontró que aquellos cargados con nBG presentaron interconexiones entre sus poros lo que determinaría un comportamiento favorable como material para regeneración ósea.

Se ha descrito que andamios más porosos ofrecen buenas condiciones para el transporte de nutrientes y desechos metabólicos debido a su alta área superficial específica, mientras que andamios más densos proporcionan una excelente resistencia mecánica cuando se implanta en el cuerpo (Wang y cols., 2011). Los andamios que tuvieron poros más regulares y de mayor tamaño fueron nBG, n-MBG y QG, mientras que andamios con nHA y MBG tuvieron poros de menor tamaño. Este efecto podría estar relacionado con el área superficial, energía superficial, morfología y grado de agregación de cada partícula, determinando distintas estructuras de hielo que finalmente se ven reflejadas en distinta porosidad al liofilizar los materiales. Se ha reportado en la literatura que un aumento de la porosidad puede aumentar la permeabilidad del andamio pero puede ir en desmedro de sus propiedades mecánicas (Wu y cols., 2014) como su módulo de elasticidad (Shimko y cols., 2005; Hollister., 2005).

Las propiedades mecánicas del tejido óseo pueden variar drásticamente de acuerdo a su localización y función (Amini y Nukavarapu, 2012). Por lo tanto, las propiedades mecánicas de los bionanocompuestos deberían adaptarse a las exigencias mecánicas del sitio del defecto (Butler y cols., 2000) a modo de disminuir o evitar complicaciones a la zona de implantación. Se ha descrito que las propiedades mecánicas de los bionanocompuestos pueden variar de acuerdo a su composición. Las cerámicas como hidroxiapatita poseen un módulo de elasticidad y fuerza compresiva similar a la del hueso cortical, sin embargo esta posee baja tasa de degradación. Los polímeros biodegradables como quitosano y gelatina poseen propiedades mecánicas similares a las del tejido óseo esponjoso. Por otra parte, se ha descrito que la incorporación de partículas de vidrio bioactivo puede afectar positivamente en las propiedades mecánicas, reforzando la estructura del andamio en comparación con andamios no nanocompuestos (Amini y Nukavarapu, 2012). Sin embargo, en las pruebas mecánicas de compresión de los distintos bionanocompuestos no se presentaron diferencias estadísticamente

significativas de acuerdo al tipo de partícula y el porcentaje de incorporación. Estos resultados demuestran que la incorporación de nanopartículas al 5% y 25% no altera las propiedades mecánicas originales de los biopolímeros.

Junto con una adecuada porosidad y propiedades mecánicas, los andamios deben presentar una tasa de degradación compatible la regeneración simultánea del tejido (Wang y cols., 2011). Los andamios sirven como soporte temporal para la formación de nuevo tejido, por lo tanto deben mantener su integridad mientras el tejido es regenerado y las funciones biomecánicas normales se restauran. En la evaluación de la **degradación *in vitro*** de los bionanocompuestos, se presentaron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos de estudio en el mismo día de inmersión. Respecto a la pérdida de peso de los materiales con el transcurso del tiempo, se presentaron diferencias estadísticamente significativas en n-MBG 5%/QG, MBG 25%/QG, nHA 5%/QG y QG respecto al tiempo cero, lo que no permite identificar un tipo de nanopartícula o concentración que determine una mayor o menor degradación. En la evaluación de las propiedades mecánicas no se presentaron diferencia estadísticamente significativas entre los materiales , por lo tanto la incorporación de nanopartículas de HA y BG no altera el módulo de elasticidad del biopolímero.

En cuanto a la **bioactividad** de los materiales, la unión del material al hueso se atribuye a la formación de una capa de hidroxiapatita carbonatada sobre la superficie de las partículas de vidrio bioactivo. La hidroxiapatita interactúa con fibras de colágeno uniéndose con el hueso original. Este proceso puede resumirse en los siguientes pasos:

En primer lugar ocurre una disolución de los componentes del vidrio en el medio. La acumulación de productos de disolución cambia tanto el pH como la composición química de la solución, favoreciendo la aparición de sitios para la formación centros de nucleación de hidroxiapatita. Se ha demostrado que la capacidad bioactiva está directamente relacionada con la energía de activación de la disolución de iones de silicio presentes en el vidrio (Arcos y cols., 2003).

