



**UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE ODONTOLOGIA
ESCUELA DE GRADUADOS**



**“SÍNTESIS DE BIOMATERIALES HÍBRIDOS
BIFUNCIONALES EN BASE A NANOPARTÍCULAS
BIOACTIVAS CON PROPIEDADES OSTEOINDUCTORAS
Y ANTIBACTERIANAS *IN VITRO*”**

**NICOLÁS ANDRÉS COHN INOSTROZA
TESIS PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR EN CIENCIAS
ODONTOLÓGICAS**

**Directores de Tesis: Prof. Dr. Cristian Covarrubias Gallardo
Prof. Dr. Alfredo Hernán von Marttens Castro**

**Santiago - Chile
2023**

PÁGINA EN BLANCO

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA
ESCUELA DE GRADUADOS

INFORME DE APROBACIÓN DE TESIS DE DOCTORADO EN CIENCIAS
ODONTOLÓGICAS

Se informa al Consejo de Posgrado de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile,
que la Tesis de Doctorado en Ciencias Odontológicas presentada por el candidato

Nicolás Andrés Cohn Inostroza

ha sido aprobada por la Comisión Evaluadora de Tesis como requisito para optar al grado de
Doctor en Ciencias Odontológicas, en examen rendido el día martes 3 de octubre de 2023.

COMISIÓN INFORMANTE DE TESIS



.....
Dra. Julieta González Burgos
Académica
Instituto de Cs. Biomédicas
Facultad de Medicina
Presidenta Comisión Examinadora

Andrónico David
Neira Carrillo
10.699.817-5
05/10/2023 - 15:23
UNIVERSIDAD
DE CHILE
ESTE DOCUMENTO CONTIENE FIRMA ELECTRÓNICA AVANZADA
<https://ceropapel.uchile.cl/validacion/verificador>
.....
CI: 651ef09b51e3192a684ecb

Dr. Andrónico Neira Carrillo
Académico
Depto. de Cs. Biológicas Animales
Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias



.....
Dr. Fermín González Bergas
Académico
Depto. de Odontología Conservadora
Facultad de Odontología



.....
Dr. Alejandro Escobar Álvarez
Académico
Instituto de Investigación en Cs. Odontológicas
Facultad de Odontología

DEDICATORIA

A mi compañera Lissa, Te amo con todo mi ser, tu amor es un universo en expansión.

Rudi, hermano amado gracias por tu fuerza para seguir adelante.

A Herminda, Gloria y Graciela por todo su amor.

A mí, por permitirme evolucionar.

Agradecimientos.

Quisiera agradecer a la Agencia Nacional de Investigación (ANID), por financiar la beca Doctorado Nacional 2018 (Folio / Código de Proyecto: 21180741) para realizar la presente investigación en el programa de doctorado en ciencias odontológicas de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile.

A mis tutores: Dr. Cristian Covarrubias y al Dr. Alfredo Von Marttens. Han sido mis mentores, agradezco su constante guía y desarrollo crítico de este estudio.

Al equipo del laboratorio de Nanobiomateriales: Dr. Miguel Maureira, por su guía y enseñanza en las técnicas de biología molecular y cultivo celular. A los asistentes de investigación: René Rivas y David Beltrán, por su dedicación y pedagogía en los experimentos microbiológicos y químicos.

A los Profesores Dr. Ignacio Moreno-Villoslada y Dr. Mario Flores Flores del Laboratorio de Polímeros de la Universidad Austral de Chile, quienes desde mi pregrado me apoyaron y enseñaron el sentido de hacer equipo en un laboratorio, además agradecer a Mg. Ariel Nenen Huenchul, quien realizó las mediciones de Análisis Mecánico Dinámico (DMA), fundamentales para la comprensión del comportamiento mecánico de los materiales híbridos.

Al Dr. Franck Quero, perteneciente al Laboratorio de Nanocelulosa y Biomateriales de la Facultad de Ciencias Físicas y Matemáticas de la Universidad de Chile, por el acceso al equipo de TGA.

A los profesores Dr. Edgar Dutra Zanotto y Dr. Henrik Bradtmüller del Laboratorio de Materiales Vitreos, Departamento de Ingeniería de Materiales de la Universidad Federal São Carlos, Brasil, por su cooperación en los análisis en ^{29}Si NMR MAS.

Al Dr. Rodrigo Araya Hermosilla del Laboratorio de Química Orgánica del Programa Institucional de Fomento a la Investigación (PIDi) de la Universidad Tecnológica Metropolitana, por su disposición en facilitar los equipos de DSC y DLS.

A la Prof. Dra. Natalia Hassan del Programa Institucional de Fomento a la Investigación (PIDi) de la Universidad Tecnológica Metropolitana, por su disposición en facilitar el uso del equipo de AFM.

Al Dr. Felipe Oyarzún Ampuero, perteneciente a la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas de la Universidad de Chile, por facilitar la caracterización del tamaño de las nanopartículas mediante Nanosight.

A la TM. Rocío Orellana, por su guía en las visitas al microscopio electrónico de barrido (SEM-EDX) en los periodos inciertos de pandemia COVID-19.

A mi abuelo Paterno Rudi Cohn Baden y mi Padre Fernando Cohn Valenzuela, quienes me mostraron desde temprana edad la ciencia a través del laboratorio químico de metalurgia donde fabricaban amalgamas para uso odontológico.

Financiamiento de tesis.

- Recursos y equipamientos disponibles en el Laboratorio de Nanobiomateriales.
- ANID, Beca Folio No 21180741, Doctorado Nacional 2018 (Gobierno de Chile).
- ANID, Beneficio complementario Folio No 23220103, Beneficio complementario extensión de beca para redacción de tesis doctoral, año 2022, primer llamado (Gobierno de Chile).

Productos derivados de la tesis.

1. **PRESENTACIÓN ORAL: Nicolas Cohn Inostroza***, Cristian Covarrubias, Gloria Young, Julian R Jones. “Synthesis and Bioactivity of sol-gel hybrid materials modified with bioactive glass nanoparticles.” International Nanoscience Student Conference 2020, realizado del 11 al 13 de agosto de 2020, en Lund, Suecia.
2. **POSTER: Nicolas Cohn Inostroza***, Cristian Covarrubias, Gloria Young, Julian R Jones, “Synthesis of PTHF based hybrid sol-gel modified with bioactive nanoparticles.” World Biomaterials Congress 2020, realizado del 11 al 15 de diciembre de 2020 en Glaswog, Escocia.
3. **PRESENTACIÓN ORAL: Nicolás Cohn Inostroza***, Cristian Covarrubias, Julian R. Jones, Gloria Young, “Síntesis de materiales híbridos sol-gel modificados con nanopartículas de vidrio bioactivo”. Segundo Congreso Anual ICOD 2020, realizado del 17 al 19 de diciembre de 2020, en Santiago, Chile.
4. **PRESENTACIÓN ORAL: Nicolás Cohn Inostroza***, Cristian Covarrubias, Gloria Young, Julian Jones, “Propiedades bioactivas de híbrido nanocompósito dopado con nanopartículas de vidrio bioactivo”, VI Congreso Nacional de Nanotecnología, realización del 22 al 24 de noviembre de 2021, en formato online.

5. **POSTER: Nicolás Cohn Inostroza***, Cristian Covarrubias, Gloria Young, Julian Jones, “Propiedades osteoinductoras en células madre de pulpa dental de un híbrido nanocompósito dopado con nanopartículas de vidrio bioactivo”. II Congreso Nacional de Ingeniería de Tejidos y Medicina Regenerativa, realización el 7 de diciembre de 2021, en formato online.
6. **Manuscrito en preparación titulado “Synthesis of novel nanocomposite hybrids modified with bioactive glass nanoparticles and their osteoconductive properties” para ser considerado para publicación en *Biomaterials Advances*.**

Participación en Proyectos Concursados.

1. Ganador VI convocatoria del programa “Estímulo para proyectos académicos de estudiantes de postgrado”. "Título: Validación de la carga viral para SARS CoV2 en saliva en una clínica odontológica". Marzo 2021.
2. Finalista Concurso Open Bridge, convocado por OpenBeauchef COVID-19. Título; “Validación de la carga viral para SARS CoV2 en saliva en la población chilena". Mayo 2020.

Índice.

DEDICATORIA	IV
Agradecimientos.	V
Financiamiento de tesis.	VII
Productos derivados de la tesis.	VIII
Participación en Proyectos Concursados.	IX
Índice.X	
Índice de figuras.....	XVI
Índice de tablas.....	XX
Resumen.....	XXII
Abstract.	XXIV
1. Introducción.	1
1.1. Antecedentes.....	1
1.2. Reconstrucción ósea en odontología.	1
1.3. Enfoques basados en ingeniería de tejidos y nanotecnología.....	3
1.4. Vidrio bioactivo.....	5
1.5. Vidrios bioactivos híbridos.....	9

2.	Hipótesis y objetivos de la investigación.....	17
2.1.	Hipótesis:.....	17
2.2.	Objetivo general:.....	17
2.3.	Objetivos específicos:.....	17
3.	Materiales y métodos.....	19
3.1.	Síntesis de híbridos sílice- PTHF y híbridos sílice- PTHF cargados con nanopartículas de nVB y nCu.....	19
3.2.	Técnicas de caracterización:.....	23
3.2.1.	Espectroscopía de resonancia magnética nuclear.....	23
3.2.2.	Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR).....	25
3.2.3.	Difracción de rayos X.....	26
3.2.4.	Calorimetría diferencial de barrido.....	27
3.2.5.	Análisis termogravimétrico.....	28
3.2.6.	Microscopía electrónica de barrido con espectroscopía dispersiva de rayos X.....	29
3.2.7.	Ensayos de compresión.....	32
3.2.8.	Análisis mecánico dinámico.....	34
3.2.9.	Nanosight.....	35

3.2.10.	Dispersión dinámica de la luz.	36
3.2.11.	Caracterización del Potencial zeta de nVB y nCu relativo al pH en PBS..	37
3.2.12.	Rugosidad de la superficie de los materiales híbridos mediante microscopía de fuerza atómica.....	38
3.2.13.	Liberación de iones calcio y cobre.....	39
3.3.	Ensayo de degradación de los híbridos.	40
3.4.	Ensayos de bioactividad de líquido corporal simulado (SBF).	40
3.5.	Citocompatibilidad de los híbridos y híbridos cargados con nVB y nCu.	41
3.6.	Determinación de la capacidad de los híbridos cargados con nVB para estimular la diferenciación celular osteogénica in vitro.	42
3.6.1.	Cuantificación de actividad de enzima fosfatasa alcalina (ALP).....	42
3.6.2.	Marcadores de diferenciación osteogénica mediante RT-qPCR.....	42
3.7.	Determinación de la capacidad antibacteriana de los híbridos bifuncionales. ..	43
4.	Resultados.	45
4.1.	Caracterización estructural, mecánica y composicional de los materiales híbridos.	45
4.1.1.	Ensayos mecánicos de compresión.	45
4.1.2.	Análisis mecánico dinámico (DMA).	46

4.1.3.	Análisis mediante calorimetría diferencial de barrido (DSC).....	48
4.1.4.	Análisis termogravimétrico (TGA).....	49
4.1.5.	Espectroscopía de resonancia magnética nuclear de silicio en estado sólido (²⁹ Si MAS RMN).....	50
4.1.6.	Espectroscopia de infrarrojo con reflectancia total atenuada (ATR-FTIR). 54	
4.1.7.	Difracción de rayos X (DRX).	56
4.1.8.	Caracterización de nanopartículas de nVB y nCu mediante microscopía SEM 57	
4.1.9.	Caracterización de nanopartículas de nVB y nCu en suspensión mediante Nanosight y DLS.	58
4.1.10.	Potencial zeta (ζ) de nVB y nCu en buffer PBS.	59
4.1.11.	Caracterización de materiales híbridos mediante microscopía SEM, espectroscopía EDX y microscopía AFM.	60
4.2.	Ensayo de degradación de los materiales híbridos.	64
4.3.	Ensayos de bioactividad de líquido corporal simulado (SBF).....	65
4.4.	Ensayos de citocompatibilidad.	69

4.2.	Determinación de la capacidad de los híbridos cargados con nVB para estimular la diferenciación celular osteogénica in vitro.	71
4.2.1.	Ensayo de actividad de enzima fosfatasa alcalina (ALP).	71
4.2.2.	Medición de biomarcadores de diferenciación celular osteogénica.....	73
4.3.	Nanocompósitos híbridos cargados con nVB-nCu.....	75
4.3.1.	Caracterización mediante FTIR de híbridos con nVB y nCu.	78
4.3.2.	Caracterización mediante SEM-EDX de híbridos optimizados con nCu. .	80
4.3.3.	Ensayos de actividad antibacteriana.....	81
4.3.4.	Liberación de iones calcio y cobre.....	82
5.	Discusión.....	85
5.1.	Caracterización estructural de los materiales híbridos.	85
5.2.	Caracterización de Nanopartículas.	90
5.3.	Degradabilidad de materiales híbridos.	91
5.4.	Bioactividad de materiales híbridos.	92
5.5.	Citocompatibilidad de los materiales híbridos.	94
5.6.	Propiedades osteoinductoras de los materiales híbridos.	95
5.7.	Propiedades antibacterianas de materiales híbridos frente a <i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>	97

6.	Conclusiones.....	98
7.	Referencias bibliográficas.....	100
8.	Anexos.....	124
8.1.	Abreviaturas.....	124
8.2.	Consentimiento informado.....	127

Índice de figuras.

Figura 1. Mecanismos propuestos de acción del vidrio bioactivo: A) mecanismo químico mediante las etapas de la formación de apatita [24] y B) mecanismo biológico por la influencia de ciertos iones bioactivos que producen la propiedad osteoinductora [25]....6

Figura 2. Representación esquemática propuesta de la estructura molecular del Bioglass 45S5 [20]. 7

Figura 3. Representación esquemática de la estructura orgánica – inorgánica de un material híbrido. En la imagen se representa la red de sílice (SiO_2) (gris) y los segmentos de las cadenas del polímero PTHF (rojo) unidos por enlaces covalentes (amarillo) producidos por el agente de acoplamiento GPTMS. Además, se muestran otras posibles interacciones moleculares en la estructura del híbrido a través de puentes de hidrógeno, fuerzas dipolo-dipolo y de London. 10

Figura 4. Representación de híbridos de gelatina-siloxano, derivado de la hidrólisis y la policondensación de GPTMS con agua y la reacción de apertura de anillo de GPTMS con gelatina [38]. 13

Figura 9. Análisis dinámico mecánico (DMA) de los materiales híbridos flexibles: Módulo de almacenamiento (G'), módulo de pérdida (G'') y $\text{Tan}\delta$ 47

Figura 10. Curvas de calorimetría diferencial de barrido (DSC) de los materiales híbridos flexibles. Las zonas coloreadas muestran las temperaturas de transición vítrea (T_g) y de cristalización (T_c) de los materiales híbridos.	49
Figura 12. Espectros de infrarrojo con reflectancia total atenuada (FTIR-ATR) y posición de enlaces representativos de los materiales híbridos flexibles y de las nanopartículas de nVB.	54
Figura 13. Patrones de difracción de rayos – X (DRX) de los materiales híbridos flexibles mostrando dominios cristalinos (flechas) a 20° y 25° en 2Θ	56
Figura 14. Imágenes SEM mostrando mediciones de los tamaños de las nanopartículas de nCu (promedio ~ 215 nm) y nVB (promedio ~ 89 nm).	57
Figura 15. Curvas de distribución de tamaños de las nanopartículas de nVB y nCu obtenidas mediante método de análisis de rastreo de nanopartículas (NTA).	59
Figura 17. Fotografías (macro), micrografías SEM (aumentos 3000x y 10.000x), mapeo EDX de átomos de silicio (en violeta) y análisis elemental EDX (gráficos) de los materiales híbridos flexibles y nanopartículas de nVB.	62
Figura 18. Mediciones mediante microscopia de fuerza atómica (AFM) de rugosidad de la superficie de materiales híbridos. Rugosidad media cuadrática (R_q) e imágenes de superficie y reconstrucción 3D de superficie de materiales híbridos flexibles.	63
Figura 19. Curvas de pérdida de peso de los híbridos obtenidas mediante inmersión en PBS a pH 7,4 por 28 días.	64

Figura 21. Micrografías SEM (magnificaciones 2000X y 5000X), mapeo y análisis elemental EDX de silicio, calcio, fósforo de la superficie de los materiales híbridos luego de 7 y 14 días de incubación en SBF. En los gráficos EDX se muestra la razón molar Ca/P y la suma de contenidos en masa de Ca + P en la superficie de cada material.68

Figura 22. Viabilidad de células hDPSCs (control) e incubadas con los materiales híbridos mediante el ensayo de actividad metabólica MTS luego de 3 y 7 días..... 70

Figura 23. Micrografías SEM de células hDPSC adheridas en la superficie de los materiales híbridos luego 3 días de incubación. Magnificaciones desde la fila superior a la inferior: 500X, 1500X y 3000X.....71

Figura 24. Actividad de fosfatasa alcalina (ALP) de células hDPSC e incubadas con los materiales híbridos por 7 y 14 días en ausencia de suplementos osteogénicos. *** $p \leq 0,01$ **** $p \leq 0,001$72

Figura 25. Cambios en la expresión génica (analizada por PCR a tiempo real) de factores de diferenciación osteogénica (A) Runx2 (3 días) y B) Osterix (14 días) de células hDPSCs incubadas con los híbridos y nanopartículas de nVB en ausencia de suplementes osteogénicos respecto al control de células incubadas sin los materiales híbridos. * $p \leq 0,05$ ** $p \leq 0,01$ *** $p \leq 0,001$74

Figura 26. Viabilidad de células hDPSCs (control) e incubadas con los materiales híbridos mediante el ensayo de actividad metabólica MTS luego de 3 días. **** $p \leq 0,001$76

Figura 27. Viabilidad de células hDPSCs (control) e incubadas con los materiales híbridos mediante el ensayo de actividad metabólica MTS luego de 3 días. **** p<=0,001.	77
Figura 28. Viabilidad de células hDPSCs (control) e incubadas con los materiales híbridos mediante el ensayo de actividad metabólica MTS luego de 3 días. * p<=0,1 ** p<=0,05 *** p<=0,01 **** p<=0,001.	78
Figura 29. Análisis FTIR-ATR de materiales híbridos nanocompuestos cargados con 15% de nVB y modificados con 1x10 ⁻⁴ %, 1x10 ⁻⁵ % y 1x10 ⁻⁶ % de nCu, y nanopartículas (nVB y nCu). Inserto se identifican señales correspondientes con C=C y Cu-O.	79
Figura 30. Micrografías SEM (magnificación, mapeo EDX de cobre (rojo) y análisis de elementos en híbridos nanocompuestos cargados con 15% de nVB y modificados con 1x10 ⁻⁴ %, 1x10 ⁻⁵ % y 1x10 ⁻⁶ % de nCu.	80
Figura 31. Recuentos de unidades formadoras de colonia (UFC) de A.a. en la superficie del material híbrido 0,25TEOS (negro) y híbridos nanocompuestos cargados con 15% de nVB y modificados con 1x10 ⁻⁴ %, 1x10 ⁻⁵ % y 1x10 ⁻⁶ % de nCu (tonos de azul) luego de 48 horas de incubación. * p<=0,1 ** p<=0,05 *** p<=0,01 **** p<=0,001.	82
Figura 32. Curvas de liberación de calcio (A) y cobre (B) de híbridos nanocompuestos cargados con 15% de nVB y modificados con 1x10 ⁻⁴ %, 1x10 ⁻⁵ % y 1x10 ⁻⁶ % de nCu, luego de 14 días de incubación en buffer TRIS a pH 7,4.	84

Figura 33. Representación esquemática propuesta de la estructura e interacciones intermoleculares del material híbrido nanocompuesto conformado por una matriz híbrida de PTHF/GPTMS/TEOS cargada con nanopartículas de VB y nCu.	87
---	----

Índice de tablas.

Tabla 1. Composiciones estudiadas en la síntesis de híbridos Sílice/PTHF y híbridos nanocompuestos Sílice/PTHF/nVB.	21
Tabla 2. Primera optimización de síntesis de materiales híbridos nanocompuestos con nVB y nCu.....	22
Tabla 3. Segunda optimización de síntesis de materiales híbridos nanocompuestos con nVB y nCu.....	22
Tabla 4. Tercera optimización de síntesis de materiales híbridos nanocompuestos con nVB y nCu.	22
Tabla 5. Valores de temperaturas de transición vítrea (Tg) y cristalización (Tc) de los materiales híbridos flexibles obtenidas mediante análisis calorimetría diferencial de barrido (DSC).....	48
Tabla 6. Temperaturas de descomposición y porcentaje de pérdida de peso de 5% (T1) y 50% (T2) de los materiales híbridos obtenidos mediante análisis termogravimétrico (TGA).....	50

Tabla 7. Desplazamientos químico-isotrópicos del ^{29}Si (δ_{iso}) y porcentaje de abundancia (f) de las especies de silicio T y Q y porcentaje de Dc de los materiales híbridos flexibles.	53
Tabla 8. Asignación de las señales FTIR mostrados en la Figura 14 de los materiales híbridos flexibles y del nVB.	55

Resumen.

En las terapias de regeneración de tejido óseo, el autoinjerto es el estándar de oro, pero presenta ciertas limitaciones como su disponibilidad y alta morbilidad del sitio donante. De la misma forma los actuales aloinjertos comerciales son materiales principalmente osteoconductivos, sin tener capacidad osteoinductora. Por otro lado, el vidrio bioactivo (VB) es una biocerámica conocida por ser osteoinductora, sin embargo, es un material frágil mecánicamente cuando se utiliza como bloques sólidos o membranas. Lo anterior ha dado origen a una nueva clase de biomateriales conocidos como híbridos, que son similares al VB, pero con una estructura inorgánica-orgánica que les otorga flexibilidad mecánica. A pesar de que los híbridos resuelven el problema de la fragilidad que presenta el VB, los híbridos reportados hasta ahora no exhiben la capacidad osteoinductora del VB; tampoco presentan propiedades antibacterianas. En este trabajo de tesis, se estudió la síntesis de un material híbrido flexible osteoinductor, utilizando para ello las propiedades de nanopartículas de vidrio bioactivo (nVB). Además, se estudió generar propiedades bifuncionales osteoinductoras-antibacterianas en el material, haciendo uso para ello las propiedades de las nanopartículas de cobre (nCu) combinadas con las de nVB.

Metodología: Se realizó la síntesis de nVB y se utilizaron nCu (comerciales), para sintetizar híbridos mediante técnica sol-gel y utilizando tetrahidrofurano (THF) como componente orgánico. La estructura y otras propiedades de los materiales se caracterizó mediante FTIR-ATR, ^{29}Si MAS NMR, SEM-EDX, AFM, DMA, DSC, TGA, DLS y

NTA. Los híbridos se evaluaron respecto a su bioactividad en líquido corporal simulado (SBF), su citocompatibilidad, capacidad osteoinductora, y sus propiedades antibacterianas *in vitro*.

Resultados: Se presentan los primeros materiales híbridos inorgánicos/orgánicos SiO₂/PTHF, híbridos nanocompósitos SiO₂/PTHF/nVB y SiO₂/PTHF/nVB/nCu sintetizados mediante la técnica sol-gel, con propiedades mecánicas de flexibilidad, bioactividad en SBF, citocompatibilidad, propiedades osteoinductoras en hDPSC y propiedades antibacterianas frente a *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*.

Conclusión: Los materiales híbridos nanocompósitos flexibles son bioactivos y presentan propiedades osteoinductivas y antibacterianas *in vitro*. Este nuevo material híbrido puede satisfacer la necesidad clínica de injertos óseos sintéticos que puedan soportar cargas cíclicas. A pesar de su baja degradabilidad tiene proyecciones en regeneración ósea, con posibilidad de combinarse con otros materiales imprimibles 3D y compuestos bioactivos para obtener propiedades mejoradas.

Abstract.

In bone tissue regeneration therapies, autograft is the gold standard, but it has certain limitations such as its availability and high morbidity of the donor site. In the same way, current commercial allografts are mainly osteoconductive materials, without having osteoinductive capacity. On the other hand, bioactive glass (BG) is a bioceramic known to be osteoinductive; however, it is a mechanically brittle material when used as solid blocks or membranes. This has given rise to a new class of biomaterials known as hybrids, ~~which are~~ like BG, but with an inorganic-organic structure that gives them mechanical flexibility. Even though the hybrids solve the problem of fragility presented by BV, the hybrids reported so far do not exhibit the osteoinductive capacity of BG; They also do not have antibacterial properties. In this thesis work, the synthesis of a flexible osteoinductive hybrid material was studied using the properties of bioactive glass nanoparticles (nBG). In addition, the study focuses on the generation of bifunctional osteoinductive-antibacterial properties in the material, using the properties of copper nanoparticles (nCu) combined with those of nBG.

Methodology: The synthesis of nBG was carried out, and nCu (commercial) were used to synthesize hybrids using the sol-gel technique and using tetrahydrofuran (THF) as an organic component. The structure and other properties of the materials were characterized by FTIR-ATR, ²⁹Si MAS NMR, SEM-EDX, AFM, DMA, DSC, TGA, DLS, and NTA. Hybrids were evaluated for their bioactivity in simulated body fluid (SBF), their

cytocompatibility, osteoinductive capacity in stem cells, and their antibacterial properties in vitro.

Results: The first inorganic/organic hybrid materials SiO₂/PTHF, nanocomposite hybrids SiO₂/PTHF/nVB and SiO₂/PTHF/nVB/nCu synthesized using the sol-gel technique, with mechanical properties of flexibility, bioactivity in SBF, cytocompatibility, osteoinductive properties in hDPSC and antibacterial properties against *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*.

Conclusion: Flexible nanocomposite hybrid materials are bioactive and exhibit osteoinductive and antibacterial properties in vitro. This new hybrid material may meet the clinical need for synthetic bone grafts that can withstand cyclic loading. Despite its low degradability, it has projections in bone regeneration, with the possibility of combining it with other 3D printable materials and bioactive compounds to obtain improved properties.

1. Introducción.

1.1. Antecedentes.

El hueso es el segundo tejido más trasplantado en el cuerpo humano [1], en USA cada año se realizan aproximadamente 3 millones y medio de procedimientos de injerto óseo [2], **Según lo reportado por el** Ministerio de Salud de Chile (MINSAL) en los periodos 2016 y 2018 incluyendo ambos años, se realizaron 800 procedimientos quirúrgicos donde se utilizó hueso autólogo y 2 cirugías con injertos óseos aloplásticos (Fuente propia, vía Portal de transparencia), pero en el área privada se estima que existen cientos de procedimientos quirúrgicos no contabilizados. Los defectos óseos tienen una etiología multifactorial, el cuerpo humano puede reparar el hueso dañado sin ayuda siempre y cuando sea menor al tamaño crítico del defecto, de esta manera si un defecto posee más de 2,5 cm cursa con un mal pronóstico [3], y puede ser necesario un injerto óseo para que la regeneración se complete [4].

1.2. Reconstrucción ósea en odontología.

En el campo de la odontología, los procedimientos que requieren una mayor cantidad de tejido óseo se relacionan a cirugía de elevación de seno maxilar, y aumento de altura en **los rebordes maxilares**, pero también en cirugía maxilofacial y periodontal [5]. Para resolver esta dificultad se utilizan injertos o biomateriales con capacidad para reparar el

tejido óseo. En general este tipo de materiales óseos se clasifican en cuatro grupos: autoinjertos, aloinjertos, xenoinjertos e injertos aloplásticos [6].

El autoinjerto se considera el estándar de oro, el cual consiste en extraer tejido óseo de un lugar del cuerpo del paciente e injertarlo en el defecto del mismo paciente. Los autoinjertos tienen características osteoinductoras (reclutamiento de células inmaduras y estimulación para su diferenciación en osteoblastos), osteoconductoras (guía o soporta el crecimiento de hueso) [1] y no producen inmunogenicidad. Las desventajas de la obtención de este injerto es que se requieren dos cirugías implicando un aumento en el tiempo de recuperación, riesgo de infección, dolor, y morbilidad de los tejidos que a menudo ocurre en el sitio del donante. Además, en los autoinjertos existe la desventaja de disponer de una limitada cantidad de hueso para ser utilizado como injerto. Alternativamente, existen los aloinjertos, que corresponden a injertos de un hueso procedente de otro individuo (cadáveres), que se mantienen en bancos de tejidos y luego son procesados en un producto comercial de uso clínico. De la misma forma existen productos basados en xenoinjertos, que se producen a partir de hueso de otra especie (bovino). Sin embargo, tanto el alo como el xenoinjerto son osteoconductores, pero no osteoinductores. Además, estos injertos aumentan el riesgo de transmisión de enfermedades y una respuesta inmune desfavorable [4].

Por esta razón las alternativas de injertos basados en materiales sintéticos (aloplásticos) han generado mayor atención, debido a que no tienen limitación de cantidad, se elaboran

en su forma pura, y se pueden adicionar agentes que estimulen los mecanismos biológicos de regeneración [7].

1.3. Enfoques basados en ingeniería de tejidos y nanotecnología.

La ingeniería de tejidos (IT), entrega un enfoque en la elaboración de materiales avanzados para estimular la regeneración ósea [7]. El primer uso registrado del término "Ingeniería de tejidos" se puede encontrar en 1991 [1], [8], y se puede definir como un campo interdisciplinario entre la ingeniería de materiales, biología, química y física para mejorar o reemplazar funciones biológicas con el objetivo de regenerar el tejido, es decir, producir un tejido con características histológicas equivalentes a las presentadas originalmente por el tejido perdido y recuperar su función. La IT se basa en una tríada conceptual que involucra: un andamio, células y agentes bioactivos [9]. El andamio provee una estructura y un sustrato para el crecimiento y desarrollo de los tejidos, las células producen la formación del tejido, y los agentes bioactivos estimulan el crecimiento y diferenciación de células que se encuentran en el andamio [10].

Por otra parte, el hueso humano es un nanocompuesto orgánico-inorgánico/orgánico, donde los dos componentes principales son el mineral óseo (fase inorgánica) y el colágeno tipo I (fase orgánica), que representan 50 a 70% y 20 a 40% respectivamente, dependiendo de la ubicación ósea y fisiológica, como también del estado de salud general [11]. Visto desde la nanoescala, la estructura jerárquica del hueso humano combinada con la interacción de ambos componentes desempeña un papel fundamental en las propiedades

mecánicas [12], [13]. La resistencia a la compresión del hueso cortical (denso) es de 100 a 230 MPa, mientras que la del hueso trabeculado (esponjoso) es de 2 a 12 MPa [4]. El mineral óseo está compuesto principalmente por nanocristales de hidroxiapatita carbonada [14], [15], que determinan la resistencia a la compresión y la rigidez del hueso [16]. Las fibras de colágeno tipo I tienden a constituir capas con cierta orientación y son responsables de la resistencia a la tracción [16], [17]. La complejidad de la estructura ósea hace que sea necesario desarrollar biomateriales con características avanzadas que induzcan la formación de un hueso con todos los requerimientos estructurales y funcionales.

Se han propuesto varios criterios para los biomateriales de regeneración ósea: deben presentar biocompatibilidad, promover la adhesión celular, adherirse al hueso y generar propiedades osteoinductoras. En el caso de andamios, actuar como una guía para el crecimiento óseo y por lo tanto tener una estructura porosa interconectada que permita el crecimiento celular, vascularización y el suministro de nutrientes. Además, estos biomateriales deben ser resorbibles, con una tasa de degradación controlable, y propiedades mecánicas similares a las del hueso hospedero. Desde el punto de vista clínico el biomaterial debería también ser diseñado para adaptarse a una gama de geometrías de defectos, además de ser esterilizable y cumplir con los requisitos regulatorios para su uso[18]–[21].

