



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS FÍSICAS Y MATEMÁTICAS
DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA QUÍMICA, BIOTECNOLOGÍA Y MATERIALES

**ELABORACIÓN DE UN COMPÓSITO BIOACTIVO Y BIOCOMPATIBLE A
BASE DE BIOVIDRIO 45S5 Y ÓXIDO DE GRAFENO**

**MEMORIA PARA OPTAR AL TÍTULO DE INGENIERA CIVIL QUÍMICA E
INGENIERA CIVIL EN BIOTECNOLOGÍA**

CAROLINA PAZ ROSS ORTIZ

PROFESOR GUÍA:
HUMBERTO CRISTIÁN PALZA CORDERO
MIEMBROS DE LA COMISION:
RAÚL QUIJADA ABARCA
JUAN FRANCISCO VIVANCO

SANTIAGO DE CHILE
2018

RESUMEN DE LA MEMORIA PARA OPTAR AL

TÍTULO DE: Ingeniera Civil Química e Ingeniera Civil en Biotecnología

POR: Carolina Paz Ross Ortiz

FECHA: 24/04/2018

PROFESOR: Humberto Palza Cordero

ELABORACIÓN DE UN COMPÓSITO BIOACTIVO Y BIOCOMPATIBLE A BASE DE BIOVIDRIO 45S5 Y ÓXIDO DE GRAFENO

El continuo y creciente envejecimiento de la población conlleva a una mayor incidencia de enfermedades degenerativas óseas. Para su reparación se necesitan implantes que en un futuro no darán abasto para cubrir estas necesidades. Así, se hacen necesarias nuevas alternativas de reemplazo de injerto como los biomateriales. Entre ellos, el biovidrio 45S5 (BV) ha mostrado excelentes propiedades de biocompatibilidad y biodegradabilidad, mientras que el óxido de grafeno (GO) de proliferación y diferenciación celular. Es así que, se propone elaborar un compósito a base de biovidrio 45S5, evaluando la adición de óxido de grafeno para la bioactividad, capacidad antimicrobiana y viabilidad celular. Se espera obtener un mejor desempeño para el compósito de BV/GO 0.5% dado sus propiedades reportadas en bibliografía.

La metodología parte con la elaboración del biovidrio (sol-gel) y la de GO (Marcanos-Terrones), fabricando polvos a razones de 20:0, 20:0.5 y 20:2 para BV:GO respectivamente. Se caracterizó el material con XRD y SEM/EDS, se analizó la bioactividad mediante la formación de una capa de hidroxiapatita (HCA) para los días 1, 7 y 14 en SBF, se evaluó la actividad antimicrobiana sobre gram-positiva y negativa midiendo la cantidad de unidades formadoras de colonia, y la viabilidad celular sobre células madre mesenquimales de pulpa dental humana.

En cuanto a la bioactividad, no se pudieron observar los resultados para GO al 2% por la disolución completa de la muestra, mientras que el BV/GO 5% mostró casi el doble de formación de HCA en comparación con BV puro. La actividad antimicrobiana tuvo mejor desempeño para el biovidrio solo en ambas bacterias (~ 500 UFC), luego los compósitos con GO ($\sim 10^4$ UFC), y finalmente el GO solo (No Contable). En viabilidad celular BV/GO 0.5% exhibió un desempeño de 66% de células activas metabólicamente para el séptimo día, mientras que 64% para BV y 61% para BV/GO 2%.

Se concluye que el candidato con más potencial para aplicaciones biomédicas es el BV/GO al 0.5%, pues presenta el mejor desempeño en la bioactividad y viabilidad celular, quedando en duda su verdadero potencial para la actividad antimicrobiana por las condiciones del protocolo.

AGRADECIMIENTOS

Realizar mi trabajo de tesis fue posible gracias a la contribución de muchas personas.

En primer lugar, mi profesor guía Humberto Palza, que con él pude desarrollar un tema de mi interés y agradezco su guía desde el comienzo y las herramientas que me facilitó para desarrollarla. La comisión evaluadora, Raúl Quijada y Juan Francisco Vivanco que me aportaron de su experiencia para mejorar mi trabajo final. A Patricia Palma de odontología, que me ayudó en gran parte con la experimentación en mi tesis. A las chicas del laboratorio de microbiología Carla, Carmen y Darna, que siempre estuvieron ahí para prestarme una mano en la experimentación o para aconsejarme de la vida. A Miguel Maureira que me prestó ayudó con la experimentación de viabilidad celular, dentro del proyecto U-Redes. A Andrés Ibáñez de cristalografía y difracción de rayos X, por su disposición a atenderme en urgencias y buenos consejos. A Cristian Nievas de Geología, Francisco Díaz de Catálisis, José Galaz de CIEN-UC y al Proyecto Fondecip EQM150101, donde realicé algunas caracterizaciones de materiales.

A Gina nuestra gran secretaria, por todas las veces que me salvó y orientó en diversos asuntos de la universidad, y por sobre todo de la tesis.

El apoyo del encargado del laboratorio de Ingeniería de Polímeros, Juan Benavides, que sin él no hubiese podido hacer gran parte de mis experimentaciones, me enseñó y ayudó en el laboratorio y su simpatía y disposición me hacían sentir siempre cómoda y dispuesta a trabajar.

A mis compañeros de laboratorio, que me prestaban su ayuda en diferentes etapas de mi trabajo y con los que podía distraerme y tirar la talla.

A mis compañeros de plan común, que sin ellos sobrevivir en esos tiempos se me hubiese hecho imposible y no estaría ahora a punto de titularme.

A mis compañeros de carrera, con los que hice mis tareas, estudié para controles, formamos grupos de trabajo, carreteamos, salimos a celebrar, disfrutamos y nos hicimos amigos.

Mis amigas del colegio Julie y Flo, que me han apoyado, dado ánimos, hecho reír y contenido en diferentes momentos de la vida.

Y finalmente a mi familia, que tanto los quiero y aprecio. A mi papá Álvaro y mi mamá Sara que siempre me apoyaron incondicionalmente y me han ayudado tremendamente para estar y ser quien soy hoy. Mis hermanas Maca y Dani por soportarme en las malas y ser mis buenas amigas. Y a mis mascotas Loba, Leña y Tigri por entregarme amor incondicional cada vez que llego a mi casa y hacerme sentir como la mejor persona del mundo.

Gracias a todos por contribuir un granito en esta etapa y hacerme más feliz en el camino.

TABLA DE CONTENIDO

CAPÍTULO 1 INTRODUCCIÓN	1
1.1 Motivación	1
CAPÍTULO 2 FUNDAMENTOS Y ESTADO DEL ARTE	3
2.1 Hueso humano	3
2.1.1 Remodelación ósea	5
2.2 Ingeniería de tejidos e injertos óseos	6
2.2.1 Ingeniería de tejidos	6
2.2.2 Injertos	8
2.3 Biomateriales para la regeneración ósea	9
2.3.1 Biovidrio 45S5 (BV)	12
2.3.2 Óxido de grafeno	17
2.4 Compósitos BV/GO	22
CAPÍTULO 3 OBJETIVOS	27
3.1 Objetivo general:	27
3.2 Objetivos específicos:	27
CAPÍTULO 4 METODOLOGÍA	28
4.1 Síntesis y caracterización biovidrio 45S5 y óxido de grafeno	28
4.1.1 Síntesis Biovidrio 45S5	28
4.1.2 Síntesis óxido de grafeno	28
4.1.3 Caracterización biovidrio 45S5	29
4.2 Elaboración pastillas de biovidrio/óxido de grafeno	30
4.3 Bioactividad	30
4.4 Actividad Antimicrobiana	30
4.5 Viabilidad Celular	31
CAPÍTULO 5 RESULTADOS Y DISCUSIONES	33
5.1 Caracterización biovidrio 45S5 por síntesis sol-gel	33
5.2 Morfología compósitos biovidrio 45S5 con óxido de grafeno	35
5.3 Bioactividad de pastillas de biovidrio 45S5 con óxido de grafeno	37
5.4 Actividad Antimicrobiana	48
5.5 Viabilidad celular	53
CAPÍTULO 6 CONCLUSIONES	58
CAPÍTULO 7 BIBLIOGRAFÍA	59

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1: ORGANIZACIÓN ESTRUCTURAL JERÁRQUICA DEL HUESO [18].....	4
FIGURA 2: ILUSTRACIÓN ETAPAS DE REMODELACIÓN DEL HUESO [24]	6
FIGURA 3: TETRAHEDRO DE SÍLICE Y NANOPARTÍCULAS. IMAGEN OBTENIDA DE [48]	13
FIGURA 4: PRINCIPALES GRUPOS FUNCIONALES PARA G, GO Y RGO, OBTENIDO DE [69].....	17
FIGURA 5: REPRESENTACIÓN DE LOS POSIBLES MODELOS ESTRUCTURALES PARA EL GO, OBTENIDO DE [71]	18
FIGURA 6: EFECTO DEL TAMAÑO DE LA LÁMINA CON LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA, OBTENIDO DE [77] ..	21
FIGURA 7: RELACIÓN ENTRE LA DEBRIS OXIDATIVA Y LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA, DE [78].....	21
FIGURA 8: EVALUACIÓN DE LA CANTIDAD DE ANIONES SUPERÓXIDO RADICALES EN N-BG, RGO, Y LOS COMPOSITOS PREPARADOS POR DISPERSIÓN, ULTRASONICACIÓN Y REDUCCIÓN SIMULTÁNEA, DE [87].	25
FIGURA 9: MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO DE PASTILLA DE BIOVIDRIO 45S5 SINTETIZADAS POR MÉTODO SOL-GEL Y MOLDEADA EN PRENSA. A) AUMENTO DE 1 MM, B) AUMENTO DE 300 NM	33
FIGURA 10: DRX DE LAS PASTILLAS DE BIOVIDRIO 45S5. $\Delta Na_2CaSi_2O_6$ Y $\bullet Na_2Ca_2Si_3O_9$	35
FIGURA 11: SUPERFICIE PASTILLA DE BIOVIDRIO 45S5 CON ÓXIDO DE GRAFENO AL 0.5%. LA FLECHA INDICA AGLOMERADOS EN LA PASTILLA.	36
FIGURA 12: SUPERFICIE PASTILLA DE BIOVIDRIO 45S5. LA FLECHA INDICA AGLOMERADOS EN LA PASTILLA.	36
FIGURA 13: SUPERFICIE PASTILLA DE BIOVIDRIO 45S5 CON ÓXIDO DE GRAFENO AL 2%. LA FLECHA INDICA PARTÍCULAS EN LA SUPERFICIE DE LA PASTILLA.	36
FIGURA 14: EVOLUCIÓN PH DEL BIOVIDRIO EN LA SOLUCIÓN DE SBF.....	38
FIGURA 15: DIFRACTOGRAMA DE BIOACTIVIDAD PARA LOS DÍAS 1, 7 Y 14. A) BIOVIDRIO 45S5, B) BIOVIDRIO 45S5 Y ÓXIDO DE GRAFENO AL 0,5%, C) BIOVIDRIO 45S5 Y ÓXIDO DE GRAFENO AL 2%. LOS PICOS CORRESPONDEN A $\Delta Na_2 CaSi_2 O_6$, $\bullet Na_2 Ca_2 Si_3O_9$ Y $\diamond HA$	40
FIGURA 16: IMÁGENES SEM A 10 MM PARA BIOACTIVIDAD DE PASTILLA DE BIOVIDRIO 45S5 A LOS DÍAS A) 0, B) 1 Y C) 14, SIENDO D) AUMENTO DE LA IMAGEN AL DÍA 14.....	42
FIGURA 17: EDS DEL BIOVIDRIO AL DÍA 14 EN SBF	43
FIGURA 18: IMÁGENES SEM A 5 MM PARA BIOACTIVIDAD DE PASTILLA DE BIOVIDRIO 45S5 CON GO 0.5% A LOS DÍAS A) 0, B) 1 Y C) 14, SIENDO D) AUMENTO DE LA IMAGEN AL DÍA 14 A 1 MM	44
FIGURA 19: EDS DEL BV/GO 0.5% AL DÍA 14 EN SBF	46
FIGURA 20: IMÁGENES SEM A DÍA 0 PARA BIOACTIVIDAD DE PASTILLA DE BIOVIDRIO 45S5 CON ÓXIDO DE GRAFENO 2% A A) 10 MM Y B) 1 MM.....	47
FIGURA 21: CULTIVOS EN PLACA 1000 VECES DILUIDO DE LA CONCENTRACIÓN INICIAL PARA E.COLI (x.1) Y S.AUREUS (x.2) CON LOS PRODUCTOS DE A) PBS, B) CLORHEXIDINA AL 0.12%, C) BV, D) BV + GO 0.5%, E) GO 0.5%, F) BV GO 2%, G) GO 2%.	49
FIGURA 22: TUBOS DE ENSAYO CON BACTERIA Y GO LISTOS PARA INICIAR LA ETAPA DE INCUBACIÓN, LUEGO DE TRES MINUTOS DE HABER SIDO MEZCLADO EN EL VÓRTEX.	51
FIGURA 23: VIABILIDAD CELULAR PARA LOS DIFERENTES PRODUCTOS A LOS DÍAS 1, 3 Y 7, A UNA CONCENTRACIÓN INICIAL DE 0.05 G/ML	54
FIGURA 24: VIABILIDAD CELULAR PARA LOS DIFERENTES PRODUCTOS A LOS DÍAS 1, 3 Y 7, A UNA CONCENTRACIÓN INICIAL DE 0.01 G/ML	56

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 1: TIEMPOS PARA LA REGENERACIÓN DEL HUESO	8
TABLA 2: CONCENTRACIONES BIOVIDRIO Y/O ÓXIDO DE GRAFENO PARA UTILIZAR COMO PRODUCTO.....	31
TABLA 3: COMPOSICIÓN ELEMENTAL TEÓRICA Y EXPERIMENTAL DE PORCENTAJE EN PESO DEL BIOVIDRIO 45S5 SINTETIZADO POR MÉTODO SOL-GEL.....	34
TABLA 4: ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE E.COLI Y S.AUREUS.....	53

CAPÍTULO 1 INTRODUCCIÓN

1.1 Motivación

El cuerpo humano es un organismo complejo y con variadas funciones que con el paso del tiempo comienza a presentar problemas. Muchas veces se nace con anormalidades, los tejidos no se pueden regenerar completamente luego de alguna enfermedad o lesión, e incluso aquellos defectos extensos que son controlados y reparados por el organismo no experimentan una mejora completa.

Además, con el continuo y creciente envejecimiento de la población, son cada vez más comunes las enfermedades degenerativas, entre ellas la osteoporosis que causa más de 8.9 millones de fracturas al año en el mundo [1].

En Europa para el año 2002 se realizaron aproximadamente 408.000 procedimientos de injertos óseos, mientras que en Estados Unidos el número ascendió a 600.000 operaciones [2]. Considerando el aspecto económico que esto conlleva, según un reporte anual de la industria ortopédica y GlobalData del año 2012, las ventas en injertos óseos ortopédicos superan los \$43.1 billones de dólares, el cual es un aumento de 3 veces el valor de 2002 [3].

En Chile cada 10.000 personas 15 presentan una fractura de cadera debido a la osteoporosis [4]. Además, se sabe que se realizan aproximadamente 400 trasplantes de hueso al año en el Instituto traumatológico [5].

Lo anterior evidencia que la demanda por implantes de hueso aumenta cada año y se hace necesario el procedimiento de cirugías de reconstrucción para tratar los traumas, enfermedades o tumores reemplazando el hueso dañado por uno funcional. En las últimas décadas se han hecho innovaciones en el área médica mejorando la técnica de operación, sin embargo, con este enfoque se llega a un límite de perfeccionamiento, lo que hace vital la introducción de nuevos materiales que cumplan con los requerimientos estructurales, funcionales y mecánicos del tejido óseo [6].

Existen tres grandes tipos de injertos dependiendo de su procedencia; autoinjertos (hueso obtenido del mismo paciente), aloinjertos (hueso de donante) y aloplásticos o sintéticos (materiales fabricados sintéticamente).

Un tipo de material sintético que ha tenido mucho éxito como expansor de injerto óseo y en cirugías maxilofaciales son los vidrios bioactivos [7][8].

El más utilizado es el biovidrio 45S5 (BV), que posee actividad osteointegrativa y osteoconductiva. Es capaz de formar un fuerte lazo mecánico con el hueso a través de una capa rica en silicio y un fuerte enlace químico al formar cristales de hidroxiapatita [9][10].

Otras propiedades deseadas que posee este vidrio es la actividad antibacteriana; efecto interesante para aplicaciones biomédicas [11], no produce una toxicidad local al disolverse en compuestos orgánicos y naturales de las vías metabólicas del organismo y no hay respuesta inflamatoria, ni de repulsión.

Tiene mayor fuerza mecánica en comparación con los fosfatos de calcio, presenta resistencia a las perforaciones y modelación, sin embargo se pueden fracturar en el proceso, lo que lo hace frágil dentro de los aloplásticos [12]. Lo anterior estimula a que se desarrollen mayores investigaciones en torno al BV y su uso en reparación ósea.

Otro material interesante y que se ha mostrado prometedor en los campos de eléctrica, mecánica y biomedicina es el óxido de grafeno (GO). Posee propiedades mecánicas, eléctrica y térmicas excepcionales, además de ser antimicrobiano. Se puede manipular de tal forma que sea mecánicamente rígido pero a la vez resistente, biomimético y puede tener un área superficial muy extensa, características atrayentes para el cultivo de células madre [13]. Varios estudios demuestran que mejora el desempeño osteogénico en compósitos [14][15][16][17]. A diferencia de los nanocarbonos, este se degrada en meses en materiales acídicos orgánicos, se dispersa en el agua y es metaestable, teniendo así mejores propiedades biológicas. Sin embargo, su compatibilidad y toxicidad a largo plazo aún son cuestionadas, razón por la cual en vez de utilizarse como base del compósito se prueba como recubrimiento [18].

Ya que actualmente es imposible obtener un scaffold multifuncional con un único material, el desarrollo de materiales híbridos se presenta como la solución.

Así, el biovidrio 45S5 solo es un buen material biocompatible y GO, por su parte, es un buen material para mejorar la mecánica y propiedades biológicas, por lo que reuniendo las propiedades de biocompatibilidad de BG y osteogénicas de GO, estos materiales podrían ser un biomaterial sinérgico para aplicaciones de implantes.

CAPÍTULO 2 FUNDAMENTOS Y ESTADO DEL ARTE

2.1 Hueso humano

En un adulto normal existen 213 huesos, 126 de ellos son del esqueleto apendicular, mientras que 74 del axial y 6 del ósculo auditivo, excluyendo los huesos sesamoideos. Hay cuatro categorías generales, los huesos largos de eje hueco a base de hueso cortical, huesos cortos, huesos planos de formación membranosa de hueso y huesos irregular, hechos de una combinación de membranoso, pero también hueso de formación endocondral (cartílago hialino embrionario).

El esqueleto cumple diversas funciones, entre ellas la más importante es proveer de soporte estructural al cuerpo, pero además permite el movimiento y la locomoción, protege órganos vitales, mantiene la homeostasis mineral y el balance ácido-base, actúa como un depósito de factores de crecimiento y citoquinas y finalmente otorga un ambiente adecuado para la hematopoyesis en los espacios medulares [19].

La composición general del hueso corresponde a 50-70% mineral, 20-40% matriz orgánica, 5-10% agua y 3% de lípidos. La hidroxiapatita (HA) en la forma de cristales es el componente principal, con trazas de carbonato, magnesio y ácido fosfórico. Estos minerales proveen las propiedades de fuerza mecánica y capacidad de carga del hueso mientras que los componentes orgánicos proveen de elasticidad y flexibilidad.

El esqueleto está hecho de aproximadamente 80% de hueso cortical (compacto o lamelar), correspondiente a la capa externa de los huesos que les confiere su rigidez y elasticidad y 20% de hueso trabecular (esponjoso o canceloso), tejido más suave, débil y menos denso y rígido que el cortical. Dependiendo de la ubicación del hueso en el cuerpo, esta composición variará, ya que deberá cumplir funciones principales diferentes. Por ejemplo, la vértebra posee un 25% de hueso cortical, mientras que la cabeza femoral posee un 50%. En la Figura 1 se aprecia su arquitectura.

El hueso cortical se caracteriza como un hueso sólido y denso, rodeando todos los espacios medulares. Por otro lado, el hueso trabecular usualmente tiene una estructura parecida a un panal de abejas con platos y barras trabeculares en los compartimientos del hueso medular.

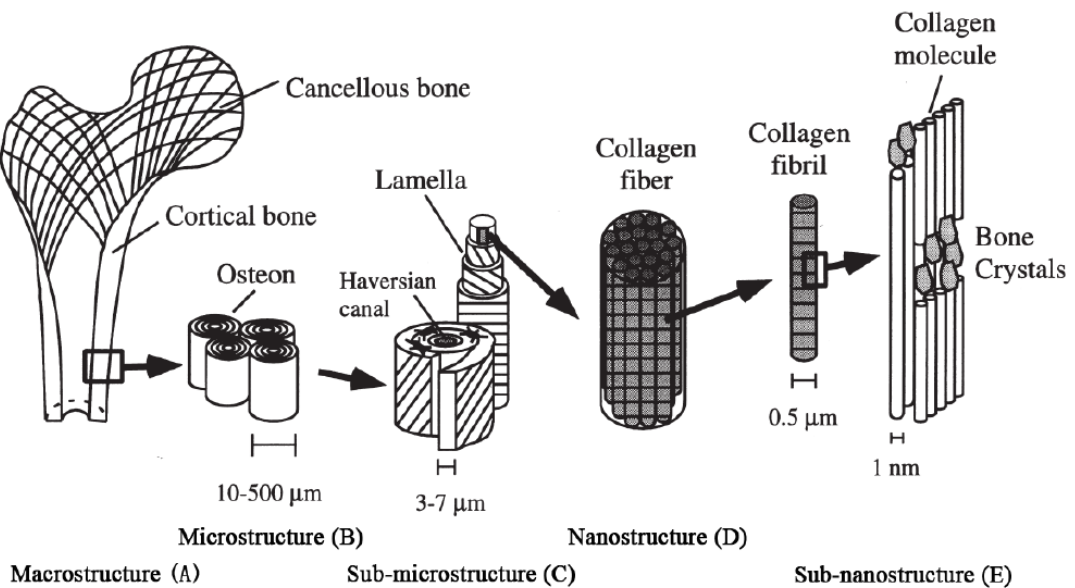


Figura 1: Organización estructural jerárquica del hueso [18].

(A) Hueso cortical y trabecular/canceloso (macroestructura) (B) Osteones del sistema Harvesiano (microestructura) (C) lamelae (sub-microestructura) (D) Ensamblaje de las fibras de colágeno(nanoestructura) (E) Cristales minerales del hueso, moléculas de colágeno y proteínas (sub-nanoestructura).

El aspecto que comparten ambos tipos de hueso es que están hechos de osteones.

Los osteones corticales forman una red ramificada conocida como el sistema Harvesiano [20], que posee forma cilíndrica con 400 mm de largo y 200 mm de ancho en la base. En un humano sano estos se encuentran en una densidad de $6 * 10^6$ osteones por metro cuadrado.

En su contraparte, los osteones trabeculares se les llama comúnmente paquetes, estos tienen forma semilunar, con un grosor aproximado de 35 mm y compuestos de lamelae concéntrica. Se encuentran en una densidad de $14 * 10^6$ osteones por metro cuadrado en humanos adultos sanos.

En cuanto a porosidad, el hueso cortical ronda entre el 5%-10%, mientras que el hueso trabecular entre un 75%-95%, pero estas cantidades varían dependiendo del estado en el que se encuentre el hueso (edad, enfermedades, sexo, remodelación). El hueso cortical posee dos superficies, la perioestál y la endoestál interna. La primera participa en el crecimiento y la reparación de fracturas, y la segunda tiene una actividad de remodelamiento alta, ya que tiene una mayor exposición a citoquinas. Con la edad la velocidad de resorción del hueso es más alta que la velocidad de formación de hueso, por lo que el espacio medular se expande.

El hueso cortical y trabecular tienen un patrón laminar, con alternaciones de fibras de colágeno, que le confieren una resistencia significativa a la estructura de los huesos lamelares. Por otro lado, los huesos entrelazados son más

débiles ya que no poseen estos patrones, como lo que se observa en aquellos huesos con osteítis fibrosa quística.

2.1.1 Remodelación ósea

Los huesos están en constante remodelación, con el fin de extraer las zonas viejas y reemplazarla con nuevo tejido óseo, evitando los microdaños y manteniendo la homeostasis mineral y la estructura resistente en un aspecto mecánico.

Hay dos tipos principales de células en el hueso; osteoclastos y osteoblastos. Los primeros son responsables por la resorción del hueso. Derivan del linaje de las células precursoras de macrófagos de monocitos. Los osteoclastos se unen a la matriz con la ayuda de integrinas, liberando iones hidrógeno y la enzima catépsina K, que acidifica el medio disolviendo el mineral de la matriz del hueso, ya que es mayormente colágeno tipo I [21].

Los osteoblastos sintetizan la matriz nueva del hueso en las superficies de formación de hueso. Dependen fuertemente de la respuesta hormonal, señales mecánicas o de la citocina, como se ha visto en los osteoblastos del hueso apendicular.

Hay un tercer tipo de células que son los osteocitos. Son osteoblastos terminales diferenciados y funcionan en conjunto con redes sincitiales apoyando la estructura del hueso y metabolismo [20].

El proceso de remodelación consta de 4 pasos ilustrados en la Figura 2: activación, resorción, reversa y formación.

