



Instituto Politécnico Nacional



***Centro de Investigación en Ciencia Aplicada y Tecnología
Avanzada***

Presenta:

Ing. Miguel Angel Martínez Hernández

**Que para obtener el título de maestro en tecnología avanzada
presenta el proyecto:**

**Síntesis de un biomaterial compuesto de nanoestructuras
de $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2$ y fibras de poliácido láctico para su
aplicación en trasplante óseo**

Directores:

Dra. María Guadalupe Valverde Aguilar

Dr. Marco Antonio Álvarez Pérez

Cd. de México, Julio 2016



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la Ciudad de México siendo las 12:00 horas del día 27 del mes de Junio del 2016 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de la Tesis, designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de CICATA Legaria para examinar la tesis titulada:

Síntesis de un biomaterial compuesto de nanoestructuras de Fe₃O₄/SiO₂ y fibras de Poliláctico Láctico para su aplicación en trasplante óseo.

Presentada por el alumno:

Martínez	Hernández	Miguel Angel
Apellido paterno	Apellido materno	Nombre(s)
Con registro:		
B	1	4
0	7	4
7		

aspirante de:

Maestría en Tecnología Avanzada

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron **APROBAR LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

LA COMISIÓN REVISORA

Directores de tesis

Dra. María Guadalupe Valverde Aguilar

Dr. Marco Antonio Álvarez Pérez

Dr. Fernando Trejo Zárraga

Dra. Mónica Rosalía Jaime Fonseca

Dra. Rocio Guadalupe Casañas Pimentel



SEP
CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIA
APLICADA Y TECNOLOGÍA AVANZADA
CICATA - LEGARIA

Dra. Mónica Rosalía Jaime Fonseca



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

CARTA CESIÓN DE DERECHOS

En la Ciudad de México, D.F. el día 27 del mes de Junio del año 2016, el que suscribe I.Q.I. Miguel Angel Martínez Hernández alumno del Programa de Maestría en Tecnología Avanzada, con número de registro B140747, adscrito al CICATA-LEGARIA, manifiesto que es el autor intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección de la Dra. María Guadalupe Valverde Aguilar y el Dr. Marco Antonio Álvarez Pérez y cede los derechos del trabajo titulado Síntesis de un biomaterial compuesto de nanoestructuras de Fe_3O_4/SiO_2 y fibras de Poliláctico para su aplicación en trasplante óseo, al Instituto Politécnico Nacional para su difusión, con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del (de la) autor(a) y/o director(es) del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a las siguientes direcciones eiqi.angel.martinez@gmail.com, valverdeag@gmail.com y malvap6@gmail.com. Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.


Martínez Hernández Miguel Angel
Nombre y firma del alumno(a)

Resumen

En este trabajo se describe la síntesis y caracterización de nanoestructuras compuestas de óxido de hierro con dióxido de silicio ($\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2$), estos materiales fueron probados en ensayos biológicos: adhesión celular y proliferación celular para determinar si son materiales candidatos para ser usados en el campo de la ingeniería de tejidos mineralizados como el hueso.

En el capítulo uno se hace una reseña del campo de la ingeniería de tejidos. que es la conjunción de la medicina, biología y ciencia de los materiales, también se revisarán conceptos básicos para comprender el porqué de la selección de este tipo de estructuras.

En el capítulo dos, se describe la síntesis y caracterización de las nanoestructuras. Primero se sintetizaron las nanopartículas magnéticas (NPM's) por el método de coprecipitación, para posteriormente mediante el método sol-gel agregar el dióxido de silicio para dar forma a las nanoestructuras de $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2$. Se prepararon los andamios compuestos de las nanoestructuras de $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2$ con el ácido poliláctico (PLA). Estas nanoestructuras se caracterizaron estructural, morfológica y químicamente por técnicas espectroscópicas como la difracción de rayos X (DRX), microscopia electrónica de barrido (MEB), microscopia electrónica de transmisión (MET) y espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FTIR, por sus siglas en inglés).

En el capítulo tres se presentan los resultados obtenidos de la caracterización y las pruebas biológicas, así como su análisis y la discusión de los mismos.

Finalmente se presentan las conclusiones del trabajo y las perspectivas de trabajos futuros, así como recomendaciones para guiar en futuras investigaciones.

Abstract

This work describes the synthesis and characterization of nanostructures composed of iron oxide and silicon dioxide ($\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2$). These materials were tested in biological assays: cell adhesion and cell proliferation to determine if they are candidates to be use in the field of tissue engineering, specifically in bone tissue regeneration.

The chapter one is a review of tissue engineering (TE) field. TE is the result of the combination of medicine, biology and materials science. Furthermore, the basic concepts were reviewed to understand the reason for the selection of this type of nanomaterials.

In chapter two, we discuss the synthesis and characterization of the nanomaterials. First, the magnetic nanoparticles (NPM's) were synthesized by coprecipitation method, after the synthesis of $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2$ nanostructures was performance by sol-gel method by the aggregation of silicon dioxide. Then the scaffolds composed by the $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2$ nanostructures and the polylactic acid (PLA) were analised. Their structural, morphological and chemical characterization were performance by spectroscopic techniques such as X-ray diffraction (XRD), scanning electron microscopy (SEM), transmission electron microscopy (TEM) and Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR).

In chapter three are presented the results of the synthesis, characterization and biological assays realized in the biomaterials, including the analysis and discussion of the results.

Finally, the conclusions are mentioned. Furthermore, some recommendations were included that can guide to the reader to modify parameters in order to improve this work.

Justificación

Con el fin de mejorar la calidad de vida, se ha visto la necesidad de buscar nuevos materiales para que puedan ser aplicados en el área de la medicina regenerativa.

En los últimos años se han investigado nuevos materiales, con el fin de restaurar algún tejido que ha sido dañado por traumas, enfermedades y/o lesiones patológicas.

El propósito de la ingeniería de tejidos es buscar estrategias para regenerar funcionalmente un tejido, a partir de materiales que pueden o no contener células troncales mesenquimales. A estos materiales se les denominan biomateriales, ya que están en contacto con tejido vivo. La característica principal de los biomateriales es su propiedad de biocompatibilidad y bioactividad con el tejido circundante. Asimismo, estimular el depósito de matriz extracelular permitiendo recuperar la funcionalidad del tejido dañado.

Existen varios tipos de biomateriales: cerámicos, poliméricos, metálicos y compuestos que involucra la combinación de cualquiera de los tres grandes grupos antes mencionados. Los biomateriales de última generación son cerámicos y metales montados en una matriz polimérica completamente biocompatible. Con el fin de promover una apropiada regeneración, dichas matrices deben de ser biodegradables para la obtención de tejido completamente regenerado.

Tomando como base las funciones celulares del cuerpo humano, en la cual las células están acostumbradas a realizarlas en rangos nanométrico, por lo que el desarrollo de materiales por medio de las nanociencias adquiere relevancia y el lograr escalas nanométricas trae ventajas en cuanto al área superficial de contacto para las células así como el volumen para el desarrollo de nuevo tejido.

Objetivos

En este trabajo se describe la obtención de un biomaterial compuesto. Este biomaterial está compuesto de fibras de ácido poliláctico (PLA) que contienen nanoestructuras compuestas de nanopartículas de Fe_2O_3 soportadas en nanoesferas de SiO_2 . El objetivo principal fue diseñar un material que pueda ser usado a nivel humano para regenerar tejido dañado por enfermedades o lesiones en tejidos duros como el hueso.

Como objetivos particulares fueron la obtención de nanopartículas de Fe_3O_4 , mediante la reacción de coprecipitación. Posteriormente se agregó el SiO_2 mediante una reacción de sol-gel. Una vez sintetizados se procedió a la caracterización de las nanopartículas por medio de análisis químico con la técnica espectroscópica de infrarrojo (FTIR), análisis estructural con la técnica de difracción de rayos X (DRX) y el análisis morfológico con las técnicas de microscopía electrónica de barrido (MEB) y de transmisión (MET).

Después se sintetizaron los andamios de PLA por la técnica de electrohilado, evaluando diversos parámetros como: disolvente, distancia de separación y voltaje aplicado. Cuando se obtuvieron las condiciones óptimas de síntesis se procedió a la realización de las membranas compuestas (PLA+NPs). A las cuales se les realizó una caracterización con las técnicas mencionadas con anterioridad.

Una vez obtenido el biomaterial, se determinó por medio de ensayos biológicos la respuesta de biocompatibilidad de las membranas hiladas de PLA y PLA/NPs por parte de los osteoblastos al ser sembrados sobre la superficie de los andamios. Las pruebas de biocompatibilidad fueron los ensayos de adhesión y proliferación celular.

Agradecimientos

Quiero agradecer a quienes fueron mis guías durante el desarrollo de este proyecto, la Dra. Guadalupe Valverde y el Dr. Marco Álvarez. Estoy muy agradecido con ellos por el tiempo, la dedicación, sugerencias y críticas. Les agradezco porque siempre fueron amables conmigo, son extraordinarias personas.

Quiero agradecer mis padres Miguel e Ilda por todo su apoyo y consejos. A mis hermanos Sandy y Eric por soportarme en este proceso. A mis amigos Angie, Yis, Chris, Juve, Ivan, Alice y Alberto porque sin ellos hubiera sido difícil el proceso de la maestría.

A los profesores investigadores que a pesar de no ser responsables directamente del proyecto sus comentarios y sugerencias siempre fueron bienvenidos: a los doctores Manuel, Fernando, Miguel y José, a las doctoras Carolina, Rocío, Mónica, Delia y en especial a Elvia.

Dentro de este proyecto, existieron varias colaboraciones con diferentes departamentos e institutos. Quisiera expresar mi gratitud al Dr. Roberto Vázquez-Arreguin (Escuela Superior de Cómputo) por las facilidades para la medición de XRD, a Mario Alberto García (CICATA-Legaria) y a la M.C. por las micrografías MEB. A la Dra. Patricia y al Dr. Luis (Instituto de Física-UNAM) por el apoyo para MET.

Gracias a la beca que me fue otorgada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) además de la Beca de Estimulo Institucional de Formación de Investigadores (BEIFI).

Se agradece la asesoría, así como el importante y excelente apoyo técnico del Dr. Fernando Suaste Olmos.

Al apoyo por parte de la DGAPA-UNAM en el financiamiento del proyecto PAPIIT IN210815.

Contenido general

	Página
Resumen	V
Abstract	VI
Justificación	VII
Objetivos	VIII
Agradecimientos	IX
I.- GENERALIDADES	
1.1 Estructura ósea	2
1.2 Tejido óseo	3
1.3 Jerarquización de la estructura ósea	5
1.4 Células óseas	6
1.5 Remodelado óseo	7
1.6 Enfermedades óseas	10
1.7 Ingeniería de tejidos	11
1.8 Aplicación en tejido óseo	12
1.8.1 Aplicación de metales y cerámicos	14
1.8.2 Aplicación de polímeros	15
II.- MATERIALES Y MÉTODOS	
2.1 Síntesis de materiales	
2.1.1 Óxido de hierro Fe_3O_4	
2.1.1.1 Métodos de síntesis	17
2.1.1.2 Procedimiento experimental	18
2.1.2 Dióxido de silicio SiO_2	
2.1.2.1 Métodos de síntesis	19
2.1.2.2 Procedimiento experimental	20
2.1.3 Nanoestructuras Fe_3O_4/SiO_2	
2.1.3.1 Métodos de síntesis	21
2.1.3.2 Procedimiento experimental	21
Síntesis por Sol-gel	

2.1.4	Preparación de los andamios de Poliácido Láctico (PLA) con las nanoestructuras	
2.1.4.1	Método de síntesis	22
2.1.4.2	Procedimiento experimental de síntesis de fibras	23
2.1.4.3	Montaje de nanoestructuras de Fe ₃ O ₄ /SiO ₂ en las fibras de PLA	24
	Procedimiento experimental	
2.2	Caracterización de materiales.	25
2.2.1	Espectroscopia infrarroja.	
2.2.1.1	Fundamentos	25
2.2.1.2	Materiales	27
2.2.2	Difracción de rayos-X	
2.2.2.1	Fundamentos	27
2.2.2.2	Ley de Bragg	28
2.2.2.3	Materiales	29
2.2.3	Microscopia electrónica de barrido.	
2.2.3.1	Fundamentos	30
2.2.3.2	Materiales	31
2.2.4	Microscopia electrónica de transmisión	
2.2.4.1	Fundamentos	32
2.2.4.2	Materiales	32
2.3	Ensayos biológicos	33
2.3.1	Ensayo de Adhesión Celular	
2.3.1.1	Fundamento del ensayo de adhesión celular	34
2.3.1.2	Procedimiento del ensayo de adhesión celular	34
2.3.2	Ensayo de Proliferación celular	
2.3.2.1	Fundamento del ensayo de proliferación celular	35
2.3.2.2	Procedimiento del ensayo de proliferación celular	36

III.- DISCUSIÓN DE RESULTADOS

3.1 Síntesis de materiales

3.1.1	Síntesis de nanopartículas de Fe ₃ O ₄	37
-------	--	----

3.1.2	Síntesis de nanoestructuras de Fe ₃ O ₄ /SiO ₂	38
3.1.3	Montaje de nanoestructuras en andamios de PLA	39
3.2	Caracterización de materiales	
3.2.1	Análisis por espectroscopia infrarroja	
3.2.1.1	Óxido de hierro Fe ₃ O ₄	41
3.2.1.2	Nanoestructuras de Fe ₃ O ₄ /SiO ₂	42
3.2.1.3	Andamios PLA	43
3.2.1.4	Andamios de PLA con las nanoestructuras de Fe ₃ O ₄ /SiO ₂	45
3.2.2	Difracción de rayos X	
3.2.2.1	Óxido de hierro Fe ₃ O ₄	46
3.2.2.2	Nanoestructuras de Fe ₃ O ₄ /SiO ₂	47
3.2.3	Microscopía electrónica de barrido	
3.2.3.1	Óxido de hierro Fe ₃ O ₄	49
3.2.3.2	Esferas de SiO ₂	51
3.2.3.3	Nanoestructuras de Fe ₃ O ₄ /SiO ₂	52
3.2.3.4	Andamios de PLA	55
3.2.3.5	Andamios de PLA con las nanoestructuras de Fe ₃ O ₄ /SiO ₂	60
3.2.4	Microscopía electrónica de transmisión	
3.2.4.1	Óxido de hierro Fe ₃ O ₄	63
3.2.4.2	Nanoestructuras de Fe ₃ O ₄ /SiO ₂	65
3.2.5	Ensayos biológicos	
3.2.5.1	Ensayo de Adhesión celular	67
3.2.5.2	Ensayo de Proliferación Celular	70
IV.-	CONCLUSIONES	
4.1.	Conclusiones generales	72
4.2	Recomendaciones para trabajos futuros	73
V.-	REFERENCIA BIBLIOGRAFICA	74

Índice de figuras

		Página
Figura 1.1	Representación (de izquierda a derecha) del sistema óseo, sistema nervioso, sistema circulatorio, sistema respiratorio, sistema digestivo y sistema muscular.	2
Figura 1.2	Cristales de hidroxiapatita.	3
Figura 1.3	Imagen del tejido óseo esponjoso y tejido óseo compacto	4
Figura 1.4	Jerarquización de la estructura del hueso.	5
Figura 1.5	Diagrama del remodelado óseo, que es la forma en que el hueso se rompe de manera que pueda repararse a sí mismo.	9
Figura 1.6	Esquema de la aplicación de la ingeniería de tejidos.	13
Figura 1.7	Placas de osteosíntesis y tornillos quirúrgicos, ejemplos de metales aplicados como biomateriales.	14
Figura 1.8	Obtención de PLA a partir de la apertura del diéster cíclico.	16
Figura 2.1	Sistema de adición. Se muestra el matraz adicionador y embudo de tres bocas.	19
Figura 2.2	Esquema representativo del sistema de electrohilado.	23
Figura 2.3	Se compone de un sistema de a) alta tensión, b) un hilador y c) un colector.	23
Figura 2.4	Tipos de vibraciones fundamentales en las moléculas.	27
Figura 2.5	Esquema representativo de la ley de Bragg.	29
Figura 2.6	Reacción química de la sal WST-8.	35
Figura 2.7	Diagrama representativo del ensayo de proliferación con el kit CCK-8.	36
Figura 3.1	Espectro infrarrojo de las nanopartículas de óxido de hierro, en la región de 4000 cm^{-1} a 400 cm^{-1}	41
Figura 3.2	Espectros de infrarrojo del a) Fe_3O_4 de b) SiO_2 (blanco) y c) nanoestructuras de $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2$, en la región de 4000 cm^{-1} a 400 cm^{-1} .	42
Figura 3.3	Espectros infrarrojos de PLA disuelto en diferentes disolventes. Región de análisis 2000 cm^{-1} a 500 cm^{-1} .	44
Figura 3.4	Comparación de espectros infrarrojos de a) nanoestructuras de $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2$ de b) PLA y del c) PLA con las nanoestructuras de $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2$. Región de análisis 2000 cm^{-1} a 500 cm^{-1} .	46
Figura 3.5	Patrón de difracción obtenido de las nanopartículas de Fe_3O_4 .	47
Figura 3.6	Patrón de difracción obtenido de las muestras de a) SiO_2 y de las b) nanoestructuras de $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2$.	48
Figura 3.7	Micrografía de la muestra con nanopartículas magnéticas de Fe_3O_4 a 1000 aumentos.	49
Figura 3.8	Micrografías de la muestra con nanopartículas magnéticas de Fe_3O_4 a 2700 aumentos.	50
Figura 3.9	Análisis EDS de las muestras de Fe_3O_4 con tabla 3.4 de elementos cuantificados.	50
Figura 3.10	Micrografía de las nanoesferas de SiO_2 , a 70000 acercamientos.	51

Figura 3.11	Histograma de distribución de tamaños de las nanoesferas de SiO ₂ .	52
Figura 3.12	Micrografía de las nanoestructuras de Fe ₃ O ₄ /SiO ₂ sintetizadas por sol-gel, a 20000 aumentos.	53
Figura 3.13	Micrografía de las nanoestructuras Fe ₃ O ₄ /SiO ₂ sintetizadas por sol-gel, a 25000 aumentos.	53
Figura 3.14	Análisis EDS de las nanoestructuras de Fe ₃ O ₄ /SiO ₂ con tabla 3.6 de elementos cuantificados.	54
Figura 3.15	Micrografías de PLA disuelto en cloroformo, a a) 500 magnificaciones y a b) 5000 magnificaciones.	55
Figura 3.16	Distribución de los tamaños de las fibras de PLA disueltas en cloroformo.	56
Figura 3.17	Micrografías de PLA disuelto en la mezcla cloroformo-etanol, a a) 500 magnificaciones y a b) 4000 magnificaciones.	57
Figura 3.18	Distribución de los tamaños de las fibras de PLA disueltas en cloroformo-etanol.	57
Figura 3.19	Micrografías de PLA disuelto en la mezcla cloroformo-dimetilformamida, a a) 500 magnificaciones y a b) 2000 magnificaciones.	58
Figura 3.20	Distribución de los tamaños de las fibras de PLA disueltas en cloroformo-dimetilformamida.	59
Figura 3.21	Micrografías de PLA conteniendo a) 0.005g, b) 0.05g y c) 0.1 g de nanoestructuras de Fe ₃ O ₄ /SiO ₂ .Todas a 500 magnificaciones.	60
Figura 3.22	Micrografías de PLA conteniendo a) 0.005g, b) 0.05g y 0.1 g de nanoestructuras de Fe ₃ O ₄ /SiO ₂ , en donde se aprecia la distribución de las nanoestructuras en las fibras. Todas a 10000 magnificaciones.	61
Figura 3.23	Distribución de los tamaños de las fibras de PLA conteniendo 0.05 g de nanoestructuras	62
Figura 3.24	Micrografías obtenidas por MET. a) Nanopartículas de Fe ₃ O ₄ . Con flechas y barras blancas se señalan las reflexiones b) (400) y c) (222) del Fe ₃ O ₄ .	63
Figura 3.25	Micrografías obtenidas por MET de las nanoestructuras de Fe ₃ O ₄ /SiO ₂ . (a) Población de nanopartículas de Fe ₃ O ₄ rodeadas de SiO ₂ . Con flechas y barras blancas se señalan las reflexiones (b) (400) y (c) (222) del Fe ₃ O ₄ , (d) patrón de difracción de SiO ₂ amorfo.	65
Figura 3.26	Resultado del ensayo de adhesión de células sobre los andamios de PLA y PLA conteniendo las nanoestructuras de Fe ₃ O ₄ /SiO ₂ .	68
Figura 3.27	Resultado del ensayo de adhesión de células sobre los andamios de PLA y PLA conteniendo las nanoestructuras de Fe ₃ O ₄ /SiO ₂ , representado en porcentaje de adhesión.	69
Figura 3.28	Resultado del ensayo de proliferación de células sobre los andamios de PLA y PLA conteniendo las nanoestructuras de Fe ₃ O ₄ /SiO ₂ .	70

Índice de tablas

	Página
Tabla 1. 1 Composición porcentual del hueso.	4
Tabla 2. 1 Concentración de nanoestructuras en la disolución de PLA.	24
Tabla 2. 2 Resumen de las técnicas de caracterización.	25
Tabla 3. 1 Tabla de condiciones que se trabajaron para buscar fibras con diámetros óptimas	39
Tabla 3. 2 Tabla de bandas de IR para las muestras de Fe ₃ O ₄ /SiO ₂ .	43
Tabla 3. 3 Tabla de bandas de IR para las muestras de PLA	45
Tabla 3. 4 Análisis EDS de las muestras de Fe ₃ O ₄ con tabla de elementos cuantificados.	50
Tabla 3. 5 Valores del diámetro del SiO ₂ sintetizado por sol-gel.	52
Tabla 3. 6 Análisis EDS de las nanoestructuras de Fe ₃ O ₄ /SiO ₂ con tabla de elementos cuantificados.	54
Tabla 3. 7 Valores del diámetro de las fibras de PLA disuelto en cloroformo.	56
Tabla 3. 8 Valores del diámetro de las fibras de PLA disuelto en cloroformo-etanol.	58
Tabla 3. 9 Valores del diámetro de las fibras de PLA disuelto en cloroformo-dimetilformamida.	59
Tabla 3. 10 Valores del diámetro de las fibras de PLA disuelto en cloroformo-dimetilformamida conteniendo nanoestructuras de Fe ₃ O ₄ /SiO ₂ .	62

I.- Generalidades

1.1 Estructura ósea

El cuerpo humano es un conjunto de sistemas, ver figura 1.1, que se encuentran en constante actividad celular, aún sin percatarnos, órganos y estructuras trabajan en conjunto para cumplir alguna función fisiológica específica. Entre algunos sistemas por mencionar se tiene el sistema circulatorio, que es el sistema de transporte del cuerpo; el sistema digestivo, que se encarga de fraccionar los alimentos en proteínas, carbohidratos, grasas, etc; el sistema muscular, que se encarga del movimiento voluntario (por ejemplo piernas, brazos) e involuntario (por mencionar el estómago, corazón) en el cuerpo. El sistema muscular se puede dividir en tres tipos: músculo cardíaco, músculo liso y músculo esquelético [1].

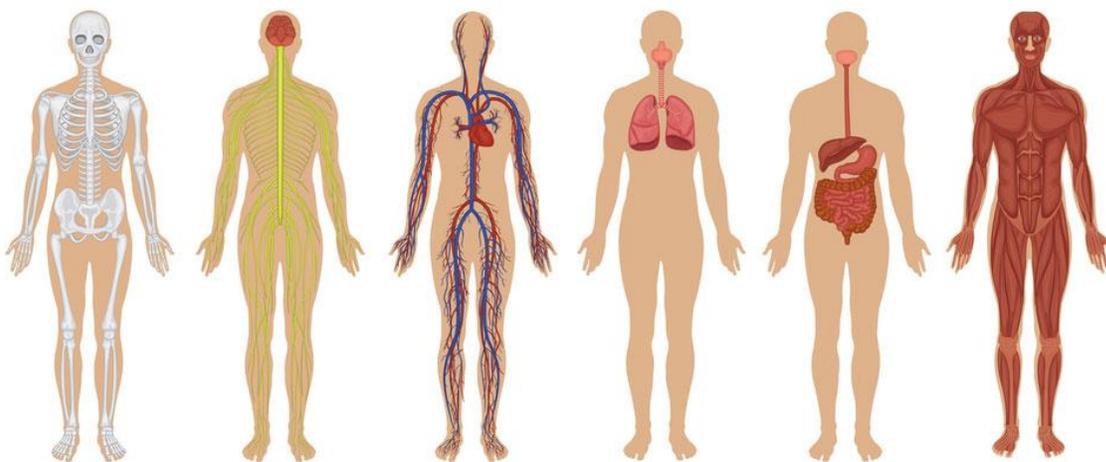


Figura 1. 1 Representación (de izquierda a derecha) del sistema óseo, sistema nervioso, sistema circulatorio, sistema respiratorio, sistema digestivo y sistema muscular [1].

