



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

**FABRICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE MEMBRANAS REABSORBIBLES  
HÍBRIDAS DE SÍLICE, GELATINA Y NANOPARTÍCULAS DE BIOVIDRIO TERCIARIO  
PARA REGENERACIÓN ÓSEA GUIADA MEDIANTE ELECTROSPINNING**

**TESIS PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTORA EN CIENCIAS DE LA INGENIERÍA,  
MENCIÓN CIENCIA DE LOS MATERIALES**

**DANIELA DEL CARMEN ACUÑA CONEJEROS**

**PROFESOR GUÍA:**

**FRANCK QUERO**

**MIEMBROS DE LA COMISIÓN:**

**ENRIQUE CERDA VILLABLANCA**

**JUAN VIVANCO MORALES**

**RODRIGO ESPINOZA GONZÁLEZ**

**ANDRÓNICO NEIRA CARRILLO**

Este trabajo ha sido financiado por la ANID beca de doctorado nacional N° 21191051

**SANTIAGO DE CHILE**

**2023**

# Resumen

El desarrollo de biomateriales para regeneración ósea guiada (ROG) continúa siendo un gran desafío, debido a la complejidad que conlleva replicar las funciones biológicas del hueso y tejidos circundantes. Además, de los riesgos a infecciones durante la fase de implantación. En este sentido, el objetivo principal de esta tesis doctoral pretende desarrollar membranas híbridas biocompatibles y biodegradables como una alternativa de gran potencial para la ROG.

En el presente trabajo se fabricaron membranas híbridas de sílice ( $\text{SiO}_2$ ), gelatina bovina (G) y óxido de polietileno (PEO) en distintas proporciones mediante electrospinning. Se sintetizaron nanopartículas de vidrio bioactivas terciarias (NpBV) y se incorporaron en el precursor de las membranas híbridas de sílice ( $\text{SiO}_2$ )-gelatina (G)-óxido de polietileno (PEO) durante el electrohilado. A partir de las mediciones de ángulo de contacto, se realizó un estudio estadístico que permitió establecer una influencia tanto geométrica como en la composición de las membranas. De los estudios celulares se encontró que las membranas electrohiladas desde el precursor 80 % $\text{SiO}_2$ -10 %G-8 %PEO-2 %NpBV eran bioactivas, no tóxicas contra las células madres del tejido de la pulpa dental (hDPSC) y poseían una capacidad significativamente mayor para la diferenciación osteogénica en comparación con el control y las otras membranas, lo que sugiere su idoneidad para aplicaciones en ingeniería de tejidos dentales.

En esta investigación se demostró que es posible, el diseño de una membrana híbrida mediante la incorporación de materiales orgánicos e inorgánicos, con capacidad para degradarse y potencial osteogénico para su uso en ROG, por ejemplo como barrera en aplicación de implante dental.

## **Dedicatoria**

Este trabajo se lo dedico a mis cinco hijos de cuatro patas, en especial a Pardito, quien me acompañó varias noches mientras escribía los avances de tesis.

## **Agradecimientos**

Agradezco a mis padres por darme la vida y cuidarme. A mi novio, amigo y compañero de vida César Aravena, quien me hace sentir amada cada día, me apoya y acompaña en cada nuevo desafío.

Agradezco a los miembros de la comisión y a mi profesor guía por ayudarme a llevar a término este trabajo de investigación. A las personas que conocí y experiencias vividas durante mis estudios de doctorado.

Agradezco a la beca de doctorado de la Facultad de Ciencias Físicas y Matemáticas de la Universidad de Chile que financió mis estudios de primer año y a la ANID por la beca de doctorado nacional N° 21191051.

# Tabla de Contenido

<b>1. Introducción</b>	<b>1</b>
1.1. Motivación . . . . .	1
1.2. Fundamentos y estado del arte . . . . .	7
1.2.1. Tejido óseo . . . . .	7
1.2.2. Hueso alveolar . . . . .	9
1.3. Ingeniería de tejidos óseos . . . . .	10
1.4. Biomateriales . . . . .	13
1.4.1. Biomateriales tipo andamio . . . . .	15
1.4.2. Biocompatibilidad . . . . .	16
1.4.3. Factores de crecimiento celular . . . . .	18
1.4.4. Respuesta al agua . . . . .	20
1.4.5. Efecto hidrofóbico . . . . .	21
1.4.6. Efecto hidrofílico . . . . .	22
1.4.7. Efecto de mojado de superficies . . . . .	22
1.4.8. Ángulo de contacto . . . . .	22
1.4.9. Biodegradación . . . . .	23
1.5. Biocerámicas y Biovidrios . . . . .	24
1.5.1. Hidroxiapatita . . . . .	24
1.5.2. Fosfato tricalcico ( $\beta$ -TCP) . . . . .	26
1.5.3. Vidrios Bioactivos . . . . .	26
1.6. Gelatina . . . . .	31
1.6.1. Fibras de gelatina . . . . .	34

1.7. Materiales híbridos . . . . .	35
1.7.1. Proceso sol-gel para la síntesis de híbridos . . . . .	36
1.7.2. Efecto del pH en el proceso sol-gel . . . . .	37
1.8. Fibras y biotextiles . . . . .	39
1.8.1. Electrospinning . . . . .	40
<b>2. Propuesta</b>	<b>43</b>
2.1. Hipótesis . . . . .	43
2.2. Objetivos . . . . .	44
2.2.1. Objetivo general . . . . .	44
2.2.2. Objetivos específicos . . . . .	44
<b>3. Metodología y procedimientos experimentales</b>	<b>45</b>
3.1. Producción de fibras de sílice, gelatina y óxido de polietileno mediante electrospinning . . . . .	45
3.1.1. Producción de membranas de sílice y óxido de polietileno mediante electrospinning . . . . .	45
3.1.2. Producción de membranas de sílice, gelatina y óxido de polietileno mediante electrospinning . . . . .	47
3.2. Síntesis de nanopartículas de biovidrio terciario (NpBV) . . . . .	48
3.3. Fabricación de membranas híbridas compuestas por sílice, gelatina bovina, óxido de polietileno y nanopartículas de biovidrio terciario . . . . .	50
3.4. Caracterización de los materiales desarrollados . . . . .	52
3.4.1. Caracterización química (composición y enlaces) . . . . .	52
3.4.2. Morfología y microestructura de los materiales fabricados . . . . .	53
3.4.3. Análisis del ángulo de contacto entre membrana y gota de agua (ensayo de humectabilidad) . . . . .	55
3.4.4. Medición de la porosidad aparente de las membranas . . . . .	55
3.4.5. Análisis estadístico de la covarianza (ANCOVA) entre la porosidad y composición de las membranas sobre el ángulo de contacto . . . . .	55
3.5. Formación de hidroxiapatita en fluido corporal simulado (SBF) . . . . .	56

3.6. Realización de cultivo celular en las membranas, pruebas de adhesión, crecimiento y diferenciación osteogénica. . . . .	57
3.6.1. Cultivo celular . . . . .	57
3.6.2. Viabilidad celular . . . . .	58
3.6.3. Diferenciación osteogénica . . . . .	60
3.6.4. Ensayos de biodegradación de las membranas . . . . .	60
<b>4. Resultados y discusión</b>	<b>62</b>
4.1. Membranas de SiO <sub>2</sub> -PEO y SiO <sub>2</sub> -G-PEO obtenidas mediante electrospinning	63
4.1.1. Caracterización química . . . . .	65
4.1.2. Determinación del contenido inorgánico de las membranas por análisis termogravimétrico TGA . . . . .	67
4.1.3. Estructura cristalina y morfología . . . . .	70
4.1.4. Análisis del ángulo de contacto entre membrana y gota de agua (ensayo de humectabilidad) . . . . .	78
4.1.5. Porosidad de las membranas . . . . .	80
4.1.6. Ensayos de viabilidad celular y diferenciación osteogénica . . . . .	81
4.1.6.1. Viabilidad celular . . . . .	81
4.1.7. Diferenciación osteogénica . . . . .	82
4.1.8. Biodegradación de las membranas . . . . .	84
4.2. Nanopartículas de biovidrio terciario (NpBV) . . . . .	88
4.2.1. Caracterización química . . . . .	88
4.2.2. Estructura cristalina y morfología . . . . .	89
4.2.3. Estudio de estabilidad térmica por análisis termogravimétrico TGA . . . . .	92
4.3. Membranas híbridas de SiO <sub>2</sub> -G-PEO-NpBV . . . . .	94
4.3.1. Incorporación de las NpBV en el precursor SiO <sub>2</sub> -G-PEO para formar fibras híbridas de SiO <sub>2</sub> -G-PEO-NpBV . . . . .	94
4.3.2. Caracterización química . . . . .	95
4.3.3. Estructura cristalina y morfología . . . . .	96
4.3.4. Observación de la incorporación de las NpBV en las fibras híbridas	98

4.3.5. Análisis del ángulo de contacto entre membrana y gota de agua (ensayo de humectabilidad) . . . . .	102
4.3.6. Porosidad de las membranas . . . . .	103
4.3.7. Análisis estadístico de la covarianza (ANCOVA) entre la porosidad y composición de las membranas sobre el ángulo de contacto . . .	105
4.3.8. Formación de hidroxiapatita en las membranas . . . . .	110
4.3.9. Ensayos de viabilidad celular y diferenciación osteogénica . . . . .	121
4.3.9.1. Viabilidad celular . . . . .	122
4.3.10. Diferenciación osteogénica . . . . .	123
<b>5. Conclusiones</b>	<b>127</b>
5.1. Resultados de la investigación . . . . .	129
5.2. Trabajos futuros . . . . .	130
<b>Bibliografía</b> . . . . .	<b>131</b>

# Indice de Tablas

1.1. Propiedades mecánicas del hueso cortical y trabecular . . . . .	9
1.2. Parámetros generales de electrospinning y efectos en la morfología de las fibras obtenidas . . . . .	41
3.1. Parámetros de trabajo específicos para el electrohilado de los precursores SiO <sub>2</sub> -G-PEO a distintas proporciones (90 %SiO <sub>2</sub> -10 %PEO, 85 %SiO <sub>2</sub> -5 %G-10 %PEO, 80 %SiO <sub>2</sub> -10 %G-10 %PEO, 70 %SiO <sub>2</sub> -20 %G-10 %PEO y 68 %SiO <sub>2</sub> -25 %G-7 %PEO) . . . . .	47
3.2. Parámetros de trabajo específicos para el electrohilado de los precursores SiO <sub>2</sub> -G-PEO-NpBV en las proporciones 80 %SiO <sub>2</sub> -5 %G-14 %PEO-1 %NpBV, 80 %SiO <sub>2</sub> -7 %G-12 %PEO-1 %NpBV y 80 %SiO <sub>2</sub> -10 %G-8 %PEO-2 %NpBV . . . . .	51
4.1. Diámetro promedio de las fibras observadas por microscopía óptica obtenidas a partir del electrohilado de los precursores 90 %SiO <sub>2</sub> -10 %PEO, 85 %SiO <sub>2</sub> -5 %G-10 %PEO, 80 %SiO <sub>2</sub> -10 %G-10 %PEO y 68 %SiO <sub>2</sub> -25 %G-7 %PEO . . . . .	65
4.2. Posición de las bandas de absorción y asignaciones de los espectros infrarrojos por transformada de Fourier (FTIR) para sílice, gelatina y óxido de polietileno (PEO) . . . . .	67
4.3. Estimación del contenido inorgánico correspondiente a las membranas y materiales (SiO <sub>2</sub> , G y PEO) (residuo en porcentaje) y sus temperaturas correspondientes a las cuales los residuos fueron determinados . . . . .	69
4.4. Ángulo de contacto entre la gota de agua y las membranas. . . . .	79

4.5. Tabla comparativa de materiales, concentración de lisozima y porcentaje de degradación obtenido a los 28 días . . . . .	87
4.6. Posición de las bandas de absorción y asignaciones del espectro infrarrojo por transformada de Fourier (FTIR) para las nanopartículas de biovidrio terciario (NpBV) . . . . .	89
4.7. Posición de las bandas de absorción y asignaciones de los espectros infrarrojos por transformada de Fourier (FTIR) para las membranas obtenidas desde los precursores 80 %SiO <sub>2</sub> -10 %G-10 %PEO, 80 %SiO <sub>2</sub> -5 %G-14 %PEO-1 %NpBV, 80 %SiO <sub>2</sub> -7 %G-12 %PEO-1 %NpBV y 80 %SiO <sub>2</sub> -10 %G-8 %PEO-2 %NpBV . . . . .	97
4.8. Ángulo de contacto entre la gota de agua y las membranas. . . . .	104
4.9. Coeficientes de correlación de Spearman entre las variables de estudio . . . . .	106
4.10. Análisis estadístico paso a paso de los materiales y combinaciones . . . . .	108
4.11. Coeficientes de correlación de Spearman entre las composiciones de las membranas 80 %SiO <sub>2</sub> -10 %G-10 %PEO (C1), 70 %SiO <sub>2</sub> -20 %G-10 %PEO (C2), 68 %SiO <sub>2</sub> -25 %G-7 %PEO (C3), 80 %SiO <sub>2</sub> -5 %G-14 %PEO-1 %NpBV (C4) y 80 %SiO <sub>2</sub> -7 %G-12 %PEO-1 %NpBV (C5) . . . . .	109
4.12. Tabla de materiales y porcentaje en peso de nanopartículas de vidrio bioactivo empleado para promover la diferenciación osteogénica . . . . .	125
4.13. Tabla comparativa de distintos materiales, técnica de obtención, medios suplementados y diferenciación osteogénica . . . . .	126
5.1. Desarrollo de actividades de difusión (presentaciones a congresos, charlas, seminarios, entre otros) durante el transcurso del doctorado . . . . .	129
5.2. Artículo publicado . . . . .	130

# Índice de Ilustraciones

1.1. Esquema ilustrativo de elevación del seno maxilar . . . . .	4
1.2. Esquema representativo del procedimiento de regeneración ósea guiada en la herida alveolar . . . . .	6
1.3. Esquema de la estructura jerárquica y composición del hueso en diferentes escalas . . . . .	8
1.4. Esquema de la sección longitudinal de un diente . . . . .	10
1.5. Diagrama de Ashby representando el módulo de Young en función de la densidad para materiales naturales y sintéticos . . . . .	16
1.6. Esquema de biocompatibilidad . . . . .	18
1.7. Adhesión celular . . . . .	19
1.8. Esquema del ángulo de contacto . . . . .	23
1.9. Esquema de formación de apatita . . . . .	25
1.10. Diagrama de Hench . . . . .	29
1.11. Esquema de interacción material-hueso . . . . .	30
1.12. Esquema de la estructura química de la gelatina . . . . .	31
1.13. Esquema ilustrativo de híbridos Clase I (A) y Clase II (B) con componentes orgánicas e inorgánicas . . . . .	36
1.14. Esquema ilustrativo de la formación de la red sol-gel de sílice . . . . .	37
1.15. Esquema ilustrativo de reacción para la hidrólisis y condensación catalizadas por (a) ácido y por base (b) de un precursor de alcóxido de silicio . . . . .	38
1.16. Esquema ilustrativo del efecto del pH del sobre el proceso sol-gel . . . . .	39
1.17. Esquema ilustrativo de componentes del sistema de electrospinning . . . . .	41

3.1. Diagrama de la preparación de los precursores SiO <sub>2</sub> -PEO para electrospinning . . . . .	46
3.2. Diagrama de la preparación de los precursores SiO <sub>2</sub> -G-PEO para electrospinning . . . . .	48
3.3. Diagrama de la preparación de las nanopartículas de biovidrio terciario . . . . .	49
3.4. Diagrama de calcinación (a) y polvo blanco y fino de NpBV (b) . . . . .	50
3.5. Diagrama ilustrativo de la preparación de los precursores SiO <sub>2</sub> -G-PEO-NpBV para electrospinning . . . . .	51
3.6. Diagrama de ciclo térmico aplicado a las membranas y materiales para determinar su contenido inorgánico . . . . .	53
3.7. Membranas recortadas en una placa de 48 pocillos para ensayo MTS (a y b) y membranas acondicionadas en medio de cultivo (c y d). . . . .	59
4.1. Fotografías macroscópicas de los materiales obtenidos a partir del precursor 90 %SiO <sub>2</sub> -10 %PEO tipo algodón (a) y membrana (b) . . . . .	63
4.2. Imágenes de microscopía óptica de las fibras obtenidas a partir del electrohilado de los precursores 90 %SiO <sub>2</sub> -10 %PEO (a), 85 %SiO <sub>2</sub> -5 %G-10 %PEO (b), 80 %SiO <sub>2</sub> -10 %G-10 %PEO (c) y 68 %SiO <sub>2</sub> -25 %G-7 %PEO (d) . . . . .	64
4.3. Espectros infrarrojos por transformada de Fourier (FTIR) de las membranas obtenidas desde los precursores 90 %SiO <sub>2</sub> -10 %PEO (lavada), 90 %SiO <sub>2</sub> -10 %PEO (sin lavar), 85 %SiO <sub>2</sub> -5 %G-10 %PEO, 85 %SiO <sub>2</sub> -15 %G, 80 %SiO <sub>2</sub> -10 %G-10 %PEO, 70 %SiO <sub>2</sub> -20 %G-10 %PEO y 68 %SiO <sub>2</sub> -25 %G-7 %PEO (A) y materiales 100 %SiO <sub>2</sub> , 100 %G y 100 %PEO (B) . . . . .	66
4.4. Curvas termogravimétricas (TGA) de las membranas obtenidas desde los precursores de composición 90 %SiO <sub>2</sub> -10 %PEO (lavada), 90 %SiO <sub>2</sub> -10 %PEO (sin lavar), 85 %SiO <sub>2</sub> -5 %G-10 %PEO, 80 %SiO <sub>2</sub> -10 %G-10 %PEO (lavada), 80 %SiO <sub>2</sub> -10 %G-10 %PEO (sin lavar), 70 %SiO <sub>2</sub> -20 %G-10 %PEO, 68 %SiO <sub>2</sub> -25 %G-7 %PEO (A) y de los materiales 100 %G y 100 %PEO (B) . . . . .	68

4.5. Relación entre el contenido sólido inorgánico teórico de los precursores con el contenido inorgánico experimental de las membranas determinado por TGA . . . . .	70
4.6. Difractogramas de las membranas fabricadas desde los precursores 90 %SiO <sub>2</sub> -10 %PEO (lavada), 90 %SiO <sub>2</sub> -10 %PEO (sin lavar), 85 %SiO <sub>2</sub> -5 %G-10 %PEO, 80 %SiO <sub>2</sub> -10 %G-10 %PEO (lavada), 80 %SiO <sub>2</sub> -10 %G-10 %PEO (sin lavar), 70 %SiO <sub>2</sub> -20 %G-10 %PEO y 68 %SiO <sub>2</sub> -25 %G-7 %PEO (A) y de los materiales 100 %SiO <sub>2</sub> , 100 %G y 100 %PEO (B) obtenidos por difracción de rayos X en polvo (DRX) . . . . .	71
4.7. Micrografías electrónicas de barrido con emisión de campo (FESEM), de las membranas obtenidas desde los precursores de 90 %SiO <sub>2</sub> -10 %PEO (lavada) (A y B) y 90 %SiO <sub>2</sub> -10 %PEO (sin lavar) (C y D). . . . .	72
4.8. Micrografías electrónicas de barrido con emisión de campo (FESEM), de las membranas obtenidas desde los precursores de 85 %SiO <sub>2</sub> -5 %G-10 %PEO (A y B), 80 %SiO <sub>2</sub> -10 %G-10 %PEO (sin lavar) (C y D) y 80 %SiO <sub>2</sub> -10 %G-10 %PEO (lavada) (E y F) . . . . .	73
4.9. Micrografías electrónicas de barrido con emisión de campo (FESEM), de las membranas obtenidas desde los precursores de 70 %SiO <sub>2</sub> -20 %G-10 %PEO (A y B) y 68 %SiO <sub>2</sub> -25 %G-7 %PEO (C y D). . . . .	74
4.10. 90 %SiO <sub>2</sub> -10 %PEO (sin lavar) (A), 90 %SiO <sub>2</sub> -10 %PEO (lavada) (B), 85 %SiO <sub>2</sub> -5 %G-10 %PEO (C), 80 %SiO <sub>2</sub> -10 %G-10 %PEO (sin lavar) (D), 80 %SiO <sub>2</sub> -10 %G-10 %PEO (lavada) (E), 70 %SiO <sub>2</sub> -20 %G-10 %PEO (F) y 68 %SiO <sub>2</sub> -25 %G-7 %PEO (G) . . . . .	75
4.11. Espectros de energía dispersiva de rayos X (EDX) de las membranas obtenidas a partir de los precursores de composición 90 %SiO <sub>2</sub> -10 %PEO (lavada) (a), 90 %SiO <sub>2</sub> -10 %PEO (sin lavar) (b), 85 %SiO <sub>2</sub> -5 %G-10 %PEO (c), 80 %SiO <sub>2</sub> -10 %G-10 %PEO (sin lavar) (d), 80 %SiO <sub>2</sub> -10 %G-10 %PEO (lavada) (e), 70 %SiO <sub>2</sub> -20 %G-10 %PEO (f) y 68 %SiO <sub>2</sub> -25 %G-7 %PEO (g)	77

4.12. Imágenes de ensayo de ángulo de contacto de las membranas obtenidas a partir de los precursores 90 %SiO <sub>2</sub> -10 %PEO (a), 85 %SiO <sub>2</sub> -5 %G-10 %PEO (b), 70 %SiO <sub>2</sub> -20 %G-10 %PEO (c), 68 %SiO <sub>2</sub> -25 %G-7 %PEO (d).	79
4.13. Porosidad de las membranas obtenidas a partir de los precursores 90 %SiO <sub>2</sub> -10 %PEO (m1), 85 %SiO <sub>2</sub> -5 %G-10 %PEO (m2), 70 %SiO <sub>2</sub> -20 %G-10 %PEO (m3) y 68 %SiO <sub>2</sub> -25 %G-7 %PEO (m4) . . . . .	80
4.14. Gráfico representativo de la viabilidad celular a los 7 y 14 días mediante ensayo MTS, de las células cultivadas en las membranas obtenidas desde los precursores 90 %SiO <sub>2</sub> -10 %PEO (m1), 85 %SiO <sub>2</sub> -5 %G-10 %PEO (m2), 70 %SiO <sub>2</sub> -20 %G-10 %PEO (m3) y 68 %SiO <sub>2</sub> -25 %G-7 %PEO (m4). Las barras representan la absorbancia medida a una longitud de onda de 490 nm. Diferencia estadísticamente significativa entre los grupos experimentales con el control (ns: no significativo) . . . . .	82
4.15. Gráfico representativo de la actividad de fosfatasa alcalina de las células cultivadas sin suplementos osteogénicos en membranas obtenidas desde los precursores 90 %SiO <sub>2</sub> -10 %PEO (m1), 85 %SiO <sub>2</sub> -5 %G-10 %PEO (m2), 70 %SiO <sub>2</sub> -20 %G-10 %PEO (m3) y 68 %SiO <sub>2</sub> -25 %G-7 %PEO (m4). Las barras representan la absorbancia medida a una longitud de onda de 405 nm después de 14 días de incubación. Diferencia estadísticamente significativa entre los grupos experimentales con el control (ns: no significativo) . . . . .	83
4.16. Fotografías de las membranas antes y después de la inmersión en solución de PBS con lisozima de las membranas obtenidas desde los precursores 90 %SiO <sub>2</sub> -10 %PEO (m1), 85 %SiO <sub>2</sub> -5 %G-10 %PEO (m2) y 80 %SiO <sub>2</sub> -10 %G-10 %PEO (m3), luego de 1, 7, 14, 21 y 28 días . . . . .	84
4.17. Resultados de biodegradación de las membranas obtenidas desde los precursores 90 %SiO <sub>2</sub> -10 %PEO (m1), 85 %SiO <sub>2</sub> -5 %G-10 %PEO (m2) y 80 %SiO <sub>2</sub> -10 %G-10 %PEO (m3) luego de 7, 14, 21 y 28 días . . . . .	86
4.18. Espectro infrarrojo por transformada de Fourier (FTIR) de las nanopartículas de biovidrio terciario (NpBV) . . . . .	89

4.19. Difractograma de las NpBV obtenido por difracción de rayos X en polvo (DRX). Las fases cristalinas corresponden a (○) $Na_2Ca_4(PO_4)_2SiO_4$ , (●) $Na_2Ca_3Si_6O_{16}$ , (*) $Na_2CaSiO_4$ , (□) $Ca_2SiO_4$ , (◇) $CaCO_3$ . . . . .	90
4.20. Micrografías electrónicas de barrido con emisión de campo (FESEM) (A y B) y espectroscopia de energía dispersiva de rayos X (EDX) (C) . . . . .	91
4.21. Micrografías electrónicas de transmisión (TEM) (A y B) e histograma de distribución de diámetro de las NpBV a partir de las imágenes TEM (C) . . . . .	92
4.22. Curva termogravimétrica (TGA) de las NpBV) . . . . .	93
4.23. Fotografía macroscópica del material obtenido a partir del precursor 80 %SiO <sub>2</sub> -10 %G-8 %PEO-2 %NpBV. . . . .	94
4.24. Micrografías electrónicas de barrido con emisión de campo (FESEM) de las fibras obtenidas desde el precursor 80 %SiO <sub>2</sub> -10 %G-10 %PEO a una magnificación 100000× (A) y 200000× (B) . . . . .	95
4.25. Espectros infrarrojos por transformada de Fourier (FTIR) de las membranas obtenidas desde los precursores 80 %SiO <sub>2</sub> -10 %G-10 %PEO, 80 %SiO <sub>2</sub> -5 %G-14 %PEO-1 %NpBV, 80 %SiO <sub>2</sub> -7 %G-12 %PEO-1 %NpBV y 80 %SiO <sub>2</sub> -10 %G-8 %PEO-2 %NpBV . . . . .	96
4.26. Difractogramas de las membranas fabricadas desde los precursores 80 %SiO <sub>2</sub> -10 %G-10 %PEO, 80 %SiO <sub>2</sub> -5 %G-14 %PEO-1 %NpBV, 80 %SiO <sub>2</sub> -7 %G-12 %PEO-1 %NpBV y 80 %SiO <sub>2</sub> -10 %G-8 %PEO-2 %NpBV. . . . .	97
4.27. Micrografías electrónicas de barrido con emisión de campo (FESEM) (A, B, C y D), histograma de distribución de diámetro (E) y espectro de energía dispersiva de rayos X (EDX) de las fibras obtenidas desde los precursores 80 %SiO <sub>2</sub> -5 %G-14 %PEO-1 %NpBV (F) . . . . .	99
4.28. Micrografías electrónicas de barrido con emisión de campo (FESEM) (A, B, C y D), histogramas de distribución de diámetro (E) y espectro de energía dispersiva de rayos X (EDX) de las fibras obtenidas desde los precursores 80 %SiO <sub>2</sub> -7 %G-12 %PEO-1 %NpBV (F) . . . . .	100

4.29. Micrografías electrónicas de barrido con emisión de campo (FESEM) (A, B, C y D), histograma de distribución de diámetro (E) y espectro de energía dispersiva de rayos X (EDX) de las fibras obtenidas desde los precursores 80 %SiO <sub>2</sub> -10 %G-8 %PEO-2 %NpBV (F) . . . . .	101
4.30. Micrografía electrónica de barrido con emisión de campo (FESEM) (A) e histograma de distribución de diámetro de las NpBV incorporadas en la superficie de las fibras de la membrana obtenida desde el precursor 80 %SiO <sub>2</sub> -10 %G-8 %PEO-2 %NpBV (B) . . . . .	102
4.31. Imágenes de ensayo de ángulo de contacto de las membranas obtenidas a partir de los precursores 80 %SiO <sub>2</sub> -10 %G-10 %PEO (a), 80 %SiO <sub>2</sub> -5 %G-14 %PEO-1 %NpBV (b), 80 %SiO <sub>2</sub> -7 %G-12 %PEO-1 %NpBV (c) y 80 %SiO <sub>2</sub> -10 %G-8 %PEO-2 %NpBV (d). . . . .	103
4.32. Porosidad de las membranas obtenidas a partir de los precursores 80 %SiO <sub>2</sub> -10 %G-10 %PEO (m1), 80 %SiO <sub>2</sub> -5 %G-14 %PEO-1 %NpBV (m2), 80 %SiO <sub>2</sub> -7 %G-12 %PEO-1 %NpBV (m3) y 80 %SiO <sub>2</sub> -10 %G-8 %PEO-2 %NpBV (m4) . . . . .	105
4.33. Gráfico categórico del análisis entre la variable explicativa porosidad y la variable de respuesta ángulo de contacto. La forma geométrica de los plots representan en el centro de la figura (línea horizontal) a la mediana y la muesca un intervalo de confianza del 95 %. . . . .	107
4.34. Gráfico del análisis entre las variables explicativas composición de las membranas 80 %SiO <sub>2</sub> -10 %G-10 %PEO (C1), 70 %SiO <sub>2</sub> -20 %G-10 %PEO (C2), 68 %SiO <sub>2</sub> -25 %G-7 %PEO (C3), 80 %SiO <sub>2</sub> -5 %G-14 %PEO-1 %NpBV (C4) y 80 %SiO <sub>2</sub> -7 %G-12 %PEO-1 %NpBV (C5) y la variable de respuesta ángulo de contacto . . . . .	109
4.35. Espectros infrarrojos por transformada de Fourier (FTIR) de las membranas formadas por los precursores 80 %SiO <sub>2</sub> -10 %G-10 %PEO (A), 80 %SiO <sub>2</sub> -5 %G-14 %PEO-1 %NpBV (B), 80 %SiO <sub>2</sub> -7 %G-12 %PEO-1 %NpBV (C) y 80 %SiO <sub>2</sub> -10 %G-8 %PEO-2 %NpBV tras inmersión en SBF durante 3, 7 y 14 días (D). . . . .	111

4.36. Difractogramas de las membranas fabricadas a partir de los precursores 80 %SiO <sub>2</sub> -10 %G-10 %PEO (A), 80 %SiO <sub>2</sub> -5 %G-14 %PEO-1 %NpBV (B), 80 %SiO <sub>2</sub> -7 %G-12 %PEO-1 %NpBV (C) y 80 %SiO <sub>2</sub> -10 %G-8 %PEO-2 %NpBV tras inmersión en SBF durante 3, 7 y 14 días (D). . . . .	112
4.37. Evolución del pH de las membranas obtenidas desde los precursores 80 %SiO <sub>2</sub> -10 %G-10 %PEO, 80 %SiO <sub>2</sub> -5 %G-14 %PEO-1 %NpBV, 80 %SiO <sub>2</sub> -7 %G-12 %PEO-1 %NpBV y 80 %SiO <sub>2</sub> -10 %G-8 %PEO-2 %NpBV tras inmersión en SBF durante 3, 7 y 14 días. . . . .	113
4.38. Micrografías electrónicas de barrido con emisión de campo (FESEM) de la membrana obtenida desde el precursor 80 %SiO <sub>2</sub> -10 %G-10 %PEO tras inmersión en SBF durante 3 (A y B), 7 (C y D) y 14 (E y F) días . . . . .	115
4.39. Micrografías electrónicas de barrido con emisión de campo (FESEM) de la membrana obtenida desde el precursor 80 %SiO <sub>2</sub> -5 %G-14 %PEO-1 %NpBV tras inmersión en SBF durante 3 (A y B), 7 (C y D) y 14 (E y F) días . . . . .	116
4.40. Micrografías electrónicas de barrido con emisión de campo (FESEM) de la membrana obtenida desde el precursor 80 %SiO <sub>2</sub> -7 %G-12 %PEO-1 %NpBV tras inmersión en SBF durante 3 (A y B), 7 (C y D) y 14 (E y F) días . . . . .	117
4.41. Micrografías electrónicas de barrido con emisión de campo (FESEM) de la membrana obtenida desde el precursor 80 %SiO <sub>2</sub> -10 %G-8 %PEO-2 %NpBV tras inmersión en SBF durante 3 (A y B), 7 (C y D) y 14 (E y F) días . . . . .	118
4.42. Micrografías electrónicas de barrido con emisión de campo (FESEM) de la membrana obtenida desde el precursor 80 %SiO <sub>2</sub> -10 %G-8 %PEO-2 %NpBV antes de la inmersión en SBF (A), después de 3 (B), 7 (C) y 14 días (D) . . . . .	119

4.43. Espectros de energía dispersiva de rayos X (EDX) y tabla de análisis elemental de las membranas obtenidas desde los precursores 80 %SiO <sub>2</sub> -10 %G-10 %PEO (a, b y c ), 80 %SiO <sub>2</sub> -5 %G-14 %PEO-1 %NpBV (d, e y f), 80 %SiO <sub>2</sub> -7 %G-12 %PEO-1 %NpBV (g, h, i) y 80 %SiO <sub>2</sub> -10 %G-8 %PEO-2 %NpBV (j, k, l) tras inmersión en SBF durante 3, 7 y 14 días . . . . .	120
4.44. Espectros de energía dispersiva de rayos X (EDX) y magnificación de la membrana obtenida desde el precursor 80 %SiO <sub>2</sub> -10 %G-8 %PEO-2 %NpBV tras inmersión en SBF durante 14 días con magnificación de 1000× (a) e in situ sobre una esfera de hidroxiapatita (b) . . . . .	121
4.45. Gráfico representativo de la viabilidad celular a los 7 y 14 días mediante ensayo MTS, de las células cultivadas en las membranas obtenidas desde los precursores 80 %SiO <sub>2</sub> -10 %G-10 %PEO (m1), 80 %SiO <sub>2</sub> -5 %G-14 %PEO-1 %NpBV (m2), 80 %SiO <sub>2</sub> -7 %G-12 %PEO-1 %NpBV (m3) y 80 %SiO <sub>2</sub> -10 %G-8 %PEO-2 %NpBV (m4). Las barras representan la absorbancia medida a una longitud de onda de 490 nm. Diferencia estadísticamente significativa entre los grupos experimentales con el control (*p<0.05 y **p<0.01) . . . . .	123
4.46. Gráfico representativo de la actividad de fosfatasa alcalina en ausencia de medio osteogénico de las células cultivadas en membranas obtenidas desde los precursores 80 %SiO <sub>2</sub> -10 %G-10 %PEO (m1), 80 %SiO <sub>2</sub> -5 %G-14 %PEO-1 %NpBV (m2), 80 %SiO <sub>2</sub> -7 %G-12 %PEO-1 %NpBV (m3) y 80 %SiO <sub>2</sub> -10 %G-8 %PEO-2 %NpBV (m4). Las barras representan la absorbancia medida a una longitud de onda de 405 nm después de 14 días de incubación. Diferencia estadísticamente significativa entre los grupos experimentales con el control (*p<0.05 y **p<0.01) . . . . .	124

# Capítulo 1

## Introducción

### 1.1. Motivación

De acuerdo con la encuesta ODONTOLOGÍA EN PANDEMIA 2021 realizada en Chile, un 70 % de la población no cuenta con acceso a la salud bucal y un 54,6 % de las personas mayores de 17 años tiene prevalencia de caries a lo largo de su vida [1].

En Chile, la salud bucal es una prioridad, siendo reconocida como parte fundamental del bienestar de las personas. Las enfermedades bucales son dentro de las más comunes, constituyendo un importante problema de salud pública por su alta prevalencia, impacto negativo en la salud bucal y sistémica en la población. Los factores de riesgo comunes de las enfermedades orales son el consumo de tabaco, alcohol y una dieta deficiente. Dentro de las distintas enfermedades, las principales causas de la pérdida de dientes son las caries dentales y la enfermedad periodontal. Un estudio realizado en el año 2018 por el Ministerio de Salud, muestra que en 2010 en el grupo de adultos de 35-44 años, un 20 % conserva su dentadura completa mientras que este porcentaje bajó a un 1 % en los adultos de 65 a 74 años. La población de 35 a 44 años tiene un promedio de 6,5 dientes perdidos mientras que en la población de 65 a 74 años este promedio es de 15,8 [2].

El estudio de preferencias sociales para la definición de Garantías Explícitas en Salud (GES) del año 2017, señala que la salud bucal es importante porque afecta el funciona-

miento social y limita a las personas en su desempeño público. La encuesta nacional de calidad de vida y salud realizada en 2006 mostró que un 37 % de la población mayor de 15 años declara que su salud bucal afecta su calidad de vida siempre o casi siempre. Los mayores de 20 años se ven más afectados que los más jóvenes, debido probablemente a que su daño bucal es mayor. Una década después, la tercera encuesta nacional de calidad de vida y salud desarrollada en 2015-2016 mostró cambios en la percepción de calidad de vida relacionada con la salud bucal, disminuyendo a 14 % el porcentaje de personas mayores de 15 años que considera que el estado de sus dientes y encía afecta su calidad de vida siempre o casi siempre. En cuanto a la edad, los adultos de 65 años y más son los que con mayor frecuencia ven afectada su calidad de vida debido a su estado de salud bucal (24 % declara siempre o casi siempre), mientras que los jóvenes de 15 a 19 son los que perciben con menor frecuencia que esto los afecta [3].

El proceso de recuperación de la pieza dental debe contar con características de funcionalidad y estética [4]. Cuando el tratamiento de elección es la colocación de un implante o una prótesis parcial fija, el mantenimiento de las dimensiones del reborde alveolar es de máxima importancia. La preservación del reborde alveolar es una técnica quirúrgica que se realiza en el momento de la extracción del diente, permitiéndole al cirujano conservar las dimensiones y contornos alveolares [5].

Actualmente, la estrategia más utilizada en implantología para la recuperación de una pieza dental es el implante de titanio debido a su baja densidad y excelente biocompatibilidad [6]. Sin embargo, cuando existe una pérdida de densidad ósea en el sitio a implantar y quedan espacios entre el implante y el sitio, esta característica biocompatible asociada a la formación espontánea de una capa proteica en su superficie promueve la colonización bacteriana, generando infección en los tejidos circundantes al implante [7]. Esta infección es potenciada durante la primera fase después de la implantación, donde la capacidad inmune del organismo se ve comprometida debido al trauma quirúrgico, convirtiéndose en el momento más propicio para la colonización bacteriana y formación de biopelícula [8]. Los tratamientos antibióticos de rutina utilizados en infecciones implantológicas, por

lo general, son incapaces de reducir la proliferación bacteriana, asociada a la capacidad de las bacterias de generar mecanismos de resistencia. Hasta ahora no existe una medida para eliminar la infección después que esta haya ocurrido y la única forma efectiva de erradicar el problema es la extracción del implante [9]. Es por esto que es de vital importancia tener un sitio adecuado y condiciones propicias previas a la colocación del implante para que el procedimiento quirúrgico sea exitoso.

Durante la extracción dental (Figura 1.1 a), es importante la utilización de técnicas quirúrgicas poco traumáticas para lograr preservar los tejidos periodontales. Cuando existe una extracción traumática, incluyendo resección ósea o fractura de la pared alveolar, el resultado es una concavidad bucal que se encuentra habitualmente en pacientes. Esto es debido a que, tras la pérdida o extracción dental, el hueso sufre un proceso de remodelación en donde antes existía una raíz dental y un diente, ahora existe un espacio vacío llamado alvéolo [10]. Este alvéolo, durante su cicatrización colapsa perdiendo gran volumen a lo ancho y a lo alto, provocando una pérdida del reborde alveolar. Cuando se presenta la ausencia del diente, el seno maxilar desciende en función del tiempo (Figura 1.1 b, c y d) produciéndose neumatización del seno maxilar, teniendo como consecuencia impedir la colocación del implante dental. En esta circunstancia, el procedimiento quirúrgico a realizar consiste en aumentar la altura del seno maxilar (Figura 1.1 e, f y g) [11].

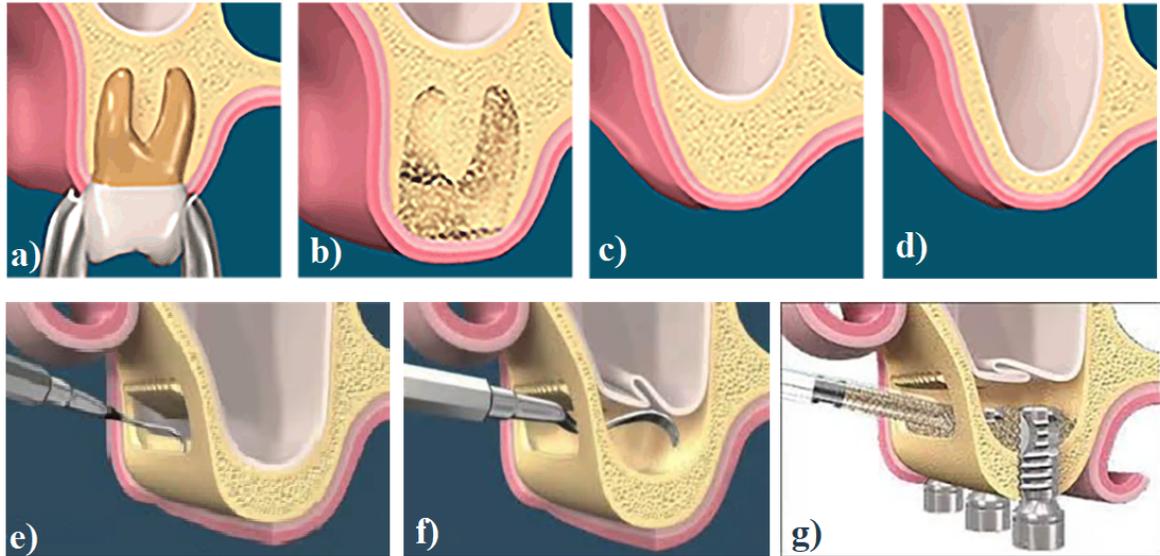


Figura 1.1: Esquema ilustrativo de elevación del seno maxilar [11].

La selección de los materiales regenerativos en preservación del reborde alveolar va a depender en gran medida de la morfología del defecto del hueso alveolar [12]. Cuanto más grande sea el defecto, mayor relevancia tiene el material a utilizar. Esto es debido a que el material de reemplazo debe ser capaz de mantener el espacio, como injertos óseos y membranas. Se han empleado diferentes materiales en los procedimientos de preservación del reborde alveolar como los injertos de hueso particulado autógeno y no-autógeno, tales como aloinjertos (mineralizados o desmineralizados), xenoinjertos y materiales aloplásticos (hidroxiapatita (HA), cristales bioactivos) [13] [14]. Con respecto a estos últimos, toman gran relevancia las nanopartículas de vidrio bioactivo, capaces de estimular la neoformación de hueso *in vivo* y promover la regeneración ósea más rápido que la HA sintética, debido a que es un tipo de vidrio biocompatible que tiene la capacidad de intercambiar los cationes presentes en su composición, permitiendo la formación de apatita en su superficie. Es por esto que ha sido considerado como un material con propiedades muy relevantes de reparación de tejido óseo y dental [15] [16].

Existen dos tipos de membranas utilizadas en implantología, las reabsorbibles y las no reabsorbibles. Las primeras están fabricadas de materiales como ácido poliláctico (PLA),

poliglicólidos (PGA), colágeno tipo I y III obtenidas del pericardio, piel o tendones de humano, porcino y bovino. La ventaja de estas membranas es que al ser implantadas se producen reacciones catabólicas que inducen su biodegradabilidad y posterior reabsorción por lo que no tienen que ser retiradas del sitio injertado [17]. Sin embargo, estas membranas son de rápida degradación y no pueden ser útiles para procedimientos de regeneración que requieren el mantenimiento de espacio físico por más de un mes [18]. La degradación se produce principalmente debido a reacciones de hidrólisis que reducen el valor del pH produciendo una condición ácida, que repercute negativamente en el proceso de regeneración ósea [19]. Las membranas no reabsorbibles constituidas por materiales como politetrafluoroetileno expandido (e-PTFE), politetrafluoroetileno de alta densidad (d-PTFE) reforzado con titanio y membranas de malla de titanio, tienen la desventaja de que requieren de un segundo procedimiento quirúrgico para ser retiradas [20].

Luego de una reciente extracción dental, una técnica para evitar la eventual pérdida ósea de hueso alveolar descrita anteriormente es la regeneración ósea guiada (ROG) (Figura 1.2). Esta consiste en rellenar la zona del hueco que dejó la extracción dental y colocar una membrana (biodegradable) sobre la lesión, formando una barrera de protección entre el tejido conectivo de la encía y el relleno, para permitir la formación de hueso nuevo [21].

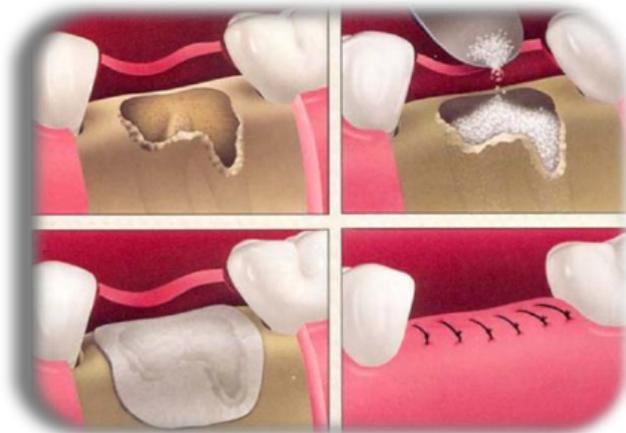


Figura 1.2: Esquema representativo del procedimiento de regeneración ósea guiada en la herida alveolar [14].

Existen membranas comerciales de colágeno reabsorbibles con duración de 4 a 6 meses utilizadas por los odontólogos como la Cytoplast® RTM, pero la desventaja es que tienen un elevado costo [22]. Mediante diversas técnicas y materiales se pueden fabricar membranas y rellenos para la ROG. Dentro de ellas se tienen membranas biodegradables fabricadas por cold casting basadas en materiales como gelatina y quitosano que contienen materiales de relleno como hidroxiapatita y nanopartículas de dióxido de titanio [21]. Otra técnica es solution blow spinning que sirve para producir nano y microfibras a partir de soluciones de materiales híbridos basados en biovidrio y gelatina [23]. Mediante electrospinning, se pueden electrohilar soluciones inorgánicas sol-gel a partir de vidrios bioactivos similares a algodón para regeneración ósea [176]. El electrospinning es una técnica que ha ganado popularidad en la última década, especialmente en el área de ingeniería de tejidos para la elaboración de andamios poliméricos de diversas características como nano y microfibras, híbridas, huecas, etc, obtenidas mediante modificación de parámetros de operación del equipo [193] [26].

## 1.2. Fundamentos y estado del arte

### 1.2.1. Tejido óseo

El tejido óseo o hueso es una estructura jerárquica compuesta de materiales inorgánicos y orgánicos, que cumple funciones de soporte estructural en el cuerpo y de protección ante cargas externas [27]. En otras palabras, el hueso puede considerarse un material compósito formado por una fase inorgánica y una fase orgánica [28]. La fase inorgánica corresponde aproximadamente entre un 70-60 % del tejido óseo y es reconocido cristalográficamente como mineral apatita, específicamente hidroxiapatita impura de baja cristalinidad  $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$ , la cual otorga la dureza que caracteriza al hueso [29]. El 30-40 % del tejido restante es la fase orgánica con un 90 % de colágeno tipo I y un 10 % de otras proteínas, brindando la flexibilidad al hueso [30] [31].

En la macroescala, el tejido óseo está constituido por un hueso cortical denso (o compacto) que envuelve un hueso trabecular (o esponjoso) macroporoso; vasos sanguíneos y células (osteoblastos, osteoclastos y osteocitos) están presentes en ambas estructuras y permiten que el hueso sea un material vivo que se remodela continuamente en respuesta a estímulos externos [27]. En la nanoescala, se encuentra la matriz extracelular ósea (MEC) compuesta por fibrillas de colágeno, otras proteínas y nanocristales de hidroxiapatita carbonatada (HCA) (Figura 1.3) [32].

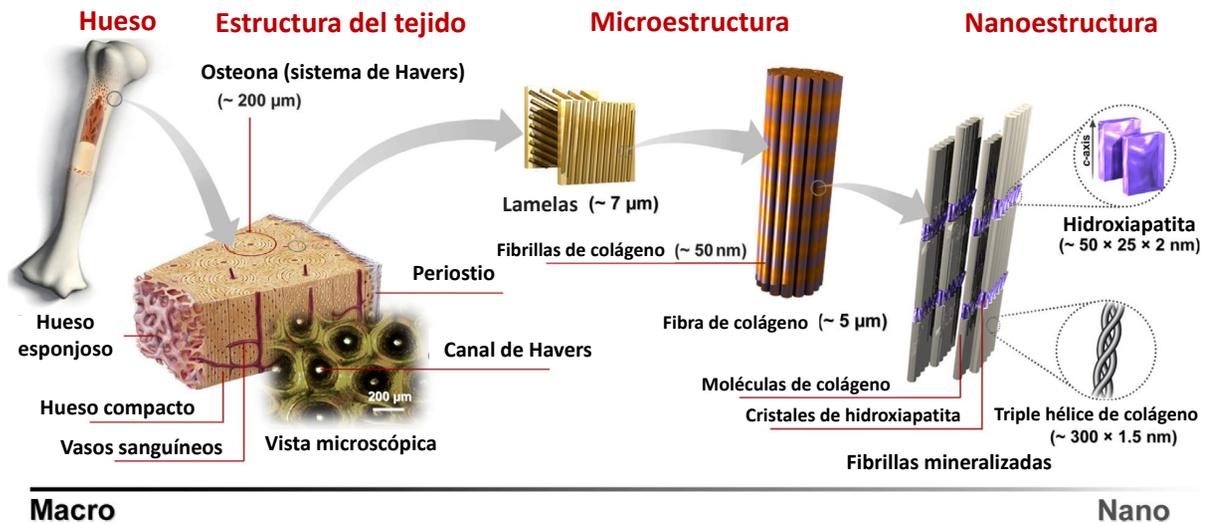


Figura 1.3: Esquema de la estructura jerárquica y composición del hueso en diferentes escalas [32].

En el tejido óseo se encuentran cuatro tipos de células: osteoprogenitoras, osteoblastos, osteocitos y osteoclastos. Las células osteoprogenitoras son células mesenquimales que poseen la capacidad de proliferar y diferenciarse en osteoblastos, los cuales construyen la matriz ósea [33]. Los osteoblastos se diferencian de los osteocitos en que estos permiten la transmisión de información a través de una red celular donde establecen contacto con otros osteocitos y osteoblastos, permitiendo la formación del hueso [34]. Para la remodelación del hueso, las principales células actuantes son los osteoclastos encargados de la resorción ósea [35]. La acción de los osteoclastos está dada por la disminución del pH en la zona a remodelar donde la liberación de iones hidronio genera un ambiente ácido que permite solubilizar los cristales de apatita. Luego, la acción de los osteoblastos produce la matriz ósea y así, se termina el proceso de remodelación [31].

La estructura del tejido óseo es altamente anisotrópica, es por esto que sus propiedades mecánicas dependerán de la densidad ósea y de su arquitectura. La densidad aparente del hueso cortical es  $1,85 \text{ g/cm}^3$  y la del hueso trabecular es  $0,30 \text{ g/cm}^3$  [30] [31]. Esta diferencia se refleja en las propiedades mecánicas como el módulo de Young  $E$ , la resistencia a la compresión  $\sigma_c$ , la resistencia a la flexión  $\sigma_f$  y la resistencia

a la tensión  $\sigma_t$  (Tabla 1.1).

Tipo de hueso	E (GPa)	$\sigma_c$ (MPa)	$\sigma_f$ (MPa)	$\sigma_t$ (MPa)	Porosidad (%)
Cortical	10 - 20	100 - 150	135 – 193	50 - 151	5-10
Trabecular	0,1 - 5	2 - 12	10 - 20	1- 5	50-90

Tabla 1.1: Propiedades mecánicas y porosidad del hueso cortical y trabecular [36].

## 1.2.2. Hueso alveolar

Dentro de los distintos tipos de huesos del cuerpo humano, se encuentra el de tipo alveolar. Este hueso ya sea del maxilar superior o de la mandíbula está encargado de soportar a los dientes, sus placas internas y externas, así como la lámina dura de las cavidades, que están compuestas de hueso cortical o compacto. La porción interna restante está compuesta de hueso esponjoso [37]. Como todos los tejidos mineralizados, el hueso alveolar está envuelto por células que regulan el entorno intraóseo y que son responsables de los procesos de aposición y reabsorción del hueso [38]. La reabsorción ocurre en todas las edades, como parte de la remodelación continua de la mandíbula y como resultado de procesos patológicos locales [39] [40].

El hueso alveolar corresponde a las porciones de los huesos maxilares que rodean y contienen los alvéolos dentarios [37]. La porción del hueso que limita directamente al alvéolo pertenece al periodonto de inserción, junto con el cemento y el ligamento periodontal, formando la articulación alveolodentaria o aparato de fijación del diente [41]. En la Figura 1.4 se observa el esquema de la sección longitudinal de un diente. La encía corresponde a la fibromucosa que rodea, protege y ayuda a la sujeción de los dientes. El ligamento periodontal esta compuesto por fibras de tejido conectivo que unen el cemento del diente con el hueso y permiten cierta movilidad dental (imperceptible) [42]. El cemento funciona como material protector del diente en la raíz y parte del diente donde se insertan las fibras de tejido conectivo del ligamento periodontal [43]. El hueso alveolar aloja a los dientes y su presencia depende de la existencia del diente. Es decir, si se pierde el diente,

el hueso alveolar se reabsorbe [39].

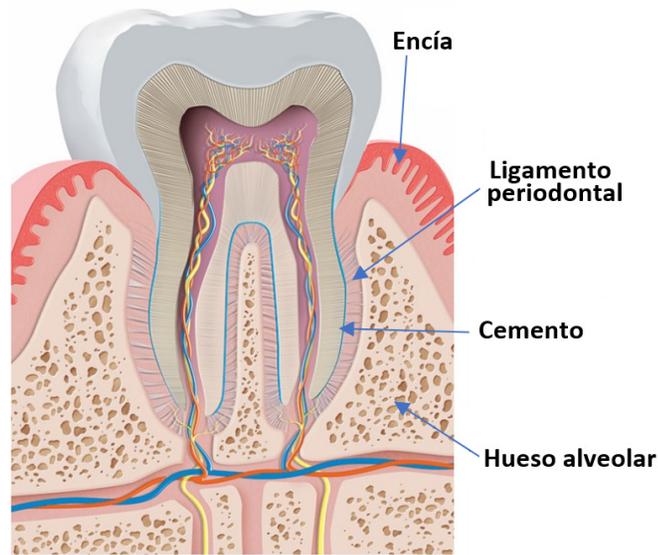


Figura 1.4: Esquema de la sección longitudinal de un diente [44].

### 1.3. Ingeniería de tejidos óseos

El término “ingeniería de tejidos” ha sido definido de diversas formas durante la historia. En la década de 1980, el término solo se refería a la manipulación quirúrgica de los tejidos y órganos o cuando se empleaban prótesis o biomateriales [45]. En 1989 Langer y Vaccanti definieron la ingeniería de tejidos como un campo interdisciplinario que aplica los principios de ingeniería y ciencias de la vida hacia el desarrollo de sustitutos biológicos para restaurar, mantener o mejorar la función del tejido u órgano completo [46] [47] [48]. Más tarde, Laurencin en 1999, incluyó en la definición el uso de biomateriales, células y otros factores para las funciones de reparación y regeneración [47] [49].

En 2010, Laurencin redefinió ingeniería de tejidos en términos de ingeniería regenerativa como “La integración de la ciencia de los materiales e ingeniería de tejidos con la biología celular y la medicina regenerativa hacia la regeneración de tejidos, sistemas de órganos o de órganos complejos” [47]. En la ingeniería de tejidos óseo existen tres estra-

tegrías terapéuticas para el tratamiento de tejido enfermo o perdido. La primera estrategia denominada regeneración *in situ* pretende regenerar el hueso con la incorporación de un andamio o soporte para que la regeneración se realice con las células del propio cuerpo. La segunda estrategia es la implantación de células recién aisladas donde se inyectan directamente en la región dañada con o sin andamio desplegable y la tercera es la implantación de un tejido similar al hueso ensamblado *in vitro* con células y andamios, el cual es implantado una vez alcanzada la madurez [45].

