



**UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA**

**FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS**

**DEPARTAMENTO DE QUÍMICA**

---

***Desarrollo de nanocompositos basados en  
hidroxiapatita/ hidroxiapatita dopada con metales y/o  
biomoléculas como materiales de recubrimiento de  
andamios para implantes ortopédicos***

---

***Tesis para optar al grado académico de Doctora de la  
Facultad de Ciencias Exactas de la Universidad  
Nacional de La Plata***

**Tesista: Dittler María Laura**

**Director/a: Mónica C. González**

**Codirector/a: Claudia A. Grillo**

**Año: 2020**

*En memoria de mi papá, que su recuerdo me acompañó todo  
el trayecto; dedicada a mi mamá, mi hermana y mi abuela  
que fueron mi sostén en estos años.*

*"Savoir penser rêver tout est là..."*

*Victor Hugo*

## ***Agradecimientos***

*A la Facultad de Ciencias Exactas por darme la posibilidad de desarrollar mi doctorado en el ámbito de una casa académica de alto prestigio, por haber tenido la posibilidad de realizar mi trabajo en una Universidad Pública Gratuita y de Calidad.*

*Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas por otorgarme la beca doctoral que me permitió financiar mis estudios.*

*Al programa de becas ALEARG que financió mi estancia de investigación de 6 meses en Alemania permitiéndome finalizar los ensayos biológicos que estaban previstos para completar el plan de trabajo.*

*A mi directora la Dra. Monica González por haber confiado en mí desde el 2013 al invitarme a trabajar en su grupo de investigación para realizar mi trabajo final de grado y por seguir confiando hasta la actualidad dándome su apoyo para desarrollar el trabajo de mi tesis doctoral y las estancias de investigación en el exterior. Por seguir enseñándome desde que fui su alumna en fisicoquímica I con la misma comprensión y paciencia a lo largo de todos estos años.*

*Gracias a mi codirectora la Dra Claudia Grillo por el apoyo incondicional, no solo en el ámbito laboral sino también en lo personal, por darme ánimo y no dejarme desanimar cuando los resultados no salían como esperaba o me decepcionaba. Sin su ayuda hacer el trabajo sola, no hubiera sido lo mismo.*

*Al Prof. Dr. Aldo Boccaccini le agradezco el haberme abierto las puertas de los laboratorios del Instituto de Biomateriales en Erlangen-Nuremberg. Así como también la calidez y la excelente predisposición para responder a mis consultas y discutir mis resultados durante las dos estancias de investigación que realicé en el instituto que se encuentra bajo su dirección. Gracias a su vez por haber confiado en mí y haberme incentivado para presentar mi trabajo en congresos internacionales, brindándome su apoyo para hacerlo posible.*

*Gracias a TODO el personal del WW7 que me ayudó durante mis estancias en el Instituto, desde la buena predisposición para ayudar cuando necesitaba hacer un trabajo hasta las cervezas que compartíamos después. En particular a Irem, Vera, Francesca, Laura, Alina, Florian, Bo, Marcela. Gracias a ustedes el trabajo y estar lejos se hizo mucho más ameno.*

*A la Ing. Irem Unalam gracias por todo, desde lo profesional gracias por las largas horas de SEM que pasamos analizando mis muestras y tantas otras medidas que compartimos en el laboratorio. Desde lo personal gracias por ser como una hermana mayor y ayudarme en todo lo que necesité durante mi tiempo en Erlangen, compartiendo tanto los malos momentos como los buenos y los viajes que hicimos juntas.*

*A las personas que me cruce estando lejos y me demostraron que uno puede estar a distancia pero sentirse como en familia: Mariangela, Daniela, Eugeni, Julia, Francesca, Natascia, Marta, Eliana, Hatice, Salvatore, Xiaoyang, Ana, Simon gracias por los buenos momentos, por los viajes y por el apoyo que me dieron, ojala nos crucemos pronto.*

*A TODO el LEAR porque cada uno a su modo ayudó a que los días de medida, trabajo en el laboratorio y oficina fueran más amenos.*

*A mis amigos Exactos, una de las mejores cosas que me dejó la facultad hace años fue conocerlos Mai, Nado, Lau, Lula, Kari, Barbi, Flor, Esteban, Fiore, gracias por bancarme siempre, a pesar de que nuestras carreras nos hayan separado y ahora sea complicado juntarse, cada uno desde su lugar siempre me apoyó.*

*Gracias a mis amigas incondicionales que son como hermanas y siempre estuvieron ahí cuando las necesité Vicky, Cin, Fefi y Maki no podría haberlo logrado sin su aguante y las largas horas de catarsis.*

*A mi familia TODA, en especial a mis abuelos Nena, Eduardo, Cito y Carmen porque desde chica siempre me dieron su apoyo y su cariño incondicional.*

*A mi mamá y a mi hermana porque sin su apoyo no se como hubiera sido seguir adelante, ambas conocen todo lo que tuve que pasar para llegar hasta este momento y estuvieron conmigo siempre. Gracias por haberme ayudado a convertirme en la persona que soy hoy.*

*Finalmente, le agradezco y dedico este trabajo a mi papá que en cada una de las cosas que hice durante estos años se que siempre estuvo presente guiándome, acompañandome y cuidándome.*

## ***Resumen***

En los últimos años, el envejecimiento progresivo de la población mundial conjuntamente con las lesiones en el tejido óseo causadas por trauma o enfermedades, ha llevado a buscar soluciones a los inconvenientes que presentan los métodos de tratamientos centrados principalmente en injertos óseos autólogos o alogénicos o bien implantando materiales sustitutos. Así, surge la ingeniería de tejido óseo (ITO) cuyo enfoque se basa, en gran medida, en el uso de biomateriales que puedan funcionar como sustitutos biológicos, como andamios 3D porosos, para proporcionar un entorno adecuado que permita la regeneración de los tejidos y órganos dañados. Algunos tipos de andamios comprenden materiales sintéticos inorgánicos tales como los vidrios bioactivos; utilizados por presentar una alta bioactividad, osteoconductividad y capacidad angiogénica. Otro tipo de material inorgánico que se ha propuesto ampliamente como sustituto óseo es la nano hidroxapatita (HAp), ya que permite imitar la hidroxapatita (HA) presente en los huesos por su tamaño nanométrico y su inhomogeneidad originada en la presencia de trazas de iones metálicos en su estructura. Por otro lado, la modificación superficial de nanomateriales con metales y/o biomoléculas ha sido una estrategia para estimular la interacción tejido óseo-biomaterial”.

En el presente trabajo de tesis se propone el desarrollo y la caracterización de andamios de biovidrio recubiertos con nanopartículas de hidroxapatita modificadas con iones metálicos, en particular  $Mg^{+2}$ ,  $Fe^{+2}/Fe^{+3}$  y  $Zn^{+2}$  y el desarrollo de nanopartículas de HA con diferentes superficies con potencial utilidad en el desarrollo de la ITO.

Para ello, en una primera etapa se desarrolló la síntesis de nanomateriales a base de HA mediante el método de deposición química húmeda, se estudió el efecto de la incorporación de iones metálicos bi y trivalentes durante la síntesis de los nanomateriales obtenidos mediante diversas técnicas de caracterización. Además, se evaluó la biocompatibilidad de los nanocompositos en la línea celular 3T3Balb-c. Por otro lado, se estudió la modificación superficial de nanohidroxapatita mediante dos estrategias diferentes. A partir de la estrategia que utilizó el ácido 3-organopropiónico como modificador de la superficie, mediante los ensayos de caracterización se observó un mayor grado de recubrimiento, lo que permitió incorporar grupos carboxilo superficiales que sirvieron como plataforma para anclar compuestos fluorescentes mediante la formación de enlaces amida.

En una segunda instancia de este trabajo, se obtuvieron andamios bioactivos a base de vidrio (de la composición 45S5) (BG) fabricados por la técnica de réplica de espuma. En particular, los andamios se recubrieron con los nanocompositos a base de hidroxiapatita modificados con metales bi y trivalentes obtenidos previamente. Para ello, se utilizó el método de inmersión y posterior secado, evaluándose los tiempos de exposición y las diferentes concentraciones de las suspensiones de partida. La microestructura y la homogeneidad de los recubrimientos aplicados se investigaron mediante microscopía electrónica de barrido (SEM). Para la evaluación de la bioactividad, los andamios con y sin recubrimiento se sumergieron en fluido corporal simulado (SBF) durante distintos tiempos de exposición. La formación de hidroxiapatita se confirmó mediante observación SEM y espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR).

Los resultados evidenciaron en los andamios de vidrio bioactivo 45S5 recubiertos con MgZnHAp un incremento de su bioactividad, efecto no observado en los andamios recubiertos para las otras las partículas evaluadas.

Los andamios recubiertos con FeHAp a su vez, presentaron propiedades superparamagnéticas, propias de los nanomateriales incorporados en su superficie.

Mediante estudios *in vitro* en contacto con células MG-63 se evaluaron los andamios antes y después del recubrimiento. Particularmente, los andamios MgZnBG presentaron una mejora en la proliferación y adhesión celular con respecto al control de BG. Por otro lado, los resultados de los ensayos de viabilidad y secreción de ALP al medio de cultivo en células ST-2 no indicaron resultados concluyentes sobre un comportamiento de diferenciación osteogénica de las células ST-2 crecidas sobre muestras recubiertas con MgZnHAp con respecto a aquellas crecidas sobre los andamios sin recubrimiento.

En conjunto, los resultados de las investigaciones actuales mostraron que los andamios recubiertos con nanohidroxiapatita modificada con metales bi y trivalentes, resultan en una nueva metodología para combinar andamios preformados a base de vidrios bioactivos con nanocompositos a base de HA. Logrando así obtener un material compuesto con un potencial prometedor para su aplicación en la ingeniería del tejido óseo.

Los andamios desarrollados por dentro del presente trabajo de tesis proporcionan una base bien fundamentada que garantizar futuras investigaciones en el campo destinado a la obtención de sustitutos óseos.

|  |           |
|--|-----------|
| <b>Tabla de siglas y abreviaciones.....</b>  | <b>15</b> |
| <b>Capítulo I. <i>Introducción y objetivos</i>.....</b>  | <b>17</b> |
| 1.1 Introducción.....  | 18        |
| 1.2 Tejido óseo .....  | 22        |
| 1.3 Ingeniería Tisular ósea.....   | 26        |
| 1.4 Biomateriales.....   | 30        |
| 1.4.1 Materiales implantables a base de hidroxiapatita.....  | 32        |
| 1.4.2 Vidrios bioactivos desde sus orígenes hasta sus usos actuales.....   | 35        |
| 1.5 Objetivos.....   | 40        |
| Referencias.....   | 41        |
| <b>Capítulo II. <i>Materiales y métodos experimentales</i>.....</b>  | <b>48</b> |
| 2.1 Solventes, gases y reactivos.....  | 49        |
| 2.2 Material común de laboratorio.....   | 50        |
| 2.3 Técnicas y equipamientos.....  | 50        |
| 2.3.1 Técnicas que utilizan radiación X.....   | 50        |
| 2.3.1.1 Difracción de rayos X (DRX) .....  | 50        |
| 2.3.1.2 Microscopía electrónica de transmisión (TEM) acoplada a<br>Espectrometría de dispersión de energía de rayos X (EDS)..... | 52        |
| 2.3.1.3 Espectroscopia fotoelectrónica de rayos X (XPS).....   | 53        |
| 2.3.1.4 Microscopía electrónica de barrido (SEM).....  | 54        |
| 2.3.1.5 Microtomografía computarizada (MCT).....   | 56        |
| 2.3.2 Técnicas que utilizan radiación UV-visible e infrarroja (IR).....  | 56        |
| 2.3.2.1 Espectroscopía Infrarroja por transformada de Fourier (FTIR).....  | 57        |
| 2.3.2.2 Fluorescencia.....   | 59        |
| 2.3.2.3 Dispersión dinámica de luz (DLS).....  | 60        |
| 2.3.2.4 Microscopía óptica.....  | 62        |
| 2.3.3 Otras técnicas.....  | 63        |
| 2.3.3.1 Análisis Termogravimétrico (TGA).....  | 64        |
| 2.3.3.2 Isotermas de adsorción.....  | 65        |
| 2.3.3.3 Espectrometría de emisión atómica de plasma por microondas   |           |

|  |    |
|--|----|
| (MPAES).....   | 66 |
| 2.3.3.4 Potencial Z.....   | 68 |
| 2.3.3.5 Magnetización versus campo aplicado.....   | 70 |
| 2.3.3.6 Resistencia mecánica.....  | 72 |
| 2.4 Ensayos y Protocolos Biológicos.....   | 73 |
| 2.4.1 Medios de cultivo (MC).....  | 74 |
| 2.4.2 Condiciones de cultivo, recuento celular y evaluación de la biocompatibilidad.....                               | 75 |
| 2.4.3. Ensayos utilizados para evaluar la biocompatibilidad de nanomateriales a base de hidroxiapatita modificada..... | 76 |
| 2.4.3.1 Reducción oxidativa del metil tetrazolio.....  | 76 |
| 2.4.3.2 Viabilidad evaluada mediante tinción con Naranja de Acridina (AO).....   | 77 |
| 2.4.4 Ensayos utilizados para evaluar la biocompatibilidad de andamios a base de vidrio bioactivo 45S5®.....           | 78 |
| 2.4.4.1 Reducción oxidativa de WST-8.....  | 78 |
| 2.4.4.2 Medida de la actividad Lactato Deshidrogenasa.....   | 79 |
| 2.4.4.3 Incorporación de Bromodesoxiuridina.....   | 80 |
| 2.4.4.4 Tinción con los colorantes DAPI y Vibrant Blue.....  | 81 |
| 2.4.4.5 Tinción con Hematoxilina y Eosina.....   | 82 |
| 2.4.4.6 Determinación de la Actividad de la Fosfatasa Alcalina.....  | 83 |
| 2.4.4.7 Detección del Factor de Crecimiento Endotelial Vascular.....   | 83 |
| 2.4.5 Análisis estadístico de los datos.....   | 84 |
| Referencias.....   | 84 |

|  |    |
|--|----|
| <b>Capítulo III. <i>Síntesis, caracterización y citocompatibilidad de nanocompositos a base de hidroxiapatita.</i></b> ..... | 86 |
| 3.1 Introducción.....  | 87 |
| 3.2 Protocolos de síntesis para la obtención de HAp y su optimización para la incorporación de metales bi y trivalentes..... | 89 |
| 3.3 Caracterización de los nanocompositos obtenidos.....   | 93 |
| 3.3.1 DRX.....   | 93 |
| 3.3.2 TEM acoplado a EDS.....  | 95 |
| 3.3.3 Espectroscopia Fotoelectrónica de rayos X.....   | 98 |

|   |     |
|---|-----|
| 3.3.4 Espectroscopía FTIR.....  | 104 |
| 3.3.5 Adsorción de Nitrógeno, DLS y Potencial Z.....  | 104 |
| 3.3.6 MP-AES.....   | 105 |
| 3.3.7 Magnetización versus campo aplicado.....  | 106 |
| 3.4 Evaluación de la Biocompatibilidad de los materiales obtenidos en células<br>fibroblásticas de ratón 3T3 Balb-c.....  | 107 |
| 3.4.1 Viabilidad evaluada mediante la tinción con Naranja de Acridina.....  | 107 |
| 3.4.2 Estudio de actividad metabólica (MTT).....  | 108 |
| 3.4.3 Respuesta celular a las diferentes concentraciones de nanomateriales.....   | 109 |
| 3.5 Conclusiones parciales.....   | 114 |
| Referencias.....  | 116 |
| <br>  |     |
| <b>Capítulo IV. <i>Modificación superficial de HAp</i></b> .....  | 119 |
| 4.1 Introducción.....   | 120 |
| 4.2 Síntesis y caracterización de los nanocompositos obtenidos.....   | 121 |
| 4.2.1 APTES como agente modificador de la superficie.....   | 121 |
| 4.2.1.1 Espectroscopía FTIR.....  | 123 |
| 4.2.1.2 Dispersión dinámica de luz y Movilidad electroforética.....   | 124 |
| 4.2.1.3 Espectroscopía Electrónica de rayos X.....  | 125 |
| 4.2.2 CEPA como agente modificador de la superficie.....  | 126 |
| 4.2.2.1 Microscopía electrónica de transmisión de alta<br>resolución (HRTEM).....   | 127 |
| 4.2.2.2 Disfracción de rayos X (DRX).....   | 127 |
| 4.2.2.3 Espectroscopía FTIR.....  | 128 |
| 4.2.2.4 Espectroscopia Fotoelectrónica de rayos X.....  | 129 |
| 4.2.2.5 Adsorción de N <sub>2</sub> y Potencial Z.....  | 130 |
| 4.2.2.6 Análisis termogravimétrico.....   | 130 |
| 4.2.2.7 Biocompatibilidad de HApCOO-(10%) evaluada en células<br>fibroblásticas de ratón 3T3 Balb-c.....  | 131 |
| 4.2.2.8 Adsorción y cinética de liberación de BSA.....  | 134 |
| 4.2.3 Anclado de compuestos fluorescentes a la superficie de los nanomateriales a<br>través de CEPA. Funcionalización con Tirosina (Tyr) y Fucsina básica (Fu)..... | 137 |
| 4.2.3.1 Inmovilización de tirosina en HApCOO- (10%).....  | 137 |

|  |     |
|--|-----|
| 4.2.3.2 Inmovilización de fucsina en HApCOO- (10%).....                | 138 |
| 4.2.3.3 Espectroscopía FTIR.....                                       | 139 |
| 4.2.3.4 Análisis termogravimétrico y adsorción de N <sub>2</sub> ..... | 139 |
| 4.2.3.5 Dispersión dinámica de luz.....                                | 140 |
| 4.2.3.6 Fluorescencia.....   | 141 |
| 4.3 Conclusiones parciales.....  | 142 |
| Referencias.....   | 143 |

**Capítulo V. *Incorporación de HAp modificada con Fe en sustratos de vidrio bioactivo***..... 147

|   |     |
|---|-----|
| 5.1 Introducción.....   | 148 |
| 5.2 Síntesis de andamios a base de vidrio 45S5®.....  | 149 |
| 5.3 Incorporación de los nanomateriales en los andamios mediante Dipcoating.....  | 152 |
| 5.4 Caracterización de los andamios obtenidos.....  | 152 |
| 5.4.1 Microscopía electrónica de barrido acoplada a Espectrometría de dispersión de energía de rayos X.....             | 153 |
| 5.4.2 Porosidad.....  | 155 |
| 5.4.3 Microscopía óptica.....   | 156 |
| 5.4.4 Microtomografía computada.....  | 157 |
| 5.4.5 Resistencia mecánica.....   | 158 |
| 5.4.6 Espectroscopía de emisión atómica de plasma por microondas y medida de iones metálicos en solución vs tiempo..... | 159 |
| 5.4.7 Susceptibilidad magnética.....  | 160 |
| 5.4.8 Magnetometría de muestra vibrante.....  | 160 |
| 5.5 Ensayo de mineralización.....   | 161 |
| 5.5.1 Microscopía electrónica de barrido.....   | 163 |
| 5.5.2 Espectroscopía FTIR.....  | 164 |
| 5.5.3 Difracción de rayos X.....  | 165 |
| 5.6 Evaluación de la biocompatibilidad y osteoconductividad de los andamios recubiertos.....                            | 166 |
| 5.6.1 En células tipo osteoblásticas humanas MG-63.....   | 166 |
| 5.6.1.1 Microscopía electrónica de barrido.....   | 166 |
| 5.6.1.2 Tinción con DAPI y Vibrant Blue.....  | 168 |

|   |     |
|---|-----|
| 5.6.1.3 Reducción oxidativa del WST-8.....  | 169 |
| 5.6.1.4 Medida de la actividad Lactato Deshidrogenasa.....  | 170 |
| 5.6.1.5 Incorporación de Bromodesoxiuridina.....  | 170 |
| 5.6.2 En células de médula ósea de ratón ST-2.....  | 171 |
| 5.6.2.1 Microscopía electrónica de barrido.....   | 172 |
| 5.6.2.2 Reducción oxidativa del WST-8.....  | 173 |
| 5.6.3 Ensayos de biocompatibilidad indirecto evaluando extractos obtenidos de FeBG en células de médula ósea de ratón ST-2..... | 174 |
| 5.6.3.1 Reducción oxidativa del WST-8.....  | 174 |
| 5.6.3.2 Detección del factor de crecimiento endotelial vascular.....  | 175 |
| 5.6.3.3 Tinción con Hematoxilina y Eosina.....  | 175 |
| 5.7 Conclusiones parciales.....   | 176 |
| Referencias.....  | 177 |

**Capítulo VI. *Incorporación de nanocompositos a base de HAp /HAp modificada con Mg y Zn en sustratos de vidrio bioactivo***..... 181

|  |     |
|--|-----|
| 6.1 Introducción.....  | 182 |
| 6.2 Incorporación de los nanomateriales en los andamios mediante Dipcoating.....             | 182 |
| 6.3 Caracterización de los andamios obtenidos.....   | 183 |
| 6.3.1 Microscopía electrónica de barrido.....  | 183 |
| 6.3.2 Porosidad y microscopía óptica.....  | 185 |
| 6.3.3 Espectroscopia de emisión atómica de plasma por microondas.....                        | 185 |
| 6.4 Ensayo de mineralización.....  | 186 |
| 6.4.1 Microscopía electrónica de barrido.....  | 186 |
| 6.4.2 Espectroscopía FTIR.....   | 190 |
| 6.4.3 Difracción de rayos X.....   | 191 |
| 6.5 Evaluación de la biocompatibilidad y osteoconductividad de los andamios recubiertos..... | 192 |
| 6.5.1 En células tipo osteoblasticas humanas MG-63.....                                      | 192 |
| 6.5.1.1 Reducción oxidativa del WST-8.....   | 193 |
| 6.5.1.2 Incorporación de Bromodesoxiuridina.....   | 194 |
| 6.5.1.3 Tinción con DAPI y Vibrant Blue.....   | 194 |

|   |     |
|---|-----|
| 6.5.1.4 Microscopía electrónica de barrido.....                               | 195 |
| 6.5.2 En células de médula ósea de ratón ST-2.....                            | 197 |
| 6.5.2.1 Microscopía electrónica de barrido.....                               | 197 |
| 6.5.2.2 Reducción oxidativa del WST-8 y medidas de la actividad               |     |
| Lactato Deshidrogenas.....  | 199 |
| 6.5.2.3 Diferenciación osteoblastica, medida de la actividad de la            |     |
| Fosfatasa Alcalina.....   | 200 |
| 6.5.3 Ensayos de biocompatibilidad indirecto evaluando extractos obtenidos de |     |
| andamios recubiertos en células de médula ósea de ratón ST-2.....             | 200 |
| 6.5.3.1 Reducción oxidativa del WST-8.....                                    | 201 |
| 6.5.3.2 Detección del factor de crecimiento endotelial vascular.....          | 201 |
| 6.5.3.3 Tinción con Hematoxilina y Eosina.....                                | 202 |
| 6.6 Conclusiones parciales.....   | 203 |
| Referencias.....  | 204 |
| <b>Anexo</b> .....  | 206 |
| A.1 Ensayo de mineralización.....   | 207 |
| A.1.1 Microscopía electrónica de barrido.....                                 | 207 |
| A.1.2 Espectroscopia FTIR.....  | 208 |
| A.1.3 Difracción de rayos X.....  | 209 |
| A.2 Evaluación de la biocompatibilidad y osteoconductividad de los andamios   |     |
| recubiertos.....  | 209 |
| A.2.1 En células tipo osteoblasticas humanas MG-63.....                       | 209 |
| A.2.1.1 Incorporación de Bromodesoxiuridina.....                              | 209 |
| A.2.1.2 Tinción con DAPI y Vibrant Blue.....                                  | 210 |
| A.2.1.3 Microscopía electrónica de barrido.....                               | 211 |
| <b>Capítulo VII. Conclusiones finales</b> .....                               | 213 |
| 7.1 Conclusiones finales y futuros trabajos .....                             | 214 |
| 7.2 Actividades complementarias.....  | 217 |
| 7.2.1 Publicaciones científicas.....  | 217 |
| 7.2.1.1 Trabajos publicados.....  | 217 |
| 7.2.1.2 Trabajos en redacción.....  | 217 |

|   |     |
|---|-----|
| 7.2.2 Participaciones en eventos científicos..... | 217 |
| 7.2.3 Estadías de investigación.....              | 219 |
| 7.2.4 Cursos de postgrado.....                    | 220 |

