



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO  
INSTITUTO DE CIENCIAS BÁSICAS E INGENIERÍA  
**MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LOS MATERIALES**

**TESIS**

**EVALUACIÓN DE LA VIABILIDAD CELULAR DE  
ANDAMIOS DE ÁCIDO POLILÁCTICO-CO-GLICÓLICO  
E HIDROXIAPATITA PARA SU POTENCIAL  
APLICACIÓN EN REGENERACIÓN TISULAR.**

**Para obtener el grado de**  
Maestra en Ciencias de los Materiales

**PRESENTA**

I.M. Blanca Lisbeth Pérez

**Director**

Dr. Ventura Rodríguez Lugo

**Codirectora**

Dra. María Isabel Reyes Valderrama

**Comité tutorial**

Dr. Demetrio Mendoza Anaya

Dr. Salvador Ivan Garduño Vértiz

Pachuca de Soto, Hgo., México., junio 2023



Mineral de la Reforma, Hgo., a 5 de junio de 2023

**Número de control:** ICBI-D/592/2023  
**Asunto:** Autorización de impresión.

**MTRA. OJUKY ROCIO ISLAS MALDONADO**  
**DIRECTORA DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR DE LA UAEH**

El Comité Tutorial de la tesis titulada **“Evaluación de la viabilidad celular de andamios de ácido poliláctico-co-glicólico e hidroxiapatita para su potencial aplicación en regeneración tisular”** realizado por el sustentante **Blanca Lisbeth Pérez** con número de cuenta **347534** perteneciente al programa de la **Maestría en Ciencias de los Materiales**, una vez que ha revisado, analizado y evaluado el documento recepcional de acuerdo a lo estipulado en el Artículo 110 del Reglamento de Estudios de Posgrado, tiene a bien extender la presente:

**AUTORIZACIÓN DE IMPRESIÓN**

Por lo que la sustentante deberá cumplir los requisitos del Reglamento de Estudios de Posgrado y con lo establecido en el proceso de grado vigente.

Atentamente  
 “Amor, Orden y Progreso”

El Comité Tutorial

Dr. Ventura Rodríguez Lugo  
 Director de tesis

Dra. María Isabel Reyes Valderrama  
 Codirectora

Dr. Demetrio Mendoza Anaya  
 Titular

Dr. Salvador Ivan Garduño Vértiz  
 Suplente



Dr. Otilio Arturo Acevedo Sandoval  
 Director del ICBI

QAASIBO



Instituto del Conocimiento  
 Carretera Pachuca-Tulancingo km 4.5 Colonia  
 Carboneras, Mineral de la Reforma, Hidalgo,  
 México. C.P. 42184  
 Teléfono: 771 71 720 00 ext. 2231 Fax 2109  
 direccion\_icbi@uaeh.edu.mx

[www.uaeh.edu.mx](http://www.uaeh.edu.mx)

## AGRADECIMIENTO

Primero agradezco a Dios por darme la vida, quien me guía, por ser mi luz en mi camino, por darme sabiduría y fortaleza para alcanzar mis objetivos.

Este trabajo representa el logro de una nueva etapa en mi formación profesional y mérito personal para mí el poder llegar hasta este punto es una bendición, por lo que quiero agradecer a todos ustedes porque fueron mi motivación más grande para concluir con éxito esta tesis.

Mi papá Gerardo Pérez Santiago, siempre has trabajado duro para el bienestar de tu familia, siempre has creído en mí, me has enseñado a no rendirme y a luchar por todo lo que me propongo, sabemos que ha habido momentos muy difíciles, pero siempre has estado presente a pesar de la distancia; por tu fuerza y valentía siempre estaré agradecida. Te amo papá.

Madre mía, Margarita Mundo Pérez, me has forjado como la persona que soy, gracias por cada palabra de aliento, por animarme en momentos difíciles, me enseñaste a ser una persona perseverante y disciplinada; siempre velaste por mi educación y mi bienestar en todo momento. Gracias por todo tu apoyo incondicional mamá. Te amo.

A mis hermanos Geraldine y Gerardo, por siempre estar a mi lado, por su confianza, cada momento de felicidad, por su apoyo moral durante esta etapa, saben que los amo y siempre estaré para ustedes.

A mis abuelitos, Tito Pedro, por siempre ir a dejarme y recogerme de la escuela desde preescolar, abuelitas Eulalia y Aquilina, gracias por cada risa compartida, a los dos gracias por siempre incúlcame la fé. A mis abuelitos José, Reynalda, Fabián y Delfina que desde el cielo guían mis pasos; gracias por siempre demostrarme su cariño y amor incondicional. Siempre están presentes en mi corazón.

A mi novio Juan Manuel Montoya Rubio por siempre creer en mí, tu apoyo fue fundamental a lo largo de mis estudios desde la preparatoria, no hubo día que no me dijeras que te sientes orgullosa de mí, has estado conmigo en los momentos más difíciles motivándome a salir adelante, por todo tu amor y comprensión gracias, Te amo Juanmi. A tus papás Araceli Rubio

Marcelo y Vicente Montoya Ramírez por darme siempre su cariño y apoyo incondicional en todos los aspectos siempre me motivaron a crecer profesionalmente debo decir que ustedes me han otorgado el mejor regalo en mi vida, los aprecio y estaré siempre agradecida.

A mis tías, tíos y primos por sus sabios consejos, palabras de aliento, por motivarme a superarme día a día y por cada momento de felicidad compartida muchas gracias por todo su cariño.

Debo agradecer de manera especial y sincera a mis sinodales quienes colaboraron directamente en el desarrollo de mi tesis magistral, así mismo por facilitarme los medios suficientes para llevar a cabo las actividades propuestas durante mi desarrollo. Todos ustedes tienen todo mi agradecimiento y total admiración hacia su persona.

Dr. Ventura Rodríguez Lugo, la voz de mi conciencia, quien desde el inicio depositó su confianza en mi conocimiento permitiéndome ser parte de uno de sus tantos proyectos dentro de Universidad y también por guiarme en el proceso de la tesis que no ha sido nada fácil, sin embargo, por su gran ayuda incondicional, asesorías en base a su experiencia y conocimiento ha sido menos complicado por lo que ha sido parte fundamental del gran resultado de mi tesis magistral.

Quiero expresar también mi más sincero agradecimiento a la Dra. María Isabel Reyes Valderrama quien ha sido mi tutora desde la Licenciatura, por todo su apoyo incondicional, por confiar en mí, por sus palabras de motivación para no rendirme, por darme sabios consejos de vida y profesionales, por cada risa y plática acompañado de buen café. Sus ideas y su conocimiento compartido fueron fundamentales para el resultado de este trabajo de tesis.

Dr. Demetrio Mendoza Anaya por brindarme su apoyo y aporte en la elaboración a este proyecto de tesis. Su conocimiento compartido durante sus cursos impartidos fue vital para el desarrollo de esta tesis magistral.

Dr. Iván Salvador Garduño Vertíz por sus conocimientos compartidos, observaciones, cada aporte y orientación ha sido fundamental para mi aprendizaje durante mi formación y para el resultado de este trabajo de investigación.

A mi amiga Yaneli, por ser una muy buena persona conmigo, nunca olvidaré todos los momentos y aventuras compartidas llenos, gracias por escucharme y aterrizarme en los días difíciles con tus consejos y palabras, además que sin esperar nada a cambio compartiste tu conocimiento conmigo. Gracias por tu bonita amistad, te quiero mucho amiguita. Y recuerda siempre juntas.

A mis compañeros del cuerpo académico por cada risa y armonía grupal y a todas aquellas personas que durante estos dos años aportaron su granito de arena para mi formación.

Y finalmente agradezco a quien lee este trabajo de investigación.

## GLOSARIO DE ACRÓNIMOS

<i>Abreviatura</i>	<i>Definición</i>
<i>HAp</i>	Hidroxiapatita
<i>PLGA</i>	Ácido poliláctico co glicólico
<i>nHAp</i>	Nanohidroxiapatita
<i>MEC</i>	Matriz Extracelular
<i>DRX</i>	Difracción de rayos X
<i>MEB</i>	Microscopia Electrónica de Barrido
<i>TEM</i>	Microscopía electrónica de Transmisión
<i>FTIR</i>	Espectroscopia Infrarroja por la Transformada de Fourier
<i>DSC</i>	Análisis térmico
<i>Rpm</i>	Revoluciones por minuto
$\mu m$	Micrómetros
<i>Nm</i>	Nanómetros
<i>PBS 1X</i>	Solución Salina tamponada con Fosfato, solución 1X, pH 7,4.
<i>DMEM</i>	Medio Eagle modificado de Dulbecco
<i>LA</i>	Ácido Láctico
<i>GA</i>	Ácido glicólico
<i>Tg</i>	Temperatura de transición vítrea
<i>TGA</i>	Análisis termogravimétrico
<i>PLGA 50:50</i>	Composición de 50% LA y 50 GA
<i>GTP</i>	Es una molécula de nucleótido compuesto por ribosa, guanina y un grupo trifosfato
<i>NADH</i>	Coenzima en su forma reducida unida por grupos fosfato
<i>CO<sub>2</sub></i>	Dióxido de carbono
<i>FADH</i>	Molécula moduladora en la actividad hidrolítica

## RESUMEN

En el presente trabajo de investigación se desarrollaron materiales compuestos de una matriz polimérica de PLGA reforzados con nanocristales de HAp los cuales son denominados andamios. Los andamios se obtienen por el método gel-casting, generando la formación de poros utilizando como agente porogénico el citrato de sodio  $Na_3C_6H_5O_7$ . La hidroxiapatita se sintetizó por el método hidrotermal a  $200^\circ C$  a partir de precursores hidróxido de calcio y fosfato de amonio dibásico. El PLGA y la HAp, se incorporaron diferentes porcentajes en relación con el peso (100), (80/20), (70/30), (60/40) y (55/45) respectivamente. Los andamios de PLGA/HAp se caracterizaron mediante Espectroscopía Infrarroja por Transformada de Fourier (FT-IR), Microscopía Electrónica de Barrido (MEB) y Difracción de Rayos X (DRX) para el análisis de la morfología, composición química y fases cristalinas. En FTIR, para el caso de la hidroxiapatita se identificaron bandas características correspondientes a los iones ( $PO_4^{-3}$ ) y para el PLGA se observaron los diferentes enlaces de grupo éster ( $C - O$ ), carbonilo ( $C = O$ ) y se distinguen carbonos tipo  $sp^3$  ( $CH$ ,  $-CH_2$ ,  $-CH_3$ ). En DRX se confirmó la presencia de la hidroxiapatita en su fase hexagonal y monoclinica. De acuerdo con MEB, en las muestras (100), (70/30) no hubo una presencia mayoritaria de poros, mientras que en la muestra (60/40) sus poros se distinguen fácilmente. Destacan las muestras (80/20), (55/45) donde se aprecia que los poros tienen una geometría circular de un tamaño promedio de 149 y 117  $\mu m$  con una porosidad  $>80\%$  además se observó una tendencia alta en la rugosidad superficial. Se realizaron ensayos de hinchamiento a 3, 6 y 9 días obteniendo una rápida degradación para la muestra 55/45 a comparación de los demás casos quedando solo con el 30.90% de su área inicial; finalmente la viabilidad de células de las muestras 80/20 y 55/45 se evaluó mediante Alamar blue colocando células madre dentales humanas en la superficie de los andamios para observar el comportamiento de 3,7 y 10 días obteniendo un índice  $>60\%$  para la muestra 55/45, mientras que para 80/20 mostró un comportamiento del 67%.

## ABSTRACT

In the present research work, materials composed of a PLGA polymeric matrix reinforced with HAp nanocrystals were developed, which are called scaffolds. The gel-casting method obtains the scaffolds, generating pore formation using sodium citrate ( $Na_3C_6H_5O_7$ ) as a porogenic agent. Hydroxyapatite was synthesized by the hydrothermal method at  $200^\circ C$  from precursors calcium hydroxide and dibasic ammonium phosphate. PLGA and HAp, different percentages were incorporated concerning weight (100), (80/20), (70/30), (60/40), and (55/45), respectively. The PLGA/HAp scaffolds were characterized by Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FT-IR), Scanning Electron Microscopy (SEM), and X-Ray Diffraction (XRD) for the analysis of morphology, chemical composition, and crystalline phases. In FTIR, for hydroxyapatite, characteristic bands corresponding to the ions ( $PO_4^{-3}$ ) were identified, and for PLGA, the different ester group bonds ( $C - O$ ), carbonyl ( $C = O$ ) and  $sp^3$  type carbons ( $CH$ ,  $-CH_2$ ,  $-CH_3$ ) were observed. XRD confirmed the presence of hydroxyapatite in its hexagonal and monoclinic phases. According to SEM, in samples (100) (70/30), there was not a majority presence of pores, while in the sample (60/40), its pores were easily distinguished. The samples (80/20), (55/45) where it is appreciated that the pores have a circular geometry of an average size of 149 and 117  $\mu m$  with a porosity  $>80\%$ ; in addition, a high trend in surface roughness was observed. Swelling tests were performed at 3, 6, and 9 days, obtaining a rapid degradation for sample 55/45 compared to the other cases remaining only with 30.90% of its initial area; finally, the cell viability of samples 80/20 and 55/45 was evaluated by Alamar blue placing human dental stem cells on the surface of the scaffolds to observe the behavior of 3, 7 and 10 days obtaining an index  $>60\%$  for sample 55/45, while for 80/20 showed a behavior of 67%.

## CONTENIDO

AGRADECIMIENTO .....	3
RESUMEN .....	7
ABSTRACT .....	8
INTRODUCCIÓN.....	15
CAPÍTULO I: ESTADO DEL ARTE .....	17
1.1 ANTECEDENTES .....	18
1.2 Marco Teórico .....	26
1.2.1 Biomaterial y sus características.....	26
1.2.2 Material compuesto.....	29
1.2.3 Andamios .....	30
1.2.4 Métodos para la síntesis de andamios porosos. ....	34
1.2.5 Matriz polimérica: Ácido poli láctico- co –glicólico (PLGA).....	40
1.2.6 Reforzante cerámico: Hidroxiapatita (HAp).....	48
1.2.7 Tejido óseo, función, estructura y propiedades. ....	56
1.2.8 Ensayos in vitro de citotoxicidad.....	62
CAPÍTULO II: METODOLOGÍA EXPERIMENTAL .....	65
2.1 Desarrollo metodológico.....	66
2.2 Síntesis de HAp .....	68
2.3 Desarrollo de andamios de PLGA/HAp .....	69
2.4 Ensayo de hinchamiento .....	71
2.5 Prueba de in vitro de citotoxicidad por Alamar blue .....	72
2.6 Equipos utilizados para la caracterización de muestras .....	78
CAPITULO III: RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	81
3.1 Difracción de Rayos X.....	82
3.2 Tamaño de cristalito promedio de la hidroxiapatita .....	84
3.3 Espectroscopía Infrarroja por Transformada de Fourier.....	86
3.3 Microscopia Electrónica de Barrido .....	90
3.4 Ensayo de hinchamiento y de pérdida de peso durante la degradación.....	97
3.5 Viabilidad celular.....	100
CAPITULO IV: .....	102
DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....	102

4.1 Discusión de resultados .....	103
4.2 Conclusiones .....	108
REFERENCIAS .....	109
ANEXOS .....	139
1. Cursos .....	139
2. Congresos Internacionales .....	139
3. Congresos Nacionales .....	139
4. Organización de congresos y seminarios.....	140

## CAPÍTULO I

### Índice de Figuras

Figura 1.1. Características de los biomateriales a través de su evolución.....	19
Figura 1.2. Características por considerar para un biomaterial ideal. ....	27
Figura 1.3. Clasificación de los biomateriales de acuerdo con su origen, naturaleza y respuesta biológica.....	27
Figura 1.4. Definición gráfica de compuesto [87].....	29
Figura 1.5. Representación del proceso de regeneración ósea. ....	33
Figura 1.6. Esquemas de las etapas del proceso sol-gel [109]. ....	34
Figura 1.7. a) Técnica de separación de fase inducida térmicamente y b) liofilización. [164]. ....	35
Figura 1.8. Representación esquemática del espumado con gas.....	36
Figura 1.9. Esquema simplificado de las técnicas comunes por impresión 3D. [116, 117]. ....	36
Figura 1.10. Esquema de la técnica gel-casting. ....	37
Figura 1.11. Clasificación de los biopolímeros naturales con aplicación en andamios para regeneración tisular. ....	40
Figura 1.12. Estructuras lineales del a) Ácido láctico, b) Ácido glicólico y el c) PLGA.....	41
Figura 1.13. Degradación por superficie.....	43
Figura 1.14. Degradación en masa. Fuente propia. ....	44
Figura 1.15. Síntesis y degradación del PLGA. ....	46
Figura 1.16. Reacciones de ciclo de Krebs [151]......	47
Figura 1.17. Estructura de la hidroxiapatita de la celda unitaria para los componentes atómicos a) Calcio (I), b) Calcio (II), c) $(PO_4^{-3})$ y d) $OH^-$ [162]......	49
Figura 1.18. Estructuras cristalinas de la hidroxiapatita a) hexagonal y b) monoclinica [163], [164]. .....	50

Figura 1.19. Clasificación de métodos de obtención de la hidroxiapatita.....	51
Figura 1.20. Etapas para la formación de hidroxiapatita.....	53
Figura 1. 21. Organización estructural jerárquica del hueso [141]. .....	57
Figura 1. 22. Mecanismos biológicos en la generación ósea. ....	59
Figura 1.23. Fases del ciclo de remodelación ósea [204].....	61
Figura 1.24. Mecanismo celular en las fases de la remodelación ósea [197].....	61
Figura 1.25. Representación esquemática de la metodología con el agente MTT [208]. .....	63
Figura 1.26. Metodología esquemática de Alamar blue.....	64

## Índice de Tablas

Tabla 1.1. Aportaciones en el desarrollo de andamios de PLGA/HAp a diferentes composiciones con diferentes técnicas. ....	25
Tabla 1.2 Clasificación de biomateriales de acuerdo con su evolución. ....	28
Tabla 1.3. Necesidades fundamentales para la fabricación de andamiajes. ....	30
Tabla 1.4. Clasificación de la porosidad en cuanto a su tamaño.....	31
Tabla 1.6. Propiedades de las diferentes composiciones de LA:GA [143]. ....	42
Tabla 1.7. Valores teóricos y experimentales del copolímero PLGA. [145]. ....	42
Tabla 1.8. Sustitutos de aniones y cationes de la hidroxiapatita. ....	48
Tabla 1.9. Comparación de los diferentes métodos de obtención de nanopartículas de la hidroxiapatita.....	52
Tabla 1.10. Acciones para el método hidrotermal, [176]. ....	54
Tabla 1.11. Antecedentes de la síntesis de hidroxiapatita por métodos húmedos.....	55
Tabla 1.12. Tabla de propiedades mecánicas del hueso [183]. ....	58

## Índice de ecuaciones

1. 1 .....	48
1. 2 .....	48
1. 3 .....	48
1. 4 .....	48

## CAPÍTULO II

### Índice de Figuras

Figura 2. 1. Etapas para el desarrollo de andamios. ....	67
--	----

Figura 2. 2. Síntesis de cristales de hidroxiapatita por el método hidrotermal a pH 7.....	69
Figura 2. 3. Síntesis de andamios porosos por el método gel casting. ....	71
Figura 2. 4. Metodología para el ensayo de hinchamiento a 3, 6 y 9 días.....	72
Figura 2. 5. a) Cabina de seguridad microbiológica Telstar. b) Estufa de cultivo Binder y c) Centrifuga.....	73
Figura 2. 6. a) Lavado de células, b) medio centrifugado, c) medio retirado y d) Botón de células. ....	74
Figura 2. 7. a) Adición de 10 $\mu$ L de solución en la cámara Neubauer, b) Conteo celular bajo microscopio óptico con ayuda de contador análogo.....	74
Figura 2. 8. Cámara de Neubauer. ....	75
Figura 2. 9. Agregando andamios a la placa para el sembrado. ....	76
Figura 2. 10. Esquema de la placa de pozos.....	76
Figura 2. 11. a) microscopio óptico y b) morfología de las células madre. ....	76
Figura 2. 12. a) Traspaso de a una nueva placa y b) Agregando Alamar blue,.....	77
Figura 2. 13. a) lector multimodal Cytation 3 (BioTek) y b) Lectura de absorbancia a 570 nm de longitud de onda. ....	77
Figura 2. 14. Difractómetro para DRX.....	78
Figura 2. 15. Espectrómetro infrarrojo. ....	79
Figura 2. 16. Microscopio Electrónico de Barrido. ....	79
Figura 2. 17. Equipos utilizados para los estudios invitro de viabilidad celular. a) Cabina de seguridad, b) estufa de cultivo, c) centrifugadora y d) Lector multimodal. ....	80

### Índice de Tablas

Tabla 2. 1. Composición para cada muestra de andamio. ....	70
Tabla 2. 2. Resultados del conteo celular.....	75

### Índice de ecuaciones

2. 1 .....	68
2. 2 .....	72
2. 3 .....	75
2. 4 .....	75

## CAPÍTULO III

### Índice de Figuras

Figura 3. 1. Patrones de difracción de la hidroxiapatita en fase hexagonal. ....	82
Figura 3. 2. Patrones de difracción de la hidroxiapatita para la fase monoclinica. ....	83
Figura 3. 3. DRX para los andamios a diferente composición (100, 80/20, 70/30, 60/40 y 55/45).....	83
Figura 3. 4. Picos principales de difractograma correspondiente a la hidroxiapatita. ....	84
Figura 3. 5. Gráfica de regresión lineal. ....	85
Figura 3. 6. Espectro FT-IR correspondiente a PLGA. ....	86
Figura 3. 7. Espectro FTIR identificando bandas de absorción y enlaces para la hidroxiapatita. ....	88
Figura 3. 8. Espectro FTIR de los andamios variando su composición. ....	89
Figura 3. 9. Micrografías obtenidas en el MEB, con diferente magnificación en donde es posible apreciar las partículas de HAp formando aglomerados. ....	90
Figura 3. 10. Micrografías correspondientes de los andamios 100, 80/20, 70/30, 60/40 y 55/45, así mismo se muestra la gráfica de rugosidad superficial para cada una ....	92
Figura 3. 11. Micrografías obtenidas por MEB para las muestras 100, 80/20, 70/30, 60/40 y 55/45. ....	94
Figura 3. 12. Fotografías del comportamiento de degradación para los andamios a 100, 80/20, 70/30, 60/40 y 55/45.....	97
Figura 3. 13. Gráfica del porcentaje correspondiente al ensayo de hinchamiento a 3, 6 y 9 días.....	98
Figura 3. 14. Área porcentual en función al tiempo de degradación.....	99
Figura 3. 15. Resultados de citotoxicidad por Alamar blue. ....	101

### Índice de ecuaciones

3. 1 .....	84
3. 2 .....	84
3. 3 .....	95
3. 4 .....	95
3. 5 .....	95

## Índice de Tablas

Tabla 3. 1. Tamaño promedio de cristalito por la ecuación de Scherrer modificada para la hidroxiapatita.....	85
Tabla 3. 2. Regiones correspondientes a IR característicos del PLGA 50:50.....	87
Tabla 3. 3. Resultados del tamaño de poro promedio y el % de porosidad.....	95
Tabla 3. 4. Relación Ca/P de las muestras PLGA/HAp.....	96
Tabla 3. 5. Porcentaje de hinchamiento para cada composición PLGA/HAp.....	98
Tabla 3. 6. Resultados del área porcentual de los andamios compuestos de PLGA/HAp ...	99
Tabla 3. 7. Células vivas para las muestras correspondientes.....	100

## CAPÍTULO IV

### Índice de Figuras

Figura 4. 1. Modelo de la formación de poros en el andamio.....	104
---	-----

### Índice de Tablas

Tabla 4. 1. Comparación de resultados reportados por otros autores para la fabricación de andamios de PLGA/HAp.....	106
---	-----

## INTRODUCCIÓN

Hoy en día miles de personas sufren accidentes y envejecen a una mayor edad lo que provoca daños o pérdidas en el tejido óseo, de acuerdo con estadísticas del Banco de Tejidos más de 40,000 trasplantes se realizaron en el 2021 y 105,800 personas están en lista de espera para recibir un trasplante [1], así mismo las proyecciones por el Consejo Nacional de Población (CONAPO) el índice de envejecimiento ha ido en aumento y se estima que para 2050, 23 de cada 100 personas serán personas mayores [2] Y de acuerdo con los reportes del Centro Nacional de Trasplantes los tejidos trasplantados frecuentes son las córneas, hueso, piel y tendones [3]. Por lo anterior se requieren desarrollar nuevos materiales que permitan la generación de soluciones novedosas sin afectar el bienestar y la calidad de vida [4].

En la actualidad, el desarrollo en ciencias de los materiales presenta una evolución en diferentes campos con un carácter multidisciplinario lo que ha generado interés en las últimas dos décadas en el estudio en la ingeniería tisular, un desafío para muchos científicos ha sido desarrollar biomateriales naturales y sintéticos que funcionen como implantes evaluando el comportamiento de sus propiedades, estructura, características y biocompatibilidad, es decir que no tenga un rechazo inmunológico con el sistema de tal manera que sean eficientes para regenerar o tratar una enfermedad dentro del tejido vivo y el principal componente que contribuye a la regeneración ósea es la hidroxiapatita con fórmula química  $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$ , es un cerámico natural que se encuentra en el hueso, en los dientes y en el esmalte dental confiriéndoles dureza, mientras que el colágeno les da la propiedad de la elasticidad [5–7], existen una gran similitud de la HAp con el componente inorgánico de la matriz ósea [8], por lo que se considera un material biocompatible y bioactivo es decir, que tiene la capacidad de formar enlaces químicos con el tejido óseo [9], sin embargo su fragilidad, su baja estabilidad mecánica y su lenta degradación limitan su aplicación en regeneración ósea.

El ácido poli láctico-co-glicólico (PLGA) es uno de los polímeros más utilizados y aplicado con éxito [9–13] debido a su biocompatibilidad y biodegradación favorable, además de ser un copolímero que se constituye de dos monómeros, los cuales son el ácido poli láctico (PLA) y ácido poli glicólico (PGA); está aprobado por la Administración de Alimentos y

Medicamentos, sus siglas en ingles FDA, y la Agencia Europea de Medicamentos, sus siglas en ingles EMA, por lo que es un buen candidato para que funcione como matriz en el compuesto para la formación de andamios [15], además que pueden mezclarse con diversos materiales biocerámicos como es el fosfato tricálcico (TCP), el biovidrio y la hidroxiapatita (HAp) [16].

En la actualidad hay mucho interés en desarrollar biomateriales biomiméticos con tamaños de poro no mayor a 150  $\mu\text{m}$  para beneficiar a la migración celular y de nutrientes [17]., sin embargo han tenido problemas para su control es por ello que este trabajo de investigación tuvo como objetivo principal desarrollar andamios compuestos utilizando como matriz polimérica el PLGA y como reforzante cerámico la HAp a diferentes proporciones con relación al peso a partir del método gel-casting; donde se buscó obtener poros con un tamaño en un rango de 50-150  $\mu\text{m}$  controlándolo con un agente porógeno, el citrato de sodio, posteriormente se evaluó la relación de los porcentajes utilizados para los andamios y mediante diferentes técnicas fisicoquímicas, mecánicas y biológicas estudiando la influencia de este material compuesto sobre la viabilidad celular en función de la relación PLGA/HAp, el porcentaje de porosidad, morfología y citotoxicidad del andamio.

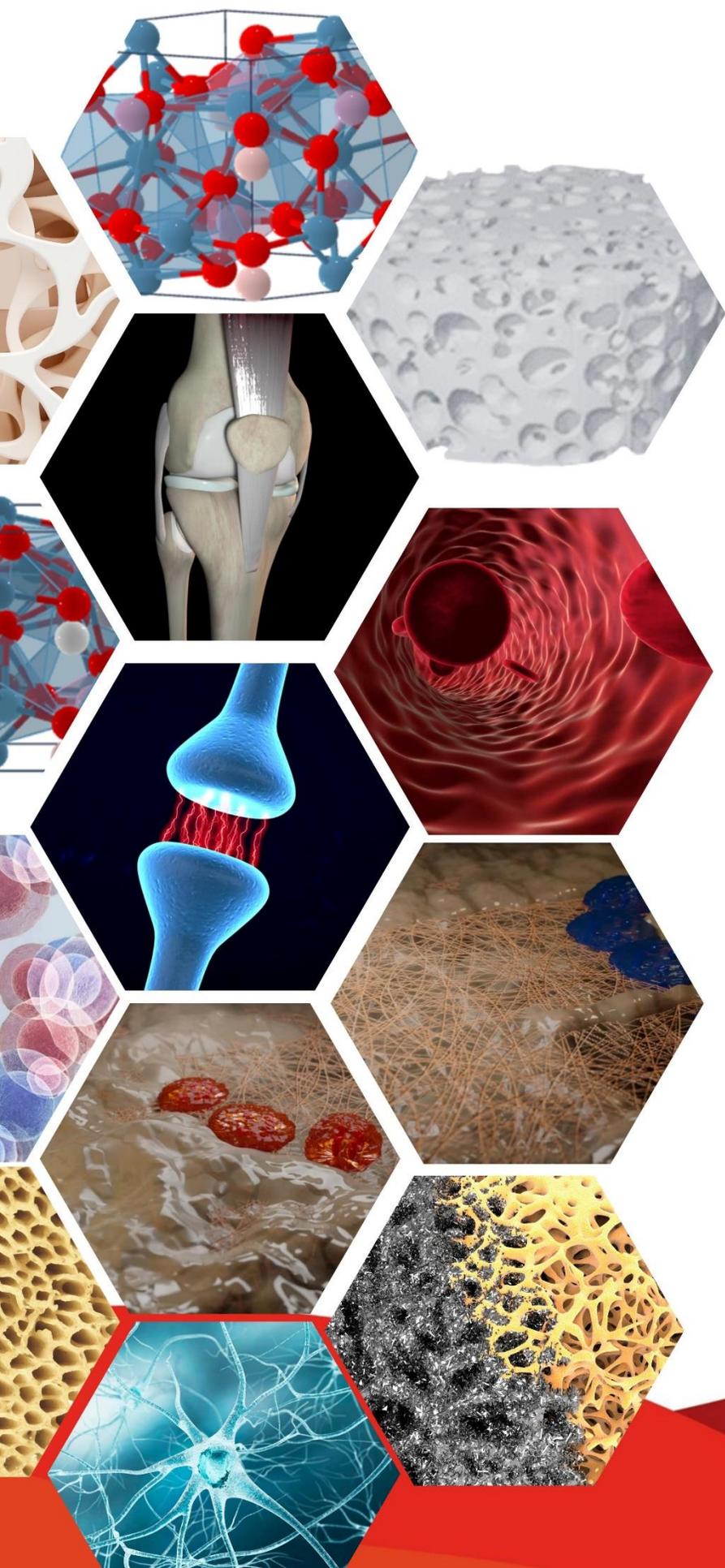
Por lo anterior este trabajo estará distribuido de la siguiente manera:

En el capítulo I se incluyen investigaciones de contribuciones a la regeneración de tejidos, de la misma forma se describen términos generales y conceptos básicos, características estructurales, propiedades y fenómenos relacionados a la interacción sistema-material para cada aplicación biomédica.

En el capítulo II se desarrolla la metodología experimental para la síntesis de andamios compuestos de PLGA/HAp mediante el método gel casting, se muestran los precursores a utilizar, los parámetros y equipos empleados para esta investigación, a la vez se plasma la metodología de las pruebas de citotoxicidad por el método alamar blue utilizando células madre troncales.

En el capítulo III se abordan los resultados obtenidos mediante una interpretación y análisis de las diferentes técnicas de caracterización, ensayos de hinchamiento y pruebas biológicas para la evaluación de la viabilidad celular en contacto directo con los andamios. Así mismo estos resultados se discuten y se presenta una comparación con los resultados ya reportados por otros investigadores, desarrollando un modelo de interacción entre la matriz y el reforzante.

En el capítulo IV se discuten los resultados obtenidos haciendo una comparación con otras investigaciones reportadas por otros autores. Finalmente, se presentan las conclusiones con las contribuciones de la presente investigación.



## CAPÍTULO I: ESTADO DEL ARTE

---

En el presente capítulo se agregan los antecedentes y aportaciones en la regeneración de tejidos por investigaciones que ya han sido reportadas y han dejado contribución a la ciencia. Así mismo, se agrega el marco teórico de la tecnología en ciencias de los materiales y biomateriales con aplicación en andamios donde se describen los términos generales y conceptos básicos, características estructurales, propiedades, métodos de obtención, relación sistema-material y aplicaciones, con el fin de analizar y entender el desarrollo de andamios como materiales biocompatibles.



## 1.1 ANTECEDENTES

Los materiales biológicos datan desde la antigüedad y se remontan en el segundo milenio antes de Cristo, encontrando los arqueólogos evidencia del uso de diferentes materiales como huesos, dientes humanos o animales, coral, conchas, madera, vidrio y varios metales como el oro y la plata para la curación [18], pero las distintas limitaciones y complicaciones de estos materiales biológicos llevaron al surgimiento de un campo multidisciplinario llamado biomateriales [19]. La primera definición de biomaterial fue en 1987 como “Un biomaterial es un material no viable usado en dispositivos médicos que intenta interactuar con sistemas biológicos” [20]. Sin embargo, gracias al avance de la tecnología médica, también se han desarrollado métodos quirúrgicos para la reparación de defectos tisulares, por ejemplo en el campo de prótesis y manipulación localizada de sitios de lesión a nivel molecular y celular se realiza el trasplante de un sitio a otro en el mismo paciente (autoinjertos) [21], Joseph Murray y John Merrill realizaron satisfactoriamente el primer trasplante de riñón entre gemelos monocigóticos, también de un individuo a otro (alotrasplante o aloinjerto) [22], William MacEwen, cirujano escocés en 1879 realizó el primer logro de aloinjerto óseo quien trató a un paciente de tres años de edad con una cirugía ortopédica con una patología de osteomielitis humeral [23]. Mientras que en el campo de la cirugía reconstructiva, se han generado soluciones basadas en trasplante de tejido a partir de animales a otra especie (xenotrasplante) [24]. El cirujano holandés Job Janszoon Van Meekeren (1611-1616) realizó el primer trasplante de hueso con éxito, donde tomó un fragmento del cráneo de un perro, lo moldeó y lo trasplantó en el defecto del paciente [25].

Sin embargo, el uso de estos métodos presentaban complicaciones en los pacientes provocando consecuencias como una segunda intervención quirúrgica y en algunas ocasiones se vio a la necesidad de retirar el dispositivo implantado [20]; por tal razón diversos investigadores se enfocaron a examinar y estudiar la selección correcta de materiales, su diseño y la evaluación de sus propiedades mediante diversos estudios clínicos [2, 5–7, 9, 10, 15, 18, 28–32].

El estudio y desarrollo de biomateriales han ido evolucionando y se ha dividido en cuatro generaciones, como se ilustra en la Figura 1.1.

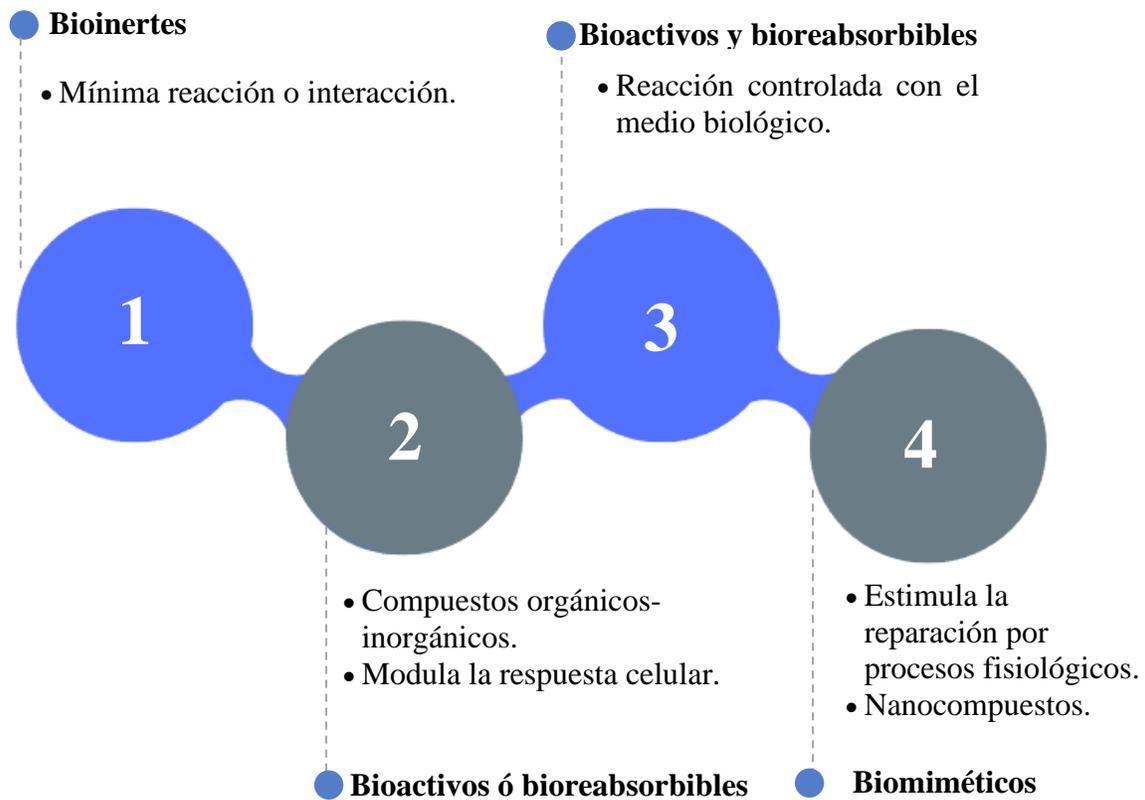


Figura 1.1. Características de los biomateriales a través de su evolución.

En los años 60's surge la primera generación de biomateriales que eran a base de metales como el titanio, acero inoxidable, aleaciones cobalto-cromo y polímeros inertes como el poliuretano y siliconas, estos materiales presentan una alta resistencia química y mecánica pero a pesar de que exhibieron estas características presentaron ciertas desventajas como desgaste y corrosión en el entorno corporal provocando un respuesta tisular baja y fallos en la mineralización del tejido causando desprendimiento del implante [33, 34]. Por consiguiente, la segunda generación de biomateriales bioactivos que dio inicio en los años 80's basados principalmente en titanio y sus aleaciones junto con otros biopolímeros como el polietileno, polipropileno y el nylon sintetizados mediante métodos rápidos y eficientes generando un entorno adecuado sobre el implante para la proliferación celular del tejido que se busca reestructurar [35], sin embargo tienen desventajas como la respuesta inmunogénica,

limitaciones de diseño de dispositivos con propiedades mecánicas específicas, contaminación microbiana y tasas variables de degradación in vivo [34].

Así que para superar los inconvenientes presentados por la primera y segunda generación se han desarrollado nuevos materiales con características y propiedades biológicas mejoradas, y son biomateriales de tercera generación de biomateriales que nace una amplia variedad de materiales sintéticos y naturales en la década de los 90's; pero ahora cumplen con propiedades estructurales y físico-químicas logrando una interacción y manipulación a una escala nanométrica ( $1 \times 10^{-9}$ ) con el tejido permitiendo obtener el control en cuanto a su estructura, tamaño, morfología, la adhesión, proliferación y migración celular, un ejemplo de esto fue la aplicación de implantes de hidroxiapatita [36]. Hoy, se encuentra en fase de desarrollo la cuarta generación compuesta por los llamados 'materiales inteligentes y funcionalizados' es decir, biomateriales que pretenden modificar sus propiedades en función de un estímulo una vez implantados y que a su vez presentan propiedades como sensor para monitorizar una función concreta e interactuar con el sistema biológico [37–39].

Por otra parte, la hidroxiapatita juega un papel importante para la regeneración del tejido óseo, este cerámico es estudiado con frecuencia por su gran similitud con el tejido nativo (propiedades y biocompatibilidad) y composición con los elementos inorgánicos del hueso humano [7], es aplicado en diferentes ámbitos clínicos con éxito, como sustituto del injerto óseo [40], como implantes biomédicos [42, 43], rellenedor óseo [9], portador de fármacos [44, 45], andamios porosos para regeneración de tejidos, etcétera [45]. La hidroxiapatita se puede obtener a partir de manera natural como son: origen animal, acuático y vegetal [43–45] también se puede obtener de manera sintética utilizando métodos químicos como son: métodos secos, altas temperaturas y húmedos como el método hidrotermal [49].

K. Byrappa y M. Yoshimura definieron el término hidrotermal como "cualquier reacción química heterogénea en presencia de un disolvente (ya sea acuoso o no acuoso) por encima de la temperatura ambiente y a una presión superior a 1 atm en un sistema cerrado" [50]

Uno de los primeros trabajos en explicar la aplicación biomédica de la hidroxiapatita fue Levitt et al., 1969, donde prensó en caliente a la hidroxiapatita en una forma adecuada para experimentos biológicos, este avance significativo ha promovido el desarrollo diferentes rutas de obtención de la hidroxiapatita sintética en polvo [51]. Al respecto, V. Rodríguez-Lugo et al., obtuvieron cristales de hidroxiapatita a 269°C con una relación Ca/P del 1.42; por el método hidrotermal convencional y por microondas [52].