El andamio debe ser tridimensional, para que permita la integración y desarrollo del tejido favoreciendo el área superficial expuesta a comparación del volumen, aumentando la porosidad [50]. Debe, además, soportar el cultivo celular antes de ser incorporado al cuerpo o promover la osteoinducción, mediante el uso de factores de crecimiento, hormonas, fármacos, estímulos físicos, entre otros y por último debe funcionar fisiológicamente y cumplir con las propiedades exigidas en el defecto a rellenar, es decir, biodegradabilidad y propiedades mecánicas [46]. La velocidad de degradación y sus subproductos también deben ser adecuados, una alta velocidad de degradación no permite la regeneración completa del tejido y los subproductos serán absorbidos y eliminados por el cuerpo [52] [53].

Una regeneración exitosa requiere de andamios que induzcan el desarrollo de tejido tridimensional, imitando la arquitectura jerárquica de la matriz extracelular (MEC) [54]. Las células reconocen e interactúan con la topografía superficial a la que están expuestas. La interacción de las células con características nanotopográficas como poros, crestas, arboledas, fibras, nodos y sus combinaciones ha demostrado ser una importante modalidad de señalización en el control de los procesos celulares [55] [56]. La integración de señales nanotopográficas es especialmente importante en la ingeniería de tejidos complejos que tienen múltiples tipos de células y requieren interacciones célula-célula y matriz-célula definidas con precisión a una escala micrométrica y nanométrica [57]. Los avances en nanotecnología han generado una nueva caja de herramientas para la fabricación de andamios nanoestructurados específicos de tejido. Por ejemplo, los polímeros biodegradables como los poliésteres, las mezclas de polímeros y los materiales compuestos híbridos

se pueden electrohilar en matrices que imitan a la MEC compuestas de nanofibras, que proporcionan un área superficial específico alto para favorecer la unión celular, el crecimiento y la diferenciación celular [58].

Actualmente en la ingeniería de tejidos óseos se emplean auto-injertos, alo-injertos y biomateriales. Los auto-injertos son considerados idóneos en los procedimientos clínicos ya que son más eficaces para la regeneración ósea promoviendo la formación del hueso sobre su superficie por unión ósea directa induciendo a la diferenciación de células madres sin ninguna respuesta inmune [59]. Sin embargo, someter al paciente a la extracción del auto-injerto conlleva a la intervención quirúrgica, riesgo de infección o dolor a largo plazo presentándose una tasa de complicación entre el 13-30 % [46]. Otra de las alternativas exploradas ha sido los alo-injertos pero con estos aún existen barreras inmunológicas que tratar, prevaleciendo el riesgo de transmisión de enfermedades, además de escasez de donantes [46] [45].

Una de las alternativas más novedosas es la síntesis de biomateriales capaces de reemplazar a los auto-injertos y/o alo-injertos. Dentro de los materiales más populares empleados en ingeniería de tejidos óseos están los cerámicos de fosfato de calcio como la hidroxiapatita o el trifosfato de calcio [60]. Estos se caracterizan por tener semejanza a la composición del hueso, permitiéndole una mejor interacción. Los inconvenientes que, sin embargo, presentan los materiales cerámicos son su pobre resistencia a la tracción, a la compresión, a la flexión y susceptibilidad a la fractura [46]. Los materiales poliméricos también han tenido gran acogida en aplicaciones de ingeniería de tejidos óseos, principalmente por permitir la construcción de andamios porosos con diferentes propiedades, como por ejemplo una baja densidad y una gran área superficial para almacenar moléculas en los poros. [61] [62].

La falta de vascularización adecuada sigue siendo un gran desafío en ingeniería de tejidos. La angiogénesis es un proceso fisiológico en donde se forman vasos sanguíneos nuevos a partir de otros preexistentes [55]. El efecto de los materiales de membrana en la

angiogénesis es de suma importancia. En 1988, Dahlin propuso el protocolo de regeneración ósea guiada (ROG), para la colocación quirúrgica de una barrera de membrana que sujetara al hueso en el área y proporcionará el espacio necesario para la regeneración ósea [63]. El principal propósito de estas membranas es crear una barrera en el espacio del defecto del hueso para permitir que sólo las células progenitoras de la médula migren a este espacio, para evitar la invasión y crecimiento de células de tejido blando en el área defectuosa [20] [63].

## **1.4. Biomateriales**

Los biomateriales son cualquier material o una combinación de materiales, sintéticos o de origen natural, que pueden ser usados por cualquier periodo de tiempo, como un todo o como parte de un sistema, el cual trata o reemplaza algún tejido, órgano o función del cuerpo [64].

Existe una constante evolución de los materiales destinados a la regeneración de tejidos. La primera generación de biomateriales tenía como objetivo desarrollar un material con propiedades mecánicas suficientes para soportar las sobrecargas fisiológicas [65]. Aunque estos materiales proporcionan una solución eficaz a corto plazo, su eficacia está limitada a largo plazo debido a que son biológicamente inertes [66]. Esta limitación ha atraído el interés de la comunidad científica por la bioactividad, que define el efecto de un agente en un organismo o tejido vivo [52]. Esto, ha sido la clave para proponer una segunda generación de biomateriales bioactivos cuya interacción con el medio biológico mejora la respuesta, degradándose progresivamente en el nuevo tejido formado [67]. Esta estrategia permite el diseño de un biomaterial específico para una aplicación clínica particular y es un ejemplo de ingeniería tisular in situ adecuado para el desarrollo de sustitutos óseos, fabricados con materiales cerámicos tales como hidroxiapatita y vidrio bioactivo que son biológicamente activos y reabsorbibles [68]. La evolución y avances tecnológicos han llevado al desarrollo de biomateriales de tercera generación que bus-

can estimular una respuesta celular específica a nivel molecular y están compuestos por materiales más complejos que combinan cerámicas, proteínas específicas, biopolímeros y células osteogénicas. La principal característica de estos materiales es que activan el proceso de regeneración a nivel biomolecular [69].

La selección de un material a utilizar en aplicaciones a pacientes debe contar con los siguientes aspectos: materiales, química del relleno, química de la superficie, rugosidad de la superficie, energía superficial, cargas superficiales, estabilidad química, química de productos de degradación, características físicas de los productos de degradación, tamaño, forma, módulo de Young, tipo de tejido y ubicación. En relación al paciente influye la edad, sexo, estado general de salud y técnica quirúrgica [70].

Los materiales poliméricos, surgieron en 1920 cuando Staudinger llegó a la conclusión de que el almidón, caucho natural y celulosa están compuestos por cadenas gigantes de átomos de carbono unidos por enlaces covalentes [71]. Sin embargo, el término solo fue aceptado hasta 1930 cuando W. H. Carothers sintetizó polímeros lineales [72].

Los biopolímeros empleados para aplicaciones médicas se pueden clasificar en inertes y bioactivos según su función y en sintéticos y naturales según su origen [73]. Los inertes son utilizados en aplicaciones donde el material está en el cuerpo por largo tiempo y no experimentan ningún cambio químico [70]. Los polímeros bioactivos se caracterizan por estimular procesos celulares. Aquellos de origen natural como colágenos, polisacáridos, fibrinas, alginatos, quitina y quitosano se caracterizan por tener actividad biológica innata [72].

La síntesis de polímeros permite ajustar y diseñar el material de acuerdo a las necesidades, por ejemplo cambiar los pesos moleculares, configuración y conformación de cadenas poliméricas, la tasa de degradación, entre otros [74]. Los polímeros biodegradables y conductores han tenido mucha acogida en la ingeniería de tejidos óseos [75]. Los términos “polímeros biodegradables” indican que un polímero por medio

de reacciones químicas en el cuerpo se convierte poco a poco en material soluble o biodegradable por el organismo [76]. En ingeniería de tejidos óseos, el material se sustituye gradualmente con el tiempo con el hueso normal, y la restauración ósea no se ve obstaculizada por la presencia del material [74] [72].

### **1.4.1. Biomateriales tipo andamio**

Un enfoque alternativo a los biomateriales mencionados considera el desarrollo de materiales tipo andamio (scaffold). Las características de estos materiales tales como, control de su arquitectura, su adecuación a la forma del sitio donde será implantado y la porosidad han facilitado la proliferación y migración celular y un adecuado transporte de nutrientes entre los poros interconectados [77]. La alta porosidad de estas estructuras ha permitido mejorar las propiedades osteoconductoras del material, facilitando el proceso natural de formación de hueso dañado, siendo portadores eficientes de células productoras de hueso [78]. No obstante, las propiedades mecánicas de estos andamios se ven disminuidas en la elaboración de estructuras porosas; causado por la estructura de baja compactación [79]. Es esta pérdida en resistencia mecánica la que ha limitado el uso de materiales poliméricos porosos. Con el objetivo de mejorar la bioactividad y la resistencia mecánica, se ha estudiado la incorporación de partículas y nanopartículas cerámicas como hidroxiapatita, fosfato de calcio y Bioglass, a fin de mejorar las propiedades mecánicas de estos materiales [80] [81]. Aún cuando la incorporación de partículas y nanopartículas cerámicas muestran un aumento en las propiedades mecánicas de polímeros porosos, no es suficiente cuando se compara con las propiedades mecánicas del hueso natural [36]. Boccaccini y colaboradores en un análisis de los trabajos realizados en la última década, informan que los esfuerzos realizados para mejorar las propiedades mecánicas de los polímeros a través de la incorporación de nanopartículas cerámicas no han sido exitosos. Esto, considerando que las propiedades mecánicas son marcadamente inferiores que aquellas del hueso natural, cortical y trabecular [82].

El diagrama de Ashby mostrado en la Figura 1.5 relaciona el valor del módulo de Young

con la densidad de distintos materiales naturales y sintéticos. Los círculos rojos muestran la ubicación del hueso cortical y trabecular.

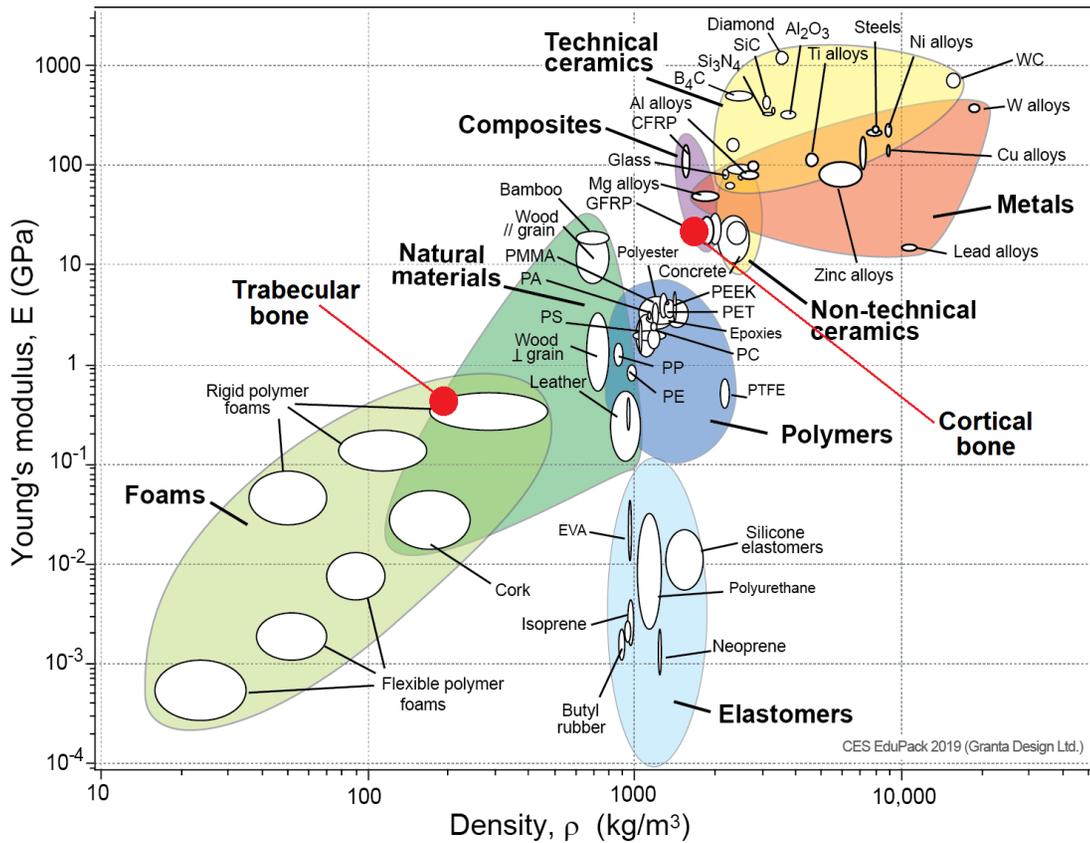


Figura 1.5: Diagrama de Ashby representando el módulo de Young en función de la densidad para materiales naturales y sintéticos [83].

Estos antecedentes, demuestran la importancia de estudiar y evaluar estrategias que permitan mejorar sustancialmente las propiedades mecánicas de los polímeros tipo andamio a fin de que estos, puedan ser potencialmente usados como implantes óseos.

### 1.4.2. Biocompatibilidad

El concepto de biocompatibilidad ha evolucionado considerablemente en los últimos 100 años. Antes de 1950, la mayoría de los implantes fracasaban debido al desconocimiento de la biocompatibilidad y esterilización [84]. Antiguamente no se tomaba en

cuenta las necesidades específicas relacionadas a la química del implante, la pérdida de masa, la forma, las propiedades mecánicas o el diseño requerido [85]. Los primeros estudios, realizados en 1829, empleaban implantes de oro, plata, plomo y platino, siendo este último bien tolerado [86]. Los ensayos con polímeros comenzaron posteriormente, principalmente por la disponibilidad de éstos. Los primeros polímeros fueron, implantes de celofán (derivado de celulosa) para aplicaciones cardíacas, fabricados a fines de la década de 1930 y posteriormente los implantes de nylon y poli(metil metacrilato) [87]. El polietileno también fue probado cerca de 1950, y se reportó que producía solo una leve reacción de cuerpo externa, atribuida a su nivel de pureza [88]. Algunos plásticos como el policloruro de vinilo (PVC) de los que se reportaba una fuerte reacción foránea fueron descartados por su nivel de exudación. Asimismo, descubrieron que el teflón tenía muy baja reacción de cuerpo externo [69].

La biocompatibilidad es la habilidad de un material para desempeñarse con una apropiada respuesta del huésped (organismo que alberga a otro en su interior). La respuesta del huésped es la respuesta del organismo huésped (local o sistémica) hacia el material implantado en una determinada aplicación [89]. La biocompatibilidad es un fenómeno de superficie (Figura 1.6) y esta debe contar con una topografía micrométrica y nanométrica produciendo una porosidad y rugosidad adecuadas para la incorporación celular que se producirá al implantarlo [90]. Otro factor importante es la evaluación de la citotoxicidad de los materiales, destinados a la fabricación de dispositivos médicos, con la finalidad de investigar los riesgos biológicos potenciales mediante la observación de reacciones o eventos adversos inesperados [91]. La norma ISO 10993 se refiere a la seguridad en el uso de dispositivos y materiales médicos y está destinada a evaluar la respuesta biológica de los materiales o dispositivos, como parte de la evaluación general y el desarrollo de dispositivos [92].

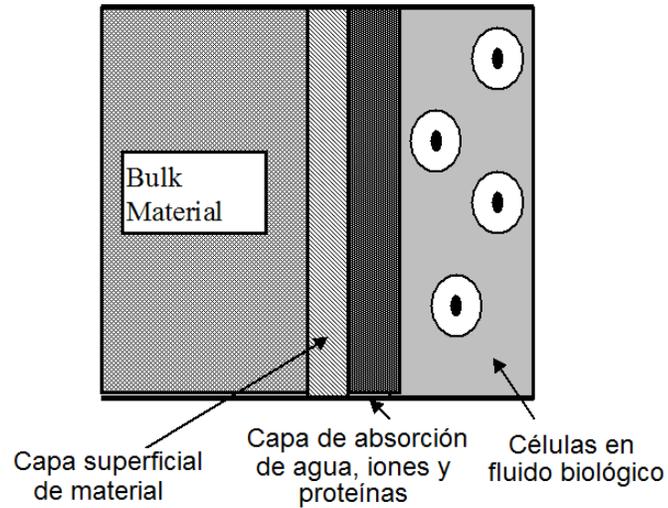


Figura 1.6: Representación esquemática de biocompatibilidad [92].

### 1.4.3. Factores de crecimiento celular

Una comprensión de los detalles del entorno a la escala micrométrica y nanométrica es esencial para diseñar biomateriales que imiten el medio celular natural. Muchas características del entorno local tienen profundas influencias sobre la adhesión celular, proliferación y la diferenciación. Es fundamental tener en cuenta que pequeñas diferencias en la microestructura pueden tener impactos de macroescala en la función del tejido (Figura 1.7) [93].

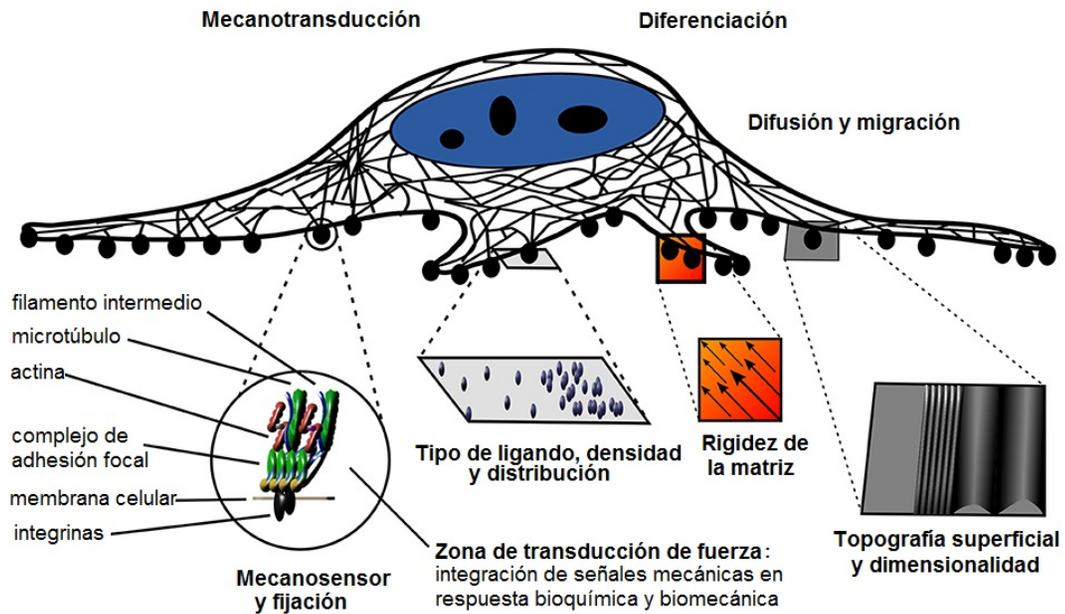


Figura 1.7: Esquema de la influencia del entorno físico y bioquímico local sobre el destino y la función celular [93].

Los factores de crecimiento son sustancias que se encuentran naturalmente en el cuerpo y son las encargadas de regular la respuesta celular [94]. Actualmente el diseño de nanomateriales y creación de estímulos para guiar el comportamiento celular se encuentran en desarrollo. Un estímulo físico se convierte en un estímulo bioquímico que culmina en la alteración fisiológica de células y tejidos [95]. Se pensaba que esto sólo ocurría en huesos (respuesta a la carga mecánica), posteriormente se ha demostrado que este fenómeno ocurre también en otros tejidos como cartílago y vasos sanguíneos [96]. Los genes relacionados con la inflamación en la proliferación de las células endoteliales (ECs) son reguladas después de exponer las ECs a tensiones de corte laminar de aproximadamente  $12 \text{ dyn/cm}^2$ . Los esfuerzos cortantes aumentan la concentración de calcio libre intracelular dando lugar a una serie de mecanismos que desencadenará en la producción de osteoblastos, condrocitos, células madre mesenquimales (CMM) y ECs [93].

El crecimiento y remodelación de tejido óseo cuenta con cuatro etapas para su desarrollo:

1. El primer paso de "acoplamiento" consiste en la conversión de la fuerza física

aplicada a una segunda fuerza física detectada por las células [97].

2. El segundo paso corresponde a la "mecanotransducción" encargada de convertir el estímulo físico primario en una respuesta eléctrica, química o bioquímica [98].
3. El el tercer paso corresponde a la "transducción de señales" que involucra la conversión de la señal bioquímica en otras que dan inicio a factores bioquímicos. Estos producen reorganización de citoesqueleto y sitios de adhesión [99].
4. El último paso corresponde a la "respuesta celular final". Esta etapa completa la conversión del estímulo físico en una respuesta final a nivel de tejido para su posterior diferenciación [100].

#### **1.4.4. Respuesta al agua**

El agua es un componente importante en cualquier proceso relacionado con biomateriales. El andamio debe ser poroso e insoluble en agua a una temperatura de  $37^{\circ}C$ , simulando condiciones *in vitro*, en el cuerpo humano. Además, este debe ser capaz de conservar su estructura durante y después del protocolo de acondicionamiento para el cultivo celular [101].

El cuerpo humano adulto está compuesto por aproximadamente un 60% de agua. Este es el componente más abundante de las células entre un 70-80% y corresponde al principal constituyente del fluido intersticial. Las células mueren en caso de ausencia de agua, debido a que estas se encuentran suspendidas en fluidos como la sangre [102]. Se debe tener en cuenta también sus propiedades químicas y la dimensión de las moléculas de agua que es de unos  $3 \text{ \AA}$ , lo que facilita que pueda entrar a casi cualquier espacio que se lo permita [103].

Debido a la polaridad del agua y a su habilidad para formar puentes de hidrógeno, es un buen disolvente para sustancias químicas polares. La mayoría de las reacciones químicas importantes para la vida se realizan en un ambiente acuoso dentro de las células

y la capacidad del agua para disolver una amplia variedad de moléculas es fundamental para que dichas reacciones puedan llevarse a cabo [104]. La energía para romper uno de estos enlaces es similar a la energía transferida por colisiones atómicas, por lo que los enlaces no son fijos, aunque la estructura general es relativamente ordenada [105]. La molécula de agua tiene dos dipolos de carga marcados, de esta forma, puede actuar como ácido y base de Lewis [103]. No obstante, en estados completos, el agua no está completamente acoplada en pares ácido-base, por lo que estos enlaces están libres para participar en otras reacciones químicas [104].

Un biomaterial tipo andamio debe considerar características de hidrofiliidad debido a que el medio en el cual estará interactuando con las células es acuoso. En este trabajo se estudiará el efecto hidrofóbico e hidrofílico de las membranas para conocer su porcentaje de biodegradabilidad y su posterior desempeño de células cultivadas en estas.

#### **1.4.5. Efecto hidrofóbico**

El efecto hidrofóbico se relaciona con la tendencia relativamente no polar de las moléculas de permanecer juntas en soluciones acuosas, es decir que son insolubles en agua [106]. Estas interacciones son importantes en procesos de interacción enzima-sustrato, ensamble de lipidos en biomembranas, agregación de surfactantes, formación de micelas, lamelas, vesículas, efectos cinéticos del solvente, etc [107]. El fenómeno hidrofóbico tiene que ver con la interacción entre el agua, intrínsecamente polar, y un componente apolar o no polar. Dado que las interacciones electroquímicas entre la molécula polar y apolar no son tan fuertes, la estabilidad relacionada con la mínima energía de enlace libre es mayor cuando hay mayor cantidad de puentes de hidrógeno ocupados [108]. De esta manera, se agregan los componentes polares entre ellos y los componentes apolares entre ellos [109].

### 1.4.6. Efecto hidrofílico

La hidrofilia se refiere al comportamiento de algunos solventes que compiten con las moléculas de agua en la obtención y generación de puentes de hidrógeno [110]. Es decir, su comportamiento de ácido o base de Lewis es mayor que el del agua, por lo que hay mayor estabilidad en esta unión que en la unión entre moléculas de agua [103]. Algunos ejemplos de solutos hidrofílicos con relevancia biomédica contienen los cationes  $Na^+$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $K^+$  o los aniones  $Cl^-$ ,  $HCO_3^-$  y  $HPO_4^{2-}$  [111].

### 1.4.7. Efecto de mojado de superficies

El agua cerca de superficies hidrofóbicas no puede enlazar sus moléculas mediante puentes de hidrógeno [106]. Al no poder configurarse, sus moléculas deben autoasociarse formando una esfera, ya que es la configuración que favorece una mayor cantidad de enlaces por unidad de volumen [112]. Existen dos categorías generales de materiales hidrofóbicos. La primera son aquellos materiales que adsorben las moléculas de agua gracias a sus interacciones electroquímicas. La segunda categoría es de aquellos materiales que absorben las moléculas de agua. Este tipo de material, entre los que se encuentra el acetato de polivinilo (PVA) y el óxido de polietileno (PEO), se hinchan o incluso pueden entrar en solución acuosa, característica que va a depender del peso molecular y del posible entrecruzamiento de las cadenas [106].

Cuando se diseña un andamio es importante que este pueda ser humectado. Una forma de corroborar que esto sea así, es la medición del ángulo de contacto de la superficie.

### 1.4.8. Ángulo de contacto

El ángulo de contacto es una medida cuantitativa de la humectabilidad de un sólido por un líquido [113]. Medidas de ángulo inferiores a  $90^\circ$  indican una mojabilidad muy alta y el fluido se extenderá sobre la superficie, mientras que ángulos superiores a  $90^\circ$  significan

que la mojabilidad es baja y el fluido disminuirá el contacto con la superficie, formando una gota compacta (Figura 1.8) [114].

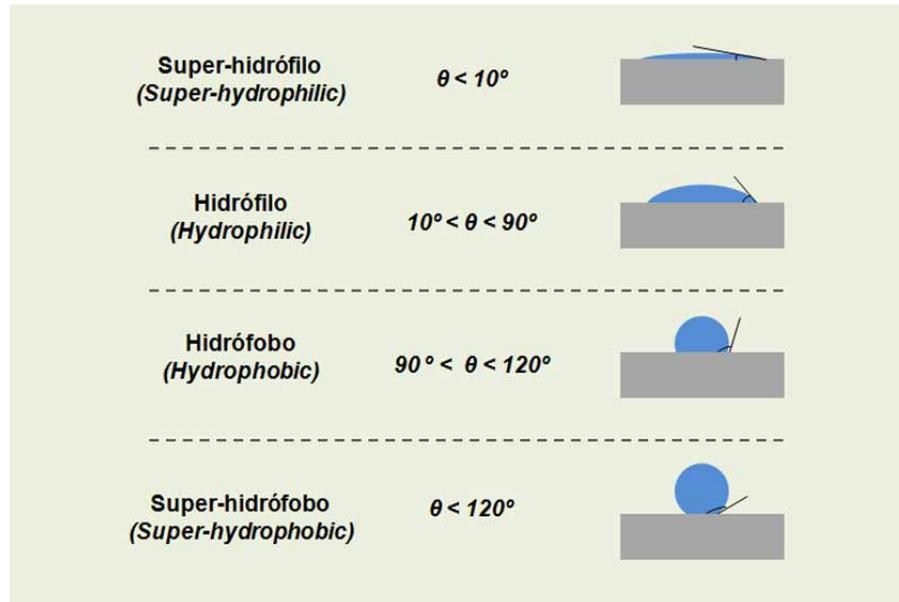


Figura 1.8: Representación esquemática del ángulo de contacto para superficies con distinta humectabilidad. [114].

La elaboración de un material hidrofílico, que presente una elevada solubilidad puede ser de gran provecho en el área de biomateriales, ya que le confiere al material la propiedad de ser biodegradable, sirviendo como soporte en las primeras etapas del proceso de reparación ósea mientras el tejido óseo se regenera [115]. En el caso de los vidrios, su base presenta enlaces de tipo covalente, si además se inserta dentro de la red átomos de sodio (Na), calcio (Ca) y potasio (K), se promoverán interacciones de tipo iónicas, lo cual permitirá ajustar las propiedades del vidrio para otorgar solubilidad [116]. Debido a la solubilidad, este tipo de vidrios puede ser considerado como un material reabsorbible o biodegradable [117].

#### 1.4.9. Biodegradación

Como se mencionó anteriormente, aunque los materiales no biodegradables se han aplicado en tratamientos clínicos, las membranas reabsorbibles o biodegradables tienen

la ventaja de que no requieren la extracción mediante un procedimiento quirúrgico secundario. La capacidad de biodegradación de un material se considera un factor importante en su biocompatibilidad, ya que permite la integración en la MEC de un tejido. En este trabajo de investigación se escogió la gelatina en lugar de otros materiales derivados sintéticamente para obtener una tasa de biodegradación óptima, alta capacidad de angiogénesis, quimiotaxis de fibroblastos, estabilización de coágulos e integración tisular favorable [17]. La biodegradación de las membranas se puede evaluar mediante un ensayo enzimático, que consiste en incubar el material en una solución de lisozima a 37 °C. Se ha reportado el uso del ensayo enzimático en lugar del método estándar de disolución de PBS debido a su aplicación potencial en la cavidad oral [118] [119].

## **1.5. Biocerámicas y Biovidrios**

### **1.5.1. Hidroxiapatita**

La hidroxiapatita (HA) de fórmula molecular  $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$ , es un mineral formado por átomos de calcio (Ca), fósforo (P), oxígeno (O) e hidrógeno (H). La HA es el constituyente mineral principal de dientes y huesos de vertebrados. Su composición química es similar a la matriz inorgánica del hueso y exhibe alta afinidad por los tejidos duros del huésped a través de enlaces de tipo covalentes e iónicos [120] [121]. Esto ofrece ventajas en aplicaciones médicas comparada con otros materiales de sustitución como aloinjertos o implantes metálicos [122].

La HA sintética está compuesta principalmente por los minerales calcio (Ca) y fosfato (P), posee una relación estequiométrica Ca/P 1.67 muy similar a la de los dientes humanos, que presenta una relación Ca/P promedio de 1.08 [123] [124]. Tiene excelente biocompatibilidad y osteoconductividad [125]. Ha sido utilizada con éxito en aplicaciones médicas como relleno de hueso en forma de cemento o de gránulos y como recubrimiento de prótesis metálicas [126] [127]. Su morfología puede variar dependiendo del método de obtención, encontrando formas irregulares, varillas, esferas, láminas, diente de león, flor

y microesfera porosa [32]. Sin embargo, su uso como andamio se ha visto limitado por su bajo módulo de Young y baja velocidad de reabsorción [128].

La reacción general para la formación de hidroxiapatita a partir de iones presentes en solución acuosa es:



En el caso de materiales como la hidroxiapatita que no poseen silicio dentro de sus componentes, al ser sumergidos en fluido corporal simulado (SBF) se cargan negativamente debido a los iones  $OH^-$  y  $PO_4^{3-}$  presentes en su superficie, atrayendo y combinándose selectivamente con los iones cargados positivamente de  $Ca^{2+}$  presentes en el fluido para formar fosfato de calcio (Figura 1.9) [129].

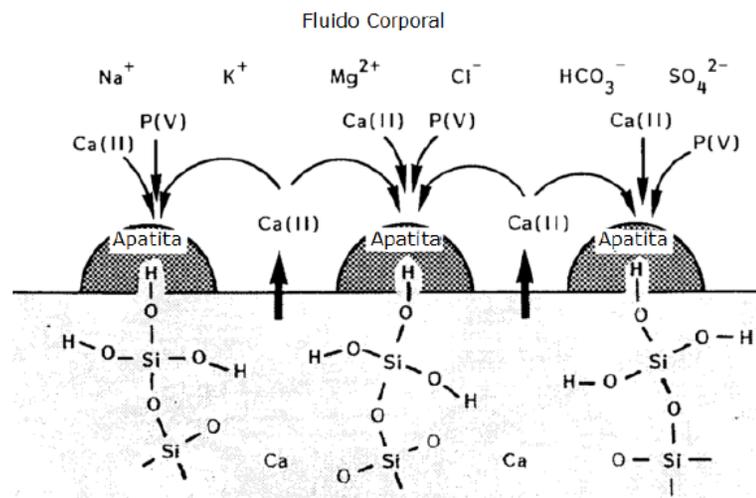


Figura 1.9: Mecanismo de la formación de hidroxiapatita en la superficie de vidrios basados en  $CaO - SiO_2$ . [129].

La capa rica en calcio y fósforo resultante es la responsable de la unión del vidrio y del hueso [36]. Esta capa compuesta de hidroxiapatita carbonatada (HCA), proporciona un medio adecuado para la proliferación de osteoblastos (células encargadas de sintetizar la matriz ósea) y fibroblastos, son responsables de generar el tejido conectivo fibroso como respuesta del sistema inmune [129].

Una vez que la capa rica en calcio y fósforo se encuentra en contacto con el hueso, los osteoblastos presentes en la superficie de éste se encargan de realizar la osteointegración del material [130] [131].

### 1.5.2. Fosfato tricalcico ( $\beta$ -TCP)

Dentro de las cerámicas cristalinas destacan los fosfatos de calcio, debido a las similitud en composición propiedades y estructura del hueso [132]. El fosfato tricálcico es una mezcla de calcio y fósforo con fórmula química  $Ca_3(PO_4)_2$ . Es completamente reabsorbible y osteoconductor. Los fosfatos tricálcicos presentan menos resistencia y mayor reabsorción que la hidroxiapatita. Sin embargo, son capaces de inducir una mayor bioactividad [132] [133].

Una desventaja de esta cerámica es la formación de poros durante su fabricación, lo que afecta directamente en las propiedades mecánicas, produciendo un material frágil [134]. Esto limita su uso clínico. La mayoría de los compósitos de fosfato de calcio se realizan mediante procesos que involucran temperaturas mayores a las de la cristalización, lo que puede producir una densificación incompleta o fallos microestructurales. Existen otros materiales como los vidrios-cerámicos bioactivos que tienen mejores propiedades mecánicas [135].

### 1.5.3. Vidrios Bioactivos

Los vidrios bioactivos fueron descritos en los años 1970. Están compuestos de óxido de sodio ( $NaO_2$ ), óxido de calcio ( $CaO$ ), pentóxido de fósforo ( $P_2O_5$ ) y dióxido de silicio o sílice ( $SiO_2$ ). El dióxido de silicio es el componente principal del vidrio bioactivo, este es un material duro, no poroso y su solubilidad *in vivo* esta relacionada proporcionalmente con el contenido del óxido de sodio [136].

El vidrio bioactivo (BG) 45S5, de nombre comercial Bioglass de composición química  $46.1SiO_2$ ,  $26.9CaO$ ,  $24.4Na_2O$  y  $2.6P_2O_5$  en %mol, ha sido el más investigado para

aplicaciones biomédicas [137]. Fué desarrollado por Hench en 1969 y ha sido utilizado clínicamente desde 1985. La bioactividad de los vidrios bioactivos se atribuye a la habilidad del material para interactuar químicamente con medios biológicos formando una capa superficial similar a la de la HA ósea [136] [15].

La síntesis del vidrio bioactivo puede llevarse a cabo mediante dos procesos; fundición en templado o por técnica sol-gel. Los biovidrios comerciales están fabricados por el método de fundición. En este proceso, los óxidos son derretidos a altas temperaturas por sobre los  $1300^{\circ}C$ . Por otro lado, el método sol-gel forma y ensambla nanopartículas de biovidrio terciario  $SiO_2 - CaO - P_2O_5$  a temperatura ambiente [138].

La síntesis del vidrio puede llevarse a cabo mediante la técnica sol-gel utilizando el precursor tetraetilortosilicato (TEOS) de fórmula molecular  $Si(OC_2H_5)_4$  que puede ser hidrolizado mediante catálisis ácida, causando la protonación del grupo alcóxido que provoca un ataque nucleofílico por el agua, produciendo la condensación que favorece la formación de una red lineal o ramificada al azar, o altamente ramificada. Durante este proceso, el pH puede ser controlado para obtener fibras que podrían ser usadas como matriz o para formar una dispersión coloidal y la obtención de nanopartículas [139] [138].

Se han reportado biovidrios sintetizados por método sol-gel que se han acercado a la composición original del 45S5, consiguiendo valores de 49.15%  $SiO_2$ , 25.4%  $CaO$ , 23.33%  $Na_2O$  y 1.72% de  $P_2O_5$  [140].

Los vidrios-cerámicos, tienen varias fases cristalinas con tamaño y contenido controlado dependiendo de los parámetros de tratamiento térmico aplicado. Se debe tener en cuenta que si se quiere mantener una estructura amorfa, las temperaturas utilizadas no deben superar los  $600^{\circ}C$  [141]. Estos vidrio-cerámicos exhiben propiedades mecánicas como módulo de Young y resistencia al corte superiores respecto a los vidrios. El ®Bioglass 45S5, cristaliza inmediatamente sobre su temperatura de transición vítrea [135]. Esta biocerámica ha demostrado ser capaz de estimular la neoformación de hueso *in vivo* y promover la regeneración ósea más rápido que la HA sintética. Es por esto que

ha sido considerado como un material con propiedades de reparación de tejido óseo y dental [139] [15].

Otro de los vidrios bioactivos comerciales es el PerioGlas, que compuesto de sales minerales 100 % sintéticas para uso en defectos periodontales, relleno del reborde, quistes e implantes [142]. Este material, además de ser osteoconductor, se le atribuye la propiedad de osteoestimulación, definida como una estimulación activa en la proliferación y diferenciación de osteoblastos, lo que ha sido evidenciado mediante estudios *in vitro* por el incremento de la síntesis de ADN y de marcadores osteoblásticos tales como osteocalcina y fosfatasa alcalina [143].

El diagrama de la Figura 1.10 relaciona la bioactividad de los vidrios con su composición. De forma general se tienen las regiones A, B, C y D donde la zona central está delimitada por la región A [144]. En esta zona la composición de los vidrios forman enlace con el hueso, los vidrios en esta región están formados por el mismo porcentaje de  $SiO_2$ ,  $Na_2O$  y  $CaO$  [145]. La región E está incluida dentro de la región A, donde los vidrios bioactivos se unen tanto al hueso, como a tejidos blandos y producen la activación de genes relacionados [146].

En la región B se encuentran los vidrios bioinertes que tienen un elevado contenido en  $Si_2O$ . Estos materiales son compactos y rígidos y tienen una reactividad demasiado baja, por lo que no se unen al hueso [144].

Los vidrios de la región C son reabsorbibles, su composición está basada en  $Si_2O$  y  $Na_2O$ , no se unen al hueso y su reactividad es demasiado alta por ello desaparecen entre los 10 y 30 días después de ser implantados [145].

En la región D no se encuentra  $SiO_2$ , que es el principal componente formador de los vidrios, por lo que no son viables. Por lo tanto, la composición moduladora permite adaptar un material para un propósito específico [146]. La bioactividad se genera producto de la

liberación de iones, tales como  $Ca^{2+}$  y  $Na^+$ . Esto fomenta la bioactividad y por eso se les llama vidrios bioactivos [147].

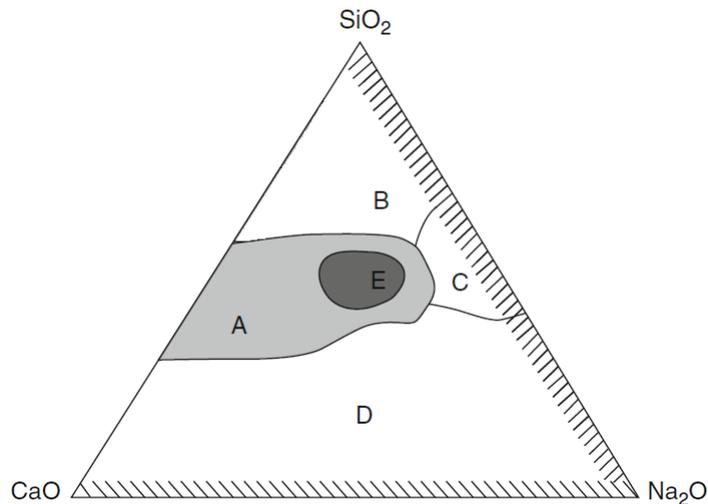


Figura 1.10: Diagrama de Hench. Región A; composición de vidrios que se unen al hueso. Región B; Composición de biovidrios sin unión al hueso, tienen una reactividad demasiado baja. Región C; composición de biovidrios sin unión al hueso, por tener una reactividad demasiado alta. Región D, no se forman vidrios. Región E; la composición de estos biovidrios permiten la unión a tejidos blandos [146].

Una forma de mejorar la bioactividad de un material inorgánico como la sílice es mediante la incorporación nanopartículas de vidrio bioactivas. La formación de una capa de HA biológicamente activa cuando un vidrio bioactivo, está inmerso en fluido corporal simulado (SBF) *in vitro*, es un indicador de bioactividad [148]. Además, esta bioactividad puede ser considerada como un indicativo de potencial bioactividad *in vivo* [149]. Los cambios químicos que se producen se describen a continuación:

- Primero se produce una rápida difusión iónica debido al intercambio de los cationes  $Na^+$  y  $Ca^{2+}$  desde el vidrio con los protones de la solución ( $H^+$  o  $H_3O^+$ ), con la finalidad de producir silanoles (Si-OH) en la superficie del vidrio [150]. El pH de la solución aumenta, produciendo en la superficie del vidrio una región enriquecida de sílice baja en cationes. Los grupos fosfatos comienzan a salir del vidrio [151].
- El aumento de pH genera un ataque del  $OH^-$ . La sílice soluble se libera a la solución en forma de  $Si(OH)_4$ , produciendo más silanoles en la superficie del vidrio [152].

- Luego se produce la condensación de los grupos Si-OH en la superficie del vidrio [150].
- Los iones  $Ca^{2+}$  y  $PO_4^{-3}$  viajan a través de la capa de sílice y desde la solución, formando una capa de  $CaO - P_2O_5$  en la superficie [151].
- Se incorporan grupos hidroxilos y carbonatos desde la solución cristalizando la capa de  $CaO - P_2O_5$ , para formar hidroxiapatita carbonatada [151].

En la Figura 1.11 se muestra un esquema de las distintas capas que interactúan durante el proceso de osteointegración del material. A medida que los iones de calcio se acumulan en la superficie, la carga neta positiva atrae iones fosfato cargados negativamente presentes en el fluido, formando fosfato de calcio amorfo, con una relación Ca/P baja, lo que eventualmente se transforma en una capa similar a la hidroxiapatita encontrada en huesos [129].

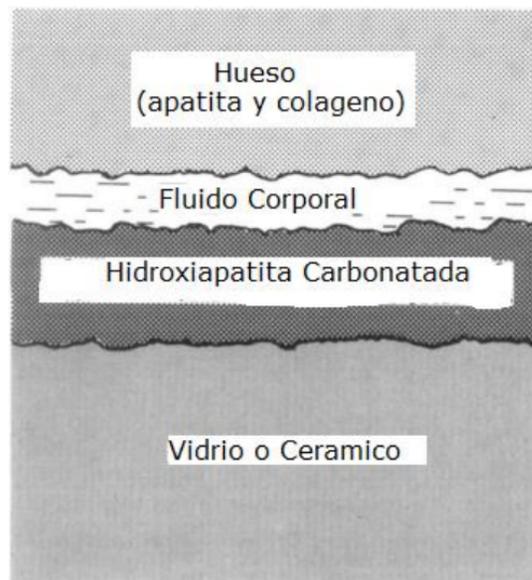


Figura 1.11: Esquema de las capas presentes en el sistema material-hueso [129].

Otro aspecto importante es que el biovidrio por si solo no imita suficientemente bien la composición del hueso. Este contiene colágeno, es por esto que una estrategia para solucionar esta deficiencia puede ser la incorporación de gelatina.

## 1.6. Gelatina

La gelatina es una proteína desnaturalizada, obtenida de la hidrólisis del colágeno. Una de las funciones del colágeno en el cuerpo es estimular ciertos procesos celulares mediante las secuencias de aminoácidos Arginina-Glicina-Ácido aspártico (RGD) que se encuentran repetidas en el colágeno. Esta secuencia, es un mecanismo de señalización celular que permitirá su posterior adhesión [131]. La adhesión celular es un mecanismo en dónde la célula reconoce sitios de anclaje celular a través de sus receptores celulares. Luego, se producen adhesiones focales mediante proteínas (integrinas) que están en la superficie de la célula y que son capaces de adherirse al material [153].

Cuando se rompe el colágeno para formar gelatina, la secuencia RGD se mantiene [154]. La composición de la gelatina corresponde a un polipéptido de alto peso molecular que oscila entre 80-250 kDa. La estructura química de la proteína se describe como una secuencia lineal de aminoácidos: glicina 34 %, prolina 14% e hidroxiprolina 9% predominantemente (Figura 1.12). Los aminoácidos se mantienen unidos entre sí mediante enlaces peptídicos, de tipo covalente [155].

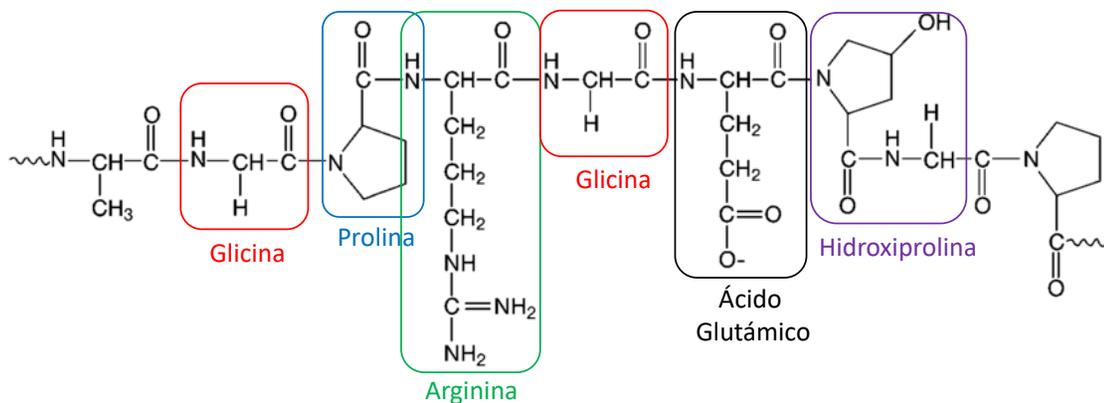


Figura 1.12: Esquema de la estructura química de la gelatina [158].

La estructura de la gelatina se clasifica, al igual que el resto de las proteínas en 4 grupos:

- Estructura primaria: determinada por la secuencia de aminoácidos en la cadena proteica, estructurada principalmente en tripletes Glicina-X-Y, donde X e Y corresponden usualmente a prolina e hidroxiprolina, respectivamente.
- Estructura secundaria: consiste en el plegamiento regular local entre residuos aminoacídicos cercanos de la cadena polipeptídica mediante la formación de puentes de hidrógeno entre los átomos que forman el enlace peptídico. En las proteínas existen tres tipos de estructuras secundarias: hélices alfa, hojas beta y giros beta, siendo las dos primeras las conformaciones más comunes y termodinámicamente estables de la estructura secundaria de los polipéptidos.
- Estructura terciaria: corresponde a la disposición tridimensional de todos los átomos que componen la proteína y se forma a partir de interacciones entre cadenas de aminoácidos a largas distancias.
- Estructura cuaternaria: formada debido a las interacciones espaciales entre cadenas individuales de polipéptidos en una proteína multicadena [158].

Existen dos tipos de gelatina en función de su proceso de obtención: gelatina tipo A (extraída por proceso en medio ácido) y gelatina tipo B (obtenida por proceso en medio básico) [155].

El proceso ácido consiste en utilizar una solución diluida de ácido clorhídrico (aproximadamente al 4 %) para la acidificación, desnaturización y solubilización del colágeno. Se usa principalmente para la extracción en pieles porcinas y de pescado, y la gelatina resultante de este proceso (Tipo A) presenta un punto isoeléctrico de  $pH=7-9$  en función de la severidad y duración del tratamiento [155].

El proceso básico se aplica para la extracción de gelatina de pieles y huesos. El colágeno se pone en contacto con una solución alcalina (carbonato de sodio o potasio) para su extracción. A diferencia de la gelatina Tipo A, la gelatina obtenida por extracción alcalina presenta un punto isoeléctrico menor, de  $pH=4.8-5.2$ , el cual puede aumentar hasta  $pH=6$  si el tratamiento básico es de corta duración [155].

En la mayoría de usos comerciales la gelatina se utiliza en forma de solución. La gelatina es prácticamente insoluble en alcohol absoluto, acetona, tetracloruro de carbono, éter, benceno, y la mayoría de solventes orgánicos no polares [156]. La gelatina es soluble en agua, ácido acético y en soluciones acuosas de alcoholes polihídricos tales como glicerol o polipropilen glicol [157]. La gelatina en polvo absorbe el agua exotérmicamente, siendo la velocidad y el grado de hinchamiento una característica particular de cada tipo de gelatina. Al sumergirse en agua fría, las partículas de gelatina se hidratan y es al aumentar la temperatura (por encima de  $35^{\circ}C$ ) cuando las partículas empiezan a disolverse rápidamente dando lugar a una solución uniforme [159]. Además de la temperatura, otros parámetros deben ser considerados a la hora de controlar el comportamiento de la gelatina en disolución, tales como el pH, el método de fabricación y la concentración utilizada [160].

La viscosidad es la propiedad más importante de las disoluciones de gelatina. Como polímero, la naturaleza macromolecular de la gelatina produce una viscosidad en disolución con propiedades reológicas de carácter newtoniano en la mayoría de temperaturas y concentraciones utilizadas para la preparación [161]. Las propiedades de viscosidad de la gelatina están principalmente relacionadas con la distribución de pesos moleculares, y consecuentemente con la fuerza de gel. Se entiende como viscosidad característica de una gelatina aquella obtenida mediante un método estandarizado que indica el tiempo de flujo de 100 ml de solución acuosa de gelatina al 6.67% a  $60^{\circ}C$  a través de una pipeta estándar. Este valor de viscosidad permite estimar el peso molecular medio de la gelatina [160].

De acuerdo con la literatura, una alta concentración de gelatina afecta directamente la viscosidad de la mezcla debido al alto entrelazamiento de las cadenas del polímero [162] [163] [164]. La ecuación de Huggins:

$$\frac{\eta_{sp}}{c} = [\eta] + K_H[\eta]^2c \quad (1.2)$$

donde  $\eta_{sp}$  es la viscosidad específica de la solución de polímero,  $\eta$  es la viscosidad intrínseca y  $K_H$  es la constante de Huggins, describe la dependencia entre la viscosidad de la solución con la concentración para soluciones homogéneas de un polímero lineal

[165].

### **1.6.1. Fibras de gelatina**

La obtención de microfibras de gelatina por el método convencional de electrospinning húmedo/seco sigue siendo desafiante debido a la naturaleza polielectrolítica de la gelatina que, junto con la presencia de fuertes enlaces puentes de hidrógeno de sus soluciones, dificulta la formación de fibras [166]. Es importante obtener una viscosidad óptima, ni demasiado baja para que no se puedan formar las fibras (evitando las estructuras de electropulverización y perlas en hilo), ni tan alta como para evitar el estiramiento de la solución debido a su alto peso molecular, evitando la gelificación de la solución que dificulta el electrohilado [167].

La mayoría de los estudios recomiendan trabajar con baja concentración de gelatina (inferior al 12% p/p) a temperatura ambiente para evitar el proceso de gelificación y facilitar el electrohilado [162]. Además, se debe tener en cuenta la relación directamente proporcional entre la concentración de gelatina y el diámetro de las fibras [162] [168]. Existen diversos estudios precedentes dedicados a la preparación de fibras de gelatina mediante la técnica de electrospinning. Para ello se recomienda incorporar a la mezcla el polímero óxido de polietileno (PEO) como ayuda durante el proceso de electrohilado [169]. Este es un polímero sintético que se electrohila bien, se ha reportado como optimizador de la viscosidad para producir fibras desde precursores a base de gelatina y colágeno, que en otros casos no sería posible ser electrohilado debido a la inestabilidad del chorro de la solución [170] [171].

El PEO está compuesto por carbono, hidrógeno y oxígeno, de fórmula molecular  $C_{16}H_{30}O_2$ , tiene la capacidad de formar puentes de hidrógeno y es soluble en agua [172]. En el presente trabajo, una estrategia para intentar incorporar mayor cantidad de gelatina en las fibras, fue mediante el uso de este polímero en los precursores para el electrohilado, intentando minimizar su proporción, de esta forma lo que se busca es maximizar la cantidad de gelatina y minimizar la cantidad de PEO para encontrar el balance entre los dos. Por otro lado, otra estrategia es utilizar un co-solvente como

el dimetilsulfoxido (DMSO), de fórmula molecular  $C_2H_6OS$  para mejorar el proceso de electrospinning cuando el solvente es principalmente agua [173]. Su rol es disminuir la tensión superficial de las mezclas. Debido a su naturaleza polar, pero no tanto como la del agua y a que no forma tantos puentes de hidrógenos como el agua y por eso su tensión superficial es menor en comparación con el agua. Es por esto, que su uso ayuda a electrohilar los precursores elegidos en este trabajo.

## 1.7. Materiales híbridos

En 1993, Novak definió los materiales híbridos sol-gel inorgánicos/orgánicos (I/O) como redes conjuntas interpenetrantes de componentes inorgánicos y orgánicos que interactúan a nivel molecular y son indistinguibles por encima de la nanoescala [174]. Existen dos tipos de híbridos formulados a partir de la incorporación de un polímero ya formado, se denominan Clase I y Clase II donde la diferencia principal radica en la interacción entre las moléculas orgánicas e inorgánicas que lo componen. Los híbridos Clase I usan polímeros para enlazarse con la red inorgánica, generalmente de sílice. Las fuerzas involucradas son de tipo Van der Waals y puentes de hidrógeno [175] [176]. Los híbridos Clase II incorporan un agente químico acoplante que forma enlaces covalentes que unen las redes interpenetrantes de fases inorgánicas y orgánicas (Figura 1.13) [177] [178] .

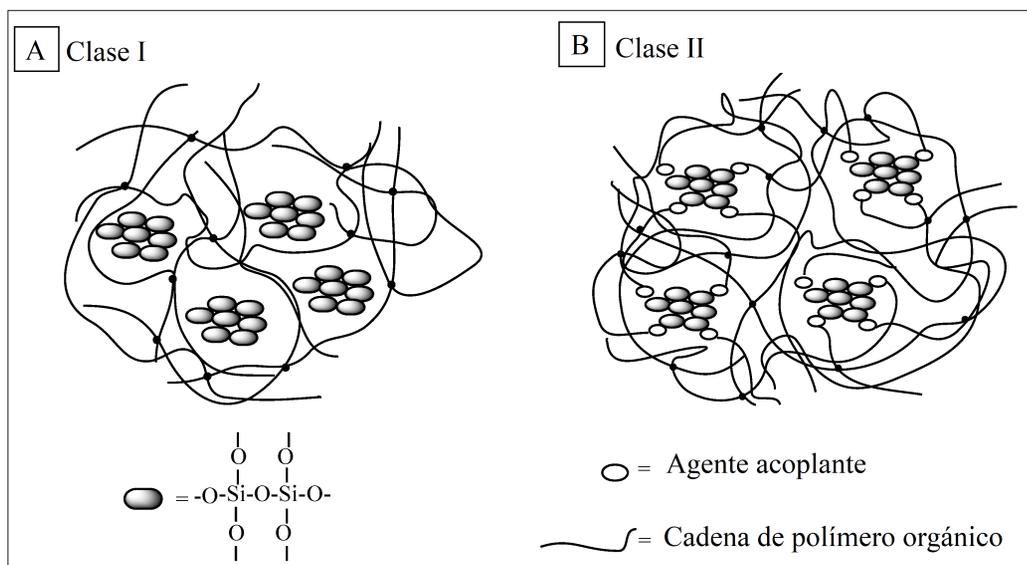


Figura 1.13: Esquema ilustrativo de híbridos Clase I (A) y Clase II (B) con componentes orgánicas e inorgánicas [177].