Algunos músculos junto con tendones se encuentran unidos al tejido óseo, es decir al sistema óseo. Éste sistema provee soporte y movilidad, además de proteger al organismo. Otra importante función del sistema óseo, es la de almacenar minerales, particularmente el calcio, que es necesario para mantener la

homeostasis mineral en el cuerpo mediante la regulación de la concentración de los electrolitos importantes.

1.2 Tejido óseo

El tejido óseo es un tejido conjuntivo que está compuesto por células y una matriz extracelular, lo que lo diferencia con otros sistemas, es la mineralización de la matriz. Esta mineralización produce un tejido muy duro capaz de proveer sostén y protección. El mineral es fosfato de calcio en forma de cristales de hidroxiapatita $[\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2]$ [2], que comprende aproximadamente el 70% en peso del hueso, ver figura 1.2.



Figura 1.2 Cristales de hidroxiapatita.

Los principales componentes estructurales de la matriz ósea, ver Tabla 1, son el colágeno del tipo I, y en menor medida del tipo V. Aunque se han encontrado vestigios del tipo III, XI y XIII. Estos colágenos constituyen aproximadamente el 90% de las proteínas de la matriz ósea y contribuyen principalmente a la elasticidad del hueso. El 10% restante de proteínas son indispensables para el desarrollo, el crecimiento, el remodelado y la reparación del hueso. Existen 4 grupos principales de proteínas no colágenas que componen este 10%. Las macromoléculas de proteoglicanos, las glucoproteínas multi-adhesivas, las proteínas dependientes de la vitamina K, osteoespecífica y factores de crecimiento [3].

Tabla 1. 1 Composición porcentual del hueso.

Componente	Porcentaje
Mineral	70
Orgánica	22
Colágeno	(90-96)
Otros	(4-10)
Agua	8

El tejido óseo se puede clasificar en tejido compacto (denso) y tejido esponjoso (trabeculado), ver figura 1.3. El tejido compacto forma la mayor parte de la estructura externa de un hueso, y puede tener un grosor variable. La superficie externa del hueso es una membrana suave, llamada periostio, se encuentra en forma laminar y esta vascularizada. El periostio esta adjunto a la superficie externa del hueso y siempre se encuentra bajo presión mecánica.

El tejido esponjoso existe solo dentro de los límites del tejido compacto. El tejido está formado por trabéculas, y hay vasos sanguíneos que se pueden encontrar dentro y fuera de los espacios de las trabéculas.

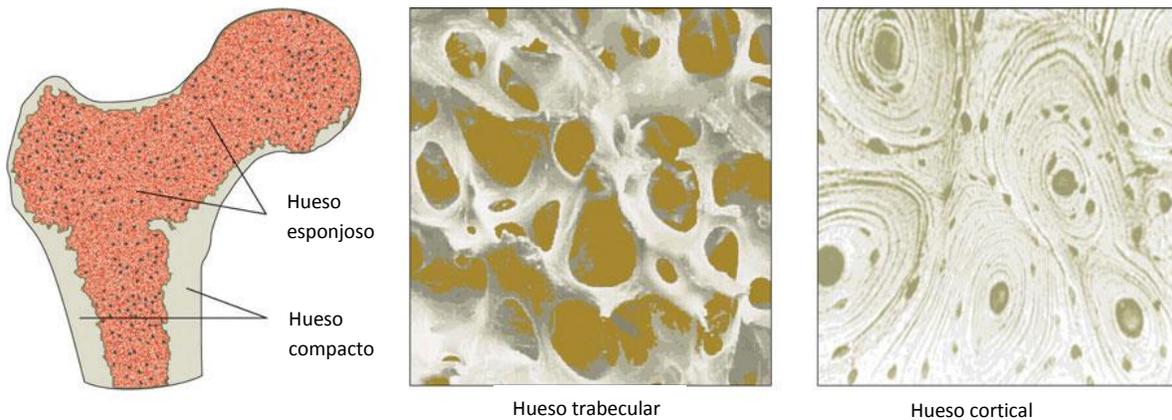


Figura 1. 3 Imagen del tejido óseo esponjoso y tejido óseo compacto.

1. 3 Jerarquización de la estructura ósea

Para poder conocer y comprender las propiedades del hueso se debe tener en cuenta que es un tejido con distintos niveles estructurales. Posee lo que se conoce como estructura jerárquica, compuesta de una estructura nanométrica hasta alcanzar una estructura macrométrica, como se aprecia en la figura 1.4.

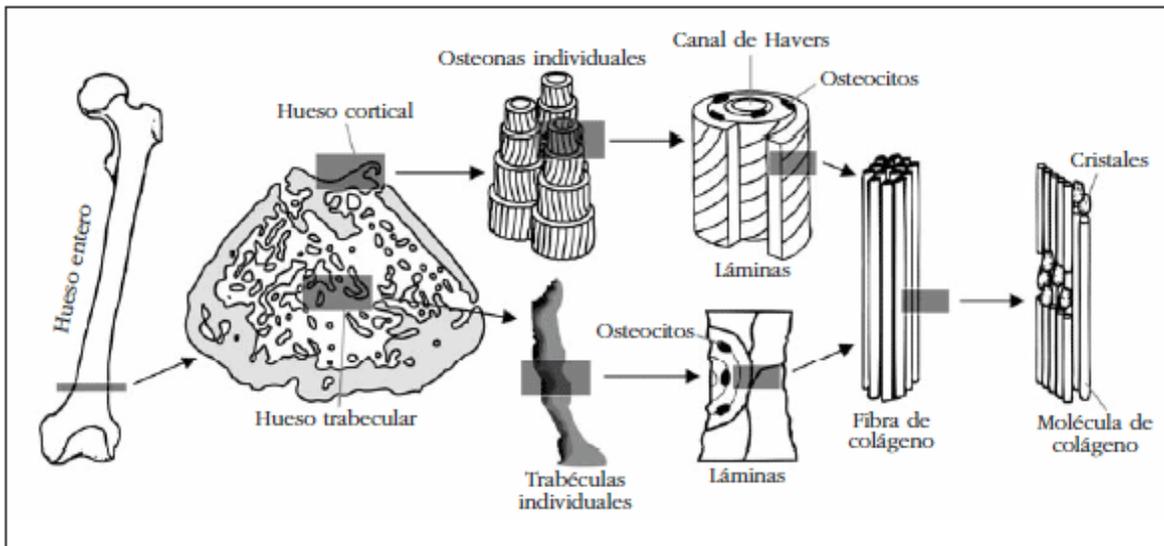


Figura 1. 4 Jerarquización de la estructura del hueso

La estructura macrométrica comprende la estructura del hueso por completo, que incluye el tejido compacto y el tejido esponjoso. Después le sigue la estructura a mesoescala, que puede ser representada por el hueso cortical, que consta de osteonas incrustadas en el hueso intersticial, o el hueso trabecular que está integrado por una red porosa en forma de barra.

Después sigue la estructura a microescala, que se representa por los arreglos laminares, de los cuales están formados el hueso cortical y trabecular. En el hueso cortical, las laminillas se arreglan en forma de cilindros concéntricos formando osteonas. Las cuales se alinean a lo largo del eje del hueso. Cada osteona contiene un canal largo llamado canal de Havers, en el que se encuentran vasos sanguíneos. El hueso trabecular está formado por laminillas acomodadas en

trabéculas que tienen forma de barra, que tienen tamaños de 50 μm a 1mm de longitud. Las trabéculas están formadas por paquetes trabeculares, los cuales se reabsorben y se forman en el remodelado óseo.

Después sigue la estructura a sub-microescala, en donde se forman las laminillas, las cuales son estructuras aproximadamente de 3 a 7 mm de espesor, formadas de fibrillas de colágeno mineralizado que se acomodan en forma de hoja. Las lagunas, que es el lugar en donde se encuentra alojadas los osteocitos, residen en laminillas y están conectadas unas con otras a través de pequeños canales con diámetro aproximado de 100 nm.

Al final se tiene la estructura nanométrica, a este nivel se puede apreciar las fibras de colágeno y la matriz inorgánica mineralizada (principalmente por cristales de hidroxiapatita y fosfato de calcio, que son las unidades de construcción básicas del hueso [4].

1. 4 Células óseas

Se pueden describir cinco tipos de células que se encuentran en el tejido óseo, el crecimiento de los huesos y el tejido adulto el cual está organizado sobre la base de los sitios anatómicos relacionados con estas células. Los osteocitos se encuentran en lagunas o también llamadas osteoplastos. Los otros cuatro tipos de la célula las células osteoprogenitoras, los osteoblastos, las células de revestimiento óseo y los osteoclastos, se encuentran situadas en la interfaz celular [5].

Células osteoprogenitoras. Hay dos tipos de células osteoprogenitoras, la tipo uno-preosteoblástica da lugar a los osteoblastos encargados de la formación de los huesos, y la tipo dos-preosteoclástica da lugar a la reabsorción de hueso por osteoclastos.

Los osteoblastos son células formadoras de hueso. Sintetizan y secretan matriz ósea no mineralizada colagenosa, denominada osteoide. Los osteoblastos también parecen participar en la calcificación del hueso y tienen un papel importante en la regulación del flujo de calcio y fosfato dentro y fuera del hueso.

Los osteoclastos son células gigantes multinucleadas responsables de la resorción del hueso. Estas células tienen diámetros que van desde 20 a 100 μm y pueden contener de 2 a 50 núcleos.

Las células de revestimiento óseo, se encuentran en su mayor parte cubriendo la interfaz celular. Las células son muy planas (0,1 μm de espesor) y alargadas. Tienen núcleos fusiformes. Se cree que las células de revestimiento óseo son derivadas de osteoblastos y/o precursores de osteoblastos que han cesado su actividad o se han diferenciado y aplanado hacia fuera en las superficies óseas.

Los osteocitos son las células de hueso con ubicación especial. Ellos se alojan en las lagunas de la matriz mineralizada, los osteocitos derivan de osteoblastos. Estos osteocitos tiene forma de estrella que están conectados en red a lo largo del hueso, a través de sus conexiones (brazos citoplasmáticos) mantienen contacto con células vecinas, permitiendo el intercambio de nutrientes y otros factores de los huesos a la sangre.

1. 5 Remodelado óseo

Como ya se describió, el que existan diferentes tipos de células en el tejido óseo, permite que durante la etapa de desarrollo y crecimiento, hasta llegar a la etapa adulta, el hueso se pueda reformar. Las células pueden cambiar de forma y con ello modifican constantemente la estructura del hueso. Esto se logra mediante dos procesos los cuales son el de crecimiento (o también llamado osificación) y el modelado. En los primeros años de vida, casi el 100% del tejido es reemplazado. En el proceso de modelado, el tejido óseo sufre procesos de reabsorción, aposición y formación de tejido de nuevo.

Pero cuando se llega a la edad adulta los huesos dejan de crecer y de modelarse, ahora continúa el remodelado óseo. Este proceso consiste en degradar y construir tejido, pero en el mismo lugar. El remodelado es continuo y permite a los huesos adaptar su estructura a las fuerzas que actúan sobre ellos, depositando y reabsorbiendo hueso, dependiendo de las necesidades mecánicas a las que se vea sometido. El científico alemán Julius Wolff hizo referencia a esta situación, de la forma y función estática del hueso y estableció un modelo matemático entre la arquitectura trabecular y la trayectoria de las tensiones a las que se ve sometido [6].

En la figura 1. 5 se observa este proceso. El remodelado óseo comienza cuando se activan los osteocitos, esto puede deberse a cambios en las fuerzas mecánicas, a la homeostasis de calcio o a variación de niveles hormonales. Provocando una señal que produce la activación de los precursores de los osteoclastos. Después los osteoclastos se agrupan en el sitio donde se va a degradar. Estas células se fusionan firmemente al hueso, gracias a que su membrana tiene pliegues irregulares y estando en la superficie comienzan a secretar iones de hidrógeno. Estos iones acidifican el medio local y disuelven los minerales de la matriz ósea, quedando en el tejido, un hueco. Este proceso recibe el nombre de resorción ósea. Esto es importante en el organismo, ya que al ser el hueso el almacén de minerales, principalmente calcio y fosfatos, va a suministrar al organismo las cantidades necesarias dependiendo de la demanda del tejido. La fisiología del calcio es vital para la función muscular, contracción cardíaca, actividad neuronal y en general para la mayoría de los procesos de regulación transmembranal.

Ya que se tiene un hueco en la superficie del hueso, los osteoclastos comienzan a morir, ahí es donde termina la resorción y comienza la tercera etapa. Esta parte del remodelado es donde se comienza a preparar la construcción. Los azúcares y proteínas se acumulan a lo largo de la superficie del hueso, formando los cimientos que van a unir hueso viejo y al hueso nuevo que está por crearse. Hasta este punto le ha tomado al organismo tres semanas en completar el proceso.

En la última etapa los osteoblastos establecen nuevo tejido osteoide, el cual rellena los huecos. El tejido osteoide es tejido de la matriz ósea que se compone de colágeno y otras proteínas, que aún no mineraliza. Después de que el tejido osteoide se construye, comienza a mineralizarse. Esta etapa dura meses, debido a que el hueso mineralizado se empaqueta de una forma continua y más densa.

Por lo tanto se puede decir que el hueso continuamente se adapta al esfuerzo mecánico, esto a través del remodelado óseo [7].

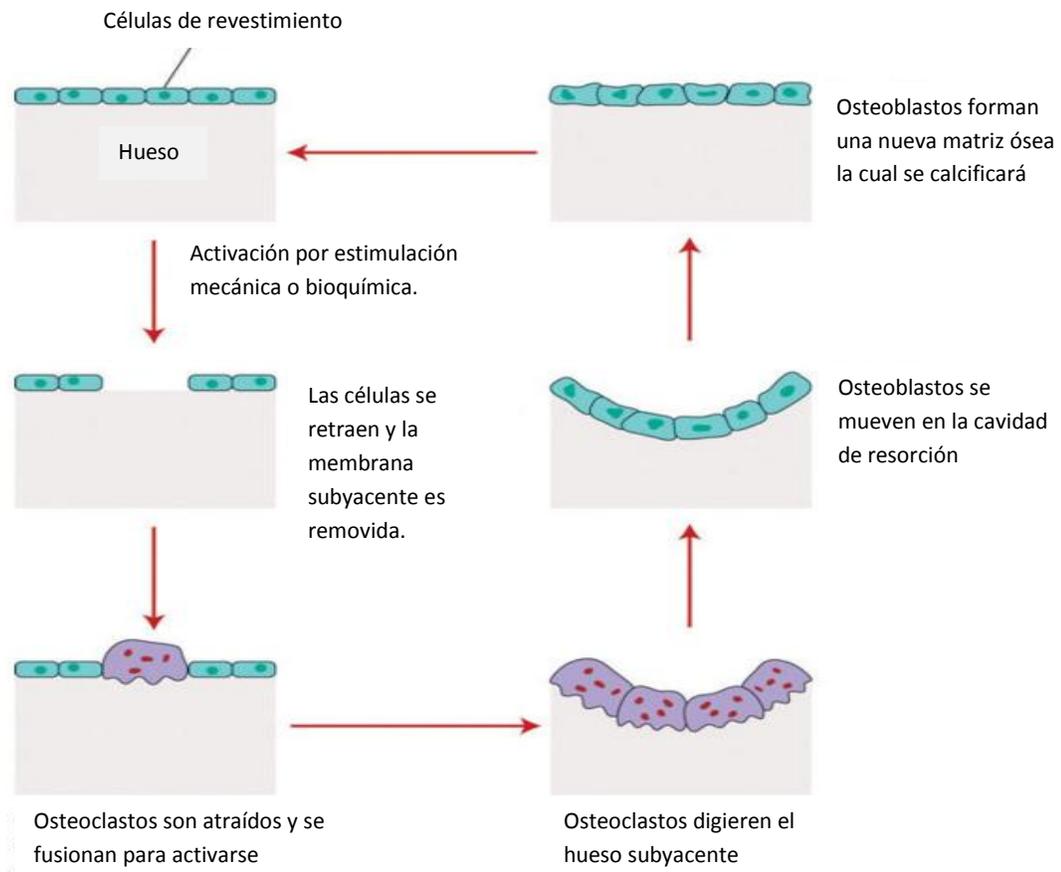


Figura 1.5 Diagrama del remodelado óseo, que es la forma en que el hueso se rompe de manera que pueda repararse a sí mismo [7].

1. 6 Enfermedades óseas

Como se mencionó anteriormente el sistema muscular junto con el tejido óseo, tiene la función de movimiento de los organismos. Por tanto los huesos van a ser tan fuertes según sea la fuerza de los músculos, por eso es tan importante el ejercicio y un buena alimentación. En los últimos años, se ha hecho énfasis en la denominada salud ósea, la cual ha demostrado que invertir en el banco óseo durante la juventud y comienzos de la edad adulta, mediante una buena alimentación y estilo de vida saludable, permite que los huesos se vuelvan más fuertes y menos vulnerables a enfermedades óseas [8].

La enfermedad ósea es una condición que daña el esqueleto y huesos débiles, haciéndolos propensos a fracturas. Existe una gran variedad de enfermedades óseas, por mencionar algunas: la enfermedad de Paget y osteogénesis imperfecta. La enfermedad de Paget afecta a más hombres que mujeres, y provoca fracturas y deformidades esqueléticas. La osteogénesis imperfecta es un trastorno hereditario que causa huesos quebradizos y fracturas frecuentes en los niños.

La enfermedad ósea más frecuente es la osteoporosis, en México se ha descrito una prevalencia de osteoporosis del 17% en mujeres mayores de 50 años [9]. Esta enfermedad se define por la pérdida de masa ósea por parte del hueso en relación a los valores normales durante el envejecimiento. Se relaciona con un aumento de sufrir fracturas óseas con mínimos traumatismos o con movimientos físicos habituales. Debido a la pérdida de masa ósea la estructura se vuelve en consecuencia más esponjosa y más frágil. En la osteoporosis predomina la destrucción ósea sobre la formación, haciendo a este hueso poroso, susceptible de fracturas [10].

Una persona adulta alcanza su pico de masa ósea hacia los 35 años. Es a partir de aquí que empieza una disminución lenta de la masa ósea que dura toda la vida.

Otra enfermedad de consideración es el cáncer óseo. El cáncer de hueso es un tumor óseo maligno que destruye el tejido normal del hueso [11]. También existen tumores de hueso benignos y son más comunes que los tumores malignos. Tanto

los tumores óseos malignos como los benignos pueden crecer y comprimir el tejido óseo sano, pero los tumores benignos no se diseminan, no destruyen el tejido óseo y rara vez ponen la vida en peligro.

Los tumores malignos que empiezan en el tejido óseo se denominan cáncer óseo primario. El cáncer que se disemina a los huesos desde otras partes del cuerpo, como de los senos, de los pulmones y de la próstata, se denomina cáncer metastático y recibe el nombre del órgano o tejido en el cual se originó.

1. 7 Ingeniería de tejidos

Con el avance tecnológico, se busca la manera de mejorar la salud y calidad de vida, por ello las ciencias como biología, medicina e ingeniería crearon el campo emergente denominado ingeniería de tejidos, en donde se busca revolucionar materiales y métodos que restauren, mantengan y mejoren el tejido y/o órgano que se desee [12]. De ahí que nacieron los biomateriales, los cuales se pueden definir como materiales que pueden estar en contacto con tejido vivo.

Al inicio de las investigaciones en este campo, los materiales solo deberían sustituir al tejido, por lo tanto, las principales característica de este tipo de materiales era ser inertes. Esto quiere decir no interactuar con el organismo para evitar alguna respuesta negativa del huésped. Pasaron los años y se diseñaron nuevas propuestas de materiales, ahora con el objetivo de reparar los tejidos por lo tanto deberían de ser biocompatibles y biodegradables. A partir de estos materiales se innovaron unos nuevos, que tienen como objetivo de regenerar al tejido debido a que estos materiales van a interactuar en el organismo a nivel biológico y molecular. Estos materiales de tercera generación tienen como principio la interacción entre células, señales y andamios [13].

1.8 Aplicación en tejido óseo

Como ya se describió anteriormente, el hueso es un tejido capaz de regenerarse dependiendo de las situaciones a las que se vea sometido, incluso a fracturas, que son alteraciones de la estructura jerárquica del tejido. La anatomía de este tejido y sus propiedades biológicas le dan la facultad de restaurar la estructura sin que queden vestigios de cicatriz alguna. Pero en casos clínicos muy especiales, ya sea por una lesión grave, alguna enfermedad o por una malformación, se llegan a presentar defectos más grandes que el organismo no puede reparar, es aquí donde se recurre a la ingeniería de tejidos.

Existen varios métodos para la regeneración de tejido óseo, los cuales van desde implantar tejido óseo hasta injerto de materiales compuestos [14]. Estos materiales deben de ser osteogénicos, osteoinductivos y osteoconductivos. La interacción de estos tres elementos va a permitir lo que se denomina osteointegración. La osteointegración describe el enlace que se forma entre las superficies del hueso y el injerto de material.

La característica osteogénica se presenta sólo en tratamientos biológicos. Los tratamientos biológicos son injertos de tejido óseos trabecular y pueden ser autoinjertos y aloinjertos. En los autoinjertos se utiliza hueso obtenido del mismo organismo. Los aloinjertos son realizados con hueso externo al organismo, la mayoría de las veces por donación de hueso. Existe un tercer tipo de injerto de tejido: el xenoinjerto. En este tipo de tratamiento se recurre a un tejido de una especie diferente, un ejemplo es la aplicación de hueso de origen bovino. Estos tipos de injertos vascularizados tienen células osteoprogenitoras que pueden sobrevivir al trasplante, son deseables porque pueden proliferar y diferenciarse a osteoblastos y llegar a formar osteocitos [15].

Cuando no se puede aplicar tratamientos biológicos se recurren a implantes de biomateriales, estos materiales van a ser usados como andamios para inducir, del tejido circundante del implante, la formación de hueso. En los materiales se busca que sean osteoinductivos y osteoconductivos. La osteoinducción es la

estimulación y activación de células multipotenciales del tejido circundante, a partir de un ambiente no óseo. Las células se diferencian a osteoblastos para que comience la formación de hueso. La osteoconducción se basa en el crecimiento interno de capilares y células del huésped en una estructura para la formación de hueso. Un material osteoinductor permite la reparación en una zona que normalmente no sanaría sin tratamiento, mientras que un material osteoconductor guía la reparación del tejido en un lugar donde la reparación ocurriría sin tratamiento [16].

Los biomateriales pueden ser sistemas acelulares o celulares. Los acelulares son materiales, que como lo indica el nombre carecen de células y pueden ser sólidos, rellenos o andamios. Los celulares, son materiales a los que se les realiza cultivos de células previo al implante del tejido. Para ambos tipos de sistemas los polímeros, los cerámicos y los materiales compuestos son buenas opciones de trabajo. Hoy en día, el campo de la ingeniería de tejidos tiene ya establecido las bases esenciales para el diseño y fabricación de tejidos en 2 o 3 dimensiones para su aplicación. Ver Figura 1.6.

