

**UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA
ESCUELA DE GRADUADOS**



**“SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE NANOZEOLITAS
SILICOALUMINOFOSTATOS MODIFICADAS CON
CALCIO Y LITIO Y EVALUACIÓN DE SUS PROPIEDADES
OSTEOINDUCTORAS”**

**CAMILA MARGARITA TORRES CEBALLOS
TESIS PARA OPTAR AL GRADO DE MAGÍSTER EN CIENCIAS
ODONTOLÓGICAS**

**Director de Tesis: Dr. Cristián Covarrubias Gallardo
Co-tutor de tesis: Dr. Rolando Vernal Astudillo**

Adscrito a Proyecto FONDECYT 1211314

**Santiago - Chile
2023**

FACULTAD DE ODONTOLOGÍA
ESCUELA DE GRADUADOS

INFORME DE APROBACIÓN DE TESIS DE MAGÍSTER EN CIENCIAS
ODONTOLÓGICAS

Se informa al Consejo de la Escuela de Graduados de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile, que la Tesis de Magíster en Ciencias Odontológicas presentada por la candidata

Camila Margarita Torres Ceballos

ha sido aprobada por la Comisión Evaluadora de Tesis como requisito para optar al grado de Magíster en Ciencias Odontológicas, en examen rendido el 31 de mayo de 2023.

COMISIÓN INFORMANTE DE TESIS



Dr. Javier Enrione Cáceres
Académico del Depto. de Biomateriales
Centro de Investigación e Innovación
Biomédica
Facultad de Medicina – U. de Los Andes



Dra. Luis Córdova Jara
Académico del Depto. de Cirugía y
Traumatología Máxilo Facial
Facultad de Odontología – U. de Chile



Dra. Sonja Buvinic Radic
Académica del Insitituto de Investigación en
Ciencias Odontológicas
Facultad de Odontología – U. de Chile
Presidenta Comisión Evaluadora

AGREDECIMIENTOS

A José, que me ha brindado su apoyo incondicional durante los últimos años, y es quien me ha visto aprender, crecer, equivocarme y reinventarme.

A mi familia, amigos y toda la red de apoyo que me ha acompañado a lo largo de este proceso.

A mi tutor y co-tutor de tesis, Dr. Cristian Covarrubias y Dr. Rolando Vernal por su colaboración para la realización de este trabajo.

A todos los miembros del Laboratorio de Nanobiomateriales, en especial al Prof. Miguel Neira, David Beltrán y Miguel Maureira, quienes siempre tuvieron excelente disposición en ayudar. También agradezco a Rocío Orellana, quien es la experta a cargo del microscopio electrónico de barrido de FOUCh.

Quiero también agradecer la colaboración del grupo del Prof. Michael Tsapatsis del Department of Chemical and Biomolecular Engineering & Institute for Nanobiotechnology, Johns Hopkins University, en especial al investigador postdoctoral Benjamin Le Monnier por realizar las mediciones de sortometría de nitrógeno de las zeolitas.

De la misma forma al Prof. Warren Grayson del Department of Biomedical Engineering, The Johns Hopkins University School of Medicine, en especial a su estudiante Emma Whitehead por realizar los ensayos celulares con microscopia de fluorescencia.

PRODUCTOS DERIVADOS DE LA TESIS

1.- Presentación de Trabajo en Congresos.

- “Síntesis de zeolitas sílicoaluminofosfato (SAPO) con propiedades para ingeniería de tejido óseo”, presentado en el II Congreso Nacional de Ingeniería de Tejidos y Medicina Regenerativa, 7 de diciembre de 2021, Santiago, Chile.
- “Synthesis of nanosized silicoaluminophosphate (SAPO) zeolites with osteoinductive properties”. Resumen presentado en la 32° Conferencia Anual de la Sociedad Europea para Biomateriales (ESB 2022), Bordeaux, Francia.
- “Osteoinductive properties of SAPO zeolites and metal organic frameworks synthesized with lithium and calcium”, enviado la 33° Conferencia Anual de la Sociedad Europea para Biomateriales (ESB 2023), Davos, Suiza.

ÍNDICE

RESUMEN	1
ABSTRACT	¡Error! Marcador no definido.
1 INTRODUCCIÓN	5
2 MARCO TEÓRICO	6
2.1 Tratamientos actuales con injertos óseos	6
2.2 Nuevas Alternativas: Ingeniería de Tejidos (IT).....	9
2.3 Ingeniería de Tejidos y Nanotecnología.....	¡Error! Marcador no definido.
2.4 Alternativas sintéticas: Zeolitas.....	¡Error! Marcador no definido.
3 HIPÓTESIS	20
4 OBJETIVOS	21
4.1 Objetivo General	21
4.2 Objetivos Específicos	21
5 MATERIALES Y MÉTODOS	22
5.1 Síntesis de zeolitas SAPO.	22
5.1.1 Síntesis de zeolitas Me-SAPO-5	22
5.1.2 Síntesis de láminas Me-SAPO-34.....	¡Error! Marcador no definido.
5.2 Caracterización estructural y composicional de las zeolitas	25
5.3 Ensayo de bioactividad en fluido fisiológico simulado (SBF).....	26
5.4 Ensayo de liberación de iones	27
5.5 Ensayo de degradabilidad de zeolitas.....	27

5.6	Ensayo de adsorción de proteínas	¡Error! Marcador no definido.
5.7	Ensayo celulares	¡Error! Marcador no definido.
5.7.1	Ensayo de viabilidad celular	¡Error! Marcador no definido.
5.7.2	Ensayos de adhesión celular.....	¡Error! Marcador no definido.
5.8	Ensayos de diferenciación celular	30
5.9	Análisis estadístico	31
6	RESULTADOS	33
6.1	Síntesis y caracterización de zeolitas SAPO-5 y SAPO-34.	33
6.2	Ensayo de bioactividad en SBF.....	39
6.3	Ensayo de adsorción de proteínas	¡Error! Marcador no definido.
6.4	Ensayo de liberación de litio y calcio.....	¡Error! Marcador no definido.
6.5	Ensayo de degradabilidad de las zeolitas	¡Error! Marcador no definido.
6.6	Ensayo de viabilidad celular.....	¡Error! Marcador no definido.
6.7	Análisis de adhesión celular	¡Error! Marcador no definido.
6.8	Ensayos de diferenciación celular osteogénica	¡Error! Marcador no definido.
7	DISCUSIÓN.	52
7.1	Síntesis y caracterización estructural de zeolitas SAPO	52
7.2	Ensayo de bioactividad en SBF.....	53
7.3	Degradación de zeolitas y liberación de iones calcio y litio	54
7.4	Capacidad de Adsorción de proteínas	55

7.5	Viabilidad y adhesión celular	56
7.6	Inducción de la diferenciación celular.....	57
8	CONCLUSIONES	60
9	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	61

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Esquema de defectos óseos comunes en el territorio cráneomáxilofacial	5
Figura 2. Ejemplos de material particulado usado en reparación de defectos óseos	6
Figura 3. Esquema de los principios de la Ingeniería de Tejidos y su interrelación.....	9
Figura 4. Esquema de elementos dentro de la escala nanométrica ..;	Error! Marcador no definido.
Figura 5. Esquema de la estructura cristalina de una zeolita;	Error! Marcador no definido.
Figura 6. Tabla con los tipos de estructuras de zeolitas existentes	12
Figura 7. Esquema representativo de la estructura de una zeolita.	15
Figura 8. Esquema de la estructura 3D de zeolitas SAPO-34 (CHA) y SAPO-5 (AFI)..	16
Figura 9. Esquema de la secuencia de síntesis de SAPO-5 y SAPO-34.....	23
Figura 10. Esquema de patrones DRX y FTIR de SAPO-5 y SAPO-34	33
Figura 11. Imágenes SEM de zeolita SAPO sintetizadas en condiciones óptimas.....	34
Figura 12. Espectros EDX, contenidos en peso (%) y mapeo EDX	12
Figura 13. Área superficial BET de zeolitas SAPO e isothermas de adsorción	37-38
Figura 14. Análisis FTIR de las zeolitas sometidas al ensayo de SBF	39
Figura 15. SEM de pastillas de zeolitas SAPO-5 y SAPO-34 sumergidas en SBF	40
Figura 16. Capacidad de zeolitas SAPO de adsorber albúmina y fibrinógeno	42
Figura 17. Curvas de liberación de iones de litio y calcio en buffer TRIS;	Error! Marcador no definido.
Figura 18. Gráficos de degradabilidad de zeolitas SAPO en buffer TRIS.....	124
Figura 19. Ensayo MTS de células MC3T3 cultivadas con nanopartículas SAPO	45
Figura 20. Imágenes de microscopia de fluorescencia de células MC3T3	46

Figura 21. Gráfico de densidad celular en superficies de zeolitas SAPO; **Error! Marcador no definido.**

Figura 22. Imágenes SEM de MC3T3 sembradas sobre zeolita en medio con Hepes; **Error! Marcador no definido.**

Figura 23. Actividad de ALP de MC3T3 cultivadas sin suplementos osteogénicos; **Error! Marcador no definido.**

Figura 24. Actividad cualitativa de fosfatasa alcalina con reactivo NBT/BCIP.....50

Figura 25. Características osteoinductoras y aplicaciones de SAPO59

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Materiales de Injerto Óseo **Error! Marcador no definido.**

Tabla 2. Secuencia de síntesis de zeolitas Me-SAPO-5.. **Error! Marcador no definido.**

Tabla 3. Composiciones de síntesis estudiadas para la obtención SAPO-34..... **Error! Marcador no definido.**

Tabla 4. Reactivos y cantidades utilizadas en la preparación de SBF; **Error! Marcador no definido.**

Tabla 5. Composiciones óptimas para la síntesis de zeolitas SAPO-5 y SAPO-34.....32

Tabla 6. Dimensión nanométrica de las zeolita determinada mediante SEM.....35

Tabla 7. Contenidos de elementos en las zeolitas medidos mediante EDX..... ¡Error!

Marcador no definido.

RESUMEN

Introducción: La reparación de defectos óseos en el complejo maxilofacial es uno de los principales desafíos del quehacer odontológico. Para reparar estos defectos se utilizan autoinjertos, aloinjertos y xenoinjertos que poseen desventajas y limitaciones que, en algunos casos, impiden obtener resultados clínicos óptimos. En este contexto, la ingeniería de tejidos y la nanotecnología juegan un rol importante mediante la obtención de nuevos materiales sintéticos con propiedades avanzadas para la regeneración de tejido óseo. Las zeolitas son materiales nanoporosos que presentan varias propiedades ventajosas para su uso en biomedicina; sin embargo, su uso en regeneración ósea ha sido menos explorado. Los estudios reportados hasta ahora muestran que las zeolitas poseen propiedades osteoestimuladoras relativamente bajas. Sin embargo, debido al avance de la ciencia de nanomateriales existe la posibilidad de sintetizar zeolitas y modificar su estructura para desarrollar en ellas propiedades bioactivas para estimular los procesos involucrados en la regeneración de tejido óseo.

Objetivo: Evaluar las propiedades osteoinductoras de nanozeolitas silicoaluminofosfato sintetizadas con nanotopografía SAPO-5 y SAPO-34 modificadas con calcio o litio y con morfología nanolaminar.

Materiales y métodos: Para la síntesis de las nanozeolitas silicoaluminofosfato (SAPO) se utilizó un método hidrotermal, posteriormente las nanopartículas se caracterizaron mediante microscopía electrónica de barrido (SEM), análisis elemental cuantitativo y cualitativo (EDX), espectroscopía infrarroja de transformada de Fourier (FTIR) y difracción de rayos X (XRD). La capacidad de las nanozeolitas para formar apatita se evaluó mediante el ensayo en fluido fisiológico simulado (SBF). La capacidad de adsorción de proteínas de las zeolitas se determinó mediante el método colorimétrico BCA. Además, se evaluó las propiedades de liberación de iones de calcio y litio de las zeolitas, así como su biodegradabilidad a pH fisiológico. La citocompatibilidad se estudió mediante el ensayo de viabilidad MTS con células preosteoblásticas MC3T3, mientras que la adhesión celular mediante microscopía de fluorescencia y SEM. La capacidad para estimular la diferenciación osteogénica se evaluó midiendo la actividad de fosfatasa alcalina.

Resultados: Las partículas SAPO sintetizadas incorporaron cationes intra y extrared de litio y calcio en su estructura, presentaron dimensiones nanométricas (93,6 nm) y morfología laminar. Todas las zeolitas SAPO presentaron capacidad de inducir la formación de apatita en SBF, adsorber proteínas y liberar iones calcio y litio. Los ensayos *in vitro* mostraron que las zeolitas SAPO son citocompatibles y osteoinductoras.

Conclusiones: Las nanozeolitas SAPO son citocompatibles y osteoinductoras, en especial aquellas modificadas con cationes extrared. Las propiedades osteoinductoras de las nanopartículas de zeolita SAPO resultan de interés para estudios en el desarrollo de biomateriales óseos más avanzados que conduzcan a tratamientos de reconstrucción ósea maxilofacial más eficientes.

ABSTRACT

Introduction: Repairing bone defects in the maxillofacial complex is one of the main challenges of dental work. The height of the alveolar ridge can be affected by trauma, periodontitis, extractions, and implants. To repair these bone defects, autografts, allografts, and xenografts are very used; however, those have disadvantages and limitations that frequently prevent optimal clinical results. In this context, tissue engineering and nanotechnology play a role by obtaining new synthetic materials with advanced properties for bone regeneration. Zeolites are nanoporous materials with several properties for use in biomedicine. However, their use in bone regeneration has not been sufficiently explored yet. Studies reported so far show that zeolites have relatively low osteoinductive properties. Nowadays, due to the advancement of the nanomaterials science, it is possible to synthesize zeolites and modify their structure to develop bioactive properties and stimulate bone regeneration.

Objective: To evaluate the osteoinductive properties of silicon-aluminum-phosphate nanozeolites synthesized with SAPO-5 and SAPO-34 nano-topography modified with calcium or lithium and with nano-laminar morphology.

Materials and methods: For the synthesis of the silicon aluminum phosphate (SAPO) nanozeolites, a hydrothermal method was used. Then, the nanoparticles were characterized by scanning electron microscopy (SEM), quantitative and qualitative elemental analysis (EDX), infrared spectroscopy of Fourier (FTIR), and X-ray diffraction (XRD). The ability of nanozeolites to form apatite was evaluated by a simulated physiological fluid (SBF) assay. The protein adsorption capacity of the zeolites was determined by BCA colorimetric method. In addition, the calcium and lithium-ion release properties of the zeolites were evaluated, as well as their biodegradability at physiological pH. Their cytocompatibility was studied using the MTS viability assay with MC3T3 pre-osteoblastic cells, while cell adhesion was studied using fluorescence microscopy and SEM. The ability to stimulate osteogenic differentiation was assessed by measuring alkaline phosphatase activity.

Results: The synthesized SAPO particles incorporated intra- and extra-lattice lithium and calcium cations in their structure, presented nanometric dimensions (93.6 nm) and lamellar

morphology. All SAPO zeolites showed the ability to induce the apatite formation in SBF, adsorb proteins and release calcium and lithium ions. In vitro assays showed that SAPO zeolites are cytocompatible and osteoinductive.

Conclusions: SAPO nanozeolites are cytocompatible and osteoinductive, particularly those modified with extra-lattice cations. The osteoinductive properties of SAPO zeolite nanoparticles are of interest for studies involving the development of more advanced bone biomaterials that lead to more efficient maxillofacial bone reconstruction treatments.

1 INTRODUCCIÓN

Las lesiones de tejido óseo se encuentran entre las heridas más comunes del cuerpo humano, las cuales tienen un impacto significativo en la salud y estilo de vida de millones de personas en el mundo¹. La reparación de defectos óseos en el complejo craneomáxilofacial consecuentes a traumas, resorción ósea por pérdida dentaria o periodontitis, cáncer y enfermedades degenerativas como la osteoporosis, constituye uno de los principales desafíos clínicos en el campo odontológico².

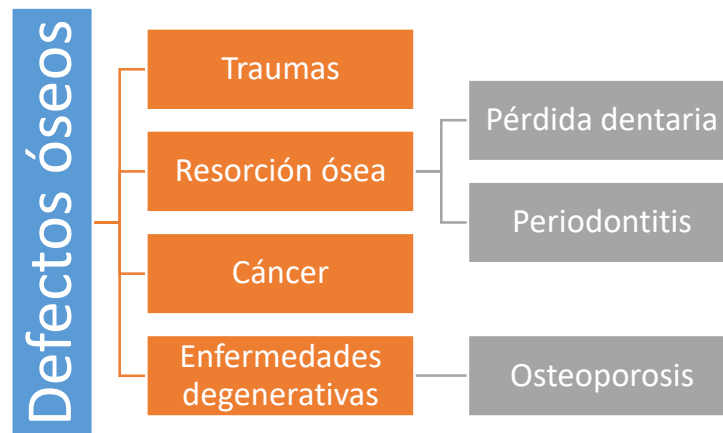


Figura 1. Esquema de defectos óseos comunes en el territorio cráneo-máxilofacial.

Después de una exodoncia, el alveolo cicatriza de forma natural, sin embargo, el hueso pierde el estímulo de reabsorción y reposición ósea debido a la ausencia de la articulación alveólodental, que es la que mantiene el equilibrio dinámico de este proceso de remodelación³. Este fenómeno, conocido como reabsorción del reborde residual está definido en la literatura como una enfermedad crónica, localizada y multifactorial⁴.

Gran parte de la población adulta padece enfermedad periodontal. Según estudios epidemiológicos realizados por el MINSAL, la enfermedad periodontal está presente en el 90% de la población adulta de nuestro país⁵. La periodontitis al ser una enfermedad inflamatoria crónica, provoca una pérdida importante de la altura y soporte óseo, y consecuente a esto, exposición radicular, aumento en la movilidad dentaria y posterior pérdida de las piezas⁶⁻⁹.

La conservación de la altura ósea después de una extracción dentaria tiene un impacto significativo en la funcionalidad y apreciación estética del paciente ante futuros tratamientos 10-12.

Para obtener resultados favorables en la regeneración y preservación de hueso alveolar, es imprescindible recurrir a terapias clínicas más eficaces, particularmente en aplicaciones quirúrgicas, implantológicas y periodontales. La respuesta ósea dependerá de la cantidad de hueso alveolar perdido, siendo plausible la autoregeneración cuando este volumen sea inferior al tamaño crítico. En pérdidas volumétricas superiores, como son 8 mm de diámetro y 15 mm de profundidad, el organismo no será capaz de reparar el defecto de manera autónoma y formará un tejido cicatricial, sin sus propiedades idóneas ^{13,14}. Es esta la razón por la cual actualmente existen tantos esfuerzos reconstructivos en esta área anatómica relativamente pequeña ^{15,16}.

2 MARCO TEÓRICO

2.1 Tratamientos actuales con injertos óseos

Durante los últimos años se ha ampliado la oferta de tratamientos y materiales para aquellos pacientes que requieren ayuda terapéutica en la recuperación del volumen y estructura ósea perdida. Entre las opciones de tratamiento están los autoinjertos (Gold Standard, tejido del mismo individuo), aloinjertos (tejido proveniente de un individuo de la misma especie), xenoinjertos (donador de otra especie) y materiales sintéticos ^{17,18}. La elección del injerto dependerá del tamaño del defecto a subsanar, la disponibilidad ósea, su costo y propiedades, entre otros ¹⁹.



Figura 2. Ejemplos de reparación de defectos óseos en huesos maxilares con material particulado.

Los injertos óseos cumplen una **función mecánica** y una **función biológica** en la zona a reparar. La función mecánica corresponde al soporte brindado frente a cargas. La función biológica promueve la generación, el crecimiento y la maduración de nuevos tejidos óseos. La importancia de cada una de sus funciones estará dada por el resultado clínico deseado ²⁰.

Además de las dos funciones mencionadas, un injerto óseo ideal debiese poseer tres propiedades que determinarán su mejor o peor desempeño e integración: ^{18,21}

- **Osteogénesis:** es la capacidad de las células osteoblásticas para producir un nuevo tejido óseo. Requiere la presencia células capaces de generar hueso. Es más eficaz en hueso esponjoso que en hueso corticalizado, debido a la rápida revascularización del primero.

- **Osteoinducción:** habilidad de un biomaterial u otro agente bioactivo para estimular el proceso de diferenciación de células madre mesenquimales hacia el linaje osteoblástico (condroblastos y osteoblastos). La diferenciación y el reclutamiento son modulados por factores de crecimiento derivados de la matriz del injerto, cuya actividad es estimulada al extraer el mineral óseo. Entre los factores de crecimiento se encuentran las proteínas morfogenéticas óseas 2, 4 y 7, factor de crecimiento derivado de las plaquetas, interleucinas, factor de crecimiento fibroblástico, factores de crecimiento pseudoinsulínico, factores estimuladores de las colonias de granulocitos y factores estimuladores de las colonias de macrófagos. También se liberan factores angiogénicos, como el factor de crecimiento vascular derivado del endotelio y la angiogenina. Esta fase comienza 2 semanas después de la cirugía y alcanza un máximo entre la sexta semana y los 6 meses.

- **Osteoconducción:** capacidad de un biomaterial para facilitar y guiar la formación del tejido óseo en su superficie, poros o canales. Es un proceso lento y prolongado en el que tiene lugar un crecimiento tridimensional de capilares, tejido perivascular y células madre mesenquimales, desde la zona receptora del huésped hacia el injerto. Este andamiaje permite absorción y formación de hueso nuevo mediante un patrón ya formado, determinado por la biología del injerto y el entorno biomecánico del mismo.

De los injertos disponibles en el mercado, el más utilizado es el autoinjerto, seguido por los aloinjertos, xenoinjertos y el uso de materiales sintéticos o aloplásticos ^{17,18}. Sin embargo, cabe señalar que la mayoría presenta limitaciones, como la cantidad de injerto disponible, riesgo de morbilidad post quirúrgica en la zona donadora y/o receptora (dolor, infección,

hemorragia, lesión neurológica), posible transmisión de virus y enfermedades, etc.^{19,22}. Con la finalidad de superar las desventajas de los injertos es que en las últimas décadas se han desarrollado materiales sintéticos con propiedades bioactivas.

Tabla 1. Materiales de Injerto Óseo. Tomado de Nasr et al. 1999103

MATERIALES DE INJERTO ÓSEO	
HUESO HUMANO	AUTOINJERTOS: <ul style="list-style-type: none"> • Intraoral • Extraoral
	ALOINJERTOS: <ul style="list-style-type: none"> • Hueso fresco congelado • Hueso liofilizado • Hueso liofilizado desmineralizado
SUSTITUTOS ÓSEOS	XENOINJERTOS: <ul style="list-style-type: none"> • Hidroxiapatita derivada de hueso bovino • Carbonato de calcio coralino
	INJERTOS ALOPLÁSTICOS: <ul style="list-style-type: none"> • Polímeros • Biocerámicas: fosfatos tricálcicos, hidroxiapatita • Vidrios Bioactivos

Las biocerámicas sintéticas son probablemente los materiales más exitosamente desarrollados para la reparación de tejido óseo²³⁻²⁵. Estos materiales incluyen a los fosfatos tricálcicos (TCP), fosfato de calcio amorfo (ACP), fosfato octacálcico (OCP) e hidroxiapatita (HA), sin embargo, la mayoría de los fosfatos de calcio/cerámicas sólo presentan propiedades osteoconductoras, pero generalmente no poseen propiedades osteoinductoras^{26,27}. Entre las biocerámicas, el vidrio bioactivo (BG) es el biomaterial que más destaca, exhibiendo propiedades osteoconductoras y osteoinductoras, ya que promueve químicamente la formación de apatita similar al hueso en contacto con fluidos fisiológicos, mientras que sus productos de disolución iónica inducen la diferenciación de las células madre en osteoblastos^{28,29}. Sin embargo, en el transcurso de las últimas décadas la literatura no reporta el desarrollo de nuevos materiales sintéticos osteoinductores, es decir, con capacidad de inducir la diferenciación celular a linaje osteogénico. Por lo señalado es de gran relevancia explorar el desarrollo de nuevos materiales con propiedades bioactivas avanzadas para la regeneración de tejido óseo.