En este trabajo se evaluó la **bioactividad** de los bionanocompósitos. En el análisis DRX se observó un alto grado de cristalización de la apatita formada en nanocompósitos con nBG y n-MBG lo que puede corroborarse mediante la gran intensidad del peak característico de la apatita a los $31,7^\circ$. Este fenómeno se explica porque la cristalización de la fase de apatita sobre los bionanocompósitos depende de la concentración de iones Ca^{+2} y PO_4^{-3} en el fluido circundante. La disolución de nanopartículas de vidrio bioactivo produce iones que en combinación con los iones del SBF producen deposición de apatita sobre los materiales. Por otra parte, las nanopartículas de hidroxiapatita actúan como centros de nucleación para el crecimiento de apatita. Tal como se describió previamente, el BG posee un carácter altamente soluble y reactivo, lo que se explica por contenido de silicio y su naturaleza menos cristalina, mientras la HA es estable y menos reactiva debido a su alta cristalinidad. El silicio es un elemento esencial que se ha asociado a la formación y calcificación de tejido óseo. Se ha demostrado que el Si en solución puede producir precipitación de apatita (Valenzuela y cols., 2012) y se han detectado mayores contenidos de este elemento en etapas tempranas de la calcificación de la matriz ósea. Este efecto se puede evidenciar en bionanocompósitos cargados con nBG y n-MBG, ya que a los mismos tiempos de inmersión y contenido de partícula que nanocompósitos con HA hay una mayor formación de apatita tal como se observa en imágenes de microscopía SEM y FTIR. Bionanocompósitos con nBG y n-MBG produjeron una mayor cantidad de deposición de apatita sobre la superficie del andamio y una capa más continua de mineral tal como se aprecia en las imágenes SEM. En los resultados de FTIR se observa el efecto de nanopartículas bioactivas en la formación temprana (1 día de inmersión) de apatita en bionanocompósitos con BG. Bionanocompósitos con nBG y n-MBG presentaron mejor bioactividad, esto se explica por el carácter reactivo del vidrio bioactivo, su alta solubilidad en medios fisiológicos como SBF y el tamaño nanométrico que determina una mayor velocidad de disolución.

En estudios similares se han obtenido distintos resultados. En un estudio de Wei y Ma (2006), se comparó la capacidad de formación de apatita de andamios con ácido poliláctico respecto a andamios con ácido poliláctico e hidroxiapatita. En este estudio se detectó una mayor bioactividad en andamios con hidroxiapatita.

Ambos andamios demostraron formación apatita a partir del cuarto día de inmersión en SBF. En otro estudio, de Kong y cols. (2006) se detectó una mayor cantidad de formación de apatita en andamios de quitosano cargados con nanohidroxiapatita (nHA/Q) que aquellos de quitosano solo. Mediante microscopía SEM se observó una capa más densa de apatita en andamios de nHA/Q tras 36 horas de inmersión en SBF. Respecto al vidrio bioactivo, en un estudio de Blaker y cols. (2003) se comparó la bioactividad de compósitos de ácido poliláctico cargados con vidrio bioactivo micromérico al 5% y 40% respecto a andamios de ácido poliláctico puro. Los resultados mostraron una mayor formación de apatita en andamios con 40% de vidrio bioactivo mediante imágenes SEM. Se detectó formación de apatita en todos los compósitos cargados con vidrio bioactivo a los 7 días de inmersión en SBF. En otro estudio de Peter y cols., (2010) se evaluaron compósitos híbridos de quitosano con gelatina con nanopartículas de vidrio bioactivo incorporadas al 1%. Al evaluar la bioactividad de los biomateriales observaron una considerable formación de hidroxiapatita a los 7 días de inmersión en SBF y un peak más agudo al aumentar los días de inmersión.

Gentile y cols. (2010) evaluaron compósitos de gelatina con distintos porcentajes de hidroxiapatita y vidrio bioactivo en su composición. Luego de 3 y 7 días de inmersión en SBF, los compósitos con 70% de vidrio y 30% de gelatina fueron los que presentaron mejor bioactividad.