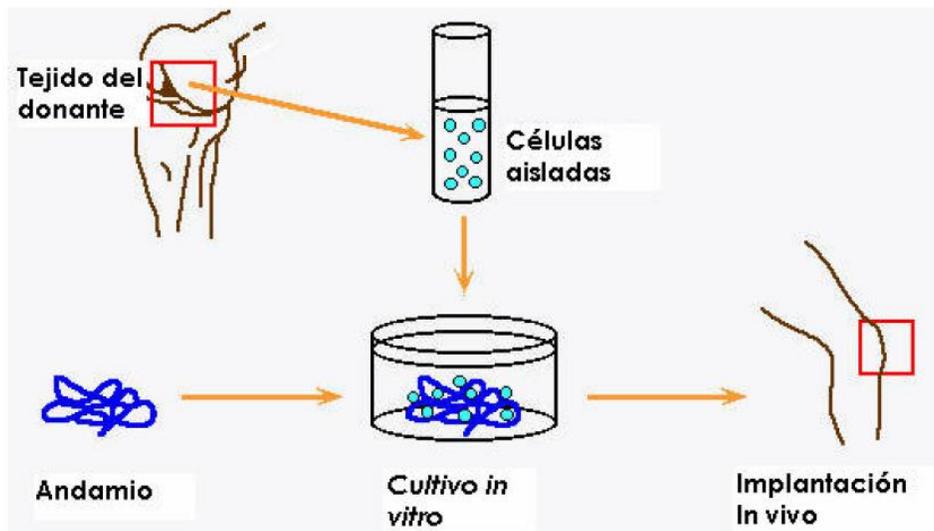


Figura 1.6 Esquema de la aplicación de la ingeniería de tejidos. [16]

1.8.1 Aplicación de metales y cerámicos

Los metales se han utilizado desde la primera generación de biomateriales. Estos materiales se han utilizado como métodos de fijación e implantes. Por ejemplo placas de osteosíntesis, clavos y tornillos quirúrgicos e implantes dentales. Figura 1.7.

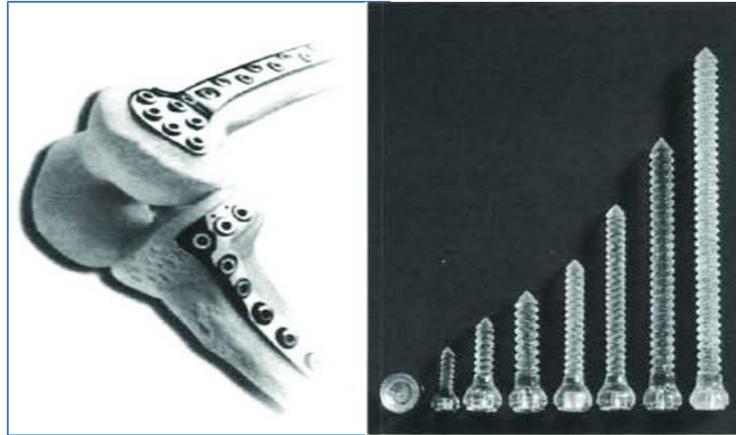


Figura 1. 7 Placas de osteosíntesis y tornillos quirúrgicos, ejemplos de metales aplicados como biomateriales [17].

Las cerámicas junto con los biovidrios se han usado para rellenar cavidades y defectos óseos. En los últimos años, se han trabajado con nanopartículas de dióxido de silicio debido a sus excepcionales propiedades físico-químicas como la resistencia mecánica, estabilidad química, biocompatibilidad y la gran versatilidad de síntesis que poseen [18].

Se han usado también nanopartículas de óxido de hierro, típicamente de magnetita (Fe_3O_4) al demostrarse que son biocompatibles y fácilmente biodegradables. Estas nanopartículas tienen gran potencial en la biomedicina dada su capacidad intrínseca de ser monitorizada mediante campos magnéticos [19]. La tecnología con materiales magnéticos ha incrementado sus aplicaciones en separación biomolecular y diagnóstico, especialmente en ensayos inmunológicos. También está su aplicación en imagenología y en tratamientos contra el cáncer [20].

Estos materiales pueden tener las características de ser inertes, o poseer una mínima reactividad química. Deben de ser bioactivos y de preferencia bioabsorbibles. Al ser bioactivos generan una respuesta biológica en la interfase del material que permite que las células de los alrededores comiencen con la regeneración de tejido. Al tener la característica de ser bioabsorbibles, estos materiales pueden ser degradados por el tejido que se está generando, sin generar productos tóxicos y ser desechados por el organismo.

1.8.2 Aplicación de polímeros

Los polímeros se han usado para la realización de implantes médicos, ya que presentan propiedades físicas y químicas que se suman a las propiedades mecánicas que poseen, que son parecidas a la de los tejidos que se busca reemplazar. En recientes años se han introducido los polímeros bioabsorbibles, que en la cirugía ortopédica tienen como objetivo la fijación de fracturas y/o reemplazo óseo. Estos materiales al ser degradados no deben producir sustancias mutagénicas, antigénicas o tóxicas. Estos polímeros deben de ser antisépticos, esterilizables para que puedan estar en contacto con el tejido sin causar algún efecto.

Existen los polímeros naturales y los sintéticos. Como ejemplos naturales se tiene al colágeno, la quitina y el quitosano. Como polímeros sintéticos se puede mencionar el polimetilmetacrilato, el polietileno y el poliácido láctico (PLA). La investigación en polímeros sintéticos en los últimos años ha tenido un gran auge. Ya que se pueden variar ciertos parámetros para tener una gran variedad de composiciones y propiedades [21]. Estos materiales poliméricos son utilizados para soportar mecánicamente a las células mientras se lleva a cabo la reparación ósea, funcionan como un andamio.

El PLA es un polímero termoplástico, amorfo o semicristalino que se utiliza en implantes y en la liberación de fármacos [22]. El PLA se degrada inicialmente por hidrólisis y esta puede ser acelerada por la presencia de enzimas, que rompe la cadena en monómeros de ácido láctico. Estos monómeros se incorporan a los procesos fisiológicos donde continúa su degradación en CO₂ y agua.

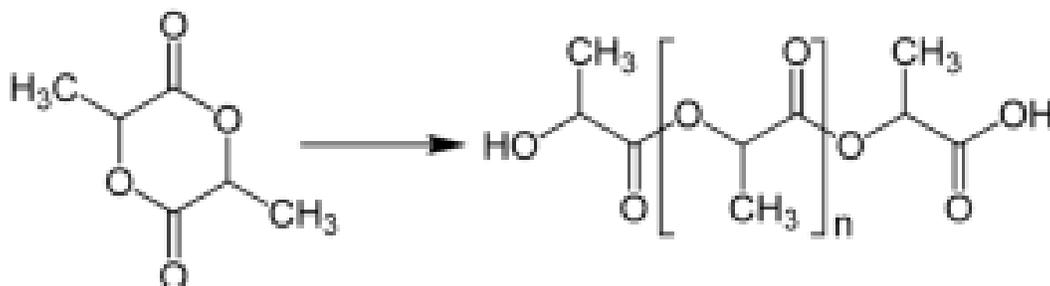


Figura 1. 8 Obtención de PLA a partir de la apertura del diéster cíclico [23].

II.- Materiales y métodos

En este capítulo se presentan los materiales utilizados para la elaboración de los biomateriales, así como los procedimientos experimentales con los cuales se sintetizaron de manera individual. El listado de estos materiales es el siguiente:

- Preparación de las nanopartículas de óxido de hierro.
- Preparación de las nanoesferas de dióxido de silicio.
- Preparación de las nanoestructuras de óxido de hierro con dióxido de silicio.
- Preparación de andamios con el polímero poliácido láctico (PLA).
- Preparación de los andamios de PLA con las nanoestructuras.

Estos materiales se caracterizaron de manera química, estructural y morfológica. En la caracterización química se utilizó la espectroscopia infrarroja, para la caracterización estructural se usó difracción de rayos X, mientras que para la caracterización morfológica se utilizó microscopia electrónica de barrido junto con microscopia electrónica de transmisión. Se revisó su funcionalidad biológica en los andamios de PLA con las nanoestructuras de $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2$, realizando los ensayos biológicos como el de adhesión celular y el de proliferación celular.

2.1 Síntesis de materiales

2.1.1 Óxido de hierro Fe_3O_4

2.1.1.1 Métodos de síntesis

Desde que se ha trabajado con los materiales magnéticos para el campo de la medicina se busca que tenga las siguientes características: un alto valor de magnetización, partículas menores a 100 nm, y una angosta distribución de tamaño. Existen muchos procedimientos de síntesis para obtener estas nanopartículas, por mencionar algunas se tiene la técnica por precipitación, las

reacciones a alta temperatura, el método sol-gel, por la descomposición de precursores organometálicos entre otros más.

De acuerdo a la literatura, la síntesis de estas nanopartículas es un proceso complejo debido a la naturaleza coloidal con la que se tiene que trabajar las disoluciones. El primer reto que se enfrenta al sintetizar este tipo de partículas es definir las condiciones experimentales, ya que esto permite la presencia de granos magnéticos monodispersos. El segundo factor crítico es la selección de un procedimiento reproducible, que en un futuro sea escalable a proporciones industriales. Con esto en mente, la síntesis por coprecipitación de sales de hierro es la más usada. Esta técnica simple y eficiente se prepara con la mezcla estequiométrica de sales férricas y ferrosas, a un periodo largo de tiempo en solución acuosa [25].

2.1.1.2 Procedimiento experimental

Se preparó una solución acuosa que contuviera disuelto sulfato férrico y sulfato ferroso en una relación molar de 2:1. Esta solución se dejó en agitación durante 15 minutos para disolver las sales y homogenizar la solución. Se montó el sistema de adición, Figura 2.1. Transcurrido ese tiempo la solución amarilla se transvasó al sistema de adición en el matraz, dejando el matraz en el sonicador Branston. Se adicionó gota a gota en la parte superior del sistema, hidróxido de amonio grado reactivo al 28.9%. Se dejó la solución en el sonicador durante dos horas. Transcurrido ese tiempo se observa un precipitado de color negro. Con ayuda de un imán se lavaron las nanopartículas magnéticas con agua desionizada tres veces. Después de diluyeron en agua desionizada para poder trabajarlas en la preparación de nanoestructuras.



Figura 2. 1 Sistema de adición. Se muestra el matraz adicionador y embudo de tres bocas.

2.1.2 Dióxido de silicio o sílice SiO_2

2.1.2.1 Métodos de síntesis

El avance de la tecnología ha permitido que se mejore el campo de estudio de los nanomateriales. Las propiedades físicas, químicas, biológicas y mecánicas (por mencionar algunas) de los materiales cambian al disminuir su tamaño. Con esto se puede hacer la idea que la mayoría de los materiales se pueden obtener a tamaño nanométrico.

El dióxido de silicio o sílice (SiO_2) no es la excepción, ya que ahora se logra producir a tamaños nanométricos, permitiendo con esto, una eficiencia para aplicaciones en la industria e investigación. El SiO_2 se extrae de fuentes naturales, por consiguiente contienen impurezas, lo que no es favorable para su uso directo y si es necesaria su purificación. El SiO_2 sintético se puede obtener en forma de coloide, o gel, como un precipitado, su estructura es amorfa pero pura.

Comparado con la forma natural, es decir el SiO₂ mineral (cuarzo, tridimita, cristobalita), el cual se encuentra en forma cristalina.

De acuerdo a la literatura los métodos para obtención de SiO₂ se han clasificado en dos grupos: *arriba-abajo* (top-down) y *abajo-arriba* (bottom-up). Las técnicas arriba-abajo reciben su nombre porque de una escala macrométrica se reduce sus dimensiones mediante técnicas especiales. Las técnicas abajo-arriba son procedimientos químicos que a partir de la escala atómica se forman escalas moleculares. En este grupo se encuentra el método sol-gel. Este método es ampliamente usado ya que permite controlar el tamaño de partícula, la distribución de tamaño y la morfología, solo monitoreando algunos parámetros durante la reacción. La reacción se realiza a temperatura ambiente y permite obtener un material homogéneo, mediante reacciones de hidrólisis y condensación de un alcóxido, en este caso el tetraetil ortosilicato (TEOS) Si(OC₂H₅)₄, y una base como catalizador [26].

2.1.2.2 Procedimiento experimental

En un vaso de precipitados se agregó en relación volumen 26:1 de alcohol etílico grado reactivo y tetraetil ortosilicato (como precursor para las nanoesferas), se agitó por tres minutos. Transcurrido ese tiempo se adicionó un volumen de agua desionizada y se agitó por tres minutos. Transcurrido ese tiempo se adicionó 0.65 mL de hidróxido de amonio grado reactivo al 28.9%. Se dejó en agitación durante 4 horas. Transcurrido ese tiempo se lavaron las nanopartículas con agua desionizada y posteriormente con etanol. El procedimiento de lavado consiste en redispersarlo con el disolvente durante 5 minutos, para después centrifugarlo a 9000 rpm durante 5 minutos. Se desecha el disolvente de la parte superior y se agrega disolvente fresco.

2.1.3 Nanoestructuras de Fe₃O₄/SiO₂

2.1.3.1 Método de síntesis

Los compositos (también llamados materiales compuestos) se consideran como materiales multifase, que conservan una proporción significativa de las propiedades de las fases constituyentes de manera que presentan la mejor combinación posible. Todo esto en base al principio de acción combinada que da pauta a nuevas propiedades, mejores combinaciones de propiedades y altos niveles de propiedades, los cuales se consiguen con la combinación racional de dos o más materiales distintos [27].

De acuerdo a la bibliografía, hay diferente técnicas por los cuales sintetizar estos compositos. Existe la técnica de síntesis por flama usando precursores en solución coloidal [28], el procedimiento modificado de microemulsión inverso [29], la técnica hidrotermal [30], y el método sol-gel [31]. El método sol-gel se utilizó debido a que las nanopartículas de Fe₃O₄ tienen afinidad hacia el SiO₂.

2.1.3.2 Procedimiento experimental

Síntesis por sol-gel

Se tomó una alícuota de la solución de nanopartícula magnéticas, y se reservó, ya que se usaría más adelante. Para la solución inicial en un vaso de precipitados se agregó en relación volumen 26:1, alcohol etílico y tetraetil ortosilicato, se agitó por tres minutos. Transcurrido ese tiempo se adicionó la alícuota de nanopartículas magnéticas, que anteriormente se había reservado, se agitó por tres minutos. Pasado ese tiempo se adicionó 0.65 mL de hidróxido de amonio al 28.9%. Se dejó en agitación durante 4 horas. Después de ese lapso, se tiene una solución de color café se enjuagó dos veces con agua desionizada y tres veces con etanol.

2.1.4 Preparación de los andamios de Poliacido Láctico (PLA) con las nanoestructuras

2.1.4.1 Método de síntesis

El poliacido láctico es un polímero versátil, existen varios métodos para poder manipularlo dependiendo de la aplicación que se quiera cubrir. A nivel industrial uno de los métodos que se utiliza es el moldeado por inyección, el cual se usa para producir artículos termoestables.

Para el campo biomédico, es exactamente lo mismo, el presente trabajo se busca que el PLA funcione como un remplazo de matriz extracelular. Por lo tanto el andamio debe de tener porosidad y tamaño de poro adecuados para que funcione. Estas características físicas se requieren debido a que el andamio debe permitir la migración celular y el crecimiento del tejido a lo largo del andamio. Entre las técnicas usadas para la fabricación de andamios se tiene: el hilado y el electrohilado.

La técnica de electrohilado consiste en hacer fibras delgadas mediante la aplicación de un campo electroestático a una gota proveniente de una solución de PLA. Estas fibras pueden tener un diámetro desde micras a nanómetros. Esta técnica consiste en aplicar un campo eléctrico entre un capilar y un colector por una fuente de alto voltaje (Figura 2.2). Debido al campo eléctrico, la gota que se encuentra en la punta del capilar va a cambiar su forma a semiesférica, y después a cónica. Con esta forma cónica recibe el nombre de cono de Taylor. Cuando el campo eléctrico supera a la tensión superficial de la solución, esta sale eyectada hacia el colector en forma de fibra, y en el trayecto se evapora los disolventes [32].

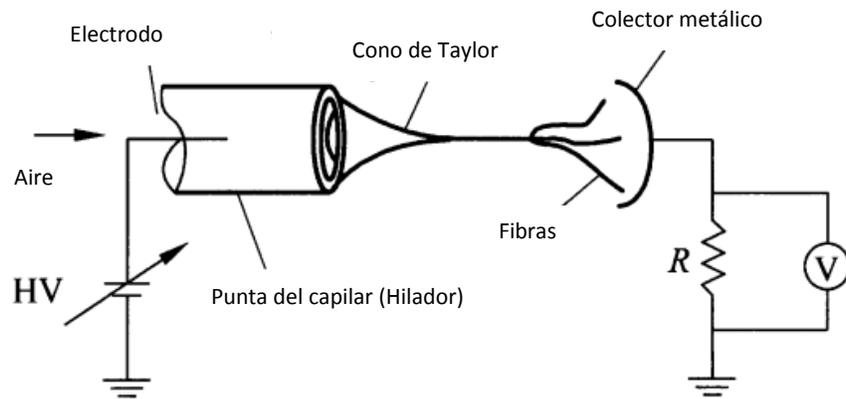


Figura 2. 2 Esquema representativo del sistema de electrohilado.

2.1.4.2 Procedimiento experimental de síntesis de fibras

El sistema de electrohilado con el que se trabajó se muestra en la Figura 2.3, se compone de un sistema de alta tensión, un hilador y un colector. Como hilador se utilizó una jeringa convencional de 5 mL. Como colector se utilizó una placa de cobre (15x15 cm) recubierta con papel aluminio. La fuente de alto voltaje se conecta en la punta de la jeringa (ánodo) y en la placa colectora (cátodo).



Figura 2. 3 Se compone de un sistema de a) alta tensión, b) un hilador y c) un colector.

A pesar de que la técnica de electrohilado es una técnica que se ha usado desde principio del siglo XX, no se puede estandarizar de forma específica, ya que intervienen diferentes parámetros como lo es la concentración de la disolución, la humedad del ambiente, el voltaje aplicado, el peso molecular del polímero, entre otros factores. El peso molecular es un parámetro crítico, se ha estudiado e influye en propiedades reológicas (como viscosidad y tensión superficial) y eléctricas (como conductividad y fuerza dieléctrica) [33].

La concentración de trabajo del PLA es del 10%, en búsqueda de fibras adecuadas para el uso de andamios, se trabajó con los siguientes parámetros:

- **Disolventes para el PLA:** cloroformo, cloroformo/etanol, cloroformo/dimetilformamida.
- **Distancias de separación entre el ánodo y cátodo:** 10 cm, 15 cm y 20 cm.
- **Voltaje aplicado:** 10 kV, 15 kV y 20 kV.

2.1.4.3 Montaje de nanoestructuras de $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2$ en las fibras de PLA

Procedimiento experimental

Al tener las condiciones adecuadas para la síntesis de nanofibras de PLA, estos parámetros experimentales se replicaron ahora agregando las nanoestructuras magnéticas. Se realizaron tres diferentes disoluciones en donde la concentración de las nanopartículas se modificó desde una disolución a baja concentración, hasta una alta concentración, como lo indica la Tabla 2.1.

Tabla 2. 1 Concentración de nanoestructuras en la disolución de PLA.

Volumen de disolución polimérica.	Masa de nanoestructuras magnéticas	Concentración
(mL)	(g)	(mg/L)
10	0.005	500
	0.01	1000
	0.1	10000

2.2 Caracterización de materiales

Los materiales que se obtuvieron de las diferentes síntesis, tienen nuevas propiedades que no sólo dependen de los materiales iniciales, sino también de la morfología y de sus propiedades adquiridas. Los materiales sintetizados previamente, fueron caracterizados con el fin de conocer estas propiedades. Realizándose los análisis químico, estructural y de morfología, para que más adelante se pudiera observar cómo funcionan específicamente en la aplicación de interés, en este caso, la ingeniería de tejidos.

En la Tabla 2.2 se muestra un resumen de las técnicas aplicadas para los materiales sintetizados.

Tabla 2. 2 Resumen de las técnicas de caracterización.

Técnica	Acrónimo	Información obtenida.
Difracción de rayos X, polvos.	DRX	Identificación de fases presentes, estructura cristalina y tamaño de partículas.
Espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier.	FTIR	Identificación de enlaces átomo-átomo, grupos funcionales y estructuras moleculares.
Microscopia electrónica de barrido.	MEB	Morfología de la superficie, cristalografía superficial y composición de elementos.
Microscopia electrónica de transmisión	MET	Morfología, tamaño y distribución de nanopartículas. Cristalinidad por difracción de electrones.

2.2.1 Espectroscopia infrarroja (IR)

2.2.1.1 Fundamentos

La región infrarroja, del espectro electromagnético, comprende la región de longitud de onda de 0,75 μm - 400 μm (en número de onda desde 12800 cm^{-1} a 10 cm^{-1}). Se divide en infrarrojo cercano, que abarca la región 12800 cm^{-1} - 4000 cm^{-1} ; infrarrojo medio, que comienza de 4000 cm^{-1} y termina en 400 cm^{-1} ; y por último el infrarrojo lejano, su región es de 400 cm^{-1} - 10 cm^{-1} [34].

En comparación con la energía de las regiones ultravioleta-visible, la energía de la región infrarroja no es suficiente para producir una transición electrónica en el

enlace, pero permite modificar la energía entre los movimientos vibracionales y rotacionales de la molécula.

La molécula para absorber energía infrarroja, debe tener un cambio en el momento dipolar cuando vibra o gira. El momento dipolar está determinado por la magnitud de las diferencias de carga y por la distancia entre los centros de carga de la molécula. Si la frecuencia de la radiación coincide con la frecuencia de vibración natural tiene lugar la absorción, sólo así, la radiación puede interactuar con la molécula y modificar la intensidad de sus movimientos.

En la Figura 2.4 se muestran los movimientos de los átomos de una molécula con uniones covalentes, que presentan movimientos de estiramiento y de deformación. Pero no todas las sustancias presentan momento dipolar durante la vibración o rotación que permita la absorción de radiación infrarroja, por mencionar, se tienen las especies homonucleares O_2 , N_2 , Cl_2 [35].

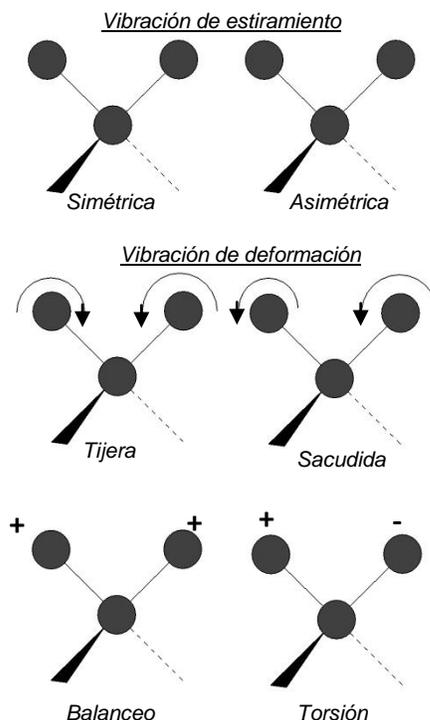


Figura 2. 4 Tipos de vibraciones fundamentales en las moléculas.

2.2.1.2 Materiales

Para la caracterización química, se empleó la técnica de espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FTIR), utilizando un equipo Shimadzu, modelo IR Affinity-1 equipado con el accesorio ATR (por sus siglas en inglés de Attenuated Total Reflectance). Los materiales en forma de polvo se analizaron de la región de 4000cm^{-1} a 400 cm^{-1} :

- Las nanopartículas de Fe_3O_4 .
- Las nanopartículas de SiO_2 .
- Las nanoestructuras de $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2$.
- Las fibras de PLA.
- Las fibras de PLA con nanoestructuras de $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2$.

2.2.2 Difracción de rayos X (DRX)

2.2.2.1 Fundamentos

Los rayos X se pueden ubicar en el espectro electromagnético aproximadamente en la región de $10\text{-}5\ \mu\text{m}$ a $100\ \text{Å}$. Esta longitud de onda se produce cuando se desaceleran los electrones de alta energía o por transiciones de electrones que se encuentran en los orbitales internos de los átomos.

Los rayos X se utilizan en la caracterización de los materiales en tres formas, la emisión, la absorción y la difracción de rayos X. La difracción de rayos X se presenta en los planos de un cristal, este método depende de las características ondulatorias de rayos X y del espaciamiento uniforme de los planos de un material cristalino. Su mayor utilidad se enfoca en obtener parámetros de cristalinidad, composición de fases cristalinas, tamaño de partícula, aunque también puede utilizarse para análisis cuantitativos [36].

2.2.2.2 Ley de Bragg

Las longitudes de onda de algunos rayos X son más o menos iguales a la distancia entre planos de átomos de sólidos cristalinos. Cuando una radiación electromagnética incide sobre una superficie, provista de un gran número de elementos espaciados regularmente a intervalos aproximadamente iguales, se produce el fenómeno de difracción, consistente en la separación del rayo incidente en una serie de haces que se dispersan en todas direcciones [37].