Con este propósito se han estudiado materiales de diferente naturaleza. Los polímeros naturales y sintéticos presentan la ventaja de propiedades mecánicas (flexibilidad) y biocompatibilidad, sin embargo, en general presentan escasa bioactividad y propiedades osteoinductoras. Por otro lado, las biocerámicas como el fosfato tricálcico o hidroxiapatita presentan buen desempeño en la reparación de defectos óseos, formando estructuras mineralizadas; aunque presentan bajos módulos de elasticidad y son biomateriales fundamentalmente osteoconductores, no son osteoinductores

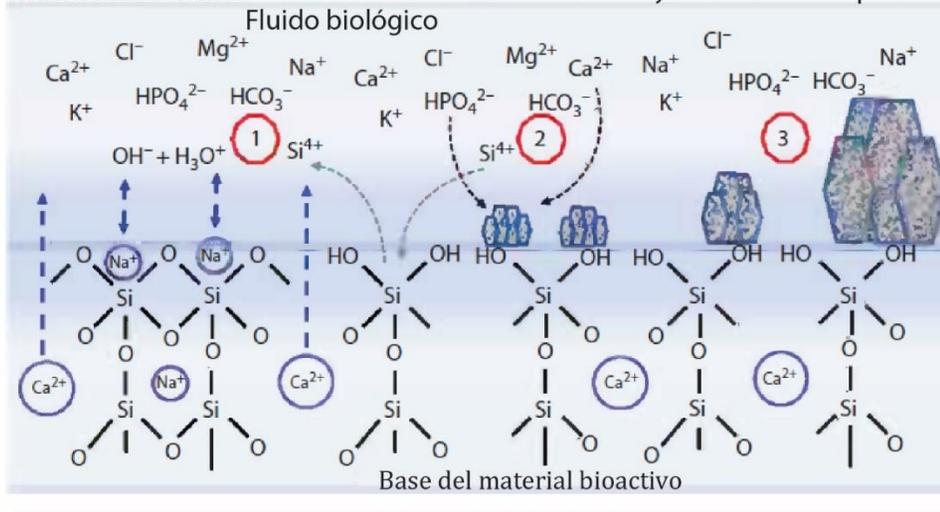
1.4. Vidrio bioactivo.

Una excepción entre las biocerámicas la constituye el **vidrio bioactivo (VB)** que presenta capacidad osteoinductora ya que puede unirse al hueso, degradarse en el cuerpo y estimular el crecimiento óseo por medio de la formación de hidroxiapatita carbonada en la superficie del vidrio, donde ocurre un intercambio iónico entre el calcio y sílice del VB y los fluidos circundantes (**Figura 1**). Además, concentraciones específicas de los iones liberados por VB estimulan la expresión de varios genes de diferenciación osteogénica [20], [22], [23]. Un VB es un material compuesto por una red amorfa de óxido de silicio

(SiO₂) que contiene ciertas cantidades de iones fosfatos y calcio.

A) Mecanismo de acción químico

1. Intercambio iónico. 2. Nucleación. 3. Cristalización y crecimiento de apatita.



B) Mecanismo de acción biológico

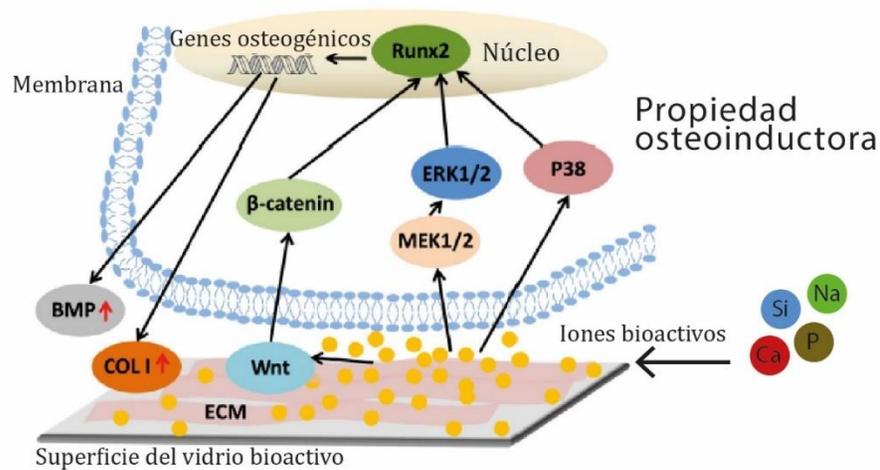


Figura 1. Mecanismos propuestos de acción del vidrio bioactivo: **A)** mecanismo químico mediante **las etapas de la** formación de apatita [24] y **B)** mecanismo biológico **por la influencia de ciertos iones bioactivos que producen** la propiedad osteoinductora [25].

Una composición típica de un VB es la del producto comercial Bioglass®: 45% SiO₂ - 24.5% Na₂O - 24.5% CaO - 6% P₂O₅, (**Figura 2**) desarrollado por el profesor Larry Hench a principios de los años setenta [26].

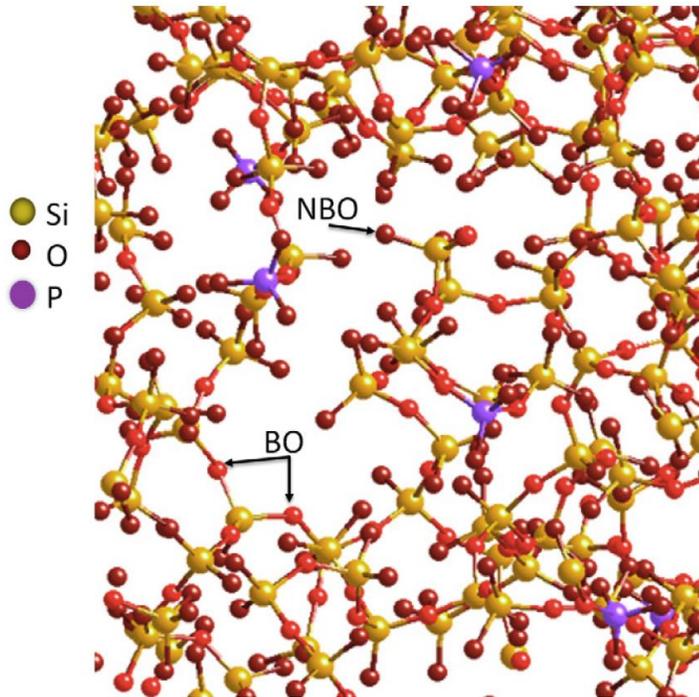


Figura 2. Representación esquemática propuesta de la estructura molecular del Bioglass 45S5 [20].

Bioglass® es un producto aprobado por la FDA para varias aplicaciones médicas y odontológicas, encontrándose con nombres comerciales como PerioGlas® (partículas 90 a 700 µm) o NovaBone® [27], [28].

A pesar de las excelentes propiedades biológicas del VB, existen limitaciones para fabricar piezas macroscópicas de VB, tales como andamios 3D o bloques del material que

se puedan implantar en el sitio del defecto óseo [20]. Lo anterior debido a que el VB presenta una tenacidad a la fractura de $0,6 \text{ MPa/m}^2$, mientras que el hueso cortical $2\text{--}12 \text{ MPa/m}^2$ [29], por lo tanto, el VB es un material frágil y poco flexible para soportar cargas mecánicas fisiológicas, como también en la manipulación quirúrgica al ser adaptado en los defectos óseos con formas irregulares.

Un enfoque que se ha estudiado para superar las limitaciones mecánicas del VB ha sido introducir partículas de VB en una matriz polimérica (compósito). En este caso el polímero aporta con la flexibilidad requerida, mientras que las partículas de VB estimulan el proceso de regeneración.

Algunos polímeros que se han utilizado como matriz para compósitos de VB son el ácido poliláctico (PLA), el ácido poliglicólico (PGA) y el copolímero de ambos (PLGA) [30], mostrando una mejora de la resistencia a la fractura.

Los mejores resultados en cuanto a bioactividad y propiedades mecánicas con compósitos de VB se han obtenido usando partículas de VB con tamaño nanométrico, ya que las nanopartículas (NPs), corresponden a partículas de 1 a 100 nm, que poseen propiedades físicas mejoradas [31]. Las nanopartículas de VB (nVB) presentan tamaños de alrededor de 70 nm, y han demostrado presentar propiedades bioactivas superiores a su contraparte micrométrica [20]. Estas mejoradas propiedades se deben en parte a la mayor área superficial por unidad de masa del nVB, lo cual potencia la propiedad osteoinductora. Varios trabajos de andamios cargados con nVB han demostrado que aceleran el proceso

de regeneración ósea [32], [33], lo cual implica que se reduzcan los tiempos de los tratamientos de reconstrucción ósea y se produzca un tejido de calidad superior respecto a otras biocerámicas. También se ha demostrado que las partículas de nVB mejoran las propiedades de osteointegración de la superficie de implantes dentales. [34]–[36].

1.5. Vidrios bioactivos híbridos.

A pesar de que los andamios nanocompuestos han presentado buen desempeño *in vitro* e *in vivo*, algunas propiedades del polímero pueden ser contrapuestas. Un polímero sintético de excelentes propiedades mecánicas puede tener una lenta tasa de biodegradabilidad, mientras que los polímeros naturales se caracterizan por ser muy biodegradables, pero en algunos casos no presentan las propiedades mecánicas deseadas. Por este motivo se ha mantenido el interés por desarrollar **vidrios bioactivos** que cumplan con los requerimientos mecánicos de flexibilidad sin la necesidad de que sean combinados con otro material (polímero). De esta forma en los últimos años se ha estudiado el desarrollo de **VB híbridos**, esto es una nueva generación de vidrios bioactivos que resultan de la **unión covalente** entre la estructura inorgánica del vidrio y la de un polímero. En 1999 Plinio Innocenzi y su grupo, propusieron una ruta sintética para producir híbridos usando un alcóxido y un silano [37]. Posteriormente en el año 2000 Lei Ren, realizó la síntesis y caracterización del primer híbrido de sílice-gelatina [38].

Estos híbridos se clasifican como clase II porque la estructura inorgánica de sílice del vidrio contiene segmentos de cadenas orgánicas de polímeros unidas covalentemente a la

red de sílice (**Figura 3**), lo cual se distingue de una simple mezcla física entre una cerámica y un polímero [39]. Así, en un híbrido, los componentes inorgánicos y orgánicos no se diferencian por sobre la escala submicrométrica, ya que interactúan y forman una red molecular reticulada que otorga **propiedades de flexibilidad** que no posee el material de vidrio puro [20], [40].

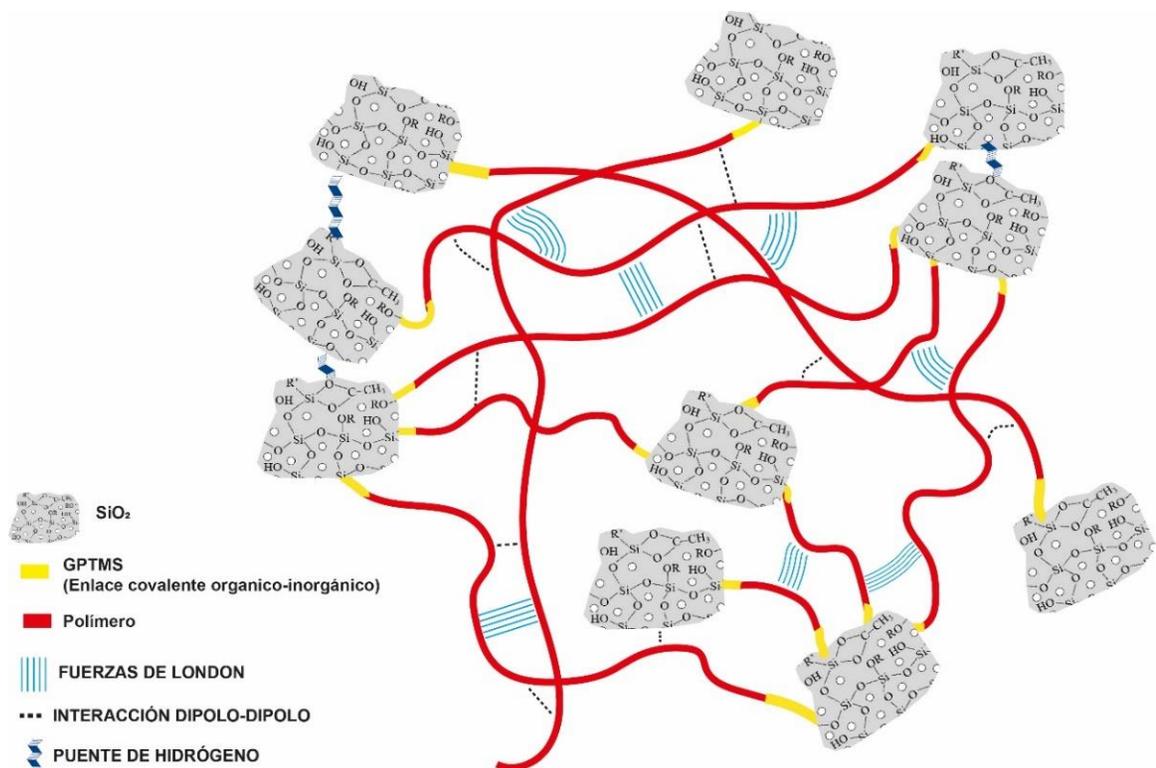


Figura 3. Representación esquemática de la estructura orgánica – inorgánica de un material híbrido. En la imagen se representa la red de sílice (SiO₂) (gris) y los segmentos de las cadenas del polímero PTHF (rojo) unidos por **enlaces covalentes (amarillo)** producidos por el agente de acoplamiento GPTMS. Además, se muestran otras **posibles interacciones moleculares en la estructura del híbrido a través de puentes de hidrógeno, fuerzas dipolo-dipolo y de London.**

Los híbridos resultan de la formación simultánea de las fases orgánica (polimerización) e inorgánica y una co-condensación [39], y se caracterizan por tener propiedades mecánicas mejoradas (como p. ej: alta tenacidad) y una degradación continua del componente orgánico e inorgánico [20], [30], [40]–[43].

La preparación de los materiales híbridos se realiza utilizando la técnica de síntesis conocida como “sol-gel”. En esta técnica se producen materiales sólidos a partir de moléculas pequeñas, en donde monómeros silíceos existentes en una solución coloidal (sol) actúan como precursores de una red integrada (gel) de partículas o polímeros reticulados [44].

Los híbridos se pueden sintetizar directamente usando un polímero que contiene silano, como por ejemplo, el polidimetoxisilano (PDMS) usado como agente de acoplamiento entre la red de sílice y el polímero [20], [41]. Otro agente de enlace para las fases orgánica-inorgánica es el silano 3-glicidoxipropil trimetoxisilano (GPTMS), y se encuentra entre los agentes de acoplamiento más reportado en la funcionalización de polímeros para formar híbridos [40], [43], [45]–[47]. El GPTMS contiene un anillo epoxi en un extremo para el ataque nucleofílico y tres grupos metoxisilano en el otro extremo para la condensación de la red silícea [48], [49]. Por lo tanto, se pueden utilizar los anillos epoxi del GPTMS para funcionalizar un polímero que contiene grupos nucleofílicos, para incorporarse en el proceso sol-gel con el precursor de sílice a través de los grupos de metoxisilano hidrolizados [20], [41].

La versatilidad que entrega el híbrido se obtiene al controlar la razón inorgánica/orgánica, la relación molar del polímero, el tipo de silano, así como otras variables de síntesis. La fracción polimérica de un híbrido posee un peso molecular variable, que le otorga propiedades mecánicas y tasas de degradación adaptadas a las necesidades del tejido [40], [43], [45], [50]. Sin embargo, se deben tomar algunas consideraciones para obtener un híbrido sol-gel inorgánico orgánico [20], [41]. Un punto crítico es la selección del polímero, el cual debe ser soluble en el sistema sol-gel. Además, debe poseer grupos funcionales nucleofílicos que puedan enlazarse covalentemente al agente de unión, como $-OH$, $-COOH$ o $-NH_2$, ya que estos grupos se acoplan al paso de terminación en la reacción de polimerización catiónica de apertura de anillos [42]. Los polímeros que muestran una degradación autocatalítica no son buenos candidatos para la síntesis híbrida, ya que pueden ser susceptibles a un cambio de pH y pueden degradarse rápidamente, lo que lleva a la pérdida de propiedades mecánicas [20][38][48]. Por lo tanto, los polímeros que conducen la degradación enzimática son deseables debido a la tasa de degradación lineal [20]. Realizando una revisión de la literatura, se han estudiado varios polímeros para obtener mediante sol-gel híbridos inorgánicos-orgánicos con sílice, tales como el poli (metil metacrilato) (PMMA) [49] [50], gelatina [38], [40], [48], poli (γ -ácido glutámico) (γ -PGA)[43], [45], [54], quitosano [55]–[57], alginato [47], poli ϵ -caprolactona (PCL) [58], [59], politetrahydrofurano (PTHF) [60], entre otros [61], [62].

Uno de los polímeros que logra la funcionalización híbrida es la gelatina, polímero natural que se deriva del colágeno, y se utiliza comúnmente para productos farmacéuticos y aplicaciones médicas por su biodegradabilidad [63], [64] y biocompatibilidad [41]. La gelatina ha sido estudiada en la elaboración de híbridos, ya que se puede funcionalizar mediante la interacción de sus grupos amida y los enlaces siloranos del GPTMS (**Figura 4**), resultando en un híbrido bioactivo y biocompatible [40], [46], [65].

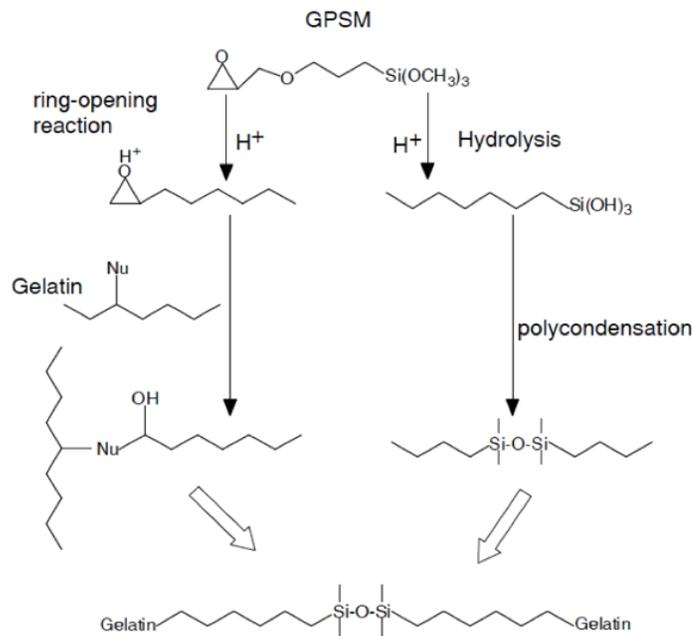


Figura 4. Representación de híbridos de gelatina-siloxano, derivado de la hidrólisis y la policondensación de GPTMS con agua y la reacción de apertura de anillo de GPTMS con gelatina [38].

Respecto al desempeño biológico, los VB híbridos han demostrado en general ser citocompatibles y formar apatita tipo ósea cuando son inmersos en fluido biológico (SBF).

Sin embargo, las propiedades osteoinductoras de estos materiales han sido escasamente estudiadas. En el 2002, Lei Ren observó un aumento de actividad de fosfatasa alcalina (ALP) en preosteoblastos cultivados con un híbrido de sílice-gelatina dopado con calcio [48]. Roya Ravarian y su grupo, detectaron la formación de matriz mineralizada mediante tinción de rojo alizarina, en preosteoblastos cultivados con un híbrido de sílice-PMMA a los 28 días de incubación [66]. Por lo tanto, la revisión de la literatura indica que no se ha logrado la obtención de híbridos con una capacidad osteoinductora equivalente a las conocidas para el VB.

Lo anterior representa un desafío científico respecto a producir materiales híbridos con propiedades osteoinductoras comparables a las de VB, pero reteniendo las propiedades mecánicas de flexibilidad que otorgan los híbridos. En este contexto, el uso de nanopartículas de vidrio bioactivas (nVB) podría permitir preparar un híbrido con propiedades osteoinductoras superiores. Debido a su tamaño nanométrico, las nVB se podrían incorporar en la matriz del híbrido sin afectar sustancialmente sus propiedades mecánicas y transferirle la bioactividad conocida de las nVB. Al respecto no se reportan estudios que incorporen nVB u otro tipo de nanopartícula en un material híbrido, por lo que constituye uno de los aspectos centrales de esta propuesta. Además los híbridos de PTHF-sílice han demostrado ser citocompatibles [40], [59], [65], [67] y podrían ser utilizados como sistemas para la elaboración de híbridos modificados con nanopartículas.

Otro aspecto relevante de los procedimientos de reconstrucción ósea es el control de infecciones asociadas a las patologías óseas y la prevención de infecciones post implantación del biomaterial. Por este motivo, es deseable que el biomaterial que se utilice para reconstrucción ósea también posea propiedades antibacterianas. En este contexto se ha propuesto actualmente el desarrollo de biomateriales bifuncionales, con capacidad para reparar el tejido óseo y que simultáneamente presenten propiedades antimicrobianas. De este modo se ha reportado la preparación de un híbrido de sílice-quitosano cargado con gentamicina, demostrando una acción antibacteriana mediante halos de inhibición [68]. Sin embargo, debido al desarrollo de resistencia bacteriana frente a los antibióticos, surge el interés por utilizar nanopartículas metálicas como una nueva generación de agentes antibacterianos. Las NPs de cobre (nCu) han demostrado excelentes propiedades antibacterianas frente a diferentes patógenos incluido bacterias y levaduras orales [69], además de poseer un efecto “antifouling” que reduce la formación de biopelículas bacterianas [70], [71]. Sin embargo, hasta el momento no se ha reportado el uso de nCu u otro tipo de nanopartícula antibacteriana en híbridos, lo cual permitiría producir un material híbrido con propiedades osteoinductoras y antibacterianas, que estimule la reparación del tejido óseo y simultáneamente prevenga el desarrollo de infecciones. Lo anterior representa varios desafíos científicos, respecto a lograr incorporar una concentración de nCu en el híbrido que produzca las propiedades antibacterianas

deseadas, pero que no altere la citocompatibilidad ni las propiedades mecánicas de flexibilidad del biomaterial.

2. Hipótesis y objetivos de la investigación.

2.1. Hipótesis:

Materiales híbridos sintetizados con nanopartículas de vidrio bioactivo y de cobre permiten producir biomateriales con propiedades osteoinductoras y antibacterianas *in vitro*.

2.2. Objetivo general:

Sintetizar biomateriales híbridos en base a nanopartículas de vidrio bioactivo y de cobre con propiedades osteoinductoras y antibacterianas *in vitro*.

2.3. Objetivos específicos:

1. Sintetizar y caracterizar la estructura de materiales híbridos puros (sílice-PTHF) y cargados con nVB.
2. Determinar la bioactividad de los híbridos por su capacidad para formar apatita tipo ósea en condiciones fisiológicas simuladas.
3. Evaluar la citocompatibilidad de los híbridos cargados con nVB.
4. Determinar la capacidad de los híbridos cargados con nVB para estimular la diferenciación celular osteogénica *in vitro*.
5. Optimizar la **composición** de híbridos bifuncionales cargados con nVB y nCu **en función de su citocompatibilidad**.

6. Determinar la capacidad antibacteriana de los híbridos cargados con nVB y nCu frente a *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*.

3. Materiales y métodos.

3.1. Síntesis de híbridos sílice- PTHF y híbridos sílice- PTHF cargados con nanopartículas de nVB y nCu.

La síntesis de nVB, se realizó utilizando un protocolo estandarizado y reportado por el Laboratorio de Nanobiomateriales [70], [72]–[74]. Los híbridos se prepararon con tetrahidrofurano (THF), utilizando la técnica sol-gel [59], [75], [76]. En esta técnica la síntesis química se realiza en dos fases. En la fase orgánica ocurre la polimerización catiónica por apertura de anillos, compuesta por 16,2 ml de THF en solución al 99,9% (Sigma-Aldrich), 440 µl de glicidil propil trimetoxi silano (GPTMS) en solución >98% (Sigma-Aldrich) y como catalizador 110 µl de etereato trifluoruro de boro (BF₃OET₂) en solución >98% (Sigma-Aldrich). En la fase inorgánica se utilizó tetraetil ortosilicato (TEOS) en solución >98% (Sigma-Aldrich) en volumen dependiendo de la composición (ver tabla 1) y 100 µl de solución de ácido clorhídrico (HCl) 1M preparada desde HCl en solución al 37% (Sigma-Aldrich). Ambas fases se mantuvieron en agitación durante 90 minutos, la fase orgánica se mantuvo en agitación durante 10-15 minutos, luego se incorpora el catalizador BF₃OET₂ comenzando una reacción exotérmica, y la fase inorgánica se incorpora lentamente a una velocidad de <100 gotas/min a la fase orgánica. Luego las soluciones se mantienen en un proceso de post-curado durante 3 días y un periodo de volatilización del solvente hasta 20 días a 40°C, pero se puede utilizar un horno al vacío para agilizar dicho proceso a 3 días.

Para los híbridos cargados con NPs, se utilizó el mismo procedimiento antes descrito y dispersando las NPs en la mezcla obtenida con ambas fases mediante agitación por 90 minutos y sonicación por 15 minutos. **Para** los híbridos cargados con nVB se estudiaron contenidos en peso de nanopartículas de 2,5% a 15 % (**Tabla 1**). Las composiciones óptimas obtenidas con los híbridos de nVB se utilizaron para preparar híbridos nanocompuestos cargados con nVB y nanopartículas de cobre (nCu). Para ello se evaluó la adición de nCu en contenidos comprendidos entre $1 \times 10^{-6}\%$ a 1 %. Se utilizaron nCu en presentación en polvo de la empresa Nanotec SpA.

Tabla 1. Composiciones estudiadas en la síntesis de híbridos Sílice/PTHF y híbridos nanocompósitos Sílice/PTHF/nVB.

Muestra	TEOS [mmol]	nVB (% peso)
2TEOS	2,0	0
1TEOS	1,0	0
2,5nVB/1TEOS	1,0	2,5
5nVB/1TEOS	1,0	5,0
10nVB/1TEOS	1,0	10
0,5TEOS	0,5	0
5nVB/0,5TEOS	0,5	5,0
10nVB/0,5TEOS	0,5	10
15nVB/0,5TEOS	0,5	15
0,25TEOS	0,25	0
5nVB/0,25TEOS	0,25	5,0
10nVB/0,25TEOS	0,25	10
15nVB/0,25TEOS	0,25	15

**Las concentraciones de THF y GPTMS se mantuvieron constantes.*

Tabla 2. Primera optimización de síntesis de materiales híbridos nanocompuestos con nVB y nCu.

Optimización 1	TEOS [mmol]	nCu (% en peso)	nVB (% en peso)
0,25nCu/0,25TEOS	0,25	0,25	0
0,5nCu/0,25TEOS	0,25	0,5	0
0,25nCu/5nVB/0,5TEOS	0,5	0,25	5
0,5nCu/5nVB/0,5TEOS	0,5	0,5	5
0,25nCu/10nVB/1TEOS	1	0,25	10
0,5nCu/10nVB/1TEOS	1	0,5	10
0,25nCu/15nVB/0,5TEOS	0,5	0,25	15
0,5nCu/15nVB/0,5TEOS	0,5	0,5	15

Tabla 3. Segunda optimización de síntesis de materiales híbridos nanocompuestos con nVB y nCu.

Optimización 2	TEOS [mmol]	nCu (% en peso)	nVB (% en peso)
0,1nCu/15nVB/0,5TEOS	0,5	0,1	15
0,05nCu/15nVB/0,5TEOS	0,5	0,05	15
0,03nCu/15nVB/0,5TEOS	0,5	0,03	15

Tabla 4. Tercera optimización de síntesis de materiales híbridos nanocompuestos con nVB y nCu.

Optimización 3	TEOS	nCu (% en	nVB (% en
	[mmol]	peso)	peso)
1×10^{-4} nCu/15nVB/0,5TEOS	0,5	1×10^{-4}	15
1×10^{-5} nCu/15nVB/0,5TEOS	0,5	1×10^{-5}	15
1×10^{-6} nCu/15nVB/0,5TEOS	0,5	1×10^{-6}	15

Aquellos sistemas (sílice-PTHF) que presentaron las mejores propiedades mecánicas de flexibilidad, se seleccionaron para la realización de ensayos de bioactividad, citocompatibilidad, propiedades osteoinductoras y propiedades antibacterianas.

3.2. Técnicas de caracterización:

La presente tesis requirió el uso de muchas técnicas de caracterización para investigar las propiedades de los materiales finales. Por lo cual, este capítulo contiene una descripción resumida de las diferentes técnicas utilizadas con el fin de explicar su principio de funcionamiento, los detalles del equipo y el propósito de su aplicación en este proyecto.

3.2.1. Espectroscopía de resonancia magnética nuclear.

La espectroscopía de resonancia magnética nuclear (**RMN**) es una técnica que utiliza el campo magnético para excitar los núcleos de los átomos en un material y medir su respuesta. Esta técnica es ampliamente utilizada en la investigación química y biológica para determinar la estructura y la dinámica de las moléculas. La **RMN** es útil para estudiar la composición, la estructura, la configuración y la distribución de los elementos químicos

en una muestra. También se utiliza para la caracterización de materiales poliméricos, sólidos, líquidos, geles, y para la identificación y cuantificación de compuestos orgánicos e inorgánicos [77].

Los espectros de RMN pueden proporcionar información detallada sobre la estructura y el enlace químico de las moléculas en las que están contenidos porque los diferentes átomos de una molécula experimentan transiciones a diferentes frecuencias [78], [79].

²⁹Si MAS RMN de estado sólido.

Debido a su naturaleza sólida semicristalina, las muestras híbridas necesitaban una investigación en estado sólido. Específicamente, la RMN de estado sólido de ²⁹Si MAS se utilizó en modo MAS de un solo pulso para obtener información cuantitativa sobre la conectividad de la red de sílice. Esto se realizó determinando la cantidad de especies de sílice unido a oxígeno (Q) y sílice unida a carbono (T), específicamente Q es un átomo de Si unido a cuatro átomos de oxígeno (como en TEOS) y T es un átomo de Si unido a un átomo de carbono y tres de oxígeno (como en GPTMS). Específicamente, el orden de las especies (n) corresponde al número de enlaces puente de oxígeno (Si-O-Si) formados por el átomo central de Si; así, las especies Qⁿ y Tⁿ corresponden a Si(O-Si)_n(OH)_{4-n} y C-Si(O-Si)_n(OH)_{3-n}, respectivamente. La RMN MAS de un solo pulso de ²⁹Si permite determinar la abundancia relativa de las especies Q_n y T_n, a partir de las cuales se puede calcular el grado de condensación de la red de sílice (D_c) con la Ecuación 1 [59]:

Ecuación 1:

$$Dc = \left(\left[\frac{4Q^4 + 3Q^3 + 2Q^2}{4} \right] + \left[\frac{3T^3 + 2T^2 + T^1}{3} \right] \right)$$

Los experimentos se llevaron a cabo a 5,64 T, en un espectrómetro Agilent DD2 (frecuencia ^1H Larmor de 243 MHz), a una frecuencia de Larmor de 48,15 MHz en una sonda de triple resonancia de 7,5 mm que funcionaba a una frecuencia de MAS de $\nu\text{MAS} = 5$ kHz. Se recopilaron 320 transitorios mediante un pulso de 90° de 8,5 μs de duración y un retraso de reciclaje de 240. Los cambios químicos de ^{29}Si se notifican con respecto a TMS (0 ppm). Todas las mediciones de ^{29}Si MAS RMN de estado sólido reportadas en la presente tesis se realizaron en el Laboratorio de Materiales Vítreos, Departamento de Ingeniería de Materiales de la Universidad Federal São Carlos (Brasil) en colaboración con los académicos Dr. Edgar Dutra Zanotto y Dr. Henrik Bradtmüller.

3.2.2. Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR).

La espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier es una técnica de análisis espectroscópico que utiliza la radiación infrarroja para caracterizar la composición y la estructura molecular de una muestra. La FTIR se basa en la absorción de radiación infrarroja por los grupos funcionales de las moléculas, que depende de su estructura y

composición. El espectro resultante representa la absorción y transmisión molecular, creando una huella digital molecular única de la muestra [80]. La técnica de FTIR es ampliamente utilizada en la investigación en áreas como: química, biología, materiales y farmacia.

En esta tesis se utilizó un FTIR-ATR Agilent Cary 630, presente en el Laboratorio de Nanobiomateriales de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile, equipado con el programa MicroLab Expert. “ATR” es el acrónimo de “Reflectancia Total Atenuada”, una técnica de muestreo que utiliza la propiedad de reflexión total interna del haz IR. La muestra está en contacto directo con un cristal ATR, caracterizado por un alto índice de refracción, de manera que cuando es atravesado por el haz IR se refleja al menos una vez en la superficie interna en contacto con la muestra.