2.2 Nuevas Alternativas: Ingeniería de Tejidos (IT)

Como alternativa a las terapias convencionales, actualmente se investigan nuevas alternativas basadas en ingeniería de tejidos (IT). La IT es un campo multidisciplinario que toma elementos de las ciencias de la ingeniería, ciencias biológicas y biomédicas. Dentro de sus objetivos se encuentra desarrollar tratamientos para la regeneración de los tejidos del cuerpo que no tienen capacidad regenerativa, controlando células con el potencial de proliferación y diferenciación ³⁰.

La ingeniería de tejidos involucra tres pilares de la medicina regenerativa (**Figura 3**), que son células madre indiferenciadas, materiales diseñados para sostener y guiar la aposición de tejido en las tres dimensiones del espacio (andamios), y factores bioactivos capaces de inducir fenómenos de diferenciación celular ³¹⁻³³.



Figura 3. Esquema de los principios de la Ingeniería de Tejidos y su interrelación.

El objetivo final de estos tres elementos interrelacionados es la formación de un constructo bioactivo que se integra al sitio con pérdida de tejido, que cumple con los tres atributos principales necesarios para la regeneración ósea: osteogénesis, osteoinducción y osteoconductividad ³⁴.

2.3 Ingeniería de Tejidos y Nanotecnología

La ingeniería de tejidos, en colaboración con la nanotecnología, ha generado avances en la búsqueda y síntesis de materiales que compartan características de propias del huésped para promover la regeneración tisular con resultados clínicos favorables, como la creación de partículas nanométricas con propiedades osteoinductoras mejoradas respecto a sus equivalentes de mayor escala, entre las que encontramos la hidroxiapatita nanométrica (nHA) y el vidrio bioactivo nanométrico (nBG).

La nanotecnología se define como “la creación de materiales, dispositivos y sistemas funcionales con al menos una dimensión en la escala nanométrica (1-100 nm), y explotación de nuevos fenómenos y propiedades (físicas, químicas y biológicas) a esa escala”³⁵.

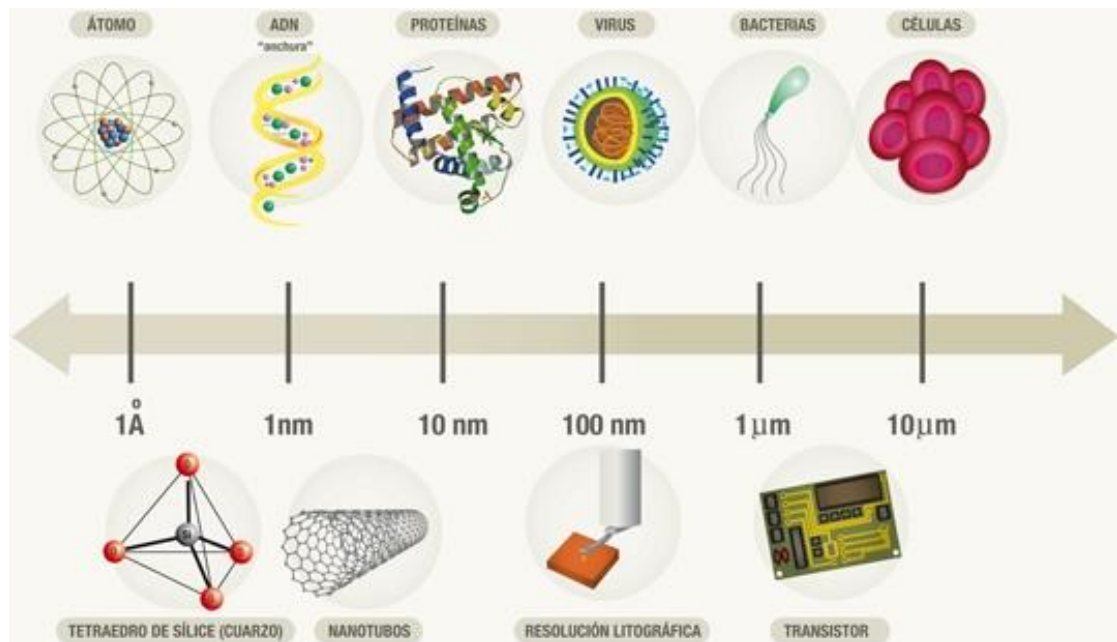
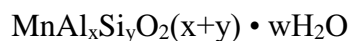


Figura 4. Se representan elementos dentro de la escala nanométrica. Imagen extraída de Químicas Tháí³⁶.

Los nanomateriales poseen propiedades únicas de superficie (topografía, química, humectabilidad y energía de superficie), debido a un incremento significativo en su área, rugosidad y energía superficial, lo que se evidencia en una mayor reactividad química, en comparación con materiales micrométricos ³⁷. Estas propiedades de superficie median la adsorción específica de proteínas y la bioactividad celular, dirigiendo su proliferación y diferenciación, la producción y organización de la matriz extracelular ³⁸. Estudios previos han demostrado que los materiales nanoestructurados pueden promover mayor cantidad de interacciones específicas de proteínas para estimular de manera eficaz el crecimiento de hueso nuevo, en comparación con los materiales convencionales. Todos estos mecanismos son clave para entender por qué los nanomateriales tendrían propiedades superiores al estimular la regeneración ósea ³⁹. En diversos estudios de nHA y nBG, se ha demostrado un mejor desempeño en sus propiedades bioactivas de reparación de tejido óseo, comparado con sus contrapartes a microescala. Esto se explica debido a que partículas más pequeñas se disuelven más rápido que las de mayor tamaño de la misma composición química, gracias a la exposición de una mayor área superficial al ambiente biológico y a un mayor número de defectos presentes en la estructura del material ^{40,41}. Es por esta razón que el diseño y/o modificación de estructuras a nivel nanométrico puede conducir a nuevos biomateriales con propiedades osteoestimuladoras avanzadas.

2.4 Alternativas sintéticas: Zeolitas

Las zeolitas son materiales cristalinos, nanoporosos, inorgánicos naturales o sintéticos ampliamente utilizados en áreas tan diversas como catalizador en la industria de refinación de petróleo y petroquímica, como adsorbente para la separación o remoción de gases y contaminantes ambientales, en la agricultura, alimentación, entre otros ⁴². El término zeolita viene del griego *zéo* (*hervir*) y *líthos* (piedra) que quiere decir “piedra que hierve”. Las zeolitas conforman una familia de minerales aluminosilicatos hidratados cristalinos que presentan micro cavidades dentro de sus cristales y que pueden ser representadas por la siguiente fórmula ^{43,44}:



donde:

- M, generalmente es un elemento del grupo I o II de la tabla periódica (metales alcalinos o alcalinotérreos), representa un catión intercambiable de valencia n.
- x es el número de Al (aluminio),
- y es el número de Si (silicio),
- w son moléculas de H₂O (agua).

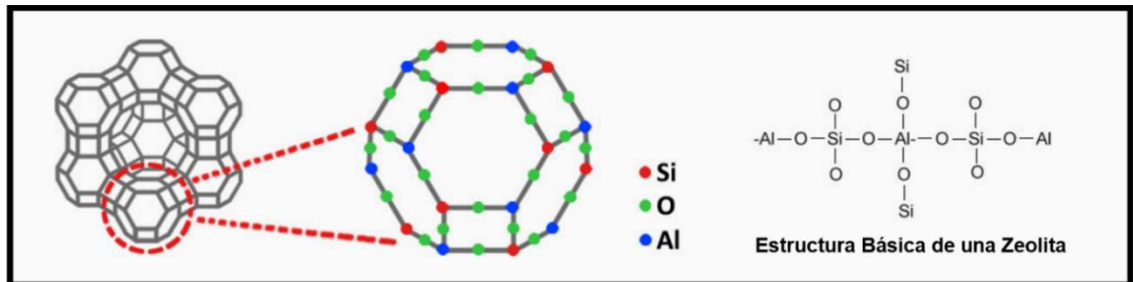


Figura 5. Representación esquemática de la estructura cristalina de una zeolita. Se muestra la estructura compuesta por poros y cavidades de dimensiones nanométricas y su composición química formada por una red de átomos de silicio-oxígeno-aluminio. Imagen obtenida de Rota Mining Corporation ⁴⁵.

Es la estructura química de la zeolita la que le otorga sus propiedades más relevantes que son porosidad, capacidad de adsorción e intercambio iónico.

- Porosidad:** Las zeolitas son formadas por canales y cavidades regulares y uniformes de dimensiones nano y sub-nanométrica (0,3 a 2 nm). Este tipo de estructura nanoporosa hace que las zeolitas presenten una elevada área superficial ⁴⁶.
- Adsorción:** Los canales centrales de entrada y las cavidades de las zeolitas se encuentran ocupados por moléculas de agua que forman esferas de hidratación alrededor de dos cationes cambiables. Si el agua es eliminada y las moléculas tienen diámetros seccionales suficientemente pequeños para que estas pasen a través de los canales de entrada, entonces son fácilmente adsorbidos en los canales deshidratados y cavidades centrales. Las moléculas demasiado grandes no pasan dentro de las cavidades centrales y se excluyen, dando origen a la propiedad de tamiz molecular ⁴⁴.

- c) **Intercambio iónico:** Se considera una propiedad intrínseca de estos materiales pues es el producto de la sustitución isomórfica de los átomos de silicio de su estructura cristalina por otros átomos. En el caso de las zeolitas esta sustitución ocurre por átomos tetravalentes de aluminio lo que produce una carga neta negativa en la estructura que se compensa por cationes extrared. Esto también es una manifestación de su naturaleza de estructura cristalina microporosa, pues las dimensiones de sus cavidades y de los cationes que se intercambian determinan el curso del proceso. Una alta capacidad de intercambio iónico corresponde a zeolitas con baja relación $\text{SiO}_2/\text{Al}_2\text{O}_3$ (óxido de silicio/óxido de aluminio) ⁴⁷.

Es por estas propiedades que en la actualidad las zeolitas son también sintetizadas, reconociéndose alrededor de 150 zeolitas sintéticas y 140 tipos de zeolitas naturales ⁴³. Las zeolitas de origen natural se utilizan en aplicaciones médicas como desintoxicante (Detoxsan®), antidiarreico (Enterex®), antimicrobiano (dopado con Zn o Ag), antioxidante e inmunoestimulante ^{48,49}. Las revisiones críticas de la evidencia científica concluyen que la zeolita puede considerarse segura para el consumo *in vivo* y es un material único con una variedad de efectos altamente positivos en la salud humana y animal, incluidos los efectos inmunomoduladores, antioxidantes y antimicrobianos ^{50,51}. Sin embargo, su uso como biomaterial de injerto o de reparación ósea se ha estudiado escasamente ⁵²⁻⁵⁴.

Los estudios relacionados con el uso directo de zeolita como biomaterial cerámico de reparación ósea no se encuentran en la literatura, aunque algunos trabajos reportados han explorado en el uso de zeolitas como relleno bioactivo para la elaboración de andamios nanocompuestos ^{55,56} y para mejorar la oseointegración del titanio. Bedi y cols., 2009, estudiaron la preparación de recubrimientos de zeolitas MFI (ZSM-5) altas en sílice para prevenir la corrosión superficial de implantes de titanio. La película de zeolita eliminó la liberación de iones citotóxicos del titanio y promovió la adhesión y proliferación de células madre, lo que confirma la citocompatibilidad del recubrimiento MFI ⁵³. Yan y su grupo de investigación, 2011, descubrieron que la superficie de titanio revestida con MFI/hidroxiapatita aumentaba la expresión del gen de la proteína morfogenética ósea (BMP-2) y de Runx-2 ⁵⁷. Li y cols., 2015, probaron *in vivo* la eficacia del recubrimiento MFI de

sílice pura aplicado sobre implantes de titanio, demostrando que el recubrimiento MFI mejora la osteointegración del implante en defectos femorales de conejo ⁵⁸.

Aunque la película de zeolita MFI aparece como material de recubrimiento promisorio para la mejora de la osteointegración de implantes de titanio, el uso de zeolitas como injerto o biomaterial de reparación ósea ha sido poco estudiado. Hao y cols., 2019, encontraron que las espumas de SiC recubiertas con zeolita ZSM-2 aumentan la adhesión, proliferación y diferenciación de los osteoblastos primarios⁵⁵. Wang y cols., 2018, usando andamios de titanio poroso impresos en 3D recubierto con zeolita-A modificada con estroncio, observó una mejor formación de apatita en el fluido corporal simulado (SBF) y mayor actividad de la fosfatasa alcalina (ALP) *in vitro*, y formación de hueso nuevo alrededor del implante⁵⁶.

A pesar de que hasta ahora solo se ha estudiado un número reducido de tipos de zeolitas en aplicaciones relacionadas con el tejido óseo, existen casi 300 tipos de estructuras de zeolitas, con diferentes propiedades químicas y físicas que dependen en gran medida de la forma y tamaño de sus poros, área superficial, química de la superficie, composición de la estructura, tamaño de cristal / partícula y cationes compensadores (Structure Commission of the International Zeolite Association, IZA, 2017) ⁵⁹.

ABW	ACO	AEI	AEL	AEN	AET	AFG	AFI	AFN	AFO	AFR	AFS	AFT	AFV	AFX
AFY	AHT	ANA	ANO	APC	APD	AST	ASV	ATN	ATO	ATS	ATT	ATV	AVE	AVL
AWO	AWW	BCT	BEC	BIK	BOF	BOG	BOZ	BPH	BRE	BSV	CAN	CAS	CDO	CFI
CGF	CGS	CHA	-CHI	-CLO	CON	CSV	CZP	DAC	DDR	DFO	DFT	DOH	DON	EAB
EDI	EEL	EMT	EON	EPI	ERI	ESV	ETL	ETR	ETV	EUO	EWO	EWS	-EWT	EZT
FAR	FAU	FER	FRA	GIS	GIU	GME	GON	GOO	HEU	IFO	IFR	-IFT	-IFU	IFW
IFY	IHW	IMF	IRN	IRR	-JRY	ISV	ITE	ITG	ITH	ITR	ITT	-ITV	ITW	IWR
IWS	IWW	IWW	JBW	JNT	JOZ	JRY	JSN	JSR	JST	JSW	KFI	LAU	LEV	LIO
-LIT	LOS	LOV	LTA	LTF	LTJ	LTL	LTN	MAR	MAZ	MEI	MEL	MEP	MER	MFI
MFS	MON	MOR	MOZ	MRT	MSE	MSO	MTF	MTN	MTT	MTW	MVY	MWF	MWW	NAB
NAT	NES	NON	NPO	NPT	NSI	OBW	OFF	OKO	OSI	OSO	OWE	-PAR	PAU	PCR
PHI	PON	POR	POS	PSI	PTO	PTT	PTY	PUN	PWN	PWO	PWW	RHO	-RON	RRO
RSN	RTE	RTH	RUT	RWR	RWY	SAF	SAO	SAS	SAT	SAV	SBE	SBN	SBS	SBT
SEW	SFE	SFF	SFG	SFH	SFN	SFO	SFS	SFW	SGT	SIV	SOD	SOF	SOR	SOS
SOV	SSF	-SSO	SSY	STF	STI	STT	STW	-SVR	SVV	SWY	-SYT	SZR	TER	THO
TOL	TON	TSC	TUN	UEI	UFI	UOS	UOV	UOZ	USI	UTL	UWY	VET	VFI	VNI
VSV	WEI	-WEN	YFI	YUG	ZON									

Figura 6. Tabla con los tipos de estructuras de zeolitas conocidos hasta la fecha. Las diferentes estructuras cristalinas que existen de zeolita se designan con un código de tres letras. Estas estructuras pueden corresponder a zeolitas de origen natural o sintético. Imagen obtenida del Atlas of Zeolite Framework Types ⁵⁹.

El diseño racional de nuevos biomateriales óseos basados en zeolitas debe llevarse a cabo cuidadosamente considerando las variables que influyen en los mecanismos de regeneración del tejido óseo. En el caso de los biomateriales cerámicos, la reparación ósea puede estimularse a través de varias vías (químicas, biológicas y físicas) involucradas en el proceso de regeneración de tejidos. La capacidad de un material para promover la formación de hidroxiapatita similar al hueso en contacto con los fluidos fisiológicos es el primer mecanismo por el cual actúan los vidrios bioactivos (BG) y otras biocerámicas ⁶⁰. Este mecanismo acelular implica reacciones de disolución e intercambio iónico en la superficie del vidrio, pérdida de especies de sílice soluble, formación de una capa rica en SiO₂, precipitación de iones Ca²⁺ y PO₄³⁻ para formar un fosfato de calcio amorfo, que se transforma en una fase de apatita más estable termodinámicamente ^{61,62}. La capacidad de algunos materiales a base de sílice para producir este tipo de reacciones químicas fisiológicas depende principalmente de su reactividad superficial, composición química, solubilidad, área superficial y porosidad. Las zeolitas tradicionales son aluminosilicatos cristalinos (SiAl) (M₂/nO · Al₂O₃ · ySiO₂ · wH₂O) con una carga negativa equilibrada por cationes no estructurales (M). La ausencia de iones Ca²⁺ y PO₄³⁻ en la estructura de las zeolitas tradicionales es una limitante para facilitar la formación acelular de hidroxiapatita (Ca₁₀(PO₄)₆(OH)₂). Sin embargo, las zeolitas de alúminofosfato (AlPO₄) (xR · Al₂O₃ · 1.0 ± 0.2 P₂O₅ · yH₂O) pueden sintetizarse por ensamblaje cooperativo entre un fosfato inorgánico y un agente director de estructura orgánico (SDA) ⁶³.

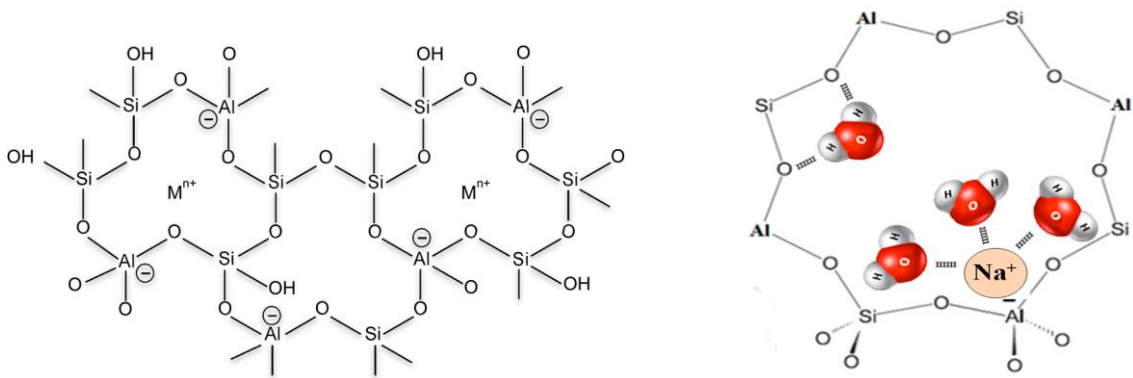


Figura 7. Representación gráfica de la estructura de una zeolita. Se puede observar que la carga negativa de las zeolitas se estabiliza con la presencia de cationes al interior de sus poros.

En las zeolitas de AlPO_4 , cada tetraedro de AlO_4 cargado negativamente se equilibra con un tetraedro de PO_4 cargado positivamente. Otras variantes incluyen las estructuras de zeolita de sílicoaluminofosfato (SAPO) en las que el Si sustituye algo de P en la estructura de AlPO_4 ; cada Si añadido necesita un catión no estructural (M) para equilibrar la carga en la estructura ⁶⁴. Por lo tanto, la presencia de PO_4 en la estructura de las zeolitas SAPO, junto con una estructura rica en sílice que contiene grupos hidroxilo de superficie, los convierte en materiales candidatos para exhibir la **capacidad de formar apatita** en contacto con fluidos fisiológicos. Un segundo mecanismo que podría presentar una zeolita para estimular la regeneración del tejido óseo es la activación de vías genéticas relacionadas con el proceso de **diferenciación celular osteogénica**. El silicio (Si) es un elemento importante que aumenta la regulación de varios genes implicados en la diferenciación de células madre a células del linaje osteogénico ^{29,65}. Concentraciones específicas de Si soluble recrean un ambiente extracelular que permite la expresión fenotípica de osteoblastos y la mineralización ósea. En contraste con las zeolitas SiAl y AlPO_4 altamente estables, las zeolitas SAPO han demostrado tener una menor estabilidad química ⁶⁶, lo que facilitaría la liberación de las especies iónicas bioactivas. La disolución del material se produce debido a la hidrólisis del enlace -Si-O-Al- y -Si-O-P- . Una tercera característica de las zeolitas SAPO es la posibilidad de ser modificadas con **cationes metálicos bioactivos**.

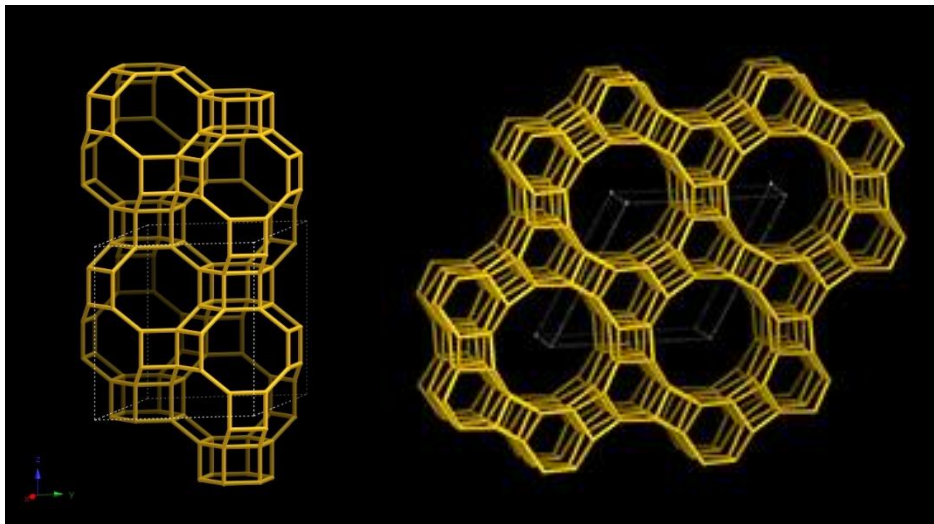


Figura 8. Estructura tridimensional de zeolita SAPO-34 (CHA); estructura 3D de zeolita SAPO-5 (AFI). Se observa que SAPO-34 tiene forma cúbica (izquierda), mientras que SAPO-5 tiene forma hexagonal (derecha).