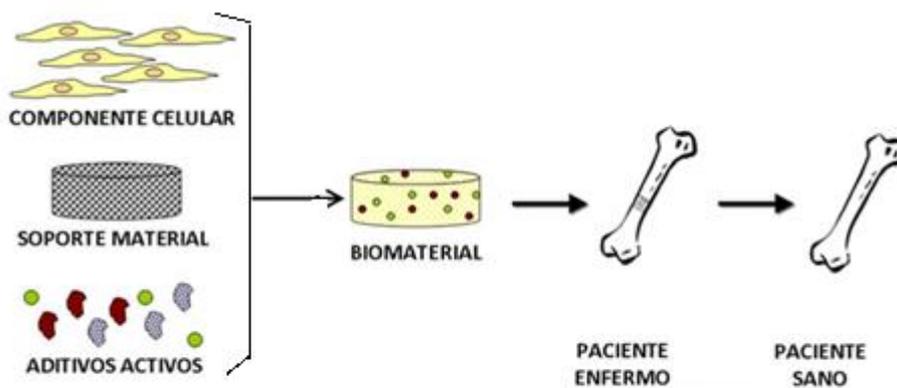
## Tabla de siglas y abreviaciones

|                           |   |
|---------------------------|---|
| ALP                       | Fosfatasa alcalina  |
| APTES                     | (3-Aminopropil) triethoxisilano                           |
| ATR                       | Reflectancia total atenuada                               |
| 45S5BG                    | Vidrio bioactivo  |
| BG                        | Andamios tridimensionales de vidrio bioactivo             |
| BrdU                      | Bromodesoxiuridina  |
| CaP                       | Fosfatos de calcio  |
| CCE                       | Condiciones de cultivo estándar                           |
| CEPA                      | Ácido 3-fosfonopropionico                                 |
| DLS                       | Dispersión dinámica de Luz                                |
| DMEM                      | Medio de Cultivo Eagle Modificado de Dulbecco             |
| DRX                       | Difracción de rayos X                                     |
| EDS                       | Espectrometría de dispersión de energía de rayos X        |
| ELISA                     | Ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas                |
| FTIR                      | Espectroscopia infrarroja transformada de Fourier         |
| Fu                        | Fucsina básica  |
| FeHAp                     | Nano hidroxapatita modificada con hierro                  |
| FeBG                      | Andamios de vidrio bioactivo recubiertos con FeHAp        |
| H <sub>2</sub> O          | Agua  |
| HA                        | Hidroxapatita   |
| HAC                       | Hidroxapatita carbonatada                                 |
| HAp                       | Nano hidroxapatita  |
| HApCOO <sup>-</sup> (10%) | Nano hidroxapatita modificada con CEPA                    |
| HEPES                     | Ácido 4-(2-Hidroxietil) piperazina-1-etanosulfónico       |
| HRTEM                     | Microscopía electrónica de transmisión de alta Resolución |
| IT                        | Ingeniería de tejidos                                     |
| ITO                       | Ingeniería tisular ósea                                   |
| ITM                       | Ingeniería de tejidos magnéticos                          |
| LDH                       | Lactato Deshidrogenasa                                    |
| MNps                      | Nanopartículas magnéticas                                 |
| MCT                       | Microtomografía Computada                                 |

|                |  |
|----------------|--|
| MC             | Medio de cultivo   |
| MgHAp          | Nano hidroxapatita modificada con magnesio   |
| MgBG           | Andamios de vidrio bioactivo recubiertos con MgHAp   |
| MgZnHAp        | Nano hidroxapatita modificada con magnesio y zinc  |
| MgZnBG         | Andamios de vidrio bioactivo recubiertos con MgZnHAp   |
| MeHAp          | Hidroxapatita modificada con metales   |
| MP-AES         | Espectrometría de emisión atómica de plasma por microondas   |
| MTT            | Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5- difeniltetrazol  |
| N <sub>2</sub> | Nitrógeno  |
| Nps            | Nanopartículas   |
| Ob             | Osteoblastos   |
| Os             | Osteocitos   |
| Oc             | Osteoclastos   |
| PU             | Poliuretano  |
| PVA            | Alcohol polivinílico   |
| rpm            | Revoluciones por minuto  |
| RPMI           | Medio de cultivo Roswell Park Memorial Institute   |
| SBF            | Fluido biológico simulado  |
| SEM            | Microscopía electrónica de barrido   |
| TGA            | Análisis termogravimétrico   |
| TRIS           | Tri(hidroximetil)aminometano   |
| Tyr            | Tirosina   |
| Uv-visible     | Ultravioleta-visible   |
| VEGF           | Factor de crecimiento vascular endotelial  |
| VSM            | Magnetización versus campoaplicado   |
| WST-8          | Sal monosódica de 2-(2-metoxi-4-nitrofenil)-3-(4-Nitrofenil)<br>5-(2,4-disulfofenil)-2H-tetrazolio |
| XPS            | Espectroscopia fotoelectrónica de rayos X  |
| ZnHAp          | Nano hidroxapatita modificada con zinc   |
| ZnBG           | Andamios de vidrio bioactivo recubiertos con ZnHAp   |

# Capítulo I

## Introducción y objetivos



## 1.1 Introducción

Es un hecho que la evolución demográfica muestra un envejecimiento progresivo de la población mundial en los últimos siglos; según los demógrafos de Naciones Unidas [1], dentro de unos 5 años es muy probable que haya más personas de más de 60 años que niños de menos de 15. Hoy en día una de cada diez personas tiene 60 años o más, pero en el año 2050 se prevé que será una de cada cinco, y se prevé también que el número de los que tienen al menos 80 años se multiplicará por cinco. La longevidad masiva puede asignarse a la mejora de la atención médica y los altos estándares de higiene, logrados especialmente en los países desarrollados. Sin embargo, el fenómeno tiene implicaciones individuales relacionadas con mantener la calidad de vida dado que este desarrollo no solo influye en la situación económica, sino que también conlleva una alta demanda del sistema de atención médica, en particular la disponibilidad de "partes del cuerpo" para reemplazar tejidos, órganos dañados y no funcionales. Más de cincuenta millones de personas en todo el mundo tienen implantado algún tipo de prótesis y es un hecho bien conocido la utilidad y necesidad de todo tipo de implantes; la sustitución o reparación de tejido dañado por una enfermedad o trauma es un desafío creciente que enfrentan miles de cirujanos todos los días. Los mismos se pueden dividir en cuatro categorías[2]: (I) autoinjertos, (II) aloinjertos, (III) isoinjertos y (IV) xenoinjertos.

Los *autoinjertos* son células, tejidos u órganos que se toman del mismo individuo. Algunos ejemplos son los trasplantes de raíces de cabello o partes de hueso (generalmente cresta ilíaca [2]), donación de sangre autóloga, extracciones de venas, piel que se usa para cubrir afecciones superficiales, entre otros. Los *aloinjertos* son trasplantes tomados de donantes genéticamente no idénticos de la misma especie. Ejemplos de estos son los trasplantes de órganos completos, por ejemplo corazón, hígado o riñón. Pero también pueden transferirse células madre o partes óseas. Un tipo especial de alotrasplante es el llamado alotrasplante de tejido compuesto[3], [4] donde se reemplazan partes de todo el cuerpo (como las extremidades). Para evitar una reacción de rechazo del cuerpo debido a las diferencias genéticas, se administran agentes inmunosupresores. Una excepción a esto son los *isoinjertos* que se toman de un gemelo idéntico. Los *xenoinjertos* [2] se trasplantan de una especie a otra, un ejemplo común de esto es el trasplante de válvula cardíaca porcina. Los diferentes tipos de trasplantes muestran tanto ventajas como inconvenientes. Aunque los autoinjertos son actualmente el estándar de oro [2], [5], [6], la disponibilidad es muy limitada. Los

aloinjertos y los xenoinjertos conllevan el riesgo de infección, rechazo e incompatibilidad. Además, las preocupaciones éticas son un problema importante al aplicar xenoinjertos. Los injertos óseos tienen una doble función: mecánica y biológica. Dependiendo del resultado clínico que se busque, una de las funciones puede ser más importante que la otra. En la interfase injerto óseo-huésped existe una compleja relación donde múltiples factores pueden intervenir en la correcta incorporación del injerto; dentro de ellos destacan la zona de implantación, vascularización del injerto, interfase hueso-huésped, inmunogenética entre donante y huésped, técnicas de conservación, factores locales y sistémicos diversos (hormonales, uso de medicamentos, calidad ósea, enfermedades crónico degenerativas) y las propiedades mecánicas (que dependen del tamaño, la forma y tipo de injerto utilizado). Por lo tanto, un enfoque de solución se basa en el desarrollo y la aplicación de injertos *aloplásticos* que consisten en materiales de ingeniería no biológica como *metales, cerámicas o polímeros*. Un campo principal para la aplicación de injertos aloplásticos es la *ingeniería del tejido óseo (ITO)*. En general, la ingeniería de tejidos combina enfoques de ciencias naturales y de ingeniería para desarrollar construcciones tridimensionales a base de biomateriales naturales y/o artificiales que soportan o reemplazan tejidos u órganos dañados [7]–[9]. Estos conceptos se conocen como biomimética y la aplicación de los mismos para la restauración, reparación, reemplazo, montaje o regeneración de la función del tejido óseo nativo se conoce como ingeniería de tejidos óseo [10], [11].

De manera que antes de diseñar un implante/injerto, se debe determinar cuál es la función que debe cumplir el injerto a utilizar. Los injertos tienen diferentes propiedades:

» **Osteogénesis:** síntesis de hueso nuevo a partir de células derivadas del injerto o del huésped. Requiere células capaces de generar hueso.[5]

» **Osteoinducción:** proceso por el que las células madre mesenquimatosas son reclutadas en la zona receptora y a su alrededor para diferenciarse en condroblastos y osteoblastos. La diferenciación y el reclutamiento son modulados por factores de crecimiento derivados de la matriz del injerto, cuya actividad es estimulada al extraer el mineral óseo. Entre los factores de crecimiento se encuentran las proteínas morfogenéticas óseas. También se liberan factores angiogénicos, como el factor de crecimiento vascular derivado del endotelio. [10]

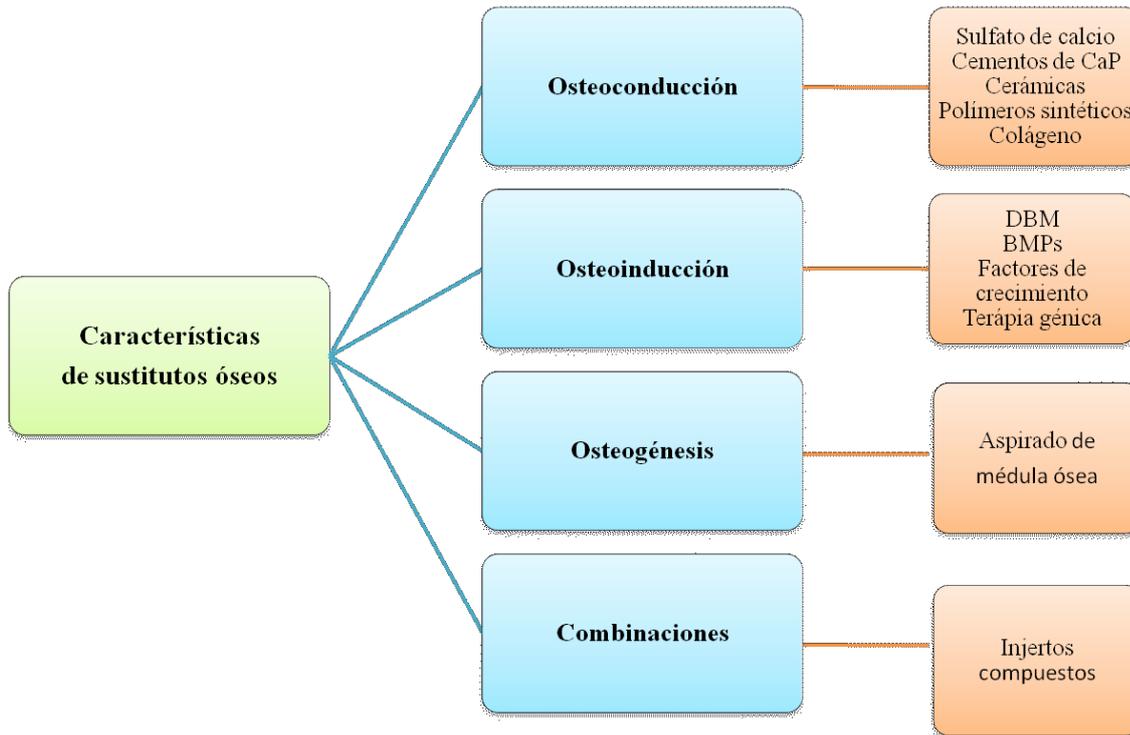
» **Osteoconducción:** proceso en el que tiene lugar un crecimiento tridimensional de capilares, tejido perivascular y células madre mesenquimatosas, desde la zona receptora del huésped hacia el injerto. Este andamiaje permite la formación de hueso nuevo mediante un patrón previsible, determinado por la biología del injerto y el entorno mecánico de la interfase huésped-injerto.

En la *Tabla 1.1* se describen las propiedades de algunos injertos óseos más frecuentes.

| Injerto óseo                            | Células osteogénicas | Factores osteoconductivos | Matriz osteoconductiva | Fuerza biomecánica inicial | Morbilidad en la zona donadora |
|---|----------------------|---------------------------|------------------------|----------------------------|--------------------------------|
| Autólogo hueso esponjoso                | +++                  | ++                        | +++                    | -                          | ++                             |
| Autólogo hueso cortical                 | +                    | +                         | +                      | +++                        | ++                             |
| Aloinjerto hueso congelado              | -                    | +                         | +                      | ++                         | -                              |
| Aloinjerto liofilizado                  | -                    | +                         | +                      | +                          | -                              |
| Cerámicas                               | -                    | -                         | +++                    | +                          | -                              |
| Matriz ósea desmineralizada             | -                    | ++                        | +                      | -                          | -                              |
| Factores de crecimiento osteoinductivos | -                    | +++                       | -                      | -                          | -                              |
| Médula ósea no fraccionada              | ++                   | +                         | -                      | -                          | +                              |
| Células madre mesenquimatosas           | +++                  | -                         | -                      | -                          | +                              |
| Concentrado plaquetario autólogo        | -                    | ++                        | -                      | -                          | -                              |

**Tabla 1.1** . Propiedades de algunos tipos de Injertos óseos [2].

De manera ideal un injerto óseo debe poseer capacidad de osteoconducción, osteoinducción y osteogénesis. Los materiales suelen presentar solo alguna de estas propiedades además de ser biocompatibles y proporcionar estabilidad biomecánica. Por todo esto, la combinación de materiales permite obtener mejores sustitutos óseos. En la *Figura 1.1* se clasifican algunos materiales comúnmente utilizados según sus propiedades.



**Figura 1.1.** Características de sustitutos óseos de acuerdo al tipo de material utilizado [12].

El hueso es un tejido complejo vascularizado lo cual indica que la ITO es un campo interdisciplinario basado en la combinación de tres componentes diferentes: células, moléculas de señalización y un andamio que actúa como una matriz temporal para apoyar la unión, el crecimiento y la proliferación de células. Dada las problemáticas asociadas a los aloinjertos y los xenoinjertos mencionadas anteriormente, la ITO generalmente involucra un injerto aloplástico utilizado como andamio [13], [14]. El andamio imita la matriz extracelular y debe ofrecer propiedades mecánicas adecuadas y porosidad adecuados para permitir el crecimiento y la vascularización del tejido [15]. Idealmente, el material aplicado debe poseer no solo osteoconductividad sino también osteoinductividad y debe ser biodegradable. Una amplia gama de biomateriales está disponible para la aplicación como material de andamios óseos. Como parte del hueso natural, la hidroxiapatita (HA) es un material apropiado y se usa ampliamente en este campo [16]–[20]. También el fosfato tricálcico, que es similar a la HA en términos de composición química, se usa muy a menudo [21], [22]. Otro grupo de biomateriales de interés dentro de este contexto, son los vidrios bioactivos los cuales atraen cada vez más atención debido a su alta bioactividad, potencial osteogénico, biodegradabilidad y efectos angiogénicos [23]–[25]. Sin embargo, los vidrios bioactivos son naturalmente muy frágiles y, por lo tanto, los andamios fabricados a partir de vidrios bioactivos

generalmente no son adecuados para aplicaciones de carga [26]. Para superar este problema, los materiales compuestos se desarrollan para combinar diferentes características de materiales [27]–[29].

Por otro lado en la ITO el uso de nanomateriales a base de HA sintética ha sido ampliamente investigado, dado que permite imitar las propiedades del hueso natural cuya formación involucra nanopartículas de hidroxiapatita [30].

Dado que los aminoácidos pueden inhibir o promover la interacción de biomateriales con el tejido óseo a través de receptores celulares y/o componentes individuales de la matriz extracelular, activando vías de transducción mejorando así la adhesión y biocompatibilidad de células óseas. En particular, se ha estudiado que algunos polipéptidos (tales como Lys-Arg-Ser-Arg) otorgan a la HA mayor adhesividad a los osteoblastos [31]. Por ello, actualmente se investigan estrategias que permitan modificar la superficie de nanomateriales con biomoléculas que actúen como centros de reconocimiento para las células del tejido óseo [32], [33].

## ***1.2 Tejido óseo***

El hueso es un tejido conectivo mineralizado de composición heterogénea y estructura compleja, muy dinámico y vascularizado, en el que se pueden diferenciar los siguientes componentes: una matriz orgánica constituida mayoritariamente por colágeno, una matriz inorgánica formada fundamentalmente por cristales de calcio y fosfato y el componente celular, que representa el 2% de la materia orgánica del hueso y está formada por los osteoblastos (Ob), osteocitos (Os) y osteoclastos (Oc) que son los responsables de la formación, modelización y remodelación ósea respectivamente [34].

Además de proporcionar el soporte estructural para el movimiento y de la función de sostén y protección de este tejido, la matriz ósea representa el principal reservorio de Ca, P y Mg en el organismo.

Desde el punto de vista estructural se pueden diferenciar dos tipos de hueso, En la *Figura 1.2* se muestra un esquema conceptual de la estructura jerárquica del tejido óseo.

- ***Hueso compacto o cortical.*** Constituido por láminas en disposición concéntrica alrededor de un canal o conducto de Havers, formando las denominadas osteonas. Se localiza en las diáfisis de los huesos largos, en la superficie de los planos y en la periferia de los cortos. Representa un 80% de la masa esquelética total.

- **Hueso esponjoso.** También conocido como trabecular o reticular, formado por una malla rígida mineralizada y localizada en el cuerpo vertebral y en las epífisis y metáfisis de los huesos largos. Se caracteriza por presentar un metabolismo muy activo y una alta velocidad de recambio. Representa un 20% de la masa esquelética total.

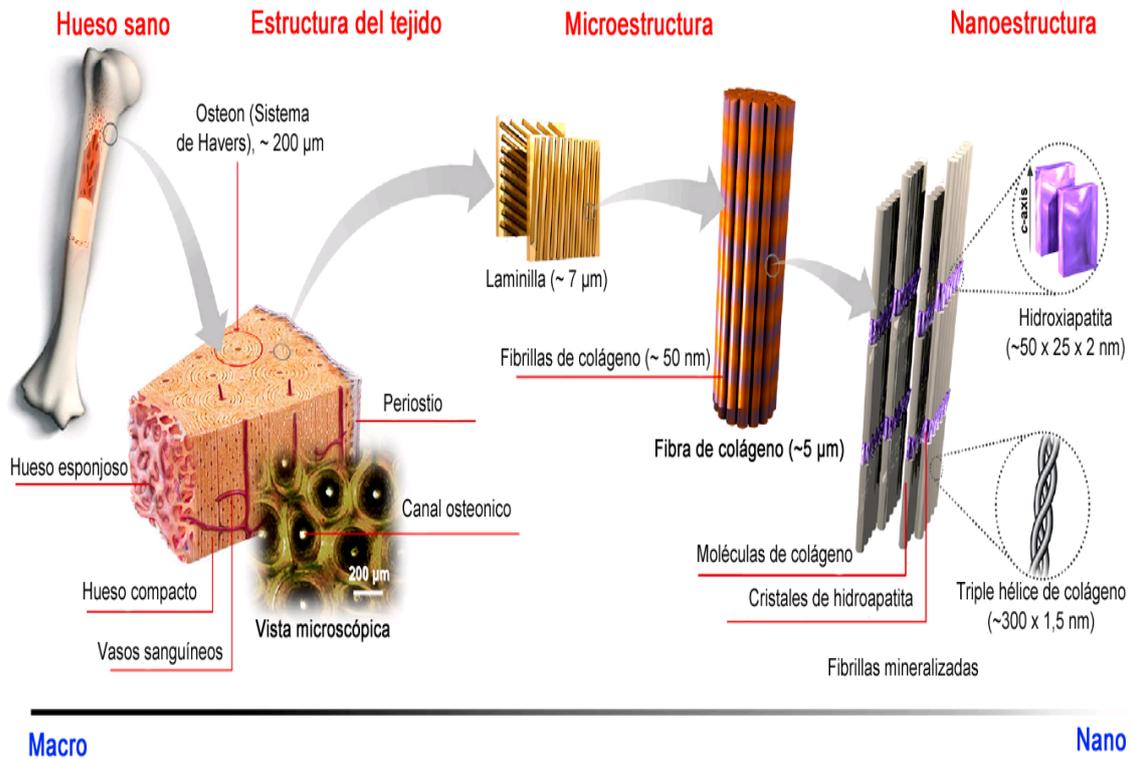


Figura 1.2. Esquema conceptual de la estructura jerárquica del tejido óseo.

La matriz inorgánica del hueso representa del 65% al 70% del volumen total del mismo. Está formada por sales de calcio y fósforo, organizadas en forma de nanocristales de fosfato básico de calcio, HA  $[Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2]$ , dicho material no es homogéneo y puede presentar, en bajas proporciones, otros iones como  $Mg^{+2}$ ,  $Na^+$ ,  $K^{+1}$ ,  $Mn^{+2}$ ,  $F^-$ ,  $CO_3^{-2}$ ,  $Cl^-$ , entre otros, adsorbidos en la superficie de los cristales de HAp, e incluso algunos elementos contaminantes como plomo, cadmio, uranio o estroncio. La presencia de dichos iones se sabe que posee influencia en la velocidad de disolución de las apatitas biológicas.

La matriz orgánica o sustancia osteoide representa un tercio del peso óseo. Está formada fundamentalmente por proteínas, entre las que destaca el colágeno (90%). Esta matriz juega un papel importante en el conjunto del sistema óseo, siendo algo más que un

reservorio de calcio y fósforo, ya que constituye una reserva de proteínas que participan en la regulación de la diferenciación celular y en la integridad y función del tejido óseo [34].