Mientras que, Chatterjee et al., 2019, que sintetizaron hidroxiapatita con diferentes valores de pH a 6, 8 y 10 por el método hidrotermal a una temperatura de 140°C, como precursores de grado analítico ocuparon fosfato de calcio dihidratado ( $CaHPO_4$ ) e hidróxido de calcio  $Ca(OH)_2$ , ácido acético glacial ( $CH_3COOH$ ) como neutralizador de pH y para tratamiento de solución acuosa se agregó agua bidestilada. En los espectros de FT-IR mostraron pequeñas impurezas debido a la fase precursora. Por MEB Y MET observaron una morfología en forma de varilla, microrods y microrods delgados con una longitud promedio de 13.55, 2.42 y 1.35 ( $\mu m$ ) y en el DRX el tamaño del cristalito reduce de 13.55 a 1.35  $\mu m$  debido al aumento del pH [53].

A su vez Ortiz et al., realizaron la síntesis de la hidroxiapatita pura por el método hidrotermal a 200°C con un pH de 7, tomando como precursores el hidróxido de calcio  $Ca(OH)_2$  y fosfato de amonio dibásico ( $(NH_4)_2PO_4$ )<sub>6</sub> disolvieron con agua desionizada y para ajustar el pH se empleó ácido nítrico ( $NH_3$ , 2M). Como resultados de DRX se observa una fase mayoritaria de monoclinica y la hexagonal en menor proporción (10%), mientras que en MEB la HAp presenta barras (rods) de 40 nm de ancho y 80 nm de largo [54].

En el caso de Sánchez-Campos, D. et. al. obtuvo hidroxiapatita a partir del nitrato de calcio tetrahidratado ( $Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$ ) y fosfato de amonio dibásico ( $(NH_4)_2HPO_4$ ) siguiendo el método hidrotermal asistido por microondas, los autores evaluaron el efecto del pH a 7 a 10 con la adición de hidróxido de amonio ( $NH_4OH$ ). Confirmaron por Rietveld la presencia de las fases hexagonal y monoclinica obteniendo un 95% a esta última por MET comprobaron que el pH modifica la morfología de la hidroxiapatita obteniendo desde partículas subédricas o esféricas a pH = 7 hasta hidroxiapatita a una escala nanométrica en forma de barra a pH=10,

con un tamaño de cristalito promedio de 23 nm, así mismo mostraron las bandas de absorción correspondientes a los grupos funcionales de  $PO_4^{-3}$  y  $CO_3^{-2}$  [55].

Y del mismo modo, Villaseñor Cerón L. S. et al., sintetizaron hidroxiapatita por el método hidrotermal asistido por microondas, evaluando el efecto de la polivinilpirrolidona (PVP) como controlador de tamaño y forma de las partículas de HAp. Obteniendo una relación Ca/P del 1.69, los autores reportaron estudios morfológicos químico-elemental a través de MEB-EDS donde confirmaron un aumento de la longitud cuando la cantidad de PVP adicionada [56]. Hasta la fecha no se han reportado casos de rechazo y toxicidad por la hidroxiapatita en el sistema humano. Sin embargo, se deben tomar en cuenta criterios de tratamiento, indicaciones y contraindicaciones para lograr una biocompatibilidad exitosa [11-17].

Así mismo, existe otra clasificación para el desarrollo de andamios conocidos como biopolímeros, la primera clasificación son los polímeros naturales como el colágeno, quitosano, aminoácidos [57] y la segunda clasificación son los polímeros sintéticos como son el PLA (ácido poli-láctico), PCL (policaprolactona), PGA (ácido poliglicólico), PVA (Alcohol poli vinílico), PLGA (ácido poli láctico- co -glicólico) [59]. El PLGA es un material biodegradable aprobado por la FDA desde 1960 [60] y ha sido estudiado por muchos investigadores debido a su tasa de degradación controlable y también porque son capaces de adoptar formas complejas para potenciar la adhesión celular, así como la capacidad de liberar moléculas solubles [29].

El profesor Robert Langer y Vacanti en 1993, en el Instituto de Tecnología de Massachusetts (MIT) fue pionero en el desarrollo de andamios tridimensionales altamente porosos compuestos de polímeros sintéticos y afirman que se han adoptado tres estrategias generales para que se pueden aplicar como dispositivos de trasplante celular en la ingeniería tisular que son aquellas células aisladas o sustitutos celulares, sustancias inductoras de tejidos y como células colocadas sobre o dentro de las matrices. [61].

Se pueden usar varios métodos para crear andamios para obtener una porosidad y un tamaño de poro específicos por métodos tradicionales como gel casting, disolución y colada con

liberación de partículas, laminación de membranas, separación de fases, saturación con gas, espumado con alta presión y liberación de partículas, liofilización, unión de fibras e impresión en 3D, entre estos métodos [62]–[71]. Actualmente, se han publicado diversos estudios sobre el desarrollo de andamios a partir de PLGA/HAp donde han evaluado su morfología, la velocidad de degradación, las propiedades físico-químicas y biológicas [10, 11, 13, 14, 28, 30].

En el caso de Díaz Tajada et al., realizaron andamios mediante separación de fases inducida térmicamente (TIPS), utilizando como precursores el PLGA/nanohidroxiapatita (nHAp), con diferente relación molar correspondiente al copolímero (PLGA) una de 53:47 y otra de 75:25, respectivamente, como disolvente usaron Dioxano finalmente las muestras fueron vertidas en moldes de aluminio. Se realizó un estudio completo de caracterización de las muestras y como resultados obtuvieron que la influencia de la razón y la presencia de nHAp confirmaron que el copolímero con una razón LA/GA menor se degradó más rápido al ser más hidrofílico y ninguna muestra del compuesto PLGA/nHAp mostró citotoxicidad [72].

Nie & Wang, fabricaron andamios con diferentes composiciones de PLGA/HAp al 0, 5 y 10% por el método de electrohilado, como precursor, 3 g de PLGA 50:50 se agregaron a 10 ml de diclorometano ( $CH_2Cl_2$ ) como disolvente, preparando alternadamente una solución de HAp para formar una fase homogénea. Después la solución mezclada se transfirió a una jeringa de vidrio de 10 ml colocada en el aparato de electrohilado. Luego los andamios se electrohilaron a diferencia de tensión de 10 kV con un flujo de solución de 5 ml/h en donde el ánodo se fijó a unos 15 cm por encima del tambor colector giratorio recubierto de aluminio (cátodo). A manera de resultados en DSC las partículas de HAp están cristalizadas y al aumentar el contenido de HAp la Tg (temperatura de transición vítrea) disminuye, la relación entre la capacidad de adhesión del andamio a las células y el contenido de HAp se ve favorecida [73].

Susana Fragoso Ángeles et al., sintetizaron hidroxiapatita por precipitación húmeda utilizando una reacción de ácido fosfórico con hidróxido de calcio  $Ca(OH)_2$  y adición de hidróxido de sodio ( $NaOH$ ) como regulador de pH, manteniendo la temperatura de síntesis

a 1050°C. Los andamios los desarrollaron a través de un método de mezcla simple y sonicación, primero disolvieron PLGA 50:50 en cloroformo, posteriormente prepararon una solución de HAp en cloroformo y realizaron mezclas de soluciones PLGA/HAp con una proporción de 65 % PLGA con 35 % HAp finalmente la mezcla la vertieron en una caja Petri con dimensiones 35 x 10 mm. Los autores comprobaron que por DRX se muestra a la fase de HAp, mientras que por FTIR se observan bandas características del PLGA y grupos funcionales de la HAp y por MEB se pueden ver conglomerados de la hidroxiapatita y una distribución superficial con mayor homogeneidad y en las películas se aprecia en la superficie una rugosidad funcionalizada con la hidroxiapatita [11].

Honglin Luo et al., sintetizaron compuestos nanofibrosos utilizando nanopartículas de HAp y PLGA 50:50 disueltos en una mezcla binaria de ácido acético ( $CH_3COOH$ ) y acetona ( $C_3H_6O$ ) por el método de electrohilado a una concentración de 95%, 90% y 85% PLGA con 5%, 10% y 15% de HAp, se evaluó el efecto de los cristales de hidroxiapatita incrustada en las nanofibras de PLGA y como resultado en MEB se muestra una morfología fibrosa similar, el PLGA puro es liso y para el compuesto muestran superficies rugosas debido a la adición de HAp, en FTIR se ve claramente la presencia de cristales de hidroxiapatita y bandas del PLGA. Por TGA la proporción PLGA/15% HAp muestra una menor pérdida de peso entre las cuatro muestras, o sea que la estabilidad térmica mejora debido a la presencia de nanopartículas de HAp, así mismo revelan que andamios de PLGA/HAp tiene un mejor rendimiento celular en adhesión y proliferación celular que en andamios de PLGA al 100% [74].

En la Tabla 1.1 se presenta de forma resumida la aplicación en el área biomédica de andamios compuestos de PLGA/HAp a diferentes composiciones que va desde el 100% - 60/40%; de acuerdo con los resultados reportados se concluye que las composiciones 90/10, 80/20 y 60/40 obtuvieron una mejor composición que los demás y también en la viabilidad celular alcanzaron un 70, 44 y 70% respectivamente. Los resultados demuestran que a mayor concentración de HAp favorecen a la bioactividad.

Tabla 1.1. Aportaciones en el desarrollo de andamios de PLGA/HAp a diferentes composiciones con diferentes técnicas.

<i>Composición PLGA/HAp</i>	<i>Técnica</i>	<i>Bioactividad</i>	<i>Viabilidad celular</i>	<i>Propiedades mecánicas (MPa)</i>	<i>Tamaño de poro (<math>\mu</math>m)</i>	<i>Porosidad (%)</i>	<i>Aplicación</i>	<i>Ref.</i>
90/10 95/5	precipitación química húmeda	90/10 mejor bioactividad	70%	Mejoradas	137 100	>50	sistemas de administración de fármacos	[12]
100 90/10 80/20 60/40	colada con disolvente y lixiviación de partículas.	80/20 mejor bioactividad	-	Mejoradas	250-355	45-68	Sustitutos óseos	[75]
95/5 90/10 80/20 60/40	precipitación en emulsión.	80/20 y 60/40 mejor bioactividad	44%	50-70	88-500	48 49 46 61	Regeneración de tejido óseo	[76]
100 90/10	pretratamiento con plasma de oxígeno	Buena	70%	$0.4 \pm 0.1$ $12.4 \pm 1.0$	100-200	77	Regeneración de tejido óseo	[77]
90/10	Polimerización in situ	Buena	63.8%	-	1-14	75		[78]

## 1.2 MARCO TEÓRICO

### 1.2.1 Biomaterial y sus características.

Gustavo Duffo definió un biomaterial como *cualquier sustancia o combinación de sustancias de origen natural o artificial que puede ser usada durante cierto tiempo como un todo o como parte de un sistema que permite tratar, aumentar o reemplazar algún tejido, órgano o función del cuerpo humano, estos biomateriales están en contacto con fluidos corporales por lo que deben de ser químicamente estables* [79].

La selección de los biomateriales depende de su área aplicación, en medicina deben ser evaluados mediante pruebas biológicas como citotoxicidad, viabilidad, adhesión y proliferación celular para entender la respuesta in vitro e in vivo. Considerando también que deben de cumplir con las características reportadas por Duffo resumidas en la Figura 1.2 para que desempeñe su función dentro del organismo descritas a continuación:

1. Biocompatible, esto es que debe ser aceptado por el organismo del huésped y que no provoque rechazo ante la interacción del biomaterial-sistema.  
En relación a esto es que debe tener un comportamiento bioinerte, es decir, que no sufra ningún cambio químico evaluable después de un tiempo prolongado de contacto en el medio biológico, así mismo que sea bioactivo, esto es, que se tenga efectos positivos en las respuestas biológicas como estimular la unión a los tejidos circundantes para promover el crecimiento de hueso nuevo [80].
2. No debe de ser tóxico.
3. Biodegradable o bioreabsorbible, o sea, que sean diseñados para degradarse gradualmente en un periodo de tiempo que se disuelva gradualmente en los fluidos y tejidos corporales para finalmente ser reemplazados por el tejido natural [81].
4. Debe de tener una morfología de preferencia porosa que se asimile a la matriz ósea.

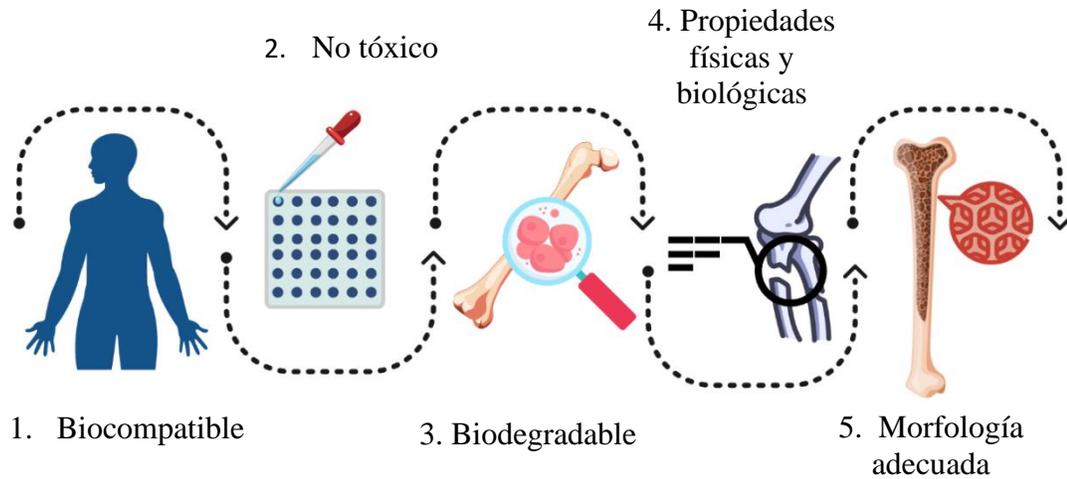


Figura 1.2. Características por considerar para un biomaterial ideal.

El estudio de ciencias de los materiales en medicina ha cambiado el desarrollo de biomateriales ya que además de que deben cumplir con las características antes ya mencionadas también se debe tomar en cuenta la selección de materiales, el diseño, parámetros como el pH y el tiempo de degradación [20]. Los biomateriales se clasifican de acuerdo con su origen y su respuesta biológica como se observa en la Figura 1.3. La primera clasificación se relaciona con la forma de obtener los precursores, es decir de manera natural o sintética; así mismo se clasifican por su naturaleza, ya sean orgánicos e inorgánicos y por último de acuerdo con su respuesta biológica de manera bioinerte, bioactivo y biodegradable o bioabsorbible.

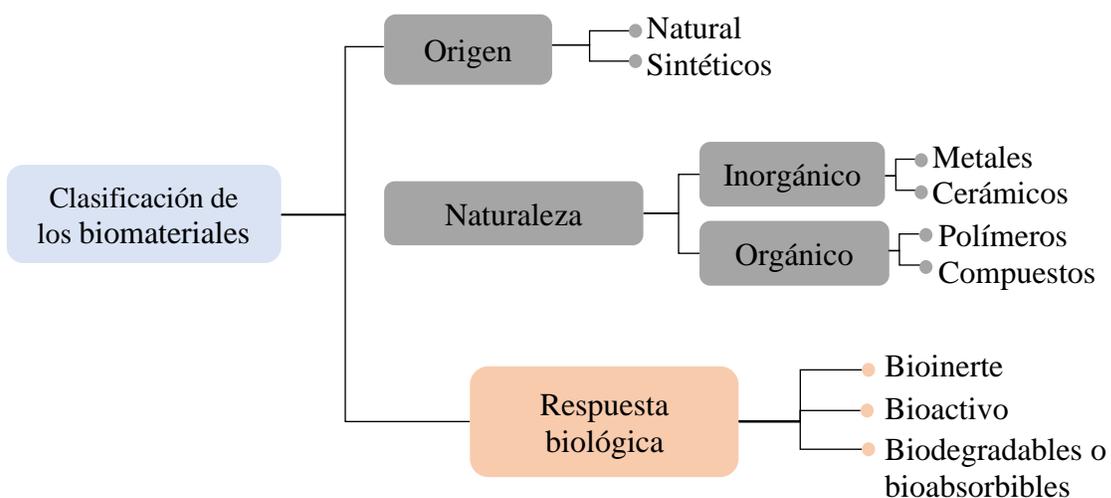


Figura 1.3. Clasificación de los biomateriales de acuerdo con su origen, naturaleza y respuesta biológica.

También, diferentes autores [33–37, 92], reportan que existe otra clasificación de acuerdo con su avance científico y evolución a lo largo de cuatro generaciones que se resume en la Tabla 1.2

Tabla 1.2 Clasificación de biomateriales de acuerdo con su evolución.

1° generación	<i>Biomateriales inertes</i>	Reemplazan el tejido dañado con reacciones tóxicas mínimas del receptor.
2° generación	<i>Biomateriales bioactivos y biodegradables</i>	Interactúan con el entorno biológico para mejorar la respuesta y se degradan gradualmente en nuevos tejidos.
3° generación	<i>Biomateriales funcionalizados</i>	Pueden estimular respuestas celulares a nivel molecular.
4° generación	<i>Biomateriales funcionalizados e inteligentes</i>	Estimulan células específicas para ayudar al cuerpo a curarse a sí mismo.

En la actualidad las biocerámicas [80]; polímeros naturales y polímeros sintéticos [17] son los materiales más estudiados como son la HAp y copolímeros [5, 38, 81] que combinan sus propiedades físicas, químicas y biológicas para crear andamios compuestos biocompatibles que pueden facilitar el proceso de regeneración de tisular.

### 1.2.2 Material compuesto

Un compuesto es un sistema de materiales formado por dos o más fases distintas, con diferentes propiedades físicas y químicas que se pueden obtener en casi cualquier forma, lo que permite un diseño flexible para lograr las propiedades requeridas, la finalidad de combinar estas características es hacer un uso óptimo de las propiedades en diferentes aplicaciones. El compuesto tiene una región de interfaz de composición química variable donde resaltan los componentes que son la matriz y el refuerzo, mientras que la superficie que los une es la interfaz [72-73]. En Figura 1.4, se muestra una definición gráfica de compuesto y sus componentes, donde la unión de dos materiales diferentes (matriz + reforzante) mejorarán sus características y propiedades fisicoquímicas [86]

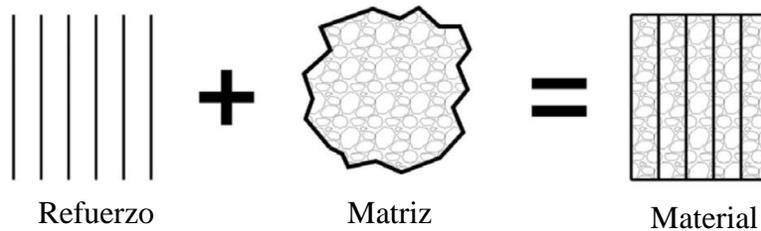


Figura 1.4. Definición gráfica de compuesto [87].

Para aplicaciones estructurales y de ingeniería se han planteado tres puntos principales de un material compuesto [94, 95]:

1. Consta de dos o más materiales físicamente y/o químicamente distintos.
2. Pueden obtenerse mezclando distintos materiales de tal forma que la dispersión de un material en el otro pueda hacerse de manera controlada para alcanzar propiedades óptimas.
3. Las propiedades aumentarán y posiblemente serán únicas en comparación con las propiedades de los materiales monolíticos.

Por ejemplo, el hueso es un material compuesto de hidroxapatita que le confiere dureza, rigidez y la alta resistencia a la compresión, mientras que el colágeno aporta elasticidad y resistencia a la tensión [90].

### 1.2.3 Andamios

Un andamio es una estructura tridimensional que funciona como plataforma de anclaje en donde las células se adhieren, promueven su migración y proliferación celular a través de su estructura porosa para permitir el intercambio de nutrientes como el oxígeno y la glucosa para mantener vivas a las células y facilitar así la remodelación tisular [96, 97].

Las células, los andamios y los factores de crecimiento son los tres factores claves para la ingeniería de tejidos [93]. Los andamios deben proporcionar un soporte estructural temporal para el crecimiento celular durante la regeneración del tejido, que finalmente se reabsorben, dejando sólo el tejido vivo recién formado y la lesión totalmente curada.

Se han establecido cuatro necesidades fundamentales, mejor conocidas como los requisitos 4F [94], para que los andamios tengan un comportamiento, ver Tabla 1.3.

Tabla 1.3. Necesidades fundamentales para la fabricación de andamiajes.

<i>Necesidad</i>	<i>Acción</i>
<i>Forma</i>	Rellenar los defectos del hueso, guiando la forma para que se asemeje al hueso natural.
<i>Función</i>	Cumpla con propiedades mecánicas y biológicas óptimas para cumplir con la función dentro del organismo.
<i>Formación</i>	Regeneración tisular mediante los mecanismo biológicos.
<i>Fijación</i>	Implantar y fijar el andamio dentro del organismo.

Para el desarrollo de andamios en aplicación de regeneración tisular deben cumplir con ciertas características descritas a continuación:

**Tamaño de poro:** deberá contar con un tamaño de poro no superior a 500  $\mu\text{m}$ , para favorecer la vascularización, el soporte de nutrientes de las matrices, la distribución e interconexión celular homogénea y su vez el crecimiento del tejido mineralizado [99, 100].

**Porosidad:** es una propiedad morfológica necesaria que mejora el anclaje del biomaterial implantado y el hueso para tener una mejor estabilidad, además es esencial en la formación de tejido óseo ya que permiten la migración y proliferación de células tisulares [97]. La porosidad total mínima ideal para un buen crecimiento óseo en un andamio es ~50% [98]. La porosidad se mide según la norma ASTM C642-06 la cual fue determinada de acuerdo a la propiedad de fisisorción (adsorción física) y el Principio de Arquímedes donde la medición de la densidad, la porosidad y el peso específico es una herramienta para determinar las propiedades estructurales que pueden ser requeridas para una aplicación determinada [99]. Además, la IUPAQ (Unión Internacional de Química Pura y Aplicada) [132] clasifica la porosidad de acuerdo a su tamaño y se resume en la Tabla 1.4 se analiza cómo se clasifica en tres grupos: macroporos, mesoporos, microporos que pueden ser divididos en supermicroporo y ultramicroporo.

Tabla 1.4. Clasificación de la porosidad en cuanto a su tamaño.

<i>Clasificación</i>	<i>Acción</i>	<i>Ventajas</i>	<i>Desventajas</i>	<i>Tamaño (nm)</i>	<i>Ref.</i>
<i>Macroporos</i>	Es la porosidad básica para la colonización de células, la formación de vasos sanguíneos y el crecimiento de nuevos tejidos.	Siembra celular mejorada para guiar a la migración y proliferación celular	-	50-200	[100, 103, 105–107]
<i>Mesoporos</i>	Estimula la osteogénesis que permitan inducir la regeneración del tejido óseo a través de la liberación controlada de factores de crecimiento	Buena bioactividad, gran área superficial y volumen de poros	Tamaño de poro limitado	<20	
<i>Microporos</i> <i>Supermicroporo</i> <i>Ultramicroporo</i>	Favorece la adsorción de proteínas y el anclaje celular.	Excelente bioactividad	Fuerza mecánica	0.7-2 <0.7	

**Agente porógeno:** es fundamental en la fabricación de andamios porosos; debido que a su presencia es posible obtener una mayor área superficial en el material adsorbente. En la investigación realizada por Adriane DV Souza et al., [104] obtuvieron como resultado que las fases de transición mostraron una gran cantidad de meso-macro poros lo que resalta su potencial para producir estructuras porosas. Para la selección de un agente porogénico es necesario tomar en cuenta que debe ser inerte, con un punto de ebullición elevado y que no se polimerice o se interactúe con el monómero u otros componentes químicos además, deben mezclarse entre sí y ser capaces de formar una solución homogénea cuando se mezclan con los monómeros [109, 110].

Debe ser **biocompatible y absorbible** con una velocidad de degradación y de resorción controlable para emparejar el crecimiento de las células del tejido in vitro e in vivo.

Debe de ser **biodegradable** porque debe de permitir su hidrólisis, decrecimiento del peso molecular, rompimiento de sus enlaces y la reducción de la rigidez del andamio, dando paso a la regeneración ósea mientras se produce la degradación del andamio.

Su **superficie** debe ser químicamente adecuada para el acceso, la proliferación, y la diferenciación de las células.

Debe ser **osteoaductivo**, esto quiere decir que por su bioactividad o por su configuración física, debe dar alojamiento adecuado para que ocurra la migración y diferenciación celular hacia la línea osteogénica.

Y debe de cumplir con **propiedades mecánicas** parecidas a las del tejido en el sitio de la implantación como la rigidez del material, la elasticidad, absorción de líquidos y sustancias del medio, estabilidad dimensional y la tasa de degradación química del andamio.

En la Figura 1.5 se observa una representación esquemática del proceso de regeneración ósea utilizando un andamio biodegradable [111, 112].

- a) Se observa que el hueso pierde su integridad mecánica debido a una fractura o traumatismo.
- b) El andamio se implanta en ese defecto para restaurar la función mecánica temporal.
- c) El hueso empieza a regenerarse en su micro y macroestructura mediante un equilibrio coordinado entre los osteoblastos y osteoclastos.
- d) El andamio empieza a degradarse in vivo y es sustituido finalmente por el nuevo tejido óseo formado.

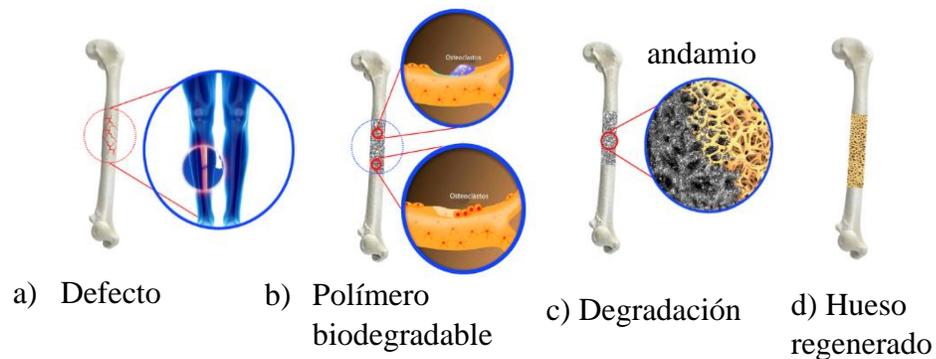


Figura 1.5. Representación del proceso de regeneración ósea.

#### 1.2.4 Métodos para la síntesis de andamios porosos.

Los andamios porosos deben cumplir con características específicas como una morfología adecuada que esté relacionada directamente con su estructura, forma, propiedades estables y porosidad; con la finalidad de que haya una buena interacción para cumplir con los mecanismo biológicos.

Las técnicas para desarrollar andamios se dividen en dos categorías: métodos convencionales y modernos. La primera clasificación se basa principalmente en técnicas sustractivas (control y eliminación de material), mientras que la clasificación moderna se basa en técnicas aditivas, es decir, la adición gradual de capas para el producto final.

En el método sol gel o eliminación de solventes se requiere una solución acuosa del precursor, seguida de hidrólisis y condensación con agitación, lo que da como resultado un sol transparente, que luego se seca y envejece durante un largo período de tiempo, generalmente semanas para finalizar con una calcinación [98], ver Figura 1.6.

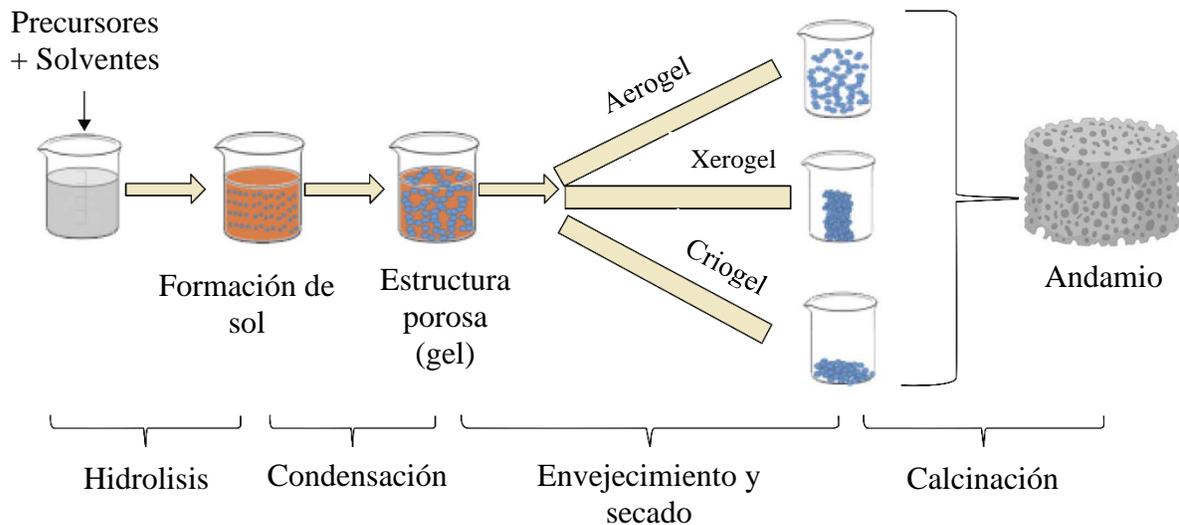


Figura 1.6. Esquemas de las etapas del proceso sol-gel [109].

La técnica de separación de fase inducida térmicamente y liofilización, esquematizada en la Figura 1.7 a) y b), consta de un proceso de dos etapas. En primer lugar, el material se seca, seguido de la sublimación del disolvente. Antes de la liofilización, la muestra debe emulsionarse y congelarse para preservar la formación de poros. Finalmente, el sistema actúa con una combinación de vacío y temperatura, que fomenta la sublimación de varios solventes sin comprometer la integridad de la estructura [110].

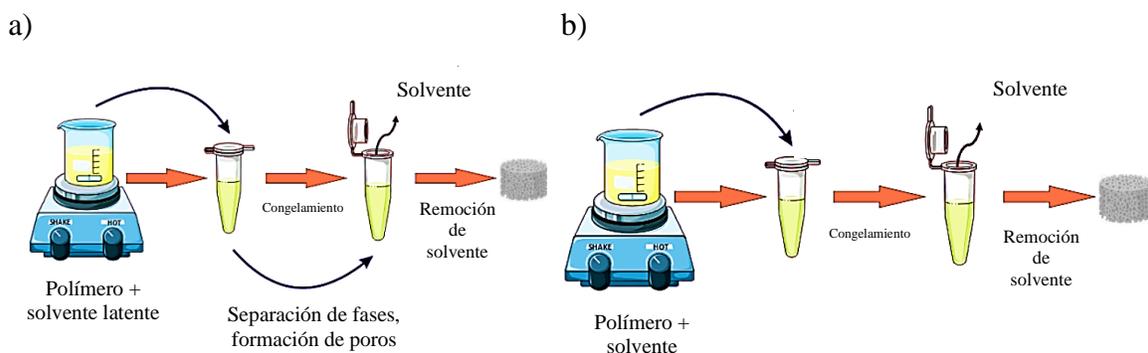


Figura 1.7. a) Técnica de separación de fase inducida térmicamente y b) liofilización. [164].

Para el moldeo por fusión, se requiere de mezclar las partículas de un polímero y de un porogénico que se combinan y son inyectadas en un molde en un proceso donde la temperatura debe estar por encima de la temperatura de transición vítrea del polímero ( $T_g$ ), después el material compuesto es extraído del molde, enfriado, y se sumergen en un líquido apropiado para evaporar el porógeno, sin embargo esta técnica tiene una desventaja la cual es el alto consumo de energía durante la síntesis [111].

Una de las técnicas más simples es el espumado con gas, ver Figura 1.8, ya que se emplea solamente un gas inerte, para generar un espumado que forme la porosidad en la estructura del andamio.

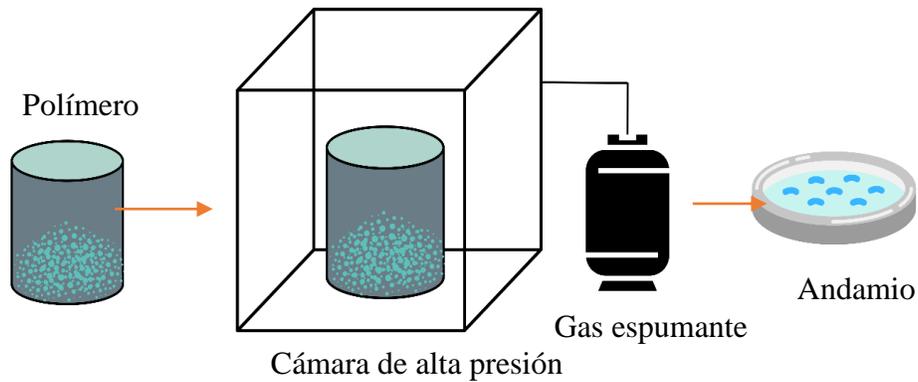


Figura 1.8. Representación esquemática del espumado con gas.

En cuanto a la impresión 3D por ejemplo: inyección de tinta, asistida por láser y extrusión siguen la misma metodología y en el primer paso consiste en seleccionar el biomaterial y mapear la forma deseada del andamio mediante tomografía computarizada (TC), imágenes por resonancia magnética (IRM) y rayos X. Los materiales utilizados en las bioimpresoras 3D se denominan biotinta y están compuestos principalmente por cadenas de polímeros que pueden ser de origen natural o sintético, ver Figura 1.9.

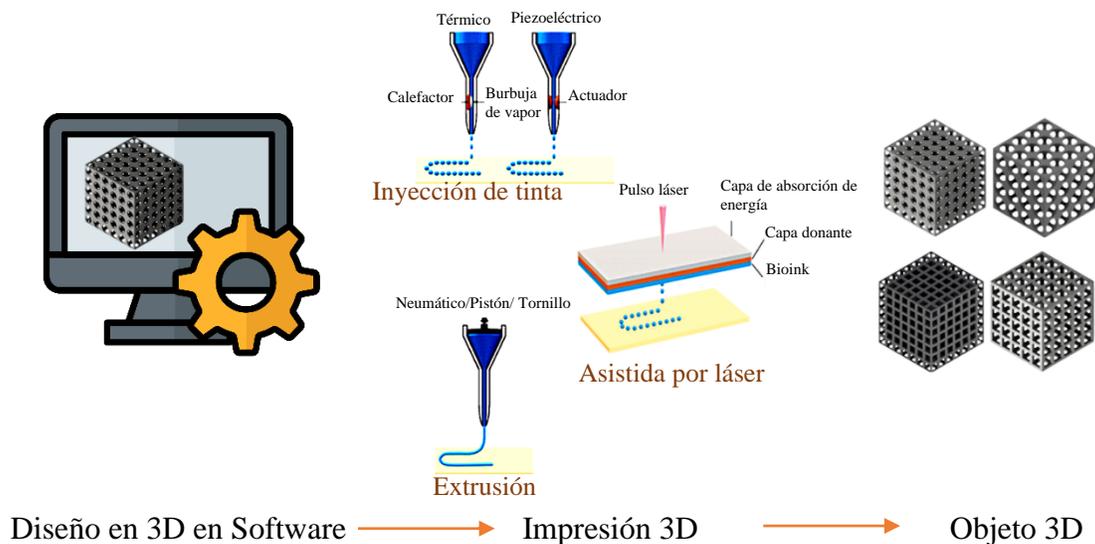


Figura 1.9. Esquema simplificado de las técnicas comunes por impresión 3D. [116, 117].

El método gel-casting, se ha reportado que es una técnica versátil y de bajo costo en donde el polímero se disuelve con un solvente adecuado preferiblemente orgánico y un agente porógeno (para controlar el tamaño de poro) convirtiéndolo en un gel que después se vierte en un molde con la forma deseada, ver Figura 1.10. Esta técnica ha reportado, obtener un tamaño de poro que va desde 60-400  $\mu\text{m}$  [121–125] beneficiando a las pruebas biológicas como en la adhesión, viabilidad y proliferación celular debido a que se ha obtenido una porosidad de 30-90% [110, 118, 119].

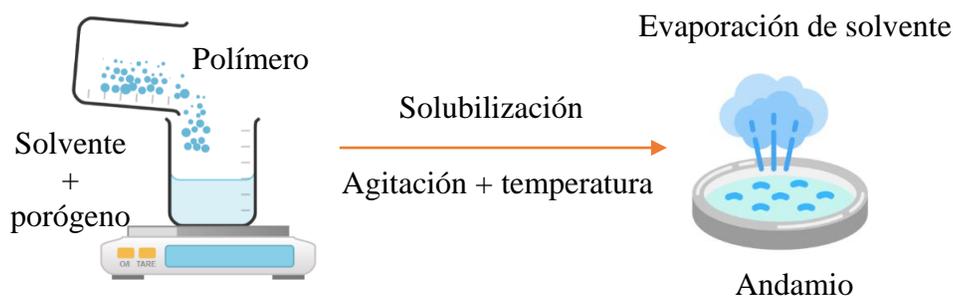


Figura 1.10. Esquema de la técnica gel-casting.

En la Tabla 1.5 se muestra un estudio comparativo de las técnicas más empleadas para el desarrollo de andamios que son: sol gel o eliminación de solventes, separación de fase inducida térmicamente y liofilización, moldeo por fusión, espumado con gas, impresión 3D y gel casting [60, 63, 67, 98, 115]; describiendo puntualmente la metodología, ventajas, desventajas, porcentaje de porosidad y la aplicación en el área de medicina.

Tabla 1.5. Técnicas más empleadas en la ingeniería de tejidos para la fabricación de andamios porosos.

<i>Técnica</i>	<i>Ventajas</i>	<i>Desventajas</i>	<i>Porosidad / Tamaño de poro</i>	<i>Aplicación</i>	<i>Ref.</i>
<i>Sol gel</i>	Simple y de bajo costo, requiere baja temperatura para el proceso de reacción.	Presenta gran contracción en el proceso de gelificación y en el secado de los geles. El costo de las materias primas es alto y los tiempos de procesamiento son largos.	75%-90%	Tecnologías ópticas, electrónicas, energéticas, de biosensores y farmacéuticas	[113, 115, 118, 120]
<i>Separación de fase inducida térmicamente y Liofilización</i>	Se puede obtener diferentes morfologías de su estructura cambiando la temperatura y el gradiente de enfriamiento.	Difícil de controlar la morfología del andamio, se requieren altas temperaturas y alto consumo de energía para obtener las muestras.	60-98 % 50-150 $\mu\text{m}$	Cartílago, hueso, transportador de fármacos, ingeniería de superficies.	[116, 121]
<i>Moldeo por fusión</i>	Hay un control independiente de la porosidad y del tamaño de los poros	Se requieren altas temperaturas para polímeros no amorfos.	>85%	Hueso esponjoso, cartílago, piel, hueso, ingeniería de superficies.	[100, 121]
<i>Espumado con gas</i>	Evita cualquier tipo de disolventes orgánicos.	Poros cerrados lo que requiere el uso de polímeros con alta cristalinidad y buenas propiedades de formación de espuma termoplástica.	<85%, 400-800 $\mu\text{m}$	Transportador de fármacos, hueso, cartílago, ingeniería de superficies.	[121-125]

<i>Impresión 3D</i>	Inyección de tinta	Bajo costo, proceso fácil y hay una amplia accesibilidad para el equipo.	Obstrucción de la boquilla, que puede evitarse con una biotinta de baja viscosidad.	
	Asistida por láser	No hay contacto físico con el andamio y se evita el crecimiento de bacterias. Imprime andamios con alta precisión y resolución.	El funcionamiento del equipo es complicado y de alto costo.	- Actividad antibacterial, biocompatibilidad, piel, válvulas cardíacas, los vasos sanguíneos, los huesos, el tejido cardíaco, etc. [117, 126–128]
	Extrusión	Hay una alta densidad celular y el equipo puede operar con biotinta de alta viscosidad.	Solo se puede usar biotinta viscosa, presenta una baja viabilidad celular, la velocidad de impresión es lenta y la resolución de impresión es moderada.	
<i>Gel casting</i>	Técnica sencilla y de bajo costo, la metodología es rápida, las condiciones de reacción son sencillas y hay un control de tamaño de poro en variación del agente porógeno, existe una rugosidad superficial que mejora la osteointegración ósea.	Existe una posibilidad que quedan residuos de solventes dentro de la estructura del andamio, es por ello por lo que se requiere de varios lavados.	30-90% 60-300 μm,	Adhesión, viabilidad y proliferación de [110, 118, 119, 122] osteoblastos, biocompatibilidad mejorada, cartílago, tejido óseo.

### 1.2.5 Matriz polimérica: Ácido poli láctico- co –glicólico (PLGA).

En la ingeniería de tejido óseo, los andamios de implantes temporales hechos de materiales biodegradables basada en compuestos de matriz polimérica provocan la regeneración ósea, estos polímeros biodegradables pueden obtenerse de manera natural y sintéticos. La clasificación de los biopolímeros naturales se muestra en la Figura 1.11 y la extensa investigación de polisacáridos como el quitosano, ácido hialurónico, alginato y la celulosa reportan tener una bioactividad inherente y además transmiten una buena respuesta biológica, mientras que las proteínas como el colágeno y la seda tienen largas cadenas de aminoácidos y se caracterizan por sus resistencia mecánica y estabilidad estructural [129, 130].