Todos estos estudios confirman lo observado en el ensayo de bioactividad del presente trabajo, que partículas biocerámicas le otorgan propiedades bioactivas al biopolímero puro y que al comparar las propiedades de la hidroxiapatita con el vidrio bioactivo, este último exhibe una bioactividad superior. En un estudio previo de este mismo proyecto se compararon las propiedades bioactivas de biocerámicas de hidroxiapatita y vidrio bioactivo en polvo (Covarrubias y cols., 2015), los resultados demostraron una mayor bioactividad en biocerámicas de vidrio bioactivo, lo que se puede explicar por la reactividad del vidrio y dentro de los distintos tipos de nanopartículas de vidrio bioactivo destacaron aquellas de nBG y n-MBG por sobre las de MBG. Estos resultados sugieren que el tamaño nanométrico de nBG y n-MBG es más determinante que la estructura interna

mesoporosa del MBG al ser de tamaño micrométrico. Nanopartículas de escala nanométrica poseen una alta energía superficial que favorece el mayor y más rápido intercambio de iones con el medio de disolución, promoviendo la mayor formación de hidroxiapatita.

De la misma manera que el tipo de partícula es determinante en el comportamiento bioactivo de los materiales, lo es el contenido de partícula. En este trabajo bionanocompuestos con 25% de contenido exhibieron una mayor formación de apatita y a menores tiempos de inmersión que aquellos con 5% de contenido, tal como se verifica en los gráficos de FTIR. .

El pH que presenten los materiales en solución es también un aspecto relevante para la supervivencia de las células tal que permita la formación de nuevo tejido óseo. Se ha encontrado que la proliferación de osteoblastos y síntesis de colágeno no se ve afectada entre rangos de pH 6,9-7,4. La respuesta de las células osteoblásticas a los cambios de pH del medio está enmarcado en mecanismos homeostáticos para mantener un equilibrio ácido-base. En medios ácidos se aumenta la actividad reabsortiva de los osteoclastos, mientras que la actividad de deposición de mineral de los osteoblastos se ve disminuida (Arnet., 2008). En este trabajo se optimizó un protocolo para estabilizar el pH de las muestras y paralelamente reforzar su estabilidad tal que sea compatible con un pH fisiológico que permita la proliferación celular y posea una adecuada tasa de degradación *in vitro*. Todos los biomateriales cargados con nanopartículas presentaron un pH dentro de los rangos fisiológicos en medio celular, de esta forma la aplicación del protocolo fue favorable para optimizar y mejorar las propiedades de los bionanocompuestos.

En base a los resultados discutidos previamente, se puede señalar que la incorporación de nanopartículas biocerámicas a una matriz polimérica no altera sus propiedades mecánicas ni su tasa de degradación *in vitro*. En cuanto a porosidad, las nanobiocerámicas si producen variaciones en el tamaño y forma de los poros del material. Todos los biomateriales presentan una porosidad adecuada para la regeneración del tejido por el tamaño de sus poros, destacando aquellos con n-MBG y nBG. Entre estos dos últimos, bionanocompuestos con nBG además

de poseer una regularidad en sus poros, presentan interconexiones que pueden favorecer el transporte de nutrientes y desechos metabólicos durante el proceso de regeneración del tejido. Dentro de las propiedades bioactivas, la incorporación de nanopartículas biocerámicas a la matriz pura polimérica ejerce un efecto positivo sobre la bioactividad, lo que se confirma en su capacidad de formar de hidroxiapatita. En este aspecto, el carácter reactivo del vidrio favorece este efecto así como el tamaño nanométrico de las partículas, lo que se verifica con la mayor formación de hidroxiapatita en bionanocompósitos con nBG y n-MBG. Ante un mayor contenido de partículas esta capacidad se ve incrementada. En consecuencia, bionanocompósitos de nBG y n-MBG al 25% pueden ser materiales con mejores características para futuros estudios de regeneración ósea. El aspecto que determinaría una diferencia entre estas dos nanopartículas sería la presencia de interconexiones entre los poros. El pH de los distintos bionanocompósitos luego de la aplicación del protocolo es favorable y compatible con un medio a pH fisiológico tal que permita la proliferación y actividad de células osteoblásticas.