La zeolita Ca-SAPO con iones Ca^{2+} en sitios no estructurales o extrared, podría prepararse mediante intercambio iónico a partir de la forma H-SAPO, e incluso metales podrían incorporarse al interior de la estructura SAPO (intrared) sintetizando las denominadas zeolitas MeSAPO ⁶⁷. En este tipo de zeolitas Al, P o Si experimentan una sustitución isomórfica por cationes mono y bivalentes (Mg, Co, Zn, Li o Be) que se incorporan como óxidos tetraédricos de estructura. Por tanto, podrían producirse zeolitas SAPO que contengan cationes relacionados con la osteogénesis. El litio es un elemento con propiedades para estimular los mecanismos celulares de formación de tejido óseo. La aplicación local de litio mejora la consolidación ósea aumentando la densidad mineral ósea o acelerando el proceso de formación ósea ⁶⁸. Se ha reportado que los iones Li^+ liberados de las nanopartículas de carbonato de litio aumentan la actividad ALP ⁶⁹, que es un marcador importante del proceso de diferenciación osteogénica que se produce cuando las células formadoras de hueso depositan la matriz extracelular ósea. Por tanto, las zeolitas SAPO que contienen Si, con Li o Ca incorporados como cationes compensadores (Me-SAPO) o estructurales (MeSAPO) podrían ser materiales avanzados potencialmente osteoinductores. Además de la influencia de las propiedades químicas de las zeolitas, sus propiedades físicas, como la nanoporosidad, el área superficial y el tamaño/morfología de los cristales, también se pueden aprovechar para producir osteoinducción. Los tipos de estructura de zeolita se caracterizan por una disposición de canales y cavidades (topología) con aberturas de poros de tamaño y forma definidos. La alta área superficial generada por topografías porosas favorece el proceso de adhesión celular sobre el biomaterial. Las células se adhieren al sustrato utilizando el complejo de integrina transmembrana (adhesión focal) a las proteínas de la matriz extracelular (MEC) adsorbidas en el biomaterial ⁷⁰. Este proceso, llamado mecanotransducción, ocurre cuando las células convierten un estímulo mecánico de **la nanoarquitectura** del material en una respuesta química. Cualquier cambio físico en el entorno celular influye en las fuerzas generadas por el citoesqueleto que se transfieren directamente al núcleo. La evidencia indica que las señales mecánicas de las superficies nanoestructuradas pueden transmitirse vía integrinas a través del citoesqueleto hasta el núcleo, afectando la expresión de factores de transcripción relacionados con los huesos ^{71,72}. Así, la arquitectura nanoporosa de las zeolitas puede ser también un factor que favorezca fuertemente el desarrollo de propiedades osteoinductoras a través de un proceso mediado por mecanotransducción. En el caso de las zeolitas SAPO, existen más de 16 estructuras

nano/subnanoporosas que incluyen SAPO-34 con aberturas porosas de anillos de 8 miembros (CHA, 0,4 - 0,43 nm), SAPO-37 con anillos de 12 miembros (FAU, 0,74 nm) y SAPO-5 (AFI, 0,73 nm) o Si-VPI-5 con poros grandes de 18 miembros por anillo (VFI, 1,25 nm) ⁷³. De esta forma, la evaluación de zeolitas con diferente nanotopografía (SAPO-34 y SAPO-5) podría producir una respuesta celular diferente en términos de adhesión, proliferación y diferenciación osteogénica. El **tamaño y la forma de los cristales** de zeolita también es un factor que afecta la bioactividad del material. Se ha demostrado que el BG con un tamaño de partícula nanométrico exhibe propiedades regenerativas óseas superiores al micro-BG ⁷⁴. Los cristales más pequeños se disuelven con mayor facilidad y rapidez que los más grandes, lo que aumenta la producción de productos iónicos bioactivos y, en consecuencia, acelera el proceso de regeneración tisular. Aunque las zeolitas tradicionales tienen un tamaño de partícula micrométrico, el control cuidadoso de las condiciones de síntesis facilita la formación de cristales de zeolita nanométricos (<100 nm), como las nanopartículas de zeolita ZSM-2 ⁷⁵⁻⁷⁷. Otra estrategia para producir zeolitas con tamaño de partícula nanodimensional es la preparación de nanoláminas de zeolitas, que exhiben una estructura nanoporosa en 2D. Aunque la preparación de las nanoláminas SAPO-5 y SAPO-34 ha sido estudiada en aplicaciones catalíticas ⁷⁸⁻⁸⁰, la obtención de nanoláminas Me-SAPO-5 o Me-SAPO-34 que contengan metales en su estructura no ha sido reportada hasta ahora. La importancia de estudiar partículas de zeolita Me-SAPO con morfología nanolaminar es que estas nanopartículas con propiedades osteoinductoras serán incorporadas en futuros trabajos en matrices poliméricas para la elaboración de andamios de ingeniería de tejidos utilizando impresión 3D. La morfología laminar de las nanozeolitas favorecerá su dispersión e interacción interfacial con el polímero, debido a la mayor razón de aspecto (superficie/volumen) o área superficial de la partícula ⁴⁶. De este modo, la síntesis de nanoláminas de zeolita SAPO-5 y SAPO-34 modificadas con cationes bioactivos como calcio y litio permitiría producir nanopartículas con diferentes propiedades osteoinductoras, producto de su distinta composición química, nanotopografía, tamaño y morfología de las partículas, factores que influyen y modulan la respuesta celular.

Teniendo en cuenta la evidencia científica y los antecedentes expuestos, en este trabajo de tesis se propone estudiar la síntesis de zeolitas osteoinductoras, preparando nanozeolitas sílicoaluminofosfato (SAPO) con nanotopografías SAPO-34 (anillos de 12 átomos y poros

de 0,73 nm) y SAPO-5 (anillos de 8 átomos y poros de 0,43 nm), utilizando composiciones modificadas con los elementos calcio y litio, y con morfología de partícula nanolaminar.

3 HIPÓTESIS

3 Hipótesis

La síntesis de zeolitas sílicoaluminofosfato con nanotopografía SAPO-5 o SAPO-34, modificadas con calcio o litio y con morfología nanolaminar permite producir zeolitas con propiedades osteoinductoras *in vitro*.

4 OBJETIVOS

4.1. Objetivo General

Evaluar las propiedades osteoinductoras de nanozeolitas silicoaluminofosfato sintetizadas con nanotopografía SAPO-5 y SAPO-34, modificadas con calcio o litio y con morfología nanolaminar.

4.2. Objetivos Específicos

1. Sintetizar y caracterizar nanozeolitas silicoaluminofosfato con diferente nanotopografía, modificadas con calcio o litio y con morfología nanolaminar.
2. Evaluar la bioactividad *in vitro* de las nanozeolitas mediante el ensayo en fluido fisiológico simulado (SBF).
3. Evaluar la citocompatibilidad de nanozeolitas con células preosteoblástica MC3T3.
4. Evaluar la capacidad de nanozeolitas para inducir la diferenciación osteogénica de células preosteoblástica MC3T3.

5 MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Síntesis de zeolitas SAPO.

5.1.1 Síntesis de zeolitas Me-SAPO-5.

La síntesis de zeolitas SAPO-5 con un metal (Me) intrared (Me-SAPO-5) se realizó mediante el método hidrotermal, utilizando trietanolamina (TEA) como agente orgánico director de estructura y utilizando acetato de litio ($\text{Li}(\text{CH}_3\text{COO})$, MW:158,17g/mol, SIGMA) y acetato de calcio ($\text{Ca}(\text{CH}_3\text{COO})_2$, MW:65,99g/mol, SIGMA) como precursores del metal (Me). Con el propósito de obtener la estructura cristalina y tamaño nanométrico deseado para la zeolita Me-SAPO-5, se estudiaron las siguientes condiciones de síntesis:

Tabla 2. Secuencia de síntesis de zeolitas Me-SAPO-5.

Síntesis	Zeolita	Composición	Tiempo	Temperatura
S1	Me-SAPO-5	0,5 Al_2O_3 :1,0 P_2O_5 :0,5 SiO_2 :1,5 TEA:50 H_2O :0,04 MeOx	24 h	200 °C
S2	Me-SAPO-5	0,5 Al_2O_3 :1,0 P_2O_5 :0,5 SiO_2 :1,5 TEA:50 H_2O :0,04 MeOx	48 h	200 °C
S3	Me-SAPO-5	1,0 Al_2O_3 :1,0 P_2O_5 :0,4 SiO_2 :1,2 TEA:60 H_2O :0,009 MeOx	24 h	200 °C

Para una síntesis típica de Me-SAPO-5 se diluyó ácido fosfórico concentrado H_3PO_4 (85% SUPELCO) en agua destilada. Seguidamente, se disolvió el isopropóxido de aluminio ($\text{Al}[\text{OCH}(\text{CH}_3)_2]_3$, MW: 204,24 g/mol, SIGMA) en el ácido diluido, y luego se disolvió la masa correspondiente de la sal del metal. A continuación, se añadió 1,96 mL de LUDOX AS-40 (MW: 60,08 g/mol, suspensión de SiO_2 40% en agua, ALDRICH), y seguidamente 7 mL de TEA (MW: 101,19 g/mol, trietanolamina $\text{C}_6\text{H}_{15}\text{NO}_3$ SIGMA-ALDRICH). La mezcla final se agitó durante 60 minutos (agitación magnética) a temperatura ambiente antes de transferirse a reactores autoclaves de acero inoxidable con vaso de teflón de 100 mL, para luego ser sometido un período hidrotermal a 200 °C durante 24 h o 48 h en una estufa (LEF-103S-1, Dahian LabTech Co. Ltd.). Una vez completado el periodo hidrotermal, el producto sólido de síntesis se separó del líquido y se purificó mediante 6 ciclos de lavados-redispersión con agua destilada mediante centrifugado a 12.000 rpm por 20 minutos. Completado el lavado, el contenido sólido de cada tubo de centrífuga se traspasó a una cápsula de porcelana y secado en una estufa a 80 °C por 12 horas. Las muestras secas fueron luego calcinadas a 550 °C por 6 horas usando una velocidad de calentamiento de 10 °C/min en una mufla marca LabTech. De esta forma se obtuvieron las zeolitas Ca-SAPO-5 y Li-SAPO-5.



Figura 9. Esquema de la secuencia de síntesis de ambas zeolitas estudiadas, SAPO-5 y SAPO-34.

Este mismo procedimiento de síntesis se utilizó para preparar zeolita SAPO-5 (zeolita control, sin metal intrared) excepto que no se agregó la sal del metal correspondiente. Por otra parte, la zeolita óptima de SAPO-5 también se preparó con los cationes metálicos extrared en su superficie. Para este propósito, en un matraz Erlenmeyer se contactó 1 gr de zeolita con 100 mL de solución de concentración 0,1 M de ion calcio o litio bajo agitación magnética por 24 h a temperatura ambiente. Completado el tiempo, las zeolitas fueron lavadas con agua destilada y purificadas mediante 6 ciclos de centrifugado-redispersión. Las partículas obtenidas fueron secadas a 80 °C por 12 h en una estufa marca Memmert. De esta manera se obtuvieron las zeolitas Ca/Ca-SAPO-5 y Li/Li-SAPO-5.

5.1.2 Síntesis de láminas Me-SAPO-34.

Para sintetizar Me-SAPO-34 se utilizó un método hidrotermal similar al descrito anteriormente. La composición de la mezcla de síntesis Me-SAPO-34 fue la siguiente: 1,3 Al₂O₃ : 0,4 SiO₂ : 1,3 P₂O₅ : 1,3 TEAOH : 90 H₂O : 0,0466 MeOx. En la **Tabla 3** se detallan las diferentes composiciones de síntesis estudiadas para obtener para la obtención de zeolitas SAPO-34, en S6 se obtuvo el material con las características adecuadas.

Se diluyó 3,6 mL de ácido fosfórico concentrado H₃PO₄ en 25 mL de agua destilada. Posteriormente se incorporó 10,9 g de isopropóxido de aluminio C₉H₂₁AlO₃ y se agregó respectivo metal, 0,154 g de Ca(CH₃CO₂)₂, o 0,049 g de Li(CH₃CO₂). Luego se añadió 0,92 mL de LUDOX AS-40, y finalmente 11 mL del precursor, en el caso de las zeolitas SAPO-34, TEAOH (MW: 147,26 g/mol, hidróxido de tetraetilamonio C₈H₂₁NO SIGMA-ALDRICH). La mezcla final se agitó durante 60 minutos (agitación magnética) y se transfirió a un reactor hidrotermal a 200 °C durante 24 h. El producto obtenido se centrifugó en 6 ciclos de lavados-redispersión con agua destilada a 12.000 rpm durante 20 minutos, se secó en estufa a 80° C por 12 horas, y finalmente se calcinó a 550 °C por 6 horas usando una velocidad de calentamiento de 10 °C/min en una mufla marca LabTech.

Tabla 3. Composiciones de síntesis estudiadas para la obtención de zeolitas SAPO-34.

Síntesis	Zeolita	Composición	Tiempo	Temperatura
S1	Me-SAPO-34	1,0Al ₂ O ₃ :1,15 P ₂ O ₅ :0,55 SiO ₂ :2,0 TEAOH:110 H ₂ O:0,007MeOx	24 h	200 °C
S2	Me-SAPO-34	1,0Al ₂ O ₃ :1,15 P ₂ O ₅ :0,55 SiO ₂ :2,0 TEAOH:110H ₂ O:0,007 MeOx	48 h	200 °C
S3	Me-SAPO-34	0,5Al ₂ O ₃ :1,2 P ₂ O ₅ :1,0 SiO ₂ :1,5 TEAOH:50 H ₂ O:0,009 MeOx	24 h	200 °C
S4	Me-SAPO-34	0,64Al ₂ O ₃ :0,6 P ₂ O ₅ :0,19 SiO ₂ :0,64TEAOH:45H ₂ O:0,0235 MeOx	24 h	200 °C
S5	Me-SAPO-34	0,64Al ₂ O ₃ :0,6 P ₂ O ₅ :0,19SiO ₂ :0,64TEAOH:45H ₂ O:0,0235 MeOx	120 h	200 °C
S6	Me-SAPO-34	1,0Al ₂ O ₃ :1,0 P ₂ O ₅ :0,4 SiO ₂ :1,2 TEAOH:60 H ₂ O:0,009 MeOx	24 h	200 °C

5.2 Caracterización estructural y composicional de las zeolitas.

Para la identificación de las zeolitas tipo SAPO-5 y SAPO-34 en los productos de síntesis se utilizó el análisis de difracción de rayos-X (DRX). La DRX permitió identificar la estructura cristalina de la zeolita, esto es la topología (SAPO-34 o SAPO-5) a la cual pertenece y que también determina su tamaño de nanoporo.

La estructura química de las zeolitas se analizó mediante espectroscopía infrarroja transformada de Fourier (FTIR) en el rango 400 cm^{-1} a 4000 cm^{-1} utilizando un espectrofotómetro infrarrojo marca Agilent, modelo Cary 630.

El tamaño y la morfología de las partículas de las zeolitas se analizaron mediante microscopía electrónica de barrido (SEM) en un microscopio JEOL JSM-IT 300 LV. Para este propósito, las partículas de zeolita fueron dispersadas en una solución de etanol al 70%, y sonicadas durante 30 min. Desde la parte superior de la solución se tomó una gota y se depositó sobre la cinta de carbono del portamuestra hasta la evaporación del alcohol. Posteriormente las muestras fueron metalizadas con una capa de oro de 5 nm en un equipo Denton Vacuum desk V. Para analizar la composición química de las zeolitas, se utilizó análisis elemental mediante espectroscopía de dispersión de rayos – X (EDX) acoplada al mismo microscopio SEM. En este caso se analizaron especialmente los contenidos de silicio (Si), aluminio (Al), fósforo (P) y calcio (Ca). El litio no es detectable mediante esta técnica debido a la baja energía de los rayos X K del átomo ($Z=3$). La detección y medición de litio en las partículas se realizó posteriormente mediante fotometría de llama. Los valores de la concentración de cada elemento se informaron como un promedio de cinco mediciones realizadas en la superficie de la muestra.

El área superficial de las zeolitas se determinó mediante sortometría de N_2 a 77 K en un equipo Quantachrome ASiQwin 5.0. A partir de las isothermas de adsorción de N_2 el equipo determinó el área superficial BET de cada zeolita.

5.3 Ensayo de bioactividad en fluido fisiológico simulado (SBF)

La capacidad de las zeolitas para inducir la formación de apatita similar al hueso se evaluó mediante el ensayo de bioactividad en fluido fisiológico simulado (SBF), que tiene concentraciones de iones inorgánicos similares a las del fluido extracelular humano. La solución de SBF se preparó como se describe por Kokubo et al.⁶⁰ utilizando la composición de iones estándar (Na^+ 142,0; K^+ 5,0; Ca^{2+} 2,5; Mg^{2+} 1,5; Cl^- 148,0; HCO_3^- 4,2; HPO_4^{2-} 1,0, SO_4^{2-} 0,5 mM) y pH 7,4. Las zeolitas en polvo se prensaron en una prensa hidráulica marca PIKE, modelo CrushIR™, hasta lograr una presión de 9 toneladas para producir pastillas circulares (9 mm de diámetro por 2 mm de espesor). Estas pastillas fueron inmersas en 50 mL de SBF en recipientes de polietileno e incubadas a 36,5 °C utilizando un baño termostático de agua con agitación horizontal. Después de 3, 7 y 14 días de incubación, las pastillas de zeolita se removieron del SBF, se lavaron con agua destilada y se secaron a 60 °C. La formación de la fase de apatita en las superficies del material se analizó mediante FTIR y SEM / EDX.

Tabla 4. Reactivos y sus respectivas cantidades utilizados en la preparación de SBF.

Reactivo	SBF para 500 mL
Agua destilada	450 mL
NaCl	3,998 g
NaHCO ₃	0,175 g
KCl	0,112 g
K ₂ HPO ₄ x 3H ₂ O	0,114 g
MgCl ₂ x 6H ₂ O	0,153 g
HCl 1M	18 mL
CaCl	0,139 g
Na ₂ SO ₄	0,036 g
(CH ₂ OH) ₃ CNH ₂ (Buffer TRIS)	3,028 g
HCl para ajustar pH 7,4	-----

5.4 Ensayo de liberación de iones.

Los ensayos de liberación de iones de litio y calcio de las zeolitas se realizaron en PBS durante 1, 3, 5, 7, 10 y 14 días a 37°C. Para ello se incubaron 0,1 y 0,05 g de zeolitas modificadas con catión litio y calcio, respectivamente, con 10 mL de PBS en viales de vidrio de 20 ml bajo agitación magnética. Completado cada periodo de tiempo, la mezcla se dejaba decantar por 30 minutos para luego analizar la concentración de litio y calcio en el sobrenadante. Las mediciones de litio se realizaron en un fotómetro de llama (Jenway PFP7), cuyo límite de detección para el litio es $\leq 0,25$ ppm. El análisis mediante esta técnica se basa en la medida de la emisión espontánea de radiación electromagnética emitida por un elemento previamente excitado con el calor de una llama. Cada elemento emite una radiación con una longitud de onda específica para el mismo (670 nm en el caso del litio), lo cual proporciona información cualitativa de la presencia del elemento en la solución. La intensidad de la radiación es proporcional a la concentración del elemento en la muestra. Para medir la concentración de calcio en la solución se utilizó un electrodo selectivo de ion calcio (Cole-Parmer® Cat. No. 27504-06), previamente calibrado con las soluciones estándares correspondientes. Un electrodo selectivo de iones (ISE por sus siglas en inglés), es un sensor que convierte la actividad de un ion específico disuelto en una solución en un potencial eléctrico, el que puede ser medido con un voltímetro.

5.5 Ensayo de degradabilidad de zeolitas.

El grado de degradabilidad de las zeolitas se evaluó mediante mediciones de pérdida de masa en medio tamponado TRIS pH 7,4 en 4 tiempos, a los 3, 7, 14 y 28 días de inmersión. Para esto, se masaron 0,1 g de las zeolitas sintetizadas, los que se vertieron en tubos Falcon® con 10 mL de medio tamponado TRIS. Posteriormente, los tubos se dejaron en incubación en estufa a 37°C hasta completar los respectivos tiempos de medición.

5.6. Ensayo de adsorción de proteínas.

La capacidad de adsorción de proteínas de las zeolitas se determinó utilizando albúmina (seroalbúmina bovina, Thermo Scientific™) y fibrinógeno (plasma humano empobrecido en plasminógeno, Merck). Para ello se contactaron 10 mL de solución de proteína con una

concentración de 200 mg/L con 100 mg de zeolita en viales de vidrio y se mantuvieron durante 24 h en agitación en un baño termostatzado a 37 °C. Transcurrido este periodo, las soluciones fueron traspasadas a tubos Falcon de 15 mL y centrifugadas durante 15 min a 2600 rpm en una Centrífuga Heraeus™ Labofuge™ 200. En el sobrenadante obtenido se determinó la concentración final de proteínas mediante el método colorimétrico BCA (ácido bicinconínico) con el kit de ensayo de proteínas BCA Pierce™. De cada solución se obtuvo una alícuota de 100 uL que se sembró en placas de lectura de 96 pocillos y se mezcló por partes iguales con el reactivo. Posteriormente, la placa de lectura fue incubada a 60°C durante 1 h, según instrucciones de fabricante y finalmente se realizó la lectura de un lector de placa Elisa. La capacidad de adsorción de proteína de cada zeolita se determinó mediante la siguiente expresión:

$$Capac. Ads. \left(\frac{mg}{g} \right) = \frac{Cantidad\ prote\acute{a}na\ (mg)_{(inicial)} - Cantidad\ prote\acute{a}na\ (mg)_{(final)}}{masa\ zeolita\ (g)}$$

5.7. Ensayos celulares.

Para evaluar la respuesta celular (viabilidad, adhesión y diferenciación) sobre las zeolitas sintetizadas, se utilizó la línea celular preosteoblástica murina MC3T3, ampliamente probada como célula modelo en estudios de diferenciación osteogénica^{81,82}. Como medio de cultivo se utilizó α -MEM (Sigma-Aldrich Corp., St Louis, MO, USA) suplementado con suero fetal bovino (FBS) al 10%, antibióticos penicilina, estreptomycin y anfotericina.

5.7.1. Ensayo de viabilidad celular.

Para los experimentos se utilizó una concentración de partículas de zeolita de 250 μ g/mL en medio de cultivo tamponado con HEPES. Para ello se preparó una suspensión inicial de partículas de zeolita de concentración 1750 μ g/mL, dispersando ~0,0018 g de zeolita previamente tratada con luz UV en 1 mL de medio de cultivo. Seguidamente la suspensión fue tratada en un baño de ultrasonido por 45 minutos para su dispersión.

La viabilidad de las células MC3T3 se evaluó en presencia de cada tipo de zeolita luego de 3, 7 y 14 días de incubación, utilizando 25×10^3 células por pocillo en placas de 48 pocillos. En cada pocillo se incubaron típicamente 100 μL de suspensión de zeolita de concentración 1750 $\mu\text{g/mL}$ (produce una concentración final de 250 $\mu\text{g/mL}$), 100 μL de la suspensión de células en el medio de cultivo y 100 μL de buffer HEPES 70 mM. Como control positivo se incubaron células sin zeolita y como control negativo se incubaron células con una concentración de 2000 ppm de iones de plomo provenientes de la sal utilizada (nitrato de plomo).

Completado cada periodo de incubación, se midió la viabilidad celular utilizando el ensayo de reducción de la sal de tetrazolio (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4sulfofenil)-2H-tetrazolio) MTS (CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay, Promega) de acuerdo con el protocolo proporcionado por el fabricante ⁸³. Luego de 2 horas de aplicado el reactivo MTS, se midió la absorbancia a 492 nm en un lector de placa para test de Elisa. La absorbancia observada corresponde al producto de reducción de MTS (formazán) por las deshidrogenasas mitocondriales de las células viables presentes en el cultivo. Se consideró como unidad muestral independiente cada incubación realizada de las células con las partículas de zeolita. Estos ensayos se realizaron mediante tres réplicas biológicas con tres réplicas técnicas cada una. Los valores se informan como el promedio \pm desviación estándar del número de réplicas biológicas $n=3$.

5.7.2 Ensayos de adhesión celular.

La adhesión celular se evaluó mediante microscopia de fluorescencia y microscopía electrónica de barrido (SEM) luego de incubar con las zeolitas por 48 horas.