- 1) Primero hay un reclutamiento y activación de los precursores de osteoclastos para formar preosteoclastos multinucleados.
- 2) Esto se une a la matriz con la acción de los receptores de integrina y péptidos con RGD en la matriz extracelular, tomando entre 2-4 semanas para resorber el hueso. Gracias a la acción de los osteoclastos al liberar iones de hidrógeno y la enzima catépsina K se acidifica el medio disolviendo el mineral de la matriz del hueso [22].
- 3) En la fase reversa la resorción de hueso cambia a formación de hueso, pero este mecanismo es aún desconocido, existiendo diferentes hipótesis al respecto [23]. Algunos suponen que se lleva a cabo con factores derivados de la matriz como TGF, IGF-1, IGF-2, PDGF o proteínas morfogenéticas del hueso, otros piensan que está mediado con el gradiente de tensión en la lacunae.
- 4) En la formación de hueso los osteoblastos sintetizan una matriz orgánica de colágeno nueva, regulando la mineralización, lo que toma entre 4-6 meses. Cuando este paso finaliza entre el 50-70% de los osteoblastos son fagocitados y, los osteocitos junto con las células de la línea ósea se convierten en las células balanceadoras.

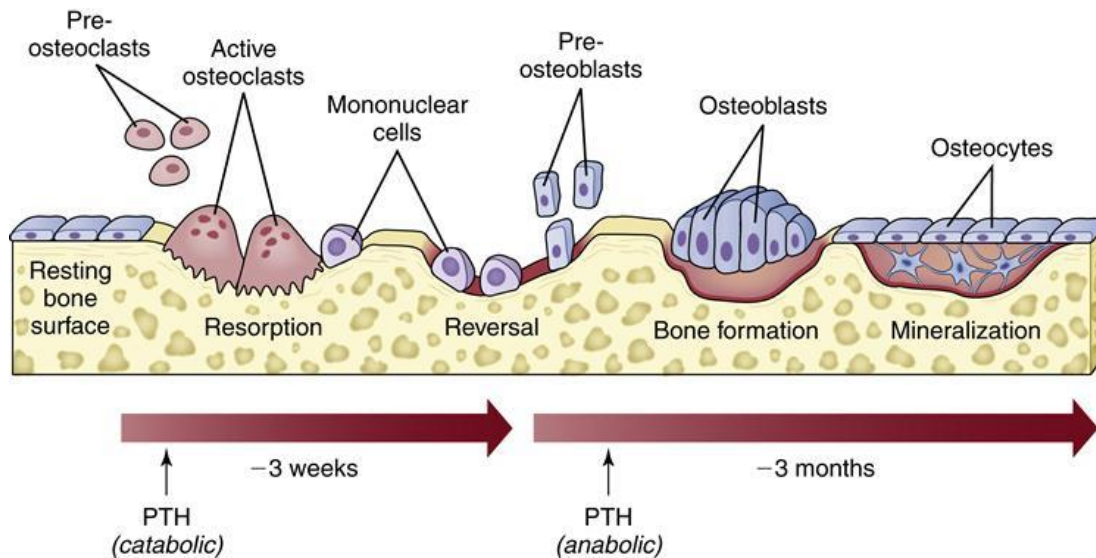


Figura 2: Ilustración etapas de remodelación del hueso [24]

Cuando las fracturas son extensas el sistema no es capaz de realizar una remodelación completa, por lo que el hueso pierde su estructura característica.

Para intentar reparar estos daños se recurre a intervenciones quirúrgicas con tal de otorgarle al cuerpo un andamio sobre el cual se regenere la estructura ósea.

2.2 Ingeniería de tejidos e injertos óseos

2.2.1 Ingeniería de tejidos

La Ingeniería de tejidos consiste en la aplicación de los principios y métodos de la ingeniería, medicina y biología, teniendo un entendimiento completo de las relaciones estructura-función en el tejido normal y aquel con enfermedades, para el desarrollo de sustitutos biológicos con el fin de reparar, mantener e incluso mejorar la función del tejido dañado [25].

De esta forma, surgen los scaffolds para la ingeniería de tejidos. Los scaffolds son dispositivos que explotan funciones físicas y biológicas específicas y complejas, ya sea *in vitro* o *in vivo*, proporcionando el soporte estructural temporal para la unión celular y el posterior desarrollo del tejido [26].

Estos andamios se comunican a través de señales bioquímicas y físicas tanto con células en el entorno y, cuando se implantan, con el sistema corporal.

Los scaffolds se producen principalmente con materiales sintéticos, y sus tecnologías de fabricación se derivan de procesos industriales ya bien

establecidos, con algunas nuevas tecnologías específicas que se han desarrollado en los últimos años para abordar las complejidades requeridas [27].

Existen dos tipos de aplicaciones, la terapéutica, en donde el tejido se cultiva en el paciente o es trasplantado hacia el paciente, y el de diagnóstico, que es un tejido hecho in vitro para probar la retención en el metabolismo de drogas, toxicidad y patogenicidad.

Hay muchos aspectos para evaluar cuando se trata de construir un scaffold. Entre ellos está la selección del material para la matriz, la forma en que va a ser el diseño y también su fabricación.

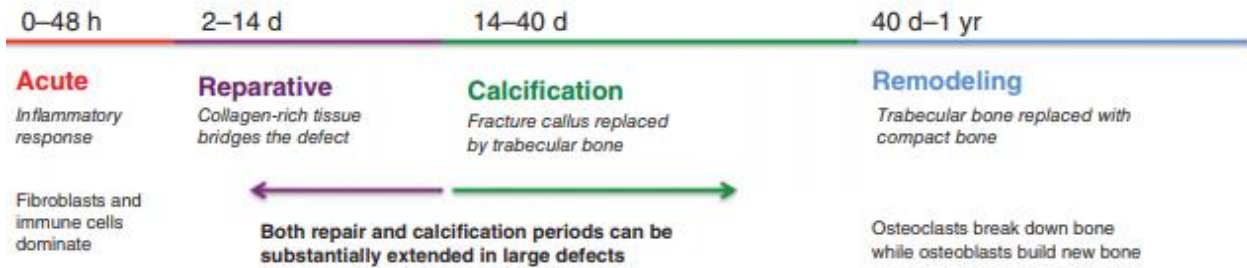
Este debe permitir la unión y migración de las células, entregar y retener factores bioquímicos y células, permitir la difusión de nutrientes celulares vitales y productos expresados y ejercer ciertas influencias mecánicas y biológicas para modificar el comportamiento de la fase celular.

Deben permanecer en el órgano hasta que todas las células que se entregan estén completamente integradas. Sin embargo, su degradación no debiese ser mayor a la velocidad de regeneración de tejido, pues en caso contrario impediría el funcionamiento del órgano. Una solución simple a esto es la biodegradabilidad. Si el biomaterial utilizado puede degradarse a la velocidad adecuada, entonces satisface todas las necesidades anteriores que un biomaterial debe cumplir [28].

En cuanto a los tejidos del cuerpo humano, el hueso es el segundo más trasplantado, después de la sangre. La búsqueda de la forma más eficiente de sustituir el hueso perdido y desarrollar el mejor material de reemplazo óseo ha sido perseguido por humanos durante miles de años [29].

Cuando se produce una fractura en el hueso, se produce un tejido cartilaginoso rico en colágeno, hasta que el tejido cierra la brecha. Primero existe una migración de proteínas y posteriormente viene la mineralización, para comenzar a formar el tejido esponjoso. Lentamente se va remodelando a un tejido más denso y ordenado [30]. Los tiempos para cada etapa se observan en la siguiente tabla.

Tabla 1: Tiempos para la regeneración del hueso [29]



Sin embargo, cuando la brecha de la lesión es muy grande, el cuerpo no es capaz de realizar una reparación completa. Esto sucede para defectos de 25 mm y dependiendo de las circunstancias corporales, si es que existe una deficiencia ya sea de vascularización o una ubicación de difícil acceso, se podría dar esta situación para defectos de 500 μm [31].

En este caso, se hace necesario el uso de injertos, para reemplazar al tejido lesionado.

2.2.2 Injertos

Los más utilizados son los autoinjertos, que corresponden a tejido óseo extraído del propio paciente e insertado en la zona afectada. Este procedimiento es preferido dada su alta biocompatibilidad con el receptor y posee las características necesarias para el crecimiento del hueso, que son:

- a) Osteoconducción: consiste en proveer el ambiente necesario para el crecimiento de células óseas necesarias para la regeneración de huesos.
- b) Osteogénesis: permite la viabilidad celular mediante la adhesión de las células al scaffold.
- c) Osteoinducción: promueve la proliferación de células madre y su posterior diferenciación a células osteogénicas.

Ahora bien, posee limitaciones como el tiempo de operación, recurso limitado y escaso y se debe realizar una operación previa para obtener el injerto, con la cual existe un 20% de probabilidad de desencadenar en morbilidad del donante (dolor a corto o largo) [32], proporcional al tamaño de la disección requerida.

La otra alternativa recurrente son los aloinjertos, que en este caso provienen de donadores o cadáveres. Posee las mismas características que el aloinjerto a excepción de las células osteogénicas. Su actividad osteoinductiva puede ser no reconocida en el cuerpo huésped por lo que se utiliza morcelizado o desmineralizado del injerto. Como problemas se observan la incidencia a fractura (19%), no unión (17% de los casos) e infecciones.

Para enfrentar la última afección, se tratan con diferentes técnicas como la congelación del tejido, congelación en seco, esterilización con rayos gamma, entre otros, pero el riesgo no se puede eliminar completamente.

La infección bacteriana se ve en el 10% de los casos y es dependiente del tamaño del injerto. La posibilidad de contraer VIH es de 1 en 1.6 millones y se han reportado tres casos de contagio con hepatitis C y uno con hepatitis B desde 1992. El riesgo es bajo, sin embargo está presente [32][33]. Incluso, otras enfermedades se han reportado a través de los años, dos casos de artritis en 2000 y una infección con *Clostridium Sordelli* en el 2001, lo que conlleva a pensar que no será erradicado en un futuro próximo.

También se tiene a los xenoinjertos, correspondientes a huesos de origen animal. Aunque con esta técnica no hay limitación en cuanto a la disponibilidad de tejido donante, hay un gran inconveniente ya que existe un alto riesgo de transmisión de enfermedades infecciosas y, obviamente, un alto riesgo de rechazo inmunológico.

Finalmente se tiene a los injertos sintéticos o aloplásticos, materiales artificiales biocompatibles (biomateriales). Generalmente son osteoconductivos, pero no necesariamente osteoinductivos u osteogénicos, a menos que se les realice un tratamiento previo como la carga de células o factores de crecimiento [34].

La ventaja de estos materiales es que cada año se logran más avances tecnológicos-científicos en la búsqueda de la similitud química, biológica, mecánica y estructural, de esta forma podrán ser moldeados 'a medida', garantizando recuperaciones rápidas y duraderas. Se revisará en más detalle a continuación.

2.3 Biomateriales para la regeneración ósea

Los biomateriales son matrices temporales para el crecimiento del hueso y proveen la arquitectura y ambiente necesario para el desarrollo del tejido. Además, se pueden utilizar como vehículos para el transporte de drogas, como antibióticos, agentes quimioterapéuticos o factores de crecimiento. Dependiendo en la aplicación exacta que se quiere lograr, ya sea soporte estructural o capacidad de transporte de medicamentos, existen materiales que son más o menos adecuados para aquellas aplicaciones. Entre ellas se encuentran polímeros, cerámicas, compósitos de ambos, metales o de origen biológico [35].

Para el diseño de estos se busca la idealidad de varias propiedades generales:

- a) La superficie debería promover la adhesión y crecimiento celular, permitiendo la retención de funciones diferenciadas celulares.
- b) La biocompatibilidad del material es necesaria, es decir, debe mostrar una nula respuesta inmunológica, y ni el material ni sus posteriores

productos generados por la degradación deberían generar una respuesta inflamatoria o de toxicidad in vivo.

- c) Biodegradabilidad ideal del compósito, en sus componentes químicos básicos y su eventual eliminación a un tiempo equivalente de regeneración de tejido.
- d) La porosidad debiese ser suficientemente alta para proveer el espacio necesario para la adhesión celular, la regeneración extracelular de la matriz, restringir una difusión mínima durante el cultivo celular, favorecer la formación uniforme del tejido dependiente de la estructura del poro, por ejemplo microporos con un tamaño menor a 10 μm son necesarios para el crecimiento capilar e interacciones entre la célula y la matriz y macroporos con un tamaño entre 150-900 μm permiten la reposición de los nutrientes y la remoción de desperdicios producidos en el crecimiento celular.
- e) El material debiese ser apto para el procesamiento de una estructura tridimensional.
- f) La estructura mecánica también es relevante, ya que el hueso responde ante la ausencia o presencia de carga física, resorbiendo o formando hueso. Es por esto que es necesario diseñar una matriz que posea propiedades mecánicas similares al tejido óseo de los alrededores inmediatos del área dañada. Si está sobrediseñada puede ser resorbida, y si el diseño no es suficiente lo más probable es que falle el aparato para soportar mecánicamente al esqueleto [35].

Así, el material debe tener características excepcionales de porosidad, bioactividad y biomecánica idéntica para lograr un compósito durable y bien unido al hueso. Actualmente para los daños en la superficie de articulaciones, fracturas en la vértebra por compresión y como tornillos y grapas degradables se utilizan plásticos, para daños grandes en el cuerpo se utilizan endoprótesis metálicas o autoinjertos/aloinjertos y finalmente para daños pequeños se utilizan cerámicas [36].

Estos últimos se muestran con características osteoinductivas y osteoconductoras, por lo que se analizará con más profundidad.

En base a la respuesta del tejido, las biocerámicas se pueden clasificar en tres grandes ramas; casi inerte como la alumina y zirconia, bioactivos como el vidrio bioactivo y las cerámicas reabsorbibles como α y β fosfato tricálcico o TCP [37].

Desde un punto de vista microestructural, estas se pueden clasificar en cerámicas cristalinas, vidrios bioactivos y cerámicas-vidrios.

Dentro de las cerámicas cristalinas destacan los fosfatos de calcio, dadas sus propiedades de similaridad de estructura y composición química a la fase mineral del hueso y su osteoconductividad.

La HA sintética posee una relación estequiométrica calcio/fosfato muy similar a la del hueso. Tiene una biocompatibilidad y osteoconductividad excelentes y ha sido utilizada exitosamente como un relleno de hueso, ya sea en forma de cemento o de gránulos, y en forma de recubrimiento para prótesis de metal. Sin embargo, su uso como scaffold es limitado por sus propiedades mecánicas y su baja velocidad de reabsorción [38].

Para solventar este último defecto, los fosfatos de calcio ahora tienen diferentes grados de solubilidad y esto se logra variando la relación Ca/P; a menor relación mayor velocidad de disolución.

Una desventaja común de esta cerámica, que en su producción forma poros, es su propiedad mecánica baja, presenta fragilidad y baja fuerza para soportar cargas. Esto limita su uso clínico a zonas de baja carga en el cuerpo humano. Hay que considerar también que la mayoría de los compósitos de fosfato de calcio se hacen mediante sinterizado a temperaturas mayores a la de cristalización, lo que puede provocar una densificación incompleta o fallos en el mismo. Existen otros materiales como vidrios-cerámicas bioactivos y compósitos que presentan mayor fuerza y rigidez en su fabricación [39].

Por otra parte se tiene a los vidrios bioactivos, los cuales han sido bastante investigados y se ha probado constantemente que son capaces de unirse fuertemente a tejido vivo (o hueso primario) al crear una interfaz que detona respuestas biológicas, como son la regeneración de tejido y la angiogénesis, y a la vez presenta una buena degradabilidad a través del tiempo [40].

Esto sucede debido a una interacción dependiente del tiempo que cambia las propiedades de su superficie al degradarse en un medio fisiológico. Suceden dos eventos simultáneos; se forma una capa de HA mientras se disuelven en sus productos (Si, Na, Ca, fosfatos, iones, entre otros), lo que estimula a la célula para la producción de tejido nuevo [41].

El primer vidrio bioactivo es el bioglass®, desarrollado por Hench L. en 1971 y utilizado clínicamente desde 1985.

Estos vidrios se sintetizan mediante el método de fundición en templado o la técnica de sol-gel. En general los vidrios hechos con este último método han reportado una formación más rápida de la capa nanocristalina de HA, debido a la mayor área disponible para intercambio iónico [42].

De la combinación de los dos anteriores se obtiene los vidrios-cerámicos, que son vidrios con varias fases cristalinas con tamaño y contenido controlado dependiente de los parámetros de tratamiento térmico otorgado. Esto exhiben propiedades mecánicas superiores respecto a los vidrios (módulo elástico, dureza, fuerza de corte y resistencia al desgaste).

Estos scaffolds se producen usualmente por el método de sinterizado, el que requiere que los vidrios se calienten por sobre su temperatura de transición para iniciar un flujo localizado. Muchos biovidrios activos, como el bioglass

45S5®, cristaliza inmediatamente sobre su temperatura de transición del vidrio, por lo que estas corresponden realmente a vidrios-cerámicas [39]. Este último tipo de biocerámica ha demostrado tener activación de genes, capacidad de regenerar el hueso con mejor y más cantidad de hueso que el tejido óseo normal, alto nivel de bioactividad, mejor fijación biológica y la capacidad de unirse a tejidos blandos y duros en comparación con la hidroxiapatita sintética [43], además está reportado que los vidrios bioactivos son capaces de estimular mayor regeneración ósea que cualquier otra cerámica bioactiva y durante 40 años de investigación en los vidrios bioactivos por variados grupos de investigación, no hay mejor composición de biovidrio en cuanto a las propiedades biológicas que el biovidrio 45S5 [44], por lo que se analizará en más profundidad.

2.3.1 Biovidrio 45S5 (BV)

El biovidrio 45S5 está compuesto de (en porcentaje peso) sílica en un 45 % (SiO_2), 24.5 % de óxido de calcio (CaO), 24.5% de óxido de sodio (Na_2O) y 6% de pentóxido de fósforo (P_2O_5). Es así que está compuesto de minerales que circulan naturalmente por el cuerpo humano, y las proporciones moleculares de los óxidos de calcio y fósforo se asemejan a las de los huesos [43].

Síntesis

Se puede sintetizar utilizando dos procedimientos; fundición en templado o la ruta sol-gel. Los biovidrios comerciales están hechos por el método de fundición, en el que los óxidos son derretidos a altas temperaturas (sobre 1300°C) en un cubo de platino y templadas en uno de grafito o en agua. El método sol-gel forma y ensambla nanopartículas de sílica a temperatura ambiente. Una solución contenedora de los precursores composicionales sufre de reacción similares a la de los polímeros para formar un gel. Este gel es una red inorgánica húmeda de sílica unida covalentemente que puede ser calentada y secada a 600°C o más para formar un vidrio [45].

La diferencia física entre estos métodos es que los vidrios de sol-gel tienden a tener una nanoporosidad inherente, mientras que los de fundición son densos. La nanoporosidad puede mejorar la nanotopografía, induciendo mayor crecimiento celular y un superficie de área específica dos órdenes de magnitud más alta que los de fundición [46][47]. Esta mayor área resulta en velocidades de dilución más rápidos.

Hay algunos biovidrios sintetizados por método sol-gel que se han acercado a la composición original del 45S5, llegando a tener 49.15% SiO_2 , 25.4% CaO , 23.33% Na_2O y 1.72% de P_2O_5 . Hay que tener en cuenta que si se quiere mantener una estructura amorfa, las temperaturas utilizadas no deben superar los 600°C [48].

La ventaja del proceso sol-gel es que tiene versatilidad y cambiando el pH del proceso se pueden sintetizar en forma de polvos nanoporosos, monolitos o nanopartículas.

Uno de los precursores más comunes es tetraetil ortosilicato (TEOS), que reacciona con agua en condiciones ácidas o básicas para formar una solución (de ahí la palabra sol) con nanopartículas [44], como se aprecia en la Figura 3.

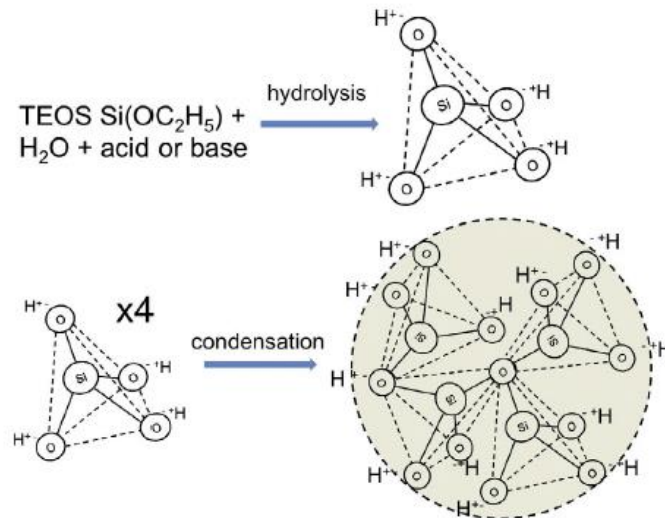


Figura 3: Tetrahedro de sílice y nanopartículas. Imagen obtenida de [44]

Si la síntesis se lleva a cabo en condiciones básicas se forman nanopartículas bioactivas esféricas y submicrométricas. Usando catálisis ácida se producen micropartículas, monolitos o espumas. En esta última, las principales nanopartículas que van de los 2 nm que se forman en el sol, se fusionan y se produce condensación (polimerización), formando uniones Si-O-Si. Las nanopartículas engrosan, se fusionan y se unen, formando una red de gel de nanopartículas ensambladas. Para introducir calcio y fósforo a la mezcla es común que se utilice calcio tetrahidratado y tetraetilfosfato (TEP) respectivamente [49].

Debido al exceso de agua en los reactivos, el gel queda húmedo. Es por esto que se usa un tratamiento térmico de 'envejecimiento', para secar y estabilizar el gel produciendo canales nanoporosos [50].

Por el exceso de agua de los reactivos, y el etanol y agua de la condensación, el gel final se encuentra húmedo. Es por esto que se le aplica un tratamiento térmico o 'envejecimiento', para secar y estabilizar la red de gel, creando canales nanoporosos. El tamaño de ellos dependerá de los precursores utilizados, la composición real del vidrio y el pH utilizado, pero usualmente fluctúan entre 1-30 nm.

Usualmente se utiliza una temperatura sobre los 700°C en el sinterizado para obtener un vidrio bioactivo y nanoporoso, este proceso térmico elimina

cualquier subproducto de los precursores que no son alcóxidos, como los nitratos [51].

Las desventajas de este método respecto al otro es la dificultad de formar monolitos. Si es que esta fuese la finalidad, durante el proceso de secado se agrietarían (mayor a 1 cm de daño). Esto se debe a dos hechos, uno de ellos es la contracción repentina y brusca que se da en el secado y la evaporación del líquido en la condensación, pues el líquido tiene que viajar por los poros desde el interior del gel, causando tensiones capilares y los agrietamientos. En cambio, para los polvos revestimientos o fibras el camino a realizar por el líquido es más corto, por tanto, menos tensión [44].

Bioactividad

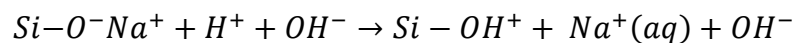
Está bien estudiado que la unión ósea se debe a la formación de una capa de hidroxiapatita (HCA), siendo esta la que interactúa con las fibrillas de colágeno del hueso dañado, formando un enlace [52].

La disolución de vidrio provoca la formación de HCA, la cual es bastante similar a la corrosión de un vidrio común.

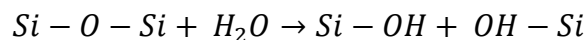
En el medio se comienzan a acumular productos de la disolución, causante del cambio de pH y composición química, cambios ideales para la formación de la capa.

Este proceso se resume en 5 etapas [40]:

- 1) Hay un intercambio catiónico entre el Ca^{2+} y/o Na^+ del vidrio con el H^+ de la solución, formando enlaces silanol (Si-OH) en la superficie del vidrio, aumentando el pH y formando una capa rica en sílice en la superficie:



- 2) El elevado pH genera un ataque a la red de sílice por parte del OH, por lo que se comienzan a romper los enlaces Si-O-Si, perdiéndose en forma de $Si(OH)_4$ en la solución, creando más enlaces silanoles en la interfaz de vidrio-solución:



- 3) Se inicia una etapa de repolimerización de la capa rica en sílice con la condensación de grupos Si-OH.
- 4) Comienza una migración en grupo de Ca^{2+} y PO_3^{4-} a la superficie, formando una película de $CaO - P_2O_5$ amorfo en la capa de sílice.
- 5) Finaliza con la incorporación de hidroxilos y carbonatos de la película a HCA

De lo anterior, la composición del vidrio es la variable que más influenciará la tasa de formación de las capas de hidroxiapatita y la unión ósea. Se ha reportado que bajo contenido de sílice conducirá a una red de sílice peor conectada, por tanto, más propensa a la disolución, lo que conlleva a que el proceso sea más acelerado. La bioactividad en sí demuestra estar relacionada directamente con la energía de activación de la disolución de sílice del vidrio [53], sin dejar de lado la importancia de la conectividad de la red que depende del contenido de sílice y otros cationes que modifican al vidrio. Por ejemplo, si se agrega más sodio en vez de silicio aumenta la tasa de disolución, pero si por otro lado se agrega iones como Al^{3+} , Ti^{4+} o Ta^{5+} en vez de sodio y calcio se reduce la bioactividad, pues se reduce la solubilidad [54].

Así, de forma general para aquellos vidrios sintetizados mediante el método de fundido si se tiene más de 60% de SiO_2 no se unen al hueso y son bioinertes, mientras que para los sintetizados por sol-gel se ha registrado bioactividad hasta 90% mol [55].