3.2.3. Difracción de rayos X.

La difracción de rayos X (**DRX**) es un fenómeno físico que ocurre cuando los rayos X inciden en un material y se ven desviados en ángulos diferentes debido a la interferencia de las ondas de los rayos X. Esta difracción se utiliza para estudiar la estructura cristalina de materiales, ya que la posición y la intensidad de los patrones de difracción de los rayos X proporcionan información sobre la disposición espacial de los átomos en un cristal. La difracción de rayos X es una herramienta importante en la investigación de materiales, la biología y la química. Proporciona datos sobre la microestructura de un material; tanto

cualitativa como cuantitativamente, sobre la presencia, tipo y cantidad de especies cristalinas dentro de una muestra [81].

En este proyecto, se utilizó el equipo Anton Paar SAXSpoint 2.0 es un instrumento de dispersión de rayos X de ángulo bajo (SAXS), equipado con el software SAXSdrive^{MR} y el SAXSanalysis^{MR}, gracias a la colaboración de: Dr. Eduardo Soto y el Dr. Patricio Romero, pertenecientes al departamento de química orgánica y físico química de la Facultad de ciencias químicas y farmacéuticas de la Universidad de Chile.

3.2.4. Calorimetría diferencial de barrido.

La calorimetría diferencial de barrido (DSC) es una técnica termoanalítica que se utiliza para determinar las propiedades térmicas de un material cuando se somete a un tratamiento térmico específico [82]. En el análisis DSC, una muestra se compara con una referencia para calcular la diferencia en la cantidad de calor necesaria (es decir, flujo de calor) para impartir el mismo aumento de temperatura a la muestra y a la referencia. El experimento está diseñado de tal manera que la temperatura aumenta linealmente en función del tiempo. La referencia, en este caso alúmina, tiene una capacidad calorífica bien definida en el rango de temperatura a escanear. En principio básico, el calor requerido de la muestra es mayor o menor que la referencia dependiendo de si el proceso es endotérmico (por ejemplo, fusión: transición de sólido a líquido) o exotérmico (por ej., cristalización) respectivamente. Al observar la diferencia en el flujo de calor entre la muestra y la

referencia, se puede medir el calor absorbido o liberado durante dichas transiciones. Por lo tanto, el resultado del experimento es una curva que representa el flujo de calor frente a la temperatura o el tiempo.

El DSC Perkin Elmer 8000 se encuentra equipado con una balanza analítica para pesar las muestras con una masa inicial de ~ 10 mg en platos de platino para muestras los cuales se sellan una vez introducida la muestra. Se llevaron a cabo escaneos de calentamiento a 10 °C/min bajo una atmósfera de nitrógeno en el rango de temperatura de -40 a 160 °C. Todas las mediciones de DSC reportadas en la presente tesis se realizaron en el Laboratorio de química orgánica del Programa Institucional de Fomento a la Investigación (PIDi) de la Universidad Tecnológica Metropolitana gracias a la colaboración con el Prof. Dr. Rodrigo Araya Hermosilla.

3.2.5. Análisis termogravimétrico.

El análisis termogravimétrico (TGA) permite la detección cuantitativa de variaciones de peso de una muestra sujeta a un tratamiento térmico controlado. A partir de la traza de TGA, que indica el porcentaje de pérdida de masa en función de la temperatura o el tiempo, se puede extrapolar la primera derivada para determinar con precisión los puntos de inflexión de pérdida de masa. Las disminuciones de peso de la muestra pueden deberse a la pérdida de la humedad adsorbida y al quemado de las fases orgánicas.

Para determinar la estabilidad térmica de los materiales se realizó un TGA utilizando un analizador termogravimétrico (TA instruments, modelo Q50, USA). Este análisis fue

llevado a cabo masando en platos de platino para muestras por separado ~ 10 mg de las muestras en una balanza analítica. El rango de análisis fue de ~ 20 a 800 °C a una velocidad de calentamiento de 10 °C min^{-1} . Se evaluó la cantidad de contenido inorgánico en régimen dinámico de calentamiento en atmosfera de aire con un flujo de 40 ml min^{-1} . El propósito fue estimar la cantidad de fase inorgánica efectivamente incorporada en las muestras de híbridos a partir de la pérdida de peso correspondiente a su quemado: dado que la masa colocada en los platos de platino para muestras varía levemente en cada muestra, se realizaron gráficas de porcentaje de masa versus temperatura, y para una mejor visualización de los cambios se graficó la primera derivada del porcentaje de masa que indica el punto de mayor tasa de cambio en las curvas.

Todas las mediciones de TGA realizadas en la presente tesis se llevaron a cabo gracias a la colaboración del Prof. Dr. Franck Quero perteneciente al Laboratorio de nanocelulosa y biomateriales de la Facultad de ciencias físicas y matemáticas de la Universidad de Chile.

3.2.6. Microscopía electrónica de barrido con espectroscopía dispersiva de rayos X.

La microscopía electrónica de barrido (SEM) utiliza un haz de electrones dispersos, lo que permite lograr un mayor aumento con la capacidad de resolver objetos hasta la escala nanométrica. El SEM es muy poderoso para la caracterización morfológica de un material, proporcionando información sobre la morfología y la topografía de la superficie de una

muestra a través de la detección de los electrones emitidos desde la superficie de la muestra cuando es golpeada por un haz de electrones de alta energía. Se recopila una imagen SEM escaneando el haz de electrones a través de la superficie de la muestra en un patrón de cuadrícula rectangular; de esta manera, la ampliación de una imagen SEM se puede modificar cambiando el tamaño del área escaneada en la superficie de la muestra. La interacción haz-muestra produce dos tipos de electrones que se pueden detectar: electrones secundarios y electrones retrodispersados, que se utilizan en la formación de imágenes de electrones secundarios (SEI) y en la formación de imágenes de electrones retrodispersados (BEI), respectivamente. Los electrones secundarios, usados aquí, son electrones de baja energía producidos cuando el haz de electrones primario excita electrones dentro de la muestra y pierde energía en el proceso. Los electrones excitados se desplazan hacia la superficie de la muestra, sufriendo choques elásticos e inelásticos hasta alcanzar la superficie. Los electrones secundarios que provienen solo de muy poca profundidad (hasta 1,5 μm) pueden salir de la superficie y ser detectados, lo que los hace muy sensibles a la topografía; por lo tanto, los electrones secundarios pueden proporcionar información detallada sobre la forma de la superficie y las características de la muestra [83], [84]. El SEM requiere muestras montadas en trozos de aluminio con cinta de carbono conductora y, si no son naturalmente conductoras, las muestras deben pulverizarse con una capa conductora, en la presente tesis se utilizaron como capa conductora pulverizada de oro y carbono.

La microscopía electrónica generalmente se combina con un espectrómetro de energía dispersiva de rayos X (EDX). Cuando el haz de electrones primario alcanza la superficie de la muestra, también se emiten rayos X característicos: estos se derivan de la excitación y el consiguiente movimiento entre diferentes niveles de energía de los electrones de los átomos de las muestras. Por lo tanto, la radiación producida es típica del material analizado y puede ser detectada por EDX, que proporciona un análisis de la composición química de los elementos de la muestra y puede determinar sus cantidades relativas en el material.

En el presente proyecto se utilizó el SEM JEOL modelo JSM-IT 300 LV (operando desde 20kV a 2 kV, distancia de trabajo variable del procedimiento, aumento $\leq 30.000\times$) para investigar: (a) la morfología de los materiales monolíticos y (b) verificar la interpenetración de componentes orgánicos e inorgánicos a nanoescala. (p. ej. nanopartículas) y (c) medición del tamaño de las nVB sintetizadas y nCu comerciales.

Las muestras en forma de monolitos se montaron en soportes de muestras de montaje SEM de aluminio con cinta de carbón conductor y, dado que son poco conductores, era necesario recubrirlos con un revestimiento de oro de 10 nm mediante deposición catódica (Denton Vacuum Inc.) a $7,27e2$ Torr y 45 mA durante 30 s para permitir la formación de imágenes y evitar la carga de la muestra. Además, para caracterizar las nVB y nCu, el aumento del SEM varió entre $8.000\times$ a $30.000\times$. El tratamiento de las muestras en SEM, las NPs se impregnaron en una cinta de carbono y luego se recubrieron con un revestimiento de oro en las condiciones descritas.

Las imágenes SEM y análisis EDX en su gran mayoría se realizaron en el Laboratorio de microscopía electrónica de barrido de la Facultad de odontología de la Universidad de Chile. Y en el caso de algunas muestras de nanopartículas de cobre y híbridos nanocompuestos con nanopartículas de cobre, la adquisición imagenológica se realizó en el equipo de microscopía electrónica de emisión de campo (FESEM) ZEISS Gemini SEM 360 equipado con detector EDX del Programa Institucional de Fomento a la Investigación (PIDi) de la Universidad Tecnológica Metropolitana gracias a la colaboración del Dr. Rodrigo Araya Hermosilla.

3.2.7. Ensayos de compresión.

Los ensayos de compresión uniaxiales consisten en aplicar, respectivamente, una fuerza de compresión en una muestra sólida en forma de paralelepípedo de ~3x3x4 mm y medir la respuesta del material hasta el límite máximo del equipo de 1 mm o la fractura del material. La **Figura 5** muestra la máquina de microensayo DEBEN (Suffolk, Reino Unido) usando una celda de carga de 200 N en modo de compresión a una velocidad de 1,5 mm/min presente en el laboratorio de Nanobiomateriales de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile.

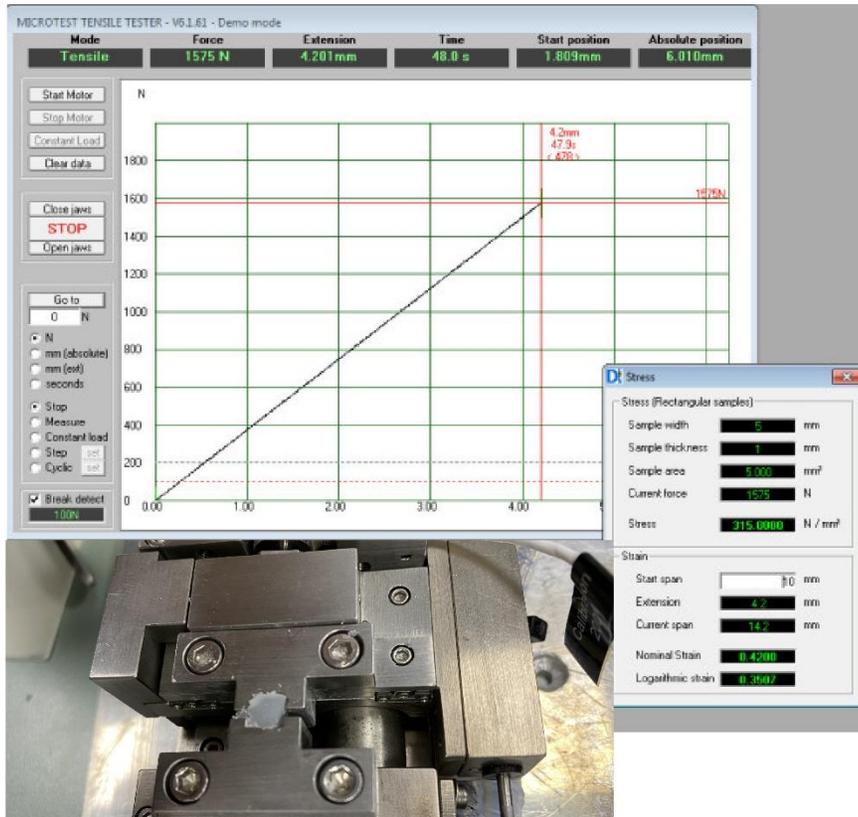


Figura 5. Muestra de material híbrido montada en la máquina de microensayo mecánico DEBEN para la realización de un ensayo de compresión y el software mostrando la curva esfuerzo-deformación del material.

Después de haber medido por cuadruplicado cada muestra, se mide la relación fuerza-desplazamiento del material y se convierte en una relación tensión-deformación, a partir de la cual se obtienen la tensión de máxima a la fractura, la deformación máxima en la fractura y el módulo de Young [85].

3.2.8. Análisis mecánico dinámico.

El análisis mecánico dinámico (DMA) permite la caracterización de las propiedades viscoelásticas de un material en respuesta a la carga vibratoria en función de la frecuencia, el estrés, el tiempo, la temperatura, la atmósfera o una combinación de estos parámetros. El DMA funciona aplicando una deformación sinusoidal a una determinada frecuencia a una muestra de geometría conocida. La prueba se puede controlar en tensión o deformación e informa cambios en la rigidez y el amortiguamiento de la muestra [82]. En la presente tesis el ensayo DMA se realizó en piezas con una geometría de 50x13x3mm, se les aplicó una deformación sinusoidal durante 15 segundos, en un rango de temperatura de 20 a 50°C. Con el objetivo de: 1) evaluar su comportamiento viscoelástico, y 2) comparar la rigidez de diferentes composiciones de materiales híbridos.

A partir de la medición de la tensión y el estrés sinusoidal en un número predefinido de ciclos, es posible calcular el módulo de almacenamiento (G'), que es una expresión de la energía almacenada en la parte elástica, el módulo de pérdida (G''), que está relacionado con la energía disipada como calor durante la deformación, que representa la parte viscosa, y la tangente de pérdida ($\tan(\delta)$, como amortiguación), que representa la contribución relativa de la parte viscosa frente a las propiedades elásticas [82].

Tanto G'' como $\tan\delta$ están asociados con la fricción interna y son sensibles a diferentes tipos de movimientos moleculares, procesos de relajación, transiciones, morfología y otras heterogeneidades estructurales (p. ej: presencia de nanopartículas).

Todas las mediciones en DMA de la presente tesis fueron realizadas gracias a la colaboración del Mg. Ariel Nenen Huenchul, perteneciente al Laboratorio de Polímeros del Instituto de ciencias químicas de la Universidad Austral de Chile.

3.2.9. Nanosight.

El Nanosight (NS300 Malvern), se basa en la tecnología de análisis de rastreo de nanopartículas (NTA), utiliza las propiedades tanto de dispersión de luz como de movimiento Browniano para obtener mediciones de concentración y distribución del tamaño de las partículas en una suspensión líquida [86], en la presente tesis se utilizó agua. Un láser pasa a través de la cámara de la muestra, y las partículas en suspensión en el camino de este haz dispersan la luz de tal manera que pueden verse fácilmente a través de un microscopio de un aumento de 40X en el que se encuentra montada una cámara digital. La cámara digital funciona a 30 cuadros por segundo (CPS) y captura un video de las partículas en su movimiento Browniano natural. El software rastrea las partículas individualmente y por medio de la ecuación de Stokes-Einstein calcula el diámetro hidrodinámico de cada una de ellas [87].

Se realizaron tres diluciones, $10 \text{ mg} \times \text{ml}^{-1}$, $1 \text{ mg} \times \text{ml}^{-1}$ y $0,1 \text{ mg} \times \text{ml}^{-1}$ hasta obtener una solución con una cantidad rastreable de nanopartículas por el método NTA, se utilizaron índices de refracción de 1,56 y 1,54 [88], [89] para las nVB y nCu respectivamente, y tres mediciones para cada tipo de nanopartículas las cuales se promediaron y se obtiene la desviación estándar ($\pm \text{SD}$) tanto del tamaño como de la concentración de nanopartículas.

En la presente tesis las mediciones de Nanosight se realizaron gracias a la colaboración del Prof. Dr. Felipe Oyarzun Ampuero, perteneciente al Departamento de ciencias y tecnología farmacéuticas, Facultad de ciencias químicas y farmacéuticas de la Universidad de Chile.

3.2.10. Dispersión dinámica de la luz.

La dispersión dinámica de la luz (DLS) se basa en el movimiento browniano de las partículas dispersas. Cuando las partículas se dispersan en un líquido, se mueven al azar en todas las direcciones. El principio del movimiento browniano es que las partículas chocan constantemente con las moléculas del solvente. Estas colisiones hacen que se transfiera una cierta cantidad de energía, lo que induce el movimiento de las partículas. La transferencia de energía es más o menos constante y, por lo tanto, tiene un mayor efecto sobre las partículas más pequeñas. Como resultado, las partículas más pequeñas se mueven a mayor velocidad que las partículas más grandes. Si conoce todos los demás parámetros que influyen en el movimiento de las partículas, puede determinar el diámetro hidrodinámico midiendo la velocidad de las partículas.

En la presente tesis el tamaño y las distribuciones de tamaño de las nanopartículas de nVB y nCu se midieron mediante DLS con el equipo Zeta Sizer Nano (Malvern) a 25°C y a un ángulo de dispersión de 90° usando una muestra con la misma dilución utilizada para el Nanosight. Con índices de refracción de 1,56 y 1,54 [88], [89] para las nVB y nCu respectivamente. El valor promedio ponderado por intensidad se registró como el

promedio de tres mediciones, y los resultados se expresaron con desviación estándar (\pm SD). Todas las mediciones de DLS reportadas en la presente tesis se realizaron en el Laboratorio de química orgánica del Programa Institucional de Fomento a la Investigación (PIDi) de la Universidad Tecnológica Metropolitana gracias a la colaboración del Dr. Rodrigo Araya Hermosilla.

3.2.11. Caracterización del Potencial zeta de nVB y nCu relativo al pH en PBS.

Potencial zeta es una medida de la carga eléctrica en la superficie de una partícula en una suspensión o solución coloidal. Es la diferencia de potencial entre la doble capa eléctrica que rodea una partícula y la solución, está determinada por el equilibrio de las fuerzas de atracción y repulsión entre las partículas y el disolvente circundante. El potencial zeta ayuda a predecir la estabilidad de las suspensiones coloidales y se usa en una variedad de aplicaciones, incluida la administración de fármacos, el tratamiento de aguas residuales y la ciencia de los alimentos [90]. Para moléculas y partículas que son lo suficientemente pequeñas, un potencial ζ alto (negativo o positivo) otorga estabilidad, es decir, las partículas resistirán la agregación [91]. Cuando el potencial es bajo, la atracción supera a la repulsión y las partículas tienden a agregarse. Por lo tanto, las partículas con potencial ζ alto (negativo o positivo) se estabilizan eléctricamente, mientras que las partículas con potencial ζ bajo tienden a agregarse o flocular. También se ha sugerido que los valores negativos del potencial ζ tienen un efecto favorable significativo sobre la unión y proliferación de las células óseas

[92]. Por lo tanto, además del efecto del potencial ζ sobre el comportamiento de las partículas en ambientes acuosos, también afecta el comportamiento celular alrededor de las partículas [92]. En la presente tesis se mide el potencial ζ de las nVB y nCu, en PBS en los siguientes pH: 5, 6, 7,4, 8 y 10, mediante el equipo Zeta Sizer Nano (Malvern) a 25°C, con una cubeta de potencial ζ DTS1070. El valor promedio ponderado por intensidad se registró como el promedio de tres mediciones, y los resultados se expresaron con desviación estándar (\pm SD). Las mediciones de DLS y potencial ζ se realizaron gracias a la colaboración del Dr. Rodrigo Araya Hermosilla del Programa Institucional de Fomento a la Investigación (PIDi) de la Universidad Tecnológica Metropolitana.

3.2.12. Rugosidad de la superficie de los materiales híbridos mediante microscopía de fuerza atómica.

El microscopio de fuerza atómica (AFM) (**Figura 6**) mide la fuerza entre la punta y la muestra, lo cual se da en función de la distancia punta-muestra. La fuerza entre ambas se puede medir en un modo estático usando la desviación como un resorte plano en forma de paralelepípedo (cantiléver) que presenta una punta en su extremo. La desviación del nivel se mide utilizando un rayo láser reflejado desde la parte posterior del cantiléver hacia un fotodiodo dividido. La superficie se mapea mientras se escanea cambiando la posición z de la punta o muestra (mediante la platina de muestras). La señal z que mantiene una distancia punta-muestra constante se registra como señal topográfica, que es la utilizada en la presente tesis. Las mediciones de AFM se realizaron gracias a la colaboración de la

Dra. Natalia Hassan López del Programa Institucional de Fomento a la Investigación (PIDi) de la Universidad Tecnológica Metropolitana.

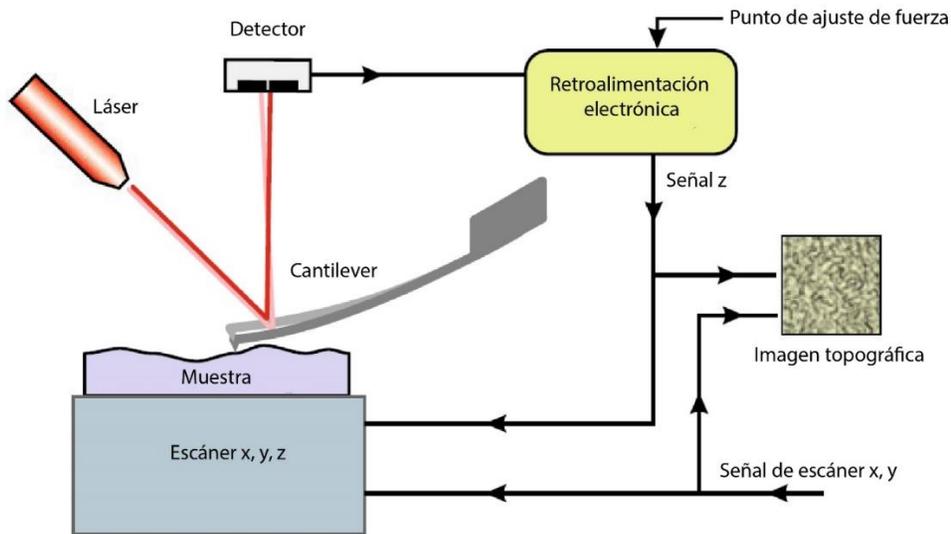


Figura 6. Representación esquemática del principio de funcionamiento de un microscopio de fuerza atómica (AFM) en modo estático [93].

3.2.13. Liberación de iones calcio y cobre.

La serie de materiales híbridos sintetizados (**Tabla 4**) se sumergieron en 15 ml de agua tamponada con buffer TRIS a pH 7,4, de forma independiente durante 1, 3, 5, 7 y 10 días, y se realizó la medición de los iones de calcio y cobre presentes en las soluciones mediante electrodos específicos para cada ion.

3.3. Ensayo de degradación de los híbridos.

Se realizó un ensayo para evaluar la degradabilidad de los materiales híbridos, se registró su pérdida de peso luego de la inmersión de muestras individuales de 5 x 5x 5 mm en buffer fosfato (PBS) (pH 7,4 y 37°C) a 0,5, 1, 3, 7, 20 y 28 días. Luego las muestras se congelaron a -20°C y se secaron mediante liofilización (Ilshin BioBase, Corea del Sur) a -60 °C durante 24 horas, y pesaron en una balanza analítica, los resultados se expresaron en porcentaje de pérdida de masa por la ecuación (2) [94]:

Ecuación 2:

$$\%Degradación = \left(\frac{W_0 - W_t}{W_0} \right) \times 100\%$$

3.4. Ensayos de bioactividad de líquido corporal simulado (SBF).

La capacidad de los híbridos para inducir la formación de apatita ósea se evaluó en fluido corporal simulado acelular (SBF), que posee concentraciones iónicas similares a las del fluido extracelular humano [95]. Los materiales híbridos se incubaron en SBF por periodos de 7 y 14 días en 50 ml de SBF en frascos de polipropileno. Posteriormente la formación de apatita se identificó mediante FTIR-ATR y SEM-EDX.

3.5. Citocompatibilidad de los híbridos y híbridos cargados con nVB y nCu.

Previamente a realizar estudios biológicos las muestras de materiales híbridos de 3x3x5 mm se esterilizan en luz UV 20 min por lado, previa inmersión en solución acuosa de etanol.

La citocompatibilidad de los materiales híbridos se evaluó mediante la incubación con células mesenquimales aisladas de pulpa dental humana (hDPSC). Las hDPSC se obtuvieron a partir de terceros molares incluidos, mediante un procedimiento estandarizado y autorizado en el laboratorio de nanobiomateriales [32], donde se obtiene un cultivo primario que luego de 2 a 3 pasajes se procedió a utilizar en los ensayos.

La viabilidad de las células se determinó mediante el ensayo MTS, incubando hDPSC sobre los híbridos, mediante la reducción de las sales de (2-il-4,5-dimetiltiazol) 5- (fenil 3-carboximetil) -2- (4-sulfofenil)-2H-tetrazolio (MTS). Estos ensayos se realizaron en tiempos 3, 7 y 14 días de incubación de las hDPSC con los híbridos. Para evaluar cualitativamente la adhesión celular, las hDPSC adheridas a las superficies del híbrido se fijaron en glutaraldehído al 2,5%, luego se deshidrataron progresivamente en etanol, se secaron en CO₂ supercrítico (Tousimis, Autosamdri-815) y se recubrieron con oro para observación SEM.

3.6. Determinación de la capacidad de los híbridos cargados con nVB para estimular la diferenciación celular osteogénica in vitro.

3.6.1. Cuantificación de actividad de enzima fosfatasa alcalina (ALP).

La actividad de la enzima fosfatasa alcalina se determinó mediante el ensayo colorimétrico de desfosforilación del reactivo para-nitrofenilfosfato, el cual se mide por la absorbancia a 405 y 690 nm. Estos ensayos se realizaron incubando los híbridos con hDPSCs por 7 y 14 días. Las absorbancias fueron normalizadas con el número de células viables determinadas en el ensayo de MTS.

3.6.2. Marcadores de diferenciación osteogénica mediante RT-qPCR.

Se analizaron marcadores de diferenciación osteogénica mediante RT-qPCR (Applied Biosystem, Thermo Fischer Scientific). El RNA total se obtuvo añadiendo el reactivo TRIZOL (Gibco) y luego se realizó la transcripción reversa usando los reactivos: *SuperScript® III cDNA Synthesis* y *ReadyScript® cDNA Synthesis Mix (Sigma)*. Se utilizaron partidores específicos de diferenciación osteogénica. Los marcadores osteogénicos analizados: *runx-2* y *osx*. Como control interno se utilizó el gen de expresión constitutiva (*housekeeping*) *18s*. Las reacciones de qPCR se realizaron utilizando los siguientes partidores específicos para humano (Macrogen, Corea del sur): RUNX-2,

Forward 5'-CAAGTA- GCAAGGTTCAACGA-3' y Reverse 5'-CGGTCAGAGAACAACACTAGG-3', OSX Forward 5'-GCCAGAAGCTGTGAAACCTC- 3' y Reverse 5'-TGATGGGGTCATGGTGTCTA-3', 18S Forward 5'-GGACAGGACAGGATTGACA-3' y Reverse 5'-GGACATCTAAGGGCATCACAG-3'. El qPCR se realizó con el sistema de RT-qPCR StepOnePlus™ (Applied Biosystems). Cada reacción se realizó en MicroAmp®Fast Reaction Tubes (Applied Biosystems) con 100 ng de ADNc, en un volumen final de 10 µL. La mezcla de PCR contenía Power SYBR®Green PCR MasterMix (Applied Biosystems) y 500 nM de cada partidor (Forward o Reverse). La fluorescencia se analizó utilizando el software Step One Plus versión 2.3 (StepOnePlus Real-time PCR, Life Technology). Los datos de qPCR en tiempo real obtenidos se analizaron utilizando el método comparativo $2^{-\Delta\Delta CT}$ [96], [97].

3.7. Determinación de la capacidad antibacteriana de los híbridos bifuncionales.

La actividad antimicrobiana de las superficies de los híbridos se evaluó frente a *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (serotipo b) (**Figura 7**). La cepa se cultivó en caldo o agar BHI (Brain Heart Infusion, Oxoid, Wesel, Alemania) y se incubó en una atmósfera de CO₂ al 5% a 37 °C durante 48 h. Desde una placa cultivada, las bacterias se transfieren a medio BHI fresco a una densidad equivalente al estándar McFarland 2. Cada híbrido estéril se coloca en tubos Eppendorf con 990 µL de medio BHI fresco y 10 µL del

inóculo, y se incubaron durante 3 horas en una atmósfera de CO₂ al 5% a 37 °C. Después del período de incubación, las superficies del híbrido se lavaron con un 0,88 % en peso de solución de NaCl y 1% de Tween 80 para eliminar las bacterias adheridas en la superficie del material. Se tomaron muestras de 100 µL de la suspensión bacteriana, se diluyen y se colocan en placas sobre agar BHI. Después de 48 h de incubación a 37 °C, se cuentan las colonias y se calculan las unidades formadoras de colonias por ml (UFC). La biopelícula bacteriana formada en cada superficie del híbrido se examinó mediante microscopía SEM. Después del período de incubación, las bacterias adheridas a las superficies del híbrido se fijaron en glutaraldehído al 2,5%, luego una deshidratación progresiva en etanol, luego se secan en CO₂ supercrítico (Tousimis, Autosamdri-815) y se recubren con oro para observación SEM.

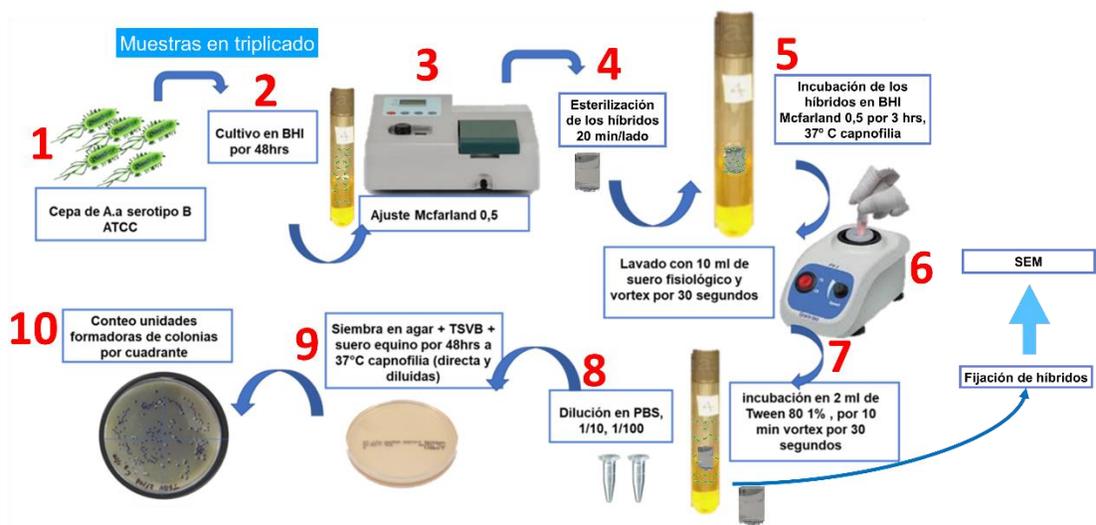


Figura 7. Flujograma experimental del ensayo utilizado para medir la capacidad antibacteriana en la superficie de los materiales híbridos.

4. Resultados.

4.1. Caracterización estructural, mecánica y composicional de los materiales híbridos.

4.1.1. Ensayos mecánicos de compresión.

Entre los diferentes materiales híbridos sintetizados se seleccionaron aquellos que cumplieran con la propiedad mecánica de flexibilidad, característica fundamental perseguida en este tipo de materiales.

En la **Figura 8** se presentan los valores de (A) porcentaje de tensión a la fractura, (B) fuerza compresiva y (C) el módulo elástico, calculados de las correspondientes curvas de tensión-deformación de los materiales. En la **Figura 8A** se puede observar que los materiales híbridos que no alcanzaron el punto de fractura y que por lo tanto exhibieron las mejores propiedades de flexibilidad fueron una composición híbrida pura (0,25TEOS) y tres híbridos formulados con nVB (5nVB/0,5TEOS, 10nVB/1TEOS y 15nVB/0,5TEOS). Aunque la incorporación de nVB tiende a aumentar la resistencia a la compresión y el módulo elástico de algunos híbridos, estos materiales flexibles no difieren significativamente en aquellas propiedades (**Figuras 8B y 8C**). En general, los valores del módulo elástico presentado por los híbridos se encuentran dentro del rango reportado para este tipo de materiales.