De acuerdo a los resultados que presentaron los biomateriales se seleccionaron aquellos con mejores propiedades, es decir, bionanocompósitos con nBG para realizar un ensayo preliminar de citocompatibilidad. No se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas entre los biomateriales respecto al control. Estos resultados indican que los bionanocompósitos de nBG tanto al 5% como al 25% presentan la característica de ser materiales citocompatibles.

En resumen, los bionanocompuestos de nBG poseen adecuadas propiedades químicas y físicas, junto con una elevada capacidad bioactiva para inducir la formación de apatita tipo ósea *in vitro*. La tasa de degradación de estos biomateriales permitiría la formación de nuevo tejido y su pH en medio celular es compatible con las condiciones fisiológicas del medio circundante, además estos materiales no alteran la viabilidad de células fibroblásticas. Todas estas propiedades demuestran que los bionanocompuestos preparados presentan propiedades potenciales para el estudio de terapias de regeneración ósea basadas en ingeniería de tejidos.

Es necesario considerar en el futuro estudios que evalúen la capacidad de los materiales para producir la diferenciación osteogénica de células madre y posteriormente su capacidad efectiva de regeneración de tejido óseo *in vivo*.

8. CONCLUSIONES

- La incorporación de nanopartículas biocerámicas tales como n-BG, MBG, nBG y nHA a matrices de quitosano y gelatina, permite generar andamios bionanocompósitos con porosidad adecuada para materiales de regeneración de tejidos. Bionanocompósitos cargados con nBG al 5% destacan por su porosidad homogénea y presencia de interconexiones.
- La incorporación de nanopartículas biocerámicas no altera las propiedades mecánicas de las matrices poliméricas.
- Los andamios bionanocompósitos con vidrio bioactivo presentan mejores propiedades bioactivas *in vitro* evidenciado por una mayor capacidad para formar de apatita tipo ósea.
- Se encontró que la bioactividad de los bionanocompósitos es favorecida por un menor tamaño de partícula, la naturaleza reactiva del vidrio bioactivo y el mayor contenido de partícula en la matriz.
- Los bionanocompósitos a base nanopartículas de BG no alteran la viabilidad celular.
- Los materiales bionanocompósitos optimizados en este trabajo presentan adecuadas propiedades bioactivas y estructurales para el estudio de terapias de regeneración ósea, basadas en ingeniería de tejidos.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alcaide M, Portoles P, Lopez-Noriega A, Arcos D, Vallet-Regi M, Portoles MT (2010). Interaction of an ordered mesoporous bioactive glass with osteoblasts, fibroblasts and lymphocytes, demonstrating its biocompatibility as a potential bone graft material. *Acta Biomaterialia* 6, 892–899.
- Amini AR, Laurencin CT, Nukavarapu SP (2012). Bone tissue engineering: recent advances and challenges. *Critical Reviews™ in Biomedical Engineering* 40: 363-408
- Arcos D, Greenspan DC, Vallet-Regí M (2003). A new quantitative method to evaluate the in vitro bioactivity of melt and sol-gel-derived silicate glasses. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* 65(3), 344-351.
- Arnett TR (2008). Extracellular pH regulates bone cell function. *The Journal of Nutrition* 138(2), 415S-418S.
- Bignon A, Chouteau J, Chevalier J, Fantozzi G, Carret JP, Chavassieux P (2003). Effect of micro- and macroporosity of bone substitutes on their mechanical properties and cellular response. *Journal of Materials Sciences: Materials in Medicine* 14(12):1089–97.
- Blaker JJ, Gough JE, Maquet V, Notingher I, Boccaccini AR (2003). In vitro evaluation of novel bioactive composites based on Bioglass®-filled polylactide foams for bone tissue engineering scaffolds. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* 67(4), 1401-1411.
- Butler DL, Goldstein SA, Guilak F (2000). Functional tissue engineering: the role of biomechanics. *Journal of Biomechanical Engineering* 122(6):570–575.
- Celhay Rodríguez I (2014). Preparación y propiedades bioactivas de bionanocompósitos para regeneración ósea basados en biopolímeros y nanopartículas cerámicas. *Tesis para optar al título de Cirujano-Dentista Universidad de Chile*. Disponible en <http://www.repositorio.uchile.cl/handle/2250/130157>