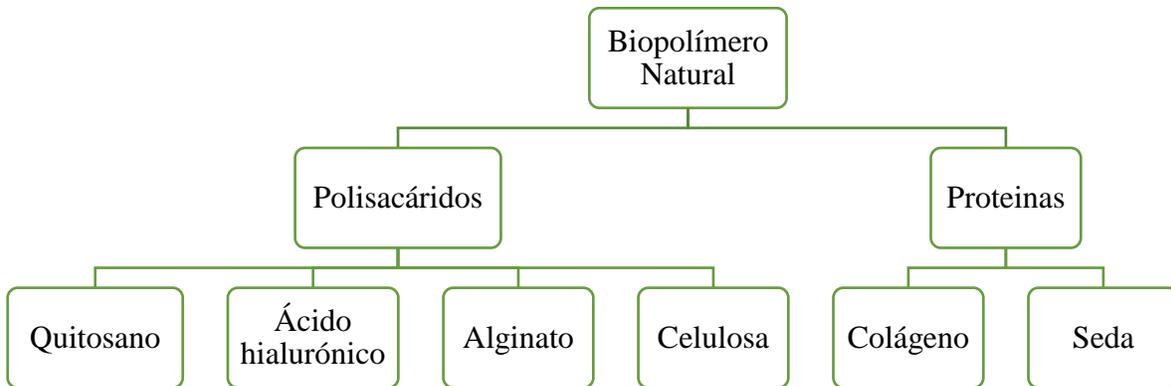


Figura 1.11. Clasificación de los biopolímeros naturales con aplicación en andamios para regeneración tisular.

La otra clasificación es la de los polímeros sintéticos y los más utilizados son los poli(a-hidroxiácidos), por ejemplo, el poli (ácido láctico) (PLA), el poli (ácido glicólico) (PGA), la poli(caprolactona) (PCL) y sus copolímeros como el PLGA. Se sabe que estos polímeros sintéticos son biocompatibles, biodegradables y han sido aprobados por la FDA para ciertas aplicaciones en el sistema humano usados en la ingeniería tisular [58].

Ambas clasificaciones han reportado [12, 131–136] tener una buena biocompatibilidad, adhesión, proliferación celular, con buena resistencia mecánica siempre y cuando actúe como matriz en un sistema compuesto.

Para realizar el andamio se fabricará un material compuesto, siendo el refuerzo cerámico: hidroxiapatita (HAp) y la matriz polimérica: ácido poliláctico-co-glicólico (PLGA). Donde la matriz PLGA realiza e implementa las siguientes funciones [138]:

- a) Transmiten los esfuerzos a las fibras de refuerzo a través de la interfaz.
- b) Protegen las fibras del refuerzo por medio de fuerzas adhesivas.
- c) Aseguran a las fibras de refuerzo de acuerdo con el orden preestablecido.
- d) Resguardan a las fibras de los ataques externos como humedad, ataques químicos.

El ácido poli láctico-co-glicólico es un poliéster alifático producido a través de la polimerización por condensación de sus dos monómeros [30] el ácido láctico (LA) y el ácido glicólico (GA), ver Figura 1.12 a) y b), es por ello que es considerado un copolímero debido a estos dos bloques poliméricos, el PLGA tiene una estructura lineal [139] como se muestra en la Figura 1.12 c), pertenece al grupo  $\alpha$ -hidroxi, es importante conocer que dependiendo de las proporciones de sus dos monómeros formadores afectarán o beneficiarán las propiedades y la tasa de degradación presentes en el copolímero [11, 139, 140, 141].

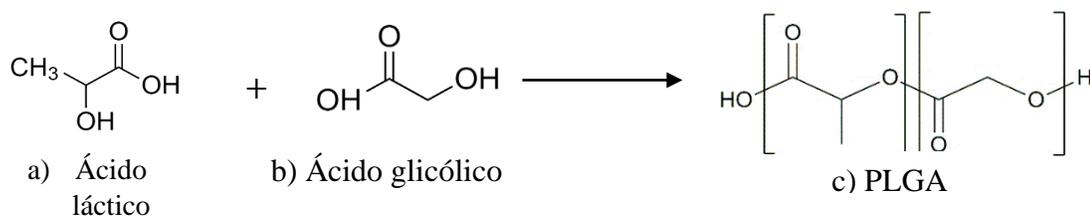


Figura 1.12. Estructuras lineales del a) Ácido láctico, b) Ácido glicólico y el c) PLGA.

En la Tabla 1.6, se muestran las propiedades fisicoquímicas de sus diferentes proporciones de monómeros y el tiempo de degradación de cada muestra analizada y reportada por diferentes autores [77–80] y muestra que cuanto mayor es el contenido de LA (ácido láctico), más lenta es la degradación.

Tabla 1.6. Propiedades de las diferentes composiciones de LA:GA [143].

<i>LA:GA</i>	<i>Viscosidad intrínseca</i>	<i>Módulo de Tensión</i>	<i>Degradación (meses)</i>
<i>PLGA 50:50</i>	0.55-0.75	2.0	1-2
<i>PLGA 65:35</i>	0.55-0.75	2.0	3-4
<i>PLGA 75:25</i>	0.55-0.75	2.0	4-6
<i>PLGA 85:15</i>	0.55-0.75	2.0	5-6

La resistencia mecánica, el comportamiento de hinchamiento, la capacidad de hidrólisis y la tasa de biodegradación de los polímeros se ven directamente afectados por la cristalinidad del PLGA [144]. Rueda et al., realizaron un estudio mediante la ecuación de Fox para calcular las temperaturas de transición vítrea teóricas para las muestras de PLGA a partir de los termogramas DSC. La siguiente Tabla 1.7 enumera las Tg de las diferentes composiciones del PLGA y las compara con las temperaturas teóricas calculadas.

Tabla 1.7. Valores teóricos y experimentales del copolímero PLGA [145].

<i>LA:GA</i>	<i>Tg teórico (°C)</i>	<i>Tg experimental (°C)</i>
<i>90:10</i>	57.49	56.66
<i>80:20</i>	53.57	50.67
<i>70:30</i>	50.00	49.96
<i>60:40</i>	46.88	49.33
<i>50:50</i>	44.12	48.61

Wu. y Wang; reportaron que los polímeros sintetizados a partir de ácido láctico/glicólico (PLGA) son materiales hidrofílicos, esto quiere decir que se degradan de forma natural en un medio acuoso, entonces esta hidrodegradación o hidrólisis se le conoce como “biodegradación” [146]. La biodegradación que en el campo de los polímeros es un fenómeno de ataque de microorganismos a estos materiales, es decir, es un proceso a través del cual se obtiene la desintegración del polímero en pequeños fragmentos debido a la ruptura de enlaces en su cadena principal [147].

Los polímeros degradables se pueden clasificar dos categorías según su mecanismo de biodegradación que son los polímeros degradables en masa y degradables en superficie. La primera clasificación es un proceso homogéneo para polímeros que pertenecen al grupo  $\alpha$ -hidroxi éster, en donde la degradación se produce en toda la matriz polimérica, en este fenómeno el volumen es constante aproximadamente pero la concentración de enlace disminuye con el tiempo, por lo contrario, la degradación en superficie es un proceso heterogéneo en el que la degradación se restringe a capas superficiales delgadas de polímeros y en este fenómeno el volumen disminuye con el tiempo pero la concentración de enlaces es constante [148]. Entonces, comenzando por la degradación de superficie, ver Figura 1.13, es básicamente un fenómeno en el que el agua intenta difundirse en el andamio pero reacciona tan rápido que solo puede atacar las cadenas poliméricas de la superficie, entonces a medida que pasa el tiempo el agua continua atacando solo las cadenas de la superficie y el núcleo permanece intacto mientras que la superficie reacciona, así que imaginemos que la superficie está retrocediendo hacia el núcleo y los lados se vuelven más pequeños y más pequeños.

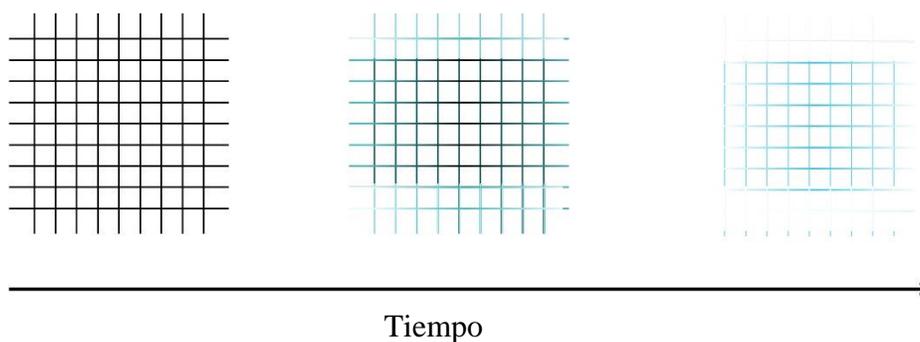


Figura 1.13. Degradación por superficie.

En la siguiente categoría que es la degradación en masa la cual se presenta en el andamio que se desarrolla en esta investigación, en la literatura se han reportado que la degradación del PLGA se produce a través de cuatro etapas consecutivas: I) hidratación, II) degradación inicial, III) degradación posterior y IV) solubilización [147, 151], ver Figura 1.14.

- I. Primero, el medio acuoso (agua) penetra en la matriz polimérica libremente dentro y a través de la estructura del andamio lo que provoca la relajación del polímero y la disminución de la Tg. El polímero absorbe agua y experimenta cierto hinchamiento,

alterando las estructuras poliméricas estabilizadas por las fuerzas de Van der Waals y los enlaces de hidrógeno.

- II. Segundo, en la región hidratada del polímero comienza la ruptura de los enlaces covalentes/éster del polímero (por hidrólisis). Se generan cada vez más grupos finales carboxílicos que pueden autocatalizar la hidrólisis y conduce a la disminución continua del peso molecular polimérica y por ende a medida que el polímero pierde masa se observa una pérdida de su resistencia mecánica, pero mantiene su integridad.
- III. Tercero, la cadena del polímero continúa la escisión masiva de los enlaces hasta que el peso molecular del polímero disminuye a un punto en el que el polímero ya no puede mantener su integridad, entonces hay una pérdida de integridad física y mecánica.
- IV. Cuarto, el polímero pierde una masa significativa debido a la solubilización de los oligómeros en el medio circundante (ácido láctico/glicólico) y el polímero se desintegra en moléculas solubles que se hidrolizarán posteriormente en ácidos libres.

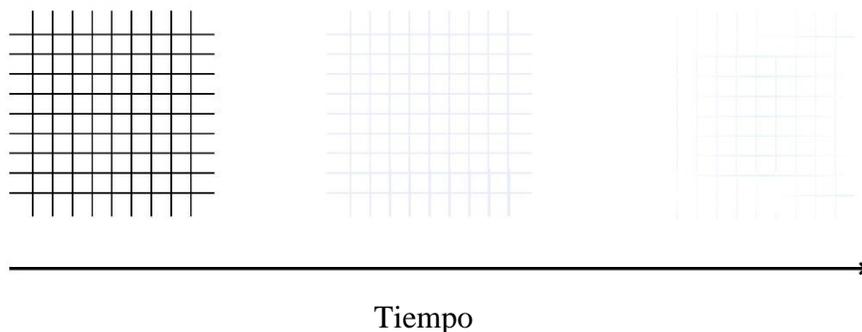


Figura 1.14. Degradación en masa. Fuente propia.

Para que la degradación del PLGA ocurra va a depender de diferentes factores [87, 138, 140, 143] como:

- a) La relación molar de los ácidos láctico y glicólico en la cadena del polímero de acuerdo con los valores de la Tabla 1.6.

b) El peso molecular del polímero, esto es a que los pesos moleculares más altos tienen tasas de degradación más bajas porque el peso molecular está directamente relacionado con el tamaño de las cadenas del polímero, o sea, que a medida que aumenta el peso molecular, la tasa de degradación disminuye.

c) La temperatura ya que acelera su degradación porque al incrementarse podrá alcanzar o superar la temperatura de transición vítrea ( $T_g$ ).

En la Figura 1.15 se observa la reacción química de como el PLGA se forma uniendo estos dos polímeros (LA, GA) mediante un enlace éster marcado con un recuadro naranja en donde este enlace está compuesto por el átomo de carbono que tiene cuatro electrones en la capa exterior (azul) y comparte dos electrones con un átomo de oxígeno (verde), otro con una cadena de carbono (rojo) y el último con un átomo de oxígeno unido a una cadena de carbono (morado).

Se conoce que este grupo éster beneficia al PLGA a degradarse cuando una nanopartícula es absorbida por el medio fisiológico en donde ocurre una reacción química conocida como hidrólisis, que al estar en contacto con el agua (el cuerpo está formado por un 70% de agua en masa), garantiza una degradación confiable in vivo provocando una ruptura heterolítica de tipo nucleofílica en la cadena principal del ácido carboxílico para su final formación de compuestos no tóxicos que son el PLA y PGA que se elimina del cuerpo con la respiración, principalmente a través de los pulmones como dióxido de carbono ( $CO_2$ ) y agua, es decir que entran en el ciclo del ácido tricarboxílico (ciclo ATC) mejor conocido como el ciclo de Krebs [152–155]



El ciclo de Krebs está conformado por ocho reacciones enzimáticas, este proceso es anfibólico esto quiere decir que es un conjunto de reacciones catabólicas como se muestra en la Figura 1.16 por las reacciones de oxidación y así mismo es un proceso anabólico por los productos que sintetiza. Realiza la oxidación de hidratos de carbono, ácidos grasos y aminoácidos hasta producir  $\text{CO}_2$  y agua, los precursores que proporciona como el citrato y malato se van a utilizar para la producción de ácidos grasos, colesterol y glucosa. La primera etapa empieza con la molécula del citrato, cuando el Acetil Coenzima A se combine con oxalacetato en cada una de estas ocho reacciones va a intervenir una enzima específica y así de esta manera por cada molécula de piruvato que entre al ciclo se va a producir una molécula de GTP, tres moléculas de NADH y una molécula de  $\text{FADH}_2$ . En la glucolisis se produjeron dos moléculas de piruvato por los tanto se van a requerir dos vueltas del ciclo para completar la oxidación completa de la molécula de glucosa así de esta forma el rendimiento total del ciclo de Krebs para una molécula de glucosa es el doble es decir dos moléculas de GTP, seis moléculas de NADH y dos moléculas de  $\text{FADH}_2$ . Y así de esta forma la glucosa se va a descomponer por completo para producir seis moléculas de  $\text{CO}_2$  de las cuales dos se produjeron en la formación del Acetil Coenzima A y las otras cuatro se produjeron en el ciclo de Krebs [138, 152, 156].

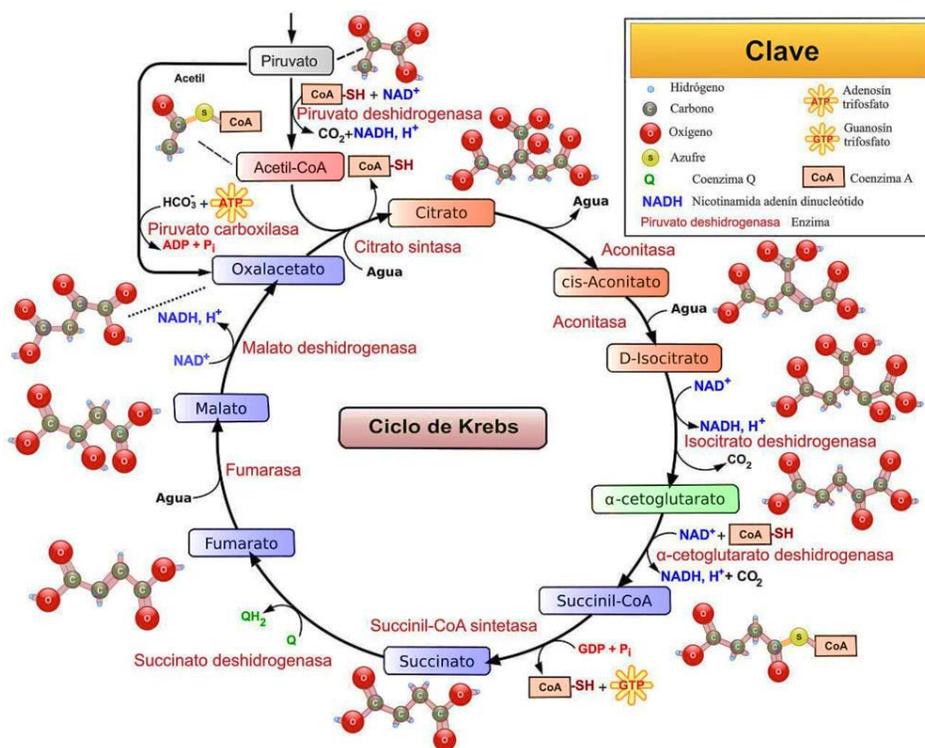


Figura 1.16. Reacciones de ciclo de Krebs [151].

### 1.2.6 Reforzante cerámico: Hidroxiapatita (HAp).

La función principal de un material reforzante es mejorar las características y propiedades físicas y químicas de la matriz, y es el componente que soporta la carga en el material compuesto es la razón por lo que muchos investigadores han estudiado la biocompatibilidad y las propiedades fisicoquímicas de la hidroxiapatita [87]. El término "hidroxiapatita" es el nombre mineral compuesto por iones "hidroxilo" y la "apatita" perteneciente a la familia de las apatitas  $CaPO_4$  [155] y el compuesto tiene la forma general de la ecuación 1.1:

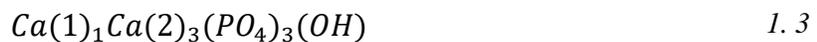


Entre ellos, la posición  $X$  puede ser ocupada por diferentes iones negativos como flúor ( $F$ ), cloro ( $Cl$ ), carbonato ( $CO_3$ ) o hidróxido ( $OH$ ), formando Fluorapatitas, Cloroapatitas o Hidroxiapatitas respectivamente, los diferentes componentes dentro de la estructura de la HAp pueden intercambiarse y ser sustituidos como se muestra la Tabla 1.8 [156].

Tabla 1.8. Sustitutos de aniones y cationes de la hidroxiapatita.

<i>Cación</i>	<i>Anión</i>	
$Ca^{+2}$	$PO_4^{-3}$	$OH^{-}$
$K^{+}$	$AsO_4^{-3}$	$F^{-}$
$Na^{+}$	$SO_4^{-2}$	$Cl^{-}$
$Mn^{+2}$	$CO_3^{-2}$	
$Ni^{+2}$	$SiO_4^{-4}$	
$Cu^{+2}$		
$Zn^{+2}$		

La HAp está representado por la fórmula general de la ecuación 1.2 y puede expandirse como se muestra en la ecuación 1.3. La fórmula estequiométrica se muestra en la Ecuación 1.4.



La celda unitaria de la hidroxiapatita consta de 10 iones de calcio, 6 grupos fosfato y 2 iones hidroxilo y existen dos sitios no equivalentes de iones calcio, el sitio I (Ca I) que tiene un número de coordinación 9 y el sitio II (Ca II) tiene número de coordinación 7 formando un prisma trigonal triapuntado entre los 9 átomos de oxígeno y un átomo de  $\text{Ca}^{+2}$  (1), de igual manera el fósforo posee un número de coordinación 4 y el hidroxilo tiene 1 número de coordinación; esto quiere decir que hay 9,7,4 y 1 átomos de oxígeno alrededor de los elementos Ca (I), Ca (II), P, y el  $\text{OH}^-$  tiene una densidad de carga con simetría casi esférica; formando un prisma trigonal, bipirámides pentagonales y tetraedros, como se muestra en la Figura 1.17 a), b), c) y d) respectivamente [161, 162].

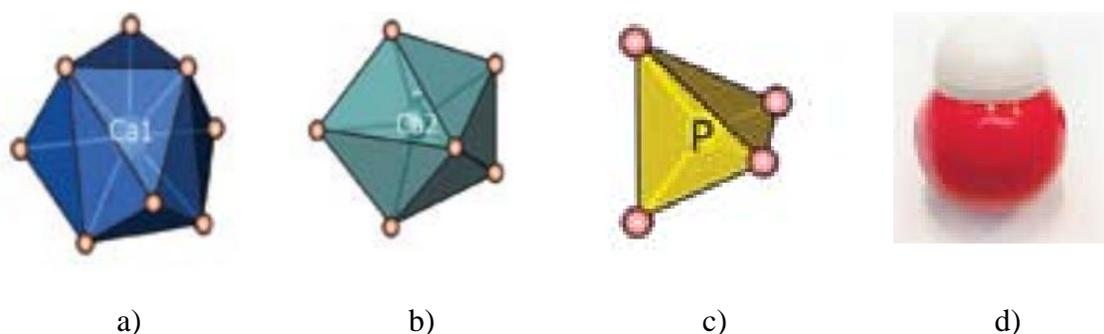


Figura 1.17. Estructura de la hidroxiapatita de la celda unitaria para los componentes atómicos a) Calcio (I), b) Calcio (II), c)  $(\text{PO}_4^{-3})$  y d)  $\text{OH}^-$  [162].

La hidroxiapatita es una biocerámica polimórfica por lo que se han propuesto dos estructuras cristalográficas diferentes para aplicaciones biológicas, una con estructura hexagonal y otra con estructura monoclinica [7, 54, 56, 175], estas dos estructuras comparten los mismos elementos y tienen una relación atómica Ca/P estequiométrica de 1,67. La principal diferencia entre ellos es la orientación de los grupos hidroxilo [90]. En la Figura 1.18 a), se observa que la estructura hexagonal los grupos hidroxilo están orientados en dos direcciones diferentes en cada columna que les confieren un menor estabilidad, tiene un grupo espacial de  $\text{P6}_3/\text{m}$ , y los parámetros de la red son  $a=b=9.432 \text{ \AA}$ ,  $c=6.881 \text{ \AA}$ ,  $\alpha=\beta=90^\circ$ ,  $\gamma=120^\circ$ , mientras que en la forma monoclinica de la Figura 1.18 b), los grupos hidroxilo tienen la misma dirección en la misma columna y una dirección opuesta entre las columnas [160] tiene un grupo espacial  $\text{P21}/\text{b}$ , parámetros de red  $a=9.421 \text{ \AA}$ ,  $b=2 \text{ \AA}$ ,  $c=6.8814 \text{ \AA}$ ,  $\gamma=90^\circ$  [177, 178].

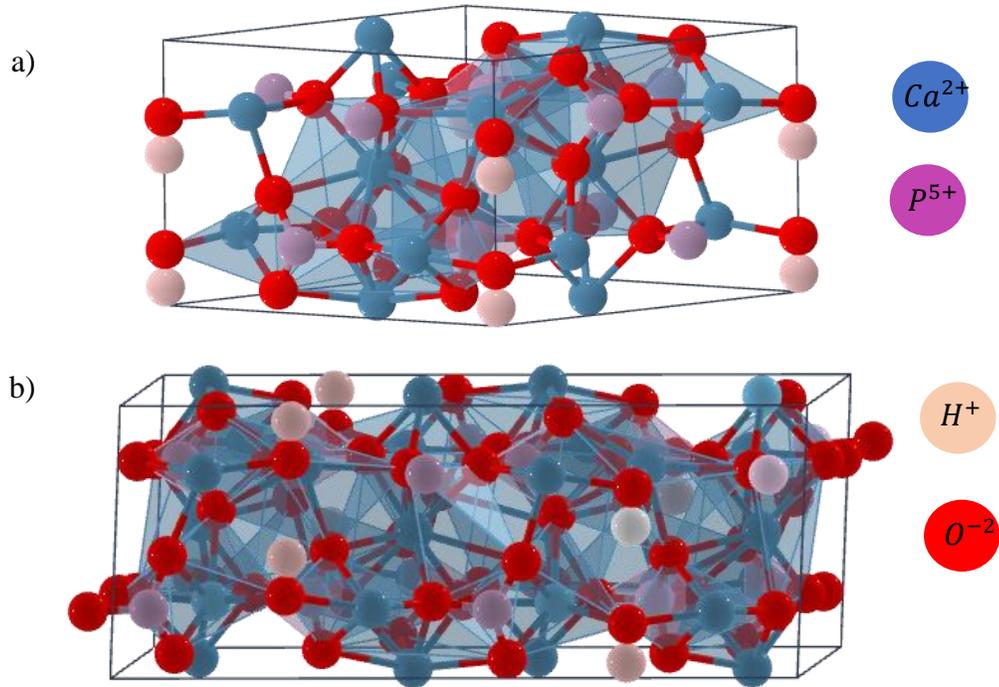


Figura 1.18. Estructuras cristalinas de la hidroxiapatita a) hexagonal y b) monoclinica [163], [164].

La HAp es el principal constituyente inorgánico del hueso (~60% en peso del hueso) y del esmalte dental al 90% [84, 172] ya que les confiere dureza, en tanto que el colágeno les da la propiedad de elasticidad y sirve de molde para dar lugar al nuevo mineral de HAp que crecerán y se diferenciará a través del proceso de remodelación tisular [7, 176], proporcionando una mayor rigidez, por lo que debe cumplir con al menos un 45% de cristalinidad para ser utilizado en el campo de los biomateriales [166]. La hidroxiapatita se caracteriza por su biocompatibilidad y puede utilizarse como sustituto óseo para la regeneración ósea debido a su alta resistencia mecánica, la presencia de porosidad en su estructura y su facilidad de interactuar en los mecanismos tisulares [33].

La obtención de nanopartículas de HAp y el control de su microestructura es un desafío cotidiano, sin embargo, existen diversos métodos de obtención como se observa en la Figura 1.19 pero las condiciones de procesamiento pueden variar en cada ruta [167].

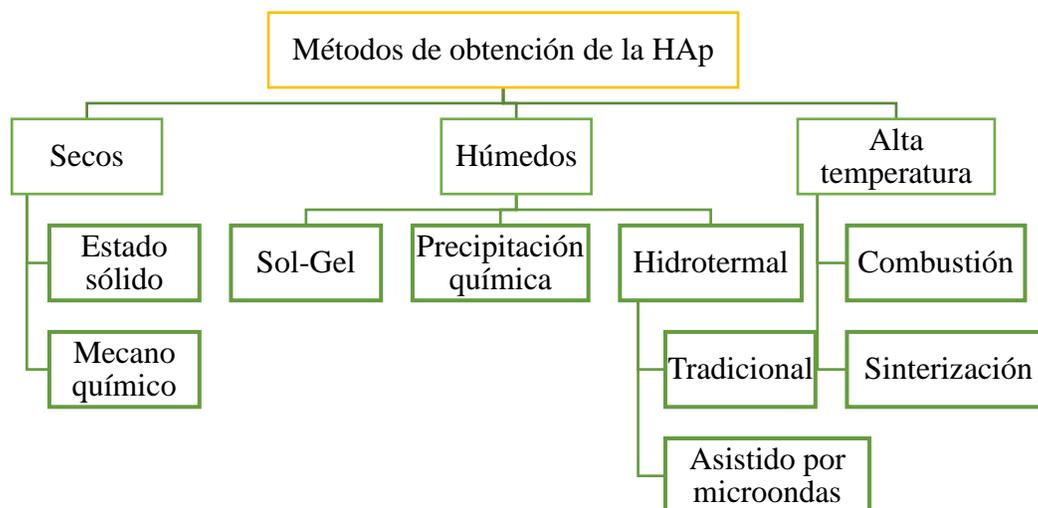


Figura 1.19. Clasificación de métodos de obtención de la hidroxiapatita.

Mehdi Sadat-Shojai et al., reportaron que existen diferentes métodos de síntesis para la obtención de nanohidroxiapatita, empezando con el método seco no se utiliza un disolvente como tal y en este método se han adoptado dos procesos que es la mecano síntesis y en estado sólido, por consiguiente, el método de altas temperaturas requiere de métodos que puedan manejar altas temperaturas como la pirólisis y la combustión en donde los materiales precursores pueden degradarse parcial o completamente, mientras que en los métodos húmedos puede ajustarse los parámetros como la presión y la temperatura para controlar la morfología, tamaño y forma de las partículas [39, 54, 57, 58, 177, 184, 185]; en la Tabla 1.9 se resume la información comparativa de cada método según su clasificación donde se destacan los resultados obtenidos hasta el momento en la preparación de nanopartículas de HAp sintética.

Tabla 1.9. Comparación de los diferentes métodos de obtención de nanopartículas de la hidroxiapatita.

		<i>Síntesis</i>			<i>Características</i>				
<i>Método</i>		<i>Costo</i>	<i>Cristalinidad</i>	<i>Ca/P ratio</i>	<i>Tamaño (Diámetro y Longitud)</i>	<i>Morfología</i>	<i>Tamaño de Distribución</i>	<i>Control de morfología</i>	<i>Ref.</i>
<i>Secos</i>	Estado sólido	Bajo	Muy alto	Variable	100 a 500 $\mu\text{m}$	Variable	Ancho		[171]
	Mecano químico	Bajo	Muy alto	No estequiométrico	-	Laminares porosos	Ancho	Bajo	[172]
<i>Húmedos</i>	Precipitación química	Bajo	Bajo	No estequiométrico	44-60 nm y 230 y 490 nm	Nanobarras	Variable		[173]
	Sol-Gel	Alto	Variable	Estequiométrico	10-50 $\mu\text{m}$ y 200 nm	Globular	Estrecho	Bueno	[174]
	Hidrotermal	Bajo	Muy Alto	Estequiométrico	16.33 nm y 32.93 nm	Nanorods	Ancho		[54], [55]
<i>Altas temperaturas</i>	Combustión	Bajo	Alto	Variable	53-75 $\mu\text{m}$ y 80-120 $\mu\text{m}$	Variable	Variable	Moderado-Bueno	[175]
	Sinterización	Bajo	Medio	No estequiométrico	20 nm y 40 nm	Varilla	Variable		[170]

La técnica hidrotermal, permiten la preparación de polvos bien cristalizados, con una composición homogénea, y de fácil sinterización. Esto se debe al efecto de la alta temperatura y presión aplicada a las soluciones acuosas ( $T > 100^{\circ}\text{C}$ ,  $P > 1 \text{ atm}$ ) por lo que es un método viable para la obtención de hidroxiapatita debido a su facilidad de síntesis y bajo costo [176].

En la Figura 1.20 se observa el proceso de formación de hidroxiapatita por el método hidrotermal, que involucra dos etapas principales, la primera etapa es la nucleación que es una reacción iónica en condiciones normales y la segunda es el tratamiento hidrotermal en donde hay un crecimiento de núcleos, la temperatura de sinterización y el pH son parámetros importantes ya que se pueden obtener hidroxiapatita con diferente morfología [177].

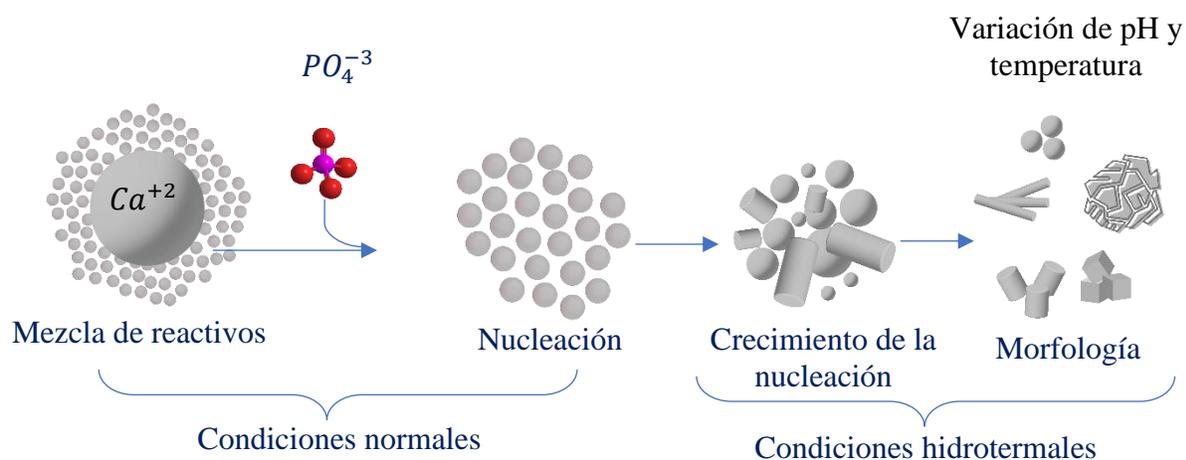


Figura 1.20. Etapas para la formación de hidroxiapatita.

Para llevar a cabo la síntesis hidrotermal existen cuatro acciones importantes para la formación de polvos de hidroxiapatita resumido en la Tabla 1.10 reportado por Paul W. Brown & Racquel Zapanta.

Tabla 1.10. Acciones para el método hidrotermal [176].

<i>Clasificación</i>	<i>Acción del fluido hidrotérmico</i>
<i>Medio de transferencia</i>	Se transfiere físicamente el calor, la presión y la energía mecánica al material sólido.
<i>Absorbente</i>	Sus componentes son adsorbidos en las superficies de sólidos.
<i>Solvente</i>	Puede disolver los materiales sólidos para formar cúmulos moleculares y especies iónicas.
<i>Reactivo</i>	Pueden reaccionar con sólidos para formar otros productos sólidos como hidratos, hidróxidos, óxido, hidruros, etc.

En la Tabla 1.11 se resumen todos los resultados obtenidos por diferentes autores para la síntesis de la hidroxiapatita por métodos húmedo utilizando la técnica hidrotermal tradicional y por microondas donde obtuvieron una relación Ca/P que va desde 1.42-1.69 y de acuerdo con J. Campa Molina, cuando el valor tiende a ser de 1.6-1.9 favorece la bioactividad debido a que la HAp no es bioreabsorbible y beneficia al hueso ya que no se degradaría de manera rápida cuando este en contacto con el fluido fisiológico; así mismo aumenta su dureza y aumenta su fragilidad [158]. Demostraron por DRX un tamaño de cristalito que va desde 13.55  $\mu\text{m}$  a 19.56 nm y confirmaron con el análisis de refinamiento rietveld la presencia de dos fases: hexagonal y monoclinica, predominando esta última en un 95%; en las micrografía se observaron aglomerados de HAp en forma de varillas, microvarillas, microrods, semiesféricas, nanovarillas, nanobastones y nanorods para aplicación en administración de fármacos, cultivo y activación celular, purificación de anticuerpos a gran escala y reemplazo de tejido duro.

Tabla 1.11. Antecedentes de la síntesis de hidroxiapatita por métodos húmedos.

<i>Año</i>	<i>Autor</i>	<i>Técnica</i>	$^{\circ}T$	<i>pH</i>	<i>Tamaño de cristalito</i>	<i>Ca/P</i>	<i>Fase mayoritaria</i>	<i>Morfología</i>	<i>Aplicación</i>	<i>Ref.</i>
2005	Rodríguez-Lugo et al.	Hidrotermal tradicional	269°C	-	-	1.42	-	Aglomerados		[52]
2019	Chatterjee et al.	Hidrotermal tradicional	140°C	6-10	13.55 $\mu\text{m}$ , 2.42 $\mu\text{m}$ , 1.35 $\mu\text{m}$	1.67	Hexagonal	Varillas, microvarillas y microrods	Administración de fármacos, cultivo y activación celular,	[53]
2020	López-Ortiz et al.	Hidrotermal tradicional	200°C	7	19.56 nm	1.67	Monoclínica	Nanorods	purificación de anticuerpos a gran escala, reemplazo de tejido duro	[54]
2021	Sánchez-Campos et al.	Hidrotermal asistida por microondas	200°C	7-9	23 nm.	1.67	Monoclínica	Semiesféricas, nanovarillas, nanobastones		[55]
2021	Villaseñor-Cerón et al.	Hidrotermal asistida por microondas	200°C	3.8-10	-	1.69	Monoclínica	Microrods		[168]

### 1.2.7 Tejido óseo, función, estructura y propiedades.

Desde un punto de vista macroscópico, el tejido óseo se le conoce como hueso y se define como un tejido conectivo multifuncional especializado con propiedades elásticas y mecánicas [178] cuya función es proporcionar soporte estructural al cuerpo además de proteger los órganos internos mediante la resistencia al impacto [179]. El tejido óseo está en constante reparación, crecimiento y remodelación mediante mecanismos bioquímicos, biomecánicos, celulares, hormonales y patológicos con ayuda de interacciones de las células especializadas tisulares que son los osteoblastos, osteoclastos y osteocitos [180]. El tejido óseo está compuesto por un 69% de la masa total de la fase mineral, un 9% de agua y un 22% de matriz orgánica que está compuesta principalmente por colágeno (90-96%) [79].

El hueso natural es un compuesto ya que contiene proteínas de la matriz extracelular (MEC), células tisulares, factores de crecimiento, calcio mineralizado en forma de hidroxiapatita y un sistema vascular [181], es decir, una fase inorgánica combinada con un mineral que contiene grupos fosfato, calcio e hidroxilo (hidroxiapatita) y una fase orgánica compuesta principalmente por colágeno, por lo que proporciona a los huesos fuerza y flexibilidad [166].

El hueso es un material que consta de dos fases, la matriz, formada esencialmente por colágeno, y el hueso mineral que se compone de dos variantes: tejido óseo compacto (cortical), es menos activo metabólicamente pero el 80% del esqueleto está compuesto de hueso cortical y el tejido óseo esponjoso (medular) que es una red tridimensional por donde atraviesan los vasos sanguíneos y las células [87, 188]. Una de las principales características entre estas dos formas es que el hueso esponjoso tiene un módulo de Young de más bajo y es más flexible que el hueso cortical de acuerdo a los resultados reportado por Caeiro JR et al., [183], además la estructura porosa consta de tamaños de poro que van desde 200 a 500  $\mu\text{m}$ , y el hueso esponjoso representa 30% al 90% de la porosidad; es por ello que se pretende obtener una porosidad  $>50\%$  en este trabajo de investigación [184].

Es importante distinguir que la estructura tejido óseo está muy bien organizada como se observa en la Figura 1.21 [181], y tiene una compleja y variable escala jerárquica que va de una escala macro a nanométrica, juntas permiten diversas funciones mecánicas, biológicas y químicas [51] a tal punto de comprender la función de la hidroxiapatita. Entonces dentro de las siguientes estructuras encontramos la macroestructura que se ve a simple vista y es el hueso cortical y esponjoso, después, la microestructura y submicroestructura tiene un rango de 10 a 500 nm donde se observa el sistemas de Havers, osteones, laminillas, posterior sigue la nanoestructura que tiene tamaños nanométricos en donde se distingue fibrilla de colágeno y mineral incrustado, y finalmente se encuentra la subnanoestructura que está por debajo de cientos de nanómetros donde se observa estructura molecular de los elementos constitutivos, como mineral, colágeno y proteínas orgánicas no colágenas [106–108].

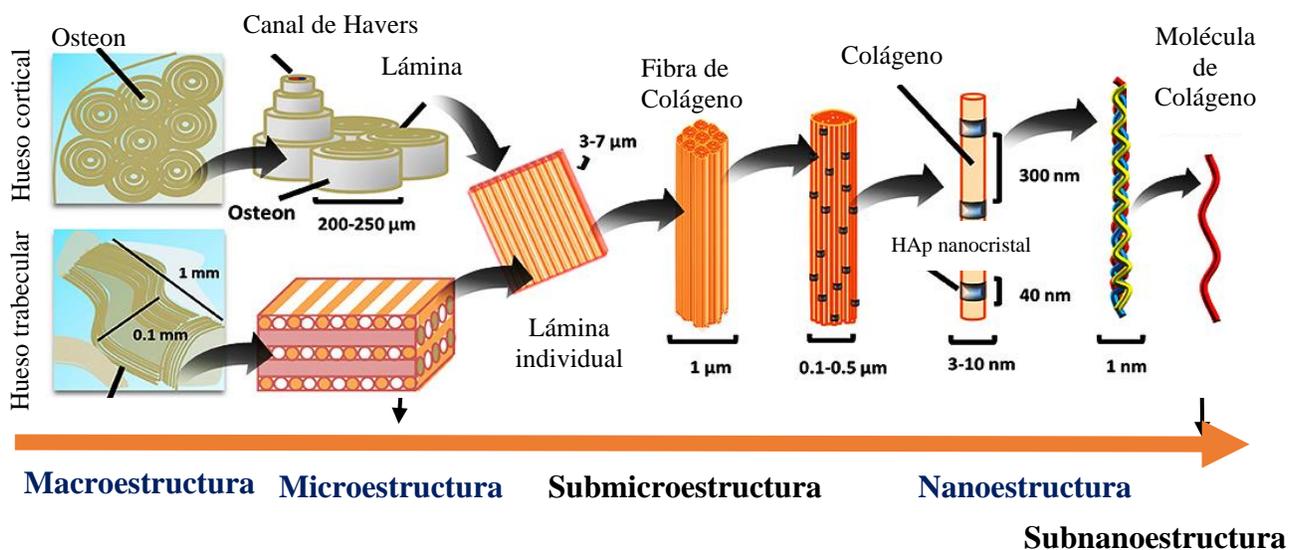


Figura 1. 21. Organización estructural jerárquica del hueso [141].

Esta estructura jerárquicamente organizada tiene una orientación irregular, lo que hace que el material del hueso sea heterogéneo y anisótropo, es decir que su resistencia varía en función de la dirección en la que se aplica la carga, o que el hueso es más frágil ante la tensión que ante la compresión según la Ley de Wolff, y la actividad muscular modifica las fuerzas que soportan los huesos [188].