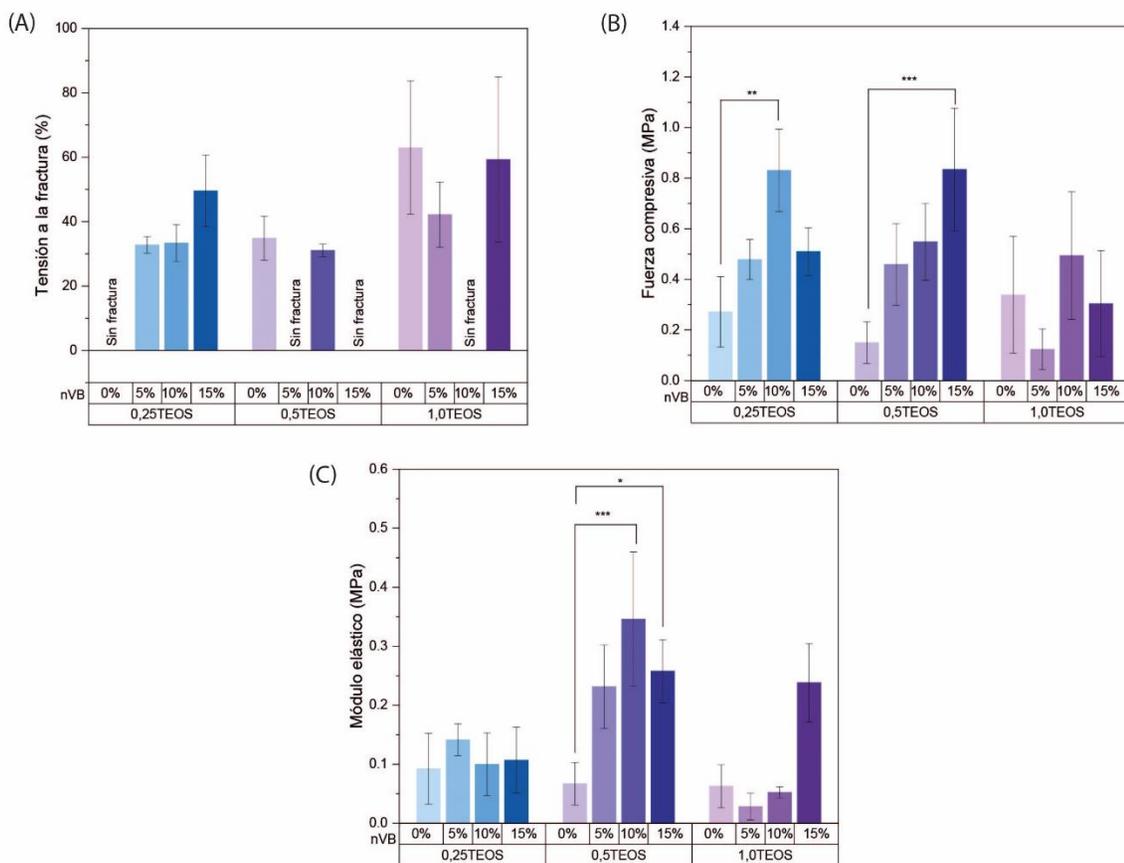


Figura 8. Propiedades mecánicas de los materiales híbridos flexibles. A) Tensión a la fractura, B) Fuerza compresiva y C) Módulo elástico. * $p \leq 0,05$ ** $p \leq 0,01$ *** $p \leq 0,001$.

4.1.2. Análisis mecánico dinámico (DMA).

Para la serie de híbridos flexibles, también se analizaron sus propiedades mecánicas mediante análisis dinámico mecánico (DMA). En la **Figura 9** se presentan los valores de módulos de pérdida (G'') y de almacenamiento (G'). Los módulos de almacenamiento (G') de los híbridos son menores que su módulo de pérdida (G''), produciendo valores de

$\text{Tan } \delta < 1$ ($\delta = G''/G'$), lo que confirma una mayor contribución del componente elástico al comportamiento mecánico de acuerdo con su flexibilidad exhibida. Además, los híbridos cargados con nVB presentan valores de G' y G'' superiores a los del híbrido puro (0,25TEOS). También se observa una reducción en el factor de amortiguamiento ($\text{Tan } \delta$) con la incorporación de nVB, lo que se debe al aumento de los valores de G'' . Los valores indican que el material con mayor rigidez es 10nVB/1TEOS, y el de menor es 0,25TEOS.

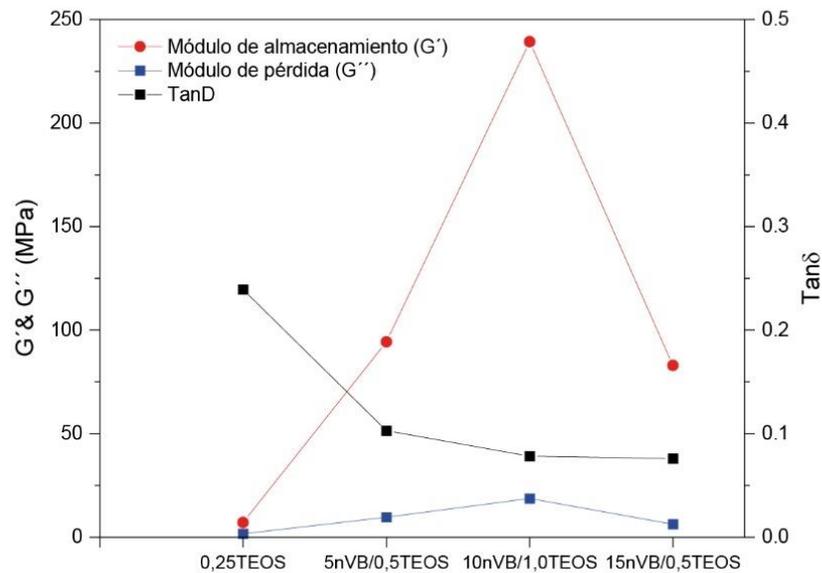


Figura 5. Análisis **dinámico mecánico (DMA)** de los materiales híbridos flexibles: Módulo de almacenamiento (G'), módulo de pérdida (G'') y $\text{Tan } \delta$.

4.1.3. Análisis mediante calorimetría diferencial de barrido (DSC).

Los materiales híbridos flexibles también fueron evaluados mediante calorimetría diferencial de barrido (DSC). Las curvas de DSC (**Figura 10**) obtenidas en el rango de temperatura de -40°C a 160°C , permitieron determinar las temperaturas de transición vítrea (T_g) y de cristalización (T_c) de los materiales (**Tabla 5**). Los resultados indican que los valores de T_g de los híbridos se encontraron entre $-7,5^{\circ}\text{C}$ a $-16,3^{\circ}\text{C}$ con un promedio de $-13,5\pm 4,0^{\circ}\text{C}$, mientras que los valores de T_c variaron entre $17,5^{\circ}\text{C}$ y $25,7^{\circ}\text{C}$ con un promedio de $19,9\pm 3,8^{\circ}\text{C}$.

Tabla 5. Valores de temperaturas de transición vítrea (T_g) y cristalización (T_c) de los materiales híbridos flexibles obtenidas mediante análisis calorimetría diferencial de barrido (DSC).

Muestra	T_g ($^{\circ}\text{C}$)	T_c ($^{\circ}\text{C}$)
0,25TEOS	-14,7	17,5 y 41,3
5nVB/0,5TEOS	-7,5	25,7
10nVB/1TEOS	-16,3	18,4
15nVB/0,5TEOS	-15,4	18,2

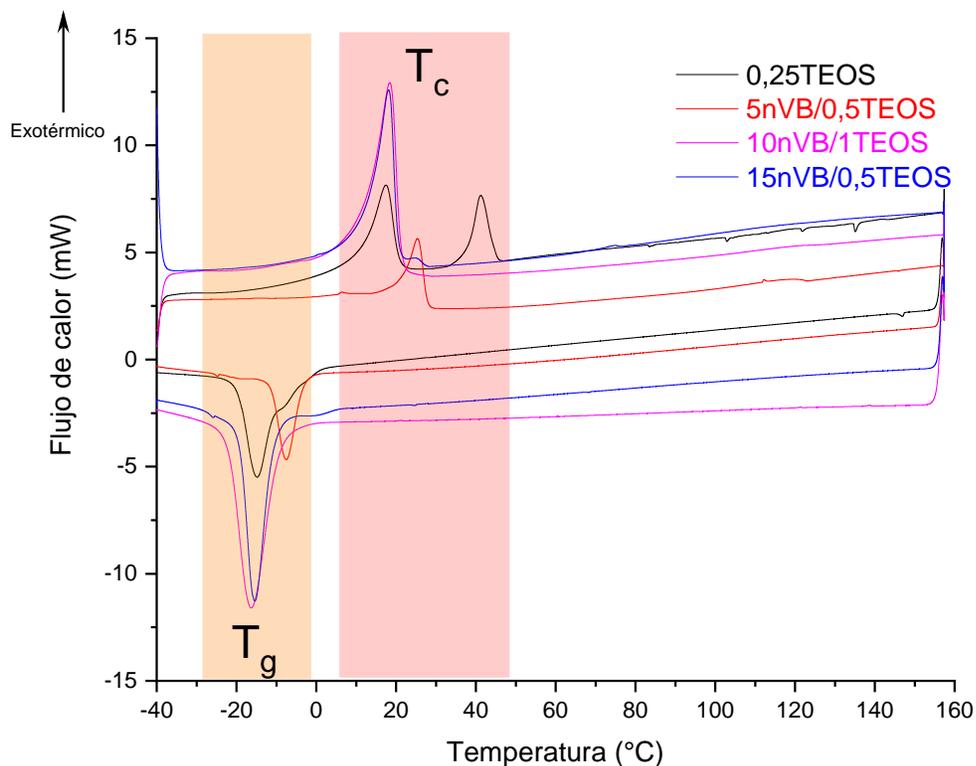


Figura 6. Curvas de calorimetría diferencial de barrido (DSC) de los materiales híbridos flexibles. Las zonas coloreadas muestran las temperaturas de transición vítrea (T_g) y de cristalización (T_c) de los materiales híbridos.

4.1.4. Análisis termogravimétrico (TGA).

En la **Tabla 6** se muestran los resultados del análisis termogravimétrico (TGA) realizado a los híbridos, representando la descomposición como pérdidas de pesos de los materiales en función de la temperatura. Si se comparan los valores para un 5% de descomposición, la descomposición térmica del híbrido 0,25TEOS se produce a los 144,7°C mientras que

para el híbrido nanocompuesto 15nVB/0,5TEOS este porcentaje de pérdida de masa se produce a los 206,3°C. Se produce un aumento de la temperatura de descomposición de la fracción orgánica con la incorporación de las nVB, como también por el aumento de la red silícea.

Tabla 6. Temperaturas de descomposición y porcentaje de pérdida de peso de 5% (T1) y 50% (T2) de los materiales híbridos obtenidos mediante análisis termogravimétrico (TGA).

Muestra	T ₁ (°C)	T ₂ (°C)
0,25TEOS	144,7	254,4
5nVB/0,5TEOS	161,5	395,3
10nVB/1TEOS	188,5	388,1
15nVB/0,5TEOS	206,3	368

4.1.5. Espectroscopía de resonancia magnética nuclear de silicio en estado sólido (²⁹Si MAS RMN).

La **Figura 11** muestra los espectros de ²⁹Si MAS NMR de los híbridos flexibles 0,25TEOS, 5nVB/0,5TEOS, 10nVB/1TEOS y 15nVB/0,5TEOS. Todas las muestras tenían especies tanto de Tⁿ como de Qⁿ que corresponden respectivamente a las estructuras de enlaces de Si a C y enlaces en torno al Si. Los resultados de todos los espectros de ²⁹Si MAS NMR y D_c se resumen en la **Tabla 7**. En todas las muestras, la matriz de sílice se encuentra bien condensada, formando enlaces Si-O-Si como lo muestra la dominancia de

las especies Q^4 en los híbridos. Además, el espectro muestra picos de alta intensidad en T^2 y Q^4 en todas las muestras. En los híbridos que tienen un mayor contenido de nVB (10nVB/1TEOS y 15nVB/0,5TEOS) se presentan picos de alta intensidad en Q^4 y Q^4 - Q^{4b} respectivamente, (Q^{4b} está más alejado del protón que Q^4). Además, todos los híbridos flexibles tuvieron un D_c mayor al 65%, pero aquellos con el mayor contenido de nVB (10% y 15% en peso) presentan un alto grado de condensación de la red de sílice, 10nVB/1TEOS: 85,67% y 15nVB/0,5TEOS: 84,42%. Aunque la muestra de 15nVB/0,5TEOS presenta un alto contenido de nVB, la muestra de 10nVB/1TEOS presenta una mayor $f\%$ en Q^4 , del 42% al 51% respectivamente. Además de un alto grado de condensación en Q^4 , la muestra 15nVB/0,5TEOS presenta especies de silicio no condensadas de silicio en Q^3 , lo cual se puede relacionar con una mayor reactividad, bioactividad y degradabilidad.

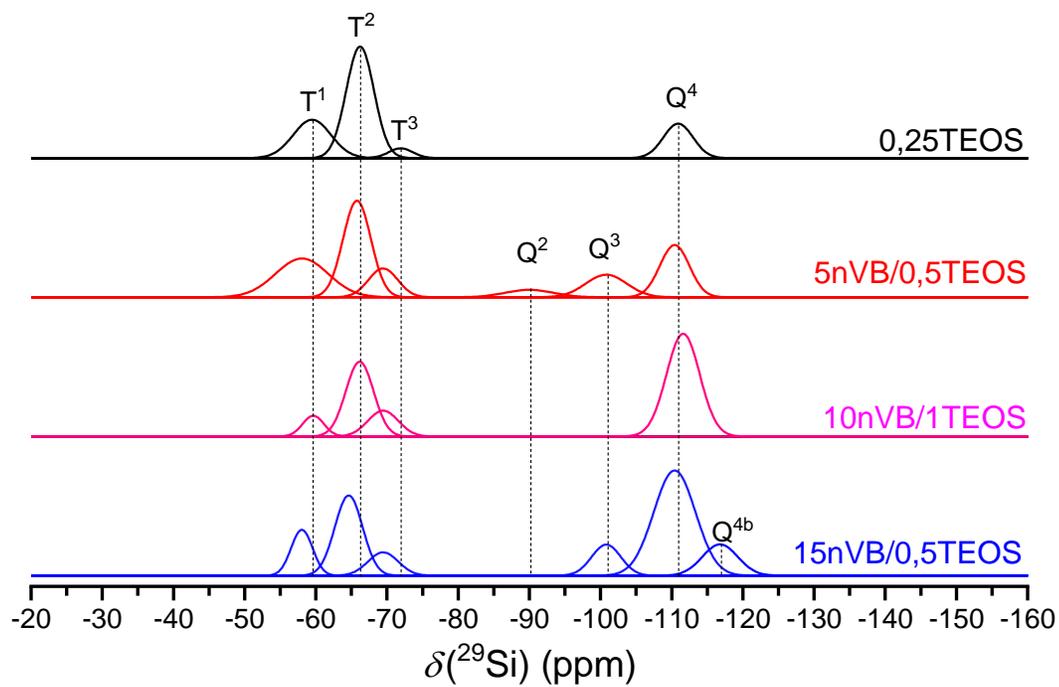


Figura 11. Espectros de **resonancia magnética nuclear de silicio en estado sólido** (^{29}Si MAS RMN) de los materiales híbridos flexibles.

Tabla 7. Desplazamientos químico-isotrópicos del ^{29}Si (δ_{iso}) y porcentaje de abundancia (f) de las especies de silicio T y Q y porcentaje de D_c de los materiales híbridos flexibles.

Muestras	T ¹		T ²		T ³		Q ²		Q ³		Q ⁴		Q ^{4b}		%D _c
	δ_{iso} [ppm]	f %													
0,25TEOS	-59.5	25	-66.2	53	-71.9	4	-	-	-	-	-110.9	18	-	-	65,67
5nVB/0,5TEOS	-58.0	24	-65.8	32	-69.5	10	-90.0	5	100.8	11	-110.4	18	-	-	68,08
10nVB/1TEOS	-59.6	6	-66.2	31	-69.5	12	-	-	-	-	-111.6	51	-	-	85,67
15nVB/0,5TEOS	-58.0	9	-64.6	22	-69.5	7	-	-	100.8	9	-110.4	42	116.8	11	84,42

δ_{iso} representa el desplazamiento químico del ^{29}Si . Los errores asociados con las mediciones son de $\pm 1,0$ ppm. $f\%$ representa el porcentaje de abundancia (f) de las especies de T y Q de silicio en los materiales híbridos. %D_c representa el grado de condensación de la red de sílice. Los errores asociados con las mediciones de f y D_c son de $\pm 5\%$.

4.1.6. Espectroscopia de infrarrojo con reflectancia total atenuada (ATR-FTIR).

La **Figura 12** presenta el análisis FTIR de los nanocompuestos híbridos flexibles y las nVB. Los espectros FTIR (**Tabla 8**) coinciden con lo reportado en la literatura para este tipo de materiales, se pueden visualizar enlaces propios del PTHF como las señales de C-H, CH₂, O-H y de los híbridos nanocompuestos Si-OH, Si-O-Si y Si-O-C (1100 cm⁻¹) propio de un material con una estructura híbrida formada por enlaces covalentes.

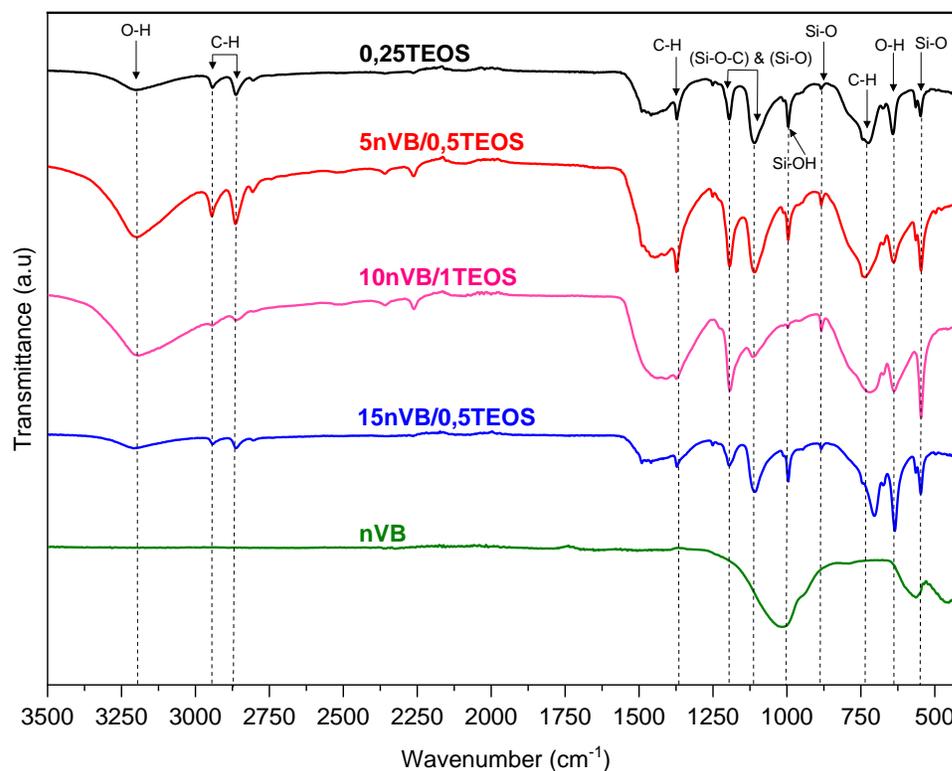


Figura 7. Espectros de infrarrojo con reflectancia total atenuada (FTIR-ATR) y posición de enlaces representativos de los materiales híbridos flexibles y de las nanopartículas de nVB.

Tabla 8. Asignación de las señales FTIR mostrados en la Figura 14 de los materiales híbridos flexibles y del nVB.

Posición del peak (cm^{-1})	Asignación	Referencias
3200	Estiramiento asimétrico de –OH	[59], [99]
2800 - 2900	Estiramiento de CH_2	[59], [99]
1375 - 1365	Estiramiento de C-H	[59], [99]
1110 - 1080	Estiramiento de Si-O-C	[59], [99]–[103]
1100 - 1000	Estiramiento de Si–O–Si	[59], [99], [100], [104]
990 - 950	Estiramiento de Si–OH	[59], [100], [103]
880 - 800	Estiramiento simétrico de Si–O–Si	[59], [60]
720 - 700	Movimiento Cis de C-H	[99], [104]
~634	Modo liberación –OH	[105]–[107]
~540	Si–O–Si vibración de balanceo	[59], [100]

4.1.7. Difracción de rayos X (DRX).

En la **Figura 13** se presentan los patrones de DRX, la cual muestra que todos los híbridos tienen una naturaleza fundamentalmente amorfa, aunque algunas composiciones presentaron reflexiones alrededor de 20° y 25° en 2θ correspondientes a dominios cristalinos de la estructura semicristalina del PTHF. Las reflexiones cristalinas del PTHF disminuyen o desaparecen con el aumento del contenido de nVB en el híbrido (10nVB/1TEOS y 15nVB/0,5TEOS).

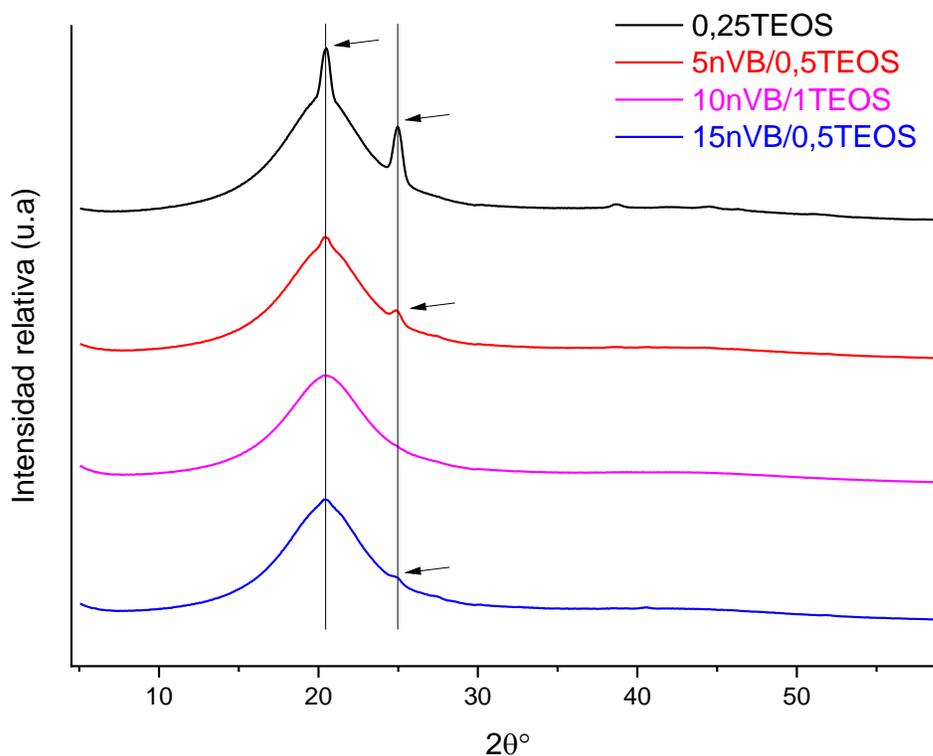


Figura 83. Patrones de difracción de rayos – X (DRX) de los materiales híbridos flexibles mostrando dominios cristalinos (flechas) a 20° y 25° en 2θ .

4.1.8. Caracterización de nanopartículas de nVB y nCu mediante microscopía SEM

La **Figura 14** muestra la caracterización mediante SEM de las nanopartículas utilizadas en la presente tesis: las nCu tienen tamaños de partículas entre 120 y 350 nm, con un tamaño promedio de $215,7 \pm 74,2$ nm, mientras que las nVB entre 50 y 120 nm, con un tamaño promedio de $89,3 \pm 25,2$ nm.

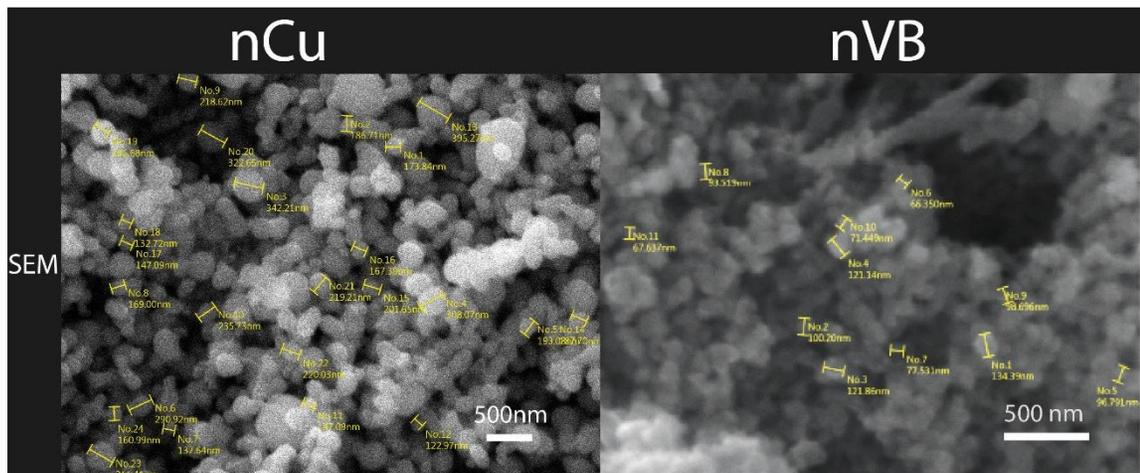


Figura 9. Imágenes SEM mostrando mediciones de los tamaños de las nanopartículas de nCu (promedio ~ 215 nm) y nVB (promedio ~ 89 nm).

4.1.9. Caracterización de nanopartículas de nVB y nCu en suspensión mediante Nanosight y DLS.

En el Nanosight se utilizó finalmente una cantidad rastreable de nanopartículas por el método de **análisis de rastreo de nanopartículas** (NTA) con una concentración de 1 mg x ml⁻¹ de NPs en agua Milli-Q a pH 7,4, registrando una concentración de nVB de $2,51 \times 10^8 \pm 2,23 \times 10^7$ partículas/ml y de nCu $3,87 \times 10^8 \pm 2,11 \times 10^7$ partículas/ml. La caracterización del tamaño de nVB mediante tanto DLS como Nanosight (**Figura 15**) se registraron distribuciones de tamaño de partículas a los 120, 200 y 400 nm, mientras que para las nCu las distribuciones se encuentran alrededor de los 150, 300 y 400 nm.

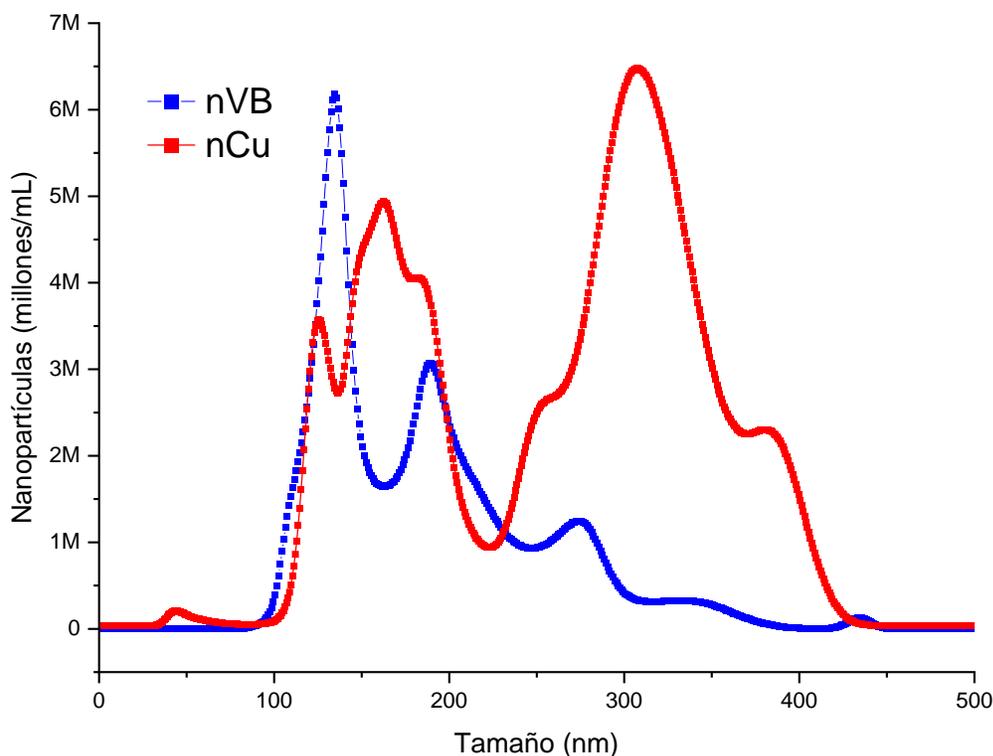


Figura 10. Curvas de distribución de tamaños de las nanopartículas de nVB y nCu obtenidas mediante método de análisis de rastreo de nanopartículas (NTA).

4.1.10. Potencial zeta (ζ) de nVB y nCu en buffer PBS.

El estudio del potencial zeta para las nVB y nCu en PBS en los siguientes pH: 5, 6, 7,4, 8 y 10, la Figura 16 se observa para las nVB un potencial ζ mínimo de $-34,47 \pm 0,35$ mV a pH 10, un máximo de $-11,33 \pm 5,59$ mV a pH 8, y a pH 7,4 fue de $-18,73 \pm 5,0$ mV. Para las nCu el potencial ζ mínimo registrado fue de $-15,03 \pm 0,71$ mV a pH 5, un máximo de $-3,54 \pm 0,39$ mV a pH 8, y a pH 7,4 fue de $-4,21 \pm 0,93$ mV. Ambas partículas a pH fisiológico 7,4 tienen un potencial ζ negativo.

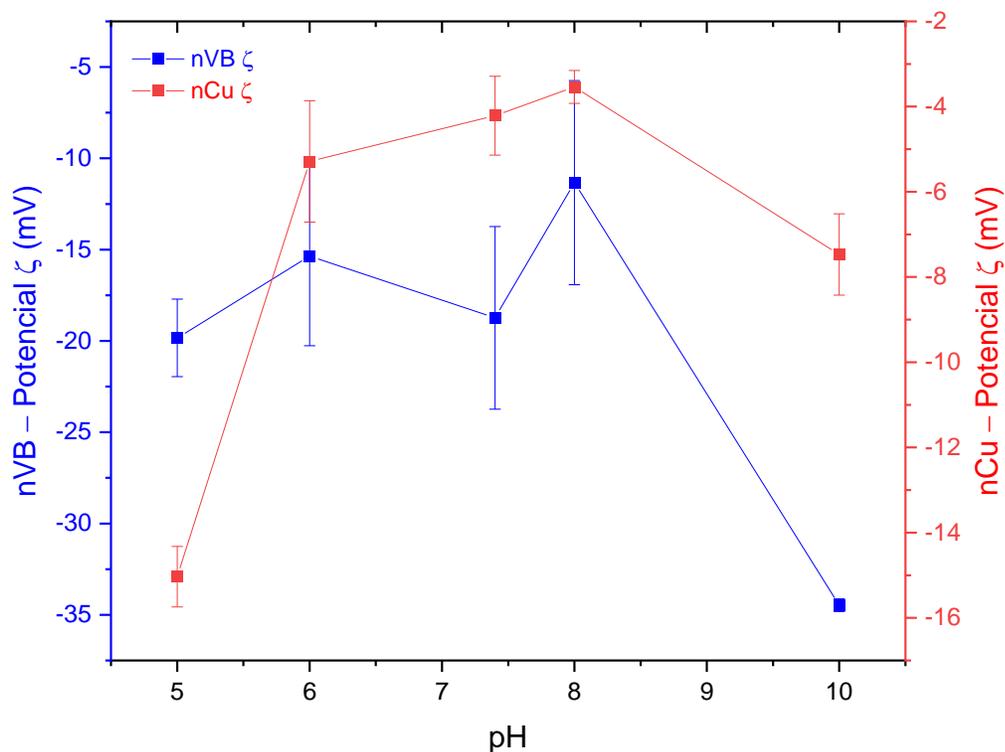


Figura 16. Potencial zeta (ζ) de suspensiones acuosas de nVB y nCu en función del pH medidas mediante DLS.

4.1.11. Caracterización de materiales híbridos mediante microscopía SEM, espectroscopía EDX y microscopía AFM.

El análisis mediante microscopía SEM con mapeo composicional EDX se muestra en la **Figura 17**. En las fotografías se puede observar un aumento en la opacidad de los materiales híbridos al aumentar el contenido de nVB. En las imágenes SEM se pueden observar las superficies de los materiales híbridos, los cuales presentan rugosidades, además, en los híbridos nanocompuestos, se puede detectar la presencia de nVB como

aglomerados o nanopartículas individuales. El mapeo elemental EDX revela la distribución de carbono, silicio, oxígeno, calcio y fósforo en las estructuras de los materiales híbridos, y en el mapeo de silicio (violeta) se puede visualizar el aumento de densidad en el híbrido con mayor contenido de nVB. Los valores de calcio y fósforo confirman la presencia de nVB en los híbridos nanocompuestos.