- Covarrubias C, Arroyo F, Balanda C, Neira M, Von Martens A, Caviedes P, Urra C (2015). The effect of the nanoscale structure of nanobioceramics on their in vitro bioactivity and cell differentiation properties. *Journal of Nanomaterials* disponible en <http://dx.doi.org/10.1155/2015/526230>
- Degidi M, Piattelli A, Carinci F. (2007). Immediate loaded dental implants: comparison between fixtures inserted in postextractive and healed bone sites. *Journal of Craniofacial Surgery* 18(4):965-71.
- Dimitriou R, Jones E, McGonagle D, Giannoudis PV (2011). Bone regeneration: current concepts and future directions. *BMC Medicine* 9:66
- El-Hefian EA, Nasef M, Yahaya AH, Khan RA (2010). Preparation and characterization of chitosan/agar blends: rheological and thermal studies. *Journal of the Chilean Chemical Society* 55(1), 130-136.
- Enrione J, Osorio F, López D, Weinstein-Oppenheimer C, Fuentes MA, Ceriani R (2010). Characterization of a Gelatin/Chitosan/Hyaluronan scaffold-polymer. *Electronic Journal of Biotechnology* 13(5): 20-21.
- García, A, Cicuendez M, Izquierdo-Barba I, Arcos D, Vallet-Regí M (2009). Essential Role of Calcium Phosphate Heterogeneities in 2D-Hexagonal and 3D-Cubic SiO₂-CaO-P₂O₅ Mesoporous Bioactive Glasses. *Chemistry of Materials* 21 (22): 5474-5484.
- Gentile P, Chiono V, Boccafoschi F, Baino F, Vitale-Brovarone C, Vernè E, Ciardelli G (2010). Composite films of gelatin and hydroxyapatite/bioactive glass for tissue-engineering applications. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition* 21(8-9), 1207-1226.
- Gentile P, Mattioli-Belmonte M, Chiono V, Ferretti C, Baino F, Tonda-Turo C, Ciardelli G (2012). Bioactive glass/polymer composite scaffolds mimicking bone tissue. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* 100(10), 2654-2667.

- Gómez-Guillén MC, Giménez B, López-Caballero ME, Montero MP (2011). Functional and bioactive properties of collagen and gelatin from alternative sources: A review. *Food Hydrocolloids* 25, 1813–1827.
- González Rojas J (2013). Síntesis de materiales bactericidas basados en nanopartículas matéricas y biopolímeros para terapia periodontal odontológica. *Tesis para optar a título de Cirujano Dentista Universidad de Chile*. Disponible en <http://www.repositorio.uchile.cl/handle/2250/117430>
- Hae-Won K, Hyoun-Ee K, Vehid S (2005). Stimulation of osteoblast responses to biomimetic nanocomposites of gelatin–hydroxyapatite for tissue engineering scaffolds. *Biomaterials* 2(25): 5221–5230.
- Hing KA, Annaz B, Saeed S, Revell PA, Buckland T (2005). Microporosity enhances bioactivity of synthetic bone graft substitutes. *Journal of Materials. Science of Materials Medicine* 16(5):467–75.
- Hing KA, Best SM, Tanner KE, Bonfield W, Revell PA (2002). Mediation of bone ingrowth in porous hydroxyapatite bone graft substitutes. *Journal of Biomedical Materials Research A* 68(1):187–200
- Hollister SJ (2005). Porous scaffold design for tissue engineering. *Nature materials* 4(7), 518-524.
- Hong Z, Reis R, Mano J (2009). Preparation and in vitro characterization of novel bioactive glass ceramic nanoparticles. *Journal of Biomedical Materials Research. Part A* 88(2), 304–313.
- Hughes J, Cameron M, Crowley K (1989). Structural variations in natural F, OH, and Cl apatites. *American Mineralogist* 74(7-8), 870–876.
- Jayakumar R, Prabakaran M, Nair SV, Tamura H (2010). Novel chitin and chitosan nanofibers in biomedical applications. *Biotechnology Advances* 28(1):142-50.
- Jones EA, Yang XB (2005). Mesenchymal stem cells and their future in bone repair. *International Journal of Advances in Rheumatology* 3(3):15–21.