### 1.7.1. Proceso sol-gel para la síntesis de híbridos

El proceso sol-gel híbrido es una reacción química que puede ocurrir a temperatura ambiente. Durante este proceso moléculas de  $Si(OH)_4$  polimerizan por condensación para formar una red lineal y ramificada, dependiendo también del pH se ensamblan nanopartículas de sílice para formar una estructura reticulada inorgánica, que permite incorporar polímeros a medida que se forma la red [179].

Se incorpora un polímero orgánico soluble en el sol inorgánico y mecánicamente se atrapa en la red de vidrio de sílice durante la condensación de esta. Las cadenas inorgánicas y orgánicas se mantienen unidas por puentes de hidrógeno a los grupos silanol ( $Si-OH$ ) de la superficie [180].

Los alcóxidos de sílice  $Si(OR)_4$  son utilizados como precursores debido a que estos permiten realizar variaciones en los parámetros de reacción durante la síntesis [181] [182]. Se ha reportado que la longitud de la cadena orgánica ( $R$ ) afecta la cinética de la hidrólisis debido a los grupos éster. Si la longitud de la cadena orgánica aumenta la rapidez de la hidrólisis disminuye [183]. Uno de los alcóxidos más utilizados en la

síntesis de sílice es el tetraetilortosilicato (TEOS) que puede ser hidrolizado para formar  $Si(OH)_4$  [139] [138]. Las moléculas de TEOS hidrolizadas se condensan y a medida que los enlaces  $Si - O - Si$  se forman, crean una red de gel húmedo, donde se introduce el polímero orgánico (Figura 1.14) [174].

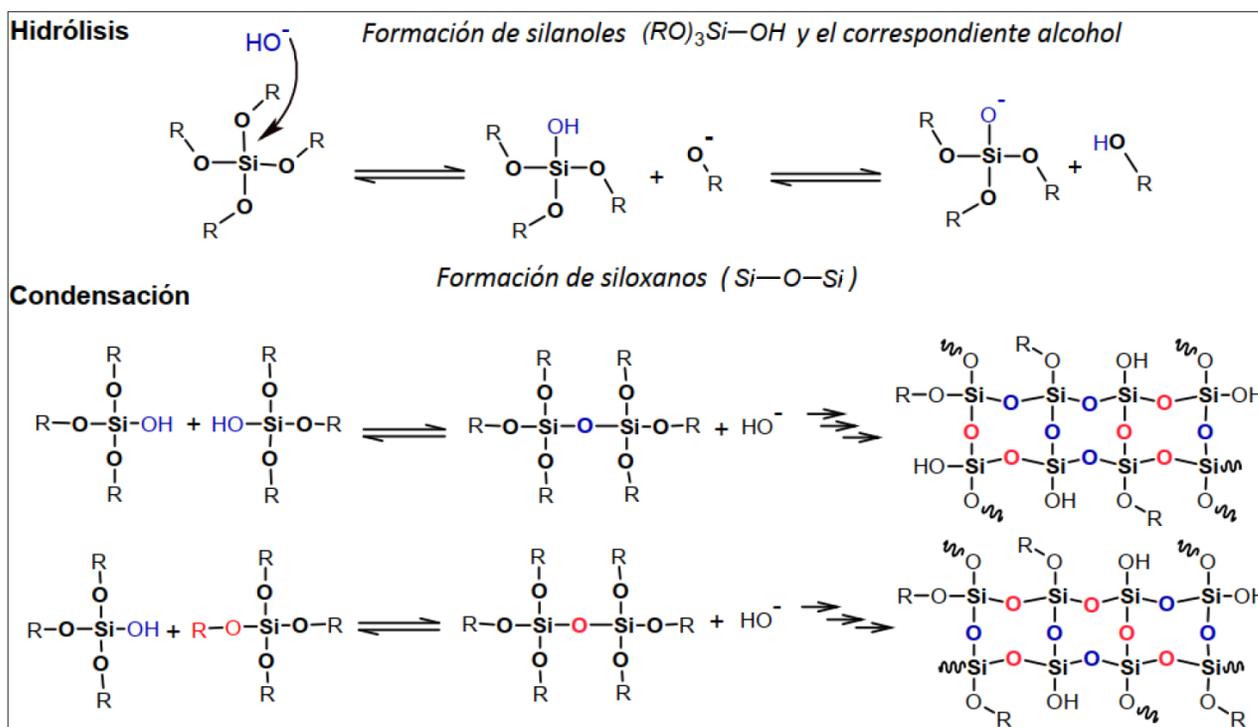


Figura 1.14: Esquema ilustrativo de la formación de la red sol-gel de sílice [174].

## 1.7.2. Efecto del pH en el proceso sol-gel

Las reacciones de hidrólisis y condensación son producidas mediante sustitución nucleofílica catalizada por un ácido o una base [184]. En la Figura 1.15 (a) se muestra un sistema catalizado por ácido. La protonación del grupo alcóxido hace que la densidad de electrones se retire del  $Si$ , lo que permite el ataque nucleofílico del agua [185]. Por el contrario, en la Figura 1.15 (b) se muestra la hidrólisis catalizada por una base de los alcóxidos de silicio procede mediante el ataque de un silanol nucleófilo desprotonado sobre un ácido silícico neutro [183] [185].

Las redes de óxido de silicio obtenidas a través de condiciones catalizadas por ácido consisten en polímeros lineales o ramificados al azar [186]. Mientras que, los sistemas catalizados por bases dan como resultado grupos altamente ramificados. Dependiendo de las condiciones de pH, conforme este aumenta y disminuye el crecimiento y gelificación de la red  $Si-O$  se van a formar redes lineales más o menos ramificadas o partículas (Figura 1.16) [183] [186] [187].

La cinética de condensación de la red sol-gel se puede controlar mediante el pH y la temperatura. Al controlar la tasa de condensación sol-gel y, por lo tanto, la gelificación del híbrido, dependiendo de la proporción de componentes orgánicos e inorgánicos es posible imprimir en 3D o electrohilar la solución [188] [189]. Se debe tener en cuenta la ventana de tiempo con la que se cuenta antes de que el híbrido gelifique.

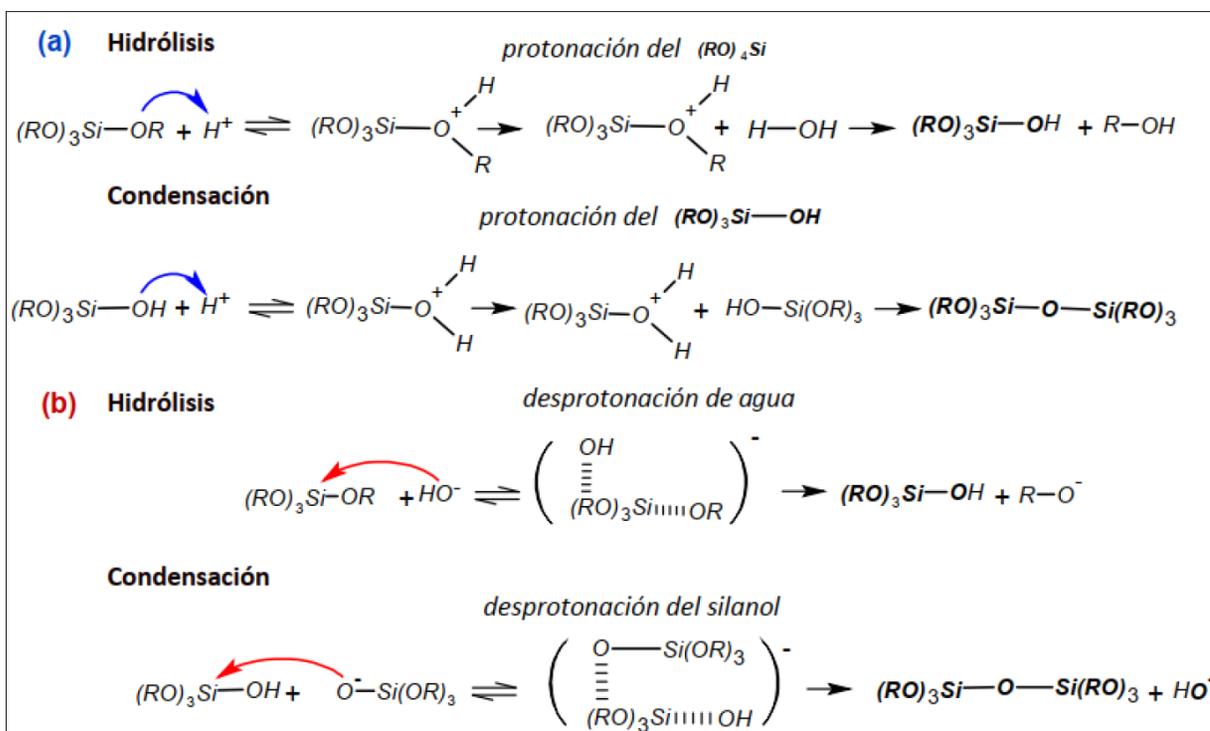


Figura 1.15: Esquema ilustrativo de reacción para la hidrólisis y condensación catalizadas por (a) ácido y por base (b) de un precursor de alcóxido de silicio [183].

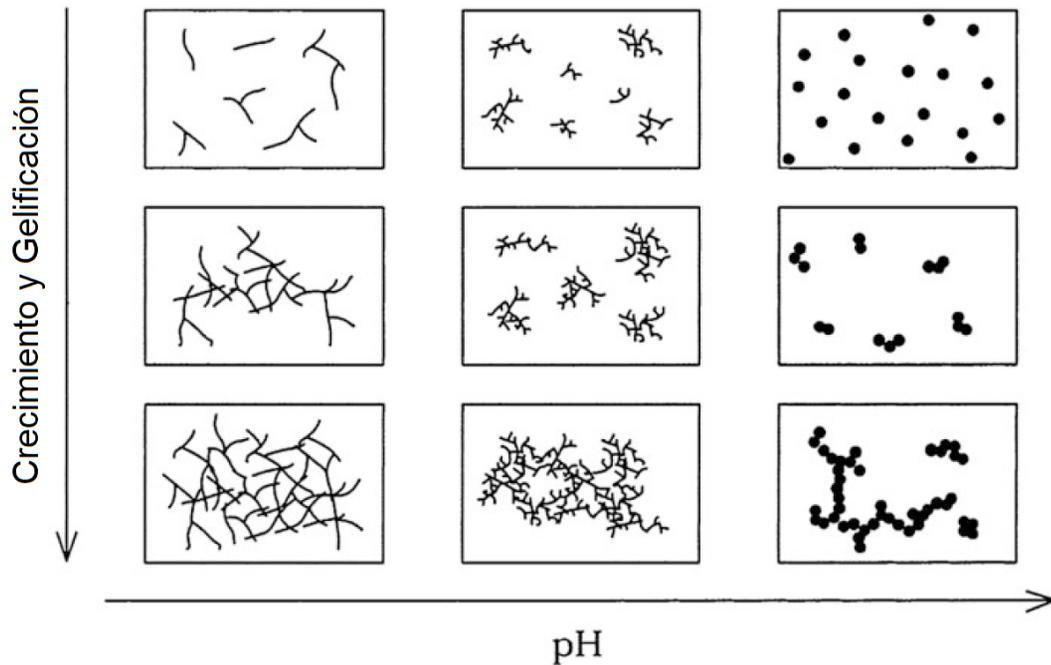


Figura 1.16: Esquema ilustrativo del efecto del pH del sobre el proceso sol-gel [187].

## 1.8. Fibras y biotextiles

Existen diversas técnicas que permiten usar fibras para obtener biotextiles tales como: drawing, síntesis por molde, separación de fases, autoensamblaje y electrospinning [190]. La técnica de electrospinning y las matrices fibrosas han ganado mucha popularidad debido principalmente a la similitud de los andamios obtenidos con la matriz extracelular de los tejidos del cuerpo humano. Casi todos los tejidos y órganos del cuerpo se sintetizan y se organizan con estructuras fibrosas de tamaños micro y nano. Usar el sistema de electrospinning ha sido reportado como un enfoque biomimético a la ingeniería de tejidos óseos [191].

### 1.8.1. Electrospinning

Los estudios sobre campos eléctricos en el siglo XIX son el origen de esta técnica, patentada originalmente en 1902 y considerada en 1934 como un medio para el procesamiento textil. Taylor fue quien en su trabajo comprendió la influencia de un campo eléctrico en un pequeño volumen de líquido [191].

Cuando un campo eléctrico es aplicado a una gotita de líquido, la carga electrostática se acumula en la punta de la gotita, por tanto, la repulsión de carga trabaja en contra de la tensión superficial cambiando la forma esférica de la gota a un cono alargado denominado cono de Taylor donde luego se libera un chorro [192]. El chorro puede tomar un camino complejo debido a inestabilidades inducidas por el campo eléctrico. Si el soluto es un líquido no viscoso se generan pequeñas gotas y en el caso de polímero se obtienen pequeñas fibras que llegan a formar estructuras entrecruzadas con forma de andamio [191].

El equipo de electrospinning, consiste básicamente en una jeringa con una solución polimérica en su interior, conectada a una bomba de flujo y una fuente de poder de alto voltaje (Figura 1.17) [193]. Esta suministra carga eléctrica a la solución polimérica rompiendo la tensión superficial del líquido para posteriormente ser elongado en forma de fibras que son depositadas en un plato colector posicionado a una distancia determinada [194]. En el proceso de formación de fibras, el solvente se evapora mientras el jet del polímero formado fluye en la dirección del campo eléctrico hacia el plato colector [195]. Esta técnica ha demostrado jugar un papel relevante a la hora de obtener andamios capaces de imitar las propiedades fibrilares de las proteínas que forman matriz extracelular [193].

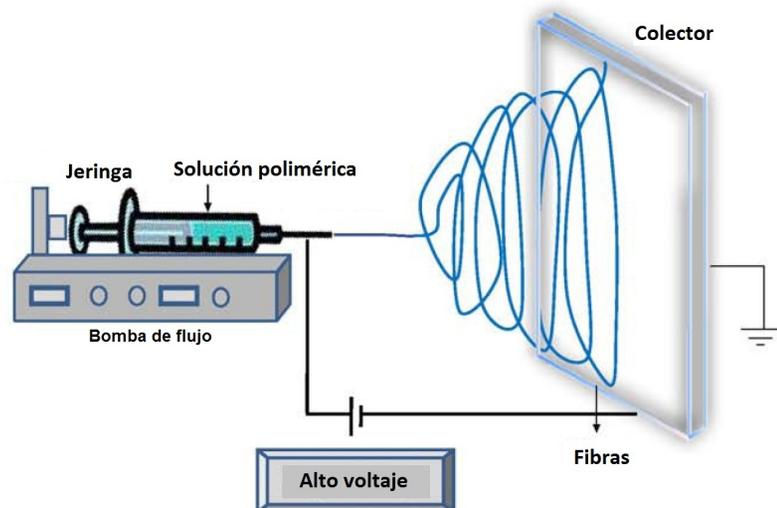


Figura 1.17: Esquema ilustrativo de componentes del sistema de electrospinning [193].

La Tabla 1.2 presenta una relación de los cambios en parámetros y los efectos que puede generar el electrospinning sobre la morfología y diámetro de las fibras obtenidas.

Parámetros		Efectos en morfología y diámetro
Solución	Concentración	↑ concentración, ↑ diámetro de la fibra
Procesamiento	Conductividad	↑ conductividad, ↓ diámetro
	Voltaje	↑ voltaje, ↓ diámetro
	Velocidad de flujo	↑ velocidad, ↑ diámetro de fibras
Ambiente	Humedad	↑ humedad, ↑ formación de poros
	Temperatura	↓ temperatura, ↑ diámetro de fibras

Tabla 1.2: Parámetros generales de electrospinning y efectos en la morfología de las fibras obtenidas [191].

Cuando el precursor a electrohilar está compuesto por una solución híbrida (inorgánica-orgánica), la generación de fibras puede resultar más compleja, como se mencionó anteriormente una de las alternativas para facilitar el proceso de electrohilado consiste en la incorporación del polímero óxido de polietileno (PEO) en la solución y DMSO como co-solvente en bajas concentraciones. Para poder electrohilar un híbrido de sílice que se ha obtenido mediante el proceso sol-gel, la viscosidad es muy importante

y se debe tener en cuenta la ventana de tiempo desde que se formó el sol-gel híbrido, se cargó en la jeringa para ser llevado al equipo de electrospinning y el tiempo que toma el depósito de las fibras en el plato colector para la posterior formación de membranas, antes de que el precursor gelifique y finalmente se convierta en un sólido.

De acuerdo con el estado del arte se proponen los siguientes rangos y concentraciones de polímeros y co-solvente:

- Sílice ( $\text{SiO}_2$ ) en un rango de concentración del 68-90 % en peso.
- Gelatina (G) en un rango de concentración del 5-25 % en peso.
- Óxido de polietileno (PEO) en un rango de concentración del 7-10 % en peso.
- Dimetil sulfóxido (DMSO) 50-100  $\mu\text{L}$ .

# Capítulo 2

## Propuesta

Esta propuesta de tesis doctoral consiste en la fabricación de membranas constituidas por fibras híbridas (inorgánicas/orgánicas) reabsorbibles. Estas fibras serán producidas mediante electrospinning y presentarán un diámetro de fibra en la escala micrométrica. Estarán compuestas por sílice ( $\text{SiO}_2$ ) (fase inorgánica), gelatina bovina (G) (fase orgánica) y óxido de polietileno (PEO) (fase orgánica). Se intentará mejorar su bioactividad mediante la incorporación de nanopartículas de biovidrio terciario (NpBV). Se estudiará la composición (atómica y enlaces), la estructura y las propiedades físico-químicas superficiales, térmicas, mecánicas, citotoxicidad, adhesión y crecimiento celular, biodegradación, difusión y diferenciación osteogénica.

### 2.1. Hipótesis

Híbridos de sílice, gelatina, óxido de polietileno y nanopartículas de biovidrio terciario al ser electrohiladas forman fibras biodegradables capaces de inducir una respuesta osteogénica *in vitro*, formando a su vez una macroestructura tipo membrana con geometría compatible con potencial para aplicaciones en regeneración ósea guiada.

## **2.2. Objetivos**

### **2.2.1. Objetivo general**

Desarrollar una membrana biocompatible y biodegradable formulada de sílice, gelatina, óxido de polietileno y nanopartículas de biovidrio terciario usando la técnica de electrospinning, con macroestructura adecuada para la regeneración ósea guiada.

### **2.2.2. Objetivos específicos**

1. Diseñar un proceso de electrospinning adecuado para electrohilar mezclas de sílice, gelatina y óxido de polietileno.
2. Desarrollar un método para la síntesis química de nanopartículas de biovidrio terciario (NpBV).
3. Producir membranas híbridas compuestas por sílice, gelatina, óxido de polietileno y NpBV.
4. Estudiar el efecto de la composición química de la membrana sobre su microestructura, bioactividad y biodegradabilidad.
5. Estudiar el comportamiento de células cultivadas sobre las membranas en sus fases de adhesión, proliferación y diferenciación osteogénica.

# Capítulo 3

## Metodología y procedimientos experimentales

La metodología empleada para la ejecución de la presente tesis doctoral se detalla a continuación en función al cumplimiento de los objetivos específicos propuestos.

### 3.1. Producción de fibras de sílice, gelatina y óxido de polietileno mediante electrospinning

#### 3.1.1. Producción de membranas de sílice y óxido de polietileno mediante electrospinning

La síntesis de la sílice ( $\text{SiO}_2$ ) se llevó a cabo mediante la técnica sol-gel, mezclando 7,5 mL del precursor tetraetil ortosilicato (TEOS) de fórmula  $\text{Si}(\text{OC}_2\text{H}_5)_4$  de grado reactivo 98 %, con 1,9 mL de agua Milli-Q y 0,6 mL de ácido clorhídrico (HCl) 1 molar a temperatura ambiente durante 20 min bajo agitación vigorosa. Luego, la mezcla se dejó envejecer durante 1 h a 50 °C a pH=1. Posteriormente se tomó 9 mL de la solución de  $\text{SiO}_2$  y se agregó 1 mL de óxido de polietileno (PEO) de 600 kDa (2 % p/v de PEO en agua) a pH=8 y 50  $\mu\text{L}$  dimetilsulfóxido (DMSO) como ayudante en la formación de fibras. De esta forma los precursores  $\text{SiO}_2$ /PEO a pH=1,8 teóricamente quedarían conformados en la propor-

ción 90/10, para finalmente ser llevados a una jeringa de 10 mL de capacidad (Figura 3.1). Los precursores fueron electrohilados a 20°C empleando una máquina de electrospinning TONG LI TECH, se utilizó una aguja de 20 Gauge. Las condiciones de trabajo para cada proporción aparecen en la Tabla 3.1. Se dispone de una ventana de tiempo de aproximadamente 1 h 30 min antes de que la solución con los precursores gelifique.

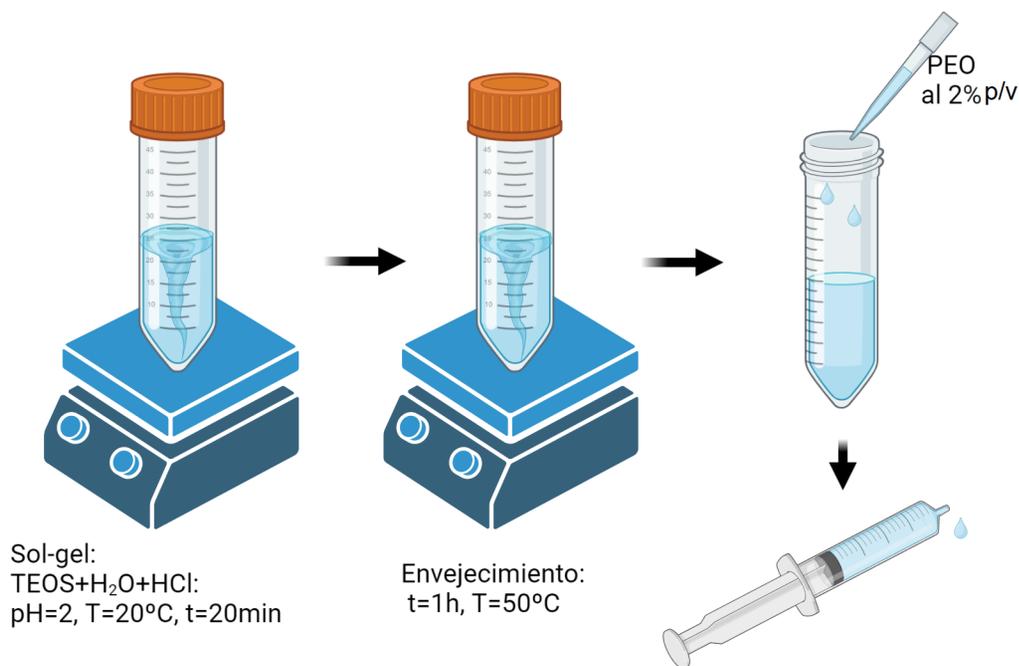


Figura 3.1: Diagrama de la preparación de los precursores SiO<sub>2</sub>-PEO para electrospinning.

Se realizó un estudio de la remoción del óxido de polietileno (PEO) de las membranas obtenidas desde los precursores 90 %SiO<sub>2</sub>-10 %PEO y 80 %SiO<sub>2</sub>-10 %G-10 %PEO, luego de lavarlas con agua destilada. Se comparó químicamente las membranas antes y después de lavarlas. Para ello fueron sumergidas en agua destilada a 40 °C durante 1 h para intentar remover el PEO y posteriormente secadas (90 %SiO<sub>2</sub>-10 %PEO lavada y 80 %SiO<sub>2</sub>-10 %G-10 %PEO lavada).

Precursores	Distancia aguja-plato (cm)	Voltaje (kV)	Flujo (mL/h)
90 %SiO <sub>2</sub> -10 %PEO	15	13,7	1
85 %SiO <sub>2</sub> -5 %G-10 %PEO	15	9,3	1
80 %SiO <sub>2</sub> -10 %G-10 %PEO	15	14,9	2
70 %SiO <sub>2</sub> -20 %G-10 %PEO	10	19,3	1,2
68 %SiO <sub>2</sub> -25 %G-7 %PEO	8	13,4	0,5

Tabla 3.1: Parámetros de trabajo específicos para el electrohilado de los precursores SiO<sub>2</sub>-G-PEO a distintas proporciones (90 %SiO<sub>2</sub>-10 %PEO, 85 %SiO<sub>2</sub>-5 %G-10 %PEO, 80 %SiO<sub>2</sub>-10 %G-10 %PEO, 70 %SiO<sub>2</sub>-20 %G-10 %PEO y 68 %SiO<sub>2</sub>-25 %G-7 %PEO).

### 3.1.2. Producción de membranas de sílice, gelatina y óxido de polietileno mediante electrospinning

Al igual que en la preparación de los precursores SiO<sub>2</sub>-PEO, la preparación de los precursores SiO<sub>2</sub>-G-PEO inicia de la misma forma. Se preparó la síntesis del biovidrio de acuerdo a la Sección 3.1.1. Además en paralelo se preparó la solución de gelatina bovina (G) 10 % p/v a 50 °C y pH=5. Las soluciones se mezclaron en diferentes proporciones la solución de G (5-25 %) con la solución de SiO<sub>2</sub> (85-68 %). Luego, la mezcla se dejó envejecer durante 1 h a 50 °C a pH=2. Posteriormente se agregó óxido de polietileno (PEO) (2 % p/v de PEO en agua) (7-10 %) a pH=8 y 50 μL dimetilsulfóxido (DMSO) en el precursor que contiene G de 5-10 % y 100 μL de DMSO en el precursor que contiene G de 20-25 % como ayudante en la formación de fibras. Finalmente el precursor fue llevado a una jeringa de 10 mL de capacidad (Figura 3.2). Los precursores fueron electrohilados a 20 °C, utilizando una aguja de 20 Gauge y con las condiciones de trabajo descritas en la Tabla 3.1. Se dispone de una ventana de tiempo de aproximadamente 1 h antes de que la solución con los precursores gelifique.

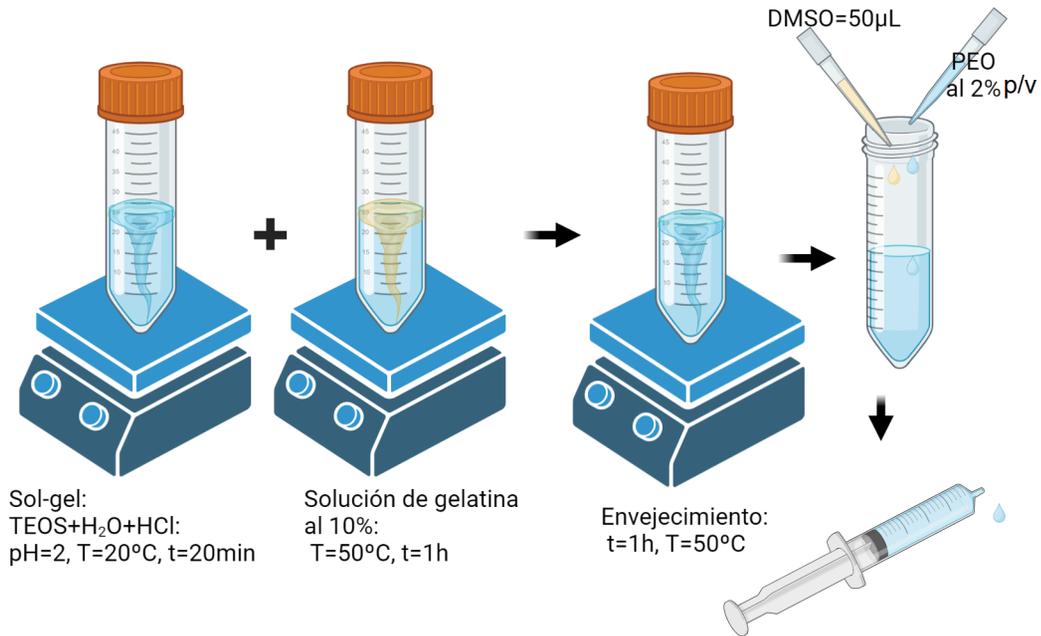


Figura 3.2: Diagrama de la preparación de los precursores SiO<sub>2</sub>-G-PEO para electrospinning.

## 3.2. Síntesis de nanopartículas de biovidrio terciario (NpBV)

Se sintetizaron nanopartículas de biovidrio terciario (NpBV), para posteriormente incorporarlas en el precursor de las fibras híbridas, con la finalidad de volverlas más bioactivas y biocompatibles debido a la presencia de calcio y fosfato que contienen estas nanopartículas. La síntesis de las NpBV se llevó a cabo mediante la técnica sol-gel. Valenzuela y col. 2012, reportaron la síntesis de nanopartículas de biovidrio utilizando la composición molar:  $58SiO_2:40CaO:5P_2O_5$  [196]. Este sistema se forma mediante  $Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$ ,  $(NH_4)H_2PO_4$  y TEOS como precursores en un medio de amonio.

Para realizar esta síntesis, se preparó la solución A que consiste en disolver 8,33 g de  $Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$  en 120 mL de agua Milli-Q en un vaso precipitado de 250 mL y se dejó en agitación a 300 rpm hasta que se disolviera todo el sólido. Paralelamente, se preparó

la solución B hidrolizando 9,7 mL de TEOS en 60 mL de etanol absoluto, agregando una solución de ácido clorhídrico 0,5 M hasta estabilizar a pH=2 (Figura 3.3).

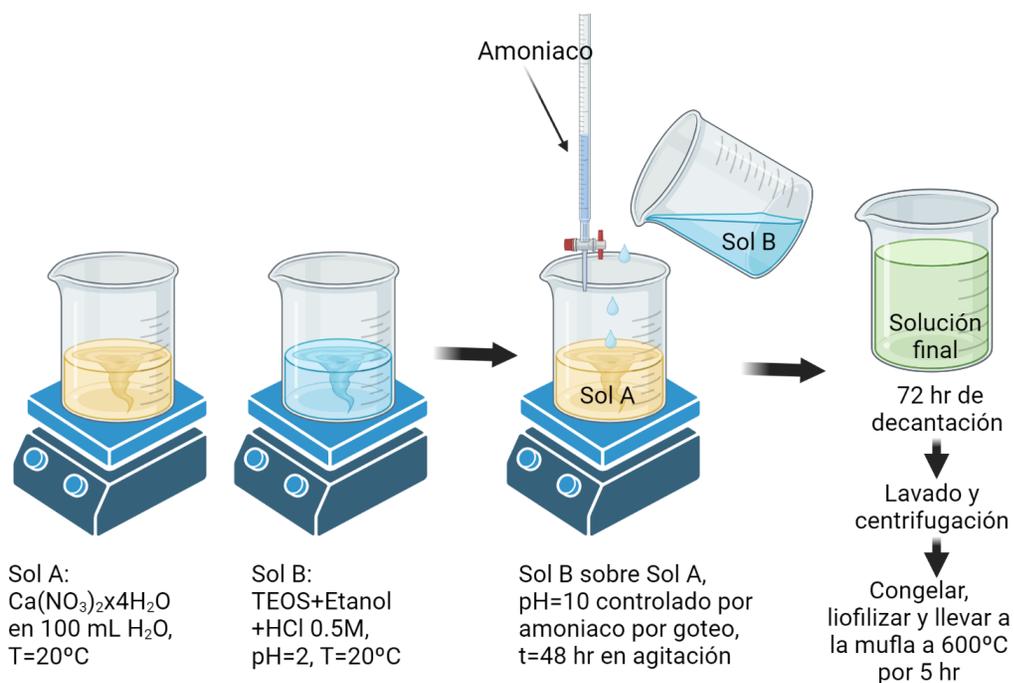


Figura 3.3: Diagrama de la preparación de las nanopartículas de biovidrio terciario.

Luego, se preparó la solución 1 que consistió en agregar la solución B a la solución A por goteo, manteniendo el pH a un valor de 2. Aparte, se preparó la solución 2, disolviendo 0,25 g de  $(\text{NH}_4)_2\text{H}_2\text{PO}_4$  en 1200 mL de agua Milli-Q. La solución final consiste en agregar la solución 1 a la 2, manteniendo el pH a un valor de 10. Se dejó la solución final en agitación a  $40^\circ\text{C}$  durante 48 h. Luego, se deja decantar por 3 días. El lavado de las NpBV se llevó a cabo centrifugando a 12.000 rpm y se eliminó el sobrenadante para redispersar con agua Milli-Q tres veces. Luego, las NpBV se congelaron a  $-80^\circ\text{C}$  toda la noche y se liofilizaron durante 48 hr, finalmente se llevaron a una mufla a  $20^\circ\text{C}$  y se aplicó una rampa de calentamiento de  $10^\circ\text{C}/\text{min}$  durante 1 h y una isoterma de 5 h para calcinar a  $600^\circ\text{C}$  (Figura 3.4 a) para obtener un polvo blanco y fino de NpBV (Figura 3.4 b).

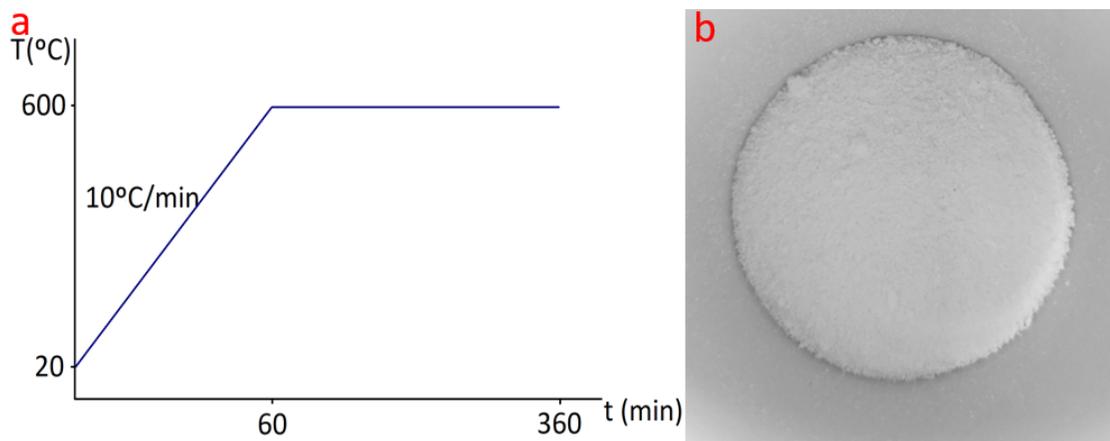


Figura 3.4: Diagrama de calcinación (a) y polvo blanco y fino de NpBV (b).

### 3.3. Fabricación de membranas híbridas compuestas por sílice, gelatina bovina, óxido de polietileno y nanopartículas de biovidrio terciario

De acuerdo con los resultados obtenidos en la Sección 3.1, se escogió la formulación para electrospinning 80%SiO<sub>2</sub>-10%G-10%PEO como precursor base para la incorporación de las NpBV en las fibras que constituyen las membranas. La elección de esta proporción, se debió a la obtención de fibras con menos defectos morfológicos a nivel de la superficie y al alto nivel de reproducibilidad de la fabricación de las membranas mediante electrospinning. Las NpBV se incorporaron en la mezcla en un 1-2% p/v, modificando la proporción de G y PEO de acuerdo a las limitaciones experimentales, principalmente por la ventana de gelificación de la mezcla, formando fibras a partir de los precursores 80%SiO<sub>2</sub>-5%G-14%PEO-1%NpBV, 80%SiO<sub>2</sub>-7%G-12%PEO-1%NpBV y 80%SiO<sub>2</sub>-10%G-8%PEO-2%NpBV.

La metodología para llevar a cabo esta formulación fue realizada de acuerdo a la Sección 3.1.2, agregando las NpBV antes del envejecimiento de 1 h a 50 °C, luego se agregó la proporción correspondiente de óxido de polietileno (PEO) y 100 μL de DMSO,

los precursores fueron sonicados durante 1 min a 60 W y 40 kHz, luego llevados a una jeringa de 10 mL de capacidad como se muestra en el esquema de la Figura 3.5. Los precursores fueron electrohilados a una temperatura de 20 °C, se utilizó una aguja de 20 G, las condiciones de trabajo para cada proporción aparecen en la Tabla 3.2. Se dispone de una ventana de tiempo de aproximadamente 50 min antes de que la solución con los precursores gelifique.

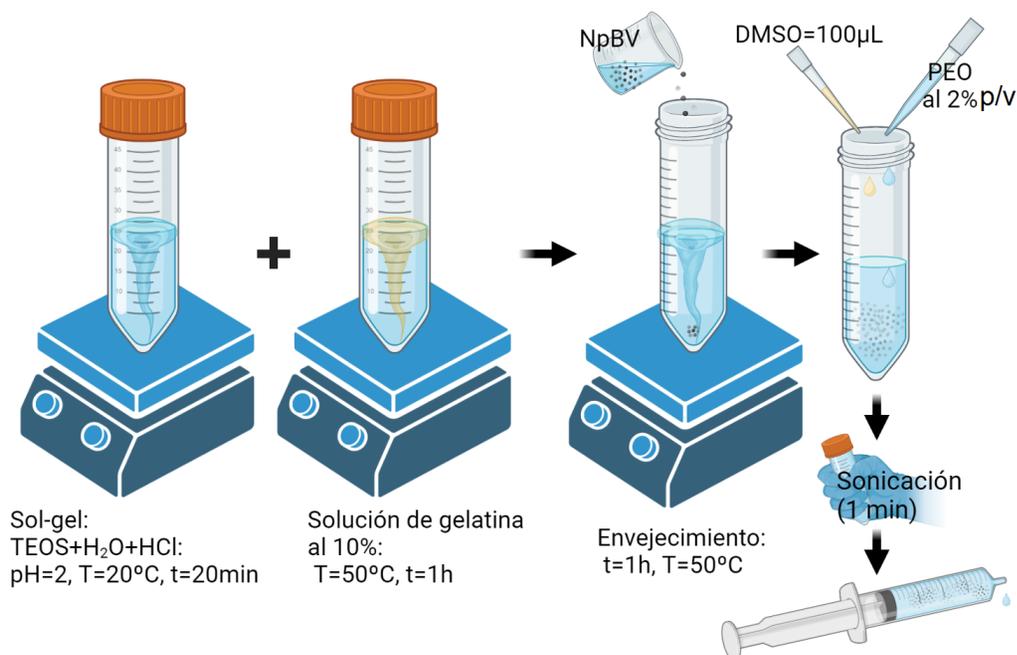


Figura 3.5: Diagrama ilustrativo de la preparación de los precursores SiO<sub>2</sub>-G-PEO-NpBV para electrospinning.

Precursores	Distancia aguja-plato (cm)	Voltaje (kV)	Flujo (mL/h)
80 %SiO <sub>2</sub> -5 %G-14 %PEO-1 %NpBV	12	9,3	1
80 %SiO <sub>2</sub> -7 %G-12 %PEO-1 %NpBV	15	19,3	1,2
80 %SiO <sub>2</sub> -10 %G-8 %PEO-2 %NpBV	15	14,9	0,8

Tabla 3.2: Parámetros de trabajo específicos para el electrohilado de los precursores SiO<sub>2</sub>-G-PEO-NpBV en las proporciones 80 %SiO<sub>2</sub>-5 %G-14 %PEO-1 %NpBV, 80 %SiO<sub>2</sub>-7 %G-12 %PEO-1 %NpBV y 80 %SiO<sub>2</sub>-10 %G-8 %PEO-2 %NpBV.

## **3.4. Caracterización de los materiales desarrollados**

Para la caracterización química (composición, enlaces), estructural y morfológica de las muestras, se han utilizado diversas técnicas para el estudio de los materiales. Esto con la finalidad de establecer la relación entre composición, estructura, morfología y propiedades de estos materiales.

### **3.4.1. Caracterización química (composición y enlaces)**

La estructura molecular de los materiales y membranas fueron obtenidas a través del uso de microscopia infrarroja por transformada de Fourier empleando un espectrómetro Thermo Scientific modelo Nicolet IS10, equipado con un detector de mercurio-cadmio, en el rango espectral de números de onda que comprende entre los 4000 a 400  $\text{cm}^{-1}$ , con una resolución espectral de 0.4  $\text{cm}^{-1}$ , en el modo de reflexión total atenuada (ATR-FTIR) y 32 escaneos. Los espectros obtenidos, fueron procesados mediante el software OMNIC 9, se corrigió la línea base y se normalizó la escala de absorbancia de 0 a 1, siendo 1 el valor máximo de la escala.

Mediante ATR-FTIR se pudo identificar los enlaces Si-O de la sílice y la gelatina bovina pudo ser semicuantificada, pero no se logró la determinación del contenido inorgánico de sílice en las membranas híbridas. Es por esto que fueron estudiadas por análisis termogravimétrico (TGA), que fue llevado a cabo utilizando un analizador termogravimétrico (TA instruments model Q50, EUA). Este análisis fue llevado a cabo masando por separado  $\sim 10$  mg de las muestras. Se evaluó la cantidad de contenido inorgánico en régimen dinámico de calentamiento en atmósfera de aire con un flujo de 40 mL/min para asegurar la remoción de la fase orgánica. De acuerdo con el diagrama de la Figura 3.6, primero se equilibró a 40 °C por 1 min a una velocidad de 10 °C/min, luego a la misma velocidad se calentó hasta 75 °C durante 15 min, luego se calentó a 400 °C por 30 min a una velocidad de 50 °C/min, finalmente a la misma velocidad se llegó hasta 800 °C [197].

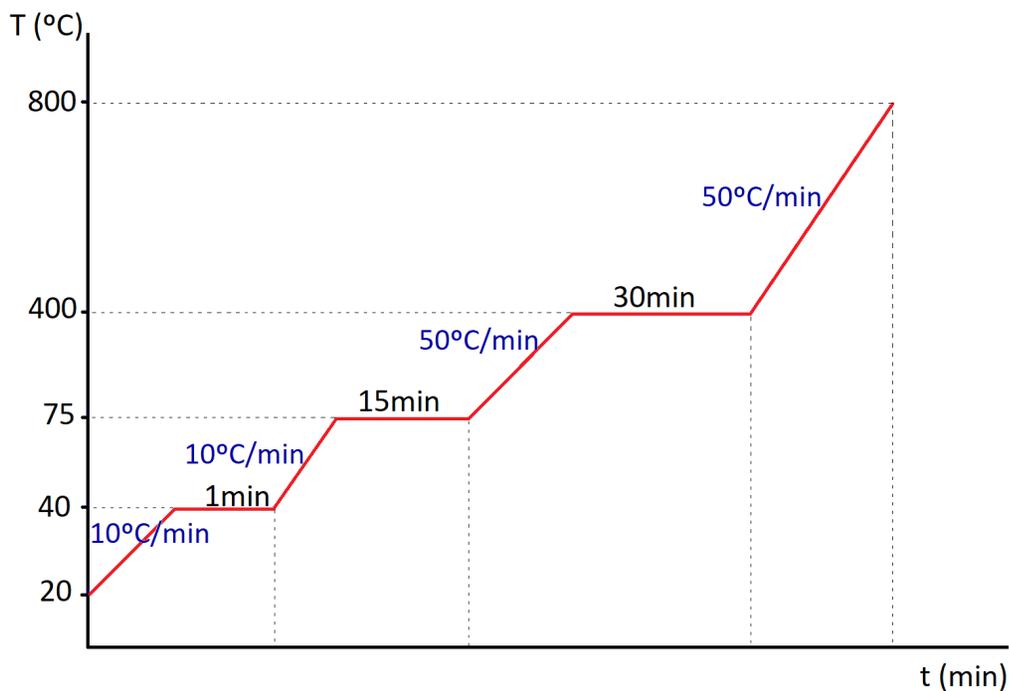


Figura 3.6: Diagrama de ciclo térmico aplicado a las membranas y materiales para determinar su contenido inorgánico.

### 3.4.2. Morfología y microestructura de los materiales fabricados

Se realizó el proceso de electrospinning de las soluciones con los precursores 90 %SiO<sub>2</sub>-10 %PEO, 85 %SiO<sub>2</sub>-5 %G-10 %PEO, 80 %SiO<sub>2</sub>-10 %G-10 %PEO, 70 %SiO<sub>2</sub>-20 %G-10 %PEO y 68 %SiO<sub>2</sub>-25 %G-7 %PEO para formar membranas. La primera caracterización realizada fue microscopia óptica para verificar la formación de fibras. Para ello en el plato colector se posicionó un portaobjetos de vidrio y se depositó fibras poco pobladas. La formación de fibras se observó con un microscopio óptico de campo oscuro OLYMPUS modelo SZX16, con magnificación de 11.5×, calibrado con un micrómetro objetivo se obtuvo una escala de 50 μm. Se estimó el diámetro de 20 fibras para cada imagen mediante el software ImageJ.

Las estructuras cristalinas de las membranas y materiales fueron estudiadas mediante difracción de rayos X de polvo (DRX). Los estudios fueron llevados a cabo utilizando un

difractómetro (Bruker D8 Advance, Reino Unido), el cual posee una fuente de radiación monocromática  $CuK\alpha$  ( $\lambda = 1.541 \text{ \AA}$ ) y operado a una tensión y corriente de 40 kV y 30 mA, respectivamente. Los difractogramas se obtuvieron en el rango de ángulos de difracción  $2\theta$  de 5 a  $80^\circ$  usando un tamaño de paso de  $0,02^\circ$  y un tiempo de 0,1 s por paso. Los patrones de difracción obtenidos fueron procesados para corrección de línea base mediante el software Origin Pro 2018.

La morfología superficial de los materiales fabricados (fibras y NpBV) fue estudiado mediante microscopia electrónica de barrido con emisión de campo (FESEM, Inspect F250, FEI, EUA), permitiendo la obtención de imágenes detalladas de las muestras. Para esto, se utilizó un voltaje de aceleración entre 5 y 10 kV. Mediante el software ImageJ, se estimaron los diámetros de aproximadamente 100 fibras para cada imagen y se obtuvieron histogramas de distribución del diámetro. Además, se pudo observar la morfología de las fibras y superficie de forma detallada y se obtuvo información de la composición atómica superficial de las muestras mediante espectroscopia dispersiva de rayos X (EDX). Pevio a los análisis, las muestras fueron colocadas en una cámara a vacío durante 10 minutos en la que fueron anteriormente recubiertas con 5 nm de oro.

La morfología de las NpBV también fue estudiada mediante microscopía electrónica de transmisión de barrido (STEM JEOL, JSM-IT300LV). Se utilizó un voltaje de aceleración de 30 kV. A partir de las imágenes TEM con magnificación de  $2500\times$  se obtuvo un histograma de distribución de diámetro de las NpBV mediante el software ImageJ, estimando los diámetros de aproximadamente 20 nanopartículas. Pevio al análisis, las NpBV fueron diluidas en agua Milli-Q en la proporción 1:100 y sonicadas, luego fueron depositadas en un porta muestras para TEM, secadas, recubiertas con 5 nm de oro y colocadas en una cámara a vacío durante 10 min.

### **3.4.3. Análisis del ángulo de contacto entre membrana y gota de agua (ensayo de humectabilidad)**

Se empleó un analizador de forma de gota (Kruss, DSA 25, Alemania) para evaluar la hidrofilia y la humectabilidad de las membranas electrohiladas. Los valores del ángulo de contacto de 10 gotas, para cada membrana individual, se midieron utilizando el software de análisis ADVANCE.

### **3.4.4. Medición de la porosidad aparente de las membranas**

La porosidad de una membrana se puede obtener basándose en la observación y análisis de su superficie. Para ello, se puede estudiar la razón entre la superficie de los poros y la superficie total de la membrana para obtener la porosidad aparente [198]. En este caso la porosidad vendría dada por:

$$\phi = \frac{A_p}{A_t} = 1 - \frac{A_s}{A_t} \quad (3.1)$$

donde  $A_t$  es el área total geométrica,  $A_p$  el área de muestra vacía y  $A_s$  el área del material sólido. Es decir:

$$A_t = A_s + A_p \quad (3.2)$$

A partir de las imágenes SEM de las membranas y mediante el software ImageJ se midió el área del espacio entre fibras y el área total geométrica para obtener la porosidad superficial.

### **3.4.5. Análisis estadístico de la covarianza (ANCOVA) entre la porosidad y composición de las membranas sobre el ángulo de contacto**

Se realizó un estudio para profundizar en la posible influencia de la geometría, topografía y composición de las membranas, sobre los resultados de ángulo de contacto

para verificar si se puede establecer una parametrización. El análisis se llevo a cabo utilizando el software R (versión 3.6.3) [199].

Los resultados se expresaron como medias y desviación estándar y en todos los casos el nivel de significancia se estableció en  $\alpha = 0.05$ . Primero se calcularon los coeficientes de Spearman [200], para determinar la correlación entre la variable de respuesta (ángulo de contacto) y las posibles variables explicativas ( $\text{SiO}_2$ , G, PEO, NpBV, porosidad). Luego, se evaluaron los efectos de la composición de las membranas en base al test Mann-Whitney-Wilcoxon, para identificar efectos estadísticamente significativos en la variable de respuesta. En base a los resultados obtenidos en el test Mann-Whitney-Wilcoxon para cada variable explicativa, se desarrolló un modelo de regresión múltiple utilizando los valores experimentales medidos de las variables explicativas y sus respectivas interacciones. El modelo lineal fue:

$$Y = (\text{SiO}_2) \times \beta_1 + (\text{PEO}) \times \beta_2 + (\text{NpBV}) \times \beta_3 + (\text{SiO}_2 : \text{PEO}) \times \beta_4 + (\text{SiO}_2 : \text{NpBV}) \times \beta_5 + \text{intercepto} \quad (3.3)$$

donde Y corresponde a la variable de respuesta ángulo de contacto,  $\beta_i$  corresponde a los coeficientes del modelo de regresión asociados a las variables  $\text{SiO}_2$ , PEO, NpBV y sus respectivas interacciones.

### **3.5. Formación de hidroxiapatita en fluido corporal simulado (SBF)**

La formación de hidroxiapatita en las membranas fueron evaluadas *in vitro* por inmersión en una solución de fluido corporal simulado (SBF) tal como la desarrollada por Kokubo et al. [201]. Se usó una relación en masa de muestra (membrana) a volumen de SBF de 0.01 g/mL, la inmersión se llevó a cabo en en tubos @Falcon de 50 mL. Se recortó por triplicado secciones de 20 x 20 mm de las membranas que contienen NpBV (80 % $\text{SiO}_2$ -5 %G-14 %PEO-1 %NpBV, 80 % $\text{SiO}_2$ -7 %G-12 %PEO-1 %NpBV y 80 % $\text{SiO}_2$ -10 %G-8 %PEO-2 %NpBV) y de la membrana obtenida desde el precursor 80 % $\text{SiO}_2$ -10 %G-10 %PEO usada como referencia al no contener NpBV. Se sumergió cada sección

en 20 mL de SBF, durante el ensayo cada membrana permaneció en contacto con el SBF durante intervalos de tiempo de 3, 7 y 14 días, a 37°C de temperatura, bajo constante agitación a 60 rpm, para simular las condiciones ambientales del cuerpo humano. Se tomaron medidas de pH después de cada tiempo de inmersión, para evaluar la variación desde pH=7.4 del SBF, con la finalidad de relacionarlas con la formación de hidroxiapatita. Luego, las membranas fueron removidas de los tubos y lavadas con agua Milli-Q, secadas en la estufa a 40°C durante 72 h. Posteriormente las membranas secas fueron caracterizadas para evaluar la formación de una capa de fosfato de calcio (CaP) sobre la superficie, mediante difracción de rayos X de polvo (DRX), espectroscopía de infrarrojo en modo reflexión total atenuada (ATR-FTIR), microscopia electrónica de barrido con emisión de campo (FESEM) y espectroscopia dispersiva de rayos X (EDX).

## **3.6. Realización de cultivo celular en las membranas, pruebas de adhesión, crecimiento y diferenciación osteogénica.**

### **3.6.1. Cultivo celular**

Se aislaron células madre de tejido de pulpa dental (hDPSC), el proceso se llevo a cabo mediante la técnica de digestión enzimática. Las muestras de encías fueron lavadas varias veces con una solución de tampón fosfato salino (PBS) suplementada con antibióticos (penicilina/estreptomicina) al 1 %. Seguidamente, para asegurar la total separación de la superficie epitelial, las muestras fueron incubadas con 2 mg/ml de Dispasa II a 4°C durante toda la noche. Luego, trituradas sobre placas de Petri en fragmentos menores a 1 mm<sup>3</sup> empleando hojas de bisturí y fueron digeridas durante 2 h en una solución de medio completo compuesto por  $\alpha$ -MEM (Minimal Eagle Medium, Invitrogen) y suero bovino fetal (SBF) al 10 % con 4 mg/ml de Colagenasa I. Cada tubo preparado fue posteriormente diluido en una solución con medio  $\alpha$ -MEM y SBF al 10 % y fueron posteriormente centrifugados, resuspendidos y nuevamente centrifugados. Las

células fueron sembradas en placas de 35 mm con  $\alpha$ -MEM, SBF al 10% y antibióticos al 1%. El medio se renovó cada 2-3 días, manteniendo el cultivo hasta alcanzar la confluencia en las placas.

### 3.6.2. Viabilidad celular

Se utilizó la técnica de reducción de MTS para medir la viabilidad celular según el kit CellTiter 96 AQueus Non-Radioactive Cell Proliferation Assay, basado en una modificación del ensayo de reducción de MTT (Mosman y col., 1983). El MTS (3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-5-[3-carboximetoxifenil]-2-[4-sulfofenil]-2Htetrazolio) es bio-reducido por las células viables a través de las enzimas deshidrogenasas mitocondriales, en un producto coloreado llamado formazán que a su vez es soluble en el medio de cultivo y su absorbancia puede ser medida con un espectrofotómetro UV-visible a una longitud de onda de 490 nm. La absorbancia de este producto es directamente proporcional a la cantidad de células vivas en el medio de cultivo [202].

Las membranas formadas por los precursores que contienen gelatina: 90%SiO<sub>2</sub>-10%PEO (usado como referencia al no contener gelatina), 85%SiO<sub>2</sub>-5%G-10%PEO, 70%SiO<sub>2</sub>-20%G-10%PEO, 68%SiO<sub>2</sub>-25%G-7%PEO y las membranas formadas por los precursores que contienen NpBV: 80%SiO<sub>2</sub>-10%G-10%PEO (usado como referencia al no contener NpBV), 80%SiO<sub>2</sub>-5%G-14%PEO-1%NpBV, 80%SiO<sub>2</sub>-7%G-12%PEO-1%NpBV y 80%SiO<sub>2</sub>-10%G-8%PEO-2%NpBV fueron recortadas por triplicado y colocadas en placas de 48 pocillos (cada uno de 0,25 mL de capacidad y 0,95 cm<sup>2</sup> de superficie) (Figura 3.7 a y b). Se aplicó un protocolo de acondicionamiento a las membranas, que consiste en esterilizar durante 2 h con etanol al 70% utilizando un volumen que cubra totalmente el material, luego fueron lavadas y sumergidas toda la noche en medio de cultivo (Figura 3.7 c y d).