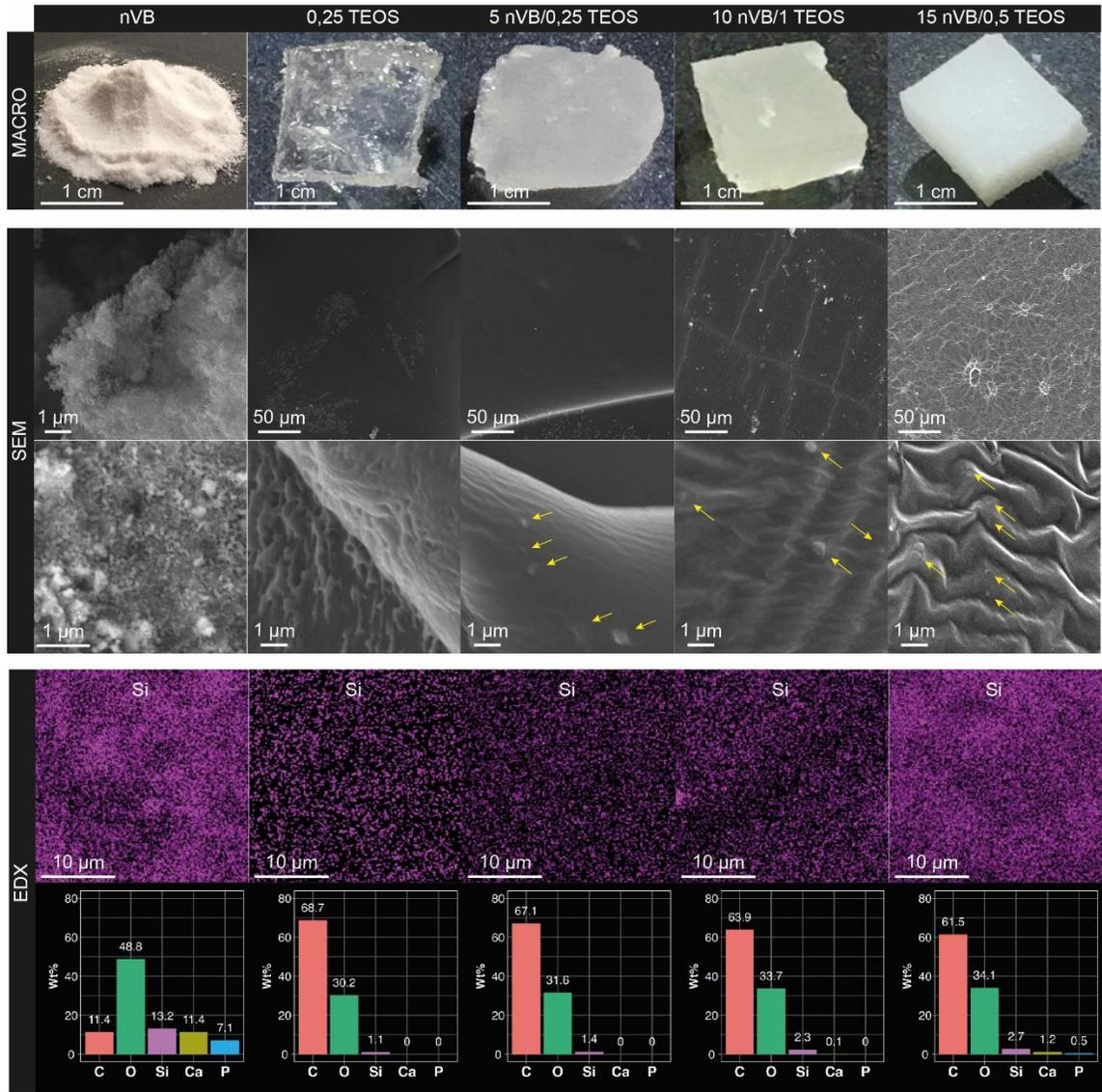


Figura 11. Fotografías (macro), micrografías SEM (aumentos 3000x y 10.000x), mapeo EDX de átomos de silicio (en violeta) y análisis elemental EDX (gráficos) de los materiales híbridos flexibles y nanopartículas de nVB.

Mediante la caracterización en microscopía AFM, se observa que los materiales híbridos flexibles poseen diversas rugosidades que se muestran en la **Figura 18**, el material **con menor rugosidad** es el híbrido 0,25TEOS con una rugosidad media cuadrática (Rq) de 1,04 nm, luego los híbridos nanocompuestos 5nVB/0,5TEOS de 54,8 nm, 10nVB/1TEOS de 212,5 nm y 15nVB/0,5TEOS de 301,6 nm, lo cual además se puede observar mediante las reconstrucciones 3D de los materiales híbridos. Lo que podría explicar una relación de la rugosidad con el contenido de nVB presente en la superficie de los materiales como agregados o nanopartículas individuales.

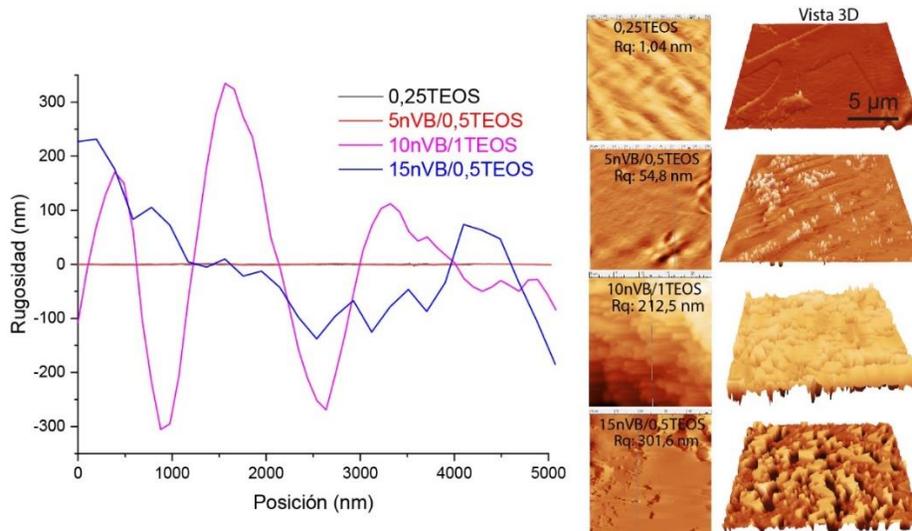


Figura 12. Mediciones mediante **microscopía de fuerza atómica (AFM)** de rugosidad de la superficie de materiales híbridos. Rugosidad media cuadrática (**Rq**) e imágenes de superficie y reconstrucción 3D de superficie de materiales híbridos flexibles.

4.2. Ensayo de degradación de los materiales híbridos.

Se realizó un ensayo para evaluar la degradabilidad de los híbridos, registrando su pérdida de peso luego de su inmersión en PBS por 28 días. En la **Figura 19** se muestra el porcentaje de la pérdida de peso de los híbridos en función del tiempo. Los materiales híbridos que presentan una mayor pérdida en peso son 5nVB/0,5TEOS y 15nVB/0,5TEOS, con un 8,4% y 10,1% respectivamente.

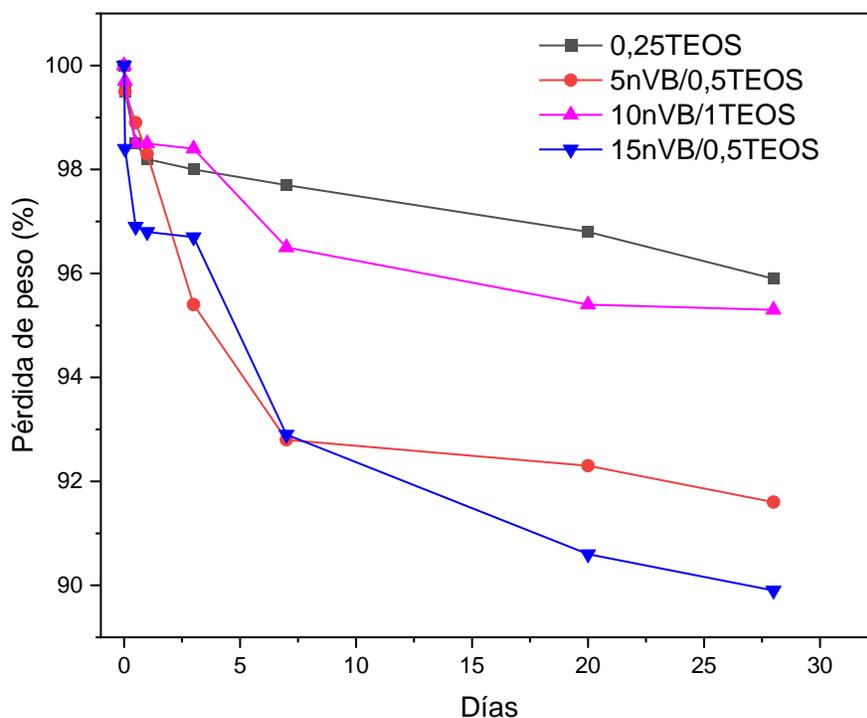


Figura 13. Curvas de pérdida de peso de los híbridos obtenidas mediante inmersión en PBS a pH 7,4 por 28 días.

4.3. Ensayos de bioactividad de líquido corporal simulado (SBF).

Este ensayo permite evaluar la habilidad de los materiales para estimular la formación de apatita tipo ósea en condiciones acelulares. En la **Figura 20** se muestra el análisis en FTIR de los materiales híbridos luego de un período de inmersión en SBF de 7 y 14 días. El análisis FTIR permite detectar la formación de apatita mediante las señales del enlace P-O de su estructura, que aparecen entorno a $\sim 580, 605$ y 1100 cm^{-1} . En todos los materiales híbridos inmersos en SBF después de 14 días se detectan las bandas de apatita, solo en 0,25TEOS las bandas de $\sim 580, 605 \text{ cm}^{-1}$ disminuyeron su intensidad. En los materiales híbridos cargados con nVB (10nVB/1TEOS, 5nVB/0,5TEOS, 15nVB/0,5TEOS) se observó un notable aumento de la intensidad de las bandas después de 14 días en SBF, lo cual estaría relacionado con la formación de apatita en la superficie del material.

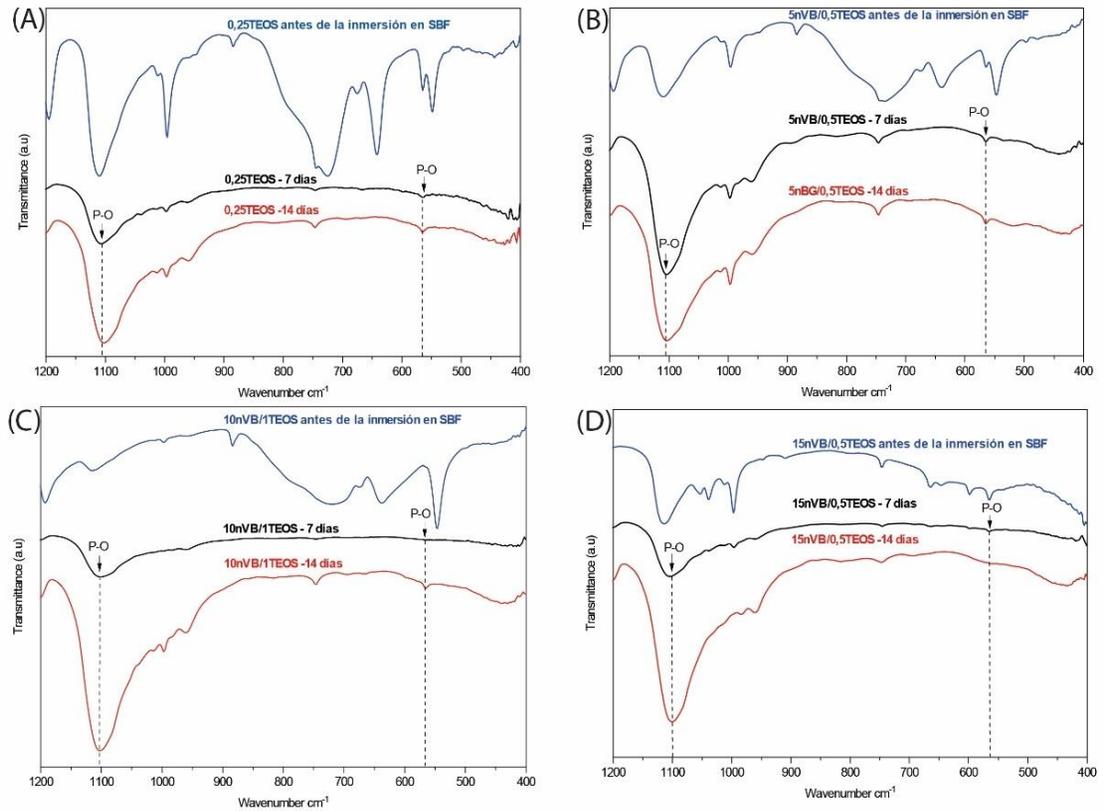


Figura 20. Análisis FTIR-ATR de híbridos **A)** 0,25TEOS, **B)** 5nVB/0,5TEOS, **C)** 10nVB/1TEOS y **D)** 15nVB/0,5TEOS, luego de su inmersión en SBF por 7 y 14 días. La formación de apatita se observa mediante señales del enlace P-O (~ 580 , 605 y 1100 cm^{-1}).

La superficie de los materiales inmersos en SBF, también fue analizada mediante microscopia SEM y análisis composicional EDX (**Figura 21**), el cual indica la presencia de silicio, calcio y fósforo. Todos los materiales cargados con nVB presentan en su superficie la formación de depósitos minerales con morfología de

apatita, acompañado de un aumento de los contenidos de calcio y fósforo, especialmente a los 14 días. Estas observaciones se correlacionan con lo observado mediante análisis FTIR, que mostró una mayor formación de apatita principalmente en los híbridos cargados con nVB, demostrando el efecto de la nanopartícula de nVB en generar propiedades bioactivas al material híbrido. El material híbrido 15nVB/0,5TEOS mostró un mayor desempeño en la formación de apatita en su superficie, lo cual se confirma mediante SEM donde se observa una mayor formación de depósitos minerales de apatita en su superficie, además el análisis EDX indica un aumento en las concentraciones de calcio y fósforo, y el análisis FTIR indica las señales del enlace P-O. Todos los materiales híbridos mostraron un aumento en las concentraciones de calcio posterior al ensayo SBF, pero cuando se incorporan nVB aumenta además la concentración de fósforo y la formación de apatita en sus superficies.

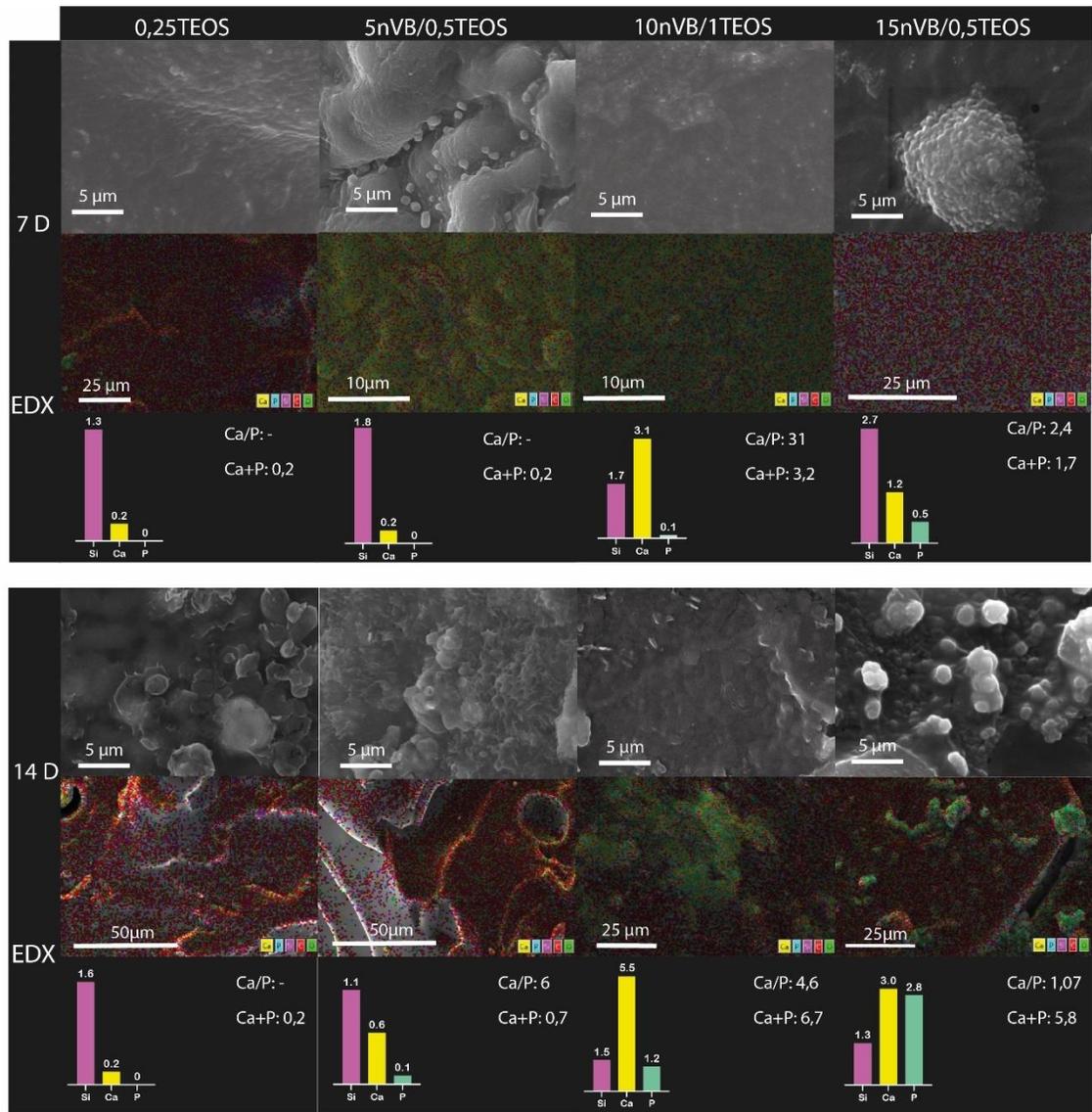


Figura 14. Micrografías SEM (magnificaciones 2000X y 5000X), mapeo y análisis elemental EDX de silicio, calcio, fósforo de la superficie de los materiales híbridos luego de 7 y 14 días de incubación en SBF. En los gráficos EDX se muestra la razón molar Ca/P y la suma de contenidos en masa de Ca + P en la superficie de cada material.

4.4. Ensayos de citocompatibilidad.

Con el propósito de evaluar la citocompatibilidad de los materiales híbridos se realizaron ensayos de viabilidad celular MTS, incubando los materiales con células madre humanas mesenquimales. En la **Figura 22** se puede observar que la viabilidad de las células incubadas con los híbridos no presenta diferencias estadísticamente significativas, respecto al control de células incubadas sin el material. Este resultado muestra la citocompatibilidad de los materiales híbridos sintetizados. Además, en la **Figura 23** se pueden observar imágenes de microscopía SEM de la adhesión de las células madre humanas mesenquimales cultivadas durante 3 días sobre las superficies de los materiales, se puede observar que las células se adhieren a la superficie de los materiales híbridos adoptando morfologías extendidas, con desarrollo de lamelipodios y filopodios, por lo tanto, las células desarrollan contactos íntimos con los materiales lo cual es una evidencia de la citocompatibilidad. En general, cuando los materiales no son o son poco citocompatibles, las células adoptan morfologías redondeadas y no desarrollan lamelipodios y filopodios.

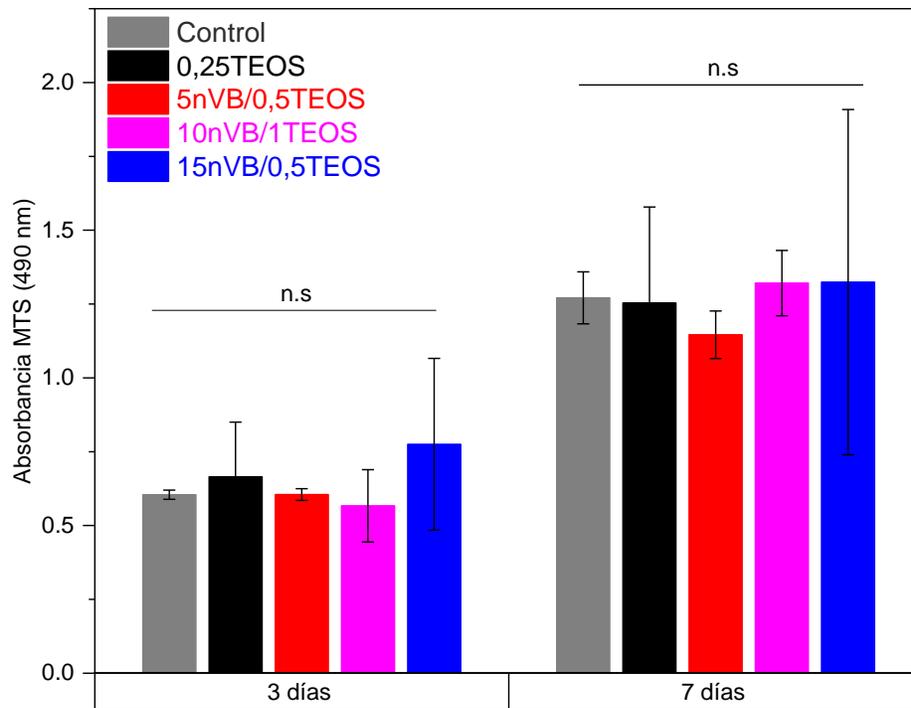


Figura 152. Viabilidad de células hDPSCs (control) e incubadas con los materiales híbridos mediante el ensayo de actividad metabólica MTS luego de 3 y 7 días.

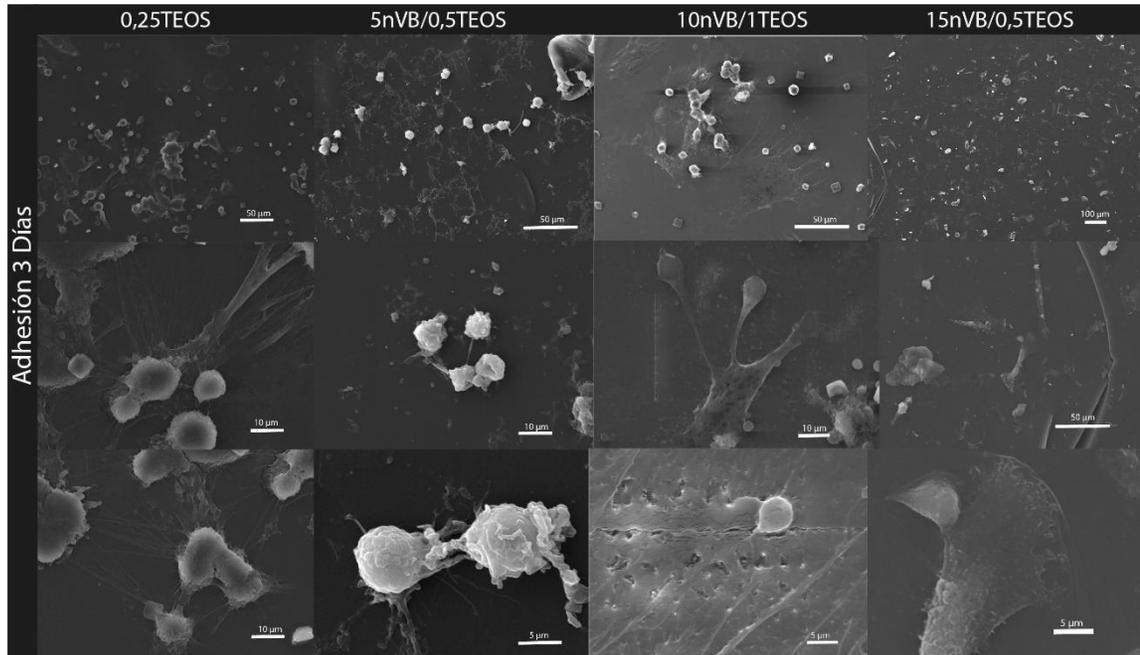


Figura 16. Micrografías SEM de células hDPSC adheridas en la superficie de los materiales híbridos luego 3 días de incubación. **Magnificaciones desde la fila superior a la inferior: 500X, 1500X y 3000X.**

4.2. Determinación de la capacidad de los híbridos cargados con nVB para estimular la diferenciación celular osteogénica in vitro.

4.2.1. Ensayo de actividad de enzima fosfatasa alcalina (ALP).

Con el fin de evaluar la capacidad de los híbridos para inducir la diferenciación osteogénica de células madre (propiedad osteoinductora), se midió en una primera instancia la actividad de la enzima fosfatasa alcalina (ALP). La ALP es un marcador

característico de la actividad mineralizante de las células diferenciadas. Estos ensayos se realizaron incubando los híbridos con hDPSCs por 7 y 14 días en **ausencia de suplementos osteogénicos**. En la **Figura 24** se puede observar que todos los materiales híbridos generaron un aumento estadísticamente significativo de la actividad ALP respecto al control (sin material), especialmente a los 14 días. Particularmente el híbrido 15nVB/0,5TEOS produjo una actividad de ALP estadísticamente significativa mayor que las demás composiciones de materiales híbridos.

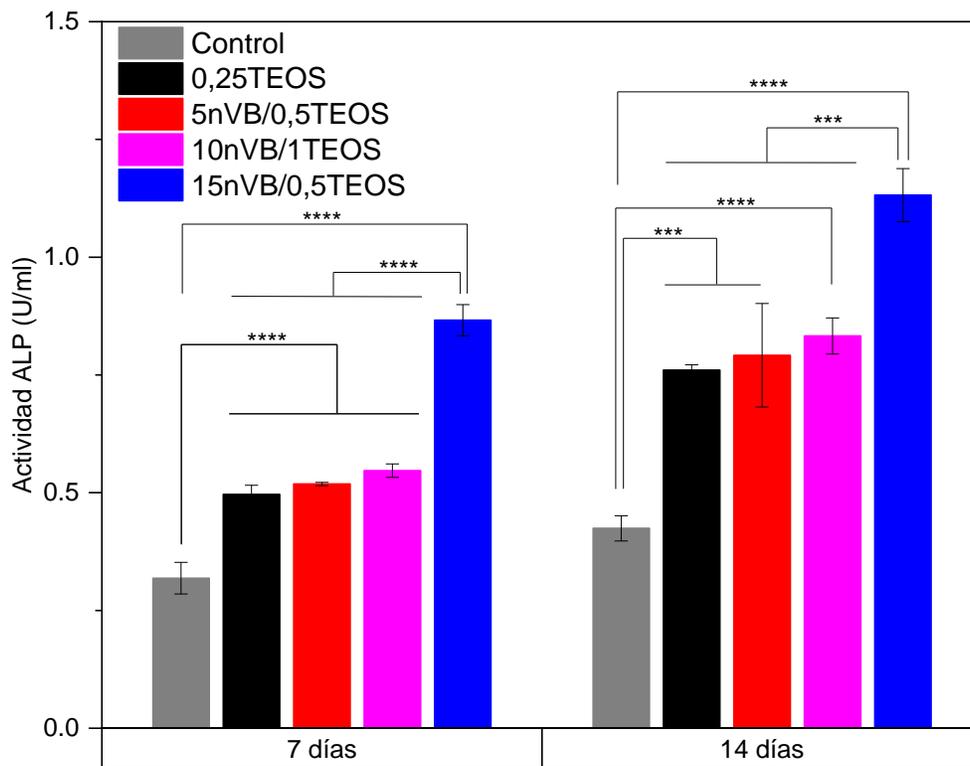


Figura 17. Actividad de fosfatasa alcalina (ALP) de células hDPSC e incubadas con los materiales híbridos por 7 y 14 días en ausencia de suplementos osteogénicos. *** $p \leq 0,01$ **** $p \leq 0,001$.

4.2.2. Medición de biomarcadores de diferenciación celular osteogénica.

Para evaluar las propiedades osteoinductoras de los materiales híbridos, se utilizó la técnica de qPCR donde se evaluaron dos factores de transcripción de diferenciación osteogénica: runx-2, es un marcador temprano el cual se identifica a los 3 días, y osterix (osx), es un marcador tardío del proceso osteoinductor y se identifica a los 14 días de incubación. Se utiliza como control pocillos sin material, y como controles positivos nVB, así como medio osteogénico. La **Figura 25** muestra los resultados de qPCR, donde se pueden observar diferencias estadísticamente significativas mayores para ambos marcadores osteogénicos en los materiales híbridos 10nVB/1TEOS y 15nVB/0,5TEOS, respecto a los materiales 5nVB/0,5TEOS, 0,25TEOS y el control de células sin material. Por lo tanto, los resultados indican que el efecto osteoinductor se produce con un contenido de nVB superior al 5%.

Por otro lado, al comparar el híbrido que presenta mayor expresión de ambos marcadores osteogénicos (15nVB/0,5TEOS) con el control positivo de nVB (una partícula osteoinductora reconocida), existen diferencias estadísticamente significativas mayores para el control positivo de nVB, lo cual es esperado debido a que existe una mayor cantidad de nVB disueltas y liberadas en el medio de cultivo, lo que implica un mayor efecto en el proceso de diferenciación osteogénica. Tanto los

ensayos de ALP como qPCR demuestran el efecto de la incorporación nVB en determinar la capacidad de los híbridos nanocompuestos para inducir la diferenciación osteogénica de las células.

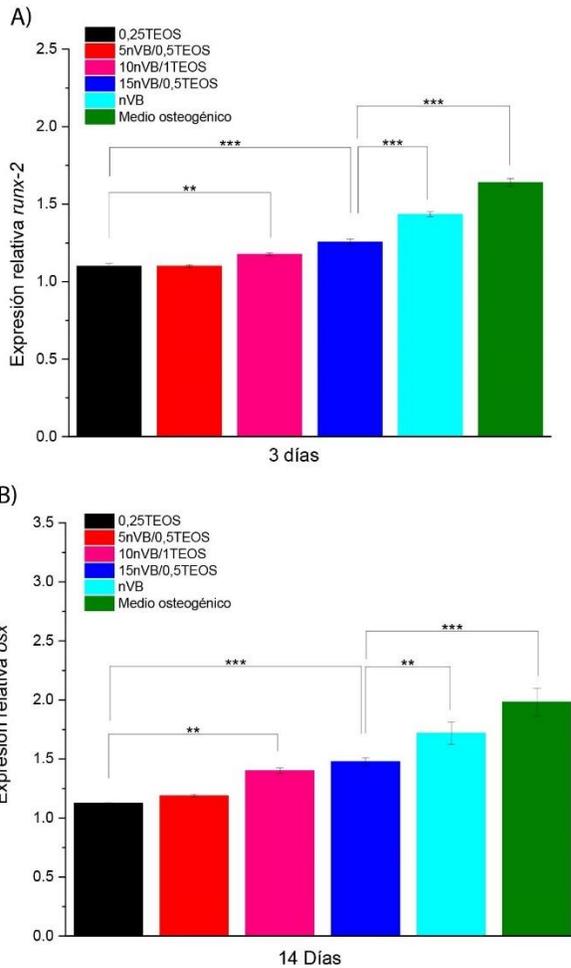


Figura 18. Cambios en la expresión génica (analizada por PCR a tiempo real) de factores de diferenciación osteogénica (A) Runx2 (3 días) y B) Osterix (14 días) de células hDPCs incubadas con los híbridos y nanopartículas de nVB en ausencia de suplementes osteogénicos respecto al control de células incubadas sin los materiales híbridos. * $p \leq 0,05$ ** $p \leq 0,01$ *** $p \leq 0,001$.