La morfología de las células adheridas sobre las nanozeolitas se analizó utilizando microscopía de fluorescencia. Con el propósito de analizar el citoesqueleto celular, las células adheridas sobre las nanozeolitas SAPO fueron fijadas en paraformaldehído (PFA) al 4% en PBS durante 20 min a temperatura ambiente, luego se realizaron 3 lavados de 5 minutos de duración con PBS. Para la permeabilización y bloqueo celular se preparó una solución de NDS (suero normal de burro) al 10% en PBS-tritón al 0.2%, con la cual las células fueron incubadas durante 30 minutos a temperatura ambiente. Para la tinción celular se prepararon soluciones de tinción DAPI diluida en una proporción 1:2000 en NDS al 1% en PBS, y

faloidina en dilución 1:400 con el mismo diluyente. Los portaobjetos fueron incubados con ambas soluciones durante 60 min en la oscuridad a temperatura ambiente.

Las muestras fueron observadas en un microscopio de fluorescencia Zeiss Z2 Axio Observer. La cuantificación se realizó utilizando diferentes plugins del programa de manipulación de imagen ImageJ. Se aplicó un umbral universal (mín. 4, máx. 30) a las imágenes de un solo canal DAPI para núcleos de segmento. Se aplicó el algoritmo de cuenca hidrográfica para separar los núcleos en contacto. Los núcleos se contaron de forma automatizada utilizando la función “Analizar Partículas” con criterios de tamaño de 100-600 μm^2 de área. Se excluyeron las células en los bordes ⁸⁴.

Para el análisis de SEM se elaboraron pastillas de zeolita de 9 mm de diámetro prensando el polvo en una prensa hidráulica. Las pastillas de zeolita previo tratamiento con luz UV fueron colocadas en el fondo de cada pocillo de la placa de cultivo. Seguidamente se depositó la suspensión de células MC3T3 en la superficie de la pastilla utilizando 25×10^3 células por pastilla y pocillo. Luego de un tiempo de incubación de 48 horas, las pastillas fueron removidas del medio, lavadas con PBS y las células fijadas con glutaraldehído (2.5%). Posteriormente, las muestras fueron sometidas a una deshidratación en concentraciones ascendentes de etanol, secadas en un secador de punto crítico de CO_2 (Autosamdri®-815) y finalmente cubiertas con una película de oro en el metalizador (Denton Desk V sputter coater). Seguidamente la morfología de las células adheridas fue examinada en el microscopio electrónico de barrido (SEM).

5.8 Ensayos de diferenciación celular.

La capacidad de las zeolitas para estimular la diferenciación osteogénica de las células MC3T3 se evaluó cultivando las células con las partículas de zeolita en ausencia de suplementos osteogénicos por 7, 14 y 21 días de incubación. Luego de cada periodo de incubación se midió la actividad de la enzima fosfatasa alcalina (ALP) de manera cuantitativa utilizando el ensayo de desfosforilación colorimétrica con el reactivo p-nitrofenil fosfato (pNPP) y cualitativamente mediante tinción NBT (nitro blue tetrazolium) / BCIP (5-Bromo-4-chloro-3-indolyl fosfato). Para ello una vez completado el tiempo de incubación, se retiró el medio de cultivo, las células se lavaron con PBS 1x y se fijaron con una solución de 90%

de etanol y 10% de formaldehído durante 30 s, tras lo cual se fueron lavadas con una solución tampón fosfato salino (PBS 1x a 4°C) y se agregó el reactivo pNPP en un buffer de reacción compuesto por bicarbonato de sodio 100 mM y MgCl₂ 1 mM pH 9,6. Al incubar con pNPP (incolore) por 20 min a 37 °C, el pNPP se descompone en presencia de ALP, liberando p-nitrofenol, que en condiciones fisiológicas pierde un protón generando p-nitrofenolato de color amarillo cuya absorbancia se mide a una longitud de onda de 405 nm en un lector de placa ELISA. La cantidad de p-nitrofenolato generado es directamente proporcional a la actividad de ALP. Se consideró como unidad muestral independiente cada incubación realizada de las células con las partículas de zeolita. Estos ensayos se realizaron mediante tres réplicas biológicas con tres réplicas técnicas cada una. Los valores se informan como el promedio \pm desviación estándar del número de réplicas biológicas n=3.

Complementariamente, la actividad ALP se analizó cualitativamente utilizando la tinción NBT (nitro blue tetrazolium) / BCIP (5-bromo-4-cloro-3-indolilfosfato ptoluidina) y registrando imágenes en un microscopio óptico (Zeiss, Primo Star 3). La fosfatasa alcalina secretada por las células en actividad osteogénica produce la liberación del grupo fosfato de BCIP. Este BCIP desfosforilado se oxida en presencia de NBT, formando un precipitado insoluble azul oscuro. Del mismo modo, el NBT reducido forma otro precipitado azul que intensifica y se hace más sensible la tinción.

Adicionalmente, se planificó la cuantificación de otros marcadores de diferenciación osteogénica, Runx-2 y Osterix, que intervienen en estadios tempranos y tardíos de este proceso. Se trabajó durante aproximadamente 3 meses en este ensayo, planificando cuidadosamente su metodología, la cual es muy sensible a la técnica. Pese a los esfuerzos realizados, donde se revisaron los protocolos de extracción de material genético, concentración celular utilizada, líneas celulares, marcadores kits para ejecución del ensayo, etc., no fue posible obtener resultados en este ensayo.

5.9 Análisis estadístico.

Los datos cuantitativos obtenidos del análisis elemental EDX, de los ensayos de viabilidad celular MTS y de diferenciación osteogénica ALP, se analizaron mediante el programa OriginPro® 2018 (OriginLab Corporation, USA). Los datos experimentales se informan como el promedio \pm desviación estándar de un número de experimentos n=3 para las

mediciones de EDX. Para los ensayos celulares (MTS y ALP) se consideró como unidad muestral independiente cada incubación realizada de las células con las partículas de zeolita. Estos ensayos se realizaron mediante tres réplicas biológicas con tres réplicas técnicas cada una. Los valores de MTS y ALP se informan como el promedio \pm desviación estándar del número de réplicas biológicas $n=3$.

Para comprobar la normalidad de la distribución de los datos, se realizó la prueba estadística de Shapiro-Wilk. Se utilizó un nivel de significancia de 95% ($p < 0,05$). Para comparar las medias entre los distintos grupos se realizó la prueba ANOVA de una sola vía y la prueba de Tukey con un nivel de significancia de 95% ($p < 0,05$).

RESULTADOS

6.1 Condiciones de síntesis y caracterización estructural de zeolitas SAPO-5 y SAPO-34.

Las condiciones óptimas de composición, tiempo y temperatura obtenidas para la síntesis de las zeolitas SAPO-5 y SAPO-34 fueron las siguientes:

Tabla 5. Composiciones óptimas para la síntesis de zeolitas SAPO-5 y SAPO-34.

Síntesis	Zeolita	Composición	Tiempo	Temperatura
S3	Me-SAPO-5	1,0 Al ₂ O ₃ :1,0 P ₂ O ₅ :0,4 SiO ₂ : 1,2 TEA:60 H ₂ O:0,009 MeOx	24 h	200 °C
S6	Me-SAPO-34	1,0Al ₂ O ₃ :1,0 P ₂ O ₅ :0,4 SiO ₂ :1,2 TEAOH:60 H ₂ O:0,009 MeOx	24 h	200 °C

En la **Figura 10a** se presenta el análisis DRX de los productos óptimos de síntesis. Los patrones de DRX confirman que los productos de síntesis corresponden a las estructuras cristalinas de las zeolitas SAPO-5 (estructura AFI, $d_p = 0,73$ nm) y SAPO-34 (estructura CHA, $d_p = 0,38$ nm) de acuerdo a la base de datos de patrones DRX de zeolitas ⁸⁵. Por otra parte, las modificaciones de las zeolitas tanto con iones litio como calcio intra y extrared no alteró el patrón DRX de las zeolitas. Los análisis de espectroscopia ATR-FTIR (Fig. 8b) muestran las señales típicas generadas por la estructura química de las zeolitas. Los peaks a 470, 790 y 1040 cm^{-1} corresponden a vibraciones (estiramientos simétricos) de los enlaces Si-O-Si o P-O-Si (enlaces T-O-T, donde T es un tetraedro formado por el correspondiente átomo), mientras que la señal a 580 cm^{-1} es atribuida a enlaces Al-O-Si o Al-O-P. Las bandas alrededor de 635 y 715 cm^{-1} , son vibraciones producidas por los enlaces T-O-T cuando forman parte de los anillos de las zeolitas, mientras que la banda en las zona de los 1000 – 1200 cm^{-1} es asignada a estiramientos asimétricos de los enlaces Si-O-Si o P-O-Si ^{86,87}. En el caso de las zeolitas modificadas con cationes extrared (Ca/Ca y Li/Li) se observa una disminución de la intensidad de las bandas FTIR respecto a las formas no modificadas o solo con cationes intrared, sin embargo, los patrones DRX no presentan estas diferencias, por lo que no se podrían atribuir a un cambio en la estructura cristalina de la zeolita, pero sí a algún tipo de interacción química entre los cationes extrared con los enlaces antes señalados.

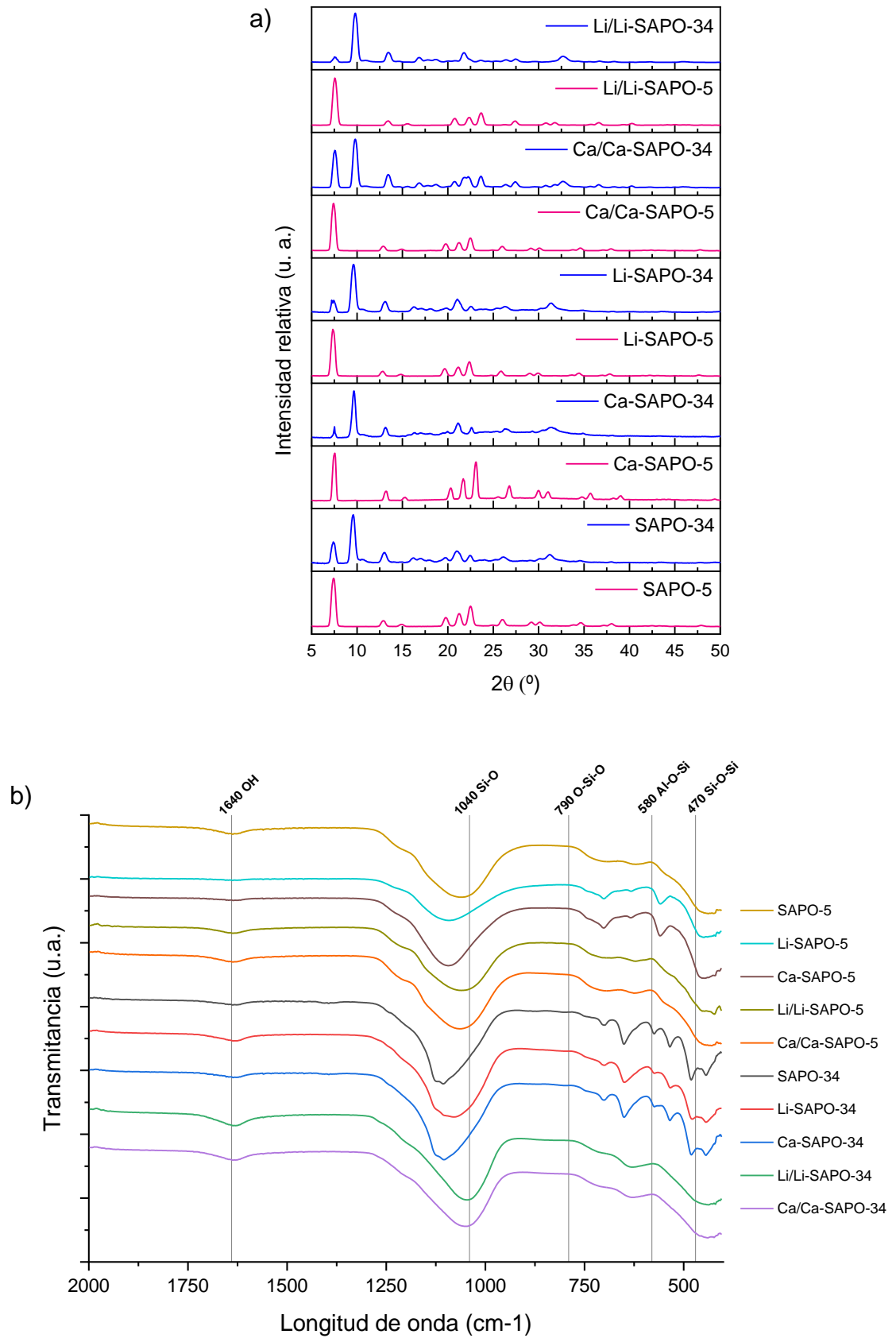


Fig. 10. a) Patrones DRX y b) espectro-análisis FTIR de las zeolitas SAPO estudiadas.

Las zeolitas también fueron examinadas mediante microscopia SEM (**Fig. 11**). Se puede observar que los cristales de zeolita SAPO-5 tienen una morfología hexagonal y laminar, con espesores de orden nanométrico (nanoláminas $\sim 70 - 170$ nm), mientras que los cristales de zeolita SAPO-34 son también nanolaminares (espesores $\sim 43 - 130$ nm) pero con morfología cúbica.

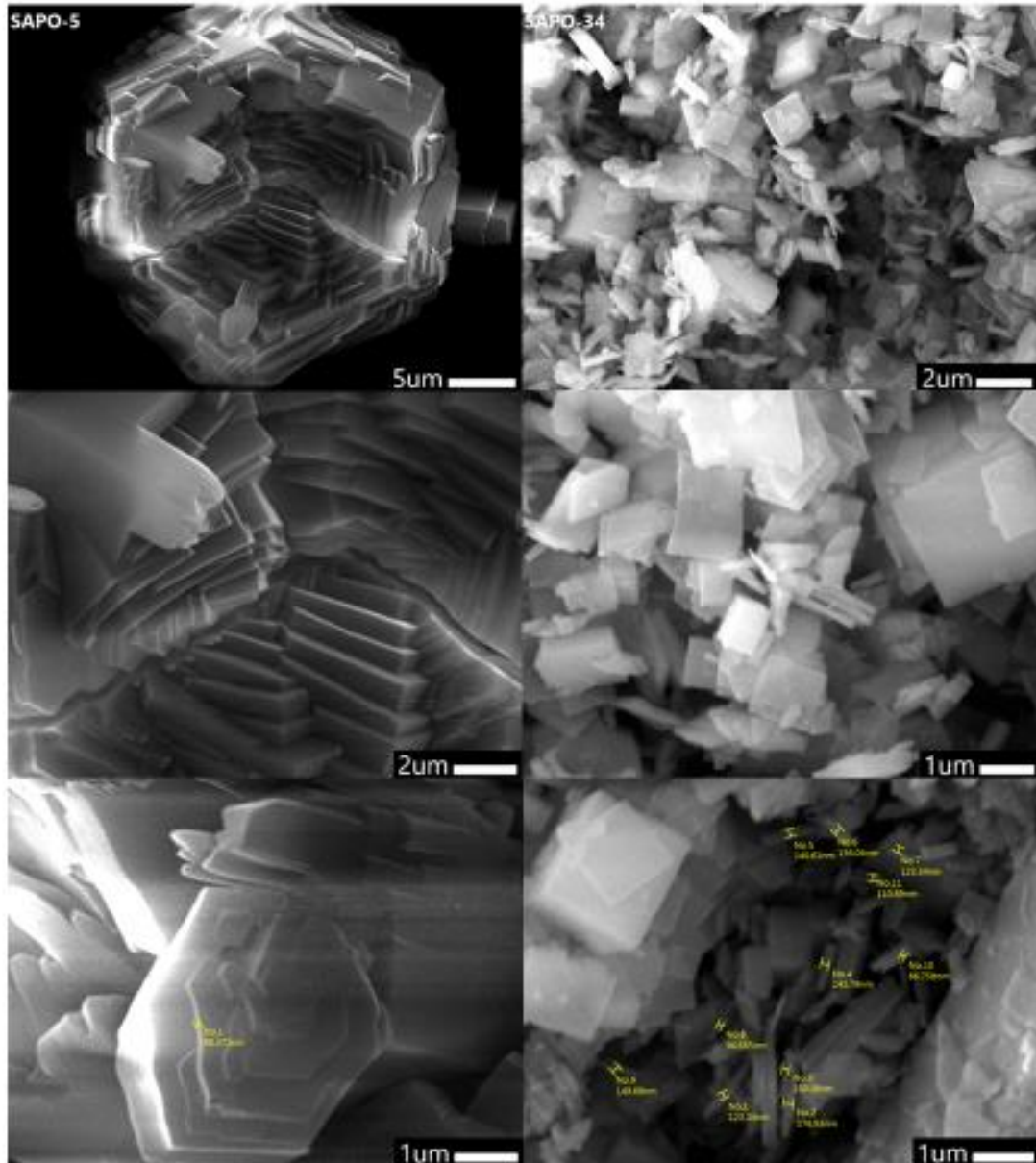


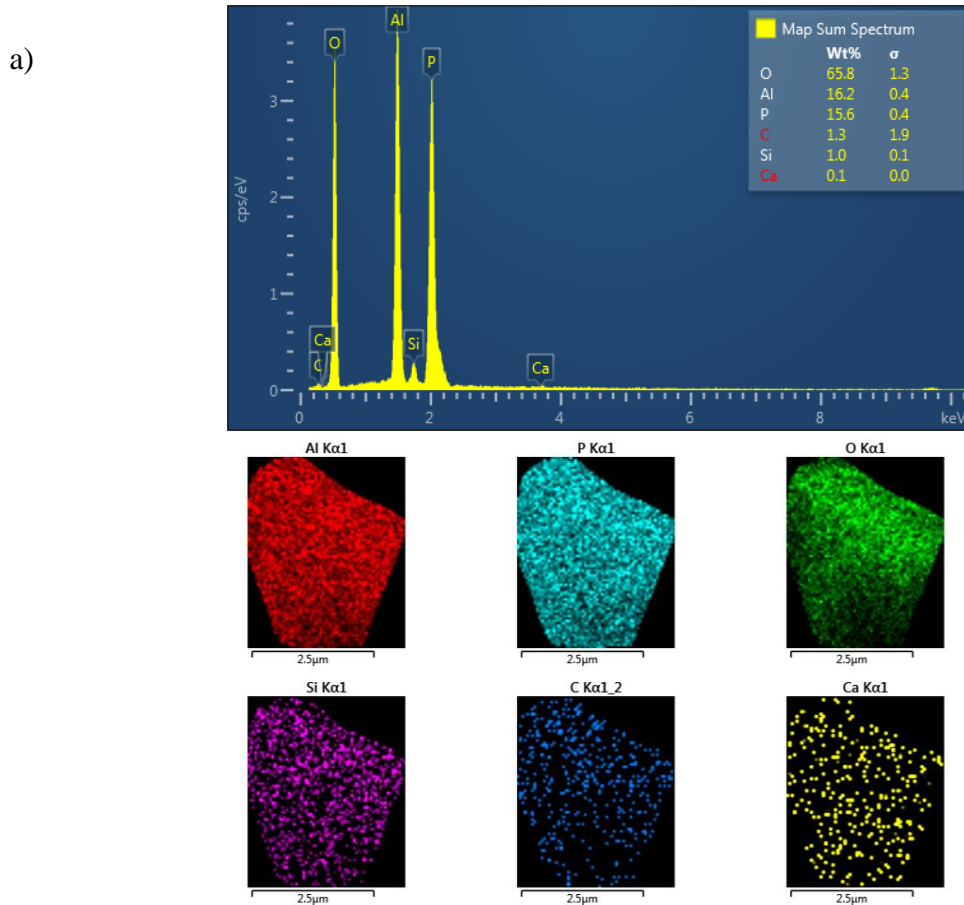
Fig. 11. Imágenes SEM de partículas de zeolita SAPO-5 y SAPO-34 sintetizadas en las condiciones óptimas (24 h a 200 °C).

En la **Tabla 6** se resumen el tamaño promedio de la dimensión nanométrica (espesor del cristal) de las partículas laminares de zeolita, los que se encuentra comprendidas entre 43 y 170 nm dependiendo de la topografía y composición química de la zeolita.

Tabla 6. Dimensión nanométrica de las partículas de zeolita determinada mediante microscopia SEM.

Zeolitas SAPO-5	Dimensión nanométrica (nm)	Zeolitas SAPO-34	Dimensión nanométrica (nm)
SAPO-5	84,8	SAPO-34	43,2
Li-SAPO-5	130,8	Li-SAPO-34	66,2
Ca-SAPO-5	88,3	Ca-SAPO-34	130,4
Li/Li-SAPO-5	171,2	Li/Li-SAPO-34	67,4
Ca/Ca-SAPO-5	71,6	Ca/Ca-SAPO-34	81,9

El análisis composicional EDX (**Fig. 12**) muestra que las zeolitas están compuestas fundamentalmente de los elementos Si, Al y P confirmando su naturaleza sílico-alúmino-fosfato (SAPO), además de contener Ca como elemento intrared (Ca-SAPO). El mapeo EDX también muestra cómo la densidad de átomos de Al y P en las zeolitas es mayor que la de Si.



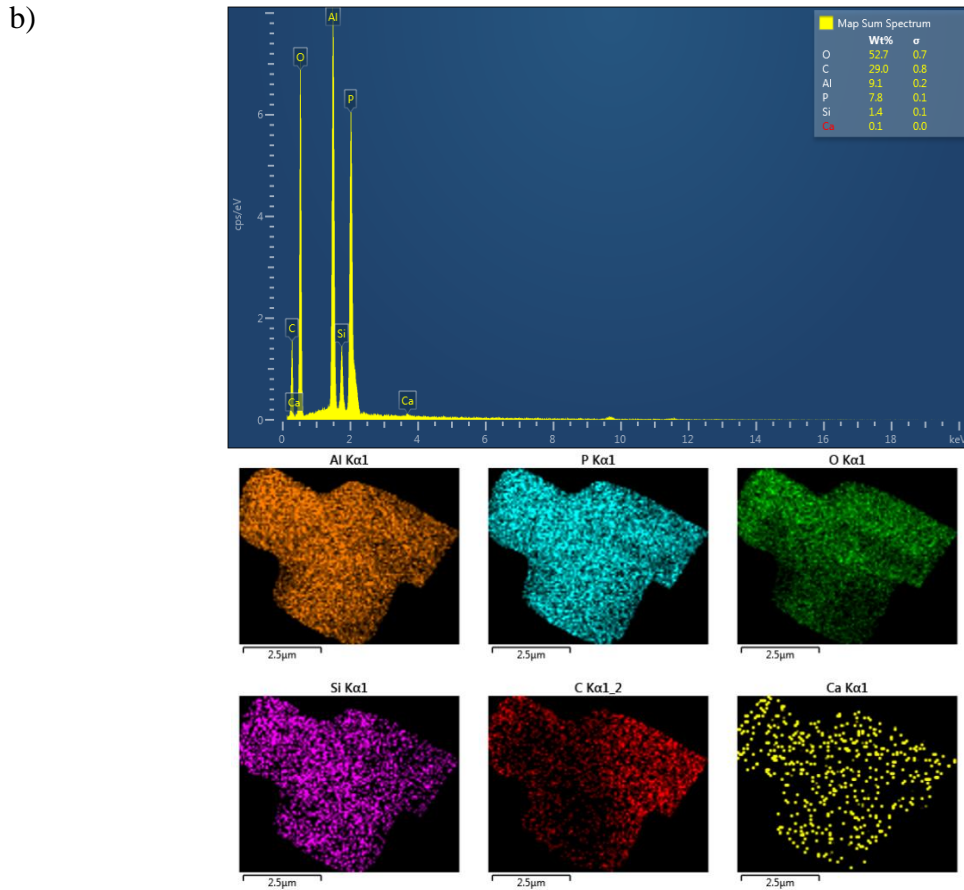


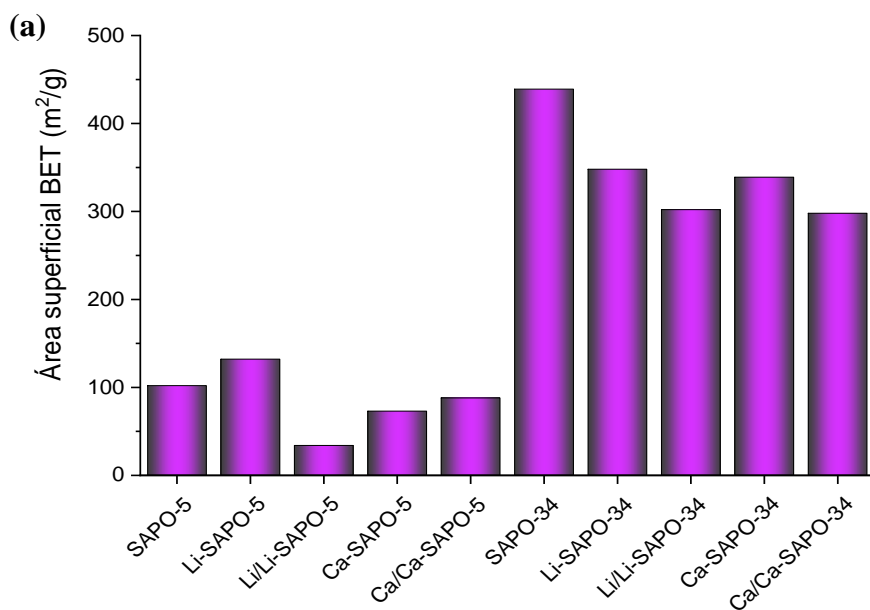
Figura 12. Espectros EDX, contenidos en peso (%) y mapeo EDX de los elementos que componen las zeolitas Ca-SAPO-5 (a) y Ca-SAPO-34 (b).