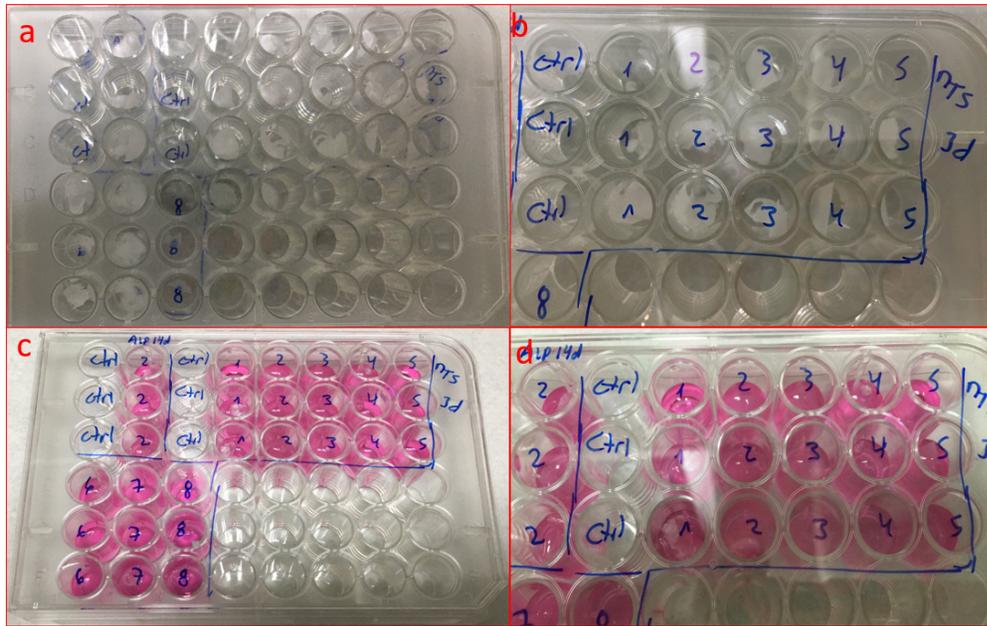


Figura 3.7: Membranas recortadas en una placa de 48 pocillos para ensayo MTS (a y b) y membranas acondicionadas en medio de cultivo (c y d).

Se sembraron 100.000 células sobre cada membrana, agregando 200  $\mu$ l de  $\alpha$ -MEM suplementado con SFB al 10%, se incubó a una temperatura de 37°C en atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5% durante 7 y 14 días. Como control se emplearon células solas en los pocillos (sin membrana) que fueron cultivadas durante los mismos periodos de tiempo. En cada periodo de tiempo, se realizaron 2 lavados con PBS, luego se agregó 200  $\mu$ l de  $\alpha$ -MEM suplementado con SFB al 10% junto con una mezcla del reactivo MTS/PMS (metosulfato de fenazina) en una proporción 20/1 de acuerdo al protocolo del fabricante del kit. Luego, se incubó la mezcla durante 1 h a una temperatura de 37°C a una atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5%, y la absorbancia se midió con un lector de microplacas a 490 nm en espectrofotómetro. La absorbancia observada corresponde al producto de reducción del MTS (formazán), el cual es producido por las deshidrogenasas mitocondriales de las células viables presentes. Los análisis estadísticos se realizaron utilizando el software Origin Pro 2021, mediante ANOVA unidireccional con comparaciones entre muestras y control mediante análisis de Tukey con significancia  $p < 0.05$  y  $p < 0.01$ .

### 3.6.3. Diferenciación osteogénica

La capacidad de diferenciación osteogénica de las células madre aisladas de los tejidos dentales en las membranas formadas por los precursores que contienen gelatina: 90 %SiO<sub>2</sub>-10 %PEO (usado como referencia al no contener gelatina), 85 %SiO<sub>2</sub>-5 %G-10 %PEO, 70 %SiO<sub>2</sub>-20 %G-10 %PEO, 68 %SiO<sub>2</sub>-25 %G-7 %PEO y las membranas formadas por los precursores que contienen NpBV: 80 %SiO<sub>2</sub>-10 %G-10 %PEO (usado como referencia al no contener NpBV), 80 %SiO<sub>2</sub>-5 %G-14 %PEO-1 %NpBV, 80 %SiO<sub>2</sub>-7 %G-12 %PEO-1 %NpBV y 80 %SiO<sub>2</sub>-10 %G-8 %PEO-2 %NpBV, se evaluó mediante la actividad de la enzima fosfatasa alcalina (ALP).

Para la medición de la actividad de ALP, se aplicó el mismo protocolo de acondicionamiento de las membranas y siembra de células de la Sección 3.6.2, estas se cultivaron en medio de cultivo (DMEM suplementado con 10 % SBF, penicilina/estreptomicina y anfotericina como antibióticos, sin suplementos osteogénicos) por 14 días. Completado el tiempo de cultivo, se retiraron las muestras y se fijaron en una solución de etanol al 90 % y formaldehído al 10 % durante 1 min, tras lo cual se lavaron con una solución PBS. La actividad de la enzima ALP fue determinada mediante el ensayo colorimétrico de desfosforilación del reactivo para-nitrofenilfosfato, la absorbancia se midió con un lector de microplacas a 405 nm por espectroscopia UV-visible. Los análisis estadísticos se realizaron utilizando el software Origin Pro 2021, mediante ANOVA unidireccional con comparaciones entre muestras y control mediante análisis de Tukey con significancia  $p < 0.05$  y  $p < 0.01$ .

### 3.6.4. Ensayos de biodegradación de las membranas

Para evaluar la biodegradación *in vitro* de las membranas, se utilizó una solución de tampón fosfato salino (PBS) con lisozima de clara de huevo a una concentración de 0,5 mg/mL. Se utilizó secciones de membranas de 40x40 mm por triplicado sumergidas en 15 mL de solución en placas de Petri. Las membranas fueron mantenidas en inmersión durante 7, 14, 21 y 28 días en una incubadora a 37 °C bajo agitación a 100 rpm.

El análisis gravimétrico para determinar la pérdida de peso durante la degradación, inicia con el registro del peso inicial seco  $W_i$  de las membranas. Luego de los respectivos periodos de inmersión, las muestras fueron extraídas de la solución y colocadas sobre papel filtro para quitarle el exceso de agua de la superficie. Luego las membranas fueron secadas a  $30\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 24 h y se registró el peso seco  $W_f$ . El porcentaje de biodegradación se calculó mediante la Ecuación 3.4

$$(\%)Biodegradacion = \frac{(W_i - W_f)}{W_i} \times 100 \quad (3.4)$$

# Capítulo 4

## Resultados y discusión

La sección de resultados y discusión se divide en cinco partes. La primera parte contempla los resultados de caracterización de las membranas obtenidas mediante electrospinning desde los precursores  $\text{SiO}_2$ -PEO y  $\text{SiO}_2$ -G-PEO, con un contenido inorgánico en un rango de 68-90% el cual fue cuantificado por TGA. Cada tipo de membrana fue caracterizada mediante FTIR, DRX y FESEM/EDX. Los resultados obtenidos en esta etapa constituyen la base para la elección del material al que se le incorporará las nanopartículas de biovidrio terciario (NpBV).

En la segunda etapa se presentan los resultados de la síntesis de nanopartículas de biovidrio terciario (NpBV). Estas fueron caracterizadas mediante FTIR, DRX, FESEM/EDX, TEM y TGA.

En la tercera etapa se realizó la incorporación de las nanopartículas de biovidrio terciario (NpBV) en el precursor  $\text{SiO}_2$ -G-PEO, para posteriormente ser electrohilado. Esta incorporación de NpBV en las fibras se corroboró mediante análisis FESEM/EDX.

La cuarta etapa corresponde a las mediciones de ángulo de contacto y porosidad de todas las membranas. Además, del estudio de bioactividad de las membranas que contienen NpBV.

En la quinta etapa, se muestran los ensayos de viabilidad y diferenciación osteogénica realizados en todas las membranas. Por último, se muestran los resultados de biodegradación.

## 4.1. Membranas de SiO<sub>2</sub>-PEO y SiO<sub>2</sub>-G-PEO obtenidas mediante electrospinning

La Figura 4.1 muestra el material obtenido desde un precursor conteniendo 90 %SiO<sub>2</sub>-10 %PEO, dependiendo de varios parámetros como el voltaje, la velocidad de flujo, la temperatura, la humedad relativa, el diámetro de la aguja y la distancia de aguja al plato colector se pudo obtener algodones (Figura 4.1 a) y membranas (Figura 4.1 b). En este presente trabajo se escogió el material tipo membrana en relación con la aplicación que se quiere dar al material para ROG.



Figura 4.1: Fotografías macroscópicas de los materiales obtenidos a partir del precursor 90 %SiO<sub>2</sub>-10 %PEO tipo algodón (a) y membrana (b).

El primer paso para comprobar la formación de fibras híbridas, fue electrohilar los precursores SiO<sub>2</sub>-PEO y SiO<sub>2</sub>-G-PEO en distintas proporciones. Se utilizaron los parámetros de voltaje, distancia aguja-plato colector y velocidad de flujo presentados en la Tabla 3.1 de la Sección 3.1.1. Finalmente, se electrohilaron los precursores, y se observaron las muestras por microscopia óptica para identificar la obtención de fibras. Se muestran imágenes de las fibras observadas que fueron obtenidas desde los precursores de formulación de 90 %SiO<sub>2</sub>-10 %PEO (Figura 4.2 a), 85 %SiO<sub>2</sub>-5 %G-10 %PEO (Figura

4.2 b), 80 %SiO<sub>2</sub>-10 %G-10 %PEO (Figura 4.2 c) y 68 %SiO<sub>2</sub>-25 %G-7 %PEO (Figura 4.2 d). Desde las imágenes de microscopía óptica se cuantificó el diámetro de las fibras y los resultados están reportados en la Tabla 4.1. A partir de estos resultados se pudo conocer los extremos de las proporciones de cada precursor a utilizar, asegurando la formación de fibras y evitar electroespray, asociado a la formación de gotas que ha sido identificado en algunas imágenes de microscopía óptica. Así, se definieron los parámetros y composiciones más adecuadas para fabricar membranas constituidas de microfibras híbridas.

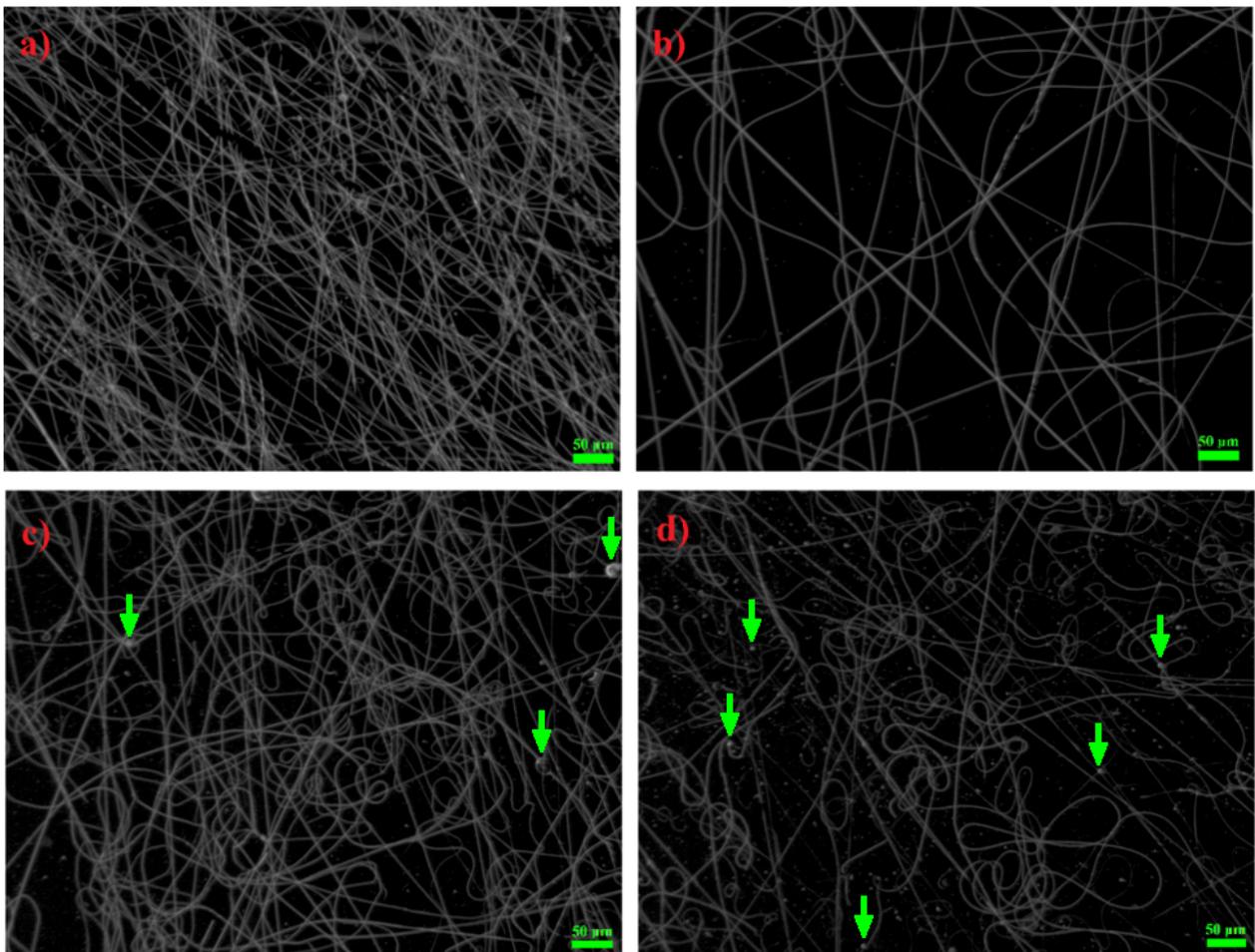


Figura 4.2: Imágenes de microscopía óptica de las fibras obtenidas a partir del electrohilado de los precursores 90 %SiO<sub>2</sub>-10 %PEO (a), 85 %SiO<sub>2</sub>-5 %G-10 %PEO (b), 80 %SiO<sub>2</sub>-10 %G-10 %PEO (c) y 68 %SiO<sub>2</sub>-25 %G-7 %PEO (d). Las flechas de color verde indican la presencia de gotas debido al electroespray.

Precursores	Diámetro promedio ( $\mu\text{m}$ )
90 %SiO <sub>2</sub> -10 %PEO	1,5 $\pm$ 0,5
85 %SiO <sub>2</sub> -5 %G-10 %PEO	1,7 $\pm$ 0,8
80 %SiO <sub>2</sub> -10 %G-10 %PEO	1,9 $\pm$ 0,9
68 %SiO <sub>2</sub> -25 %G-7 %PEO	1.8 $\pm$ 0.8

Tabla 4.1: Diámetro promedio de las fibras observadas por microscopía óptica obtenidas a partir del electrohilado de los precursores 90 %SiO<sub>2</sub>-10 %PEO, 85 %SiO<sub>2</sub>-5 %G-10 %PEO, 80 %SiO<sub>2</sub>-10 %G-10 %PEO y 68 %SiO<sub>2</sub>-25 %G-7 %PEO.

Mediante la realización de estos experimentos preliminares, se pudo observar que al disminuir la proporción de PEO de 10 a 7% y aumentar la proporción de G, la mezcla con los precursores se volvió más difícil de electrohilar debido al aumento de la tensión superficial, que depende principalmente de la naturaleza química del disolvente, del polímero y de la temperatura [203] [204]. En general, distintos disolventes pueden contribuir a diferentes valores de tensión superficiales [205]. Durante el proceso de electrohilado, la tensión superficial influye directamente sobre la morfología de las fibras [163]. Se ha reportado que valores de tensión superficial muy altos inhiben la obtención de fibras y que a medida que disminuye el valor de la tensión superficial, se obtienen fibras sin defectos [203]. De acuerdo con lo reportado en la literatura, una medida que se implementó para disminuir los defectos y gotas al aumentar la proporción de G (Figura 4.2 c y d), fue la incorporación del co-solvente dimetilsulfóxido (DMSO) en una cantidad muy baja [163] [206], no mayor al 1 % en la formulación con los precursores SiO<sub>2</sub>-G-PEO, resultando en fibras con menos defectos y fáciles de electrohilar.

#### 4.1.1. Caracterización química

La estructura molecular de los materiales desarrollados fue analizada mediante espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FTIR), se analizó la estructura química de las membranas (SiO<sub>2</sub>-PEO y SiO<sub>2</sub>-G-PEO) y los materiales (SiO<sub>2</sub>, PEO y G), cuyos espectros se muestran en las Figuras 4.3 A y 4.3 B, respectivamente. En la Tabla 4.2 se muestra el resumen de las bandas de absorción y asignaciones asociadas a las estructu-

ras moleculares de cada material.

En el caso de las membranas (Figura 4.3 A), se identificó la presencia de sílice a través de las bandas de absorción correspondientes a los movimientos vibracionales del enlace Si-O posicionadas en el rango de números de onda 830-1110  $\text{cm}^{-1}$  (Figura 4.3 B) [176]. También se logró identificar la banda de absorción característica de la gelatina posicionada a un número de onda de 1.640  $\text{cm}^{-1}$  debido a los movimientos vibracionales del enlace doble C=O (vibración amida I) presente en la estructura molecular del enlace peptídico (Figura 4.3 B) [207] [164]. Se puede observar el aumento de la intensidad relativa de esta banda conforme al aumento del porcentaje de gelatina en los precursores SiO<sub>2</sub>-G-PEO electroestirados (Figura 4.3 A). Esto permitió semi-cuantificar la presencia de gelatina incorporada en las membranas híbridas.

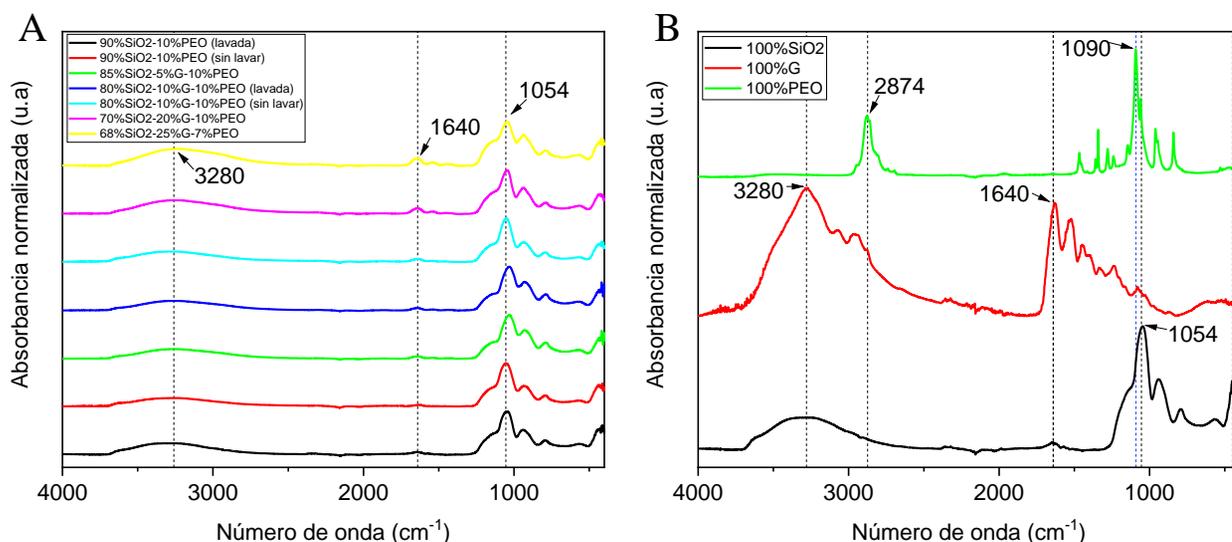


Figura 4.3: Espectros infrarrojos por transformada de Fourier (FTIR) de las membranas obtenidas desde los precursores 90 %SiO<sub>2</sub>-10 %PEO (lavada), 90 %SiO<sub>2</sub>-10 %PEO (sin lavar), 85 %SiO<sub>2</sub>-5 %G-10 %PEO, 80 %SiO<sub>2</sub>-10 %G-10 %PEO (lavada), 80 %SiO<sub>2</sub>-10 %G-10 %PEO (sin lavar), 70 %SiO<sub>2</sub>-20 %G-10 %PEO y 68 %SiO<sub>2</sub>-25 %G-7 %PEO (A) y materiales 100 %SiO<sub>2</sub>, 100 %G y 100 %PEO (B).

Debido a que mediante FTIR no se puede cuantificar la sílice, se utilizó el análisis termogravimétrico para determinar el contenido inorgánico presente en las fibras.

Material	Posición de las bandas de absorción ( $cm^{-1}$ )	Asignación
sílice	1054	Si-O-Si (vibración de tensión) [176]
	954	Si-OH [176]
	796	Si-O (vibración de flexión) [176]
	576	Si-O (vibración de balanceo) [176]
Gelatina	1640	Amida I (C=O vibración de tensión) [207] [164]
	1544	Amida II (N-H vibración de flexión, C-H vibración de tensión) [207] [164]
	3280	Amida A (N-H vibración de tensión) [207] [164]
PEO	1090	C-O-C (vibración de tensión) [208]
	2874	C-H (vibración de tensión) [208]

Tabla 4.2: Posición de las bandas de absorción y asignaciones de los espectros infrarrojos por transformada de Fourier (FTIR) para sílice, gelatina y óxido de polietileno (PEO).

#### 4.1.2. Determinación del contenido inorgánico de las membranas por análisis termogravimétrico TGA

El contenido inorgánico de las membranas y de los materiales, fue cuantificado mediante análisis termogravimétrico (TGA) en atmósfera oxidante. Los termogramas obtenidos se muestran en la Figura 4.4 y la información de análisis detallada de estos se dan a conocer en la Tabla 4.3, incluyendo los valores de contenido inorgánicos.

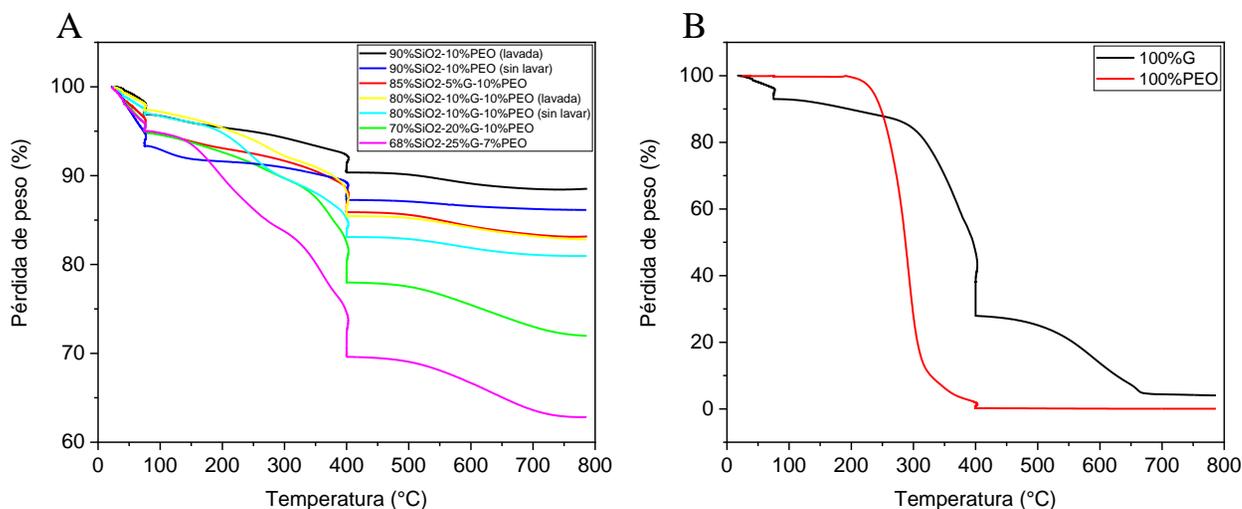


Figura 4.4: Curvas termogravimétricas (TGA) de las membranas obtenidas desde los precursores de composición 90 %SiO<sub>2</sub>-10 %PEO (lavada), 90 %SiO<sub>2</sub>-10 %PEO (sin lavar), 85 %SiO<sub>2</sub>-5 %G-10 %PEO, 80 %SiO<sub>2</sub>-10 %G-10 %PEO (lavada), 80 %SiO<sub>2</sub>-10 %G-10 %PEO (sin lavar), 70 %SiO<sub>2</sub>-20 %G-10 %PEO, 68 %SiO<sub>2</sub>-25 %G-7 %PEO (A) y de los materiales 100 %G y 100 %PEO (B).

De acuerdo con los análisis de TGA obtenidos para estas muestras fue posible observar la estimación del contenido inorgánico correspondiente a la presencia de sílice para cada membrana obtenida (residuo en porcentaje) (Figura 4.4 A). Desde los termogramas obtenidos, fue posible observar que estas presentaron cuatro eventos térmicos de degradación. El primer evento térmico fue determinado en el rango de temperatura de aproximadamente 50 a 90 °C, que fue asociado a la pérdida de humedad presente en las muestras. El segundo evento térmico fue determinado en el rango de temperatura de 90 a 300 °C, el que se asoció a la degradación de componentes de bajo peso molecular relativo como el PEO. El tercer evento térmico se determinó alrededor de los 400 °C y este corresponde al principal evento donde se produjo la mayor pérdida de masa, debido principalmente a la degradación térmica de la G. Finalmente, el cuarto evento térmico fue determinado en el rango de temperaturas entre 400 y 750 °C, no observándose otros eventos sobre los 750 °C.

Membranas y materiales	Temperatura (°C)	Residuo (%)
100%SiO <sub>2</sub>	750	95.1 ± 0.9
90%SiO <sub>2</sub> -10%PEO	750	88.3 ± 0.5
85%SiO <sub>2</sub> -5%G-10%PEO	750	84.9 ± 0.3
85%SiO <sub>2</sub> -15%PEO	750	83.2 ± 0.4
80%SiO <sub>2</sub> -10%G-10%PEO	750	80.9 ± 0.5
70%SiO <sub>2</sub> -20%G-10%PEO	750	72.2 ± 0.6
68%SiO <sub>2</sub> -25%G-7%PEO	750	66.3 ± 0.4
100%G	750	4.1 ± 0.6
100%PEO	400	0.0 ± 0.1

Tabla 4.3: Estimación del contenido inorgánico correspondiente a las membranas y materiales (SiO<sub>2</sub>, G y PEO) (residuo en porcentaje) y sus temperaturas correspondientes a las cuales los residuos fueron determinados.

En la Tabla 4.3 se muestra la información del residuo que es proporcional a la cantidad de sílice presente en las membranas. El gráfico de la Figura 4.5 permite estudiar la relación que existe entre la cantidad teórica de sílice proveniente del precursor y la cantidad obtenida mediante TGA. Se obtuvo la ecuación lineal  $y = 1,01x$  que puede ayudar a predecir el contenido inorgánico experimental que se obtiene a partir del contenido teórico del precursor. Se observa una buena correlación, positiva y lineal de 0.99 lo que indica una relación fuertemente lineal 1:1, las diferencias que existen se deben probablemente a la fase orgánica correspondiente al PEO y la G que se degradan completamente a 400 °C y a 650 °C respectivamente, quedando un residuo carbonizado.

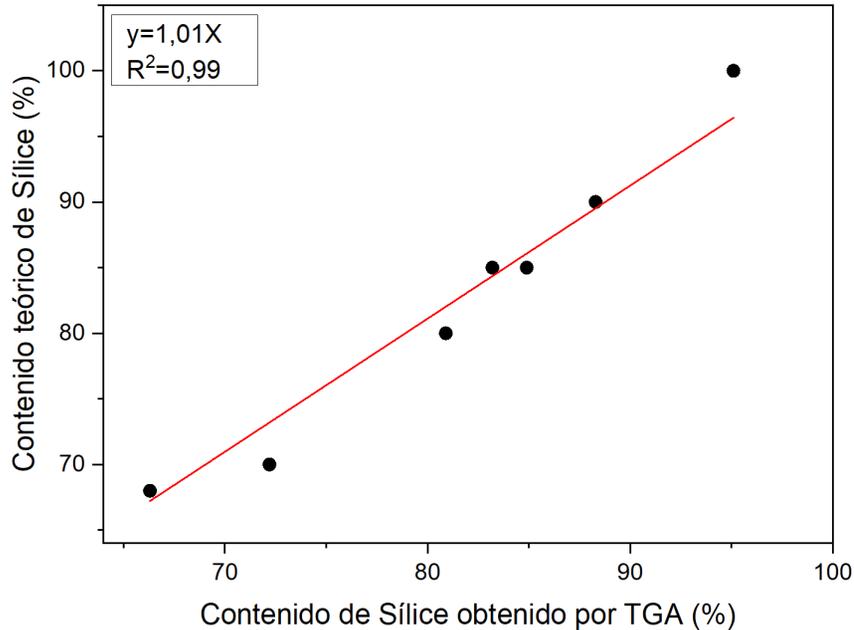


Figura 4.5: Relación entre el contenido sólido inorgánico teórico de los precursores con el contenido inorgánico experimental de las membranas determinado por TGA.

Dado que el FTIR no fue capaz de identificar la presencia del PEO, tampoco el TGA que no permitió discriminar los componentes de la fase orgánica. Es por eso que las membranas y los materiales se analizaron por difracción de rayos X de polvo para poder identificar la potencial presencia de PEO.

#### 4.1.3. Estructura cristalina y morfología

La estructura cristalina de las membranas,  $\text{SiO}_2$ , G y PEO, fueron analizadas mediante difracción de rayos X en polvo (DRX). Los resultados se muestran en la Figura 4.6. En los difractogramas obtenidos se pueden observar peaks localizados en los ángulos de difracción  $2\theta$ : 18 y 22.5°, los cuales fueron asociados a los planos de difracción (120) y (112), respectivamente. Estos peaks de difracción corresponden a la estructura cristalina del PEO [118].

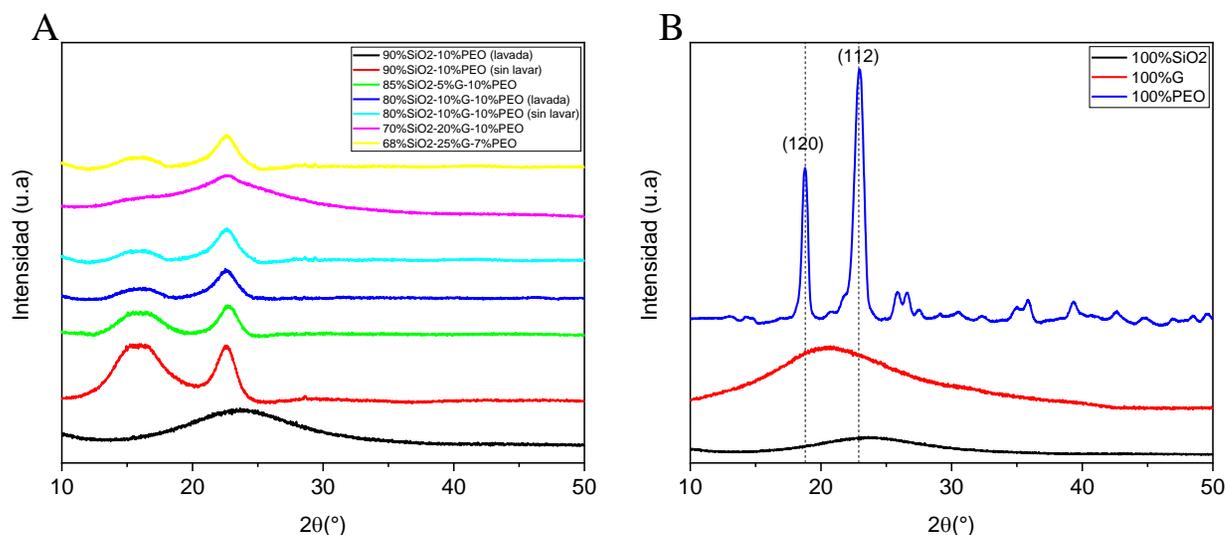


Figura 4.6: Difractogramas de las membranas fabricadas desde los precursores 90%SiO<sub>2</sub>-10%PEO (lavada), 90%SiO<sub>2</sub>-10%PEO (sin lavar), 85%SiO<sub>2</sub>-5%G-10%PEO, 80%SiO<sub>2</sub>-10%G-10%PEO (lavada), 80%SiO<sub>2</sub>-10%G-10%PEO (sin lavar), 70%SiO<sub>2</sub>-20%G-10%PEO y 68%SiO<sub>2</sub>-25%G-7%PEO (A) y de los materiales 100%SiO<sub>2</sub>, 100%G y 100%PEO (B) obtenidos por difracción de rayos X en polvo (DRX).

La morfología superficial de las membranas fue observada mediante FESEM. Se observa que las membranas fabricadas mediante la técnica de electrospinning están constituidas principalmente por una red de fibras bien definidas, estas fueron obtenidas desde los precursores 90%SiO<sub>2</sub>-10%PEO (lavada) (Figura 4.7 A y B), 90%SiO<sub>2</sub>-10%PEO (sin lavar) (Figura 4.7 C y D), 85%SiO<sub>2</sub>-5%G-10%PEO (Figura 4.8 A y B), 80%SiO<sub>2</sub>-10%G-10%PEO (sin lavar) (Figura 4.8 C y D), 80%SiO<sub>2</sub>-10%G-10%PEO (lavada) (Figura 4.8 E y F). También se observa en las membranas obtenidas a partir de los precursores 70%SiO<sub>2</sub>-20%G-10%PEO (Figura 4.9 A y B) y 68%SiO<sub>2</sub>-25%G-7%PEO (Figura 4.9 C y D), conforme aumenta la concentración de G de un 20-25%, comienzan a aparecer defectos morfológicos como perlas y gotas, así como rugosidades en la superficie de las fibras.

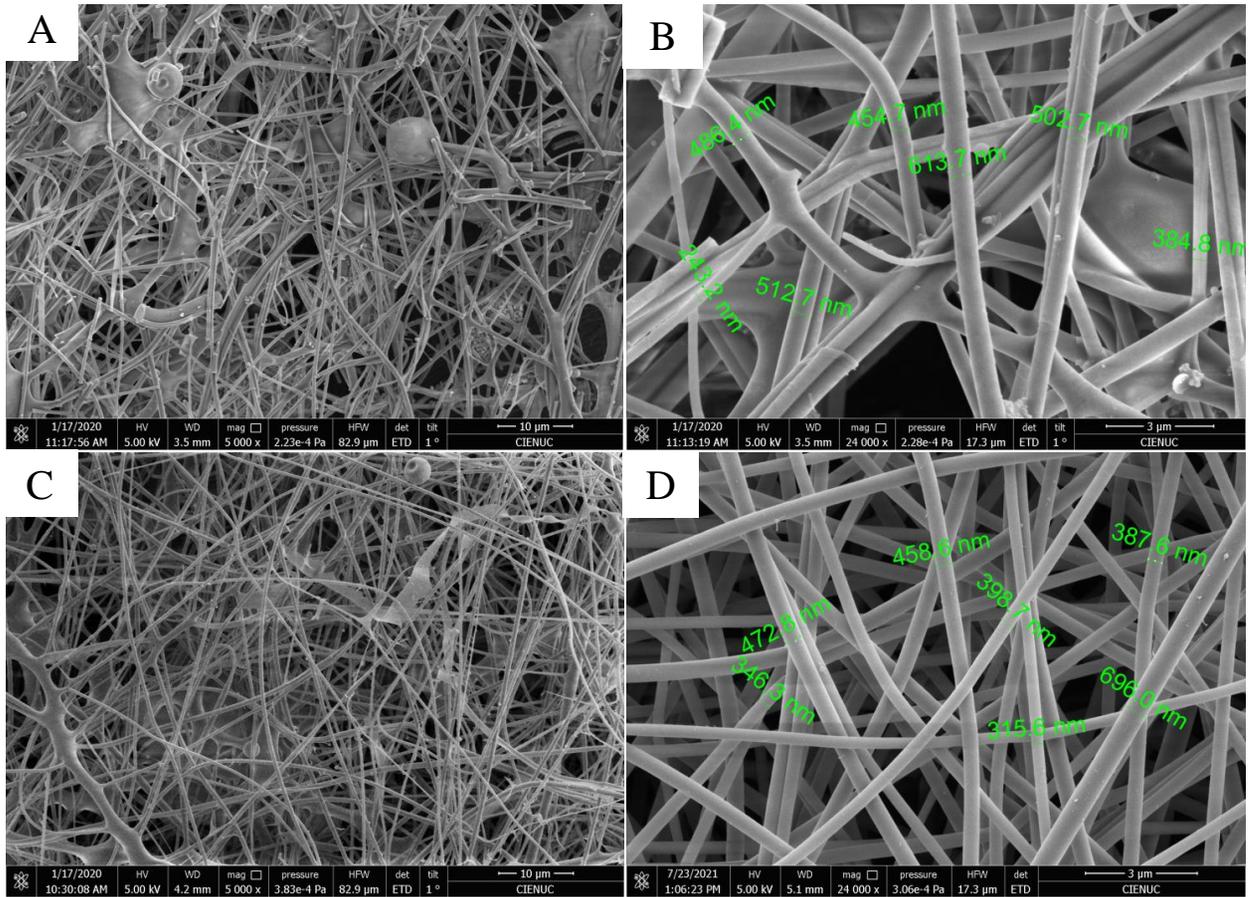


Figura 4.7: Micrografías electrónicas de barrido con emisión de campo (FESEM), de las membranas obtenidas desde los precursores de 90 %SiO<sub>2</sub>-10%PEO (lavada) (A y B) y 90 %SiO<sub>2</sub>-10%PEO (sin lavar) (C y D).

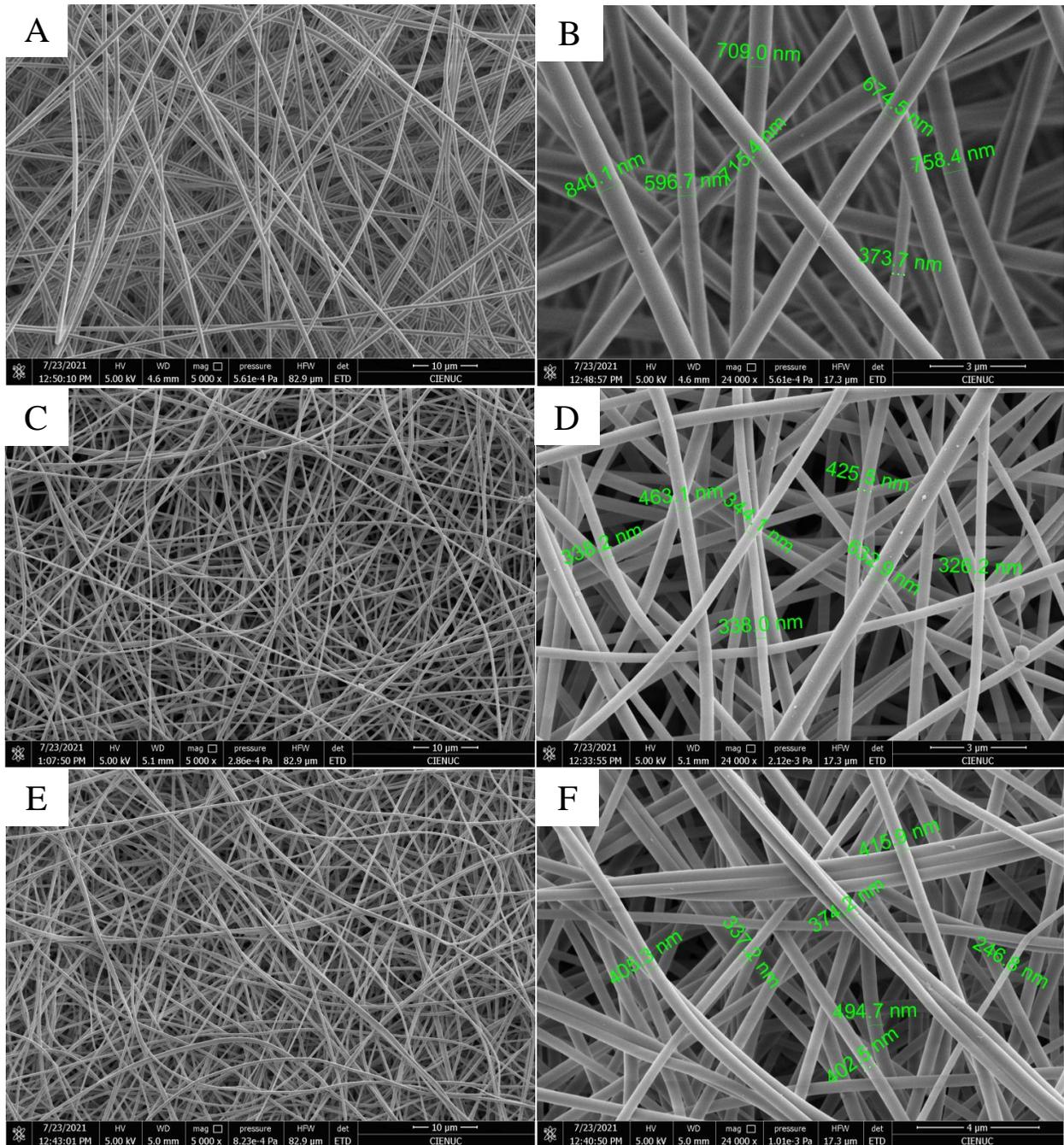


Figura 4.8: Micrografías electrónicas de barrido con emisión de campo (FESEM), de las membranas obtenidas desde los precursores de 85%SiO<sub>2</sub>-5%G-10%PEO (A y B), 80%SiO<sub>2</sub>-10%G-10%PEO (sin lavar) (C y D) y 80%SiO<sub>2</sub>-10%G-10%PEO (lavada) (E y F).



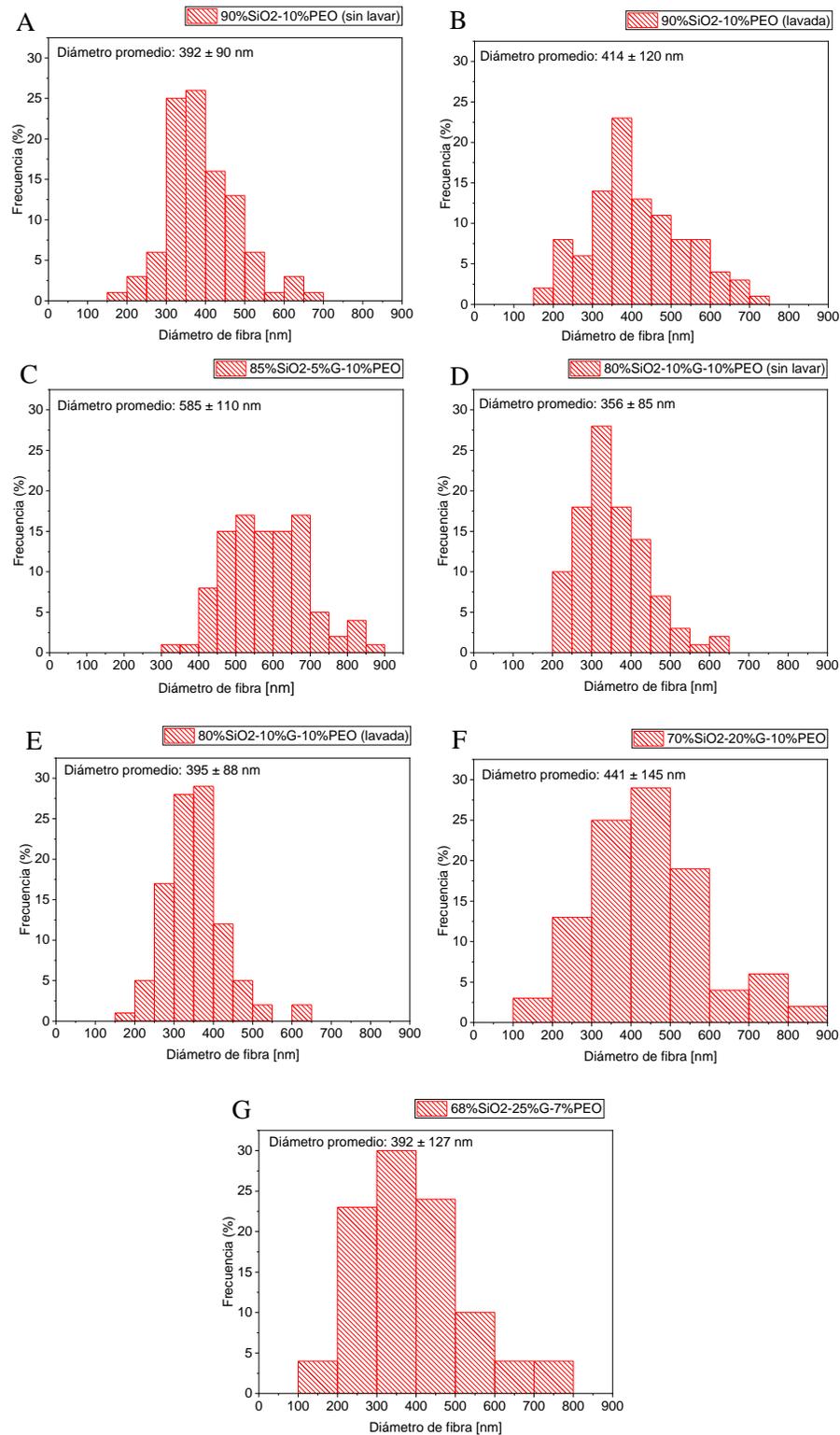


Figura 4.10: Histogramas de distribución de diámetro de las fibras observadas en FESEM obtenidas desde los precursores 90%SiO<sub>2</sub>-10%PEO (sin lavar) (A), 90%SiO<sub>2</sub>-10%PEO (lavada) (B), 85%SiO<sub>2</sub>-5%G-10%PEO (C), 80%SiO<sub>2</sub>-10%G-10%PEO (sin lavar) (D), 80%SiO<sub>2</sub>-10%G-10%PEO (lavada) (E), 70%SiO<sub>2</sub>-20%G-10%PEO (F) y 68%SiO<sub>2</sub>-25%G-7%PEO (G).

La composición atómica de las membranas fue determinada mediante espectroscopia de energía dispersiva de rayos X (EDX). Los resultados obtenidos se aprecian en la Figura 4.11. A las membranas obtenidas desde el precursor 90 %SiO<sub>2</sub>-10 %PEO (Figura 4.11 a) se le realizaron lavados con agua destilada, luego fueron secadas y se verificó la remoción superficial del PEO de la membrana 90 %SiO<sub>2</sub>-10 %PEO (lavada) mediante EDX dado que no se pudo detectar la presencia del elemento C que está presente en la composición atómica del PEO y que no está presente en la composición atómica del SiO<sub>2</sub>.

Para las membranas obtenidas desde los precursores que contienen G, 85 %SiO<sub>2</sub>-5 %G-10 %PEO, 80 %SiO<sub>2</sub>-10 %G-10 %PEO (sin lavar), 80 %SiO<sub>2</sub>-10 %G-10 %PEO (lavada), 70 %SiO<sub>2</sub>-20 %G-10 %PEO y 68 %SiO<sub>2</sub>-25 %G-7 %PEO (Figuras 4.11 c-g), se indica la presencia de nitrógeno, lo cual fue relacionado a la presencia de G en la superficie de las membranas. En el caso de las membranas obtenidas desde el precursor 80 %SiO<sub>2</sub>-10 %G-10 %PEO que fueron lavadas y secadas, se verificó que G se mantenía en ellas posterior a los lavados. Pero, no se pudo determinar la remoción superficial de PEO, es decir que no se observaron diferencias cuando hay G y PEO debido a que los dos materiales contienen al elemento C en su composición atómica. Es por esto, que no se puede asegurar si se logró retirar el PEO superficial del material. En base a estos resultados, con conocimiento de que G está presente en las membranas luego de ser lavadas, posteriormente se aplicó el protocolo de acondicionamiento para realizar las pruebas biológicas.

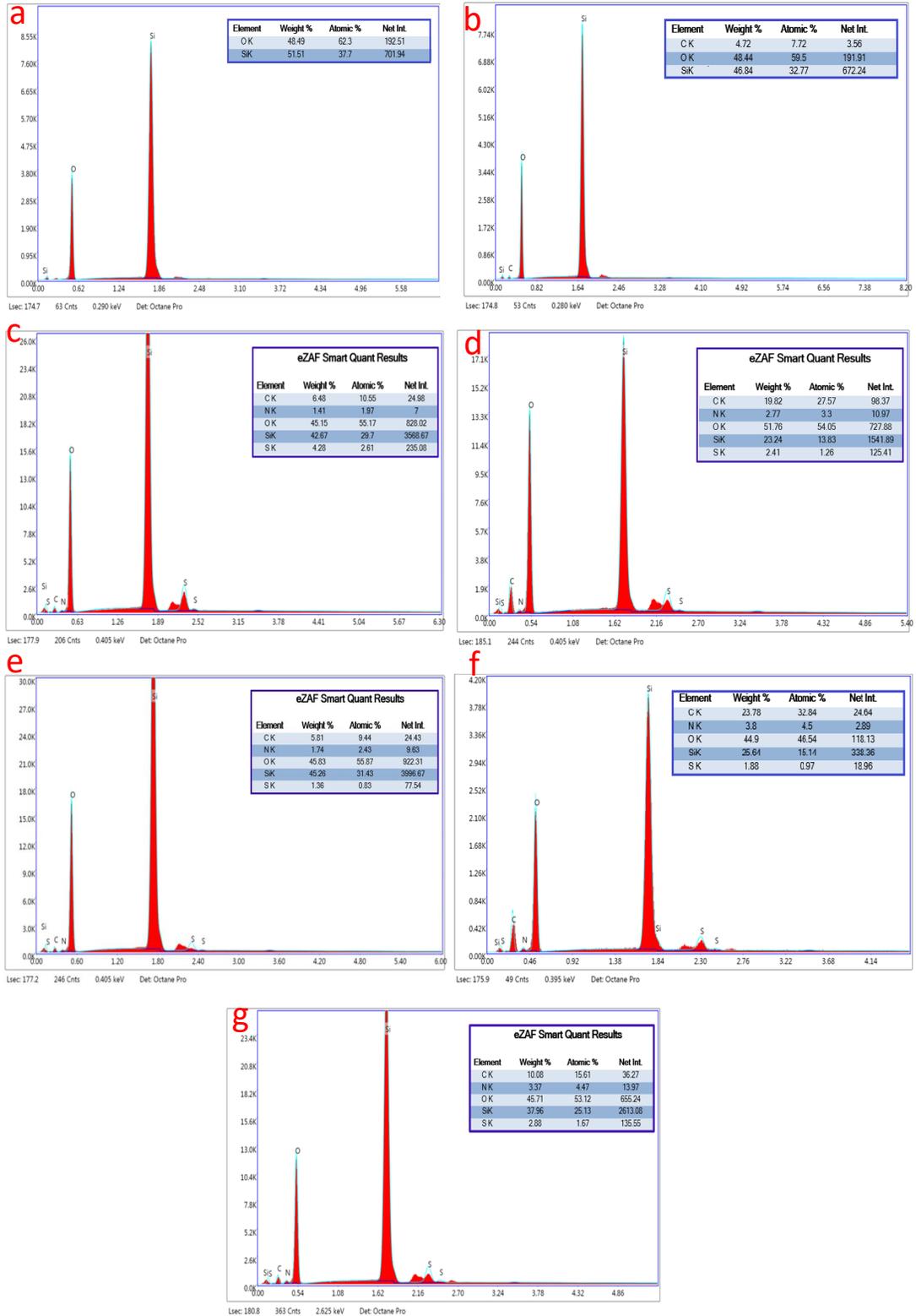


Figura 4.11: Espectros de energía dispersiva de rayos X (EDX) de las membranas obtenidas a partir de los precursores de composición 90%SiO<sub>2</sub>-10%PEO (lavada) (a), 90%SiO<sub>2</sub>-10%PEO (sin lavar) (b), 85%SiO<sub>2</sub>-5%G-10%PEO (c), 80%SiO<sub>2</sub>-10%G-10%PEO (sin lavar) (d), 80%SiO<sub>2</sub>-10%G-10%PEO (lavada) (e), 70%SiO<sub>2</sub>-20%G-10%PEO (f) y 68%SiO<sub>2</sub>-25%G-7%PEO (g).

#### **4.1.4. Análisis del ángulo de contacto entre membrana y gota de agua (ensayo de humectabilidad)**

Los resultados de los ensayos de ángulo de contacto se muestran en la Figura 4.12. Dado que las membranas obtenidas a partir de los precursores 90 %SiO<sub>2</sub>-10 %PEO y 85 %SiO<sub>2</sub>-5 %G-10 %PEO son muy hidrofílicas (Figura 4.12 a y b), no se pudo realizar la medición. Se observa que a medida que aumenta la proporción de biovidrio aumenta el ángulo de contacto y por ende la hidrofilia. En la membrana obtenida desde el precursor 68 %SiO<sub>2</sub>-25 %G-7 %PEO (Figura 4.12 d) el aumento de proporción de gelatina en el precursor ha disminuido el ángulo de contacto en comparación con la membrana obtenida desde el precursor 70 %SiO<sub>2</sub>-20 %G-10 %PEO (Figura 4.12 c).

En la Tabla 4.4 se detallan los valores de ángulo de contacto izquierdo y derecho de cada membrana, cuyos valores promedio no presentan variación significativa entre cada lado. Estos resultados indican que las membranas son altamente hidrofílicas lo cual, de acuerdo a lo reportado en la Sección 1.4.8 las hace idóneas para aplicación en biomateriales biodegradables [65]. Se requiere de un análisis adicional para profundizar en si este carácter hidrofílico viene dado por el espesor, geometría y/o composición química de las membranas.

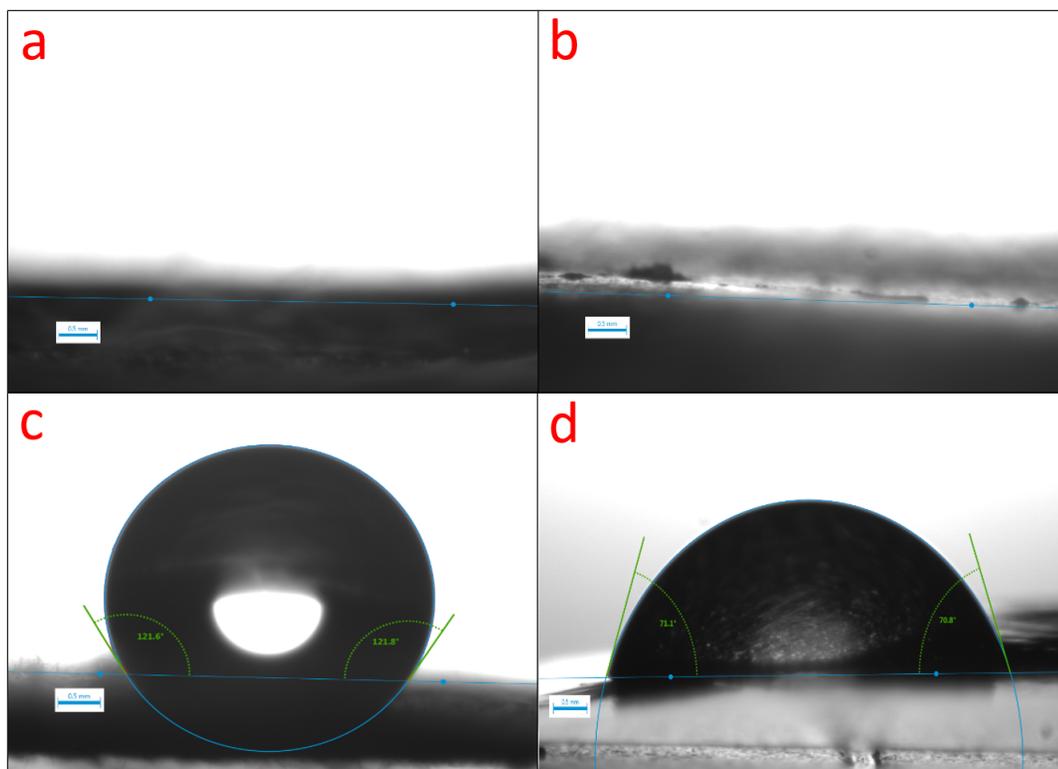


Figura 4.12: Imágenes de ensayo de ángulo de contacto de las membranas obtenidas a partir de los precursores 90%SiO<sub>2</sub>-10%PEO (a), 85%SiO<sub>2</sub>-5%G-10%PEO (b), 70%SiO<sub>2</sub>-20%G-10%PEO (c), 68%SiO<sub>2</sub>-25%G-7%PEO (d).