Actividad antimicrobiana

El biovidrio presenta actividad antibacterial, y en su mayoría esto se atribuye al aumento de pH por la liberación de cationes en la solución antes visto [56]. Con un biovidrio S53P4 se demostró que eliminaba patógenos relacionados con caries y periodontitis (*Streptococcus mutans*, *Actinomyces naeslundii*, *Actinobacillus actinomycetemcomitans*) in vitro. Se utilizó un tamaño promedio de partícula de 45 μm en una concentración de 50 mg/ml o superior para demostrar estas propiedades antimicrobianas, atribuidas al aumento de pH [57]. Sin embargo, no se realizó un estudio para células mamíferas con las mismas concentraciones para analizar si era citotóxicas.

En otros estudios, se necesitaron 1, 0.5 y 0.5 mg/ml de biovidrio en el cultivo para matar a las bacterias de *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus* respectivamente [58], lo que podría llevar a pensar que con una concentración más elevada se lograría el mismo efecto en un sistema in vivo, pero cuestionando la toxicidad de este cambio.

En otros estudios se ha probado que nanopartículas de 45S5 eliminaban *Enterococcus faecalis*, bacterias relacionadas con la falla de tratamientos del conducto radicular [59].

Es relevante considerar que sólo el pH es el factor que genera la actividad antibacterial, debido a que el cuerpo humano posee buffers naturales [60] que regularían en parte la alcalinización generada por el vidrio, por tanto, este efecto se podría ver diezmado. Es así que se piensa que existen otros métodos para combatir bacterias.

En otro estudio se probó el efecto de BV en concentraciones de 50 y 100 mg/ml contra *S.aureus*, *S.epidermidis* y *E.coli*, demostrando un fuerte efecto

bacteriano, notando que las las gram-positivas eran más sensibles que las gram-negativas al efecto del vidrio. Se relacionó con la formación tipo aguja de los restos del BV, dañando la pared celular e inactivando a las bacterias. Por lo que, tanto el pH como la superficie del biovidrio funcionaban como mecanismo antibacteriano [61].

En otro trabajo pusieron a prueba el área superficial específica para analizar el efecto que tenía en bacterias, utilizando partículas nanométricas versus micropartículas. Concluyeron que la eficacia en enterococos de infecciones del conducto radicular era mucho mayor para las nanopartículas debido a liberación diez veces más elevada de sílice y por tanto, mayor elevación del pH de la solución en más de tres unidades [62].

Esto significaría más útil utilizar una misma concentración de biovidrio que los ya estudiados con un tamaño de nanopartícula para tener un aumento más drástico de la alcalinidad.

Viabilidad celular

Se ha demostrado con diferentes tipos celulares que el biovidrio posee viabilidad celular. Por ejemplo, los osteoblastos humanos cultivados en 0.5 g de biovidrio 58S comenzaron a producir colágeno para formar la matriz extracelular, propiedad indispensable para la adhesión celular, todo esto sin la necesidad de suplementos como hormonas o sin la presencia de fosfato. Por otra parte, el calcio y el silicio en el medio estimulaban la división celular de los osteoblastos, mientras otras biocerámicas necesitan medios agregados para cumplir aquella función [63][64].

En otro estudio se sembraron 5000 osteoblastos de ratón, a una concentración de BV45S5, 77S y 58S de 2.38 mg por plato y se analizaron hasta el día 6. El BV 45S5 provocó una alcalinización extra e intracelular, provocando una leve hiperpolarización de la membrana plasmática, lo que generó un aumento en la producción de lactato, sin embargo no tuvo efecto sobre la viabilidad de los osteoblastos (92% viabilidad a las 48 horas), al igual que en la proliferación y diferenciación celular, a diferencia del biovidrio 77S y 58S que la disminuyeron a 88% y 66% respectivamente [65].

Cuando el BV 45S5 se mezcla con ácido fosfórico se puede tratar la hipersensibilidad de la dentina. Para esto fue necesario evaluar en conjunto la biocompatibilidad que presentaba con células de pulpa dental de rata. Se compararon mediante ensayo MTT 5000 células por plato, sembradas por 24 horas a una concentración de BV de 0.05 g/ml y se comparó con otras pastas disponibles en el mercado (Cavitón). Su viabilidad celular no difirió significativamente, sin embargo, con el análisis microscópico se podía observar un leve efecto tóxico [66].

Se ha determinado también que un derivado del BV, S70C30 sintetizado por método sol-gel, posee una serie de características deseables como lo son la formación de la fase cristalina $Na_2Ca_2Si_3O_9$, que muestra una biodegradabilidad y resistencia mecánica satisfactorias, demostraba tener bioactividad al formar la capa de HA promoviendo la unión ósea y demostraba tener citocompatibilidad [67].

En otro artículo en el que se analizaba el bioglass sintetizado por método sol-gel a una concentración de 0.1 g/ml provocaba una respuesta inicial de shock en las células debido a la alcalinidad del medio, sin embargo, este efecto se alivió con el tiempo (a los dos días). Contrastando con un grupo de HA, no se observó citotoxicidad significativa, sin embargo este efecto no se podía ligar a priori al balance de alcalinidad del medio por parte de las células [68].

2.3.2 Óxido de grafeno

El grafeno y sus derivados como óxido de grafeno (GO) u óxido de grafeno reducido (rGO) han recibido mucha atención últimamente para ser utilizados en aplicaciones biomédicas, ya que presentan propiedades interesantes, tales como gran área de superficie, alta fuerza mecánica y facilidad de funcionalización. La diferencia general entre sus estructuras se encuentra en la Figura 4.

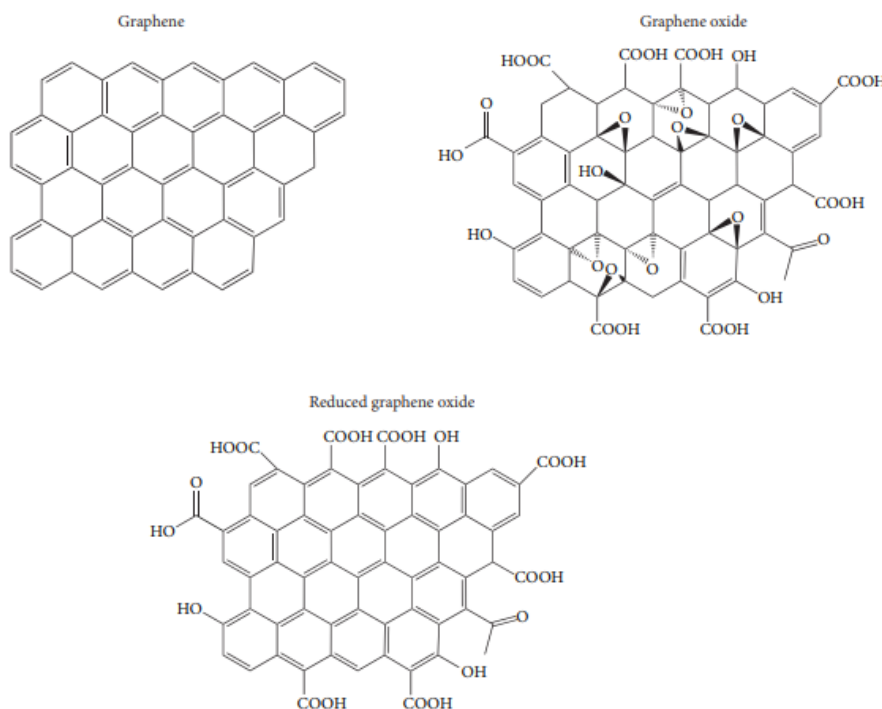
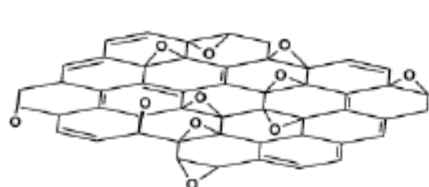


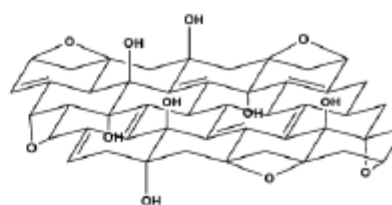
Figura 4: Principales grupos funcionales para G, GO y rGO, obtenido de [69]

El GO en específico ha demostrado tener buena dispersibilidad, propiedades coloidales y potencial funcionalización de la superficie, lo que lo convierten en un material atractivo para la biomedicina, como la ingeniería de tejidos, agentes microbianos, bioimagen y entrega de medicamentos [70].

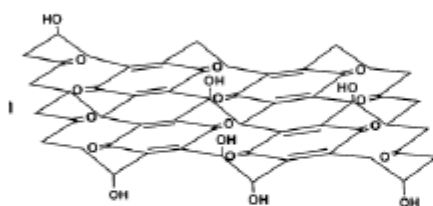
El óxido de grafeno corresponde a una lámina de grafeno que se encuentra funcionalizada con distintos grupos oxigenados, entre estos grupos oxigenados se pueden encontrar grupos epóxido o hidroxilo. A la fecha, no se ha llegado a un consenso acerca de la estructura de este material, dado que puede tener variadas formas de obtención y procesado, por lo que se han postulado distintos modelos tal como se muestra en la Figura 5.



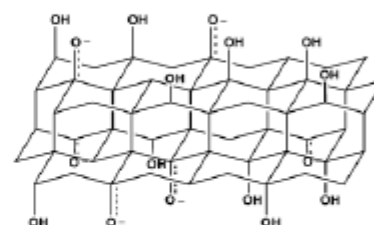
a.- Hofmann



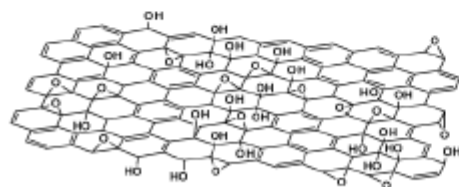
b.- Ruess



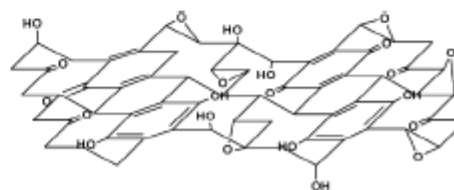
c.- Scholz-Boehm



d.- Nakajima-Matsuo



e.- Lerf-Klinowski



f.- Dékány

Figura 5: Representación de los posibles modelos estructurales para el GO, obtenido de [71]

Síntesis

Existen 3 métodos más utilizados para la síntesis de GO. Estos son el de Brodie, Staudenmaier o el de Hummers, o alguna variación de los anteriores. La diferencia recae en las propiedades estructurales que se busque. Brodie y Staudenmaier usan una combinación de clorato de potasio ($KClO_3$) con ácido nítrico (HNO_3) para oxidar al grafito, mientras que el método de Hummers implica tratar al grafito con permanganato de potasio ($KMnO_4$) y ácido sulfúrico (H_2SO_4) [72].

Uno de los métodos variados de Hummers es el de Marcanos et al. para sintetizar un GO más oxidado y posible de producir a gran escala.

Previamente en uno de sus estudios descubrieron que la adición de ácido fosfórico (H_3PO_4) a la reacción de nanotubos de multipared de óxido de grafeno para su preparación escalable, producía GO con planos basales grafiticos más intactos. Las cintas producidas por esta modificación tenían una conductividad comparable con los preparados por reducción de primera generación. Por lo que utilizaron un procedimiento modificado al de Hummers, con $KMnO_4$ y una mezcla de 9:1 de H_2SO_4 concentrado/ H_3PO_4 , para preparar un GO con menos defectos en el plano basal y más oxidado.

Se utilizaron una variedad de técnicas para comparar las propiedades entre el GO mejorado (IGO), Hummers modificado (HGO+) y Hummers (HGO). En general se obtuvo un orden de oxidación de $HGO < HGO+ < IGO$. Las diferencias eran de 10% entre IGO y HGO+. Mediante espectroscopía de fotoelectrones por rayos X se obtuvieron picos más pronunciados en 287 eV (correspondiente a carbono oxidado) para IGO que el resto, lo que sugiere una estructura más regular. Esto se continuaba corroborando con espectros UV/vis, y atribuyeron esta característica a una mayor retención de anillos de carbono en los planos basales. Mediante el coeficiente de extinción concluyeron que el IGO tiene más anillos aromáticos o dominios aromáticos aislados y retenidos.

El protocolo para producir este IGO no implica una gran exotermia y tampoco produce un gas tóxico, pues en los otros se produce NO_2 , N_2O_4 y ClO_2 . El método mejorado tiene un mayor rendimiento, produciendo una fracción más alta de material de carbono hidrófilo bien oxidado, en la primera filtración se retira aquellos GO menos oxidados e hidrofóbicos, en IGO se retiraron 0.7 g, mientras que en HGO y HGO+, 6.7 y 3.9 g respectivamente cuando se comenzaba el proceso con 3 g de hojuelas de grafito (notar que este peso podría contener agua que no se evaporó totalmente de los tratamientos previos). IGO es un material más oxidado y con una estructura más regular, probablemente por la mayor cantidad de anillos aromáticos. Se cree habría una formación de grupos fosfatos cíclicos de cinco miembros entre el ácido fosfórico y dos dioles vecinales formados en el plano basal de grafito [73].

El protocolo, con una modificación de Terrones para la filtración, se encuentra en metodología.

Actividad antimicrobiana

Varios factores del GO se han reportado que afectan las funciones de las bacterias. Entre ellas se encuentra su estructura 2D plana, tamaño lateral, los bordes (filosos o suaves), grupos funcionales existentes en la superficie y el estado de oxidación [74][75][76].

Un estudio de 2018 estudió la influencia del nivel de oxidación de la superficie del GO. Sus simulaciones teóricas y los datos experimentales determinaron que las esquinas agudas y las protuberancias de los bordes del GO permiten que penetre a las membranas bacterianas, extrayendo lípidos y moléculas, induciendo así la disrupción de la membrana. Además, la expresión de grupos epoxi, hidroxilo y carbono en la superficie, incluido los grupos carboxilos de los bordes, contribuían a los efectos bactericidas [70].

En modelos de bacterias gram-positivas y gram-negativas se probó la toxicidad que tenían nanoláminas de grafeno como recubrimiento de acero inoxidable. Las nanoparedes de óxido de grafeno las sintetizaron con una exfoliación química y por deposición electroforética.

Se determinó la fuerte influencia que tienen los bordes extremadamente agudos de las nanoparedes, que inactivaba a las bacterias, ya que dañaban la membrana celular con el contacto directo. Gram-negativa (*Escherichia coli*) por su parte demostró tener menos daños que la gram-positiva (*Staphylococcus aureus*), esto se debe a que la primera posee una membrana externa. También se determinó que los GO reducidos tienen mayor efecto sobre las bacterias que el GO (aproximadamente del 22%), lo que fue explicado por la mejor transferencia de carga entre bacterias y los bordes, que a la vez se encontraban más afilados por la reducción [74].

Como se mencionó previamente, el tamaño es otro factor importante para la toxicidad. En un estudio se investigó el efecto sobre *Escherichia coli*. Para esto, se produjeron suspensiones de óxido de grafeno, con un área promedio de lámina variable entre 0.01-0.65 μm^2 , evaluando su actividad en suspensiones celulares o como un revestimiento de superficie. Cuando se trataba de este último, la actividad antimicrobiana aumentó 4 veces cuando el área de la lámina disminuyó de 0.65 a 0.01 μm^2 , efecto ilustrado en la Figura 6.

El efecto se atribuyó a los mecanismos oxidativos, asociadas directamente con la mayor densidad de defectos que poseía una lámina más pequeña.

En cambio, para los ensayos en suspensión, el GO 'atrapaba' a las bacterias, rodeándolas y privándolas de su medio, por lo que, en este caso a mayor tamaño del área de la hoja, mayor el efecto tóxico. Se observó una inactivación

completa después de las 3 horas de exposición con las láminas de $0.65 \mu\text{m}^2$ [77].

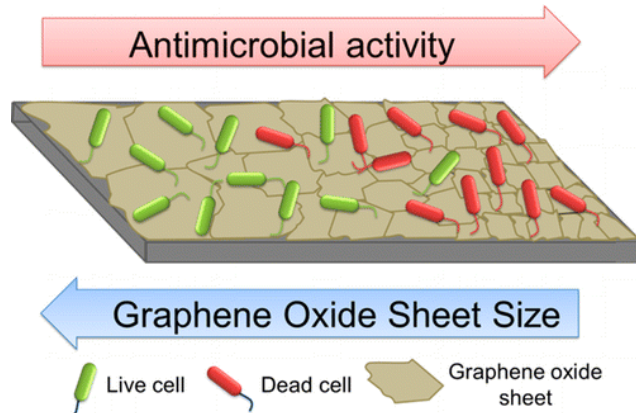


Figura 6: Efecto del tamaño de la lámina con la actividad antimicrobiana, obtenido de [77]

Hay otra propiedad que no ha sido muy reportada, sin embargo, parece tener un efecto sobre las bacterias. Corresponde a la debris oxidativa, que son los desechos o restos pequeños y altamente oxidados que se encuentran adsorbidos en la superficie del GO. En un estudio para analizar este factor se le hizo un lavado a las láminas de GO y su toxicidad hacia las *E.coli* disminuyó significativamente. Emplearon una concentración de $50 \mu\text{g}/\text{ml}$ de GO en la cual inocularon 10^8 UFC/ml, con una diferencia de inactivación de 20% entre el GO con y sin debris. Las mediciones de espectroscopía Raman y la oxidación acelular del glutatión indicaron que los desechos oxidativos aumentan la capacidad de promover la inactivación de las bacterias a través del daño de la membrana celular y los mecanismos de estrés oxidativo [78].

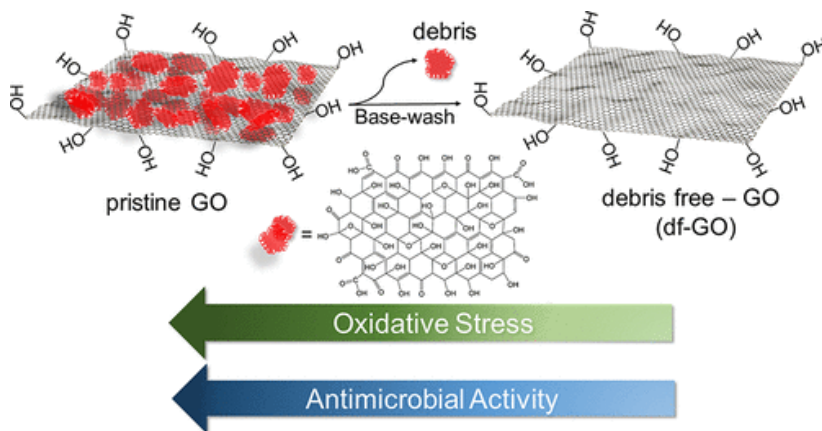


Figura 7: Relación entre la debris oxidativa y la actividad antimicrobiana, de [78]

Viabilidad celular

Existe una opinión diferida respecto a la toxicidad del GO en células mamíferas. Algunos aseveran que no tiene efecto, y que por sobre todo promueve la proliferación y diferenciación celular, mientras otros reportan sus efectos citotóxicos a concentraciones iguales o incluso menores a 50 µg/ml. Esto se debe a que no existe una completa caracterización del GO utilizado y cómo el tamaño, la superficie, el recubrimiento utilizado y los estados de oxidación contribuyen a presentar efectos tóxicos en células mamíferas, principalmente por la falta de comprensión química de la relación del GO con estas células, por lo que se requieren más estudios al respecto [75][79].

Se ha observado que el GO puede inducir una respuesta de inflamación y efectos fibrogénicos en el pulmón, razón por la cual se quiso observar el daño a la membrana y la citotoxicidad que provocaba en macrófagos del pulmón, ya que podría ser un sistema útil para delinear las primeras relaciones de estructura-actividad relacionadas con la variación de las propiedades de la superficie.

Se utilizaron nanomateriales con diferentes niveles de funcionalidad de superficie y se analizó su efecto. Se concluyó que a mayor cantidad de radicales de carbono se inducía una mayor citotoxicidad en células THP-1 y BEAS-2B, debido a adsorción del GO en la membrana plasmática, peroxidación lipídica, daño a la membrana y por tanto muerte celular. El que tuvo una menor acción citotóxica fue el rGO [70].

En una reseña del grafeno para ingeniería de tejidos se señalaron diversos efectos de varios estudios. Destacaban la importancia del anclaje de las células, para llevar a cabo la adhesión celular por medio de la ECM. En este aspecto se cultivó grafeno mediante deposición por química del vapor en células madres mesenquimales humanas, permitiendo la adhesión y proliferación celular. Por otra parte, se utilizaron MSCs de cabra, derivadas de la médula ósea, y pudieron proliferar en las placas que estaban recubiertas con GO a una concentración de 0.1 mg/ml.

Destacan que, aunque el GO cuando esté en su estado de recubrimiento no presenta una actividad citotóxica elevada, en solución podría ser lo contrario. Por ejemplo, el GO en altas concentraciones en solución (50 µg/ml) se acumulaba en la membrana celular, conduciendo a altos niveles de estrés oxidativo, disminuyendo la viabilidad celular.

Hay que tener en cuenta que con un tamaño lateral igual o menor a 5 µm el material puede ingresar a la célula mamífera [69].

2.4 Compósitos BV/GO

La unión de bioglass con GO puede presentar mejoras respecto a los materiales en forma individual. Un compósito con ambos productos presentaría mejoras mecánicas y de las propiedades antibacterianas, se podría mejorar la dureza que poseen las cerámicas bioactivas con la adición de óxido de grafeno, pues

el vidrio por sí solo es frágil. Por otro lado, se podría funcionalizar la superficie del GO, para utilizarlo como una plataforma para dirigir la osteogénesis de células madres, y junto al biovidrio se podrían mejorar la adhesión celular, proliferación y la diferenciación osteogénica.

Síntesis

En la elaboración del compuesto se busca principalmente una buena dispersión del GO en el biovidrio.

Uno de los protocolos consistía en utilizar biovidrio 45S5 con un tamaño medio de partícula <10 µm. Para sintetizar el GO utilizar el método de Hummers modificado.

Para obtener el compuesto se utilizó un proceso coloidal utilizando dimetilformamida (DMF), para asegurar una buena dispersión a largo plazo del GO, lo que se ha reportado previamente.

Estos fueron sonicados por 30 min en DMF de forma independiente a 1 mg/ml para GO y 86 mg/ml para 45S5, esto maximizaba el grado de homogeneidad. Se mezcló el sonicado y se procedió a secar con un agitador magnético de placa caliente a 100°C hasta obtener un gel. En un horno de secado al vacío con aire se realizó un segundo batch a 80°C por 24 horas para eliminar el DMF restante.

Se obtuvieron así polvos compuestos con GO al 0.1, 0.5 y 1% en peso. Luego con un mortero se molió la torta seca.

Finalmente se sinterizó el polvo a 550°C por 3 minutos mediante un sistema SPS con una tasa de calentamiento y enfriamiento de 50°C/min y 100°C/min respectivamente. Se escogió esa temperatura en base a hallazgos de sus estudios pasados [80].

En otro estudio se preparó biovidrio 58S hasta obtener el gel previo al horno de secado, mientras que en paralelo se ultrasonicaba el GO por 2 horas en DMF.

Posteriormente se mezclaron ambas soluciones hasta lograr concentraciones de 1%-5% en peso de GO. Luego se agitó por 2 horas y se secaron en una placa calefactora a 80°C por 12 horas.

Finalmente, el material compuesto se carbonizó a 300°C por 1 hora, 750°C por 2 horas y luego 1000°C por 3 horas con aire. De esta forma se logró reducir el GO [81].

Bioactividad

Los estudios respecto a la bioactividad de este compuesto son escasos ya que la literatura está enfocada en viabilidad celular, por lo que se exponen símiles, ya sea del biovidrio o el óxido de grafeno.

Se sintetizó un compuesto de rGO/HA mediante una ruta ecológica, la que consistía en polimerizar al GO con dopamina (PDA) a una concentración de 1 mg/ml, luego exponer esta mezcla a SBF (fluido corporal simulado, con diferentes concentraciones de iones) por 14 días, de esta forma obteniendo una capa de HA en la superficie. Se demostró así que la capa de PDA permitía una buena interacción con iones y rGO promoviendo así la formación de las nanopartículas de HA [82].

En un estudio de bioglass 45S5/Grafeno al 0, 0.5, 3 y 5% vol. evaluaron la bioactividad para el tercer día de sumergido en SBF. No hubo diferencia observable en la capa de HA formada para compuestos con diferentes vol% carga del grafeno, lo que sugiere que este no obstaculizó la bioactividad de BV. De hecho, el tamaño de las grietas en la capa de HA sugiere que las capas formadas eran bastante gruesas [83].

Otro compuesto de 58S/GO se formó a concentraciones de este último de 0, 0.5, 1 y 1.5% en peso. Se depositó el compuesto en una solución de SBF, exponiendo un área superficial de 0.1 cm²/ml a 37°C durante 7 días. Se renovó el medio cada tres días para mantener constante la concentración de iones y el pH para una mejor simulación de las condiciones in vivo.

Se reveló al último día, que el andamio se encontraba cubierto por una capa gruesa de HCA. Además, se verificó que los gránulos depositados estaban distribuidos homogéneamente, mientras que la prueba EDS reveló una relación Ca/P de 1.69. Por otra parte, el análisis XDR indicó que picos de HCA se superpusieron con los de $CaSiO_3$ en los ángulos 25.8° y 31.7° [84].

Actividad antimicrobiana

Las características que influyen a las bacterias son el conjunto de las previamente mencionadas como materiales independientes.

Sin embargo, el mecanismo exacto ejercido por partículas para la actividad antibacteriana aún no se entiende claramente. Se piensa que en mayor parte el GO es el que más efecto bacteriano ejerce. Existen 4 mecanismos que son los más reportados [85].

- a) Perforación de la membrana, en donde las puntas filosas de las hojas de GO perforan la membrana de la bacteria.
- b) Extracción de fosfolípidos, con la interacción de fuerzas de Van der Waals entre los lípidos de la membrana y el GO.
- c) Entrelazado, la bacteria se entrelaza en las hojas de GO, disminuyen el potencial de la membrana.
- d) Producción de especies reactivas al oxígeno (ROS), liberadas por GO que se dirigen a infecciones dependientes de oxígeno causando efectos nocivos.