Este espaciado es del orden de Å, que es la misma magnitud de la longitud de onda de los rayos X, éstos últimos pueden ser difractados por el sólido que actúa como rejilla de difracción. Los elementos de la rejilla, son las partículas constituyentes del sólido y más precisamente sus electrones, que al recibir la radiación, la remiten haciendo las veces de nuevas fuentes de radiación.

La Figura 3 indica la Ley de Bragg, que se muestra en la ecuación 1.

$$n\lambda = 2 * d * \text{sen}\theta \quad \text{ec. 1}$$

Donde n es un número entero, λ la longitud de onda de radiación, d es la distancia interplanar del cristal y θ es el ángulo de incidencia. Para el ángulo θ , los rayos reflejados están en fase y se refuerzan mutuamente y representa el ángulo entre el rayo incidente (o el reflejado) y el cristal. El rayo incidente número 2 recorre la siguiente distancia (más que el rayo incidente número 1).

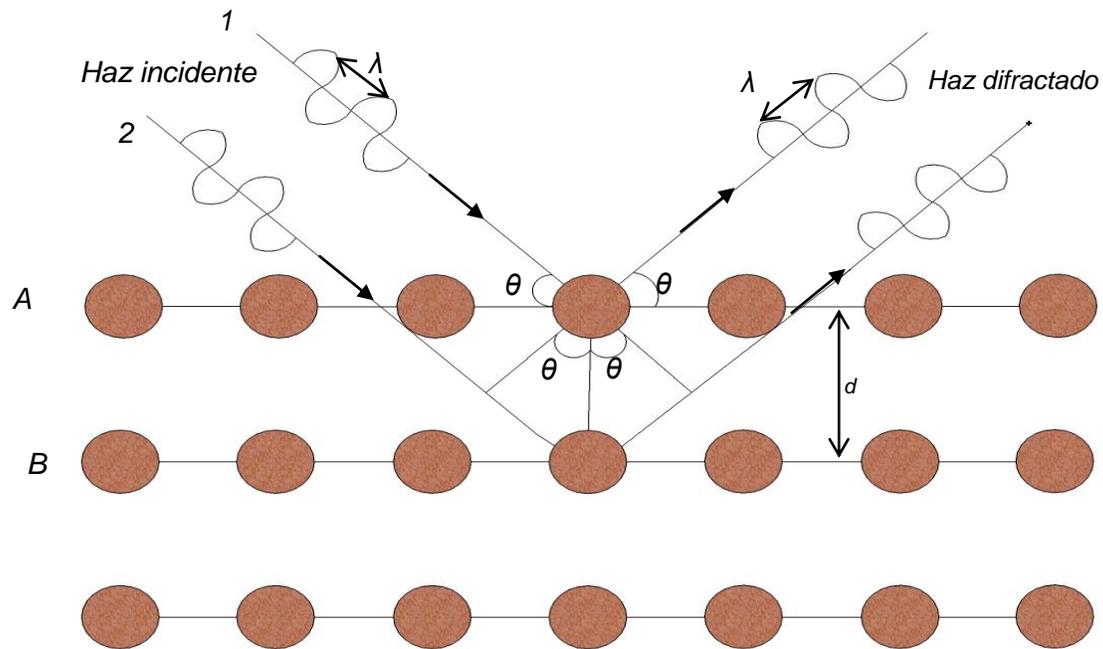


Figura 2. 5 Esquema representativo de la ley de Bragg.

2.2.2.3 Materiales

Para la caracterización estructural se usó la técnica de difracción de rayos X. Se usó el difractómetro de rayos X Siemens modelo D5000. Los materiales se analizaron del ángulo 2θ . Se analizaron en forma de polvos y de fibras, los siguientes materiales:

- Las nanopartículas de Fe_3O_4 .
- Las nanopartículas de SiO_2
- Las nanoestructuras de $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2$.
- Las fibras de PLA.
- Las fibras de PLA con nanoestructuras de $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2$.

2.2.3 Microscopía electrónica de barrido (MEB)

2.2.3.1 Fundamentos

La microscopía electrónica de barrido (MEB) es un método para la proyección de imagen de alta resolución de superficies. MEB utiliza electrones para la proyección de imagen, que es lo que lo diferencia del microscopio óptico que utiliza la luz visible.

El microscopio electrónico genera un haz de electrones incidentes, los cuales son contenidos en una columna de lentes electromagnéticas por encima de la cámara de muestras. Los electrones son producidos por una emisión térmica de una fuente (como el filamento de tungsteno calentado o por un cátodo de emisión de campo) al calentar el filamento desprende electrones creando una nube de iones que se colectan y enfocan para formar un haz. La energía del haz de electrones pueden ser tan bajo como 100 eV o tan alto como 30 keV. Los electrones se concentran en un pequeño haz de luz, a causa de una serie de lentes electromagnéticas en la columna del equipo.

Las bobinas de exploración, cerca del final de la columna, direccionan y colocan el haz enfocado sobre la superficie de la muestra. El haz de electrones se escanea en patrón sobre la superficie de la muestra para la proyección de la imagen. El haz de electrones puede ser enfocado en un punto o puede analizar a lo largo de una línea esto para análisis de rayos X. El haz puede ser enfocado a un diámetro final de la sonda tan pequeño como 10 Å.

La interacción de los electrones con la materia es inevitable, provocando electrones emitidos de la muestra debido a eventos de dispersión elásticas e inelástica. Los electrones emitidos de la superficie del material de la muestra, son electrones de alta energía que son expulsados por una colisión elástica de un electrón incidente, se denominan electrones retrodispersados. Los electrones de baja energía, emitidos de la dispersión inelástica, se llaman electrones secundarios. Los electrones secundarios, se pueden formar por las colisiones con el núcleo donde se producen pérdidas de energía considerable o por la expulsión

de electrones ligadas a los átomos de la muestra. La energía de electrones secundarios es típicamente 50 eV o menos.

La señal de electrones secundarios proporciona la imagen morfológica de la muestra, la señal de electrones retrodispersados proporciona una imagen cualitativa de zonas con diferente número atómico medio y la señal de rayos-X proporciona datos de la composición de elementos químicos en la muestra [38].

2.2.3.1 Materiales

Para la caracterización morfológica se usó la técnica de microscopía electrónica de barrido. Se usó el instrumento Jeol JSM 6390LV. Los materiales se analizaron a diferentes acercamientos y fueron analizados en forma de polvos y fibras los siguientes materiales:

- Las nanopartículas de Fe_3O_4 .
- Las nanopartículas de SiO_2
- Las nanoestructuras de $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2$.
- Las fibras de PLA.
- Las fibras de PLA con nanoestructuras de $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2$.

2.2.4 Microscopía electrónica de transmisión (MET)

2.2.4.1 Fundamentos

Esta técnica también hace uso de un haz de electrones, el cual es transmitido a través de una muestra delgada e interactúa con ella cuando la atraviesa. Cuando se realiza la interacción, una imagen se forma debido a los electrones que se transmiten a través de la muestra.

En MET las muestras cristalinas interactúan con el haz de electrones principalmente debido a difracción. La intensidad de la difracción depende de la orientación de los planos de los átomos en un cristal con respecto con el haz de electrones. Esto produce una variación en la intensidad de electrones, y con ello se puede obtener información estructural del cristal que se está analizando.

Con esta técnica se puede detectar defectos en la red cristalina. Se puede producir una imagen debido a los electrones desviados por un plano cristalino en particular, y se debe a la técnica de campo oscuro.

La preparación de la muestra es importante, ya que debe ser lo suficientemente delgada para que el haz de electrones pueda penetrar en ella. Esta técnica no tiene inconvenientes para muestras en polvo. Cuando se presentan espesores mayores a 100 nm es necesario el uso de micrótomos [39].

2.2.4.2 Materiales

Para complementar la caracterización morfológica se usó la técnica de microscopía electrónica de transmisión. Se usó el microscopio JEOL modelo JEM-ARM200CF. Los materiales se analizaron a diferentes acercamientos y fueron analizados en forma de polvos,

- Las nanopartículas de Fe_3O_4 .
- Las nanoestructuras de $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2$.

2.3 Ensayos biológicos

Se llevaron a cabo los ensayos biológicos para conocer el comportamiento de estos materiales en presencia de células en un ambiente controlado, con el fin de conocer si los materiales afectan a las células al ser utilizados como andamios.

Antes de realizar los ensayos, las fibras se tienen que esterilizar. El siguiente procedimiento se realizó para este fin: Se realizaron cortes de las fibras sintetizadas de PLA y PLA con nanoestructuras de $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2$, en forma circular de un centímetro de diámetro. Después de ser cortadas se trabajó en la campana de flujo laminar. Se adicionó 200 μl de una mezcla etanol/antibiótico en relación volumen 1:1. Se dejaron en esta solución durante 30 minutos. Se les retiró la solución después de transcurrido ese tiempo. Posteriormente se les colocó bajo luz ultravioleta durante 30 minutos.

Ya esterilizadas las fibras, se pueden utilizar para el cultivo celular. Para el cultivo celular se utilizaron osteoblastos, los cuales fueron cultivados en medio de cultivo DMEM suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB), una solución de antibióticos (penicilina (100 UI/ml), estreptomina (100 mcg/ml) y fungizona (0.3 mcg/ml)), 100 mM de aminoácidos no esenciales y 100 mM de piruvato de sodio. Los cultivos se mantuvieron a una temperatura de 37°C y en una atmósfera de 95% de aire y 5% de CO_2 en un ambiente con 100% de humedad.

La biocompatibilidad de los osteoblastos al ser cultivados sobre la superficie de las membranas hiladas se evaluó por medio del ensayo de adhesión y el ensayo de proliferación celular. Para lo cual se sembraron 10,000 células en placas de 24 pozos.

2.3.1 Ensayo de adhesión celular

2.3.1.1 Fundamento del ensayo de adhesión celular

La adhesión celular es el proceso por el cual la célula se ancla a un sustrato. Para ello, se utilizan varios tipos de proteínas y otros componentes de membrana, como las integrinas y los glucolípidos. La interacción entre las integrinas y las proteínas extracelulares adsorbidas en el sustrato van permitie en un futuro los procesos de proliferación y diferenciación celular. Este proceso de adhesión celular es un marcador para conocer la respuesta de la integración de tejido con biomateriales [40].

La técnica de tinción es el proceso por el cual las moléculas de un colorante se adsorben a una superficie. El uso del colorante facilita la detección de células en el microscopio óptico. El colorante cristal violeta se une a componentes celulares de carga negativa, atraviesa la membrana celular y se acumula en el citoplasma. Después se extrae este colorante para la cuantificación con la ayuda de un espectrofotómetro. La intensidad de la absorbancia está relacionada con la cantidad de células que contenía cada pozo.

2.3.1.2 Procedimiento del ensayo de adhesión celular

Para evaluar la propiedad de las membranas hiladas de PLA y PLA conteniendo las nanoestructuras $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2$ sobre la adhesión celular, los osteoblastos fueron cultivados sobre las membranas en placas de cultivo de 24 pozos durante 4 y 8 horas. Pasado el tiempo de incubación; las células que no se adhirieron a las superficies fueron removidas por medio de tres lavados con PBS (solución amortiguadora de fosfatos). Las células adheridas a los andamios fueron fijadas con 4% de PFA (paraformaldehído) e incubadas con una solución al 0.01% de cristal violeta por 15 minutos. Posteriormente se lavaron con agua bidestilada para quitar el exceso de colorante o hasta que el agua bidestilada no tuviera presencia de color. Una vez logrado lo anterior se extrajo el colorante de las muestras con

200 μL de SDS (dodecilsulfato de sodio) al 1%. La solución resultante fue sometida a lectura para obtener la densidad óptica en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 550 nm. Los cultivos controles fueron las células sembradas sobre las cajas de cultivo celular.

2.3.2 Ensayo de Proliferación Celular

2.3.2.1 Fundamento del ensayo de proliferación celular

Para este ensayo se utilizó una sal de tetrazolio, la cual es altamente soluble en agua. La sal es WST-8 ([2-(2-metoxi-4-nitrofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-(2,4-disulfofenil)-2H-tetrazolio, sal monosódica]), esta sal se encuentra disuelta en un kit de conteo celular llamado CCK-8. La Figura 2.6 se observa la reacción de reducción que produce un precipitado colorido.

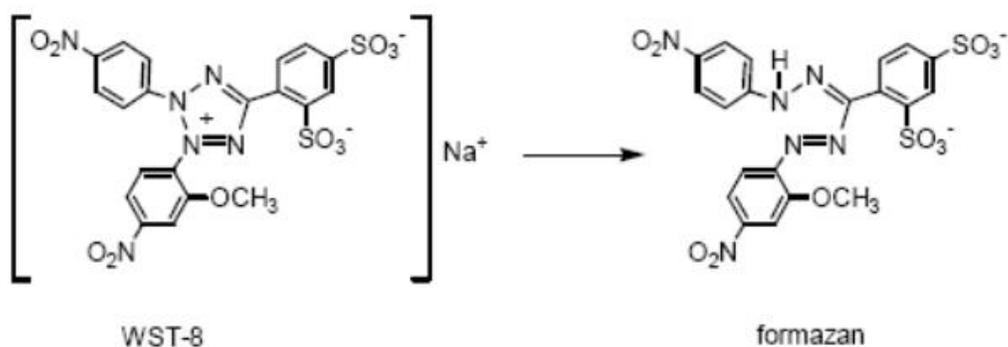


Figura 2. 6 Reacción química de la sal WST-8.

La sal WST-8 se reduce por acción de la deshidrogenasa en las células, lo cual produce formazán, el cual es de color naranja. Esta sal es soluble en el medio de cultivo de trabajo. La cantidad de formazán producido por deshidrogenasa (Figura 2.7) es directamente proporcional al número de células vivas [16].

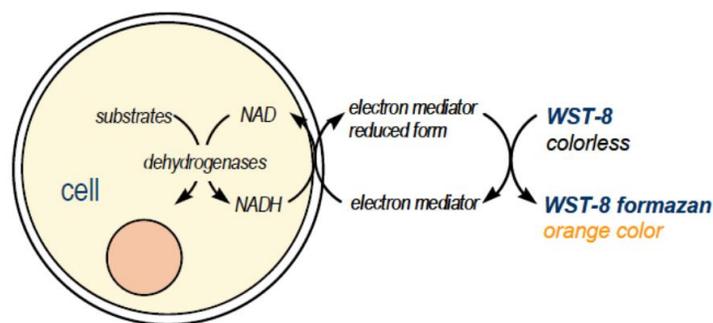


Figura 2. 7 Diagrama representativo del ensayo de proliferación con el kit CCK-8.

2.3.2.2 Procedimiento del ensayo de proliferación celular

Para determinar la influencia de la topografía de las membranas hiladas de PLA y PLA conteniendo las nanoestructuras $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2$ sobre la proliferación celular, se evaluó por medio del ensayo basado en la habilidad de la enzima deshidrogenada mitocondrial para oxidar una sal de tetrazolio a un producto soluble de color anaranjado secretado en el medio celular. Las células osteoblásticas fueron cultivadas sobre las membranas nanoestructuradas de PLA en placas de cultivo de 24 pozos a una densidad celular de 5×10^3 cel/mL por triplicado por 1, 3, 5, 7, 14 y 21 días de cultivo celular. Después de cada periodo de incubación experimental, las células fueron incubadas con 10 μL de la sal del kit CCK-8 (5 mg/ml) a 37°C por 2 horas. Pasado este tiempo, 200 μL del sobrenadante fué removido y depositado en una placa de 96 pozos y llevados a un lector de ELISA, para obtenerse el valor de absorbancia a 450 nm. Debido a que la generación del producto anaranjado es directamente proporcional a la actividad oxidativa de la enzima deshidrogenasa, una disminución en los valores que se obtengan en la absorbancia a 450 nm nos indica una medida de la viabilidad celular. Los cultivos controles fueron las células sembradas sobre la placa de cultivo.

III.- Discusión de resultados

En este capítulo se presentan los resultados obtenidos del proceso de síntesis de estos materiales, de la caracterización química, estructural y morfológica de los materiales propuestos, así como de los ensayos biológicos.

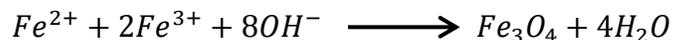
Primero revisaremos la síntesis de nanoestructuras por los procesos de coprecipitación y sol-gel. Continuaremos con el proceso de obtención de los andamios por la técnica de electrohilado. Analizaremos los resultados obtenidos por las técnicas de caracterización química (espectroscopia infrarroja), estructural (difracción de rayos X) y morfológica (microscopia electrónica de barrido y por transmisión).

Para finalizar se discuten los resultados obtenidos de los ensayos biológicos de adhesión y proliferación celular. Estas pruebas nos dan una idea del comportamiento de nuestro material cuando está presente con materia orgánica viva, y de la interacción material/células.

3.1 Síntesis de materiales

3.1.1 Síntesis de nanopartículas de Fe_3O_4

Primeramente se sintetizaron las nanopartículas magnéticas, las cuales se obtuvieron por la reacción de coprecipitación cuya reacción química se presenta a continuación.



En esta reacción es de suma importancia que se respete la relación molar 2:1, para que se lleve a cabo la formación adecuada de partículas de magnetita, la cual va a estar condicionada a la cantidad de oxígeno que esté presente en el sistema. Es de suma importancia mencionar que gracias al sistema con el que se contó, no

fue necesario realizar ajustes especiales a la reacción, por ejemplo en la literatura hacen mención del uso de una atmósfera controlada con nitrógeno. Este sistema de adición permitió que la presencia de oxígeno durante la reacción fuera mínima. Otra ventaja de esta reacción fue la de haber trabajado a temperatura ambiente [41].

3.1.2 Síntesis de nanoestructuras de Fe₃O₄/SiO₂

Una vez que se tuvieron las nanopartículas de Fe₃O₄, se adicionó SiO₂ mediante la reacción de sol-gel. La reacción se muestra a continuación.



La reacción 1 es característica de una hidrólisis, mientras que la segunda es una polimerización de Si-O.

Al igual que en la reacción de coprecipitación, no fue necesario el aplicar energía calorífica para que la reacción se llevara a cabo. En esta reacción los parámetros a considerar es la cantidad de catalizador (hidróxido de amonio) y la agitación a la que se sometieron los reactivos. La cantidad de catalizador influye en el tamaño de las esferas sintetizadas, mientras que la agitación que se aplica al sistema permite que la reacción de polimerización tenga una mayor eficiencia [42].

De este modo se sintetizó SiO₂, esto con el fin de tener un blanco para poder compararlo con la muestra nanoestructuras de Fe₃O₄/SiO₂.

3.1.3 Montaje de nanoestructuras en andamios de PLA

Antes de colocar las nanoestructuras en los andamios de PLA, se sintetizaron fibras solo de PLA para conocer las condiciones adecuadas para la síntesis de andamios. Esto tuvo como primer objetivo conocer en que disolvente se trabajaría, después la distancia que existiría entre el ánodo y el cátodo de la fuente de poder, y por último el voltaje aplicado entre estos. En la Tabla 3.1 se muestran brevemente los parámetros con los que se trabajaron.

Tabla 3. 1 *Tabla de condiciones que se trabajaron para buscar fibras con diámetros óptimas*

Disolvente	Distancia ánodo/cátodo (cm)	Voltaje aplicado (kV)
Etanol	10	10
		15
		20
Etanol/cloroformo	15	10
		15
		20
Cloroformo/dimetilformamida	20	10
		15
		20

La técnica de electrohilado consiste en sintetizar nanofibras mediante un campo eléctrico. En la punta de la jeringa que se usa, se forma una gota, la cual va a ser atraída dependiendo del campo eléctrico que hay entre el ánodo y el cátodo, esta fuerza depende del voltaje aplicado. El diámetro de las fibras se relaciona con la distancia que hay del hilador al colector, y se debe de tomar en cuenta el voltaje que se aplica [33].

El disolvente es el primer factor importante con el que se trabajó, ya que dependiendo del reactivo que se use para disolver al PLA, éste modificará su polaridad de la disolución, ya sea en mayor o menor medida. Al afectar la

polaridad de la disolución esta se verá influenciada por el campo eléctrico que se aplica en la gota de la punta del hilador.

Hasta que se tuvieron todas las muestras y se analizaron por MEB se tomó la decisión de replicar las condiciones de la disolución de PLA compuesta de cloroformo/dimetilformamida, a una distancia de 20 cm, y con un voltaje de 20 kV.

3.2 Caracterización de materiales

3.2.1 Análisis por espectroscopia infrarroja

3.2.1.1 Óxido de hierro Fe_3O_4

Las nanopartículas de Fe_3O_4 después de ser lavadas, se secaron para poder ser analizadas en el espectrofotómetro infrarrojo, se analizó la región de 4000 cm^{-1} a 400 cm^{-1} . En la figura 3.1 se muestra el espectro infrarrojo de las nanopartículas.

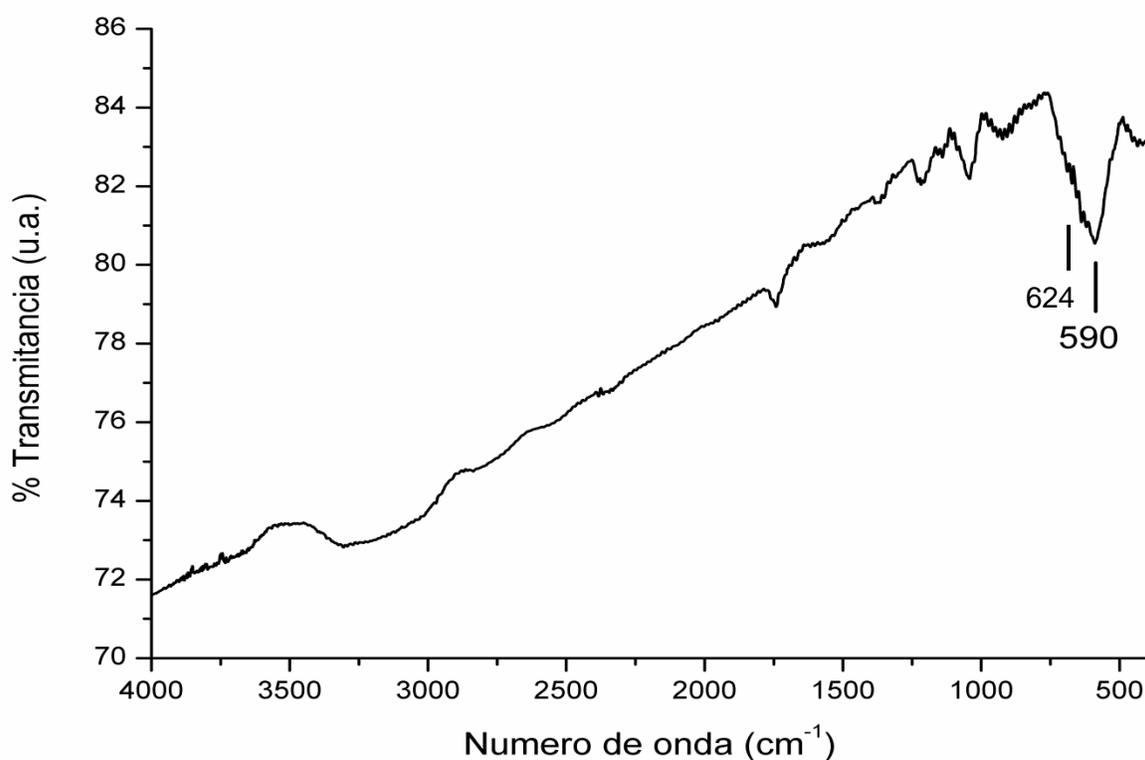


Figura 3. 1 Espectro infrarrojo de las nanopartículas de óxido de hierro, en la región de 4000 cm^{-1} a 400 cm^{-1}

Las bandas localizadas en 590 cm^{-1} y 624 cm^{-1} corresponden a las vibraciones de estiramiento de los enlaces Fe-O que se encuentran presentes en las nanopartículas [41,42].

3.2.1.2 Nanoestructuras de $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2$

La Figura 3.2 muestra los espectros de infrarrojo del (a) Fe_3O_4 , (b) SiO_2 (blanco), y (c) la nanoestructura de $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2$.