- Keshaw H, Forbes A, Day RM (2005). Release of angiogenic growth factors from cells encapsulated in alginate beads with bioactive glass. *Biomaterials* 26(19):4171-9.
- Kokubo T, Takadama H (2006). How useful is SBF in predicting in vivo bone bioactivity?. *Biomaterials* 27(15): 2907–2915.
- Kong L, Gao Y, Lu G, Gong Y, Zhao N, Zhang X (2006). A study on the bioactivity of chitosan/nano-hydroxyapatite composite scaffolds for bone tissue engineering. *European Polymer Journal* 42(12), 3171-3179.
- Krishnan V, Lakshmi T (2013). Bioglass: A novel biocompatible innovation. *Journal of Advanced Pharmaceutical Technology & Research* 4:78-83.
- Lee MK, Chung N, Lee J (2010). Membranes with through-thickness porosity prepared by unidirectional freezing. *Polymer* 51: 6258–6267.
- Lim EH, Sardinha JP, Myers S (2014). Nanotechnology biomimetic cartilage regenerative scaffolds. *Archives of Plastic Surgery* 41(3):231-40.
- Mao JS, Zhao LG, Yin YJ, Yao KD (2003). Structure and properties of bilayer chitosan–gelatin scaffolds. *Biomaterials* 24(6), 1067-1074,
- Mastrogiacomo M, Scaglione S, Martinetti R, Dolcini L, Beltrame F, Cancedda R, Quarto R (2006). Role of scaffold internal structure on in vivo bone formation in macroporous calcium phosphate bioceramics. *Biomaterials* 27(17), 3230-3237.
- Mikael PE, Nukavarapu SP (2011). Functionalized carbon nanotube composite scaffolds for bone tissue engineering: prospects and progress. *Journal of Biomaterials and Tissue Engineering* 1(1), 76-85.
- Ministerio de Salud. (2010). Diagnóstico de situación de salud bucal Chile 2010: análisis de situación salud bucal. Chile.
- Misra SK, Mohn D, Brunner T J, Stark WJ, Philip SE, Roy I, Boccaccini AR (2008). Comparison of nanoscale and microscale bioactive glass on the properties of P (3HB)/Bioglass® composites. *Biomaterials* 29(12), 1750-1761.

- Nandi SK, Roy S, Mukherjee P, Kundu B, De DK, Basu D (2010). Orthopaedic applications of bone graft & graft substitutes: a review. *Indian Journal of Medical Research* 132:15-30.
- Peter M, Binulal NS, Nair SV, Selvamurugan N, Tamura H, Jayakumar R (2010). Novel biodegradable chitosan–gelatin/nano-bioactive glass ceramic composite scaffolds for alveolar bone tissue engineering. *Chemical Engineering Journal* 158(2), 353-361.
- Peter M, Binulal NS, Nair SV, Selvamurugan N, Tamura H, Jayakumar R (2010). Novel biodegradable chitosan–gelatin/nano-bioactive glass ceramic composite scaffolds for alveolar bone tissue engineering. *Chemical Engineering Journal* 158(2), 353-361.
- Polo-Corrales L, Latorre-Esteves M, Ramirez-Vick JE (2014). Scaffold Design for Bone Regeneration. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology* 14(1), 15–56.
- Rezwana K, Chena QZ, Blakera JJ, Boccaccinia AR (2006). Biodegradable and bioactive porous polymer/inorganic composite scaffolds for bone tissue engineering. Review. *Biomaterials* 27: 3413-3431.
- Roether JA, Gough JE, Boccaccini AR, Hench LL, Maquet V, Jérôme R (2002). Novel bioresorbable and bioactive composites based on bioactive glass and polylactide foams for bone tissue engineering. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 13(12):1207-1.
- Sanosh KP, Chu M, Balakrishnan A, Lee Y, Kim TN, Cho S (2009). Synthesis of nano hydroxyapatite powder that simulate teeth particle. *Current Applied Physics* 9: 1459–1462.
- Saska S, Souza Mendes L, Minarelli Gaspar AM, Sidorenko de Oliveira Capote T. (2015). Bone Substitute Materials in Implant Dentistry. *Current Concepts in Dental Implantology* 4(51), 978-953.
- Schropp L, Wenzel A, Kostopoulos L, Karring T (2003). Bone healing and soft tissue contour changes following single-tooth extraction: a clinical and radiographic 12-

month prospective study. *International Journals of Periodontics and Restorative Dentistry* 23: 313–323.