Respecto a ROS, la especie típica es el anión superóxido producido por GO, que se presenta de forma natural en las células inmunes [86].

Por ejemplo, se elaboró un compuesto de rGO/n-BG y obtuvieron que había mayor influencia de parte del rGO que el biovidrio como agente ROS. Esto se lo atribuían a la interacción entre las moléculas y la alta área de superficie de las hojas de rGO. En los compuestos la producción de aniones superóxido fue más bajo, pero más elevado que BV, como se parecía en la Figura 8 [87]. Y esto podría deberse a la presencia de SiO_2 . Sin embargo, hay que considerar que hay estudios que revelan a concentraciones de 100 mg/ml el grafeno produce dosis letales de ROS [86].

Tal como se ve en este estudio, las partículas de n-BG no producen una cantidad considerable de O_2^- , mientras que rGO producen altos niveles de O_2^- que podría ser perjudicial para una célula mamífera. Es por esto que, en conjunto, podrían representar un buen balance para este efecto.

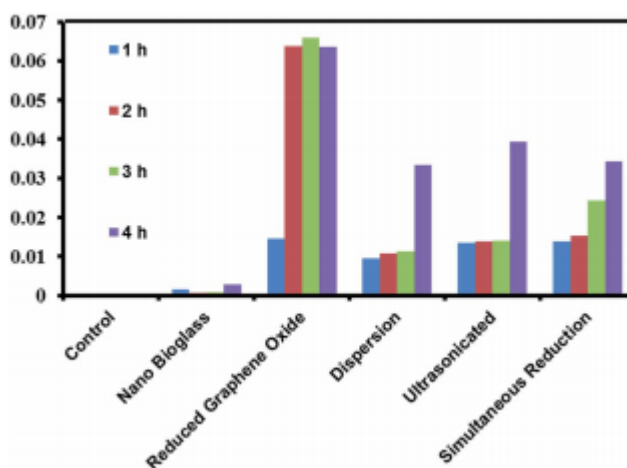


Figura 8: Evaluación de la cantidad de aniones superóxido radicales en n-BG, rGO, y los compósitos preparados por dispersión, ultrasonicación y reducción simultánea, de [87].

En otro estudio de 2016 se probó la actividad antimicrobiana para vidrio bioactivo dopado con óxido de grafeno en una proporción aproximada de 16:1 p/p sobre *E.coli* y *S.aureus*. Se le atribuyó la actividad al GO más que al BV, y dado los datos experimentales que obtuvieron una de las razones fue el tamaño de este. Por otro lado, la diferencia que se podía observar entre en polvo de P-GO-BV (GO tratado con ácido fosfórico) y el de N-GO-BV (GO tratado con nitrato de sodio) que tenían similares tamaños, se atribuía a la actividad ROS, y que los primeros tres mecanismos del GO para atacar la bacteria no eran los relevantes. Lo anterior se condecía con el alto desorden estructural entre ambas elaboraciones (que conllevaba a mayores defectos y espacios de oxígeno vacíos) que determinaban mayor muerte de bacterias, por lo que pensaban que ese era el mecanismo predominante.

Viabilidad celular

Utilizando un método de autoensamblaje, se recubrieron vidrios con películas de GO a una concentración de 0.4 mg/ml y se comparó la viabilidad celular de células madre derivadas de tejido adiposo (hASCs). Las células cultivadas en la película de GO demostraron una adhesión aumentada y una mayor correlación entre las orientaciones de los filamentos de actina y las bandas de vinculina en comparación con el vidrio solo.

Además, se demostró mayor afinidad y por tanto mayor viabilidad celular dependiente del tiempo con las hASCs. La diferenciación mejorada incluía osteogénesis, adipogénesis y génesis epitelial, mostrando su versatilidad y afinidad con células madre, mientras que la diferenciación condrogénica disminuyó en comparación con el control, correspondiente a poliestireno. Se demostró entonces, que el GO es un sustrato eficiente para adhesión, proliferación y diferenciación de hASCs [88].

También se ha analizado la biocompatibilidad de biovidrio 58S con grafeno a diferentes concentraciones (0, 0.5, 1 y 1.5% peso) para células del osteosarcoma humano MG-63. Los ensayos in vitro revelaron que estas células colonizaron y crecieron favorablemente para el compuesto de BV 58S/GO 0.5% a los 7 días.

En este scaffold, las MG-63 mostraron una forma redonda con nódulos mineralizados y estaban ancladas a la superficie por filopodios alargados, demostrando la buena compatibilidad [84].

Siguiendo con esta línea celular, en otro estudio se conformaron compósitos de biovidrio 45S5 con óxido de grafeno al 0, 0.1, 0.5 y 1.0 % peso. Las células se sembraron directamente a los pellets pulidos a una relación de 0.4 g/ml (pellet/masa), sembrando 1000 células. A las 72 horas se evaluó la citocompatibilidad, y no se encontró diferencia estadística entre el porcentaje células vivas en la muestra pura de 45S5 y los pellets compuestos.

Se encontró que al agregar 0.5% en peso de GO a los pellets sinterizados, la resistencia a la fractura aumentaba en un 130%, mientras que el coeficiente de fricción y la tasa de desgaste específico disminuyeron en 21.3% y 62% respectivamente. Además, la viabilidad de las células MG-63 era un 0.1% más alta que las células cultivadas en 45S5 puro, mientras que las que estaban cultivadas al 0.1% de GO presentaron una diferencia de casi el 1% [80].

CAPÍTULO 3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo general:

Evaluar la adición de óxido de grafeno al biovidrio 45S5, para la bioactividad, capacidad antimicrobiana y viabilidad celular del compuesto.

3.2 Objetivos específicos:

1. Sintetizar biovidrio cuaternario (45% SiO_2 , 24,5% Na_2O , 24,5% de CaO y 6% P_2O_5 en peso) mediante método sol-gel y óxido de grafeno mediante método de Marcano y de Terrones modificado.
2. Evaluar la formación de una capa de apatita por inmersión en SBF y su dependencia con la adición de GO en diferentes proporciones.
3. Analizar la capacidad antibacterial in vitro del biovidrio en dependencia del GO, evaluando el crecimiento bacterial de gram-positiva y gram-negativa.
4. Evaluar el efecto del biovidrio y el GO en la viabilidad celular de células madres mesenquimales de pulpa dental.

CAPÍTULO 4 METODOLOGÍA

4.1 Síntesis y caracterización biovidrio 45S5 y óxido de grafeno

4.1.1 Síntesis Biovidiro 45S5

Síntesis biovidrio 45S5 por método sol-gel

1. Se agrega en un vaso de precipitado 76 ml de HNO_3 0.25 M bajo agitación magnética a 300 rpm y a 25 °C.
2. Posteriormente se agrega en una primera etapa y por goteo 42.7 ml de tetraetilortosilicato (TEOS, $Si(OC_2H_5)_4$; Aldrich 98%). Se deja agitar por 45 minutos.
3. Una vez pasados los primeros 45 minutos, agregar por goteo 1.9 ml de trietilfosfato (TEP, $OP(OC_2H_5)_3$; Aldrich 99.8%) y repetir tiempo de agitación, antes de agregar el siguiente reactivo.
4. Agregar 8.58 g de nitrato de sodio ($NaNO_3$; Riedel-de Hæn, 99.5%) y dejar agitando por 45 minutos.
5. Agregar 26.34 g de nitrato de calcio ($(Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O)$; Merck, 99%) y dejar agitando por 60 minutos. La solución resultante debe tener un pH igual a 1 y se transformará en un gel. Almacenar el gel por 3 días a 60°C.
6. Posteriormente se debe dejar por dos días más a 130°C, para terminar proceso de gelación y eliminar agua.
7. El material resultante es sometido a molienda en molino analítico, 10 ciclos de 5 min cada uno a 500 rpm, con una pausa de 1 min.
8. El polvo obtenido es sometido a tratamiento térmico a 700°C (0.5 °C/min hasta llegar a 200°C y 2°C/min hasta llegar a 700°C) por 10 horas, con el fin de estabilizar la estructura de los vidrios y eliminar restos de $NaNO_3$ y $Ca(NO_3)_2$ que se logra a los 680°C y 560°C respectivamente.

4.1.2 Síntesis óxido de grafeno

Se utilizó una combinación de las técnicas propuestas por Marcano y colaboradores en relación con la síntesis de grafeno, y por Terrones y colaboradores en relación a la filtración y separación de GO.

1. Agregar una mezcla en una proporción de 9:1 de H_2SO_4/H_3PO_4 concentrado (360:40 mL) a una mezcla de láminas de grafito (3.0 g, 1 wt % equivalente) y $KMnO_4$ (18.0 g, 6 wt % equivalente), produciéndose una leve reacción exotérmica a 35° 40 °C.
2. Calentar la reacción a 50 °C y agitar a 200 rpm por 12 horas.

3. Enfriar la reacción hasta llegar a temperatura ambiente y verter sobre hielo (~400 mL) con H_2O_2 al 30% (3 mL).
4. Dejar dispersión de GO en solución, de color amarillo brillante, toda la noche reposando para que se neutralice completamente el $KMnO_4$

Purificación del GO

1. Decantar sobrenadante de dispersión de GO anaranjado. Eliminar sobrenadante.
2. La torta de GO sólido se dispersa en 1 L de H_2SO_4 5 wt%.
3. Mezclar en agitador por 15 minutos.
4. Centrifugar la dispersión de GO a 4000 rpm por 5 minutos y el sobrenadante decantado se elimina, conservando el barro de color anaranjado.
5. Repetir pasos 2, 3 y 4 tres veces, pero en vez de usar H_2SO_4 , usar agua destilada. Mientras el ácido es lavado, el GO expande.
6. A diferencia del método anterior, la capa bifásica desaparece. Se obtiene solamente una capa homogénea color marrón anaranjado. El aspecto del material obtenido es el de un hidrogel.
7. Se extrae todo el material con una espátula.
8. Se obtiene una cantidad de 47,3 gr de material.
9. Se dispersa 3,6 gr de material en 300 mL de agua. Esta relación se obtiene aplicando lo señalado por Terrones y col, donde dispersaban el material recolectado en 4 L de agua.
10. El material se somete a centrifugación a 4000 rpm por 3 minutos.
11. El material sólido se separa del sobrenadante y se descarta. El sobrenadante se somete a ciclo de centrifugación por 3 hrs a 6000 rpm.

4.1.3 Caracterización biovidrio 45S5

La caracterización del material se realizó mediante difracción de rayos X (DRX), análisis de superficie mediante un microscopio electrónico de barrido (SEM) y análisis de la composición elemental mediante espectroscopia de energía dispersiva de rayos X (EDS).

Para DRX se utilizó un difractómetro Bruker modelo D8 Advance con un detector lineal LynxEye, radiación $CuK\alpha$ ($\lambda=1.5418 \text{ \AA}$), sistema de filtro de níquel y rejilla variable. El difractómetro fue operado a 40 kV y 30 mA con un rango 2θ de 2-80° usando un barrido acoplado con un tamaño de paso de 0.02°/s.

Para las imágenes SEM se utilizó un equipo de microscopio de barrido electrónico con cátodo de emisión de campo FESEM Quanta 250 FES del Centro de investigación de nanotecnología y materiales avanzados de la Universidad Católica de Chile. Previamente fue necesario recubrir las muestras con una capa de oro durante 60 segundos a 30 mA, ya que el biovidrio de por sí no es conductor y el porcentaje de GO es muy bajo.

El microscopio fue operado con un voltaje de aceleración entre 5-10 kV.

4.2 Elaboración pastillas de biovidrio/óxido de grafeno

1. Se calcula la masa necesaria de biovidrio 45S5 y de óxido de grafeno (20:0,5 y 20:2 en peso respectivamente).
2. Se sonica por 2 horas a temperatura ambiente en agua destilada y se seca encima de una estufa a 60°C por 48 horas.
3. Se muele la muestra con un mortero de cerámica.
4. Se depositan 0,25 gr de la muestra en un pastillero y con una prensa hidráulica se aplican presiones de 2, 4 y 6 toneladas por 1,5 minutos cada una.

4.3 Bioactividad

Se refiere a la capacidad que tiene un material de realizar uniones químicas con el hueso mediante la formación de una capa rica en silicio, parecida a la hidroxiapatita del tejido óseo [31].

1. Se fabrica un triplicado de las pastillas de biovidrio 45S5 y óxido de grafeno en las relaciones correspondientes (20:0.5 y 20:2).
2. Se prepara el SBF según Kokubo [89], considerando una relación para el ensayo de 0.01 mg/ml de SBF [31].
3. Se acomoda la pastilla en un tubo Falcon de 50 ml, rellenando con SBF. Se prepara un control negativo con agua destilada, y otro de SBF solo sin pastilla.
4. Se dejan las muestras en agitación a 60 rpm y 37°C [31], para simular las condiciones ambientales del cuerpo humano.
5. Se toman medidas de pH a las muestras embebidas en SBF a los 0, 1, 7 y 14 días. Posteriormente se le realiza difracción de rayos X y microscopía electrónica de barrido (SEM) a las pastillas en los días 0, 1 y 14 del experimento.

4.4 Actividad Antimicrobiana

Se realiza un ensayo de contacto en tubo de materiales 2D para cultivos de *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* (gram-negativa y gram-positiva respectivamente). Se describirá el protocolo para la primera, siendo la única diferencia el tipo de medio de cultivo a utilizar, Luria-Bertani (LB) en caldo y placa para *E.coli* y Tryptic Soy Broth (TSB) en caldo y Trypticase Soy Agar (TSA) en placa para *S.aereus*. Para todas las experimentaciones se usaron los materiales en calidad de polvo.

1. Se preparan las muestras de biovidrio 45S5 y óxido de grafeno en las relaciones descritas en la Tabla 2. Sonicar por 2 horas en agua destilada y secar muestras encima del horno de 80°C por 48 horas para su uso.

Tabla 2: Concentraciones biovidrio y/o óxido de grafeno para utilizar como producto

Material	Masa	Masa para 2 mL
BV 45S5	20 wt%	0,4 g
GO	0,5 wt%	0,01 g
GO	2,0 wt%	0,04 g
BV 45S5 + GO	20 wt% + 0,5 wt%	0,4 g + 0,01 g
BV 45S5 + GO	20 wt% + 2,0 wt%	0,4 g + 0,04 g

2. Preparación de los medios de cultivo para caldo y placa de Luria-Bertani (LB). Se esterilizan a 121°C por 1 hora.
3. Se les aplica luz UV a las placas Petri al igual que a los productos, y se preparan las placas con el medio de cultivo LB, las cuales se refrigeran a 4°C.
4. Se realiza un cultivo de bacterias desde un inóculo de placa a caldo LB. Se incuba a 37°C por 24 horas.
5. Se ajusta el caldo previamente preparado en un espectrofotómetro a 0,125 Å con una longitud de onda de 600 nm. Como método alternativo se puede utilizar un tubo McFarland 0,5 para calibrar el caldo, siendo más inexacto. Se utilizan 3 ml del caldo ajustado en donde se vierten los productos y se prepara el control positivo (adición de 1 ml de PBS 1X), el control negativo (adición de 1 ml de clorhexidina al 0,12%) y un testimonio. Se agitan por 20 segundos a velocidad baja y se incuba por 24 horas a 37°C en aerobiosis.
6. Se siembra en duplicado una alícuota (100 µl) de las muestras incubadas sobre placa LB. Además, se realizan diluciones de 10^{-1} , 10^{-2} y 10^{-3} y se siembran. Para esto se extraen 100 µl de cada muestra inicial y se agregan 900 µl de PBS 1X, se agita por 15 segundos y se obtiene la primera dilución. De esta dilución se extraen 100 µl y se repite el procedimiento para obtener una segunda dilución. Se repite la acción para obtener una tercera dilución. Todas las placas se incuban a 37°C por 24 horas.
7. Se evalúa la presencia o ausencia de colonias de bacterias, mediante un conteo de UFC utilizando algún programa morfométrico (ImageJ).

4.5 Viabilidad Celular

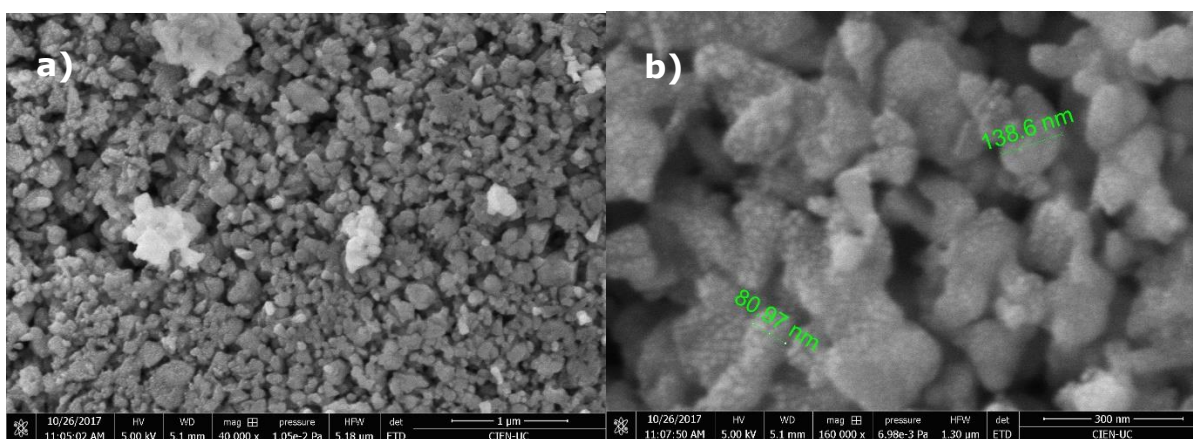
Se realizó un ensayo MTS para los días 1,3 y 7 de cultivo en placas de 96 pocillos en triplicado. Este ensayo se basa en la habilidad de las células vivas de reducir la sal tetrazolio a un producto soluble: formazán coloreado.

1. Se prepararon los polvos de biovidrio 45S5 y/o óxido de grafeno, en una relación de 20:0.5 y 20:2, considerando una concentración de 0.05 g/ml y/o 0.01 g/ml (biovidrio).
2. Se ambientaron los polvos por 24 horas.
3. Se depositó en placas de 96 pozos un triplicado para cada condición (con el objetivo de realizar en ellas MTS), una muestra control y un negativo (peróxido).
4. Se dejó por 30 minutos en la campana con luz UV con el fin de esterilizar.
5. Se sembraron 5.000 células por pozo, agregando 300 μ l de medio al 10% de SBF. A las muestras control negativo tan solo se les agregó medio al 10% SFB. Se deja incubar por los días a analizar (1, 3 y 7).
6. Se prepara la solución para colorimetría; 344 μ l de MTS y 4,3 ml de medio de cultivo sin suero bovino (DMEM-F12).
7. Se lavan los pocillos con PBS 1X gentilmente y luego se les añade 100 μ l de la solución de MTS con medio DMEM. Se incuba por 2 horas.
8. Se retira el medio con MTS y se deposita en un nuevo pocillo de 96 pozos.
9. Se mide la densidad óptica a 540 nm, utilizando el control para medir la viabilidad.

CAPÍTULO 5 RESULTADOS Y DISCUSIONES

5.1 Caracterización biovidrio 45S5 por síntesis sol-gel

Los materiales en forma de pastilla fueron observados mediante microscopía electrónica de barrido. Tal como se presenta en la Figura 9, las partículas poseen una morfología irregular y tamaños variados entre 80 nm y 140 nm, sin embargo, obtener un valor determinado para el tamaño de ellas se dificulta debido a que las partículas están muy agregadas y han experimentado un proceso de prensado, por lo que previo al prensado se debería realizar un tamizado a las partículas de biovidrio con una malla de 38 μm , pues aquel tamaño o menor ha demostrado mejor bioactividad [31].



Para analizar la composición de las partículas se empleó el método de espectrometría de energía dispersiva (EDS), técnica que detecta la composición elemental del material. Tal como se aprecia en la Tabla 3, el porcentaje atómico experimental para los elementos oxígeno, sodio, silicio, calcio y fósforo se asemeja a los esperados según la composición teórica. Se puede observar una presencia más alta de oxígeno y silicio en comparación con el resto de los elementos. Dada la estequiometría se tendría una composición de 60.7% SiO_2 , 19.3% Na_2O , 18.3% CaO y 1.7% de P_2O_5 , lo que no presentaría un problema para la bioactividad según lo revisado en bibliografía [89]. Naturalmente se escapa de la composición deseada, sin embargo, para métodos sol-gel esto es común, siendo la mejor aproximación de 49% de SiO_2 .

La muestra en sí poseía un recubrimiento de oro (para la medición SEM) y en su confección no se contaba con un ambiente ideal (estéril y libre de contaminación cruzada). Estos factores podrían haber afectado la medición del oxígeno debido a que es un elemento liviano ($Z < 11$), por tanto, al ser difícil de ionizar, la energía de los rayos que alcanzan el detector se debe a la superficie de la muestra y no necesariamente a las del elemento, ya que estas

son fácilmente absorbidas por la misma muestra. En caso de que el porcentaje de oxígeno fuese calculado por estequiometría, resultaría un total más cercano a lo esperado de 52,2%.

Por otra parte, se tiene una mayor formación de silicio, esto repercute directamente en el total de óxido de sílice de un 60,7% en vez del rango esperado de 45-55%, clasificando como un biovidrio de bioactividad de clase B [90], es decir, es capaz de unirse sólo a hueso y no a colágeno de tejido suave como los biovidrios de clase A.

Para el P_2O_5 se obtuvo una concentración menor a lo esperada, que bien podría ser considerada traza. Esto podría influir en la bioactividad como se describirá más adelante.

Finalmente, la concentración de calcio es dos veces menor a lo esperado, lo que podría afectar tanto la bioactividad como la viabilidad celular.

Tabla 3: Composición elemental teórica y experimental de porcentaje en peso del biovidrio 45S5 sintetizado por método sol-gel

Compuesto	% atómico Teórico	% atómico Experimental
<i>Oxígeno</i>	54,7	61,9
<i>Sodio</i>	16,3	11,9
<i>Sílice</i>	15,0	19,4
<i>Calcio</i>	12,3	6,3
<i>Fósforo</i>	1,7	0,5

En paralelo se aplicó difracción de rayos X a las partículas para obtener un análisis estructural de estas. Tal como se aprecia en la Figura 10, el material presenta una estructura más cristalina de lo esperado [91], denotada por la cantidad de picos correspondiente a la formación de cristales y leve pronunciación de la curva basal (halo).

La presencia de las fases cristalinas se debe al tipo de procesamiento que tuvo el material, pues al aplicar temperaturas iguales o sobre los 600°C se comienzan a formar picos característicos de $Na_2CaSi_2O_6$ [92][93]. Esto es apreciable en los picos característico 2θ de 20.3°, 26.8°, 30.1°, 33.6°, 34.1°, 38.2° y 41.9°, identificados con Δ .

Sin embargo, hay otro cristal que se forma en la síntesis de biovidrio y es el $Na_2Ca_2Si_3O_9$, influenciado por las altas temperaturas de sinterización reportado en bibliografía [94] [95]. Estos picos se encuentran en la Figura 10 en 20.3°, 23.9°, 38.2°, 48.9°, 50.7° y 60.1° representados por \bullet .

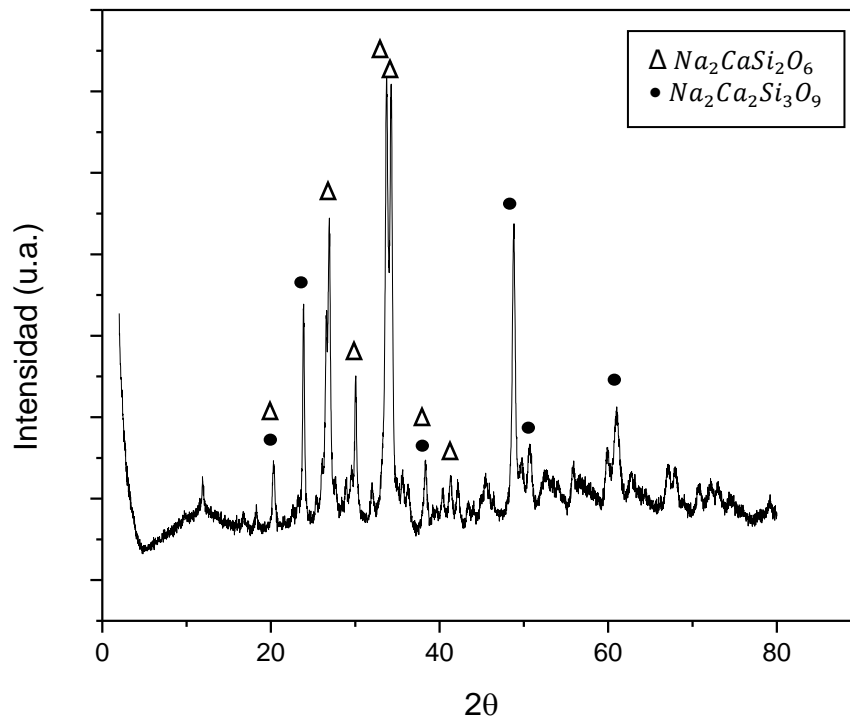


Figura 10: DRX de las pastillas de Biovidrio 45S5. Δ $Na_2CaSi_2O_6$ y \bullet $Na_2Ca_2Si_3O_9$.

La formación de estos cristales podría tener consecuencias graves en la bioactividad presentada por el material, disminuyéndola. Se ha reportado que la alta cristalización del biovidrio 45S5 convierte un vidrio bioactivo en un material inerte [91]. Por otra parte, se ha declarado que $Na_2Ca_2Si_3O_9$ da mayor soporte mecánico a la estructura, por tanto, mayor resistencia ante fracturas. Razón por la cual, la etapa de sinterizado es de importancia y determinante para la bioactividad.