El remodelado óseo es un proceso de reestructuración del hueso existente, que está en constante formación y reabsorción. Este fenómeno equilibrado permite, en condiciones normales, la renovación de un 5-10% del hueso total al año.

En una primera instancia las células encargadas de la reabsorción ósea, Oc reabsorben una cantidad determinada de hueso. Se trata de células multinucleadas, ricas en mitocondrias y vacuolas. Los Oc contienen fosfatasa ácida tartrato resistente (TRAP), que permite la desfosforilación de las proteínas, cuya actividad es aprovechada para su identificación, tanto *in vivo* como *in vitro*. Además, tienen receptores para calcitonina.

En una segunda instancia los osteoblastos (Ob) forman la matriz osteoide y la mineralizan para rellenar la cavidad previamente creada. Los Ob son células de forma poliédrica, con citoplasma basófilo y con un aparato de Golgi y un retículo endoplásmico rugoso de tamaño importante. Proceden de las células mesenquimales pluripotenciales de la médula ósea, endostio, periostio y pericitos perivasculares. Emiten procesos citoplasmáticos hacia la matriz, que comunican con la red de osteocitos y con osteoblastos vecinos. Los Ob sintetizan la matriz orgánica o sustancia osteoide y expresan una enzima característica, la fosfatasa alcalina (ALP), que permite la mineralización. Actualmente, se sabe que: (I) sintetizan las proteínas de la matriz orgánica del hueso, (II) dirigen la disposición de las fibrillas de la matriz extracelular, (III) contribuyen a la mineralización de la sustancia osteoide, (IV) median en la reabsorción llevada a cabo por los osteoclastos a través de la síntesis de citoquinas específicas [34] y (V) sintetizan factores de crecimiento como el VEGF.

En la *Tabla 1.2* se listan los factores locales que participan del remodelado óseo.

|                         | Estimulan formación  | Estimulan reabsorción   | Inhiben reabsorción                            |
|-------------------------|--|---|--|
| Factores de crecimiento | BMP-2 (Proteína morfogénica ósea-2)<br>BMP-4 (Proteína morfogénica ósea-4)<br>BMP-6 (Proteína morfogénica ósea-6) BMP-7 (Proteína morfogénica ósea-7)<br>IGF-I (factor análogo a la insulina I)<br>IGF-II (factor análogo a la insulina II)<br>TGF-β (Factor transformante del crecimiento β)<br>FGF (Factor del crecimiento fibroblástico)<br>PDGF (Factor de crecimiento derivados de las plaquetas)<br>VEGF (Factor de crecimiento vascular endotelial) | TNF (Factor de necrosis tumoral)<br>EGF (Factor de crecimiento epidérmico)<br>PDGF (Factor de crecimiento derivado de las plaquetas)<br>FGF (Factor de crecimiento fibroblástico)<br>M-CSF (Factor estimulante de colonias de macrófagos)<br>GM-CSF (Factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos)   |  |
| Citoquinas              |  | IL-1 (Interleuquina-1)<br>IL-6 (Interleuquina-6)<br>IL-8 (Interleuquina-8)<br>IL-11 (Interleuquina-11)<br>PGE <sub>2</sub> (Prostaglandina E-2)<br>PGE <sub>1</sub> (Prostaglandina E-1)<br>PGG <sub>2</sub> (Prostaglandina G-2)<br>PGI <sub>2</sub> (Prostaglandina I-2)<br>PGH <sub>2</sub> (Prostaglandina H-2) | INF-γ (Interferón γ)<br>IL-4 (Interleuquina-4) |

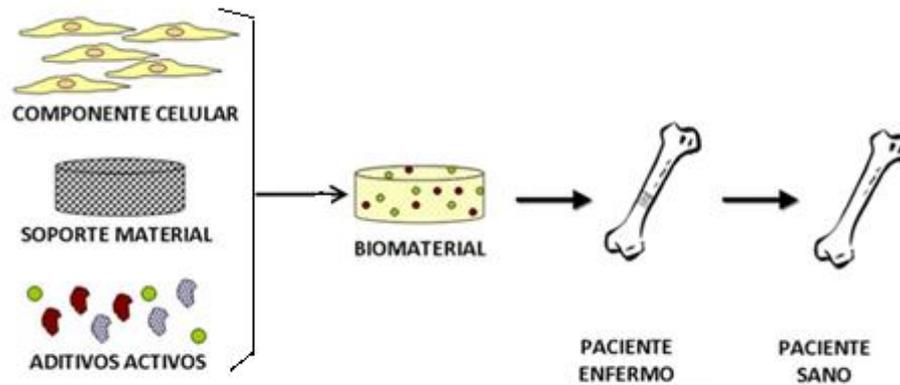
**Tabla 1.2.** Factores locales reguladores del remodelado óseo [34]

A nivel microscópico el remodelado óseo se produce en unidades básicas multicelulares conformadas por Oc, macrófagos, preosteoblastos y Ob conducidos por una serie de factores, tanto generales como locales, que permiten el normal funcionamiento del hueso y el mantenimiento de la masa ósea. El balance entre la reabsorción y la formación óseas está influido por una serie de factores interrelacionados entre sí, como factores genéticos, mecánicos, vasculares, nutricionales, hormonales y locales (ver *Tabla 1.2*). Cuando este proceso se desequilibra aparecen las patologías óseas, bien por exceso (osteopetrosis) o por defecto (osteoporosis) [34].

### ***1.3 Ingeniería tisular ósea***

La reparación ósea de fracturas es un proceso muy complejo y se puede dividir en reparación directa e indirecta [15]. Está influenciado por muchos factores como el tipo de fractura y el hueso, el suministro de sangre, la edad del paciente, entre otros. La curación directa puede diferenciarse entre el contacto y la cicatrización. Si hay un contacto cercano entre las partes de la fractura (hasta 200  $\mu\text{m}$ ), la curación por contacto puede tener lugar. En ella, los osteones cierran la brecha de la fractura y permiten el crecimiento de los osteoblastos, osteoclastos y vasos. Si la brecha está entre 200  $\mu\text{m}$  y 1 mm, se forma tejido óseo y se transforma gradualmente en hueso lamelar. La curación indirecta de fracturas se implementa en varias etapas, durante la etapa I se desarrolla un hematoma de fractura entre los fragmentos de hueso. A esto le sigue una reacción de inflamación, etapa II, donde los macrófagos y los granulocitos extirpan el tejido necrótico. En la etapa III, los fibroblastos comienzan a producir colágeno y se forma tejido de granulación que se endurece en la etapa IV (callo). Bajo la influencia de las proteínas morfogenéticas óseas (BMP), las células osteoprogenitoras se diferencian en osteoblastos que inducen la mineralización del callo y la transformación a tejido óseo. Durante la remodelación en la etapa V, el tejido óseo se convierte en hueso laminar y la estructura ósea original se restaura [15]. Sin embargo, la capacidad de regeneración ósea es limitada, el umbral no regenerativo del hueso se denomina "defecto de tamaño crítico" [35] y se define como "la herida intraósea de menor tamaño en un hueso particular de una especie que no se curará espontáneamente" [35], [36]. Por lo tanto, el tratamiento de defectos óseos más grandes causados por traumatismos o enfermedades requiere la aplicación de injertos óseos que pueden proceder de diferentes orígenes.

A causa de los obstáculos descritos previamente, como escasez de donantes, transmisión de enfermedades, morbilidad del sitio de extracción e incapacidad de los materiales para remodelarse y reaccionar ante condiciones fisiológicas, ninguno de los tratamientos convencionales ha podido suplir todas las necesidades a la hora de tratar problemas relacionados con la pérdida o deterioro del tejido óseo; por lo tanto, se ha hecho necesaria la búsqueda de soluciones alternativas. Para enfrentar estas dificultades, como se mencionó anteriormente, nace la Ingeniería de Tejidos (IT) como una opción para restaurar, mantener o mejorar la función de un órgano o tejido, a partir de la manipulación de las matrices tridimensionales (andamios), las células y los factores de crecimiento/ diferenciación (véase *Figura 1.3*).



**Figura 1.3.** Elementos claves de la Ingeniería de Tejidos.

En la IT confluyen tres elementos fundamentales: las matrices tridimensionales, las moléculas de señalización y los diferentes tipos de células, generando así un ambiente físico-químico apropiado que permita la regeneración del tejido u órgano.

### 1.3.1 *Matrices tridimensionales (3D)*

Las matrices 3D son dispositivos que proporcionan a las células el apoyo necesario para su proliferación y el mantenimiento de sus funciones, sirven como reservorio de agua, nutrientes, citocinas y factores de crecimiento, entre otros [1, 18, 19, 20] y proveen de un ambiente y una arquitectura específicos al tejido [17]. Las células interactúan con estos dispositivos de manera activa en el proceso de regeneración del tejido, lo cual induce la liberación de factores de diferenciación y crecimiento, mientras que sintetizan su propia matriz extracelular (MEC).

Las matrices tridimensionales para la IT deben satisfacer ciertos criterios:

»*Biocompatibilidad.* Esto es, que permitan la integración adecuada implante/tejido sin presentar efectos tóxicos (genotóxicos o citotóxicos) o causar respuesta inmune.

»*Porosidad.* Deben tener poros abiertos e interconectados, necesarios para la difusión de nutrientes y gases, así como para la remoción de desechos metabólicos resultantes de la actividad celular. Esta propiedad es fundamental particularmente en el hueso, debido a sus características metabólicas, ya que se esperan altas tasas de transferencia de masa, incluso cuando se realizan procesos *in vitro* [10].

»*Tamaño del poro.* El tamaño ideal del poro para la IT varía entre 200 y 900  $\mu\text{m}$  [24];

»*Propiedades de la superficie.* Tanto las propiedades químicas como topográficas pueden controlar y afectar la adhesión y proliferación celular [27]. Las propiedades químicas están relacionadas con la habilidad de las células para adherirse al material. Las propiedades topográficas son fundamentales para la osteoconducción, mediante la cual las células osteogénicas migran a la superficie de la matriz tridimensional a través de un coágulo de fibrina, que se establece después de implantado el material.

»*Propiedades mecánicas.* Dependen principalmente del lugar de implantación y de las fuerzas mecánicas a las que se verá expuesto el implante.

»*Biodegradabilidad.* Para la fabricación de las matrices se deben utilizar materiales que tengan tasas de resorción que igualen a las de formación ósea, de tal manera que, para cuando la lesión esté totalmente regenerada, la matriz tridimensional se haya degradado totalmente [2, 9, 10].

En la última década, se ha reportado la fabricación de matrices porosas mediante diferentes técnicas, entre las que se destacan: *gas foaming* [21], *solvent casting/particulate leaching* [22], *rapid prototyping* [3] y *H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> foaming* [23], que permiten el procesamiento de materiales metálicos, cerámicos (hidroxiapatita, fosfato tricálcico) y poliméricos, de origen natural (colágeno, ácido hialurónico, fibrinógeno, quitosano) o sintético (policarbonatos, polímeros de ácido poliláctico (PLA), ácido poliglicólico (PGA) [10, 26].

De acuerdo con lo anterior, el reto de la ingeniería del tejido óseo (ITO) es diseñar matrices tridimensionales capaces de imitar las propiedades naturales del hueso, que puedan proporcionar una ayuda temporal para la regeneración del tejido y balancear la degradación y la pérdida de las propiedades mecánicas con el crecimiento y la formación del hueso nuevo. Si se lograran optimizar estos aspectos, se podría esperar que las alternativas sintéticas simulen de manera precisa las propiedades del hueso natural [25].

### 1.3.2. *Células.*

Las células ideales para la IT deben ser fáciles de obtener y de expandir, conservar el fenotipo y mantener su función. Si bien diversas líneas celulares establecidas han permitido el desarrollo de experiencias en IT, particularmente en el ámbito de la ITO las células osteogénicas ocupan un rol central [37]. El papel fisiológico de mismas, en el adulto es participar en la remodelación ósea y reparación de fracturas. *In vitro*, después de estimulación adecuada, estas células expresan marcadores, tales como fosfatasa alcalina, osteocalcina y forman nódulos calcificados [38].

Las líneas celulares osteoblásticas, tales como las células periósticas, los osteoblastos y las células mesenquimáticas son ampliamente utilizadas para en ensayos *in vitro* de diferenciación, fenómenos de regulación y para la detección de drogas. Varias de las líneas celulares en uso derivan de tumores óseos o son células osteogénicas inmortalizadas. A pesar de que disponibilidad y caracterización óptima *in vitro*, las preocupaciones de seguridad evitan que se usen en ingeniería de tejidos aplicados [39], [40].

Particularmente las células multipotentes resultan de gran interés, ya que se pueden replicar como células indiferenciadas y posteriormente diferenciarse en diferentes linajes de tejidos [26]. En este sentido, las células madre mesenquimales (*mesenchymal stem cells*, MSC), que muestran un fenotipo estable y permanecen en monocapa, han sido utilizadas con mayor frecuencia en ITO, tendón, cartílago y músculo, contando con la ventaja de que pueden obtenerse a partir de tejido adiposo o médula ósea [28, 29].

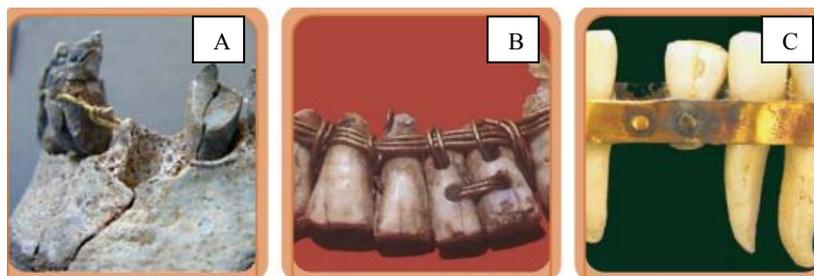
### 1.3.3 *Factores de crecimiento.*

Los nuevos conocimientos sobre el desarrollo embrionario del hueso han llevado al descubrimiento de factores que regulan la diferenciación y la proliferación celular. El uso de técnicas como la hibridización *in situ*, reacción en cadena de la polimerasa de cDNA en tiempo real (RT-PCR) y el uso de los anticuerpos monoclonales, entre otras, ha sido posible identificar varias moléculas de señalización involucradas en la proliferación y diferenciación celular, junto con la morfogénesis del tejido óseo durante la embriogénesis, en el crecimiento postnatal y en la edad adulta. Los factores de crecimiento son moléculas de señalización que pueden actuar como mitógenos promoviendo la proliferación de ciertos tipos de células o como morfógenos induciendo el cambio en el fenotipo de las células blanco.

Los factores de crecimiento más relacionados con la osteogénesis son: las proteínas morfogénicas óseas (*bone morphogenetic protein* BMP), el factor insulinoide de crecimiento (*insulin-like growth factor* IGF), el factor transformante del crecimiento de tipo b (*transforming growth factor beta* TGFb), el factor de crecimiento derivado de plaquetas (*platelet derived growth factor* PDGF) y el factor de crecimiento de fibroblastos (*fibroblast growth factor* FGF) [32].

#### 1.4 Biomateriales

El área de la ciencia que actualmente, se denomina “Ciencia de los Materiales” es muy reciente como disciplina científica; sin embargo, el uso de biomateriales data de tiempos remotos. Es un hecho conocido que los fenicios, etruscos, chinos y aztecas empleaban el oro en cirugías dentales, hace más de 2000 años.



**Figura 1.4.** Retrato de sustitutos dentales en la antigüedad. A) Diente de madera unido entre sí por alambre de oro (origen romano), B) Prótesis dental fenicia (cerca 400-600 a.C), C) Prótesis dental etrusca (cerca 300 a.C) [41]

El término “Biomaterial” designa a aquellos materiales utilizados en la fabricación de dispositivos que interactúan con los sistemas biológicos y que se aplican en diversas especialidades de la medicina.

Dentro de la definición de Biomateriales, están comprendidos materiales de muy diferente naturaleza como los metales, cerámicos, poliméricos (tanto naturales como sintéticos) y los materiales compuestos.

Sobre la base de la duración y la forma de contacto que se establece con el organismo, los Biomateriales suelen clasificarse como de uso temporal o permanente y de localización intra o extracorpórea. Desde el punto de vista de su función, se pueden distinguir los dispositivos destinados al soporte, al diagnóstico o al tratamiento.

Asimismo, algunos materiales contienen drogas y son considerados como medicamentos, se denominan materiales inteligentes a aquellos que son capaces de responder a señales provenientes del medio biológico.

Los requisitos que debe cumplir un biomaterial son:

»Ser *biocompatible*, es decir, debe permitir la integración adecuada implante/tejido sin causar respuesta inmune

»*No ser tóxico*, citotóxico-genotóxico, ni carcinógeno.

»Ser *químicamente estable* (no presentar degradación en el tiempo) e inerte, salvo en el caso de que el objetivo sea alcanzar la biodegradabilidad.

»Tener una *resistencia mecánica* adecuada.

»Tener una *resistencia a la fatiga*, así también como densidad y peso adecuados.

»Ser relativamente *económico*, *reproducible*, *fácil de fabricar* y *procesar* para su producción en gran escala.

Los biomateriales son empleados en distintos contextos y cada uno de ellos asociado a algún tipo de aplicación particular. Dentro de las posibles aplicaciones se encuentran: (I) Para reemplazo de partes dañadas, enfermas o faltantes como reemplazo de la articulación de la cadera, implantes y prótesis dentales, etc. (II) Para asistir en cicatrizaciones y curaciones tales como: suturas quirúrgicas, placas y tornillos para fijación de fracturas óseas, etc. (III) Para mejorar las funciones de algunos órganos como: marcapasos cardíaco, lentes de contacto, etc. (IV) En correcciones estéticas: modificación de labios, pechos, barbilla, etc. (V) Como ayuda para diagnósticos y tratamientos: catéteres, electrodos específicos, drenajes.

Particularmente, los biomateriales utilizados como sustitutos del tejido óseo deben ser esterilizables, bioactivos, económicos y almacenables. Hay muchos materiales disponibles, pero por todo lo antes mencionado, solo algunos de ellos pueden considerarse biomateriales. En la *Tabla 1.3* se detallan algunos biomateriales comúnmente empleados y la función que cumplen.

| <b>Aplicación</b>  | <b>Material Frecuentemente empleado</b>  |
|--|--|
| <b>Sistema óseo</b><br>Reemplazo de articulaciones<br>Placas para la fijación de fracturas<br>Cemento para huesos<br>Reparación de defectos óseos<br>Ligamento y tendones artificiales<br>Implantes dentales | Aleaciones de titanio, acero inoxidable, polietileno.<br>Acero inoxidable, aleación cobalto-cromo<br>Polimetilmetacrilato<br>Hidroxiapatita<br>Teflón®, Dacrón®<br>Titanio, alúmina, fosfato de calcio |
| <b>Sistema Cardiovascular</b><br>Prótesis vasculares<br>Válvulas de corazón<br>Catéter   | Dacrón®, Teflón®, poliuretano<br>Tejido reprocessado, acero inoxidable, Dacrón®<br>Goma de silicona, Teflón, poluretano  |
| <b>Órganos</b><br>Corazón artificial<br>Placas para reparación de la piel<br>Riñón artificial<br>Respiradores artificiales   | Poliuretano<br>Materiales compuesto de silicona-colágeno<br>Celulosa, poliacrilonitrilo<br>Goma de silicona  |
| <b>Sentidos</b><br>Lentes intraoculares<br>Lentes de contacto  | Polimetilmetacrilato, goma de siliconas<br>Silicona-acrilato, hidrogeles   |

**Tabla 1.3.** Materiales frecuentemente utilizados según su aplicación [41].

### ***1.4.1 Materiales implantables a base HA***

Como se mencionó anteriormente, la HA es el componente inorgánico principal de los huesos. Debido a su excelente biocompatibilidad y propiedades bioactivas junta a su composición y similitud biológicas, la hidroxiapatita sintética se encuentra en la vanguardia de las investigaciones en biocerámicas para uso en injertos óseos artificiales. La HA posee características superficiales propias de los grupos funcionales presentes en la superficie, como una alta estabilidad bajo condiciones oxidantes y reductoras, acidez y basicidad, carga superficial, hidrofiliidad y porosidad; además de su fácil método de síntesis y bajo costo de producción.

El uso de nanomateriales, permite proporcionar una solución a problemas imitando las propiedades del hueso natural dado que, como se discutió previamente, su formación

involucra nanopartículas de hidroxiapatita (HAp) nanocristalina de dimensiones entre los 20-80 nm de largo y 2-5,5 nm de espesor [34].

Hasta la fecha, muchas investigaciones de materiales al nivel de la nanofase han puesto de manifiesto su uso potencial para la restauración ósea. Por ejemplo, se ha informado el aumento de la adhesión de Ob en materiales de tamaño nanométrico en comparación con materiales convencionales [31], [33], [43]. La adhesión, proliferación y diferenciación de osteoblastos se ha visto incrementada en estudios *in vitro* con cerámicas cuyos granos poseen dimensiones menor que 100 nm [30]. Por otro lado, estudios *in vivo* han mostrado un aumento de la formación de hueso nuevo cuando se utilizan implantes de metales recubiertos con nanohidroxiapatita en comparación con aquellos cuyas coberturas eran de apatita convencional.

Clínicamente, la HA se utiliza en la forma de polvos, gránulos, revestimientos, bloques densos y porosos, como un vehículo no viral para el reparto de plásmidos de ADN y como constituyente en diversos biocompositos [44], [45]. Sin embargo, la HA del tamaño de micras muestra una mala biorreabsorbilidad y características quebradizas [46],[47]. Otros inconvenientes incluyen limitaciones para controlar las dimensiones de los materiales a sintetizar y el alto grado de cristalinidad que puede resultar en una disminución de la biodegradabilidad cuando se usa HA pura en implantes [48]. Así el estudio de HA de tamaño nanométrico (HAp) se ha vuelto más imperiosa.

Se han publicado varios métodos para la producción de HAp: deposición química húmeda, deposición biomimética, de sol-gel y electrodeposición. Más adelante se discutirá cada método de síntesis por separado.

Numerosas investigaciones se han dedicado a intentar mejorar las propiedades mecánicas de fosfatos de calcio sintéticos. Una de las estrategias es dopar este tipo de materiales con iones metálicos tales como magnesio, zinc y hierro, entre otros. Las trazas de iones pueden tener un efecto importante sobre los parámetros de red, la cristalinidad, la disolución y otras propiedades físicas de la apatita [49]. Se cree que el dopado con iones metálicos tiene un papel significativo en la mejora de las interacciones célula-materiales de fosfato de calcio y en el fortalecimiento de sus propiedades mecánicas. Por otra parte, los minerales y las trazas de elementos metálicos podrían ayudar a acelerar la formación de hueso y la resorción en las células óseas *in vivo* [50] e *in vitro* [51]. También se ha informado que ciertos iones metálicos tales como  $Zn^{+2}$ ,  $Ag^{+1}$  entre otros, pueden penetrar en bacterias, inactivar su sistema

enzimático y generar peróxido de hidrógeno, lo que puede conducir a la muerte de bacterias e inclusive hongos [52].

Estudios recientes han demostrado que los moldes cerámicos de hidroxiapatita con nanopartículas de magnetita incorporada [53], [54] y microesferas de HA dopadas con iones  $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$  [55] resultaron ser biocompatibles y no presentaron efectos negativos asociados con la presencia de Fe o con el uso de campos magnéticos [54]. Estas ventajas han impulsado el desarrollo de estos materiales como una alternativa a la HAP sintética utilizados en tratamientos clínicos de regeneración de huesos [56].