Material	Ángulo de contacto izquierdo (°)	Ángulo de contacto derecho (°)
90%SiO <sub>2</sub> -10%PEO	–	–
85%SiO <sub>2</sub> -5%G-10%PEO	–	–
70%SiO <sub>2</sub> -20%G-10%PEO	121.1 ± 9.3	120.9 ± 9.6
68%SiO <sub>2</sub> -25%G-7%PEO	62.8 ± 7.5	61.9 ± 8.3

Tabla 4.4: Ángulo de contacto entre la gota de agua y las membranas.

#### 4.1.5. Porosidad de las membranas

En la Figura 4.13 se observan los resultados de porosidad aparente obtenidos a partir de las imágenes SEM de la sección 4.1.3, en donde se estudió la razón entre la superficie de los poros y la superficie de una sección de las membranas obtenidas desde los precursores 90 %SiO<sub>2</sub>-10 %PEO (m1), 85 %SiO<sub>2</sub>-5 %G-10 %PEO (m2), 70 %SiO<sub>2</sub>-20 %G-10 %PEO (m3) y 68 %SiO<sub>2</sub>-25 %G-7 %PEO (m4). Todas las membranas tienen una porosidad de aproximadamente 75 %. En comparación con la literatura, estas porosidades logradas han sido reportadas como favorables para la regeneración ósea porque permiten infiltración celular y vascular [147]. Valores de porosidad sobre el 70 % han demostrado facilitar la vascularización y generación de nuevos tejidos [210]. Contar con un material poroso facilitaría el intercambio de nutrientes a nivel celular necesarios en la formación de tejidos [211].

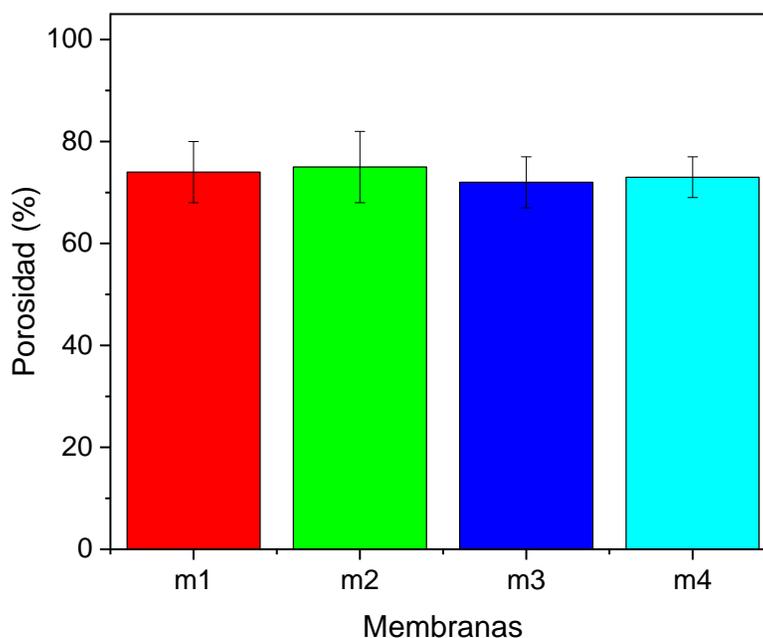


Figura 4.13: Porosidad de las membranas obtenidas a partir de los precursores 90 %SiO<sub>2</sub>-10 %PEO (m1), 85 %SiO<sub>2</sub>-5 %G-10 %PEO (m2), 70 %SiO<sub>2</sub>-20 %G-10 %PEO (m3) y 68 %SiO<sub>2</sub>-25 %G-7 %PEO (m4).

#### **4.1.6. Ensayos de viabilidad celular y diferenciación osteogénica**

Se realizaron cultivos celulares para determinar la viabilidad de las células madres mesenquimales de pulpa dental (hDPSC) al exponerse a los medios condicionados por las membranas obtenidas desde los precursores 90 %SiO<sub>2</sub>-10 %PEO (m1), 85 %SiO<sub>2</sub>-5 %G-10 %PEO (m2), 70 %SiO<sub>2</sub>-20 %G-10 %PEO (m3) y 68 %SiO<sub>2</sub>-25 %G-7 %PEO (m4), para medir la actividad MTS . Las células viables, es decir con actividad mitocondrial activa, serán capaces de reducir el tetrazolio para convertirlo en colorante de formazán soluble en el medio de cultivo. Además, se midió la actividad de la enzima fosfatasa alcalina (ALP) como un parámetro para conocer la diferenciación osteogénica inducida por las diferentes membranas.

##### **4.1.6.1. Viabilidad celular**

En la Figura 4.14 se muestran los resultados de actividad MTS de las células cultivadas a los 7 y 14 días, se puede observar que las células son viables, las membranas no producen alteraciones en la viabilidad de las hDPSC, ya que se mantiene en cada uno de los medios condicionados a las distintas membranas en comparación con el control, no habiendo diferencias estadísticamente significativas con el control o entre ellas. Estos resultados muestran que las membranas no son tóxicas, por lo que el material es compatible pero requiere de una componente adicional para obtener diferencias estadísticamente significativas [212]. Es por esto la importancia de la posterior incorporación de las nanopartículas de biovidrio en las fibras de las membranas, para estudiar si existe alguna diferencia. Se han reportado estudios en dónde las utilizan para mejorar la viabilidad celular y posterior diferenciación osteogénica [213] [120].

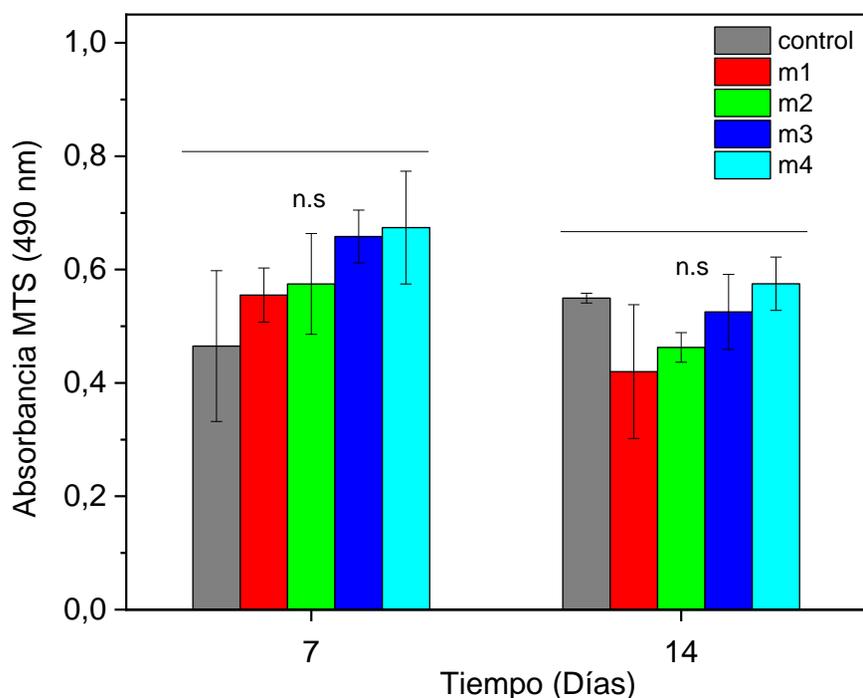


Figura 4.14: Gráfico representativo de la viabilidad celular a los 7 y 14 días mediante ensayo MTS, de las células cultivadas en las membranas obtenidas desde los precursores 90 %SiO<sub>2</sub>-10 %PEO (m1), 85 %SiO<sub>2</sub>-5 %G-10 %PEO (m2), 70 %SiO<sub>2</sub>-20 %G-10 %PEO (m3) y 68 %SiO<sub>2</sub>-25 %G-7 %PEO (m4). Las barras representan la absorbancia medida a una longitud de onda de 490 nm. Diferencia estadísticamente significativa entre los grupos experimentales con el control (ns: no significativo).

#### 4.1.7. Diferenciación osteogénica

En la Figura 4.15 se presentan los resultados de la actividad enzimática ALP de las células cultivadas a los 14 días de incubación. Se observa que no existen diferencias estadísticamente significativas entre el control y las células cultivadas en las distintas membranas. Por lo que las membranas no inducen la diferenciación osteogénica. Estos resultados son los esperados en materiales producidos mediante electrospinning cuya matriz esta constituida principalmente de sílice, debido a que presenta enlaces de tipo covalentes, lo cual los hace poco reactivos [214].

Los resultados de otras investigaciones en donde utilizan colágeno o gelatina han demostrado que a pesar de que la matriz contenga las secuencias RGD del colágeno, que promueven la viabilidad celular, se requiere de un componente adicional que promueva la bioactividad [215]. Esta propiedad ha sido reportado en materiales tipo nanocompósito que al ser expuestos a fluido corporal simulado (SBF), inducen cambios en la superficie del material que contiene nanopartículas cerámicas bioactivas, capaces de formar hidroxiapatita en su superficie [216] [217].

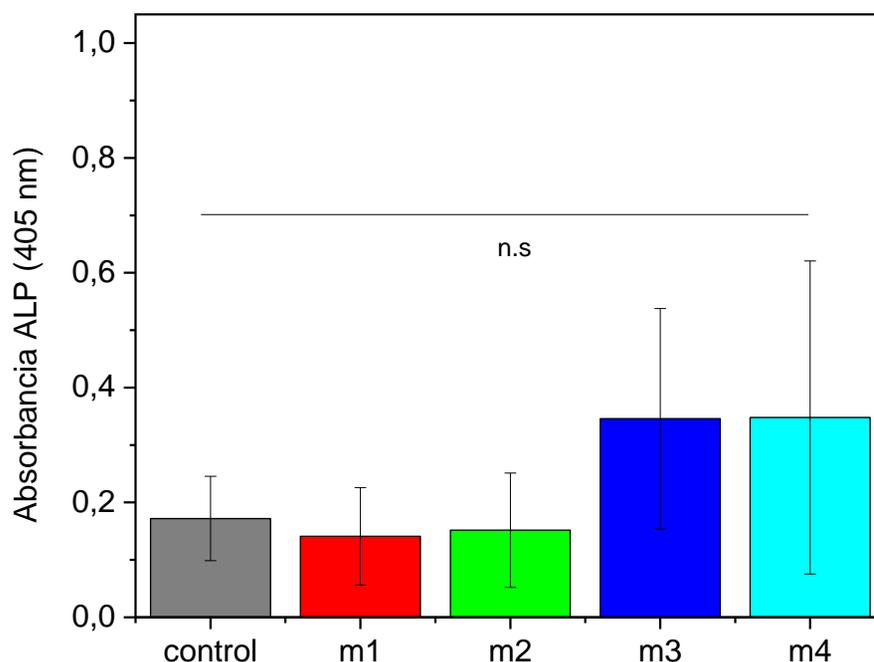


Figura 4.15: Gráfico representativo de la actividad de fosfatasa alcalina de las células cultivadas sin suplementos osteogénicos en membranas obtenidas desde los precursores 90%SiO<sub>2</sub>-10%PEO (m1), 85%SiO<sub>2</sub>-5%G-10%PEO (m2), 70%SiO<sub>2</sub>-20%G-10%PEO (m3) y 68%SiO<sub>2</sub>-25%G-7%PEO (m4). Las barras representan la absorbancia medida a una longitud de onda de 405 nm después de 14 días de incubación. Diferencia estadísticamente significativa entre los grupos experimentales con el control (ns: no significativo).

#### 4.1.8. Biodegradación de las membranas

La porosidad de las membranas y su capacidad de retener agua, permite que se de inicio a reacciones entre el medio y la superficie de estas. La lisozima proveniente de la clara de huevo ha sido ampliamente utilizada en ensayos de biodegradación debido a que es un catalizador biológico que permite acelerar reacciones específicas como la degradación de un polímero [218]. En este estudio se evaluó la biodegradación de las membranas obtenidas desde los precursores 90 %SiO<sub>2</sub>-10 %PEO (m1), 85 %SiO<sub>2</sub>-5 %G-10 %PEO (m2) y 80 %SiO<sub>2</sub>-10 %G-10 %PEO (m3) a los 7, 14 y 28 días. En la Figura 4.16 se observan las fotografías de las membranas antes y después de la inmersión en solución con PBS y lisozima.

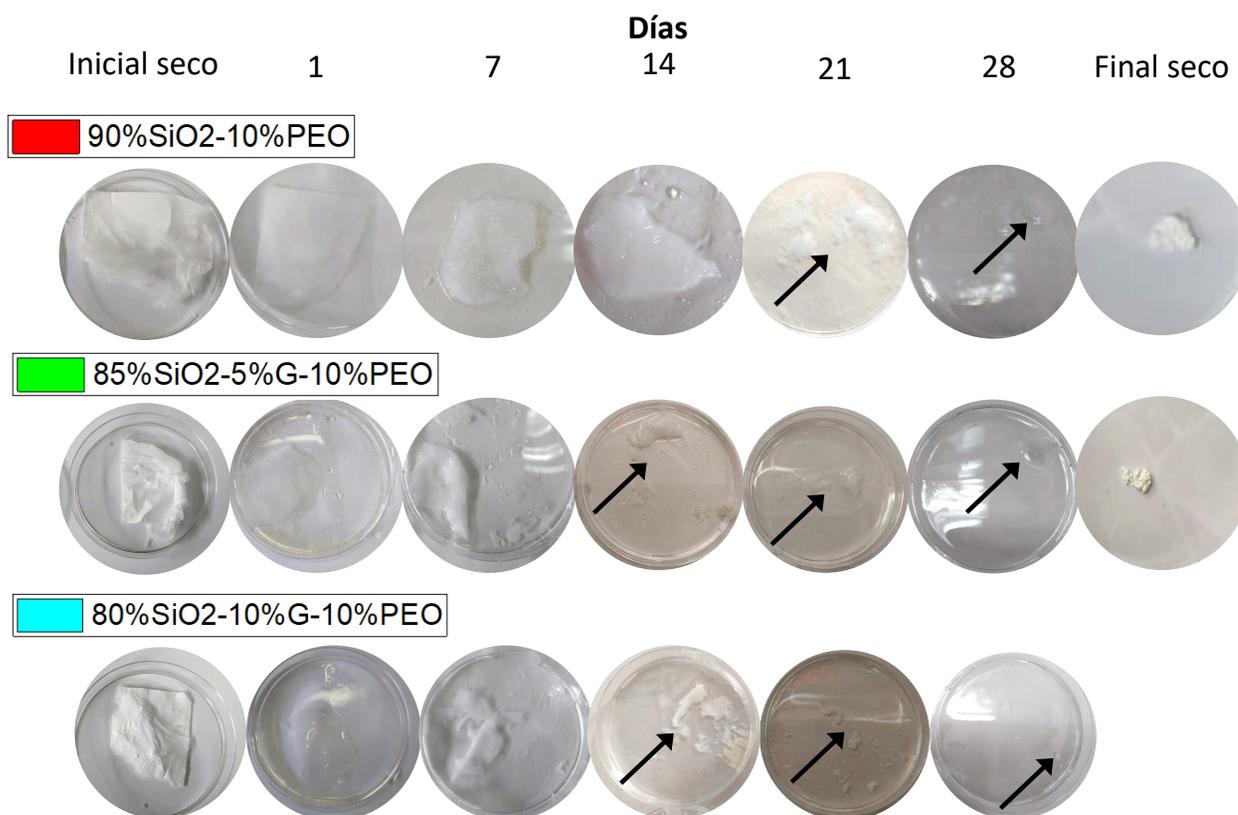


Figura 4.16: Fotografías de las membranas antes y después de la inmersión en solución de PBS con lisozima de las membranas obtenidas desde los precursores 90 %SiO<sub>2</sub>-10 %PEO (m1), 85 %SiO<sub>2</sub>-5 %G-10 %PEO (m2) y 80 %SiO<sub>2</sub>-10 %G-10 %PEO (m3), luego de 1, 7, 14, 21 y 28 días.

En la figura 4.17 se muestra el cambio de peso en porcentaje experimentado por las membranas luego de 28 días. La membrana m1 se degradó en un 69,8 %, mientras que m2 tuvo un 60,1 %. Se observa que la membrana obtenida desde el precursor 80 %SiO<sub>2</sub>-10 %G-10 %PEO (m3) es la que presenta mayor porcentaje de degradación, llegando a un 100 %. Estos resultados son lo esperado de acuerdo con la literatura, debido a que la sílice se degrada por el intercambio iónico con el medio al que fue inmerso, generando la disolución de la red de sílice al salir los grupos  $Si(OH)_4$ , dando inicio al proceso de degradación y pérdida de masa de las membranas [151]. En este estudio se obtuvo que la membrana que contenía gelatina en mayor proporción se degradó por completo a los 28 días. Lo cual era esperable debido a la naturaleza hidrofílica de esta y al material híbrido clase I que conforma.

La cinética de degradación total de las membranas depende de factores químicos y estructurales [82]. Estudios *in vitro* de híbridos de sílice y gelatina muestran la pérdida de peso de andamios causada por la degradación enzimática que involucra a los enlaces químicos entre los grupos carboxilo  $-COOH$  y amino  $-NH_2$  pertenecientes a la molécula de gelatina y al enlace covalente  $P - O$  e hidróxido  $O - H$  del vidrio bioactivo [219]. La molécula enzimática contiene una superficie de unión denominada sitio activo, utilizada para orientar de forma óptima al sustrato incrementando la velocidad de reacción [220]. La degradación de la gelatina se lleva a cabo mediante la reacción de hidrólisis y la de la sílice mediante esterificación [221].

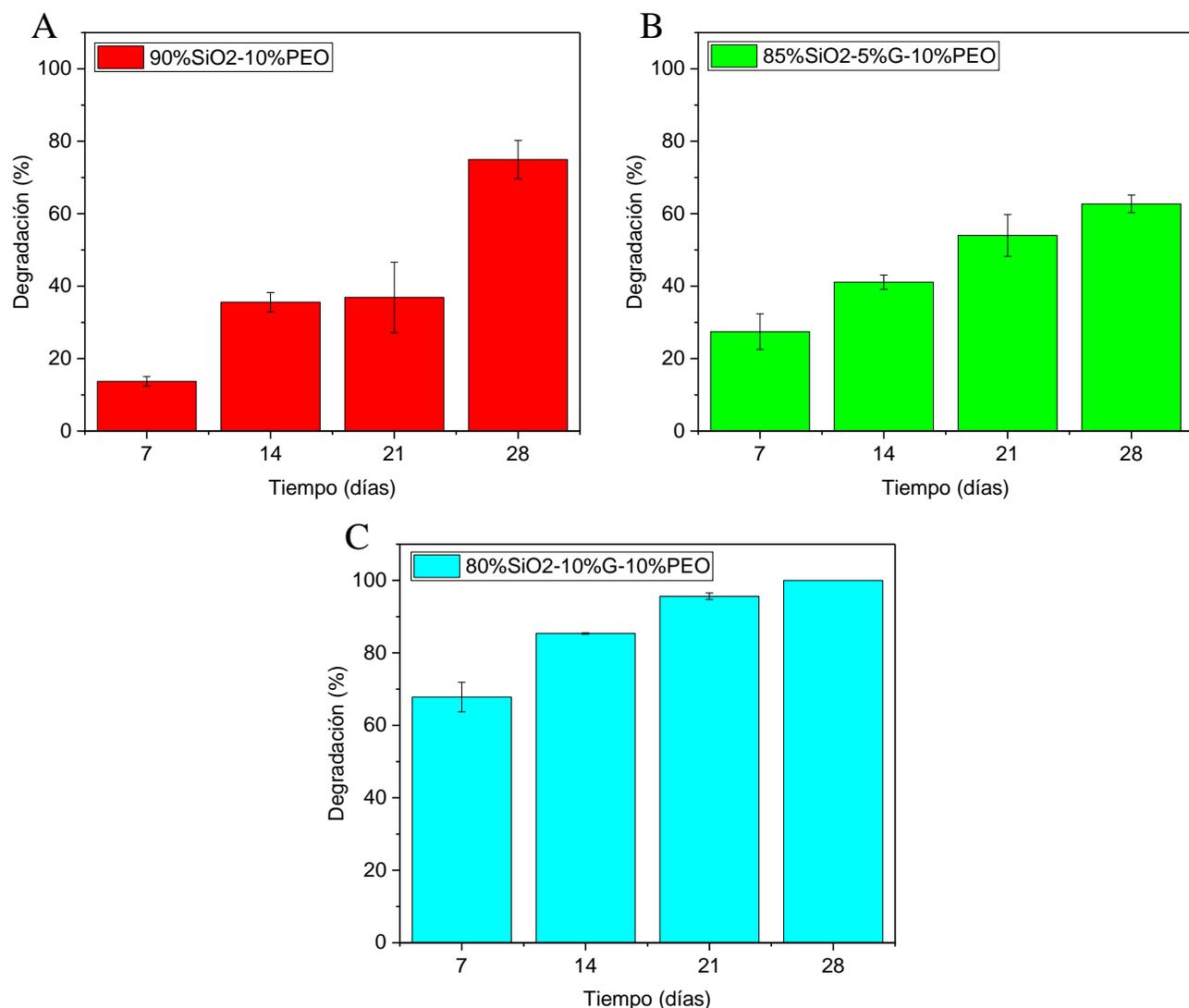


Figura 4.17: Resultados de biodegradación de las membranas obtenidas desde los precursores 90 %SiO<sub>2</sub>-10%PEO (m1), 85 %SiO<sub>2</sub>-5%G-10 %PEO (m2) y 80 %SiO<sub>2</sub>-10 %G-10 %PEO (m3) luego de 7, 14, 21 y 28 días.

En la Tabla 4.5 se muestran distintos estudios en comparación con el material creado, considerando la concentración de lisozima y el porcentaje de degradación alcanzado. Las diferencias de biodegradabilidad entre el material y algunos de los materiales reportados por otros estudios, se deben probablemente a la morfología (andamios 3D) y porque varios de ellos son híbridos Clase II con enlaces covalentes y no Clase I como en el caso de la presente investigación con puentes de hidrógeno y fuerzas de Van der Waals.

Los resultados obtenidos en esta investigación, en conjunto con los materiales estudiados de otras investigaciones permiten inferir que a la matriz híbrida se le puede agregar nanopartículas de vidrio bioactivas que contribuirían con la biodegradación, debido a que estas tienen alta área superficial lo que podría aumentar la retención de agua, además de la liberación de iones y el rompimiento de enlaces producido por la acción de la lisozima [178].

Materiales	Concentración de lisozima (mg/ml)	Degradación (%)	Referencias
Mesoporoso de gelatina/vidrio bioactivo/NpAg	0.4	70-85	[219]
Compósito de vidrio bioactivo/gelatina	0.5	31.7-48.6	[222]
Híbrido de quitosano/gelatina/fosfato de calcio	0.5	60-80	[223]
Compósito de gelatina/vidrio bioactivo	1	65.3-93.8	[224]
Compósito de vidrio bioactivo/alginato	0.5	21	[225]
SiO <sub>2</sub> :PEO	0.5	69.8	Este estudio
SiO <sub>2</sub> :G:PEO	0.5	60.1-100	Este estudio

Tabla 4.5: Tabla comparativa de materiales, concentración de lisozima y porcentaje de degradación obtenido a los 28 días.

## 4.2. Nanopartículas de biovidrio terciario (NpBV)

### 4.2.1. Caracterización química

La estructura molecular de las NpBV sintetizadas fue analizada mediante espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FTIR), en la cual se analizó la estructura química de las NpBV, cuyo espectro se muestra en la Figura 4.18. En la Tabla 4.6 se muestra el resumen de las bandas y asignaciones asociadas.

Se identificó la presencia de sílice a través de las bandas de absorción que corresponden a movimientos vibracionales del enlace covalente Si-O posicionadas a números de onda de  $\sim 460$  y  $1025 \text{ cm}^{-1}$  [226]. La banda intensa que aparece a números de onda de  $\sim 1025 \text{ cm}^{-1}$  de acuerdo con lo descrito en la literatura (L. L Hench., 2001) se podría relacionar al solapamiento de las vibraciones de los enlaces covalentes Si-O y P-O correspondientes a vibración por flexión y tensión [226] [227]. Este tipo de enlace influirá en las propiedades del material que contiene estos enlaces, produciendo que este no sea soluble. La banda en el rango de  $700$  a  $900 \text{ cm}^{-1}$  puede asignarse al enlace iónico Ca-O [228] [229]. El carácter iónico de este tipo de enlace es relevante para la aplicación que se le dará a las NpBV, debido a que dará origen a la solubilidad y a la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  en medios acuosos para luego inducir la formación de HA. De esta forma se obtuvo información sobre la estructura química y los enlaces de las NpBV sintetizadas mediante el método sol-gel.

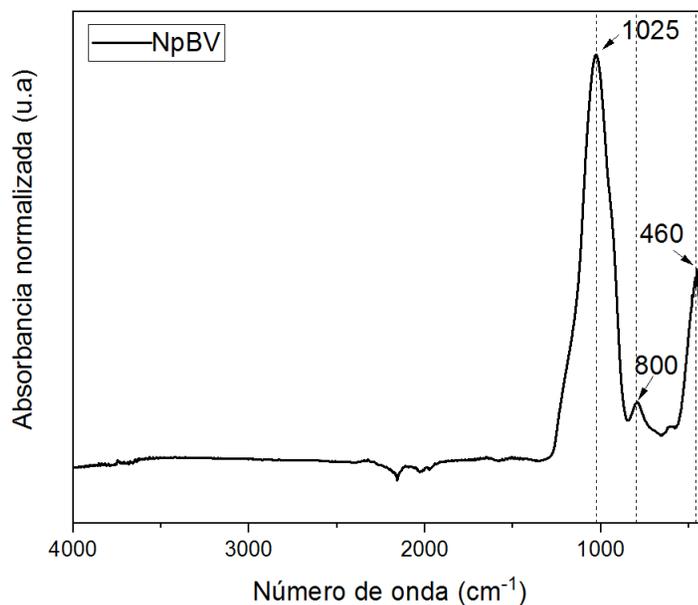


Figura 4.18: Espectro infrarrojo por transformada de Fourier (FTIR) de las nanopartículas de biovidrio terciario (NpBV).

Material	Posición de las bandas de absorción ( $cm^{-1}$ )	Asignación
Sílice	1025	Si-O-Si (vibración de tensión) [226]
	460	Si-O (vibración de flexión) [226]
Fósforo	1025	P-O (vibración de tensión) [227]
Calcio	800	Ca-O [228] [229]

Tabla 4.6: Posición de las bandas de absorción y asignaciones del espectro infrarrojo por transformada de Fourier (FTIR) para las nanopartículas de biovidrio terciario (NpBV).

#### 4.2.2. Estructura cristalina y morfología

En la Figura 4.19, se presenta el análisis de difracción de rayos X en polvo (DRX) para identificar el ordenamiento estructural de las NpBV. El patrón se muestra principalmente amorfo, presentando un peak bien definido a  $\sim 29,4^\circ$  ( $2\theta$ ) asociado a calcita ( $CaCO_3$ ). La calcita presenta capacidad de unión al hueso, lo cual promueve la bioactividad del vidrio

[230]. Además, se observan algunos peaks a  $24^\circ$ ,  $32,6^\circ$  y  $33,7^\circ$  asociados a la formación de silicatos de calcio ( $Na_2Ca_3Si_6O_{16}$ ,  $Na_2CaSiO_4$ ,  $Ca_2SiO_4$ ), y los peaks de difracción a  $\sim 26^\circ$  y  $31^\circ$  están asociados a fosfato silicorhenanita ( $Na_2Ca_4(PO_4)_2SiO_4$ ) producido probablemente por tratamiento térmico al que fueron sometidas las NpBV [231], lo que sugiere una estructura semi-cristalina [232] [233]. Es importante que las NpBV presenten un patrón de difracción más amorfo que cristalino para favorecer la liberación de iones de la red de vidrio, permitiendo la formación de hidroxiapatita en su superficie favoreciendo la bioactividad en aplicaciones biológicas [234] [235] [236].

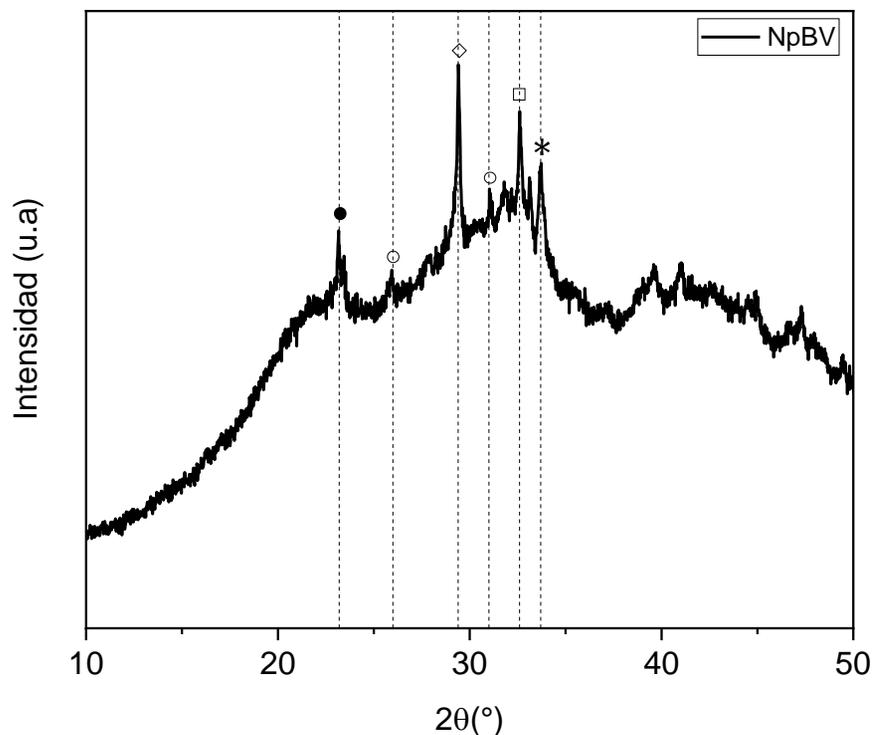


Figura 4.19: Difractograma de las NpBV obtenido por difracción de rayos X en polvo (DRX). Las fases cristalinas corresponden a (○)  $Na_2Ca_4(PO_4)_2SiO_4$ , (●)  $Na_2Ca_3Si_6O_{16}$ , (\*)  $Na_2CaSiO_4$ , (◻)  $Ca_2SiO_4$ , (◊)  $CaCO_3$ .

La morfología superficial y estructural de las NpBV, fue observada mediante microscopía electrónica de barrido con emisión de campo (FESEM) (Figura 4.20 A y B) y microscopía electrónica de transmisión (TEM) (Figura 4.21 A y B), respectivamente.

Además, mediante espectroscopia de energía dispersiva de rayos X (EDX), se determinó la composición superficial de las NpBV, en estas se observa la presencia de calcio y fósforo (Figura 4.20 C).

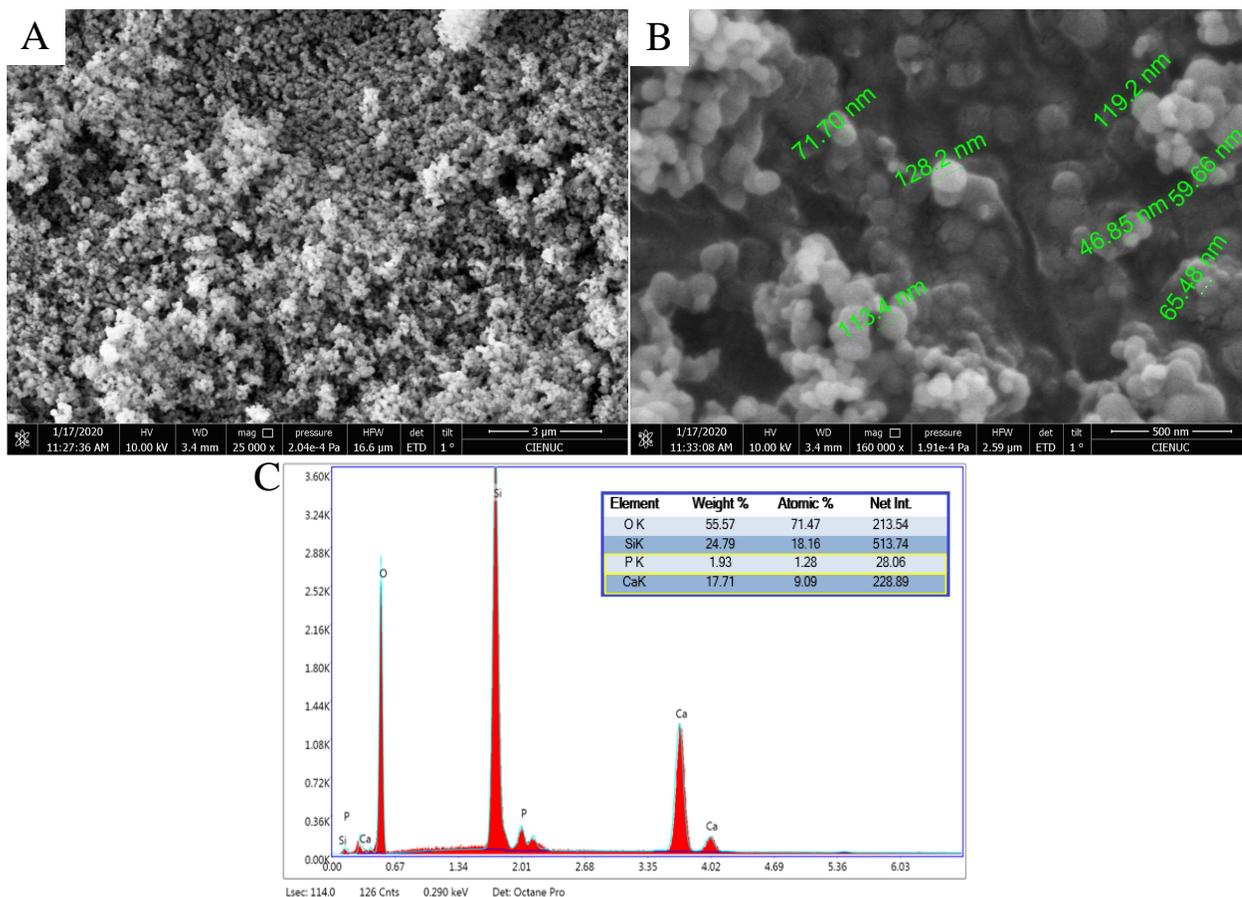


Figura 4.20: Micrografías electrónicas de barrido con emisión de campo (FESEM) (A y B) y espectroscopia de energía dispersiva de rayos X (EDX) (C).

De acuerdo a la morfología de las nanopartículas se puede observar que presentan una forma circular y forman agrupaciones tipo racimo [237]. A partir de las imágenes TEM se observó una distribución de diámetro promedio de 65 nm (Figura 4.21 C). Estas dimensiones han sido reportadas en otros estudios y se consideran favorables debido a la mayor reactividad y liberación de iones desde las nanopartículas debido a su mayor área superficial [238].

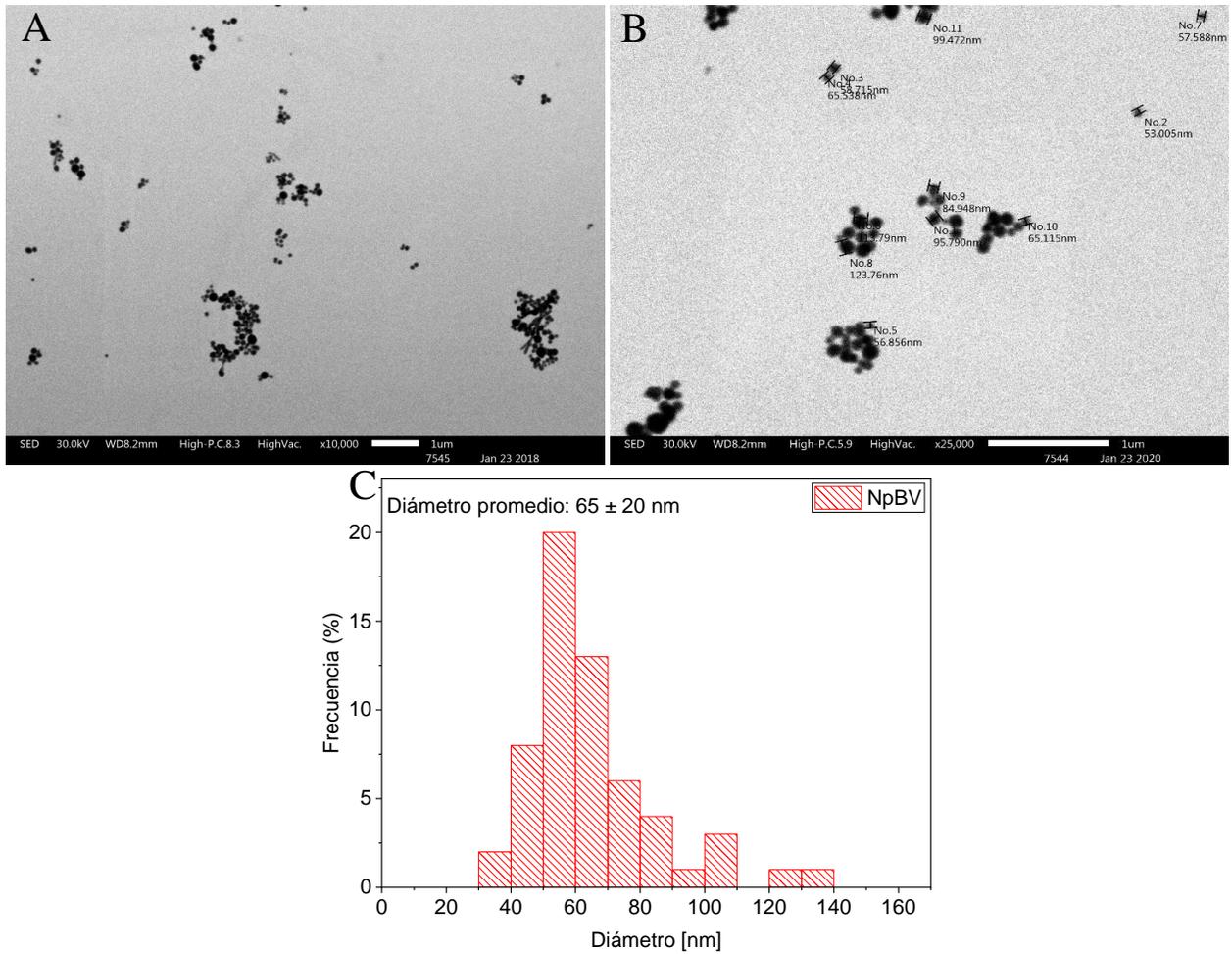


Figura 4.21: Micrografías electrónicas de transmisión (TEM) (A y B) e histograma de distribución de diámetro de las NpBV a partir de las imágenes TEM (C).

### 4.2.3. Estudio de estabilidad térmica por análisis termogravimétrico TGA

La estabilidad térmica de las NpBV, fue analizada mediante análisis termogravimétrico (TGA). Es importante este estudio, debido a que al aplicar temperaturas iguales o sobre los 600 °C se comienza a observar la presencia de fases cristalinas en las nanopartículas de vidrio bioactivo [239] [231] [240]. Lo cual tiene directa relación con los resultados obtenidos en el difractograma DRX (Sección 4.2.2), con el protocolo de la síntesis de

la NpBV y en particular la etapa de calcinación. El termograma obtenido se muestra en la Figura 4.22.

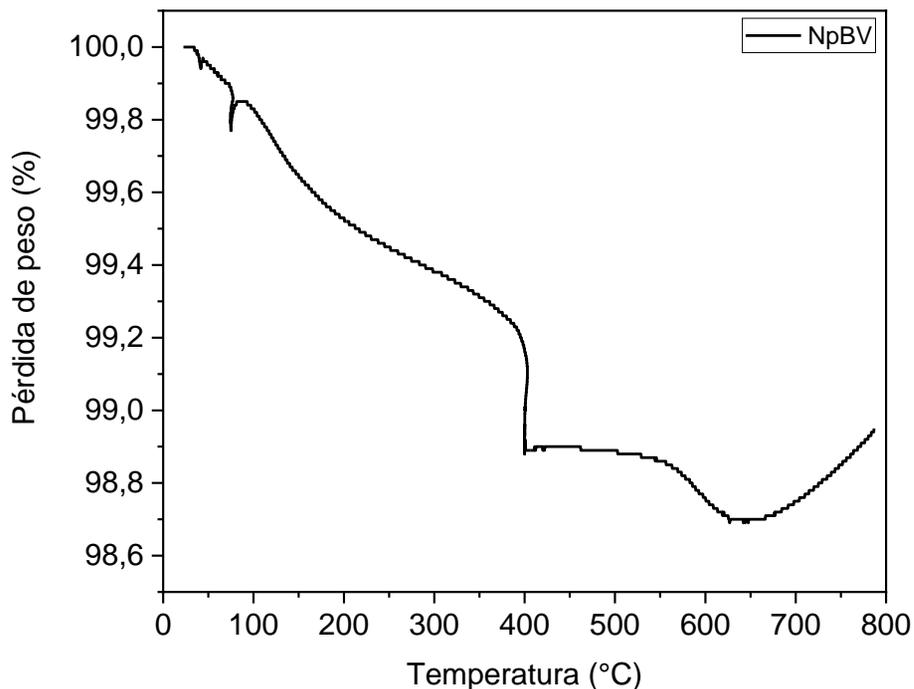


Figura 4.22: Curva termogravimétrica (TGA) de las NpBV).

De acuerdo con el análisis del termograma obtenido de las NpBV fue posible observar que estas presentaron cuatro eventos térmicos de degradación. El primer evento térmico fue determinado en el rango de temperatura de 50 a 80 °C, que fue asociado a la pérdida de humedad presente en las muestras. El segundo evento térmico fue determinado en el rango de 80 a 200 °C, el que se asoció a la degradación de componentes de bajo peso molecular. El tercer evento térmico se determinó alrededor de los 400 °C que puede ser atribuido a la eliminación de impurezas [241]. Finalmente, el cuarto evento térmico fue determinado en el rango de temperaturas entre 400 y 650 °C. Luego de los 650 °C se observa un aumento de masa, probablemente asociado a alguna reacción química entre el material y el gas asociado a la calcinación de las NpBV.

### 4.3. Membranas híbridas de $\text{SiO}_2$ -G-PEO-NpBV

La Figura 4.23 muestra el material tipo membrana obtenido desde un precursor con un contenido sólido de 80 % $\text{SiO}_2$ -10 %G-8 %PEO-2 %NpBV.



Figura 4.23: Fotografía macroscópica del material obtenido a partir del precursor 80 % $\text{SiO}_2$ -10 %G-8 %PEO-2 %NpBV.

#### 4.3.1. Incorporación de las NpBV en el precursor $\text{SiO}_2$ -G-PEO para formar fibras híbridas de $\text{SiO}_2$ -G-PEO-NpBV

En la Sección 4.1 se estudió la incorporación de gelatina bovina (G) en las fibras, la composición química y la morfología de las membranas al aumentar el porcentaje de gelatina bovina en los precursores para electrospinning. A partir de los resultados obtenidos, se determinó como material base la proporción de precursores 80 % $\text{SiO}_2$ -10 %G-10 %PEO (Figura 4.24) para la incorporación de nanopartículas de biovidrio terciario (NpBV) del 1-2 % p/v, en función de la reproducibilidad de fibras y considerando morfología de la superficie, para asegurar su correcta incorporación y posterior observación. Es por esto, que se mantuvo fija la proporción de  $\text{SiO}_2$  al 80 % y se modificó la proporción de G y PEO en los precursores de acuerdo a las limitaciones experimentales como pre-

sencia de gotas y gelificación del precursor.

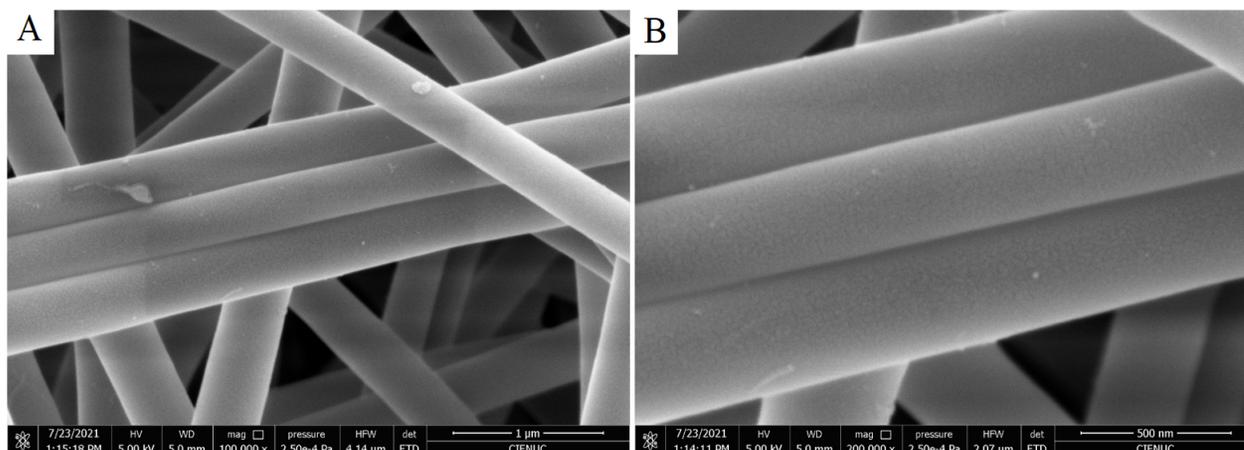


Figura 4.24: Micrografías electrónicas de barrido con emisión de campo (FESEM) de las fibras obtenidas desde el precursor 80 %SiO<sub>2</sub>-10 %G-10 %PEO a una magnificación 100000× (A) y 200000× (B).

### 4.3.2. Caracterización química

Las estructuras químicas de las membranas formuladas desde los precursores 80 %SiO<sub>2</sub>-10 %G-10 %PEO, 80 %SiO<sub>2</sub>-5 %G-14 %PEO-1 %NpBV, 80 %SiO<sub>2</sub>-7 %G-12 %PEO-1 %NpBV y 80 %SiO<sub>2</sub>-10 %G-8 %PEO-2 %NpBV fueron analizadas mediante espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR) (Figura 4.25). Se observan cuatro peaks de absorción ubicados en los números de onda de aproximadamente 576, 796, 954 y 1054 cm<sup>-1</sup>, que se relacionan con los movimientos vibracionales de la red de sílice [242]. Se observa un peak de absorción posicionado a un número de onda de aproximadamente 1640 cm<sup>-1</sup> debido a los movimientos vibracionales del resto C=O (amida I) que pertenece a la estructura molecular de la gelatina [174]. La mayor intensidad relativa de esta banda está asociada con el aumento de la concentración de G en el precursor que se ve reflejado en un aumento de la concentración de G en las fibras que constituyen las membranas. En la Tabla 4.7 se muestra el resumen de las bandas y asignaciones asociadas a las membranas.

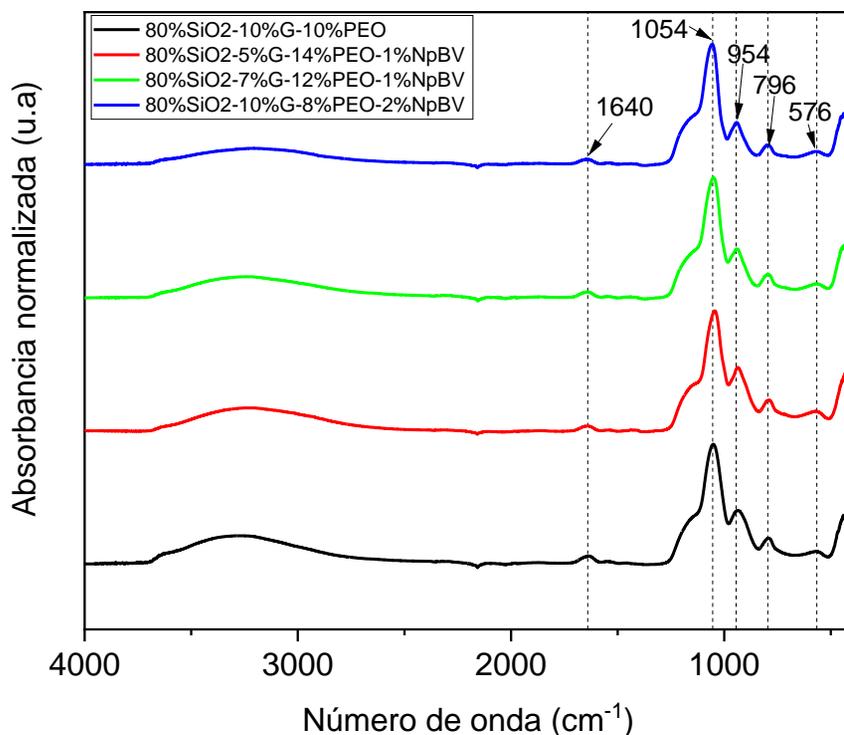


Figura 4.25: Espectros infrarrojos por transformada de Fourier (FTIR) de las membranas obtenidas desde los precursores 80 %SiO<sub>2</sub>-10 %G-10 %PEO, 80 %SiO<sub>2</sub>-5 %G-14 %PEO-1 %NpBV, 80 %SiO<sub>2</sub>-7 %G-12 %PEO-1 %NpBV y 80 %SiO<sub>2</sub>-10 %G-8 %PEO-2 %NpBV.

### 4.3.3. Estructura cristalina y morfología

Las estructuras cristalinas de las membranas obtenidas desde los precursores 80 %SiO<sub>2</sub>-10 %G-10 %PEO, 80 %SiO<sub>2</sub>-5 %G-14 %PEO-1 %NpBV, 80 %SiO<sub>2</sub>-7 %G-12 %PEO-1 %NpBV y 80 %SiO<sub>2</sub>-10 %G-8 %PEO-2 %NpBV, fueron analizadas mediante difracción de rayos X en polvo (DRX) (Figura 4.26). Todos los difractogramas mostraron dos peaks de difracción ubicados en  $2\theta$ : 18 y 22,5° que correspondían a las reflexiones (120) y (112) del PEO, respectivamente.

Posición de las bandas de absorción ( $cm^{-1}$ )	Asignación
1054	Si-O-Si (vibración de tensión) [176]
954	Si-OH [176]
796	Si-O (vibración de flexión) [176]
576	Si-O (vibración de balanceo) [176]
1640	Amida I (C=O vibración de tensión) [207] [164]
3280	Amida A (N-H vibración de tensión) [207] [164]
1090	C-O-C (vibración de tensión) [208]

Tabla 4.7: Posición de las bandas de absorción y asignaciones de los espectros infrarrojos por transformada de Fourier (FTIR) para las membranas obtenidas desde los precursores 80 %SiO<sub>2</sub>-10%G-10 %PEO, 80 %SiO<sub>2</sub>-5%G-14 %PEO-1 %NpBV, 80 %SiO<sub>2</sub>-7 %G-12 %PEO-1 %NpBV y 80 %SiO<sub>2</sub>-10 %G-8 %PEO-2 %NpBV.

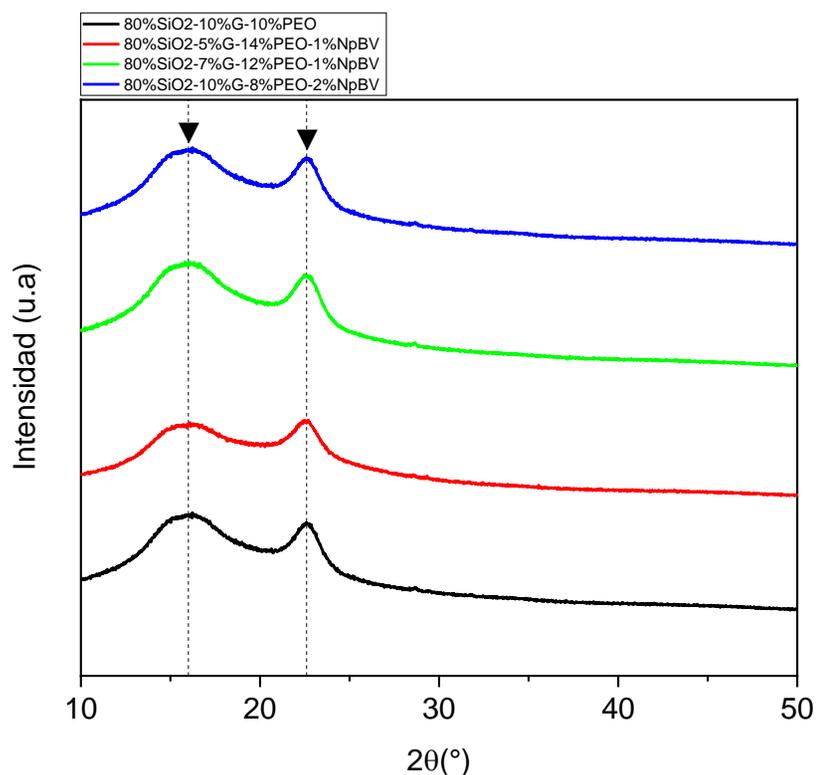


Figura 4.26: Diffractogramas de las membranas fabricadas desde los precursores 80 %SiO<sub>2</sub>-10%G-10 %PEO, 80 %SiO<sub>2</sub>-5%G-14 %PEO-1 %NpBV, 80 %SiO<sub>2</sub>-7 %G-12 %PEO-1 %NpBV y 80 %SiO<sub>2</sub>-10 %G-8 %PEO-2 %NpBV.

#### 4.3.4. Observación de la incorporación de las NpBV en las fibras híbridas

La morfología superficial de las membranas híbridas fabricadas a partir de precursores que contienen NpBV en su formulación fue observada mediante microscopia electrónica de barrido con emisión de campo (FESEM). En la Figura 4.27 se muestran los resultados de la membrana formulada desde el precursor 80 %SiO<sub>2</sub>-5 %G-14 %PEO-1 %NpBV. Se observa la incorporación de las NpBV a nivel de la superficie de las fibras de la membrana (flechas verdes). Para observar mejor la presencia de las NpBV ubicadas en la superficie de las fibras, se aplicó una magnificación de 100000× y 200000× (Figura 4.27 C y D). Se muestra el histograma de las fibras con un diámetro promedio de  $527 \pm 136$  nm (Figura 4.27 E) y el espectro de energía dispersiva de rayos X (EDX), en donde se identificó la presencia de calcio y fósforo provenientes de las NpBV, dado que los otros materiales presentes no poseen átomos de Ca y P en su composición elemental (Figura 4.27 F).

En la Figura 4.28 se muestran los resultados de la membrana formulada desde el precursor 80 %SiO<sub>2</sub>-7 %G-12 %PEO-1 %NpBV. Se muestra el histograma de las fibras con un diámetro promedio de  $545 \pm 78$  nm (Figura 4.28 E) y la espectroscopía de energía dispersiva de rayos X (EDX), en donde también se indica la presencia de calcio y fósforo (Figura 4.28 F).

La Figura 4.29 muestra los resultados de la membrana formulada desde el precursor 80 %SiO<sub>2</sub>-10 %G-8 %PEO-2 %NpBV. En la superficie de esta se logró distinguir claramente la presencia de las NpBV en la superficie de las fibras. Además, se muestra el histograma de las fibras con un diámetro promedio de  $523 \pm 140$  nm (Figura 4.29 E) y el espectro de energía dispersiva de rayos X (EDX), en donde también se indica la presencia de calcio y fósforo (Figura 4.29 F).

En las distintas formulaciones se corroboró la incorporación superficial de las NpBV y se obtuvo el diámetro promedio de fibras.