4.3. Nanocompósitos híbridos cargados con nVB-nCu.

Con el fin de otorgar propiedades antimicrobianas a los materiales híbridos flexibles, se sintetizaron materiales híbridos modificados con nanopartículas de cobre (nCu) mediante series de iteraciones representadas en las **Tablas 2 a 4**. Además, debido a la oxidación de las nCu se tuvo que cambiar en la síntesis el ácido clorhídrico por ácido cítrico. **Seleccionando el material en función de su citocompatibilidad. Primero** se realizó la síntesis de materiales optimizados con contenidos de nCu de 0,25% y 0,5% **en peso** en las matrices seleccionadas de híbridos flexibles (**Tabla 2**), y se evaluó la viabilidad celular mediante ensayos MTS, resultando en una muy baja viabilidad a los 3 días (**Figura 26**). Por lo cual, se realizó una segunda optimización, considerando solamente la matriz 15nVB/0,5TEOS, ya que tuvo el mejor efecto osteoinductor. En este caso se adicionaron contenidos de 0,1%, 0,05% y 0,03% en peso de nCu (**Tabla 3**), y luego se evaluó la viabilidad celular a los 3 días, arrojando nuevamente una muy baja viabilidad (**Figura 27**). Finalmente, se realizó una tercera optimización a la matriz 15nVB/0,5TEOS, con contenidos de $1 \times 10^{-4}\%$, $1 \times 10^{-5}\%$ y $1 \times 10^{-6}\%$ en peso de nCu (**Tabla 4**). La **Figura 28** muestra que a los 3 días existe viabilidad celular en todas las muestras y no hay diferencias estadísticamente significativas entre los híbridos y los controles. A los 7 días sólo los materiales con $1 \times 10^{-5}\%$ y $1 \times 10^{-6}\%$ en peso de nCu presentan viabilidad celular y sin diferencias estadísticamente significativas con el control del material. Los resultados indican que concentraciones

menores a 1×10^{-4} % en peso de nCu permiten la viabilidad celular en híbridos de 15nVB/0,5TEOS cargados con nCu. Por lo tanto, se seleccionaron los materiales de esta última optimización para su **caracterización** mediante FTIR-ATR (**Figura 29**), SEM-EDX (**Figura 30**) y realizar los ensayos de actividad antimicrobiana (**Figura 31**).

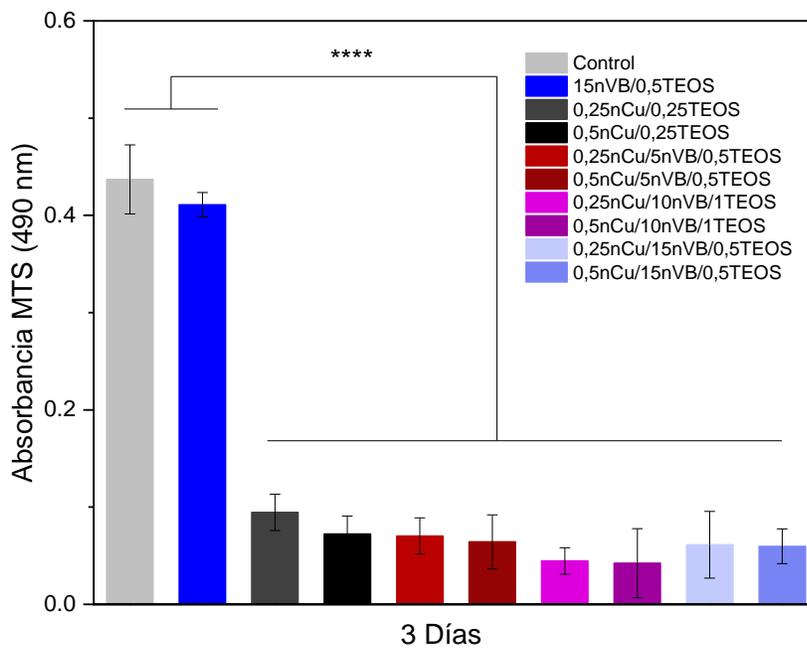


Figura 196. Viabilidad de células hDPSCs (control) e incubadas con los materiales híbridos mediante el ensayo de actividad metabólica MTS luego de 3 días. **** $p \leq 0,001$.

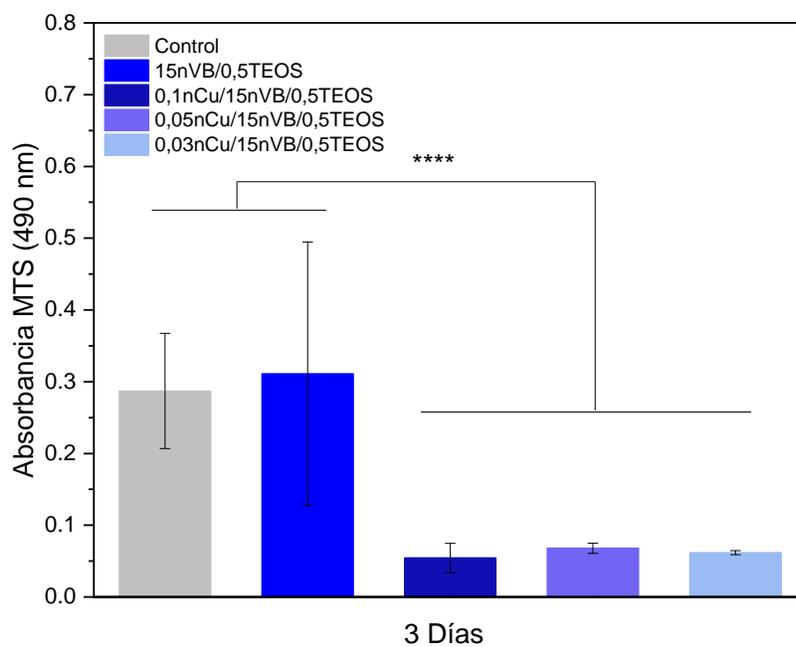


Figura 20. Viabilidad de células hDPSCs (control) e incubadas con los materiales híbridos mediante el ensayo de actividad metabólica MTS luego de 3 días. **** $p \leq 0,001$.

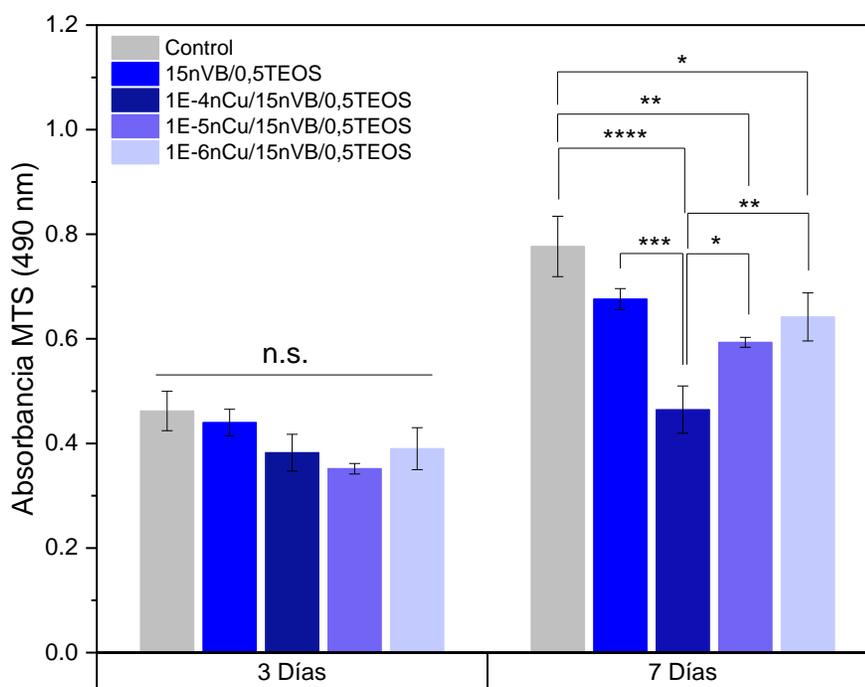


Figura 21. Viabilidad de células hDPSCs (control) e incubadas con los materiales híbridos mediante el ensayo de actividad metabólica MTS luego de 3 días. * $p \leq 0,1$ ** $p \leq 0,05$ *** $p \leq 0,01$ **** $p \leq 0,001$.

4.3.1. Caracterización mediante FTIR de híbridos con nVB y nCu.

La **Figura 29**, muestra el análisis FTIR de los materiales híbridos que presentaron una adecuada viabilidad (**Tabla 4**), los cuales muestran nuevas señales respecto al material híbrido sin nCu, de C=O a los 1683 cm^{-1} , y de Cu-O a los 656 cm^{-1} .

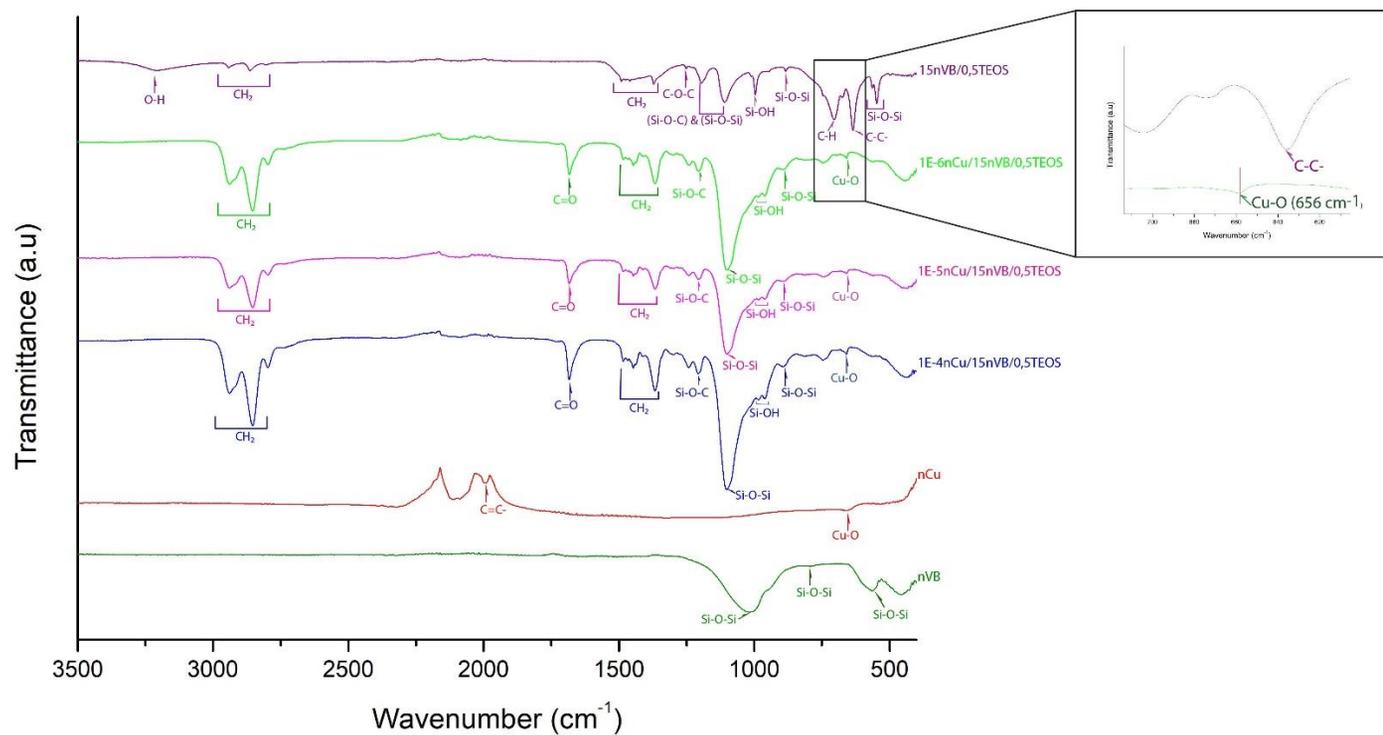


Figura 22. Análisis FTIR-ATR de materiales híbridos nanocompuestos cargados con 15% de nVB y modificados con $1 \times 10^{-4}\%$, $1 \times 10^{-5}\%$ y $1 \times 10^{-6}\%$ de nCu, y nanopartículas (nVB y nCu). Inserto se identifican señales correspondientes con C=C y Cu-O.

4.3.2. Caracterización mediante SEM-EDX de híbridos optimizados con nCu.

En las imágenes SEM de la **Figura 30**, se pueden observar las superficies de los materiales híbridos, que presentan rugosidades, como también presencia de agregados de nanopartículas. En los análisis EDX se puede determinar la concentración para los elementos: carbono, oxígeno, silicio, calcio, fósforo y cobre.

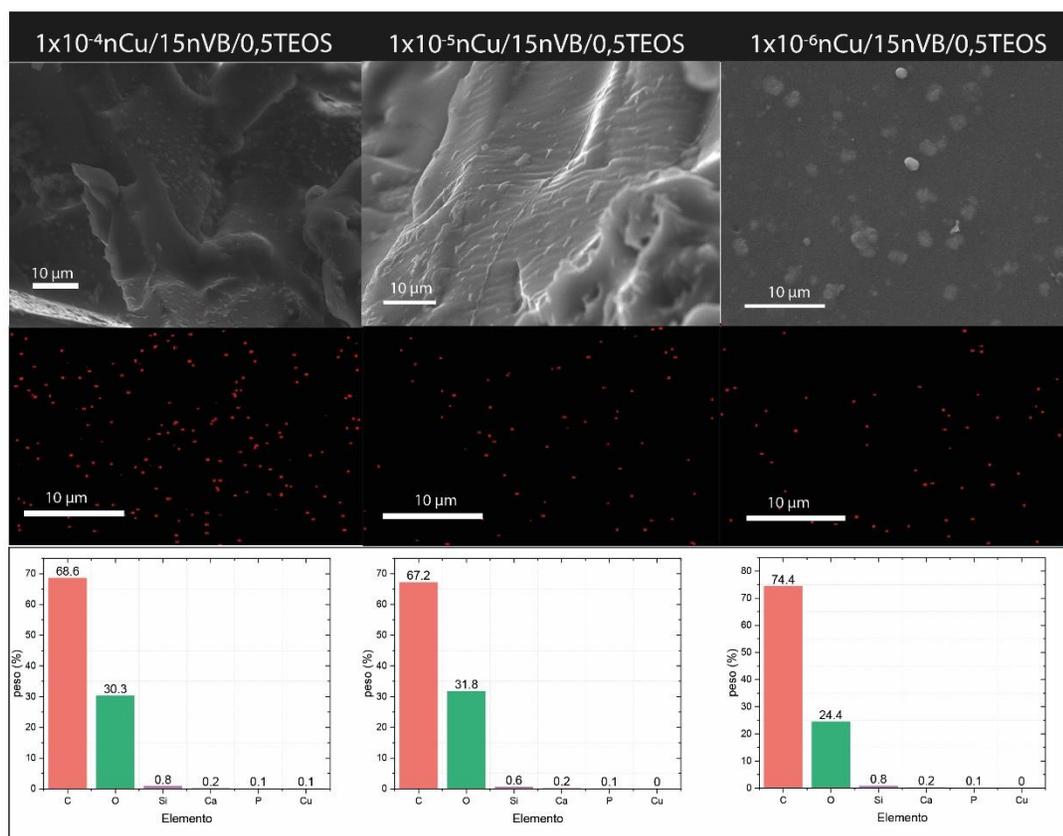


Figura 23. Micrografías SEM (magnificación, mapeo EDX de cobre (rojo) y análisis de elementos en híbridos nanocompuestos cargados con 15% de nVB y modificados con $1 \times 10^{-4}\%$, $1 \times 10^{-5}\%$ y $1 \times 10^{-6}\%$ de nCu.

4.3.3. Ensayos de actividad antibacteriana.

Los materiales híbridos seleccionados en la última iteración (**Tabla 4**), se incuban con la bacteria *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (serotipo **b**) asociada a enfermedades periodontales y periimplantarias. Los ensayos antimicrobianos se realizan incubando los materiales híbridos nanocompósitos con una dilución 0,5 Mcfarland de A.a durante 3 horas, removiendo las bacterias adheridas sobre su superficie usando el surfactante neutro Tween-80, y luego sembrando las suspensiones en placas de agar con medio BHI para su incubación por 24 horas a 37°C. Completando el tiempo de incubación, se realiza el recuento de las unidades formadoras de colonias (UFC) que provienen de bacterias viables de la superficie del material. Los resultados de la **Figura 31** muestran que los materiales que presentan nCu y nVB producen una notable reducción de las UFC de A.a respecto al material que no contiene nanopartículas (0,25TEOS). Además, se observa que los híbridos cargados con 1×10^{-4} y 1×10^{-5} % de nCu presentan un efecto antibacteriano estadísticamente significativo mayor respecto al híbrido sin nCu (15nVB/0,5TEOS). Estos resultados demuestran que algunos contenidos de nCu en el híbrido 15nVB/0,5TEOS permite obtener un material que combina una adecuada citocompatibilidad (75% respecto al control) con propiedades antibacterianas frente a A.a. Adicionalmente, el híbrido 15nVB/0,5TEOS sin nCu también presenta una mejorada citocompatibilidad (100%) y además un efecto antibacteriano importante,

el cual se atribuye al efecto antimicrobiano que también poseen las partículas de nVB debido a la comprobada alcalinización que producen estas.

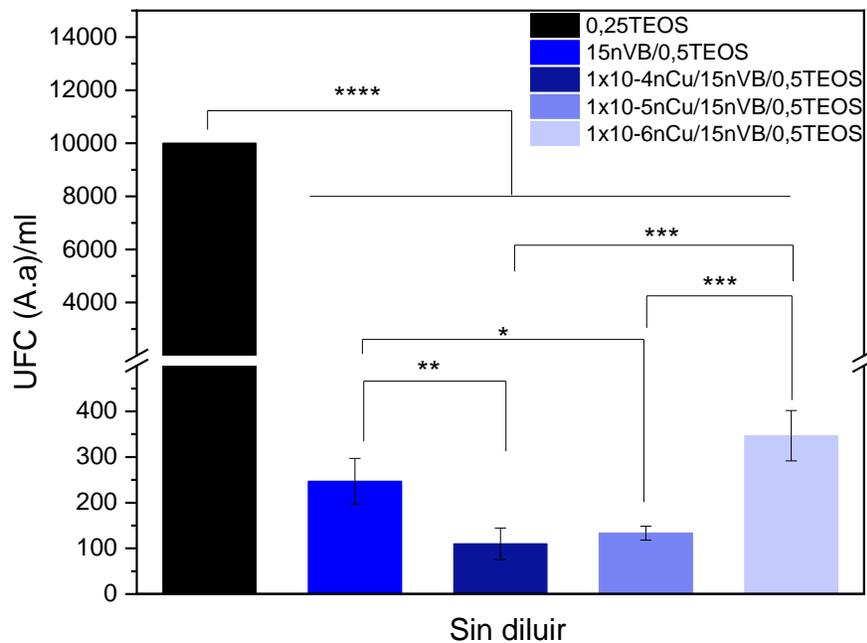


Figura 24. Recuentos de unidades formadoras de colonia (UFC) de A.a. en la superficie del material híbrido 0,25TEOS (negro) y híbridos nanocompuestos cargados con 15% de nVB y modificados con 1×10^{-4} %, 1×10^{-5} % y 1×10^{-6} % de nCu (tonos de azul) luego de 48 horas de incubación. * $p \leq 0,1$ ** $p \leq 0,05$ *** $p \leq 0,01$ **** $p \leq 0,001$.

4.3.4. Liberación de iones calcio y cobre.

La serie de materiales híbridos seleccionados en la última iteración (Tabla 4) se sumergieron en 15 ml de agua tamponada con buffer TRIS a pH 7,4, de forma independiente durante 1, 3, 5, 7 y 10 días, y se realizó la medición de los iones de

calcio y cobre presentes en las soluciones mediante electrodos específicos para cada ion. Respecto a la liberación de cobre (**Figura 32**), se producen concentraciones de este ion que fluctúan entre 0,1 a 0,7 mg/L luego de 3 a 7 días de incubación, lo cual podría explicar la disminución de la viabilidad celular observada en híbridos con mayor contenido de nCu. Por otra parte, respecto a las concentraciones de Ca^{2+} los híbridos liberan entre 1,5 a 2,75 mg/L, entre 1 a 10 días, lo cual puede contribuir tanto a la proliferación como diferenciación celular, y a la mineralización de apatita.

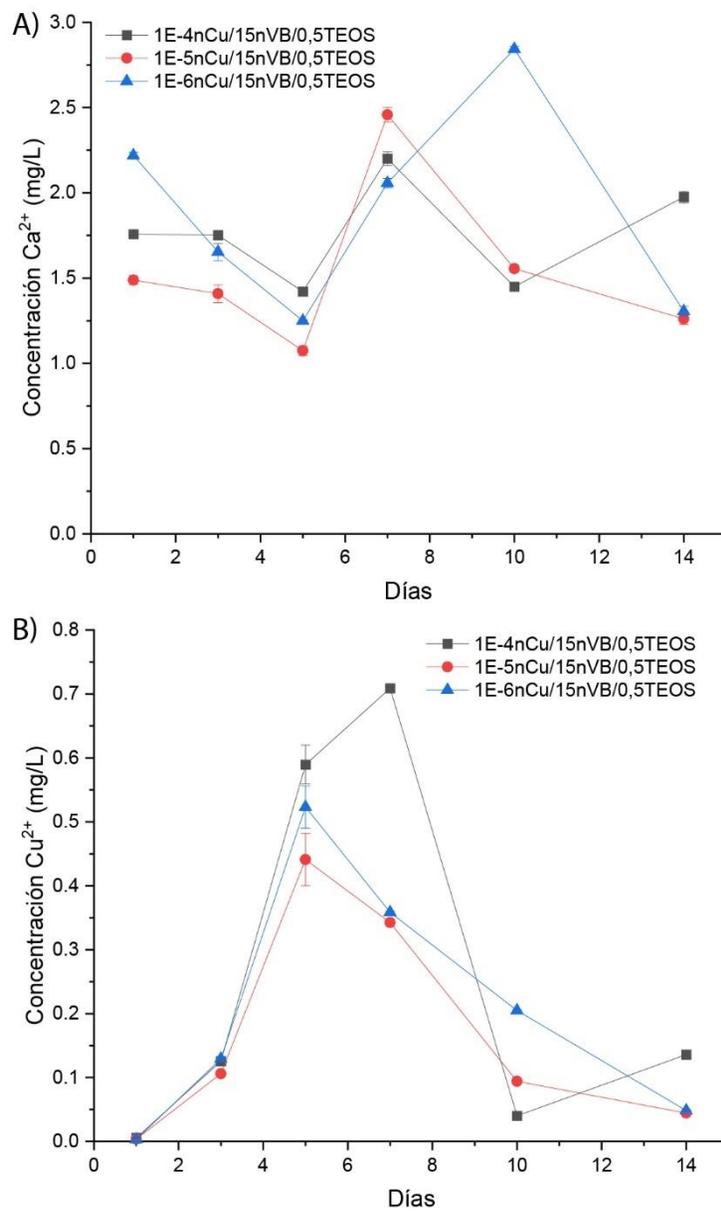


Figura 252. Curvas de liberación de calcio (A) y cobre (B) de híbridos nanocompuestos cargados con 15% de nVB y modificados con $1 \times 10^{-4}\%$, $1 \times 10^{-5}\%$ y $1 \times 10^{-6}\%$ de nCu, luego de 14 días de incubación en buffer TRIS a pH 7,4.

5. Discusión.

5.1. Caracterización estructural de los materiales híbridos.

En la presente tesis se exploró la síntesis de materiales híbridos flexibles para regeneración ósea en base a PTHF/GPTMS/TEOS que contuvieran por primera vez nanopartículas de nVB en su estructura, y posteriormente también nanopartículas de nCu. Lo anterior con el propósito de desarrollar un material híbrido que posea simultáneamente la propiedad mecánica de flexibilidad, junto con presentar las propiedades bioactivas de osteoinducción y antibacteriana. Se realizaron exitosamente iteraciones de síntesis respecto a la concentración de TEOS y los contenidos de nVB y nCu que condujeron a producir materiales híbridos con las propiedades deseadas.

La estructura híbrida de los biomateriales sintetizados se pudo comprobar mediante diferentes técnicas. El análisis ^{29}Si MAS NMR mostró señales de especies T^n , es decir la presencia de átomos de Si unidos a átomos de C, lo cual contrasta con la estructura de un vidrio bioactivo puro que solo presenta señales Q^n [98] (Si unidos a O). Además, mediante ^{29}Si MAS NMR se verificó la unión del GPTMS con la red silíceo, indicando que la estructura condensó y polimerizó con éxito [99]. La naturaleza híbrida de los materiales también se comprobó mediante análisis FTIR, donde la banda de 1100 cm^{-1} de los espectros es producida por el enlace covalente Si-O-C característico en este tipo de materiales [59], [76], [100]. Por otra parte, mediante análisis DRX se encontró que los híbridos poseen una estructura fundamentalmente amorfa acorde con lo observado en

otros trabajos [76], [101]. Los híbridos 0,25TEOS, 5nVB/0,5TEOS y 15nVB/0,5TEOS exhibieron un dominio cristalino a los 20° y 25° 2theta [102], esta señal disminuye su intensidad al aumentar el contenido de nVB, la concentración de TEOS y GPTMS [103]. En la síntesis de los híbridos, se observó un aumento del tiempo de polimerización cuando aumentan los contenidos de nVB y TEOS [99]. La gelificación tarda entre 8 a 12 horas en productos de síntesis con un alto contenido de nVB (10-15% en peso) y una concentración de TEOS $\geq 0,5$ mmol, mientras que el híbrido puro (0,25TEOS) la gelificación comienza tan pronto como se aplica el catalizador y tarda unos 15 minutos en gelificar por completo. Este efecto puede estar relacionado con el mayor grado de condensación (D_c) o de polimerización de (**Tabla 7**) de la red sílice que presentaron los híbridos con mayores contenidos de TEOS y nVB. Por otra parte, mediante análisis SEM-EDX y DLS-NTA se comprobó la presencia de las NPs incorporadas en la estructura de los híbridos, observándose las partículas distribuidas en toda la matriz híbrida, confirmándose de este modo la obtención de un material híbrido nanocompuesto. La principal diferencia entre un material híbrido y un material compuesto es que un material híbrido (clase II) combina diferentes materiales que se unen covalentemente para obtener un conjunto de propiedades mejoradas [104], mientras que un material compuesto se forma mediante la unión de dos o más materiales diferentes, en el que uno actúa como matriz y otro como refuerzo para producir un material con propiedades superiores [20]. En el presente trabajo se combinan

ambos elementos, y se denomina híbrido nanocompósito, combinando por un lado el material híbrido y por otro el refuerzo de NPs para obtener propiedades mejoradas.

Se habían reportado algunos esfuerzos con el propósito de incorporar elementos bioactivos a materiales híbridos como calcio [48], [105]–[107], silicio [57], borofosfosilicato [108] en la estructura de los híbridos para aumentar su capacidad osteoinductiva, sin embargo la producción de materiales híbridos compósitos modificados con nanopartículas de VB no había sido reportada hasta ahora. En la **Figura 33** se muestra una representación esquemática de la posible estructura e interacciones moleculares del híbrido nanocompósito preparado en este trabajo.

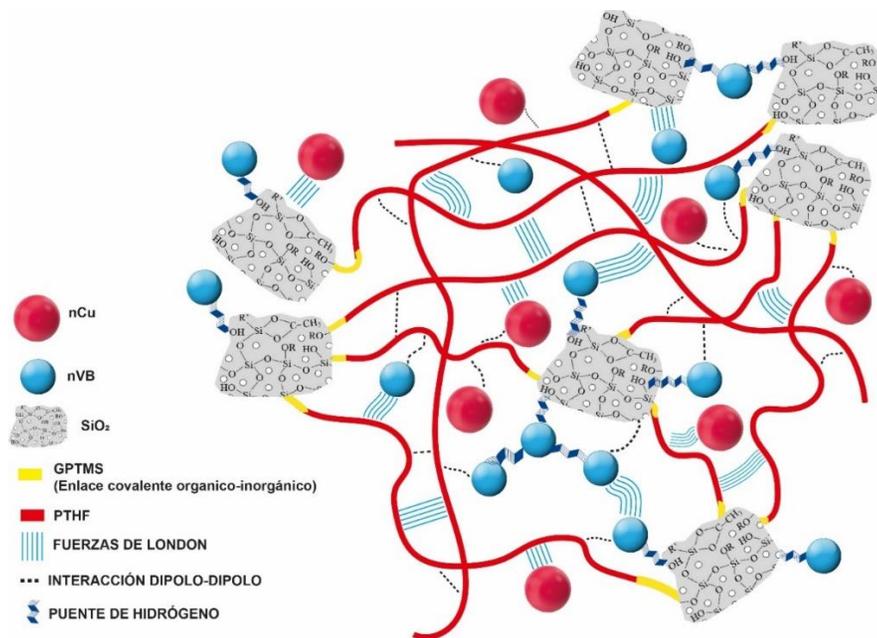


Figura 263. Representación esquemática propuesta de la estructura e interacciones intermoleculares del material híbrido nanocompósito conformado por una matriz híbrida de PTHF/GPTMS/TEOS cargada con nanopartículas de VB y nCu.

Es probable que se produzcan diferentes interacciones físicas y químicas entre las nanopartículas y la estructura del híbrido. Entre el nVB y la matriz híbrida pueden generarse enlaces de tipo puente de hidrógeno producida por los grupos O-H de la superficie de las nVB y grupos O-H en la superficie de la matriz híbrida. Tanto las nVB como las nCu pueden interactuar molecularmente con la estructura del híbrido mediante fuerzas dipolo-dipolo y de London [109]. Por otro lado, el estudio de diferentes composiciones de síntesis condujo inicialmente a la obtención de al menos cuatro híbridos con propiedades de flexibilidad mecánica, siendo tres de ellos, híbridos nanocompuestos formulados con nVB en su estructura. Los ensayos de compresión y las mediciones DMA realizadas a los híbridos flexibles confirmaron la mayor contribución del componente elástico en su comportamiento mecánico, acorde con las características de flexibilidad exhibida. Lo anterior constituye un desafío científico logrado que se puede comparar con otros esfuerzos recientes donde sintetizan híbridos flexibles en base a PTHF y TEOS [59], [75], [110], pero sin nanopartículas bioactivas en su estructura. Además, los híbridos cargados con nVB presentaron valores de módulo de almacenamiento (G') y de pérdida (G'') superiores a los del híbrido puro, explicado por el reforzamiento mecánico que produce la incorporación de nVB en la matriz híbrida. Es conocido que las nanopartículas que tienen una alta relación área superficial/volumen restringen la movilidad de las cadenas poliméricas [111], [112] produciendo así un aumento en el módulo de almacenamiento [113]. Si bien, la incorporación de nVB tiende a aumentar la resistencia

a la compresión y el módulo elástico de algunos híbridos, los materiales flexibles no son diferentes en esas propiedades como se muestra en la **Figura 8**. Además, la reducción en el factor de amortiguamiento ($\tan \delta$) con la incorporación de nVB se puede atribuir a: (1) al aumento de los valores de G' y G'' como consecuencia de las fuerzas de fricción y disipación de calor que producen las nanopartículas de relleno en el nanocompuesto [114], y (2) al mayor grado de condensación de la red de silicio (D_c) (**Tabla 7**). Además, respecto a la temperatura de transición vítrea (T_g), que es la temperatura (en el caso de los polímeros amorfos) a la que el aumento de la movilidad molecular da como resultado cambios en las propiedades térmicas, si aumenta la rigidez molecular de las cadenas poliméricas, la temperatura de transición vítrea del polímero aumenta [115]. El análisis en DSC de los materiales híbridos registró temperaturas de transición vítreas (T_g) entre $-7,5^\circ\text{C}$ a $-17,2^\circ\text{C}$ con un promedio de $-14,2 \pm 3,9^\circ\text{C}$, mayor que la reportada para el PTHF de -40°C [116], lo cual es coherente con un aumento en la rigidez de las cadenas de los polímeros tanto por el componente inorgánico de la red silícea condensada de TEOS que se une covalentemente al PTHF como por la incorporación de las nVB.

Complementado lo anterior, el análisis termogravimétrico entregó evidencia de: (1) existe una estabilización térmica de los materiales producto de la incorporación de las nVB, y (2) la co-condensación entre la red silícea de TEOS y el polímero estabiliza el polímero por el enlace covalente entre el GPTMS y la red silícea del TEOS, lo cual está evidenciado por el grado de condensación (D_c) (**Tabla 7**). Además, la temperatura máxima de

descomposición del PTHF reportada en la literatura es de 339°C [117] y la del híbrido 0,25TEOS es de 374°C, esta diferencia se explica por la naturaleza de los materiales híbridos clase II [20], [44], [103] ya que la unión covalente entre el PTHF y la red silícea del TEOS genera un efecto de reforzamiento [59].