En la **Tabla 7** se presentan los contenidos de cada elemento determinado mediante EDX para todos los tipos de zeolita estudiadas. Puesto que la técnica EDX no detecta litio, el contenido de este elemento se determinó mediante fotometría de llama. Estos análisis confirman que los cationes Ca y Li fueron incorporados tanto en la red interna de la zeolita (Ca - o Li - SAPO) como de manera extrared en su superficie (Ca/Ca o Li/Li - SAPO). Se detectaron también concentraciones de carbono, que podría provenir de los compuestos orgánicos utilizados en la síntesis de las zeolitas.

Tabla 7. Contenidos de elementos en las zeolitas medidos mediante EDX. Li*: el contenido de litio de las partículas se determinó mediante fotometría de llama, este dato se midió en 6 tiempos (1, 3, 5, 7, 10 y 14 días). Los datos expresados corresponden al promedio de las mediciones y se expresan como ppm.

	Si (% m)	Al	P	O	C	Ca	Li*
SAPO-5	0,6	10,4	8,8	61,1	19,1	-	-
Li-SAPO-5	0,9	13,4	13,1	58,1	14,5	-	0,5
Ca-SAPO-5	1,0	16,2	15,6	65,8	1,3	0,1	-
Li/Li-SAPO-5	0,9	13,3	11,7	62,1	12,2	-	0,6
Ca/Ca-SAPO-5	0,8	5,0	3,5	51,4	39,2	0,1	-
SAPO-34	1,2	8,4	6,1	63,2	21,1	-	-
Li-SAPO-34	0,9	9,3	6,9	61,8	21,0	-	0,5
Ca-SAPO-34	1,4	9,1	7,8	52,7	29,0	0,1	-
Li/Li-SAPO-34	0,4	8,4	5,8	59,3	26,1	-	0,6
Ca/Ca-SAPO-34	0,3	4,1	2,8	54,1	38,7	0,1	-

En la **Figura 13** se muestran los valores de área superficial BET y las correspondientes isothermas de adsorción de N₂ obtenidas para cada tipo de zeolita. Se encontró que las zeolitas SAPO-34 presentan valores de área superficial entre 300 – 400 m²/g mientras que las zeolitas SAPO-5 presentan valores entre 34 – 130 m²/g. Ambos tipos de zeolita exhibieron isothermas tipo I/IV (clasificación IUPAC) propia de materiales microporosos (Tipo I) con presencia de mesoporos o espacios interpartícula (Tipo IV) (adsorción a P/Po cercano a 1,0). Las zeolitas SAPO-5 presentan una adsorción de tipo IV más intensa que las SAPO-34.



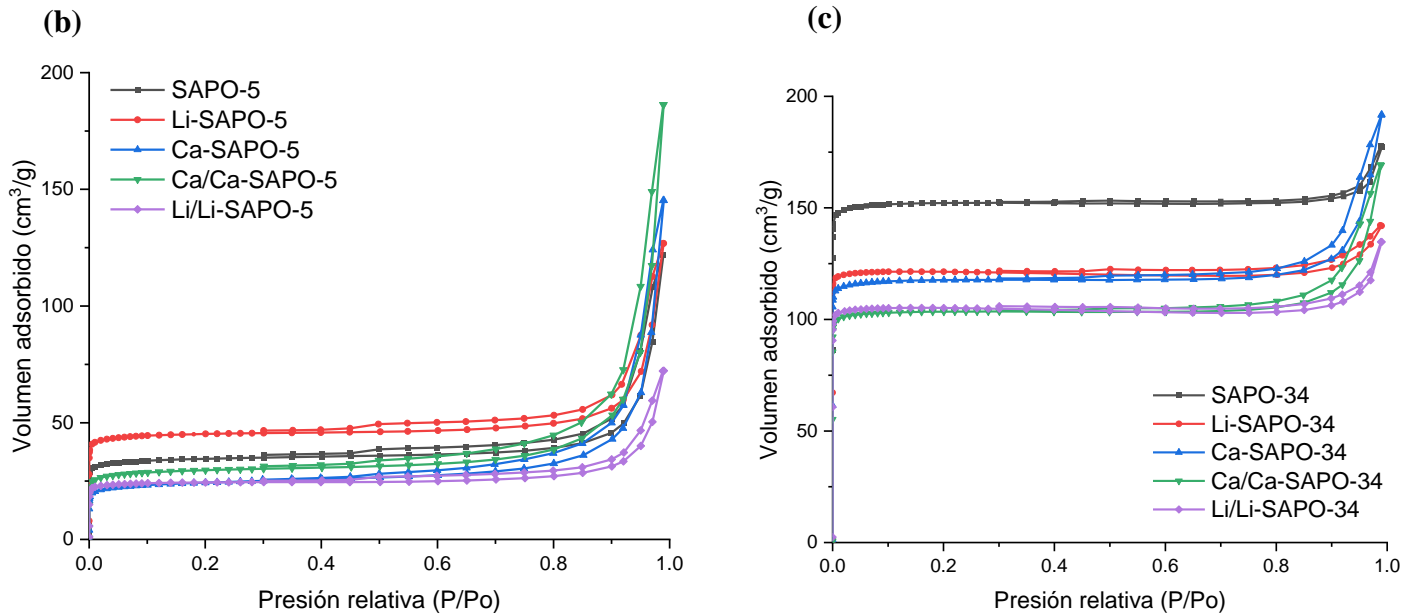


Figura 13. Área superficial BET de las zeolitas SAPO estudiadas (a) e isothermas de adsorción de N_2 de zeolitas SAPO-5 (b) y SAPO-34 (c).

6.2 Evaluación de la capacidad de formación de apatita en líquido corporal simulado (SBF).

El ensayo SBF mide la habilidad de algunos materiales para estimular la formación de hidroxiapatita ósea *in vitro*. Los cambios en la superficie de las zeolitas luego de su inmersión en SBF se analizaron mediante FTIR y SEM. En la **Fig. 14** se muestran los espectros FTIR de las zeolitas y luego de su inmersión en SBF por 3, 7 y 14 días. En todos los espectros de la serie de zeolitas SAPO estudiadas se puede observar que luego de su inmersión en SBF se produce la aparición de bandas asociadas a la estructura de la apatita. La apatita genera señales en el infrarrojo a 1040 , 604 y 567 cm^{-1} , correspondientes a los enlaces P-O del grupo PO_4 . Aunque las tres bandas se desarrollan con diferente intensidad, la formación de apatita se distingue más claramente por la banda de alrededor de los 1040 cm^{-1} . Luego de 3 días de inmersión, se observa que en las zeolitas SAPO-5 las señales del enlace P-O a 1040 cm^{-1} son más intensas, lo que significa que la formación de apatita en estas partículas es más rápida que en SAPO-34. Luego de 7 y 14 días se observan bandas de apatita en todas las zeolitas, sin embargo, las zeolitas con cationes extrared de litio y especialmente con calcio presenta las señales más intensas de apatita.

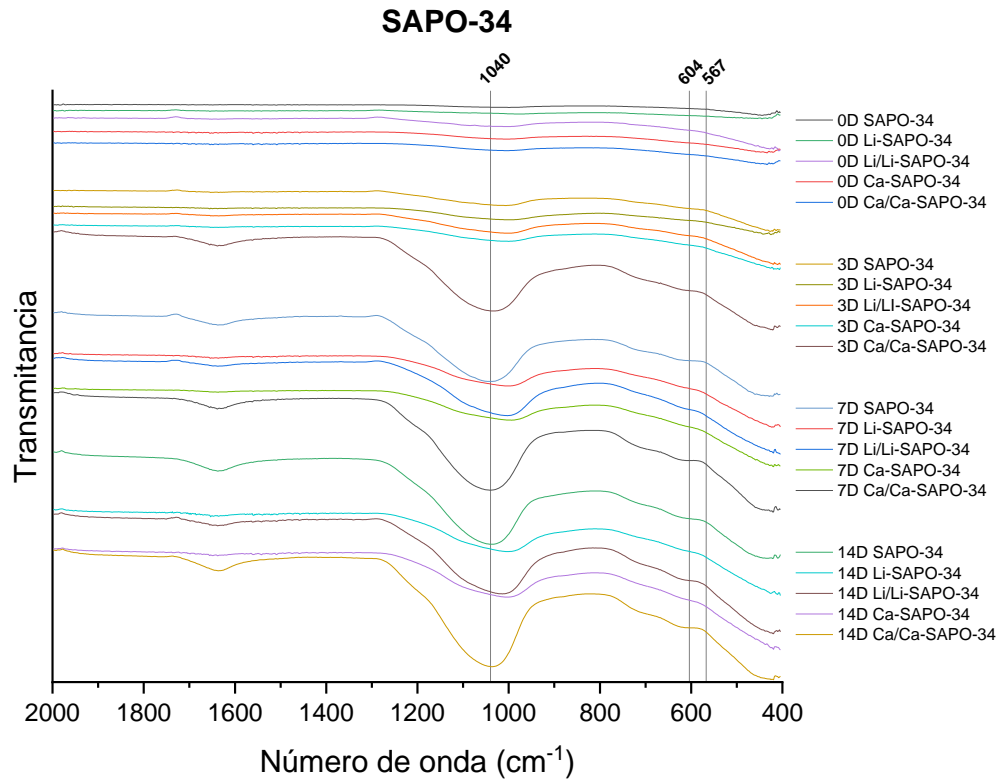
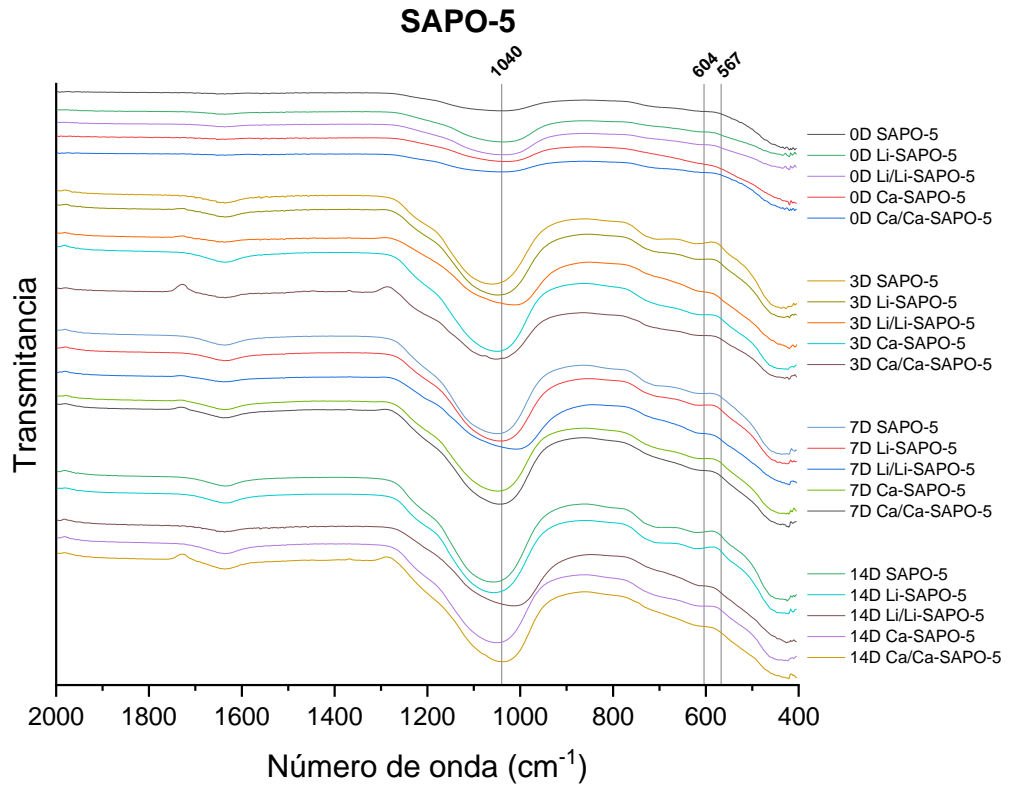


Fig. 14. Análisis FTIR de las zeolitas sometidas al ensayo de SBF durante 3, 7 y 14 días.

En la **Fig. 15** se muestran imágenes SEM y análisis elemental EDX de la superficie de algunas de las zeolitas (pastillas elaboradas compactando las partículas) antes y después de su inmersión en SBF.

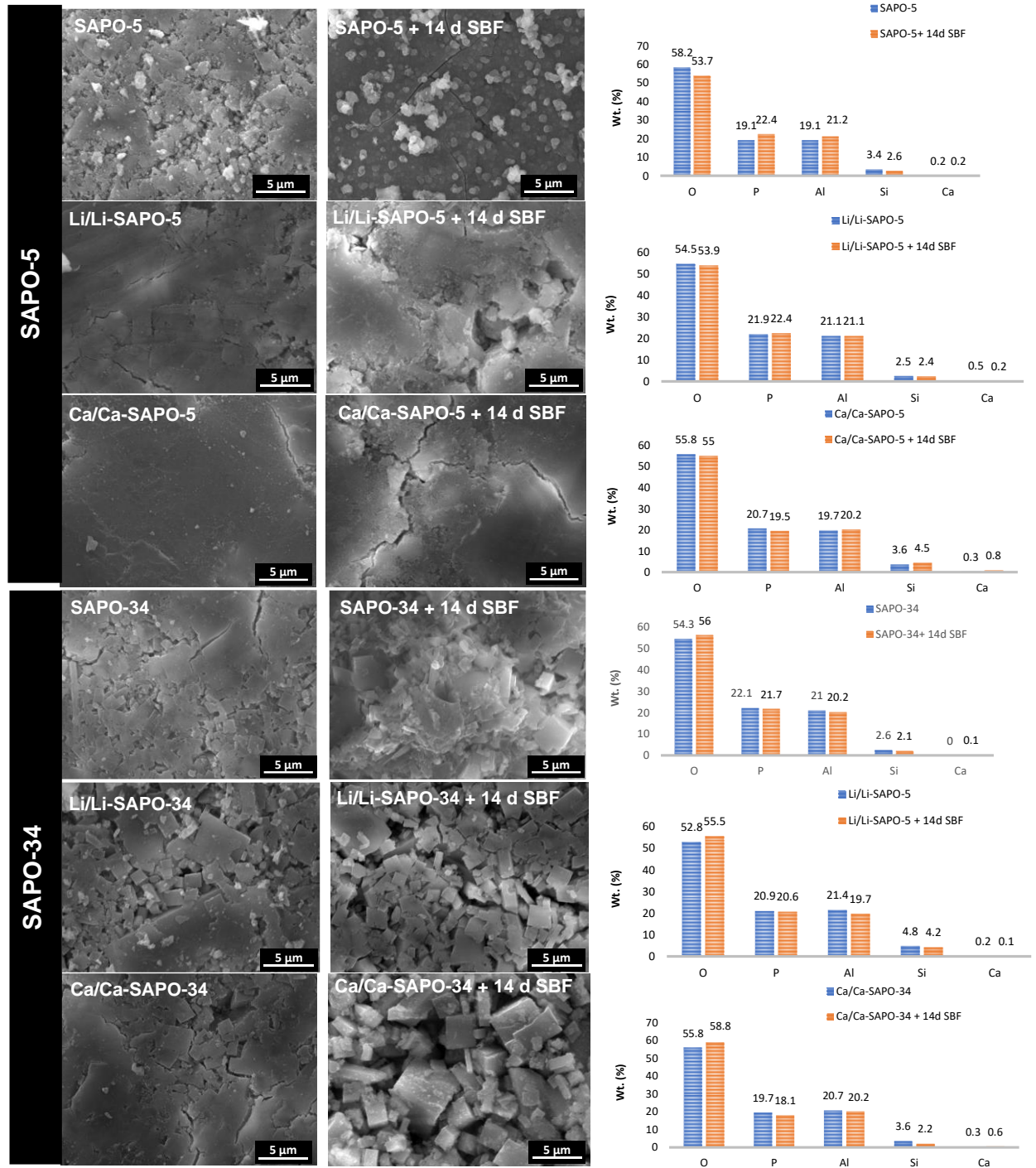


Fig. 15. Imágenes SEM y composicional EDX de zeolitas SAPO antes y después de 14 días de inmersión en SBF.

Las imágenes SEM muestra algunos cambios en la morfología de la superficie de pastillas de zeolitas luego del periodo de inmersión en SBF. En el caso de SAPO-5, se pueden visualizar depósitos minerales con morfología característica de apatita, mientras que para Li/Li-SAPO-5 y Ca/Ca-SAPO-5 se observa una capa mineral más densa. En el caso de las zeolitas SAPO-34, resulta más difícil detectar formaciones minerales, ya que se observa simultáneamente una disgregación de la pastilla. Sin embargo, sobre los cristales de Ca/Ca-SAPO-34 se pueden detectar la presencia de depósitos minerales que podrían corresponder a la apatita detectada por FTIR. El análisis composicional EDX demostró en la mayoría de los casos ocurrió un aumento del contenido de Ca en la superficie después de su inmersión en SBF. En varias muestras este aumento de calcio estuvo acompañado por una disminución de los contenidos de Si y Al de la zeolita.

6.3 Evaluación de la capacidad de adsorción de proteínas de las zeolitas.

La **Figura 16** muestra los valores de la capacidad de adsorción de proteínas obtenidos para cada zeolita. Todas las zeolitas presentaron capacidad para adsorber tanto albúmina como fibrinógeno, sin embargo, la adsorción de albúmina fue significativamente menor en las zeolitas SAPO-34, Li-SAPO-34, Ca-SAPO-34 y Li/Li-SAPO-34, mientras que no hubo diferencias significativas en la adsorción de fibrinógeno.

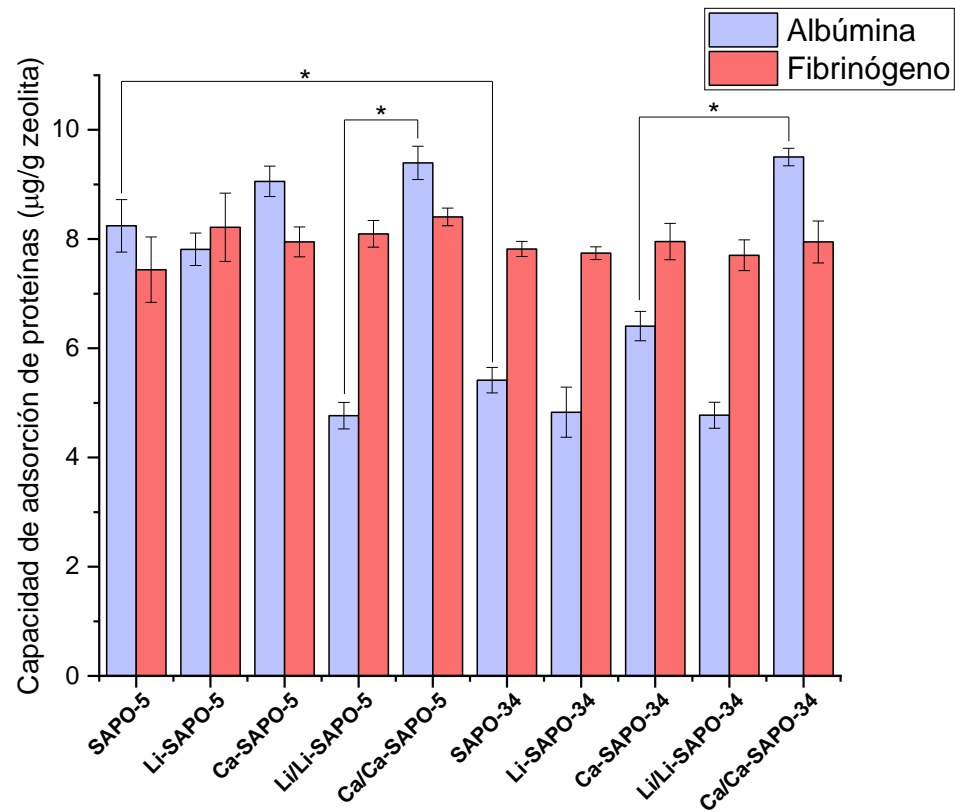


Figura 16. Capacidad de adsorción de proteínas albúmina y fibrinógeno de las zeolitas SAPO estudiadas. Se realizó la comparación estadística de todos los grupos entre sí según la proteína adsorbida, no encontrándose diferencias significativas en la adsorción de fibrinógeno. En el gráfico se muestra con * los grupos que presentaron diferencias significativas en la adsorción de albúmina. * $p < 0.05$; ANOVA de una vía con prueba de Tukey.

6.4 Capacidad de liberación de litio y calcio de las zeolitas.

En la **Fig. 17** se muestran las concentraciones de litio y calcio liberadas por las nanozeolitas luego de ser incubadas en medio de cultivo por 14 días. Se puede observar que luego de 1 día las zeolitas liberan una importante concentración de los iones, que en general se estabiliza luego de 3 días para luego aumentar nuevamente a los 7 días.

Como era de esperar, las zeolitas con cationes extrared son las que liberan una mayor concentración de Ca^{2+} y Li^+ sin diferencias significativas cuando se trata de zeolita SAPO-5 o SAPO-34.