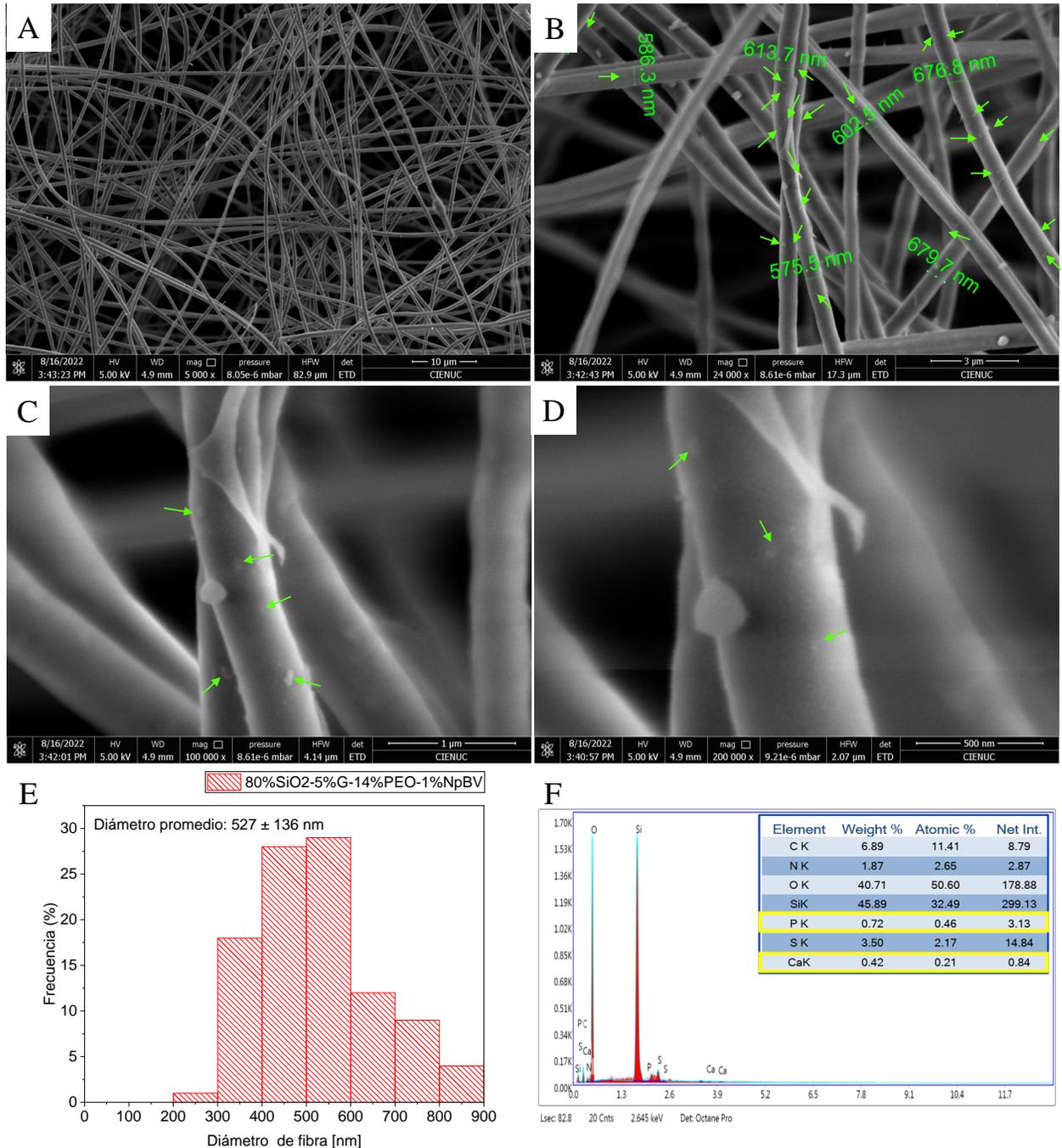


Figura 4.27: Micrografías electrónicas de barrido con emisión de campo (FESEM) (A, B, C y D), histograma de distribución de diámetro (E) y espectro de energía dispersiva de rayos X (EDX) de las fibras obtenidas desde los precursores 80 %SiO<sub>2</sub>-5 %G-14 %PEO-1 %NpBV (F).

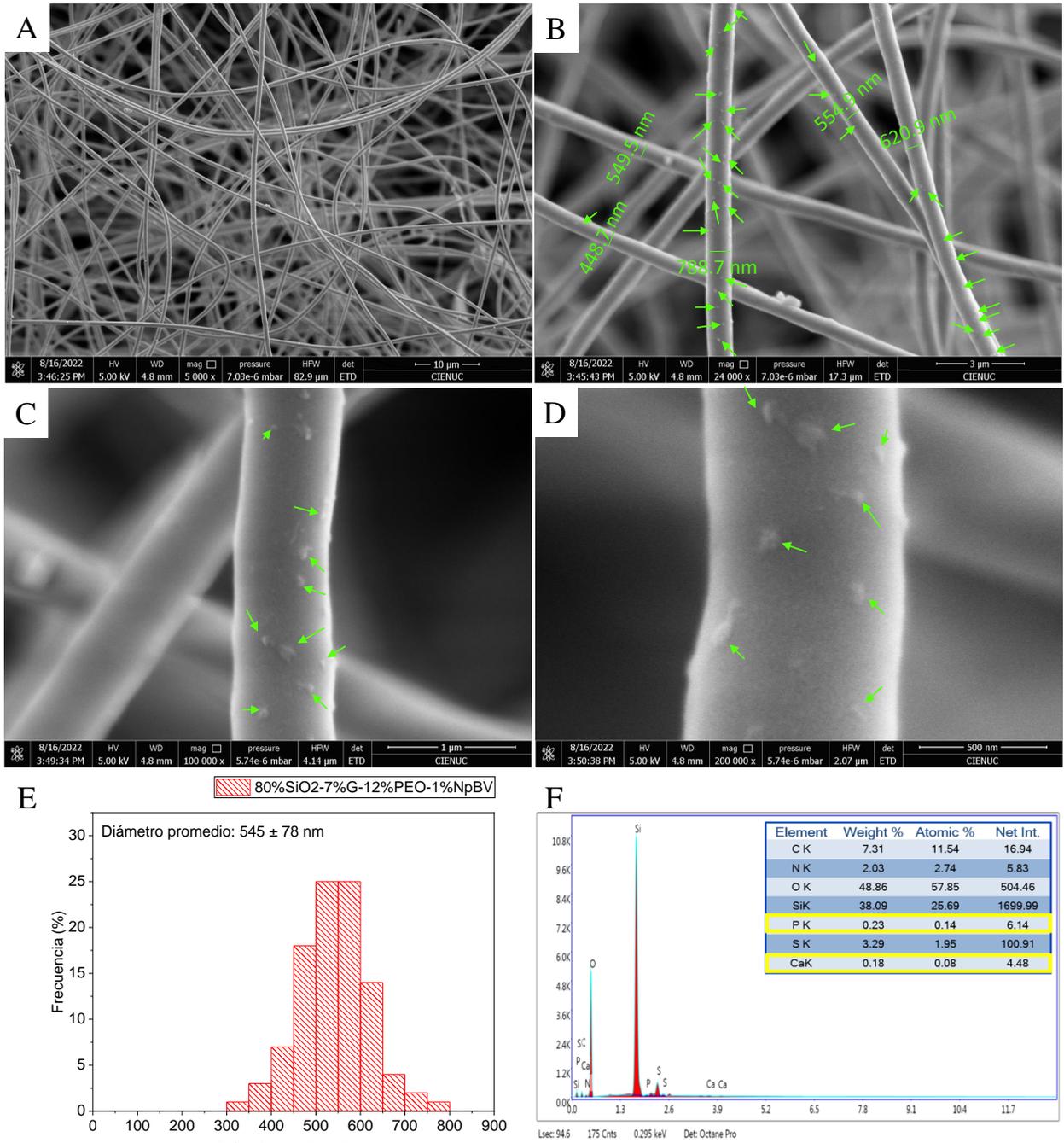


Figura 4.28: Micrografías electrónicas de barrido con emisión de campo (FESEM) (A, B, C y D), histogramas de distribución de diámetro (E) y espectro de energía dispersiva de rayos X (EDX) de las fibras obtenidas desde los precursores 80 %SiO<sub>2</sub>-7 %G-12 %PEO-1 %NpBV (F).

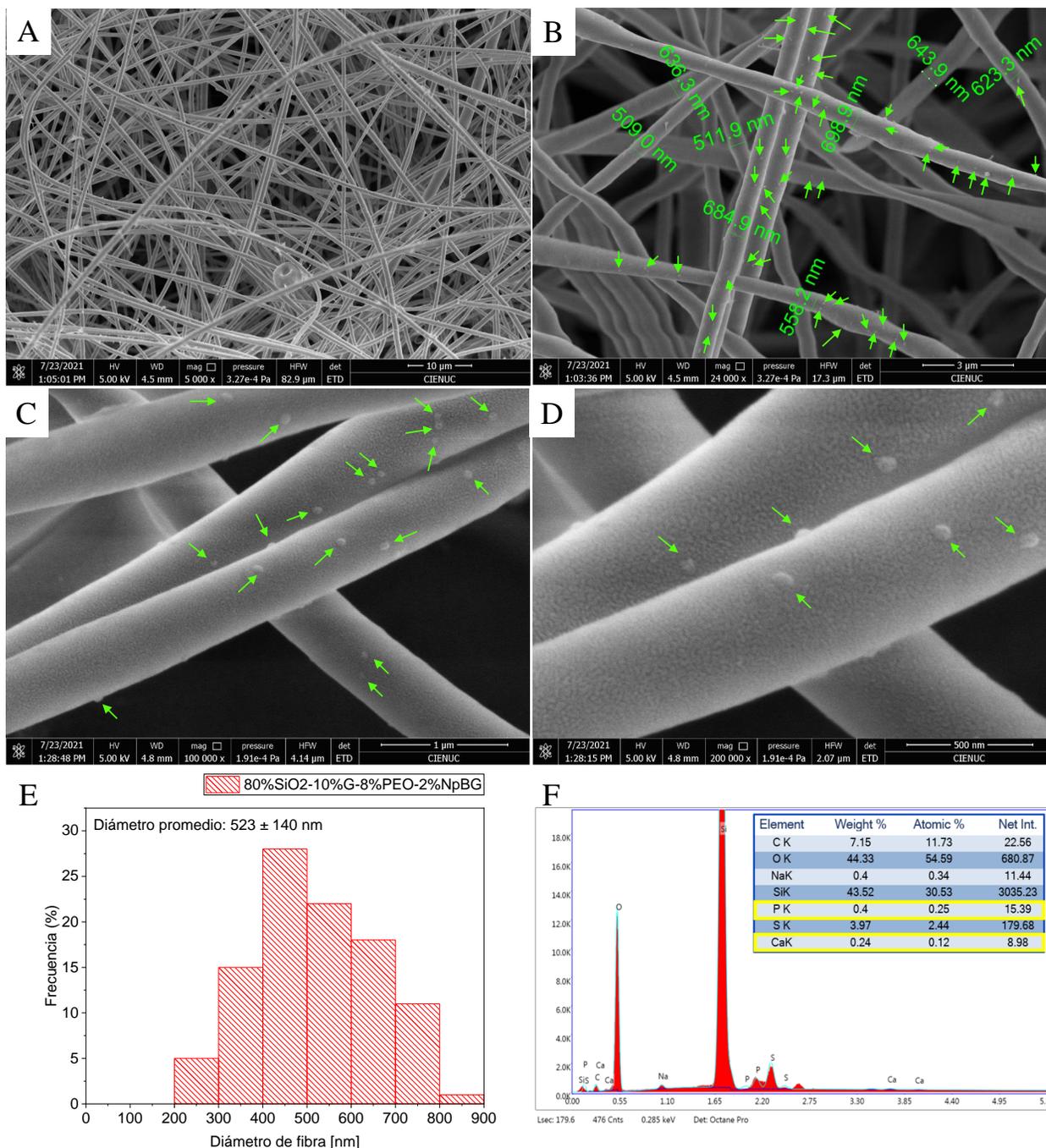


Figura 4.29: Micrografías electrónicas de barrido con emisión de campo (FESEM) (A, B, C y D), histograma de distribución de diámetro (E) y espectro de energía dispersiva de rayos X (EDX) de las fibras obtenidas desde los precursores 80 %SiO<sub>2</sub>-10 %G-8 %PEO-2 %NpBV (F).

Finalmente se muestra una micrografía electrónica de barrido a una magnificación de 200000 $\times$  con una estimación de diámetro de las NpBV (Figura 4.30 A), en ella se pue-

de observar a una NpBV incrustada en la fibra con altura aparente cercana a los 18 nm (flecha verde). Además, se obtuvo el histograma de distribución de diámetro de las NpBV (Figura 4.30 B), con un diámetro promedio de  $70 \pm 18$  nm, el cual es similar al diámetro de las NpBV antes de incorporar en las membranas.

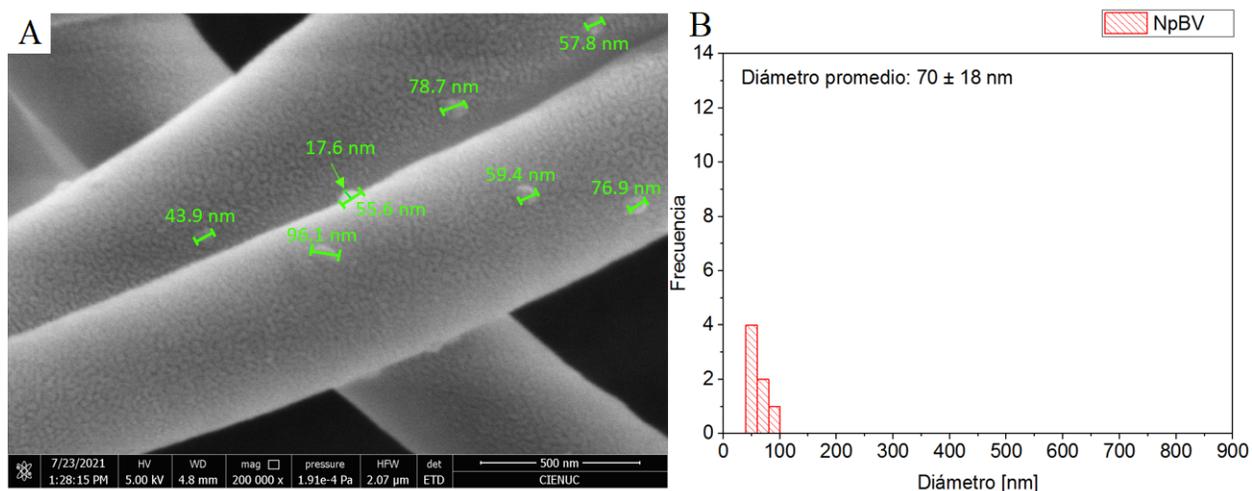


Figura 4.30: Micrografía electrónica de barrido con emisión de campo (FESEM) (A) e histograma de distribución de diámetro de las NpBV incorporadas en la superficie de las fibras de la membrana obtenida desde el precursor 80 %SiO<sub>2</sub>-10 %G-8 %PEO-2 %NpBV (B).

#### 4.3.5. Análisis del ángulo de contacto entre membrana y gota de agua (ensayo de humectabilidad)

Los resultados de los ensayos de ángulo de contacto se muestran en la Figura 4.31. Dado que la membrana obtenida a partir del precursor 80 %SiO<sub>2</sub>-10 %G-8 %PEO-2 %NpBV (Figura 4.31 d) es muy hidrofílica, no se pudo realizar la medición. Para el resto de las muestras, se pudo medir los ángulos de contacto, resultando con un valor promedio de aproximadamente 132° para la membrana obtenida desde el precursor 80 %SiO<sub>2</sub>-10 %G-10 %PEO (Figura 4.31 a), 116° para la membrana obtenida desde el precursor 80 %SiO<sub>2</sub>-5 %G-14 %PEO-1 %NpBV (Figura 4.31 b) y 70° para la membrana obtenida desde el precursor 80 %SiO<sub>2</sub>-7 %G-12 %PEO-1 %NpBV (Figura 4.31 c). En la

Tabla 4.8 se detallan los valores de ángulo de contacto izquierdo y derecho de cada membrana, cuyos valores promedio no presentan variación significativa entre cada lado. Estos resultados indican que este tipo de membranas al igual que las de la Sección 4.1.4 son altamente hidrofílicas y se requiere de un análisis adicional para profundizar en si este carácter hidrofílico viene dado por el espesor, geometría y/o composición química de las membranas.

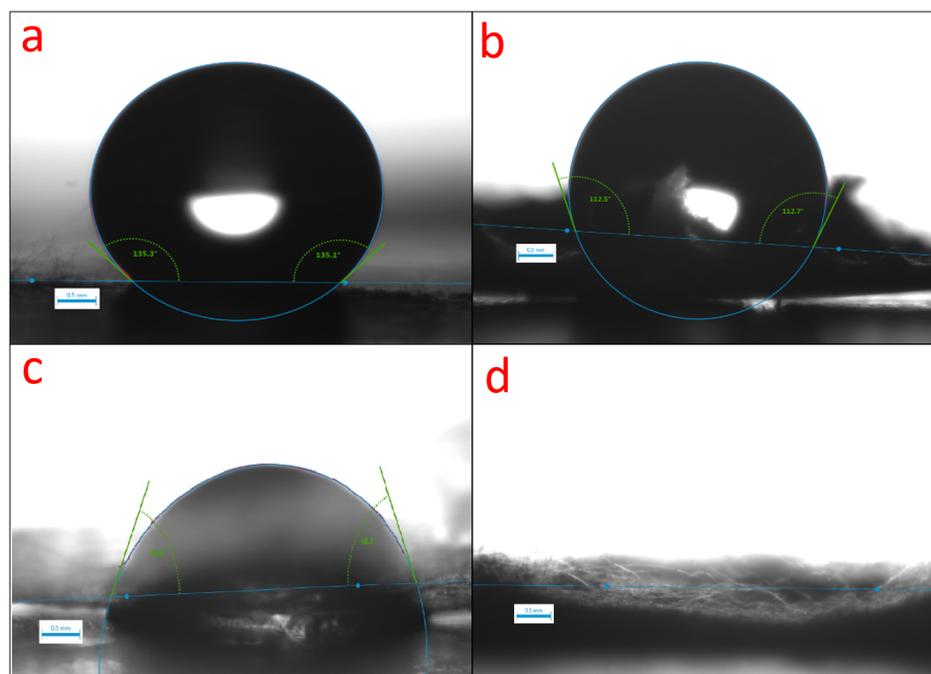


Figura 4.31: Imágenes de ensayo de ángulo de contacto de las membranas obtenidas a partir de los precursores 80 %SiO<sub>2</sub>-10 %G-10 %PEO (a), 80 %SiO<sub>2</sub>-5 %G-14 %PEO-1 %NpBV (b), 80 %SiO<sub>2</sub>-7 %G-12 %PEO-1 %NpBV (c) y 80 %SiO<sub>2</sub>-10 %G-8 %PEO-2 %NpBV (d).

#### 4.3.6. Porosidad de las membranas

En la Figura 4.32 se observan los resultados de porosidad aparente obtenidos a partir de las imágenes SEM de la sección 4.1.3. La membrana m1 (80 %SiO<sub>2</sub>-10 %G-10 %PEO) corresponde a la membrana que no tiene gelatina presente en su composición para comparar que sucede a medida que aumenta la proporción de G en el precursor que contiene NpBV como en el caso de m2 (80 %SiO<sub>2</sub>-5 %G-14 %PEO-1 %NpBV), m3 (80 %SiO<sub>2</sub>-

Material	Ángulo de contacto izquierdo (°)	Ángulo de contacto derecho (°)
80 %SiO <sub>2</sub> -10 %G-10 %PEO	131.8 ± 7.3	131.8 ± 7.1
80 %SiO <sub>2</sub> -5 %G-14 %PEO-1 %NpBV	116.0 ± 8.0	116.0 ± 8.3
80 %SiO <sub>2</sub> -7 %G-12 %PEO-1 %NpBV	71.0 ± 16.5	69.7 ± 13.9
80 %SiO <sub>2</sub> -10 %G-8 %PEO-2 %NpBV	–	–

Tabla 4.8: Ángulo de contacto entre la gota de agua y las membranas.

7 %G-12 %PEO-1 %NpBV) y m4 (80 %SiO<sub>2</sub>-10 %G-8 %PEO-2 %NpBV). Se observa un aumento de la porosidad de las membranas desde aproximadamente 69 a 83 %. Este aumento de porosidad en comparación con los resultados obtenidos en la sección 4.1.5 resultan ser aún más favorables para la infiltración celular y vascular, debido principalmente a la interconectividad entre los poros y mayor hidrofiliidad.

La absorción y retención de agua en la porosidad de la membrana permite que se lleven a cabo reacciones entre la superficie de la membrana y el medio. En el caso de las membranas que contiene NpBV en su composición, tiene la capacidad de interactuar con el SBF e iniciar el proceso de degradación y pérdida de peso por su característica biodegradable. El vidrio bioactivo se degrada por el intercambio iónico con el medio, provocando una disolución de la red de sílice al salir los grupos  $Si(OH)_4$  lo que da inicio a la degradación y pérdida de masa de la red [151]. La cinética de degradación de la membrana dependerá, entre otros factores de las características químicas del resto de precursores y de la topografía de las membranas [82].

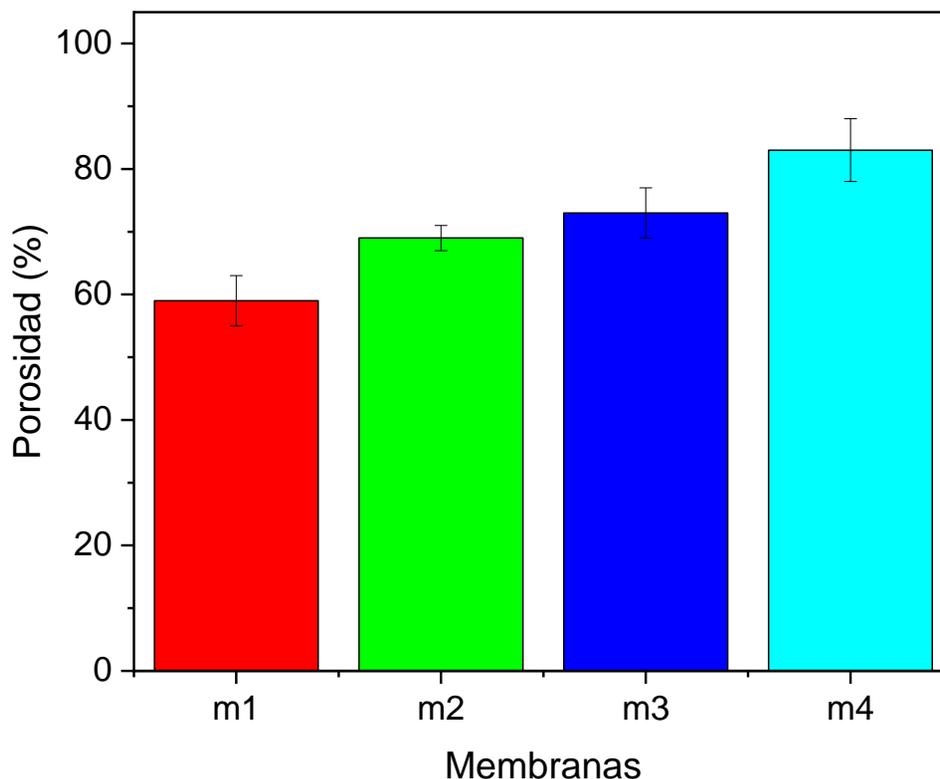


Figura 4.32: Porosidad de las membranas obtenidas a partir de los precursores 80%SiO<sub>2</sub>-10%G-10%PEO (m1), 80%SiO<sub>2</sub>-5%G-14%PEO-1%NpBV (m2), 80%SiO<sub>2</sub>-7%G-12%PEO-1%NpBV (m3) y 80%SiO<sub>2</sub>-10%G-8%PEO-2%NpBV (m4).

#### 4.3.7. Análisis estadístico de la covarianza (ANCOVA) entre la porosidad y composición de las membranas sobre el ángulo de contacto

Se realizaron análisis estadísticos para evaluar la correlación entre los diferentes parámetros a partir de los resultados obtenidos en las secciones 4.1.4, 4.1.5, 4.3.5 y 4.3.6. Se utilizó la correlación de Spearman para obtener una medida no paramétrica de correlación de rango. Esta correlación describe qué tan bien se puede definir la relación

usando una función monótona. La Tabla 4.9 muestra los coeficientes de correlación de Spearman entre las variables independientes (SiO<sub>2</sub>, G, PEO, NpBV y porosidad) y la variable de respuesta (ángulo de contacto).

Variables independientes y de respuesta							
	SiO <sub>2</sub>	G	PEO	NpBV	N	Porosidad	Ángulo de contacto
SiO <sub>2</sub>	1	-0.98	0.71	0.48	-0.21	-0.76	0.52
G	-0.98	1	-0.85	-0.61	0.27	0.64	-0.54
PEO	0.71	-0.85	1	0.73	-0.32	-0.25	0.55
NpBV	0.48	-0.61	0.73	1	-0.44	0.18	-0.14
N	-0.21	0.27	-0.32	-0.44	1	-0.08	0.039
Porosidad	-0.76	0.64	-0.25	0.18	-0.08	1	-0.66
Ángulo de contacto	0.52	-0.54	0.55	-0.14	-0.39	-0.66	1

Tabla 4.9: Coeficientes de correlación de Spearman entre las variables de estudio, N representa al número de observaciones.

Los datos se graficaron como diagramas de caja con muescas (Figuras 4.33 y 4.34). Los recuadros representan el segundo y tercer cuartil alrededor de la mediana, que está representada por la línea horizontal gruesa dentro del bloque. Los bigotes representan el 100% de los datos dentro de cada grupo, incluidos los valores atípicos. Las muescas representan un intervalo de confianza del 95% ( $CI_{muesca}$ ) de la mediana y se extienden hasta  $[1.58 \times IQR / ((n)0, 5)]$ . IQR corresponde al rango intercuartílico entre el primer y el tercer cuartil y N es el número de observaciones no faltantes dentro del grupo. Las muescas que no se superponen representan diferencias estadísticamente significativas [243] [244].

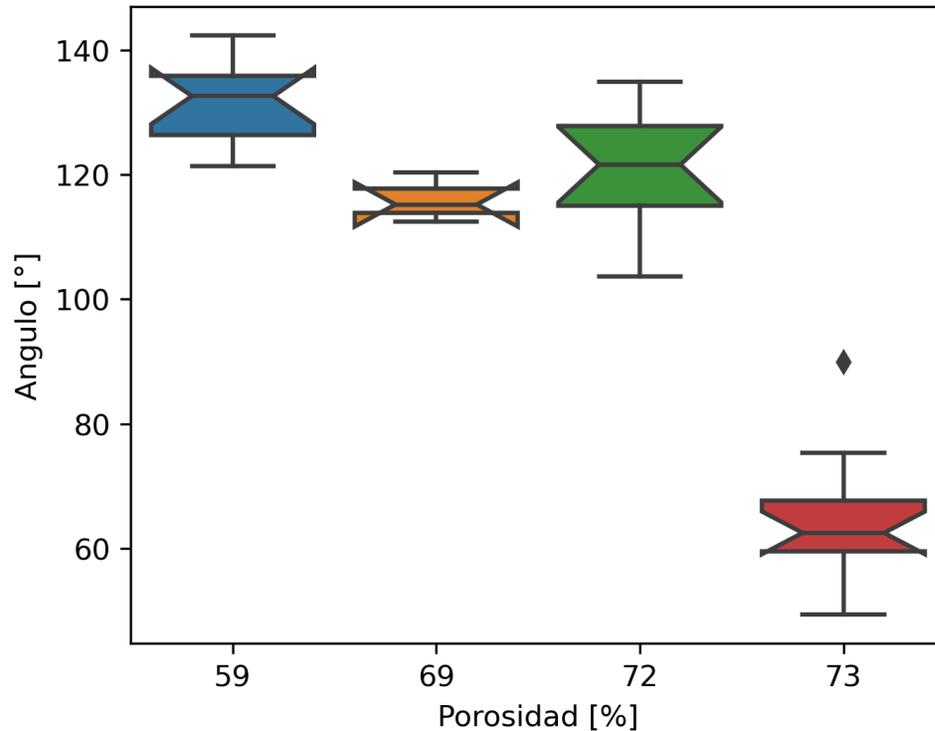


Figura 4.33: Gráfico categórico del análisis entre la variable explicativa porosidad y la variable de respuesta ángulo de contacto. La forma geométrica de los plots representan en el centro de la figura (línea horizontal) a la mediana y la muesca un intervalo de confianza del 95 %.

La variable de respuesta ángulo de contacto exhibió una correlación más alta con la porosidad (-0.66) y una correlación insignificante con NpBV (0.14). En el gráfico de la Figura 4.33 se observa una tendencia negativa entre la porosidad y ángulo de contacto. Existen diferencias estadísticamente significativas entre los primeros dos grupos (azul y amarillo) y entre el primer y tercer grupo (azul y verde). No se observan diferencias estadísticamente significativas entre el segundo y tercer grupo (amarillo y verde). En el último grupo (rojo) se tiene un ángulo de contacto bajo y es estadísticamente significativo con todo el resto. Además, se observa que se escapa uno de los puntos debido a que probablemente hay una desviación estándar muy alta. De todo lo anterior se puede concluir que cuándo la porosidad aumenta el ángulo de contacto disminuye.

La correlación de Spearman de la Tabla 4.9 permitió definir que variables utilizar en el modelo, se decidió sacar G ya que siempre se correlaciona con los otros datos y resulta

redundante para el ANCOVA.

La Tabla 4.10 muestra el análisis estadístico paso a paso de todos los materiales y las combinaciones de estos. Se muestran los coeficientes de determinación ( $R^2$ ), coeficiente del modelo de regresión asociado a la variable ( $\beta_i$ ) y p-valor para cada una de las variables y sus interacciones, donde  $p < 0.0001$ : \*\*\*\*,  $p < 0.001$ : \*\*\*,  $p < 0.01$ : \*\*,  $p < 0.05$ : \*,  $p \geq 0.05$ : NA (no contribuye al modelo). Se observa que el PEO tiene un  $p > 0.05$  lo que significa que no es estadísticamente significativo. El  $\text{SiO}_2$  y la interacción  $\text{SiO}_2$ :PEO si son estadísticamente significativos. NpBV y la interacción entre  $\text{SiO}_2$ :NpBV si son estadísticamente significativos. La interacción entre PEO:NpBV y  $\text{SiO}_2$ :PEO:NpBV no son estadísticamente significativas.

	$\beta_i$	$R^2$	t	$p >  t $
Intercepto	0.446	0.273	1.633	0.112
$\text{SiO}_2$	-1.009	0.170	-5.927	0.000
PEO	4.578	0.746	1.667	0.105
$\text{SiO}_2$ :PEO	0.208	0.031	6.680	0.000
NpBV	-0.018	0.007	-2.469	0.019
PEO:NpBV	0.0002	0.001	0.339	0.737
$\text{SiO}_2$ :NpBV	-1.481	0.600	-2.469	0.019
$\text{SiO}_2$ :PEO:NpBV	0.016	0.047	0.339	0.737

Tabla 4.10: Análisis estadístico paso a paso de los materiales y combinaciones.

La Tabla 4.11 muestra la comparación entre las distintas composiciones para determinar si son estadísticamente significativas entre ellas. En el gráfico de la Figura 4.34 se observa la relación entre las composiciones de las membranas 80% $\text{SiO}_2$ -10%G-10%PEO (C1), 70% $\text{SiO}_2$ -20%G-10%PEO (C2), 68% $\text{SiO}_2$ -25%G-7%PEO (C3), 80% $\text{SiO}_2$ -5%G-14%PEO-1%NpBV (C4) y 80% $\text{SiO}_2$ -7%G-12%PEO-1%NpBV (C5) y sus respectivos ángulo de contacto. Además, se detalla la significancia entre todas las composiciones. Estos resultados responden a la información obtenida anteriormente en la Tabla 4.10 que muestra que la variable explicativa NpBV es estadísticamente significativa respecto a la variable de respuesta ángulo de contacto.

Comparación de composición					
	C1	C2	C3	C4	C5
C1	1	0.048	0.001	0.060	0.001
C2	0.048	1	0.001	0.892	0.001
C3	0.001	0.001	1	0.001	0.001
C4	0.060	0.893	0.001	1	0.001
C5	0.001	0.001	0.583	0.001	1

Tabla 4.11: Coeficientes de correlación de Spearman entre las composiciones de las membranas 80%SiO<sub>2</sub>-10%G-10%PEO (C1), 70%SiO<sub>2</sub>-20%G-10%PEO (C2), 68%SiO<sub>2</sub>-25%G-7%PEO (C3), 80%SiO<sub>2</sub>-5%G-14%PEO-1%NpBV (C4) y 80%SiO<sub>2</sub>-7%G-12%PEO-1%NpBV (C5).

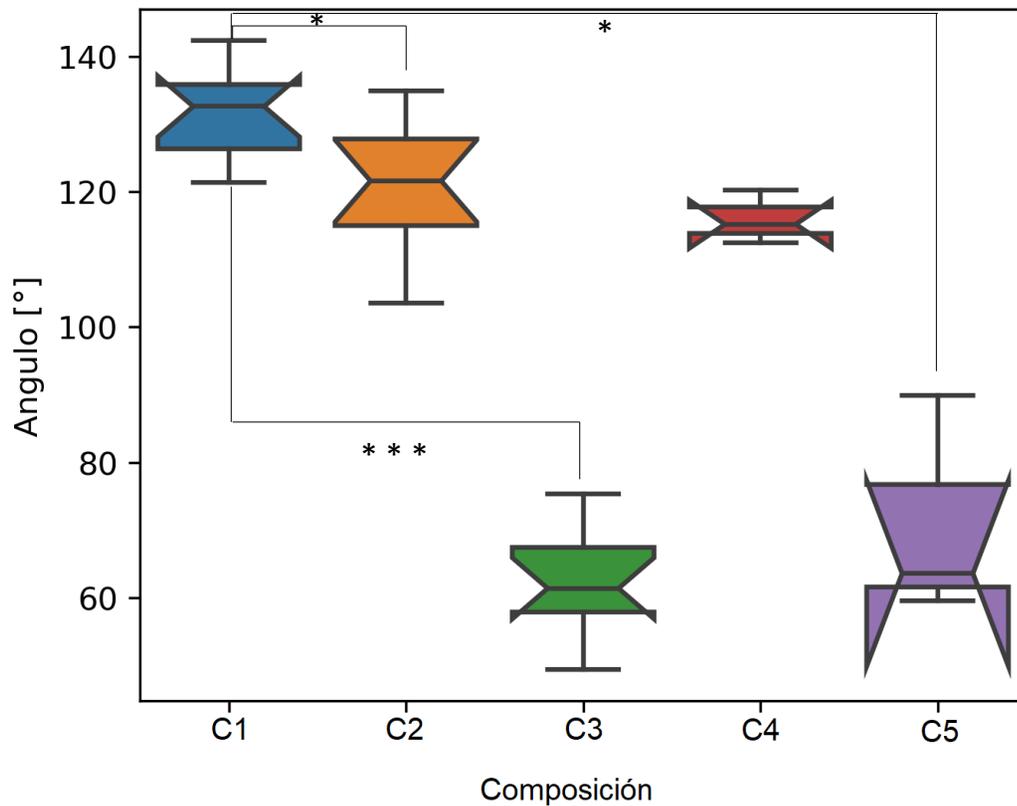


Figura 4.34: Gráfico del análisis entre las variables explicativas composición de las membranas 80%SiO<sub>2</sub>-10%G-10%PEO (C1), 70%SiO<sub>2</sub>-20%G-10%PEO (C2), 68%SiO<sub>2</sub>-25%G-7%PEO (C3), 80%SiO<sub>2</sub>-5%G-14%PEO-1%NpBV (C4) y 80%SiO<sub>2</sub>-7%G-12%PEO-1%NpBV (C5) y la variable de respuesta ángulo de contacto.

#### 4.3.8. Formación de hidroxiapatita en las membranas

Se evaluó la formación de hidroxiapatita en las membranas que contienen NpBV en su composición y en la obtenida desde el precursor 80 %SiO<sub>2</sub>-10 %G-10 %PEO utilizada como muestra control al no contener NpBV, luego de la inmersión en fluido corporal simulado (SBF) a intervalos de tiempo de 3, 7 y 14 días. Los espectros infrarrojos por transformada de Fourier se muestran en la Figura 4.35, los difractogramas DRX en la Figura 4.36 y la evolución del pH a intervalos de tiempo 3, 7 y 14 días en la Figura 4.37. Además, se muestran las micrografías electrónicas de barrido con emisión de campo (FESEM) de las membranas obtenidas a partir de los precursores 80 %SiO<sub>2</sub>-10 %G-10 %PEO (Figura 4.38), 80 %SiO<sub>2</sub>-5 %G-14 %PEO-1 %NpBV (Figura 4.39), 80 %SiO<sub>2</sub>-7 %G-12 %PEO-1 %NpBV (Figura 4.40) y 80 %SiO<sub>2</sub>-10 %G-8 %PEO-2 %NpBV (Figura 4.41) y sus respectivos espectros de energía dispersiva de rayos X (EDX) (Figura 4.43).

Los espectros FTIR de las membranas que contienen NpBV en su composición después de la inmersión en SBF mostraron la aparición de las bandas de absorción posicionadas a números de onda 592 y 662 cm<sup>-1</sup> relacionadas con la flexión asimétrica del enlace P-O de la hidroxiapatita cristalina (HA) [227] [245]. También se observa la banda de absorción posicionada a un número de onda 1036 cm<sup>-1</sup> asociada con el estiramiento antisimétrico del enlace P-O [232] [230] [246]. El peak posicionado en 1455 cm<sup>-1</sup> se asignó a los movimientos vibratorios de los restos C-O que pertenecen a la estructura molecular del carbonato [247], lo que sugiere la formación de hidroxiapatita. Esto se confirmó mediante los difractogramas de la Figura 4.36 que muestran la aparición de los peaks de difracción característicos ubicados a  $2\theta$ : 26, 31.7 y 45.4°, correspondientes a los reflejos (002), (211) y (222) de hidroxiapatita cristalina [248] [249]. Conforme fue avanzando el tiempo de inmersión hasta los 14 días, los peaks se volvieron mas intensos, lo cual se relaciona con lo esperado teóricamente para materiales como vidrios y nanopartículas bioactivas [166].

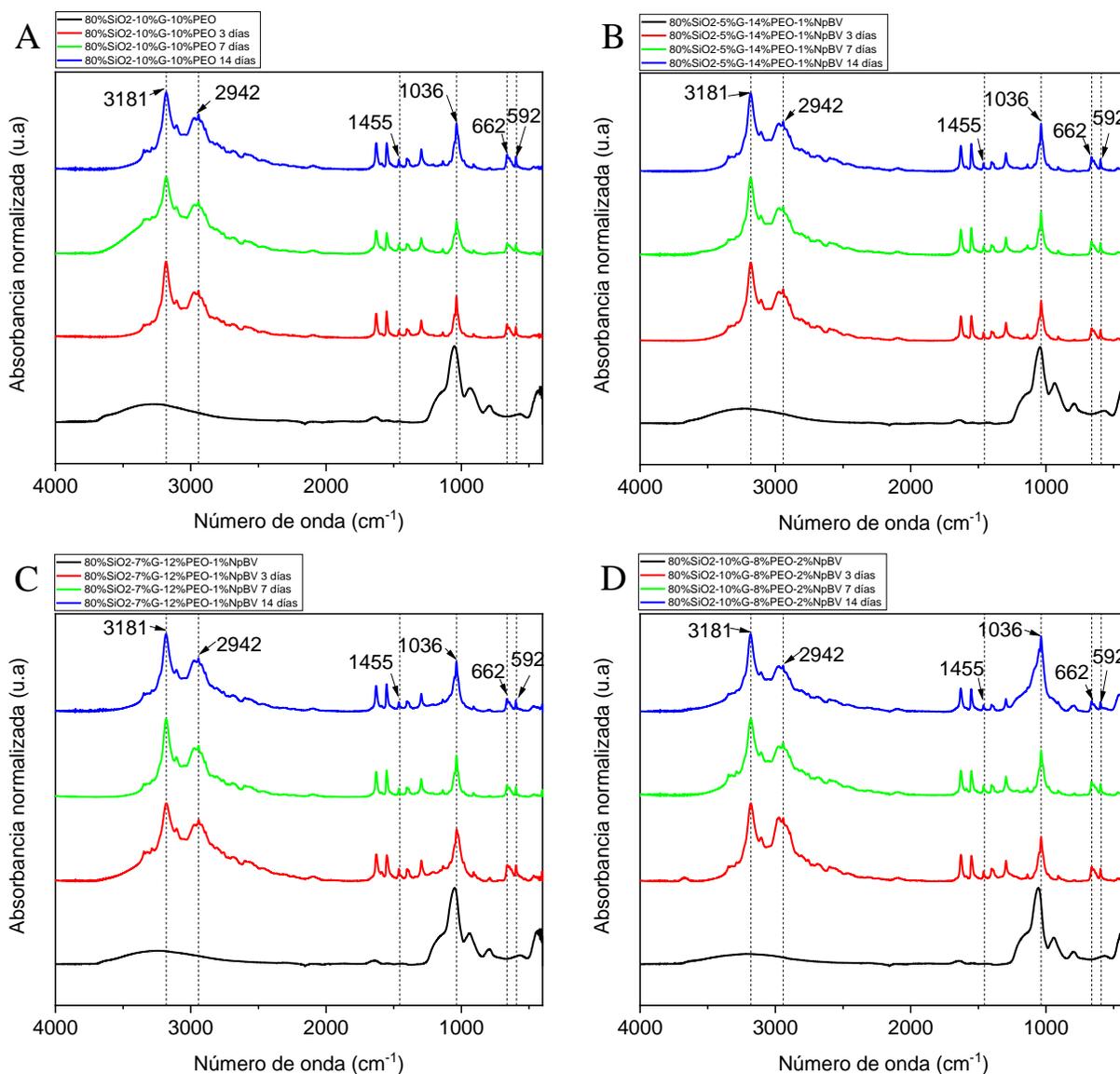


Figura 4.35: Espectros infrarrojos por transformada de Fourier (FTIR) de las membranas formadas por los precursores 80%SiO<sub>2</sub>-10%G-10%PEO (A), 80%SiO<sub>2</sub>-5%G-14%PEO-1%NpBV (B), 80%SiO<sub>2</sub>-7%G-12%PEO-1%NpBV (C) y 80%SiO<sub>2</sub>-10%G-8%PEO-2%NpBV tras inmersión en SBF durante 3, 7 y 14 días (D).

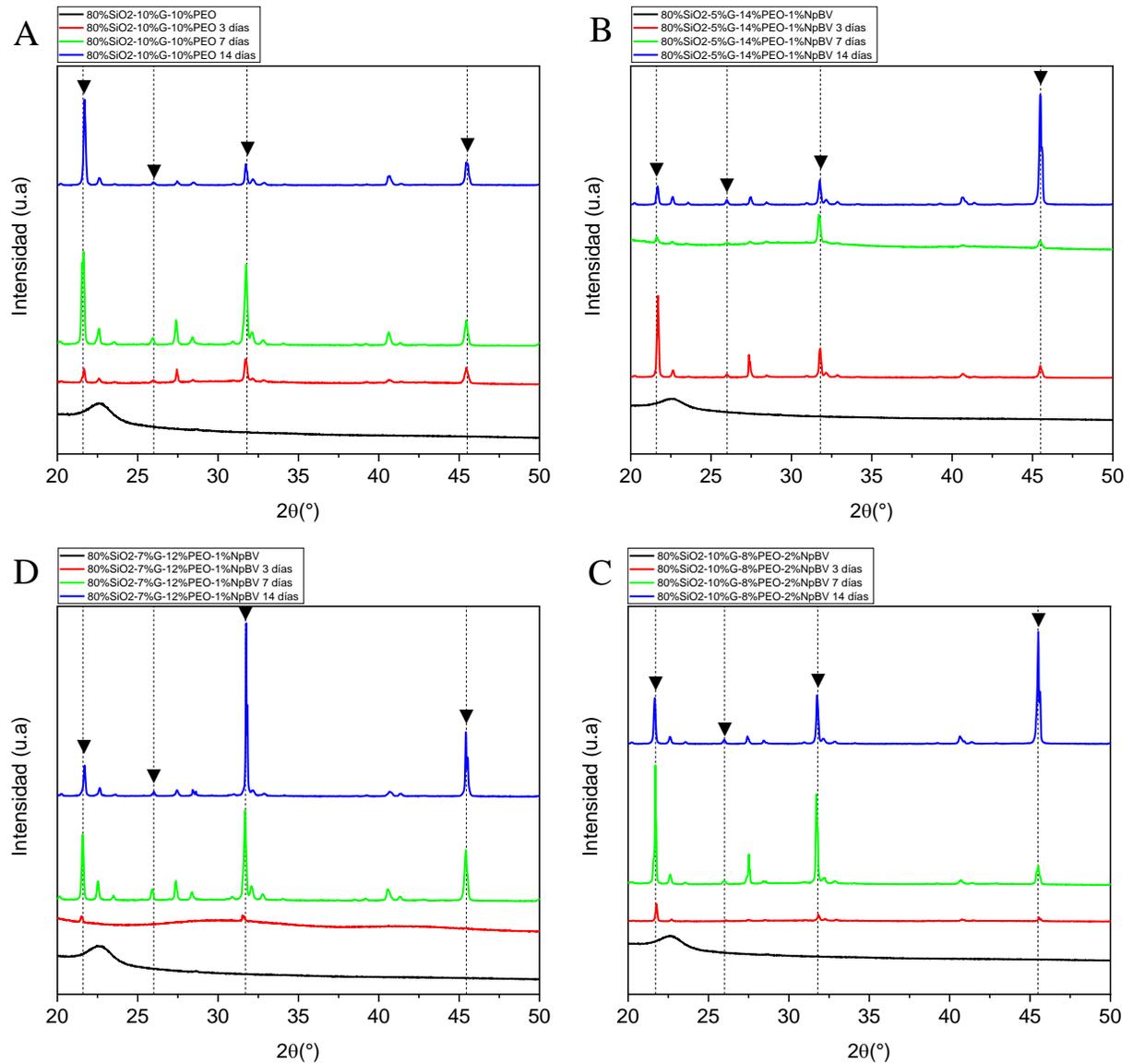


Figura 4.36: Difractogramas de las membranas fabricadas a partir de los precursores 80 %SiO<sub>2</sub>-10 %G-10 %PEO (A), 80 %SiO<sub>2</sub>-5 %G-14 %PEO-1 %NpBV (B), 80 %SiO<sub>2</sub>-7 %G-12 %PEO-1 %NpBV (C) y 80 %SiO<sub>2</sub>-10 %G-8 %PEO-2 %NpBV tras inmersión en SBF durante 3, 7 y 14 días (D).

La Figura 4.37 muestra la evolución del pH del SBF en función del tiempo. Para todas las membranas se encontró que el pH aumenta, el mayor incremento de pH en el medio fue inducido por las membranas que contienen NpBV en su formulación, lo que sugiere su capacidad para liberar  $Ca^{2+}$  y  $PO_4^{3-}$  al SBF para inducir la formación de hidroxiapatita [16]. Este aumento ha sido reportado en la literatura y se debe a que los vidrios bioactivos

incrementan el pH del medio por intercambio de iones  $Ca^{+2}$  y  $Na^{+2}$  desde la superficie del vidrio con los  $H^+$  del medio [151].

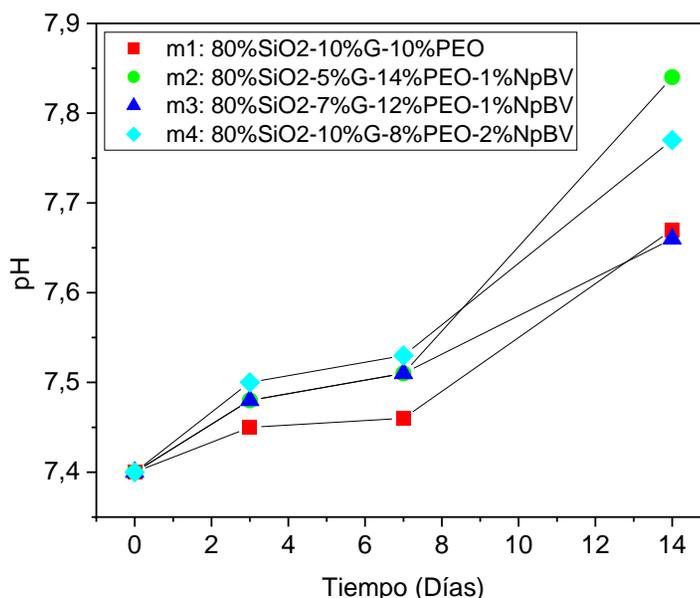


Figura 4.37: Evolución del pH de las membranas obtenidas desde los precursores 80 %SiO<sub>2</sub>-10%G-10 %PEO, 80 %SiO<sub>2</sub>-5%G-14 %PEO-1 %NpBV, 80 %SiO<sub>2</sub>-7%G-12 %PEO-1 %NpBV y 80 %SiO<sub>2</sub>-10%G-8 %PEO-2 %NpBV tras inmersión en SBF durante 3, 7 y 14 días.

Las imágenes FESEM también corroboraron la formación de HA superficial en las membranas. Se ha reportado la aparición de Ca/P similares a las obtenidas en hidroxiapatita con bioactividad y habilidad para unirse al hueso [231] [250] [251]. En la membrana obtenida desde el precursor 80 %SiO<sub>2</sub>-10 %G-10 %PEO luego de 7 y 14 días de inmersión en SBF se observan algunos depósitos de Ca/P (Figura 4.38 D y F) en la superficie de la fibra, lo cual fue corroborado mediante los espectros de energía dispersiva de rayos X (EDX) (Figura 4.43 b y c). En las membranas que contienen NpBV en su formulación se observan claramente depósitos de Ca/P en las fibras de las membranas, asociados a la formación de HA luego del día 3 de inmersión en SBF, los cuales van en aumento en el día 7, para finalmente convertirse en microesferas bien definidas de HA en el día 14 (Figuras 4.39, 4.40 y 4.41). La formación de estas microesferas han sido reportadas en estudios de HA sintética obtenida mediante los métodos de secado

por aspersión, hidrotermal y utilizando emulsión de aceite en agua [32]. La composición elemental de las membranas expuestas a SBF fue identificada por EDX y los elementos más relevantes resultaron ser C, N, O, P y Ca, se observa el aumento de porcentaje en peso de los elementos Ca y P conforme aumentaba el tiempo de inmersión en SBF, alcanzando su valor más alto en el día 14 en todas las membranas (Figuras 4.43 c, f, i y j). También se observa la presencia de los elementos Na, Cl y K asociados a residuos que pudieran haber quedado de la composición del SBF.

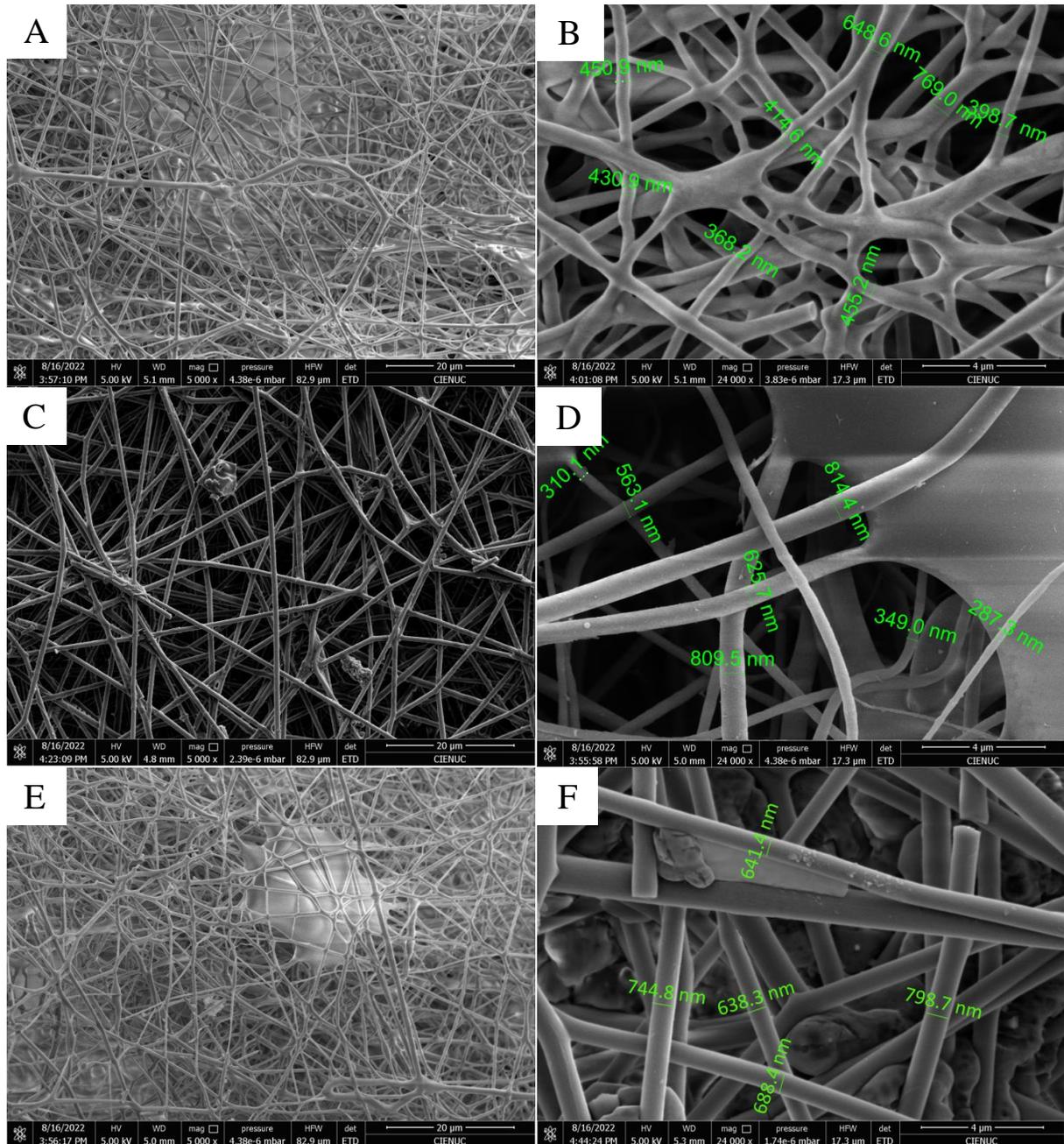


Figura 4.38: Micrografías electrónicas de barrido con emisión de campo (FESEM) de la membrana obtenida desde el precursor 80%SiO<sub>2</sub>-10%G-10%PEO tras inmersión en SBF durante 3 (A y B ), 7 (C y D) y 14 (E y F) días.