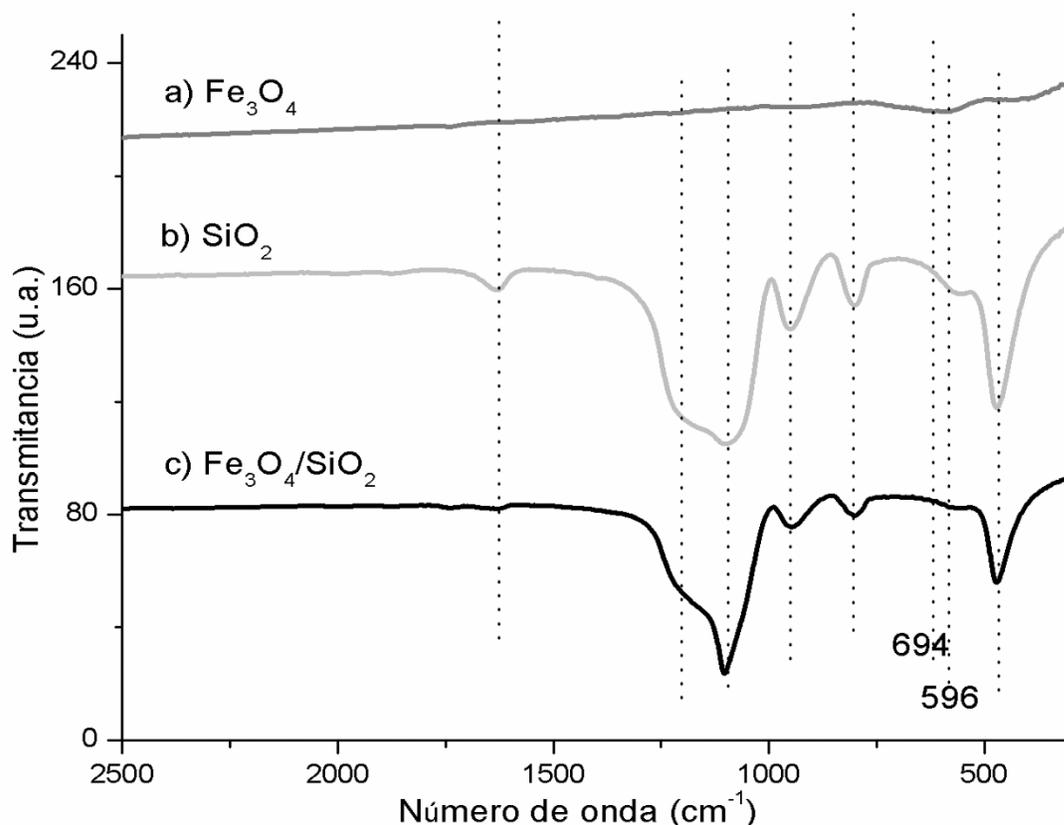


Figura 3. 2 Espectros de infrarrojo del a) Fe_3O_4 de b) SiO_2 (blanco) y c) nanoestructuras de $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2$, en la región de 4000 cm^{-1} a 400 cm^{-1}

En la Figura 3.2 (a) se observa el espectro de Fe-O, en la Figura 3.2 (b) se observan bandas en 1631 cm^{-1} , 1170 cm^{-1} , 1103 cm^{-1} , 951 cm^{-1} , 801 cm^{-1} y 562 cm^{-1} . Las bandas en 801 cm^{-1} y 562 cm^{-1} son bandas intensas de absorción y están asociadas a los modos de vibración entre los elementos Si-O en modo de estiramiento y doblez. La banda en 1103 cm^{-1} corresponde al enlace Si-O y se atribuye al modo de estiramiento. La banda que se presenta alrededor de los 3500 cm^{-1} corresponde a los enlaces entre O-H, y se debe a la vibración de estiramiento de Si-OH y H_2O . Las bandas localizadas en 1170 cm^{-1} y 1100 cm^{-1} se deben a

estiramiento de los enlaces Si-O-Si. La banda en 951 cm^{-1} está relacionada con los grupos silanos presentes en la superficie del SiO_2 y a las vibraciones tipo estiramiento en los enlaces Si-O de los grupos Si-OH [41,42].

En la Figura 3.2 (c), se identificaron bandas de absorción en 1164 cm^{-1} , 1105 cm^{-1} , 946 cm^{-1} , 800 cm^{-1} y 570 cm^{-1} . La banda de 570 cm^{-1} se aproxima a la región del enlace Fe-O, que se observó en la Figura 3.1. Las bandas en 1164 cm^{-1} , 1105 cm^{-1} se deben a estiramiento de los enlaces Si-O-Si, la banda en 946 cm^{-1} son los grupos silanos (SiH_4) de la superficie, y la banda 800 cm^{-1} está asociada a los modos de vibración entre los elementos Si-O en modo de estiramiento y doblez son las bandas de interacción del SiO_2 , ver Tabla 3.2.

Tabla 3. 2 *Tabla de bandas de IR para las muestras de $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2$.*

$\nu_{\text{exp}}\text{ (cm}^{-1}\text{)}$	Asignación	Ref.
1164	Si-O-Si	(41,42)
1105	Si-O-Si	(41,42)
946	Si-H	(41,42)
800	Si-O	(41,42)
570	Fe-O	(41,42)

Comparando las nanoestructuras FeO/SiO_2 con la muestra de SiO_2 se puede observar que las bandas conservan sus posiciones. Es importante observar que en el espectro de las nanoestructuras disminuye la intensidad de las bandas, esto se puede deber a la presencia de las nanopartículas de hierro [41,42].

3.2.1.3 Andamios PLA

De las fibras de PLA que se sintetizaron con los diferentes disolventes se les realizó análisis infrarrojo. En la figura 3.3 se aprecia los espectros del PLA disuelto en cloroformo, en la mezcla 3:1 de cloroformo/etanol y en la mezcla 9:1 cloroformo/dimetilformamida.

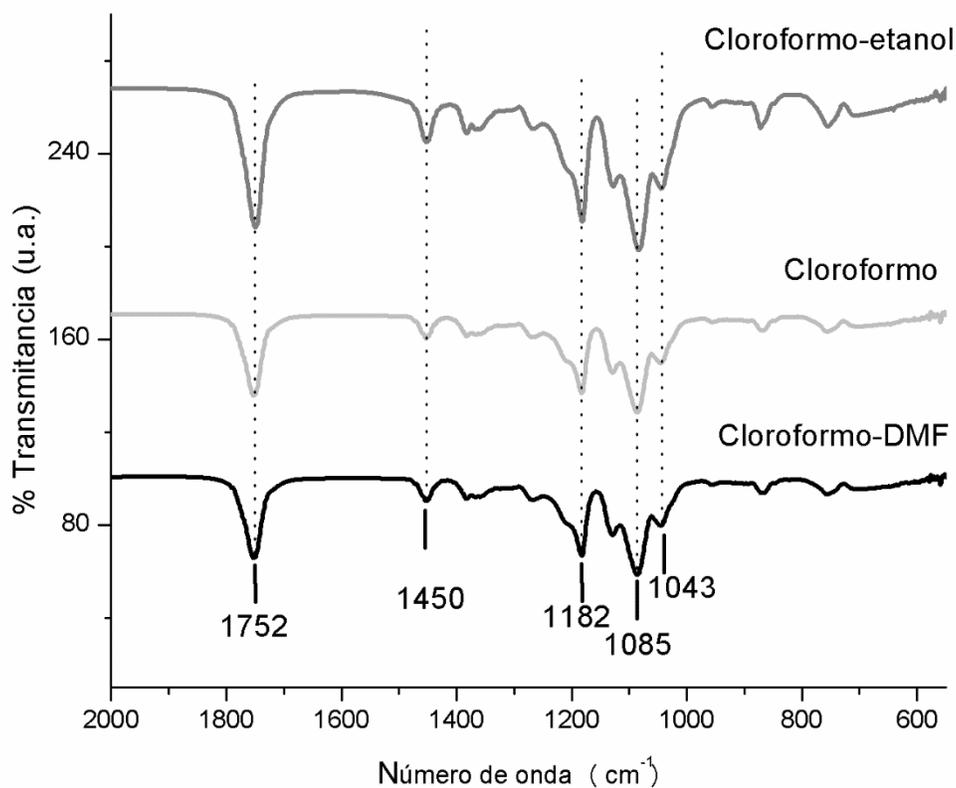


Figura 3. 3 Espectros infrarrojos de PLA disuelto en diferentes disolventes. Región de análisis 2000 cm⁻¹ a 500 cm⁻¹

La Figura 3.3 muestra las bandas características del PLA, las cuales se encuentran en 1752 cm⁻¹, 1450 cm⁻¹, 1182 cm⁻¹, 1085 cm⁻¹ y 1043 cm⁻¹. Las bandas en 1752 cm⁻¹ y 1085 cm⁻¹ corresponden al movimiento de estiramiento del grupo carbonil C-O-C. La banda que se aprecia en 1450 cm⁻¹ se debe al estiramiento del enlace entre C-H del grupo metilo que está presente. La banda en 1043 cm⁻¹ corresponde a la vibración de estiramiento entre C-CH₃. La banda en 1085 cm⁻¹ se atribuye al movimiento de estiramiento entre C-O. Se aprecia el usar diferentes disolventes no altera la estructura del polímero ya que conservan las mismas posiciones [43].

Tabla 3. 3 Tabla de bandas de IR para las muestras de PLA

ν_{exp} (cm^{-1})	asignación	Ref.
1752	-C=O	(43)
1450	-C-H	(43)
1182	-C-O	(43)
1085	-C-O	(43)
1043	-C-CH ₃	(43)

En ningún espectrograma aparecen bandas relacionadas a los disolventes, esto se debe a que en el momento en que el campo eléctrico permite la eyección de la gota, además de estirar el polímero, permite la evaporación del disolvente. Quedando solamente la fibra del polímero.

3.2.1.4 Andamios de PLA con las nanoestructuras de Fe₃O₄/SiO₂

Después tener las condiciones adecuadas para tener fibras, se adicionaron las nanoestructuras de Fe₃O₄/SiO₂. En la figura 3.4 se hace una comparación entre los espectros vibracionales de las a) nanoestructuras de Fe₃O₄/SiO₂ del b) PLA obtenido de las condiciones óptimas y del c) andamio de PLA conteniendo las nanoestructuras de Fe₃O₄/SiO₂.

En la imagen 3.4 se aprecian las bandas características del PLA y se puede apreciar que ya no se nota la banda de vibración del enlace Fe-O, esto puede atribuirse a que estas nanopartículas se encuentran en menor proporción y se sobreponen las bandas del polímero.

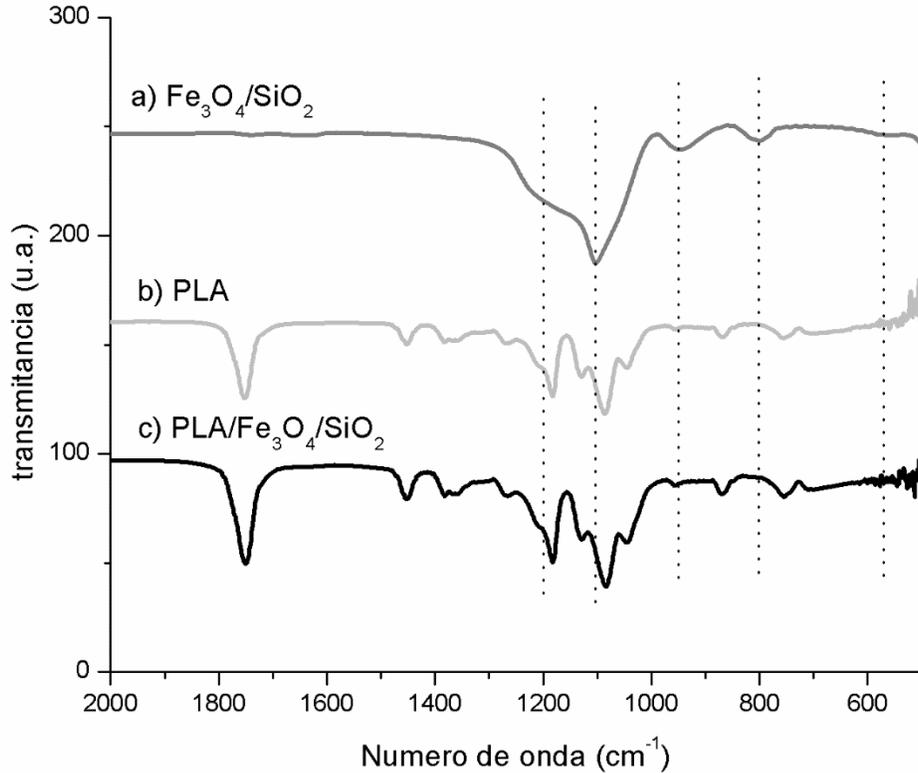


Figura 3. 4 Comparación de espectros infrarrojos de a) nanoestructuras de $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2$ de b) PLA y del c) PLA con las nanoestructuras de $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2$. Región de análisis 2000 cm^{-1} a 500 cm^{-1} .

3.2.2 Difracción de rayos X

3.2.2.1 Óxido de hierro Fe_3O_4

La reacción de coprecipitación, como muchas otras reacciones químicas, puede dar paso a una reacción secundaria. Para este caso se puede tener como producto secundario partículas de maghemita, esto debido a que la magnetita no es muy estable y puede reaccionar en presencia de una atmósfera oxidante. El sistema limitaba la presencia del oxígeno en la reacción. Para saber que fases cristalinas se obtuvieron se procedió al análisis estructural.

En la Figura 3.5, se observan los planos cristalográficos indexados (220) (311) (400) (511) (440), que están localizados en la posición $2\theta = 30.06^\circ, 35.45^\circ, 43.04^\circ, 57.17^\circ$ y 62.73° , respectivamente. El patrón de difracción corresponde a fase

magnetita, el cual presenta una estructura cúbica con parámetros de red $a = 8.374$ Å de acuerdo a la ficha cristalográfica JCPDS (Joint Committee for Powder Diffraction Standards, siglas en inglés) 01-111. Con la ecuación de Scherrer se calculó el tamaño de cristalita, obteniéndose un valor de 24.6 nm.

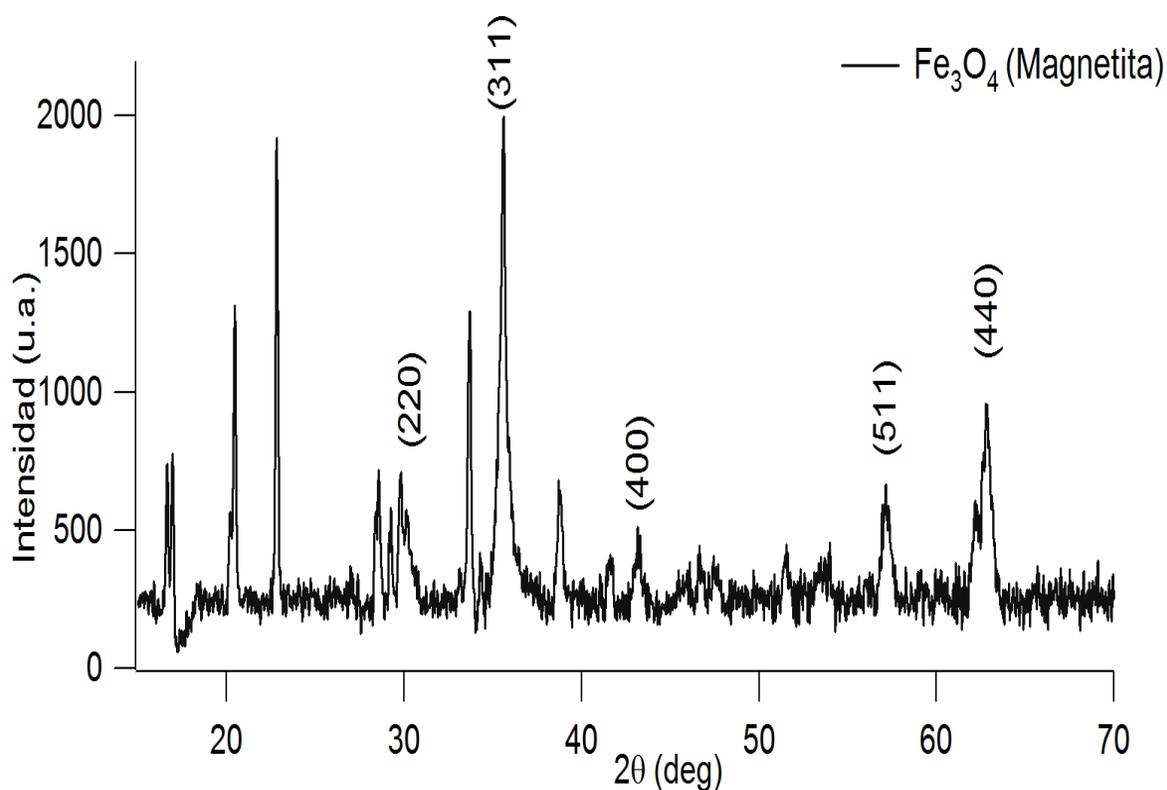


Figura 3. 5 Patrón de difracción obtenido de las nanopartículas de Fe₃O₄.

3.2.2.2 Nanoestructuras de Fe₃O₄/SiO₂

Para monitorear la síntesis de los materiales y la formación de fases cristalinas en ambas muestras, se analizaron por difracción de rayos X. La Figura 3.6 muestra los patrones de difracción de las muestras de (a) SiO₂ y de las (b) nanoestructuras de Fe₃O₄/SiO₂.

En la Figura 3.6 (a) se tiene el difractograma del SiO₂, en el cual se observa en el ángulo $2\theta = 22^\circ$, que es un pico ancho característico de una fase amorfa, ya que la muestra de SiO₂ que se sintetizó no recibió ningún tratamiento térmico para generar alguna cristalinidad. En la Figura 3.6 (b) es el difractograma de la nanoestructura de Fe₃O₄/SiO₂ se observa que sobre la fase amorfa del dióxido de silicio se tienen los picos de difracción en las posiciones $2\theta = 30.06^\circ$, 35.45° , 43.04° , 57.17° y 62.73° , los cuales pueden ser indexados como (220), (311), (400), (511) y (440), respectivamente. La posición de estos picos coincide con los de la fase magnetita con ficha cristalográfica JCPDS 01-111. Con la presencia de ambas fases, el SiO₂ amorfo y la fase cristalina de la magnetita, se puede concluir que

que

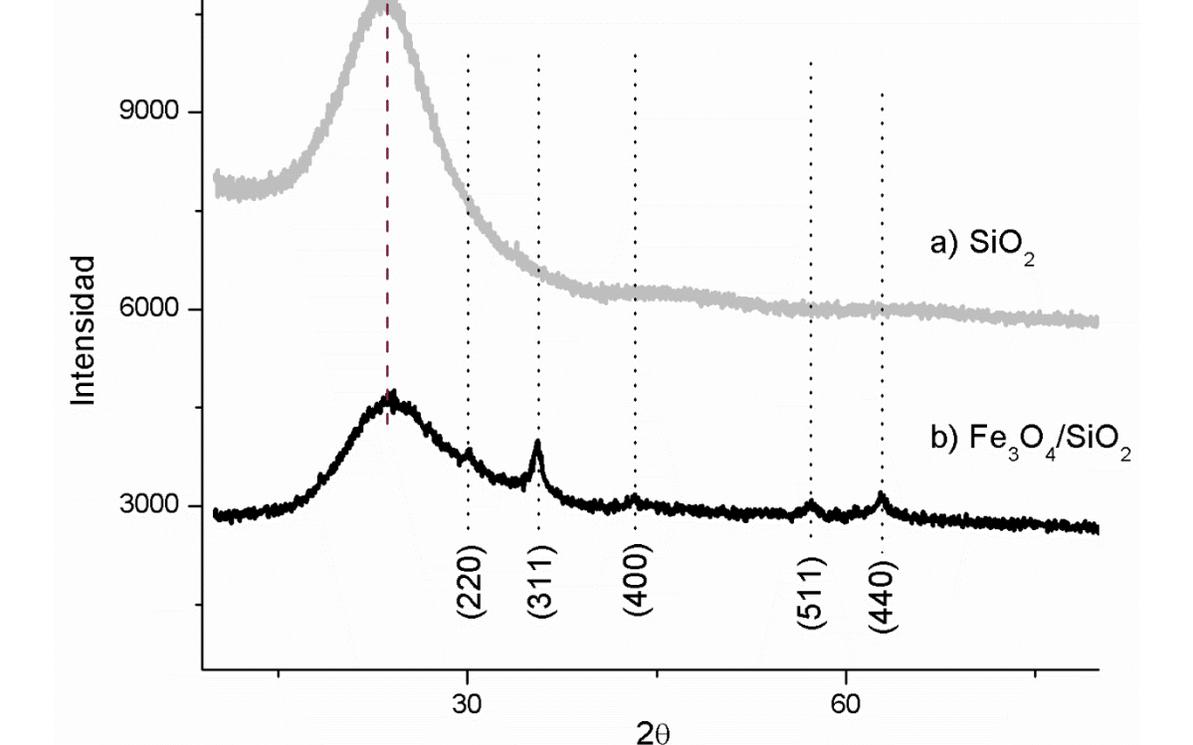


Figura 3. 6 Patrón de difracción obtenido de las muestras de a) SiO₂ y de las b) nanoestructuras de Fe₃O₄/SiO₂.

3.2.3 Microscopia electrónica de barrido

3.2.3.1 Óxido de hierro Fe_3O_4

La morfología de las muestras con nanopartículas de Fe_3O_4 se analizó por microscopia electrónica de barrido. En las Figuras 3.7 y 3.8 se muestran las micrografías donde se aprecian aglomerados de este compuesto con forma de hojuela.

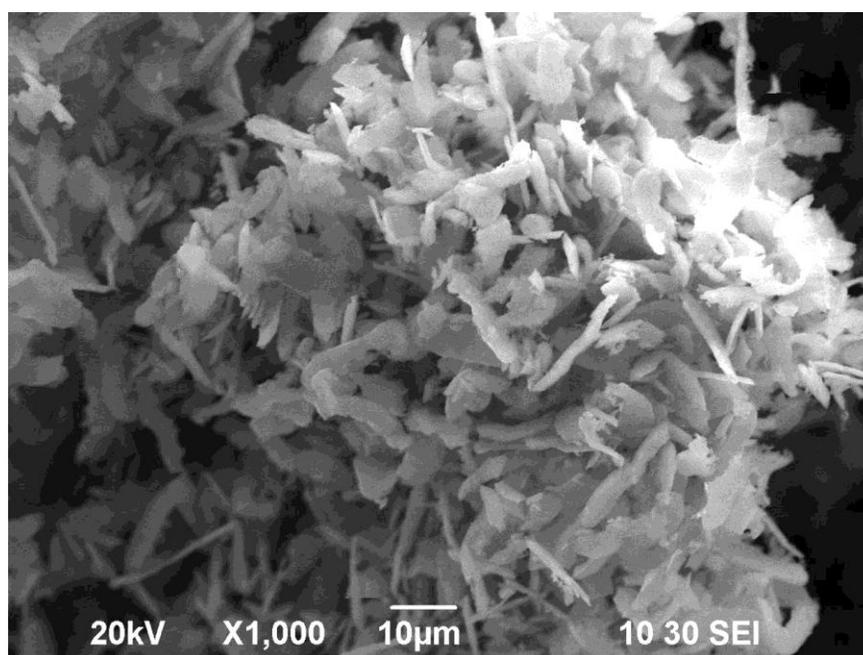


Figura 3. 7 Micrografía de las muestra con nanopartículas magnéticas de Fe_3O_4 a 1000 aumentos.