5.2 Morfología compósitos biovidrio 45S5 con óxido de grafeno

Luego de la preparación de las pastillas estas fueron observadas por la técnica de SEM, como se ve en la Figura 11, Figura 12 y Figura 13.

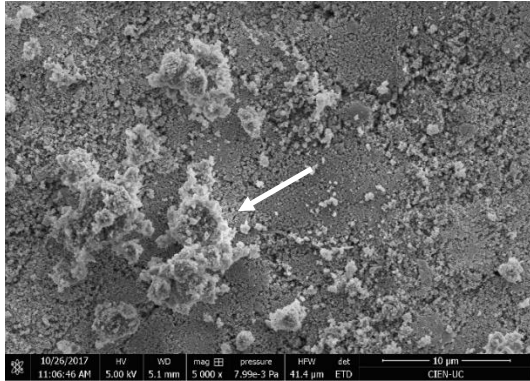


Figura 12: Superficie pastilla de biovidrio 45S5. La flecha indica aglomerados en la pastilla.

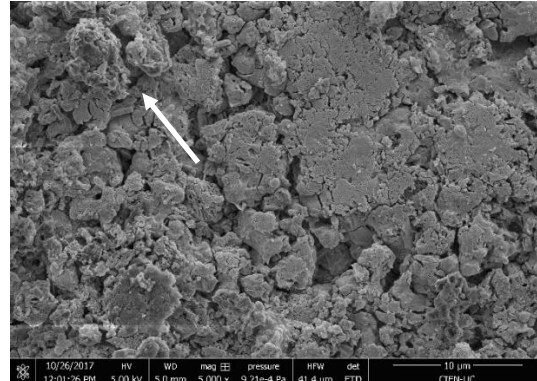


Figura 11: Superficie pastilla de biovidrio 45S5 con óxido de grafeno al 0.5%. La flecha indica aglomerados en la pastilla.

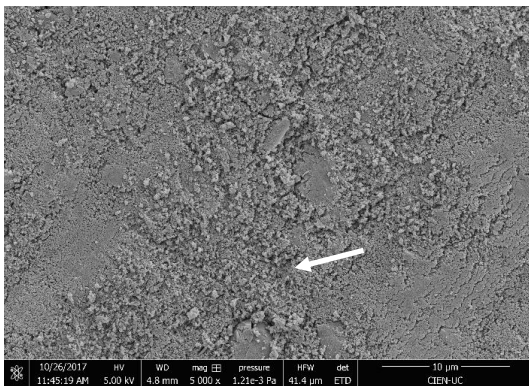


Figura 13: Superficie pastilla de biovidrio 45S5 con óxido de grafeno al 2%. La flecha indica partículas en la superficie de la

Tanto en la Figura 12 como en la Figura 11 se aprecian deposiciones de conglomerados de partículas en la superficie de la pastilla (indicadas con la flecha blanca), mientras que en la Figura 13 estos parecieran ser partículas aisladas distribuidas por toda la superficie, otorgando una apariencia más uniforme. Por otro lado, la superficie de las pastillas de biovidrio y biovidrio con GO al 2% tienen una gran similitud, difiriendo con la pastilla de biovidrio con GO al 0.5%, ya que esta última presenta una granulometría mayor, dando la apariencia de mayor espacio vacío.

Se esperaba que para las pastillas con óxido de grafeno se obtuviera una superficie similar entre ellas, ya que ambas a se les aplicó el mismo proceso para el mezclado, sonicado por 2 horas y posterior molienda de las muestras, lo que debería asegurar una mejor dispersión de GO en el biovidrio.

La mayor uniformidad que se aprecia en la Figura 13 para el biovidrio con GO 2% probablemente se deba a la etapa del mortero, ya que el óxido de grafeno tiene un color negro se logra una mejor apreciación física visible al ojo

humano, por tanto se puede llegar a un mejor mezclado en la molienda manual (zonas blancas para aquellas concentradas en biovidrio y negras para óxido de grafeno). Así, con el GO a menor concentración resultan zonas con baja y otras con mayor concentración imperceptibles para el ojo humano.

Por otro lado, al biovidrio puro no se le aplicó un proceso de sonicado ni tamizado, lo que podría explicar la mayor cantidad de conglomerados distribuidos en la superficie, tal como se aprecia en imágenes de bibliografía [91][92][96].

Para evitar aquellas irregularidades, un tamizado con una malla de $<38 \mu\text{m}$ en la última etapa pudo asegurar mayor homogeneidad.

5.3 Bioactividad de pastillas de biovidrio 45S5 con óxido de grafeno

Para determinar la bioactividad de las pastillas, es decir la formación de una capa tipo apatita rica en calcio y fósforo, estas fueron sumergidos en una solución de SBF a una temperatura controlada de 37°C y en agitación para emular condiciones corporales durante 14 días, sin reposición del medio. Fueron caracterizados mediante SEM y DRX para los días 1, 7 y 14.

En la síntesis del biovidrio las composiciones de los elementos distan de los esperado. En primer lugar, el alto contenido de silicio podría afectar en la unión que tendrá el hueso con el material. En un estudio de Oonishi H.[40] en la que se probaban injertos de biovidrio terciario con diferentes concentraciones de SiO_2 en el cóndilo femoral de conejos, la velocidad de crecimiento interno de hueso decrecía significativamente con el aumento del contenido de óxido de silicio. Por ejemplo, para una concentración de 55% mol. o superior estimulaba el crecimiento después de 2 semanas transcurridas, en contraste con aquel de 50% que a las seis semanas ya se encontraba totalmente integrado. Si la concentración de SiO_2 era 60 % mol. o mayor, no existía adherencia alguna al hueso. Esto denota la importancia de la concentración de silicio en un estado basal para la bioactividad del material. Por otra parte, existe evidencia de que el pentóxido de difósforo influye el tipo de apatita que se deposita en la bioactividad. Por el método sol-gel se elaboró un biovidrio terciario $\text{SiO}_2 - \text{CaO} - \text{P}_2\text{O}_5$, el cual contenía 80 %mol de SiO_2 y variaban la concentración de P_2O_5 , uno tenía 3 %mol y el otro 0 %mol. Se concluyó que en ambos se formaba una capa HA, pero los cristales en aquel vidrio con pentóxido eran más grandes [97].

La concentración de calcio es dos veces menor a lo esperado y esto podría repercutir en la formación de la capa de hidroxiapatita, ya que el segundo paso consiste en un intercambio de iones entre el sodio y/o el calcio con el hidrógeno de la solución para crear los enlaces silanol [98]. Además, está reportado que la concentración de calcio disuelto influye en la actividad mitocondrial,

aumentando la formación de ATP, por tanto, la viabilidad celular mediante MTS.

Todo lo anterior podría afectar el desempeño general de la bioactividad de las pastillas.

Se midió el pH en aquellos días, expuesto en la Figura 14, en la cual se aprecia un aumento de la basicidad del medio al transcurrir los días.

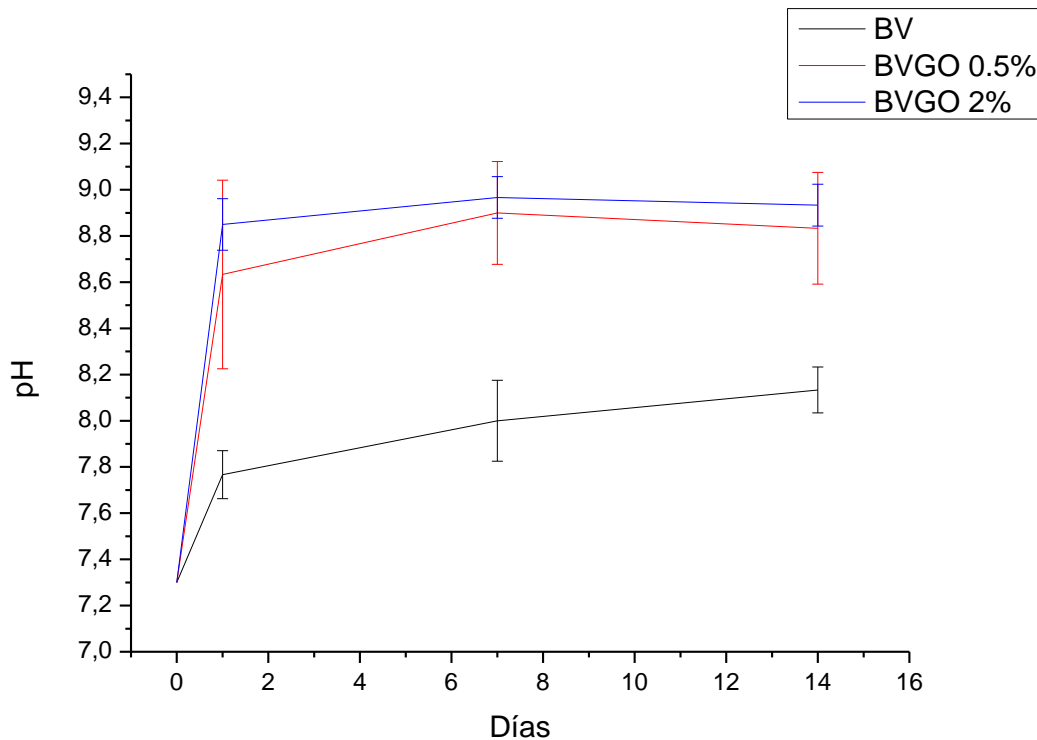


Figura 14: Evolución pH del biovidrio en la solución de SBF

Este aumento de basicidad se explica por la transferencia de iones tanto calcio, sodio, fosfato y silicio del vidrio a la solución, tal como se espera para la formación de la capa de apatita [95][44]. Es más, las cerámicas son conocidas por elevar la basicidad de la solución alcalinizándola hasta valores cercanos a 9-10 [99].

Sin embargo, es inesperado que el pH de las pastillas con GO haya aumentado de una forma más crítica que el biovidrio puro. Se esperaba que existiese una compensación por parte del óxido de grafeno con los grupos carboxilos e hidroxilos para disminuir la basicidad del medio [100].

La diferencia en el cambio de pH entre las pastillas con y sin óxido de grafeno es de aproximadamente 1 unidad. Cabe destacar que para el ensayo de bioactividad se utilizó un tubo con pastilla de biovidrio en agua, para observar su cambio de pH. Se obtuvo que para el primer día ya había aumentado de 7.2 a 10.

Como se mencionó previamente, para obtener una mejor dispersión del GO en el biovidrio para la elaboración de pastillas, se utilizó sonicación en agua destilada durante 2 horas. Esto debió dejar más expuesto al biovidrio, por el proceso de disolución de los cristales en agua. Se ha evidenciado que la forma cristalinas al ser más estable en agua se disuelve con una velocidad menor a su contraparte amorfa, sin embargo en electrolitos las velocidades son similares [101][102].

Además, a las muestras sonicadas se les reduce el tamaño de partícula [103], lo que conduce a una mayor área superficial expuesta, implicando mejor intercambio de iones, por tanto aumento de pH en este caso. Es más, en la práctica se utilizan diferentes métodos de fabricación de compósitos de biovidrio 45S5 para cambiar la 'textura' de la cerámica, dejando un mayor área superficial de contacto[104].

Por último, que el GO 2% presente pH más alcalino que el GO 0.5% probablemente se deba a una desprotonación de los grupos hidroxilo y carboxilo del GO y disolución de los cristales del biovidrio al primer día, convirtiendo al GO en una base débil y dejando más área expuesta por el sonicado del polvo, lo que significa una disolución e intercambio de iones más alta. Para prevenir en medida la basicidad del compuesto habría que cambiar la fuerza utilizada en la prensa hidráulica, ya que estas podrían ser excesivas y con un material duro se provocan roces con mayores presiones, creando grietas en la estructura interna de la pastilla [38]. Es así, que para el radio utilizado en el molde (0.8 cm) se recomendaría una fuerza máxima de 3 toneladas.

La liberación de los iones a través de los días propicia a una mayor uniformidad en la superficie de las pastillas, lo cual es apreciable tanto en la Figura 16 como en la Figura 18. Comparando estas mismas figuras, se aprecia una superficie más lisa para las pastillas de biovidrio puro. Lo anterior afectaría el área total expuesta, por tanto, el intercambio de iones, lo que podría correlacionarse a un menor aumento de basicidad. La adición de GO podría estar generando mayor porosidad del material, lo que se relacionaría a una menor estabilidad del compósito, provocando mayor intercambio iónico [105].

A las muestras de los días 0, 1 y 14 se les realizó un análisis DRX para comprobar la formación de hidroxiapatita, los cuales se pueden observar en la Figura 15

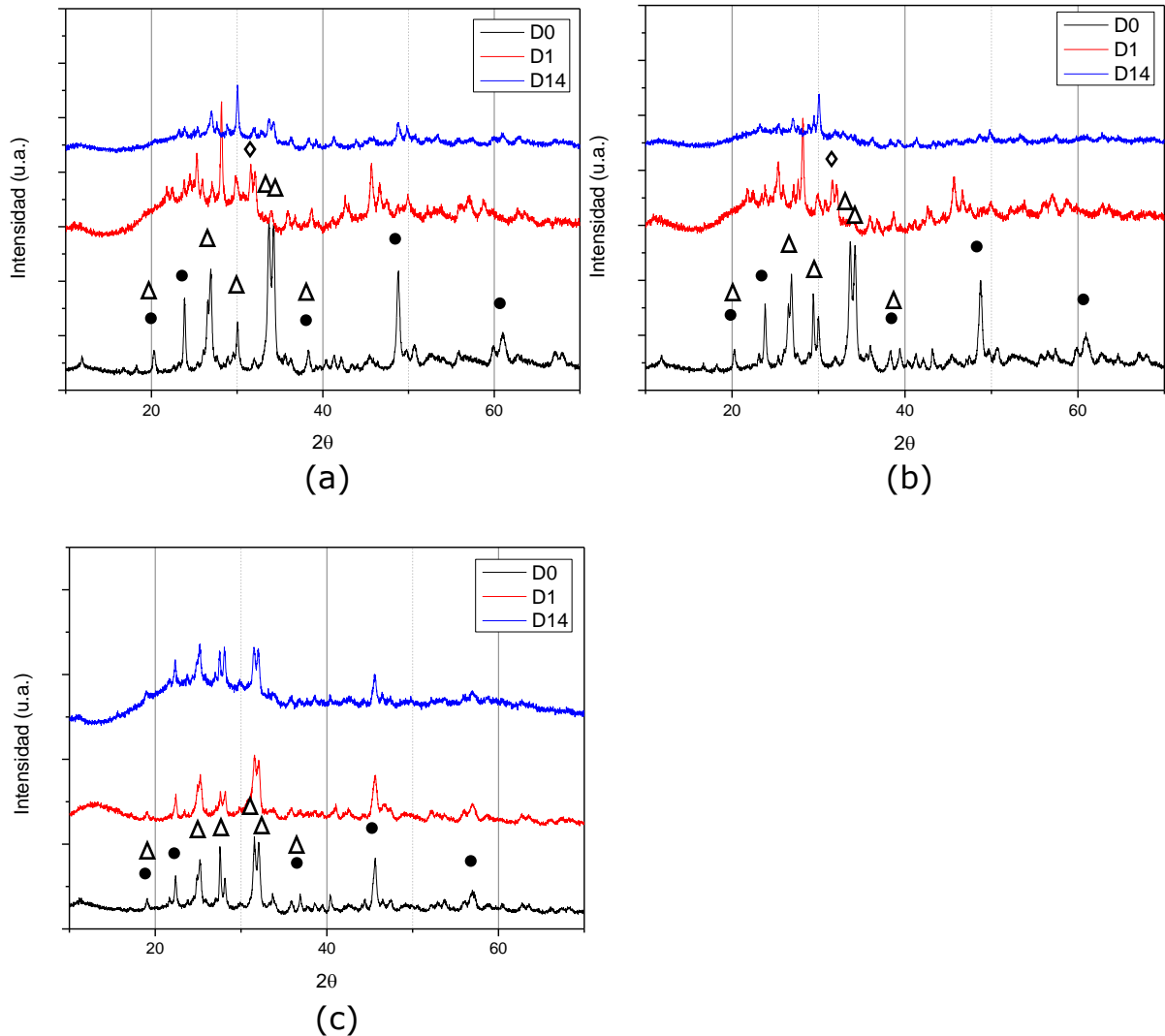


Figura 15: Difractograma de bioactividad para los días 1, 7 y 14. a) Biovidrio 45S5, b) Biovidrio 45S5 y óxido de grafeno al 0,5%, c) Biovidrio 45S5 y óxido de grafeno al 2%. Los picos corresponden a Δ $Na_2CaSi_2O_6$, \bullet $Na_2Ca_2Si_3O_9$ y \diamond HA

Las tres pastillas poseen picos marcados para el día 0 en los ángulos 20.3° , 23.9° , 26.8° , 30.1° , 33.6° , 34.1° , 38.2° , 48.9° y 60.1° atribuidos

principalmente a los picos característicos que se observaban anteriormente en la estructura del biovidrio.

El pico característico para óxido de grafeno usualmente se ubica en 12.5° , 16.6° , 26.5° y 42.9° , sin embargo, debido a que su concentración es mínima en comparación con el otro material, su espectro se hace imperceptible.

La intensidad de los picos de la pastilla con óxido de grafeno al 2% son más bajos, lo que se debe a una menor concentración de biovidrio. Además, se observa que estos picos se sitúan a 2° menos de los esperado y obtenido con las otras pastillas. Esto es un error común para valores de 2θ bajos en los que la muestra ha sido desplazada respecto al eje del difractómetro, lo que afecta finalmente la posición en la que se encuentra el pico [106].

Se observa en los tres difractogramas un cambio en la curvatura a través de los días, lo que podría corresponder a una transformación de una estructura más cristalina a una amorfa. Esto ha sido reportado para los cristales de $Na_2Ca_2Si_3O_9$, que al estar inmersos por 28 días en fluido corporal simulado se transforman a fosfato de calcio amorfo [94]. Esto se veía reflejado en el difractograma con una desaparición de los picos característicos y la formación de un halo, lo que indica la transición de la fase cristalina a una amorfa.

Lo anterior es un indicio destacable, ya que se reporta que esta transformación de una fase cristalina a una amorfa permite que haya un equilibrio entre la competencia mecánica y la biodegradabilidad del material [91].

Para el primer día se nota la formación de un pico en 32° para las muestras de BV y BV/GO 0.5% denotado por \diamond , el cual es característico para la hidroxiapatita. No así para BV/GO 2%, ya que tiene los picos desplazados. Es más, para este último se nota una repetición de los picos sin mayor transformación, lo que podría sugerir que no existe bioactividad, o esta es muy baja, posiblemente relacionado con su disgregación completa. Esto no sería un resultado esperado, por lo que se debiese volver a realizar la prueba con la pastilla completa para el día 14.

A medida que pasan los días se nota una desaparición de la mayoría de los picos, quedando los que se sitúan entre el rango de 20° - 40° .

En paralelo se efectuaron microscopías electrónicas de barridos a las pastillas para los días 0, 1 y 14, a excepción de la de BVGO 2%, que solo se pudo obtener al día 0, ya que las pastillas se disolvían casi completamente al primer día, comprometiendo su integridad para realizar pruebas. Las imágenes se encuentran en las figuras a continuación.

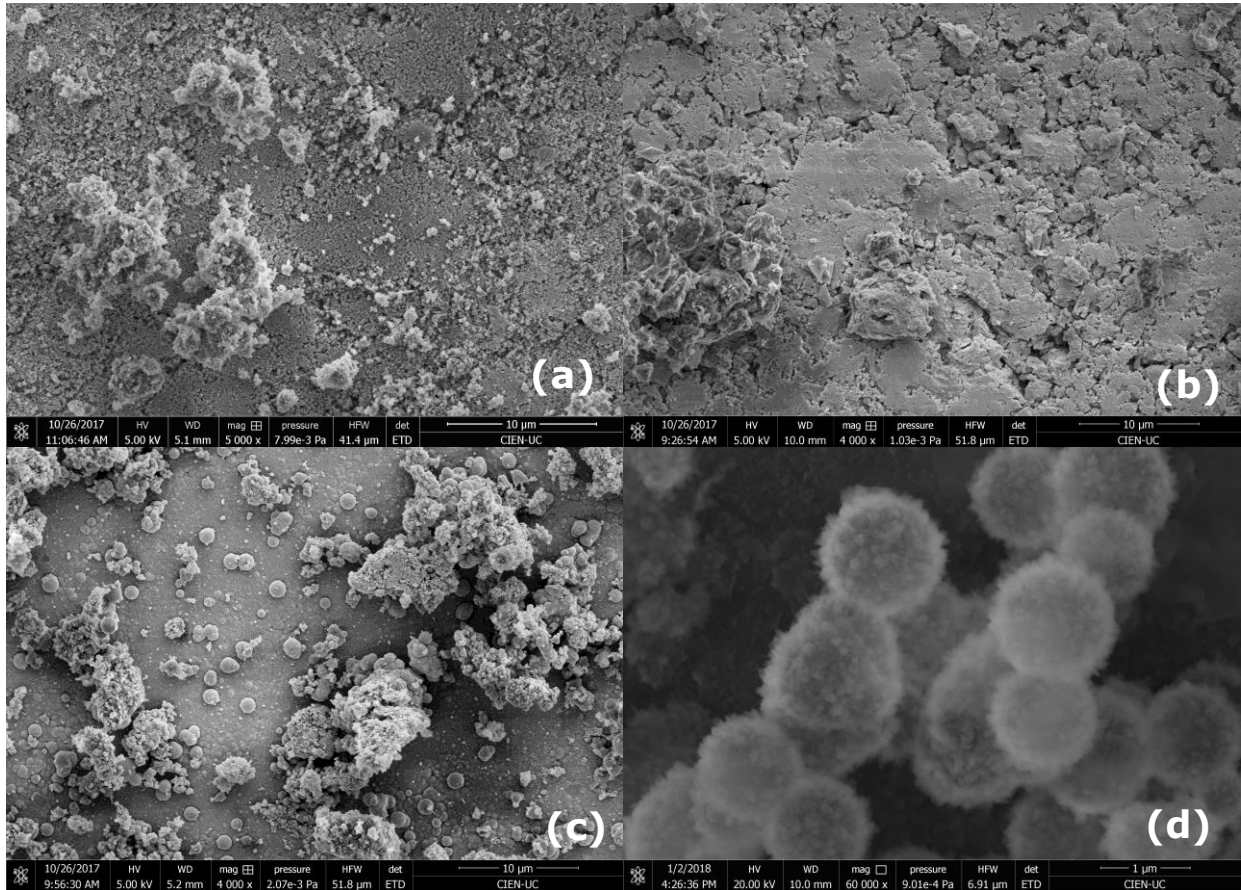


Figura 16: Imágenes SEM a 10 μm para bioactividad de pastilla de biovidrio 45S5 a los días a) 0, b) 1 y c) 14, siendo d) Aumento de la imagen al día 14

En la Figura 16 se presenta la bioactividad para el BG. Al día 0 (a) se aprecia una rugosidad en la superficie con una notable porosidad y conglomerados de partículas. Luego, para el día 1 (en b), la superficie se comienza a suavizar, pero aún no se visualiza la presencia de hidroxiapatita o derivados.

En cambio, en el día 14 se aprecian formaciones esféricas, muy similares a las que adopta la hidroxiapatita por toda la superficie, que se encuentra aún más suavizada. Para cualquier material bioactivo que haya sido expuesta a SBF se aprecia una evolución similar en la superficie del material [31][98][107].

Mediante EDS que se dispone en la Figura 17, se logró obtener la relación Ca/P equivalente a 2.5, cifra que se escapa de lo visto en bibliografía ya que el rango va entre 1.37-1.87, y sobre todo de 1.67 que equivale a relación de HA del hueso [108]. Esto indicaría que la relación estequiométrica es diferente para la apatita formada, e incluso podría estar ligada a su tamaño, pues hay

evidencia de que a mayor tamaño de HA formada menor es la relación Ca/P [109].

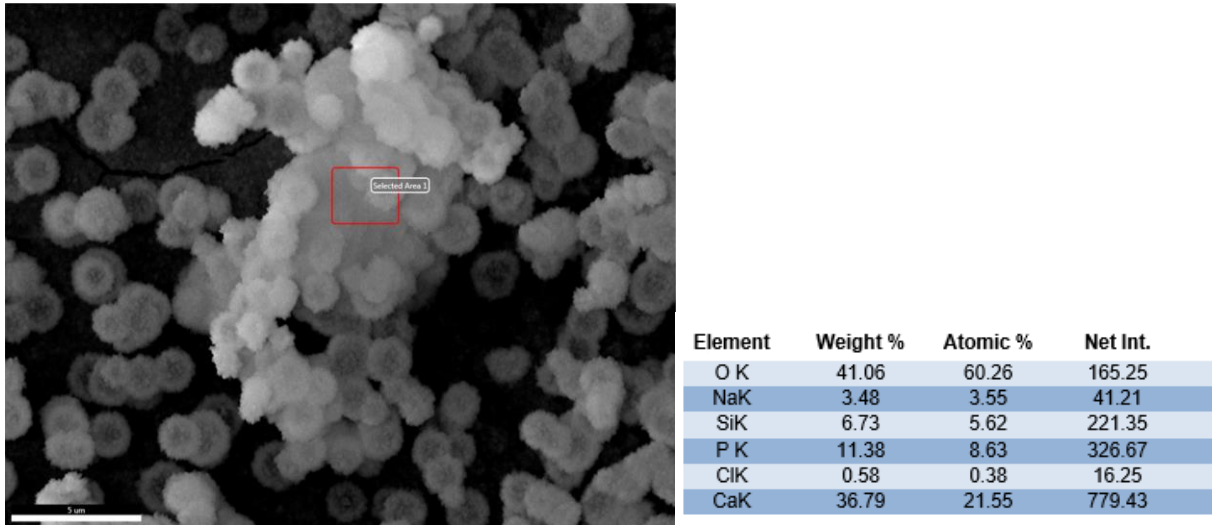


Figura 17: EDS del biovidrio al día 14 en SBF

Finalmente, si se observa la Figura 16 se logra apreciar que las esferas de pseudo apatita se van formando en agregados y presentan una leve porosidad. Cómo sea la forma de la apatita dependerá en gran parte del tratamiento térmico que se le da al vidrio [110], el tamaño de partícula y el pH [100][111], además del tipo de biovidrio que se esté utilizando, como se ve para NaBG, CuNaBG, 1ZnNaBG y 1ZnCuNaBG sumergidas en SBF en el trabajo de Bejarano J.[112] en el que para las primeras la partícula es muy porosa, mientras que en las últimas dos es más densa.