Selvam P, Bhatia SK, Sonwane CG (2001). Recent advances in processing and characterization of periodic mesoporous MCM-41 silicate molecular sieves. *Industrial and Engineering Chemistry Research* 40(15): 3237–3261.

Shi C, Zhu Y, Ran X, Wang M, Su Y, Cheng T (2006). Therapeutic potential of chitosan and its derivatives in regenerative medicine. *Journal of Surgical Research* 133(2), 185-192.

Shimko DA, Shimko VF, Sander EA, Dickson KF, Nauman EA (2005). Effect of porosity on the fluid flow characteristics and mechanical properties of tantalum scaffolds. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials* 73(2), 315-324.

Smith IO, Liu XH, Smith LA, Ma PX (2009). Nanostructured polymer scaffolds for tissue engineering and regenerative medicine. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology* 1(2), 226-236.

Stephan SJ, Tholpady SS, Gross B, Petrie-Aronin CE, Botchway EA, Nair LS (2010). Injectable tissue-engineered bone repair of a rat calvarial defect. *Laryngoscope* 120(5):895-901.

Sukumar S, Drízhai I (2008). Bone grafts in periodontal therapy. *Acta Medica* 51(4):203-7.

Swetha M, Sahithi K, Moorthi A, Srinivasan N, Ramasamy K, Selvamurugan N (2010). Biocomposites containing natural polymers and hydroxyapatite for bone tissue engineering. *International journal of biological macromolecules* 47(1), 1-4.

Valenzuela F, Covarrubias C, Martínez C, Smith P, Díaz-Dosque M, Yazdani-Pedram M (2012). Preparation and bioactive properties of novel bone-repair bionanocomposites based on hydroxyapatite and bioactive glass nanoparticles. *Journal of Biomedical Materials Research. Part B, Applied Biomaterials* 100(6), 1672–1682.

- Vallet-Regí M (2010). Nanostructured mesoporous silica matrices in nanomedicine. *Journal of Internal Medicine* 267(1) 22–43.
- Wang Q, Wang QG, Wan C (2011). Effect of Porosity on the Structure and properties of Calcium Phosphate Bioceramics. *Ceramics-Silikáty* 55(1), 43-48.
- Wei G, Ma PX (2004). Structure and properties of nano-hydroxyapatite/polymer composite scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials* 25(19), 4749-4757.
- Wei G, Ma PX (2006). Macroporous and nanofibrous polymer scaffolds and polymer/bone-like apatite composite scaffolds generated by sugar spheres. *Journal of biomedical materials research Part A* 78(2), 306-315.
- Woodard JR, Hilldore AJ, Lan SK, Park CJ, Morgan AW, Eurell JAC, Johnson AJW (2007). The mechanical properties and osteoconductivity of hydroxyapatite bone scaffolds with multi-scale porosity. *Biomaterials* 28(1), 45-54.
- Wu C, Fan W, Chang J (2013). Functional mesoporous bioactive glass nanospheres: synthesis, high loading efficiency, controllable delivery of doxorubicin and inhibitory effect on bone cancer cells. *Journal of Materials Chemistry B* 1: 2710–2718.
- Wu C, Jiang C (2015). Mesoporous Bioactive Glasses: Structure Characteristics, Drug/growth Factor Delivery and Bone Regeneration Application. *Interface Focus* 2(3):292-306.
- Wu S, Liu X, Yeung KW, Liu C, Yang X (2014). Biomimetic porous scaffolds for bone tissue engineering. *Materials Science and Engineering: R*(80), 1-36.
- Xiao X, Wang W, Liu D, Zhang H, Gao P, Geng L, Wang Z (2015). The promotion of angiogenesis induced by three-dimensional porous beta-tricalcium phosphate scaffold with different interconnection sizes via activation of PI3K/Akt pathways. *Scientific Reports* 5, 9409.
- Yoo JS, Kim YJ, Kim SH, Choi SH (2011). Study on Genipin: A New Alternative Natural Crosslinking Agent for Fixing Heterograft Tissue. *The Korean Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery* 44(3), 197–207 disponible en: <http://doi.org/10.5090/kjtcs.2011.44.3.197>.