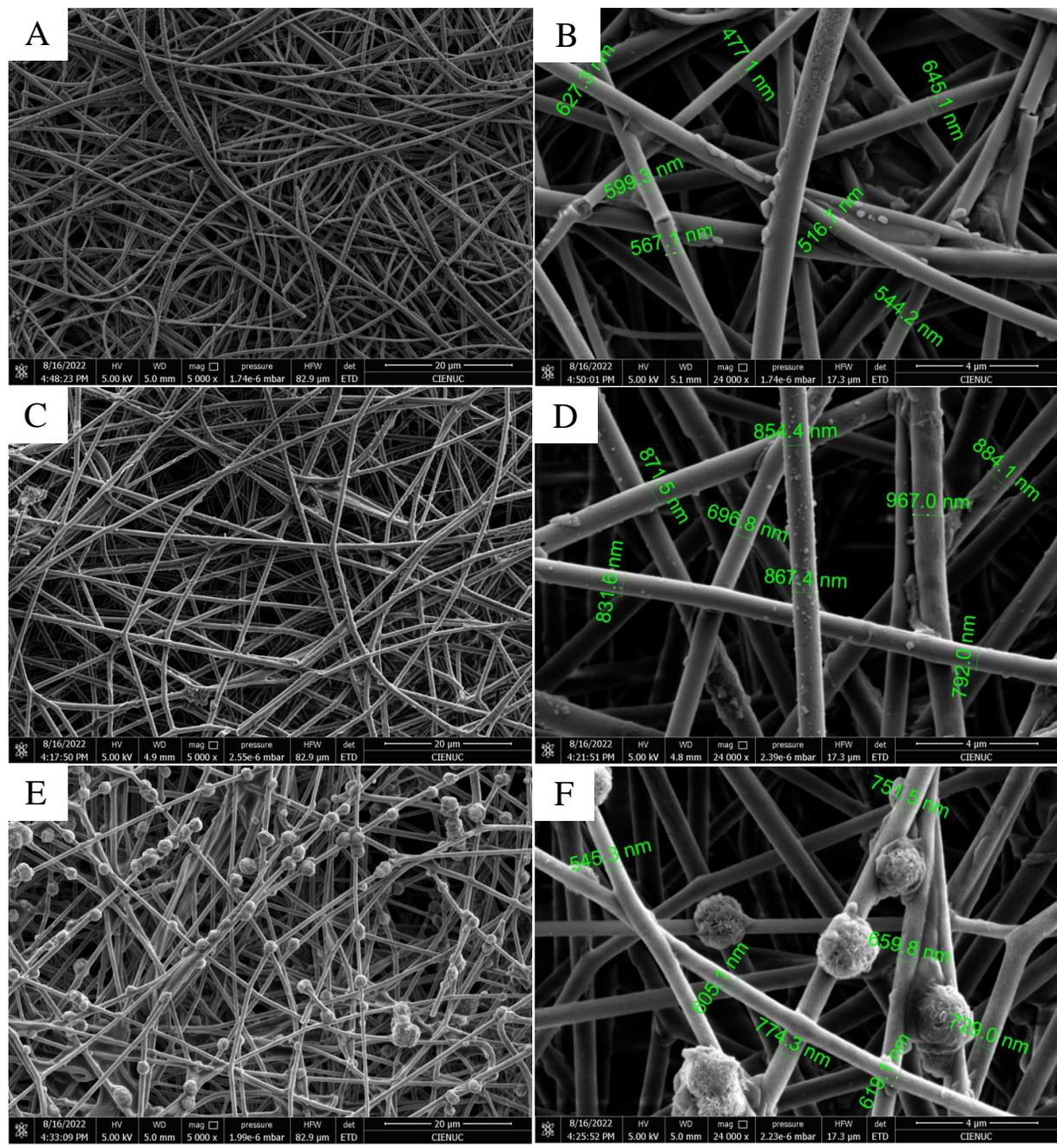


Figura 4.39: Micrografías electrónicas de barrido con emisión de campo (FESEM) de la membrana obtenida desde el precursor 80%SiO<sub>2</sub>-5%G-14%PEO-1%NpBV tras inmersión en SBF durante 3 (A y B), 7 (C y D) y 14 (E y F) días.

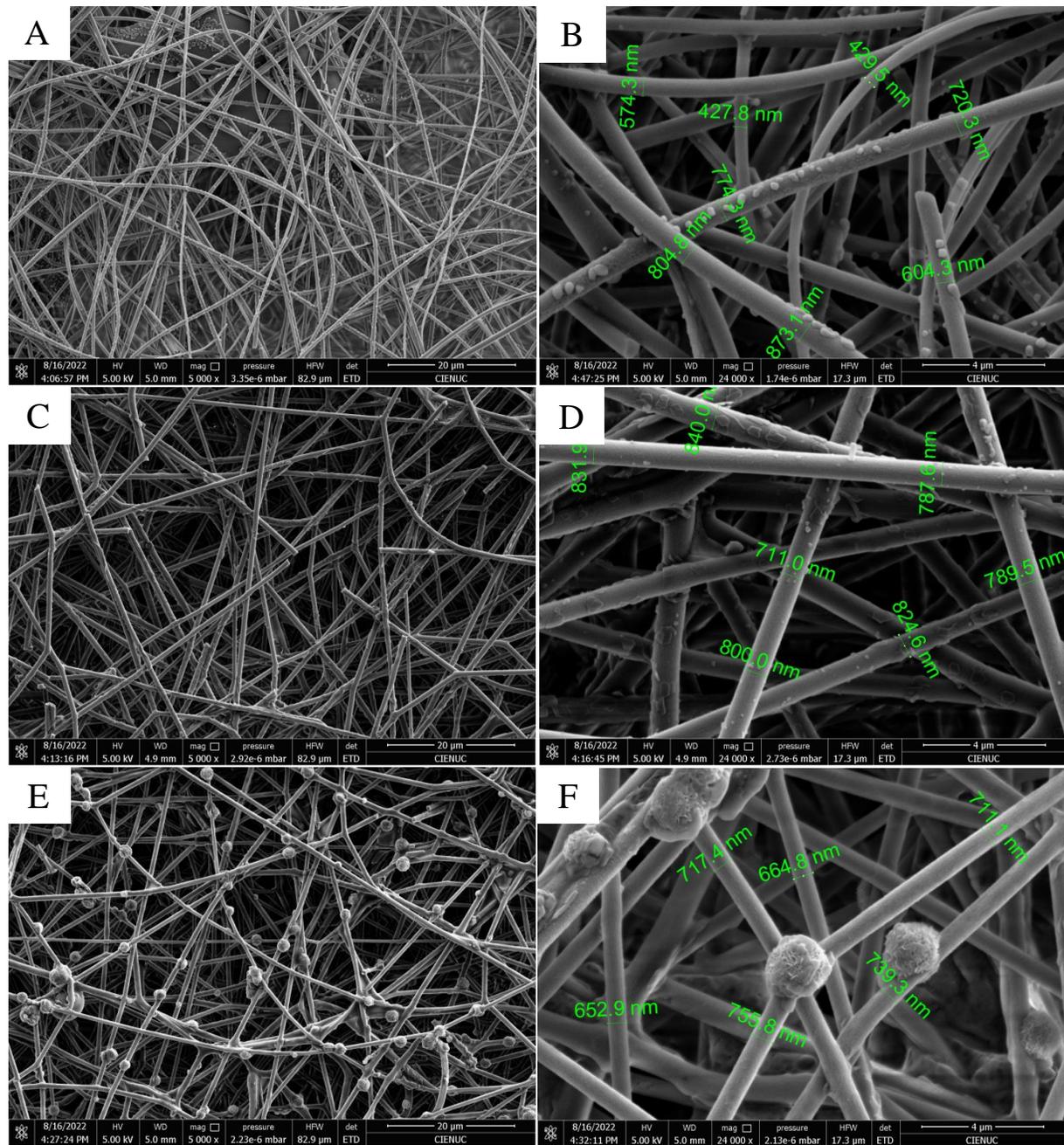


Figura 4.40: Micrografías electrónicas de barrido con emisión de campo (FESEM) de la membrana obtenida desde el precursor 80%SiO<sub>2</sub>-7%G-12%PEO-1%NpBV tras inmersión en SBF durante 3 (A y B), 7 (C y D) y 14 (E y F) días.

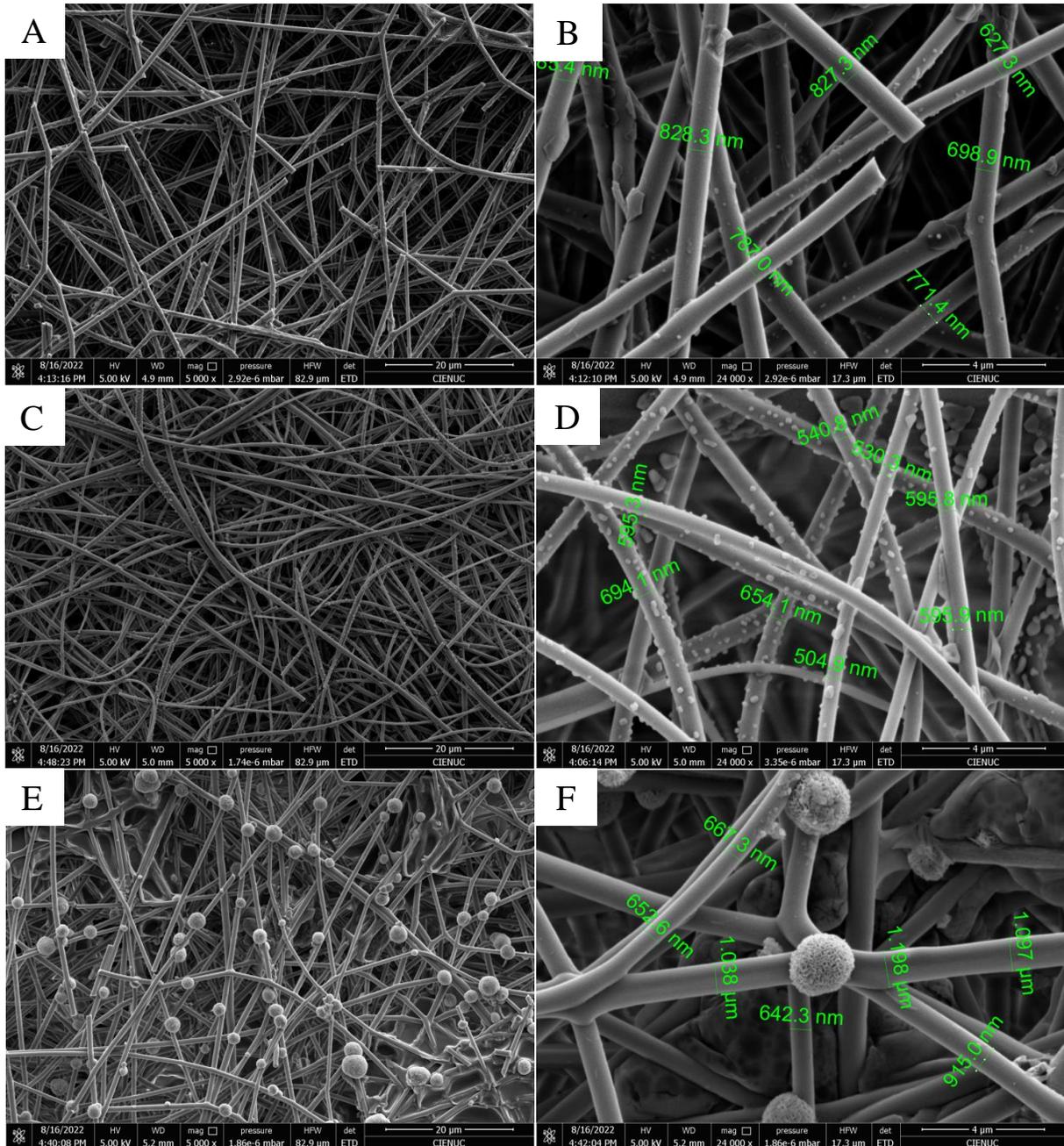


Figura 4.41: Micrografías electrónicas de barrido con emisión de campo (FESEM) de la membrana obtenida desde el precursor 80%SiO<sub>2</sub>-10%G-8%PEO-2%NpBV tras inmersión en SBF durante 3 (A y B), 7 (C y D) y 14 (E y F) días.

A continuación se muestra la evolución de la membrana obtenida a partir del precursor 80%SiO<sub>2</sub>-10%G-8%PEO-2%NpBV antes de la inmersión en SBF (Figura 4.42 A), luego

de 3 (Figura 4.42 B), 7 (Figura 4.42 C) y 14 días (Figura 4.42 D) a una magnificación de  $100000\times$ . Se observa que la presencia de NpBV en la membrana potencia la formación de precipitados de fosfato cálcico en las fibras, para luego de 14 días llegar a la formación de microesferas de HA. El análisis elemental de la región in situ de la microesfera de HA (Figura 4.44 B) muestra un aumento significativo del porcentaje en peso de los elementos Ca/P de 1.22/0.61 a 31.42/15.86 tras la inmersión durante 14 días en SBF, al comparar con la región de la membrana a una magnificación  $1000\times$  (Figura 4.44 A). La morfología de este tipo de HA ha sido reportada en la literatura con tamaños que van de los  $0.5\text{--}7\ \mu\text{m}$ , similares en bioactividad y habilidad de unión al hueso [32].

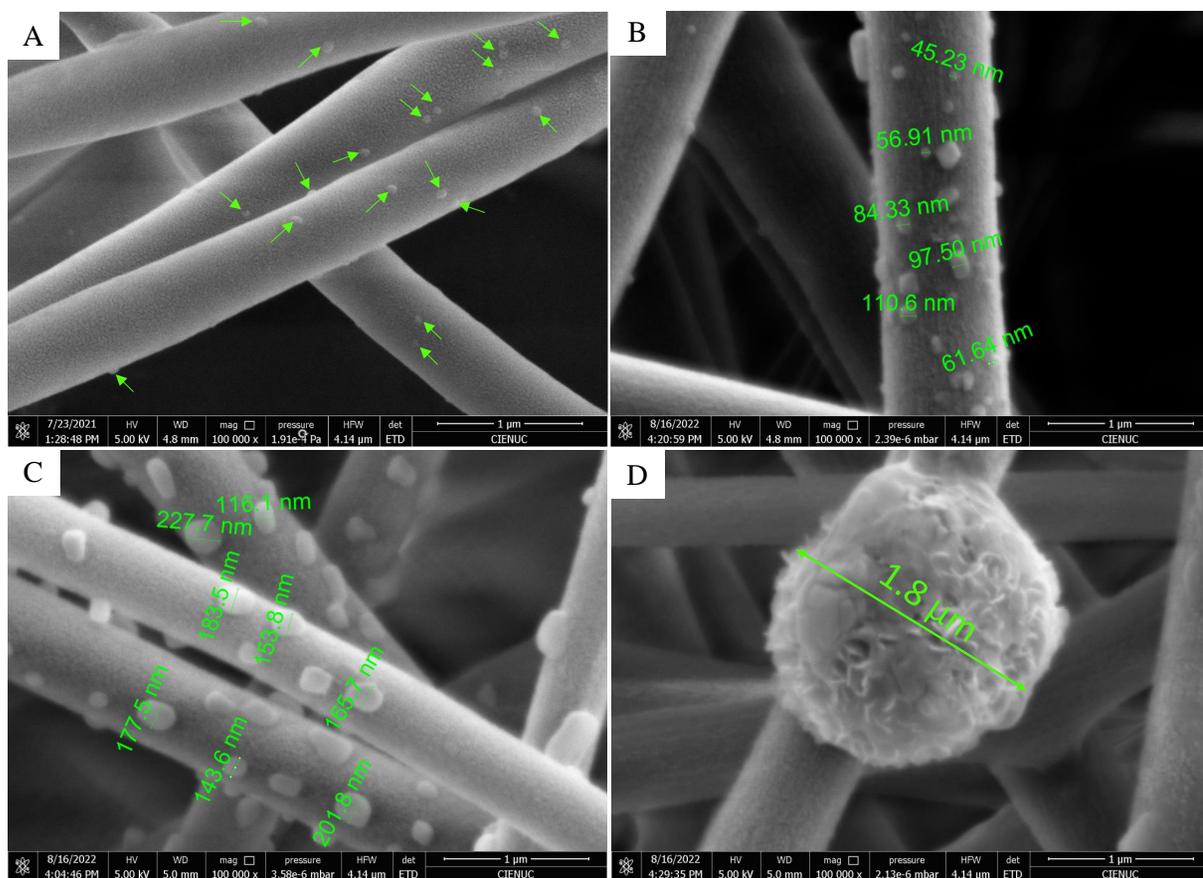


Figura 4.42: Micrografías electrónicas de barrido con emisión de campo (FESEM) de la membrana obtenida desde el precursor  $80\%\text{SiO}_2\text{-}10\%\text{G-}8\%\text{PEO-}2\%\text{NpBV}$  antes de la inmersión en SBF (A), después de 3 (B), 7 (C) y 14 días (D).

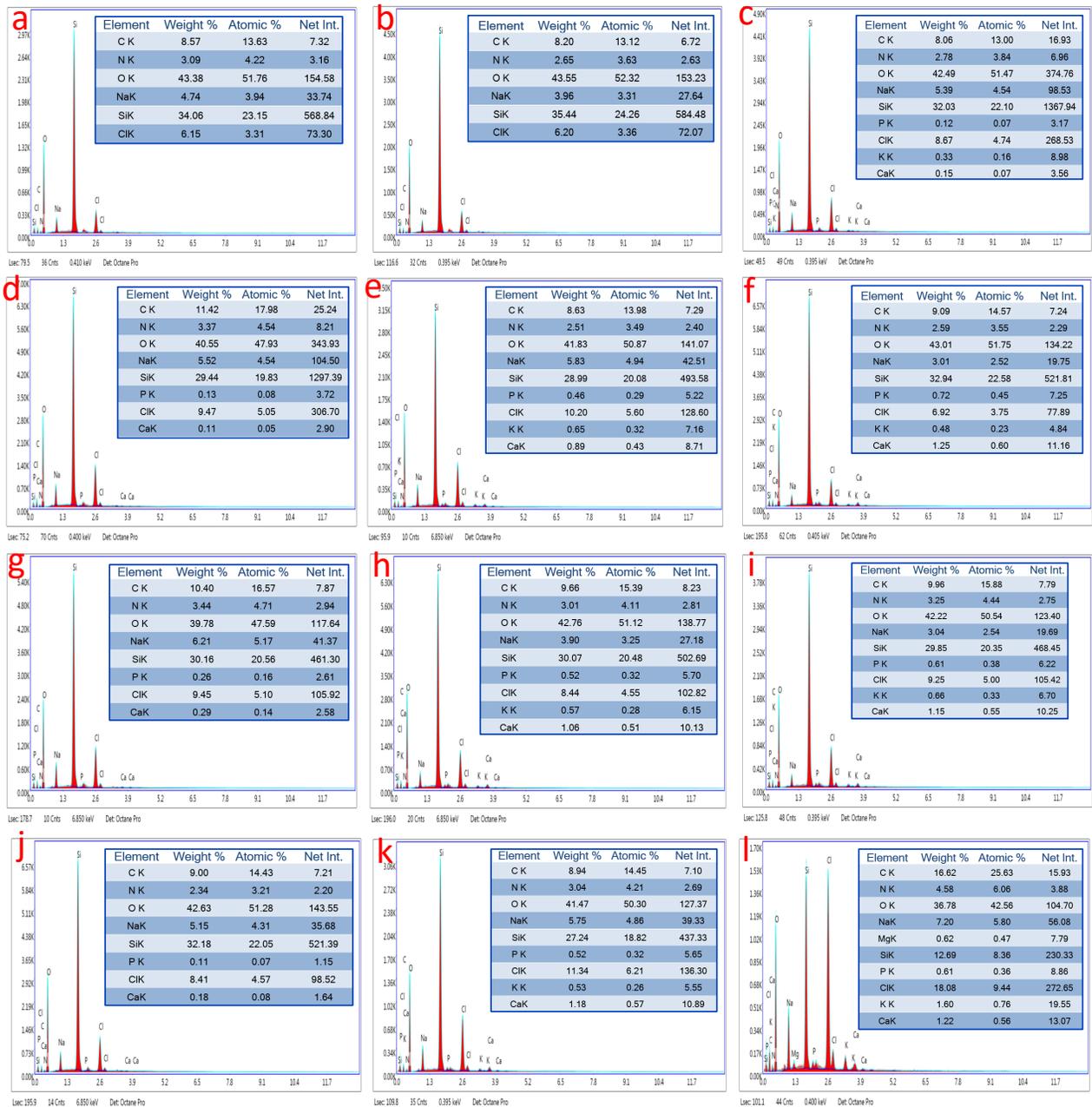


Figura 4.43: Espectros de energía dispersiva de rayos X (EDX) y tabla de análisis elemental de las membranas obtenidas desde los precursores 80%SiO<sub>2</sub>-10%G-10%PEO (a, b y c), 80%SiO<sub>2</sub>-5%G-14%PEO-1%NpBV (d, e y f), 80%SiO<sub>2</sub>-7%G-12%PEO-1%NpBV (g, h, i) y 80%SiO<sub>2</sub>-10%G-8%PEO-2%NpBV (j, k, l) tras inmersión en SBF durante 3, 7 y 14 días.

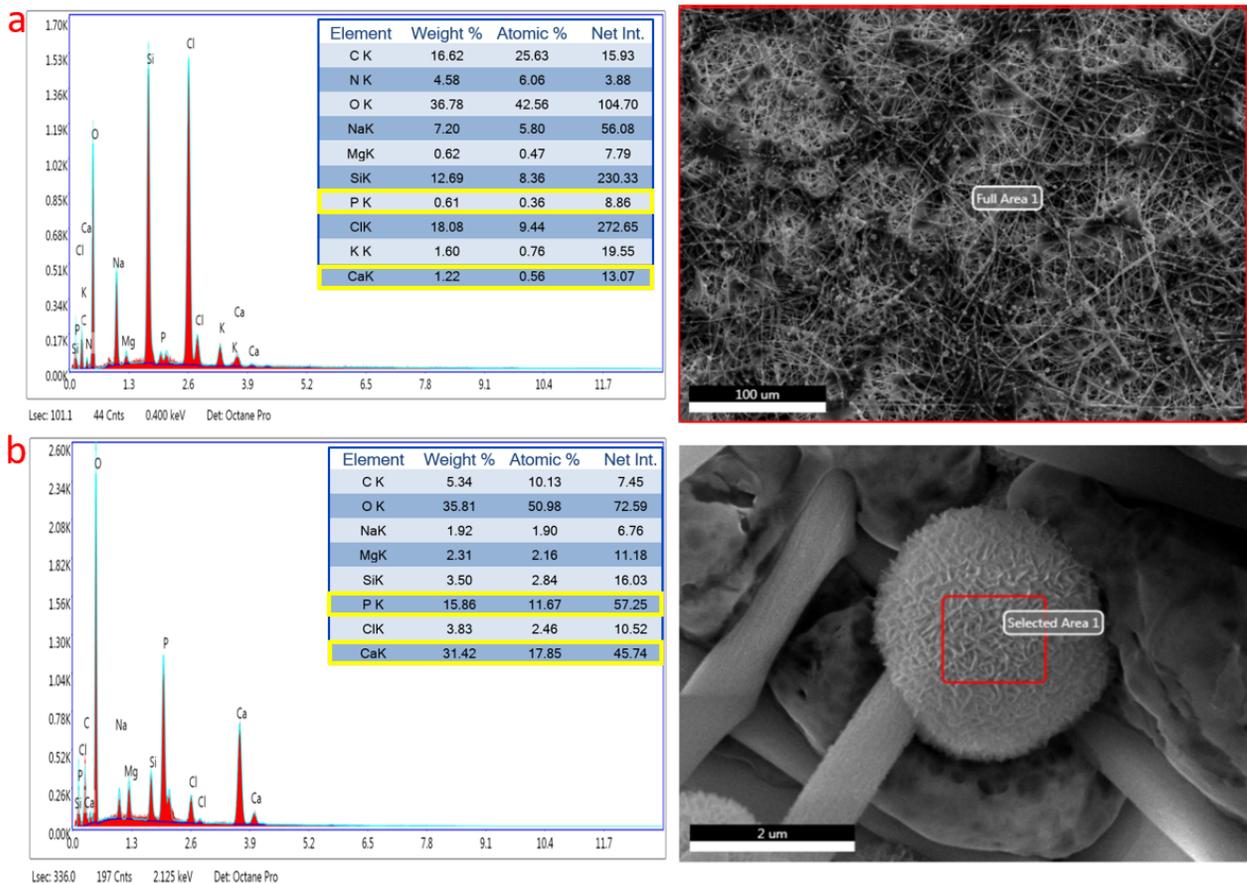


Figura 4.44: Espectros de energía dispersiva de rayos X (EDX) y magnificación de la membrana obtenida desde el precursor 80%SiO<sub>2</sub>-10%G-8%PEO-2%NpBV tras inmersión en SBF durante 14 días con magnificación de 1000× (a) e in situ sobre una esfera de hidroxiapatita (b).

#### 4.3.9. Ensayos de viabilidad celular y diferenciación osteogénica

Se realizaron cultivos celulares para determinar la viabilidad de las células madres del tejido de la pulpa dental (hDPSC) al exponerse a los medios condicionados por las membranas obtenidas desde los precursores 80 %SiO<sub>2</sub>-10 %G-10 %PEO (m1), 80 %SiO<sub>2</sub>-5 %G-14 %PEO-1 %NpBV (m2), 80 %SiO<sub>2</sub>-7 %G-12 %PEO-1 %NpBV (m3) y 80 %SiO<sub>2</sub>-10 %G-8 %PEO-2 %NpBV (m4), para medir la actividad MTS. Las células viables, es decir con actividad mitocondrial activa, serán capaces de reducir el tetrazolio para convertirlo en colorante de formazán soluble en el medio de cultivo. Además, se midió la actividad de la enzima fosfatasa alcalina (ALP) de las hDPSC. Esta se cuantificó

midiendo la desfosforilación del reactivo de fosfato de p-nitrofenilo a 37 °C durante 2 h en una atmósfera de aire humidificado que contenía 5 % de CO<sub>2</sub>.

#### **4.3.9.1. Viabilidad celular**

La Figura 4.45 muestra los resultados de viabilidad celular para todas las membranas y el control. Los resultados sugirieron que las membranas no son tóxicas para las hDPSC. Después de 7 días, m1, m2 y m4 mostraron diferencia estadísticamente significativa con el control. Después de 14 días, m1 y m4 mostraron diferencia estadísticamente significativa con el control ( $p < 0.05$ ). Los resultados contrastan con los obtenidos anteriormente en la Sección 4.1.6, en donde no se obtuvo diferencias. Los resultados luego de 14 días pueden atribuirse al mayor porcentaje en peso de G (10 %) en la composición de las membranas obtenidas desde los precursores 80 %SiO<sub>2</sub>-10 %G-10 %PEO (m1) y 80 %SiO<sub>2</sub>-10 %G-8 %PEO-2 %NpBV (m4).

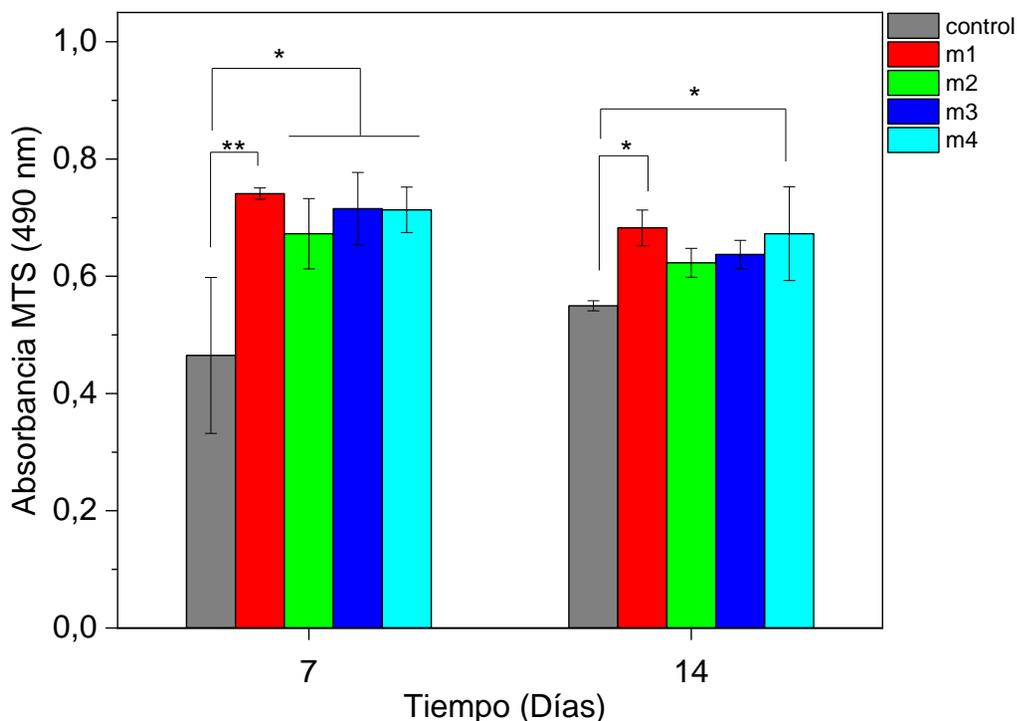


Figura 4.45: Gráfico representativo de la viabilidad celular a los 7 y 14 días mediante ensayo MTS, de las células cultivadas en las membranas obtenidas desde los precursores 80%SiO<sub>2</sub>-10%G-10%PEO (m1), 80%SiO<sub>2</sub>-5%G-14%PEO-1%NpBV (m2), 80%SiO<sub>2</sub>-7%G-12%PEO-1%NpBV (m3) y 80%SiO<sub>2</sub>-10%G-8%PEO-2%NpBV (m4). Las barras representan la absorbancia medida a una longitud de onda de 490 nm. Diferencia estadísticamente significativa entre los grupos experimentales con el control (\*p<0.05 y \*\*p<0.01).

#### 4.3.10. Diferenciación osteogénica

La Figura 4.46 muestra los resultados de la actividad enzimática ALP de las células cultivadas a los 14 días de incubación. A diferencia de los resultados obtenidos en la Sección 4.1.6, se obtuvo diferencias estadísticamente significativas entre la membrana m4, con el control y las otras membranas. Se puede observar que las células cultivadas en la membrana obtenida desde el precursor 80%SiO<sub>2</sub>-10%G-8%PEO-2%NpBV (m4), presentaron una actividad ALP significativamente mayor en comparación con las células cultivadas en las membranas m1, m2 y m3 (p<0.01) y el control (p<0.05). Esto sugiere

que m4 induce la diferenciación osteogénica, probablemente debido a que su precursor contiene el doble de concentración en peso de NpBV (2%), en comparación con m2 y m3 que solo tienen un 1%. En otros estudios (Tabla 4.12) se suele utilizar porcentajes más elevados de NpBV en la fabricación de andamios o membranas, sobre el 4% con diámetro promedio entre 100 a 200 nm [252], las dimensiones de las nanopartículas elaboradas en este estudio tienen un diámetro promedio de aproximadamente 65 nm y quedaron dispersadas en la superficie de las fibras de las membranas, lo que puede atribuirles mayor reactividad producto de su mayor área superficial, produciendo la posterior liberación de los iones  $Ca^{2+}$  y  $PO_4^{3-}$  desde las NpBV promoviendo la diferenciación celular a osteoblastos. Es por esto que m4 posee una diferenciación osteogénica significativamente mayor al control ( $p < 0.05$ ) y a m1, m2 y m3 ( $p < 0.01$ ), corroborado por la producción de fosfatasa alcalina.

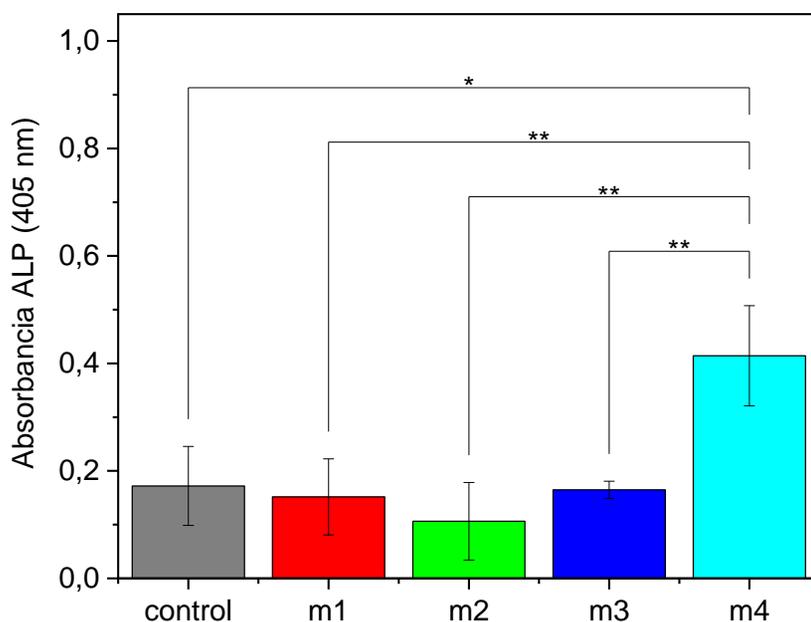


Figura 4.46: Gráfico representativo de la actividad de fosfatasa alcalina en ausencia de medio osteogénico de las células cultivadas en membranas obtenidas desde los precursores 80%SiO<sub>2</sub>-10%G-10%PEO (m1), 80%SiO<sub>2</sub>-5%G-14%PEO-1%NpBV (m2), 80%SiO<sub>2</sub>-7%G-12%PEO-1%NpBV (m3) y 80%SiO<sub>2</sub>-10%G-8%PEO-2%NpBV (m4). Las barras representan la absorbancia medida a una longitud de onda de 405 nm después de 14 días de incubación. Diferencia estadísticamente significativa entre los grupos experimentales con el control (\* $p < 0.05$  y \*\* $p < 0.01$ ).

La tabla 4.12 muestra materiales y porcentaje en peso de nanopartículas de vidrio bioactivo empleado para promover la diferenciación osteogénica en materiales tipo andamio y membrana.

Materiales	Tipo de material	Nanopartículas de vidrio bioactivo (% en peso)	Tamaño promedio de partícula (nm)	Referencias
Vidrio bioactivo/alginato	Andamio	25-35	70	[196]
Vidrio bioactivo	Nanopartícula	100	500	[252]
Gelatina/vidrio bioactivo	Membrana	0	—	[253]
Gelatina metacrilatada/biovidrio	Andamio	20	139	[254]
Vidrio bioactivo/gelatina	Andamio	0	—	[255]
80 %SiO <sub>2</sub> -10 %G-8 %PEO-2 %NpBV	Membrana	2	65	Este estudio

Tabla 4.12: Tabla de materiales y porcentaje en peso de nanopartículas de vidrio bioactivo empleado para promover la diferenciación osteogénica.

El material final obtenido en esta investigación tiene una baja concentración de NpBV en comparación con otras investigaciones, como las presentadas en la Tabla 4.12. Esta muestra la comparación del material 80 %SiO<sub>2</sub>-10 %G-8 %PEO-2 %NpBV (m4) de este estudio con materiales similares de otras investigaciones.

El uso de nanopartículas de vidrio bioactivo terciarias por sí solas en diferenciación osteogénica ha sido estudiado en otras investigaciones (Tabla 4.13), demostrando que células madres del tejido de la pulpa dental humana se diferencian en un linaje osteogénico en presencia de estas *in vitro* e *in vivo* [256] [257]. La membrana m4 de esta investigación promueve la diferenciación osteogénica. Debido probablemente al

hecho de que son más amorfas y con diámetro menor a las reportadas en la literatura, volviéndolas más reactivas debido al intercambio de iones que se produce al exponer el material a medios de cultivo [258] [259] [260]. Otra razón puede atribuirse a que las nanopartículas bioactivas se encuentran bien dispersas a nivel de la superficie, corroborado anteriormente en la Sección 4.3.4 por las imágenes FESEM.

Materiales	Técnica	Medio osteogénico	Diferenciación	Referencias
Híbrido de gelatina/vidrio bioactivo	Swelling y liofilizado	Si	Si	[261]
Híbrido de biovidrio/colágeno I	Mezcla y liofilizado	Si	Si	[262]
Híbrido de gelatina/vidrio bioactivo	Electrospinning	No	Si	[253]
Híbrido de sílica/gelatina	Blow spinning	No	No	[197]
Nanopartículas de vidrio bioactivo	Sol-gel y precipitación	No	Si	[196]
80 %SiO <sub>2</sub> -10 %G-8 %PEO-2 %NpBV	Electrospinning	No	Si	Este estudio

Tabla 4.13: Tabla comparativa de distintos materiales, técnica de obtención, medios suplementados y diferenciación osteogénica.

# Capítulo 5

## Conclusiones

De acuerdo con los objetivos específicos planteados en esta tesis, se llevo a cabo la fabricación y caracterización de membranas híbridas de sílice ( $\text{SiO}_2$ ), gelatina bovina (G) y óxido de polietileno (PEO) a distintas proporciones (90 % $\text{SiO}_2$ -10 %PEO, 85 % $\text{SiO}_2$ -5 %G-10 %PEO, 80 % $\text{SiO}_2$ -10 %G-10 %PEO, 70 % $\text{SiO}_2$ -10 %G-10 %PEO y 68 % $\text{SiO}_2$ -25 %G-7 %PEO). Se logró identificar y semi-cuantificar la presencia superficial de gelatina en las membranas mediante espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR) en modo reflectancia total atenuada. Además, se realizó la síntesis y la caracterización de nanopartículas de biovidrio terciario (NpBV). Los materiales desarrollados fueron caracterizados mediante la utilización de diversas técnicas analíticas, tales como: difracción de rayos X de polvo (DRX), análisis termogravimétrico (TGA), microscopia electrónica de barrido con emisión de campo (FESEM) y microscopía electrónica de transmisión (TEM).

La caracterización morfológica realizada mediante FESEM y TEM reveló, respectivamente, que las fibras híbridas obtenidas mediante la técnica de electrospinning presentan una distribución de tamaños de diámetro promedio en el rango de los 400 a 700 nm y que la distribución de tamaños de diámetro de las NpBV se encuentra en el rango de los 50 a 100 nm. Además, mediante FESEM, se logró corroborar la incorporación exitosa de las NpBV a nivel de la superficie de las fibras híbridas obtenidas desde los precursores 80 % $\text{SiO}_2$ -5 %GB-14 %PEO-1 %NpBV, 80 % $\text{SiO}_2$ -7 %GB-12 %PEO-1 %NpBV y 80 % $\text{SiO}_2$ -10 %GB-8 %PEO-2 %NpBV. La incorporación de las NpBV en las fibras permi-

tió la formación de hidroxiapatita.

Se realizaron mediciones de ángulo de contacto y se midió la porosidad efectiva, a partir de estos resultados se realizó un estudio estadístico de la covarianza entre la variable de respuesta ángulo de contacto y las variables explicativas porosidad efectiva y composición de los materiales de las membranas, por separados y la combinación de estos, encontrando una relación inversamente proporcional entre la porosidad y el ángulo de contacto. Además, que el valor de ángulo de contacto disminuye conforme aumenta la cantidad de G y por ende disminuye la cantidad de SiO<sub>2</sub>. Es decir, en los valores de ángulo de contacto existe una influencia geométrica característica de una superficie porosa y además en la composición de los materiales, debido probablemente a la alta hidrofiliidad de G.

Se realizaron cultivos celulares para determinar la viabilidad de células madres de tejido de pulpa dental (hDPSC) al exponerse a los medios condicionados de los distintos tipos de membrana, en donde las células se vieron estimuladas en su crecimiento debido a las membranas, presentando buena citocompatibilidad. Además, se midió la actividad de la enzima fosfatasa alcalina (ALP) como un parámetro para conocer la diferenciación osteogénica inducida por las diferentes membranas en las células, en donde se obtuvo que la membrana formulada desde el precursor 80 %SiO<sub>2</sub>-10 %GB-8 %PEO-2 %NpBV es la que induce mayores niveles de diferenciación celular en comparación con el control y las otras membranas. Es decir el material tiene la capacidad de diferenciación sobre las células sin suplementos osteogénicos.

En conclusión se fundamenta la hipótesis de esta investigación, debido a que se logró obtener un material tipo membrana que induce una respuesta osteogénica *in vitro*, que requiere una cantidad considerablemente menor de nanopartículas de vidrio bioactivo en comparación con materiales de otras investigaciones. El material híbrido elaborado se degrada en un 100 % y las nanopartículas por si solas también, por lo que infiere que la membrana híbrida que contiene NpBV también.

## 5.1. Resultados de la investigación

Como parte del desarrollo de la presente tesis doctoral se generaron las siguientes presentaciones en eventos y publicación de los resultados.

Titulo	Lugar de presentación	Modalidad
Membranas híbridas de biovidrio y gelatina bovina fabricadas mediante electrospinning para regeneración ósea guiada.	VI Simposio de materiales poliméricos. ASTINSENA, Colombia del 23 al 27 de noviembre de 2020.	Oral
Membranas híbridas de biovidrio y gelatina bovina, obtenidas mediante electrohilado para aplicación en regeneración ósea guiada.	VI CONGRESO NACIONAL DE NANOTECNOLOGÍA. Chile del 23 al 26 de noviembre de 2021.	Póster
Fabricación de membranas híbridas compuestas por biovidrio, gelatina bovina, óxido de polietileno y nanopartículas de biovidrio terciario mediante electrospinning para aplicación en regeneración ósea guiada.	II Congreso Nacional de Ingeniería de Tejidos y Medicina Regenerativa. Chile 7 de diciembre de 2021.	Oral
Fabricación de membranas híbridas compuestas por biovidrio, gelatina bovina, óxido de polietileno y nanopartículas de biovidrio terciario mediante electrospinning para aplicación en regeneración ósea guiada.	I Congreso de Postgrado de la Facultad de Ciencias Físicas y Matemáticas del 10 al 12 de agosto de 2022, Chile.	Póster

Tabla 5.1: Desarrollo de actividades de difusión (presentaciones a congresos, charlas, seminarios, entre otros) durante el transcurso del doctorado.

Titulo	Autores	Revista
Electrospun tertiary bioactive glass nanoparticles-containing silica/gelatin/polyethylene oxide hybrid membranes for potential dental bone tissue engineering applications	Daniela Acuña, Nicolás Cohn, Franck Quero	Materials Letters

Tabla 5.2: Artículo publicado.

## 5.2. Trabajos futuros

Considerando el alcance de esta tesis doctoral, se plantean los siguientes trabajos futuros a partir de los resultados y análisis desarrollados:

- Realizar pruebas en biorreactor para aportar mayor evidencia del potencial del material elaborado.
- Realizar pruebas *in vivo*.
- Evaluar las propiedades mecánicas de las membranas mediante ensayos de tracción e indentación.
- Mejorar las propiedades mecánicas de las membranas.
- Evaluar el desempeño de la membrana como superficie limite con materiales de relleno.

# Bibliografía

- [1] Cecilia Espinosa Cortés. Periodista y Directora de Comunicaciones de la Facultad de Odontología. Los Desafíos de enseñar odontología en pandemia - Universidad de Chile. Disponible en: <https://portaluchile.uchile.cl/noticias/178798/los-desafios-de-ensenar-odontologia-en-pandemia> [Fecha de consulta: 6 de Febrero 2023].
- [2] Subsecretaría de Salud Pública División de Prevención Y Control de Enfermedades Departamento de Salud Bucal. Plan Nacional de Salud Bucal 2018-2030, 16. Disponible en: [https://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=5&cad=rja&uact=8&ved=2ahUKEwiU15m3rvHjAhUxC9QKHU\\_oAMsQFjAEegQIABAC&url=https%3A%2F%2Fwww.minsal.cl%2Fwp-content%2Fuploads%2F2017%2F12%2FPlan-Nacional-Salud-Bucal-2018-2030-Consulta-P%25C3%25BAblica-20\\_12\\_2017.pdf&usg=AOvVaw1dfBu2V0GUsAj1wpp\\_WzV6](https://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=5&cad=rja&uact=8&ved=2ahUKEwiU15m3rvHjAhUxC9QKHU_oAMsQFjAEegQIABAC&url=https%3A%2F%2Fwww.minsal.cl%2Fwp-content%2Fuploads%2F2017%2F12%2FPlan-Nacional-Salud-Bucal-2018-2030-Consulta-P%25C3%25BAblica-20_12_2017.pdf&usg=AOvVaw1dfBu2V0GUsAj1wpp_WzV6) [Fecha de consulta: 7 de Agosto 2019].
- [3] Ministerio de Salud. Resultados encuesta calidad de vida y salud, 2015-2016, 13. Disponible en: [http://epi.minsal.cl/wp-content/uploads/2017/06/Resultados\\_Abril2017\\_ENCAVI\\_2015-16\\_Depto\\_Epidemiolog%C3%ADa\\_MINSAL.pdf](http://epi.minsal.cl/wp-content/uploads/2017/06/Resultados_Abril2017_ENCAVI_2015-16_Depto_Epidemiolog%C3%ADa_MINSAL.pdf) [Fecha de consulta: 7 de Agosto 2019].
- [4] Attia, S., Wiltfang, J., Streckbein, P., Wilbrand, J., El Khassawna, T., & Mausbach, K. et al. (2019). Functional and aesthetic treatment outcomes after immediate jaw reconstruction using a fibula flap and dental implants. *Journal Of Cranio-Maxillofacial Surgery*, 47(5), pp. 786-791. doi: 10.1016/j.jcms.2018.12.017

- [5] Simon, B., Hagen, S., Deasy, M., Faldu, M., & Resnansky, D. (2000). Changes in Alveolar Bone Height and Width Following Ridge Augmentation Using Bone Graft and Membranes. *Journal Of Periodontology*, 71(11), pp. 1774-1791. doi: 10.1902/jop.2000.71.11.1774
- [6] Das, R., & Bhattacharjee, C. (2019). Titanium-based nanocomposite materials for dental implant systems. *Applications Of Nanocomposite Materials In Dentistry*, pp. 271-284. doi: 10.1016/b978-0-12-813742-0.00016-x
- [7] Hetrick, E., & Schoenfisch, M. (2006). Reducing implant-related infections: active release strategies. *Chemical Society Reviews*, 35(9), 780. doi: 10.1039/b515219b
- [8] Zhao, L., Chu, P., Zhang, Y., & Wu, Z. (2009). Antibacterial coatings on titanium implants. *Journal Of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, 91B(1), pp. 470-480. doi: 10.1002/jbm.b.31463
- [9] Cillo, J., & Barbosa, N. (2019). Adalimumab-Related Dental Implant Infection. *Journal Of Oral And Maxillofacial Surgery*, 77(6), pp. 1165-1169. doi: 10.1016/j.joms.2019.01.033
- [10] Cardaropoli, D., Tamagnone, L., Roffredo, A., & Gaveglio, L. (2015). Soft Tissue Contour Changes at Immediate Postextraction Single-Tooth Implants with Immediate Restoration: A 12-Month Prospective Cohort Study. *The International Journal Of Periodontics And Restorative Dentistry*, 35(2), pp. 191-198. doi: 10.11607/prd.2326
- [11] Julia Baffa. (2019). Elevación del Seno Maxilar. [online] Disponible en: <http://www.juliabaffa.com/elevacion-del-seno-maxilar/> [Fecha de consulta: 19 de Diciembre 2019].
- [12] Fugazzotto, P. (2005). Treatment Options Following Single-Rooted Tooth Removal: A Literature Review and Proposed Hierarchy of Treatment Selection. *Journal Of Periodontology*, 76(5), pp. 821-831. doi: 10.1902/jop.2005.76.5.821
- [13] Peñarrocha-Diago, M., Aloy-Prósper, A., Peñarrocha-Oltra, D., Guirado, J., & Peñarrocha-Diago, M. (2013). Localized Lateral Alveolar Ridge Augmentation with

Block Bone Grafts: Simultaneous Versus Delayed Implant Placement: A Clinical and Radiographic Retrospective Study. *The International Journal Of Oral & Maxillofacial Implants*, 28(3), pp. 846-853. doi: 10.11607/jomi.2964

- [14] Suarez, D. (2012). PRINCIPIOS BÁSICOS EN REGENERACIÓN ÓSEA GUIADA. *ACTA BIOCLÍNICA*, [online] 2, pp.89-116. Disponible en: [https://www.researchgate.net/publication/312029159\\_PRINCIPIOS\\_BASICOS\\_EN\\_REGENERACION\\_OSEA\\_GUIADA](https://www.researchgate.net/publication/312029159_PRINCIPIOS_BASICOS_EN_REGENERACION_OSEA_GUIADA) [Fecha de consulta: 19 de Diciembre 2019].
- [15] Krishnan, V., & Lakshmi, T. (2013). Bioglass: A novel biocompatible innovation. *Journal Of Advanced Pharmaceutical Technology & Research*, 4(2), 78. doi: 10.4103/2231-4040.111523
- [16] Jones, J. (2015). Review of bioactive glass: From Hench to hybrids. *Acta Biomaterialia*, 9(1), pp. 4457-4486. doi: 10.1016/j.actbio.2012.08.023
- [17] Schwarz, F., Rothamel, D., Herten, M., Wüstefeld, M., Sager, M., Ferrari, D., & Becker, J. (2008). Immunohistochemical characterization of guided bone regeneration at a dehiscence-type defect using different barrier membranes: An experimental study in dogs. *Clinical Oral Implants Research*, 19(4), 402-415. doi:10.1111/j.1600-0501.2007.01486.x
- [18] Sela, M. N., Kohavi, D., Krausz, E., Steinberg, D., & Rosen, G. (2003). Enzymatic degradation of collagen-guided tissue regeneration membranes by periodontal bacteria. *Clinical Oral Implants Research*, 14(3), 263-268. doi:10.1034/j.1600-0501.2003.140302.x
- [19] Gorrasi, G., & Pantani, R. (2017). Hydrolysis and biodegradation of poly(lactic acid). *Synthesis, Structure and Properties of Poly(lactic Acid)*, 119-151. doi:10.1007/12\_2016\_12
- [20] Nappe, C., & Baltodano, C. (2013). Regeneración ósea guiada para el aumento vertical del reborde alveolar.