El hueso tiene una estructura elástica única que cambia sus propiedades en respuesta a las tensiones que se le imponen y se regenera a través de procesos bioquímicos, biofísicos y biológicos que están interrelacionados y relacionados con las propiedades mecánicas del hueso natural, que varían con la edad [189], en la Tabla 1.12 se muestran los valores obtenidos de pruebas mecánicas realizadas con ensayos de compresión, tracción, flexión y torsión por Caeiro JR et al., es importante destacar que para conocer las propiedades mecánicas del hueso cortical o compacto, estas propiedades van a depender de la naturaleza del hueso, la variación de la edad, de la en la estructura histológica y la densidad, [126, 140].

Tabla 1.12. Tabla de propiedades mecánicas del hueso [183].

	<i>Resistencia a la compresión</i> (MPa)	<i>Resistencia a la flexión</i> (MPa)	<i>Resistencia a la tracción</i> (MPa)	<i>Modulo elástico</i> (GPa)	<i>Tenacidad a la fractura</i>	<i>Porosidad</i> (%)
<i>Hueso cortical</i>	100-150	135-193	50-151	10-20	2-12	5-10
<i>Hueso trabecular</i>	2-12	10-20	1-5	0.1-5	0.1-0.8	50-90

El tejido óseo se renueva constantemente a través de la coordinación de osteoblastos, osteoclastos y osteocitos ya que pueden sintetizar colágeno y no colágeno en la matriz orgánica del hueso, guiar la disposición de las fibrillas y promover la mineralización de la matriz extracelular, también sintetiza factores de crecimiento que organizan la formación de nuevo tejido óseo. [105, 186]. La función principal de los osteoblastos es la formación de hueso nuevo durante y en el desarrollo de la regeneración ósea y a medida que se diferencian adquieren la capacidad de secretar matriz ósea y de la regulación de los osteoclastos. El tamaño de los osteoblastos varía de 10 a 50  $\mu\text{m}$ , sin embargo, los osteoblastos para regenerar el hueso mineralizado después de la implantación requieren poros más grandes de aproximadamente 100 a 200  $\mu\text{m}$  ya que estos poros permiten que los macrófagos se infiltren, eliminen bacterias e induzcan la infiltración de otras células involucradas en la colonización, migración y vascularización in vivo, cabe señalar que cuando el tamaño de poro es  $<100 \mu\text{m}$  tiende a la formación de tejido fibroso u osteoide no mineralizado [192].

Posteriormente, los osteoclastos, se comunican entre sí y con los osteoblastos a través de amplias prolongaciones citoplasmáticas que ocupan los canalículos dentro de la matriz ósea. Tanto las células de revestimiento óseo como los osteocitos se han identificado como fuentes importantes de RANKL [193]. Y finalmente, los osteocitos son células mecanosensoriales que participan activamente en la formación ósea en donde esta red de osteocitos interaccionan en el intercambio iónico a través de la interacción célula-matriz [107].

En la Figura 1.22 se analiza que la regeneración ósea pasa por distintos fenómenos llamados mecanismos biológicos. I) La osteoinducción que es un proceso en donde las células madre se transforman en células osteogénicas para posteriormente diferenciarse en osteoblastos, este fenómeno ocurre en el momento que entra en contacto con la superficie del implante con el hueso. II) La osteogénesis solo se da cuando se realiza un autoinjerto ya que implica el trasplante y acción de elementos celulares óseas vivas de una parte del organismo a otra en donde la proliferación de estas células puede darse en dos direcciones: desde el implante y desde el tejido óseo. III) La osteoconducción permite el crecimiento óseo sobre y alrededor un injerto por ejemplo un andamio y termina con IV) La osteointegración ya es el anclaje estable de un implante y se logra mediante el contacto directo entre el hueso y el implante [194].

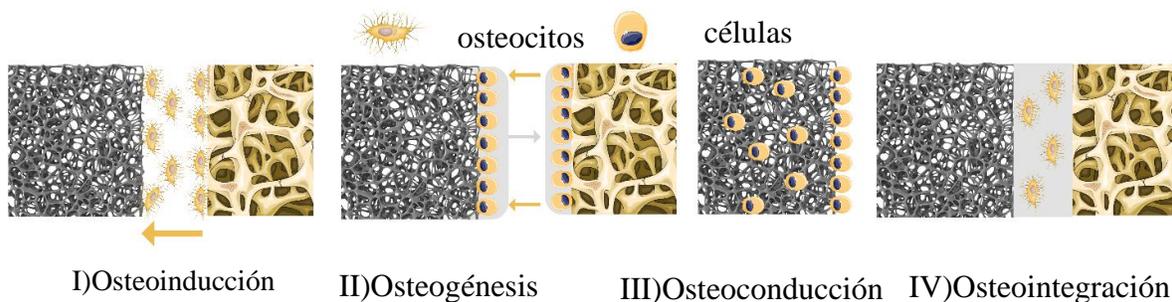


Figura 1. 22. Mecanismos biológicos en la generación ósea.

Explicando un poco mejor el proceso comienza con I) la activación, en donde una señal bioquímica es emitida por los osteoblastos detectando microfisuras, II) en la reabsorción las células de borde (osteoblastos) se encargan de segregar unas sustancias llamadas RANK- L que interaccionando con el RANK de los osteoclastos precursores permiten su diferenciación y maduración que hasta este punto formaran parte de la BMU (Basic Multicellular Unit) que son un conjunto de osteoclastos y osteoblastos. Las células de borde cambian su forma aplanada de manera que se encogen y aumentan su espesor dejando libre parte de la superficie ósea para que los osteoclastos puedan comenzar el proceso.

Posteriormente III) la inversión es la fase que da lugar a la transición de actividad entre osteoclastos y osteoblastos, este período dura unos 30 días. En la etapa de IV) la formación comienza cuando los osteoblastos se sitúan sobre la zona que se han reabsorbido secretando enzimas lisosomales, principalmente colagenasa que dirige la proteína a la matriz orgánica produciendo ácido clorhídrico (HCl) que va a disolver a la hidroxiapatita en iones de calcio  $\text{Ca}^{+2}$  y  $\text{PO}_4^{-3}$ , liberándose en el torrente sanguíneo, también ocurre una dispersión de osteocitos que quedan atrapados dentro de la matriz ósea que cuando se liberan por la disolución del hueso son fagocitados por los osteoclastos, finalmente en la V) mineralización que tiene un lapso de 10 y 20 días después de depositar el osteoide es cuando comienzan a aparecer los primeros cristales de hidroxiapatita desplazando parte del agua del osteoide. Finalmente, los osteoclastos sufren apoptosis y la BMU se detiene. Aún durante un cierto tiempo los osteoblastos seguirán rellenando las cavidades que correspondan de osteoide y luego sufrirán apoptosis, se convertirán en osteocitos o en células de borde. El osteoide depositado irá poco a poco mineralizándose aun cuando la BMU haya dejado de estar activa [202, 203]. Estas cinco fases consecutivas de crecimiento óseo y eventos celulares se esquematizan en la Figura 1.23.

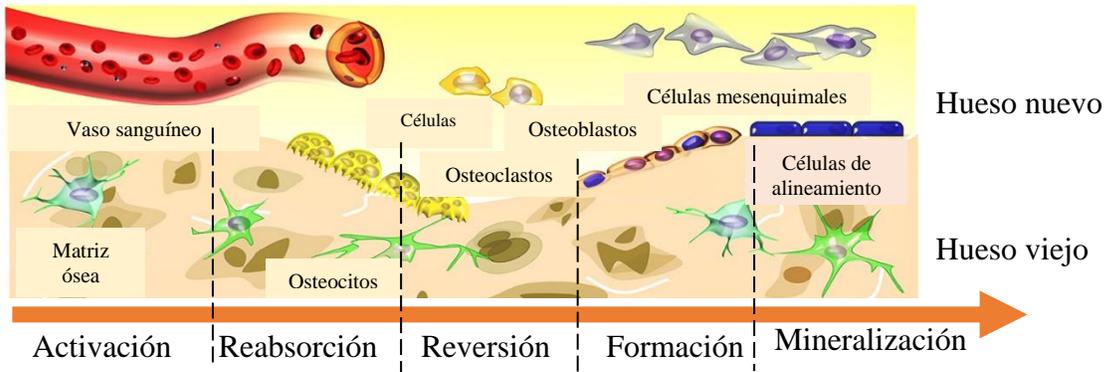
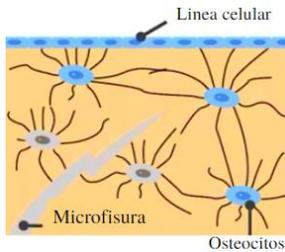


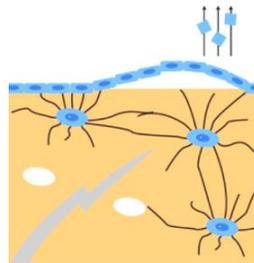
Figura 1.23. Fases del ciclo de remodelación ósea [204].

En la Figura 1.24 se observa el mecanismo celular a mayor detalle en la fase de microdaño de señalización, activación y reclutamiento de preosteoblastos así mismo de observa el mecanismo celular de la reversión y formación de tejido nuevo.

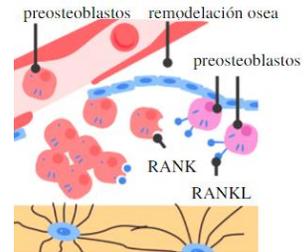
Microdaño de señalización



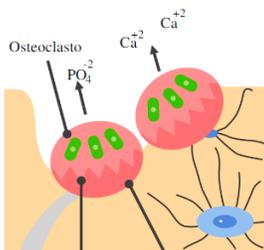
Activación



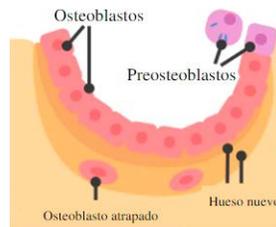
Reclutamiento de preosteoblastos



Reabsorción



Reversión



Formación

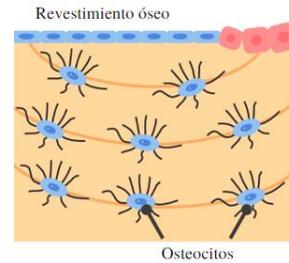


Figura 1.24. Mecanismo celular en las fases de la remodelación ósea [197].

### 1.2.8 Ensayos in vitro de citotoxicidad

Antes de utilizar cualquier material biocompatible, se realizan estudios de citotoxicidad in vitro para observar sus efectos con las líneas celulares. Estas pruebas tienen como objetivo medir la cantidad de células vivas presentes y, al mismo tiempo, considerar los cambios morfológicos y la muerte celular en éste. Las pruebas ideales deberían ser eficientes, rápidas, seguras y sencillas de realizar sin interferir con el material que se está evaluando, cabe señalar que la mayoría de los ensayos de citotoxicidad se basan en sistemas de tinción destructivos. [81].

El cumplimiento estricto de las normas ISO es esencial cuando se realizan pruebas in vitro para evaluar la citotoxicidad. Estas pruebas emplean metodologías de biología celular y molecular cuidadosamente controladas para garantizar que el sistema acepte completamente el biomaterial que se está estudiando. Por ejemplo, la norma ISO 10993 establece las reglas de biocompatibilidad de los biomateriales y brinda información sobre el impacto de las líneas celulares en un escenario in vitro dentro de un proceso de gestión de riesgos como los cambios en el dispositivo médico a lo largo del tiempo. En general la norma ISO 10993-1 proporciona los principios generales para probar la biocompatibilidad de los dispositivos médicos sanitarios, así mismo en la norma ISO 10993-5:2009 describe los métodos de prueba para evaluar la citotoxicidad in vitro los dispositivos médicos, además de acuerdo con este norma se evalúan biológicamente y rige que una disminución de la viabilidad celular superior al 30 % indica la presencia de efectos citotóxicos [204, 205].

La evaluación de la toxicidad de un material compuesto para varios tipos de células se puede realizar utilizando ensayos de citotoxicidad, como el ensayo MTT (nombre IUPAC: 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolio) que es un ensayo de viabilidad celular que ha sido modificado por varios investigadores desde que Mosmann Tim lo desarrolló por primera vez en 1983 [200]. El MTT es un colorante de tetrazolio soluble en agua de color amarillo que las células vivas reducen a un producto de formazán púrpura (insoluble en solución acuosa); una vez disuelto en un disolvente adecuado, la cantidad de MTT-formazán producido puede medirse espectrofotométricamente. La metodología se esquematiza en la Figura 1.25.

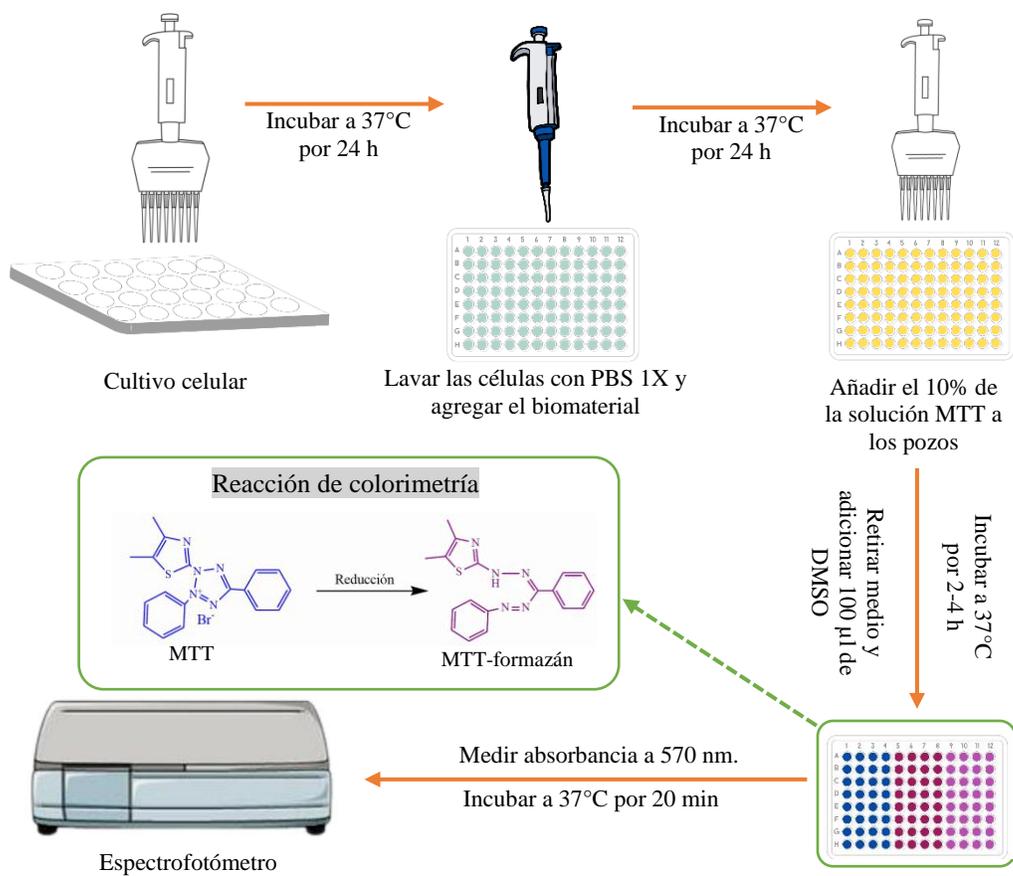


Figura 1.25. Representación esquemática de la metodología con el agente MTT [208].

Una desventaja de este ensayo es que no distingue entre los efectos citotóxicos (muerte celular) y citostáticos (tasa de crecimiento reducida), pero la principal ventaja de este ensayo es que requiere menos células en comparación con el Alamar blue [207, 208, 209].

Alamar blue es otra técnica disponible desde 1933, es un indicador de oxidación-reducción (redox) sensible que emite fluorescencia y monitorea como cambia de color al reducirse por las células vivas [210, 220], se utiliza un principio activo que es la resazurina (nombre IUPAC: 7-hidroxi-10-oxidofenoxazin-10-ium-3-ona), comúnmente conocido como diazo-resorcinol, azoresorcina, resazoína, resazurina, que es hidrosoluble, estable en medio de cultivo, no es tóxico y es permeable a través de las membranas celulares; de esta forma permite un control y seguimiento continuo de las células en cultivo. Este activo se evaluó por primera vez para la contaminación bacteriana o por levaduras en la leche por Pesch y Simmert en 1929.

El ensayo Alamar Blue se caracteriza por ser más simple, rápido y sensible ya que proporciona mediciones precisas del transcurso del tiempo, no es tóxico para las células porque no se mueren y esas células se pueden reutilizar para un próximo estudio, es seguro para el usuario y el medio ambiente en comparación con el ensayo MTT [206]. La metodología que sigue el ensayo Alamar blue se muestra gráficamente en la Figura 1.26.

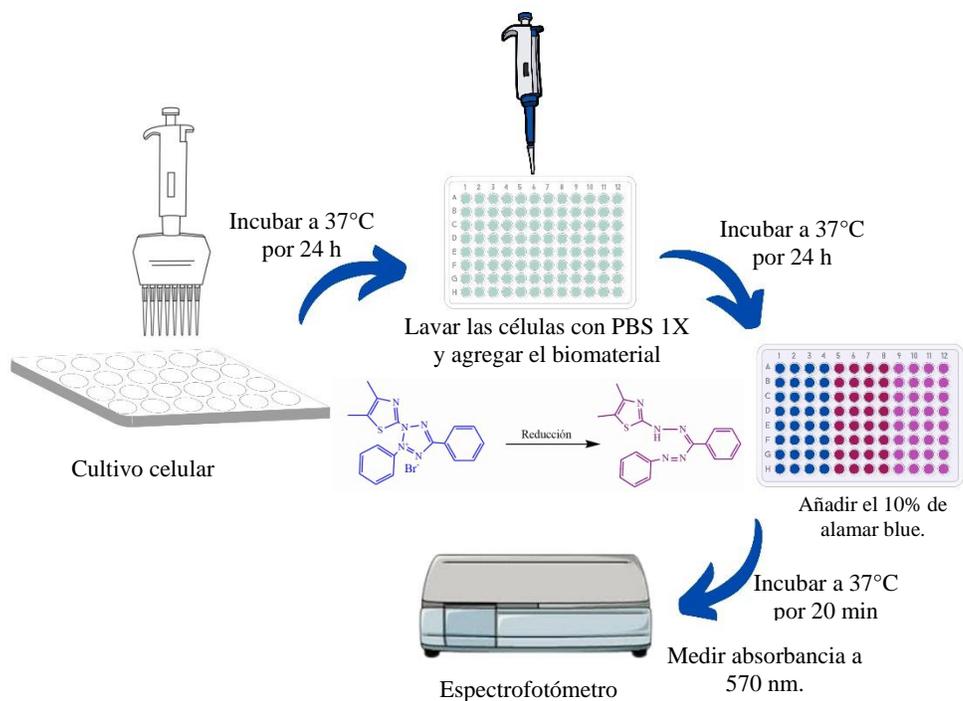


Figura 1.26. Metodología esquemática de Alamar blue.



Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo

## CAPÍTULO II: METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

En el presente capítulo se muestra la metodología experimental.

Primero se sintetizó hidroxiapatita (HAp) por el método hidrotermal a  $200^{\circ}\text{C}$  y un pH de 7.

Segundo, se desarrollaron andamios por el método gel-casting variando la composición del material compuesto PLGA/HAp

Tercero, se evaluó el porcentaje de hinchamiento mediante ensayos de absorción y pérdida de área porcentual.

Cuarto, se realizaron pruebas de citotoxicidad, viabilidad, adhesión y proliferación celular por la técnica alamar blue con células madre de pulpa dental humana.



## 2.1 Desarrollo metodológico

En la Figura 2.1 se resume de manera general el desarrollo metodológico utilizado en este trabajo de investigación.

Primero se realizó la síntesis de hidroxiapatita por el método hidrotermal controlando parámetros de síntesis como la temperatura, presión y pH con el fin de obtener hidroxiapatita cristalina.

Posteriormente, por el método gel casting se desarrollaron andamios compuestos del PLGA incorporando HAp con el fin de formar un biocompuesto. Aquí se varió la composición en relación con el peso de la matriz y el reforzante, agregando un agente porógeno; citrato de sodio.

Consecutivamente se prepararon las muestras para su caracterizaron mediante DRX, FT-IR, RAMAN, MEB con el fin de conocer la estructura, su cristalinidad, los grupos funcionales, su interacción y la morfología del andamio.

Finalmente se realizaron pruebas biológicas como el ensayo de hinchamiento y la evaluación citotóxica por Alamar blue utilizando células madre troncales para analizar la fluorescencia, absorbancia y el porcentaje de viabilidad o crecimiento celular sobre el andamio.

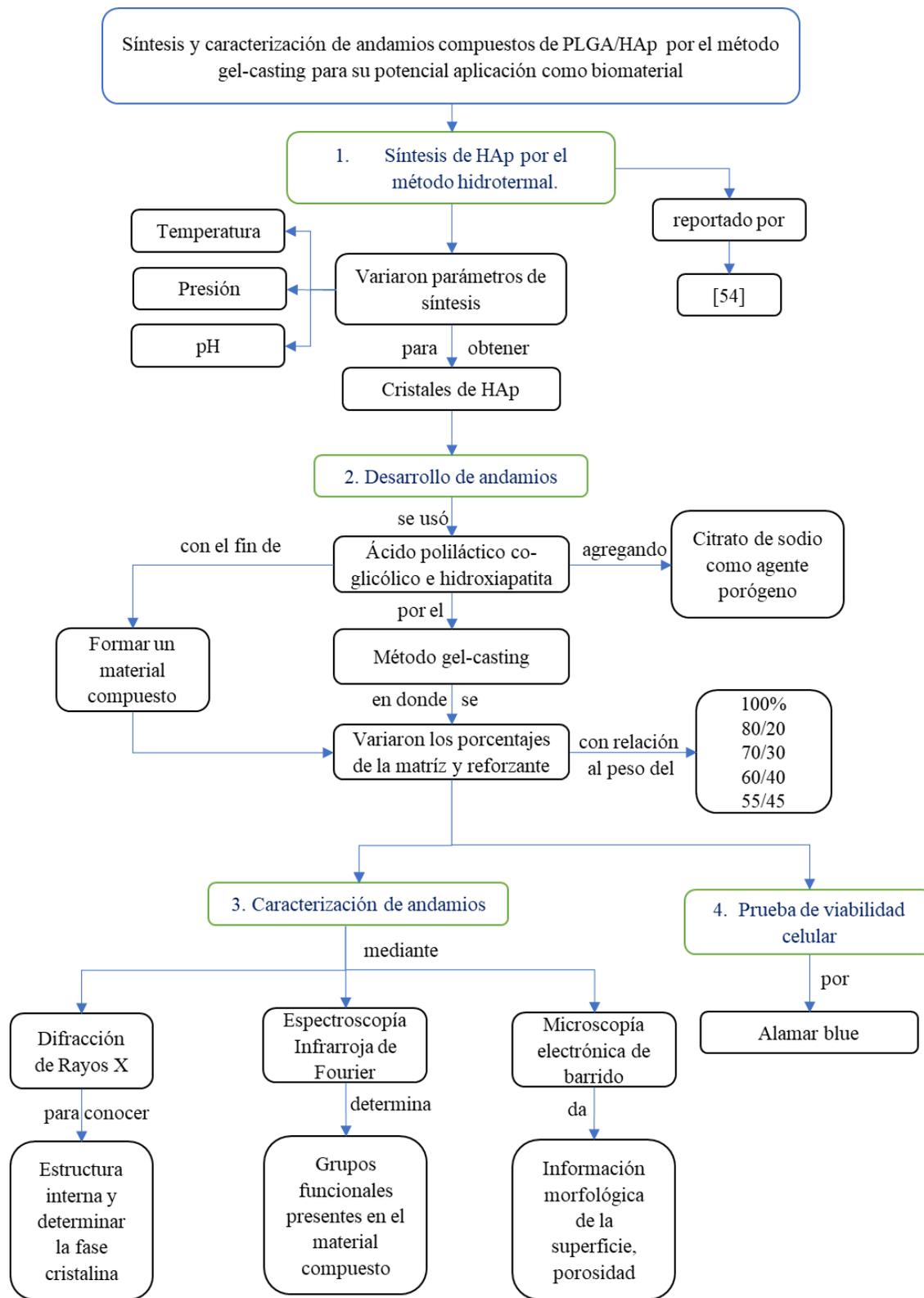
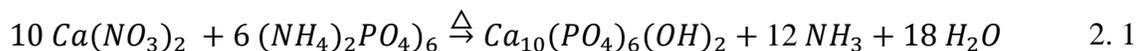


Figura 2. 1. Etapas para el desarrollo de andamios.

## 2.2 Síntesis de HAp

Para la formación de HAp, ver Figura 2.2 se realiza como lo reporta López-Ortíz et al., [54], que se representa en la siguiente ecuación 2.1:



La síntesis se llevó a cabo a partir de los precursores: hidróxido de calcio  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  marca Sigma Aldrich (98%) y fosfato de amonio dibásico  $(\text{NH}_4)_2\text{PO}_4$  marca Meyer (98.5%). Para ajustar el pH se empleó ácido nítrico ( $\text{NH}_3$ , 2M) marca Meyer. Primero, se pesó 4.98 g de hidróxido de calcio  $\text{CaOH}_2$  y 12.33 g fosfato de amonio dibásico  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  después se disolvieron en 30 mL de agua en desionizada por separado las dos soluciones y se mantuvieron en agitación constante a 250 rpm por 10 minutos; ver Figura 2.2 a). Segundo, se adicionó gota a gota la solución de hidróxido de calcio a la solución de Fosfato de amonio dibásico  $[(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4]$  manteniéndolo en agitación constante para obtener una solución homogénea, ver Figura 2.2 b). Tercero, con ayuda de un pHmetro digital se midió el pH obteniendo un valor de 9.6, entonces, se ajustó a 7 (ya que el cuerpo humano tiende a estar en ese valor), adicionando gota a gota 67 mL de ácido nítrico  $\text{HNO}_3$  2M previamente preparada; ver Figura 2.2 c). Cuarto, la solución se lleva a una autoclave a 200°C por 24 h; ver Figura 2.2 d). Quinto, se retiró la solución de la autoclave, y se dejó en reposo para que las partículas se sedimenten y se realizaron 6 ciclos de lavados con agua desionizada por decantación. Sexto, llevamos la solución a una estufa a 80°C por 12 h; ver Figura 2.2 e). Y finalmente, para la obtención de polvos se llevaron a calcinación en una mufla a 500°C por 3 h para eliminar subproductos que se puedan formar, ver Figura 2.2 f) y g).

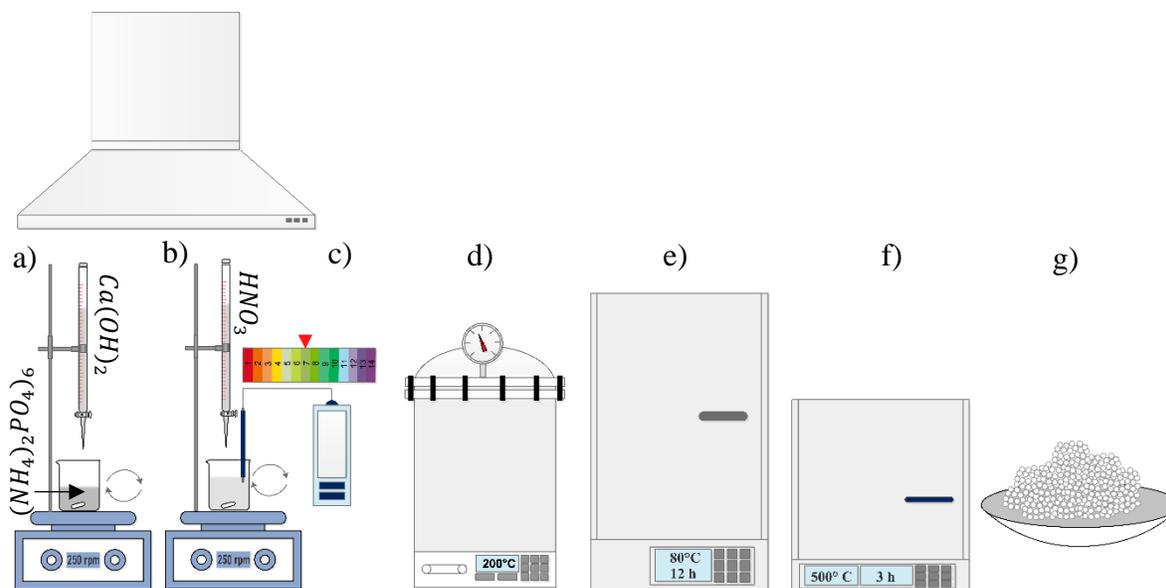


Figura 2. 2. Síntesis de cristales de hidroxiapatita por el método hidrotermal a pH 7.

### 2.3 Desarrollo de andamios de PLGA/HAp

La formación de andamios compuestos de PLGA/HAp se representa en la Figura 2.3, se utilizaron como precursores el Ácido poli láctico-co-glicólico PLGA 50:50, Cloroformo anhídrido ( $HCl_3$ ) como disolvente, como agente porógeno el citrato de sodio anhídrido ( $Na_3C_6H_5O_7$ ), todos Marca Sigma Aldrich y la HAp obtenida por la técnica hidrotermal descrita anteriormente.

Mediante la técnica gel-casting, se obtuvieron cinco muestras de andamios compuestos con diferente composición en relación con el peso de la matriz polimérica PLGA y el reforzante cerámico HAp.

Primero se esterilizaron los materiales de laboratorio a utilizar, y se trabajó bajo campana de extracción para evitar la contaminación por bacterias del medio.

Después, se pesaron los reactivos de las diferentes composiciones en relación con el peso con ayuda de una balanza digital agregando el 15% de citrato de sodio. En la Tabla 2.1 se muestra la cantidad en gramos para cada composición.

Tabla 2. 1. Composición para cada muestra de andamio.

Peso		Agente porógeno	Etiquetado
PLGA (g)	HAp (g)		
0.1008	-	15%	M1 (M 100%)
-	0.1002		M2 (R 100%)
0.0801	0.0204		M3 (80%, 20%)
0.0702	0.0303		M4 (70%, 30%)
0.0605	0.0408		M5 (60%, 40%)
0.0552	0.0457		M6 (55%, 45%)

La cantidad de agente porógeno, citrato de sodio se estableció de acuerdo con la literatura ya que se ha reportado que se ha utilizado el 1%, 1.5%, 30%, 70% a estos dos últimos valores la fragilidad aumentaba en los andamios [136, 222–225] con relación al peso del andamio, así que una vez pesada las muestras con los valores en gramos de la Tabla anterior, se colocaron en compartimentos separados para empezar la síntesis.

Por consiguiente, el PLGA se disolvió en 10 ml de cloroformo a 250 rpm por 1 hora, ver Figura 2.3 a) y aparte la HAp y el 15% de agente porógeno se disolvieron en 10 ml de cloroformo a 250 rpm por 60 min, ver figura 2.3 b); después la solución de HAp se adicionó a la solución polimérica para poder recubrir las partículas cerámicas y se dejó nuevamente en agitación por 30 minutos hasta obtener una solución uniforme y una consistencia en gel, ver Figura 2.3 c). Posterior a eso se realiza el vaciado en un molde de acero inoxidable con compartimentos circulares de 0.5 mm de diámetro por 0.3 mm de altura (medidas estándar de acuerdo con la norma ISO 10993-5 para las pruebas de viabilidad) que se dejó en reposo por 24 horas a temperatura ambiente para que el solvente se evapore cubriéndolo con Parafilm, ver Figura 2.3 d). Seguidamente, los andamios se desmoldaron con mucha precaución bajo campana con pinzas previamente esterilizadas. Más adelante, se realizó un lavado dentro de un cristalizador adicionando agua desionizada donde se sumergieron cada una de las muestras por 5 días, cambiando el agua desionizada cada 24 horas para eliminar la sal y excesos o residuos presentes en las muestras; ver Figura 2.3 e). Finalmente, se agregaron los andamios

en una caja Petri, se llevó a un secado a 35°C durante 12 h y se prepararon las muestras para su posterior caracterización; ver Figura 2.3 f) y g).

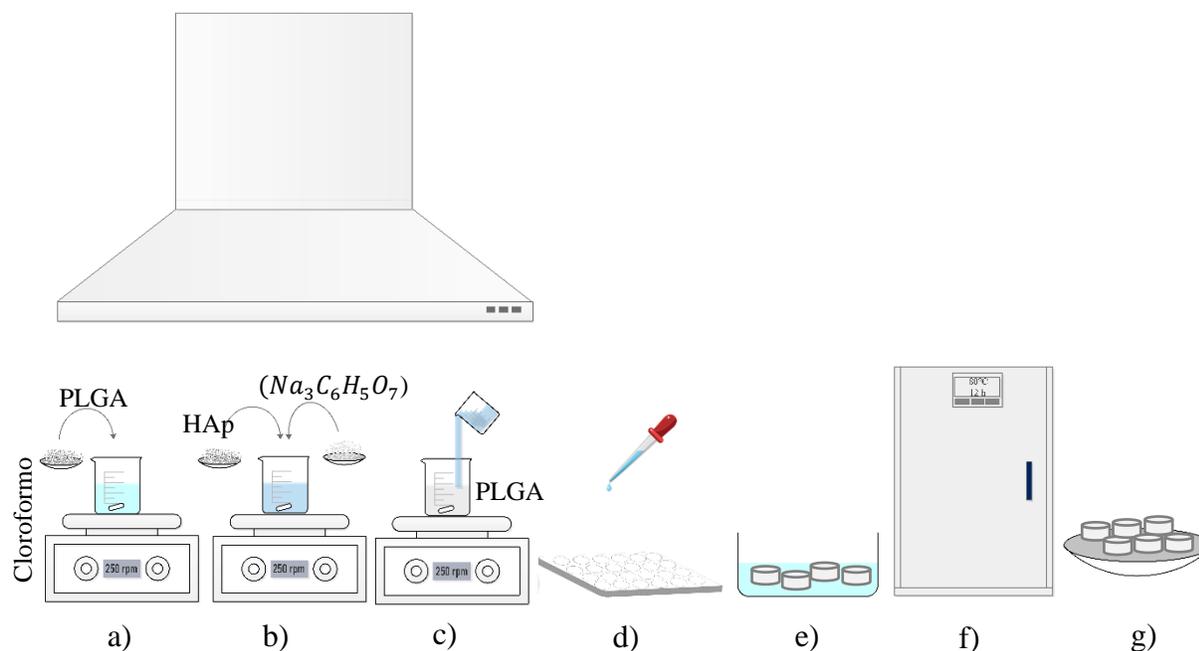


Figura 2. 3. Síntesis de andamios porosos por el método gel casting.

#### 2.4 Ensayo de hinchamiento

Para la evaluación del porcentaje de absorción de agua se realizó un método gravimétrico convencional, y se evaluó sumergiendo los andamios en una solución de PBS (Solución salina tamponada con fosfato) para simular el fluido fisiológico corporal a 3, 6 y 9 días, se siguieron los siguientes pasos y se esquematizan en la Figura 2.4.

- Se prepararon por triplicado las muestras identificadas como: M1 (M 100%), M2 (R 100%), M3 (80%,20%), M4 (70%, 30%), M5 (60%, 40%), M6 (55%, 45%) y se registraron los pesos en seco de las muestras.
- La pastilla de PBS se llevó a una agitación constante de 250 rpm por 60 minutos.
- Cada una de las muestras se colocaron en una placa agregando 3 mL de PBS pH 7 y se conservaron en una incubadora conservándolas a una temperatura de 37 °C.
- Los andamios se retiraron de la solución de PBS retirando el exceso con un papel filtro para finalmente registrar su peso, realizando mediciones de hinchamiento a 3,

6 y 9 días. Para cada muestra se midió un mínimo de tres réplicas de cada composición y se promediaron los resultados.

Se registró el peso en húmedo y mediante la ecuación 2.2 se calculó el porcentaje de hinchamiento.

$$\% \text{ hinchamiento} = \frac{\text{peso húmedo} - \text{peso seco}}{\text{peso seco}} \times 100 \quad 2.2$$

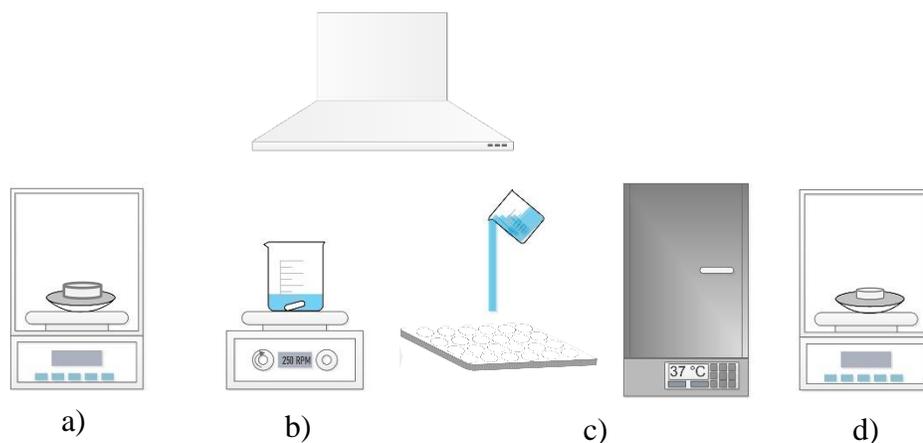


Figura 2. 4. Metodología para el ensayo de hinchamiento a 3, 6 y 9 días.

### 2.5 Prueba de in vitro de citotoxicidad por Alamar blue

Para la evaluación de viabilidad celular se determinó mediante un ensayo celular calorimétrico Alamar blue<sup>TM</sup> [211], ya que este ensayo no produce la muerte celular, se utilizaron 5 muestras para cada composición de 55/45 y 80/20 de andamios de PLGA/HAp, utilizando un total de 30 andamios; para este estudio se utilizaron células madre de pulpa dental humana obtenidas como lo reporta [212], estas células son buena fuente para la regeneración de tejido óseo.

Se trabajó todo el tiempo bajo una cabina de seguridad biológica marca Telstar Bio II advance EN-12469-2000, ver Figura 2.5 a), b) una estufa de cultivo marca Binder, y c) una centrifugadora marca Sigma.

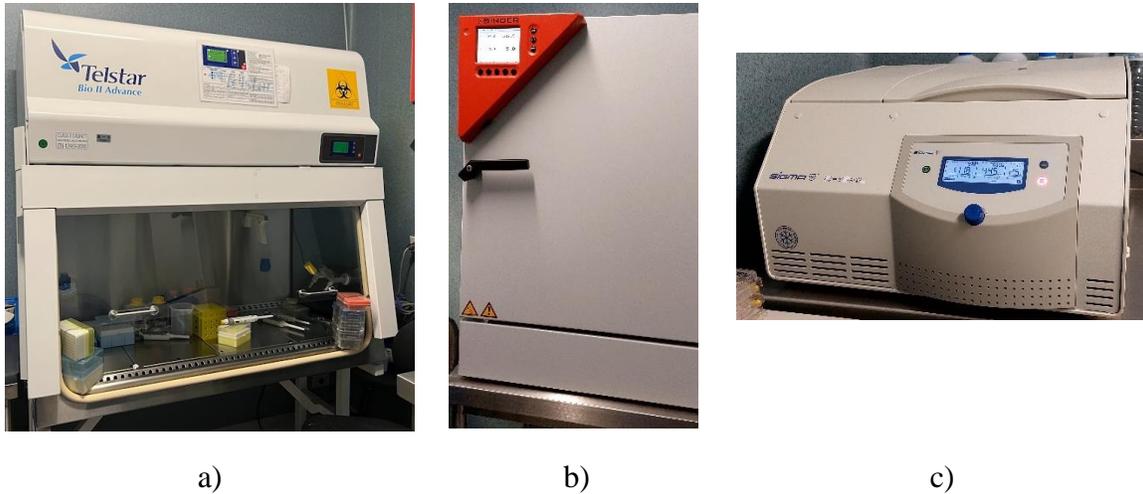


Figura 2. 5. a) Cabina de seguridad microbológica Telstar. b) Estufa de cultivo Binder y c) Centrífuga

Primero se realizó la esterilización de andamios sumergiéndolos en etanol al 70% por 1 h, luego los andamios se colocaron en cajas Petri y se irradiaron en luz UV bajo la campana de extracción durante 20 minutos por cada lado, después se guardan los andamios en portamuestras previamente esterilizadas.

Segundo, las células que estaban resguardadas en una caja de 25 cm<sup>3</sup> fueron sacadas de la incubadora, se lavaron con 3 mL de PBS 1X y las células adheridas en la pared de la caja se retiraron con 3 mL de TryPLE-Express. (Relación 1:1), ver Figura 2.6 a). Posteriormente se pasó a un tubo de cultivo celular adicionando 3 mL de DMEM con un 10% de suero fetal bovino y un 1% de penicilina-estreptomina para después centrifugar a 200 rpm por 5 minutos a una temperatura relativa de 20-25°C. Ya centrifugadas se observó la separación de las células con el medio, ver Figura 2.6 b), el medio se extrajo con una micropipeta, ver Figura 2.6 c), para solo dejar el botón de células, ver Figura 2.6 d), y por último se agregó 1 mL de DMEM al 10% para disolver las células y se lleva a incubación a 37° C, con una humedad del 90% y una atmósfera del 5% de CO<sub>2</sub> por 24 horas.