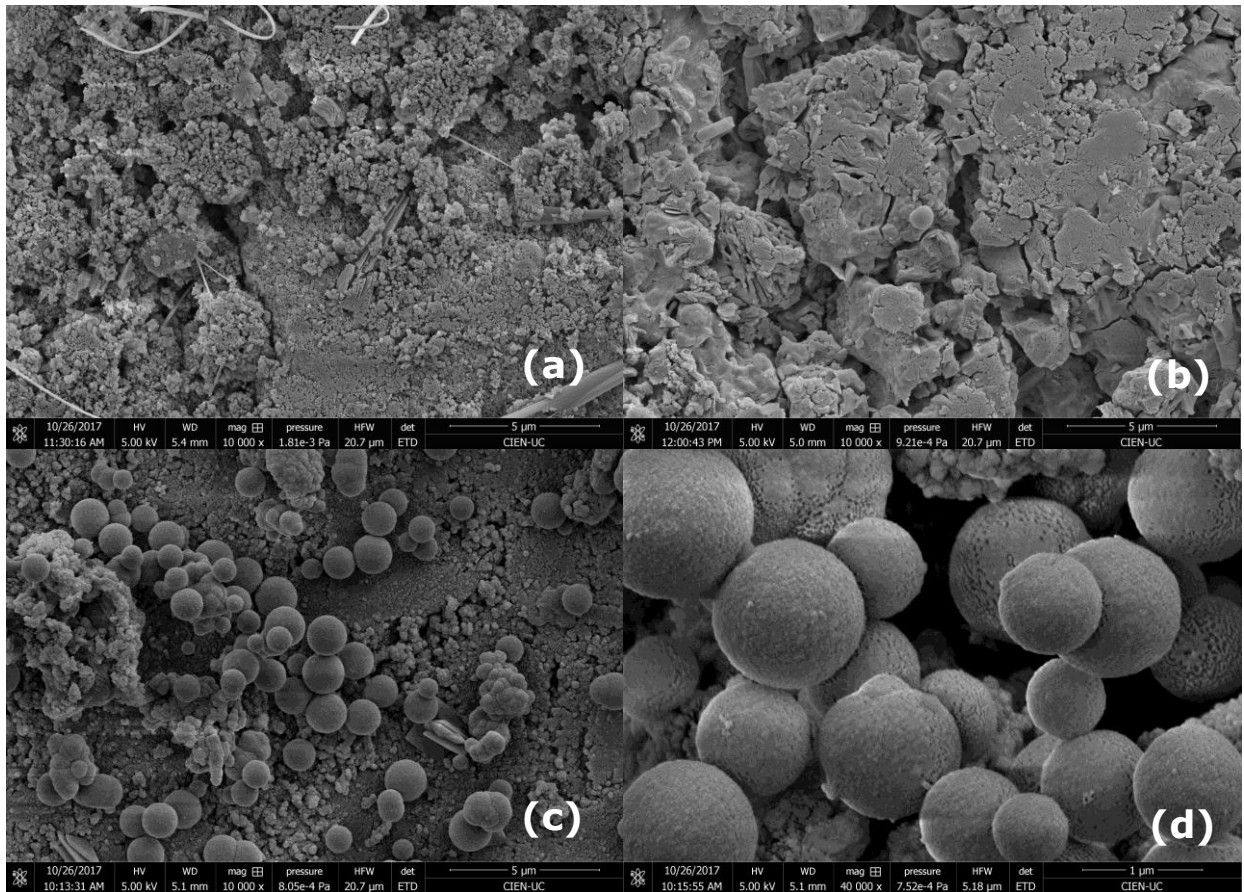


Figura 18: Imágenes SEM a 5 μm para bioactividad de pastilla de biovidrio 45S5 con GO 0.5% a los días a) 0, b) 1 y c) 14, siendo d) Aumento de la imagen al día 14 a 1 μm

Para el día 14 en el biovidrio con GO 0.5% existe una de formación de la capa tipo-apatita, con una morfología esférica, densa y poco porosa tal como se aprecia en (d), siendo anormal para lo reportado en bibliografía [31][112].

Dada su apariencia densa aquellas partículas podrían corresponder a vaterita, uno de los polimorfos de la calcita, pero más inestable y soluble. Su morfología, agregación y pH al cual se encuentra es muy similar a un estudio de Sheng Han de 2005 [111] en el que se observa la cristalización y transformación de la vaterita a pH controlado.

Ahora bien, la vaterita es un carbonato de calcio muy soluble y se disocia rápidamente cuando está en SBF. Por ejemplo, a un medio que poseía vaterita y calcita estabilizada con dopamina se le agregó 1.5x SBF y a las 48 horas ya se había transformado completamente en hidroxiapatita y en menor forma se mantuvo la calcita, es decir, la vaterita es un precursor para la formación de HA [109]. El GO podría actuar como estabilizante del mineral al controlar la nucleación y crecimiento de los cristales de $CaCO_3$.

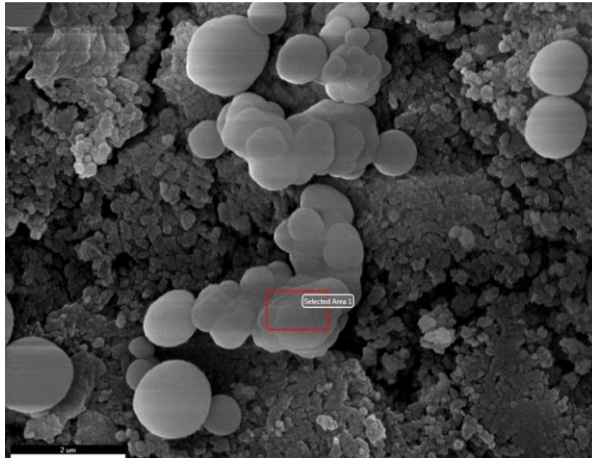
En el estudio anterior se utilizó GO reducido, el cual posee grupos carboxilos residuales en los bordes, los cuales interactúan con los iones de Ca^{2+} controlando la mineralización de la vaterita.

Además, se explica que por su magnitud mayor a la de moléculas convencionales para estabilizar el mineral, reducen la energía interfacial de Gibbs para la nucleación según la ecuación de Nielsen, por lo que se encapsulan fácilmente formando compósitos de cristal [113]. Hay que rescatar que la disolución de la vaterita implica un aumento en la supersaturación de la apatita en SBF [114][115][112].

En este caso particular el GO utilizado no se encuentra reducido, sin embargo, puede estarlo parcialmente, ya que en el proceso de homogenización de la mezcla biovidrio/GO con sonicado y molido existía una diferencia de color en la mezcla, de inicialmente un gris claro a un gris oscuro, además se ha reportado que agentes alcalinos reducen al GO [116].

Los picos característicos de la vaterita se encuentran posicionados en 2θ 21°, 24°, 26.6°, 33.4°, 38.4°, 39°, 42.1°, 48.2°, 49°, 50.3° [109] muy cercano o en el mismo grado que los cristales formados desde un inicio en el biovidrio, por lo que se podría estar generando una superposición de los espectros.

Sin embargo, al medir la relación Ca/P de las esferas posee un valor de 1.55, lo que se encuentra dentro del rango de lo reportado y más cercano a 1.67 que el BV, tal como se ve en la Figura 19.



Element	Weight %	Atomic %	Net Int.
O K	45.18	62.06	261.04
NaK	5.6	5.35	76.17
SiK	16.33	12.78	572.88
P K	10.62	7.53	289.58
ClK	0.96	0.59	26.49
CaK	21.32	11.69	466.86

Figura 19: EDS del BV/GO 0.5% al día 14 en SBF

Dado lo anterior, y debido a la existencia de fosfato en la partícula, es más probable que se trate de hidroxiapatita o alguno de sus fosfatos de calcio relacionados como hidroxiapatita deficiente en calcio, fosfato de calcio amorfo, tricalcio fosfato o fosfato de calcio bifásico (tricalcio fosfato + hidroxiapatita). Sus relaciones Ca/P corresponden a 1.67, 1.33-1.66, 1.2-2.2, 1.5, 1.5 y 1.55-1.66 respectivamente [117].

El tricalcio fosfato, tanto en su forma α y β , no puede ser precipitado de soluciones acuosas y se forma a partir de los 800°C.

A parte de la temperatura, otro factor crítico es el pH al cual se encuentra el medio. De esta forma, se descarta el resto de los compuestos a excepción de la apatita deficiente en calcio (CDA) y fosfato de calcio amorfo (ACP), con estabilidad en rangos de pH de 6.5-9.5 y 5-12 respectivamente, a temperaturas entre 25-37°C.

De estos dos, en análisis DRX los picos característicos más intensos para CDA se encuentran en 26°, 32° y 33° aproximadamente y otros menos pronunciados en 34°, 40°, 48° y 50° [118], siendo evidenciada como una apatita cristalina en el trabajo reportado. Por su lado, ACP posee los picos en 28°, 31° y 34° aproximadamente [117].

Por la comparación de los picos presentes, existe mayor similitud con CDA, coincidiendo incluso en intensidad de estos, siendo bastante marcado para 26°-32°-33°.

Se ha reportado que ACP es muy soluble en medios acuosos y se convierte en hidroxiapatita, por lo que se piensa que es un precursor de HA [119]. Por otra parte, la hidroxiapatita en un medio agotado de SBF se puede transformar en CDA, debido al déficit de calcio en el medio, pasando primero por una fase más amorfa de HA [120]. En el estudio, el secuestro de Ca^{2+} estaba potenciado por la presencia de ácido cítrico, siendo que recambiaban el medio cada dos

días. Un efecto similar pudo haberse desencadenado en el experimento al no cambiar el SBF durante los 14 días.

De acuerdo a la literatura la apatita biológica humana siempre serán nanopartículas deficientes de calcio de HA, que contiene un pequeño porcentaje de carbonato, fosfato, sodio y magnesio debido al contacto continuo con un flujo traza de iones [82].

Ahora, si se compara la HA formado en biovidrio 45S5 y BV/GO 0.5% se aprecia que el tamaño medio de las esferas del segundo son más grandes que las del BV, lo que podría sugerir una mayor reactividad de BV/GO más que BV. La adición de GO pudo haber otorgado una nano-rugosidad extra al compuesto mejorando la bioactividad [83].

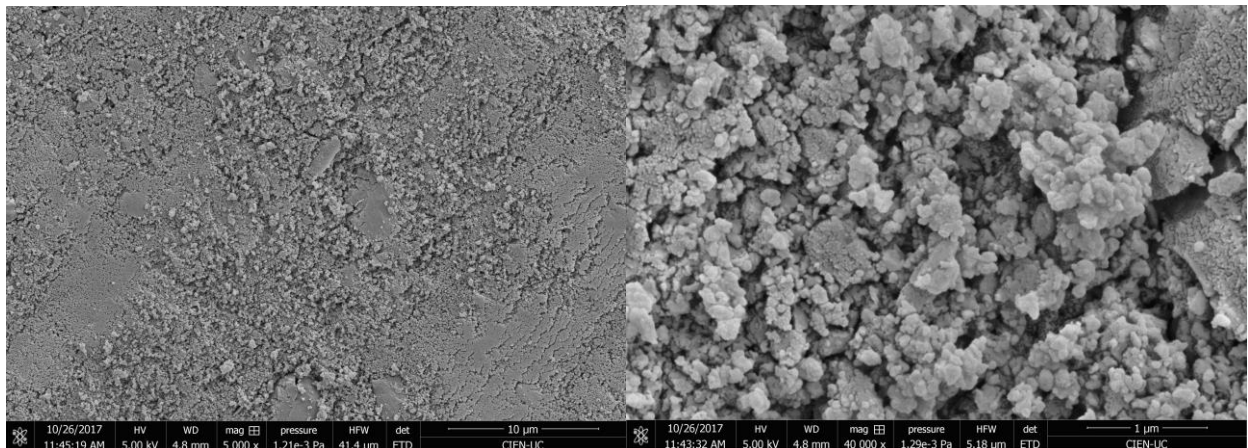


Figura 20: Imágenes SEM a día 0 para bioactividad de pastilla de biovidrio 45S5 con óxido de grafeno 2% a) 10 µm y b) 1 µm

Por último, se tienen las imágenes para BV GO 2%, y como previamente se mencionó solo se presenta el día 0. Se aprecia una superficie más homogénea que el resto de las pastillas y con mayor rugosidad. Se hubiese esperado un comportamiento similar al observado en el caso anterior, con agregación de vaterita y suavizamiento de la superficie. Posiblemente una menor densidad en la formación de este mineral ya que proporcionalmente se encuentra menos biovidrio, por tanto, se dispondría de menos calcio en el medio. Recordar que la medida de pH no implica una relación directa con la concentración de Ca^{2+} , pues también existe sílice, fósforo y sodio.

Se puede ver, por tanto, que la mejor formación de capa de apatita se dio en BV/GO 0.5% al comparar la frecuencia de esferas en la superficie de casi el doble que BV. Habría que volver a realizar la experimentación para confirmar el desempeño de BV/GO 2%, y analizar en más profundidad si las esferas en estos compuestos son CDA o si efectivamente son hidroxiapatita, pero con una

estructura modificada debido a la presencia del GO, considerando que su Ca/P es de 1.55, muy similar al de HA del hueso (1.67).

5.4 Actividad Antimicrobiana

Una de las características deseadas en implantes es que estos tengan capacidad antibacteriana, ya que la posibilidad de infección puede significar el fracaso de un implante al desencadenar una respuesta inflamatoria del tejido circundante, llevando eventualmente al rechazo del aparato [121].

En la familia de las bacterias existen dos grandes categorías, las gram-positivas que se caracterizan por tener una pared celular de peptidoglucano, la cual rodea a la membrana interna citoplasmática y las gram-negativas, que poseen una membrana citoplasmática y otra externa. En este caso se realizó la prueba con *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* bacterias que normalmente generan infecciones cuando se realizan procedimientos médicos y quirúrgicos [121] y representantes de las respectivas familias.

En la Figura 21 se muestran las placas cultivadas con las bacterias y los diferentes productos a las 24 horas de sembradas.

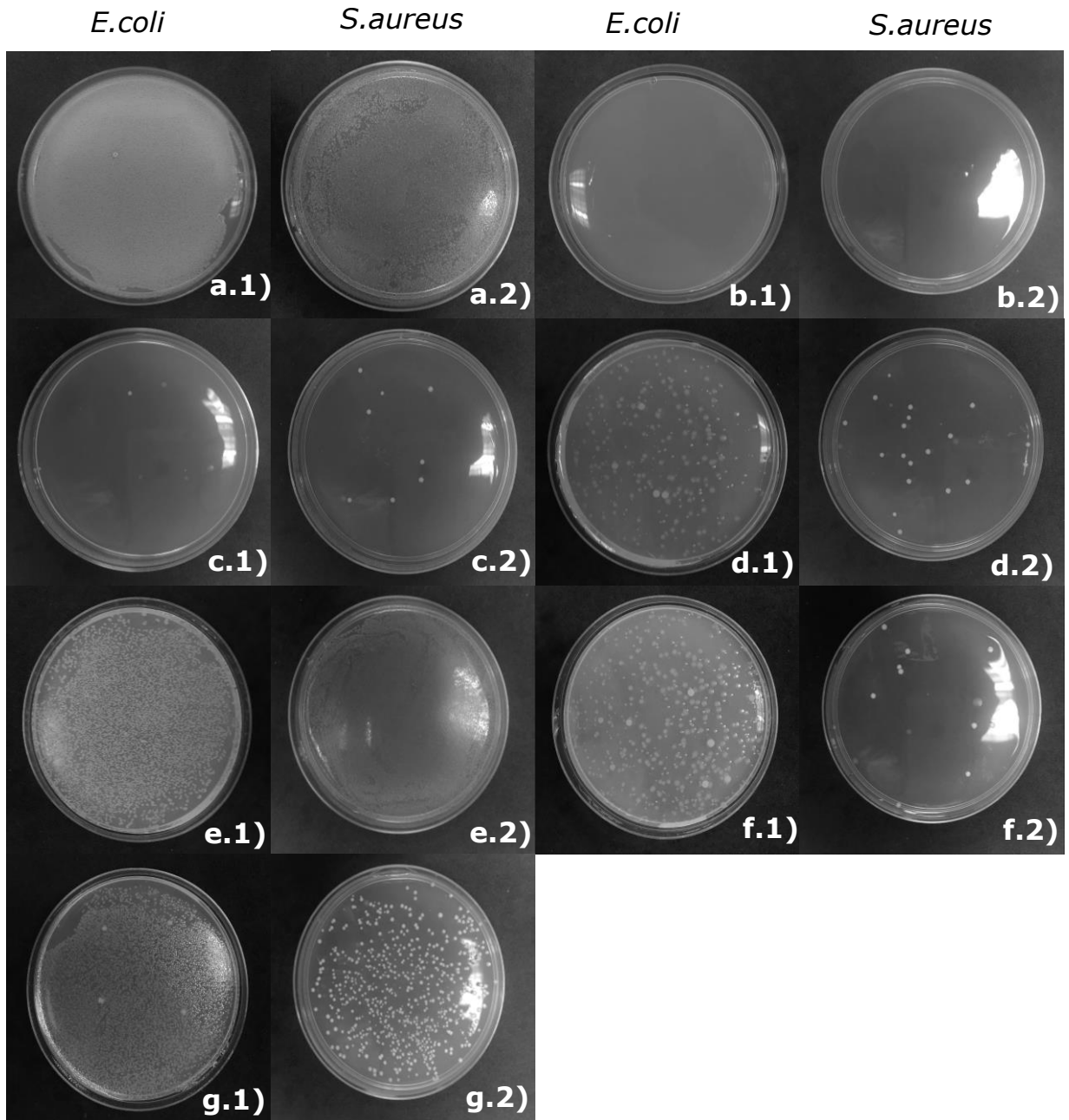


Figura 21: Cultivos en placa 1000 veces diluido de la concentración inicial para *E.coli* (x.1) y *S.aureus* (x.2) con los productos de a) PBS, b) Clorhexidina al 0.12%, c) BV, d) BV + GO 0.5%, e) GO 0.5%, f)BV GO 2%, g) GO 2%.

El control positivo fue realizado a base de PBS 1X y el control negativo con clorhexidina al 0.12%. Se utilizaron para corroborar que las etapas del protocolo fueron bien llevadas a cabo. Se esperaba que el PBS no influyera en forma alguna en el crecimiento bacteriano, y en caso contrario, que la clorhexidina desencadenara muerte celular. Los resultados se ven en la Figura 21 en a.1, a.2, b.1 y b.2 y se condicen con lo esperado.

Para el biovidrio 45S5 de 0.2 g/ml se aprecia que las bacterias se ven influenciadas de diferente forma. La gram-positiva (*S.aureus*) es menos sensible a los efectos del material que la gram negativa, donde su actividad se ve casi completamente extinguida. Las muestras que se encuentra en c.1 y c.2 están diluida 1000 veces, por lo que cada colonia más implica una diferencia de 10^3 bacterias/ml aproximadamente. Esto se explica por los pHs a los que usualmente viven las bacterias, *E.coli* desde pH tan bajos como 2 hasta 7-8 y las *S.aureus* desde 7-7.5 a un máximo de 9.3 [122].

Varios estudios reportan al biovidrio 45S5 y sus derivados con buena actividad antibacteriana [123][124][125] y atribuyen su desempeño al cambio de pH que genera en el medio, volviéndolo más básico, es decir, menos propicio para el crecimiento de bacterias, y en paralelo a la superficie del biovidrio que rompe la pared de la bacteria con sus bordes filosos.

Los productos con GO al 0.5% y 2% no tuvieron tanta influencia en el crecimiento bacteriano como el biovidrio, tal como se muestra en e) y g) respectivamente de la Figura 21. Se aprecia que el GO al 2% reduce la actividad de ambos tipos de bacteria, pero no drásticamente como lo logra el BV.

Se podría pensar que uno de los factores influyentes sería la concentración que se utilizó para medir el ensayo, pues el BV estaba al 20%, mientras que el GO eran menor o igual a 2%, lo que se transforma en una concentración entre 2.5 y 10 mg/ml. Sin embargo, en un estudio de Shaobin Liu se analiza la dependencia entre la dimensión lateral de las hojas de GO y la actividad antibacterial [126], en el que logró observar un efecto considerable desde los 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ para hojas de gran tamaño, estas interactuaban directamente con las células, envolviéndolas y privándolas de su entorno, imposibilitándoles así la función de proliferación. Por tanto, se descarta esta característica como influyente.

Por otra parte, el método empleado considera una etapa de cultivo en suspensión, y tal como se mencionó previamente, en estos tipos de cultivo el

óxido de grafeno presenta mejor actividad cuando aísla a la bacteria, se desprende que el contacto directo con la bacteria es de suma importancia.

En el experimento como no existió agitación en la etapa de incubación, el producto decantó acumulándose en el fondo, tal como se aprecia en la Figura 22 inferior generando una mínima interacción con las células y estas se pudieron desarrollar eventualmente en el medio circundante superior del tubo de ensayo.

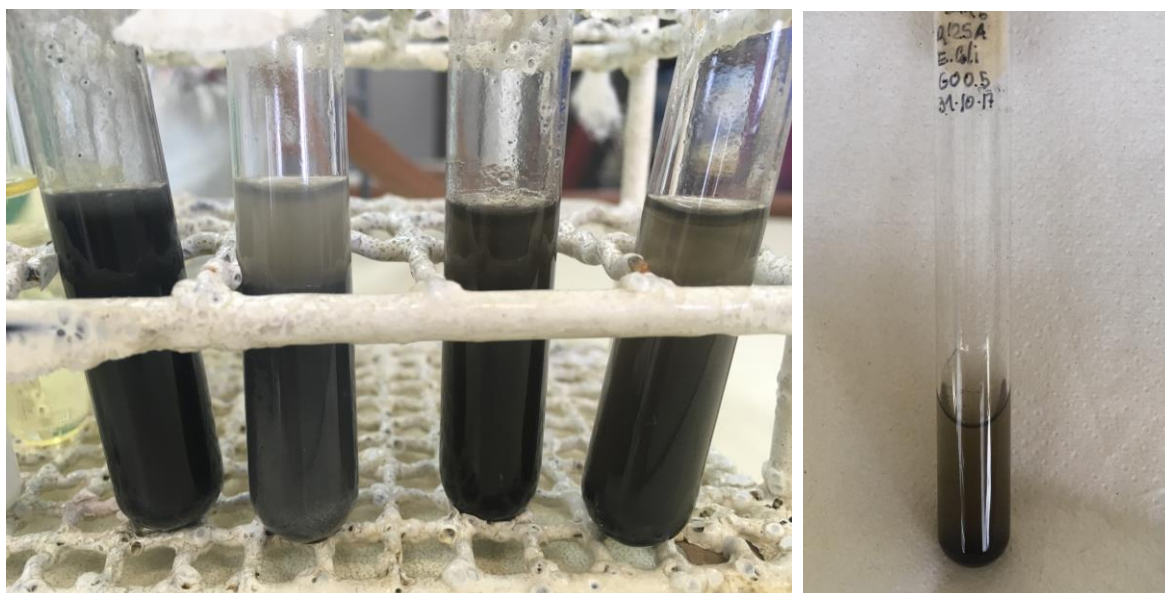


Figura 22: Tubos de ensayo con bacteria y GO listos para iniciar la etapa de incubación, luego de tres minutos de haber sido mezclados en el vórtex.

Un factor físico que pudo haber influido en el desempeño de la actividad son los bordes filosos del GO, pues estos al hacer contacto con la bacteria les dañan su membrana como se mencionó previamente. Se ha reportado además que el efecto es mayor en *S.aureus* que para *E.coli*, ya que esta última presenta una capa exterior que protege a las gram-negativas del contacto directo [127]. Esto explicaría la diferencia de UFC en las placas de GO para ambas bacterias.

Otra propiedad a analizar es la capacidad oxidativa del GO, provocando un estrés oxidativo en la célula, pero el método empleado para la elaboración de este se escogió pensando en generar una mayor cantidad de grupos hidrofílicos oxidados en comparación con el método tradicional de Hummers o Hummers mejorado [73]. Por tanto, se justifica un mejor rendimiento para el GO 2%.

Respecto a las características químicas del GO, también existe el efecto de la debris oxidativa, correspondiente a fragmentos oxidados absorbidos en la superficie del material y que influye directamente en la toxicidad hacia *Escherichia coli*. Según el estudio del 2018, a mayor cantidad de fragmentos,

mayor es el efecto tóxico hacia las células [78]. Dado que ambos son el mismo tipo de GO, pero en diferentes concentraciones se observa mejor rendimiento para GO 2% nuevamente.

El método de Marcano genera hojas con una estructura más regular y con el plano basal más retenido, además el lavado y filtración es más minucioso que el del método tradicional, esto posiblemente conlleve a una menor cantidad de fragmentos oxidados en la superficie, lo que conllevaría a una menor actividad antimicrobiana en general.