A pesar de los efectos tóxicos de los óxidos de Fe, este elemento participa en la mineralización de osteoblastos y existe una asociación entre el metabolismo del Fe y la proliferación de células óseas en procesos de regeneración de este tejido. Por ello, el dopado con iones  $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$  de materiales basados en la hidroxiapatita puede resultar una alternativa interesante en el diseño de nanomateriales magnéticos biocompatibles.

Teniendo en cuenta los sustitutos catiónicos, el ion de  $\text{Mg}^{2+}$  es el más abundante en la HA biológica, alcanzando un valor alrededor del 6% en moles, en el cartílago y el tejido óseo durante las fases iniciales de la osteogénesis, mientras que tiende a desaparecer cuando el hueso está maduro [57].

Los cambios en los parámetros de red de la HA que se producen por la sustitución catiónica de  $\text{Ca}^{2+}$  por  $\text{Mg}^{2+}$  tienen un impacto directo en las propiedades de MgHAp [58]–[60]. Si bien estos cambios no modifican la solubilidad y biodegradabilidad en fluidos fisiológicos, comparado con la HA no sustituida, favorecen su conversión final en fosfato  $\beta$  sustituido con Mg [61]. La MgHAp exhibe una mayor osteoconductividad a lo largo del tiempo y una mayor reabsorción del material, en comparación con la HA sin sustituir [59]. Además, el magnesio inhibe la cristalización de la apatita y desestabiliza la estructura apatítica.

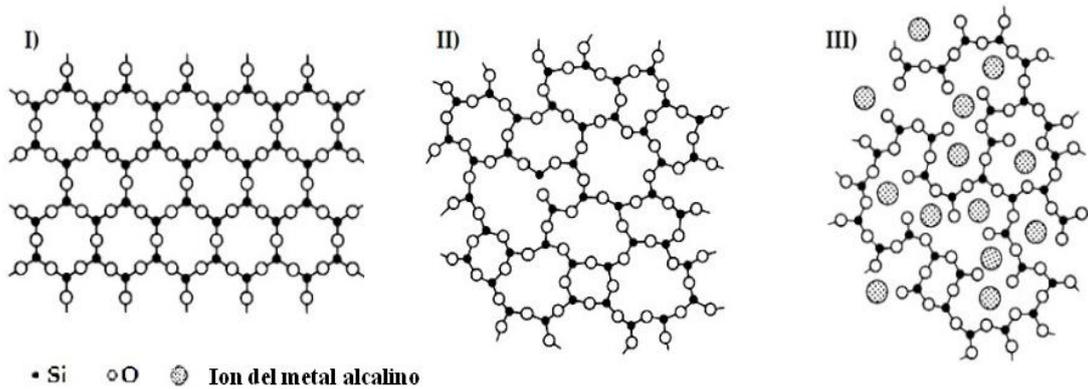
Otro ion interesante que se puede encontrar en todos los tejidos biológicos es el zinc. El hueso contiene la mayor parte del total de Zn en el cuerpo [62]. El Zn es importante para el crecimiento y desarrollo normal del sistema esquelético, y su deficiencia se asocia con una disminución de la densidad ósea [63]. El zinc inhibe la diferenciación de los Oc y promueve la actividad de los Ob.

Por otro lado, la síntesis de los nanomateriales asociados a péptidos ofrecen la capacidad de controlar distribuciones de tamaño, morfologías, y proporcionar una gama de funcionalidades superficiales. En particular, algunos polipéptidos (tales como Lys-

Arg-Ser-Arg) otorgan a la HAp mayor adhesividad a los Ob, lo que lleva a la integración ósea de implantes [31]. Los péptidos proporcionan un valioso recurso para la ciencia de los materiales por la incorporación de especificidad biológica y multifuncionalidad en los nanomateriales inorgánicos o a base de carbono, al tiempo que permite controlar las propiedades y estructuras de las Nps. Una variedad de péptidos de diferente longitud y secuencia de aminoácidos se han utilizado para controlar la síntesis de muchos materiales diferentes tales como: metales, óxidos metálicos, sulfuros metálicos y materiales híbridos bimetálicos. Esto permite adaptar las propiedades de nanopartículas y estructuras para impartir funcionalidad a la superficie de las mismas [17], [32]. Estas cualidades se originan en la capacidad de los péptidos de interactuar con los nanomateriales través de sus grupos amino primarios y carboxílicos y /o su estructura secundaria. Sin embargo, el efecto de las estructuras primaria y secundaria del péptido en las interacciones péptido-nanomateriales continúa siendo un tema de investigación actual. Como resultado, el comportamiento de los péptidos en presencia de nanomateriales requiere un estudio separado y la consideración individual de cada péptido. Debido a esto, la eficacia de los complejos de péptido-nanopartículas es a menudo impredecible [64].

#### ***1.4.2 Materiales implantables a base de Vidrios bioactivos***

En general, un vidrio se define como material no cristalino, frágil e inorgánico. Su estado se puede caracterizar como líquido congelado y sobreenfriado con estructura amorfa y comportamiento isotrópico. Los óxidos metálicos y no metálicos específicos forman una estructura tridimensional. Los llamados formadores de red proporcionan la estructura esquelética, p. Ej.  $\text{SiO}_2$ ,  $\text{B}_2\text{O}_3$  o  $\text{P}_2\text{O}_5$ . Basada en la teoría de Zachariasen [65] y Warren [66], la unidad estructural de vidrio de silicato consiste en tetraedros de  $\text{SiO}_4$  que exhiben una estructura distorsionada debido a distancias y ángulos de enlace irregulares. En comparación, un cristal de cuarzo posee una estructura regular con un orden de corto y largo alcance (*Figura 1.5*). Los modificadores de red (por ejemplo,  $\text{CaO}$ ,  $\text{K}_2\text{O}$  o  $\text{Na}_2\text{O}$ ), como su nombre lo indica, modifican la red, cambian su estructura y propiedades mediante inclusiones en la estructura del tetraedro de  $\text{SiO}_4$  [67]. Para ello, los enlaces de oxígeno que forman el puente  $-\text{Si} - \text{O} - \text{Si}-$  se rompen y el O forma enlaces iónicos con los cationes alcalinos presentes (por ejemplo,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{K}^+$  o  $\text{Na}^+$ ).



**Figura 1.5.** Modelo de estructura bidimensional de (I) cristal de cuarzo, (II) vidrio de silicato y (III) vidrio de silicato alcalino con red interrumpida [68].

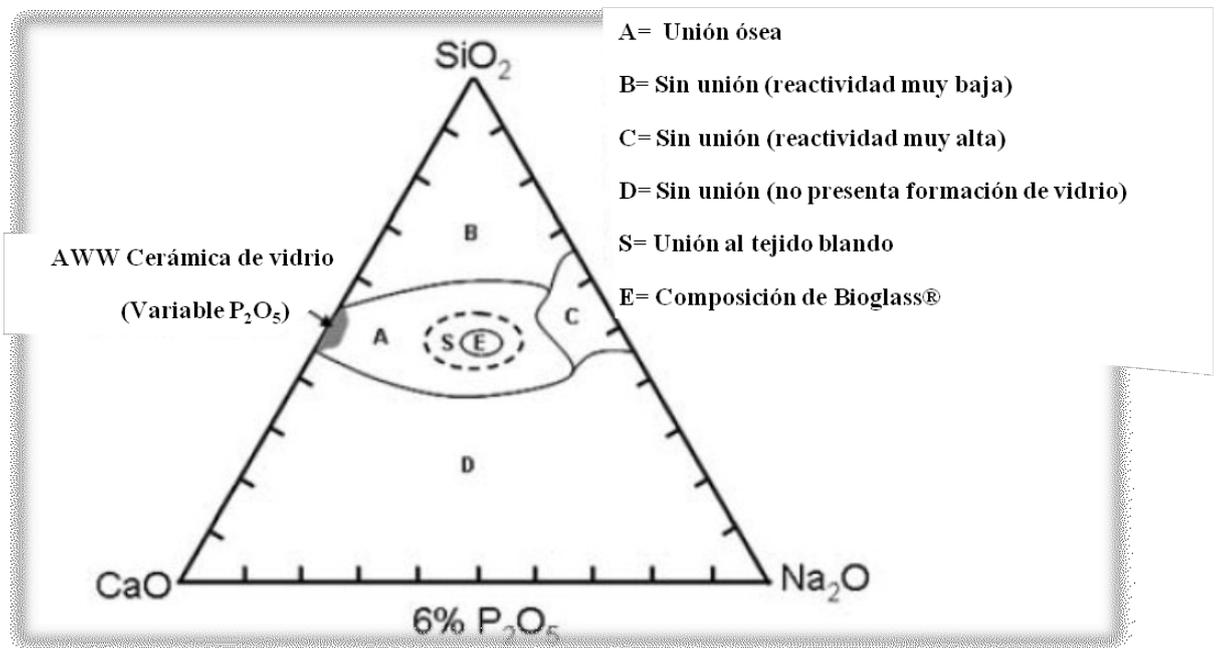
Las propiedades de un vidrio dependen predominantemente de la composición; los vidrios bioactivos en general muestran la capacidad de unión interfacial entre el material y el tejido por una respuesta biológica específica que resulta en la formación de una capa de hidroxiapatita biológicamente activa en la superficie del implante [69], [70]. En la actualidad, existen varios tipos de vidrios bioactivos, como los vidrios a base de fosfato y borato o los silicatos convencionales, como el conocido 45S5 Bioglass<sup>®</sup> en el que se enfoca esta sección.

El 45S5 Bioglass<sup>®</sup> fue obtenido por grupo de Larry L. Hench en 1969 [71] y se lo usa para aplicaciones clínicas desde 1985 [72]. Este vidrio, con una composición de 45% de SiO<sub>2</sub>, 24,5% de CaO, 24,5% de Na<sub>2</sub>O y 6% de P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> (en% en peso), se produce mediante una ruta de síntesis derivada de la fusión convencional. En este método, la sílice, el óxido de calcio, el óxido de sodio y el pentóxido de fósforo se mezclan homogéneamente y se funden en un crisol de platino a 1400 °C. Para obtener un bloque de vidrio sólido, la fusión de vidrio se moldea en moldes termoestables de grafito. Para la producción de polvo de *Bioglass*<sup>®</sup>, el vidrio líquido se enfría en agua, lo que da lugar a la llamada frita de vidrio que se puede moler hasta un tamaño de partícula deseado utilizando un molino. Originalmente, se eligió la composición de *Bioglass*<sup>®</sup> por estar cerca de un eutéctico ternario, lo que facilita su uso para fundir [21], [71]. En comparación con la composición del vidrio convencional, el *Bioglass*<sup>®</sup> exhibe tres diferencias principales [73]: (I) menor cantidad de SiO<sub>2</sub> (<60% en moles), (II) alto contenido de CaO y Na<sub>2</sub>O y (III) alta proporción de fosfato y calcio. La *Figura 1.6* muestra el diagrama de fase ternario de SiO<sub>2</sub>-CaO-Na<sub>2</sub>O en el que se basa la

composición de 45S5 Bioglass®. Por lo tanto, SiO<sub>2</sub> actúa como red anterior, la estructura de los tetraedros de SiO<sub>4</sub> se ve interrumpida por la presencia de iones Ca<sup>+2</sup> y Na<sup>+</sup>, que actúan como modificadores de la red, lo que produce oxígenos que no participan de enlaces Si-O-Si dentro de la estructura del vidrio. La alta proporción de calcio y fosfato promueve su alta bioactividad.

La estructura del vidrio puede evaluarse a partir de la composición del mismo utilizando el concepto propuesto por Bruder *et al.* [72] de conectividad de red, que describe el número de puentes de oxígeno por elemento de formación de red. La conectividad de la red se puede calcular teniendo en cuenta la relación molar de cada componente. En el caso de Bioglass®, Si es el elemento de formación de red que exhibe una conectividad de red de 2,1 [72].

La característica especial de la composición 45S5 Bioglass® es su capacidad para unirse a tejidos blandos y duros (*Figura 1.6*). Este fenómeno se denomina *bioactividad* y describe la capacidad de un material para interactuar con el tejido vivo, lo que resulta en una fuerte interfaz entre el implante y el hueso.



**Figura 1.6.** Diagrama donde se muestra relación entre la composición del vidrio y su bioactividad [71].

Los biomateriales se pueden dividir en tres categorías según su comportamiento biológico: bioinerte, bioactivo y reabsorbible [23], [29]. Un material se define como *bioinerte* si no es tóxico y no interactúa con el tejido circundante, sino que está encapsulado por tejido fibroso. Ejemplos de cerámicas bioinertes son Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> o ZrO<sub>2</sub>. Si

un material se disuelve completamente y es reemplazado por tejido nuevo, es *reabsorbible* (por ejemplo,  $\beta$ -TCP). Como ya se mencionó, Bioglass<sup>®</sup> está clasificado como material *bioactivo*. El nivel de bioactividad se relaciona con el tiempo empleado en días ( $t_{0,5}$ ) para unir más del 50% de la interfaz al hueso [74]. El índice de bioactividad IB se puede calcular como:

$$IB = 100/t_{0,5} \quad (\text{Ec 1})$$

Los materiales, que muestran valores de  $IB > 8$ , son materiales bioactivos de clase A (como Bioglass<sup>®</sup>) y pueden unirse al tejido blando y duro, mientras que los materiales de clase B muestran IB por debajo de 8 pero  $> 0$  y solo pueden unirse al tejido duro.

Como se informó en la literatura anterior sobre Bioglass<sup>®</sup>, el mecanismo de unión ósea se habilita mediante la formación de una capa de hidroxiapatita en la superficie del material y se divide en once etapas [23]. Las etapas I-V son reacciones químicas que también pueden simularse *in vitro* mediante la inmersión en fluido biológico simulado (SBF). Las etapas VI-XI requieren implantación en el cuerpo humano, ya que las células y las entidades biológicas de la matriz extracelular están involucradas en los procesos [23], [75]

En contacto con soluciones acuosas (como fluidos corporales), la red Bioglass<sup>®</sup> comienza a disolverse, los cambios químicos y estructurales ocurren en función del tiempo. Debido a la falta de oxígeno en el puente, la red de sílice en Bioglass<sup>®</sup> está menos reticulada en comparación con el vidrio convencional, lo que lleva a una estructura más abierta que facilita la penetración de las moléculas de agua en la red de vidrio [23]. Las etapas I y II del mecanismo de bioactividad se controlan por difusión, donde los iones  $\text{Na}^+$  y  $\text{Ca}^{2+}$ , que forman parte de la estructura de Bioglass<sup>®</sup>, se intercambian rápidamente con  $\text{H}^+$  o  $\text{H}_3\text{O}^+$  de la solución acuosa, los grupos de sílice se hidrolizan, formando grupos silanol (Si-OH) sobre la superficie del vidrio. Durante la etapa III, tiene lugar la policondensación de los grupos Si-OH, lo que da como resultado la formación de una capa rica en sílice ( $\text{SiO}_2$ ) en la superficie. En la etapa IV,  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{PO}_4^{3-}$  migran a la capa rica en sílice, formando una capa de fosfato de calcio amorfo que se cristaliza durante la etapa V debido a la incorporación de iones solubles de  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{PO}_4^{3-}$ ,  $\text{OH}^-$  y  $\text{CO}_3^{2-}$  de la solución que resulta en una capa de hidroxiapatita carbonatada (HCA), estructuralmente similar a la fase mineral en el hueso. El proceso biológico de la unión ósea comienza en la etapa VI cuando las entidades biológicas se adsorben. Los

macrófagos se activan (etapa VII) y las células madre se adhieren a la superficie bioactiva (etapa VIII). En el estadio IX, las células madre se diferencian en osteoblastos que comienzan a generar la matriz ósea orgánica (estadio X). Durante la etapa final XI, la matriz orgánica se mineraliza por la incorporación de fosfato de calcio, formando una estructura ósea natural. Además, se informa que los productos de disolución de 45S5 Bioglass® estimulan la osteogénesis y la angiogénesis por la expresión aumentada de genes en las células que conducen a la formación de hueso y la vascularización [24]. Los productos de disolución son, por lo tanto, factores clave que influyen en el comportamiento de diferenciación y proliferación de las células osteoblásticas y aumentan la secreción de factores de crecimiento relevantes, por ejemplo VEGF para promover la angiogénesis [24].

Por primera vez en 2006, Chen *et al.* [26] produjeron andamios basados en Bioglass 45S5® con una estructura porosa altamente interconectada mediante la técnica de replicación de espuma. Como Bioglass® ofrece excelente bioactividad, alta biocompatibilidad y biodegradabilidad controlable, es un material de andamio prometedor para aplicaciones de ingeniería de tejidos. La técnica de réplica de espuma requiere una plantilla de sacrificio (por ejemplo, espuma de poliuretano) que esté recubierta por una suspensión de Bioglass®, dando como resultado cuerpos porosos. Al controlar las dimensiones de la estructura de la plantilla, se puede influir en la geometría final del andamio. Durante un proceso de sinterización posterior (dos etapas, 400 ° C y 1050 ° C), el material de la plantilla se quema y la microestructura de vidrio bioactivo se densifica. El tratamiento térmico del polvo 45S5 Bioglass® conlleva una transformación de fase que muestra la nucleación y el crecimiento de una fase cristalina ( $\text{Na}_2\text{Ca}_2\text{Si}_3\text{O}_9$ ) [25], [67] que no solo influye en el proceso de densificación, sino que también puede afectar el comportamiento bioactivo [25], [26]. Sin embargo, la cristalinidad puede ser controlada por la temperatura de sinterización y la velocidad de calentamiento. Además, como los andamios basados en Bioglass® 45S5 ofrecen un área de superficie alta debido a la alta porosidad, la cinética de bioactividad puede diferir de la de un material grueso y denso. Chen *et al.* [26] describieron la transición de  $\text{Na}_2\text{Ca}_2\text{Si}_3\text{O}_9$  a una fase amorfa bioactiva y biodegradable después de la inmersión en SBF durante 28 días. Además, la fase cristalina mecánicamente fuerte ofrece un soporte mecánico temporal. Por lo tanto, los andamios basados en Bioglass® 45S5 tienen la ventaja de combinar la competencia mecánica suficiente, la bioactividad y la biodegradabilidad para futuras investigaciones en IT.

### **1.5 Objetivos**

En el contexto del conocimiento actual del tema, el aporte original de las investigaciones a realizar propone el desarrollo de andamios tridimensionales de biovidrio 45S5<sup>®</sup> recubierto con nanomateriales compuestos basados en la nano hidroxiapatita modificada con metales (bi y trivalentes), y/o hidroxiapatita recubierta con biomoléculas capaces de producir la nucleación y crecimiento de material óseo en implantes ortopédicos con potenciales aplicaciones en la Ingeniería de Tejido Óseo (ITO).

Para ello, se propone desarrollar investigaciones comenzando por la síntesis de nanomateriales en base a nanopartículas de HA modificada con los iones metálicos  $Fe^{+2}/Fe^{+3}$ ,  $Mg^{+2}$  y  $Zn^{+2}$  o modificadas superficialmente de forma de anclar colorantes fluorescentes y aminoácidos que aporten mayor especificidad a las nanopartículas en estudios biológicos. Los nanomateriales se caracterizarán exhaustivamente para evaluar cambios en su composición y propiedades fisicoquímicas y se evaluará su toxicidad y biocompatibilidad.

Algunos de estos nanomateriales se utilizarán como cobertura de andamios 3D porosos a base de vidrio bioactivo 45S5<sup>®</sup> con el fin de mejorar sus propiedades morfológicas y osteoconductoras. El potencial de los nuevos andamios en aplicaciones de ITO se evaluará en términos de su morfología, bioactividad, biodegradabilidad, biocompatibilidad celular y capacidad osteoconductoras.

#### **Objetivos específicos a desarrollar.**

Los objetivos propuestos involucran los siguientes estudios:

- » Desarrollar y optimizar protocolos para la síntesis de nanopartículas de HA mediante métodos húmedos en fase acuosa. Adaptación de estos métodos para la incorporación de iones metálicos ( $Fe^{2+}/Fe^{3+}$ ,  $Zn^{+2}$  y  $Mg^{+2}$ ).
- » Introducir grupos funcionales sobre la superficie de las nanopartículas de HA capaces de anclar diferentes colorantes fluorescentes y biomoléculas.
- » Caracterizar los nanocompositos obtenidos.
- » Evaluar la biocompatibilidad de los compositos en diferentes líneas celulares.
- » Desarrollar la síntesis de andamios a base de biovidrio 45S5<sup>®</sup> seguido del recubrimiento de los mismos con las nanopartículas de hidroxiapatita.

» Evaluar la morfología, la bioactividad, la biocompatibilidad y la osteoconductividad *in vitro* de los sustratos recubiertos por los nanocompositos.

## Referencias

- [1] [Online]. Available:  
[https://population.un.org/wpp/Publications/Files/WPP2019\\_PressRelease\\_ES.pdf](https://population.un.org/wpp/Publications/Files/WPP2019_PressRelease_ES.pdf)  
 . [Accessed: 30-Jan-2020].
- [2] S. N. Khan, F. P. Cammisa, H. S. Sandhu, A. D. Diwan, F. P. Girardi, and J. M. Lane, “The biology of bone grafting.,” *J. Am. Acad. Orthop. Surg.*, vol. 13, no. 1, pp. 77–86, 2005.
- [3] F. Petit, A. B. Minns, J.-M. Dubernard, S. Hettiaratchy, and W. P. A. Lee, “Composite Tissue Allotransplantation and Reconstructive Surgery,” *Ann. Surg.*, vol. 237, no. 1, pp. 19–25, 2003.
- [4] K. V. Ravindra, S. Wu, M. McKinney, H. Xu, and S. T. Ildstad, “Composite Tissue Allotransplantation: Current Challenges,” *Transplant. Proc.*, vol. 41, no. 9, pp. 3519–3528, 2009.
- [5] P. G. Whang and J. C. Wang, “Bone graft substitutes for spinal fusion,” *Spine J.*, vol. 3, no. 2, pp. 155–165, 2003.
- [6] S. D. Boden, “The biology of posterolateral lumbar spinal fusion,” *Orthop. Clin. North Am.*, vol. 29, no. 4, pp. 603–619, 1998.
- [7] U. Meyer, U. Joos, and H. P. Wiesmann, “Biological and biophysical principles in extracorporal bone tissue engineering. Part I,” *Int. J. Oral Maxillofac. Surg.*, vol. 33, no. 4, pp. 325–332, 2004.
- [8] R. Langer and J. P. Vacanti, “- 1. ARTICLES Tissue Engineering,” *Science (80-)*, vol. 260, pp. 920–926, 1993.
- [9] T. Blunk et al., “Differential Effects of Growth Factors on Tissue-Engineered Cartilage,” *Tissue Eng.*, vol. 8, no. 1, pp. 73–84, 2002.
- [10] S. Bose, M. Roy, and A. Bandyopadhyay, “Recent advances in bone tissue engineering scaffolds,” *Trends Biotechnol.*, vol. 30, no. 10, pp. 546–554, 2012.
- [11] H. P. Wiesmann, U. Joos, and U. Meyer, “Biological and biophysical in extracorporal bone tissue engineering Part II,” *Int. J. Oral Maxillofac. Surg.*, vol. 33, no. 6, pp. 523–530, 2004.