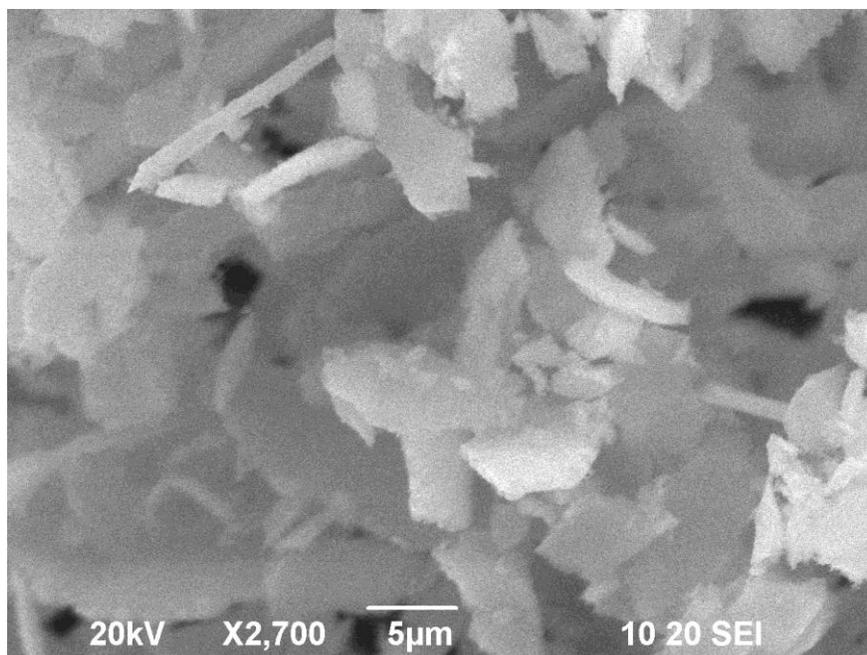


Figura 3. 8 Micrografías de la muestra con nanopartículas magnéticas de Fe_3O_4 a 2700 aumentos.

Se realizó un análisis de microscopía de energía dispersiva de rayos X (EDS por sus siglas en inglés, Energy dispersive X-ray spectroscopy), el cual es un análisis elemental de la muestra de Fe_3O_4 . La Figura 3.9 muestra el resultado obtenido de EDS, junto con una tabla de la relación atómica y peso de los elementos presentes en la muestra.

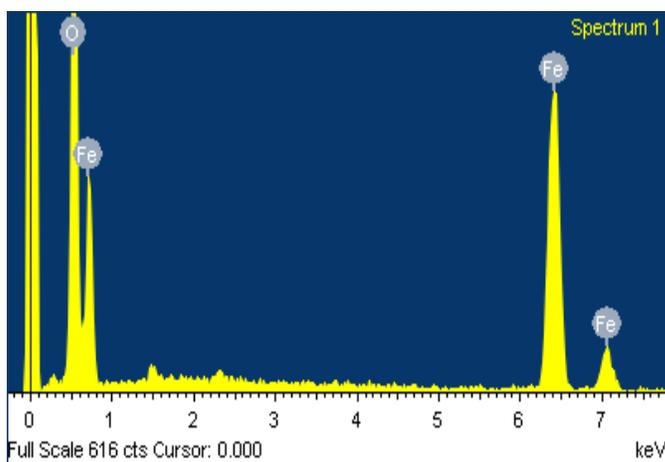


Tabla 3. 4

Elemento	% Peso	% Atómico
O K	42.63	72.18
Fe K	57.37	27.82
Total		100

Figura 3. 9 Análisis EDS de las muestras de Fe_3O_4 con tabla 3.4 de elementos cuantificados.

Con el análisis EDS se pudo confirmar qué elementos se encuentran en el Fe_3O_4 , se observa en la tabla de composición que hay 42.63% en peso de O, y en mayor proporción en 57.37% de Fe. Este análisis nos confirma que el Fe_3O_4 no tiene residuos de los reactivos precursores, ya que en el análisis no hay presencia de azufre, ya que este compuesto se obtuvo de sulfato férrico y sulfato ferroso.

3.2.3.2 Esferas de SiO_2

En la Figura 3.10 se presenta una imagen del dióxido de silicio, SiO_2 , que se utilizó como blanco. Se aprecia que el SiO_2 sintetizado tiene forma de esferas, las cuales son uniformes, no forman aglomerados. Se midió el tamaño de las nanoesferas y se obtuvo que tienen una distribución normal, el tamaño promedio que se obtuvo fue de 134 nm, con una desviación estándar de 14.46 nm, ver Tabla 3.5.

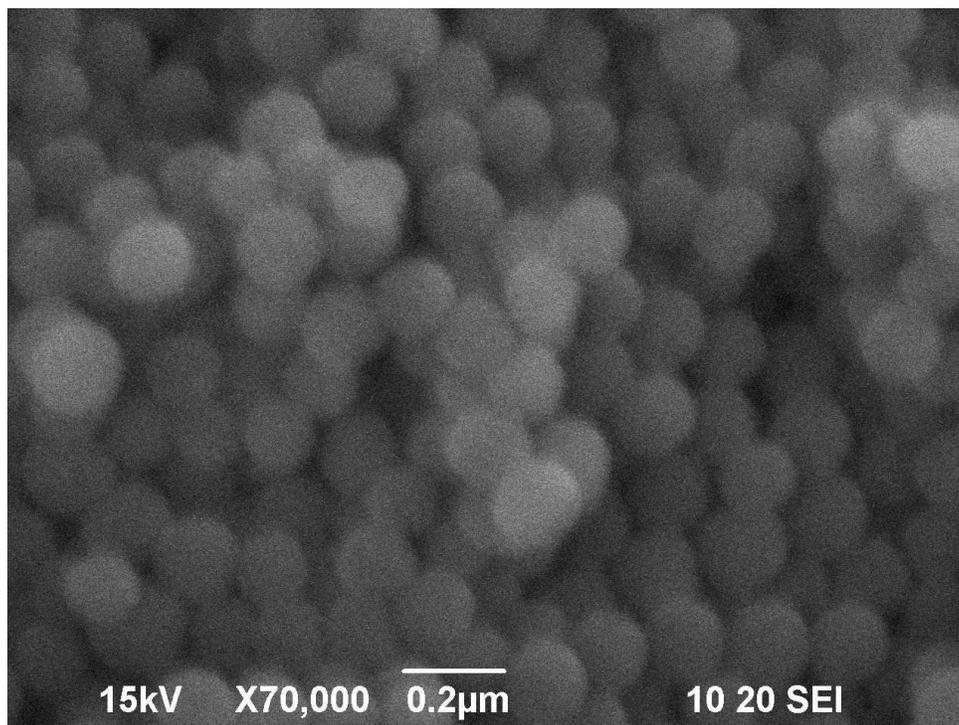


Figura 3. 10 Micrografía de las nanoesferas de SiO_2 , a 70000 acercamientos.

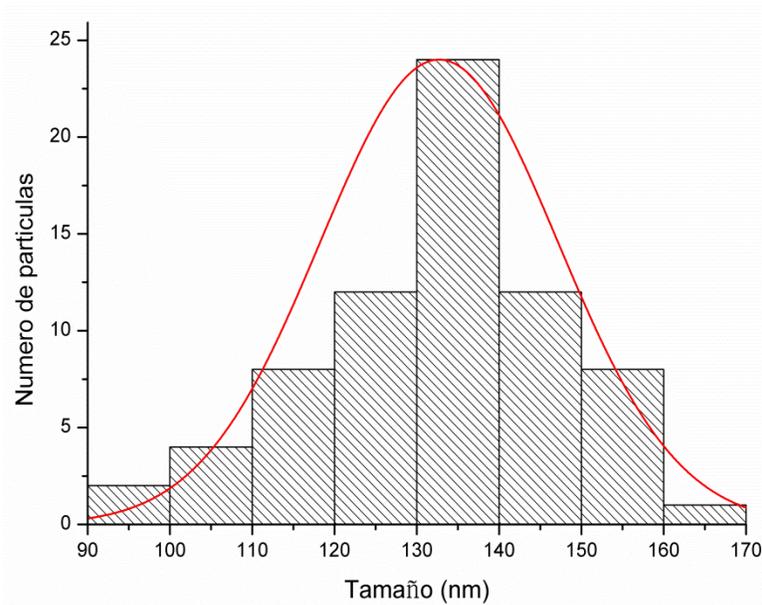


Figura 3. 11 Histograma de distribución de tamaños de las nanoesferas de SiO₂.

Tabla 3. 5 Valores del diámetro del SiO₂ sintetizado por sol-gel.

	Menor (nm)	Mayor (nm)	Prom (nm)
SiO ₂	90	170	134±14.46

3.2.3.3 Nanoestructuras de Fe₃O₄/SiO₂

En la Figuras 3.12 y 3.13 se aprecia la morfología de las nanoestructuras de Fe₃O₄/SiO₂. En estas figuras se observan las nanoestructuras sintetizadas, estas micrografías muestran aglomeraciones, esto se debe a que las nanoestructuras tienden a hacerlo al eliminar todo rastro de disolvente, por lo tanto no se aprecia de forma individual. Se realizó un análisis de EDS a las nanoestructuras de Fe₃O₄/SiO₂. La Figura 3.14 muestra el resultado obtenido de EDS, junto con la Tabla 3.5 donde se muestra la relación atómica y másica de los elementos presentes en la muestra.

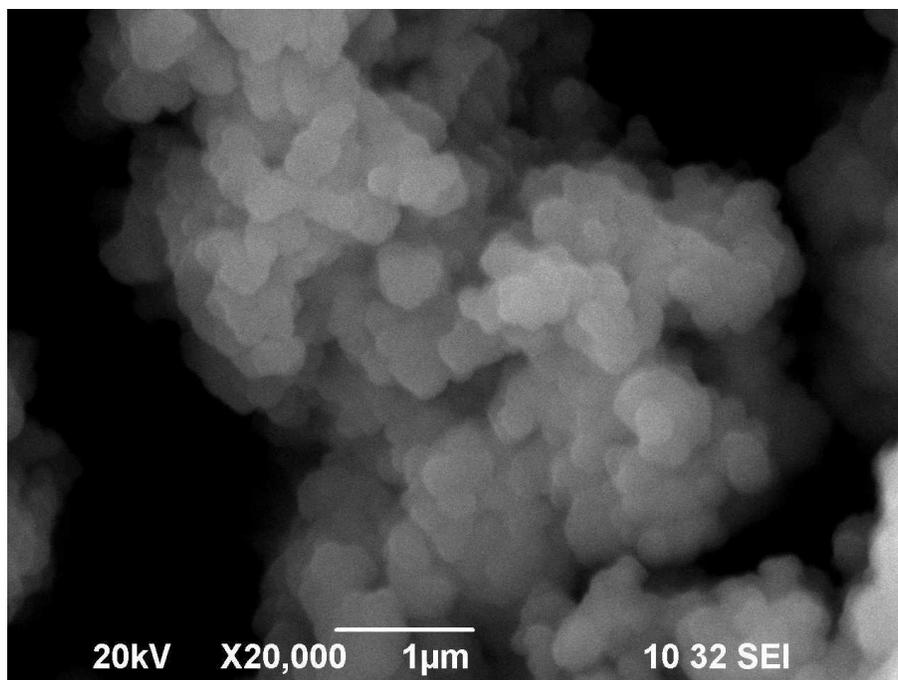


Figura 3. 12 Micrografía de las nanoestructuras de Fe_3O_4/SiO_2 sintetizadas por sol-gel, a 20000 aumentos.

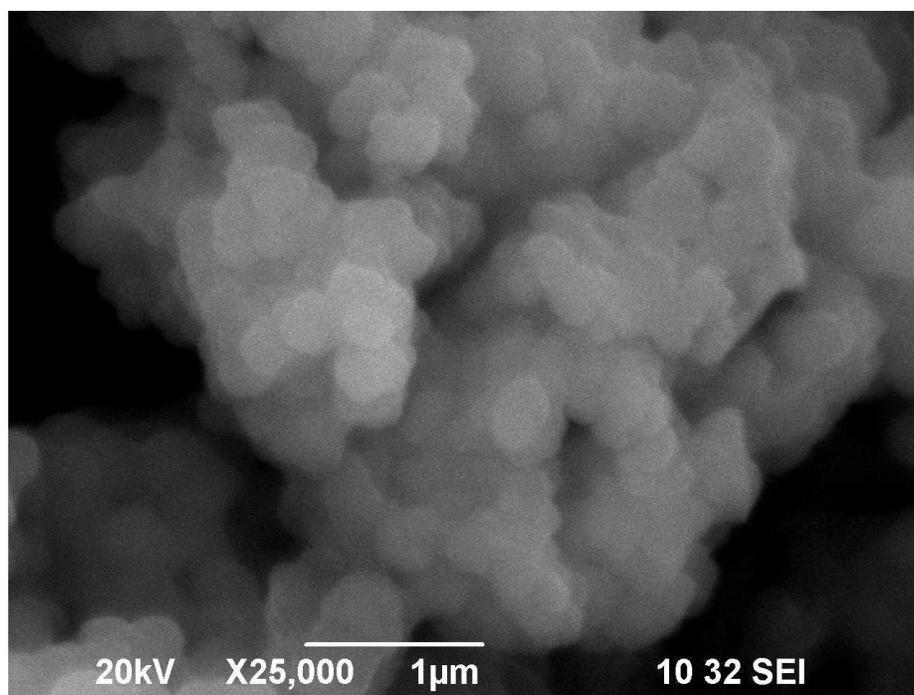


Figura 3. 13 Micrografía de las nanoestructuras Fe_3O_4/SiO_2 sintetizadas por sol-gel, a 25000 aumentos.

Con el análisis EDS se pudo determinar qué elementos se encuentran en las nanoestructuras de las imágenes previamente obtenidas, se observa en la tabla de composición que hay 31.30% en peso de Si, y en menor proporción en 12.43% de Fe. El elemento oxígeno es el más abundante ya que ambos elementos se encuentran en forma de óxido. El Fe se encuentra recubierto con Si, por eso hay un mayor conteo del elemento de recubierto.

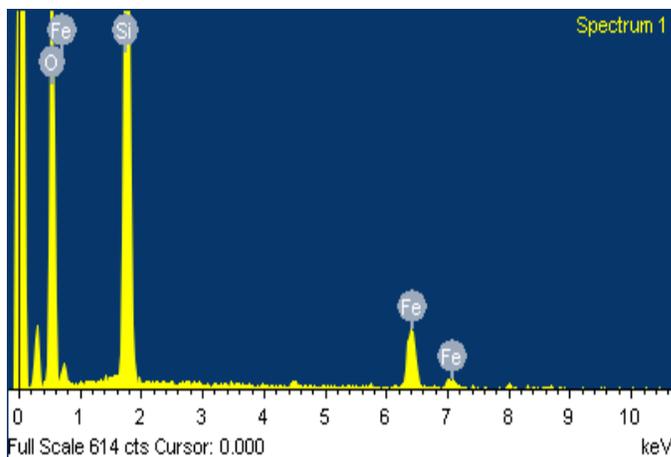


Tabla 3. 6

Elemento	% Peso	% Atómico
O K	56.18	72.38
Fe K	12.43	4.59
Si K	31.39	23.04
Total		100

Figura 3. 14 Análisis EDS de las nanoestructuras de Fe_3O_4/SiO_2 con tabla 3.6 de elementos cuantificados.

3.2.3.4 Andamios de PLA

Para colocar las nanoestructuras en las fibras, primero se buscaron las condiciones adecuadas con las cuales se puede realizar un andamio que pueda asemejarse a la matriz extracelular, como por ejemplo las fibras de colagena del hueso. Para poder seleccionar el andamio adecuado, se recurrió a la técnica de microscopia electrónica de barrido. Esta técnica permite observar la morfología de las fibras y el diámetro de estas.

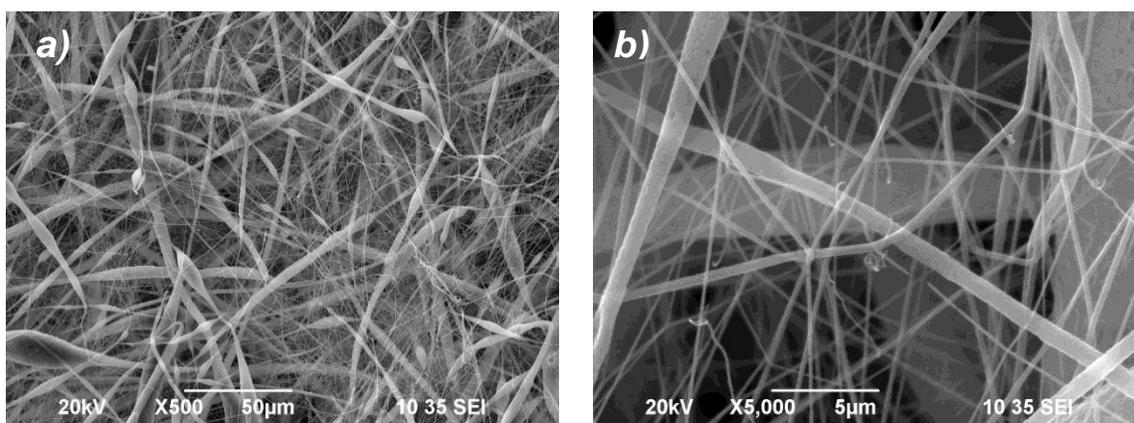


Figura 3. 15 Micrografías de PLA disuelto en cloroformo, a a) 500 magnificaciones y a b) 5000 magnificaciones.

En las Figuras 3.15 (a) y 3.15 (b) se aprecian las fibras que se obtuvieron disolviendo el PLA en cloroformo. En la Figura 3.15 (a) se observan las fibras que tienen diámetros de diferentes magnitudes, ya que hay fibras gruesas y delgadas. Además se aprecia malformaciones en la fibra, esto se debe a que el polímero no alcanza a estirarse por completo. En la Figura 3.15 (b) se hizo un acercamiento y se hace notoria la diferencia de diámetros de estas fibras. En la Figura 3.16 se presenta el histograma que se realizó del conteo de estas fibras y se obtuvo un promedio de 329 nm, con una desviación estándar de 254 nm. Inmediato se observa que las fibras no presentan una distribución normal. Eso se debe a las condiciones de síntesis no fueron óptimas [32].

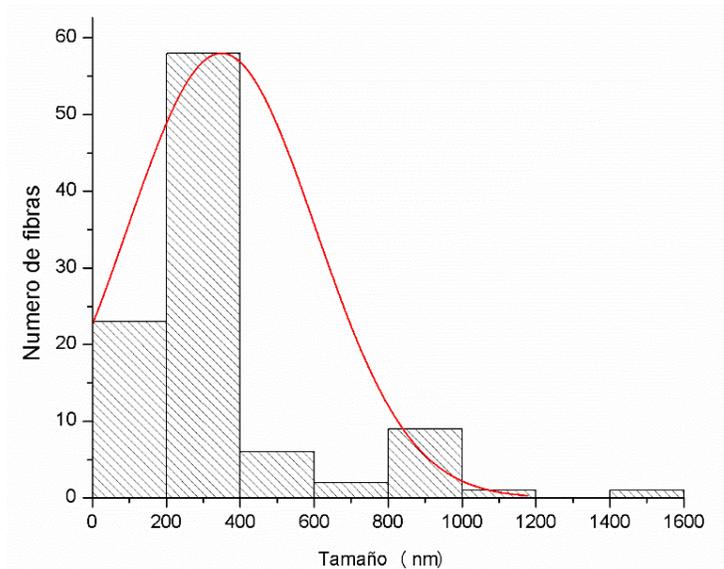


Figura 3. 16 Distribución de los tamaños de las fibras de PLA disueltas en cloroformo

Tabla 3. 7 Valores del diámetro de las fibras de PLA disuelto en cloroformo.

	Menor (nm)	Mayor (nm)	Prom (nm)
PLA	96	1514	349±254

En la Figura 3.17 se aprecian las fibras que se obtuvieron disolviendo el PLA en la mezcla cloroformo-etanol. En la Figura 3.17a) se aprecia que hay deposición en exceso del polímero, son formas más grandes en el centro y pierden la forma de fibra, en el acercamiento de la Figura 3.17b) se aprecia que a pesar del exceso de polímero las fibras son más uniformes. Se midió el diámetro de estas fibras y se obtuvo un promedio de 642 nm, con una desviación estándar de 229 nm. En la Figura 3.18 se presenta la gráfica de distribución de tamaños, donde se muestra que las fibras a pesar de tener un diámetro promedio mayor en comparación con el disolvente cloroformo, existe un incremento en la uniformidad en el tamaño de las fibras. Ver Tabla 3.8.

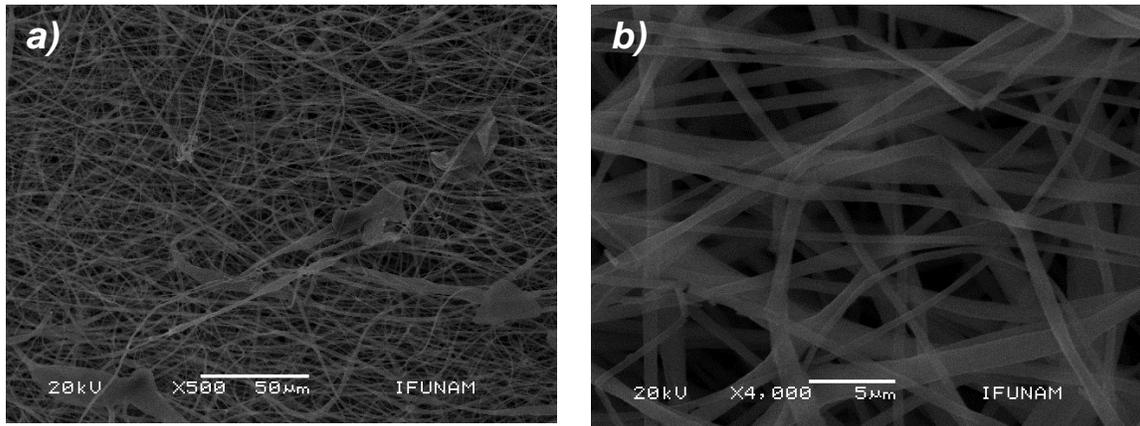


Figura 3. 17 Micrografías de PLA disuelto en la mezcla cloroformo-etanol, a a) 500 magnificaciones y a b) 4000 magnificaciones.

Aún no existe una distribución normal pero la desviación estándar disminuyó con respecto al disolvente anterior, con esto se observa que el disolvente para el PLA si influye en la distribución de las fibras.

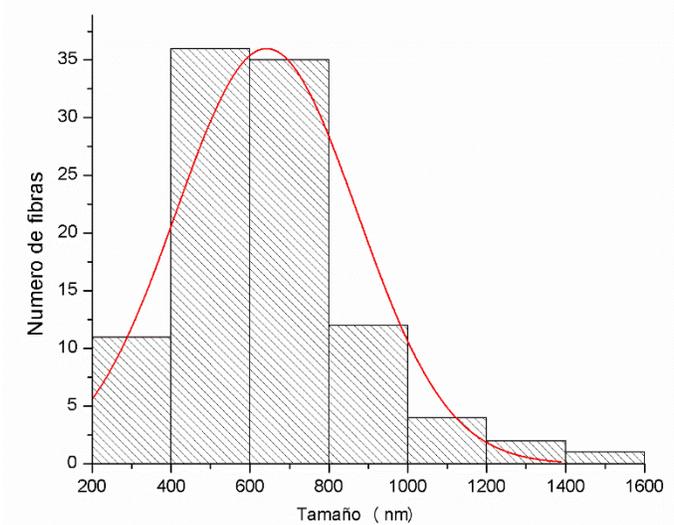


Figura 3. 18 Distribución de los tamaños de las fibras de PLA disueltas en cloroformo-etanol.

Tabla 3. 8 Valores del diámetro de las fibras de PLA disuelto en cloroformo-etanol.

	Menor (nm)	Mayor (nm)	Prom (nm)
PLA	241	1477	642±229

En la Figura 3.19 se aprecian las fibras que se obtuvieron disolviendo el PLA en la mezcla cloroformo-dimetilformamida. En la Figura 3.19a) se aprecia que ha disminuido la presencia de malformaciones en las fibras, y en la Figura 3.19b) se aprecia una homogenización de diámetros en las fibras. Además se observa que tienen una morfología diferente a la obtenida con los disolventes anteriores. Se midió el diámetro de estas fibras y se obtuvo un promedio de 1415 nm, con una desviación estándar de 347 nm. En la Figura 3.20 se observa un incremento en el diámetro medio de las fibras, pero ya se tiene una distribución con un comportamiento normal. Ver Tabla 3.9.