Referente a la rugosidad de los materiales híbridos, los que presentaron una superficie con mayor rugosidad (R_q) se relacionan con un mayor contenido de nanopartículas, lo cual se evidencia mediante SEM y AFM, ya que se puede detectar la presencia de nVB como aglomerados o nanopartículas individuales. En la literatura hay reporte de un híbrido PTHF/GPTMS/TEOS/PCL-diol [59], donde la superficie de los materiales presenta una rugosidad menor a la reportada en esta tesis, lo que se explica por la presencia de las nVB utilizadas en este estudio.

5.2. Caracterización de Nanopartículas.

Las nanopartículas de nVB y nCu fueron caracterizadas respecto a su tamaño de partícula utilizando SEM y DLS/NTA. Las diferencias en los tamaños de partículas encontradas mediante estas técnicas se deben a que las mediciones mediante DLS y NTA son muy sensibles al estado de aglomeración de las nanopartículas, detectando en algunos casos aglomerados de las partículas más que las nanopartículas individuales, produciéndose una sobreestimación del tamaño informado [119]–[121]. Por otra parte, los valores de potencial zeta (ζ) medidos para las nVB y nCu a pH 7,4 (**Figura 16**) fueron coherentes con lo reportado en la literatura [92], [122]. Se ha demostrado *in vivo* que un potencial

zeta negativo a pH fisiológico en biocerámicos (superficie de la partícula cargada negativamente) tiene importantes efectos biológicos [123], promoviendo la adhesión y proliferación celular [124]. Por ejemplo, en el estudio de Teng et. al. [124] utilizaron hidroxiapatita con un potencial ζ negativo, como resultado el material fue más viable para la unión y proliferación de osteoblastos que las superficies sin carga eléctrica o incluso con carga eléctrica positiva.

5.3. Degradabilidad de materiales híbridos.

Según lo reportado en la literatura la degradabilidad de materiales híbridos con PTHF es baja, [59], [67], [75], [125]. En la presente tesis el híbrido nanocompuesto 15nVB/0,5TEOS registra la mayor pérdida de peso (10,1%) posterior a su inmersión en PBS por 28 días, lo cual ocurre probablemente debido a la presencia de nVB en su estructura produciendo una liberación y disolución de las partículas de nVB y provocando una menor estabilidad de la matriz híbrida. Una matriz híbrida comparable se encuentra en el trabajo de Tallia [67] que al sumergir un híbrido de PTHF/PCL-diCOOH en PBS durante 7 días, se produce una pérdida de un 12% en peso. Lo anterior es reforzado en otro trabajo de Tallia [101] con un híbrido SiO₂-CaO-P₂O₅/PTHF/PCL-diCOOH que al ser sumergido durante 7 días en solución de TRIS pierde un 10,8% de peso, lo cual se explica por el efecto combinado del agua que provoca la hidrólisis de PCL-diCOOH [126] y la degradación de la red de vidrio que se encuentra unida al PTHF. Ensayos de degradación en otras matrices híbridas se pueden comparar como en el trabajo de Mondal

[127], con un híbrido de PCL/borofosfosilicato que registra hasta un 15% de pérdida de peso a los 15 días de inmersión en PBS. También en el trabajo de Ravarian [66], con un híbrido de PMMA reporta cerca de un 20% de pérdida de peso a los 25 días de inmersión en PBS. En la presente tesis la degradabilidad de la matriz híbrida PTHF/SiO₂ cargada con nanopartículas de VB se explica por la presencia de nVB que al poseer un tamaño nanométrico presentan una mayor área superficial por masa y, por lo tanto, un incremento en el intercambio iónico con el medio, como también por la degradación de la red de vidrio del híbrido unida al PTHF.

5.4. Bioactividad de materiales híbridos.

Una propiedad de interés en los materiales estudiados para aplicaciones de reparación ósea es su habilidad para promover la formación de apatita en SBF. Todos los materiales híbridos obtenidos con propiedades mecánicas flexibles presentaron bioactividad produciendo la formación de apatita en su superficie siendo particularmente mayor en los híbridos modificados con nVB, **si bien no se obtiene la relación molar teórica de la hidroxiapatita los resultados se pueden relacionar con fosfato de calcio o apatita con una menor nucleación, tanto la relación molar Ca/P como la suma Ca+P aumenta en los híbridos con un mayor contenido de nVB y con el tiempo de inmersión en SBF lo cual denota bioactividad [128]–[130].** Este efecto se atribuye principalmente a la presencia de nVB en la estructura de los híbridos nanocompuestos, ya que las nVB en contacto con SBF forman hidroxiapatita en su superficie a través de un mecanismo bien conocido [131]. De

este modo la incorporación de nVB a la matriz híbrida de PTHF-TEOS aumenta su capacidad para producir apatita en su superficie, análogamente a como lo produce cuando ha sido utilizada para mejorar la bioactividad de diferentes polímeros o superficies [132], [133]. La bioactividad exhibida por el híbrido nanocompósito, también es favorecida por su propia matriz híbrida. Un híbrido tiene ventajas por sobre un material compósito convencional, ya que en un híbrido la fase bioactiva inorgánica está directamente disponible para que se produzcan los mecanismos de formación de hidroxiapatita, mientras que, en un compósito, la fase orgánica debe degradarse primero para que las partículas bioactivas se expongan y entren en contacto con el medio SBF. [99], [134]. Existen varios esfuerzos de síntesis de materiales híbridos que presentan bioactividad [48], [52], [55], [99], [135], [136], como por ejemplo el trabajo de Lao [137] que al incorporar calcio a un híbrido de gelatina ve incrementada la aposición de apatita en su superficie, y Mondal [138] que con un híbrido de PCL cargado con micropartículas de vidrio de borofosfosilicato resulta aumentar la bioactividad desde los 7 días, semejante efecto en los materiales híbridos de esta tesis, donde se logra un efecto bioactivo desde los 7 días de inmersión en SBF, y ocurre un mayor efecto bioactivo en los híbridos nanocompósitos cargados con nVB, evidenciando la influencia en bioactividad que otorgan las nVB al incorporarlas en las matrices híbridas.

5.5. Citocompatibilidad de los materiales híbridos.

En la literatura se ha demostrado la citocompatibilidad en híbridos con PTHF [75], [110]. En el presente trabajo se lograron composiciones de híbridos nanocompósitos que fueron citocompatibles, incluso algunas composiciones con nVB alcanzaron una viabilidad celular cercana al 100%. El nVB es una nanopartícula cuya citocompatibilidad se encuentra bien demostrada, aumentando en algunos casos la proliferación celular debido a las concentraciones de iones de calcio que libera y a cambios leves de alcalinidad que produce [139], [140]. Por otro lado, cuando los híbridos nanocompósitos con nVB fueron modificados con nCu, sólo los híbridos con contenidos de nCu menores a 1×10^{-5} % en peso presentaron una viabilidad $\geq 70\%$. Estas composiciones citocompatibles requirieron de ajustes en las condiciones de síntesis y de varias iteraciones, lo cual presentó un desafío científico logrado. En la literatura no se encontraron reportes acerca de materiales híbridos de PTHF cargados con nCu y con la citocompatibilidad exhibida en este trabajo. Aunque ciertos niveles de cobre pueden afectar la viabilidad celular por mecanismos oxidativos, es posible encontrar concentraciones que no alteran la viabilidad celular como ha sido demostrado en otros materiales modificados con nCu [141], [142] En el presente trabajo las bajas concentraciones de cobre incorporadas en el híbrido así como liberadas por el material al medio explican la citocompatibilidad lograda.

5.6. Propiedades osteoinductoras de los materiales híbridos.

Se han reportado algunos esfuerzos para obtener híbridos con propiedades osteoinductoras [57], [105], [106], [108], [143], es decir la capacidad de un biomaterial para promover la diferenciación celular hacia un linaje osteogénico. En el presente trabajo los híbridos nanocompuestos con nVB con propiedades mecánicas flexibles y citocompatibles, también presentaron propiedades osteoinductoras. Estos materiales fueron capaces de aumentar la expresión de runx-2, ALP y osterix (sp7), tres marcadores característicos del proceso de diferenciación celular osteogénica. Aunque todos los híbridos presentaron capacidad osteoinductora, la más alta expresión de los marcadores se encontró en los híbridos nanocompuestos con un contenido $\geq 10\%$ de nVB. El aumento en la capacidad osteoinductora con la incorporación de nVB se atribuye a los productos iónicos de disolución de esta partícula, principalmente silicio, calcio y fósforo [144], los cuales activan vías como MAPK-ERK y WNT/ β -catenina [145]–[147] relacionadas con el proceso de diferenciación celular en células encargadas de sintetizar la matriz ósea (osteoblastos). Estos resultados son comparables (considerando las diferencias de matrices y nanopartículas) a los obtenidos en otros estudios dirigidos a mejorar las propiedades osteoestimulativas de los materiales híbridos. Por ejemplo el estudio de Rhee [107] con un híbrido de polimetilmetacrilato y silicio, aumentó la actividad de fosfatasa alcalina en preosteoblastos. Otra forma de mejorar la osteoinducción ha sido cargar los híbridos con micropartículas bioactivas. Mondal [108] con un híbrido de policaprolactona cargado con

un 2% de vidrio de borofosfosilicato observó un aumento de la expresión de los genes de osteopontina, osteocalcina y fosfatasa alcalina en células madre pluripotentes inducidas (iPSC), comprobando la influencia en la osteoinducción que tiene la adición de estas micropartículas a la matriz híbrida de PCL. A diferencia de este estudio en la presente tesis se utilizan nanopartículas de VB, las cuales poseen una mayor área superficial por masa, lo cual incrementa el intercambio de iones solubles, mejorando la capacidad osteoinductora del material. Además, en los estudios de Shirosaki [106], Ren [105] y Aghayan [143] que incorporando calcio a las matrices híbridas registraron un aumento de la actividad de ALP, y en el último además se observó un aumento en la expresión de runx2, colágeno tipo 1, osteopontina y osteocalcina en preosteoblastos. Estos resultados revelan la importancia que tienen los iones de calcio, silicio, fósforo (entre otros) en la activación de las vías de diferenciación osteogénica [144], [148]. Sin embargo, a diferencia de los trabajos reportados que usaron directamente iones solubles de calcio como agente modificante de la estructura del híbrido, los híbridos formulados con nanopartículas de VB del presente estudio utilizan un agente bioactivo que no se solubiliza inmediatamente y por lo tanto ofrecería un efecto bioactivo más sostenido en el tiempo. Adicionalmente, como fue ya discutido, las partículas de nVB contribuyen a reforzar mecánicamente la estructura del híbrido manteniendo la flexibilidad, efecto que no ocurre utilizando iones solubles de calcio.

5.7. Propiedades antibacterianas de materiales híbridos frente a *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*.

Por otro lado, se exploró la incorporación de nCu a los híbridos, para lo cual se requirió iterar el contenido de nCu resultando en híbridos nanocompuestos flexibles con contenidos de nCu de 1×10^{-6} % y 1×10^{-5} % citocompatibles y antibacterianos. Estas composiciones logran tener un efecto antibacteriano frente a *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (serotipo b) debido a que los iones solubles de Cu^{2+} afectan la integridad de las bacterias, aumentando los radicales libres de oxígeno los cuales dañan la membrana plasmática y el núcleo [149]–[151]. Las concentraciones mínimas inhibitorias de iones de Cu^{2+} para los procariotas y eucariotas se encuentran en el rango de 9×10^{-5} a 9×10^{-6} g/ml [152], en los híbridos cargados con nCu esta concentración es más de 10.000 veces mayor (0,1 a 0,45 mg/l), lo cual explica su carácter antibacteriano permitiendo al mismo tiempo una óptima citocompatibilidad. También, el híbrido 15nVB/0,5TEOS presenta citocompatibilidad y además un efecto antibacteriano importante, el cual se atribuye al efecto antimicrobiano que también poseen las partículas de nVB por generar un pH alcalino local posterior al intercambio de iones de sodio con protones. Este cambio de pH a un entorno alcalino es estresante para las bacterias, que responden cambiando su morfología y ultraestructura, modificando el patrón de expresión de numerosos genes y proteínas [153]–[155].

La aplicabilidad de este tipo de materiales se enmarca principalmente en la regeneración de tejidos duros, pero hay otros estudios en cartílago ya que el material puede imitar el

comportamiento de compresión del cartílago y provocar que los condrocitos produzcan marcadores de la matriz similar al cartílago [59], [156]. Las proyecciones clínicas de estos materiales implican una versatilidad debido a que el material puede ser posicionado en un nicho quirúrgico con diferentes geometrías, presenta propiedades osteoinductivas y antibacterianas. Por otro lado, respecto a las limitaciones del estudio, los materiales híbridos nanocompuestos formulados en esta tesis tienen una tasa de degradabilidad baja, pero considerando que es la primera vez que se conceptualiza, sintetiza, caracteriza y se prueba biológicamente un material híbrido nanocompuesto con nVB y nCu, se puede extender a otras matrices de interés, como hidrogeles, biopolímeros o con materiales termoplásticos imprimibles en 3D como el PLGA, otorgando propiedades mejoradas y llevarlo a otros ámbitos de la regeneración de tejidos.

6. Conclusiones.

1. Fue posible la síntesis de materiales híbridos nanocompuestos modificados en su estructura con nanopartículas de nVB y nCu, ciertas composiciones de estos materiales presentaron la propiedad de flexibilidad mecánica.
2. Los híbridos nanocompuestos flexibles fueron bioactivos, promoviendo la formación de apatita tipo ósea en su superficie en contacto con medio fisiológico acelular.

3. Los híbridos nanocompuestos fueron materiales citocompatibles, manteniendo la proliferación celular y ofreciendo un sustrato favorable para la adhesión celular.
4. Los híbridos nanocompuestos con contenidos de nVB superiores al 5% presentaron propiedades osteoinductoras, aumentando la expresión de marcadores del proceso de diferenciación celular hacia linaje osteogénico.
5. La incorporación de ciertas concentraciones de nCu a la estructura de los híbridos cargados con nVB permite generar en el biomaterial propiedades antibacterianas, pero conservando su citocompatibilidad.
6. Las propiedades osteoinductoras, antibacterianas y de flexibilidad mecánica presentadas por los híbridos en base a nanopartículas de nVB/nCu resultan promisorias para el desarrollo de tratamientos clínicos que estimulen la regeneración de tejido óseo, prevengan la aparición de infecciones y ofrezcan adaptabilidad y flexibilidad mecánica en el sitio quirúrgico.

7. Referencias bibliográficas

- [1] D. R. Dawson, A. El-Ghannam, J. E. Van Sickels, and N. Y. Naung, “Tissue Engineering: What is New?,” *Dent. Clin. North Am.*, vol. 63, no. 3, pp. 433–445, 2019, doi: 10.1016/j.cden.2019.02.009.
- [2] US Department of Health and Human Service, “2020: A New Vision,” pp. 1–34, 2005, [Online]. Available: <https://medicine.osu.edu/regenerativemedicine/documents/2020vision.pdf>.
- [3] E. H. Schemitsch, “Size Matters: Defining Critical in Bone Defect Size!,” *J. Orthop. Trauma*, vol. 31, no. 10, pp. S20–S22, 2017, doi: 10.1097/BOT.0000000000000978.
- [4] L. L. Hench, *An Introduction to Bioceramics*. IMPERIAL COLLEGE PRESS, 2013.
- [5] O. Iocca, *Evidence-based implant dentistry*. 2016.
- [6] D. Beebe, *Advanced Periodontal Treatment*. 2014.
- [7] H. Larry L and P. Julia M, “Third-generation biomedical materials,” *Science (80-.)*, vol. 295, no. 5557, pp. 1014–1017, 2002.
- [8] C. A. Vacanti, “The history of tissue engineering,” *J. Cell. Mol. Med.*, vol. 10, no. 3, pp. 569–576, 2006, doi: 10.1111/j.1582-4934.2006.tb00421.x.
- [9] R. Langer and J. Vacanti, “Tissue engineering,” *Science (80-.)*, vol. 260, no. 5110, pp. 920–926, May 1993, doi: 10.1126/science.8493529.

- [10] C. M. Murphy, F. J. O'Brien, D. G. Little, and A. Schindeler, "Cell-scaffold interactions in the bone tissue engineering triad. Attribution-Non-Commercial-ShareAlike 1.0," *Mater. C. Murphy al. Cell-scaffold Interact. Eur. Cells Mater.*, vol. 26, no. 26, pp. 120–132, 2013, [Online]. Available: <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/1.0/> <http://creativecommons.org/worldwide/uk/translated-license/> <http://epubs.rcsi.ie/anatart/61/> <http://www.ecmjournal.org>.
- [11] J. E. Shea and S. C. Miller, "Skeletal function and structure: Implications for tissue-targeted therapeutics," *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 57, no. 7, pp. 945–957, 2005, doi: 10.1016/j.addr.2004.12.017.
- [12] R. Karpiński, Ł. Jaworski, and P. Czubacka, "The Structural and Mechanical Properties of the Bone," *J. Technol. Exploit. Mech. Eng.*, vol. 3, no. 1, pp. 43–50, 2017.
- [13] J. Currey, "The structure and mechanical properties of bone," in *Bioceramics and Their Clinical Applications*, CRC Press, 2008, pp. 3–27.
- [14] J. Rho, L. Kuhn-Spearing, and P. Zioupos, "Mechanical properties and the hierarchical structure of bone," *Med. Eng. Phys.*, vol. 20, no. 2, pp. 92–102, Mar. 1998, doi: 10.1016/S1350-4533(98)00007-1.
- [15] H. Aoki, M. Akao, A. Ito, and S. Nakamura, "Crystal chemistry of hydroxyapatite," *J. Stomatol. Soc.*, vol. 55, no. 3, pp. 451–459, 2011, doi:

10.5357/koubyou.55.451.

- [16] S. Weiner and H. D. Wagner, “THE MATERIAL BONE: Structure-Mechanical Function Relations,” *Annu. Rev. Mater. Sci.*, vol. 28, no. 1, pp. 271–298, 1998, doi: 10.1146/annurev.matsci.28.1.271.
- [17] J. D. Termine, H. K. Kleinman, S. W. Whitson, K. M. Conn, M. L. McGarvey, and G. R. Martin, “Osteonectin, a bone-specific protein linking mineral to collagen,” *Cell*, vol. 26, no. 1 PART 1, pp. 99–105, 1981, doi: 10.1016/0092-8674(81)90037-4.
- [18] P. Ducheyne and Q. Qiu, “Bioactive ceramics: The effect of surface reactivity on bone formation and bone cell function,” *Biomaterials*, vol. 20, no. 23–24, pp. 2287–2303, 1999, doi: 10.1016/S0142-9612(99)00181-7.
- [19] J. R. Jones, “New trends in bioactive scaffolds: The importance of nanostructure,” *J. Eur. Ceram. Soc.*, vol. 29, no. 7, pp. 1275–1281, 2009, doi: 10.1016/j.jeurceramsoc.2008.08.003.
- [20] J. R. Jones, “Reprint of: Review of bioactive glass: From Hench to hybrids,” *Acta Biomater.*, vol. 23, no. S, pp. S53–S82, 2015, doi: 10.1016/j.actbio.2015.07.019.
- [21] J. R. Jones, P. D. Lee, and L. L. Hench, “Hierarchical porous materials for tissue engineering,” *Philos. Trans. R. Soc. A Math. Phys. Eng. Sci.*, vol. 364, no. 1838, pp. 263–281, 2006, doi: 10.1098/rsta.2005.1689.
- [22] L. L. Hench, “The story of Bioglass®,” *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, vol. 17, no. 11,

pp. 967–978, 2006, doi: 10.1007/s10856-006-0432-z.

- [23] N. Gómez-Cerezo *et al.*, “Effects of a mesoporous bioactive glass on osteoblasts, osteoclasts and macrophages,” *J. Colloid Interface Sci.*, vol. 528, pp. 309–320, 2018, doi: 10.1016/j.jcis.2018.05.099.
- [24] C. Wu, J. Chang, and Y. Xiao, *Advanced Bioactive Inorganic Materials for Bone Regeneration and Drug Delivery*. CRC Press, 2013.
- [25] Y. Zhou, C. Wu, and J. Chang, “Bioceramics to regulate stem cells and their microenvironment for tissue regeneration,” *Mater. Today*, vol. 24, no. xx, pp. 41–56, 2019, doi: 10.1016/j.mattod.2018.07.016.
- [26] L. L. Hench, R. J. Splinter, W. C. Allen, and T. K. Greenlee, “Bonding mechanisms at the interface of ceramic prosthetic materials,” *J. Biomed. Mater. Res.*, vol. 5, no. 6, pp. 117–141, 1971, doi: 10.1002/jbm.820050611.
- [27] N. L. Chacko, S. Abraham, H. N. S. Rao, N. Sridhar, N. Moon, and D. H. Barde, “A Clinical and Radiographic Evaluation of Periodontal Regenerative Potential of PerioGlas®: A Synthetic, Resorbable Material in Treating Periodontal Infrabony Defects.,” *J. Int. oral Heal. JIOH*, vol. 6, no. 3, pp. 20–6, 2014, [Online]. Available:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25083028><http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC4109250>.
- [28] F. Baino, S. Hamzehlou, and S. Kargozar, “Bioactive glasses: Where are we and

- where are we going?,” *J. Funct. Biomater.*, vol. 9, no. 1, 2018, doi: 10.3390/jfb9010025.
- [29] I. D. Thompson and L. L. Hench, “Mechanical properties of bioactive glasses, glass-ceramics and composites,” *Proc. Inst. Mech. Eng. Part H J. Eng. Med.*, vol. 212, no. 2, pp. 127–136, 1998, doi: 10.1243/0954411981533908.
- [30] K. Rezwani, Q. Z. Chen, J. J. Blaker, and A. Roberto, “Biodegradable and bioactive porous polymer / inorganic composite scaffolds for bone tissue engineering,” *Biomaterials*, vol. 27, no. 18, pp. 3413–3431, 2006, doi: 10.1016/j.biomaterials.2006.01.039.
- [31] K. Nogi, M. Naito, and T. Yokoyama, *Nanoparticle Technology Handbook*, THIRD EDIT. Amsterdam, Netherlands: Joe Hayton, 2018.
- [32] C. Covarrubias, M. Cádiz, M. Maureira, I. Celhay, F. Cuadra, and A. von Martens, “Bionanocomposite scaffolds based on chitosan–gelatin and nanodimensional bioactive glass particles: In vitro properties and in vivo bone regeneration,” *J. Biomater. Appl.*, vol. 32, no. 9, pp. 1155–1163, 2018, doi: 10.1177/0885328218759042.
- [33] C. Covarrubias *et al.*, “In situ preparation and osteogenic properties of bionanocomposite scaffolds based on aliphatic polyurethane and bioactive glass nanoparticles,” *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 96, no. December, pp. 642–653, 2019, doi: 10.1016/j.msec.2018.11.085.

- [34] S. Mistry *et al.*, “Clinical outcome of hydroxyapatite coated, bioactive glass coated, and machined Ti6Al4V threaded dental implant in human jaws: A short-term comparative study,” *Implant Dent.*, vol. 25, no. 2, pp. 252–260, 2016, doi: 10.1097/ID.0000000000000376.
- [35] M. V. Thomas, D. A. Puleo, and M. Al-Sabbagh, “Bioactive Glass Three Decades On,” *J. Long. Term. Eff. Med. Implants*, vol. 15, no. 6, pp. 585–597, 2012, doi: 10.1615/jlongtermeffmedimplants.v15.i6.20.
- [36] M. Xuereb, J. Camilleri, and N. Attard, “Systematic Review of Current Dental Implant Coating Materials and Novel Coating Techniques,” *Int. J. Prosthodont.*, vol. 28, no. 1, pp. 51–59, 2015, doi: 10.11607/ijp.4124.
- [37] P. Innocenzi, G. Brusatin, M. Guglielmi, and R. Bertani, “New synthetic route to (3-glycidoxypropyl)trimethoxysilane-based hybrid organic-inorganic materials,” *Chem. Mater.*, vol. 11, no. 7, pp. 1672–1679, 1999, doi: 10.1021/cm980734z.
- [38] L. Ren, K. Tsuru, S. Hayakawa, and A. Osaka, “Synthesis and characterization of gelatin-siloxane hybrids derived through sol-gel procedure,” *J. Sol-Gel Sci. Technol.*, vol. 21, no. 1–2, pp. 115–121, 2001, doi: 10.1023/A:1011226104173.
- [39] B. M. Novak, “Hybrid Nanocomposite Materials—between inorganic glasses and organic polymers,” *Adv. Mater.*, vol. 5, no. 6, pp. 422–433, 1993, doi: 10.1002/adma.19930050603.
- [40] O. Mahony *et al.*, “Silica-gelatin hybrids with tailorable degradation and

- mechanical properties for tissue regeneration,” *Adv. Funct. Mater.*, vol. 20, no. 22, pp. 3835–3845, 2010, doi: 10.1002/adfm.201000838.
- [41] E. M. Valliant and J. R. Jones, “Softening bioactive glass for bone regeneration: Sol-gel hybrid materials,” *Soft Matter*, vol. 7, no. 11, pp. 5083–5095, 2011, doi: 10.1039/c0sm01348j.
- [42] O. Nuyken and S. D. Pask, “Ring-opening polymerization-An introductory review,” *Polymers (Basel)*, vol. 5, no. 2, pp. 361–403, 2013, doi: 10.3390/polym5020361.
- [43] E. M. Valliant *et al.*, “Bioactivity in silica/poly(α -glutamic acid) sol-gel hybrids through calcium chelation,” *Acta Biomater.*, vol. 9, no. 8, pp. 7662–7671, 2013, doi: 10.1016/j.actbio.2013.04.037.
- [44] L. Klein, M. Aparicio, and A. Jitianu, *Handbook of Sol-Gel Science and Technology*, Second Edi. Cham: Springer International Publishing, 2018.
- [45] G. Poologasundarampillai *et al.*, “Bioactive silica-poly(γ -glutamic acid) hybrids for bone regeneration: Effect of covalent coupling on dissolution and mechanical properties and fabrication of porous scaffolds,” *Soft Matter*, vol. 8, no. 17, pp. 4822–4832, 2012, doi: 10.1039/c2sm00033d.
- [46] O. Mahony *et al.*, “Silica-gelatin hybrids for tissue regeneration: Inter-relationships between the process variables,” *J. Sol-Gel Sci. Technol.*, vol. 69, no. 2, pp. 288–298, 2014, doi: 10.1007/s10971-013-3214-3.

- [47] Y. Vueva *et al.*, “Silica/alginate hybrid biomaterials and assessment of their covalent coupling,” *Appl. Mater. Today*, vol. 11, pp. 1–12, 2018, doi: 10.1016/j.apmt.2017.12.011.
- [48] L. Ren, K. Tsuru, S. Hayakawa, and A. Osaka, “Novel approach to fabricate porous gelatin-siloxane hybrids for bone tissue engineering,” *Biomaterials*, vol. 23, no. 24, pp. 4765–4773, 2002, doi: 10.1016/S0142-9612(02)00226-0.
- [49] L. Gabrielli *et al.*, “Exploring GPTMS reactivity against simple nucleophiles: Chemistry beyond hybrid materials fabrication,” *RSC Adv.*, vol. 4, no. 4, pp. 1841–1848, 2014, doi: 10.1039/c3ra44748k.
- [50] D. Mondal, A. S. Rizkalla, and K. Mequanint, “Bioactive borophosphosilicate-polycaprolactone hybrid biomaterials: Via a non-aqueous sol gel process,” *RSC Adv.*, vol. 6, no. 95, pp. 92824–92832, 2016, doi: 10.1039/c6ra08339k.
- [51] D. Eglin, D. Mortisen, and M. Alini, “Degradation of synthetic polymeric scaffolds for bone and cartilage tissue repairs,” *Soft Matter*, vol. 5, no. 5, pp. 938–947, 2009, doi: 10.1039/b803718n.
- [52] S. Rhee and J. Choi, “Preparation of a Bioactive Poly(methyl methacrylate)/Silica Nanocomposite,” *J. Am. Ceram. Soc.*, vol. 85, no. 5, pp. 1318–1320, Dec. 2004, doi: 10.1111/j.1151-2916.2002.tb00269.x.
- [53] J. J. Chung, S. Li, M. M. Stevens, T. K. Georgiou, and J. R. Jones, “Tailoring Mechanical Properties of Sol-Gel Hybrids for Bone Regeneration through Polymer

- Structure,” *Chem. Mater.*, vol. 28, no. 17, pp. 6127–6135, 2016, doi: 10.1021/acs.chemmater.6b01941.
- [54] L. S. Connell, L. Gabrielli, O. Mahony, L. Russo, L. Cipolla, and J. R. Jones, “Functionalizing natural polymers with alkoxy silane coupling agents: Reacting 3-glycidoxypropyl trimethoxysilane with poly(γ -glutamic acid) and gelatin,” *Polym. Chem.*, vol. 8, no. 6, pp. 1095–1103, 2017, doi: 10.1039/c6py01425a.
- [55] L. S. Connell *et al.*, “Chemical characterisation and fabrication of chitosan-silica hybrid scaffolds with 3-glycidoxypropyl trimethoxysilane,” *J. Mater. Chem. B*, vol. 2, no. 6, pp. 668–680, 2014, doi: 10.1039/c3tb21507e.
- [56] R. Ravarian, M. Craft, and F. Dehghani, “Enhancing the biological activity of chitosan and controlling the degradation by nanoscale interaction with bioglass,” *J. Biomed. Mater. Res. - Part A*, vol. 103, no. 9, pp. 2898–2908, 2015, doi: 10.1002/jbm.a.35423.
- [57] Y. SHIROSAKI *et al.*, “Preparation of osteocompatible Si(IV)-enriched chitosan–silicate hybrids,” *J. Ceram. Soc. Japan*, vol. 118, no. 1383, pp. 989–992, 2010, doi: 10.2109/jcersj2.118.989.
- [58] T. Sang, S. Li, H. K. Ting, M. M. Stevens, C. R. Becer, and J. R. Jones, “Hybrids of Silica/Poly(caprolactone coglycidoxypropyl trimethoxysilane) as Biomaterials,” *Chem. Mater.*, vol. 30, no. 11, pp. 3743–3751, 2018, doi: 10.1021/acs.chemmater.8b00751.

- [59] F. Tallia *et al.*, “Bouncing and 3D printable hybrids with self-healing properties,” *Mater. Horizons*, vol. 5, no. 5, pp. 849–860, 2018, doi: 10.1039/c8mh00027a.
- [60] A. Fidalgo and L. M. Ilharco, “The defect structure of sol-gel-derived silica/polytetrahydrofuran hybrid films by FTIR,” *J. Non. Cryst. Solids*, vol. 283, no. 1–3, pp. 144–154, 2001, doi: 10.1016/S0022-3093(01)00418-5.
- [61] Y. fei Zhang *et al.*, “O-Carboxymethyl-chitosan/organosilica hybrid nanoparticles as non-viral vectors for gene delivery,” *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 29, no. 6, pp. 2045–2049, 2009, doi: 10.1016/j.msec.2009.04.003.
- [62] R. Z. Zand, A. E. Langroudi, and A. Rahimi, “Synthesis and Characterization of Nanocomposite Hybrid Coatings Based on 3-Glycidoxypropyl-trimethoxysilane and Bisphenol A,” *Iran. Polym. J.*, vol. 14, no. 4, pp. 371–377, 2005.
- [63] S. J. Shieh and J. P. Vacanti, “State-of-the-art tissue engineering: From tissue engineering to organ building,” *Surgery*, vol. 137, no. 1, pp. 1–7, 2005, doi: 10.1016/j.surg.2004.04.002.
- [64] J. J. Li, M. Ebied, J. Xu, and H. Zreiqat, “Current Approaches to Bone Tissue Engineering: The Interface between Biology and Engineering,” *Adv. Healthc. Mater.*, vol. 7, no. 6, pp. 1–8, 2018, doi: 10.1002/adhm.201701061.
- [65] B. Lei, K. H. Shin, Y. H. Koh, and H. E. Kim, “Porous gelatin-siloxane hybrid scaffolds with biomimetic structure and properties for bone tissue regeneration,” *J. Biomed. Mater. Res. - Part B Appl. Biomater.*, vol. 102, no. 7, pp. 1528–1536, 2014,

doi: 10.1002/jbm.b.33133.