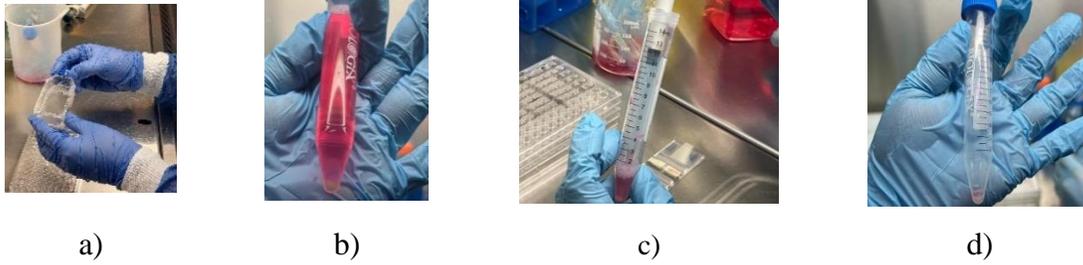


Figura 2. 6. a) Lavado de células, b) medio centrifugado, c) medio retirado y d) Botón de células.

Tercero, para llevar el conteo celular por microlitro se agregó 10  $\mu\text{L}$  de la solución final preparada de la figura 2.6 d) cuidadosamente con una micropipeta en la cámara de Neubauer como se observa en la Figura 2.7 a), para realizar el conteo se ocupó un contador análogo bajo un microscopio óptico, ver Figura 2.7 b).

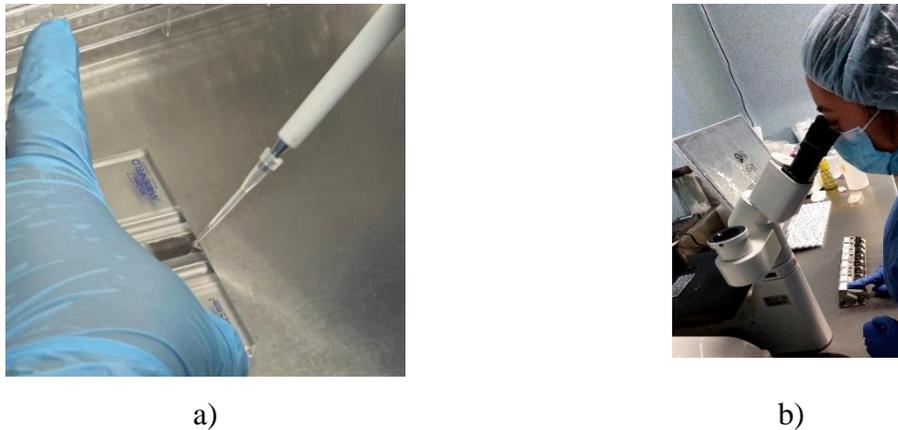


Figura 2. 7. a) Adición de 10  $\mu\text{L}$  de solución en la cámara Neubauer, b) Conteo celular bajo microscopio óptico con ayuda de contador análogo.

La cámara Neubauer, ver Figura 2.8 a) tiene subdivisiones con nueve cuadrantes de los cuales solo se ocuparán 4 cuadrantes. Hay cuatro áreas de conteo celular marcadas en color rojo en la Figura 2.8 b). Existen dos criterios de conteo, como se observa en la Figura 2.8 c) la primera es el orden en que se van a contar marcado con la flecha negra y segundo que células se deben de contar marcado en color azul las células dentro del régimen, mientras que las células que están en color rojo no se contarán.

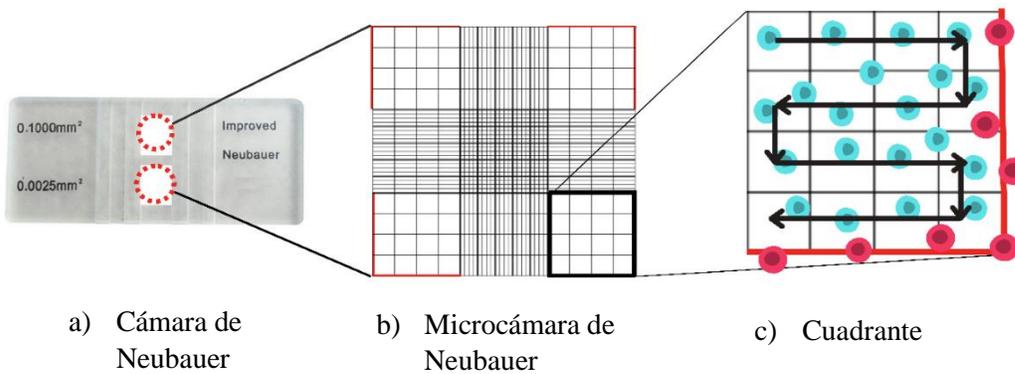


Figura 2. 8. Cámara de Neubauer.

En la Tabla 2.2 Se observan el total de células para cada cuadrante obteniendo un número total de 288 células por microlitro.

Tabla 2. 2. Resultados del conteo celular.

<i>Cuadrante 1</i>	<i>Cuadrante 2</i>	<i>Cuadrante 3</i>	<i>Cuadrante 4</i>
66	67	87	68
<i>Número total de células: 288</i>			

Entonces, para saber el número de células por  $\mu\text{L}$  se hace un cálculo con la ecuación 2.3

$$\text{num de células por } \mu\text{L} = \frac{\text{número de células totales} \times 10\,000}{4} \quad 2.3$$

Sustituyendo los valores de la fórmula anterior, ver ecuación 2.4 :

$$\text{num de células por } \mu\text{L} = \frac{288 \times 10\,000}{4} = 720\,000 \text{ células} \quad 2.4$$

Se hace una regla de 3 para conocer la cantidad de  $\mu\text{L}$  para agregar a cada pozo en el cultivo.

$$\begin{array}{l} 1\,000 \mu\text{L} - 720\,000 \text{ células} \\ x - 10\,000 \text{ células} \end{array}$$

Donde  $x = 13.88 \mu\text{L}$  entonces se agregó  $14 \mu\text{L}$  por pozo para el sembrado de células.

Cuarto, para el sembrado celular los andamios se agregaron directamente en la placa de 96 pozos, ver Figura 2.9 y se acomodaron como se muestra en el siguiente esquema de la Figura 2.10 adicionando  $14 \mu\text{L}$  en cada pozo para analizar el crecimiento celular a 3, 7 y 10 días. Se dejó un control como base agregarle andamios indicándolo con una letra “C”.



Pasada las 4 horas se transfirió el material a una nueva placa, ver Figura 2.12 a) y se adicionó el 10% de solución de Alamar blue marca Sigma Aldrich (trabajando sin luz), ver Figura 2.12 b), devolviendo la placa a la incubadora por 4 horas envuelto en aluminio.



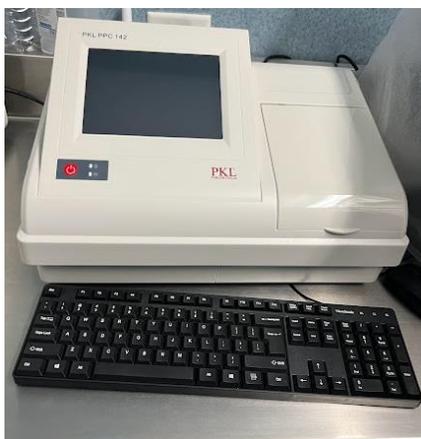
a)



c)

Figura 2. 12. a) Traspaso de a una nueva placa y b) Agregando Alamar blue,

Y quinto, la viabilidad celular se midió a 3, 7 y 10 días mediante lecturas de absorbancia a 570 nm en un lector multimodal Cytation 3 (BioTek), ver Figura 2.13 a) y b).



a)



b)

Figura 2. 13. a) lector multimodal Cytation 3 (BioTek) y b) Lectura de absorbancia a 570 nm de longitud de onda.

## 2.6 Equipos utilizados para la caracterización de muestras

Los equipos utilizados para caracterizar las muestras fueron los siguientes:

- Para identificar las fases presentes en la hidroxiapatita, PLGA y del sistema PLGA/HAp se utilizó la técnica de Difracción de rayos X usando un difractómetro de la marca Bruker modelo Discover D8, ver Figura 2.14, con una radiación  $\text{CuK}\alpha$  de 1.54 Å.



Figura 2. 14. Difractómetro para DRX.

- Para identificar las bandas de absorción y confirmar la presencia de grupos funcionales de la estructura de los precursores y de los andamios compuesto se caracterizó mediante Espectroscopia Infrarroja por Transformada de Fourier utilizando un equipo Perkin Elmer Spectrum 2, ver Figura 2.15; en un rango entre 400 y 4000  $\text{cm}^{-1}$  haciendo una molienda del andamio y se utilizó microgramos de la cada muestra los cuales fueron mezclados con bromuro de potasio seco para formar una pastilla por compresión.



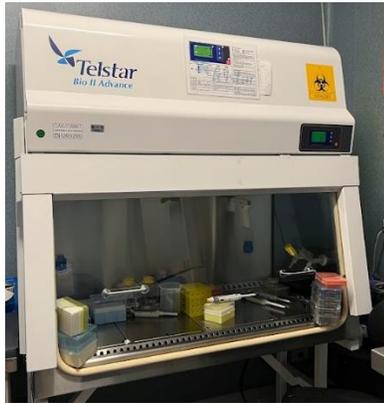
Figura 2. 15. Espectrómetro infrarrojo.

- Para analizar la morfología estructural y superficial de los andamios se caracterizó mediante Microscopía Electrónica de Barrido utilizando un equipo de la marca JEOL modelo JSM-5900LV, ver Figura 2.16; con un haz de electrones de 20 KeV.



Figura 2. 16. Microscopio Electrónico de Barrido.

- Para las pruebas de viabilidad celular se trabajó bajo una cabina de seguridad biológica ver Figura 2.17 a) marca Telstar Bio II advance EN-12469-2000; ver Figura 2.17 b) una estufa de cultivo marca Binder; ver Figura 2.17 c) una centrifugadora marca Sigma y finalmente se hizo la lectura en un lector multimodal Cytation 3 (BioTek), ver figura 2.17 d).



a)



b)



c)

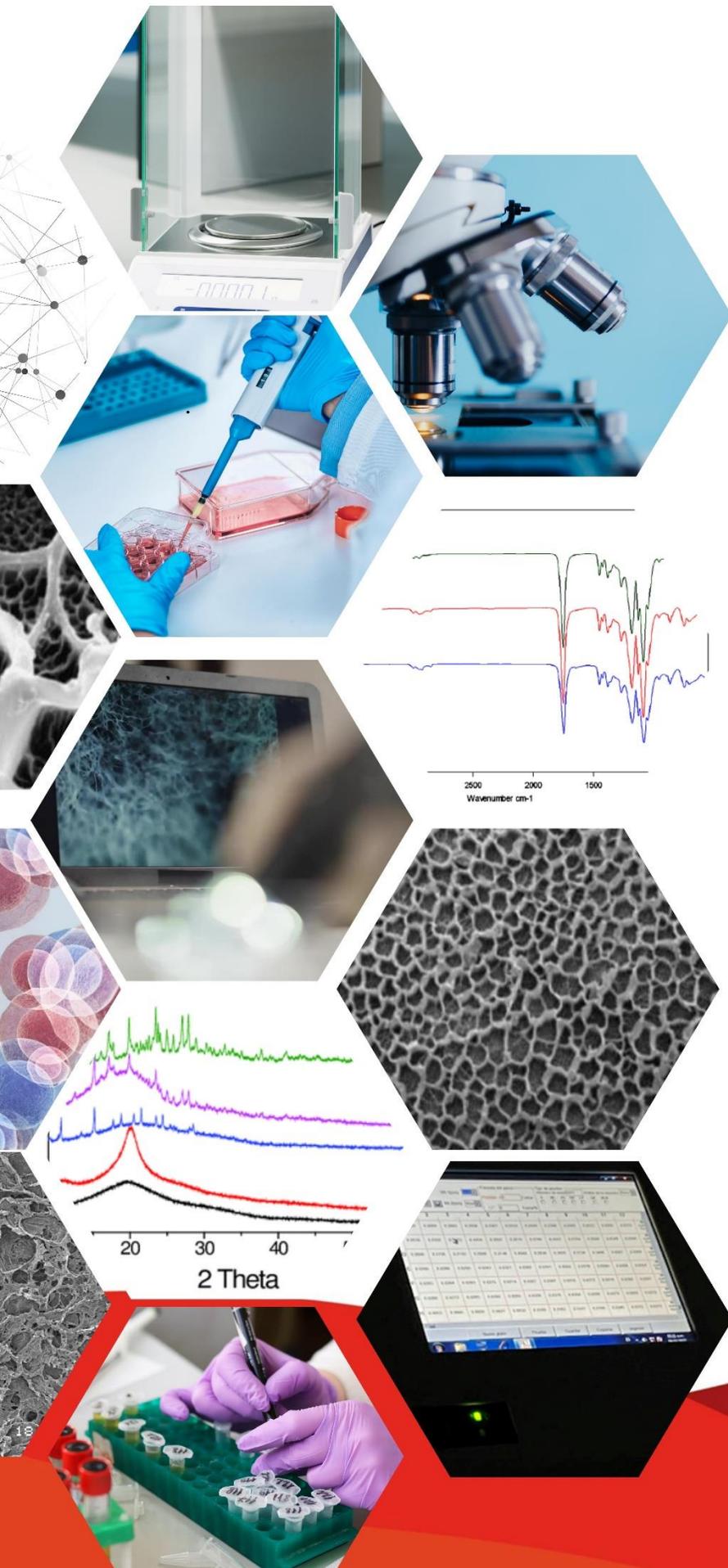


d)

Figura 2. 17. Equipos utilizados para los estudios invitro de viabilidad celular. a) Cabina de seguridad, b) estufa de cultivo, c) centrifugadora y d) Lector multimodal.

### CAPITULO III: RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En este capítulo se presentan los resultados obtenidos de la caracterización por diferentes técnicas para el análisis del comportamiento, la morfología, composición química de los andamios compuestos de PLGA/HAp desarrollados por el método gel-casting, así como el comportamiento celular del biomaterial. De igual forma se incluye la discusión de resultados que determinó la aportación de esta investigación.



### 3.1 Difracción de Rayos X

La hidroxiapatita obtenida por el método hidrotermal se caracterizó por difracción de rayos X, en la Figura 3.1 se observa el difractograma correspondiente a la fase hexagonal señalando las principales reflexiones en  $10.84^\circ$ ,  $25.87^\circ$ ,  $28.94^\circ$ ,  $31.79^\circ$ ,  $32.20^\circ$ ,  $32.92^\circ$ ,  $34.07^\circ$ ,  $39.83^\circ$ ,  $43.88^\circ$ ,  $45.76^\circ$ ,  $48.11^\circ$ ,  $49.50^\circ$ ,  $53.22^\circ$ ,  $64.01^\circ$  a  $2\theta$  asociados con los planos identificados a (100), (002), (210), (211), (112), (300), (202), (130), (113), (222), (132), (213), (004), (304), respectivamente, según el patrón de difracción de la tarjeta PDF-86-1199 de la ICDD (International Centre for Diffraction Data).

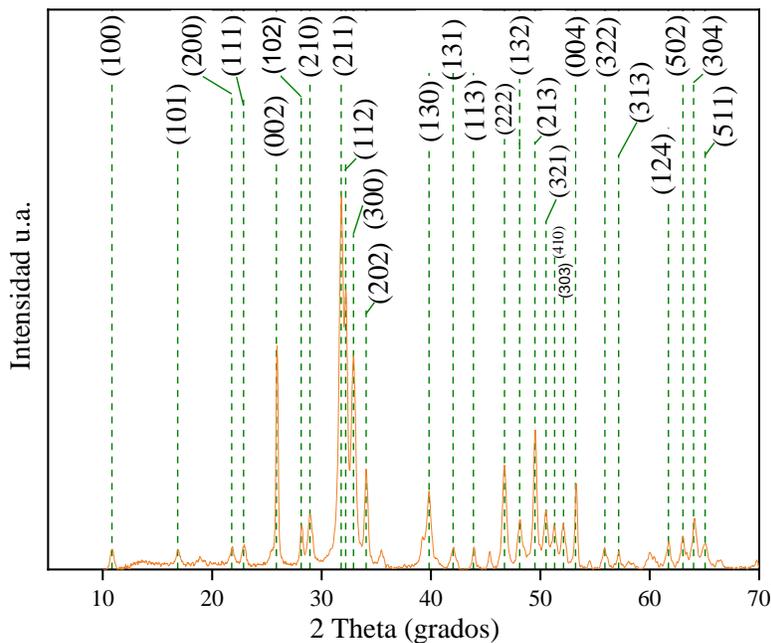


Figura 3. 1. Patrones de difracción de la hidroxiapatita en fase hexagonal.

Mientras que en la Figura 3.2 se destacan los picos principales para la fase monoclinica con ángulos en  $10.83^\circ$ ,  $25.87^\circ$ ,  $39.80^\circ$ ,  $46.69^\circ$ ,  $49.48^\circ$ ,  $53.20^\circ$  y  $64.16^\circ$  correspondientes a los planos (020), (002), (-420), (242), (-343), (004) y (343) para  $2\theta$ , de acuerdo los patrones de difracción de la tarjeta PDF-76-0694 de la ICDD (International Centre for Diffraction Data).

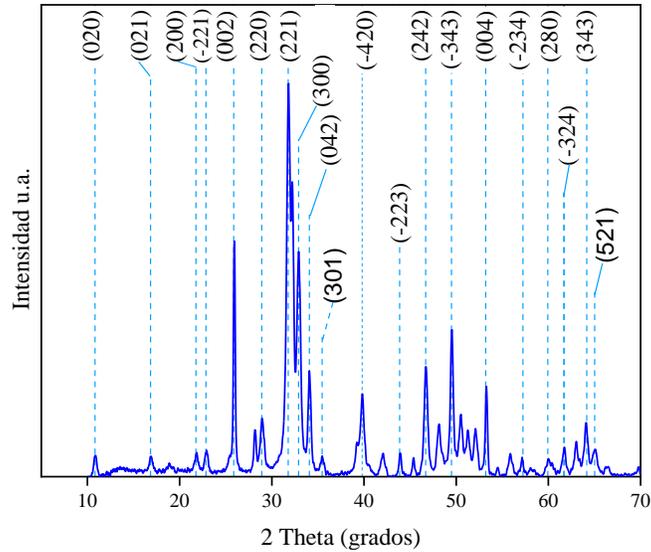


Figura 3. 2. Patrones de difracción de la hidroxiapatita para la fase monoclinica.

En la Figura 3.3 se observan los picos característicos de los espectros correspondiente a PLGA y también se observa la presencia de HAp en 25. 87°, 31. 79°, 32. 20°, 32.92 ° en los andamios; en el patrón DRX para los andamios compuestos no existió un pico distinto a los picos principales de los precursores lo que resultará benéfico en las propiedades mecánicas y acelerará la hidrólisis del enlace éster del PLGA.

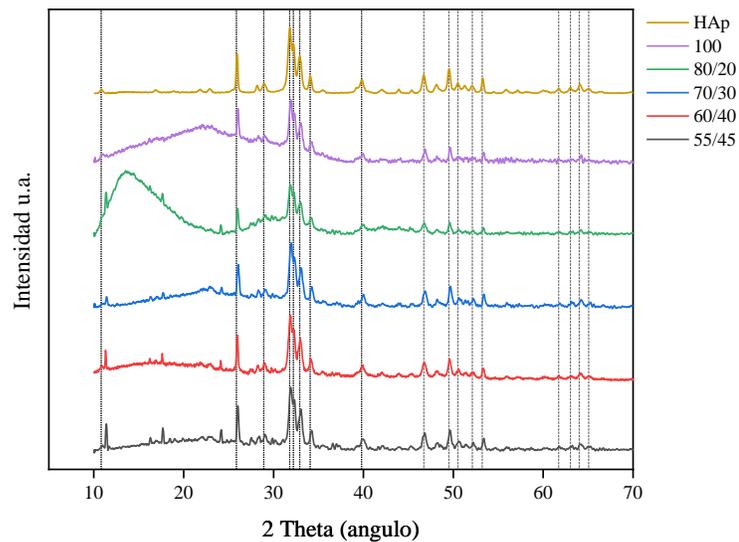


Figura 3. 3. DRX para los andamios a diferente composición (100, 80/20, 70/30, 60/40 y 55/45).

### 3.2 Tamaño de cristalito promedio de la hidroxiapatita

La ecuación 3.1 de Paul Scherrer es una herramienta utilizada para calcular el tamaño de cristalito; esta ecuación es una aproximación que tiene en cuenta la función de forma ( $\kappa$ ), la longitud de onda ( $\lambda$ ) y la integración del ancho medio del pico experimental ( $\beta$ ), así como el ángulo de incidencia ( $\theta$ ) para determinar el tamaño promedio de los cristalitos ( $D$ ).

$$D = \frac{\kappa\lambda}{\beta\cos\theta} \quad 3.1$$

La ecuación 3.2 ofrece un enfoque novedoso para usar la ecuación de Scherrer al minimizar las fuentes de errores a través de una técnica de mínimos cuadrados que fue presentada por A. Monshi, M. R. Foroughi y M. R. Monshi en 2012 [213].

$$L = \frac{\kappa\lambda}{e^b} \quad 3.2$$

En donde ( $\kappa$ ) y ( $\lambda$ ) toman valores constantes de 0.89 y 0.15405 nm ( $\text{CuK}\alpha 1$ ), respectivamente, el valor de  $b$  se obtiene mediante la intersección de una regresión lineal de mínimos cuadrados graficando  $\ln\left(\frac{1}{\cos\theta}\right)$  obteniendo el valor de  $L$ . En la Figura 3.4 se señalaron los 9 picos principales por encima de 500 de intensidad de la hidroxiapatita; estos picos se encuentran a  $25.9^\circ$ ,  $31.8^\circ$ ,  $32.2^\circ$ ,  $32.9^\circ$ ,  $34.1^\circ$ ,  $39.8^\circ$ ,  $46.7^\circ$ ,  $49.5^\circ$  y  $53.3^\circ$  para  $2\theta$  correspondientes a los planos (002), (211), (112), (300), (202), (130), (222), (213) y (004); así mismo con ayuda el software Origin se determinó el valor para FWHM por la regresión gaussiana.

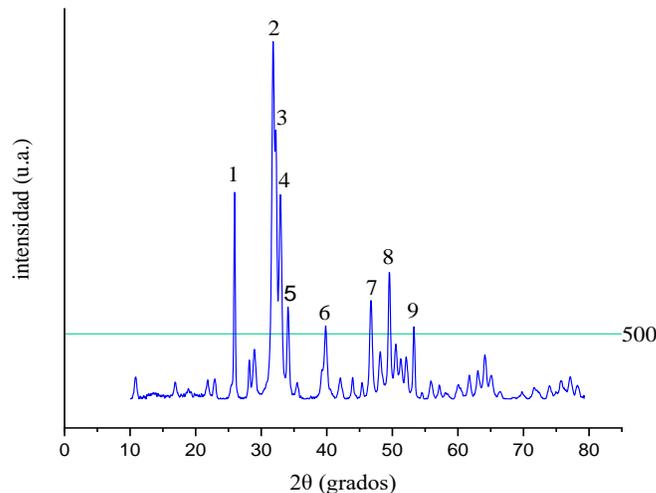


Figura 3. 4. Picos principales de difractograma correspondiente a la hidroxiapatita.

En la Tabla 3.1 se calculan los valores correspondientes a los nueve picos principales para determinar el tamaño promedio de cristalito.

Tabla 3. 1. Tamaño promedio de cristalito por la ecuación de Scherrer modificada para la hidroxiapatita.

Pico	(hkl)	$2\theta$	FWHM (B)	FWHM (B) * (radianes)	$\theta$	$\cos\theta$	B(rad) * $\cos\theta$	$\ln\left(\frac{1}{\cos\theta}\right)$	$\ln(B)$ * rad
1	(002)	28.9254	0.2415	0.0042	14.4627	0.3198	0.0013	1.1400	-5.4687
2	(211)	31.8022	0.5325	0.0092	15.9011	0.9814	0.0091	0.0187	-4.6783
3	(112)	32.2285	0.3153	0.0055	16.1142	0.9186	0.0050	0.0849	-5.2022
7	(300)	32.92	0.5471	0.0095	16.4644	0.7273	0.0069	0.3184	-4.6513
5	(202)	34.08	0.3936	0.0068	17.043	0.2336	0.0016	1.4542	-4.9806
6	(130)	39.84	0.6232	0.0108	19.9205	0.4793	0.0052	0.7354	-4.5209
7	(222)	46.72	0.4556	0.0079	23.3613	0.1993	0.0015	1.6131	-4.8343
8	(213)	49.55	0.4350	0.0075	24.7772	0.9375	0.0071	0.0645	-4.8806
9	(004)	53.29	0.2991	0.0052	26.6499	0.0536	0.0002	2.9269	-5.2551

En la Figura 3.5 se graficaron los valores  $\ln\left(\frac{1}{\cos\theta}\right)$  y  $\ln(B) * rad$  para determinar la regresión lineal correspondientes a  $y = -0.1358x - 4.8153$ , en donde 4.8153 toma el valor de b. Se sustituyen los datos de la ecuación 3.2 se obtuvo un tamaño promedio de cristalito con un valor de 16.92 nm.

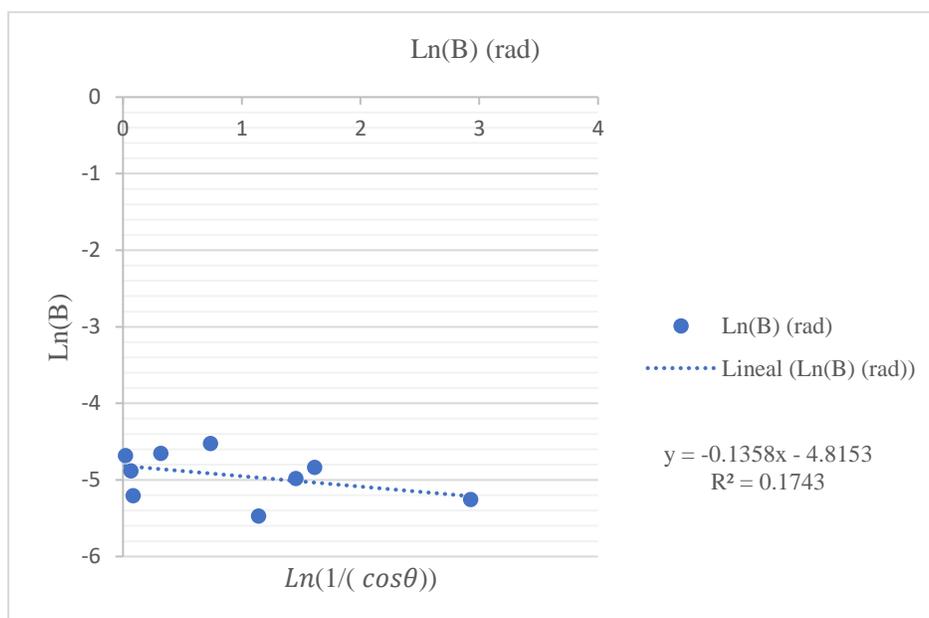


Figura 3. 5. Gráfica de regresión lineal.

### 3.3 Espectroscopía Infrarroja por Transformada de Fourier

Se analizó el precursor PLGA obteniendo espectros FTIR en el intervalo de 400 a 4000  $\text{cm}^{-1}$  como se muestra en la Figura 3.6. Comenzando dentro de la huella dactilar que comprende en el rango 400 a 1500  $\text{cm}^{-1}$  se aprecia una fuerte intensidad del grupo éster, con un enlace sencillo primario de C-O a 1050 y 1270  $\text{cm}^{-1}$ , en el enlace C-H a 754  $\text{cm}^{-1}$ , por otra parte se distinguen carbonos tipo  $\text{sp}^3$  ligado a los enlaces -CH, -CH<sub>2</sub>, -CH<sub>3</sub> dentro de las regiones 1385, 1367, 1456  $\text{cm}^{-1}$ , mientras que en la región de diagnóstico se identifica un momento dipolar con una señal intensa de característica del enlace carbonilo (C=O) a 1760  $\text{cm}^{-1}$  debido al estiramiento del grupo éster, de igual manera se identifica en enlace -CH<sub>2</sub> y CH<sub>3</sub> a 2950-3000  $\text{cm}^{-1}$ . Finalmente, se observó una frecuencia de absorción que solapa una banda ancha del enlace OH- a 3650  $\text{cm}^{-1}$  que atribuye a la humedad de las muestras.

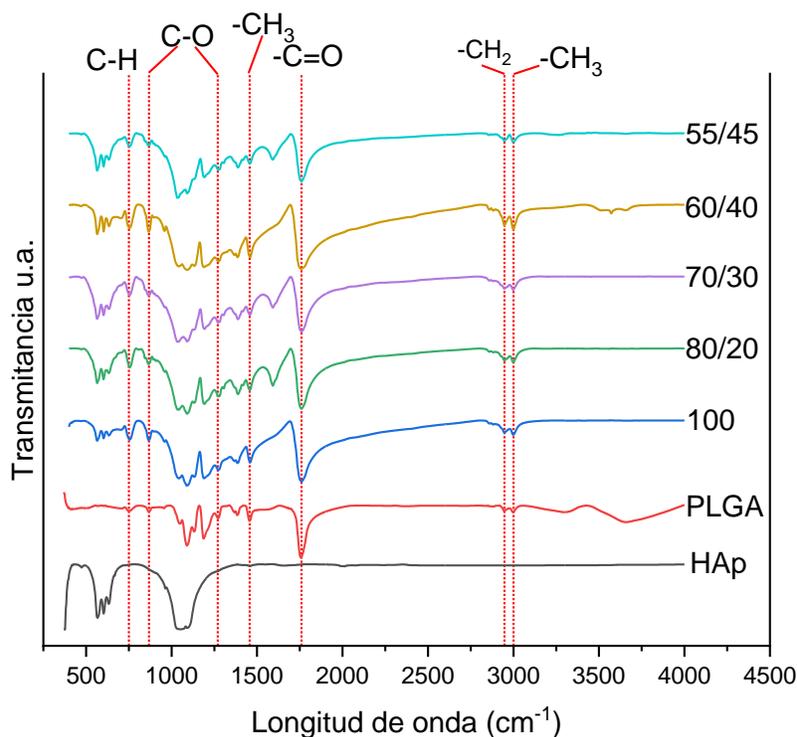


Figura 3. 6. Espectro FT-IR correspondiente a PLGA.

En la Tabla 3.2 se integran los grupos funcionales antes mencionados identificando su región y modo vibracional, la presencia de estos grupos funcionales forman al biopolímero PLGA [13], [214].

Tabla 3. 2. Regiones correspondientes a IR característicos del PLGA 50:50.

<i>Enlace</i>	<i>Rango (cm<sup>-1</sup>)</i>	<i>Modo vibracional</i>	<i>Forma</i>	<i>Intensidad</i>	<i>Ref.</i>
<i>-C=O</i>	1750	Estiramiento asimétrico	Estrecha	Fuerte	[219– 225]
<i>C-O-C</i>	1090, 1272, 1750,	Estiramiento simétrico	Media estrecha	Media	
<i>C-COO</i>	867	-	Poco estrecha	Débil	
<i>-C-O</i>	1050, 1150	Estiramiento simétrico y asimétrico y flexión	Media estrecha	Media	
<i>-CH<sub>3</sub></i>	956, 1130, 1364, 1385, 1456,	Flexión simétrica, tensión simétrica y asimétrica.	Media Estrecha	Media	
<i>CH<sub>3</sub>, -CH<sub>2</sub>, C-H</i>	2850-3000				
<i>OH libre</i>	3650	Estiramiento	Media estrecha	Media	

En la Figura 3.7 se identificaron los grupos funcionales para la hidroxiapatita y se confirmó su presencia en el andamio. Dentro de la huella dactilar se observa un estiramiento a 473 cm<sup>-1</sup>, 565 cm<sup>-1</sup> y 604 cm<sup>-1</sup>, 1035 cm<sup>-1</sup> y 1092 cm<sup>-1</sup> correspondientes al grupo fosfato PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>, mientras que la vibración simétrica está indicada por el grupo P-O en 964 cm<sup>-1</sup> y a 1022 cm<sup>-1</sup> corresponde al modo de estiramiento asimétrico del grupo fosfato O-P-O.

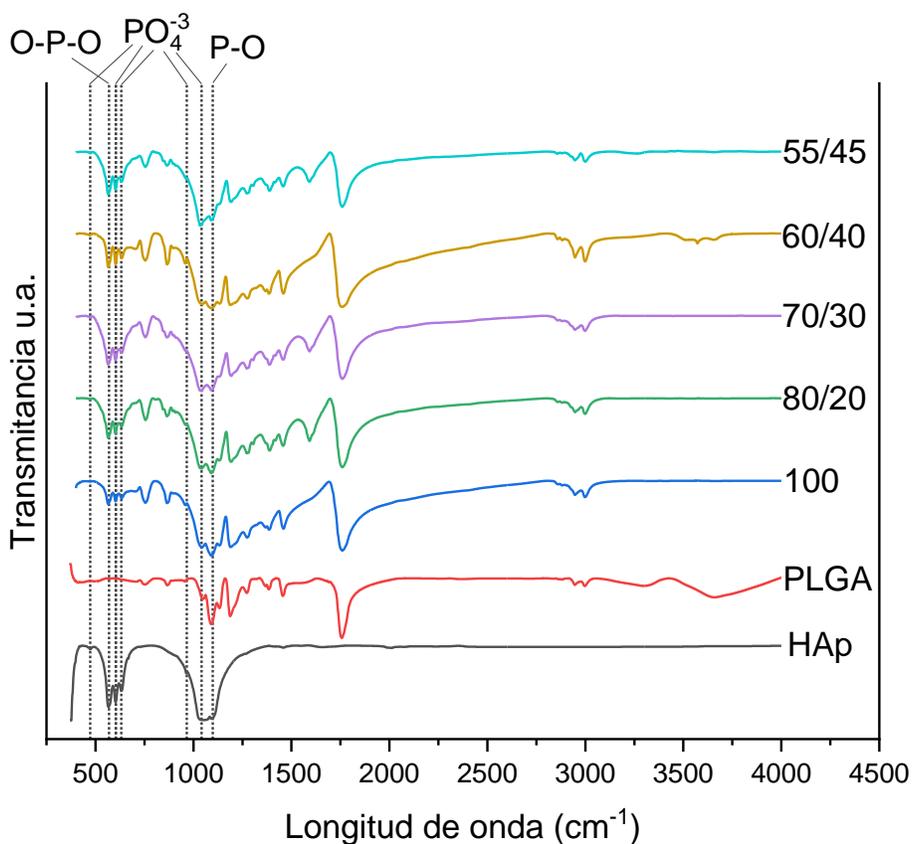


Figura 3. 7. Espectro FTIR identificando bandas de absorción y enlaces para la hidroxiapatita.

En la Figura 3.8 se aprecia el comportamiento de este material compuesto, al agregar las partículas de hidroxiapatita en el polímero. Se observa que el grupo fosfato en  $1092\text{ cm}^{-1}$  el ancho de banda aumenta y lo mismo ocurre para las bandas del grupo  $-\text{CH}$ ,  $-\text{CH}_2$ ,  $-\text{CH}_3$  del polímero a  $754$ ,  $2950\text{-}3000\text{ cm}^{-1}$ .

Entre el grupo fosfato de la hidroxiapatita y los grupo  $\text{sp}^3$  de PLGA puede detectarse en la región  $1050\text{ cm}^{-1}$ ,  $1270\text{ cm}^{-1}$ ,  $473\text{ cm}^{-1}$ ,  $565\text{ cm}^{-1}$  y  $604\text{ cm}^{-1}$  mediante la formación de enlaces débiles como las fuerzas de Van der Waals el momento dipolar o los enlaces de hidrógeno. Las bandas de  $\text{OH}^-$  en  $3360\text{ cm}^{-1}$  se atribuye a grupos carbonos tipo  $\text{sp}^3$  sin reaccionar.

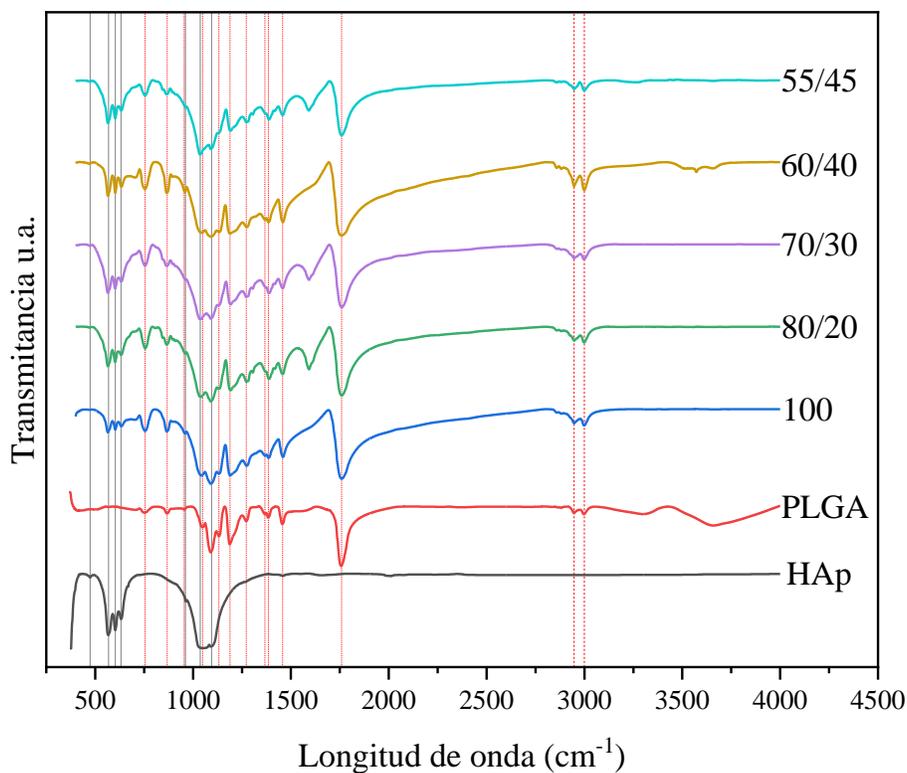


Figura 3. 8. Espectro FTIR de los andamios variando su composición.

Comparando los espectros de los andamios se determinó que al incrementar la cantidad de hidroxiapatita el ancho de banda aumenta en  $1022\text{ cm}^{-1}$  en todas las composiciones debido a la presencia de la hidroxiapatita y este mismo comportamiento se ve para los grupos funcionales principales del PLGA, sin embargo, en la composición 60/40 hay un cambio diferente ya que hay un estiramiento visible en el rango  $1950\text{ a }3000\text{ cm}^{-1}$  debido a que hay mayor cantidad de polímero y corresponde a los grupos  $-\text{CH}_2$ ,  $-\text{CH}_3$ .