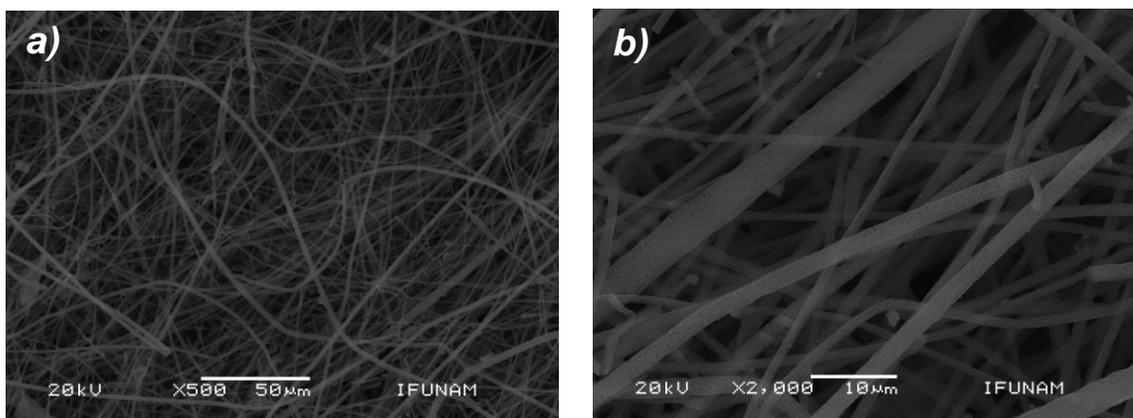


Figura 3. 19 Micrografías de PLA disuelto en la mezcla cloroformo-dimetilformamida, a a) 500 magnificaciones y a b) 2000 magnificaciones.

En las Figura 3.20 se aprecia que la distribución del tamaño de las de las fibras se acerca a una distribución normal, en comparación con las anteriores fibras existe una mejor distribución de tamaños de diámetro de estas fibras.

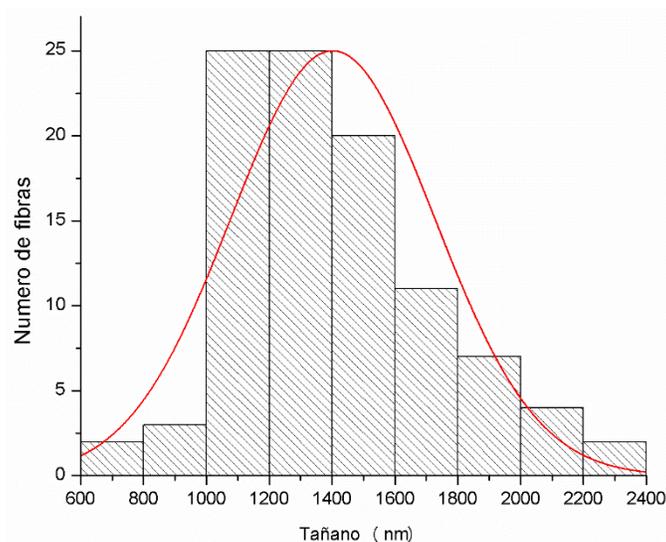


Figura 3. 20 Distribución de los tamaños de las fibras de PLA disueltas en cloroformo-dimetilformamida.

Tabla 3. 9 Valores del diámetro de las fibras de PLA disuelto en cloroformo-dimetilformamida.

	Menor (nm)	Mayor (nm)	Prom (nm)
PLA	90	1600	329±250

En las fibras de la Figura 3.19 además de observar una uniformidad en el tamaño de las fibras, se aprecia que tienen textura. No es lisa, como con los anteriores disolventes, en estas fibras aparecen huecos a lo largo de esta. Teniendo en mente que se quiere colocar las nanoestructuras de Fe_3O_4/SiO_2 en el andamio de PLA, este disolvente se selecciona para continuar con el trabajo.

3.2.3.5 Andamios de PLA con las nanoestructuras de $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2$

Para introducir las nanoestructuras de $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2$ es necesario volver a sintetizar las nanofibras, por ello se hacen tres disoluciones de trabajo, en donde se agregan las nanoestructuras al PLA. Estas nanoestructuras están disueltas a diferentes concentraciones. En la Figura 3.21, se presentan las micrográficas de las tres concentraciones que se realizaron con (a) 0.005 g, (b) 0.05 g y (c) 0.1 g de nanoestructuras de $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2$. Se sintetizaron con las condiciones de electrohilado de 20 cm de distancia entre el hilador y el colector, aplicando 20 kV.

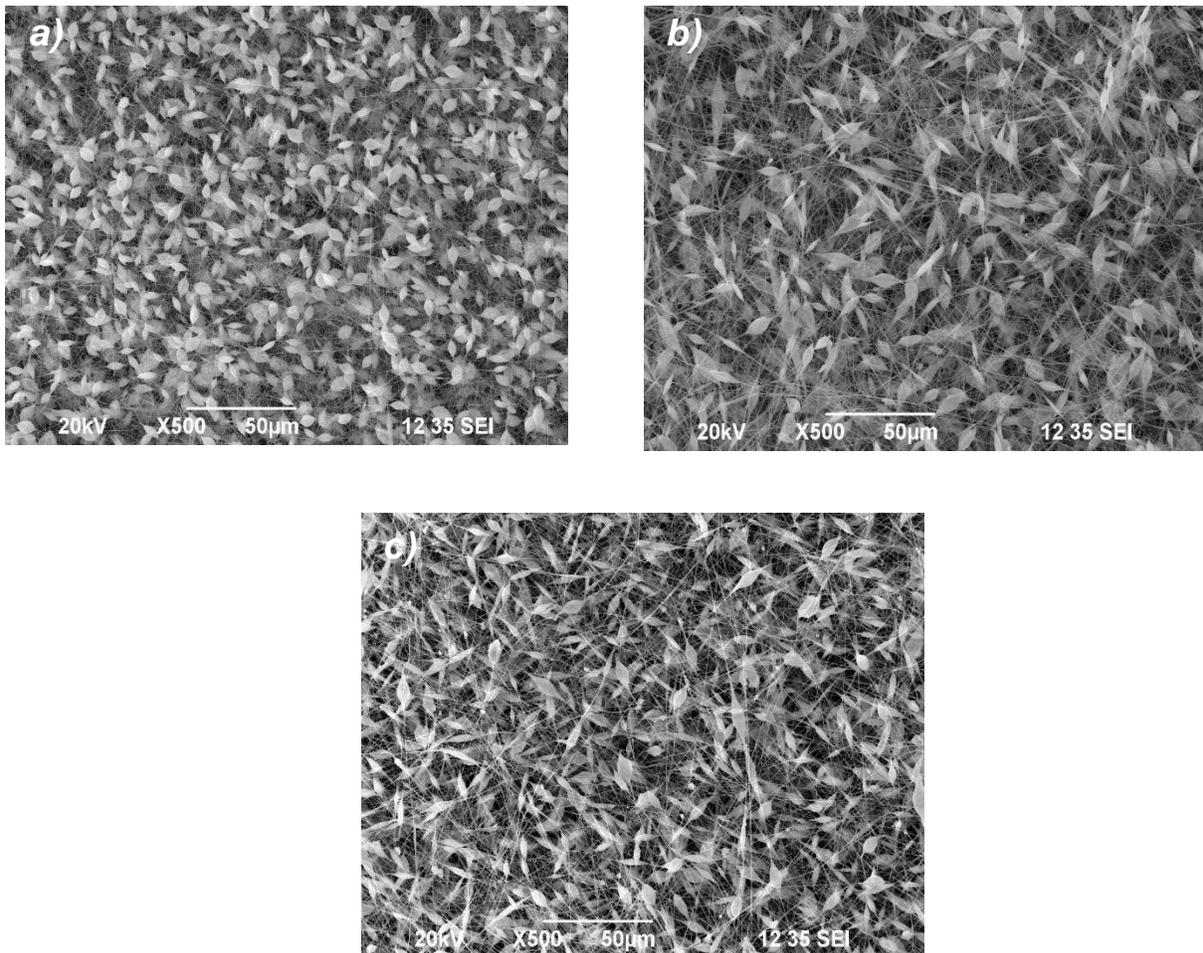


Figura 3. 21 Micrográficas de PLA conteniendo a) 0.005g, b) 0.05g y c)0.1 g de nanoestructuras de $\text{SiO}_2\text{-Fe}_3\text{O}_4$. Todas a 500 magnificaciones.

En las tres micrografías de la Figura 3.21 se observan otras formaciones además de las fibras, estas formaciones son diferentes a las observadas en la Figura 3.17, estas formaciones reciben el nombre de beads, que son consideradas defectos en la fabricación de fibras de PLA, en el presente trabajo se presentaron solo al adicionar las nanoestructuras, por lo que se puede atribuir la formación de beads debido a la interacción del campo electrostático con las nanopartículas de Fe_3O_4 contenido en el PLA. En la Figura 3.22 se muestran las micrografías a 10000 aumentos, que se realizaron a las fibras.

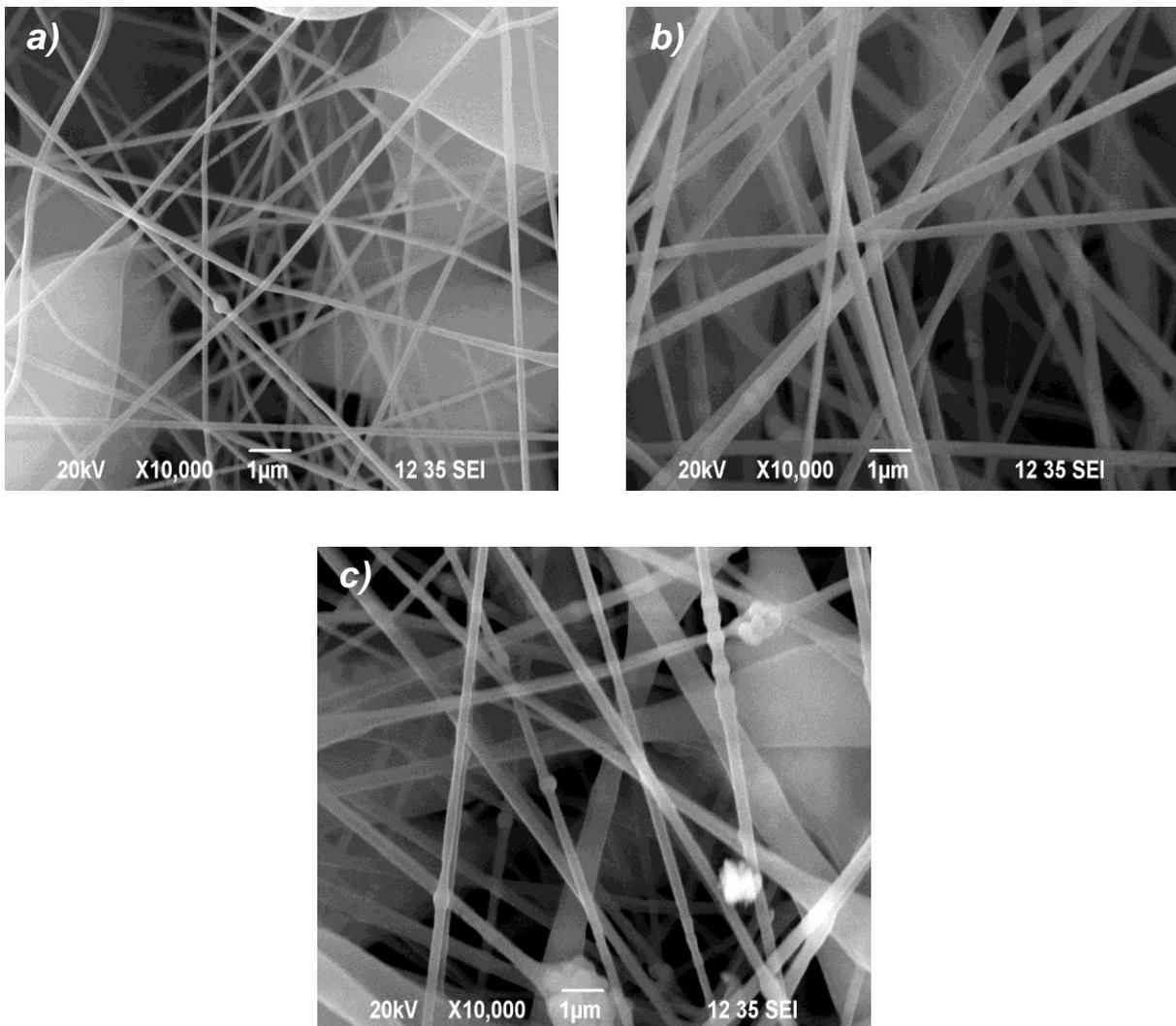


Figura 3. 22 Micrografías de PLA conteniendo a) 0.005g, b) 0.05g y 0.1 g de nanoestructuras de $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2$ -, en donde se aprecia la distribución de las nanoestructuras en las fibras. Todas a 10000 magnificaciones.

De las tres concentraciones que se prepararon se seleccionó la que contiene 0.05 g de nanoestructuras de $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2$. Se seleccionó esta concentración de trabajo debido a que en la Figura 3.22b) se aprecia un menor número de beads presentes en la fibra, además que en comparación con la Figura 3.22a) se observa una mayor presencia de las nanoestructuras a lo largo de las fibras y estas no presentan aglomeraciones en las fibras como se aprecia en 3.22c).

Es importante hacer notar que ya se observa una uniformidad en el diámetro de las fibras. El diámetro se midió y se obtuvo como resultado, que se presenta en la Figura 3.23, el tamaño de diámetro promedio de 290 nm, con una desviación estándar de 79 nm. Con esto podemos observar que la presencia de las nanoestructuras $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2$ mejoraron la producción de fibras [44]. La distribución de tamaño de diámetro ya tiene un comportamiento normal. Ver Tabla 3.10.

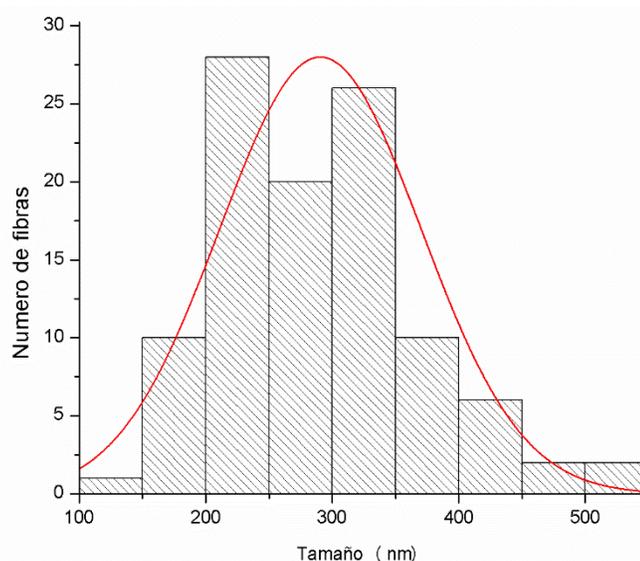


Figura 3. 23 Distribución de los tamaños de las fibras de PLA conteniendo 0.05 g de nanoestructuras

Tabla 3. 10 Valores del diámetro de las fibras de PLA disuelto en cloroformo-dimetilformamida conteniendo nanoestructuras de $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2$.

	Menor (nm)	Mayor (nm)	Prom (nm)
PLA	148	536	290±79

3.2.4 Microscopia electrónica de transmisión

3.2.4.1 Óxido de hierro Fe_3O_4

En la Figura 3.24 se muestran las micrografías de MET de las nanopartículas de Fe_3O_4 sintetizadas por coprecipitación. En la figura 3.24a) se aprecia una población de nanopartículas de Fe_3O_4 .

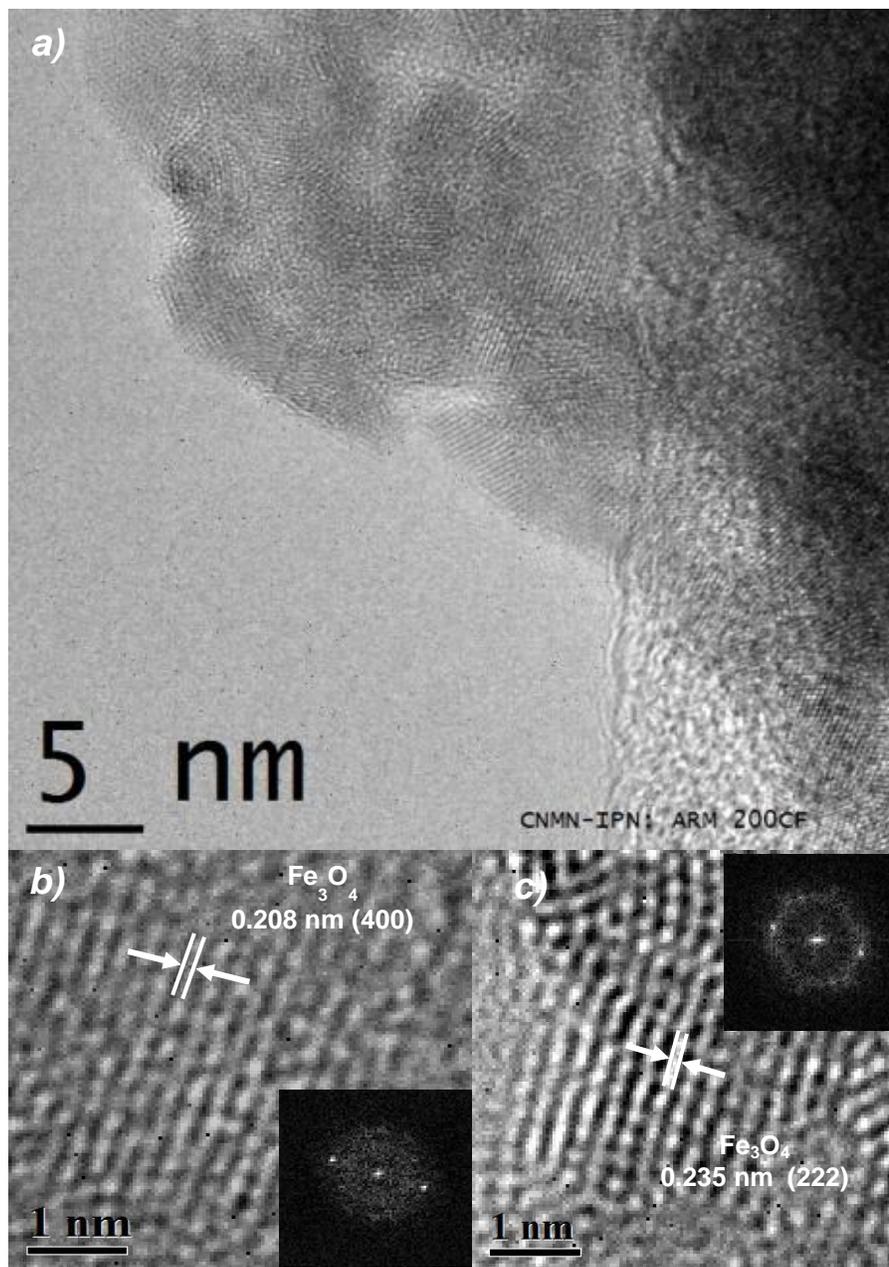


Figura 3. 24 Micrografías obtenidas por MET. a) Nanopartículas de Fe_3O_4 . Con flechas y barras blancas se señalan las reflexiones b) (400) y c) (222) del Fe_3O_4 .

En la Figura 3.24b) se observa el plano cristalográfico (400) y en la figura 3.24c) se observa el plano cristalográfico (222), los cuales tienen una distancia interplanar de 0.208 nm y 0.235 nm respectivamente. Las reflexiones de estos planos fueron identificadas con flechas blancas. El recuadro muestra el patrón de difracción de estas reflexiones. La reflexión (400) coincide con las que se obtuvo en el apartado **3.2.2.1**. En la misma carta cristalográfica se encuentra la reflexión (222), que está presente en Fe_3O_4 .

3.2.4.2 Nanoestructuras de $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2$

La Figura 3.25 muestra las micrografías de MET de las nanoestructuras de $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2$. Estas nanoestructuras se obtuvieron mediante la reacción sol-gel descrita en la sección 3.1.2. En la figura 3.25a) se aprecia que las nanopartículas de Fe_3O_4 están rodeadas de SiO_2 .

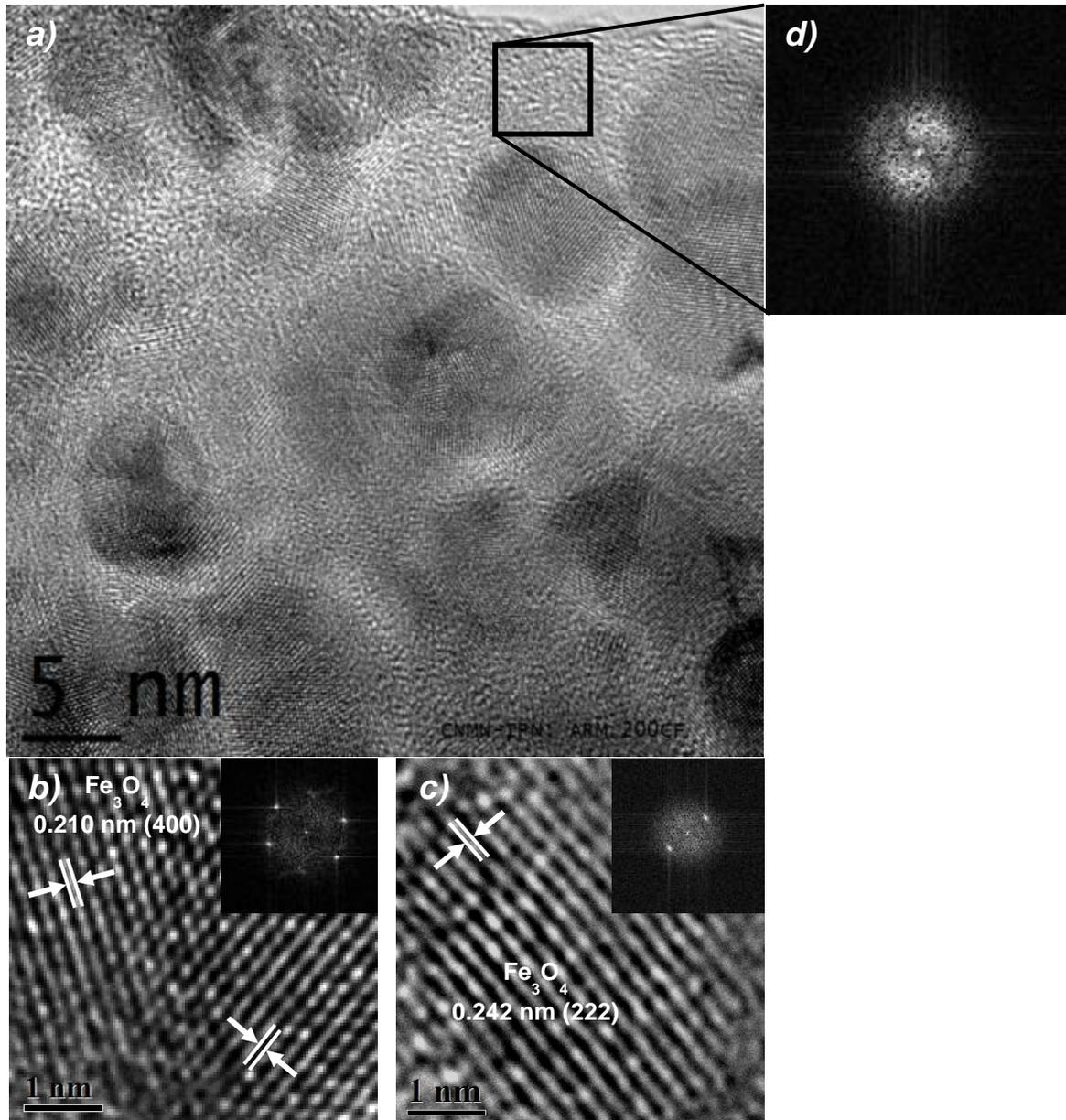


Figura 3. 25 Micrografías obtenidas por MET de las nanoestructuras de $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2$. (a) Población de nanopartículas de Fe_3O_4 rodeadas de SiO_2 . Con flechas y barras blancas se señalan las reflexiones (b) (400) y (c) (222) del Fe_3O_4 , (d) patrón de difracción de SiO_2 amorfo.

En la Figura 3.25b) se observa el plano cristalográfico (400) y en la Figura 3.25c) se observa el plano cristalográfico (222), los cuales tienen una distancia interplanar de 0.210 nm y 0.242 nm respectivamente. Las reflexiones de estos planos fueron identificadas con flechas blancas. El recuadro muestra el patrón de difracción de estas reflexiones.