- [12] Ó. Fernández Hernández, “Sustitutivos óseos,” *Monogr. Actual. la Soc. Española Med. y Cirugía del Pie y Tobillo*, vol. 9, no. 1, May 2017.
- [13] P. Costantino, D. Hiltzik, S. Govindaraj, and J. Moche, “Bone healing and bone substitutes,” *Facial Plast Surg*, vol. 18, no. 1, pp. 13–26, 2002.
- [14] B. L. Eppley, W. S. Pietrzak, and M. W. Blanton, “Allograft and alloplastic bone substitutes: A review of science and technology for the craniomaxillofacial surgeon,” *J. Craniofac. Surg.*, vol. 16, no. 6, pp. 981–989, 2005.
- [15] D. W. Hutmacher and A. J. Garcia, “Scaffold-based bone engineering by using genetically modified cells,” *Gene*, vol. 347, no. 1, pp. 1–10, 2005.
- [16] J. R. Woodard *et al.*, “The mechanical properties and osteoconductivity of hydroxyapatite bone scaffolds with multi-scale porosity,” *Biomaterials*, vol. 28, no. 1, pp. 45–54, 2007.
- [17] K. Lin *et al.*, “Biomimetic hydroxyapatite porous microspheres with co-substituted essential trace elements: Surfactant-free hydrothermal synthesis, enhanced degradation and drug release,” *J. Mater. Chem.*, vol. 21, no. 41, pp. 16558–16565, 2011.
- [18] S. Deville, E. Saiz, and A. P. Tomsia, “Freeze casting of hydroxyapatite scaffolds for bone tissue engineering,” *Biomaterials*, vol. 27, no. 32, pp. 5480–5489, 2006.
- [19] S. C. Cox, P. Jamshidi, L. M. Grover, and K. K. Mallick, “Preparation and characterisation of nanophase Sr, Mg, and Zn substituted hydroxyapatite by aqueous precipitation,” *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 35, no. 1, pp. 106–114, 2014.
- [20] J. M. Oliveira *et al.*, “Macroporous hydroxyapatite scaffolds for bone tissue engineering applications : Physicochemical characterization and assessment of rat bone marrow stromal cell viability,” 2008.
- [21] J. Sohier, G. Daculsi, S. Sourice, K. De Groot, and P. Layrolle, “Porous beta tricalcium phosphate scaffolds used as a BMP-2 delivery system for bone tissue engineering,” *J. Biomed. Mater. Res. - Part A*, vol. 92, no. 3, pp. 1105–1114, 2010.
- [22] S. Tarafder, N. M. Davies, A. Bandyopadhyay, and S. Bose, “3D printed tricalcium phosphate bone tissue engineering scaffolds: Effect of SrO and MgO doping on in vivo osteogenesis in a rat distal femoral defect model,” *Biomater. Sci.*, vol. 1, no. 12, pp. 1250–1259, 2013.
- [23] J. Hum and A. R. Boccaccini, “Bioactive glasses as carriers for bioactive molecules and therapeutic drugs: A review,” *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, vol. 23,

- no. 10, pp. 2317–2333, 2012.
- [24] V.-R. María, R. C. Victoria, and S. Antonio J., “Glasses with Medical Applications,” *Eur. J. Inorg. Chem.*, vol. 2003, no. 6, pp. 1029–1042, 2003.
- [25] S. Oh, N. Oh, M. Appleford, and J. L. Ong, “Bioceramics for Tissue Engineering Applications – A Review,” *Am. J. Biochem. Biotechnol.*, vol. 2, no. 2, pp. 49–56, 2006.
- [26] Q. Z. Chen, I. D. Thompson, and A. R. Boccaccini, “45S5 Bioglass®-derived glass-ceramic scaffolds for bone tissue engineering,” *Biomaterials*, vol. 27, no. 11, pp. 2414–2425, 2006.
- [27] D. Mohamad Yunos, O. Bretcanu, and A. R. Boccaccini, “Polymer-bioceramic composites for tissue engineering scaffolds,” *J. Mater. Sci.*, vol. 43, no. 13, pp. 4433–4442, 2008.
- [28] Q. Z. Chen, K. Rezwani, D. Armitage, S. N. Nazhat, and A. R. Boccaccini, “The surface functionalization of 45S5 Bioglass®-based glass-ceramic scaffolds and its impact on bioactivity,” *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, vol. 17, no. 11, pp. 979–987, 2006.
- [29] R. Yunus Basha, S. K. Sampath, and M. Doble, “Design of biocomposite materials for bone tissue regeneration,” *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 57, pp. 452–463, 2015.
- [30] L. Zhang and T. J. Webster, “Nanotechnology and nanomaterials: Promises for improved tissue regeneration,” *Nano Today*, vol. 4, no. 1, pp. 66–80, 2009.
- [31] M. Nelson, G. Balasundaram, and T. J. Webster, “Increased osteoblast adhesion on nanoparticulate crystalline hydroxyapatite functionalized with KRSR,” *Int. J. Nanomedicine*, vol. 1, no. 3, pp. 339–349, 2006.
- [32] G. M. Cunniffe, F. J. O’Brien, S. Partap, T. J. Levingstone, K. T. Stanton, and G. R. Dickson, “The synthesis and characterization of nanophase hydroxyapatite using a novel dispersant-aided precipitation method,” *J. Biomed. Mater. Res. - Part A*, vol. 95, no. 4, pp. 1142–1149, 2010.
- [33] H. Liu *et al.*, “Biomaterials Composite scaffolds of nano-hydroxyapatite and silk fibroin enhance mesenchymal stem cell-based bone regeneration via the interleukin 1 alpha autocrine / paracrine signaling loop,” *Biomaterials*, vol. 49, pp. 103–112, 2015.
- [34] I. Fernandez-Tresguerres Hernandez-Gil, M. A. Alobera Gracia, M. Del Canto Pingarron, and L. Blanco Jerez, “Bases fisiológicas de la regeneración ósea:

- Histología y fisiología del tejido óseo.” *Med. Oral Patol. Oral Cir. Bucal*, vol. 11, no. 1, pp. 47–51, 2006.
- [35] J. S. Sun, S. Y. H. Wu, and F. H. Lin, “The role of muscle-derived stem cells in bone tissue engineering,” *Biomaterials*, vol. 26, no. 18, pp. 3953–3960, 2005.
- [36] J. M. Orban, K. G. Marra, and J. O. Hollinger, “Composition Options for Tissue-Engineered Bone,” *Tissue Eng.*, vol. 8, no. 4, pp. 529–539, 2002.
- [37] U. Kneser, D. J. Schaefer, B. Munder, C. Klemm, C. Andree, and G. B. Stark, “Tissue engineering of bone,” *Minimally Invasive Therapy and Allied Technologies*, vol. 11, no. 3, pp. 107–116, 2002.
- [38] G. S. Stein, J. B. Lian, and T. A. Owen, “Relationship of cell growth to the regulation of tissue-specific gene expression during osteoblast differentiation,” *FASEB Journal*, vol. 4, no. 13, pp. 3111–3123, 1990.
- [39] S. R. Winn, G. Randolph, H. Uludag, S. C. Wong, G. A. Hair, and J. O. Hollinger, “Establishing an Immortalized Human Osteoprecursor Cell Line: OPC1,” *J. Bone Miner. Res.*, vol. 14, no. 10, pp. 1721–1733, Oct. 1999.
- [40] J. O. Hollinger and S. R. Winn, “Tissue engineering of bone in the craniofacial complex,” in *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1999, vol. 875, pp. 379–385.
- [41] M. De Educación, A. E. Sileoni, L. María, R. Almandoz, and I. R. Díaz, “Autoridades Presidente de la Nación Dra. Cristina Fernández de Kirchner.”
- [42] B. Li, B. Guo, H. Fan, and X. Zhang, “Preparation of nano-hydroxyapatite particles with different morphology and their response to highly malignant melanoma cells in vitro,” *Appl. Surf. Sci.*, vol. 255, no. 2, pp. 357–360, 2008.
- [43] E. Cañas, M. Vicent, E. Bannier, P. Carpio, M. J. Orts, and E. Sánchez, “Effect of particle size on processing of bioactive glass powder for atmospheric plasma spraying,” *J. Eur. Ceram. Soc.*, vol. 36, no. 3, pp. 837–845, 2016.
- [44] Q. Fu, M. N. Rahaman, F. Dogan, and B. S. Bal, “Freeze-cast hydroxyapatite scaffolds for bone tissue engineering applications,” *Biomed. Mater.*, vol. 3, no. 2, Jun. 2008.
- [45] C. E. Pedraza, D. C. Bassett, M. D. McKee, V. Nelea, U. Gbureck, and J. E. Barralet, “The importance of particle size and DNA condensation salt for calcium phosphate nanoparticle transfection,” *Biomaterials*, vol. 29, no. 23, pp. 3384–3392, Aug. 2008.
- [46] B. Cengiz, Y. Gokce, N. Yildiz, Z. Aktas, and A. Calimli, “Synthesis and

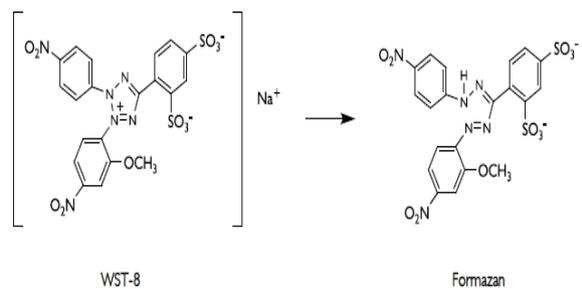
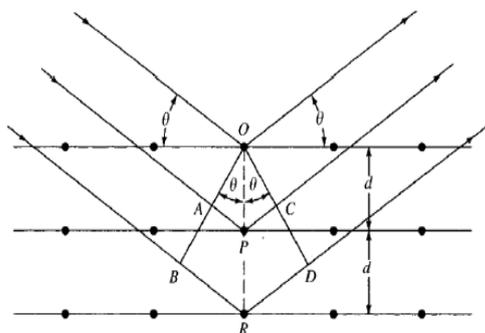
- characterization of hydroxyapatite nanoparticles,” *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.*, vol. 322, no. 1–3, pp. 29–33, Jun. 2008.
- [47] C. R. Kothapalli, M. T. Shaw, and M. Wei, “Biodegradable HA-PLA 3-D porous scaffolds: Effect of nano-sized filler content on scaffold properties,” *Acta Biomater.*, vol. 1, no. 6, pp. 653–662, Nov. 2005.
- [48] K. Lin and J. Chang, “Structure and properties of hydroxyapatite for biomedical applications,” in *Hydroxyapatite (HAp) for Biomedical Applications*, Elsevier Ltd, 2015, pp. 3–19.
- [49] S. Adzila, M. Murad, and I. Sopyan, “Doping Metal into Calcium Phosphate Phase for Better Performance of Bone Implant Materials,” *Recent Patents Mater. Sci.*, vol. 5, no. 1, pp. 18–47, 2012.
- [50] S. Adzila, M. Murad, and I. Sopyan, “Doping Metal into Calcium Phosphate Phase for Better Performance of Bone Implant Materials,” *Recent Patents Mater. Sci.*, vol. 5, no. 1, pp. 18–47, Jan. 2012.
- [51] S. Jegou Saint-Jean, C. L. Camiré, P. Nevsten, S. Hansen, and M. P. Ginebra, “Study of the reactivity and in vitro bioactivity of Sr-substituted  $\alpha$ -TCP cements,” *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, vol. 16, no. 11, pp. 993–1001, Nov. 2005.
- [52] R. J. Chung, M. F. Hsieh, C. W. Huang, L. H. Perng, H. W. Wen, and T. S. Chin, “Antimicrobial effects and human gingival biocompatibility of hydroxyapatite sol-gel coatings,” *J. Biomed. Mater. Res. - Part B Appl. Biomater.*, vol. 76, no. 1, pp. 169–178, 2006.
- [53] S. Panseri *et al.*, “Intrinsically superparamagnetic Fe-hydroxyapatite nanoparticles positively influence osteoblast-like cell behaviour,” *J. Nanobiotechnology*, vol. 10, no. 1, p. 1, 2012.
- [54] S. Panseri *et al.*, “Magnetic Hydroxyapatite bone substitutes to enhance tissue regeneration: Evaluation in vitro using osteoblast-like cells and in vivo in a bone defect,” *PLoS One*, vol. 7, no. 6, pp. 4–11, 2012.
- [55] Y. P. Guo, L. H. Guo, Y. B. Yao, C. Q. Ning, and Y. J. Guo, “Magnetic mesoporous carbonated hydroxyapatite microspheres with hierarchical nanostructure for drug delivery systems,” *Chem. Commun.*, vol. 47, no. 44, pp. 12215–12217, Nov. 2011.
- [56] T. Toya and K. Okada, “Glass-Ceramics Prepared from Mixtures of Waste (Kira) and Dolomite,” *Ceram. Intern.*, vol. 30, pp. 983–989, 2004.

- [57] E. Boanini, M. Gazzano, and A. Bigi, "Ionic substitutions in calcium phosphates synthesized at low temperature," *Acta Biomater.*, vol. 6, no. 6, pp. 1882–1894, 2010.
- [58] A. Bigi, G. Falini, E. Foresti, A. Ripamonti, M. Gazzano, and N. Roveri, "Magnesium influence on hydroxyapatite crystallization," *J. Inorg. Biochem.*, vol. 49, no. 1, pp. 69–78, 1993.
- [59] E. Landi, G. Logroscino, L. Proietti, A. Tampieri, M. Sandri, and S. Sprio, "Biomimetic Mg-substituted hydroxyapatite: From synthesis to in vivo behaviour," *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, vol. 19, no. 1, pp. 239–247, 2008.
- [60] W. L. Suchanek, K. Byrappa, P. Shuk, R. E. Riman, V. F. Janas, and K. S. Tenhuisen, "Preparation of magnesium-substituted hydroxyapatite powders by the mechanochemical-hydrothermal method," *Biomaterials*, vol. 25, no. 19, pp. 4647–4657, 2004.
- [61] M. S. Sader, E. L. Moreira, V. C. a. Moraes, J. C. Araújo, R. Z. LeGeros, and G. D. de Almeida Soares, "Rietveld Refinement of Sintered Magnesium Substituted Calcium Apatite," *Key Eng. Mater.*, vol. 396–398, pp. 277–280, 2009.
- [62] R. A. Barrea, C. A. Pérez, A. Y. Ramos, H. J. Sánchez, and M. Grenón, "Distribution and incorporation of zinc in biological calcium phosphates," *X-Ray Spectrom.*, vol. 32, no. 5, pp. 387–395, 2003.
- [63] M. Yamaguchi, "Role of zinc in bone formation and bone resorption," *J. Trace Elem. Exp. Med.*, vol. 11, no. 2–3, pp. 119–135, 1998.
- [64] J. M. Slocik and R. R. Naik, "Probing peptide-nanomaterial interactions," *Chem. Soc. Rev.*, vol. 39, no. 9, pp. 3454–3463, 2010.
- [65] W. H. Zachariasen, "THE ATOMIC ARRANGEMENT IN GLASS," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 54, no. 10, pp. 3841–3851, Oct. 1932.
- [66] B. E. Warren, "SUMMARY OF WORK ON ATOMIC ARRANGEMENT IN GLASS\*," *J. Am. Ceram. Soc.*, vol. 24, no. 8, pp. 256–261, Aug. 1941.
- [67] J. R. Jones, "Reprint of: Review of bioactive glass: From Hench to hybrids," *Acta Biomater.*, vol. 23, no. S, pp. S53–S82, 2015.
- [68] D. S. Brauer, "Bioactive Glasses: Structure and properties," *Angew. Chemie*, vol. 127, no. 14, pp. 4232–4254, 2015.
- [69] J. K. Hum, "Bioactive glass combined with natural derived proteins as composite materials for the application in bone tissue engineering Kompositmaterialien bestehend aus bioaktivem Glas und natürlichen Proteinen für die Anwendung im

- Knochen Tissue Engineering,” p. 159, 2016.
- [70] L. L. Hench and J. Wilson, *An Introduction to Bioceramics*. WORLD SCIENTIFIC, 1993.
- [71] L. L. Hench, “The story of Bioglass®,” *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, vol. 17, no. 11, pp. 967–978, 2006.
- [72] S. P. Bruder and B. S. Fox, “Tissue engineering of bone: Cell based strategies,” in *Clinical Orthopaedics and Related Research*, 1999, no. 367 SUPPL.
- [73] L. L. Hench, “Bioceramics: From Concept to Clinic.”
- [74] J. M. Polak, L. L. Hench, P. Kemp, L. L. Hench, J. R. Jones, and P. Sepulveda, “Bioactive Materials for Tissue Engineering Scaffolds,” in *Future Strategies for Tissue and Organ Replacement*, IMPERIAL COLLEGE PRESS, 2002, pp. 3–24.
- [75] D. W. Hutmacher, “Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage,” *Biomaterials*, vol. 21, no. 24, pp. 2529–2543, Dec. 2000.

# Capítulo II

## Materiales y métodos experimentales



## 2.1 Solventes, gases y reactivos

Todas las reacciones de síntesis se llevaron a cabo utilizando como solvente agua de calidad Milli-Q ( $>18\text{M}\Omega\cdot\text{cm}^{-1}$ ,  $<20$  ppb de carbono orgánico). La misma se obtuvo mediante un sistema de purificación de agua MILLI-Q<sup>®</sup> de filtros y resinas de intercambio iónico (Millipore<sup>®</sup>).

En la *Tabla 2.1* se detallan los reactivos y solventes utilizados, su pureza y el proveedor. Todos los reactivos se utilizaron sin purificación previa.

| Reactivo   | Fórmula  | Pureza (%)      | Marca               |
|--|--|-----------------|---------------------|
| Hidroxido de calcio  | $\text{Ca}(\text{OH})_2$   | 98,5            | Sigma-Aldrich       |
| Acido Fosfórico  | $\text{H}_3\text{PO}_4$  | 85              | Sigma-Aldrich       |
| Cloruro de magnesio anhidro                                  | $\text{MgCl}_2$  | 99              | Sigma-Aldrich       |
| Cloruro de zinc anhidro                                      | $\text{ZnCl}_2$  | 98,3            | Sigma-Aldrich       |
| Cloruro de sodio   | $\text{NaCl}$  | 100             | VWR Chemicals       |
| Bicarbonato de sodio   | $\text{NaHCO}_3$   | 99,7 -<br>100,3 | Sigma-Aldrich       |
| Cloruro de potasio   | $\text{KCl}$   | 99,5            | EMSURE <sup>®</sup> |
| Fosfato ácido de potasio trihidratado                        | $\text{K}_2\text{HPO}_4\cdot 3\text{H}_2\text{O}$                  | 99              | Sigma-Aldrich       |
| Cloruro de magnesio hexahidratado                            | $\text{MgCl}_2\cdot 6\text{H}_2\text{O}$                           | 99 -102         | Sigma-Aldrich       |
| Cloruro de calcio dihidratado                                | $\text{CaCl}_2\cdot 2\text{H}_2\text{O}$                           | 101,0           | AnalarNORMAPUR      |
| Sulfato de sodio   | $\text{Na}_2\text{SO}_4$   | 99,6            | AnalarNORMAPUR      |
| Trisaminometano  | $(\text{HOCH}_2)_3\text{CNH}_2$                                    | 100             | VWR Chemicals       |
| Cloruro ferroso tetrahidratado                               | $\text{FeCl}_2\cdot 4\text{H}_2\text{O}$                           | 99              | Sigma-Aldrich       |
| Cloruro ferrico hexahidratado                                | $\text{FeCl}_3\cdot 6\text{H}_2\text{O}$                           | 98,3            | Sigma-Aldrich       |
| Ácido 3-fosfonopropiónico                                    | $(\text{OH})_2\text{P}(\text{O})\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$ | 99              | Sigma-Aldrich       |
| N,N' dicitclohexilcarbodiimida                               | $\text{C}_{13}\text{H}_{22}\text{N}_2$                             | -               | Sigma-Aldrich       |
| N-hidroxisuccinimida   | $\text{C}_4\text{H}_5\text{NO}_3$                                  | 98,9            | Sigma-Aldrich       |
| 4-[(4-aminofenil)(4-imino-2,5-ciclohexadien-1-ylideno)metil- | $\text{C}_{20}\text{H}_{19}\text{N}_3\text{HCl}$                   | -               | Sigma-Aldrich       |

|   |   |    |               |
|---|---|----|---------------|
| 2-metil]- benzenamina<br>monohidrocloruro |   |    |               |
| 3-(Aminopropil)trimetoxisilano            | $\text{NH}_2(\text{CH}_2)_3\text{Si}(\text{OCH}_3)_3$ | 99 | Sigma-Aldrich |

**Tabla 2.1** Reactivos y solventes utilizados.

## 2.2 Material Común de Laboratorio

Las pesadas se realizaron mediante una balanza electrónica marca A& D modelo ER-182A de  $\pm 0,1$ mg de precisión.

Para la homogeneización de las suspensiones se utilizó un equipo de ultrasonidos marca TESLAB S.R.L Modelo TB04TA con una potencia de 160W y una frecuencia de 40 kHz.

Se emplearon filtros de membrana hidrofílica (Osmonics Inc) con poros de  $0,22 \mu\text{m}$  y un diámetro de 47 mm, para separar las partículas del medio donde fueron sintetizadas.

Se utilizó una centrífuga de eppendorf, marca Centrifuge 5415C con una velocidad máxima de centrifugación de 14.000 rev/min en los casos donde fue necesario realizar lavados y separación de partículas.

## 2.3 Técnicas y equipamiento

### 2.3.1 Técnicas que utilizan radiación X

Los rayos X son una radiación electromagnética de longitud de onda corta producida por el frenado de electrones de elevada energía o por transiciones de electrones que se encuentran en los orbitales internos de los átomos. El intervalo de longitudes de onda de los rayos X comprende desde aproximadamente  $10^{-6}$  nm hasta 10 nm, sin embargo, la espectroscopía de rayos X convencional se limita, en su mayor parte, a la región de aproximadamente 0,01 nm a 2,5 nm. Dentro de las diferentes técnicas analíticas que utilizan los rayos X como fuente de radiación se detallarán las utilizadas en el presente trabajo de tesis:

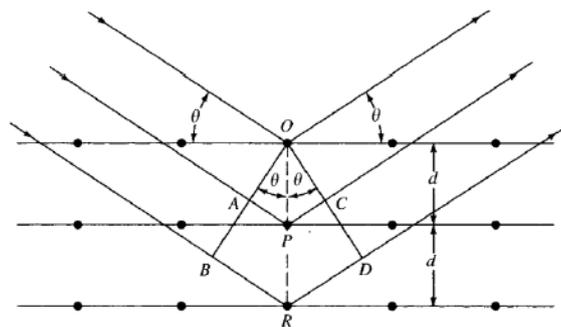
#### 2.3.1.1 Difracción de rayos X (DRX)

Al igual que con otros tipos de radiación electromagnética, la interacción entre el vector eléctrico de la radiación X y los electrones de la materia que atraviesa da lugar a una dispersión. Cuando los rayos X son dispersados por el entorno ordenado de un cristal, tienen lugar interferencias entre los rayos dispersados ya que la distancia entre los centros de dispersión es del mismo orden de magnitud que la longitud de onda de la radiación. Dichas interferencias pueden ser constructivas o destructivas, el resultado de dicho proceso es la difracción.

El fenómeno de difracción de rayos X se puede explicar basándose en tres hipótesis: que el medio cristalino es periódico, que los rayos X son ondas, y que la longitud de onda de los rayos X es del mismo orden que la magnitud de las distancia que se repite en los cristales [1].

Para conocer la distancia entre planos (h,k,l) se aplica la ley de Bragg según la cual los planos reticulares pueden actuar como espejos de la radiación incidente, los rayos X reflejados por dos planos contiguos de una familia sufrirán interferencia constructiva si estaban en fase y la diferencia de camino para reflexiones de planos sucesivos es un número entero de longitudes de onda:

$$2d_{hkl} \sin\theta = n\lambda \quad (\text{Ec 1})$$



**Figura 2.1** Difracción de rayos X producida por un cristal.

A partir del método de difracción del sólido se pueden determinar los parámetros de la red y en algunos casos las estructuras cristalinas a partir de las intensidades de difracción.