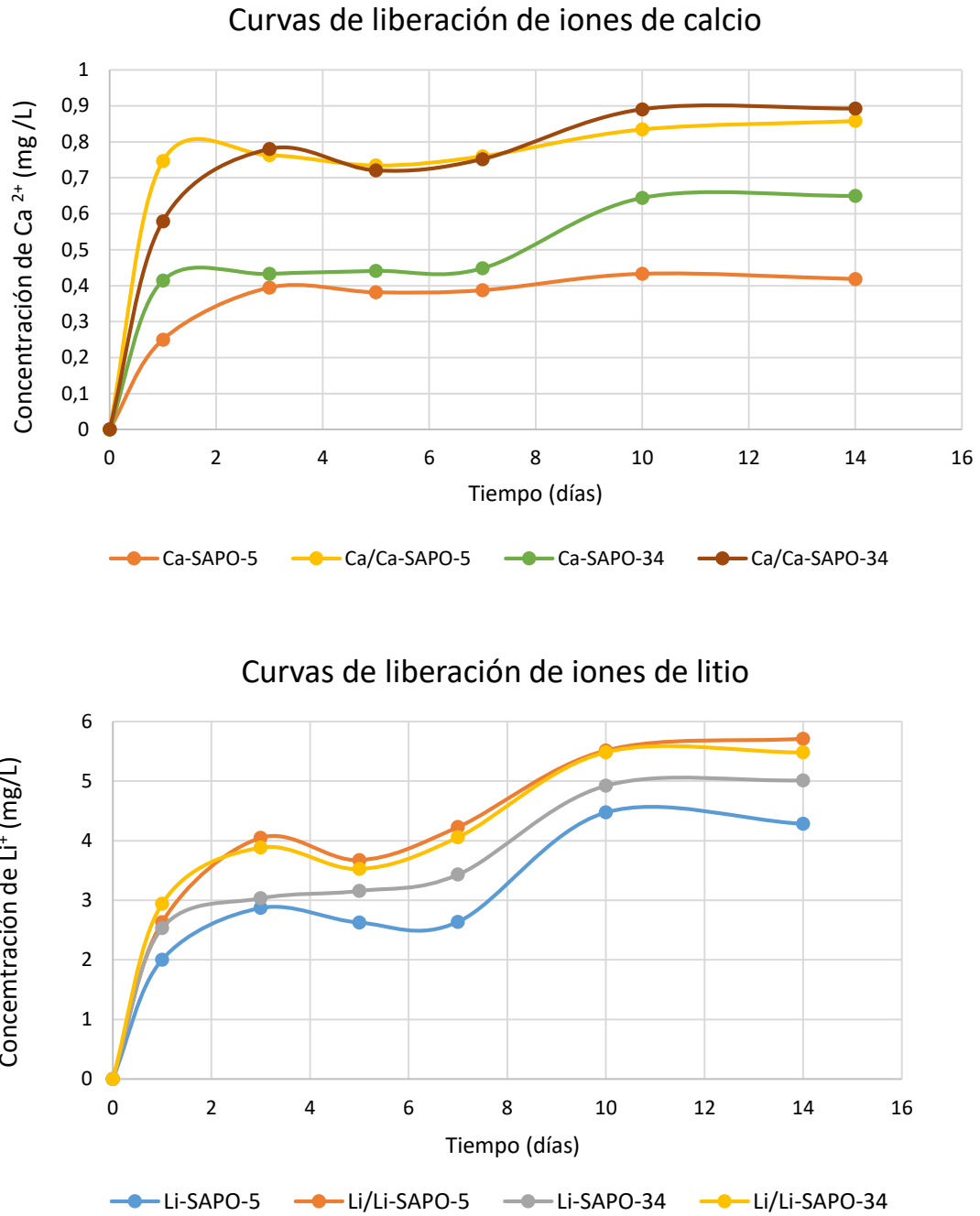


Figura 17. Curvas de liberación de iones de litio y calcio desde zeolitas SAPO en buffer TRIS pH 7,4.

6.5 Propiedades de degradabilidad de las zeolitas.

En la **Fig. 18** Se puede observar que todas las zeolitas experimentan una pérdida significativa de masa luego de 3 días de inmersión en el medio. Esta pérdida de masa se encuentra en torno al 15 – 20 % para la mayoría de las zeolitas, pero solo alrededor de 5 % para las zeolitas Li-SAPO-5 y Ca-SAPO-5. Se observa una tendencia de una mayor pérdida de peso en las zeolitas SAPO-34 que en las SAPO-5, y una mayor degradabilidad cuando se encuentran modificadas con cationes extrared (Ca/Ca y Li/Li).

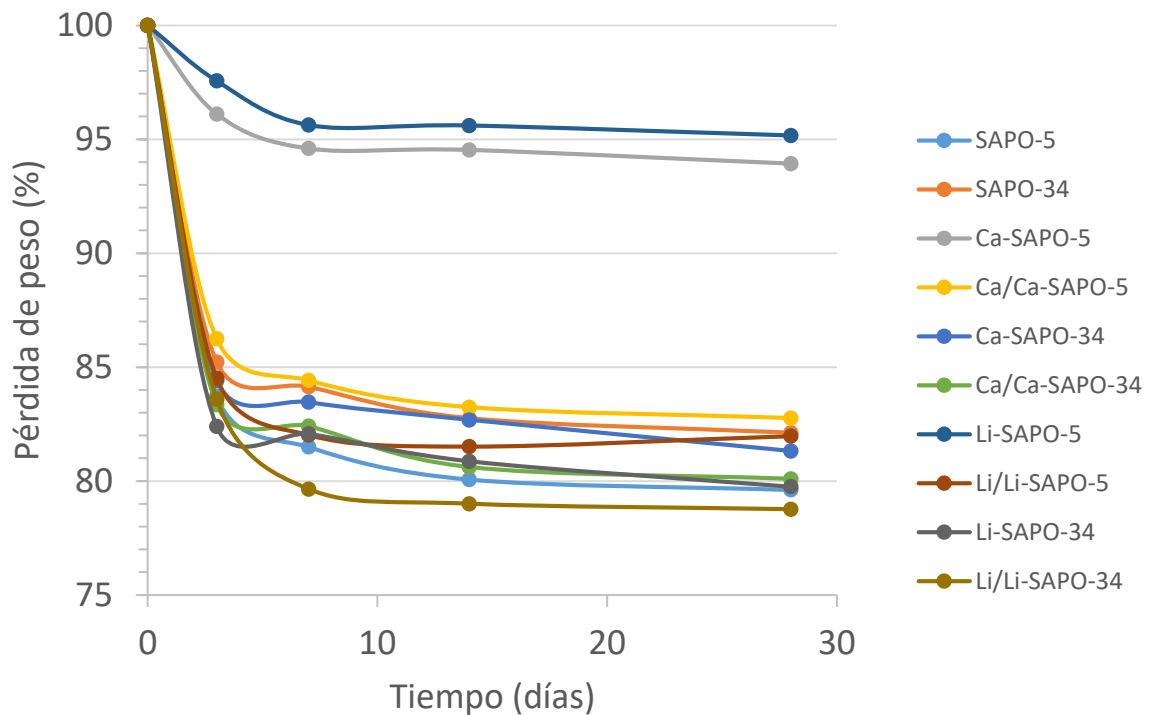


Figura 18. Gráficos de degradabilidad de zeolitas SAPO-5 y SAPO-34 en medio tamponado TRIS.

6.6. Viabilidad de células preostoblásticas MC3T3 cultivadas con las zeolitas.

La viabilidad celular se estudió con una concentración de zeolita de 250 $\mu\text{g/mL}$ con el propósito de comparar su citocompatibilidad con biocerámicas de referencia como nBG, en cuyos ensayos se utiliza aquella concentración. En la **Figura 19** se muestran las viabilidades celulares medidas con el método MTS de las células MC3T3 cultivadas con cada tipo de zeolita comparadas al control positivo (sin zeolita) luego de 3, 7 y 14 días de incubación. A

los 3 días no se observan diferencias significativas en la viabilidad de las células cultivadas con zeolitas respecto al control (solo en el control negativo con iones de plomo). A los 7 días, disminuye la viabilidad celular en la serie de zeolitas SAPO-34 respecto al control. Luego de un periodo de 14 días de incubación, solo en las zeolitas SAPO-34, Li-SAPO-34 y Ca-SAPO-34 disminuye la viabilidad, no observándose pérdida de viabilidad celular con las demás zeolitas, especialmente en aquellas con cationes extrared (Ca/Ca y Li/Li) y toda la serie SAPO-5.

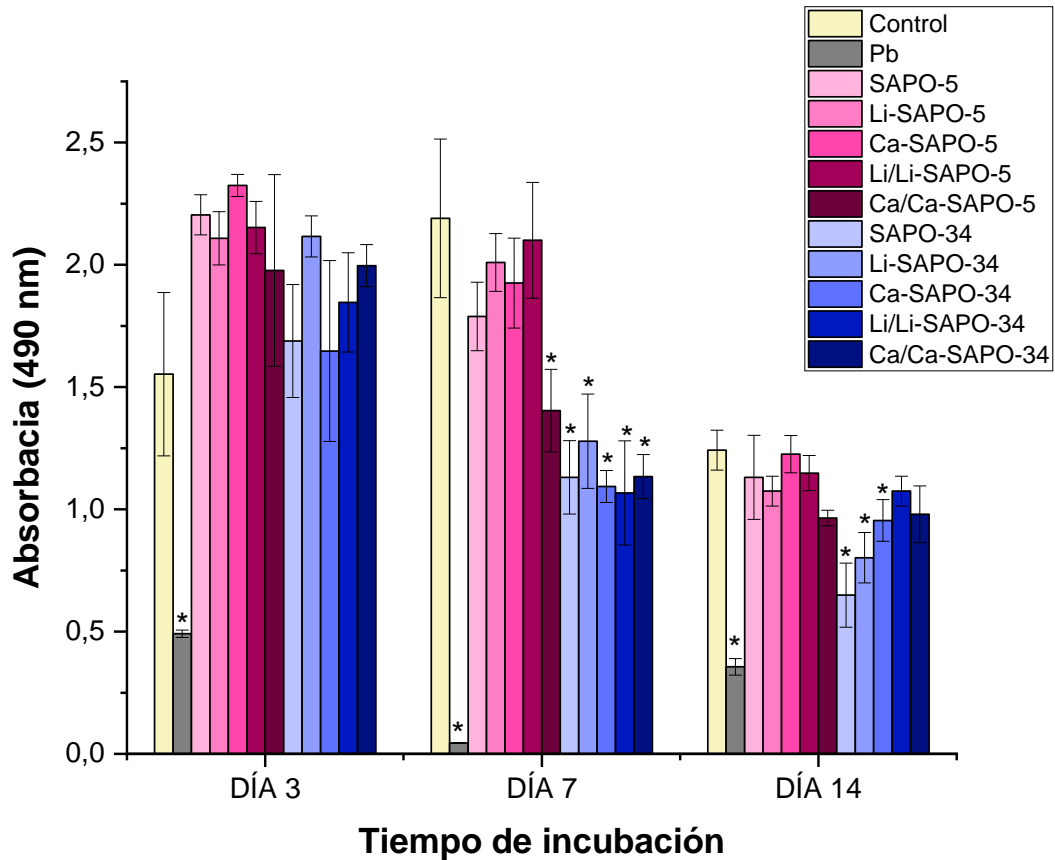


Figura 19. Ensayo de viabilidad celular MTS de células MC3T3 cultivadas con las nanopartículas de zeolitas. Los resultados se expresan como un promedio \pm desviación estándar del número de réplicas biológicas $n=3$ para cada uno de los grupos. El gráfico compara para cada tiempo todos los grupos de zeolitas SAPO entre sí respecto al control (células sin material) y al control negativo con plomo (Pb). En el gráfico se representa con * sólo aquellos grupos que mostraron diferencias significativas respecto al control en un mismo tiempo. * $p < 0.05$; ANOVA de una vía con prueba de Tukey.

6.7. Adhesión de células preostoblásticas MC3T3 cultivadas con las zeolitas.

La adhesión de células MC3T3 sobre las partículas de zeolita SAPO se analizó mediante microscopía de fluorescencia tiñendo los filamentos de actina con faloidina (rojo) y los núcleos celulares con DAPI (azul) (**Fig. 20**).

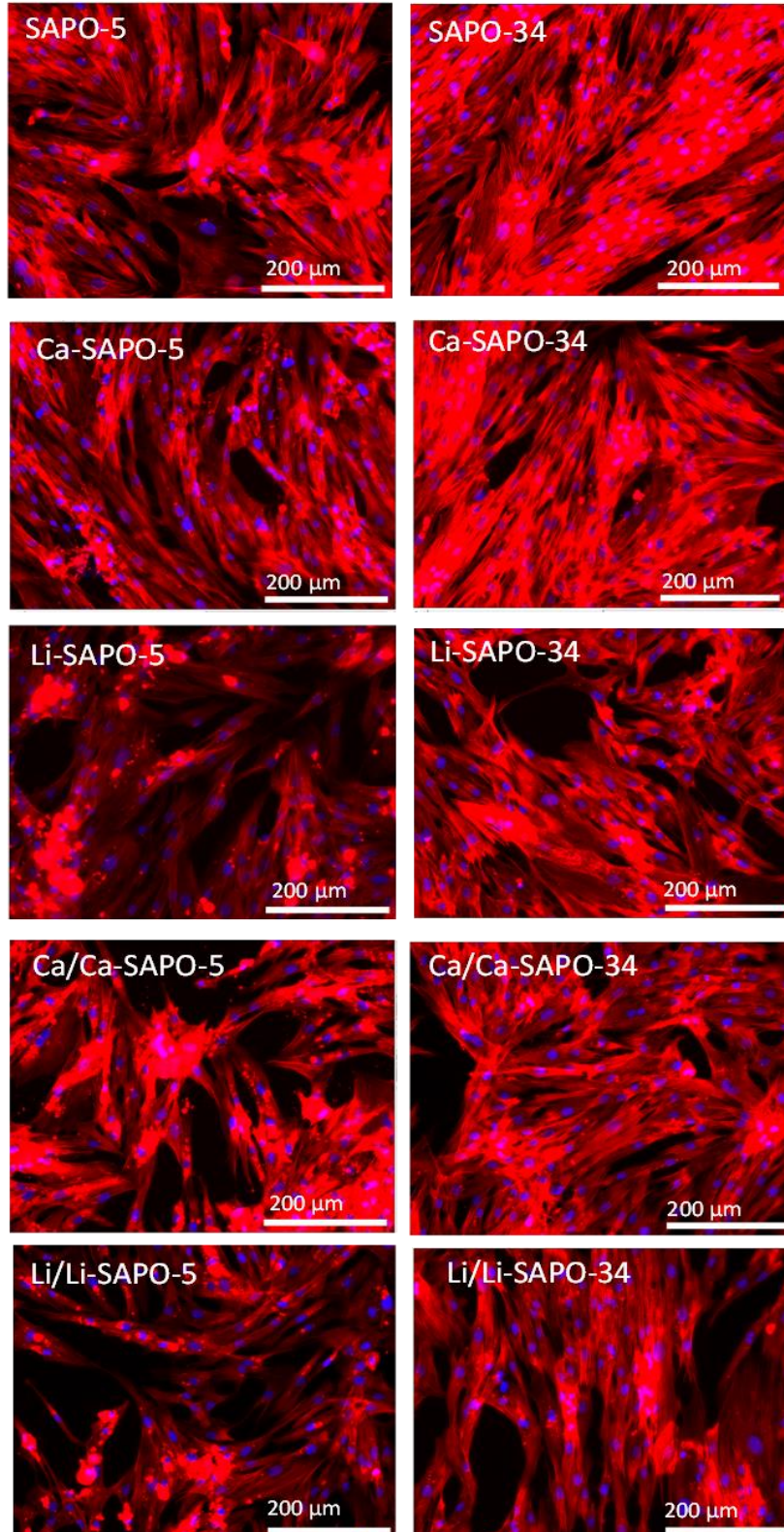


Figura 20. Imágenes de microscopía de fluorescencia mostrando el citoesqueleto (faloidina) y núcleos (DAPI) de células MC3T3 adheridas en las diferentes partículas de zeolita SAPO luego de 48 horas.

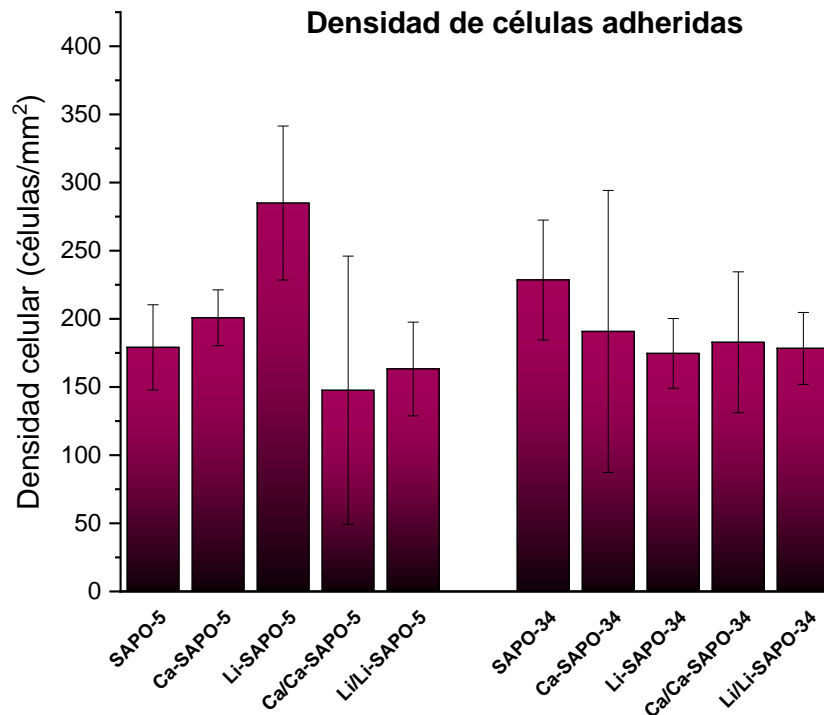


Figura 21. Densidad de células MC3T3 en las zeolitas luego de 48 horas determinada mediante cuantificación de núcleos teñidos con DAPI. Se realizó la comparación estadística de todos los grupos entre sí, no encontrándose diferencias significativas entre ellos. ANOVA de una vía con prueba de Tukey ($p < 0.05$).

En todos los casos se observó que el citoesqueleto de las células adopta una morfología extendida en presencia de los cristales (zonas rojas de mayor intensidad) de las diferentes zeolitas, lo cual es una indicación de una buena adherencia de las células al sustrato nanoparticulado de zeolita. Aunque morfológicamente no se pueden confirmar diferencias significativas, aparentemente las células se aprecian más separadas entre ellas en los cultivos con zeolita SAPO-5, especialmente en las zeolitas SAPO-5 modificadas con litio. En la **Fig. 21** se presentan las densidades celulares determinadas mediante la cuantificación de los núcleos teñidos con DAPI, en donde no se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos estudiados.

La morfología de las células adheridas sobre diferentes zeolitas se analizó utilizando microscopía SEM (**Fig. 22**). Se puede observar la presencia de células adheridas en la superficie de todas las zeolitas estudiadas. Las células adoptaron una morfología

principalmente extendida, distinguiéndose en algunos casos la presencia de filopodios y lamelopodios. En general las células forman una monocapa sobre las superficies, exhibiendo una íntima interacción con los cristales de zeolita.

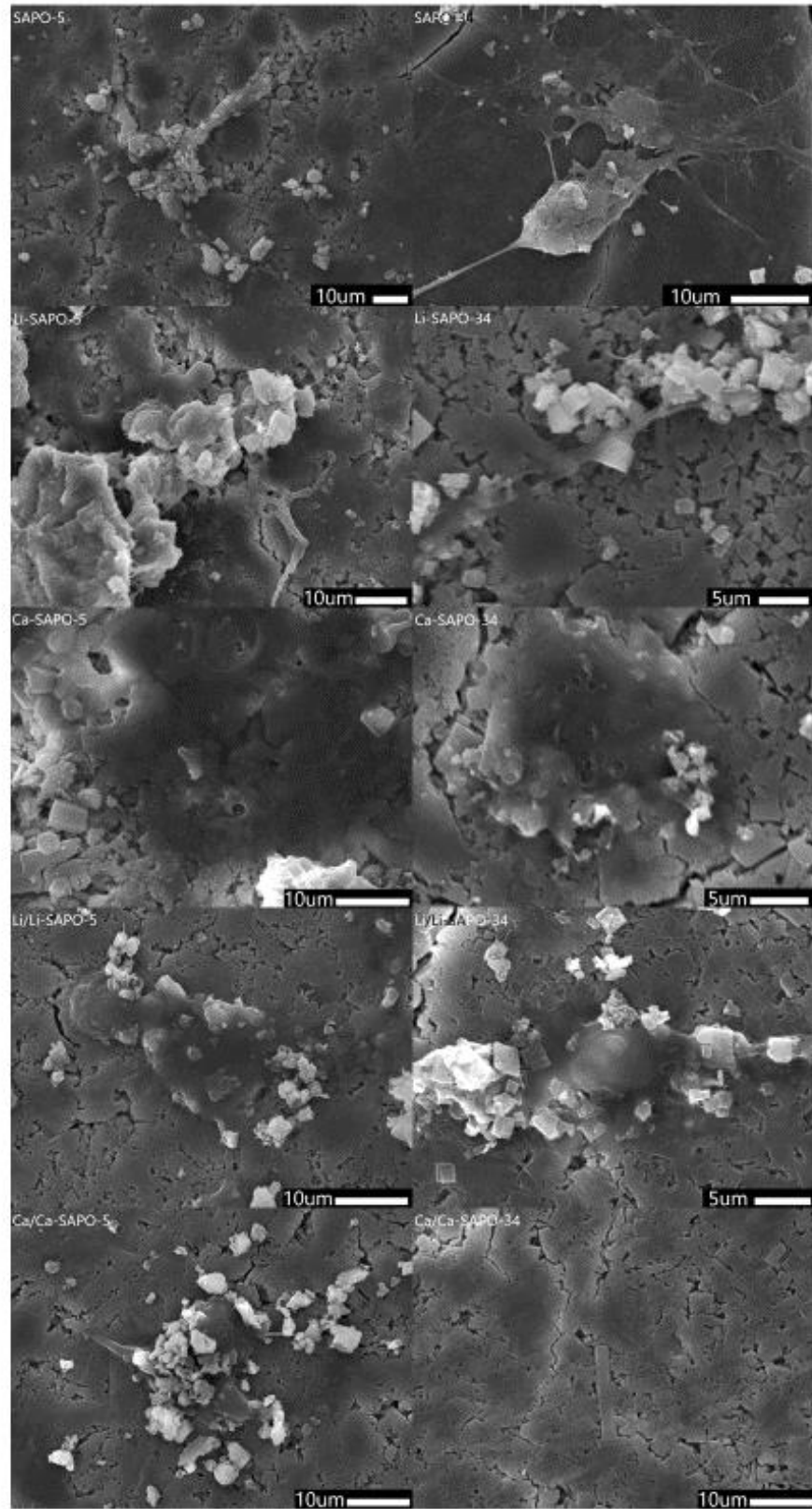


Figura 22. Imágenes SEM de células MC3T3-E1 sembradas sobre discos de zeolita en medio completo con 100mM HEPES. 1000X y 1500X.

6.8. Evaluación de la capacidad de las zeolitas para inducir la diferenciación celular osteogénica.

La capacidad de las nanopartículas para estimular la diferenciación osteogénica de células preosteoblásticas MC3T3 se evaluó midiendo la actividad enzimática de ALP. La **Figura 23** muestra los valores de actividad de ALP obtenidos. Al día 7 no se observaron diferencias significativas entre las zeolitas con cationes extrared (Li/Li-SAPO-5/34, Ca/Ca-SAPO-5/34) y nBG, que presentaron mayor actividad de ALP respecto al control y a las zeolitas sin cationes extrared. Al día 14, la actividad ALP fue aún mayor en las células cultivadas con Ca/Ca-SAPO-5, Ca/Ca-SAPO-34, Li/Li-SAPO-5, Li/Li-SAPO-34 y nBG respecto al control, siendo esta diferencia estadísticamente significativa. La actividad de ALP producida por las zeolitas Li/Li-SAPO-5 y Li/Li-SAPO-34, que fueron las que presentaron mayor desempeño, fue similar a la producida por las nanopartículas de vidrio bioactivo (nBG) usadas como referencia, ya que no se observaron diferencias estadísticamente significativas.