### 3.3 Microscopia Electrónica de Barrido

A continuación, se observan las micrográficas obtenidas de la síntesis de la hidroxiapatita sintetizada por el método hidrotérmal en la Figura 3.9 a) y b) se muestra la morfología característica de la hidroxiapatita pura a pH 7; donde se identificaron aglomerados o cúmulos con una forma esférica; cabe mencionar que diferentes autores obtuvieron la misma morfología [51, 52, 54, 55]. Y en la Figura 3.9 c) y d) se puede observar al cambio de la morfología de la hidroxiapatita al agregar el 15% de agente porógeno citrato de sodio; en el andamio con el 100% de hidroxiapatita y se observa una morfología más compacta pero se siguen formando aglomerados esféricos

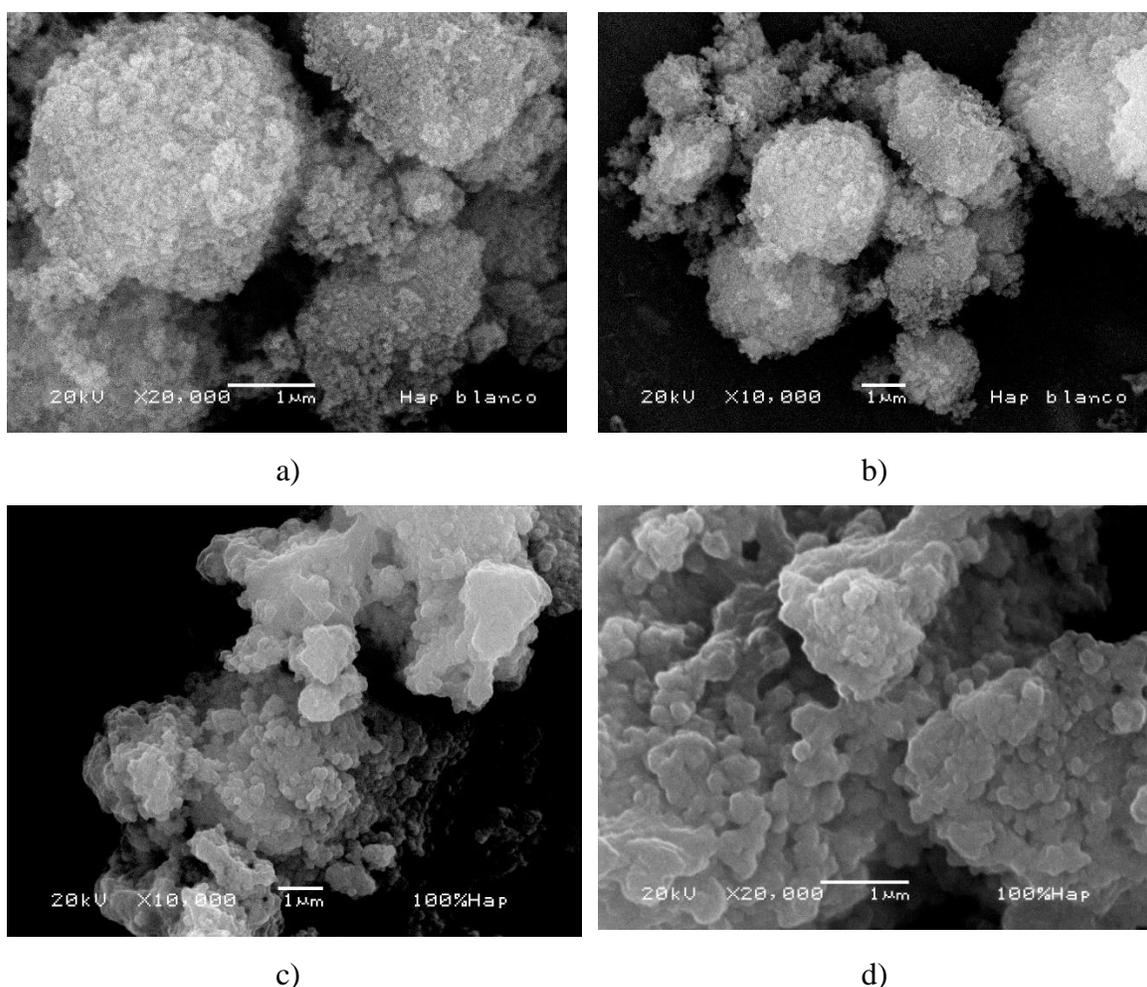
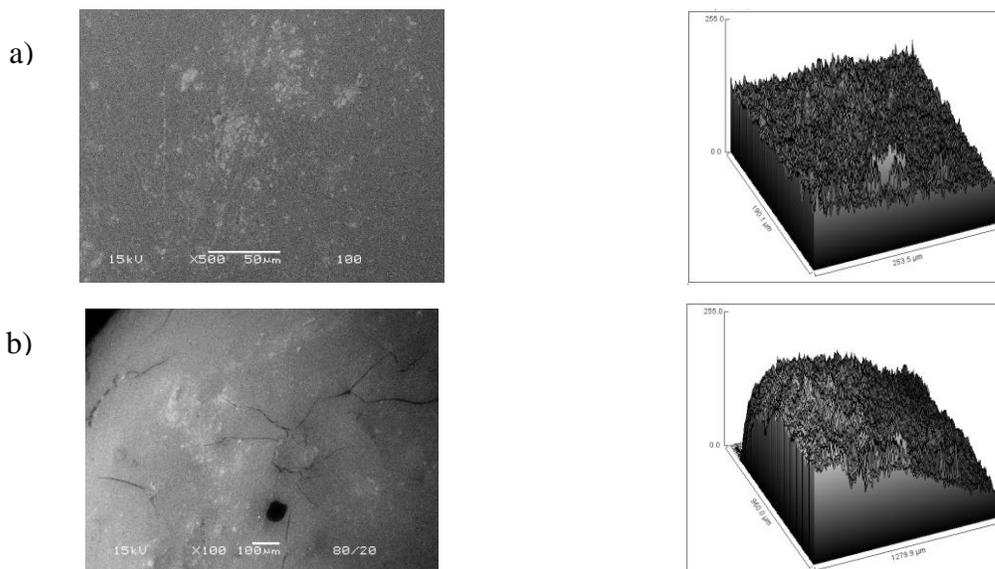


Figura 3. 9. Micrográficas obtenidas en el MEB, con diferente magnificación en donde es posible apreciar las partículas de HAp formando aglomerados.

A continuación se analizaron las micrografías de las diferentes composiciones (100, 80/20, 70/30, 60/40, 55/45%), además se muestra la gráfica que comprende a la medición de la rugosidad superficial mediante un método sencillo; la rugosidad superficial que se define como irregularidades de una superficie [222]. Esta característica beneficiará a la adherencia de células y se medirá a partir de micrografías obtenidas por MEB con el uso del software ImageJ y Origin Pro.

En la Figura 3.11 a) para la composición 100% PLGA su superficie se observa lisa la tendencia de la rugosidad es uniforme en todo el área; mientras que para la muestra 80/20, ver la Figura 3.11 b), demostró una tendencia de rugosidad alta en un área y después disminuye; en la muestra 70/30 de la Figura 3.11 c) su superficie se observa irregular y lo demuestra su gráfica ya que hay áreas con rugosidad diferente a diferencia de la muestra 60/40 que en su superficie se observan cúmulos blancos que corresponden a la hidroxiapatita lo que hace que tenga una estabilidad y rugosidad homogénea en toda el área analizada, ver Figura 3.11 d); por último en la Figura 3.11 e) corresponde a la muestra 55/45 y en su superficie se muestra con más intensidad los cúmulos de hidroxiapatita y su rugosidad se ve homogénea en toda el área del andamio.



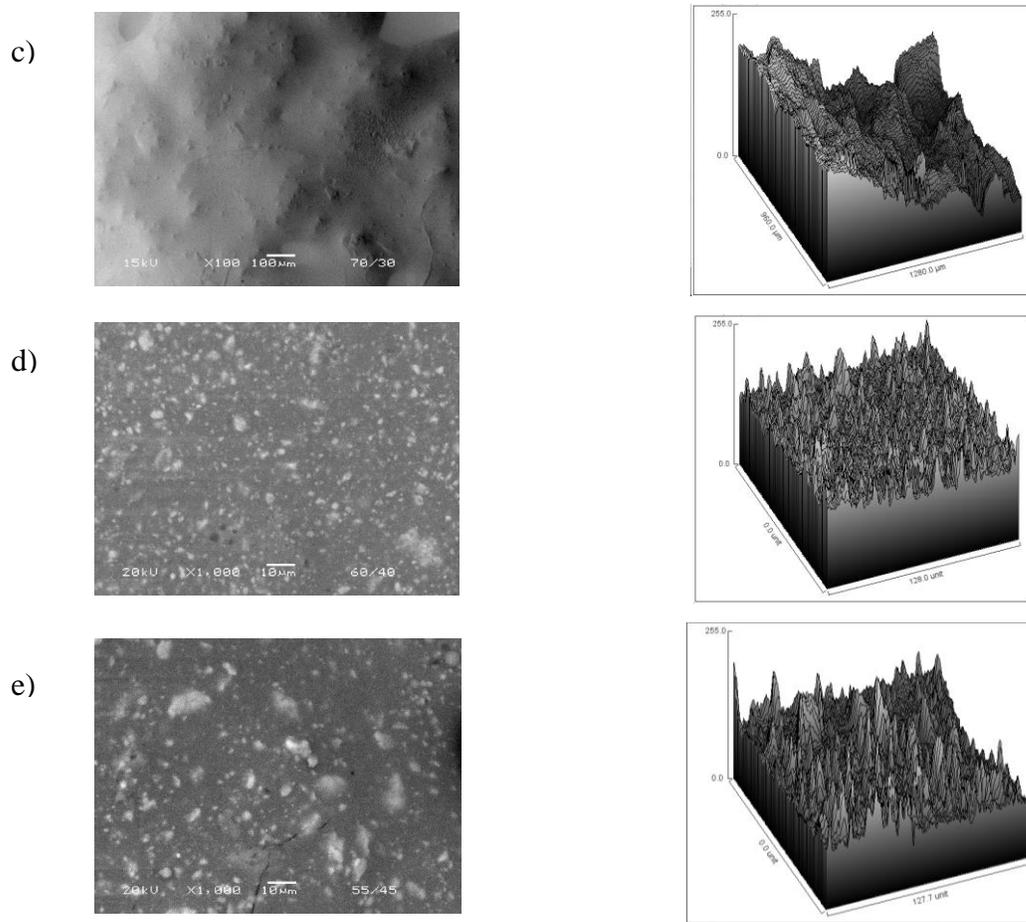
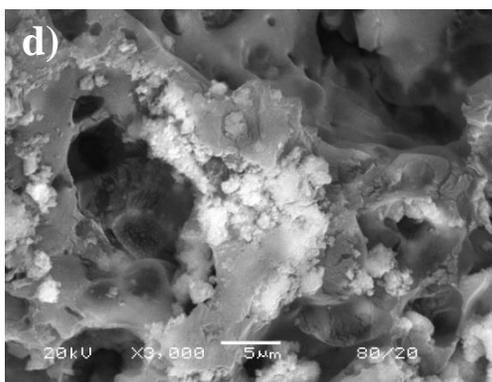
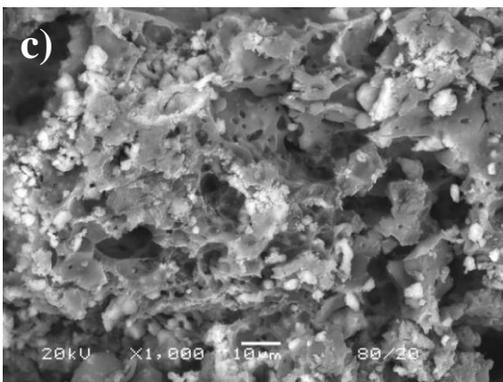
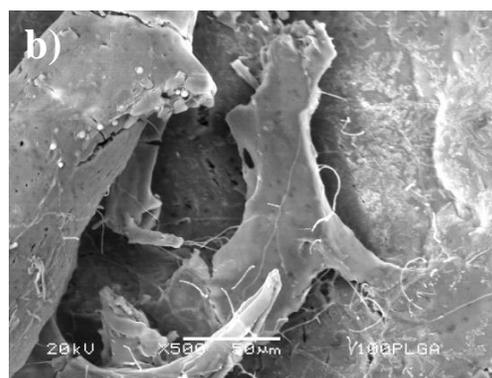
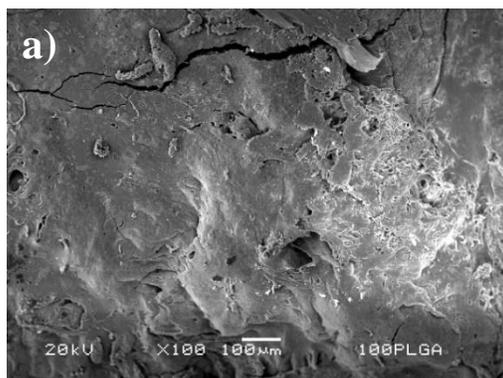


Figura 3. 10. Micrografías correspondientes de los andamios 100, 80/20, 70/30, 60/40 y 55/45, así mismo se muestra la gráfica de rugosidad superficial para cada una

Posteriormente, a todas las muestras se les realizó un corte trasversal para poder observar internamente los poros; se puede observar las micrografías correspondientes a la composición 100% PLGA en la Figura 3.11 a) la superficie es plana y se identifican las cadenas poliméricas del copolímero, ver Figura 3.11 b). En ambas micrografías se puede observar la presencia de poros pequeños debido al agente porógeno. En la muestra 80/20 los poros están bien interconectados con una morfología homogénea y con una forma irregular elíptica también se puede apreciar la presencia de aglomerados de la hidroxiapatita de forma esponjosa, ver Figura 3.11 c) y d). Para la composición 70/30 se ve la presencia de afloramientos porosos que están dispersos de manera homogénea como se muestra en la Figura 3.11 e), además se aprecian los aglomerados de la hidroxiapatita, ver Figura 3.11 f). Para la muestra 60/40 en la Figura 3.11 g) la presencia de poros se ven más ensanchada sin embargo, se ven zonas aisladas y que no hay presencia mayoritaria de porosidad esto se debe

a que posiblemente a que el polímero encapsuló las partículas de HAp y afectó su distribución. En la Figura 3.11 h) se ve la presencia de cúmulos de hidroxiapatita sobre las cadenas poliméricas y finalmente, en la Figura 3.11 i) que corresponde a la muestra 55/45 se observa en la superficie rugosa con los agregados de hidroxiapatita y de igual modo existen poros interconectados, ver Figura 3.11 j).

En todas las composiciones, excepto en la muestra 100%PLGA observó la formación de aglomerados esponjosos de hidroxiapatita, así mismo hubo presencia de poros de una forma irregular elíptica y es posible definir que a mayor cantidad de hidroxiapatita la porosidad aumenta reflejándose en su morfología.



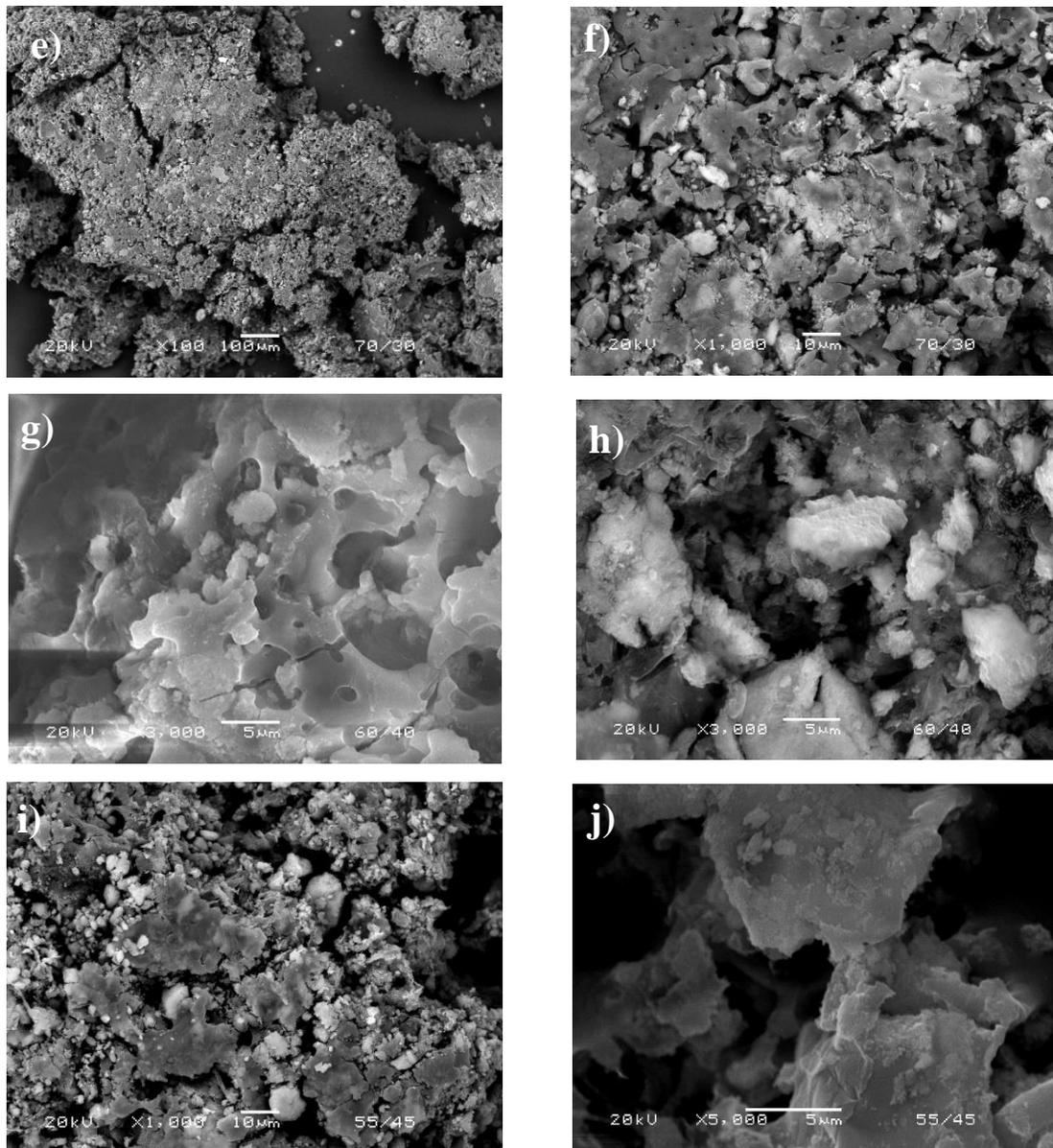


Figura 3. 11. Micrografías obtenidas por MEB para las muestras 100, 80/20, 70/30, 60/40 y 55/45.

Para calcular el porcentaje de porosidad se utilizó el desarrollo de ecuaciones por Abdullah y Khairurrija [223], en la ecuación 3.3 la superficie representa la función  $f(x, y)$  es decir, la altura de la superficie en las coordenadas  $(x, y)$  medidas desde un plano determinado, entonces el espacio bajo la superficie es material sólido mientras que el espacio por encima de la superficie está vacío, así que volumen del material sólido en la superficie es:

$$V_{\text{sólido}} = \int_{x_{\min}}^{x_{\max}} \int_{y_{\min}}^{y_{\max}} f(x, y) dx dy \quad 3.3$$

Ahora supongamos que  $f_{\max}$  es la altura máxima de la superficie medida desde el plano base a cualquier coordenada  $(x, y)$ , donde  $f(x, y) \leq f_{\max}$  para todas las  $x$  y todas las  $y$ . A partir de esto se genera un plano paralelo donde la distancia desde el plano base es  $f_{\max}$ , así que el volumen total del material es cuando un poro está ausente cuando el volumen del espacio en la superficie plana de la altura máxima y limitada por  $x_{\max}$ ,  $x_{\min}$ ,  $y_{\max}$ ,  $y_{\min}$ ; representa el volumen total, ver ecuación 3.4

$$V_{\text{total}} = f_{\max}(x_{\max} - x_{\min})(y_{\max} - y_{\min}) \quad 3.4$$

Entonces la porosidad de superficie se define como la ecuación 3.5

$$\phi = 1 - \frac{V_{\text{sólido}}}{V_{\text{total}}} \quad 3.5$$

De acuerdo con la ecuación 3.3 y con ayuda del software Origin 2018 se determinó el tamaño de poro promedio y la porosidad para cada composición, ver Tabla 3.3.

Tabla 3.3. Resultados del tamaño de poro promedio y el % de porosidad.

<i>Muestra</i>	<i>Tamaño de poro promedio (<math>\mu\text{m}</math>)</i>	<i>%Porosidad</i>
<i>100</i>	51	72%
<i>80/20</i>	149	84%
<i>70/30</i>	60	56%
<i>60/40</i>	70	46%
<i>55/45</i>	117	85%

De acuerdo con estos resultados se puede establecer que las micrografías de las muestras 80/20 y 55/45 se pudo apreciar que hay dos formas de porosidad con un tamaño diferente, unas más grandes que otras, con una distribución que parece más heterogénea que homogénea porque existen áreas más pequeñas sin embargo estas áreas son significativas, así mismo en las variaciones 80/20 y 55/45 la porosidad es mayor y presentaron un tamaño de poro  $>100 \mu\text{m}$ , en comparación del resto.

Así que estos resultados reflejan que conforme se aumenta el contenido de la hidroxiapatita se ve una mayor área superficial y mayor homogeneidad de poros, es por esta razón que las muestras 80/20 y 55/45 se eligieron y se separaron para el siguiente paso de evaluación invitro del comportamiento de la viabilidad celular.

La relación Ca/P es importante para aplicaciones biomédicas ya que debe de cumplir un rango de 1.67 a 1.9, que de acuerdo con la literatura esta se forma la hidroxiapatita estequiométrica además presenta tanto una baja resistencia mecánica como una baja reabsorción [158]. En la Tabla 3.4 se calculó la relación Ca/P donde todas las composiciones están dentro de este rango, excepto de la muestra 100% ya que predomina la concentración de PLGA.

Tabla 3. 4. Relación Ca/P de las muestras PLGA/HAp.

<i>Muestra</i>	<i>% Elemento</i>		<i>Ca/P</i>
<i>55/45</i>	C	49.89	1.85
	O	38.74	
	P	3.81	
	Ca	7.06	
<i>60/40</i>	C	50.31	1.82
	O	39.48	
	P	3.47	
	Ca	6.33	
<i>70/30</i>	C	50.17	1.76
	O	42.15	
	P	2.64	
	Ca	4.66	
<i>80/20</i>	C	51.84	1.85
	O	41.70	
	P	2.08	
	Ca	3.66	
<i>100</i>	C	53.97	2.12
	O	41.38	
	P	1.46	
	Ca	3.10	

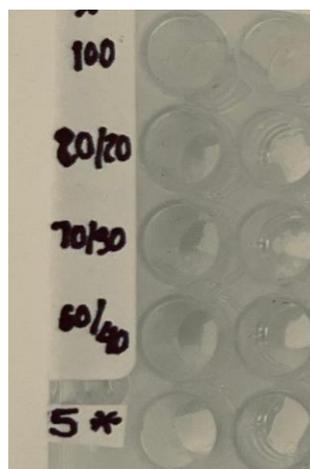
### 3.4 Ensayo de hinchamiento y de pérdida de peso durante la degradación.

En la Figura 3.12 a) y b) se muestra el proceso de degradación de los andamios, en el día uno tiene un forma rectangular y el andamios es sólido, de 3 a 5 días los andamios absorben suficiente PBS (simula los fluidos fisiológicos) y como consecuencia los andamios sufren un hinchamiento, posteriormente a partir de los días 6-9 estos andamios se van desintegrando, perdiendo su forma y área inicial como se ve en la Figura 3.12 c)

**a) 1 día**



**b) 3-5 días**



**c) 6-9 días**



Figura 3. 12. Fotografías del comportamiento de degradación para los andamios a 100, 80/20, 70/30, 60/40 y 55/45.

En la Tabla 3.5 se muestran los datos obtenidos del porcentaje de hinchamiento de los andamios en cada composición correspondiente en función al tiempo de degradación a 3, 6 y 9 días, calculando este porcentaje de acuerdo con la ecuación 2.2 descrita en el Capítulo II.

Tabla 3. 5. Porcentaje de hinchamiento para cada composición PLGA/HAp

<i>Muestras</i>	Días		
	3	6	9
100	52%	148%	43%
80/20	49%	145%	41%
70/30	46%	146%	38%
60/40	44%	141%	34%
55/45	42%	145%	29%

En la Figura 3.13 se aprecia el comportamiento del porcentaje hinchamiento para andamios con relación al tiempo en donde empezaron con un peso inicial similar y al paso de los días hubo un aumento constante en todos los casos, pero al cumplir los 9 días el peso en todas las muestras disminuyó considerablemente, esto se debe a la pérdida de peso de los andamios, es decir, el efecto de degradación. De acuerdo con este comportamiento se determinó que a mayor concentración de hidroxiapatita más rápida es su degradación.

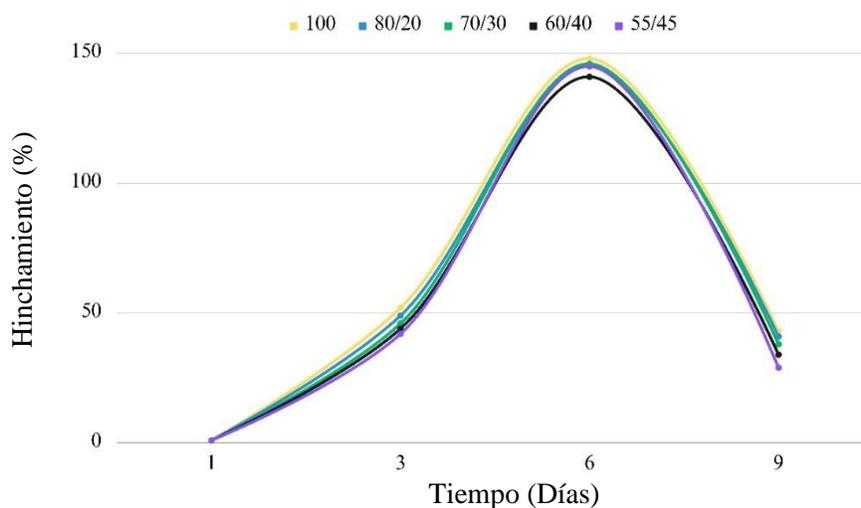


Figura 3. 13. Gráfica del porcentaje correspondiente al ensayo de hinchamiento a 3, 6 y 9 días.

Por otra parte, en la Tabla 3.6 se analiza el cálculo del incremento y pérdida del área porcentual; al transcurso de los días se registró el peso, y se calculó el área total.

A los tres días las muestras 60/40 y 55/45 tuvieron una absorción menor a 50% de su área inicial caso contrario para la composición del 100 y 80/20 aumentando más del 50%. Al cumplir los 6 días para todos los casos aumento más del 100% de su área inicial y finalmente a los 9 días hubo una perdida mayor para el andamio 55/45 a comparación de los demás casos quedando solo el 30.90% de su área inicial, ver Figura 3.14, volviéndose quebradizo y deforme debido a la absorción y al hinchamiento.

Tabla 3. 6. Resultados del área porcentual de los andamios compuestos de PLGA/HAp  
Área porcentual (%)

<i>Muestra</i>	<i>Días</i>		
	<i>3</i>	<i>6</i>	<i>9</i>
<i>100</i>	74.54	276.36	58.64
<i>80/20</i>	52.72	243.63	116.36
<i>70/30</i>	36.36	210.90	65.45
<i>60/40</i>	18.18	116.36	52.72
<i>55/45</i>	18.18	116.36	30.90

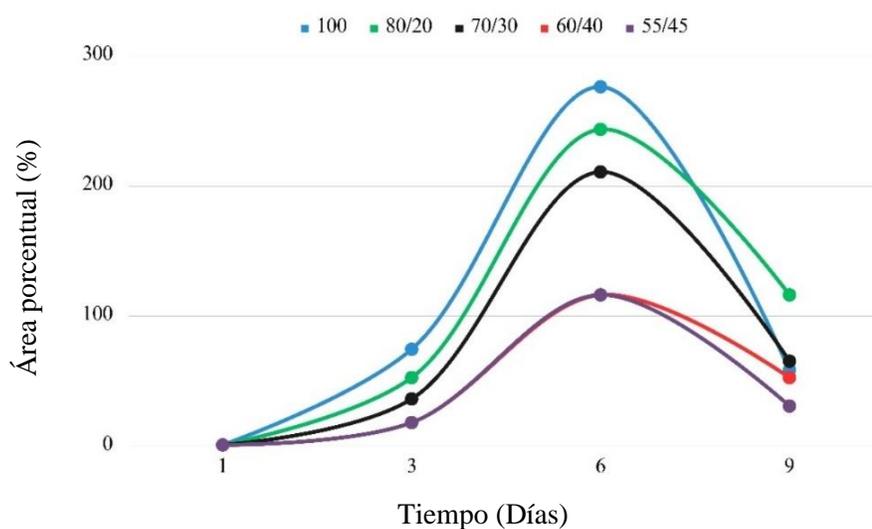


Figura 3. 14. Área porcentual en función al tiempo de degradación.

### 3.5 Viabilidad celular

La viabilidad celular se llevó a cabo a partir de la técnica Alamar blue agregando directamente células madre de pulpa dental humana a la superficie de los andamios, esta prueba fue hecha por quintuplicando, dejando un control al cual no se le agregaron los andamios para representar el 100% de viabilidad celular. Entonces de acuerdo con las micrografías, las muestras 80/20 y 55/45 los resultados de porosidad fueron mayores por lo que se tomaron para esta prueba in vitro.

Los resultados de este ensayo se presentan en la Tabla 3.7, observando que el comportamiento al día tres para los andamios con una composición del 55/45 presentaron ligeramente una mayor proliferación celular con una tasa superior al 60%; así mismo para la composición 80/20 hubo una mayor cantidad de células en el día tres con una supervivencia de células del 67%, sin embargo, para el día siete afectan la actividad celular así mismo para el día 10 en el andamio con composición 55/45; con fundamento a los estándares ISO 10993-5 para que una muestra se considere citotóxica se debe reducir la viabilidad en un 30% o más.

Tabla 3. 7. Células vivas para las muestras correspondientes.

<i>Muestra</i>	<i>Días</i>		
	<i>3</i>	<i>7</i>	<i>10</i>
<i>Control (células)</i>	100%	100%	100%
<i>55/45</i>	61.04%	62.73%	57.81%
<i>80/20</i>	67.33%	63.62%	41.98%

En la Figura 3.15 se observa la tendencia de los resultados de la Tabla 3.7 determinando que el comportamiento de la viabilidad celular se mantiene estable si se incrementa la cantidad de hidroxiapatita.

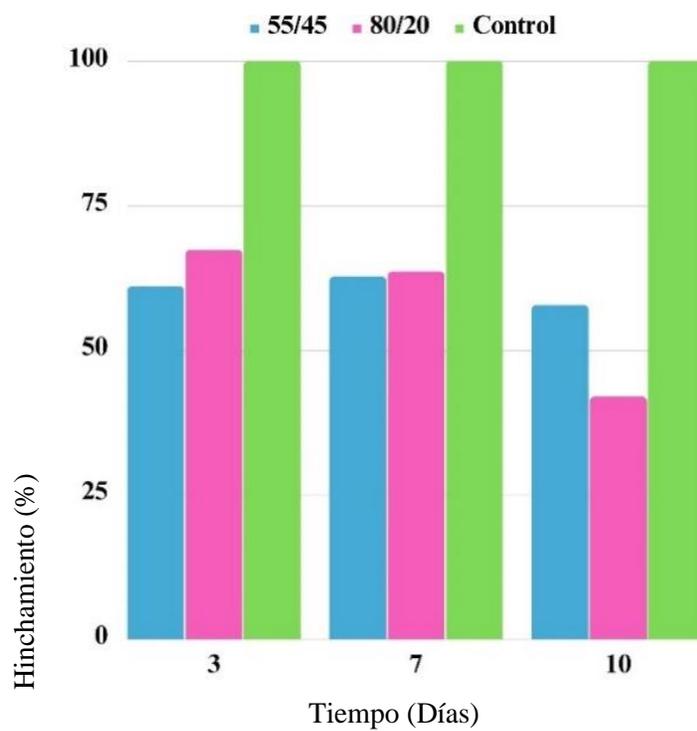


Figura 3. 15. Resultados de citotoxicidad por Alamar blue.

## CAPITULO IV:

### DISCUSIÓN DE RESULTADOS

En este capítulo se discuten los resultados obtenidos correspondientes al desarrollo de andamios compuestos de PLGA/HAp variando su composición a 100, 80/20, 70/30, 60/40 y 55/45.



## 4.1 Discusión de resultados

En este trabajo de investigación se desarrollaron andamios variando la composición de la matriz y el reforzante (PLGA/HAp), haciendo una comparación en función de la concentración. Se determinaron los modos de vibración del grupo fosfato en  $1092\text{ cm}^{-1}$  y bandas del grupo -CH, -CH<sub>2</sub>, -CH<sub>3</sub> del polímero a 754, 2950-3000. En DRX se determina la presencia de la fase monoclinica y hexagonal de la hidroxiapatita; se determinó el tamaño de cristalito, siendo de tamaño nanométrico, 16.92 nm. Así mismo mediante microscopía electrónica de barrido se analizó la morfología superficial distinguiendo la rugosidad apreciando que los andamios con una composición 80/20 y 55/45, su tamaño de poro promedio fue mayor a  $100\ \mu\text{m}$  y el porcentaje total de la porosidad mayor al 80% del andamio. La viabilidad celular para el andamio con proporción de 80/20 fue del 67.33 y 63.62% para 3 y 7 días, respectivamente, en tanto que para el andamio con proporción 55/45 fue de 61.04% y 62.73%, respectivamente.

El modelo presentado en la Figura 4.1 describe un proceso de tres etapas para la formación de poros. Inicialmente, mediante fuerzas de adhesión entre PLGA y HAp facilitan su unión; posteriormente, el agente formador de poros, el citrato de sodio genera fuerzas electrostáticas positivas para el polímero, mientras que grupos como el fosfato, el carbonato y el hidróxido generan fuerzas negativas, luego, el polímero precipita en la interfase agua-solución, creando una capa envolvente influenciada por la tensión superficial, mientras que el cloroformo se volatiliza con el calor. Y finalmente una vez que el solvente se evapora, las gotas de agua se condensan y el polímero se estabiliza a temperatura ambiente, lo que genera presión y la apertura de cadenas de polímero para crear poros cuya distribución y porcentaje depende de la cantidad de PLGA y HAp utilizada.

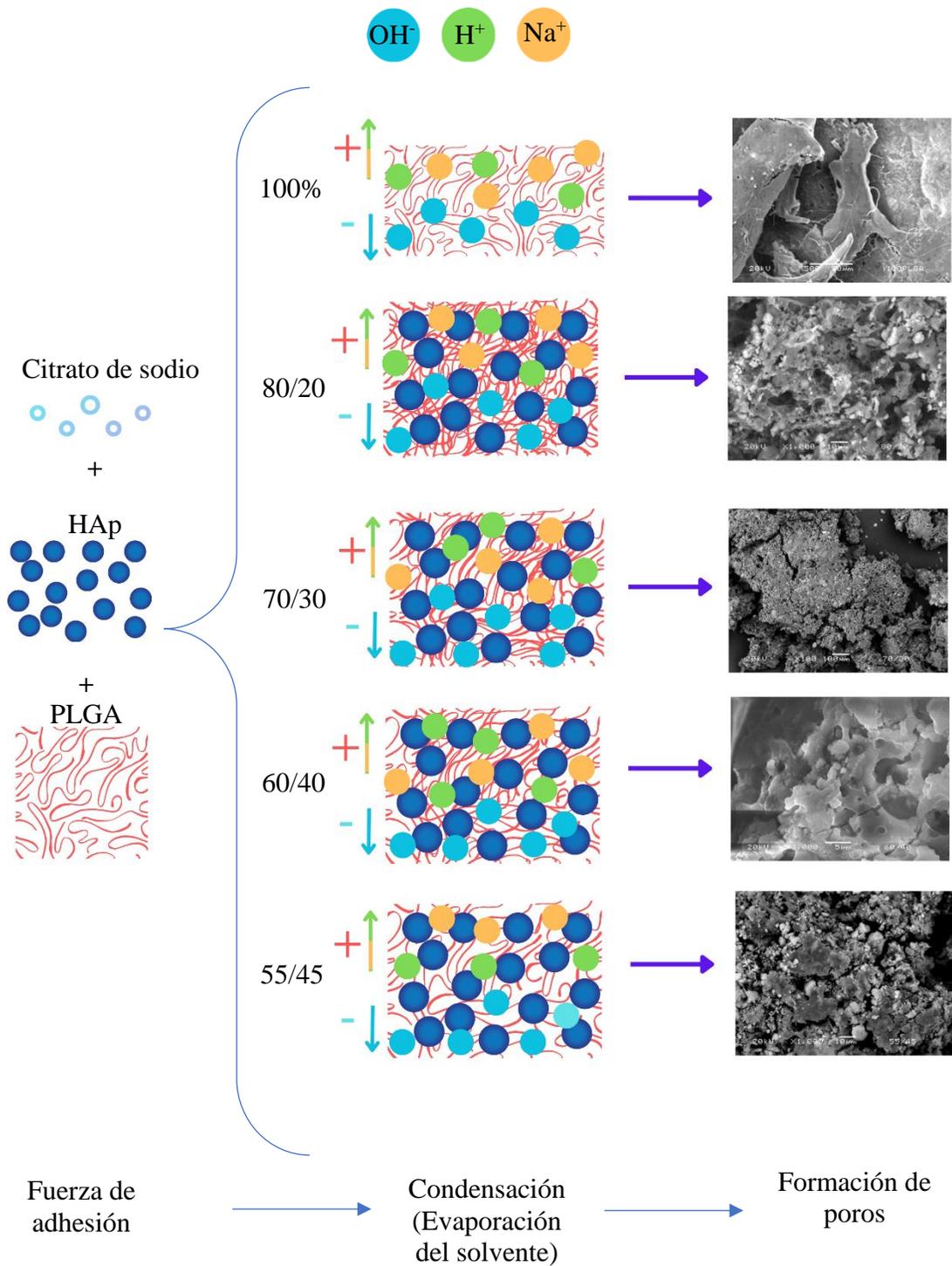


Figura 4. 1. Modelo de la formación de poros en el andamio.

Para analizar la aportación de este trabajo de investigación en comparación con otros autores que han fabricado andamios compuestos de PLGA/HAp en la Tabla 4.1 se incluye lo que se han reportado diferentes autores el desarrollo de andamios con sistemas similares al empleado en este trabajo variando el porcentaje de los precursores, es decir, de la matriz y el reforzante, sin embargo, la mayoría de estas investigaciones como en la realizada por Nie & Wang y Honglin Luo et al. han empleado diferentes rutas por impresión 3D como el método de electrohilado y por filamento fundido respectivamente, obteniendo andamios con una rugosidad que varía de media a alta, tamaños de poro entre 200-300  $\mu\text{m}$ , obtuvieron un porcentaje de porosidad  $\geq 75$  y la citotoxicidad en todos los estudios fueron negativas.

Mientras que, para las técnicas tradicionales reportados por Díaz Tajada, Esperanza et al., Susana Fragoso Ángeles et al., y Sokolova Viktoriya et al., mediante las técnicas fases inducida térmicamente, mezcla simple y sonicación y precipitación por emulsión respectivamente reportaron andamios con una rugosidad media a alta similar a las técnicas 3D, pero varía el porcentaje de porosidad entre 82, 65 y 50 % con un tamaño de poro promedio de 100-300  $\mu\text{m}$  e insensibles a en las pruebas de citotoxicidad.

Finalmente, en ambas técnicas, por impresión 3D y técnicas tradicionales en las pruebas de hinchamiento tuvieron una degradación óptima con un comportamiento hidrofílico debido a las propiedades del PLGA.

El comportamiento analizado por las técnicas tradicionales es similar con el resultado de este trabajo sin embargo el incremento de la hidroxiapatita aumento las características de porosidad, rugosidad y tamaño de poro son un cambio indicativo de la incorporación exitosa de los iones fosfatos en las cadenas poliméricas incrementando así la bioactividad del sistema.

Tabla 4. 1. Comparación de resultados reportados por otros autores para la fabricación de andamios de PLGA/HAp.

<i>Autor</i>	<i>Composición PLGA/HAp</i>	<i>¿Agente porógeno?</i>	<i>Técnica</i>	<i>Rugosidad</i>	<i>Tamaño poro promedio</i>	<i>% Porosidad</i>	<i>Citotoxicidad</i>	<i>Ref.</i>
<i>Díaz Tajada, Esperanza et al.,</i>	53/47, 75/25	No	fases inducida térmicamente (TIPS)	Media	-	82%	Negativo	[72]
<i>Nie &amp; Wang</i>	100, 95/5, 90/10	No	electrohilado.	Media	200-300 $\mu m$	75%	Negativo	[73].
<i>Susana Frago Ángeles et al.</i>	65/35	No	mezcla simple y sonicación	Alta	-	65%	Negativo	[11].
<i>Honglin Luo et al.</i>	90/5, 90/10	No	filamento fundido	Media	200 $\mu m$	>70%	Negativo	[224]
<i>Sokolova Viktoriya et al.</i>	95/5, 90/10, 80/20, 60/40	No	precipitación en emulsión	Media-Alta	100 $\mu m$	50%	Negativo	[225]
<i>Pérez Blanca</i>	100, 80/20, 70/30, 60/40, 55/45	Sí, Citrato de Sodio	gel-casting	Media-Alta	51-149 $\mu m$	>80%	>60%	

En esta investigación se obtuvieron condiciones y parámetros adecuados considerando la relación costo-beneficio mediante la técnica gel-casting; en resumen, por esta técnica se han desarrollado con éxito andamios de PLGA/HAp a diferentes proporciones (100, 80/20, 70/30, 60/40, 55/45) en relación con el peso.

Además acorde al comparativo de la Tabla 4.1, no se habían estudiado los efectos de la adición del citrato de sodio, en conjunto con la variación de la concentración de HAp, sobre la porosidad y tamaño de poro en la fabricación de andamios de PLGA/HAp.

Se obtuvo un tamaño de poro de aproximadamente de 150  $\mu\text{m}$  con una porosidad mayor al 80% en los andamios de concentración 80/20, estos parámetros han demostrado beneficiar la migración celular; mientras que en el andamio de 55/45 de concentración de PLGA/HAp mostró comportamientos que muy probablemente vale la pena resaltar y enfocar hacia el propósito de estos andamios; es decir, una viabilidad celular estable de 60% $\pm$ 4% en un periodo de 10 días y una degradación con una pérdida de peso / área de 115% / 85% a partir de una condición de hinchamiento máxima por lo que son buenos candidatos para su aplicación biomédica.