Francois Perrault evaluó el efecto del tamaño del GO en recubrimientos y suspensiones, demostrando que a mayor cantidad de imperfecciones, o mayor densidad de defectos, mejor propiedades antibacteriales para los recubrimientos, que se da mayormente en hojas pequeñas, ya que esto les confiere mayor potencial oxidativo por las imperfecciones de los bordes y enlaces intactos que median el estrés oxidativo [128].

Dicho lo anterior, probablemente se formaron hojas grandes de GO con una estructura más ordenada, las cuales decantaron en el fondo del tubo, por lo que no se pudo observar su actividad antimicrobiana en condiciones óptimas (agitación), dificultando el envolvimiento de las bacterias. No obstante, sus bordes afilados dañaron las membranas de ciertas bacterias, provocando la muerte celular. Es por esto que se debiesen realizar modificaciones al protocolo para observar la verdadera actividad del GO.

Pareciera ser que el pH es el mayor influyente en la actividad antibacterial entre todas las propiedades mencionadas, sin embargo, este efecto se podría ver disminuido en el cuerpo, por la acción del organismo para controlar la basicidad del cuerpo a un pH más neutro, por lo que sería de mayor interés la acción del GO.

Finalmente se tienen las placas para las mezclas de biovidrio 45S5 y óxido de grafeno en d) y f).

Por lo analizado anteriormente, era de esperar que estuviese presente la actividad antimicrobiana, ya que existe la presencia de BV en mayor porcentaje.

En un estudio de Hu Sheng [123], se destaca que a menores concentraciones de BV 45S5, menor es la actividad antibacteriana observada, lo que explicaría la menor actividad para los productos que son mezclas. Además, como se mencionó previamente *S.aureus* es más susceptible a el daño en la membrana provocado por cualquier tipo de borde, ya sea del biovidrio o del óxido de grafeno, lo que se condice con una menor cantidad de colonias en ambos casos respecto a la *E.coli*. Luego, existe un menor efecto para el biovidrio con 0.5%

de óxido de grafeno, lo que se explica por una menor concentración de bordes afilados expuestos en el medio y concentración de GO.

La tabla Tabla 4 resume los resultados obtenidos para las pruebas de actividad antimicrobiana en duplicado y con dos sesiones independientes para asegurar reproducibilidad del ensayo.

Tabla 4: Actividad antimicrobiana de *E.coli* y *S.aureus*

	<i>E.coli</i> UFC	<i>S. aureus</i> UFC
TESTIMONIO	No Contable	No Contable
CONTROL +	No Contable	No Contable
CONTROL -	0	0
BV 45S5	0	1025
GO 0.5%	No Contable	No Contable
GO 2%	438200	No Contable
BV 45S5 + GO 0.5%	718000	17530
BV 45S5 +GO 2%	52190	8030

Como se observa en la tabla el biovidrio 45S5 posee el mejor desempeño, seguido por aquellos que son mezcla.

La actividad observada para el óxido de grafeno es casi nula en comparación con el biovidrio, dado que se están utilizando concentraciones elevadas de este último material. Sería valioso repetir el ensayo, pero esta vez con agitación para que las partículas se encuentren en suspensión y en contacto más directo con las bacterias. Esto, además, simularía de forma más fehaciente al cuerpo humano.

5.5 Viabilidad celular

Para el ensayo de citocompatibilidad se utilizaron células madres mesenquimales de pulpa dental y se les aplicó el ensayo MTS. Las células viables, es decir con actividad mitocondrial activa, serán capaces de reducir el tetrazolio para convertirlo en un colorante de formazán, soluble en el medio de cultivo.

En la Figura 23 se expone el comportamiento de cada una de las células con los productos a los días 1,3 y 7 a una concentración de 0.05 g/ml.

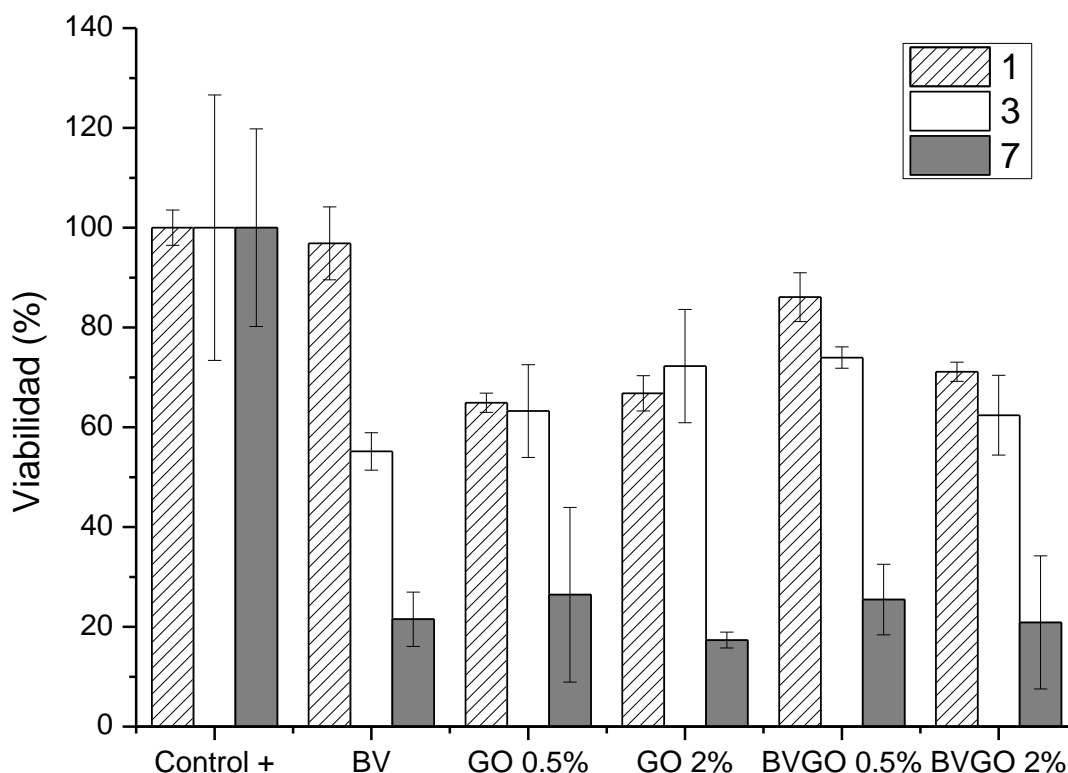


Figura 23: Viabilidad celular para los diferentes productos a los días 1, 3 y 7, a una concentración inicial de 0.05 g/ml

Todas las muestras fueron contrastadas con el control positivo considerándolo como un 100% para cada día. Además, las muestras que poseían biovidrio debieron ser tratadas previamente con ácido clorhídrico para disminuir su pH entre un rango de 7-8 antes de ser embebidas en el medio con células.

Para el primer día se nota una baja de la viabilidad, siendo el GO 0.5% el de mayor cambio llegando a un 65%.

Luego, al tercer día todas las muestras presentan un decrecimiento, a excepción del biovidrio y el GO 2%. El primero sufrió un decrecimiento drástico del 40%, mientras que el segundo tuvo un alza en la cantidad de células viables, pasando de un 67% a un 72%. La primera se puede deber a la concentración de la cerámica, que genera una presencia de iones calcio muy alta en el medio, provocando un colapso en la célula al intentar mantener la homeostasis de este ión [129]. Otros estudios hechos en osteoblastos humanos concluyeron que la presencia de iones del biovidrio disminuyen la actividad metabólica [130][131].

Por otra parte, esa alza para el GO 2% es inesperada y contradictoria con la otra concentración menor de óxido de grafeno y significativa según la prueba t-student al utilizar el programa IBM SPSS Statistics. Se han reportado

estudios que acreditan un aumento en la proliferación y adhesión de células mamíferas en presencia de óxido de grafeno, pero estas estaban en menores concentraciones a la utilizada (25 µg/ml en ese estudio versus 5 mg/ml en este trabajo) [132], por lo que si el alza fuese consistente, el GO 0.5% debió haber aumentado a la vez. Es más, el error asociado es del 11%, lo que cuestiona el valor real para aquella absorbancia. Probablemente al momento de depositar el producto en el pocillo se generó una aglomeración del mismo en un sector específico, dejando espacio libre en el fondo para el crecimiento celular.

Se observa que para los primeros días las mezclas de GO con biovidrio tienen una actividad sostenida cercana al 80%, decreciendo enfáticamente al séptimo día.

Aun así, su actividad promedio es mejor que aquella del GO, e incluso que el biovidrio para el caso del BVGO 0.5%.

Se cree que la alcalinización provocada por el biovidrio es contrarrestada al agregar GO, pues debido a la baja concentración de los compuestos no se utilizó sonicado para su mezcla, si no tan solo mortero. En un estudio de 2014 se reportó que existía un decrecimiento del pH en compósitos de silicato de calcio con nanoplaquetas de grafeno al 0.5 y 2 % wt en comparación con aquellos sin grafeno, es más, la diferencia era de un pH de 8.75 para los silicatos a uno de 8.40 y 7.65 para los de grafeno 0.5 y 2%wt respectivamente. Esto se explicaba por los grupos funcionales del grafeno, como éteres, carboxilos o hidroxilos que pueden formar ácidos y por tanto reducir el pH cuando hace contacto con la solución de SBF [133].

Walker et al. explica que pudo haber existido una envoltura alrededor de la matriz, actuando como una barrera para el vidrio y la solución acuosa en el ensayo realizado en compósito cerámicos con grafeno [134].

En general, existió una muerte celular para todos los productos más pronunciada para el séptimo día, llegando a tener un máximo de 26% para el GO 0.5% y un error asociado muy alto. Dado lo anterior, se decidió repetir el ensayo, pero con una concentración menor, equivalente a 0.01 g/ml como se ha reportado en otros ensayos. En la Figura 24 se adjunta los resultados.

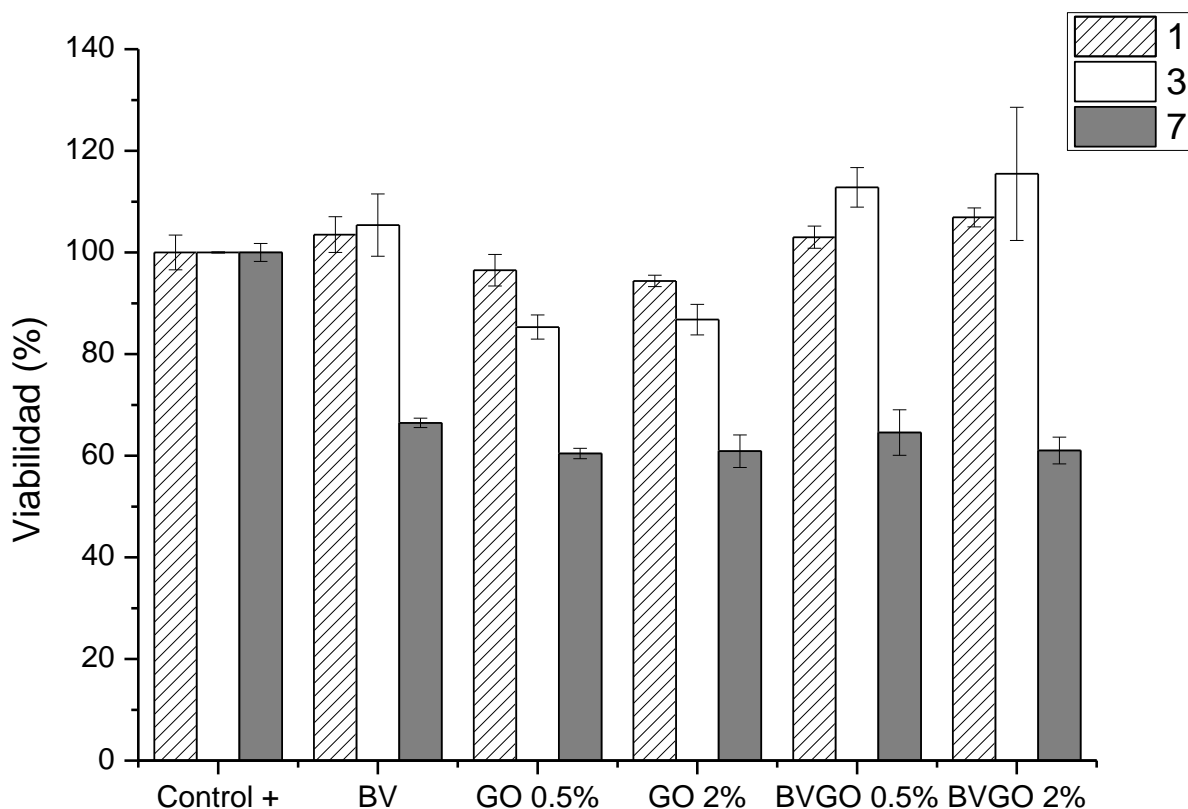


Figura 24: Viabilidad celular para los diferentes productos a los días 1, 3 y 7, a una concentración inicial de 0.01 g/ml

Se aprecia una mejora sustancial para todos los productos al reducir la concentración inicial, al séptimo día todas las muestras presentan una viabilidad superior al 60%, comparando con el caso anterior debe ser la concentración más baja, que permite que las células sean capaces de regular el pH.

Con esta concentración existe incluso un alza superior al control para todos aquellos compuestos en presencia de biovidrio, siendo mayor para aquellas que son mezcla.

Q.Z.Chen et al. sembró 2000 células de osteoblasto en pellets de 0.5 g de BV, obteniendo mejor crecimiento celular que el control (thermanox®) para los días 1, 3 y 6 de incubación, atribuyendo esta diferencia a la rugosidad de la superficie, en las que se desea tener rugosidad de micrómetros.

De ser así, se explicaría una mejor viabilidad en caso de que el polvo haya decantado en el fondo propiciando una mejor adherencia de las células a la partícula. Además, como se mencionó previamente en la fabricación de pastillas y posterior bioactividad, la adición de GO al compuesto puede estar causando esta mayor rugosidad, por lo que se podría esperar mayor actividad de ellas.

Esta rugosidad y adhesión no necesariamente garantiza mejor citocompatibilidad para los últimos días, debido a los efectos tóxicos previamente mencionados y sus efectos dependientes del tiempo.

Ahora bien, se ve una menor viabilidad para las muestras con GO, a pesar de brindar mayor rugosidad al medio. Esto se explicaría con la mayor liberación de aniones superóxido (ROS) como se comentó de estudios anteriores. Concentraciones de 100 mg/ml presentan dosis letales para las células. En este caso se utilizó 0.25 mg/ml y 1 mg/ml para GO 0.5 y 2% respectivamente. Además, se señalaba en el mismo estudio que esta actividad se veía reducida con la adición de BV, lo que podría sumarse a la mejor viabilidad demostrada con BV/GO.

Con la reducción general de la concentración se obtiene un mejor desempeño debido a que los efectos tóxicos antes visto se ven apaciguados. Concentraciones aún menores podrían demostrar un rendimiento mejor, como se reporta en diferentes estudios [135][136][137].

El mejor rendimiento se obtiene entonces para el biovidrio 45S5 con óxido de grafeno al 0.5% a largo plazo (séptimo día), con una diferencia leve en porcentaje respecto a los otros compuestos del 2% y 5% con el biovidrio y BV/GO 2% respectivamente. Estos resultados son significativos al realizar la prueba t-student con el programa IBM SPSS Statistics, pasando las pruebas de Shapiro Wilk de normalidad y Levene de igualdad de varianzas.

CAPÍTULO 6 CONCLUSIONES

Se lograron elaborar compósitos a base de biovidrio 45S5 y óxido de grafeno en una relación de 20:0.5 y 20:2 respectivamente.

Se analizó la capacidad bioactiva para cada una de las pastillas, determinando mejores resultados para la de biovidrio con óxido de grafeno al 0.5%, al poseer una densidad de casi el doble de HA en comparación con el biovidrio para la misma cantidad de días. Se debe evaluar si el compuesto corresponde a hidroxiapatita o a vaterita, siendo este precursor del anterior. No se tienen datos del BV/GO 2%, por lo que no se pudo contrastar con este compuesto.

Específicamente se sintetizó un vidrio similar al 45S5 mediante el método sol-gel, pero no en sus mismas relaciones estequiométricas, con un porcentaje de SiO_2 mayor. Por otra parte, se logró sintetizar el óxido de grafeno con el método de Marcanos y de Terrones modificado, faltando una caracterización del material para conocer mejor sus propiedades, como el tamaño lateral y si efectivamente se encontraba más oxidado que el del método de Hummers.

Se evaluó la capacidad antimicrobiana, determinando una mejor acción en el biovidrio y una acción más débil en el óxido de grafeno, pero siempre más marcada para las gram-positivas. Se recomiendan modificaciones en la experiencia para analizar mejor los resultados: misma concentración para todos los productos en estado puro y agitación para mantener en suspensión las partículas de producto. De todas formas, BV con GO demostró tener capacidad antibacteriana directamente relacionadas con la concentración de GO.

Se realizaron pruebas para determinar la viabilidad celular, mostrando mejores resultados para biovidrio 45S5 con óxido de grafeno al 0.5%, con una diferencia leve en porcentaje para el séptimo día con los otros materiales con biovidrio (de aproximadamente 3%), utilizando una concentración de 0.01 g/ml.

Se concluye que el candidato con más potencial para aplicaciones biomédicas es el biovidrio con óxido de grafeno al 0.5%, al presentar mejor desempeño que el biovidrio en la bioactividad y mejorar las condiciones para la viabilidad celular, quedando en duda su verdadero potencial para la actividad antimicrobiana.

Se recomienda modificar el protocolo de la síntesis de biovidrio para que el porcentaje de los elementos se asimile más al teórico, caracterizar el GO (si forma hojas, si es nanopartícula, si está parcialmente reducido, tamaño lateral), cambiar el SBF de la bioactividad cada dos días y realizar la experiencia de actividad antimicrobiana con agitación durante la incubación.

CAPÍTULO 7 BIBLIOGRAFÍA

- [1] I. O. Foundation, "Facts and Statistics | International Osteoporosis Foundation". [En línea]. Disponible en: <https://www.iofbonehealth.org/facts-statistics>. [Accedido: 20-abr-2018].
- [2] K. A. Hing, "Bone repair in the twenty-first century: biology, chemistry or engineering?", *Philos. Trans. R. Soc. A Math. Phys. Eng. Sci.*, vol. 362, nº 1825, pp. 2821–2850, dic. 2004.
- [3] S. Wu, X. Liu, K. W. K. Yeung, C. Liu, y X. Yang, "Biomimetic porous scaffolds for bone tissue engineering", *Mater. Sci. Eng. R Reports*, vol. 80, nº 1, pp. 1–36, jun. 2014.
- [4] International Osteoporosis Foundation, "Hip Fracture Incidence Map | International Osteoporosis Foundation". [En línea]. Disponible en: <https://www.iofbonehealth.org/facts-and-statistics/hip-fracture-incidence-map>. [Accedido: 27-sep-2017].
- [5] Instituto Traumatológico, "Instituto Traumatológico - Banco de Huesos evita amputación de extremidades". [En línea]. Disponible en: <http://www.intraumatologico.cl/noticias/461/0/banco-de-huesos-evita-amputaci-n-de-extremidades>. [Accedido: 27-sep-2017].
- [6] L. Polo-Corrales, M. Latorre-Esteves, y J. E. Ramirez-Vick, "Scaffold design for bone regeneration.", *J. Nanosci. Nanotechnol.*, vol. 14, nº 1, pp. 15–56, ene. 2014.
- [7] I. Kinnunen, K. Aitasalo, M. Pöllönen, y M. Varpula, "Reconstruction of orbital floor fractures using bioactive glass", *J. Cranio-Maxillofacial Surg.*, vol. 28, nº 4, pp. 229–234, ago. 2000.
- [8] M. Peltola, "Experimental Follow-up Model for Clinical Frontal Sinus Obliteration with Bioactive Glass (S53P4)", *Acta Otolaryngol.*, vol. 120, nº 543, pp. 167–169, ene. 2000.
- [9] L. L. Hench y J. Wilson, "Surface-active biomaterials.", *Science*, vol. 226, nº 4675, pp. 630–6, nov. 1984.
- [10] U. Gross, J. Brandes, V. Strunz, I. Bab, y J. Sela, "The ultrastructure of the interface between a glass ceramic and bone", *J. Biomed. Mater. Res.*, vol. 15, nº 3, pp. 291–305, may 1981.
- [11] A. M. Cícero, "Matrices de tercera generación en la ingeniería de tejidos óseos", Buenos Aires, p. 157, 2017.
- [12] H. Oonishi *et al.*, "Particulate bioglass compared with hydroxyapatite as a bone graft substitute.", *Clin. Orthop. Relat. Res.*, nº 334, pp. 316–25, ene. 1997.
- [13] Z. Wang, Y. Gao, J. Xia, F. Zhang, Y. Xia, y Y. Li, "Synthesis and characterization of glycyrrhizin-decorated graphene oxide for hepatocyte-targeted delivery", *Comptes Rendus Chim.*, vol. 15, nº 8, pp. 708–713, ago. 2012.
- [14] W. C. Lee *et al.*, "Origin of Enhanced Stem Cell Growth and Differentiation on Graphene and Graphene Oxide", *ACS Nano*, vol. 5, nº

- 9, pp. 7334–7341, sep. 2011.
- [15] H. Elkhenany *et al.*, “Graphene supports *in vitro* proliferation and osteogenic differentiation of goat adult mesenchymal stem cells: potential for bone tissue engineering”, *J. Appl. Toxicol.*, vol. 35, n° 4, pp. 367–374, abr. 2015.
- [16] C. Zhao, X. Lu, C. Zanden, y J. Liu, “The promising application of graphene oxide as coating materials in orthopedic implants: preparation, characterization and cell behavior”, *Biomed. Mater.*, vol. 10, n° 1, p. 15019, feb. 2015.
- [17] S. Kim, S. H. Ku, S. Y. Lim, J. H. Kim, y C. B. Park, “Graphene-Biomaterial Hybrid Materials”, *Adv. Mater.*, vol. 23, n° 17, pp. 2009–2014, may 2011.
- [18] B. D. Holt, Z. M. Wright, A. M. Arnold, y S. A. Sydlik, “Graphene oxide as a scaffold for bone regeneration”, *Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology*, vol. 9, n° 3. p. e1437, may-2017.
- [19] R. S. Taichman, “Blood and bone: two tissues whose fates are intertwined to create the hematopoietic stem-cell niche Introduction and historical perspective”, *Blood*, vol. 105, n° 7, pp. 2631–2639, 2005.
- [20] B. Clarke, “Normal Bone Anatomy and Physiology”, *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.*, vol. 3, n° Supplement 3, pp. S131–S139, nov. 2008.
- [21] S. L. Teitelbaum, Y. Abu-Amer, y F. P. Ross, “Molecular mechanisms of bone resorption”, *J. Cell. Biochem.*, vol. 59, n° 1, pp. 1–10, sep. 1995.
- [22] S. L. Teitelbaum, Y. Abu-Amer, y F. P. Ross, “Molecular mechanisms of bone resorption”, *J. Cell. Biochem.*, vol. 59, n° 1, pp. 1–10, sep. 1995.
- [23] B. Clarke, “Normal Bone Anatomy and Physiology”, *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.*, vol. 3, n° Supplement 3, pp. S131–S139, nov. 2008.
- [24] “Bone Remodeling Structure And Function Of The Musculoskeletal System Minimalist | Interior Home Design Ideas”. [En línea]. Disponible en: <http://patantour.com/bone-remodeling-structure-and-function-of-the-musculoskeletal-system-minimalist>. [Accedido: 04-mar-2018].
- [25] R. Langer y J. P. Vacanti, “Tissue engineering.”, *Science*, vol. 260, n° 5110, pp. 920–6, may 1993.
- [26] B. P. Chan y K. W. Leong, “Scaffolding in tissue engineering: general approaches and tissue-specific considerations.”, *Eur. Spine J.*, vol. 17 Suppl 4, n° Suppl 4, pp. 467–79, dic. 2008.
- [27] C. Migliaresi y A. Motta, *Scaffolds for tissue engineering : biological design, materials, and fabrication*. .
- [28] D. Hutmacher, A. Kirsch, K. L. Ackermann, y M. B. Hürzeler, “Matrix and Carrier Materials for Bone Growth Factors: State of the Art and Future Perspectives”, en *Biological Matrices and Tissue Reconstruction*, Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 1998, pp. 197–206.
- [29] H. Shegarfi y O. Reikeras, “Review Article: Bone Transplantation and Immune Response”, *J. Orthop. Surg.*, vol. 17, n° 2, pp. 206–211, ago. 2009.