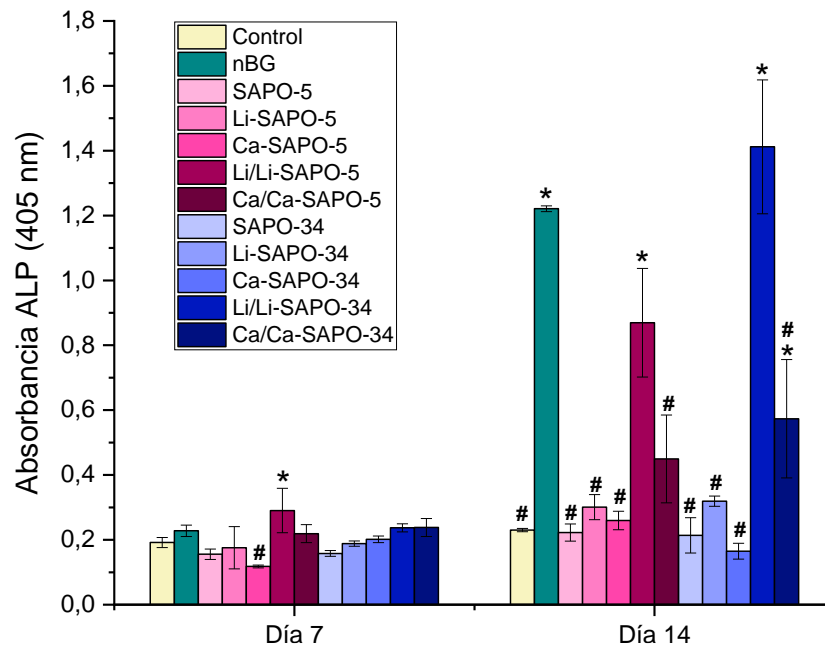


Figura 23. Actividad de la enzima fosfatasa alcalina (ALP) de células MC3T3 cultivadas con las zeolitas SAPO en ausencia de suplementos osteogénicos. Para cada tiempo de incubación, se realizó la comparación estadística de todos los grupos con zeolitas SAPO entre sí, así como respecto a las células sin el material (Control) y con la partícula osteoinductiva de referencia (nBG). En el gráfico se representa con * sólo aquellos grupos que mostraron diferencias significativas con el control, y con # aquellos grupos que mostraron diferencias significativas con el nBG. Los resultados se expresan como un promedio \pm desviación estándar del número de réplicas biológicas $n=3$ para cada uno de los grupos descritos. */# $p<0.05$; ANOVA de una vía con prueba de Tukey.

La **Figura 24** muestra imágenes de microscopía óptica de las células MC3T3 teñidas con el reactivo NBT/BCIP específico para la detección de actividad de la enzima ALP. Se observa la tinción para ALP en todos los grupos estudiados, observándose una mayor producción de ALP en las células cultivadas con zeolitas SAPO modificadas con Li y Ca extrared (Li/Li-SAPO-5, Ca/Ca-SAPO-5, Li/Li-SAPO-34 y Ca/Ca-SAPO-34). La intensidad de ALP producida con estas zeolitas es equivalente o mayor a la obtenida con la partícula osteoinductora de referencia nBG.

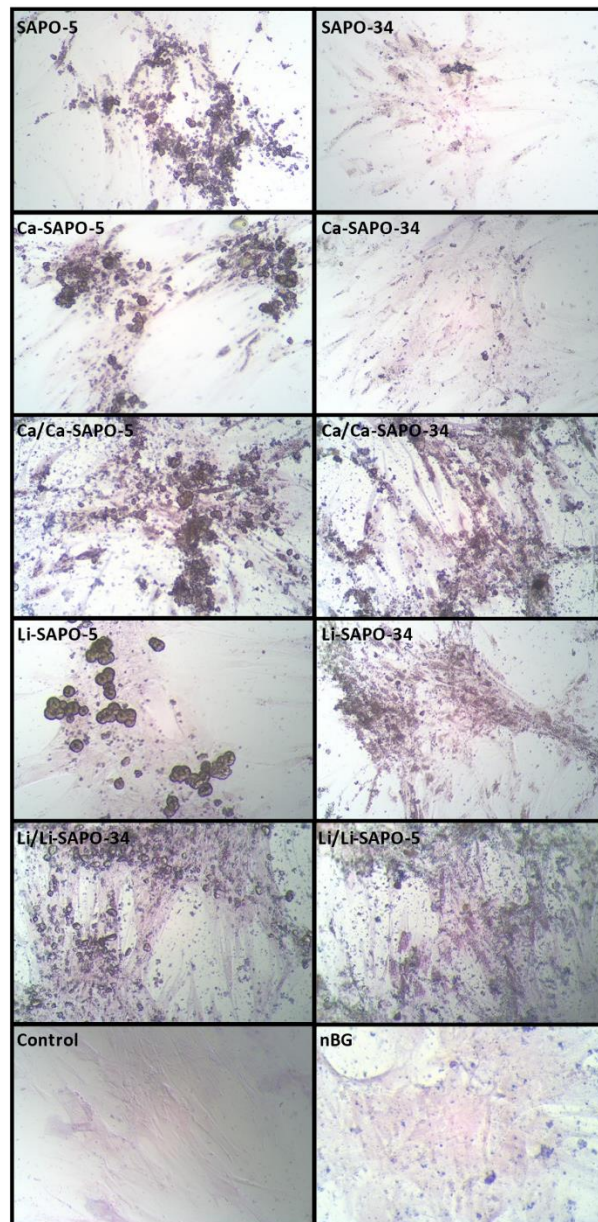


Figura 24. Actividad cualitativa de fosfatasa alcalina. Fotografías en microscopio óptico de MC3T3 cultivadas con zeolitas SAPO, nBG y medio osteogénico durante 10 días, teñidas con reactivo NBT/BCIP.

6 DISCUSIÓN.

7.1. Síntesis y caracterización estructural de zeolitas SAPO.

En este trabajo de tesis se planteó la obtención de zeolitas sílicoaluminofosfato (SAPO) con dimensiones nanométricas y que pudiesen incorporar cationes de Li^+ y Ca^{2+} en su estructura como agentes promotores de propiedades osteoinductoras. La obtención del material que cumpliera con las características cristolagráficas, morfológicas y composicionales deseadas fue verificada mediante técnicas de análisis de DRX, FTIR, SEM y EDX. Para la síntesis de las nanopartículas de zeolitas se utilizó el método hidrotérmal, siguiendo inicialmente condiciones descritas en diferentes fuentes bibliográficas^{80,88}. En la literatura no se describen métodos de síntesis que incorporen calcio y litio dentro de la estructura de zeolitas SAPO, por lo que las composiciones y condiciones de síntesis se optimizaron hasta obtener partículas de zeolita SAPO con las características deseadas de topografía (SAPO-5 y SAPO-34), de tamaño de partícula (nanodimensional), morfológicas (laminares) y composicionales (con litio y calcio estructural). Las estructuras cristalinas de las zeolitas SAPO-5 y SAPO-34 se confirmó mediante análisis DRX, encontrándose que corresponden a las estructuras topográficas AFI y CHA (Atlas of Zeolite Frameworks), respectivamente⁵⁹. La estructura AFI de la zeolita SAPO-5 se caracteriza por tener nanoporos con aperturas conformada por un anillo de 12 miembros con diámetro de 0,73 nm, mientras que la estructura CHA de la SAPO-34 posee poros de 8 miembros y con diámetro de 0,38 nm. Por otra parte, ambas zeolitas presentaron partículas o cristales con una morfología laminar y de espesor nanométrico. En el caso de la SAPO-5 las nanoláminas fueron hexagonales, pero formando agregados micrométricos, mientras que las láminas de SAPO-34 fueron de morfología cúbica y mucho más dispersas que los de SAPO-5. Estas características nanométricas de tamaño de poro, forma y tamaño de cristal determinan propiedades físicas, químicas y biológicas de estos materiales. Una de estas propiedades es el área superficial de las zeolitas, que al ser medida mediante isotermas de adsorción de nitrógeno arrojó áreas superficiales promedio en torno a los $100 \text{ m}^2/\text{g}$ para las zeolitas SAPO-5 y de $350 \text{ m}^2/\text{g}$ para las zeolitas SAPO-34.

La mayor área superficial de la zeolita SAPO-34 podría explicarse por la mayor dispersión, morfología cúbica y menor tamaño de los nanocristales de SAPO-34, lo cual incrementa su área superficial externa, a pesar de que posea un tamaño de poro menor que la SAPO-5. Otra diferencia encontrada entre las zeolitas es que, aunque la zeolita SAPO-5 tiene menor área superficial, esta zeolita posee mayor mesoporosidad que la zeolita SAPO-34 como lo mostraron las formas de las isothermas de adsorción. Estos “mesoporos” en realidad corresponden a espacios interpartícula formados por la aglomeración de los pequeños nanocristales y que se comportan como mesoporos^{89,90}. Los espacios interpartícula tienen un rol importante en la adsorción de macromoléculas biológicas que por su tamaño no pueden ser adsorbidas a través de los nanoporos de la zeolita.

Por otra parte, se confirmó la composición química de las zeolitas SAPO, especialmente que su estructura estaba compuesta de silicio (Si), aluminio (Al), fósforo (P) y oxígeno (O), elementos que le otorgan el nombre de sílicoaluminofosfato (SAPO). Aunque estos elementos se encuentran en todas las zeolitas obtenidas, se encontró una mayor proporción de Al y P por sobre Si. Asimismo, se verificó la incorporación de los iones de Ca y Li en la estructura de las zeolitas SAPO, detectándose la incorporación de ambos elementos tanto de forma intrared (Ca-SAPO-5 y Li-SAPO-5) como de manera extrared en la superficie de las zeolitas (Ca/Ca-SAPO-34 y Li/Li-SAPO-34). Mediante DRX se comprobó que la modificación de las zeolitas con estos cationes no produce cambios en su estructura cristalina, lo cual les permite conservar sus propiedades de porosidad y área superficial. Aunque las zeolitas SAPO-5 y SAPO-34 se han sintetizado para su uso en otras aplicaciones (catalizadores de reacciones petroquímicas)⁹¹⁻⁹³, no se encuentran en la literatura reportes de su preparación para su utilización en aplicaciones de regeneración ósea.

7.2. Evaluación de la capacidad de las zeolitas para formar apatita en SBF.

El SBF es una prueba utilizada para evaluar la capacidad de materiales biocerámicos para estimular químicamente la formación de hidroxiapatita (HA) en contacto con el fluido fisiológico. A los 3 días en SBF, todas las zeolitas SAPO-5 y Ca/Ca-SAPO-34 mostraron señales FTIR asociadas a la formación de la estructura de apatita. Sin embargo, a los 7 y 14

días, todas las zeolitas mostraron señales FTIR de la HA, siendo más intensas en las zeolitas modificadas con cationes extrared de calcio, lo cual se puede explicar considerando que el calcio es uno de los componentes principales de la HA ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$), por lo que los iones de Ca^{2+} liberados por la zeolita facilitan la mineralización de apatita. La formación de apatita también fue evidenciada en algunos casos mediante depósitos minerales detectados con microscopía SEM y por el aumento de los contenidos de calcio (y disminución de Al y Si) luego del tiempo de inmersión en SBF. Por lo tanto, la formación de apatita en la zeolita se puede explicar por la liberación de iones de calcio y fosfato de sus cristales que sufren una disolución parcial junto con la alta área superficial que ofrecen estos materiales para las reacciones químicas superficiales de precipitación de apatita. La capacidad de las zeolitas para inducir la formación de apatita no había sido hasta aquí bien demostrada. El 2015, Li et al. usando recubrimientos de zeolita MFI (sílice pura) sobre titanio detectó la formación de depósitos minerales con morfología de apatita mediante microscopía SEM después de 4 días en SBF⁵⁸, pero no confirmaron la estructura química de los depósitos mediante otra técnica. En el presente trabajo la composición sílicoaluminofosfato (grupos fosfatos), la alta área superficial de las zeolitas SAPO, las dimensiones nanométricas, junto con la presencia de cationes como calcio pueden explicar la mejorada mineralización de apatita presentada por estas zeolitas en SBF. La capacidad mostrada por las zeolitas SAPO para promover la formación de apatita es una propiedad deseada para las biocerámicas para su potencial aplicación en la reparación de tejido óseo.

7.3. Propiedades de degradación y capacidad de liberación de iones calcio y litio de las zeolitas.

En los ensayos de degradación se observó que todas las nanopartículas estudiadas presentaron cierto grado de degradación (~15 – 20 % en masa), particularmente las SAPO-34 y SAPO-5 modificadas con cationes extrared. En general las zeolitas tradicionales con composición aluminosilicato (AlSi) son materiales estables química y térmicamente, por lo tanto, poco solubles o degradables. En cambio, las zeolitas SAPO han demostrado tener una estructura menos estable químicamente y, por lo tanto, más soluble, debido a la hidrólisis que pueden sufrir sus enlaces -Si-O-Al- y -Si-O-P- incluso en condiciones normales⁶⁶.

Esta mayor reactividad de las estructuras SAPO explicaría la degradabilidad que presentaron en medio con pH fisiológico, lo cual es una propiedad deseada para su aplicación en procesos de regeneración ósea. La degradabilidad de las zeolitas SAPO debería también producir la liberación de especies solubles de silicio, las que se han demostrado que estimulan los procesos diferenciación osteogénica como ocurre con el vidrio bioactivo^{29,65}. En el ensayo de liberación de iones se observó que todas las zeolitas SAPO liberaron iones de Ca^{2+} y Li^+ al medio, sin embargo, las concentraciones de cationes liberados fue superior en SAPO-5 y SAPO-34 que contenían estos cationes de forma extrared. En el ensayo de liberación de calcio se observó que alrededor de las 3 horas las partículas con cationes extrared liberaron una concentración de $\sim 0,8$ mg/L, mientras que las partículas sin cationes extrared liberaron alrededor de $\sim 0,4$ mg/L. Estos niveles de liberación de calcio explican también que las partículas con cationes extrared hayan presentado una mayor formación de apatita en SBF. Un mayor potencial degradativo y una mayor liberación de cationes Ca^{2+} y Li^+ también se debería traducir en una mayor interacción de estos productos iónicos de disolución con las células, lo que podría estimular los procesos de proliferación y diferenciación celular.

7.4. Capacidad de adsorción de proteínas de las zeolitas.

Las zeolitas SAPO también presentaron alta capacidad para adsorber proteínas como fibrinógeno y albúmina. Respecto a la adsorción de fibrinógeno las zeolitas SAPO-5 y SAPO-34 no presentaron diferencias significativas. Sin embargo, las zeolitas SAPO-5 en general presentaron mayor capacidad de adsorción de albúmina respecto a las zeolitas SAPO-34, excepto cuando la SAPO-5 contenía litio extrared (Li/Li-SAPO-5). Aunque la zeolita SAPO-34 tiene mayor área superficial (~ 300 m²/g) que las zeolitas SAPO-5 (~ 100 m²/g), su alta área superficial está dada principalmente por el área *interna* dentro de los nanoporos de la zeolita, área que no es accesible para las macromoléculas de las proteínas. Por lo tanto, la adsorción de proteínas se explica por su adsorción en la superficie *externa* de los cristales de zeolita y por la presencia de espacios interpartículas. En este sentido, la forma de las isotermas de adsorción de N₂ de las zeolitas SAPO-5 mostraron mayor presencia de mesoporos que en las SAPO-34.

Estos mesoporos en realidad corresponden a espacios interpartículas (espacios entre los nanocristales de zeolita) que facilitan la adsorción de grandes moléculas de proteína y con forma globular como es el caso de la proteína albúmina (14 x 4 x 4 nm)^{94,95}. El fibrinógeno al ser una molécula más lineal y de menor diámetro (6,5 x 6,5 x 46 nm) posee menos limitaciones difusionales para acceder por los espacios interpartícula a la superficie de los cristales de SAPO-34⁹⁶. Estas diferencias de adsorción de albúmina versus fibrinógeno han sido reportadas también por nuestro grupo en otros tipos de materiales nanoporosos que generalmente distinguen la morfología y tamaño de las proteínas^{74,97}. La capacidad de adsorción de proteínas presentada por las zeolitas es una propiedad deseable en los biomateriales, ya que la adsorción de proteínas extracelulares es un proceso que precede y favorece la adhesión y proliferación celular en la superficie del material⁹⁸. Específicamente, proteínas extracelulares como fibronectina promueven la adhesión de células osteoprogenitoras mediante el dominio Arg-Gly-Asp (RGD), el cual se une a receptores transmembranas (integrinas)⁹⁹. En general materiales con alta capacidad de adsorción de proteínas, tiende a presentar una mejor adhesión y proliferación celular en su superficie, como fue posteriormente verificado en las zeolitas estudiadas.

7.5. Viabilidad y adhesión de células MC3T3 cultivadas con las zeolitas.

Las zeolitas SAPO mostraron ser citocompatibles con las células preosteoblásticas MC3T3. El ensayo MTS mostró que al día 3 no hay diferencias significativas de viabilidad celular entre el grupo control y las células incubadas con zeolitas. La serie de zeolitas SAPO-5 no provocaron pérdidas de viabilidad celular en ningún periodo de incubación. Aunque a los 7 días se observó una disminución de la viabilidad con las zeolitas SAPO-34, a los 14 días las células incubadas con las zeolitas Ca/Ca-SAPO-34 y Li/Li-SAPO-34 no presentaron diferencias respecto al control cultivado sin zeolita. Las diferencias de citocompatibilidad observadas en el día 7 entre las zeolitas SAPO-5 y SAPO-34 podría ser consecuencia de las menores dimensiones nanométricas y mayor dispersión de los cristales cúbicos de SAPO-34, a diferencia de los nanocristales de SAPO-5 que forman y se comportan como aglomerados micrométricos de mayor tamaño.

Varios estudios indican que la toxicidad de un nanomaterial puede ser provocada por factores relacionados al tamaño y forma de la partícula, su composición química o área superficial lo cual determina diversas respuestas intracelulares que afectan la viabilidad celular ¹⁰⁰. Sin embargo, en el presente trabajo se encontró que la modificación de las zeolitas con los cationes de Ca y Li permitieron producir partículas que no afectaron la viabilidad celular incluso hasta 14 días de incubación. Existen reportes en la literatura que destacan el rol del Ca^{2+} y del pH intracelular básico en la proliferación celular ¹⁰¹. En este estudio, la liberación iones Ca^{2+} y la alcalinidad producida por las zeolitas SAPO son características que pueden favorecer la proliferación celular.

La citocompatibilidad de las zeolitas SAPO fue también corroborada mediante los ensayos de adhesión celular, y el registro de imágenes con microscopia de fluorescencia y SEM. En estos ensayos fue posible comprobar que las células se adhieren con una alta densidad, una morfología muy extendida e interactuando íntimamente a través de filopodios con la superficie de las diferentes nanopartículas, lo cual confirma la inocuidad de los materiales sintetizados.

7.6. Capacidad de las zeolitas para inducir la diferenciación osteogénica de células MC3T3

La capacidad de las zeolitas para promover la diferenciación celular osteogénica se evaluó mediante la medición de la actividad de ALP. La enzima ALP es un marcador ampliamente utilizado para evaluar la diferenciación celular hacia linaje osteogénico, ya que esta enzima es producida cuando las células osteoblásticas se encuentran formando la matriz extracelular ósea ¹⁰². Los resultados mostraron que con todos los tipos de zeolitas se produjo un aumento de la actividad de ALP (especialmente evaluado con el ensayo NBT). Se encontró que incluso las zeolitas sin modificaciones con calcio y litio (SAPO-5 y SAPO-34) fueron capaces de estimular la diferenciación celular. Este efecto se podría atribuir a la topografía nanoporosa de las zeolitas. Se conoce que la diferenciación celular puede ser estimulada mediante mecanismos de mecanotransducción, es decir, mediante estímulos físicos provenientes de un material con una topografía particular ⁷⁰.

En este caso, las zeolitas SAPO-5 y SAPO-34 poseen una estructura formada por una red porosa tridimensional perfectamente ordenada compuesta por poros de 0,73 nm y 0,43 nm respectivamente, que podría generar estímulos mecánicos específicos. Sin embargo, la mayor actividad ALP se observó en las muestras modificadas con cationes extrared de calcio y litio (Ca/Ca-SAPO-5 y Ca/Ca-SAPO-34, Li/Li-SAPO-5 y Li /Li-SAPO-34), pero especialmente mayor en las zeolitas modificadas con ion litio. Estos resultados se explicarían por las mayores concentraciones de Li^+ y Ca^{2+} que estas zeolitas liberan al medio. El litio es un elemento que posee una reconocida capacidad osteoinductora. Se ha demostrado que la estimulación de células madre con ciertas concentraciones de iones Li^+ (5-10 mM), tienen la capacidad de regular la vía de señalización Wnt/ β -catenina mediante la inhibición de la enzima glucógeno sintasa quinasa-3 β (GSK-3 β). La activación de la vía Wnt/ β -catenina estimula la expresión de genes en el núcleo asociados al proceso de diferenciación osteogénica^{103,104}. Por su parte, el calcio presenta conocidas funciones en el control del metabolismo del hueso y la angiogénesis¹⁰⁵. Numerosos procesos celulares, tales como la migración y la diferenciación, dependen de la interacción con el microambiente, lo cual hace relevante el papel de los receptores de membrana, como el receptor sensor de calcio o Calcium Sensing Receptor (CaSR). Cuando el CaSR detecta altos niveles de calcio extracelular, los osteoblastos proliferan y se diferencian a osteocitos maduros^{106,107}. Los resultados demuestran que tanto las zeolitas SAPO-5 y SAPO-34 que presentan litio y calcio estructurales y extrared estimulan notoriamente la diferenciación osteogénica de células preosteoblásticas MC3T3, generando de este modo las propiedades osteoinductoras que se propusieron en la hipótesis de este trabajo.

Las partículas de zeolita SAPO con propiedades osteoinductoras podría ser de interés para desarrollar biomateriales más eficientes para la reparación de tejido óseo. Con la excepción del vidrio bioactivo, los actuales biomateriales utilizados en odontología están basados en autoinjertos óseos o biocerámicas (fosfato tricálcico, HA) que no presentan un mecanismo genético de estimulación ósea (osteoinducción), razón por la cual producen una reparación y no necesariamente la regeneración del tejido óseo provocada cuando existe osteoinductividad en el biomaterial.

Las propiedades osteoinductoras presentadas por las partículas SAPO podrían ayudar a mejorar la calidad del tejido regenerado, así como disminuir los tiempos requerido para la reconstrucción ósea. Con estos antecedentes, las partículas SAPO con morfología nanolaminar y propiedades osteoinductoras podrían dar pie al desarrollo de biomateriales más eficientes para la reparación de tejido óseo, en términos de formar hueso nuevo con mejores características histológicas en menores lapsos de tiempo. Esto permitiría, por ejemplo, mejorar la calidad ósea en el sitio receptor del biomaterial, reducir los tiempos de tratamiento y disminuir la tasa de fracasos consecuente a la instalación de implantes de titanio.