## 4.2 Conclusiones

De acuerdo con el trabajo experimental, análisis, discusión de resultados obtenidos y los objetivos planteados para esta investigación se formulan las siguientes conclusiones:

- Por el método hidrotermal tradicional se obtuvo hidroxiapatita; por DRX se identificaron los picos característicos de la fase hexagonal y monoclinica, se calculó mediante la ecuación de Scherrer modificada el tamaño de cristalito obteniéndolo de 16.92 nm; por MEB se observaron aglomerados con forma esférica; mientras que por FTIR se distinguieron los grupos fosfato y grupos hidroxilo.
- Se logró desarrollar andamios de PLGA/HAp a diferentes composiciones de 100, 80/20, 70/30, 60/40 y 55/45; respectivamente, con relación al peso mediante el método gel-casting, y la adición del 15% del agente porógeno, citrato de sodio, benefició la morfología en todas las composiciones confirmándolo en las micrografías, sin embargo en la composición 50/45 tuvo una mejor rugosidad, un tamaño relativo de poro de 50-150  $\mu\text{m}$  y una porosidad >80%.
- En los ensayos de viabilidad celular a 3, 7 y 10 días se obtuvo para la composición 80/20 el 67.33, 62.62 y 41.98 % de células vivas; mientras que el 61.04, 62.73 y 57.81% para la muestra 55/45 siendo esta última composición la que obtuvo un resultado favorable.
- Se estableció un mecanismo para la simulación de la interfaz implante-sistema que contribuye a la interacción física, la degradación química mediante el rompimiento éster del PLGA y la unión por el grupo  $\text{OH}^-$  de la hidroxiapatita de la matriz celular y los cristales de hidroxiapatita sintética del andamio cuando están en contacto con el medio fisiológico del cuerpo humano.
- La técnica tradicional gel casting es ideal por su fácil reproducción y bajo costo, así mismo, favorecerá estudios posteriores como la biocompatibilidad en la adhesión y proliferación celular además de estudiar las propiedades mecánicas para aplicaciones en sectores biomédicos; específicamente en la ingeniería de tejidos como potencial en la regeneración ósea.

## REFERENCIAS

- [1] HRSA, «Estadísticas sobre la donación de órganos». <https://donaciondeorganos.gov/conocer/2n8u/estadisticas-sobre-la-donacion-de-organos>
- [2] Gobierno de México, «Día Internacional de las Personas Adultas Mayores: Claves para un envejecimiento saludable». <http://www.gob.mx/inapam/es/articulos/dia-internacional-de-las-personas-adultas-mayores-claves-para-un-envejecimiento-saludable?idiom=es>
- [3] Dirección General de Comunicación Social-UNAM, «Cada día mueren 20 personas en México en espera de un trasplante», 2019. [https://www.dgcs.unam.mx/boletin/bdboletin/2019\\_595.html](https://www.dgcs.unam.mx/boletin/bdboletin/2019_595.html)
- [4] L. Contreras, K. Noris-Suárez, y G. Gonzalez, «Aplicaciones de materiales mesoporosos en la ingeniería del tejido óseo», Pontificia Universidad Católica de Ecuador, 2021. [En línea]. Disponible en: <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=8269977>
- [5] Department of Materials, University of Oxford, Parks Road, Oxford, OX1 3PH, UK, D. Wahl, y J. Czernuszka, «Collagen-Hydroxyapatite Composites for Hard Tissue Repair», *Eur. Cell. Mater.*, vol. 11, pp. 43-56, mar. 2006, doi: 10.22203/eCM.v011a06.
- [6] A. Szcześ, L. Hołysz, y E. Chibowski, «Synthesis of hydroxyapatite for biomedical applications», *Adv. Colloid Interface Sci.*, vol. 249, pp. 321-330, nov. 2017, doi: 10.1016/j.cis.2017.04.007.
- [7] M. V. García-Garduño, «LA HIDROXIAPATITA, SU IMPORTANCIA EN LOS TEJIDOS MINERALIZADOS Y SU APLICACIÓN BIOMÉDICA», vol. 9, n.º 2, p. 7, 2006.
- [8] P. Sengupta, «Nanobiomaterials in hard tissue repair», 2022, pp. 57-77. doi: 10.1016/B978-0-12-819469-0.00005-8.

- [9] S. Gutiérrez, L. Sequeda-Castañeda, y M. Rincón, «Investigaciones de la hidroxiapatita como un andamio para la regeneración del tejido óseo en odontología: aproximaciones iniciales.», 2018, p. 344.
- [10] F. Danhier, E. Ansorena, J. M. Silva, R. Coco, A. Le Breton, y V. Préat, «PLGA-based nanoparticles: An overview of biomedical applications», *J. Controlled Release*, vol. 161, n.º 2, pp. 505-522, jul. 2012, doi: 10.1016/j.jconrel.2012.01.043.
- [11] S. F. Angeles, R. Vera-Graziano, G. L. P. González, A. L. Iglesias, L. E. G. Pineda, y L. J. Villarreal-Gómez, «Síntesis y Caracterización de Hidroxiapatita Sintética para la Preparación de Filmes de PLGA/HAP con Potencial Uso en Aplicaciones Biomédicas», *ReCIBE Rev. Electrónica Comput. Informática Bioméd. Electrónica*, vol. 7, n.º 2, pp. 93-116, 2018.
- [12] J. Babilotte *et al.*, «Development and characterization of a PLGA-HA composite material to fabricate 3D-printed scaffolds for bone tissue engineering», *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 118, p. 111334, ene. 2021, doi: 10.1016/j.msec.2020.111334.
- [13] V. Sokolova, K. Kostka, K. T. Shalumon, O. Prymak, J.-P. Chen, y M. Epple, «Synthesis and characterization of PLGA/HAP scaffolds with DNA-functionalised calcium phosphate nanoparticles for bone tissue engineering», *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, vol. 31, n.º 11, p. 102, nov. 2020, doi: 10.1007/s10856-020-06442-1.
- [14] S. Zheng, Y. Guan, H. Yu, G. Huang, y C. Zheng, «Poly-L-lysine-coated PLGA/poly(amino acid)-modified hydroxyapatite porous scaffolds as efficient tissue engineering scaffolds for cell adhesion, proliferation, and differentiation», *New J. Chem.*, vol. 43, n.º 25, pp. 9989-10002, jun. 2019, doi: 10.1039/C9NJ01675A.
- [15] E. Saito, H. Kang, J. M. Taboas, A. Diggs, C. L. Flanagan, y S. J. Hollister, «Experimental and computational characterization of designed and fabricated 50:50 PLGA porous scaffolds for human trabecular bone applications», *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, vol. 21, n.º 8, pp. 2371-2383, ago. 2010, doi: 10.1007/s10856-010-4091-8.

- [16] Y. Yang *et al.*, «Anti-infective efficacy, cytocompatibility and biocompatibility of a 3D-printed osteoconductive composite scaffold functionalized with quaternized chitosan», *Acta Biomater.*, vol. 46, pp. 112-128, dic. 2016, doi: 10.1016/j.actbio.2016.09.035.
- [17] A. A. Kulkarni y P. S. Rao, «2 - Synthesis of polymeric nanomaterials for biomedical applications», en *Nanomaterials in Tissue Engineering*, A. K. Gaharwar, S. Sant, M. J. Hancock, y S. A. Hacking, Eds., en Woodhead Publishing Series in Biomaterials. Woodhead Publishing, 2013, pp. 27-63. doi: 10.1533/9780857097231.1.27.
- [18] N. Acerbi Cremades, «Origenes de la cirugía plástica, padres, pioneros y otros mas», *Rev Salud Pública Córdoba*, pp. 47-52, 2009.
- [19] F. Burny, M. Donkerwolcke, y D. Muster, «Biomaterials education: a challenge for medicine and industry in the late 1990s», *Mater. Sci. Eng. A*, vol. 199, n.º 1, pp. 53-59, ago. 1995, doi: 10.1016/0921-5093(95)09907-7.
- [20] D. Clavijo Grimaldo, J. E. Alfonso Orjuela, C. A. Cardozo de Martínez, C. A. Casadiego Torrado, y Á. Perea Covarrubias, «Hacia una nueva generación de biomateriales: primera parte», *Rev Colomb Ortop Traumatol*, 2010, Accedido: 29 de noviembre de 2022. [En línea]. Disponible en: <http://www.sccot.org.co/pdf/RevistaDigital/24-03-2010/09NuevaGeneracion.pdf>
- [21] J. Alfaro, J. Sueiro-Fernández, R. Pesudo, J. Bermúdez, y J. Lanau, «Regeneración ósea. Biomateriales, sustitutos óseos y sustitutos del injerto óseo», 2011, pp. 11-26
- [22] J. H. Harrison, J. P. Merrill, y J. E. Murray, «Renal homotransplantation in identical twins», *Surg. Forum*, vol. 6, pp. 432-436, 1956.
- [23] A. Sanan y S. J. Haines, «Repairing holes in the head: a history of cranioplasty», *Neurosurgery*, vol. 40, n.º 3, pp. 588-603, mar. 1997, doi: 10.1097/00006123-199703000-00033.

- [24] W. W. Tomford, «Bone Allografts: Past, Present and Future», *Cell Tissue Bank.*, vol. 1, n.º 2, pp. 105-109, jun. 2000, doi: 10.1023/A:1010158731885.
- [25] A. Martín-Piedra y L. Martín-Piedra, «Matrices para Ingeniería del tejido óseo», *Scaffolds for bone tissue engineering*, abr. 2019, doi: 10.15568/am.2019.806.re01.
- [26] C. N. de Población, «Día Internacional de las Personas de Edad», *gob.mx*. <http://www.gob.mx/conapo/es/articulos/dia-internacional-de-las-personas-de-edad-284170?idiom=es> (accedido 6 de abril de 2022).
- [27] M. Moncayo Donoso, «Desarrollo de prototipos de soportes tridimensionales a base de colágeno tipo I E Hidroxiapatita para regeneración ósea», feb. 2020, Accedido: 11 de marzo de 2022. [En línea]. Disponible en: <https://repositorio.unal.edu.co/handle/unal/77380>
- [28] H. K. Makadia y S. J. Siegel, «Poly Lactic-co-Glycolic Acid (PLGA) as Biodegradable Controlled Drug Delivery Carrier», *Polymers*, vol. 3, n.º 3, Art. n.º 3, sep. 2011, doi: 10.3390/polym3031377.
- [29] A. Eltom, G. Zhong, y A. Muhammad, «Scaffold Techniques and Designs in Tissue Engineering Functions and Purposes: A Review», *Adv. Mater. Sci. Eng.*, vol. 2019, p. e3429527, mar. 2019, doi: 10.1155/2019/3429527.
- [30] J. Anita Lett *et al.*, «Recent advances in natural polymer-based hydroxyapatite scaffolds: Properties and applications», *Eur. Polym. J.*, vol. 148, p. 110360, abr. 2021, doi: 10.1016/j.eurpolymj.2021.110360.
- [31] M. A. Sofuoğlu, «A new biomaterial selection approach using reference ideal method», *Sādhanā*, vol. 46, n.º 1, p. 36, feb. 2021, doi: 10.1007/s12046-021-01559-7.
- [32] H. J. Haugen, S. P. Lyngstadaas, F. Rossi, y G. Perale, «Bone grafts: which is the ideal biomaterial?», *J. Clin. Periodontol.*, vol. 46, n.º S21, pp. 92-102, 2019, doi: 10.1111/jcpe.13058.

- [33] J. Sepúlveda-Arias, J. Cárdenas, A. Cárdenas, L. Muriel, y L. Estancio, *Biotechnología y sus aplicaciones en el sector salud*. 2020. doi: 10.22517/9789587224399.
- [34] C. Calvache, C. Cobos, M. Mendoza, M. Niño Zambrano, C. Romero, y J. Narvaez, *Reflexiones de los proyectos de Jovenes Investigadores e Innovadores en el Departamento del Cauca 2022*. 2023.
- [35] M. E. Abad Javier, «Síntesis, caracterización y biofuncionalización de andamios biomiméticos de biovidrio nanoestructurado por la técnica sol-gel acoplada a secado por aspersión», Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, 2019. [En línea]. Disponible en: [http://bibliotecavirtual.dgb.umich.mx:8083/xmlui/handle/DGB\\_UMICH/1326](http://bibliotecavirtual.dgb.umich.mx:8083/xmlui/handle/DGB_UMICH/1326)
- [36] M. Armijos Briones, G. Vaca Altamirano, R. Moreano Moreano, y N. Torres Nieto, «Biomateriales inteligentes usados en odontología», mar. 2022, doi: 10.5281/zenodo.5888336.
- [37] B. Moreno Burriel, M. Carballo, y J. R. Jurado Egea, «Una revisión del uso del TiO<sub>2</sub> en terapias e ingeniería tisular», 2009, Accedido: 4 de octubre de 2022. [En línea]. Disponible en: <https://digital.csic.es/handle/10261/36667>
- [38] Y. Zaokari, A. Persaud, y A. Ibrahim, «Biomaterials for Adhesion in Orthopedic Applications: A Review», *Eng. Regen.*, vol. 1, pp. 51-63, ene. 2020, doi: 10.1016/j.engreg.2020.07.002.
- [39] L. S. Villaseñor Cerón *et al.*, «Characterization of hap nanostructures doped with AgNp and the gamma radiation effects», *Results Phys.*, vol. 15, p. 102702, dic. 2019, doi: 10.1016/j.rinp.2019.102702.
- [40] R. G. Santos, «Hidroxiapatita Porosa Coralina Hap-200. 15 Años de Aplicaciones Clínicas.», vol. 36, p. 9, 2005.
- [41] A. Martinelli, M. C. Novoa, C. Oldani, y A. Corominas, «Síntesis y caracterización de hidroxiapatita para implantes biomédicos», p. 9, 2011.

- [42] S. L. Ortiz *et al.*, «Dy2O3-unpurified hydroxyapatite: a promising thermoluminescent sensor and biomimetic nanotherapeutic», *Appl. Phys. A*, vol. 127, n.º 12, p. 893, nov. 2021, doi: 10.1007/s00339-021-05010-w.
- [43] S. Kano, A. Yamazaki, R. Otsuka, M. Ohgaki, M. Akao, y H. Aoki, «Application of Hydroxyapatite-Sol as Drug Carrier», *Biomed. Mater. Eng.*, vol. 4, n.º 4, pp. 283-290, ene. 1994, doi: 10.3233/BME-1994-4404.
- [44] V. Rodríguez-Lugo, D. E. Salado-Leza, S. L. Ortiz, D. Mendoza-Anaya, L. S. Villaseñor-Cerón, y M. I. Reyes-Valderrama, «Revisión de la Hidroxiapatita Nanoestructurada como Alternativa para Tratamiento de Cáncer», *Pädi Bol. Científico Cienc. Básicas E Ing. ICBI*, vol. 8, n.º Especial, Art. n.º Especial, dic. 2020, doi: 10.29057/icbi.v8iEspecial.6466.
- [45] S. C. Cox, J. A. Thornby, G. J. Gibbons, M. A. Williams, y K. K. Mallick, «3D printing of porous hydroxyapatite scaffolds intended for use in bone tissue engineering applications», *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 47, pp. 237-247, feb. 2015, doi: 10.1016/j.msec.2014.11.024.
- [46] L. G. Sequeda, J. M. Díaz, S. J. Gutiérrez, S. J. Perdomo, y O. L. Gómez, «Obtención de hidroxiapatita sintética por tres métodos diferentes y su caracterización para ser utilizada como sustituto óseo», p. 17.
- [47] Castaño VM, «Controlled Hydrothermal Production Of Hydroxylapatite From Marine Skeletons», *Mater. Technol.*, vol. 16, n.º 2, pp. 97-103, ene. 2001, doi: 10.1080/10667857.2001.11752918.
- [48] V. Rodríguez-Lugo, E. Salinas-Rodríguez, R. A. Vázquez, K. Alemán, y A. L. Rivera, «Hydroxyapatite synthesis from a starfish and  $\beta$ -tricalcium phosphate using a hydrothermal method», *RSC Adv.*, vol. 7, n.º 13, pp. 7631-7639, ene. 2017, doi: 10.1039/C6RA26907A.

- [49] Y. L. Botero, «Hidroxiapatita carbonatada, una opción como biomaterial para implantes: una revisión del estado del arte», *Rev. Colomb. Mater.*, n.º 8, Art. n.º 8, jun. 2016.
- [50] K. Byrappa y M. Yoshimura, *Handbook of Hydrothermal Technology*. William Andrew, 2012. [En línea]. Disponible en: <https://shop.elsevier.com/books/handbook-of-hydrothermal-technology/byrappa/978-0-8155-1445-9>
- [51] S. R. Levitt, P. H. Crayton, E. A. Monroe, y R. A. Condrate, «Forming method for apatite prostheses», *J. Biomed. Mater. Res.*, vol. 3, n.º 4, pp. 683-684, 1969, doi: 10.1002/jbm.820030413.
- [52] V. Rodríguez-Lugo, C. Angeles-Chavez, G. Mondragon, S. Recillas-Gispert, y V. M. Castaño, «Synthesis And Structural Characterization Of Hydroxyapatite Obtained From CaO And CaHP04 By A Hydrothermal Method», *Mater. Res. Innov.*, vol. 9, n.º 1, pp. 20-22, mar. 2005, doi: 10.1080/14328917.2005.11784875.
- [53] T. Chatterjee, A. K. Das, S. Lala, S. K. Pradhan, y A. K. Meikap, «Structural and electrical characterizations of hydrothermally grown hydroxyapatite polycrystals: A morphological hierarchy», *J. Appl. Phys.*, vol. 125, n.º 22, p. 225107, jun. 2019, doi: 10.1063/1.5096452.
- [54] S. López-Ortiz *et al.*, «The pH Effect on the Growth of Hexagonal and Monoclinic Hydroxyapatite Synthesized by the Hydrothermal Method», *J. Nanomater.*, vol. 2020, p. e5912592, dic. 2020, doi: 10.1155/2020/5912592.
- [55] D. Sánchez-Campos *et al.*, «Modulated Monoclinic Hydroxyapatite: The Effect of pH in the Microwave Assisted Method», *Minerals*, vol. 11, n.º 3, Art. n.º 3, mar. 2021, doi: 10.3390/min11030314.
- [56] L. S. Villaseñor-Cerón, V. Rodríguez-Lugo, M. I. Reyes-Valderrama, E. Salinas-Rodríguez, y D. Mendoza Anaya, «Aplicación del MEB-EDS en el estudio morfológico y químico-elemental de hidroxiapatita sintetizada en presencia de PVP», *Pädi Bol.*

*Científico Cienc. Básicas E Ing. ICBI*, vol. 9, n.º Especial2, pp. 50-56, dic. 2021, doi: 10.29057/icbi.v9iEspecial2.8021.

- [57] H. Nosrati, S. Pourmotabed, y E. Sharifi, «A Review on Some Natural Biopolymers and Their Applications in Angiogenesis and Tissue Engineering», *J. Appl. Biotechnol. Rep.*, vol. 5, n.º 3, pp. 81-91, sep. 2018, doi: 10.29252/JABR.05.03.01.
- [58] M. Okamoto y B. John, «Synthetic biopolymer nanocomposites for tissue engineering scaffolds», *Prog. Polym. Sci.*, vol. 38, n.º 10, pp. 1487-1503, oct. 2013, doi: 10.1016/j.progpolymsci.2013.06.001.
- [59] S. H. Rao, B. Harini, R. P. K. Shadamarshan, K. Balagangadharan, y N. Selvamurugan, «Natural and synthetic polymers/bioceramics/bioactive compounds-mediated cell signalling in bone tissue engineering», *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 110, pp. 88-96, abr. 2018, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2017.09.029.
- [60] V. Ulloa y M. José, «Estudio de la degradación del poli (ácido L-láctico-co-glicólico) para la dosificación de Everolimus en medio dinámico.», abr. 2017, Accedido: 20 de enero de 2023. [En línea]. Disponible en: <http://tesis.ipn.mx:8080/xmlui/handle/123456789/21700>
- [61] R. Langer y J. P. Vacanti, «Tissue engineering», *Science*, vol. 260, n.º 5110, pp. 920-926, may 1993, doi: 10.1126/science.8493529.
- [62] A. G. Coombes y J. D. Heckman, «Gel casting of resorbable polymers. 1. Processing and applications», *Biomaterials*, vol. 13, n.º 4, pp. 217-224, 1992, doi: 10.1016/0142-9612(92)90187-s.
- [63] M. C. Wake, P. K. Gupta, y A. G. Mikos, «Fabrication of pliable biodegradable polymer foams to engineer soft tissues», *Cell Transplant.*, vol. 5, n.º 4, pp. 465-473, jul. 1996, doi: 10.1016/0963-6897(96)00025-5.

- [64] A. G. Mikos, G. Sarakinos, S. M. Leite, J. P. Vacanti, y R. Langer, «Laminated three-dimensional biodegradable foams for use in tissue engineering», *Biomaterials*, vol. 14, n.º 5, pp. 323-330, abr. 1993, doi: 10.1016/0142-9612(93)90049-8.
- [65] Y. S. Nam y T. G. Park, «Biodegradable polymeric microcellular foams by modified thermally induced phase separation method», *Biomaterials*, vol. 20, n.º 19, pp. 1783-1790, oct. 1999, doi: 10.1016/S0142-9612(99)00073-3.
- [66] D. J. Mooney, D. F. Baldwin, N. P. Suh, J. P. Vacanti, y R. Langer, «Novel approach to fabricate porous sponges of poly(D,L-lactic-co-glycolic acid) without the use of organic solvents», *Biomaterials*, vol. 17, n.º 14, pp. 1417-1422, jul. 1996, doi: 10.1016/0142-9612(96)87284-X.
- [67] L. D. Harris, B. S. Kim, y D. J. Mooney, «Open pore biodegradable matrices formed with gas foaming», *J. Biomed. Mater. Res.*, vol. 42, n.º 3, pp. 396-402, dic. 1998, doi: 10.1002/(sici)1097-4636(19981205)42:3<396::aid-jbm7>3.0.co;2-e.
- [68] Y. Y. Hsu, J. D. Gresser, D. J. Trantolo, C. M. Lyons, P. R. Gangadharam, y D. L. Wise, «Effect of polymer foam morphology and density on kinetics of in vitro controlled release of isoniazid from compressed foam matrices», *J. Biomed. Mater. Res.*, vol. 35, n.º 1, pp. 107-116, abr. 1997, doi: 10.1002/(sici)1097-4636(199704)35:1<107::aid-jbm11>3.0.co;2-g.
- [69] L. Lu y A. G. Mikos, «The Importance of New Processing Techniques in Tissue Engineering», *MRS Bull.*, vol. 21, n.º 11, pp. 28-32, nov. 1996, doi: 10.1557/S088376940003181X.
- [70] A. G. Mikos, Y. Bao, L. G. Cima, D. E. Ingber, J. P. Vacanti, y R. Langer, «Preparation of poly(glycolic acid) bonded fiber structures for cell attachment and transplantation», *J. Biomed. Mater. Res.*, vol. 27, n.º 2, pp. 183-189, feb. 1993, doi: 10.1002/jbm.820270207.

- [71] D. Gorth y T. J Webster, «Matrices for tissue engineering and regenerative medicine», en *Biomaterials for Artificial Organs*, Elsevier, 2011, pp. 270-286. doi: 10.1533/9780857090843.2.270.
- [72] I. Puerto Lecanda, E. Díaz Tajada, y M. del M. Ibáñez Fernandez, «Andamios de PLGA/nHA para regeneración ósea, efectos de su composición sobre Citotoxicidad y degradación In Vitro», *Servicio Editorial de la Universidad del País Vasco/Euskal Herriko Unibertsitatearen Argitalpen Zerbitzua.*, n.º Archivo Digital para la Docencia y la Investigación., pp. 152-154, 31 de diciembre de 2018.
- [73] H. Nie y C.-H. Wang, «Fabrication and characterization of PLGA/HAp composite scaffolds for delivery of BMP-2 plasmid DNA», *J. Controlled Release*, vol. 120, n.º 1, pp. 111-121, jul. 2007, doi: 10.1016/j.jconrel.2007.03.018.
- [74] H. Luo *et al.*, «Incorporation of hydroxyapatite into nanofibrous PLGA scaffold towards improved breast cancer cell behavior», *Mater. Chem. Phys.*, vol. 226, pp. 177-183, mar. 2019, doi: jaco.
- [75] J. E. Song, D. H. Lee, G. Khang, y S.-J. Yoon, «Accelerating bone regeneration using poly(lactic-co-glycolic acid)/hydroxyapatite scaffolds containing duck feet-derived collagen», *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 229, pp. 486-495, feb. 2023, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2022.12.296.
- [76] V. Sokolova, K. Kostka, K. T. Shalumon, O. Prymak, J.-P. Chen, y M. Epple, «Synthesis and characterization of PLGA/HAP scaffolds with DNA-functionalised calcium phosphate nanoparticles for bone tissue engineering», *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, vol. 31, n.º 11, p. 102, nov. 2020, doi: 10.1007/s10856-020-06442-1.
- [77] X. Liang *et al.*, «Bilayered PLGA/PLGA-HAp Composite Scaffold for Osteochondral Tissue Engineering and Tissue Regeneration», *ACS Biomater. Sci. Eng.*, vol. 4, n.º 10, pp. 3506-3521, oct. 2018, doi: 10.1021/acsbomaterials.8b00552.
- [78] S. Selvaraju, S. Ramalingam, y J. R. Rao, «Inorganic apatite nanomaterial: Modified surface phenomena and its role in developing collagen based polymeric bio-composite

- (Coll-PLGA/HAp) for biological applications», *Colloids Surf. B Biointerfaces*, vol. 172, pp. 734-742, dic. 2018, doi: 10.1016/j.colsurfb.2018.09.038.
- [79] G. Duffo, *Biomateriales: Materiales y materias primas*, vol. 3. Encuentro, 2011. [En línea]. Disponible en: <http://www.bnm.me.gov.ar/giga1/documentos/EL007269.pdf>
- [80] S. Ajmal, F. Athar Hashmi, y I. Imran, «Recent progress in development and applications of biomaterials», *Mater. Today Proc.*, vol. 62, pp. 385-391, ene. 2022, doi: 10.1016/j.matpr.2022.04.233.
- [81] I. Barrios de Arenas, M. Vásquez, U. Spadavecchia, S. Camero, y G. González, «Estudio comparativo de la bioactividad de diferentes materiales cerámicos sumergidos en fluido simulado del cuerpo», *Rev. Latinoam. Metal. Mater.*, vol. 25, n.º 1-2, pp. 23-31, ene. 2005.
- [82] T. Federico, «Diseño y caracterización de andamios reabsorbibles para emular tejido óseo y estimular mecanismos de osificación.», sep. 2020, Accedido: 1 de enero de 2023. [En línea]. Disponible en: <http://ri.unsam.edu.ar/handle/123456789/1322>
- [83] R. Donate, M. Monzón, y M. E. Alemán-Domínguez, «Additive manufacturing of PLA-based scaffolds intended for bone regeneration and strategies to improve their biological properties», *E-Polym.*, vol. 20, n.º 1, pp. 571-599, ene. 2020, doi: 10.1515/epoly-2020-0046.
- [84] Valery Vasiliev y Evgeny Morozov, *Advanced Mechanics of Composite Materials and Structural Elements - 3rd Edition*. [En línea]. Disponible en: <https://www.elsevier.com/books/advanced-mechanics-of-composite-materials-and-structural-elements/vasiliev/978-0-08-098231-1>
- [85] P. Fernández M., V. Martínez, M. Valencia, y J. Cruz, «APLICACIONES DE LOS MATERIALES COMPUESTOS DE MATRIZ METÁLICA EN EL SECTOR ELÉCTRICO Y ELECTRÓNICO», *DYNA*, vol. 73, n.º 149, pp. 131-140, jul. 2006.

- [86] TWI, «What is a Composite Material? (A Definitive Guide)». <https://www.twi-global.com/technical-knowledge/faqs/what-is-a-composite-material.aspx>
- [87] J. L. Dávila *et al.*, «NUEVOS MATERIALES: APLICACIONES ESTRUCTURALES E INDUSTRIALES», QUITO/ IMPREFEPP/ 2011, 2011. Accedido: 2 de enero de 2023. [En línea]. Disponible en: <http://bibdigital.epn.edu.ec/handle/15000/4532>
- [88] It-Meng Bajo y yu dong, «Prefacio - ScienceDirect», Accedido: 17 de abril de 2023. [En línea]. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128205129099883>
- [89] Derek Hull, «Materiales compuestos - Google Books». [https://www.google.com.mx/books/edition/Materiales\\_compuestos/cxo3EAAAQBAJ?hl=es&gbpv=1&dq=inauthor:%22Derek.+Hull%22&printsec=frontcover](https://www.google.com.mx/books/edition/Materiales_compuestos/cxo3EAAAQBAJ?hl=es&gbpv=1&dq=inauthor:%22Derek.+Hull%22&printsec=frontcover)
- [90] Noam Eliaz y Noah Metoki, «Calcium Phosphate Bioceramics: A Review of Their History, Structure, Properties, Coating Technologies and Biomedical Applications - PubMed», *PubMed*, doi: 10.3390/ma10040334.
- [91] J. F. R. Valle, V. M. P. Puyana, M. F. Angel, y A. R. García, «Biomateriales: desarrollo de andamios para ingeniería de tejidos», en *Avances en la investigación en ciencia e ingeniería, 2019, ISBN 978-84-120057-2-1, págs. 243-251*, 3ciencias, 2019, pp. 243-251. Accedido: 28 de febrero de 2022. [En línea]. Disponible en: <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=7173548>
- [92] I. Hidalgo, J. Ramírez, M. Sabino, y A. Müller, «OBTENCIÓN DE ESTRUCTURAS TIPO ANDAMIO DE POLI(ÁCIDO) LÁCTICO PARA BIOINGENIERÍA MEDIANTE ELECTROSPINNING», *Rev. Latinoam. Metal. Mater.*, pp. 28-29, abr. 2011.
- [93] B. D. Ratner y G. Zhang, «1.1.2 - A History of Biomaterials», en *Biomaterials Science (Fourth Edition)*, W. R. Wagner, S. E. Sakiyama-Elbert, G. Zhang, y M. J. Yaszemski, Eds., Academic Press, 2020, pp. 21-34. doi: 10.1016/B978-0-12-816137-1.00002-7.

- [94] M. Vallet-Regi, *Bio-Ceramics with Clinical Applications*. New York, UNITED KINGDOM: John Wiley & Sons, Incorporated, 2014. Accedido: 29 de abril de 2022. [En línea]. Disponible en: <http://ebookcentral.proquest.com/lib/uaeh/detail.action?docID=1712693>
- [95] O. D. Acevedo Rueda, P. Fernández-Morales, y J. Ramirez, «Definición geométrica de andamios metálicos para posibles aplicaciones en ingeniería de tejidos», *INGE CUC*, vol. 15, n.º 1, pp. 17-24, mar. 2019, doi: 10.17981/ingecuc.15.1.2019.02.
- [96] S. A. Bencherif, T. M. Braschler, y P. Renaud, «Advances in the design of macroporous polymer scaffolds for potential applications in dentistry», *J. Periodontal Implant Sci.*, vol. 43, n.º 6, pp. 251-261, dic. 2013, doi: 10.5051/jpis.2013.43.6.251.
- [97] V. Karageorgiou y D. Kaplan, «Porosity of 3D biomaterial scaffolds and osteogenesis», *Biomaterials*, vol. 26, n.º 27, pp. 5474-5491, sep. 2005, doi: 10.1016/j.biomaterials.2005.02.002.
- [98] B. A. E. Ben-Arfa y R. C. Pullar, «A Comparison of Bioactive Glass Scaffolds Fabricated by Robocasting from Powders Made by Sol–Gel and Melt-Quenching Methods», *Processes*, vol. 8, n.º 5, Art. n.º 5, may 2020, doi: 10.3390/pr8050615.
- [99] «ASTM C373.pdf», *Google Docs*. [https://drive.google.com/file/d/1PgLVFQGx2Sn4qN8gKnEav2qZ1vRcXsLd/view?usp=sharing&usp=embed\\_facebook](https://drive.google.com/file/d/1PgLVFQGx2Sn4qN8gKnEav2qZ1vRcXsLd/view?usp=sharing&usp=embed_facebook) (accedido 29 de abril de 2022).
- [100] ATRIA Innovation, «¿Cómo medir la porosidad de los materiales?», *ATRIA Innovation*, 16 de febrero de 2021. <https://www.atriainnovation.com/como-medir-la-porosidad-de-los-materiales/>
- [101] C. A. Guerrero F, C. Martínez, J. Sarmiento, y C. A. Cardozo, «LA PROTEÍNA DE ESTRÉS, HEAT SHOCK COGNATE (HSC70) SE SOBREEXPRESA EN OSTEÓBLASTOS SOMETIDOS A CENTRIFUGACIÓN», *Rev. Fac. Med.*, vol. 54, n.º 3, pp. 169-180, jul. 2006.

- [102] Paulina Luciel Lugo de León, «Desarrollo de un porógeno sintético para la preparación de carbón activado con alta área superficial», 7 de diciembre de 2017. Accedido: 19 de enero de 2023. [En línea]. Disponible en: <http://ciqa.repositorioinstitucional.mx/jspui/handle/1025/332>
- [103] C. Wu y J. Chang, «Mesoporous bioactive glasses: structure characteristics, drug/growth factor delivery and bone regeneration application», *Interface Focus*, vol. 2, n.º 3, pp. 292-306, jun. 2012, doi: 10.1098/rsfs.2011.0121.
- [104] A. D. V. Souza, C. C. Arruda, L. Fernandes, M. L. P. Antunes, P. K. Kiyohara, y R. Salomão, «Characterization of aluminum hydroxide (Al(OH)<sub>3</sub>) for use as a porogenic agent in castable ceramics», *J. Eur. Ceram. Soc.*, vol. 35, n.º 2, pp. 803-812, feb. 2015, doi: 10.1016/j.jeurceramsoc.2014.09.010.
- [105] X. Liang *et al.*, «Design and preparation of quasi-spherical salt particles as water-soluble porogens to fabricate hydrophobic porous scaffolds for tissue engineering and tissue regeneration», *Mater. Chem. Front.*, vol. 2, n.º 8, pp. 1539-1553, jul. 2018, doi: 10.1039/C8QM00152A.
- [106] F. R. Mansour, S. Waheed, B. Paull, y F. Maya, «Porogens and porogen selection in the preparation of porous polymer monoliths», *J. Sep. Sci.*, vol. 43, n.º 1, pp. 56-69, 2020, doi: 10.1002/jssc.201900876.
- [107] E. M. Aarden, P. J. Nijweide, y E. H. Burger, «Function of osteocytes in bone», *J. Cell. Biochem.*, vol. 55, n.º 3, pp. 287-299, 1994, doi: 10.1002/jcb.240550304.
- [108] T. Adachi, Y. Osako, M. Tanaka, M. Hojo, y S. J. Hollister, «Framework for optimal design of porous scaffold microstructure by computational simulation of bone regeneration», *Biomaterials*, vol. 27, n.º 21, pp. 3964-3972, jul. 2006, doi: 10.1016/j.biomaterials.2006.02.039.
- [109] D. Bokov *et al.*, «Nanomaterial by Sol-Gel Method: Synthesis and Application», *Adv. Mater. Sci. Eng.*, vol. 2021, p. e5102014, dic. 2021, doi: 10.1155/2021/5102014.

- [110] Y. Cao *et al.*, «The influence of architecture on degradation and tissue ingrowth into three-dimensional poly(lactic-co-glycolic acid) scaffolds in vitro and in vivo», *Biomaterials*, vol. 27, n.º 14, pp. 2854-2864, may 2006, doi: 10.1016/j.biomaterials.2005.12.015.
- [111] H.-K. Chang y P.-Y. Chen, «Synthesis of silica-based scaffolds with high porosity and controllable microstructure by a sintering-free sol-gel/freeze-casting hybrid method under mild conditions», *J. Mater. Res. Technol.*, vol. 9, n.º 6, pp. 16167-16178, nov. 2020, doi: 10.1016/j.jmrt.2020.11.057.
- [112] T. L. do A. Montanheiro *et al.*, «Recent progress on polymer scaffolds production: Methods, main results, advantages and disadvantages», *Express Polym. Lett.*, vol. 16, n.º 2, pp. 197-219, 2022, doi: 10.3144/expresspolymlett.2022.16.
- [113] E. Saygili, A. A. Dogan-Gurbuz, O. Yesil-Celiktas, y M. S. Draz, «3D bioprinting: A powerful tool to leverage tissue engineering and microbial systems», *Bioprinting*, vol. 18, p. e00071, jun. 2020, doi: 10.1016/j.bprint.2019.e00071.
- [114] H. R. Ramay y M. Zhang, «Preparation of porous hydroxyapatite scaffolds by combination of the gel-casting and polymer sponge methods», *Biomaterials*, vol. 24, n.º 19, pp. 3293-3302, ago. 2003, doi: 10.1016/S0142-9612(03)00171-6.
- [115] Z. Y. Wu, R. G. Hill, S. Yue, D. Nightingale, P. D. Lee, y J. R. Jones, «Melt-derived bioactive glass scaffolds produced by a gel-cast foaming technique», *Acta Biomater.*, vol. 7, n.º 4, pp. 1807-1816, abr. 2011, doi: 10.1016/j.actbio.2010.11.041.
- [116] J. H. Kim, J. H. Lee, T. Y. Yang, S. Y. Yoon, B. K. Kim, y H. C. Park, «TBA-based freeze/gel casting of porous hydroxyapatite scaffolds», *Ceram. Int.*, vol. 37, n.º 7, pp. 2317-2322, sep. 2011, doi: 10.1016/j.ceramint.2011.03.023.
- [117] S. Sánchez-Salcedo, J. Werner, y M. Vallet-Regí, «Hierarchical pore structure of calcium phosphate scaffolds by a combination of gel-casting and multiple tape-casting methods», *Acta Biomater.*, vol. 4, n.º 4, pp. 913-922, jul. 2008, doi: 10.1016/j.actbio.2008.02.005.