Las nanopartículas de Fe_3O_4 se identifican entre el SiO_2 . En el recuadro negro, ver Figura 3.25d), no existe reflexión alguna, por lo que el SiO_2 como no tiene tratamiento térmico, es amorfo. Las nanopartículas de Fe_3O_4 tienen forma ovalada y debido a la presencia de SiO_2 se puede observar de forma individual a cada nanopartícula. La reflexión (400) coincide con las que se obtuvo en el apartado **3.2.2.1**. En la misma carta cristalográfica se encuentra la reflexión (222), que está presente en Fe_3O_4 .

3.3 Ensayos biológicos

3.3.1 Ensayo de adhesión celular

En los capítulos anteriores se ha estudiado química, estructural y morfológicamente a las nanoestructuras de $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2$. Debido a que se tiene previsto que estos materiales sean aplicados como biomateriales, es necesario el estudio de su respuesta biológica.

El estudio *in vitro* es el primer estudio para la comprensión de la interacción célula-material, debido a que son cultivos celulares con parámetros específicos. El ensayo de adhesión celular es uno de los primeros ensayos *in vitro* en realizarse, ya que es en donde se estudia el proceso por el cual la célula se “pega” a un sustrato, una vez adherida la célula y teniendo condiciones adecuadas la célula puede realizar procesos como la proliferación y la diferenciación [39].

El ensayo de adhesión consiste en cuantificar las células que se adhieren al PLA y al PLA con las nanoestructuras $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2$ (PLA+NP) en periodos cortos de tiempo, los cuales fueron a dos tiempos: a 4 y 8 horas. En la Figura 3.26 se aprecia que existe una buena adhesión de las células sobre los andamios, lo que se observa en esta figura son los niveles de absorbancia después de la coloración con azul violeta. El control son células que se depositaron directamente en el pozo de cultivo. Este pozo posee características adecuadas para que se adhieran sin ningún problema las células. La absorbancia del control en los dos tiempos no varía en gran proporción.

Se aprecia que el andamio de PLA presenta una mayor absorbancia con respecto al control a 4 y 8 horas. Esto se puede atribuir a que el andamio tiene una mayor área superficial que el control, por lo tanto las células que son sembradas tienen una mayor superficie de contacto para que puedan adherirse [45].

El andamio de PLA+NP presenta una mayor absorbancia en comparación con el andamio de PLA y con el control. A las 8 horas la absorbancia incrementa un 51% con respecto a 4 horas. Esto significa que las nanoestructuras de $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2$, no son citotóxicos y en cierta medida las nanopartículas mejoran la adhesión de las células.

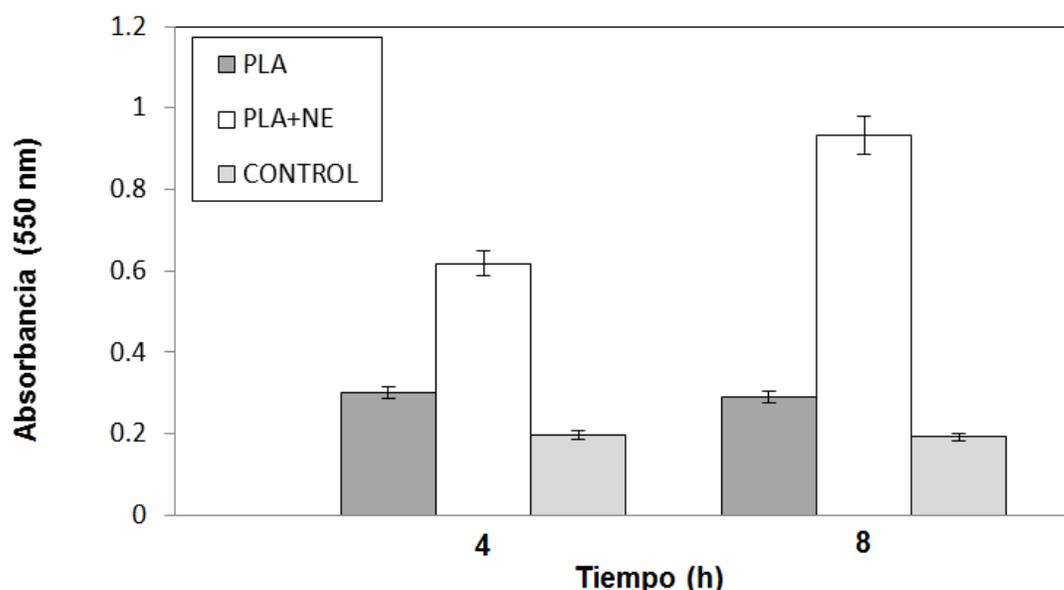


Figura 3. 26 Resultado del ensayo de adhesión de células sobre los andamios de PLA y PLA conteniendo las nanoestructuras de $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2$.

El incremento de la absorbancia de los andamios de PLA+NP con respecto a los de PLA puede atribuirse a que la presencia de las nanoestructuras mejora la síntesis de fibras. Como se discutió en las secciones 3.2.3.4 y 3.2.3.5 los andamios de PLA tienen un diámetro de fibra de 329 nm, mientras que los andmios de PLA+NP tienen un diámetro de fibra de 290 nm. Esto significa una disminución del 12% del diámetro de las fibras, lo que podríamos traducir a un incremento del área superficial [45].

Otra forma de representar los resultados obtenidos de los ensayos de proliferación es en porcentaje de adhesión, los resultados se presentan en la Figura 3.27. Estos resultados se obtienen al comparar las absorbancias de los andamios de PLA y de PLA+NP con el control. El control, que es el fondo del pozo, tiene características

(superficie plana, grupos hidrófilos) que permiten una adecuada adhesión de células. Se observa que ambos materiales presentan una buena adhesión al tener más del 100% de adhesión. Sin embargo, los andamios de PLA+NP presentan a 4 horas más de 300% de adhesión y a 8 horas cerca de 500% de adhesión. Esto implica que la presencia de las nanoestructuras influye en el proceso de adhesión celular.

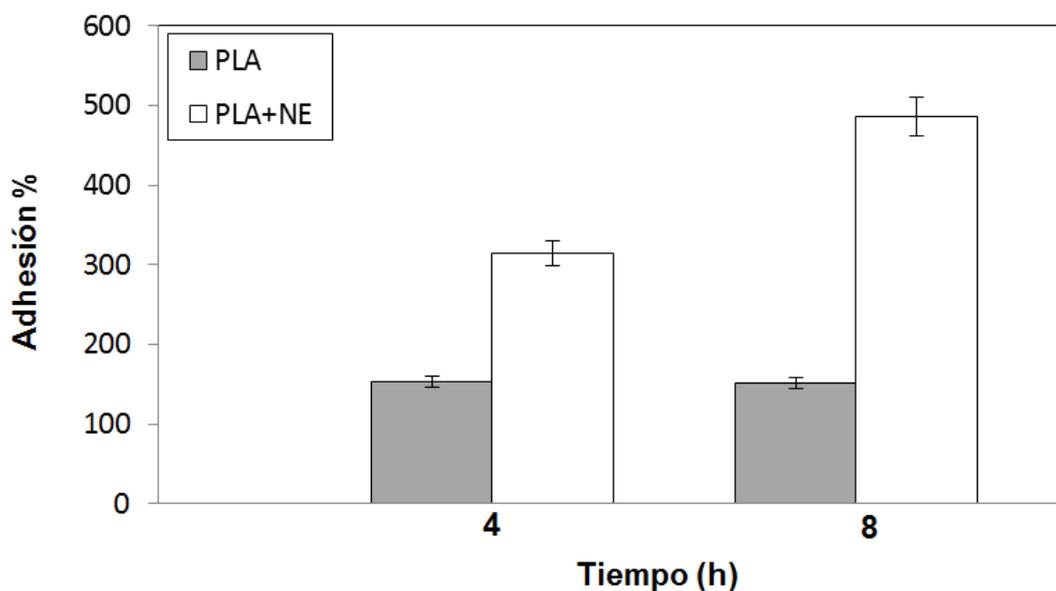


Figura 3.27 Resultado del ensayo de adhesión de células sobre los andamios de PLA y PLA conteniendo las nanoestructuras de Fe_3O_4/SiO_2 , representado en porcentaje de adhesión.

Esto puede atribuirse a que las nanoestructuras modifican la superficie de las fibras. Se reportado que el PLA tiene características hidrofílicas y la presencia de Fe_3O_4 incrementa esta propiedad, por lo tanto las células tienen mayor facilidad de adhesión [46,47].

3.3.2 Ensayo de Proliferación Celular

En la Figura 3.28 se presentan los resultados obtenidos del ensayo de proliferación celular, a los diferentes tiempos de monitoreo.

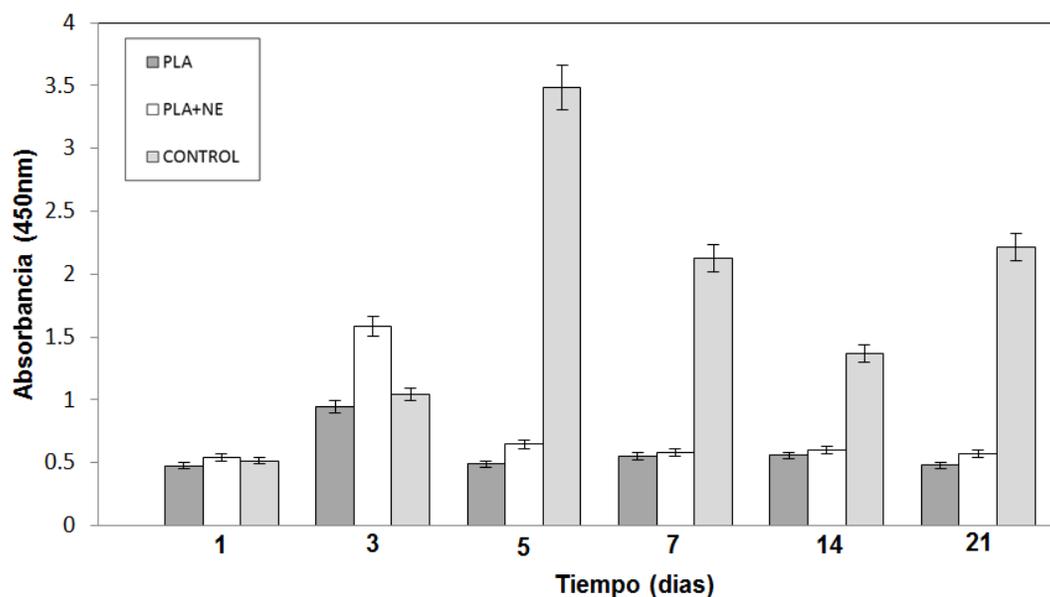


Figura 3.28 Resultado del ensayo de proliferación de células sobre los andamios de PLA y PLA conteniendo las nanoestructuras de Fe_3O_4/SiO_2 .

Se observa que a las 24 horas de que las células fueron sembradas los andamios de PLA tienen una absorbancia parecida con el control, mientras que los andamios de PLA+NE presentan una mayor absorbancia indicando una mayor proliferación celular. Para el día tres se observa que el andamio de PLA aún tiene una absorbancia parecida a la del control y el andamio de PLA+NP presenta una mayor absorbancia. Comparando el día tres contra el día uno, las absorbancias se incrementaron, lo que indica un mayor número de células. Y como resultado implícito, se confirma una vez más que los andamios son no citotóxicos.

A partir de los días 5 al 21 se observa que los andamios presentan una absorbancia parecida, siendo el andamio de PLA+NP mayor que la de andamio de PLA. La absorbancia de los controles a partir del día 5 incrementa su valor en comparación con los primeros tres días. El que los andamios presenten

absorbancias parecidas en los días 5, 7,14 y 21 indica que se mantienen el mismo número de células en los andamios durante este lapso de tiempo. Lo cual es interesante porque indica que los andamios no son citotóxicos, sin embargo la disminución en la proliferación indica que podrían estar presentando un efecto citostático o entrando en la diferenciación celular. Ya que se propone que los osteoblastos al presentar una buena adhesión celular en las primeras etapas de la regeneración, sufren un cambio en su maquinaria génica para empezar a secretar matriz osteoide o mineral [47].

Se debe de tener en cuenta que se trabajaron dos ensayos con fundamentos diferentes, por lo que para un mismo número de células se puede tener dos diferentes resultados. Mientras que la adhesión se trabajó con cristal violeta, este ensayo valora los puntos de adhesión celular importante para la sobrevivencia celular, mientras que el ensayo de proliferación por CCK-8 se utiliza sales de formazán las cuales actúan en el sistema mitocondrial de la célula y permite medir la viabilidad celular.

IV.- Conclusiones

4.1 Conclusiones generales

En este trabajo se presentó la preparación, la caracterización y los ensayos biológicos que se realizaron en andamios compuestos de nanoestructuras de $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2$ montadas en fibras de PLA. Estos andamios son una propuesta de biomateriales para la aplicación en el campo de la medicina regenerativa.

Para la síntesis de las nanoestructuras de $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2$ se utilizó dos métodos de preparación, la técnica de coprecipitación y el método sol-gel. El método sol-gel presenta mejores características morfológicas, ya que las nanoestructuras sintetizadas son altamente estables. Ambos métodos se utilizaron ya que no se requirió aplicación de energía externa ni condiciones especiales como atmósferas controladas inertes, y no alteran las características de las especies químicas con las que se está trabajando como lo demostró la caracterización química y estructural. Estructuralmente se tienen dos especies la cristalina (Fe_3O_4) y la amorfa (SiO_2).

Se encontraron las condiciones óptimas de síntesis de fibras de PLA para montar las nanoestructuras sintetizadas. Hay una excelente interacción entre las nanoestructuras y las fibras, cuando se sintetizaron estas disminuyeron su diámetro. Estas técnicas de síntesis no modifican químicamente las especies presentes. Con la caracterización morfológica se aprecia que las nanoestructuras se distribuyen a lo largo de las fibras de PLA y la disminución de diámetros.

En este material compuesto fue analizado como una propuesta para el campo de ingeniería tisular mediante ensayos biológicos que se realizaron para conocer la interacción del mismo con células en condiciones específicas. Se demostró que las fibras obtenidas por electrohilado ofrecen un ambiente adecuado a las células para que estas puedan adherirse y crecer, como lo harían en la matriz extracelular.

Los resultados obtenidos por el ensayo de adhesión celular nos indican un incremento del número de células que tienen los andamios con la nanoestructuras, lo que puede atribuirse a la disminución del diámetro de la fibra, lo que permite que se incremente el área superficial y con ello más células puedan ser contenidas en este andamio

Con estos resultados se puede concluir que se tiene una buena propuesta de biomateriales. Que estos andamios se pueden considerar como un reemplazo de matriz extracelular y ayudar a la regeneración de tejidos.

4.2 Recomendaciones para trabajos futuros

Síntesis de nanoestructuras aplicando surfactantes, con ello mejoraría las condiciones superficiales.

El montaje de estas nanoestructuras en otros polímeros y realizar una comparación.

El estudio de estos andamios de nanoestructuras de $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2$ y fibras de PLA con la aplicación de un campo magnético.

V.- Referencia bibliográfica

- [1] Rettner R., (2013) The Human Body: Anatomy, Facts & Functions, <http://www.livescience.com/37009-human-body.html>, Fecha de edición, May 30, 2013 05:23pm.
- [2] Gómez Ortega J.L., Elizondo Villareal N., Guerrero Villa H., (2004) Visualización cristalográfica de la hidroxiapatita, Ingenierías, Vol. VII, 24: 46-50.
- [3] Ross M.H., Pawlina W., (2007) Histología, Texto y atlas color con biología celular y molecular. Capítulo 8-Tejido óseo. 5° edición. Editorial médica panamericana. 218-234.
- [4] Ural A., Vashishth D., (2014) Hierarchical perspective of bone toughness from molecules to fracture, International Materials Reviews, 59, 5: 245-263.
- [5] Cowin S.C., Doty S.B., (2007) Tissue Mechanics- Bone tissue, Springer Science, 353-356.
- [6] FORRIOL F., (2001) Bone response to mechanical demand under physiological conditions, Rev Ortop Traumatol 2001; 3: 258-265.
- [7] Maureen Zimmerman, Beth Snow, (2012) An Introduction to Nutrition- Nutrients Important for Bone Health.
- [8] Bloomfield S.A., Optimizando la salud ósea: impacto de la nutrición, el ejercicio y las hormonas, Sports Science Exchange 82, 14, 3.
- [9] Consejo de salubridad general, (2013), Diagnóstico y tratamiento de osteoporosis en mujeres posmenopáusicas. Evidencias y recomendaciones. Catálogo maestro de guías de práctica clínica: IMSS-673-13.
- [10] Mackey P.A., Whitaker M.D., (2015) Osteoporosis: A Therapeutic Update, The Journal for Nurse Practitioners, 11, 10: 1011–1017.

[11] Malawer M.M., Helman L.J., O'Sullivan B., (2004) Rosenberg SA, editors. Cancer: Principles and Practice of Oncology. Vol. 2. 7th ed. Philadelphia.

[12] Bartold P.M., Xiao Y., Lyngstaadas S.P., Paine M.L., Snead M.L., (2006). Principles and applications of cell delivery systems for periodontal regeneration, *Periodontol* 2000; 41: 123-35.

[13] Ohba S., Yano F., Chung U., (2009), Tissue engineering of bone and cartilage, *Bone Key*, 6: 405-419.

[14] Giannoudis P.V., Dinopoulos H., Tsiridis E., (2005) Bone substitutes: An update, *Injury, Int. J. Care Injured*, 36S, S20-S27.

[15] Cypher TJ, Grossman JP., (1996) Biological principles of bone graft healing. *J Foot Ankle Surg*; 35: 413-7.

[16] Constantino P.D., Freidman C.D., (1994) Synthetic bone graft substitutes. *Otolaryngol Clin North Am*; 27: 1037-73.

[17] Gil F.J., Ginebra M.P., Planell J.A., (2002) 20 descriptiva de materials Materials en el procés de disseny. http://tdd.elisava.net/coleccion/20/gil_ginebra_planell-es.

[18] Slowing I.I, Vivero-Escoto J.L., Trewyn B.G., Lina V.S., (2010) Mesoporous silica nanoparticles: structural design and applications, *J. Mater. Chem.*, 20: 7924-7937.

[19] Llinàs M.C., Sánchez-García D., (2014) Nanopartículas de sílice: preparación y aplicaciones en biomedicina, *AFINIDAD LXXI*, 565: 20-31.

[20] R. A. Whitehead, S. Chagnon, E. V. Groman, L. Josephson, (1985) US Patent 4,554,088 (Advanced Magnetics Inc., US).

[21] LeGeros R, editor. Calcium phosphate glasses with or without fluoride support proliferation and expression of human osteoblast phenotype in vitro.: *Key Engineering Materials*, 2000.

[22] Ren J., EBook (2010), Biodegradable Poly(Lactic Acid): Synthesis, Modification, Processing and Applications, ISBN: 978-3-642-17595-4 (Print) 978-3-642-17596-1 (Online).

[23] Shalaby S. (1994) Synthetic absorbable polyesters. Editor. Biomedical Polymers. Hanser, 1-34.

[24] Figura obtenida de <http://plasticgenesis.blogspot.mx/>, última fecha de actualización 14 de mayo 2012.

[25] Lu A., Salabas E.L., Schüt F., (2007) Magnetic nanoparticles: synthesis, protection, functionalization, and application., *Angew. Chem. Int. Ed.*, 46: 1222-1244.

[26] Rahman I., Padavettan V., (2012), Synthesis of Silica Nanoparticles by Sol-Gel: Size-Dependent Properties, Surface Modification, and Applications in Silica-Polymer Nanocomposites. A Review. *Journal of Nanomaterials*, ID 132424, 15.

[27] Roylance D., (2000), Introduction to composite materials, Department of materials science and engineering, Institute of technology, Massachusetts, 1-7.

[28] Guo B., Yim H., Khasanov A., Stevens J., (2010) Formation of Magnetic Fe₃O₄/Silica Core-Shell Particles in a One-Step Flame Aerosol Process, *Aerosol Science and Technology*, 44: 281–291.

[29] Jang E. S., Lee S.Y., Cha E.J., Sun I.C., Kwon I.C., Kim D., Kim Y., Kim K., Ahn C.H., (2014) Fluorescent Dye Labeled Iron Oxide/Silica Core/Shell Nanoparticle as a Multimodal Imaging Probe, *Pharm Res*, 31: 3371–3378

[30] Tian H., Liu F., He J., (2014), Multifunctional Fe₃O₄@nSiO₂@mSiO₂-Fe core-shell microspheres for highly efficient removal of 1,1,1-trichloro-2,2-bis (4-chlorophenyl)ethane (DDT) from aqueous media, *Journal of Colloid and Interface Science* 431: 90–96

[31] Hua J., Huang S., Huang X., Kang Z., Gan N., (2014), Superficially mesoporous Fe₃O₄@SiO₂ core shell microspheres: Controlled syntheses and attempts in protein separations, *Microporous and Mesoporous Materials* 197:180–184.

[32] Ren J., EBook (2010), *Biodegradable Poly(Lactic Acid): Synthesis, Modification, Processing and Applications*, ISBN: 978-3-642-17595-4 (Print) 978-3-642-17596-1 (Online).

[33] Dan K., Sing S. L., Xian J. L., (2014) Biodegradable polymers for electrospinning: Towards biomedical applications, *Materials Science and Engineering C* 45, 659–670.

[34] Harris D. C., (2007) *Espectrofotómetros, Espectroscopia atómica*, Ed. Reverte, 3^o edición en español, *Análisis químico cuantitativo*, 495-511.

[35] Skoog D. A., Holler F. J., Crouch S. R., (2008), *Introducción a los métodos espectro métricos,, Introducción a espectroscopia infrarroja, Espectroscopía atómica de rayos-X*, Ed Cengage Learning, 6^a edición, *Principios de análisis instrumental*, México, p. 230-254, 481-495, 325-328.

[36] Willard H. H., Merritt L. L., Dean J. A., Settle F. A., (1992) *Espectroscopía infrarroja, Espectroscopía Raman, Método de rayos-X*, Ed. Compañía editorial continental, 3^o edición, *Métodos instrumentales de análisis*, p. 207-253, 247-262, 268-298.

[37] *Apuntes de microscopía electrónica*, (2010), Laboratorio de microscopía electrónica UAM-I.

[38] Joshi M., Bhattacharyya A., Wazed A., (2008) Characterization techniques for nanotechnology applications in textiles. *Indian journal of fibre and textile research*, 33: 304-3017.

[39] Anselme K. (2000) Osteoblast adhesion on biomaterials. *Biomaterials*; 21(7): 667-681.

[40] Technical Manual, Cell Proliferation Assay and Cytotoxicity Assay Cell Counting Kit-8 (CCK-8), Revised February 17, 2016.

[41] Ziyang Lu Z., Dai J., Song X., Wang G., Yang W., (2008) Facile synthesis of Fe₃O₄/SiO₂ composite nanoparticles from primary silica particles, *Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects*, 317: 450-456.

[42] Chen L., Xu Z., Dai H., Zhang S., (2010) Facile synthesis and magnetic properties of monodisperse Fe₃O₄/silica nanocomposite microspheres with embedded structures via a direct solution-based route, *Journal of Alloys and Compounds* 497: 221-227.

[43] Song X., You J., Wang J., Zhu A., (2014) Preparation and Investigation of Arsenic Trioxide-loaded Polylactic Acid/Magnetic Hybrid Nanoparticles, *Chem. Res. Chin. Univ.*, 30(2): 326-332.

[44] Lee H.J., Lee S.J., Uthaman S., Thomas R.G., Hyun H., Jeong Y.Y., Cho C.S., Park I.K. (2015) Biomedical Applications of Magnetically Functionalized Organic/Inorganic Hybrid Nanofibers, *Int. J. Mol. Sci.*, 16: 13661-13677.

[45] Vogler EA. (1993) Interfacial chemistry in biomaterials science. In: Berg JC, editor. *Wettability, surfactant science series*: 183-250.

[46] Meng, J.; Xiao, B.; Zhang, Y.; Liu, J.; Xue, H. D.; Lei, J.; Kong, H.; Huang, Y.G.; Jin, Z.Y.; Gu, N., (2013) Super-paramagnetic responsive nanofibrous scaffolds under static magnetic field enhance osteogenesis for bone repair in vivo, *Sci. Rep.*, 2013, 3, doi:10.1038/srep02655.

[47] Navarro M., Engel E., Planell J. A., Amaral I., Barbosa M., Ginebra M. P., (2007) Surface characterization and cell response of a PLA/CaP glass biodegradable composite material, *Journal of Biomedical Materials Research*, 477-486.