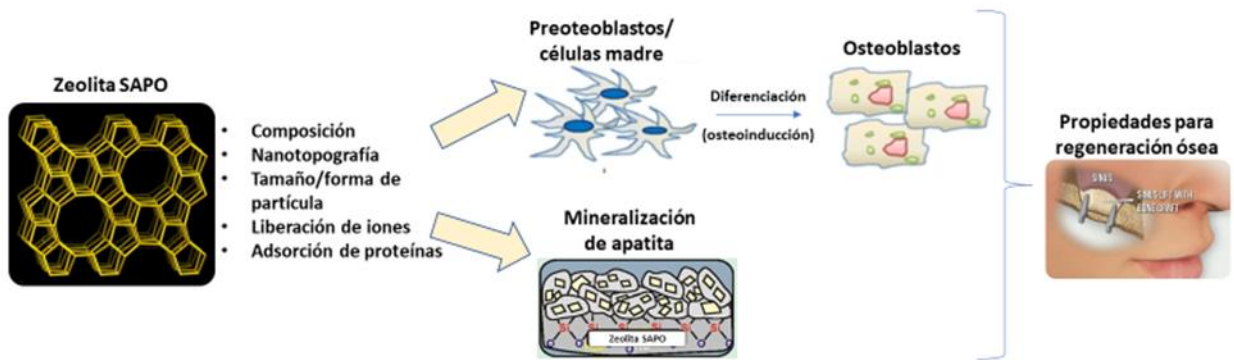


Figura 25. Representación esquemática de las principales características que le confieren a las zeolitas SAPO propiedades osteoinductoras, además de un ejemplo de su potencial aplicación en la regeneración de tejido óseo en el territorio maxilar.

En el contexto del proyecto en el que se enmarca este trabajo de tesis, las partículas de zeolita SAPO serán posteriormente utilizadas como un nano relleno en la elaboración de andamios poliméricos de ingeniería de tejido (IT) óseo, generando de este modo propiedades osteoinductoras a matrices poliméricas generalmente inertes o poco bioactivas. Estudios posteriores determinarán qué tipo de zeolita (SAPO-5 o SAPO-34) será la que permita el mejor desempeño como aditivo bioactivo para estas aplicaciones, ya que en la elaboración de los andamios de IT influyen variables como el tamaño, forma y concentración de las partículas y la manera en cómo estas variables afectan las propiedades mecánicas y de procesabilidad del polímero.

7 CONCLUSIONES

1. Fue posible la síntesis hidrotermal de zeolitas SAPO-5 y SAPO-34 modificadas con cationes intra y extrared de litio y calcio en su estructura, además presentando partículas de dimensiones nanométrica y morfología laminar.
2. Las zeolitas presentaron capacidad para promover la formación acelular de apatita tipo ósea en líquido fisiológico simulado, particularmente la zeolita SAPO-5 presentó una más rápida mineralización de apatita.
3. Las zeolitas SAPO mostraron ser citocompatibles, en especial aquellas modificadas con cationes extrared, no alterando la viabilidad celular a tiempos prolongados de incubación y favoreciendo la adhesión celular en su superficie.
4. Las nanozeolitas SAPO presentaron propiedades osteoinductoras, siendo capaces de estimular el proceso de diferenciación celular osteogénica en células preosteoblásticas, especialmente aquellas modificadas con iones de litio extrared.
5. Las propiedades osteoinductoras exhibidas por las nanopartículas de zeolita SAPO resultan de interés para estudios en el desarrollo de biomateriales óseos más avanzados y que conduzcan a tratamientos de reconstrucción ósea maxilofacial más eficientes.

8 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

1. Badylak, S. F. & Nerem, R. M. Progress in tissue engineering and regenerative medicine. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* vol. 107 3285–3286 (2010).
2. Ward, B., Brown, S. & Krebsbach, P. Bioengineering strategies for regeneration of craniofacial bone: a review of emerging technologies. *Oral Dis.* **16**, 709–716 (2010).
3. Alikhani, M. *et al.* High-Frequency Acceleration: Therapeutic Tool to Preserve Bone following Tooth Extractions. *J. Dent. Res.* **95**, 311–318 (2016).
4. Atwood, D. A. Reduction of residual ridges: a major oral disease entity. *J. Prosthet. Dent.* **26**, 266–279 (1971).
5. División de Prevención y Control de Enfermedades. Enfermedad Periodontal - DIPRECE. <https://diprece.minsal.cl/temas-de-salud/temas-de-salud/guias-clinicas-no-ges/guias-clinicas-no-ges-salud-bucal/salud-oral-en-adolescentes-de-10-19-anos-prevencion-diagnostico-y-tratamiento-de-la-enfermedad-periodontal/> (2017).
6. Haffajee, A. D. & Socransky, S. S. Microbial etiological agents of destructive periodontal diseases. *Periodontol. 2000* **5**, 78–111 (1994).
7. Pihlstrom, B. L., Michalowicz, B. S. & Johnson, N. W. Periodontal diseases. *Lancet (London, England)* **366**, 1809–1820 (2005).
8. Slots, J. & Chen, C. The oral microflora and human periodontal disease. *Med. Importance Norm. Microflora* 101–127 (1999) doi:10.1007/978-1-4757-3021-0_5.
9. Ramnarayan, B. K., Sowmya, K. & Rema, J. Management of Idiopathic Gingival Fibromatosis: Report of a Case ...: Ingenta Connect. *American Academy of Pediatric Dentistry* 431–436
<https://www.ingentaconnect.com/content/aapd/pd/2011/00000033/00000005/art00010> (2011).

10. Klemetti, E. A review of residual ridge resorption and bone density. *J. Prosthet. Dent.* **75**, 512–514 (1996).
11. Nemcovsky, C. E. & Serfaty, V. Alveolar ridge preservation following extraction of maxillary anterior teeth. Report on 23 consecutive cases. *J. Periodontol.* **67**, 390–395 (1996).
12. Wiesen, M. & Kitzis, R. Preservation of the alveolar ridge at implant sites - PubMed. *Periodontal Clin. Investig.* **20**, 17–20 (1998).
13. Campion, C. R., Chander, C., Buckland, T. & Hing, K. Increasing strut porosity in silicate-substituted calcium-phosphate bone graft substitutes enhances osteogenesis. *J. Biomed. Mater. Res. - Part B Appl. Biomater.* **97 B**, 245–254 (2011).
14. Hutchens, S. A., Campion, C., Assad, M., Chagnon, M. & Hing, K. A. Efficacy of silicate-substituted calcium phosphate with enhanced strut porosity as a standalone bone graft substitute and autograft extender in an ovine distal femoral critical defect model. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **27**, 1–12 (2016).
15. Mansour, A., Al-Hamed, F., Torres Garcia-Denche, J. & Tamimi, F. Alveolar Bone Grafting: Rationale and Clinical Applications. in *Dental Implants and Bone Grafts - 1st Edition* (eds. Alghamdi, H. & Jansen, J.) 43–71 (2019).
16. Mittal, Y., Jindal, G. & Garg, S. Bone manipulation procedures in dental implants. *Indian J. Dent.* **7**, 86 (2016).
17. Lewandrowski, K.-U., Gresser, J. D., Wise, D. L., Trantolo, D. J. & Hasirci, V. Tissue responses to molecularly reinforced polylactide-co-glycolide implants. *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* **11**, 401–414 (2000).
18. Soto Góngora, S. & Taxis González, M. G. *Revista cubana de estomatología. Revista Cubana de Estomatología* vol. 42 (Editorial Ciencias Médicas, 2005).
19. Goldberg, V. M. Natural History of Autografts and Allografts. in *Bone Implant Grafting* 9–12 (Springer London, 1992). doi:10.1007/978-1-4471-1934-0_2.

20. Calvo, R., Figueroa, D., Díaz-Ledezma, C., Vaisman, A. & Figueroa, F. Aloinjertos óseos y la función del banco de huesos. *Rev. Med. Chil.* **139**, 660–666 (2011).
21. Whang, P. G. & Wang, J. C. Bone graft substitutes for spinal fusion. *Spine J.* **3**, 155–165 (2003).
22. Sheikh, Z. *et al.* Natural graft tissues and synthetic biomaterials for periodontal and alveolar bone reconstructive applications: A review. *Biomaterials Research* vol. 21 (2017).
23. Brunello, G. *et al.* The Impact of Bioceramic Scaffolds on Bone Regeneration in Preclinical In Vivo Studies: A Systematic Review. *Materials (Basel)*. **13**, 1500 (2020).
24. El-Ghannam, A. Bone reconstruction: From bioceramics to tissue engineering. *Expert Review of Medical Devices* vol. 2 87–101 (2005).
25. Ginebra, M. P., Espanol, M., Maazouz, Y., Bergez, V. & Pastorino, D. Bioceramics and bone healing. *EFORT Open Rev.* **3**, 173–183 (2018).
26. Sheikh, Z. *et al.* Biodegradable materials for bone repair and tissue engineering applications. *Materials* vol. 8 5744–5794 (2015).
27. Shetty, V. & Han, T. J. Alloplastic materials in reconstructive periodontal surgery. *Dental Clinics of North America* vol. 35 521–530 (1991).
28. Jones, J. R. Reprint of: Review of bioactive glass: From Hench to hybrids. *Acta Biomaterialia* vol. 23 S53–S82 (2015).
29. Xynos, I. D., Edgar, A. J., Buttery, L. D. K., Hench, L. L. & Polak, J. M. Ionic products of bioactive glass dissolution increase proliferation of human osteoblasts and induce insulin-like growth factor II mRNA expression and protein synthesis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **276**, 461–465 (2000).
30. Reddi, A. H. Morphogenesis and tissue engineering of bone and cartilage: inductive signals, stem cells, and biomimetic biomaterials. *Tissue Eng.* **6**, 351–359 (2000).

42. Kulprathipanja, S. & James, R. B. Overview in Zeolites Adsorptive Separation . in *Zeolites in Industrial Separation and Catalysis* (ed. Kulprathipanja, S.) 173 (2010).
43. Laurino, C. & Palmieri, B. ZEOLITE: ‘THE MAGIC STONE’; MAIN NUTRITIONAL, ENVIRONMENTAL, EXPERIMENTAL AND CLINICAL FIELDS OF APPLICATION. *Nutr. Hosp.* **32**, 573–581 (2015).
44. QuimiNet. ¿Cuál es la estructura de las zeolitas? <https://www.quiminet.com/articulos/cual-es-la-estructura-de-las-zeolitas-2678324.htm> (2012).
45. ROTA MINING CORPORATION. What is Zeolite? <https://www.rotamining.com/what-is-zeolite/>.
46. Diguilio, E., Córdoba, A., Marchena, C. L., Renzini, M. S. & Pierella, L. Generación de mesoporosidad en zeolitas ZSM-11, BETA e Y por tratamiento alcalino. *Matéria (Rio Janeiro)* **23**, (2018).
47. Curi, A., Granda, W. J. V., Lima, H. M. & Sousa, W. T. Las Zeolitas y su Aplicación en la Descontaminación de Efluentes Mineros. *Inf. tecnológica* **17**, 111–118 (2006).
48. Langbein, T., Dathe, W., Deuerling, A. & Baum, R. P. Efficacy of Detoxsan® powder on diarrhea caused by gastrointestinal neuroendocrine tumors. *World J. Gastroenterol.* **25**, 2133–2143 (2019).
49. Pavelić, K. & Hadžija, M. Medical Applications of Zeolite. in *ZEOLITE SCIENCE AND TECHNOLOGY* (eds. Auerbach, S. M., Carrado, K. A. & Dutta, P. K.) (2003).
50. Colella, C. A critical reconsideration of biomedical and veterinary applications of natural zeolites. *Clay Miner.* **46**, 295–309 (2011).
51. Pavelić, S. K. *et al.* Critical review on zeolite clinoptilolite safety and medical applications in vivo. *Frontiers in Pharmacology* vol. 9 (2018).

52. Bedi, R. S., Beving, D. E., Zanello, L. P. & Yan, Y. Biocompatibility of corrosion-resistant zeolite coatings for titanium alloy biomedical implants. *Acta Biomater.* **5**, 3265–3271 (2009).
53. Bedi, R. S., Zanello, L. P. & Yan, Y. Osteoconductive and Osteoinductive Properties of Zeolite MFI Coatings on Titanium Alloys. *Adv. Funct. Mater.* **19**, 3856–3861 (2009).
54. Bedi, R. S., Chow, G., Wang, J., Zanello, L. & Yan, Y. S. Bioactive materials for regenerative medicine: Zeolite-hydroxyapatite bone mimetic coatings. in *Advanced Engineering Materials* vol. 14 200–206 (2012).
55. Hao, F., Zhang, C., Wu, L., Gao, Y. & Jiao, Y. Both silicalite-1/SiC foam and ZSM-5/SiC foam may serve as novel bone replacement materials. *Ann. Transl. Med.* **7**, 255–255 (2019).
56. Wang, S. *et al.* Fabrication of bioactive 3D printed porous titanium implants with Sr ion-incorporated zeolite coatings for bone ingrowth. *J. Mater. Chem. B* **6**, 3254–3261 (2018).
57. Yan, Y. & Bedi, R. S. ZEOLITE AND BONE MIMETIC ZEOLITE BASED COATINGS FOR BIOMPLANTS. (2011).
58. Li, Y., Jiao, Y., Li, X. & Guo, Z. Improving the osteointegration of Ti6Al4V by zeolite MFI coating. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **460**, 151–156 (2015).
59. McCusker, L. B., Olson, D. H. & Baerlocher, C. Atlas of Zeolite Framework Types. *Atlas Zeolite Framew. Types* (2007) doi:10.1016/B978-0-444-53064-6.X5186-X.
60. Kokubo, T., Kushitani, H., Sakka, S., Kitsugi, T. & Yamamuro, T. Solutions able to reproduce in vivo surface-structure changes in bioactive glass-ceramic A-W3. *J. Biomed. Mater. Res.* **24**, 721–734 (1990).
61. Hench, L. L. Bioceramics: From Concept to Clinic. *J. Am. Ceram. Soc.* **74**, 1487–1510 (1991).

62. Lin, K. S. K. *et al.* Mechanistic study of apatite formation on bioactive glass surface using ^{31}P solid-state NMR spectroscopy. *Chem. Mater.* **17**, 4493–4501 (2005).
63. Flanigen, E. M., Broach, R. W. & Wilson, S. T. Introduction. in *Zeolites in Industrial Separation and Catalysis* 1–26 (Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2010). doi:10.1002/9783527629565.ch1.
64. Wilson, T. S. Phosphate-Based Molecular Sieves: New Structures, Synthetic Approaches, and Applications. in *Introduction to Zeolite Science and Practice* (eds. Čejka, J., van Bekkum, H., Corma, A. & Schüth, F.) 105–108 (Elsevier, 2009).
65. Tsigkou, O., Jones, J. R., Polak, J. M. & Stevens, M. M. Differentiation of fetal osteoblasts and formation of mineralized bone nodules by 45S5 Bioglass® conditioned medium in the absence of osteogenic supplements. *Biomaterials* **30**, 3542–3550 (2009).
66. Lutz, W. *et al.* Hydrothermal stability of zeolite SAPO-11. *Microporous Mesoporous Mater.* **132**, 31–36 (2010).
67. Guth, J.-L. & Kessler, H. Synthesis of Aluminosilicate Zeolites and Related Silica-Based Materials. in *Catalysis and Zeolites* 1–52 (Springer Berlin Heidelberg, 1999). doi:10.1007/978-3-662-03764-5_1.
68. Arioka, M. *et al.* Acceleration of bone regeneration by local application of lithium: Wnt signal-mediated osteoblastogenesis and Wnt signal-independent suppression of osteoclastogenesis. *Biochem. Pharmacol.* **90**, 397–405 (2014).
69. Covarrubias, C., Durán, J. P. & Maureira, M. Facile synthesis of lithium carbonate nanoparticles with potential properties for bone repair applications – NanoBioMat.cl. *Materials Letters* 205–208 <https://nano-biomat.cl/2019/06/18/facile-synthesis-of-lithium-carbonate-nanoparticles-with-potential-properties-for-bone-repair-applications/> (2018).

70. Whitelock, J. M. & Melrose, J. Adhesion of Cells to Biomaterials. in *Wiley Encyclopedia of Biomedical Engineering* (John Wiley & Sons, Inc., 2006). doi:10.1002/9780471740360.ebs0028.
71. Greiner, J. F. *et al.* Natural and synthetic nanopores directing osteogenic differentiation of human stem cells. *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.* **17**, 319–328 (2019).
72. Kulangara, K., Yang, Y., Yang, J. & Leong, K. W. Nanotopography as modulator of human mesenchymal stem cell function. *Biomaterials* **33**, 4998–5003 (2012).
73. Baerlocher, C., McCusker, L. B. & Olson, D. H. *Atlas of Zeolite Framework Types - 6th Edition.* (2007).
74. Covarrubias, C. *et al.* The Effect of the Nanoscale Structure of Nanobioceramics on Their In Vitro Bioactivity and Cell Differentiation Properties. (2015) doi:10.1155/2015/526230.
75. Covarrubias, C., Quijada, R. & Rojas, R. Ethylene polymerization using dealuminated ZSM-2 zeolite nanocrystals as an active metallocene catalyst support. doi:10.1016/j.apcata.2008.06.023.
76. Covarrubias, C., Quijada, R. & Rojas, R. Ethylene polymerization using dealuminated ZSM-2 zeolite nanocrystals as an active metallocene catalyst support. <https://vivo.uc.cl/vivo/display/pHA38675> (2008).
77. Covarrubias, C., Gracia, F. & Palza, H. Catalytic degradation of polyethylene using nanosized ZSM-2 zeolite. *Appl. Catal. A Gen.* **384**, 186–191 (2010).
78. Gao, B. *et al.* In situ growth and assembly of microporous aluminophosphate nanosheets into ordered architectures at low temperature and their enhanced catalytic performance. *J. Mater. Chem. A* **3**, 7741–7749 (2015).

79. Sun, Q. *et al.* High performance nanosheet-like silicoaluminophosphate molecular sieves: Synthesis, 3D EDT structural analysis and MTO catalytic studies. *J. Mater. Chem. A* **2**, 17828–17839 (2014).
80. Sun, Q., Wang, N., Guo, G. & Yu, J. Ultrafast synthesis of nano-sized zeolite SAPO-34 with excellent MTO catalytic performance. *Chem. Commun.* **51**, 16397–16400 (2015).
81. Fernández-Murga, M. L. *et al.* Respuesta de preosteoblastos a compuestos de estroncio o calcio: proliferación, diferenciación, mineralización y respuesta génica global. *Rev. Osteoporos. y Metab. Miner.* **5**, 133–140 (2013).
82. Cadenas Martín, M. *et al.* Efectos de la estimulación mecánica en la comunicación entre células óseas. *Rev. Osteoporos. y Metab. Miner.* **11**, 12–18 (2019).
83. Corporation, P. CellTiter 96 ® Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay Instructions for Use of Products G3580, G3581 and G3582.
84. Labno, C. Two Ways to Count Cells with ImageJ. 1–5.
85. Treacy, M. M. J. & Higgins, J. B. Collection of Simulated XRD Powder Patterns for Zeolites Fifth (5th) Revised Edition. *Collect. Simulated XRD Powder Patterns Zeolites Fifth Revis. Ed.* (2007) doi:10.1016/B978-0-444-53067-7.X5470-7.
86. He, Y. R., Zhu, Y. L., Duan, Y., Zhang, M. & Jiang, J. Green Route To Grow Hierarchical SAPO-34 Crystal with Excellent Catalytic Performance in Methanol to Olefin Reaction. *Cryst. Growth Des.* **20**, 17–23 (2019).
87. Ashtekar, S., Chilukuri, S. V. V. & Chakrabarty, D. K. Small-pore molecular sieves SAPO-34 and SAPO-44 with chabazite structure: A study of silicon incorporation. *J. Phys. Chem.* **98**, 4878–4883 (1994).
88. Zhu, S. *et al.* Ultrathin nanosheets of molecular sieve SAPO-5: A new photocatalyst for efficient photocatalytic reduction of CO₂ with H₂O to methane. *Appl. Catal. B Environ.* **187**, 11–18 (2016).

89. Pechousek, J., Hermanek, M. & Hermankova, P. Quasi-isothermal decomposition: A way to nanocrystalline mesoporous-like Fe₂O₃ catalyst for rapid heterogeneous decomposition of hydrogen peroxide . *Artic. J. Mater. Chem.* (2010) doi:10.1039/c000632g.
90. Numpilai, T. *et al.* CO₂ Hydrogenation to Light Olefins Over In₂O₃/SAPO-34 and Fe-Co/K-Al₂O₃ Composite Catalyst. *Top. Catal.* **64**, 316–327 (2021).
91. Valizadeh, B., Askari, S., Halladj, R. & Haghmoradi, A. Effect of Synthesis Conditions on Selective Formation of SAPO-5 and SAPO-34. <http://dx.doi.org/10.1080/15533174.2013.768646> **44**, 79–83 (2013).
92. Hajfarajollah, H., Askari, S. & Halladj, R. Effects of micro and nano-sized SAPO-34 and SAPO-5 catalysts on the conversion of methanol to light olefins. *React. Kinet. Mech. Catal.* **2**, 723–736 (2014).
93. Sun, Q., Wang, N., Guo, G. & Yu, J. Ultrafast synthesis of nano-sized zeolite SAPO-34 with excellent MTO catalytic performance. *Chem. Commun.* **51**, 16397–16400 (2015).
94. Morales Hernández, Y., Cajamarca García, Y. N. & Arturo Calvache, J. E. Algoritmo de Matlab® para calcular isothermas de adsorción de Langmuir en ácidos carboxílicos con adsorbente sólido carbón activado y Amberlite IRA 67 como adsorbentes sólidos. *Educación Química* <https://www.revistas.unam.mx/index.php/req/article/view/64601/60254> (2018).
95. Cordero, M. R., Montero, U. C. & Murillo, N. CONCEPTOS GENERALES SOBRE LA ALBÚMINA HUMANA Y SU UTILIZACIÓN CLÍNICA. *Acta Med. Costarric.* 32–38.
96. Merck. Fibrinogen, Plasminogen-Depleted, Human Plasma. https://www.merckmillipore.com/CL/es/product/Fibrinogen-Plasminogen-Depleted-Human-Plasma,EMD_BIO-341578#anchor_PDS.

97. Eborá Inzunza, D. *et al.* Synthesis of nanostructured porous silica coatings on titanium and their cell adhesive and osteogenic differentiation properties. *J Biomed Mater Res Part A* **102**, 37–48 (2013).
98. Anselme, K. Osteoblast adhesion on biomaterials. *Biomaterials* **21**, 667–681 (2000).
99. Grzesik, W. J. & Robey, P. G. Bone matrix RGD glycoproteins: immunolocalization and interaction with human primary osteoblastic bone cells in vitro. *J. Bone Miner. Res.* **9**, 487–496 (1994).
100. Sohaebuddin, S. K., Thevenot, P. T., Baker, D., Eaton, J. W. & Tang, L. Nanomaterial cytotoxicity is composition, size, and cell type dependent. *Part. Fibre Toxicol.* **7**, (2010).
101. Schreiber, R. Ca²⁺ signaling, intracellular pH and cell volume in cell proliferation. *J. Membr. Biol.* **205**, 129–137 (2005).
102. Blair, H. C. *et al.* Osteoblast Differentiation and Bone Matrix Formation In Vivo and In Vitro. *Tissue Eng. Part B. Rev.* **23**, 268–280 (2017).
103. Klein, P. S. & Melton, D. A. A molecular mechanism for the effect of lithium on development. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **93**, 8455–8459 (1996).
104. Lenox, R. H. & Wang, L. Molecular basis of lithium action: Integration of lithium-responsive signaling and gene expression networks. *Mol. Psychiatry* **8**, 135–144 (2003).
105. Hoppe, A., Güldal, N. S. & Boccaccini, A. R. A review of the biological response to ionic dissolution products from bioactive glasses and glass-ceramics. *Biomaterials* **32**, 2757–2774 (2011).
106. Chattopadhyay, N. *et al.* Mitogenic Action of Calcium-Sensing Receptor on Rat Calvarial Osteoblasts. *Endocrinology* **145**, 3451–3462 (2004).

107. Ahlström, T. *et al.* Correlation between plasma calcium, parathyroid hormone (PTH) and the metabolic syndrome (MetS) in a community-based cohort of men and women. *Clin. Endocrinol. (Oxf)*. **71**, 673–678 (2009).