- [118] F. Afghah *et al.*, «3D Fiber Reinforced Hydrogel Scaffolds by Melt Electrowriting and Gel Casting as a Hybrid Design for Wound Healing», *Adv. Healthc. Mater.*, vol. 11, n.º 11, p. 2102068, 2022, doi: 10.1002/adhm.202102068.
- [119] K. A. Kravanja y M. Finšgar, «A review of techniques for the application of bioactive coatings on metal-based implants to achieve controlled release of active ingredients», *Mater. Des.*, vol. 217, p. 110653, may 2022, doi: 10.1016/j.matdes.2022.110653.
- [120] F. Safaei, S. Khalili, S. N. Khorasani, L. Ghasemi-Mobarakeh, y R. E. Neisiany, «Porogen Effect of Solvents on Pore Size Distribution of Solvent-Casted Polycaprolactone Thin Films», *J. Polym. Sci. Eng.*, vol. 1, n.º 4, Art. n.º 4, ene. 2018, doi: 10.24294/jpse.v1i4.1076.
- [121] J. D. Mackenzie, «Applications of the sol-gel process», *J. Non-Cryst. Solids*, vol. 100, n.º 1, pp. 162-168, mar. 1988, doi: 10.1016/0022-3093(88)90013-0.
- [122] H. Janik y M. Marzec, «A review: Fabrication of porous polyurethane scaffolds», *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 48, pp. 586-591, mar. 2015, doi: 10.1016/j.msec.2014.12.037.
- [123] H. Janik y M. Marzec, «A review: Fabrication of porous polyurethane scaffolds», *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 48, pp. 586-591, mar. 2015, doi: 10.1016/j.msec.2014.12.037.
- [124] J. Ju, Z. Gu, X. Liu, S. Zhang, X. Peng, y T. Kuang, «Fabrication of bimodal open-porous poly (butylene succinate)/cellulose nanocrystals composite scaffolds for tissue engineering application», *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 147, pp. 1164-1173, mar. 2020, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2019.10.085.
- [125] L. Wang, D. Wang, Y. Zhou, Y. Zhang, Q. Li, y C. Shen, «Fabrication of open-porous PCL/PLA tissue engineering scaffolds and the relationship of foaming process, morphology, and mechanical behavior», *Polym. Adv. Technol.*, vol. 30, n.º 10, pp. 2539-2548, 2019, doi: 10.1002/pat.4701.
- [126] P. Liu, W. Chen, C. Liu, M. Tian, y P. Liu, «A novel poly (vinyl alcohol)/poly (ethylene glycol) scaffold for tissue engineering with a unique bimodal open-celled

- structure fabricated using supercritical fluid foaming», *Sci. Rep.*, vol. 9, n.º 1, Art. n.º 1, jul. 2019, doi: 10.1038/s41598-019-46061-7.
- [127] Z. Xie, M. Gao, A. O. Lobo, y T. J. Webster, «3D Bioprinting in Tissue Engineering for Medical Applications: The Classic and the Hybrid», *Polymers*, vol. 12, n.º 8, Art. n.º 8, ago. 2020, doi: 10.3390/polym12081717.
- [128] H.-J. Jeong, H. Nam, J. Jang, y S.-J. Lee, «3D Bioprinting Strategies for the Regeneration of Functional Tubular Tissues and Organs», *Bioengineering*, vol. 7, n.º 2, Art. n.º 2, jun. 2020, doi: 10.3390/bioengineering7020032.
- [129] Y. Zhang *et al.*, «Biomaterials Based on Marine Resources for 3D Bioprinting Applications», *Mar. Drugs*, vol. 17, n.º 10, Art. n.º 10, oct. 2019, doi: 10.3390/md17100555.
- [130] S. Pramanik, S. Kharche, N. More, D. Ranglani, y G. Kapusetti, «Natural Biopolymers for Bone Tissue Engineering: A Brief Review», *Eng. Regen.*, dic. 2022, doi: 10.1016/j.engreg.2022.12.002.
- [131] T.-T. Li, Y. Zhang, H.-T. Ren, H.-K. Peng, C.-W. Lou, y J.-H. Lin, «Two-step strategy for constructing hierarchical pore structured chitosan–hydroxyapatite composite scaffolds for bone tissue engineering», *Carbohydr. Polym.*, vol. 260, p. 117765, may 2021, doi: 10.1016/j.carbpol.2021.117765.
- [132] A. Kara, S. Tamburaci, F. Tihminlioglu, y H. Havitcioglu, «Bioactive fish scale incorporated chitosan biocomposite scaffolds for bone tissue engineering», *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 130, pp. 266-279, jun. 2019, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2019.02.067.
- [133] F. D. Cojocar *et al.*, «Biopolymers – Calcium phosphates composites with inclusions of magnetic nanoparticles for bone tissue engineering», *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 125, pp. 612-620, mar. 2019, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2018.12.083.
- [134] H. S. Sofi, T. Akram, N. Shabir, R. Vasita, A. H. Jadhav, y F. A. Sheikh, «Regenerated cellulose nanofibers from cellulose acetate: Incorporating hydroxyapatite (HAp) and silver (Ag) nanoparticles (NPs), as a scaffold for tissue engineering

- applications», *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 118, p. 111547, ene. 2021, doi: 10.1016/j.msec.2020.111547.
- [135] M. Hospodiuk-Karwowski *et al.*, «Dual-charge bacterial cellulose as a potential 3D printable material for soft tissue engineering», *Compos. Part B Eng.*, vol. 231, p. 109598, feb. 2022, doi: 10.1016/j.compositesb.2021.109598.
- [136] T. D. H. Le, V. Liaudanskaya, W. Bonani, C. Migliaresi, y A. Motta, «Enhancing bioactive properties of silk fibroin with diatom particles for bone tissue engineering applications», *J. Tissue Eng. Regen. Med.*, vol. 12, n.º 1, pp. 89-97, 2018, doi: 10.1002/term.2373.
- [137] G. Ramanathan, T. Muthukumar, y U. Tirichurapalli Sivagnanam, «In vivo efficiency of the collagen coated nanofibrous scaffold and their effect on growth factors and pro-inflammatory cytokines in wound healing», *Eur. J. Pharmacol.*, vol. 814, pp. 45-55, nov. 2017, doi: 10.1016/j.ejphar.2017.08.003.
- [138] López, Héctor R., «Poliésteres Alifáticos», n.º 24-26. Accedido: 2 de enero de 2023. [En línea]. Disponible en: <https://ciqa.mx/PoliesteresAlifaticos.aspx>
- [139] A. M. Maadani y E. Salahinejad, «Performance comparison of PLA- and PLGA-coated porous bioceramic scaffolds: Mechanical, biodegradability, bioactivity, delivery and biocompatibility assessments», *J. Controlled Release*, vol. 351, pp. 1-7, nov. 2022, doi: 10.1016/j.jconrel.2022.09.022.
- [140] C. M. Agrawal y R. B. Ray, «Biodegradable polymeric scaffolds for musculoskeletal tissue engineering», *J. Biomed. Mater. Res.*, vol. 55, n.º 2, pp. 141-150, may 2001, doi: 10.1002/1097-4636(200105)55:2<141::aid-jbm1000>3.0.co;2-j.
- [141] B. I. C. Cristerna, A. de J. P. Guillén, M. Q. Ruíz, y H. Flores, «Síntesis y caracterización de microesferas de ácido Poli(D,L-Láctico-CO-Glicólico) cargadas con albúmina sérica de bovino», *Rev. Iberoam. Polímeros*, vol. 15, n.º 6, pp. 301-311, 2014.
- [142] V. K. Thakur y M. K. Thakur, *Handbook of Polymers for Pharmaceutical Technologies, Structure and Chemistry*. Hoboken, UNITED STATES: John Wiley &

- Sons, Incorporated, 2015. Accedido: 2 de enero de 2023. [En línea]. Disponible en: <http://ebookcentral.proquest.com/lib/uaeh/detail.action?docID=4040719>
- [143] J. E. Rosas y J. L. Pedraz, «Microesferas de PLGA: un sistema para la liberación controlada de moléculas con actividad inmunogénica», *Rev. Colomb. Cienc. Quím.-Farm.*, vol. 36, n.º 2, Art. n.º 2, jul. 2007, Accedido: 19 de enero de 2023. [En línea]. Disponible en: <https://revistas.unal.edu.co/index.php/rccquifa/article/view/1574>
- [144] Fabio Zuluaga, «ALGUNAS APLICACIONES DEL ÁCIDO POLI-L-LÁCTICO». Accedido: 2 de enero de 2023. [En línea]. Disponible en: [http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0370-39082013000100009](http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0370-39082013000100009)
- [145] C. Rueda, I. Vallejo, M. Corea, E. G. Palacios, y I. Chairez, «Degradation study of poly(lactic-L(+)-co-glycolic acid) in chloroform», *Rev. Mex. Ing. Quím.*, vol. 14, n.º 3, pp. 813-827, dic. 2015.
- [146] X. S. Wu y N. Wang, «Synthesis, characterization, biodegradation, and drug delivery application of biodegradable lactic/glycolic acid polymers. Part II: Biodegradation», *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.*, vol. 12, n.º 1, pp. 21-34, ene. 2001, doi: 10.1163/156856201744425.
- [147] B. Shiroud Heidari *et al.*, «Natural, synthetic and commercially-available biopolymers used to regenerate tendons and ligaments», *Bioact. Mater.*, vol. 19, pp. 179-197, ene. 2023, doi: 10.1016/j.bioactmat.2022.04.003.
- [148] L. L. Lao, N. A. Peppas, F. Y. C. Boey, y S. S. Venkatraman, «Modeling of drug release from bulk-degrading polymers», *Int. J. Pharm.*, vol. 418, n.º 1, pp. 28-41, oct. 2011, doi: 10.1016/j.ijpharm.2010.12.020.
- [149] P. Ferruti, M. Penco, P. D'Addato, E. Ranucci, y R. Deghenghi, «Synthesis and properties of novel block copolymers containing poly(lactic-glycolic acid) and poly(ethyleneglycol) segments», *Biomaterials*, vol. 16, n.º 18, pp. 1423-1428, dic. 1995, doi: 10.1016/0142-9612(95)96879-5.

- [150] D. G. Ryan y L. A. J. O'Neill, «Krebs Cycle Reborn in Macrophage Immunometabolism», *Annu. Rev. Immunol.*, vol. 38, n.º 1, pp. 289-313, 2020, doi: 10.1146/annurev-immunol-081619-104850.
- [151] J. L. M. Valderrey, «El ciclo de Krebs», *Naturaleza y turismo*. <https://www.asturnatura.com/catabolismo/ciclo-de-krebs.html> (accedido 30 de enero de 2023).
- [152] A. Serra-Pérez *et al.*, «Extended Ischemia Prevents HIF1 $\alpha$  Degradation at Reoxygenation by Impairing Prolyl-hydroxylation: ROLE OF KREBS CYCLE METABOLITES\*», *J. Biol. Chem.*, vol. 285, n.º 24, pp. 18217-18224, jun. 2010, doi: 10.1074/jbc.M110.101048.
- [153] J. D. Caicedo Ruiz, J. J. Diaztagle Fernández, J. I. Alvarado Sánchez, S. I. Latorre Alfonso, M. Ocampo Posada, y L. E. Cruz Martínez, «Intermediarios del ciclo de Krebs en sepsis: una revisión sistemática», *Acta Colomb. Cuid. Intensivo*, vol. 21, n.º 1, pp. 42-50, ene. 2021, doi: 10.1016/j.acci.2020.02.002.
- [154] Amin Gasmi, Massimiliano Peana, Maria Arshad, Monica Butnariu, Alain Menzel, y Geir Bjørklund, «Krebs cycle: activators, inhibitors and their roles in the modulation of carcinogenesis | SpringerLink». <https://link.springer.com/article/10.1007/s00204-021-02974-9> (accedido 31 de enero de 2023).
- [155] S. Zhang, *Biological and Biomedical Coatings Handbook: Applications*. Baton Rouge, UNITED STATES: Taylor & Francis Group, 2011. Accedido: 2 de enero de 2023. [En línea]. Disponible en: <http://ebookcentral.proquest.com/lib/uaeh/detail.action?docID=708939>
- [156] S. Esteban-Gómez, A. Sánchez-Catillo, E. Salinas-Rodriguez, M. I. Reyes-Valderrama, y V. Rodríguez-Lugo, «Simulación estructural de hidroxapatita con base en la teoría del funcional de la densidad», *Tópicos Investig. En Cienc. Tierra Mater.*, vol. 4, pp. 44-55, oct. 2017, doi: 10.29057/aactm.v4i4.9379.

- [157] J. R. Viana, A. A. M. Macêdo, A. O. dos Santos, P. de F. Façanha Filho, M. P. F. Graça, y C. C. da Silva, «Análise comparativa da síntese de hidroxiapatita via estado sólido», *Matér. Rio Jan.*, vol. 25, p. e, abr. 2020, doi: 10.1590/S1517-707620200001.0914.
- [158] Jorge Campa Molina, Guadalupe Sandra Ulloa Godínez, Lauro Bucio Galindo, Irma A. Belío, Rodrigo Velazquez, y Eric M. Rivera Muñoz, *Biomateriales. Fundamentos, técnicas y aplicaciones*, Universidad de Guadalajara. Centro Universitario de la Ciénega, 2007.
- [159] V. Rodríguez-Lugo, J. S. Hernández, M. J. Arellano-Jimenez, P. H. Hernández-Tejeda, y S. Recillas-Gispert, «Characterization of hydroxyapatite by electron microscopy», *Microsc. Microanal. Off. J. Microsc. Soc. Am. Microbeam Anal. Soc. Microsc. Soc. Can.*, vol. 11, n.º 6, pp. 516-523, dic. 2005, doi: 10.1017/S1431927605050646.
- [160] C. Méndez Ramos, «Preparación y caracterización de biomateriales híbridos de hidroxiapatito con fosfonato (2-Hidroxi fosfonoacetato)», *Preparation and characterization of phosphonate-hydroxyapatite hybrid compounds for use as biomaterials*, jun. 2016, Accedido: 3 de enero de 2023. [En línea]. Disponible en: <https://riuma.uma.es/xmlui/handle/10630/11553>
- [161] S. L. Ortiz, V. Rodríguez-Lugo, L. S. Villaseñor-Cerón, M. I. Reyes-Valderrama, D. E. Salado-Leza, y D. Mendoza-Anaya, «El Potencial de la Hidroxiapatita Dopada como Sensor Termoluminiscente de Radiación ionizante», *Pädi Bol. Científico Cienc. Básicas E Ing. ICBI*, vol. 8, n.º Especial, Art. n.º Especial, dic. 2020, doi: 10.29057/icbi.v8iEspecial.6310.
- [162] C. Vidal Millán, «Estudio del óxido de grafeno como refuerzo mecánico y agente nucleante en andamiajes de policaprolactona, fabricados por el método Freeze Extraction, con futura aplicación en injertos de hueso», Proyecto/Trabajo fin de carrera/grado, Universitat Politècnica de València, 2019. Accedido: 3 de enero de 2023. [En línea]. Disponible en: <https://riunet.upv.es/handle/10251/124775>

- [163] The Materials Project, «Monoclinic Structure», *Materials Project*.  
[https://materialsproject.org/materials/mp-721624?formula=Ca5\(PO4\)3\(OH\)](https://materialsproject.org/materials/mp-721624?formula=Ca5(PO4)3(OH))
- [164] Material Project, «Hexagonal structure», *Materials Project*.  
[https://materialsproject.org/materials/mp-41472?formula=Ca5\(PO4\)3\(OH\)](https://materialsproject.org/materials/mp-41472?formula=Ca5(PO4)3(OH))
- [165] A. Szcześ, L. Hołysz, y E. Chibowski, «Synthesis of hydroxyapatite for biomedical applications», *Adv. Colloid Interface Sci.*, vol. 249, pp. 321-330, nov. 2017.
- [166] D. Anaya-Barajas *et al.*, «Biomateriales para Regeneración de Tejido Óseo Extraídos de Desechos de Pescado», *Rev. Mex. Ing. Bioméd.*, vol. 40, n.º 3, dic. 2019, doi: 10.17488/rmib.40.3.13.
- [167] Caballero Dorantes, Alberto, Gutiérrez-Arzaluz, Mirella, Rojas-Trigos, Bruno, Aguilar-Martínez, Octavio, y Torres-Rodríguez, Miguel, «Síntesis de hidroxiapatita con hierro», Universidad Autónoma Metropolitana, 2019. [En línea]. Disponible en: <http://zaloamati.azc.uam.mx/handle/11191/7829>
- [168] «Aplicación del MEB-EDS en el estudio morfológico y químico-elemental de hidroxiapatita sintetizada en presencia de PVP | Padi Boletín Científico de Ciencias Básicas e Ingenierías del ICBI». <https://repository.uaeh.edu.mx/revistas/index.php/icbi/article/view/8021> (accedido 21 de abril de 2023).
- [169] L.S. Villaseñor-Cerón, M. I. Reyes-Valderrama, S. López-Ortiz, E. Salinas-Rodríguez, y V. Rodríguez-Lugo, «El pH como parámetro en la síntesis de hidroxiapatita y cloroapatita a partir del método hidrotermal asistido por microondas | Padi Boletín Científico de Ciencias Básicas e Ingenierías del ICBI». <https://repository.uaeh.edu.mx/revistas/index.php/icbi/article/view/7727> (accedido 29 de abril de 2023).
- [170] V. Rodríguez-Lugo *et al.*, «Wet chemical synthesis of nanocrystalline hydroxyapatite flakes: effect of pH and sintering temperature on structural and morphological

- properties», *R. Soc. Open Sci.*, vol. 5, n.º 8, p. 180962, ago. 2018, doi: 10.1098/rsos.180962.
- [171] J. González Ocampo, D. M. Escobar Sierra, y C. P. Ossa Orozco, «Métodos de fabricación de cuerpos porosos de hidroxiapatita, revisión del estado del arte», *Rev. ION*, vol. 27, n.º 2, pp. 55-70, dic. 2014.
- [172] D. G. de R. U. México Universidad Nacional Autónoma de, «Repositorio Institucional de la Universidad Nacional Autónoma de México». <http://repositorio.unam.mx> (accedido 30 de abril de 2023).
- [173] M. A. Cárdenas Henao, «Evaluación biológica de sustitutos óseos inyectables a base de fibroína y nanobarras de hidroxiapatita», 2020, Accedido: 30 de abril de 2023. [En línea]. Disponible en: <https://bibliotecadigital.udea.edu.co/handle/10495/15113>
- [174] J. G. Ayala, J. A. Díaz, y M. Chávez-Sifontes, «Propiedades físicas y químicas de materiales tipo hidroxiapatita sintetizados a partir de residuos de la industria alimentaria y empleando un método sol-gel modificado», *Rev. Científica Multidiscip. Univ. El Salv. - Rev. Minerva*, vol. 5, n.º 2, Art. n.º 2, jun. 2022, doi: 10.5377/revminerva.v5i2.15800.
- [175] H. COPETE, MARÍA ESPERANZA LÓPEZ, FABIO VARGAS, ALEJANDRO ECHAVARRÍA, y TATIANA RIOS, «EVALUACIÓN DEL COMPORTAMIENTO IN VITRO DE RECUBRIMIENTOS DE HIDROXIAPATITA DEPOSITADOS MEDIANTE PROYECCIÓN TÉRMICA POR COMBUSTIÓN OXIACETILÉNICA SOBRE UN SUSTRATO DE Ti6Al4V». [En línea]. Disponible en: [http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0012-73532013000100012](http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0012-73532013000100012)
- [176] Paul W. Brown y Racquel Zapanta, *Hydroxyapatite and Related Materials*. CRC Press. Accedido: 25 de enero de 2023. [En línea]. Disponible en: <https://api.taylorfrancis.com/content/books/mono/download?identifierName=doi&identifierValue=10.1201/9780203751367&type=googlepdf>

- [177] M. Sadat-Shojai, M. Atai, y A. Nodehi, «Design of experiments (DOE) for the optimization of hydrothermal synthesis of hydroxyapatite nanoparticles», *J. Braz. Chem. Soc.*, vol. 22, pp. 571-582, mar. 2011, doi: 10.1590/S0103-50532011000300023.
- [178] L. Duplomb, M. Dagouassat, P. Jourdon, y D. Heymann, «Concise Review: Embryonic Stem Cells: A New Tool to Study Osteoblast and Osteoclast Differentiation», *Stem Cells*, vol. 25, n.º 3, pp. 544-552, mar. 2007, doi: 10.1634/stemcells.2006-0395.
- [179] Kenneth S. Saladin, *TEJIDO ÓSEO / Anatomía y fisiología. La unidad entre forma y función, 9e | AccessMedicina | McGraw Hill Medical*. [En línea]. Disponible en: <https://accessmedicina.mhmedical.com/content.aspx?bookid=3137&sectionid=263544496>
- [180] J. A. Riancho y J. Delgado-Calle, «Mecanismos de interacción osteoblasto-osteoclasto», *Reumatol. Clínica*, vol. 7, pp. 1-4, sep. 2011, doi: 10.1016/j.reuma.2011.03.003.
- [181] S. Shahbazi, A. Zamanian, M. Pazouki, y Y. Jafari, «Introducing an attractive method for total biomimetic creation of a synthetic biodegradable bioactive bone scaffold based on statistical experimental design», *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 86, pp. 109-120, may 2018, doi: 10.1016/j.msec.2017.12.033.
- [182] D. M. B. Cumbal, «Reparación del tejido óseo en el envejecimiento», *Morfología*, vol. 12, n.º 2, Art. n.º 2, 2020, Accedido: 11 de enero de 2023. [En línea]. Disponible en: <https://revistas.unal.edu.co/index.php/morfologia/article/view/92688>
- [183] «Biomecánica y hueso (y II): ensayos en los distintos niveles jerárquicos del hueso y técnicas alternativas para la determinación de la resistencia ósea». [https://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1889-836X2013000200007](https://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1889-836X2013000200007) (accedido 10 de enero de 2023).
- [184] M. Prakasam, J. Locs, K. Salma-Ancane, D. Loca, A. Largeteau, y L. Berzina-Cimdina, «Fabrication, Properties and Applications of Dense Hydroxyapatite: A

- Review», *J. Funct. Biomater.*, vol. 6, n.º 4, pp. 1099-1140, dic. 2015, doi: 10.3390/jfb6041099.
- [185] N. J. Kim, S. J. Lee, y A. Atala, «1 - Biomedical nanomaterials in tissue engineering», en *Nanomaterials in Tissue Engineering*, A. K. Gaharwar, S. Sant, M. J. Hancock, y S. A. Hacking, Eds., en Woodhead Publishing Series in Biomaterials. Woodhead Publishing, 2013, pp. 1-25e. doi: 10.1533/9780857097231.1.
- [186] R. Reyes García, P. Rozas Moreno, y M. Muñoz-Torres, «REGULACIÓN DEL PROCESO DE REMODELADO ÓSEO», *REEMO*, vol. 17, n.º 1, pp. 10-14, ene. 2008, doi: 10.1016/S1132-8460(08)71132-2.
- [187] S. R. A. Villanueva y S. R. A. Villanueva, «Desarrollo de poros en la hidroxiapatita para aplicaciones biomédicas», 1999. [En línea]. Disponible en: <https://repositorio.tec.mx/handle/11285/628357>
- [188] C. de la G. Páez, Ó. F. M. Lemus, R. G. Martínez, R. A. B. Navarro, y E. Á. Lozano, «Banco de hueso y tejidos: Alta tecnología disponible para los ortopedistas mexicanos», *Acta Ortopédica Mex.*, vol. 18, n.º 6, pp. 261-265, 2004.
- [189] M. Ortiz Domínguez, «La mecánica del hueso, una revisión de los modelos de remodelación óseo», ene. 2018. [En línea]. Disponible en: <https://www.uaeh.edu.mx/investigacion/productos/7866/>
- [190] A. Flores Jacobo, «Fabricación por colada en gel inorgánica de andamios de biovidrio 45s5 para aplicación en regeneración de tejido óseo», ago. 2020, [En línea]. Disponible en: [http://bibliotecavirtual.dgb.umich.mx:8083/xmlui/handle/DGB\\_UMICH/5342](http://bibliotecavirtual.dgb.umich.mx:8083/xmlui/handle/DGB_UMICH/5342)
- [191] Angelina Villani, Arnaldo Millán, y Gema González, «Caracterización físico-química y cerámica de hidroxiapatitas producidas por distintos métodos de síntesis: Parte II: Efectos del tratamiento térmico», *Scielo*. [En línea]. Disponible en: [https://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0798-40652015000100020](https://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0798-40652015000100020)

- [192] N. Abbasi, S. Hamlet, R. M. Love, y N.-T. Nguyen, «Porous scaffolds for bone regeneration», *J. Sci. Adv. Mater. Devices*, vol. 5, n.º 1, pp. 1-9, mar. 2020, doi: 10.1016/j.jsamd.2020.01.007.
- [193] J. Caetano-Lopes, H. Canhao, y J. E. Fonseca, «Osteoblasts and bone formation», *Acta Reumatol. Port.*, vol. 32, n.º 2, pp. 103-110, 2007.
- [194] L. Aguirre, S. B. Finten, y A. R. Vallejos, «Principios básicos en regeneración ósea», *Rev. Fac. Odontol.*, vol. 3, n.º 3, Art. n.º 3, ago. 2021.
- [195] «Activación discreta de BMUs en modelos de remodelación ósea interna». <https://1library.co/document/z3e022eq-activacion-discreta-de-bmus-modelos-remodelacion-osea-interna.html>.
- [196] «REMODELACIÓN ÓSEA». [http://scholar.googleusercontent.com/scholar?q=cache:oydrPe-ceH8J:scholar.google.com/+REMODELACI%C3%93N+%C3%93SEA+Patricia+M.+Mandalunis&hl=es&as\\_sdt=0,5](http://scholar.googleusercontent.com/scholar?q=cache:oydrPe-ceH8J:scholar.google.com/+REMODELACI%C3%93N+%C3%93SEA+Patricia+M.+Mandalunis&hl=es&as_sdt=0,5).
- [197] Lectorio, «Huesos: Remodelación y Curación Ósea». <https://app.lectorio.com/#/article/3721?return=%23%2Fwelcome%3Ffv%3D1>
- [198] ISO, «Evaluación biológica de dispositivos médicos — Parte 1: Evaluación y prueba dentro de un proceso de gestión de riesgos», *Norma ISO 10993-1:2018*. <https://www.iso.org/standard/68936.html>
- [199] ISO, «Evaluación biológica de dispositivos médicos — Parte 5: Pruebas de citotoxicidad in vitro», *Norma ISO 10993-5:2009*. <https://www.iso.org/standard/36406.html>
- [200] T. Mosmann, «Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays», *J. Immunol. Methods*, vol. 65, n.º 1, pp. 55-63, dic. 1983, doi: 10.1016/0022-1759(83)90303-4.

- [201] J. M. Edmondson, L. S. Armstrong, y A. O. Martinez, «A rapid and simple MTT-based spectrophotometric assay for determining drug sensitivity in monolayer cultures», *J. Tissue Cult. Methods*, vol. 11, n.º 1, pp. 15-17, mar. 1988, doi: 10.1007/BF01404408.
- [202] J. A. Plumb, «Cell Sensitivity Assays: The MTT Assay», en *Cancer Cell Culture: Methods and Protocols*, S. P. Langdon, Ed., en *Methods in Molecular Medicine*<sup>TM</sup>. Totowa, NJ: Humana Press, 2004, pp. 165-169. doi: 10.1385/1-59259-406-9:165.
- [203] A. Miri y M. Sarani, «Biological studies of synthesized silver nanoparticles using *Prosopis farcta*», *Mol. Biol. Rep.*, vol. 45, dic. 2018, doi: 10.1007/s11033-018-4299-0.
- [204] John O'Brien, Ian Wilson, Terry Orton, y François Pognan, «Investigación del tinte fluorescente Alamar Blue (resazurina) para la evaluación de la citotoxicidad de células de mamíferos - O'Brien - 2000 - European Journal of Biochemistry - Wiley Online Library». [En línea]. Disponible en: <https://febs.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1046/j.1432-1327.2000.01606.x>
- [205] R. Hamid, Y. Rotshteyn, L. Rabadi, R. Parikh, y P. Bullock, «Comparison of alamar blue and MTT assays for high through-put screening», *Toxicol. In Vitro*, vol. 18, n.º 5, pp. 703-710, oct. 2004, doi: 10.1016/j.tiv.2004.03.012.
- [206] S. N. Rampersad, «Multiple Applications of Alamar Blue as an Indicator of Metabolic Function and Cellular Health in Cell Viability Bioassays», *Sensors*, vol. 12, n.º 9, Art. n.º 9, sep. 2012, doi: 10.3390/s120912347.
- [207] A.-C. Chao, S.-H. Yu, y G.-S. Chuang, «Using NaCl particles as porogen to prepare a highly adsorbent chitosan membranes», *J. Membr. Sci.*, vol. 280, n.º 1, pp. 163-174, sep. 2006, doi: 10.1016/j.memsci.2006.01.016.
- [208] L. Liu, Y. Wang, S. Guo, Z. Wang, y W. Wang, «Porous polycaprolactone/nanohydroxyapatite tissue engineering scaffolds fabricated by combining NaCl and PEG as co-porogens: Structure, property, and chondrocyte–

- scaffold interaction in vitro», *J. Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater.*, vol. 100B, n.º 4, pp. 956-966, 2012, doi: 10.1002/jbm.b.32658.
- [209] N. Verma, S. Zafar, y M. Talha, «Application of microwave energy for rapid fabrication of nano-hydroxyapatite reinforced polycaprolactone composite foam», *Manuf. Lett.*, vol. 23, pp. 9-13, ene. 2020, doi: 10.1016/j.mfglet.2019.11.006.
- [210] R. Scaffaro, F. Lopresti, L. Botta, S. Rigogliuso, y G. Gherzi, «Preparation of three-layered porous PLA/PEG scaffold: relationship between morphology, mechanical behavior and cell permeability», *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.*, vol. 54, pp. 8-20, feb. 2016, doi: 10.1016/j.jmbbm.2015.08.033.
- [211] P. Kumar, A. Nagarajan, y P. D. Uchil, «Analysis of Cell Viability by the alamarBlue Assay», *Cold Spring Harb. Protoc.*, vol. 2018, n.º 6, p. pdb.prot095489, ene. 2018, doi: 10.1101/pdb.prot095489.
- [212] F. J. Aguilar-Perez *et al.*, «Preparation and characterization of titanium-segmented polyurethane composites for bone tissue engineering», *J. Biomater. Appl.*, vol. 33, n.º 1, pp. 11-22, jul. 2018, doi: 10.1177/0885328218772708.
- [213] A. Monshi, M. R. Foroughi, y M. R. Monshi, «Modified Scherrer Equation to Estimate More Accurately Nano-Crystallite Size Using XRD», *World J. Nano Sci. Eng.*, vol. 2, n.º 3, Art. n.º 3, sep. 2012, doi: 10.4236/wjnse.2012.23020.
- [214] S. Streck, H. Neumann, H. Nielsen, T. Rades, y A. McDowell, «Comparison of bulk and microfluidics methods for the formulation of poly-lactic-co-glycolic acid (PLGA) nanoparticles modified with cell-penetrating peptides of different architectures», *Int. J. Pharm. X*, vol. 1, p. 100030, ago. 2019, doi: 10.1016/j.ijpx.2019.100030.
- [215] Y. Fu *et al.*, «Photothermal properties of PLGA/graphene composite nanofiber membrane for potential anti-tumor application», *J. Mol. Struct.*, vol. 1275, p. 134628, mar. 2023, doi: 10.1016/j.molstruc.2022.134628.

- [216] M. Hajian, V. Erfani-Moghadam, M. S. Arabi, A. Soltani, y M. Shahbazi, «A comparison between optimized PLGA and CS-Alg-PLGA microspheres for long-lasting release of glatiramer acetate», *J. Drug Deliv. Sci. Technol.*, vol. 82, p. 104355, abr. 2023, doi: 10.1016/j.jddst.2023.104355.
- [217] M. K. Amin y J. Boateng, «Surface functionalization of PLGA nanoparticles for potential oral vaccine delivery targeting intestinal immune cells», *Colloids Surf. B Biointerfaces*, vol. 222, p. 113121, feb. 2023, doi: 10.1016/j.colsurfb.2022.113121.
- [218] S. H. Youssef, S. Kim, R. Khetan, F. Afinjuomo, Y. Song, y S. Garg, «The development of 5-fluorouracil biodegradable implants: A comparative study of PCL/PLGA blends», *J. Drug Deliv. Sci. Technol.*, vol. 81, p. 104300, mar. 2023, doi: 10.1016/j.jddst.2023.104300.
- [219] J. Xu *et al.*, «Enhanced hydrophilicity of one-step electrosprayed red blood cell-like PLGA microparticles by block polymer PLGA-PEG-PLGA with excellent magnetic-luminescent bifunction and affinity to HUVECs», *Eur. Polym. J.*, vol. 191, p. 112040, jun. 2023, doi: 10.1016/j.eurpolymj.2023.112040.
- [220] A. Kaur, J. Rathee, R. Kanwar, D. Kaushik, D. B. Salunke, y S. K. Mehta, «TLR2 agonistic lipopeptide enriched PLGA nanoparticles as combinatorial drug delivery vehicle», *Colloids Surf. Physicochem. Eng. Asp.*, vol. 647, p. 129084, ago. 2022, doi: 10.1016/j.colsurfa.2022.129084.
- [221] E. Vey, C. Rodger, J. Booth, M. Claybourn, A. F. Miller, y A. Saiani, «Degradation kinetics of poly(lactic-co-glycolic) acid block copolymer cast films in phosphate buffer solution as revealed by infrared and Raman spectroscopies», *Polym. Degrad. Stab.*, vol. 96, n.º 10, pp. 1882-1889, oct. 2011, doi: 10.1016/j.polymdegradstab.2011.07.011.
- [222] J. G. Lugo-Varillas, P. L. Tinedo-López, G. W. Oshiro, A. C. Medina, E. Á. Vidigal, y M. H. Novoa, «Influencia del nivel de pH de geles blanqueadores en la rugosidad superficial del esmalte bovino», *Odovtos - Int. J. Dent. Sci.*, vol. 22, n.º 2, pp. 113-123, feb. 2020.

- [223] M. Abdullah y K. Khairurrijal, «A Simple Method for Determining Surface Porosity Based on SEM Images Using OriginPro Software», *Indones. J. Phys.*, vol. 20, n.º 2, pp. 37-40, nov. 2016, doi: 10.5614/itb.ijp.2009.20.2.4.
- [224] H. Luo *et al.*, «Incorporation of hydroxyapatite into nanofibrous PLGA scaffold towards improved breast cancer cell behavior», *Mater. Chem. Phys.*, vol. 226, pp. 177-183, mar. 2019, doi: 10.1016/j.matchemphys.2019.01.022.
- [225] V. Sokolova, K. Kostka, K. T. Shalumon, O. Prymak, J.-P. Chen, y M. Epple, «Synthesis and characterization of PLGA/HAP scaffolds with DNA-functionalised calcium phosphate nanoparticles for bone tissue engineering», *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, vol. 31, n.º 11, p. 102, nov. 2020, doi: 10.1007/s10856-020-06442-1.

## ANEXOS

### 1. Cursos

1. Por su participación en las conferencias impartidas durante el V Seminario Regional de Materiales Avanzados, mismo que se efectuó de manera virtual, organizado por el Cuerpo Académico de Materiales Avanzados, perteneciente al Área Académica de Ciencias de la Tierra y Materiales, realizado del 6 al 8 de octubre de 2021.

### 2. Congresos Internacionales

1. Blanca Lisbeth Perez, Lesly Sabina Villaseñor Cerón, Demetrio Mendoza Anaya, Jesús Angel Arenas Alatorre, María Isabel Reyes Valderrama, Ventura Rodriguez Lugo presented the contribution: THE EFFECT OF POLYETHYLENE GLYCOL SURFACTANT IN THE FORMATION OF HAP SYNTHESIZED BY THE MICROWAVE-ASSISTED HYDROTHERMAL METHOD. as Poster modality, in the D7. Structural and Chemical Characterization of Metals and Alloys Symposium durante el XXX International Materials Research Congress and International Conference on Advanced Materials del 14-19de agosto al 19 de 2022.
2. Blanca Lisbeth Pérez I am pleased to inform you that your contribution "DEVELOPMENT OF PLGA/HA COMPOSITE SCAFFOLDS BY GEL-CASTING METHOD." by Blanca Lisbeth Perez, María Isabel Reyes Valderrama, Lesly Sabina Villaseñor Cerón, Demetrio Mendoza Anaya, Salvador Ivan Garduño, Ventura Rodriguez Lugo, has been accepted in symposium F3, Biomaterials for Health Applications: Permanent and Temporary Biomedical Implants, Dental and Cosmetics at the 31st International Materials Research Congress, to be held in Cancun in August 13 - 18, 2023.

### 3. Congresos Nacionales

1. Participación en el concurso de carteles científicos presentando el trabajo “Polietilenglicol (PEG) como surfactante y controlador de forma y tamaño en la formación de nanohidroxiapatita (NHAP) por el método hidrotermal asistido por microondas” en el marco de actividades del Primer Congreso Estatal de investigación en Ciencias de los Materiales, compartiendo autoría con “L.S. Villaseñor Cerón, D. Mendoza Anaya, J. A. Arenas Alatorre, M.I. Reyes Valderrama, V. Rodríguez Lugo”,

efectuado de manera virtual y organizado por el Capítulo Estudiantil UAEH – SMMater durante los días 16 y 17 de mayo de 2022.

2. Presentación en póster “Síntesis de andamios compuestos de hidroxiapatita y ácido poliláctico-co-glicólico”, cuya autoría se comparte con: S. López Ortiz, M. I. Reyes Valderrama, D. Mendoza Anaya y V. Rodríguez Lugo, misma que se efectuó de manera virtual, durante el VI Seminario Regional de Materiales Avanzados, organizado por el Cuerpo Académico de Materiales Avanzados perteneciente al Área Académica de Ciencias de la Tierra y Materiales del 5 al 7 de octubre de 2022.
  
4. Organización de congresos y seminarios
  1. Perez Blanca Lisbeth, participó en las actividades del Primer Congreso Estatal de Investigación en Ciencias de los Materiales efectuado de manera virtual y organizado por el Capítulo estudiantil UAEH – SMMater durante los días 16 y 17 de mayo del dos mil veintidós.



August 2022

**TO WHOM IT MAY CONCERN**

P r e s e n t

This is to certify that *Blanca Lisbeth Perez, Lesly Sabina Villaseñor Cerón, Demetrio Mendoza Anaya, Jesús Angel Arenas Alatorre, María Isabel Reyes Valderrama, Ventura Rodriguez Lugo* presented the contribution: **THE EFFECT OF POLYETHYLENE GLYCOL SURFACTANT IN THE FORMATION OF HAP SYNTHESIZED BY THE MICROWAVE- ASSISTED HYDROTHERMAL METHOD.** as **Poster** modality, in the **D7. Structural and Chemical Characterization of Metals and Alloys** Symposium at the **XXX International Materials Research Congress and International Conference on Advanced Materials** held in Cancun, Mexico from August 14th to 19th, 2022.

Sincerely,

**Patricia del Carmen Zambrano Robledo**  
*President*





Mexico City, May 8th, 2023

**Blanca Lisbeth Perez**

Instituto de Ciencias Básicas e Ingeniería  
Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo

I am pleased to inform you that your contribution "**DEVELOPMENT OF PLGA/HA COMPOSITE SCAFFOLDS BY GEL-CASTING METHOD.**" by *Blanca Lisbeth Perez, María Isabel Reyes Valderrama, Lesly Sabina Villaseñor Cerón, Demetrio Mendoza Anaya, Salvador Ivan Garduño, Ventura Rodriguez Lugo*, has been **accepted** in symposium **F3, Biomaterials for Health Applications: Permanent and Temporary Biomedical Implants, Dental and Cosmetics** at the 31st International Materials Research Congress, to be held in Cancun in August 13 - 18, 2023.

The presentation has been accepted in the **Poster Presentation** modality. Remember that in order to include your abstract in the congress program you must confirm your participation no later than May 26th by choosing the modality you will present your abstract(s); you can do this from your IMRC account.

**Organizers of the Symposium**

*"Biomaterials for Health Applications: Permanent and Temporary Biomedical Implants, Dental and Cosmetics"*

**Silva-Bermudez Phaedra, Almaguer-Flores Argelia, Pierre Weiss, Fabio Variola**





UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO

Instituto de Ciencias Básicas e Ingeniería

School of Engineering and Basic Sciences

Área Académica de Ciencias de la Tierra y Materiales

Department of Materials and Earth Sciences

Mineral de la Reforma, Hgo., a 19 de mayo de 2022

Número de control: ICBI-ACCTyM/905/2022

Asunto: Constancia de participación en el capítulo estudiantil.

### A QUIEN CORRESPONDA:

Por este medio se hace constar que **Perez Blanca Lisbeth**, participó en las actividades del Primer Congreso Estatal de Investigación en Ciencias de los Materiales efectuado de manera virtual y organizado por el Capítulo estudiantil UAEH – SMMater durante los días 16 y 17 de mayo del dos mil veintidós.

Se extiende la presente para los fines y efectos a los que haya lugar.

Atentamente

“Amor, Orden y Progreso”

M. en C. Carlos Alfredo Zamora Valencia  
Presidente del capítulo estudiantil  
UAEH - SMMater

Dra. Patricia del Carmen Zambrano  
Robledo Presidenta de la Sociedad  
Mexicana de Materiales

Dr. Félix Sánchez de Jesús  
Jefe del Área Académica de Ciencias  
de la Tierra y Materiales  
Vo.Bo.

Dr. Otilio Arturo Acevedo Sandoval  
Director ICBI  
Vo.Bo.

BJLH/

Ciudad del Conocimiento  
Carretera Pachuca-Tulancingo km 4.5 Colonia  
Carboneras, Mineral de la Reforma, Hidalgo,  
México. C.P. 42184  
Teléfono: +52 (771) 71 720 00 ext. 2270,2280  
Fax 2109  
aactym\_icbi@uaeh.edu.mx



[www.uaeh.edu.mx](http://www.uaeh.edu.mx)



Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo

La Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo a través del Instituto de Ciencias Básicas e Ingeniería

otorga el presente

## RECONOCIMIENTO

a

### Blanca Lisbeth Pérez

Por su participación en el concurso de carteles científicos presentando el trabajo “Polietilenglicol (PEG) como surfactante y controlador de forma y tamaño en la formación de nanohidroxiapatita (NHAP) por el método hidrotermal asistido por microondas” en el marco de actividades del Primer Congreso Estatal de investigación en Ciencias de los Materiales, compartiendo autoría con “L.S. Villaseñor Cerón, D. Mendoza Anaya, J. A. Arenas Alatorre, M.I. Reyes Valderrama, V. Rodríguez Lugo”, efectuado de manera virtual y organizado por el Capítulo Estudiantil UAEH – SMMater durante los días 16 y 17 de mayo de 2022.

Mineral de la Reforma, Hgo., a 17 de mayo de 2022.

Atentamente

“Amor, Orden y Progreso”

Dr. Otilio Acevedo Sandoval  
Director del Instituto de  
Ciencias Básicas e  
Ingeniería

Dr. Félix Sánchez de Jesús  
Jefe del Área Académica de  
Ciencias de la Tierra y  
Materiales

M. en C. Carlos Alfredo  
Zamora Valencia  
Presidente del Capítulo  
Estudiantil UAEH - SMMater

ICBI Número de control: ICBI-D/R383/2022

Dra. Patricia del Carmen  
Zambrano Robledo  
Presidenta de la Sociedad  
Mexicana de Materiales





otorgan el presente

# Reconocimiento

a

## Blanca Lisbeth Pérez

Por la presentación en póster de manera oral “Síntesis de andamios compuestos de hidroxapatita y ácido poliláctico-co-glicólico”, cuya autoría se comparte con: S. López Ortiz, M. I. Reyes Valderrama, D. Mendoza Anaya y V. Rodríguez Lugo, misma que se efectuó de manera virtual, durante el VI Seminario Regional de Materiales Avanzados, organizado por el Cuerpo Académico de Materiales Avanzados perteneciente al Área Académica de Ciencias de la Tierra y Materiales del 5 al 7 de octubre de 2022.

Mineral de la Reforma, Hgo., a 7 de octubre de 2022.

Atentamente  
“Amor, Orden y Progreso”

Dr. Otilio Arturo Acevedo Sandoval  
Director del Instituto de Ciencias  
Básicas e Ingeniería

Dr. Ventura Rodríguez Lugo  
Líder del Cuerpo Académico de  
Materiales Avanzados

Dr. Félix Sánchez De Jesús  
Jefe de Área Académica de  
Ciencias de la Tierra y Materiales

 Número de control: ICBI-D/R1348/2022





Otorgan el presente

## CONSTANCIA

a

### Blanca Lisbeth Pérez

Por su participación en las conferencias impartidas durante el **V Seminario Regional de Materiales Avanzados**, mismo que se efectuó de manera virtual, organizado por el Cuerpo Académico de Materiales Avanzados, perteneciente al Área Académica de Ciencias de la Tierra y Materiales, realizado del **6 al 8 de octubre de 2021**.

Mineral de la Reforma, Hgo., a 8 de octubre de 2021.

Atentamente

“Amor, Orden y Progreso”

Dr. Otilio Arturo Acevedo Sandoval  
Director del ICBI

Dr. Ventura Rodríguez Lugo  
Líder del Cuerpo Académico de  
Materiales Avanzados

Dr. Félix Sánchez De Jesús  
Jefe de AACTyM

Número de control: ICBI-AACTyM/2992