- [21] Acevedo, C., Olgúin, Y., Briceño, M., Forero, J., Osses, N., & Díaz-Calderón, P. et al. (2019). Design of a biodegradable UV-irradiated gelatin-chitosan/nanocomposed membrane with osteogenic ability for application in bone regeneration. *Materials Science And Engineering: C*, 99, pp. 875-886. doi: 10.1016/j.msec.2019.01.135
- [22] CYTOPLAST RTM COLLAGEN Membrana Reabsorbible. (2022). Disponible en : <http://salugraftdental.com/productos/cytoplast-rtm-collagen-membrana-reabsorbible-reabsorcion-media-4-6-meses/> [Fecha de consulta: 27 de Septiembre 2022].
- [23] Greenhalgh, R., Ambler, W., Quinn, S., Medeiros, E., Anderson, M., & Gore, B. et al. (2017). Hybrid sol–gel inorganic/gelatin porous fibres via solution blow spinning. *Journal Of Materials Science*, 52(15), pp. 9066-9081. doi: 10.1007/s10853-017-0868-1
- [24] Poologasundarampillai, G., Wang, D., Li, S., Nakamura, J., Bradley, R., & Lee, P. et al. (2014). Cotton-wool-like bioactive glasses for bone regeneration. *Acta Biomaterialia*, 10(8), pp. 3733-3746. doi: 10.1016/j.actbio.2014.05.020
- [25] Zhu, N., & Che, X. (2013). Biofabrication of Tissue Scaffolds. *Advances in Biomaterials Science and Biomedical Applications*. doi:10.5772/54125
- [26] Electrospinning. (2015). *Polymer Chemistry Series*. doi: 10.1039/9781849735575
- [27] Barrientos, G., Sarmiento, P., & Galligani, P. (2016). Evaluación de la diagénesis ósea Mediante el uso de microscopía Electrónica de barrido (MEB): Aproximaciones Analíticas aplicables a Muestras Arqueológicas. *Revista Argentina De Antropología Biológica*, 18(2). doi:10.17139/raab.2016.0018.02.03
- [28] Feng, X. (2009). Chemical and biochemical basis of cell-bone matrix interaction in health and disease. *Current Chemical Biology*, 3(2), 189-196. doi:10.2174/187231309788166398
- [29] Tampieri, A., Celotti, G., Landi, E., Sandri, M., Roveri, N., & Falini, G. (2003). Biologically inspired synthesis of bone-like composite: Self-assembled collagen fi-

bers/hydroxyapatite nanocrystals. *Journal of Biomedical Materials Research*, 67A(2), 618-625. doi:10.1002/jbm.a.10039

- [30] Behari, J. (2009). *Biophysical bone behavior: Principles and applications*, Singapore: John Wiley & SonS.
- [31] D. Lacroix y J. A. Planell, (2009). *Biomaterials: Processing, Characterization, and Applications*. Biomedical Materials. New York. Springer. pp. 123-154.
- [32] Sadat-Shojai, M., Khorasani, M., Dinpanah-Khoshdargi, E., & Jamshidi, A. (2013). Synthesis methods for nanosized hydroxyapatite with diverse structures. *Acta Biomaterialia*, 9(8), 7591-7621. doi: 10.1016/j.actbio.2013.04.012
- [33] Dominici, M., Pritchard, C., Garlits, J. E., Hofmann, T. J., Persons, D. A., & Horwitz, E. M. (2004). Hematopoietic cells and osteoblasts are derived from a common marrow progenitor after bone marrow transplantation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(32), 11761-11766. doi:10.1073/pnas.0404626101
- [34] Lemaire, T., Capiez-Lernout, E., Kaiser, J., Naili, S., & Sansalone, V. (2011). What is the importance of multiphysical phenomena in bone remodelling signals expression? A multiscale perspective. *Journal Of The Mechanical Behavior Of Biomedical Materials*, 4(6), pp. 909-920. doi: 10.1016/j.jmbbm.2011.03.007
- [35] HADJIDAKIS, D. J., & ANDROULAKIS, I. I. (2006). Bone Remodeling. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1092(1), 385-396. doi:10.1196/annals.1365.035
- [36] Fu, Q., Saiz, E., Rahaman, M., & Tomsia, A. (2011). Bioactive glass scaffolds for bone tissue engineering: state of the art and future perspectives. *Materials Science And Engineering: C*, 31(7), 1245-1256. doi: 10.1016/j.msec.2011.04.022
- [37] Craven, C., Cole, P., Hollier, L., & Stal, S. (2007). Ensuring success in alveolar bone grafting. *Journal of Craniofacial Surgery*, 18(4), 855-859. doi:10.1097/scs.0b013e31806849fa
- [38] Ortman, H. R. (1962). Factors of bone resorption of the residual ridge. *The Journal of Prosthetic Dentistry*, 12(3), 429-440. doi:10.1016/0022-3913(62)90124-5

- [39] HAMMARSTRÖM, L., & LINDSKOG, S. (1985). General morphological aspects of resorption of teeth and alveolar bone. *International Endodontic Journal*, 18(2), pp. 93-108. doi: 10.1111/j.1365-2591.1985.tb00426.x
- [40] Carter, D., Van der Meulen, M., & Beaupré, G. (1996). Mechanical factors in bone growth and development. *Bone*, 18(1). doi:10.1016/8756-3282(95)00373-8
- [41] Ellis, E., & James Gallo, W. (1986). Relapse following mandibular advancement with dental plus skeletal maxillomandibular fixation. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, 44(7), 509-515. doi:10.1016/s0278-2391(86)80090-8
- [42] Rees, J., & Jacobsen, P. (1997). Elastic modulus of the periodontal ligament. *Biomaterials*, 18(14), 995-999. doi:10.1016/s0142-9612(97)00021-5
- [43] Hill, E. E. (2007). Dental cements for definitive luting: A review and practical clinical considerations. *Dental Clinics of North America*, 51(3), 643-658. doi:10.1016/j.cden.2007.04.002
- [44] ENFERMEDAD PERIODONTAL EXPLICADA PARA LA FARMACIA. (2019). Disponible en: <https://www.saludbucaldentaid.com/es/enfermedad-periodontal-explicada-para-la-farmacia/489> [Fecha de consulta: 24 de Diciembre 2019].
- [45] Meyer, U. (2009). The History of Tissue Engineering and Regenerative Medicine in Perspective. *Fundamentals Of Tissue Engineering And Regenerative Medicine*, pp. 5-12. doi: 10.1007/978-3-540-77755-7\_1
- [46] Lyles, M., Hu, J., Varanasi, V., Hollinger, J., & Athanasiou, K. (2015). Bone tissue engineering. *Regenerative Engineering Of Musculoskeletal Tissues And Interfaces*, pp. 97-134. doi: 10.1016/b978-1-78242-301-0.00005-7
- [47] Tang, X., Thankappan, S., Lee, P., Fard, S., Harmon, M., Tran, K., & Yu, X. (2014). Polymeric Biomaterials in Tissue Engineering and Regenerative Medicine. *Natural And Synthetic Biomedical Polymers*, pp. 351-371. doi: 10.1016/b978-0-12-396983-5.00022-3

- [48] Langer, R., & Vacanti, J. (1993). Tissue engineering. *Science*, 260(5110), pp. 920-926. doi: 10.1126/science.8493529
- [49] Laurencin, C., Ambrosio, A., Borden, M., & Cooper, J. (1999). Tissue Engineering: Orthopedic Applications. *Annual Review Of Biomedical Engineering*, 1(1), pp. 19-46. doi: 10.1146/annurev.bioeng.1.1.19
- [50] Wu, X., Walsh, K., Hoff, B. L., & Camci-Unal, G. (2020). Mineralization of biomaterials for bone tissue engineering. *Bioengineering*, 7(4), 132. doi:10.3390/bioengineering7040132
- [51] Blokhuis, T. (2014). Bioresorbable bone graft substitutes. *Bone Substitute Biomaterials*, pp. 80-92. doi: 10.1533/9780857099037.1.80
- [52] Blokhuis, T., & Arts, J. C. (2011). Bioactive and osteoinductive bone graft substitutes: Definitions, facts and Myths. *Injury*, 42. doi:10.1016/j.injury.2011.06.010
- [53] Balint, R., Cassidy, N., & Cartmell, S. (2013). Electrical Stimulation: A Novel Tool for Tissue Engineering. *Tissue Engineering Part B: Reviews*, 19(1), pp. 48-57. doi: 10.1089/ten.teb.2012.0183
- [54] Schwiedrzik, J., Taylor, A., Casari, D., Wolfram, U., Zysset, P., & Michler, J. (2017). Nanoscale deformation mechanisms and yield properties of hydrated bone extracellular matrix. *Acta Biomaterialia*, 60, 302-314. doi:10.1016/j.actbio.2017.07.030
- [55] Bramfeld, H., Sabra, G., Centis, V., & Vermette, P. (2010). Scaffold Vascularization: A Challenge for Three-Dimensional Tissue Engineering. *Current Medicinal Chemistry*, 17(33), pp. 3944-3967. doi: 10.2174/092986710793205327
- [56] Baird, A., Dominguez Falcon, N., Saeed, A., & Guest, D. (2019). Biocompatible Three-Dimensional Printed Thermoplastic Scaffold for Osteoblast Differentiation of Equine Induced Pluripotent Stem Cells. *Tissue Engineering Part C: Methods*, 25(5), pp. 253-261. doi: 10.1089/ten.tec.2018.0343

- [57] Janmey, P. A., & McCulloch, C. A. (2007). Cell mechanics: Integrating cell responses to mechanical stimuli. *Annual Review of Biomedical Engineering*, 9(1), 1-34. doi:10.1146/annurev.bioeng.9.060906.151927
- [58] Deng, M., James, R., Laurencin, C., & Kumbar, S. (2012). Nanostructured Polymeric Scaffolds for Orthopaedic Regenerative Engineering. *IEEE Transactions On Nanobioscience*, 11(1), pp. 3-14. doi: 10.1109/tnb.2011.2179554
- [59] Govoni, M., Vivarelli, L., Mazzotta, A., Stagni, C., Maso, A., & Dallari, D. (2021). Commercial bone grafts claimed as an alternative to autografts: Current trends for Clinical Applications in Orthopaedics. *Materials*, 14(12), 3290. doi:10.3390/ma14123290
- [60] Ding, G., Zhu, Y., Qi, C., Sun, T., Wu, J., & Chen, F. (2015). Yolk-shell porous microspheres of calcium phosphate prepared by using calcium-lactate and adenosine 5'-triphosphate disodium salt: Application in protein/drug delivery. *Chemistry - A European Journal*, 21(27), 9868-9876. doi:10.1002/chem.201406547
- [61] Umair, M., Zhang, Y., Iqbal, K., Zhang, S., & Tang, B. (2019). Novel strategies and supporting materials applied to shape-stabilize organic phase change materials for thermal energy storage—A review. *Applied Energy*, 235, pp. 846-873. doi: 10.1016/j.apenergy.2018.11.017
- [62] Shi, L., Ding, P., Wang, Y., Zhang, Y., Ossipov, D., & Hilborn, J. (2019). Self-Healing Polymeric Hydrogel Formed by Metal–Ligand Coordination Assembly: Design, Fabrication, and Biomedical Applications. *Macromolecular Rapid Communications*, 40(7), 1800837. doi: 10.1002/marc.201800837
- [63] Dahlin, C., & Johansson, A. (2010). Iliac crest autogenous bone graft versus alloplastic graft and guided bone regeneration in the reconstruction of atrophic maxillae: A 5-year retrospective study on cost-effectiveness and clinical outcome. *Clinical Implant Dentistry and Related Research*, 13(4), 305-310. doi:10.1111/j.1708-8208.2009.00221.x

- [64] Helsen, J. and Missirlis, Y. (2010). *Biomaterials*. pp.1-4. doi:10.1007/978-3-642-12532-4
- [65] Navarro, M., Michiardi, A., Castaño, O., & Planell, J. (2008). Biomaterials in orthopaedics. *Journal of The Royal Society Interface*, 5(27), 1137-1158. doi:10.1098/rsif.2008.0151
- [66] Yu, X., Tang, X., Gohil, S. V., & Laurencin, C. T. (2015). Biomaterials for bone regenerative engineering. *Advanced Healthcare Materials*, 4(9), 1268-1285. doi:10.1002/adhm.201400760
- [67] Sola, A., Bellucci, D., Cannillo, V., & Cattini, A. (2011). Bioactive glass coatings: A Review. *Surface Engineering*, 27(8), 560-572. doi:10.1179/1743294410y.0000000008
- [68] Hench, L. L., & Polak, J. M. (2002). Third-generation biomedical materials. *Science*, 295(5557), 1014-1017. doi:10.1126/science.1067404
- [69] Ruhle, M. (2002). European white book on fundamental research in materials science. Stuttgart: Max-Planck-Institut für Metallforschung, pp. 72-76.
- [70] Williams, D. (2006). *Biofunctionality and biocompatibility*. Materials Science and Technology, New York, Wiley-VCH.
- [71] Mülhaupt, R. (2004). Hermann Staudinger and the origin of Macromolecular Chemistry. *Angewandte Chemie International Edition*, 43(9), 1054-1063. doi:10.1002/anie.200330070
- [72] Srichana, T., & Domb A. (2009) «Polymeric Biomaterials,» de *Biomedical Materials*, New York, Springer, pp. 83-119.
- [73] Biswal, T., BadJena, S. K., & Pradhan, D. (2020). Sustainable biomaterials and their applications: A short review. *Materials Today: Proceedings*, 30, 274-282. doi:10.1016/j.matpr.2020.01.437
- [74] *Bone Substitute Biomaterials*. (2014). doi: 10.1016/c2013-0-16287-3

- [75] Vroman, I., & Tighzert, L. (2009). Biodegradable polymers. *Materials*, 2(2), 307-344. doi:10.3390/ma2020307
- [76] Angelova, N., & Hunkeler, D. (1999). Rationalizing the design of polymeric biomaterials. *Trends in Biotechnology*, 17(10), 409-421. doi:10.1016/s0167-7799(99)01356-6
- [77] White, E., & Shors, E. C. (1986). Biomaterial aspects of intercore-200 porous hydroxyapatite. *Dental Clinics of North America*, 30(1), 49-67. doi:10.1016/s0011-8532(22)02094-8
- [78] Jain, P., El-Sayed, I., & El-Sayed, M. (2007). Au nanoparticles target cancer. *Nano Today*, 2(1), pp. 18-29. doi: 10.1016/s1748-0132(07)70016-6
- [79] Nouri, A., Hodgson, P., & Wen, C. (2010). Effect of process control agent on the porous structure and mechanical properties of a biomedical ti–sn–nb alloy produced by Powder Metallurgy. *Acta Biomaterialia*, 6(4), 1630-1639. doi:10.1016/j.actbio.2009.10.005
- [80] Al-Munajjed, A., & O'Brien, F. (2009). Influence of a novel calcium-phosphate coating on the mechanical properties of highly porous collagen scaffolds for bone repair. *Journal Of The Mechanical Behavior Of Biomedical Materials*, 2(2), pp. 138-146. doi: 10.1016/j.jmbbm.2008.05.001
- [81] Cunniffe, G., Dickson, G., Partap, S., Stanton, K., & O'Brien, F. (2010). Development and characterisation of a collagen nano-hydroxyapatite composite scaffold for bone tissue engineering. *Journal Of Materials Science: Materials In Medicine*, 21(8), pp. 2293-2298. doi: 10.1007/s10856-009-3964-1
- [82] Rezwan, K., Chen, Q., Blaker, J., & Boccaccini, A. (2006). Biodegradable and bioactive porous polymer/inorganic composite scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials*, 27(18), pp. 3413-3431. doi: 10.1016/j.biomaterials.2006.01.039
- [83] Gibson, L., Ashby, M., & Harley, B. (2010). *Cellular materials in nature and medicine*. Cambridge: Cambridge University Press.

- [84] Ratner, B. D., & Zhang, G. (2020). A history of biomaterials. *Biomaterials Science*, 21-34. doi:10.1016/b978-0-12-816137-1.00002-7
- [85] Marin, E., Boschetto, F., & Pezzotti, G. (2020). Biomaterials and biocompatibility: An historical overview. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 108(8), 1617-1633. doi:10.1002/jbm.a.36930
- [86] Gilardino, M. S., Chen, E., & Bartlett, S. P. (2009). Choice of internal rigid fixation materials in the treatment of facial fractures. *Craniofacial Trauma & Reconstruction*, 2(1), 49-60. doi:10.1055/s-0029-1202591
- [87] AUTIAN, J. (1975). Toxicological problems and untoward effects from plastic devices used in medical applications. *Essays in Toxicology*, 1-33. doi:10.1016/b978-0-12-107606-1.50007-0
- [88] Tian, B., & Liu, Y. (2020). Chitosan-based biomaterials: From Discovery to Food Application. *Polymers for Advanced Technologies*, 31(11), 2408-2421. doi:10.1002/pat.5010
- [89] Piña, M. (2019). Biomateriales. [online] Disponible en: <http://www.docenciatraumatologia.uc.cl/biomateriales> [Fecha de consulta: 26 de Diciembre 2019].
- [90] Recum, A. F., Shannon, C. E., Cannon, C. E., Long, K. J., Kooten, T. G., & Meyle, J. (1996). Surface roughness, porosity, and texture as modifiers of cellular adhesion. *Tissue Engineering*, 2(4), 241-253. doi:10.1089/ten.1996.2.241
- [91] Spangberg, L. (1973). Kinetic and quantitative evaluation of material cytotoxicity in vitro. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology*, 35(3), 389-401. doi:10.1016/0030-4220(73)90077-7
- [92] Quality : Medical Plastics Data Service. (2019). [online] Disponible en: [http://www.medicalplasticsindia.com/mpds/2010/july/qualit\\_1.htm](http://www.medicalplasticsindia.com/mpds/2010/july/qualit_1.htm) [Fecha de consulta: 26 de Diciembre 2019].

- [93] Hickey, R., & Pelling, A. (2019). Cellulose Biomaterials for Tissue Engineering. *Frontiers In Bioengineering And Biotechnology*, 7. doi: 10.3389/fbioe.2019.00045
- [94] Hajimiri, M., Shahverdi, S., Kamalinia, G., & Dinarvand, R. (2014). Growth factor conjugation: Strategies and applications. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 103(2), 819-838. doi:10.1002/jbm.a.35193
- [95] Lanyon, L. (1987). Functional strain in bone tissue as an objective, and controlling stimulus for adaptive bone remodelling. *Journal of Biomechanics*, 20(11-12), 1083-1093. doi:10.1016/0021-9290(87)90026-1
- [96] Colnot, C., Zhang, X., & Tate, M. L. (2012). Current insights on the regenerative potential of the periosteum: Molecular, Cellular, and endogenous engineering approaches. *Journal of Orthopaedic Research*, 30(12), 1869-1878. doi:10.1002/jor.22181
- [97] Paiva, K. B., & Granjeiro, J. M. (2014). Bone tissue remodeling and development: Focus on matrix metalloproteinase functions. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 561, 74-87. doi:10.1016/j.abb.2014.07.034
- [98] Chiquet, M., Gelman, L., Lutz, R., & Maier, S. (2009). From mechanotransduction to extracellular matrix gene expression in fibroblasts. *Biochimica Et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1793(5), 911-920. doi:10.1016/j.bbamcr.2009.01.012
- [99] Jones, D., Nolte, H., Scholübbbers, J., Turner, E., & Veltel, D. (1991). Biochemical signal transduction of mechanical strain in osteoblast-like cells. *Biomaterials*, 12(2), 101-110. doi:10.1016/0142-9612(91)90186-e
- [100] Thompson, W. R., Scott, A., Loghmani, M. T., Ward, S. R., & Warden, S. J. (2016). Understanding mechanobiology: Physical therapists as a force in Mechanotherapy and musculoskeletal regenerative rehabilitation. *Physical Therapy*, 96(4), 560-569. doi:10.2522/ptj.20150224

- [101] Vogler, E. A. (1998). Structure and reactivity of water at biomaterial surfaces. *Advances in Colloid and Interface Science*, 74(1-3), 69-117. doi:10.1016/s0001-8686(97)00040-7
- [102] Torres, F. G., Commeaux, S., & Troncoso, O. P. (2013). Starch-based biomaterials for wound-dressing applications. *Starch - Stärke*, 65(7-8), 543-551. doi:10.1002/star.201200259
- [103] Chang, R., & Overby, J. (2011). *General chemistry* (6th ed.). New York, NY: McGraw-Hill.
- [104] Chandler, D. (2005). Interfaces and the driving force of Hydrophobic Assembly. *Nature*, 437(7059), 640-647. doi:10.1038/nature04162
- [105] Némethy, G., & Scheraga, H. A. (1962). Structure of water and hydrophobic bonding in proteins. i. A model for the thermodynamic properties of liquid water. *The Journal of Chemical Physics*, 36(12), 3382-3400. doi:10.1063/1.1732472
- [106] Bailey, F. E., & Callard, R. W. (1959). Some properties of poly(ethylene oxide)1 in aqueous solution. *Journal of Applied Polymer Science*, 1(1), 56-62. doi:10.1002/app.1959.070010110
- [107] Has, C., & Pan, S. (2020). Vesicle Formation Mechanisms: An overview. *Journal of Liposome Research*, 31(1), 90-111. doi:10.1080/08982104.2020.1730401
- [108] Blokzijl, W., & Engberts, J. B. (1993). Hydrophobic effects. opinions and facts. *Angewandte Chemie International Edition in English*, 32(11), 1545-1579. doi:10.1002/anie.199315451
- [109] ResearchGate. (2015). [online] Disponible en: [https://www.researchgate.net/publication/319253334\\_Thermodynamic\\_Properties\\_of\\_Hydrophobic\\_Effect\\_in\\_Protein\\_Folding](https://www.researchgate.net/publication/319253334_Thermodynamic_Properties_of_Hydrophobic_Effect_in_Protein_Folding) [Fecha de consulta: 26 de Diciembre 2019].
- [110] Rose, G. D., & Wolfenden, R. (1993). Hydrogen bonding, hydrophobicity, packing, and protein folding. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure*, 22(1), 381-415. doi:10.1146/annurev.bb.22.060193.002121

- [111] Jiménez-Gallegos, R., Téllez-Jurado, L., Rodríguez-Lorenzo, L., & San Roman, J. (2011). Modulación del carácter hidrofílico e influencia sobre la biocompatibilidad de híbridos base poliuretano-siloxano. *Boletín De La Sociedad Española De Cerámica Y Vidrio*, 50(1), pp. 1-8. doi: 10.3989/cyv.012011
- [112] Dodd, L. R., & Theodorou, D. N. (1991). Analytical treatment of the volume and surface area of molecules formed by an arbitrary collection of unequal spheres intersected by planes. *Molecular Physics*, 72(6), 1313-1345. doi:10.1080/00268979100100941
- [113] Good, R. J. (1992). Contact angle, wetting, and adhesion: A critical review. *Journal of Adhesion Science and Technology*, 6(12), 1269-1302. doi:10.1163/156856192x00629
- [114] Innovation, A. (2019). ¿Qué es el ángulo de contacto? - atria Innovation. [online] Disponible en: <https://www.atriainnovation.com/en/what-contact-angle-is/> [Fecha de consulta: 29 de Diciembre 2019].
- [115] Navarro, M., Ginebra, M., Planell, J., Barrias, C., & Barbosa, M. (2005). In vitro degradation behavior of a novel bioresorbable composite material based on PLA and a soluble Cap Glass. *Acta Biomaterialia*, 1(4), 411-419. doi:10.1016/j.actbio.2005.03.004
- [116] Kaur, G., Pandey, O., Singh, K., Homa, D., Scott, B., & Pickrell, G. (2013). A review of bioactive glasses: Their structure, properties, fabrication and Apatite Formation. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 102(1), 254-274. doi:10.1002/jbm.a.34690
- [117] Berger, G., Gildenhaar, R., & Ploska, U. (1995). Rapid resorbable, glassy crystalline materials on the basis of calcium alkali orthophosphates. *Biomaterials*, 16(16), 1241-1248. doi:10.1016/0142-9612(95)98131-w

- [118] Xu, X., Jiang, L., Zhou, Z., Wu, X., & Wang, Y. (2012). Preparation and Properties of Electrospun Soy Protein Isolate/Polyethylene Oxide Nanofiber Membranes. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 4(8), 4331-4337. doi: 10.1021/am300991e
- [119] Thangavel, P., Ramachandran, B., Kannan, R., & Muthuvijayan, V. (2016). Biomimetic hydrogel loaded with silk and l-proline for tissue engineering and wound healing applications. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, 105(6), 1401-1408. doi:10.1002/jbm.b.33675
- [120] Zhou, H., & Lee, J. (2011). Nanoscale hydroxyapatite particles for bone tissue engineering. *Acta Biomaterialia*, 7(7), 2769-2781. doi: 10.1016/j.actbio.2011.03.019
- [121] Lee M, Chung N, Lee J. (2010). Membranes with through-thickness porosity prepared by unidirectional freezing. *Polymer*, 51(26), 6258–6267.
- [122] Bauer, T., Geesink, R., Zimmerman, R., & McMahon, J. (1991). Hydroxyapatite-coated femoral stems. Histological analysis of components retrieved at autopsy. *The Journal Of Bone & Joint Surgery*, 73(10), 1439-1452. doi: 10.2106/00004623-199173100-00001
- [123] Cazalbou, S., Combes, C., Eichert, D., Rey, C., & Glimcher, M. J. (2004). Poorly crystalline apatites: Evolution and maturation in vitro and in vivo. *Journal of Bone and Mineral Metabolism*, 22(4). doi:10.1007/s00774-004-0488-0
- [124] Meski, S., Ziani, S., Khireddine, H., Yataghane, F., & Ferguene, N. (2011). Elaboration of the hydroxyapatite with different precursors and application for the retention of the lead. *Water Science and Technology*, 63(10), 2087-2096. doi:10.2166/wst.2011.210
- [125] Sanosh, K., Chu, M., Balakrishnan, A., Kim, T., & Cho, S. (2009). Preparation and characterization of nano-hydroxyapatite powder using sol-gel technique. *Bulletin Of Materials Science*, 32(5), 465-470. doi: 10.1007/s12034-009-0069-x

- [126] Ginebra, M., Traykova, T., & Planell, J. (2006). Calcium phosphate cements as bone drug delivery systems: A review. *Journal Of Controlled Release*, 113(2), 102-110. doi: 10.1016/j.jconrel.2006.04.007
- [127] Bohner, M. (2000). Calcium orthophosphates in medicine: from ceramics to calcium phosphate cements. *Injury*, 31, D37-D47. doi: 10.1016/s0020-1383(00)80022-4
- [128] Barrère, F., Blitterswijk, C., & Groot, K. (2006). Bone regeneration: molecular and cellular interactions with calcium phosphate ceramics. *Int J Nanomedicine*, 1(3), pp. 317–332.
- [129] Kokubo, T. (1996). Formation of biologically active bone-like apatite on metals and polymers by a biomimetic process. *Thermochimica Acta*, 280-281, 479-490. doi: 10.1016/0040-6031(95)02784-x
- [130] Pellegrini, G., Francetti, L., Barbaro, B., & Del Fabbro, M. (2018). Novel surfaces and osseointegration in implant dentistry. *Journal of Investigative and Clinical Dentistry*, 9(4). doi:10.1111/jicd.12349
- [131] Yamada, K. (1997). Molecular interactions in cell adhesion complexes. *Current Opinion In Cell Biology*, 9(1), pp. 76-85. doi: 10.1016/s0955-0674(97)80155-x
- [132] *Introduction to Biomedical Engineering*. (2005). Elsevier Academic Press doi: 10.1016/b978-0-12-238662-6.x5000-9
- [133] Bronstein, M., Nappe, C., Villavicencio, J., Toro, H., & Guiñez, H. (2016). Preservación de alvéolos mediante fosfato tricálcico beta, con y sin membrana. *Clin. Periodoncia Implantol. Rehabil.*9. doi: 10.1016/j.piro.2016.05.005
- [134] Li, J., Yuan, H., Chandrakar, A., Moroni, L., & Habibovic, P. (2021). 3D porous ti6al4v-beta-tricalcium phosphate scaffolds directly fabricated by additive manufacturing. *Acta Biomaterialia*, 126, 496-510. doi:10.1016/j.actbio.2021.03.021
- [135] Baino, F., & Vitale-Brovarone, C. (2011). Three-dimensional glass-derived scaffolds for bone tissue engineering: Current trends and forecasts for the future. *Journal Of Biomedical Materials Research Part A*, 97A(4), 514-535. doi: 10.1002/jbm.a.33072

- [136] Baino, F., Novajra, G., & Vitale-Brovarone, C. (2015). Bioceramics and Scaffolds: A Winning Combination for Tissue Engineering. *Frontiers In Bioengineering And Biotechnology*, 3. doi: 10.3389/fbioe.2015.00202
- [137] Fernandes, H. R., Gaddam, A., Rebelo, A., Brazete, D., Stan, G. E., & Ferreira, J. M. (2018). Bioactive glasses and glass-ceramics for healthcare applications in bone regeneration and Tissue Engineering. *Materials*, 11(12), 2530. doi:10.3390/ma11122530
- [138] Hench, L., & West, J. (1990). The sol-gel process. *Chemical Reviews*, 90(1), pp. 33-72. doi: 10.1021/cr00099a003
- [139] Jones, J. (2015). Review of bioactive glass: From Hench to hybrids. *Acta Biomaterialia*, 9(1), pp. 4457-4486. doi: 10.1016/j.actbio.2012.08.023
- [140] Saravanapavan, P., Jones, J., Pryce, R., & Hench, L. (2003). Bioactivity of gel-glass powders in the CaO-SiO<sub>2</sub> system: A comparison with ternary (CaO-P<sub>2</sub>P<sub>5</sub>-SiO<sub>2</sub>) and quaternary glasses (SiO<sub>2</sub>-CaO-P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>-Na<sub>2</sub>O). *Journal Of Biomedical Materials Research*, 66A(1), pp. 110-119. doi: 10.1002/jbm.a.10532
- [141] Jones, J. R., Ehrenfried, L. M., & Hench, L. L. (2006). Optimising bioactive glass scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials*, 27(7), 964-973. doi:10.1016/j.biomaterials.2005.07.017
- [142] Cannio, M., Bellucci, D., Roether, J. A., Boccaccini, D. N., & Cannillo, V. (2021). Bioactive glass applications: A literature review of Human Clinical Trials. *Materials*, 14(18), 5440. doi:10.3390/ma14185440
- [143] Brunellii, G., Carinici, F., Girardi, A., Palmieri, A., & Caccianiga, G. (2012). *European Journal of Inflammation*, 10 (1), pp. 43-47.
- [144] Washio, Morotomi, Yoshii, & Kitamura. (2019). Bioactive glass-based endodontic sealer as a promising root canal filling material without semisolid core materials. *Materials*, 12(23), 3967. doi:10.3390/ma12233967

- [145] JONES, J. R. (2008). Bioactive Glass. *Bioceramics and Their Clinical Applications*, 266-283. doi:10.1533/9781845694227.2.266
- [146] Schmidt, R. (1996). *Biokompatible Werkstoffe und Bauweisen*. Von E. Wintermante und Suk-Woo Ha. 1. Auflage, 423 S., 202 Abb., 102 Tab. Springer-Verlag Berlin-Heidelberg-New York 1996, geb., DM 98,-, ISBN 3-540-59405-1. *Materials And Corrosion/Werkstoffe Und Korrosion*, 47(12), pp. 716-717. doi: 10.1002/maco.19960471213
- [147] Gerhardt, L., & Boccaccini, A. R. (2010). Bioactive glass and glass-ceramic scaffolds for bone tissue engineering. *Materials*, 3(7), 3867-3910. doi:10.3390/ma3073867
- [148] Bonfield, W., Wang, M., & Tanner, K. (1998). Interfaces in analogue biomaterials. *Acta Materialia*, 46(7), 2509-2518. doi:10.1016/s1359-6454(98)80035-9
- [149] Rahaman, M. N., Day, D. E., Sonny Bal, B., Fu, Q., Jung, S. B., Bonewald, L. F., & Tomsia, A. P. (2011). Bioactive glass in tissue engineering. *Acta Biomaterialia*, 7(6), 2355-2373. doi:10.1016/j.actbio.2011.03.016
- [150] Hench, L. L., Splinter, R. J., Allen, W. C., & Greenlee, T. K. (1971). Bonding mechanisms at the interface of ceramic prosthetic materials. *Journal of Biomedical Materials Research*, 5(6), 117-141. doi:10.1002/jbm.820050611
- [151] Jones, J. R. (2013). Review of bioactive glass: From Hench to hybrids. *Acta Biomaterialia*, 9(1), 4457-4486. doi:10.1016/j.actbio.2012.08.023
- [152] Larbi, J., Fraay, A., & Bijen, J. (1990). The chemistry of the pore fluid of silica fume-blended cement systems. *Cement and Concrete Research*, 20(4), 506-516. doi:10.1016/0008-8846(90)90095-f
- [153] Acevedo, C., Sánchez, E., Orellana, N., Morales, P., Olguín, Y., Brown, D., & Enrione, J. (2019). Re-Epithelialization Appraisal of Skin Wound in a Porcine Model Using a Salmon-Gelatin Based Biomaterial as Wound Dressing. *Pharmaceutics*, 11(5), pp. 196. doi: 10.3390/pharmaceutics11050196

- [154] Su, K., & Wang, C. (2015). Recent advances in the use of gelatin in biomedical research. *Biotechnology Letters*, 37(11), 2139-2145. doi:10.1007/s10529-015-1907-0
- [155] Schrieber, R., & Gareis, H. (2007). *Gelatine handbook*.
- [156] Masamune, H., Siozima, S., & Masukawa, A. (1951). Chemistry and biology of lipids. *The Tohoku Journal of Experimental Medicine*, 54(4), 327-331. doi:10.1620/tjem.54.327
- [157] Zalivskaya, A., Fadeeva, D., Shestopalova, N., Avtina, N., Radyukova, V., & Ivanova, V. (2021). Comparative characteristics of gel bases for semisolid dosage forms. *BIO Web of Conferences*, 40, 03008. doi:10.1051/bioconf/20214003008
- [158] Ge, Y., Wang, J., Shi, Z., & Yin, J. (2012). Gelatin-assisted fabrication of water-dispersible graphene and its inorganic analogues. *Journal Of Materials Chemistry*, 22(34), 17619. doi: 10.1039/c2jm33173j
- [159] Djabourov, M., Leblond, J., & Papon, P. (1988). Gelation of aqueous gelatin solutions. I. Structural investigation. *Journal De Physique*, 49(2), pp. 319-332. doi: 10.1051/jphys:01988004902031900
- [160] GMIA, Gelatin Manufacturers Institute of America Members, (2019), *Gelatin Handbook*, 26.
- [161] Zhang, X., Liao, B., Guan, Z., Thakur, K., Khan, M. R., Busquets, R., . . . Wei, Z. (2022). Interaction between gelatin and mulberry leaf polysaccharides in miscible system: Physicochemical characteristics and rheological behavior. *Foods*, 11(11), 1571. doi:10.3390/foods11111571
- [162] Ki, C. S., Baek, D. H., Gang, K. D., Lee, K. H., Um, I. C., & Park, Y. H. (2005). Characterization of gelatin nanofiber prepared from gelatin–formic acid solution. *Polymer*, 46(14), 5094-5102. doi:10.1016/j.polymer.2005.04.040

- [163] Choktaweessap, N., Arayanarakul, K., Aht-ong, D., Meechaisue, C., & Supaphol, P. (2007). Electrospun gelatin fibers: Effect of solvent system on morphology and fiber diameters. *Polymer Journal*, 39(6), 622-631. doi:10.1295/polymj.pj2006190
- [164] Oraby, M., Waley, A., El-Dewany, A., Saad, E., & Abd El-Hady, B. (2013). Electrospinning of Gelatin Functionalized with Silver Nanoparticles for Nanofiber Fabrication. *Modeling And Numerical Simulation Of Material Science*, 03(04), 95-105. doi: 10.4236/mnsms.2013.34013
- [165] Abrusci, C., Martin-Gonzalez, A., Del Amo, A., Corrales, T., & Catalina, F. (2004). Biodegradation of type-B gelatine by bacteria isolated from cinematographic films. A viscometric study. In *Polymer Degradation and Stability* (Vol. 86, Issue 2, pp. 283-291). Elsevier BV. doi:10.1016/j.polymdegradstab.2004.04.024
- [166] Wang, L., Cao, Y., Zhang, K., Fang, Y., Nishinari, K., & Phillips, G. O. (2015). Hydrogen bonding enhances the electrostatic complex coacervation between kappa-carrageenan and gelatin. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 482, 604-610. doi:10.1016/j.colsurfa.2015.07.011
- [167] GENG, X., KWON, O., & JANG, J. (2005). Electrospinning of chitosan dissolved in concentrated acetic acid solution. *Biomaterials*, 26(27), 5427-5432. doi:10.1016/j.biomaterials.2005.01.066
- [168] Song, J., Kim, H., & Kim, H. (2007). Production of electrospun gelatin nanofiber by water-based co-solvent approach. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 19(1), 95-102. doi:10.1007/s10856-007-3169-4
- [169] Bhardwaj, N., & Kundu, S. (2010). Electrospinning: A fascinating fiber fabrication technique. *Biotechnology Advances*, 28(3), pp. 325-347. doi: 10.1016/j.biotechadv.2010.01.004
- [170] Righi, T. M., Almeida, R. S., & D'Ávila, M. A. (2012). Electrospinning of Gelatin/PEO blends: Influence of process parameters in the nanofiber properties. *Macromolecular Symposia*, 319(1), 230-234. doi:10.1002/masy.201100137

- [171] Buttafoco, L., Kolkman, N., Engbers-Buijtenhuijs, P., Poot, A., Dijkstra, P., Vermes, I., & Feijen, J. (2006). Electrospinning of collagen and elastin for tissue engineering applications. *Biomaterials*, 27(5), 724-734. doi:10.1016/j.biomaterials.2005.06.024
- [172] Gaudreault, R., Van de Ven, T. G., & Whitehead, M. (2005). Mechanisms of flocculation with poly(ethylene oxide) and novel cofactors. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 268(1-3), 131-146. doi:10.1016/j.colsurfa.2005.04.044
- [173] Wortmann, M., Frese, N., Sabantina, L., Petkau, R., Kinzel, F., Gölzhäuser, A., Ehrmann, A. (2019). New polymers for needleless electrospinning from low-toxic solvents. *Nanomaterials*, 9(1), 52. doi:10.3390/nano9010052
- [174] Mahony, O., Tsigkou, O., Ionescu, C., Minelli, C., Ling, L., Hanly, R., . . . Jones, J. R. (2010). Hybrid materials: Silica-gelatin hybrids with tailorable degradation and mechanical properties for tissue regeneration (*adv. funct. mater.* 22/2010). *Advanced Functional Materials*, 20(22), 3808-3808. doi:10.1002/adfm.201090099
- [175] Allo, B. A., Rizkalla, A. S., & Mequanint, K. (2010). Synthesis and electrospinning of  $\epsilon$ -polycaprolactone-bioactive glass hybrid biomaterials via a sol-gel process. *Langmuir: The ACS Journal of Surfaces and Colloids*, 26(23), 18340–18348. doi:10.1021/la102845k
- [176] Poologasundarampillai, G., Yu, B., Jones, J. R., & Kasuga, T. (2011). Electrospun silica/PLLA hybrid materials for skeletal regeneration. *Soft Matter*, 7(21), 10241. doi:10.1039/c1sm06171b
- [177] Malucelli, G. (2016). Hybrid organic/inorganic coatings through dual-cure processes: State of the art and perspectives. *Coatings*, 6(1), 10. doi:10.3390/coatings6010010
- [178] Maquet, V., Boccaccini, A. R., Pravata, L., Notingher, I., & Jérôme, R. (2004). Porous poly(alpha-hydroxyacid)/Bioglass composite scaffolds for bone tissue engineering.

- I: Preparation and in vitro characterisation. *Biomaterials*, 25(18), 4185–4194. doi:10.1016/j.biomaterials.2003.10.082
- [179] Allcock, H. R. (2018). *Introduction to materials chemistry*. Hoboken, NJ: Wiley.
- [180] Valliant, E. M., & Jones, J. R. (2011). Softening bioactive glass for bone regeneration: sol–gel hybrid materials. In *Soft Matter* (Vol. 7, Issue 11, p. 5083). Royal Society of Chemistry (RSC). doi:10.1039/c0sm01348j
- [181] Guglielmi, M., & Carturan, G. (1988). Precursors for sol-gel preparations. In *Journal of Non-Crystalline Solids* (Vol. 100, Issues 1–3, pp. 16–30). Elsevier BV. doi:10.1016/0022-3093(88)90004-x
- [182] *The Chemistry of Metal Alkoxides*. (2002). Kluwer Academic Publishers. doi:10.1007/b113856
- [183] Innocenzi, P. (2019). *The Sol-to-Gel Transition*. In *SpringerBriefs in Materials*. Springer International Publishing. doi:10.1007/978-3-030-20030-5
- [184] Pope, E. J. A., & Mackenzie, J. D. (1986). Sol-gel processing of silica. In *Journal of Non-Crystalline Solids* (Vol. 87, Issues 1–2, pp. 185–198). Elsevier BV. doi:10.1016/s0022-3093(86)80078-3
- [185] Barczak, M., McDonagh, C., & Wencel, D. (2016). Micro- and nanostructured sol-gel-based materials for optical chemical sensing (2005–2015). In *Microchimica Acta* (Vol. 183, Issue 7, pp. 2085–2109). Springer Science and Business Media LLC. doi:10.1007/s00604-016-1863-y
- [186] Díaz, U., Brunel, D., & Corma, A. (2013). Catalysis using multifunctional organo-siliceous hybrid materials. In *Chemical Society Reviews* (Vol. 42, Issue 9, p. 4083). Royal Society of Chemistry (RSC). doi:10.1039/c2cs35385g
- [187] Fahlman, B. D. (2018). *Materials chemistry*. Dordrecht: Springer.

- [188] Yun, H.-S., Kim, S.-E., & Hyeon, Y.-T. (2007). Design and preparation of bioactive glasses with hierarchical pore networks. *Chemical Communications* (Cambridge, England), 21, 2139–2141. doi:10.1039/b702103h
- [189] Gao, C., Rahaman, M. N., Gao, Q., Teramoto, A., & Abe, K. (2013). Robotic deposition and in vitro characterization of 3D gelatin-bioactive glass hybrid scaffolds for biomedical applications. *Journal of Biomedical Materials Research. Part A*, 101(7), 2027–2037. doi:10.1002/jbm.a.34496
- [190] Wu, S., Dong, T., Li, Y., Sun, M., Qi, Y., Liu, J., Kuss, M. A., Chen, S., & Duan, B. (2022). State-of-the-art review of advanced electrospun nanofiber yarn-based textiles for biomedical applications. In *Applied Materials Today* (Vol. 27, p. 101473). Elsevier BV. doi:10.1016/j.apmt.2022.101473
- [191] Electrospinning. (2015). *Polymer Chemistry Series*. doi: 10.1039/9781849735575
- [192] Wilm, M. S., & Mann, M. (1994). Electrospray and Taylor-cone theory, Dole's beam of macromolecules at last? *International Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes*, 136(2-3), 167-180. doi:10.1016/0168-1176(94)04024-9
- [193] Zhu, N., & Che, X. (2013). Biofabrication of Tissue Scaffolds. *Advances in Biomaterials Science and Biomedical Applications*. doi:10.5772/54125
- [194] Robb, B., & Lennox, B. (2011). The electrospinning process, conditions and control. *Electrospinning for Tissue Regeneration*, 51-66. doi:10.1533/9780857092915.1.51
- [195] Doshi, J., & Reneker, D. H. (1995). Electrospinning process and applications of electrospun fibers. *Journal of Electrostatics*, 35(2-3), 151-160. doi:10.1016/0304-3886(95)00041-8
- [196] Valenzuela, F., Covarrubias, C., Martínez, C., Smith, P., Díaz-Dosque, M., & Yazdani-Pedram, M. (2012). Preparation and bioactive properties of novel bone-repair bionanocomposites based on hydroxyapatite and bioactive glass nanopar-

- ticles. *Journal Of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, 100B(6), pp.1672-1682. doi: 10.1002/jbm.b.32736
- [197] Greenhalgh, R., Ambler, W., Quinn, S., Medeiros, E., Anderson, M., & Gore, B. et al. (2017). Hybrid sol–gel inorganic/gelatin porous fibres via solution blow spinning. *Journal Of Materials Science*, 52(15), pp. 9066-9081. doi: 10.1007/s10853-017-0868-1
- [198] Abdullah, M., & Khairurrijal, K. (2016). A simple method for determining surface porosity based on SEM images using OriginPro software. *Indonesian Journal of Physics*, 20(2), 37–40. doi:10.5614/itb.ijp.2009.20.2.4
- [199] Liviano, D., & Jover, M. P. (2017). *Analisis Cuantitativo con R: Matematicas, estadistica y econometria*. Barcelona: Editorial UOC.
- [200] Pirie, W. (2004). Spearman rank correlation coefficient. *Encyclopedia of Statistical Sciences*. doi:10.1002/0471667196.ess2499
- [201] Kokubo, T., & Takadama, H. (2006). How useful is SBF in predicting in vivo bone bio-activity?. *Biomaterials*, 27(15), 2907-2915. doi: 10.1016/j.biomaterials.2006.01.017
- [202] Buttke, T., McCubrey, J., & Owen, T. (1993). Use of an aqueous soluble tetrazolium/formazan assay to measure viability and proliferation of lymphokine-dependent cell lines. *Journal Of Immunological Methods*, 157(1-2), 233-240. doi:10.1016/0022-1759(93)90092-1
- [203] Abutaleb, A., Lolla, D., Aljuhani, A., Shin, H., Rajala, J., & Chase, G. (2017). Effects of Surfactants on the Morphology and Properties of Electrospun Polyetherimide Fibers. *Fibers*, 5(3), 33. doi: 10.3390/fib5030033
- [204] *Electrospinning: Nanofabrication and Applications*. (2019). doi: 10.1016/c2016-0-01374-8
- [205] Mehta, P., & Pawar, V. (2018). Electrospun nanofiber scaffolds. *Applications Of Nanocomposite Materials In Drug Delivery*, 509-573. doi: 10.1016/b978-0-12-813741-3.00023-6

- [206] Nguyen, T., & Lee, B. (2010). Fabrication and characterization of cross-linked gelatin electrospun nanofibers. *Journal Of Biomedical Science And Engineering*, 03(12), 1117-1124. doi: 10.4236/jbise.2010.312145
- [207] Farris, S., Song, J., & Huang, Q. (2010). Alternative Reaction Mechanism for the Cross-Linking of Gelatin with Glutaraldehyde. *Journal Of Agricultural And Food Chemistry*, 58(2), 998-1003. doi: 10.1021/jf9031603
- [208] Duan, J., Karaaslan, M., Cho, M., Liu, L., Johnson, A., & Renneckar, S. (2018). Investigation into electrospinning water-soluble xylan: developing applications from highly absorbent and hydrophilic surfaces to carbonized fiber. *Cellulose*, 26(1), 413-427. doi: 10.1007/s10570-018-2188-2
- [209] Chen, Y., Chen, M., Gao, Y., Zhang, F., Jin, M., Lu, S., & Han, M. (2022). Biological efficacy comparison of natural tussah silk and mulberry silk nanofiber membranes for guided bone regeneration. *ACS Omega*, 7(23), 19979–19987. doi:10.1021/acsomega.2c01784
- [210] Verrier, S., Blaker, J. J., Maquet, V., Hench, L. L., & Boccaccini, A. R. (2004). PDLLA/Bioglass® Composites for soft-tissue and hard-tissue engineering: An in vitro cell biology assessment. *Biomaterials*, 25(15), 3013–3021. doi:10.1016/j.biomaterials.2003.09.081
- [211] Eppley, B. L., Sadove, A. M., & German, R. Z. (1990). Evaluation of HTR polymer as a craniomaxillofacial graft material. *Plastic and Reconstructive Surgery*, 86(6), 1085–1092. doi:10.1097/00006534-199012000-00006
- [212] Jaroch, D., McLamore, E., Zhang, W., Shi, J., Garland, J., Banks, M. K., ... Rickus, J. L. (2011). Cell-mediated deposition of porous silica on bacterial biofilms. *Biotechnology and Bioengineering*, 108(10), 2249–2260. doi:10.1002/bit.23195
- [213] Guarnieri, D., Malvindi, M. A., Belli, V., Pompa, P. P., & Netti, P. (2014). Effect of silica nanoparticles with variable size and surface functionalization on human

endothelial cell viability and angiogenic activity. *Journal of Nanoparticle Research*, 16(2). doi:10.1007/s11051-013-2229-6

- [214] KANG, Y., KIM, K., SEOL, Y., & RHEE, S. (2009). Evaluations of osteogenic and osteoconductive properties of a non-woven silica gel fabric made by the electrospinning method. *Acta Biomaterialia*, 5(1), 462–469. doi:10.1016/j.actbio.2008.07.004
- [215] Shou, G., Lin, S., Shen, S., He, X., Dong, L., Cheng, K., & Weng, W. (2019). Insights into the osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells on crystalline and vitreous silica. *ACS Biomaterials Science & Engineering*, 5(7), 3352–3360. doi:10.1021/acsbomaterials.9b00679
- [216] Stodolak-Zych, E., Szumera, M., & Blazewicz, M. (2012). Osteoconductive nanocomposite materials for bone regeneration. *Materials Science Forum*, 730–732, 38–43. doi:10.4028/www.scientific.net/msf.730-732.38
- [217] Seol, Y., Kim, K., Kang, Y. M., Kim, I. A., & Rhee, S. (2009). Bioactivity, Pre-osteoblastic cell responses, and osteoconductivity evaluations of the electrospun non-woven  $\text{SiO}_2$ - $\text{CaO}$  gel fabrics. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, 90B(2), 679–687. doi:10.1002/jbm.b.31334
- [218] Sheng, L., Wang, J., Huang, M., Xu, Q., & Ma, M. (2016). The changes of secondary structures and properties of lysozyme along with the egg storage. *International Journal of Biological Macromolecules*, 92, 600–606. doi:10.1016/j.ijbiomac.2016.07.068
- [219] Yazdimamaghani, M., Vashaei, D., Assefa, S., Walker, K. J., Madhally, S. V., Köhler, G. A., & Tayebi, L. (2014). Hybrid macroporous gelatin/bioactive-glass/nanosilver scaffolds with controlled degradation behavior and antimicrobial activity for Bone Tissue Engineering. *Journal of Biomedical Nanotechnology*, 10(6), 911–931. doi:10.1166/jbn.2014.1783
- [220] Murray, R. K., Botham, K. M., & Rodwell, V. W. (2010). *Harper Bioquímica Ilustrada*. Mexico: McGraw-Hill Interamericana.

- [221] Holler, E., Rupley, J. A., & Hess, G. P. (1970). Kinetics of lysozyme-substrate interactions. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 40(1), 166–170. doi:10.1016/0006-291x(70)91061-2
- [222] Govindan, R., Gu, F. L., Karthi, S., & Girija, E. K. (2020). Effect of phosphate glass reinforcement on the mechanical and biological properties of freeze-dried gelatin composite scaffolds for bone tissue engineering applications. *Materials Today Communications*, 22, 100765. doi:10.1016/j.mtcomm.2019.100765
- [223] Raz, M., Moztarzadeh, F., & Kordestani, S. S. (2016). Synthesis, characterization and in-vitro study of chitosan/gelatin/calcium phosphate hybrid scaffolds fabricated via ion diffusion mechanism for Bone Tissue Engineering. *Silicon*, 10(2), 277–286. doi:10.1007/s12633-016-9439-3
- [224] Huang, G., Xu, L., Wu, J., Wang, S., & Dong, Y. (2021). Gelatin/bioactive glass composite scaffold for promoting the migration and odontogenic differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells. *Polymer Testing*, 93, 106915. doi:10.1016/j.polymertesting.2020.106915
- [225] Srinivasan, S., Jayasree, R., Chennazhi, K. P., Nair, S. V., & Jayakumar, R. (2012). Biocompatible alginate/nano bioactive glass ceramic composite scaffolds for periodontal tissue regeneration. *Carbohydrate Polymers*, 87(1), 274–283. doi:10.1016/j.carbpol.2011.07.058
- [226] Ricci, P., Gulleri, G., Fumagalli, F., Carbonaro, C., & Corpino, R. (2013). Optical characterization of polysilazane based silica thin films on silicon substrates. *Applied Surface Science*, 265, 470-474. doi: 10.1016/j.apsusc.2012.11.030
- [227] Sepulveda, P., Jones, J., & Hench, L. (2002). In vitro dissolution of melt-derived 45S5 and sol-gel derived 58S bioactive glasses. *Journal Of Biomedical Materials Research*, 61(2), 301-311. doi: 10.1002/jbm.10207

- [228] Parchur, A., & Ningthoujam, R. (2011). Preparation and structure refinement of Eu<sup>3+</sup> doped CaMoO<sub>4</sub> nanoparticles. *Dalton Transactions*, 40(29), 7590. doi: 10.1039/c1dt10327j
- [229] Zaitan, H., Bianchi, D., Achak, O., & Chafik, T. (2008). A comparative study of the adsorption and desorption of o-xylene onto bentonite clay and alumina. *Journal Of Hazardous Materials*, 153(1-2), 852-859. doi: 10.1016/j.jhazmat.2007.09.070
- [230] Goh, Y., Alshemary, A., Akram, M., Abdul Kadir, M., & Hussain, R. (2014). Bioactive Glass: An In-Vitro Comparative Study of Doping with Nanoscale Copper and Silver Particles. *International Journal Of Applied Glass Science*, 5(3), 255-266. doi:10.1111/ijag.12061
- [231] Lefebvre, L., Chevalier, J., Gremillard, L., Zenati, R., Thollet, G., Bernache-Assolant, D., & Govin, A. (2007). Structural transformations of bioactive glass 45S5 with thermal treatments. *Acta Materialia*, 55(10), 3305-3313. doi: 10.1016/j.actamat.2007.01.029
- [232] Srivastava, A., & Pyare, R. (2012). Characterization of ZnO substituted 45S5 Bioactive Glasses and Glass - Ceramics. *Journal Of Materials Science Research*, 1(2). doi: 10.5539/jmsr.v1n2p207
- [233] Hudon, P., & Baker, D. R. (2002). The nature of phase separation in binary oxide melts and glasses. I. Silicate Systems. *Journal of Non-Crystalline Solids*, 303(3), 299–345. doi:10.1016/s0022-3093(02)01043-8
- [234] Taghian Dehaghani, M., Ahmadian, M., & Fathi, M. (2014). Synthesis, Characterization, and Bioactivity Evaluation of Amorphous and Crystallized 58S Bioglass Nanopowders. *International Journal Of Applied Ceramic Technology*, 12(4), 867-874. doi: 10.1111/ijac.12293
- [235] Xuan Bui, V., Quang Vo, M., Anh Nguyen, T., & Thi Bui, H. (2019). Investigation of Bioactive Glass-Ceramic 60SiO<sub>2</sub>-30CaO-10P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> Prepared by Hydrothermal Method. *Advances In Materials Science And Engineering*, 2019, 1-8. doi: 10.1155/2019/1528326

- [236] Huang, L., Lin, C., & Shen, P. (2007). Crystallization and stoichiometry of crystals in Na<sub>2</sub>CaSi<sub>2</sub>O<sub>6</sub>–P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> based bioactive glasses. *Materials Science And Engineering: A*, 452-453, 326-333. doi: 10.1016/j.msea.2006.10.136
- [237] Rastogi, S. K., Rutledge, V. J., Gibson, C., Newcombe, D. A., Branen, J. R., & Branen, A. L. (2011). AG colloids and AG clusters over EDAPTMS-coated silica nanoparticles: Synthesis, characterization, and antibacterial activity against escherichia coli. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 7(3), 305–314. doi:10.1016/j.nano.2010.11.003
- [238] F. Hincapié Rojas, D., Pineda Gómez, P., & Rosales Rivera, A. (2019). Production and characterization of silica nanoparticles from Rice Husk. *Advanced Materials Letters*, 10(1), 67–73. doi:10.5185/amlett.2019.2142
- [239] Li, P., Yang, Q., Zhang, F., & Kokubo, T. (1992). The effect of residual glassy phase in a bioactive glass-ceramic on the formation of its surface apatite layer in vitro. *Journal Of Materials Science: Materials In Medicine*, 3(6), 452-456. doi: 10.1007/bf00701242
- [240] Lin, N., & Dufresne, A. (2014). Nanocellulose in biomedicine: Current status and future prospect. *European Polymer Journal*, 59, 302-325. doi:10.1016/j.eurpolymj.2014.07.025
- [241] Tabia, Z., Akhtach, S., Bricha, M., & El Mabrouk, K. (2021). Tailoring the biodegradability and bioactivity of green-electrospun polycaprolactone fibers by incorporation of bioactive glass nanoparticles for guided bone regeneration. *European Polymer Journal*, 161, 110841. doi:10.1016/j.eurpolymj.2021.110841
- [242] Mami, M., Lucas-Girot, A., Oudadesse, H., Dorbez-Sridi, R., Mezahi, F. & Dietrich E. (2008). *Appl. Surf. Sci.* 254 7386–7393. doi:10.1016/j.apsusc.2008.05.340.
- [243] McGill, R., Tukey, J. W., & Larsen, W. A. (1978). Variations of box plots. *The American Statistician*, 32(1), 12. doi:10.2307/2683468
- [244] R Development Core Team (2015) R: A Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna.

- [245] Renno, A., Bossini, P., Crovace, M., Rodrigues, A., Zanotto, E., & Parizotto, N. (2013). Characterization and In Vivo Biological Performance of Biosilicate. *Biomed Research International*, 2013, 1-7. doi: 10.1155/2013/141427
- [246] Khalil, E., ElBatal, F., Hamdy, Y., Zidan, H., Aziz, M., & Abdelghany, A. (2010). Infrared absorption spectra of transition metals-doped soda lime silica glasses. *Physica B: Condensed Matter*, 405(5), 1294-1300. doi: 10.1016/j.physb.2009.11.070
- [247] Sharifianjazi, F., Parvin, N., Tahriri, M. (2017). *Ceram. Int.* 43 15214–15220. <https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2017.08.056>
- [248] Chen, Q., Li, Y., Jin, L., Quinn, J., & Komesaroff, P. (2010). A new sol–gel process for producing Na<sub>2</sub>O-containing bioactive glass ceramics. *Acta Biomaterialia*, 6(10), 4143-4153. doi: 10.1016/j.actbio.2010.04.022
- [249] Wheeler, D., Montfort, M., & McLoughlin, S. (2001). Differential healing response of bone adjacent to porous implants coated with hydroxyapatite and 45S5 bioactive glass. *Journal Of Biomedical Materials Research*, 55(4), 603-612. doi: 10.1002/1097-4636(20010615)55:4<603::aid-jbm1054>3.0.co;2-n
- [250] Bi, L., Jung, S., Day, D., Neidig, K., Dusevich, V., Eick, D., & Bonewald, L. (2012). Evaluation of bone regeneration, angiogenesis, and hydroxyapatite conversion in critical-sized rat calvarial defects implanted with bioactive glass scaffolds. *Journal Of Biomedical Materials Research Part A*, 100A(12), 3267-3275. doi: 10.1002/jbm.a.34272
- [251] Habibovic, P., & Barralet, J. (2011). Bioinorganics and biomaterials: Bone repair. *Acta Biomaterialia*, 7(8), 3013-3026. doi: 10.1016/j.actbio.2011.03.027
- [252] Pajares-Chamorro, N., & Chatzistavrou, X. (2020). Bioactive glass nanoparticles for tissue regeneration. *ACS Omega*, 5(22), 12716–12726. doi:10.1021/acsomega.0c00180
- [253] Gao, C., Gao, Q., Li, Y., Rahaman, M. N., Teramoto, A., & Abe, K. (2012). in vitro evaluation of electrospun gelatin-bioactive glass hybrid scaffolds

for bone regeneration. *Journal of Applied Polymer Science*, 127(4), 2588–2599. doi:10.1002/app.37946

- [254] Haghighi, F. D., Beidokhti, S. M., Najaran, Z. T., & Sahebian Saghi, S. (2021). Highly improved biological and mechanical features of bioglass-ceramic/ gelatin composite scaffolds using a novel silica coverage. *Ceramics International*, 47(10), 14048–14061. doi:10.1016/j.ceramint.2021.01.274
- [255] Lao, J., Dieudonné, X., Fayon, F., Montouillout, V., & Jallot, E. (2016). Bioactive glass–gelatin hybrids: Building scaffolds with enhanced calcium incorporation and controlled porosity for Bone Regeneration. *Journal of Materials Chemistry B*, 4(14), 2486–2497. doi:10.1039/c5tb02345a
- [256] El-Gendy, R., Yang, X. B., Newby, P. J., Boccaccini, A. R., & Kirkham, J. (2013). Osteogenic differentiation of human dental pulp stromal cells on 45S5 bioglass® based scaffolds in vitro and in vivo. *Tissue Engineering Part A*, 19(5–6), 707–715. doi:10.1089/ten.tea.2012.0112
- [257] Tavares, M. T., Oliveira, M. B., Mano, J. F., Farinha, J. P., & Baleizão, C. (2020). Bioactive silica nanoparticles with calcium and phosphate for single dose osteogenic differentiation. *Materials Science and Engineering: C*, 107, 110348. doi:10.1016/j.msec.2019.110348
- [258] Wang, S., Gao, X., Gong, W., Zhang, Z., Chen, X., & Dong, Y. (2014). Odontogenic differentiation and dentin formation of dental pulp cells under nanobioactive glass induction. *Acta Biomaterialia*, 10(6), 2792–2803. doi:10.1016/j.actbio.2014.02.013
- [259] Ha, S.-W., Vigneswarapu, M., Habib, M. M., & Beck, G. R. (2018). Bioactive effects of silica nanoparticles on bone cells are size, surface, and composition dependent. *Acta Biomaterialia*, 82, 184–196. doi:10.1016/j.actbio.2018.10.018
- [260] Martín-Moldes, Z., López Barreiro, D., Buehler, M. J., & Kaplan, D. L. (2021). Effect of the silica nanoparticle size on the osteoinduction of

biomineralized silk-silica nanocomposites. *Acta Biomaterialia*, 120, 203–212.  
doi:10.1016/j.actbio.2020.10.043

[261] Qu, T., & Liu, X. (2013). Nano-structured gelatin/bioactive glass hybrid scaffolds for the enhancement of odontogenic differentiation of human dental pulp stem cells. *Journal of Materials Chemistry B*, 1(37), 4764. doi:10.1039/c3tb21002b

[262] Fan, B., Wang, X., Zhang, H., Gao, P., Zhang, H., Li, X., ... Wang, Z. (2016). Improving the osteogenesis and degradability of biomimetic hybrid materials using a combination of bioglass and collagen I. *Materials & Design*, 112, 67–79. doi:10.1016/j.matdes.2016.09.059