- [30] B. D. Holt, Z. M. Wright, A. M. Arnold, y S. A. Sydlik, "Graphene oxide as a scaffold for bone regeneration", *Wiley Interdiscip. Rev. Nanomedicine Nanobiotechnology*, vol. 9, n° 3, p. e1437, may 2017.
- [31] J. Bejarano Narváez, "Desarrollo de materiales compuestos de polímero biodegradable/vidrio bioactivo dopado con Cu y/o Zn para su uso potencial como biomaterial óseo", Universidad de Chile, 2015.
- [32] C. Laurencin, Y. Khan, y S. F. El-Amin, "Bone graft substitutes", *Expert Rev. Med. Devices*, vol. 3, n° 1, pp. 49–57, ene. 2006.
- [33] T. Boyce, J. Edwards, y N. Scarborough, "Allograft bone. The influence of processing on safety and performance.", *Orthop. Clin. North Am.*, vol. 30, n° 4, pp. 571–81, oct. 1999.
- [34] W. R. Moore, S. E. Graves, y G. I. Bain, "Synthetic bone graft substitutes", *ANZ J. Surg.*, vol. 71, n° 6, pp. 354–361, jun. 2001.
- [35] F. Matassi, L. Nistri, D. Chicon Paez, y M. Innocenti, "New biomaterials for bone regeneration.", *Clin. Cases Miner. Bone Metab.*, vol. 8, n° 1, pp. 21–4, ene. 2011.
- [36] M. Puska, A. J. Aho, y P. K. Vallittu, "[Biomaterials in bone repair].", *Duodecim.*, vol. 129, n° 5, pp. 489–96, 2013.
- [37] J. D. (John D. Enderle, J. D. Bronzino, y S. M. Blanchard, *Introduction to biomedical engineering*. Elsevier Academic Press, 2005.
- [38] F. Barrère, C. A. van Blitterswijk, y K. de Groot, "Bone regeneration: molecular and cellular interactions with calcium phosphate ceramics.", *Int. J. Nanomedicine*, vol. 1, n° 3, pp. 317–32, 2006.
- [39] F. Baino y C. Vitale-Brovarone, "Three-dimensional glass-derived scaffolds for bone tissue engineering: Current trends and forecasts for the future", *J. Biomed. Mater. Res. Part A*, vol. 97A, n° 4, pp. 514–535, jun. 2011.
- [40] J. R. Jones, "Reprint of: Review of bioactive glass: From Hench to hybrids", *Acta Biomater.*, vol. 23, pp. S53–S82, sep. 2015.
- [41] L. L. Hench, "Bioactive materials: the potential for tissue regeneration.", *J. Biomed. Mater. Res.*, vol. 41, n° 4, pp. 511–8, sep. 1998.
- [42] F. Baino, G. Novajra, y C. Vitale-Brovarone, "Bioceramics and Scaffolds: A Winning Combination for Tissue Engineering.", *Front. Bioeng. Biotechnol.*, vol. 3, p. 202, 2015.
- [43] V. Krishnan y T. Lakshmi, "Bioglass: A novel biocompatible innovation.", *J. Adv. Pharm. Technol. Res.*, vol. 4, n° 2, pp. 78–83, abr. 2013.
- [44] J. R. Jones, "Reprint of: Review of bioactive glass: From Hench to hybrids", *Acta Biomater.*, vol. 23, pp. S53–S82, sep. 2015.
- [45] L. L. Hench y J. K. West, "The sol-gel process", *Chem. Rev.*, vol. 90, n° 1, pp. 33–72, ene. 1990.
- [46] P. Sepulveda, J. R. Jones, y L. L. Hench, "Characterization of melt-derived 45S5 and sol-gel-derived 58S bioactive glasses.", *J. Biomed. Mater. Res.*, vol. 58, n° 6, pp. 734–40, 2001.

- [47] B. Lei, X. Chen, Y. Wang, N. Zhao, C. Du, y L. Fang, "Surface nanoscale patterning of bioactive glass to support cellular growth and differentiation", *J. Biomed. Mater. Res. Part A*, vol. 9999A, nº 4, p. NA-NA, sep. 2010.
- [48] R. L. Siqueira, O. Peitl, y E. D. Zanotto, "Gel-derived SiO₂-CaO-Na₂O-P₂O₅ bioactive powders: Synthesis and in vitro bioactivity", *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 31, nº 5, pp. 983-991, jul. 2011.
- [49] S. Labbaf, O. Tsigkou, K. H. Müller, M. M. Stevens, A. E. Porter, y J. R. Jones, "Spherical bioactive glass particles and their interaction with human mesenchymal stem cells in vitro", *Biomaterials*, vol. 32, nº 4, pp. 1010-1018, feb. 2011.
- [50] S. Lin, C. Ionescu, K. J. Pike, M. E. Smith, y J. R. Jones, "Nanostructure evolution and calcium distribution in sol-gel derived bioactive glass", *J. Mater. Chem.*, vol. 19, nº 9, p. 1276, feb. 2009.
- [51] E. M. Valliant, C. A. Turdean-Ionescu, J. V. Hanna, M. E. Smith, y J. R. Jones, "Role of pH and temperature on silica network formation and calcium incorporation into sol-gel derived bioactive glasses", *J. Mater. Chem.*, vol. 22, nº 4, pp. 1613-1619, dic. 2012.
- [52] L. L. Hench y H. A. Paschall, "Direct chemical bond of bioactive glass-ceramic materials to bone and muscle", *J. Biomed. Mater. Res.*, vol. 7, nº 3, pp. 25-42, may 1973.
- [53] D. Arcos, D. C. Greenspan, y M. Vallet-Regí, "A new quantitative method to evaluate the *in vitro* bioactivity of melt and sol-gel-derived silicate glasses", *J. Biomed. Mater. Res. Part A*, vol. 65A, nº 3, pp. 344-351, jun. 2003.
- [54] D. C. Greenspan y L. L. Hench, "Chemical and mechanical behavior of bioglass-coated alumina", *J. Biomed. Mater. Res.*, vol. 10, nº 4, pp. 503-509, jul. 1976.
- [55] M. Vallet-Regí, C. V. Ragel, y A. J. Salinas, "Glasses with Medical Applications", *Eur. J. Inorg. Chem.*, vol. 2003, nº 6, pp. 1029-1042, mar. 2003.
- [56] P. Stoor, E. Söderling, y J. I. Salonen, "Antibacterial effects of a bioactive glass paste on oral microorganisms.", *Acta Odontol. Scand.*, vol. 56, nº 3, pp. 161-5, jun. 1998.
- [57] E. Munukka *et al.*, "Bactericidal effects of bioactive glasses on clinically important aerobic bacteria", *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, vol. 19, nº 1, pp. 27-32, ene. 2008.
- [58] M. Bellantone, H. D. Williams, y L. L. Hench, "Broad-spectrum bactericidal activity of Ag(2)O-doped bioactive glass.", *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 46, nº 6, pp. 1940-5, jun. 2002.
- [59] T. Waltimo, T. J. Brunner, M. Vollenweider, W. J. Stark, y M. Zehnder, "Antimicrobial Effect of Nanometric Bioactive Glass 45S5", *J. Dent. Res.*, vol. 86, nº 8, pp. 754-757, ago. 2007.
- [60] J. A. Kellum, "Determinants of blood pH in health and disease", *Crit. Care*, vol. 4, nº 1, p. 6, ene. 2000.

- [61] S. Hu, J. Chang, M. Liu, y C. Ning, "Study on antibacterial effect of 45S5 Bioglass®", *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, vol. 20, nº 1, pp. 281–286, ene. 2009.
- [62] T. Waltimo, T. J. Brunner, M. Vollenweider, W. J. Stark, y M. Zehnder, "Antimicrobial Effect of Nanometric Bioactive Glass 45S5", *J. Dent. Res.*, vol. 86, nº 8, pp. 754–757, ago. 2007.
- [63] J. E. Gough, J. R. Jones, y L. L. Hench, "Nodule formation and mineralisation of human primary osteoblasts cultured on a porous bioactive glass scaffold.", *Biomaterials*, vol. 25, nº 11, pp. 2039–46, may 2004.
- [64] J. R. Jones, O. Tsigkou, E. E. Coates, M. M. Stevens, J. M. Polak, y L. L. Hench, "Extracellular matrix formation and mineralization on a phosphate-free porous bioactive glass scaffold using primary human osteoblast (HOB) cells", *Biomaterials*, vol. 28, nº 9, pp. 1653–1663, mar. 2007.
- [65] I. A. Silver, J. Deas, y M. Erecińska, "Interactions of bioactive glasses with osteoblasts in vitro: effects of 45S5 Bioglass®, and 58S and 77S bioactive glasses on metabolism, intracellular ion concentrations and cell viability", *Biomaterials*, vol. 22, nº 2, pp. 175–185, ene. 2001.
- [66] A. S. Bakry, Y. Tamura, M. Otsuki, S. Kasugai, K. Ohya, y J. Tagami, "Cytotoxicity of 45S5 bioglass paste used for dentine hypersensitivity treatment", *J. Dent.*, vol. 39, nº 9, pp. 599–603, sep. 2011.
- [67] Q.-Z. Chen, Y. Li, L.-Y. Jin, J. M. W. Quinn, y P. A. Komesaroff, "A new sol-gel process for producing Na₂O-containing bioactive glass ceramics", *Acta Biomater.*, vol. 6, nº 10, pp. 4143–4153, oct. 2010.
- [68] Q.-Z. Chen y G. A. Thouas, "Fabrication and characterization of sol-gel derived 45S5 Bioglass®-ceramic scaffolds", *Acta Biomater.*, vol. 7, nº 10, pp. 3616–3626, oct. 2011.
- [69] N. Dubey, R. Bentini, I. Islam, T. Cao, A. H. Castro Neto, y V. Rosa, "Graphene: A Versatile Carbon-Based Material for Bone Tissue Engineering.", *Stem Cells Int.*, vol. 2015, p. 804213, jun. 2015.
- [70] R. Li *et al.*, "Surface Oxidation of Graphene Oxide Determines Membrane Damage, Lipid Peroxidation, and Cytotoxicity in Macrophages in a Pulmonary Toxicity Model", *ACS Nano*, vol. 12, nº 2, pp. 1390–1402, feb. 2018.
- [71] T. Nanomateriales y Nanodispositivos, "Óxido de grafeno: el más desconocido de la familia del carbono | Nanotecnología", *Telefónica*, 2016. [En línea]. Disponible en: <https://nanotecnologia.fundaciontelefonica.com/2016/08/24/oxido-de-grafeno-el-mas-desconocido-de-la-familia-del-carbono/>. [Accedido: 06-mar-2018].
- [72] Y. Zhu *et al.*, "Graphene and Graphene Oxide: Synthesis, Properties, and Applications", *Adv. Mater.*, vol. 22, nº 35, pp. 3906–3924, sep. 2010.
- [73] D. C. Marcano *et al.*, "Improved Synthesis of Graphene Oxide", 2010.

- [74] O. Akhavan y E. Ghaderi, "Toxicity of Graphene and Graphene Oxide Nanowalls Against Bacteria", *ACS Nano*, vol. 4, n° 10, pp. 5731–5736, oct. 2010.
- [75] R. Li *et al.*, "Identification and Optimization of Carbon Radicals on Hydrated Graphene Oxide for Ubiquitous Antibacterial Coatings", *ACS Nano*, vol. 10, n° 12, pp. 10966–10980, dic. 2016.
- [76] S. Azimi, J. Behin, R. Abiri, L. Rajabi, A. Derakhshan, y H. Karimnezhad, "Synthesis, Characterization and Antibacterial Activity of Chlorophyllin Functionalized Graphene Oxide Nanostructures", *Sci. Adv. Mater.*, vol. 6, n° 4, pp. 771–781, abr. 2014.
- [77] F. Perreault, A. F. de Faria, S. Nejati, y M. Elimelech, "Antimicrobial Properties of Graphene Oxide Nanosheets: Why Size Matters", *ACS Nano*, vol. 9, n° 7, pp. 7226–7236, jul. 2015.
- [78] A. F. Faria, F. Perreault, y M. Elimelech, "Elucidating the Role of Oxidative Debris in the Antimicrobial Properties of Graphene Oxide", *ACS Appl. Nano Mater.*, p. acsanm.7b00332, feb. 2018.
- [79] W. Hu *et al.*, "Graphene-Based Antibacterial Paper", *ACS Nano*, vol. 4, n° 7, pp. 4317–4323, jul. 2010.
- [80] Z. Li, N. W. Khun, X.-Z. Tang, E. Liu, y K. A. Khor, "Mechanical, tribological and biological properties of novel 45S5 Bioglass® composites reinforced with in situ reduced graphene oxide", *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.*, vol. 65, pp. 77–89, ene. 2017.
- [81] X. Mo *et al.*, "Enhanced Stem Cell Osteogenic Differentiation by Bioactive Glass Functionalized Graphene Oxide Substrates", *J. Nanomater.*, vol. 2016, pp. 1–11, jun. 2016.
- [82] H. Liu *et al.*, "Simultaneous Reduction and Surface Functionalization of Graphene Oxide for Hydroxyapatite Mineralization", *J. Phys. Chem. C*, vol. 116, n° 5, pp. 3334–3341, feb. 2012.
- [83] H. Porwal, S. Grasso, L. Cordero-Arias, C. Li, A. R. Boccaccini, y M. J. Reece, "Processing and bioactivity of 45S5 Bioglass®-graphene nanoplatelets composites", *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, vol. 25, n° 6, pp. 1403–1413, jun. 2014.
- [84] C. Gao, T. Liu, C. Shuai, y S. Peng, "Enhancement mechanisms of graphene in nano-58S bioactive glass scaffold: mechanical and biological performance", *Sci. Rep.*, vol. 4, n° 1, p. 4712, may 2015.
- [85] S.-J. Shih, C.-Y. Chen, Y.-C. Lin, J.-C. Lee, y R.-J. Chung, "Investigation of bioactive and antibacterial effects of graphene oxide-doped bioactive glass", *Adv. Powder Technol.*, vol. 27, n° 3, pp. 1013–1020, may 2016.
- [86] Y. Zhang *et al.*, "Cytotoxicity Effects of Graphene and Single-Wall Carbon Nanotubes in Neural Phaeochromocytoma-Derived PC12 Cells", *ACS Nano*, vol. 4, n° 6, pp. 3181–3186, jun. 2010.
- [87] C. Ashok raja, S. Balakumar, D. Durgalakshmi, R. P. George, B. Anandkumar, y U. Kamachi Mudali, "Reduced graphene oxide/nano-Bioglass composites: processing and super-anion oxide evaluation", *RSC Adv.*, vol. 6, n° 24, pp. 19657–19661, 2016.

- [88] J. Kim *et al.*, "Bioactive effects of graphene oxide cell culture substratum on structure and function of human adipose-derived stem cells", *J. Biomed. Mater. Res. Part A*, vol. 101, n° 12, pp. 3520–3530, dic. 2013.
- [89] T. Kokubo y H. Takadama, "How useful is SBF in predicting in vivo bone bioactivity?", *Biomaterials*, vol. 27, n° 15, pp. 2907–2915, may 2006.
- [90] L. L. Hench, *Bioglass and Similar Materials*. 2001.
- [91] P. Li, Q. Yang, F. Zhang, y T. Kokubo, "The effect of residual glassy phase in a bioactive glass-ceramic on the formation of its surface apatite layer in vitro", *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, vol. 3, n° 6, pp. 452–456, nov. 1992.
- [92] L. Lefebvre *et al.*, "Structural transformations of bioactive glass 45S5 with thermal treatments", *Acta Mater.*, vol. 55, n° 10, pp. 3305–3313, jun. 2007.
- [93] C.-C. Lin, L.-C. Huang, y P. Shen, "Na₂CaSi₂O₆-P₂O₅ based bioactive glasses. Part 1: Elasticity and structure".
- [94] Q. Z. Chen, I. D. Thompson, y A. R. Boccaccini, "45S5 Bioglass®-derived glass-ceramic scaffolds for bone tissue engineering", *Biomaterials*, vol. 27, n° 11, pp. 2414–2425, abr. 2006.
- [95] O. Peitl, E. Dutra Zanotto, y L. L. Hench, "Highly bioactive P₂O₅-Na₂O-CaO-SiO₂ glass-ceramics", *J. Non. Cryst. Solids*, vol. 292, n° 1–3, pp. 115–126, nov. 2001.
- [96] J. Ning *et al.*, "Synthesis and in vitro bioactivity of a borate-based bioglass", *Mater. Lett.*, vol. 61, n° 30, pp. 5223–5226, dic. 2007.
- [97] M. Vallet-Regi, I. Izquierdo-Barba, y A. J. Salinas, "Influence of P₂O₅ on crystallinity of apatite formed in vitro on surface of bioactive glasses", *J. Biomed. Mater. Res.*, vol. 46, n° 4, pp. 560–565, sep. 1999.
- [98] O. Peitl, E. D. Zanotto, y L. L. Hench, "Highly bioactive P₂O₅ ± Na₂O ± CaO ± SiO₂ glass-ceramics".
- [99] L. L. Hench y H. A. Paschall, "Direct chemical bond of bioactive glass-ceramic materials to bone and muscle", *J. Biomed. Mater. Res.*, vol. 7, n° 3, pp. 25–42, may 1973.
- [100] M. Mehrli *et al.*, "Mechanical and in vitro biological performance of graphene nanoplatelets reinforced calcium silicate composite.", *PLoS One*, vol. 9, n° 9, p. e106802, 2014.
- [101] P. M. Dove, N. Han, A. F. Wallace, y J. J. De Yoreo, "Kinetics of amorphous silica dissolution and the paradox of the silica polymorphs.", *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 105, n° 29, pp. 9903–8, jul. 2008.
- [102] F. Mohandes y M. Salavati-Niasari, "Freeze-drying synthesis, characterization and in vitro bioactivity of chitosan/graphene oxide/hydroxyapatite nanocomposite", *RSC Adv.*, vol. 4, n° 49, p. 25993, jun. 2014.
- [103] S. Pan y I. A. Aksay, "Factors Controlling the Size of Graphene Oxide Sheets Produced *via* the Graphite Oxide Route", *ACS Nano*, vol. 5, n° 5, pp. 4073–4083, may 2011.

- [104] M. S. Bahniuk, H. Pirayesh, H. D. Singh, J. A. Nychka, y L. D. Unsworth, "Bioactive Glass 45S5 Powders: Effect of Synthesis Route and Resultant Surface Chemistry and Crystallinity on Protein Adsorption from Human Plasma", *Biointerphases*, vol. 7, n° 1, p. 41, dic. 2012.
- [105] M. Li *et al.*, "An overview of graphene-based hydroxyapatite composites for orthopedic applications", *Bioact. Mater.*, vol. 3, n° 1, pp. 1–18, mar. 2018.
- [106] Universidad Politécnica de Cartagena, "Aplicaciones de la Difracción de rayos X. Apuntes y ejercicios". [En línea]. Disponible en: http://www.upct.es/~dimgc/webjoseperez/DOCENCIA_archivos/Aplicaciones_DRX_Apuntes_y_ejercicios.pdf. [Accedido: 23-feb-2018].
- [107] D. Sriranganathan, N. Kanwal, K. A. Hing, y R. G. Hill, "Strontium substituted bioactive glasses for tissue engineered scaffolds: the importance of octacalcium phosphate", *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, vol. 27, n° 2, p. 39, feb. 2016.
- [108] L. A. Quintero y D. M. Escobar, "Chemical Composition Effect of Sol-Gel Derived Bioactive Glass Over Bioactivity Behavior", Springer, Cham, 2017, pp. 11–19.
- [109] S. Kim y C. B. Park, "Mussel-inspired transformation of CaCO₃ to bone minerals", *Biomaterials*, vol. 31, n° 25, pp. 6628–6634, sep. 2010.
- [110] D. C. Clupper, J. J. Mecholsky, G. P. LaTorre, y D. C. Greenspan, "Bioactivity of tape cast and sintered bioactive glass-ceramic in simulated body fluid", *Biomaterials*, vol. 23, n° 12, pp. 2599–2606, jun. 2002.
- [111] Y. Sheng Han, G. Hadiko, M. Fuji, y M. Takahashi, "Crystallization and transformation of vaterite at controlled pH", *J. Cryst. Growth*, vol. 289, n° 1, pp. 269–274, mar. 2006.
- [112] H. Maeda, T. Kasuga, y M. Nogami, "Apatite formation on titania–vaterite powders in simulated body fluid", *J. Eur. Ceram. Soc.*, vol. 24, n° 7, pp. 2125–2130, jun. 2004.
- [113] X. Wang *et al.*, "Synthesis of CaCO₃/graphene composite crystals for ultra-strong structural materials", *RSC Adv.*, vol. 2, n° 5, p. 2154, feb. 2012.
- [114] A. Obata, T. Hotta, T. Wakita, Y. Ota, y T. Kasuga, "Electrospun microfiber meshes of silicon-doped vaterite/poly(lactic acid) hybrid for guided bone regeneration", *Acta Biomater.*, vol. 6, n° 4, pp. 1248–1257, abr. 2010.
- [115] S. Kim, J. W. Ko, y C. B. Park, "Bio-inspired mineralization of CO₂ gas to hollow CaCO₃ microspheres and bone hydroxyapatite/polymer composites", *J. Mater. Chem.*, vol. 21, n° 30, p. 11070, jul. 2011.
- [116] X. Fan *et al.*, "Deoxygenation of Exfoliated Graphite Oxide under Alkaline Conditions: A Green Route to Graphene Preparation", *Adv. Mater.*, vol. 20, n° 23, pp. 4490–4493, dic. 2008.
- [117] S. J. Magali y D. Chávez, "Síntesis y caracterización de fosfatos de calcio por el método sol-gel", Universidad Nacional de Asunción, 2012.

- [118] M. J. Lukić *et al.*, "Peculiarities in sintering behavior of Ca-deficient hydroxyapatite nanopowders", *Mater. Lett.*, vol. 68, pp. 331–335, feb. 2012.
- [119] Universidad Central de Venezuela. Facultad de Odontología., *Acta odontológica venezolana*. Facultad de Odontología de la Universidad Central de Venezuela, 2009.
- [120] O. Kaygili, S. Keser, M. Kom, N. Bulut, y S. V Dorozhkin, "The effect of simulating body fluid on the structural properties of hydroxyapatite synthesized in the presence of citric acid.", *Prog. Biomater.*, vol. 5, n° 3–4, pp. 173–182, dic. 2016.
- [121] C. Vargas Hernández y M. A. Avellaneda Céspedes, "Avances en la creación de implantes óseos antibacteriales", 2000. [En línea]. Disponible en: <http://noticiasdela-ciencia.com/not/22410/avances-en-la-creacion-de-implantes-oseos-antibacteriales/>. [Accedido: 01-mar-2018].
- [122] A. Martins *et al.*, "Role of calcium in the efflux system of *Escherichia coli*.", *Int. J. Antimicrob. Agents*, vol. 37, n° 5, pp. 410–4, may 2011.
- [123] Ö. Sheng, H. Ae, J. Chang, M. Liu, y C. Ning, "Study on antibacterial effect of 45S5 Bioglass".
- [124] P. Stoor, E. Söderling, y J. I. Salonen, "Antibacterial effects of a bioactive glass paste on oral microorganisms", *Acta Odontol. Scand.*, vol. 56, n° 3, pp. 161–165, ene. 1998.
- [125] E. Munukka *et al.*, "Bactericidal effects of bioactive glasses on clinically important aerobic bacteria", *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, vol. 19, n° 1, pp. 27–32, ene. 2008.
- [126] S. Liu *et al.*, "Lateral Dimension-Dependent Antibacterial Activity of Graphene Oxide Sheets", *Langmuir*, vol. 28, n° 33, pp. 12364–12372, ago. 2012.
- [127] S. Sajjad, S. A. Khan Leghari, y A. Iqbal, "Study of Graphene Oxide Structural Features for Catalytic, Antibacterial, Gas Sensing, and Metals Decontamination Environmental Applications", *ACS Appl. Mater. Interfaces*, vol. 9, n° 50, pp. 43393–43414, dic. 2017.
- [128] F. Perreault, A. F. de Faria, S. Nejati, y M. Elimelech, "Antimicrobial Properties of Graphene Oxide Nanosheets: Why Size Matters", *ACS Nano*, vol. 9, n° 7, pp. 7226–7236, jul. 2015.
- [129] S. Labbaf, O. Tsigkou, K. H. Müller, M. M. Stevens, A. E. Porter, y J. R. Jones, "Spherical bioactive glass particles and their interaction with human mesenchymal stem cells in vitro", *Biomaterials*, vol. 32, n° 4, pp. 1010–1018, feb. 2011.
- [130] O. Tsigkou, J. R. Jones, J. M. Polak, y M. M. Stevens, "Differentiation of fetal osteoblasts and formation of mineralized bone nodules by 45S5 Bioglass® conditioned medium in the absence of osteogenic supplements", *Biomaterials*, vol. 30, n° 21, pp. 3542–3550, jul. 2009.
- [131] J. R. Jones, O. Tsigkou, E. E. Coates, M. M. Stevens, J. M. Polak, y L. L. Hench, "Extracellular matrix formation and mineralization on a

- phosphate-free porous bioactive glass scaffold using primary human osteoblast (HOB) cells”, *Biomaterials*, vol. 28, n° 9, pp. 1653–1663, mar. 2007.
- [132] O. N. Ruiz *et al.*, “Graphene Oxide: A Nonspecific Enhancer of Cellular Growth”, *ACS Nano*, vol. 5, n° 10, pp. 8100–8107, oct. 2011.
- [133] M. Mehrali *et al.*, “Mechanical and In Vitro Biological Performance of Graphene Nanoplatelets Reinforced Calcium Silicate Composite”, *PLoS One*, vol. 9, n° 9, p. e106802, sep. 2014.
- [134] L. S. Walker, V. R. Marotto, M. A. Rafiee, N. Koratkar, y E. L. Corral, “Toughening in Graphene Ceramic Composites”, *ACS Nano*, vol. 5, n° 4, pp. 3182–3190, abr. 2011.
- [135] S.-R. Ryoo, Y.-K. Kim, M.-H. Kim, y D.-H. Min, “Behaviors of NIH-3T3 Fibroblasts on Graphene/Carbon Nanotubes: Proliferation, Focal Adhesion, and Gene Transfection Studies”, *ACS Nano*, vol. 4, n° 11, pp. 6587–6598, nov. 2010.
- [136] Q. Z. Chen, A. Efthymiou, V. Salih, y A. R. Boccaccini, “Bioglass®-derived glass–ceramic scaffolds: Study of cell proliferation and scaffold degradation *in vitro*”, *J. Biomed. Mater. Res. Part A*, vol. 84A, n° 4, pp. 1049–1060, mar. 2008.
- [137] H. Elkhenany *et al.*, “Graphene supports *in vitro* proliferation and osteogenic differentiation of goat adult mesenchymal stem cells: potential for bone tissue engineering”, *J. Appl. Toxicol.*, vol. 35, n° 4, pp. 367–374, abr. 2015.