En este trabajo la técnica se utilizó como herramienta para identificar las fases presentes en los nanocompositos obtenidos. Para ello el equipo utilizado fue un difractómetro de

rayos X, Philips X'Pert equipado con una unidad de control PW3710 y un goniómetro vertical PW3020, radiación de Cu-K $\alpha$  y un filtro de Ni y 40 kV-20mA.

La formación de fosfatos de calcio (CaP) sobre los andamios por inmersión en fluido biológico simulado (SBF) se analizó mediante medidas de DRX. Para ello se utilizó un difractómetro de polvo automático Philips PW 1700 Series, que empleaba radiación Cu k $\alpha$  (a 40 kV y 40 mA) con un monocromador de cristal secundario. Los andamios se molieron y aproximadamente 100 mg del polvo se utilizó para el análisis. Los datos se recopilaron en el rango de  $2\Theta$  variando entre 20 y 80, utilizando un tamaño de paso de 0,041 y un tiempo de conteo de 25 s por paso.

### ***2.3.1.2 Microscopía electrónica de transmisión (TEM) acoplada a Espectrometría de dispersión de energía de rayos X (EDS)***

La microscopía electrónica de transmisión se basa en un haz de electrones que manejado a través de lentes electromagnéticas se proyecta sobre una muestra muy delgada situada en una columna de alto vacío. Los electrones del haz pueden atravesar la muestra o chocar con los núcleos atómicos. Información estructural específica de la muestra se obtiene según las pérdidas específicas de los diferentes electrones del haz.

Los electrones difractados al pasar a través de la muestra generan un difractograma que puede ser transformado directamente en imagen mediante lentes magnéticas, la cual es la proyección de la estructura cristalina a lo largo de la dirección de los electrones. Tanto el difractograma de electrones como la imagen reconstruida se pueden proyectar en una pantalla. Las imágenes se pueden producir a partir de los electrones difractados (imágenes de campo oscuro) o a partir de los electrones directos que han atravesado la muestra sin interacción (imágenes de campo claro/brillante).

Mediante esta técnica se pueden evaluar detalladamente las estructuras de los materiales proporcionando unos 120.000 aumentos del tamaño real de la muestra. El poder de resolución depende de la longitud de onda y de la calidad de las lentes del objetivo. Una limitación de la técnica TEM es que muchos materiales no sobreviven a las condiciones que existen en la cámara del microscópico debido al alto vacío y al impacto de electrones acelerados.

En el presente trabajo la técnica se utilizó para estimar el tamaño de las partículas, y estado de agregación de las mismas. Las micrografías de alta resolución obtenidas se realizaron en colaboración con YTEC, se utilizó un instrumento FEI Talos F200X

equipado con una cámara CCD. Las muestras fueron depositadas en seco sobre rejillas de cobre recubiertas con carbono de malla 200.

La espectroscopia de dispersión de energía de rayos X es una técnica utilizada para el análisis elemental o caracterización química de una muestra. Se basa en la investigación de la interacción de una fuente de excitación de rayos X y una muestra. Cada elemento tiene una estructura atómica particular que permite obtener un único conjunto de picos en su espectro de rayos X. Para estimular la emisión de rayos X característico de una muestra un haz de alta energía de partículas cargadas, tales como electrones o protones, o un haz de rayos X incide sobre la muestra excitando un electrón de un nivel interior, provocando así la creación de un “hueco” donde éste se encontraba. A continuación, un electrón de un nivel de mayor energía llena ese espacio vacante, emitiendo, en la transición un fotón de rayos X. La energía de los fotones emitidos está directamente relacionada con el peso atómico del elemento emisor. De este modo es posible asociar cada valor de energía emitida con un elemento de la tabla periódica (análisis cualitativo). Asimismo, se puede cuantificar el número de fotones emitidos a cada energía, haciendo posible determinar la cantidad relativa de cada elemento (análisis cuantitativo). Con el detector de rayos X se pueden realizar microanálisis puntuales, zonales y mapeados de elementos mayoritarios de muestras en polvo, lámina delgada, probeta pulida, rotura natural, etc.

En el presente trabajo se utilizó un espectrómetro de rayos X EDAX SDD Apollo 40 acoplado a un microscopio FEI Talos F200X. El “mapeo” de elementos EDS se realizó a alto voltaje (20kV) y se analizaron los espectros obtenidos en función del porcentaje atómico.

### ***2.3.1.3 Espectroscopia fotoelectrónica de rayos X (XPS)***

La espectroscopia fotoelectrónica de rayos X es una técnica semicuantitativa y de baja resolución espacial que habitualmente se utiliza para estimar la estequiometría, estado químico y estructura electrónica de los elementos que existen en la superficie de un material (de 1 a 10 nm de profundidad). Los espectros XPS son obtenidos cuando una muestra es irradiada por rayos X, al tiempo que se mide la energía cinética y el número de electrones que se escapan de la superficie a analizar.

Cabe recordar que cuando un fotón se encuentra con un átomo pueden ocurrir varios sucesos: que el electrón atraviese la muestra sin interactuar con sus átomos; que el electrón pase lo bastante cerca del núcleo como para ser atraído por su carga positiva,

sufriendo una desviación de su trayectoria inicial (dispersión elástica); que el electrón sufra una desviación de su trayectoria y además una pérdida de energía, es decir, que experimente una dispersión inelástica; o que el fotón interactúe con un electrón de un orbital atómico con una transferencia total de la energía del fotón hacia el electrón, ocurriendo la emisión del electrón del átomo. Este último suceso es el que es relevante para esta técnica. El proceso de fotoemisión resulta ser extremadamente rápido, 10<sup>-16</sup> s, y su física básica se describe mediante la ecuación de Einstein:

$$E_B = h\nu - K_E \quad (\text{Ec 2})$$

donde  $E_B$  es la energía de enlace del electrón en el átomo,  $h\nu$  es la energía de la fuente de rayos X, y  $K_E$  es la energía cinética del electrón detectado que es medida por el espectrómetro del XPS. Los espectros son obtenidos cuando una muestra es irradiada con rayos X y, simultáneamente, se miden la energía cinética y el número de electrones que escapan de la superficie del material analizado. Para una medida de XPS se requieren condiciones de ultra alto vacío (UHV), debido a que a presiones mayores la tasa de adsorción de contaminantes sobre la muestra puede ser del orden de varias monocapas atómicas, impidiendo el estudio de la superficie que realmente se quiere analizar.

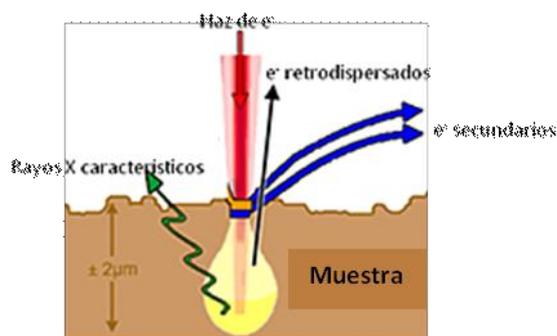
Dado que el XPS es una excelente técnica de caracterización de la superficie. En el presente trabajo se utilizó para determinar la presencia de distintos elementos en la superficie midiendo sus estados de oxidación y se calculó una composición superficial relativa.

Los espectros fueron obtenidos en UHV con un espectrómetro XR50 Specs GmbH espectrómetro con Mg K( $\alpha$ ) como fuente de excitación y un analizador de energía Phoibos 100 de media esfera. La calibración interna se realizó con el pico de Au 4f<sub>7/2</sub> (energía de unión, BE, 84,00 eV) utilizado como referencia y con el pico C 1s a BE = 284,6 eV debido al carbono espurio presente en todas las muestras que han estado en contacto con la atmósfera [2].

#### 2.3.1.4 Microscopía electrónica de barrido (SEM)

El microscopio electrónico de barrido (SEM, *Scanning Electron Microscope*) posee una alta resolución y una gran capacidad de foco (aproximadamente entre 100 y 1000 veces mayor que la de un microscopio óptico a la misma magnificación), lo cual permite

observar a la muestra como una imagen tridimensional. Las imágenes se pueden obtener con electrones secundarios o retrodispersados. Los electrones secundarios permiten observar la textura y características morfológicas de las fases analizadas. Los electrones retrodispersados poseen mayor energía que los secundarios, por tanto proporcionan información de regiones más profundas de la muestra y son sensibles a la composición de la misma: a mayor distancia de trabajo ( $Z$ ), mayor emisión de  $e^-$  retrodispersados. Por tanto, las áreas con elementos pesados aparecen brillantes en la imagen. La escala de trabajo comprende aumentos que van desde pocas decenas hasta 300.000 en condiciones ideales. Esta técnica de análisis permite caracterizar una amplia variedad de materiales como: aleaciones metálicas, polímeros, minerales, fibras, películas delgadas, materiales nano-estructurados, biomateriales y en algunos casos muestras con alto contenido en humedad e hidrogeles.



**Figura 2.2** Esquema de la interacción que sufre una muestra con la radiación al ser analizada por SEM

El microscopio electrónico de barrido utilizado en este trabajo, cuenta con capacidad analítica por rayos X debido a que tiene acoplado un detector de energía dispersiva (EDS, *Energy Dispersive Spectrometer*). Como se mencionó anteriormente en la *sección 2.3.1.2*, la presencia de dicho detector permite realizar análisis puntuales, zonales y mapeados de elementos mayoritarios en muestras en polvo, lámina delgada, probeta pulida, rotura natural, etc. Debido a esto, fue posible obtener simultáneamente información topográfica y composicional de una misma área dentro de las muestras.

Particularmente, esta técnica se utilizó para evaluar la morfología y la microestructura de los andamios con y sin recubrimiento, antes y después de su inmersión en fluido biológico simulado. Para ello se utilizó un equipo SEM, Auriga 0750 de ZEISS, operado a 2 kV y fijando una distancia de trabajo de aproximadamente 4 mm, detectando electrones secundarios. El “mapeo” de elementos EDS se realizó a alto

voltaje (20kV) y se analizaron los espectros obtenidos en función del porcentaje atómico.

Todas las muestras se fijaron al soporte con pasta conductora de plata. En el caso de las muestras biológicas, estas se recubrieron con una pátina de Au previo a ser analizadas por SEM.

### **2.3.1.5 Microtomografía computarizada (MCT)**

La microtomografía computarizada (MCT *Micro-computerized tomography*) es una técnica de gran alcance que tiene como fundamento la exploración con rayos X, obteniendo como resultado, imágenes axiales de gran tamaño y alta definición. La radiación que no ha sido absorbida por el objeto, en forma de espectro, es recogida por los detectores. Luego el emisor del haz, cambia su posición, y vuelve a realizar el proceso anterior hasta abarcar todo el objeto. En la MCT, un haz muy fino de rayos X se hace incidir sobre el objeto que se estudia y parte de este lo atraviesa.

Las múltiples proyecciones obtenidas son almacenadas en una única matriz llamada sinograma, a la cual se le aplica un algoritmo de reconstrucción basado en la transformada de Radón, permitiendo la reconstrucción de una imagen a partir de múltiples proyecciones de esta a diferentes ángulos. El ordenador transforma todos los datos recogidos por los detectores, en imágenes virtuales.

La microtomografía axial permite la obtención de imágenes 2D de la estructura interna de las muestras, sin necesidad de destruirlas, siendo una técnica conservacionista y no invasiva. Estos cortes de alta resolución muestran la estructura interna y permiten la evaluación anatómica virtual y el análisis morfométrico, de forma muy precisa, de muestras de pequeño tamaño. Además, a partir de las imágenes 2D, se pueden recrear los modelos en 3D, obteniendo una reconstrucción digital del objeto, permitiendo análisis morfológico, y la observación de formas en las muestras a una alta resolución.

En este trabajo se utilizó un equipo Bruker SkyScan 1173, las medidas realizaron como servicio a terceros en YTEC. La estructura interna de los andamios, el tamaño de poro y la interconexión entre los mismos fue analizada realizando la reconstrucción 3D de los tomogramas con el software 3DSlicer.

### **2.3.2 Técnicas que utilizan radiación UV-visible e infrarroja (IR)**

La parte infrarroja del espectro electromagnético que cubre el rango desde aproximadamente los 300 GHz (1 mm) hasta los 400 THz (750 nm). Puede ser dividida en tres partes:

- **Infrarrojo lejano**, desde 300 GHz (1 mm) hasta 30 THz (10  $\mu\text{m}$ ). La parte inferior de este rango también puede llamarse microondas. Esta radiación es absorbida por los llamados modos rotatorios en las moléculas en fase gaseosa, mediante movimientos moleculares en los líquidos, y mediante fotones en los sólidos.

-**Infrarrojo medio**, desde 30 a 120 THz (10 a 2,5  $\mu\text{m}$ ). Se absorbe por vibraciones moleculares, es decir, cuando los diferentes átomos en una molécula vibran alrededor de sus posiciones de equilibrio. Este rango es llamado, a veces, región de huella digital, ya que el espectro de absorción del infrarrojo medio de cada compuesto es muy específico.

-**Infrarrojo cercano**, desde 120 a 400 THz (2500 a 750 nm). Los procesos físicos que son relevantes para este rango son similares a los de la luz visible.

La frecuencia por encima del infrarrojo es la de la luz visible, dichas frecuencias son absorbidas y emitidas por electrones en las moléculas y átomos que se mueven desde un nivel de energía a otro. La luz que vemos con nuestros ojos es realmente una parte muy pequeña del espectro electromagnético. La radiación electromagnética con una longitud de onda entre aproximadamente 400 nm y 700 nm es detectado por el ojo humano y percibida como luz visible. A otras longitudes de onda, sobre todo al infrarrojo cercano (más largo de 700 nm) y al ultravioleta (más corto que 400 nm) también se les llama luz a veces, sobre todo cuando la visibilidad para los humanos no es relevante. La siguiente frecuencia en el espectro es el ultravioleta (o rayos UV), que es la radiación cuya longitud de onda es más corta que el extremo violeta del espectro visible. Al ser muy energética, la radiación ultravioleta puede romper enlaces químicos, haciendo a las moléculas excepcionalmente reactivas o ionizándolas, lo que cambia su comportamiento.

### ***2.3.2.1 Espectroscopía Infrarroja por transformada de Fourier (FTIR)***

Dado que las energías vibracionales de las moléculas se encuentran en la región infrarroja del espectro electromagnético, la técnica de espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier permite obtener información útil de la naturaleza de los grupos funcionales presentes en los nanomateriales.

La técnica se basa en un fenómeno de absorción resonante de energía, si la frecuencia de la radiación coincide exactamente con la frecuencia de algún modo normal

vibracional de la molécula, tiene lugar una transferencia neta de energía que origina un cambio en la amplitud de la vibración molecular; la consecuencia es la absorción de radiación. De manera análoga, la rotación de las moléculas asimétricas, alrededor de su centro de masa, produce una variación periódica en el dipolo que puede interaccionar con la radiación. Dado que diferentes grupos funcionales absorben a diferentes frecuencias, la espectroscopía IR puede ser utilizada para el estudio de la estructura molecular y constituye una “huella dactilar”.

Para que un modo normal de vibración sea activo debe darse acompañado en un cambio en el momento dipolar, las intensidades que presentan los modos activos son proporcionales al cambio en el momento dipolar producido durante la vibración.

En este trabajo se utilizaron dos modos de detección, el más común es la técnica de transmitancia en el cual se fabrica una pastilla de KBr con el compuesto a analizar sobre la cual incide el haz de luz infrarroja y con un detector del otro lado de la muestra, se determina qué fracción de la radiación incidente (longitud de onda) ha sido adsorbida.

Los espectros fueron obtenidos con un espectrofotómetro Nicolet 380 que funcionaba a 64 exploraciones con una resolución de  $4\text{ cm}^{-1}$  en el rango de  $4000$  a  $400\text{ cm}^{-1}$ . Las muestras se prepararon presionando una mezcla molida de polvo de partículas al 1% con un 99% de KBr seco a una carga de 5 toneladas.

La otra técnica de detección utilizada en el presente trabajo consistió en FTIR por Reflectancia Total Atenuada (ATR), la cual permite el estudio de absorbancia de radiación infrarroja de compuestos químicos depositados sobre una superficie, la técnica es una herramienta de muestreo FTIR, que permite realizar el análisis cualitativo o cuantitativo de muestras con poca o ninguna preparación previa, lo cual acelera en gran medida el análisis. El principal beneficio de muestreo ATR se debe a que la longitud de trayectoria de muestreo es muy delgada y permite identificar, preferentemente, los grupos ubicados en la superficie de las nanopartículas. Esto es una limitación cuando lo que se pretende analizar es la composición interna de los materiales.

Los índices de refracción del cristal y de la muestra son importantes consideraciones en la técnica de muestreo de ATR en virtud de la siguiente ecuación:

$$\Theta_c = \text{sen}^{-1}(n_2/n_1) \quad (\text{Ec } 3)$$

Donde  $n_2$  es el índice de refracción de la muestra,  $n_1$  es el índice de refracción del cristal y  $\Theta_c$  es el ángulo crítico. Cuando se supera el ángulo crítico se observa un resultado

espectral puramente ATR. Si no se cumple con el ángulo crítico, se observa un ATR combinado y resultado de reflectancia externa. Esto puede ocurrir si el ángulo de incidencia del haz IR es demasiado bajo, si el índice de refracción del cristal es demasiado bajo, o si el índice de refracción de la muestra es demasiado alto o una combinación de las 3.

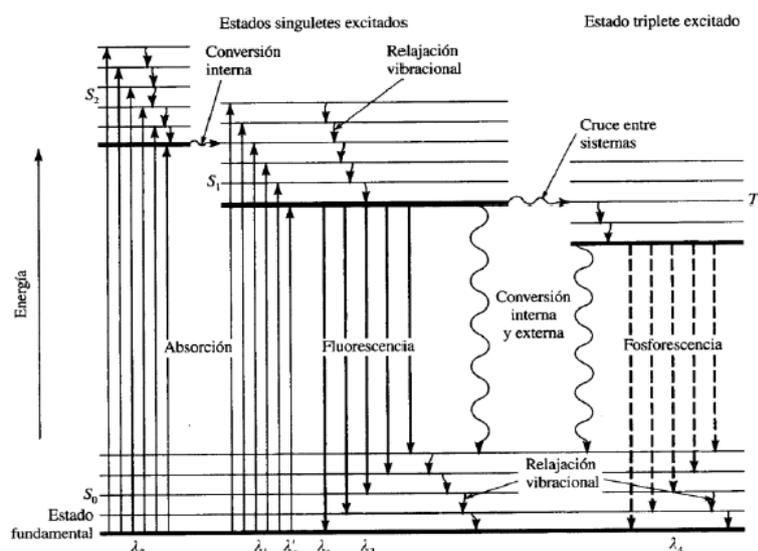
Los espectros fueron obtenidos con un equipo Perkin Elmer modelo Spectrum One con un accesorio de muestreo universal ATR. La muestra se introdujo sobre un soporte de seleniuro de zinc y diamante de 1,7 mm<sup>2</sup> de área. Se realizó el muestreo barriendo desde 650 cm<sup>-1</sup> hasta 4000 cm<sup>-1</sup> con una resolución de 4 cm<sup>-1</sup>.

### 2.3.2.2 Fluorescencia

La fotoluminiscencia es el fenómeno en el cual al incidir radiación UV-visible sobre las moléculas, éstas se excitan mediante la absorción de fotones y emiten luz de longitudes de onda características de la estructura molecular. El término luminiscencia engloba los fenómenos de fosforescencia y fluorescencia.

Una molécula que inicialmente se encontraba en un estado electrónico fundamental singlete S<sub>0</sub> (en el cual todos los espines de los electrones están apareados) puede ser excitada a un nivel energético superior S<sub>1</sub> (dicho estado excitado sigue siendo un estado singlete, ya que el espín del electrón promovido continúa apareado con el electrón del estado fundamental). En otros casos la molécula puede haber sido excitada a un estado electrónico excitado superior S<sub>2</sub> pero normalmente pasa a su estado excitado más bajo S<sub>1</sub> mediante una serie de relajaciones vibracionales rápidas y conversiones internas que no producen emisión de radiación. De esta manera, la fluorescencia surge, generalmente, de una transición desde el nivel vibracional más bajo del primer estado electrónico excitado a uno de los niveles vibracionales del estado electrónico fundamental (*Figura 2.3*). Así, para la mayoría de los compuestos fluorescentes orgánicos, la radiación se produce por una transición  $\Pi \rightarrow \Pi^*$  o  $n \rightarrow \Pi^*$ , dependiendo de cuál sea la de menor energía.

Uno de los aspectos más atractivos de esta técnica es su alta sensibilidad, con límites de detección que suelen ser de uno a tres órdenes de magnitud superiores a los encontrados en la espectroscopia de absorción.



**Figura 4.3** Diagrama de energía parcial para un sistema fotoluminiscente.

Para evaluar la presencia de compuestos fluorescentes anclados a los nanomateriales obtenidos se llevaron a cabo medidas de fluorescencia estacionaria, obteniendo los espectros de emisión-excitación a temperatura ambiente. Para ello se usó un equipo Horiba Jobin-Yvon spex fluorolog FL3-11 con Lifetime TCSPC con 2 nm de ancho de rejilla de entrada y de salida. Algunos espectros de emisión fueron obtenidos utilizando un espectrofotómetro de fluorescencia Varian Cary Eclipse equipado con un soporte multicelda Peltier termostatzado. En dichas medidas se utilizó un ancho de rendija de 5 nm de entrada y de salida.

### 2.3.2.3 Dispersión dinámica de luz (DLS)

La dispersión de la luz es el fenómeno mediante el cual la radiación electromagnética, al chocar con partículas coloidales es desviada en su dirección de propagación, de forma aparentemente caótica, en cada uno de los núcleos de dispersión, por tener un índice de refracción diferente al del medio. La medida de la luz dispersada da lugar a técnicas muy útiles en la determinación de la concentración de sustancias en suspensión, así como en la caracterización del tamaño de las partículas coloidales y macromoleculares. En las medidas de dispersión de luz estática, la intensidad de luz, para un determinado ángulo, es el resultado de un promedio a lo largo de un amplio periodo de observación, del orden de segundos. Esta técnica permite conocer el estado de agregación de las partículas. Sin embargo, con las técnicas hoy en día accesibles, es posible medir la

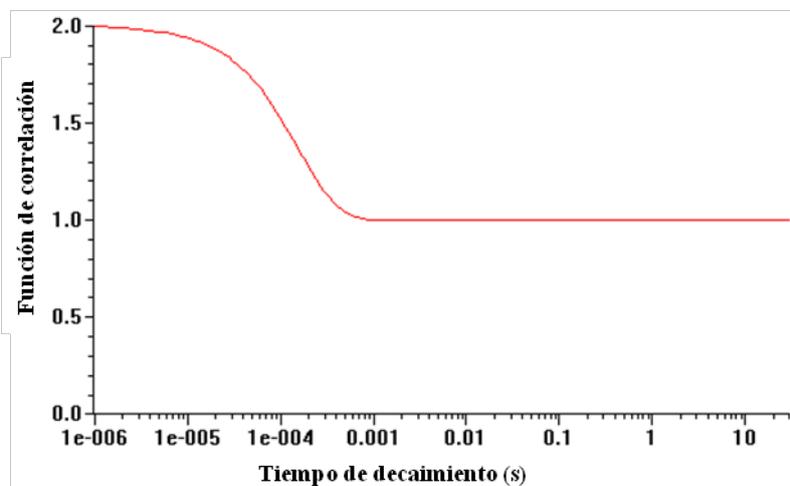
intensidad de luz dispersada en tiempos muy breves, en el margen del microsegundo, de tal forma que puede detectarse el movimiento caótico (browniano) de las partículas emisoras, como consecuencia de su energía térmica. Esta información, que por efecto Doppler se manifiesta en un ensanchamiento de la banda de frecuencia de la luz dispersada, puede ser utilizada para la determinación del coeficiente de difusión de las partículas y de su radio hidrodinámico.