- [66] R. Ravarian, C. M. Murphy, A. Schindeler, A. Rawal, J. M. Hook, and F. Dehghani, “Bioactive poly(methyl methacrylate) for bone fixation,” *RSC Adv.*, vol. 5, no. 75, pp. 60681–60690, 2015, doi: 10.1039/c5ra08824k.
- [67] F. Tallia, “3-D printed flexible hybrids for tissue regeneration,” no. November, 2016.
- [68] L. Wang, B. Yu, L. P. Sun, L. Ren, and Q. Q. Zhang, “Microsphere-integrated gelatin-siloxane hybrid scaffolds for bone tissue engineering: In vitro bioactivity & antibacterial activity,” *Front. Mater. Sci. China*, vol. 2, no. 2, pp. 172–178, 2008, doi: 10.1007/s11706-008-0029-1.
- [69] R. P. Allaker, *Nanoparticles and the Control of Oral Biofilms*. Elsevier Inc., 2012.
- [70] K. C. Anyaogu, A. V. Fedorov, and D. C. Neckers, “Synthesis, characterization, and antifouling potential of functionalized copper nanoparticles,” *Langmuir*, vol. 24, no. 8, pp. 4340–4346, 2008, doi: 10.1021/la800102f.
- [71] J. Chapman *et al.*, “Antifouling performances of macro- to micro- to nano-copper materials for the inhibition of biofouling in its early stages,” *J. Mater. Chem. B*, vol. 1, no. 45, pp. 6194–6200, 2013, doi: 10.1039/c3tb21285h.
- [72] C. Covarrubias Gallardo, Mauricio., S. A. Correa Hernández, L. F. Matamala López, and J. P. González Rojas, “Method for producing orthopaedic and dental acrylic materials having antimicrobial properties, using copper nanoparticle

- technology,” WO 2017/113030 A1, 2017.
- [73] F. Valenzuela, C. Covarrubias, C. Martínez, P. Smith, M. Díaz-Dosque, and M. Yazdani-Pedram, “Preparation and bioactive properties of novel bone-repair bionanocomposites based on hydroxyapatite and bioactive glass nanoparticles,” *J. Biomed. Mater. Res. - Part B Appl. Biomater.*, vol. 100 B, no. 6, pp. 1672–1682, 2012, doi: 10.1002/jbm.b.32736.
- [74] C. Covarrubias *et al.*, “The Effect of the Nanoscale Structure of Nanobioceramics on Their In Vitro Bioactivity and Cell Differentiation Properties ,” *J. Nanomater.*, vol. 2015, pp. 1–14, 2015, doi: 10.1155/2015/526230.
- [75] G. Young *et al.*, “Hybrid materials with continuous mechanical property gradients that can be 3D printed,” *Mater. Today Adv.*, vol. 17, p. 100344, Mar. 2023, doi: 10.1016/j.mtadv.2023.100344.
- [76] W. Fan *et al.*, “Resolving the Conflict between Strength and Toughness in Bioactive Silica–Polymer Hybrid Materials,” *ACS Nano*, vol. 16, no. 6, pp. 9748–9761, Jun. 2022, doi: 10.1021/acsnano.2c03440.
- [77] M. J. Duer, *Solid-State NMR Spectroscopy Principles and Applications*. 2010.
- [78] P. Hore, *Nuclear Magnetic Resonance*. Oxford Chemistry Primers, 2015.
- [79] E. Becker, *Book Reviews: High Resolution NMR: Theory and Chemical Applications*, vol. 54, no. 8. Academic Press Inc., 2000.
- [80] G. S. Nikoli, *Fourier Transforms - New Analytical Approaches and FTIR*

Strategies. 2012.

- [81] M. Lee, *X-Ray Diffraction for Materials Research: From Fundamentals to Applications* Myeongkyu Lee, vol. 42, no. 02. 2017.
- [82] P. Gabbott, *Principles and Applications of Thermal Analysis*, vol. 4, no. 1. 2008.
- [83] R. Egerton, *Physical Principles of Electron Microscopy*, 2nd ed. Edmonton, Canada: Springer International Publishing, 2016.
- [84] thermoscientific, *Exploring Uncharted Realms with Electron Microscopy*. 2018.
- [85] W. D. Callister Jr and D. G. Rethwisch, *Materials Science and Engineering*, 10th ed. 2018.
- [86] L. N. D. M. Ribeiro, V. M. Couto, L. F. Fraceto, and E. de Paula, “Use of nanoparticle concentration as a tool to understand the structural properties of colloids,” *Sci. Rep.*, vol. 8, no. 1, p. 982, Jan. 2018, doi: 10.1038/s41598-017-18573-7.
- [87] Malvern Instruments, *Manual: NanoSight NS300 user manual MAN0516*, no. September. 2015.
- [88] J. J. R. and C. A. G., *Bio-Glasses*. .
- [89] A. V. Kalenskii, A. A. Zvekov, A. P. Nikitin, and M. V. Anan’eva, “Optical Properties of Copper Nanoparticles,” *Russ. Phys. J.*, vol. 58, no. 8, pp. 1098–1104, Dec. 2015, doi: 10.1007/s11182-015-0618-2.
- [90] G. W. Lu and P. Gao, “Emulsions and Microemulsions for Topical and

Transdermal Drug Delivery,” in *Handbook of Non-Invasive Drug Delivery Systems*, Elsevier, 2010, pp. 59–94.

- [91] N. Schultz, G. Metreveli, M. Franzreb, F. H. Frimmel, and C. Syldatk, “Zeta potential measurement as a diagnostic tool in enzyme immobilisation,” *Colloids Surfaces B Biointerfaces*, vol. 66, no. 1, pp. 39–44, Oct. 2008, doi: 10.1016/j.colsurfb.2008.05.004.
- [92] A. Doostmohammadi, A. Monshi, R. Salehi, M. H. Fathi, Z. Golniya, and A. U. Daniels, “Bioactive glass nanoparticles with negative zeta potential,” *Ceram. Int.*, vol. 37, no. 7, pp. 2311–2316, Sep. 2011, doi: 10.1016/j.ceramint.2011.03.026.
- [93] B. Voigtländer, *Atomic Force Microscopy*. Aachen, Germany: Springer International Publishing, 2019.
- [94] T. Furuike, H. Nagahama, T. Chaochai, and H. Tamura, “Preparation and Characterization of Chitosan-Coated Poly(l-Lactic Acid) Fibers and Their Braided Rope,” *Fibers*, vol. 3, no. 4, pp. 380–393, Oct. 2015, doi: 10.3390/fib3040380.
- [95] T. Kokubo, H. Kushitani, C. Ohtsuki, S. Sakka, and T. Yamamuro, “Chemical reaction of bioactive glass and glass-ceramics with a simulated body fluid,” *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, vol. 3, no. 2, pp. 79–83, 1992, doi: 10.1007/BF00705272.
- [96] K. J. Livak and T. D. Schmittgen, “Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method,” *Methods*, vol. 25, no. 4, pp. 402–408, 2001, doi: 10.1006/meth.2001.1262.

- [97] T. Ovejero Martinez, “Validación de los datos obtenidos en un análisis genómico y metabolómico de un modelo animal de sobreexpresión de la COX-2 en hígado,” Universitat de Valencia, 2013.
- [98] H. Eckert, “Structural characterization of bioactive glasses by solid state NMR,” *J. Sol-Gel Sci. Technol.*, vol. 88, no. 2, pp. 263–295, 2018, doi: 10.1007/s10971-018-4795-7.
- [99] G. Poologasundarampillai *et al.*, “Synthesis of bioactive class II poly(γ -glutamic acid)/silica hybrids for bone regeneration,” *J. Mater. Chem.*, vol. 20, no. 40, pp. 8952–8961, 2010, doi: 10.1039/c0jm00930j.
- [100] D. Tian, P. Dubois, and R. Jérôme, “Biodegradable and biocompatible inorganic-organic hybrid materials. I. Synthesis and characterization,” *J. Polym. Sci. Part A Polym. Chem.*, vol. 35, no. 11, pp. 2295–2309, 1997, doi: 10.1002/(SICI)1099-0518(199708)35:11<2295::AID-POLA21>3.0.CO;2-8.
- [101] F. Tallia *et al.*, “Bioactive, Degradable and Tough Hybrids Through Calcium and Phosphate Incorporation,” *Front. Mater.*, vol. 9, no. July, pp. 1–18, Jul. 2022, doi: 10.3389/fmats.2022.901196.
- [102] S. Paszkiewicz *et al.*, “Biobased Thermoplastic Elastomers: Structure-Property Relationship of Poly(hexamethylene 2,5-furanodicarboxylate)-Block-Poly(tetrahydrofuran) Copolymers Prepared by Melt Polycondensation,” *Polymers (Basel)*, vol. 13, no. 3, p. 397, Jan. 2021, doi: 10.3390/polym13030397.

- [103] C. Gül, S. Albayrak, H. Durmuş, and N. Çömez, “Characterization of SiO₂ sol-gel coated Ti6Al4V alloy obtained by using TEOS and GPTMS,” *Sci. Sinter.*, vol. 53, no. 4, pp. 461–473, 2021, doi: 10.2298/SOS2104461G.
- [104] D. Mondal, “Covalently Crosslinked Organic / Inorganic Hybrid Biomaterials for Bone Tissue Engineering Applications,” 2018.
- [105] L. Ren, K. Tsuru, S. Hayakawa, and A. Osaka, “In vitro evaluation of osteoblast response to sol-gel derived gelatin-siloxane hybrids,” *J. Sol-Gel Sci. Technol.*, vol. 26, no. 1–3, pp. 1137–1140, 2003, doi: 10.1023/A:1020775227716.
- [106] Y. Shirosaki *et al.*, “In vitro cytocompatibility of MG63 cells on chitosan-organosiloxane hybrid membranes,” *Biomaterials*, vol. 26, no. 5, pp. 485–493, 2005, doi: 10.1016/j.biomaterials.2004.02.056.
- [107] S. H. Rhee, M. H. Hwang, H. J. Si, and J. Y. Choi, “Biological activities of osteoblasts on poly(methyl methacrylate)/silica hybrid containing calcium salt,” *Biomaterials*, vol. 24, no. 6, pp. 901–906, 2003, doi: 10.1016/S0142-9612(02)00421-0.
- [108] D. Mondal, S. Lin, A. S. Rizkalla, and K. Mequanint, “Porous and biodegradable polycaprolactone-borophosphosilicate hybrid scaffolds for osteoblast infiltration and stem cell differentiation,” *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.*, vol. 92, pp. 162–171, 2019, doi: 10.1016/j.jmbbm.2019.01.011.
- [109] V. P.M. and M. José Martínez Morlanes, *Nanomaterials and Nanocomposites*.

Wiley-VCH.

- [110] W. Fan *et al.*, “Resolving the Conflict between Strength and Toughness in Bioactive Silica-Polymer Hybrid Materials,” *ACS Nano*, vol. 16, no. 6, pp. 9748–9761, 2022, doi: 10.1021/acsnano.2c03440.
- [111] Khoulood Jlassi, M. M. Chehimi, and S. Thomas, *Clay Polymer Nanocomposites*. Elsevier B.V, 2019.
- [112] M. D. Kiran, H. K. Govindaraju, T. Jayaraju, and N. Kumar, “Review-Effect of Fillers on Mechanical Properties of Polymer Matrix Composites,” *Mater. Today Proc.*, vol. 5, no. 10, pp. 22421–22424, 2018, doi: 10.1016/j.matpr.2018.06.611.
- [113] J. M. Faulstich de Paiva and E. Frollini, “Unmodified and Modified Surface Sisal Fibers as Reinforcement of Phenolic and Lignophenolic Matrices Composites: Thermal Analyses of Fibers and Composites,” *Macromol. Mater. Eng.*, vol. 291, no. 4, pp. 405–417, Apr. 2006, doi: 10.1002/mame.200500334.
- [114] K. A. Padmanabhan, “Mechanical properties of nanostructured materials,” *Mater. Sci. Eng. A*, vol. 304–306, no. 1–2, pp. 200–205, May 2001, doi: 10.1016/S0921-5093(00)01437-4.
- [115] R.-M. Wang, S.-R. Zheng, and Y.-P. Zheng, “Matrix materials,” in *Polymer Matrix Composites and Technology*, Elsevier, 2011, pp. 101–548.
- [116] G. P. Rajendran, V. Mahadevan, and M. Srinivasan, “Synthesis of some low glass transition temperature polytetrahydrofuran polymers,” *Eur. Polym. J.*, vol. 25, no.

- 5, pp. 461–463, Jan. 1989, doi: 10.1016/0014-3057(89)90186-9.
- [117] T. C. Chang, K. H. Wu, H. B. Chen, S. Y. Ho, and Y. S. Chiu, “Thermal degradation of aged polytetrahydrofuran and its copolymers with 3-azidomethyl-3-methyloxetane and 3-nitratomethyl-3-methyloxetane by thermogravimetry,” *J. Polym. Sci. Part A Polym. Chem.*, vol. 34, no. 16, pp. 3337–3343, Nov. 1996, doi: 10.1002/(SICI)1099-0518(19961130)34:16<3337::AID-POLA10>3.0.CO;2-H.
- [118] A. L. B. Maçon, “Impact of the polymer design on the structure and properties of class II silicate hybrids.”
- [119] P. Lagarrigue *et al.*, “Poly(ϵ -lactide)-Grafted Bioactive Glass Nanoparticles: From Nanobricks to Freeze-Cast Scaffolds for Bone Substitution,” *ACS Appl. Nano Mater.*, vol. 5, no. 4, pp. 5278–5291, Apr. 2022, doi: 10.1021/acsanm.2c00313.
- [120] S. L. Greasley *et al.*, “Controlling particle size in the Stöber process and incorporation of calcium,” *J. Colloid Interface Sci.*, vol. 469, pp. 213–223, May 2016, doi: 10.1016/j.jcis.2016.01.065.
- [121] N. Pajares-Chamorro and X. Chatzistavrou, “Bioactive Glass Nanoparticles for Tissue Regeneration,” *ACS Omega*, vol. 5, no. 22, pp. 12716–12726, Jun. 2020, doi: 10.1021/acsomega.0c00180.
- [122] J. Sarkar, N. Chakraborty, A. Chatterjee, A. Bhattacharjee, D. Dasgupta, and K. Acharya, “Green Synthesized Copper Oxide Nanoparticles Ameliorate Defence

- and Antioxidant Enzymes in *Lens culinaris*,” *Nanomaterials*, vol. 10, no. 2, p. 312, Feb. 2020, doi: 10.3390/nano10020312.
- [123] R. Smeets *et al.*, “A new biphasic osteoinductive calcium composite material with a negative Zeta potential for bone augmentation,” *Head Face Med.*, vol. 5, no. 1, p. 13, Dec. 2009, doi: 10.1186/1746-160X-5-13.
- [124] N. C. Teng, S. Nakamura, Y. Takagi, Y. Yamashita, M. Ohgaki, and K. Yamashita, “A New Approach to Enhancement of Bone Formation by Electrically Polarized Hydroxyapatite,” *J. Dent. Res.*, vol. 80, no. 10, pp. 1925–1929, Oct. 2001, doi: 10.1177/00220345010800101201.
- [125] G. Young, “Hybrid biomaterials with tuneable mechanical property gradients,” Imperial College London, 2019.
- [126] M. A. Woodruff and D. W. Hutmacher, “The return of a forgotten polymer—Polycaprolactone in the 21st century,” *Prog. Polym. Sci.*, vol. 35, no. 10, pp. 1217–1256, Oct. 2010, doi: 10.1016/j.progpolymsci.2010.04.002.
- [127] D. Mondal, S. J. Dixon, K. Mequanint, and A. S. Rizkalla, “Mechanically-competent and cytocompatible polycaprolactone-borophosphosilicate hybrid biomaterials,” *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.*, vol. 75, pp. 180–189, 2017, doi: 10.1016/j.jmbbm.2017.07.010.
- [128] O. Kaygili, S. Keser, M. Kom, N. Bulut, and S. V. Dorozhkin, “The effect of simulating body fluid on the structural properties of hydroxyapatite synthesized in

- the presence of citric acid,” *Prog. Biomater.*, vol. 5, no. 3–4, pp. 173–182, Dec. 2016, doi: 10.1007/s40204-016-0055-5.
- [129] O. Kaygili *et al.*, “Strontium substituted hydroxyapatites: Synthesis and determination of their structural properties, in vitro and in vivo performance,” *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 55, pp. 538–546, Oct. 2015, doi: 10.1016/j.msec.2015.05.081.
- [130] O. Kaygili, S. Keser, R. H. Al Orainy, T. Ates, and F. Yakuphanoglu, “In vitro characterization of polyvinyl alcohol assisted hydroxyapatite derived by sol–gel method,” *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 35, no. 1, pp. 239–244, Feb. 2014, doi: 10.1016/j.msec.2013.11.001.
- [131] N. Rocton, H. Oudadesse, B. Lefevre, H. Peisker, and K. Rbii, “Fine analysis of interaction mechanism of bioactive glass surface after soaking in SBF solution: AFM and ICP-OES investigations,” *Appl. Surf. Sci.*, vol. 505, no. September, p. 144076, Mar. 2020, doi: 10.1016/j.apsusc.2019.144076.
- [132] C. Covarrubias *et al.*, “In situ preparation and osteogenic properties of bionanocomposite scaffolds based on aliphatic polyurethane and bioactive glass nanoparticles,” *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 96, pp. 642–653, 2019, doi: 10.1016/j.msec.2018.11.085.
- [133] C. Corral Nuñez, C. Covarrubias, E. Fernandez, and O. B. de Oliveira Junior, “Enhanced bioactive properties of biodentine™ modified with bioactive glass

- nanoparticles,” *J. Appl. Oral Sci.*, vol. 25, no. 2, pp. 177–185, 2017, doi: 10.1590/1678-77572016-0209.
- [134] M. Navarro, C. Aparicio, M. Charles-Harris, M. P. Ginebra, E. Engel, and J. A. Planell, “Development of a Biodegradable Composite Scaffold for Bone Tissue Engineering: Physicochemical, Topographical, Mechanical, Degradation, and Biological Properties,” in *Advances in Polymer Science*, vol. 200, no. 1, 2006, pp. 209–231.
- [135] B. A. Allo, S. Lin, K. Mequanint, and A. S. Rizkalla, “Role of bioactive 3D hybrid fibrous scaffolds on mechanical behavior and spatiotemporal osteoblast gene expression,” *ACS Appl. Mater. Interfaces*, vol. 5, no. 15, pp. 7574–7583, Aug. 2013, doi: 10.1021/am401861w.
- [136] A. Houaoui *et al.*, “New generation of hybrid materials based on gelatin and bioactive glass particles for bone tissue regeneration,” *Biomolecules*, vol. 11, no. 3, pp. 1–16, 2021, doi: 10.3390/biom11030444.
- [137] J. Lao, X. Dieudonné, F. Fayon, V. Montouillout, and E. Jallot, “Bioactive glass-gelatin hybrids: Building scaffolds with enhanced calcium incorporation and controlled porosity for bone regeneration,” *J. Mater. Chem. B*, vol. 4, no. 14, pp. 2486–2497, 2016, doi: 10.1039/c5tb02345a.
- [138] D. Mondal, A. S. Rizkalla, and K. Mequanint, “Bioactive borophosphosilicate-polycaprolactone hybrid biomaterials: Via a non-aqueous sol gel process,” *RSC*

Adv., vol. 6, no. 95, pp. 92824–92832, 2016, doi: 10.1039/c6ra08339k.

- [139] A. B. Houreh, S. Labbaf, H. K. Ting, F. Ejeian, J. R. Jones, and M. H. N. Esfahani, “Influence of calcium and phosphorus release from bioactive glasses on viability and differentiation of dental pulp stem cells,” *J. Mater. Sci.*, vol. 52, no. 15, pp. 8928–8941, 2017, doi: 10.1007/s10853-017-0946-4.
- [140] R. Schreiber, “Ca²⁺ Signaling, Intracellular pH and Cell Volume in Cell Proliferation,” *J. Membr. Biol.*, vol. 205, no. 3, p. 129, Jun. 2005, doi: 10.1007/s00232-005-0778-z.
- [141] L. Matamala López, “Optimización de materiales acrílicos modificados con nanopartículas de cobre para el desarrollo de prótesis dentales con propiedades antimicrobianas frente a *Candida albicans*,” 2016.
- [142] M. Fernández-Arias *et al.*, “Copper nanoparticles obtained by laser ablation in liquids as bactericidal agent for dental applications,” *Appl. Surf. Sci.*, vol. 507, p. 145032, Mar. 2020, doi: 10.1016/j.apsusc.2019.145032.
- [143] M. Aghayan, P. Alizadeh, and M. Keshavarz, “Multifunctional polyethylene imine hybrids decorated by silica bioactive glass with enhanced mechanical properties, antibacterial, and osteogenesis for bone repair,” *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 131, no. November, p. 112534, Dec. 2021, doi: 10.1016/j.msec.2021.112534.
- [144] I. D. Xynos, A. J. Edgar, L. D. K. Buttery, L. L. Hench, and J. M. Polak, “Gene-expression profiling of human osteoblasts following treatment with the ionic

- products of Bioglass® 45S5 dissolution,” *J. Biomed. Mater. Res.*, vol. 55, no. 2, pp. 151–157, May 2001, doi: 10.1002/1097-4636(200105)55:2<151::AID-JBM1001>3.0.CO;2-D.
- [145] L. Li *et al.*, “Acceleration of bone regeneration by activating Wnt/ β -catenin signalling pathway via lithium released from lithium chloride/calcium phosphate cement in osteoporosis,” *Sci. Rep.*, vol. 7, no. 1, p. 45204, Mar. 2017, doi: 10.1038/srep45204.
- [146] M. Ojansivu *et al.*, “Bioactive glass induced osteogenic differentiation of human adipose stem cells is dependent on cell attachment mechanism and mitogen-activated protein kinases,” *Eur. Cells Mater.*, vol. 35, pp. 54–72, Jan. 2018, doi: 10.22203/eCM.v035a05.
- [147] W. Gong, Y. Dong, S. Wang, X. Gao, and X. Chen, “A novel nano-sized bioactive glass stimulates osteogenesis via the MAPK pathway,” *RSC Adv.*, vol. 7, no. 23, pp. 13760–13767, 2017, doi: 10.1039/C6RA26713K.
- [148] I. D. Xynos, M. V. J. Hukkanen, J. J. Batten, L. D. Buttery, L. L. Hench, and J. M. Polak, “Bioglass® 45S5 Stimulates Osteoblast Turnover and Enhances Bone Formation In Vitro: Implications and Applications for Bone Tissue Engineering,” *Calcif. Tissue Int.*, vol. 67, no. 4, pp. 321–329, Oct. 2000, doi: 10.1007/s002230001134.
- [149] X. Ma, S. Zhou, X. Xu, and Q. Du, “Copper-containing nanoparticles: Mechanism

- of antimicrobial effect and application in dentistry-a narrative review,” *Front. Surg.*, vol. 9, no. August, Aug. 2022, doi: 10.3389/fsurg.2022.905892.
- [150] C. Covarrubias *et al.*, “Preparation of osteoinductive – Antimicrobial nanocomposite scaffolds based on poly (D,L-lactide-co-glycolide) modified with copper – Doped bioactive glass nanoparticles,” *Polym. Polym. Compos.*, vol. 30, p. 096739112210982, Jan. 2022, doi: 10.1177/09673911221098231.
- [151] D. Aguilar-Perez *et al.*, “Antibacterial activity of a glass ionomer cement doped with copper nanoparticles,” *Dent. Mater. J.*, vol. 39, no. 3, pp. 389–396, 2020, doi: 10.4012/dmj.2019-046.
- [152] L. Fowler, H. Engqvist, and C. Öhman-Mägi, “Effect of Copper Ion Concentration on Bacteria and Cells,” *Materials (Basel)*, vol. 12, no. 22, p. 3798, Nov. 2019, doi: 10.3390/ma12223798.
- [153] P. Zhou, B. L. Garcia, and G. A. Kotsakis, “Comparison of antibacterial and antibiofilm activity of bioactive glass compounds S53P4 and 45S5,” *BMC Microbiol.*, vol. 22, no. 1, p. 212, Sep. 2022, doi: 10.1186/s12866-022-02617-8.
- [154] L. Drago, M. Toscano, and M. Bottagisio, “Recent Evidence on Bioactive Glass Antimicrobial and Antibiofilm Activity: A Mini-Review,” *Materials (Basel)*, vol. 11, no. 2, p. 326, Feb. 2018, doi: 10.3390/ma11020326.
- [155] S. Begum, W. E. Johnson, T. Worthington, and R. A. Martin, “The influence of pH and fluid dynamics on the antibacterial efficacy of 45S5 Bioglass,” *Biomed. Mater.*,

vol. 11, no. 1, p. 015006, Feb. 2016, doi: 10.1088/1748-6041/11/1/015006.

[156] M. Nelson, “3D Silica-Gelatin Hybrid Scaffolds for Tissue Regeneration,” Imperial College London, 2016.

8. Anexos.

8.1. Abreviaturas.

ALP: fosfatasa alcalina.

BF₃·OEt₂: Trifluoruro dietil eterato de boro.

BG: Bioglass or bioactive glass.

C_p: Capacidad calorífica.

CROP: Polimerización catiónica de apertura de anillos.

D_c: grado de condensación.

DLS: Dispersión dinámica de luz.

DMA: Análisis dinámico mecánico.

DSC: Calorimetría diferencial de barrido.

FTIR-ATR: espectroscopia de infrarrojo por transformada de Fourier con reflexión total atenuada.

f %: porcentaje de abundancia (*f*) de las especies de T y Q de silicio en los materiales híbridos.

G´: módulo de almacenamiento.

G'': módulo de pérdida

GPTMS: 3-(Glicidiloxipropil)trimetoxisilano.

hDPSC: Células madre de pulpa dental.

iPSC: Células madre pluripotentes inducidas.

MTS: Ensayo de viabilidad celular por reducción de sales de tetrazolio.

mW: Miliwatts.

nBG: Bioactive glass nanoparticles.

nCu: Nanopartículas de cobre.

NTA: análisis de rastreo de nanopartículas.

nVB: Nanopartículas de vidrio bioactivo.

PBS: Solución buffer de fosfato salino.

PCL: Policaprolactona.

PLGA: ácido poli (láctico-co-glicólico).

PTHF: Poli-tetrahidrofurano.

R_q: Rugosidad media cuadrática.

SBF: Fluido corporal simulado.

SEM: Microscopio electrónico de barrido.

Tan Delta (δ): Representa la relación entre la respuesta viscosa y elástica de un material viscoelástico.

TEM: Microscopio electrónico de transmisión.

TEOS: Tetraetil Ortosilicato.

T_c: Temperatura de cristalización.

T_g: Temperatura de transición vítrea.

THF: Tetrahidrofurano.

TRIS: tris(hidroximetil)aminometano (usado en buffer).

8.2. Consentimiento informado.



CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

(Participantes adultos)

Nombre de estudio: “Diseño de nuevos biomateriales y aislamiento de células madre para ingeniería de tejido óseo y cartilaginoso”

Investigador Principal: Prof. Dr. Cristian Covarrubias Gallardo.
Instituto de Investigación en Ciencias Odontológicas
Facultad de Odontología, Universidad de Chile.
Sergio Livingstone Pohlhammer 943, Independencia, Santiago.
Fono: 9781719, E-mail: ccovarrubias@odontologia.uchile.cl

Nombre del Patrocinante: Facultad de Odontología, Universidad de Chile

Proyecto revisado y aprobado por el Comité Ético Científico de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile.

Presidente CEC: Dr. Eduardo Fernández G.
Departamento de Odontología Restauradora. Universidad de Chile
Sergio Livingstone Pohlhammer 943, Independencia, Santiago.
E-mail: edofdez@u.uchile.cl

Nombre del Participante: _____

Este Documento de Consentimiento Informado tiene dos partes:

- Información (proporciona información sobre el estudio para usted)
- Formulario de Consentimiento (para firmar si está de acuerdo en participar)

Se le dará una copia del Documento completo de consentimiento informado

Solicitamos a Usted su colaboración con este estudio. Antes de decidir si colabora o no, debe conocer y comprender los aspectos que se exponen a continuación. Siéntase con absoluta libertad para preguntar sobre cualquier aspecto sobre el cual tenga dudas. Una vez que haya comprendido el estudio y si usted desea colaborar, entonces se le pedirá que firme este formulario.



EXPLICACIÓN DEL PROYECTO

El hueso de nuestro cuerpo se puede perder por diferentes motivos, tales como accidentes, enfermedades, malformaciones, o infecciones como las que afectan el hueso que sostiene nuestros dientes. Para recuperar el hueso perdido se debe extraer al paciente hueso de otra zona de su cuerpo o utilizar algunos injertos sintéticos que no siempre son muy efectivos. Por esta razón hoy en día la ingeniería de tejidos estudia formas para regenerar hueso utilizando biomateriales y células madre.

Se está haciendo un estudio para desarrollar biomateriales, utilizando unas partículas muy pequeñas (nanopartículas) que estimulan la formación de hueso, las que se combinarán con células madre, que pueden formar un hueso nuevo. Estas células madre se obtendrán desde la pulpa de los dientes o de una parte de la encía que se conoce como zona retromolar.

Lo hemos contactado porque usted requiere la extracción de algunos dientes que cumplen con los requisitos requeridos para este estudio (la extracción del tercer molar por indicaciones quirúrgicas o protésicas u ortodóncicas, sin enfermedad periodontal ni otras enfermedades generales); quisiéramos solicitar a Usted, la donación de sus dientes extraídos. De otra forma, si usted está siendo sometido a un tratamiento con implantes dentales le solicitamos donar una pequeña muestra de su encía obtenida de la zona que está detrás de su último diente. Estas muestras de tejido serán tomadas por el cirujano maxilofacial y no implicará un procedimiento extra.

Los dientes o el tejido de la zona retromolar donados, se utilizarán sólo con el fin recién expuesto y no se guardará ningún registro de su relación con el donante (con usted). Ningún otro tipo de estudio se realizará con tejidos dentales ni con las células madre obtenidas de ellos. Una vez utilizados, los dientes serán destruidos y eliminados siguiendo los protocolos de bioseguridad vigentes. La obtención de estas muestras en sí no presenta riesgos, ni costos adicionales para usted, pero el financiamiento del proceso quirúrgico de extracción será su responsabilidad.

No existe ningún tipo beneficio inmediato por su participación en el estudio, ya que los tejidos dentales a utilizar son normalmente desechados. Sin embargo, como consecuencia de esta donación y de la investigación a realizar se espera contribuir a aplicaciones futuras en el ámbito clínico.

Aclaraciones

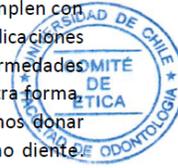
La colaboración con el estudio es completamente voluntaria, y usted puede dejar de participar libremente.

No habrá ninguna consecuencia desfavorable para usted en caso de no aceptar la invitación.

No tendrá que efectuar gasto alguno como consecuencia del estudio.

No recibirá pago por su donación.

Si considera que no existen dudas ni preguntas acerca de su participación, le solicitamos firmar el Formulario de consentimiento Informado anexo al documento. Si usted desea conocer los resultados o tiene cualquier pregunta puede hacerla ahora o más tarde, contactando al Dr. Cristian Covarrubias (Instituto de investigación en ciencias odontológicas, Facultad de Odontología, U. de Chile. Fono: 9781719, E-mail: ccovarrubias@odontología.uchile.cl o si lo desea al Dr. Eduardo Fernández G. presidente del Comité de Ética y aclarar sus dudas.





FORMULARIO DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

He sido invitado a colaborar con la investigación de creación y evaluación de nuevos materiales para la regeneración ósea. Entiendo que colaboraré donando mis dientes extraídos o una muestra de encía, los que serán utilizados para la extracción de células madre y destruidos una vez tratados y observados. Sé que no existen beneficios para mi persona y que no se me recompensará por participar. Se me ha proporcionado el nombre de un investigador que puede ser fácilmente contactado y su dirección de correo electrónico.

He leído la información proporcionada. He tenido la oportunidad de preguntar sobre ella y se me ha contestado satisfactoriamente las preguntas que he realizado. Consiento voluntariamente colaborar en esta investigación donando mis dientes extraídos o una pequeña muestra de encía.

Nombre del Participante _____

Firma _____



Santiago, ____/____/____

Sección a llenar por el Investigador o su representante:

He explicado al Sr(a).....la naturaleza de la investigación. He contestado a las preguntas en la medida de lo posible y he preguntado si tiene alguna duda. Una vez concluida la sesión de preguntas y respuestas, se procedió a firmar el presente documento

Nombre y Firma del Investigador que toma el CI _____ Fecha _____

Dr. Cristian Covarrubias Gallardo (PhD).

Nombre y Firma del Investigador Principal _____ Fecha _____

Dra. Andrea Véliz Ramírez

Nombre y Firma del director del Centro o de su Representante _____ Fecha _____