En un experimento de Dispersión de luz dinámica (también denominado *Photon correlation spectroscopy*), se mide la luz dispersada en intervalos de tiempo  $\tau$ , pudiéndose observar que la intensidad fluctúa alrededor de un valor medio, como consecuencia del movimiento aleatorio de las partículas. Este comportamiento puede racionalizarse a través de la denominada función de autocorrelación normalizada  $g(\tau)$

$$g(\tau) = \langle I_{\theta}(t) \cdot I_{\theta}(t+\tau) \rangle / \langle I_{\theta}(t) \rangle^2 \tag{Ec 4}$$

donde  $I_{\theta}(t)$  es la intensidad de la luz dispersada medida a un ángulo  $\theta$  y al tiempo  $t$  y los corchetes indican el promedio sobre todo el tiempo de medición  $t$ . Puede demostrarse que la evolución de  $g(\tau)$  es decreciente de forma exponencial a medida que crece el valor de  $\tau$  y depende del coeficiente de difusión traslacional de las macromoléculas, por tanto se relaciona con su radio hidrodinámico.

Para calcular una distribución de tamaños la función de autocorrelación se simboliza como  $g_2$ . Teniendo en cuenta la difusión de partículas monodispersas esféricas, la función de autocorrelación de intensidad dispersada presenta la siguiente forma:



**Figura 5.4** Función de correlación versus tiempo de decaimiento en segundos.

descrita por la función de correlación  $g_2$ :

$$g_2(\tau) = B + \beta \cdot \exp(-2\Gamma\tau) \quad (\text{Ec } 5)$$

donde B es la línea base de la correlación para  $\tau$  muy largos,  $b$  es la amplitud de la función autocorrelación a  $\tau = 0$  y  $\Gamma$  es el tiempo de decaimiento de la correlación.

Los datos experimentales tratados con la función de correlación  $g(\tau)$  pueden ajustarse a la ecuación (5) y así obtener  $\Gamma$ . El parámetro  $\Gamma$  está relacionado con la constante de difusión D por la relación (6), donde  $q$  es la magnitud del vector dispersión,  $n_0$  el índice de refracción del solvente y  $\lambda_0$  la longitud de onda de la radiación incidente en el vacío.

$$D = \Gamma / q^2 \quad \text{con } q = (4\pi n_0 / \lambda_0) \sin(\theta/2) \quad (\text{Ec } 6)$$

Para partículas esféricas que difunden D puede expresarse de acuerdo a la ecuación de Stokes-Einstein como  $D = k_B T / \pi \eta R_h$ , siendo T la temperatura,  $\eta$  la viscosidad del medio,  $k_B$  la constante de Boltzmann y  $R_h$  el radio hidrodinámico de la partícula.

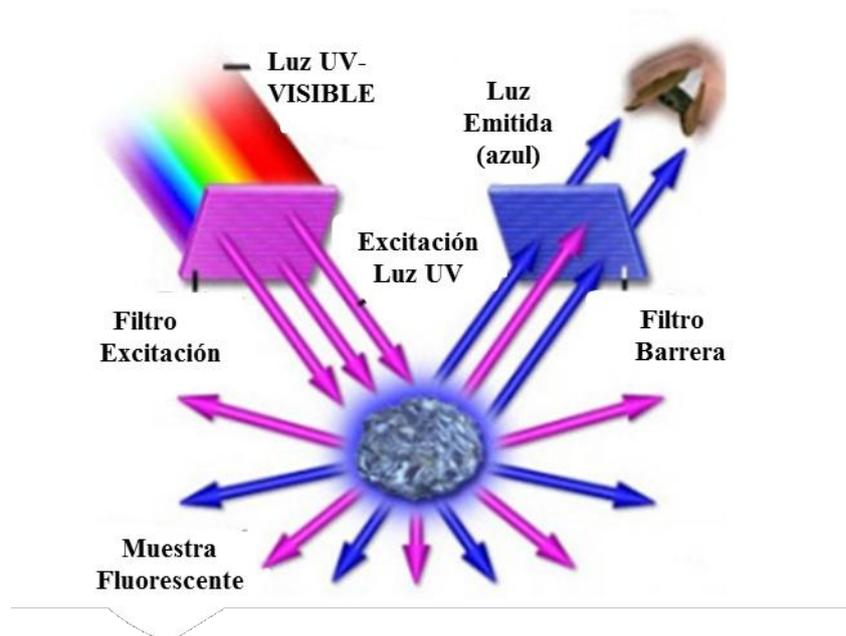
La técnica se utilizó para determinar el estado de agregación de las suspensiones de nanomateriales. El equipo, MALVER Z-SIZER, emplea luz de 633 nm proveniente de un láser continuo por lo que fue posible utilizar celdas de plástico descartables. Las NPs se dispersaron en el buffer 50mM en  $\text{HPO}_4^{2-} / \text{H}_2\text{PO}_4^{-1}$  de pH= 7,40, de forma de mantener la suspensión lo suficientemente diluida. Las medidas se llevaron a cabo a 25 °C.

#### 2.3.2.4 Microscopía óptica

En un microscopio óptico en general la iluminación es proporcionada por una lámpara de Haluro de Tungsteno posicionado en el portalámparas, la luz emitida pasa primero a través de una lente colectora y luego por un camino óptico en la base del microscopio. En dicho lugar también se encuentran estacionados una serie de filtros que condicionan la luz emitida por la lámpara incandescente antes de que se refleje en un espejo y pase a través del diafragma de campo y en el condensador de platina inferior. El condensador forma un cono de iluminación que baña la muestra, que se encuentra en la platina del microscopio, y posteriormente entra en el objetivo. La luz que va dejando el objetivo es desviada por un haz divisor y por una combinación de prismas ya sea por los oculares

para formar una imagen virtual, o directamente a través de la cámara ubicada en el tubo de extensión tri-ocular, donde se puede formar una imagen sobre la matriz de fotodiodos CCD posicionada dentro del sistema de imagen digital.

El microscopio de fluorescencia es una variación del microscopio de luz blanca en el que los objetos son iluminados por rayos de una determinada longitud de onda. La imagen observada es el resultado de la radiación electromagnética emitida por las moléculas que han absorbido la excitación primaria y re-emitido una luz con mayor longitud de onda. Para dejar pasar sólo la emisión secundaria deseada, se deben colocar filtros apropiados debajo del condensador y encima del objetivo. El microscopio de fluorescencia es utilizado para detectar sustancias con autofluorescencia o sustancias marcadas con fluorocromos. Así, el uso de estos marcadores ha permitido identificar células, componentes celulares sub-micrométricos y otras entidades con un alto grado de especificidad. Más aún, este tipo de microscopía permite la detección del material fluorescente con una altísima sensibilidad. En una misma muestra, gracias a las técnicas de marcado específico se pueden apreciar distintos tipos de moléculas mediante el uso de diferentes sondas fluorescentes.



**Figura 2.5.** Representación de una muestra en el Microscopio de Fluorescencia. Por medio de un filtro de excitación se seleccionan las longitudes de onda específicas de la luz de una fuente UV-visible. Un filtro de barrera permite el paso de la luz fluorescente emitida bloqueando la luz UV reflejada. La fluorescencia se irradia en todas las direcciones independientemente de la dirección de la luz de excitación

En el presente trabajo se utilizó un microscopio óptico Olympus BX51, las imágenes obtenidas con el programa Leica se utilizaron para analizar la estructura porosa y el tamaño de los andamios después del proceso de sinterización. A su vez, dicho microscopio se utilizó en modo de epifluorescencia equipado con un filtro apropiado conectado a una cámara de video en color Olympus DP71. Para analizar la viabilidad y adhesión celular mediante tinciones con fluorocromos, se obtuvieron medidas de la densidad celular superficial a partir de imágenes digitales usando el software Image-Pro plus.

### ***2.3.3 Otras técnicas***

En el siguiente apartado se describirán el resto de las técnicas utilizadas durante el desarrollo del presente trabajo doctoral que no se encuentran relacionadas directamente con procesos de interacción con los diferentes tipos de radiación.

#### ***2.3.3.1 Análisis Termogravimétrico (TGA)***

La termogravimetría se basa en la medida de la variación de la masa de una muestra cuando es sometida a un programa de temperatura en una atmósfera controlada. Dicha variación de masa puede ser una pérdida o ganancia. El registro de estos cambios nos dará información sobre si la muestra se descompone o reacciona con otros componentes.

La termogravimetría puede utilizarse conjuntamente con otras técnicas, como por ejemplo Análisis termogravimétrico diferencial (ATD) o calorimetría de barrido diferencial (DSC), ya que permiten obtener información complementaria sobre el comportamiento térmico de una muestra.

Algunas aplicaciones de la termogravimetría son: estudios de descomposición y estabilidad térmica, estudios composicionales, determinación de pureza, determinación de contenido en humedad, materia volátil, cenizas y carbono.

Para realizar las medidas se utilizó un equipo Rigaku Serie Thermo Plus Evo que emplea atmósfera de N<sub>2</sub> o aire, dependiendo de si lo que se pretende evaluar es la cantidad de carbono orgánico. Se pesó una masa aproximada de 200 mg de muestra en crisoles de PtRh y se utilizó un programa de temperatura que comenzaba a una temperatura inicial de 30 °C seguida por una rampa de 10 °C/ min hasta 1000 °C, la que se mantuvo durante 10 minutos [1].

### 2.3.3.2 Isotermas de adsorción

Los estudios de absorción de gases sobre la superficie de un sólido permiten determinar el área específica de las muestras y en el caso de materiales sólidos porosos se obtiene, además, la distribución de tamaños de poros de los mismos.

Estas medidas se basan en la absorción física que tiene lugar a partir de las interacciones de Van der Waals entre el adsorbato (normalmente  $N_2(g)$  o  $H_2O(g)$ ) y el sustrato (sólido) que involucran energías del orden de 20-40 kJ/mol. En estos procesos el adsorbato puede difundir en la superficie, la estructura del sólido no cambia, el equilibrio de adsorción se establece rápidamente y ocurre la adsorción en multicapas. Al bajar la presión del gas tiene lugar la desorción del adsorbato en forma reversible (excepto en sólidos porosos). El modelo desarrollado por Brunauer, Emmet y Teller, conocido como isoterma de BET para la adsorción en multicapas, contempla muchas de estas características y asume una superficie homogénea química y estructuralmente. La expresión linealizada de la isoterma de BET se da en la Ec 7.

$$\frac{P}{V(P_0 - P)} = \frac{1}{V_m C} + \frac{(C-1)P}{V_m C P_0} \quad (\text{Ec 7})$$

Donde P es la presión del gas en equilibrio con el sólido adsorbido,  $P_0$  es la presión de vapor del líquido a la temperatura de trabajo, V el volumen del gas adsorbido expresado en condiciones normales de temperatura y presión (CNTP) y  $V_m$  el volumen de gas necesario para la adsorción de una monocapa también expresado en CNTP.

El parámetro C puede calcularse como  $C \approx \exp \left( \frac{\Delta H_1 - \Delta H_L}{RT} \right)$  donde  $\Delta H_1$  es el calor para la adsorción de la primer capa y  $\Delta H_L$  calor asociado a la formación para las capas subsiguientes y es del orden de la entalpía de condensación del vapor.

El intervalo de presiones en el que los datos experimentales se ajustan a la ecuación anterior es de  $0,05 < P/P_0 < 0,3$ . A presiones relativas debajo de este intervalo, la ecuación de BET desestima la adsorción y por sobre este intervalo, hay una sobreestimación como consecuencia de las condiciones “ideales” planteadas por el modelo. Los valores de área específica de los materiales suele estimarse en este intervalo. Teniendo en cuenta estos factores el área específica ( $A_{sp}$ ), se calcula a partir de los parámetros de ajuste, mediante la ecuación:

$$A_{sp} = \frac{V_m N_A \sigma^0}{22,414} \quad (\text{Ec } 8)$$

Donde  $\sigma^0 = 16,2 \text{ \AA}^2$  es el área transversal de la molécula de  $N_2$ ,  $V_m$  el volumen del gas necesario para formar una monocapa a temperatura y presión estándar y  $N_A$  el número de Avogadro.

Cuando los sólidos presentan poros se observa una histéresis en las curvas de adsorción, originada en el hecho que la adsorción y la desorción para un mismo recubrimiento del material no ocurren a la misma presión. Esto ocurre como consecuencia de que el llenado de poros implica la presencia de una curvatura, y de acuerdo a la ecuación de Laplace, aumenta la diferencia de presión a medida que disminuye la curvatura. Por ello, el vapor condensará en el poro a mayor presión que la de equilibrio.

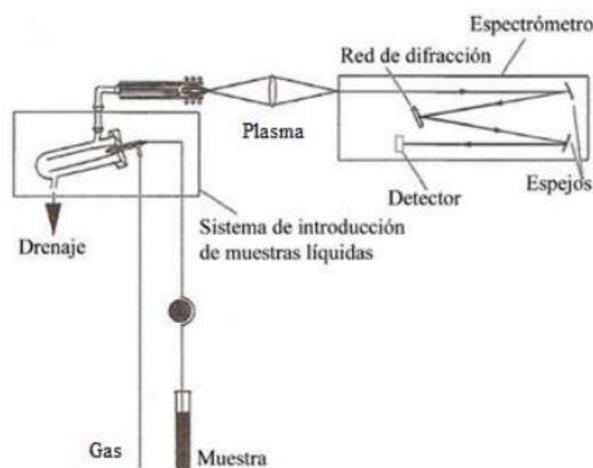
En este trabajo la técnica se utilizó para determinar el área específica de los materiales. Las medidas se realizaron en colaboración con investigadores del Politécnico de Torino (Italia) utilizando un equipo de marca Micromeritics modelo ASAP 2020. Se utilizó  $N_2$  como adsorbato, la presión del colector máxima fue 925,00 mm Hg. Se fijó la temperatura en 77 K mediante un modelo ASAP2020 de Micromeritics. Antes de cada medición, se desgasificaron las muestras durante 10 horas a  $80^\circ \text{C}$  y a una presión residual de aproximadamente 10–2 mbar para garantizar una buena limpieza de la superficie de la muestra.  $P_0$  se midió en intervalos de T durante el análisis para lo cual se empleó un baño de temperatura por debajo de  $-196^\circ \text{C}$ .

### ***2.3.3.3 Espectrometría de emisión atómica de plasma por microondas (MP-AES)***

La espectroscopia de emisión y absorción atómica se usa casi exclusivamente para el análisis de átomos. En principio, la espectroscopia de emisión puede utilizarse para la identificación y para la determinación cuantitativa de todos los elementos de la tabla periódica. En el caso de la espectroscopia de emisión los átomos son llevados previamente a un estado excitado y se mide la intensidad de la radiación emitida a la frecuencia característica correspondiente a la transición desde el estado excitado al estado fundamental. El método está basado en la medición de la emisión atómica por medio de una técnica de espectroscopia óptica

Las muestras que se utilizan se encuentran en estado líquido, debido a que se trata de muestras en las que el analito está distribuido homogéneamente en el medio y son fáciles de manipular. Con el objetivo de introducir la muestra líquida normalmente se genera un aerosol (conjunto heterogéneo de gotas suspendidas en un gas) mediante una cámara de nebulización y posterior drenando las gotas de mayor tamaño. El aerosol que sale de la cámara se transporta a una velocidad determinada desde el tubo inyector hasta el plasma. En el seno del plasma se producen los procesos de desolvatación, vaporización, atomización, excitación y/o ionización. Para la detección de la emisión espontánea de los átomos y/o iones del plasma generado, se dispersan los haces de luz y se cuantifica la emisión según las diferentes longitudes de onda mediante un espectrómetro de red de difracción. Los detectores se encargan de medir las intensidades de las líneas y finalmente las señales originadas se procesan y se controlan mediante un sistema informático.

Los componentes físicos de un instrumento, tanto de MP-AES como de ICP-AES se muestran en la *Figura 2.6*.



**Figura 2.6.** Componentes principales de un espectrómetro de MP-AES convencional.

La determinación de la cantidad de iones metálicos presente en las muestras se midió mediante un espectrómetro MP-AES, Agilent MP-4200 AES. Los andamios con y sin recubrimiento se trituraron primero hasta obtener un polvo, luego se suspendieron 5 mg en 4 ml de agua con 2 ml de HNO<sub>3</sub> (10N), las suspensiones se sonicaron durante 30

minutos antes de realizar la medición. Para la determinación de los iones presentes en las nanopartículas se utilizó un protocolo muy similar.

#### 2.3.3.4 Potencial Z

El potencial Zeta ( $\zeta$ ) es una función de la carga superficial que se desarrolla cuando el material se suspende en un solvente líquido, particularmente, agua. Su valor permite predecir la interacción repulsiva eléctrica entre partículas cargadas y por ende, la estabilidad del coloide en dispersión. En su valor tienen gran influencia las características de la interfase sólido / líquido. Su medición se basa en los fenómenos electrocinéticos, siendo el más explotado el de electroforesis, que se fundamenta en el movimiento de partículas cargadas en un líquido bajo la influencia de un campo eléctrico aplicado.

Para comprender su significado se debe tener en cuenta el modelo de la doble capa eléctrica, (esquemático en la *Figura 2.7*) el cual considera que la interfase sólido/líquido está compuesta por dos “capas”. Una de ellas presenta un decaimiento lineal del potencial eléctrico, decaimiento que permanece constante aun cuando las partículas están en movimiento. La otra, denominada capa difusa, presenta un decaimiento exponencial, representado por un plano de referencia ubicado entre la capa fija y la capa difusa, el potencial de dicho plano es el potencial de Stern. El potencial Zeta se encuentra en la superficie de corte, cercano al punto donde la capa de Stern termina y la capa difusa empieza. La relación entre el potencial zeta y el potencial de superficie depende de la concentración de iones en la solución. En solventes como el agua, la medición experimental del potencial Z es una buena aproximación del potencial de superficie.

La relación entre la carga superficial ( $\sigma$ ) y el potencial superficial ( $\psi_0$ ) puede expresarse mediante la ecuación de Grahame, derivada a partir de la teoría de Gouy-Chapman asumiendo la condición de electroneutralidad entre la doble capa y la carga superficial del material. Para ello, se hace uso de la ecuación de Poisson en una dimensión y asumiendo que a distancias infinitamente grandes el gradiente de potencial se hace cero. A su vez, asumiendo bajos potenciales se obtiene la ecuación de Grahame para bajos campos:

$$\sigma = \frac{\epsilon\epsilon_0\psi_0}{\lambda_D} \quad (\text{Ec 9})$$

Donde  $\lambda_D$  es el radio de Debye,  $\epsilon_0$  es la permitividad en el vacío,  $\epsilon$  es la permitividad relativa del medio.

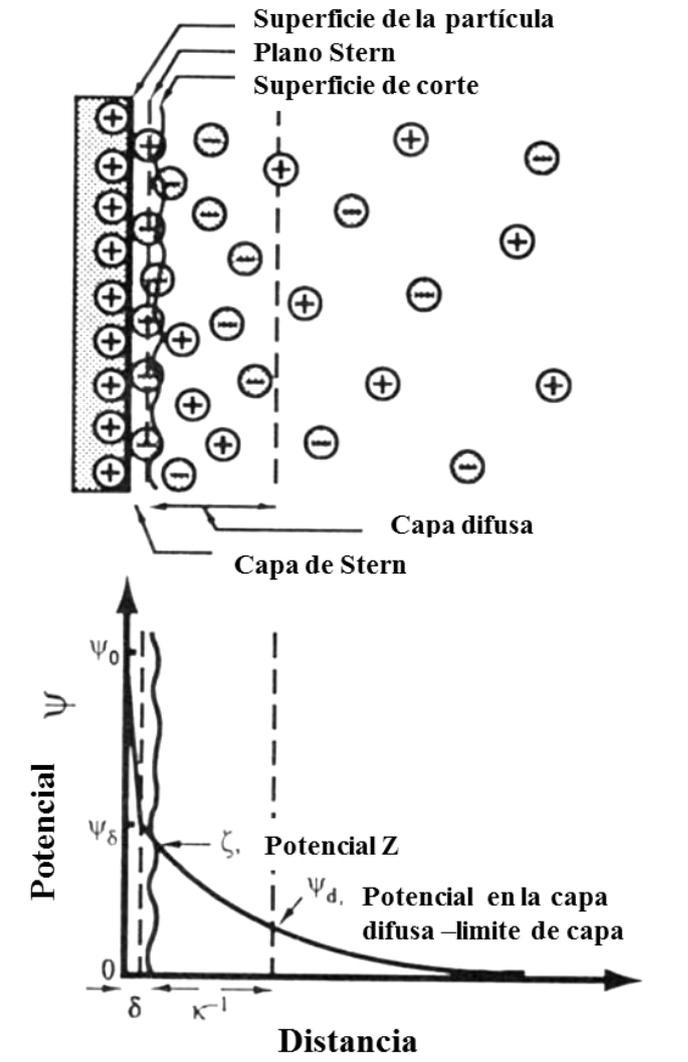


Figura 2.7. Diagrama de la doble capa eléctrica.

El potencial zeta ( $\zeta$ ) está relacionado con la movilidad electroforética de las partículas ( $u/E$ , variable medida experimentalmente) por la ecuación de Helmholtz–Smoluchowski (Hunter, 1981):

$$\zeta = \frac{u \times \eta}{\epsilon_0 \times \epsilon \times E} \quad (\text{Ec } 10)$$

Dónde:  $u$  es la velocidad de la partícula,  $\eta$  es la viscosidad del líquido y  $E$  es el campo eléctrico aplicado.

La relación de las medidas experimentales de movilidad electroforética y el potencial Zeta no es trivial. La expresión simple que las relaciona no es de aplicabilidad para todos los sistemas.

Para estas medidas se utilizó un equipo MALVER Z-SIZER que emplea un láser de excitación de 633nm. Las medidas se llevaron a cabo a 25 °C en buffer de  $\text{HPO}_4^{-2} / \text{H}_2\text{PO}_4^{-1}$  (50 mM) a pH= 7,46.

### 2.3.3.5 Magnetización versus campo aplicado

Los materiales ferromagnéticos son aquellos que presentan zonas o “dominios” bien definidos donde los momentos magnéticos tienen una dirección privilegiada, con lo cual el momento magnético total no necesariamente es nulo. Un procedimiento típico para orientar estos momentos es el que se conoce como Imanación, el cual consiste en someter al material de estudio a un campo magnético externo (H) que provoca que los dominios ferromagnéticos del material privilegien una dirección en desmedro de la inicial.

Para ello se utiliza normalmente una disposición denominada anillo de Rowland, que consiste en un anillo o toroide del material a ensayar sobre el cual se enrolla un bobinado primario al que se conecta una fuente de corriente variable. La corriente que circula por este bobinado crea dentro del material un campo magnético H (llamado fuerza magnetomotriz = fmm). Otro bobinado secundario permite medir el flujo magnético dentro del anillo que es proporcional al campo de inducción magnética B. En el ensayo se va aumentando desde cero el valor de la corriente (por consecuencia, de la fmm) y se mide el valor de la densidad de flujo de B a medida que ocurre el proceso de magnetización del material.

Bajo estas condiciones se obtiene un campo inducido (B) en el material de la siguiente forma:

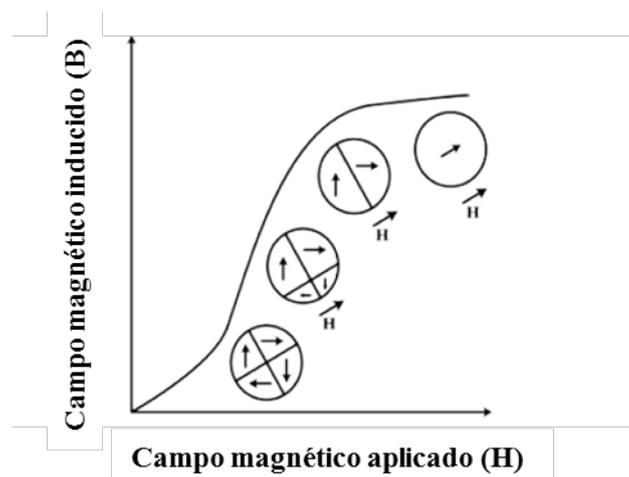
$$B = \mu_0(1 + \chi_m) \times H \quad (\text{Ec 11})$$

Donde  $\mu_0$  y  $\chi_m$  son la permeabilidad en el vacío y la susceptibilidad magnética del material respectivamente. La susceptibilidad magnética es un parámetro dependiente de la magnitud del campo aplicado, por lo que la relación B-H resulta no lineal, conociéndose como “curva de magnetización” de un material ferromagnético. En rigor esta curva debe obtenerse aplicando al material magnético un campo magnético (H) estático (con corriente continua) y medir la inducción B, también estática, provocada en

el material. Este proceso comienza con la rotación de los dominios magnéticos más pequeños o inestables alineándose (quizás no por completo) con el campo. A medida que giran, se produce coalescencia de dominios. Este proceso se lleva a cabo con poco cambio de energía y la curva  $M(H)$  o  $B(H)$  crece rápidamente. Si se sigue aumentando la fmm cuando la magnetización por coalescencia y absorción de dominios pequeños o inestables ha terminado, el siguiente mecanismo implica la orientación de los dominios más fuertes que aún no están completamente alineados. Este proceso involucra un gran gasto de energía y entonces la curva crece cada vez más lentamente. Se llega a un momento donde ya todos los dominios del material se hallan alineados con el campo aplicado y la magnetización se satura (*Figura 2.8*) [3].

La no linealidad en esta curva se relaciona con las características termodinámicas de la deformación de los dominios magnéticos y las interacciones entre dominios.

Para llevar a cabo la caracterización magnética de los materiales se utilizó un Magnetómetro de muestra vibrante LakeShore 7404. La metodología utilizada consistió en variar la temperatura entre  $-193\text{ }^{\circ}\text{C}$  y  $177\text{ }^{\circ}\text{C}$  pudiendo aplicar campos magnéticos continuos de hasta 2Tesla. Para el análisis de la magnetización de saturación de los andamios se utilizaron muestras de pequeño tamaño, logrando analizar el comportamiento magnético sin cambiar la estructura porosa original. En todas las mediciones se utilizaron BGS como control.

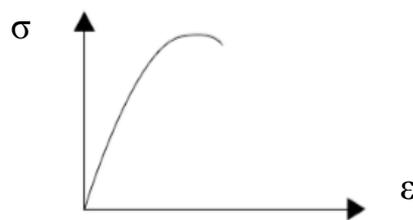


**Figura 2.8.** Curva de Magnetización, donde el eje Y corresponde al campo inducido (B) en el material y el eje X al campo magnético (H) que es aplicado al material.

La susceptibilidad magnética de polvos de partículas y andamios recubiertos se analizó mediante un Sistema de Sensibilidad Magnética MS2 / MS3 (Sistema Bartington MS2G).

### 2.3.3.6 Resistencia mecánica

Todo cuerpo real sobre el que actúa un sistema cualquiera de fuerzas exteriores se deforma, apareciendo simultáneamente fuerzas interiores o tensiones que se oponen a esta deformación, hasta que finalmente se establece un equilibrio entre las fuerzas exteriores y las interiores. Durante el proceso de deformación se realiza un trabajo que, total o parcialmente, se almacena en el cuerpo en forma de energía potencial. En el caso de un cuerpo perfectamente elástico, el trabajo efectuado por las fuerzas exteriores se transformará totalmente en energía potencial interna. En el caso de un cuerpo parcialmente elástico, parte de trabajo efectuado por las fuerzas exteriores se almacena en forma de energía potencial interna y el resto se disipa en forma de calor, que se desarrolla en el cuerpo al producirse las deformaciones no elásticas. Experimentalmente se comprueba que los desplazamientos de un punto A de un cuerpo elástico por efecto de una fuerza  $\sigma$  que crece gradualmente, crecen – hasta cierto límite – proporcionalmente con el valor de la fuerza. Pasado este límite las deformaciones ( $\varepsilon$ ) crecen más deprisa que  $\sigma$ . Esta variación de la deformación con respecto a  $\sigma$  se representa gráficamente en la *Figura 2.9*.



**Figura 2.9.** Variación que experimenta el esfuerzo axial de un cuerpo debido a ser sometido a una deformación uniaxial.

Esta observación experimental se recoge en ley de Hooke que puede enunciarse como: “Sin pasar el valor umbral, llamado límite de proporcionalidad, la deformación en general producida en cualquier punto o sección de un cuerpo elástico es proporcional a la fuerza  $\sigma$  que la produce”.

El límite de elasticidad se define como la deformación máxima que puede soportar un cuerpo elástico, siendo ésta totalmente recuperable, al cesar de actuar la fuerza o fuerzas que la produjeron.

Dicha ley solo se aplica a la zona elástica de los materiales y dice que el esfuerzo axial ( $\sigma$ ) es directamente proporcional a la deformación unitaria axial ( $\epsilon$ ) y que la constante de proporcionalidad entre los dos es el módulo de elasticidad (E).

$$\sigma = E * \epsilon \quad (\text{Ec } 12)$$

La ley acabada de enunciar constituye la base fundamental de la resistencia de los materiales. Los ensayos de compresión, se basan en someter la muestra a evaluar a una carga uniaxial (estática) con dirección coincidente al eje longitudinal de la muestra desde los extremos, produciendo una acción aplastante hasta generar la ruptura del material.

El uso de materiales implantables como sustitutos óseos requiere de condiciones elásticas similares a las del hueso natural, por lo que resulta importante analizar las propiedades mecánicas de los andamios con potencial aplicación en ingeniería de tejidos.

Se determinó la resistencia a la compresión uniaxial  $\sigma$  de los andamios antes y después del recubrimiento. Los andamios de forma cilíndrica se comprimieron con una velocidad de 1 mm/min (Zwick Z050, DE). Las muestras se pre-cargaron a 0,1 N y se aplicó una fuerza máxima de 50 N. La carga se aplicó hasta alcanzar un desplazamiento de 4 mm [4].

#### ***2.4 Ensayos y Protocolos Biológicos***

El comportamiento biológico de los andamios es, en definitiva, su propiedad más importante. El éxito de un implante, más allá de cuestiones como disponibilidad de materiales, facilidad de fabricación o costos, depende de la respuesta biológica *in vivo*. Previo a los estudios *in vivo* en animales y finalmente en seres humanos, es indispensable la realización de estudios *in vitro*, ya que éstos aportan información sobre el tipo de respuesta que se podría esperar al utilizar el biomaterial en el organismo. Los cultivos celulares son ideales para la observación y el análisis de las interacciones

substrato-célula y la influencia de los materiales en el comportamiento celular respecto a su biocompatibilidad y citotoxicidad.

Debido a que los andamios obtenidos en el desarrollo de la presente tesis doctoral fueron recubiertos con nanomateriales a base de hidroxiapatita modificada con metales, tales como hierro, magnesio y zinc, fue necesario evaluar previamente la biocompatibilidad de los nanomateriales sintetizados antes de utilizarlos como material de recubrimiento. Para dichos ensayos se utilizó la línea celular de tipo fibroblástica de ratón Balb-c 3T3 (ATCC, USA), ampliamente utilizada en ensayos de citotoxicidad debido a que se encuentra bien caracterizada y dado a que el tejido conectivo es uno de los tejidos mayoritarios en el organismo [5].

Por otro lado, considerando que los andamios sintetizados tienen como finalidad ser utilizados en aplicaciones de reparación y regeneración ósea, el análisis de la biocompatibilidad de los mismos antes y después del recubrimiento, fue realizado con dos líneas de células de origen óseo: (1) células tipo osteoblasto provenientes de la línea celular MG-63 derivada de osteosarcoma humano y (2) células preosteoblásticas provenientes de la línea celular ST-2, derivada de médula ósea de ratón.

La línea celular MG-63 fue elegida para llevar a cabo los experimentos de biocompatibilidad debido a que se ha demostrado que conservan una serie de características fenotípicas de osteoblastos diferenciados.

La línea celular preosteoblástica ST-2 se considera adecuada para estudios del desarrollo osteogénico *in vitro*, debido a que expresan marcadores osteoblásticos y llevan a cabo la mineralización de la matriz extracelular. Por lo tanto, se utilizaron para realizar ensayos preliminares de diferenciación celular inducida por los materiales testeados.

#### **2.4.1 Medios de cultivo (MC)**

Los MC utilizados en este trabajo de tesis variaron de acuerdo a la línea celular utilizada, tal como se describirá en el *capítulo* respectivo. Se utilizaron dos medios de cultivo:

- Medio MEM modificado por Dulbecco (DMEM), suplementado con 10 % de suero fetal bovino (SBF), 50  $\mu\text{L}/\text{mL}$  (UI) de penicilina y 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de sulfato de estreptomina.

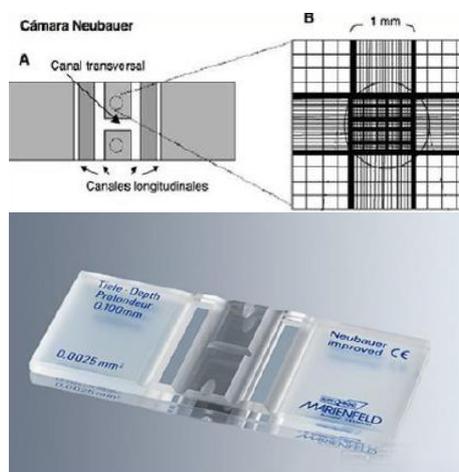
- Medio *Roswell Park Memorial Institute* (RPMI), suplementado con 10 % de suero fetal bovino (SBF), 50  $\mu\text{L}/\text{mL}$  (UI) de penicilina y 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de sulfato de estreptomicina.

#### 2.4.2 Condiciones de cultivo, recuento celular y evaluación de la biocompatibilidad

Las líneas celulares fueron cultivadas según protocolos ya establecidos. Las células fueron sembradas en frascos de cultivo de 75  $\text{cm}^2$  y se cultivaron en MC (descritos previamente). Las células fueron mantenidas en incubadoras a 37°C, en una atmósfera con 5% de  $\text{CO}_2$  y humedad controlada (condiciones de cultivo estándar, CCE).

Luego del crecimiento en monocapa hasta un 70-80 % de confluencia fueron subcultivadas cada 7 días. La confluencia celular fue confirmada visualmente por observación del frasco de cultivo bajo microscopia de contraste de fase. El medio de cultivo fue aspirado, la monocapa celular lavada con solución salina tamponada estéril de buffer fosfato (PBS) y las células se desprendieron del sustrato mediante tripsinización (0,1% tripsina–1 mM EDTA en solución buffer PBS durante 5 minutos a 37°C). Una vez tripsinizadas, se procedió a añadir MC para neutralizar la reacción de tripsinización y así las células fueron resuspendidas por adición de MC. A partir de la suspensión celular se tomaron alícuotas para llevar a cabo los diferentes experimentos.

Para realizar el conteo de células se utilizó la cámara de Neubauer o hematocitómetro (*Figura 2.10*). Este dispositivo consta de varios cuadrantes (L) de dimensiones 1x1 mm. Cada cuadrante de 1x1 mm esta a su vez subdividido en 16 cuadrados lo cual facilita el conteo dentro del mismo, el mismo posee una altura de 0,1 mm de modo que el volumen del cuadrante (L) queda definido en 0,1  $\text{mm}^3$ .



**Figura 2.10.** Cámara de Neubauer

Empleando un microscopio de contraste de fase invertido (mencionado en la sección 2.3.2.4), se contaron las células que se encontraban en las posiciones L. El número total de células/mL se obtuvo multiplicando el número medio de células contado en los cuatro cuadrantes por 10.000.

Dado que la biocompatibilidad se define como la capacidad de un biomaterial para desempeñar la función deseada de acuerdo con un tratamiento, sin provocar ningún efecto indeseable, generando al mismo tiempo una mejor respuesta celular o del tejido en esa situación específica, la evaluación de dichos efectos en un cultivo celular expuesto a un determinado material se lleva a cabo a través de un conjunto de investigaciones cualitativas y cuantitativas, con el fin de poder observar la respuesta celular en un amplio espectro.

Dentro de los ensayos validados y apropiados para los materiales a testear se encuentran los que fueron utilizados en el presente trabajo y que se describirán a continuación. En todos los ensayos cuantitativos los porcentajes de células viables se calcularon como:

$$[(A-B)/A \times 100] \quad (\text{Ec } 13)$$

donde A y B fueron la absorbancia del control y de las células en contacto con el material a evaluar, respectivamente.

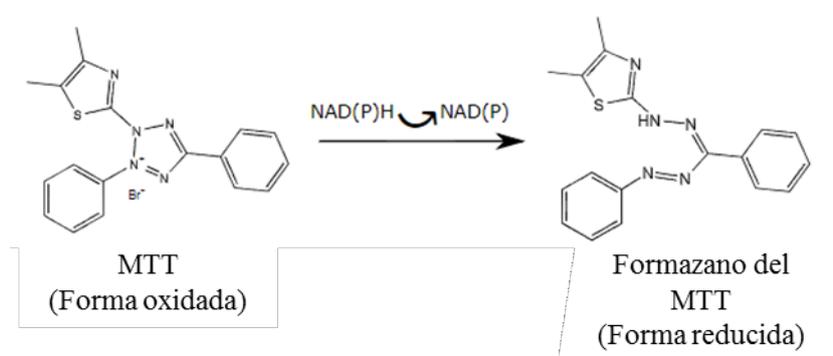
### ***2.4.3. Ensayos utilizados para evaluar la biocompatibilidad de nanomateriales a base de hidroxiapatita modificada***

#### ***2.4.3.1 Reducción oxidativa del metil tetrazolio***

Este ensayo se basa en la reducción metabólica del Bromuro de 3-(4,5- dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT, Sigma Aldrich, USA) realizada por enzimas mitocondriales (succinato-deshidrogenasa) a un compuesto (formazan), permitiendo determinar la funcionabilidad mitocondrial de las células tratadas. Este método ha sido muy utilizado para medir supervivencia y proliferación celular, ya que la cantidad de células vivas es directamente proporcional a la cantidad de formazán producido. La técnica fue desarrollada por Mosmann en 1983 siendo modificado en 1986 por Francois Denizot y Rita Lang [6]. El método se encuentra íntimamente ligado a la reducción

oxidativa de WST-8 que se describirá a continuación en la sección 2.4.3.3, la diferencia sustancial entre ambos es que el ensayo de MTT es un método destructivo.

El protocolo experimental diseñado para este trabajo de tesis consistió en colocar 50  $\mu$ l de una suspensión de los nanomateriales (11,5 mg/mL) en cada uno de los pozos de una placa de 96 pocillos, el disolvente se dejó evaporar a temperatura ambiente y posteriormente se sembraron  $2,7 \times 10^4$  células por pocillo. Después de 24 hs de incubación en CCE, el MC se descartó y cada pocillo se lavó con PBS, posteriormente se adicionó una solución que contenía reactivo MTT con una concentración de 1 mg/mL. Luego de 3 hs de incubación, la solución de MTT se eliminó y las células fueron lavadas. El color se evidenció mediante la adición de 100  $\mu$ L de dimetilsulfóxido (DMSO) a cada pocillo para lograr la lisis celular y la disolución de cristales de formazán. La placa se agitó durante 10 minutos, la solución coloreada se trasvaso a una nueva placa y la absorbancia se midió a 560 nm utilizando un lector automático de placas ELISA (BioTek $\mu$ Quant). La reducción de MTT se expresó como un porcentaje de las células de control siguiendo la ecuación 13. Cada ensayo se repitió tres veces en experimentos independientes.



**Figura 2.11.** Estructura esquemática de MTT y formazan de MTT.

#### 2.4.3.2 Viabilidad evaluada mediante tinción con Naranja de Acridina (AO)

El fluorocromo naranja de acridina N,N,N',N'-tetrametilacridina (Sigma Aldrich, USA) posee la capacidad de unirse a los ácidos nucleicos. Permitiendo así evaluar cualitativamente y cuantitativamente la adhesión y la proliferación celular.

Para evaluar la viabilidad de células crecidas sobre una superficie recubierta con MeHAp, se sumergieron láminas de vidrio de 24×24 mm (cubreobjetos) en

suspensiones de nanopartículas de concentración 23 mg/mL, durante 10 minutos. Transcurrido este tiempo el disolvente se evaporó a temperatura ambiente y las láminas de vidrio se introdujeron en una placa de Petri de 10 cm de diámetro, donde se sembró la suspensión de células de la línea Balb-c 3T3.

Después de 24 hs de incubación según CCE. Los cubreobjetos fueron lavados dos veces con PBS y teñidos con colorante AO para su posterior observación mediante microscopía de epifluorescencia. Células 3T3 Balb-c cultivadas sobre láminas de vidrio sin nanopartículas se utilizaron como controles.

Por cada tipo de muestra, al menos 10 imágenes en cada experiencia fueron analizadas, mediante el software Image J. La evaluación cuantitativa de los resultados se expresó como % de área cubierta respecto al control, (células crecidas en ausencia de nanopartículas, o células crecidas sobre nanopartículas de HAp).

A fin de considerar la posible liberación de los nanomateriales en medios biológicos y por consiguiente el efecto que podrían generar en células circundantes, se realizaron ensayos de dosis respuesta, utilizando concentraciones variables dentro del rango 1,56 - 25 mg/mL para todas las nanopartículas sintetizadas.

#### ***2.4.4 Ensayos utilizados para evaluar la biocompatibilidad de andamios a base de vidrio bioactivo 45S5®:***

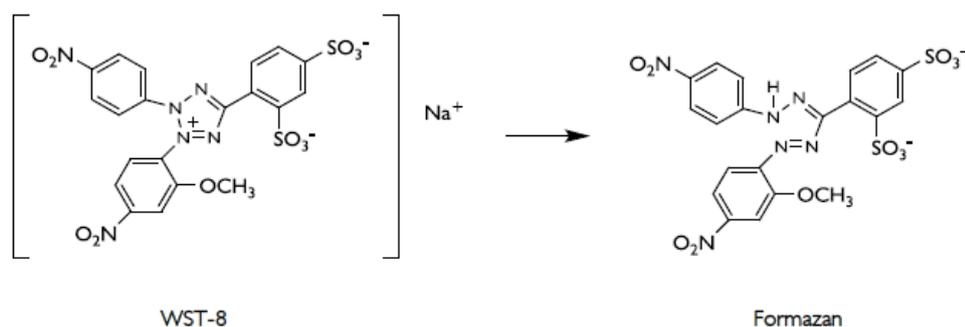
##### ***a) Métodos directos:***

A fin de evaluar la respuesta celular al permanecer en contacto con la superficie de los andamios se realizaron las siguientes técnicas cualitativas y cuantitativas

##### ***2.4.4.1 Reducción oxidativa de WST-8***

La viabilidad celular se evaluó como una medida indirecta la capacidad celular de llevar a cabo la reducción oxidativa del 2-(2-metoxi-4-nitrofenil)-3-(4-Nitrofenil)5-(2,4-disulfonil)-2H-tetrazolio (WST-8). Utilizando el kit de conteo celular (*Cell Counting Kit-8*, Sigma-Aldrich, DE [7]). A fin de garantizar que sólo las células adheridas en la superficie de los andamios fueran analizadas, dichos andamios fueron lavados con PBS y colocadas en una nueva placa de 24 pocillos. Posteriormente, una solución al 1% en volumen de WST-8 en MC se les adicionó y fueron incubadas por 4 hs. Durante el

período de incubación, la sal WST-8 soluble en agua es reducida enzimáticamente por la actividad celular de deshidrogenasas a formazan de color naranja (*Figura 2.12*) soluble en el MC. Dicho compuesto se detectó colorimétricamente mediante espectroscopia UV-Vis, midiendo la absorbancia a 450 nm con un lector de microplacas (PHOmo, Autobio Labtec Instruments).

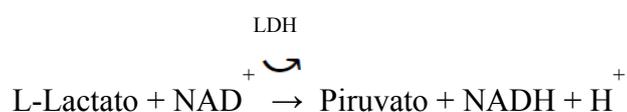


**Figure 2.12.** Estructura esquemática de WST-8 y formazan de WST-8.

Las células, que son metabólicamente activas, metabolizan la sal de tetrazolio a formazán en el citosol. Por lo tanto, la cantidad de formazán es directamente proporcional al número de células vivas.

#### 2.4.4.2 Medida de la actividad Lactato Deshidrogenasa

La determinación de la actividad lactato deshidrogenasa (LDH) se basa en el siguiente esquema de reacción:

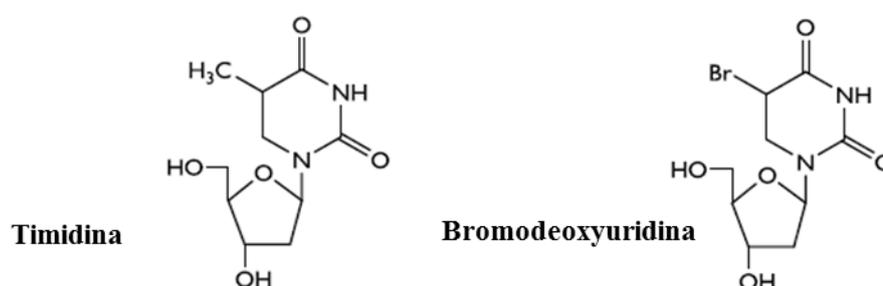


En el presente trabajo dicha técnica se utilizó para evaluar indirectamente la adhesión y la proliferación celular sobre los andamios. Para ello, se lisaron las células adheridas a los andamios empleados previamente para el análisis de WST-8, de esa suspensión celular 2 mL se transfirieron a cada pocillo de una placa de 96 pocillos. Transcurridos 30 min a 25°C, los extractos se centrifugaron (2000 rpm/min, durante 5 min) y 140 µL de la solución de células lisadas se agregaron a una cubeta para ser tratados con 60 µL de una mezcla de ensayo LDH (obtenida al mezclar un sustrato de ensayo solución comercial de LDH, con solución de tinte y solución de cofactor en una proporción de 1:

1: 1. Después de 30 minutos de incubación en oscuridad, la reacción fue detenida por adición de ácido clorhídrico (1 M). Tras realizar una dilución con H<sub>2</sub>O destilada, se determinaron las concentraciones de células lisadas mediante medidas de absorción a 490 nm y 690 nm (Espectrómetro UV / Vis, Specord 40, Analytik Jena) [8].

#### 2.4.4.3 Incorporación de Bromodesoxiuridina

La proliferación celular se determinó directamente mediante un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA). Para dicha medición, se utilizó un kit de proliferación celular (ELISA de proliferación celular, BrdU, [9]) que permite la detección inmuno histoquímica del anticuerpo.



**Figura 2.13.** Estructura esquemática de timidina (izquierda) y su derivado sintético Bromodeoxiuridina.

Este ensayo se basa en la incorporación de 5-bromo-2'-deoxyuridina (BrdU) durante la síntesis de ADN. BrdU es un nucleósido sintético, análogo de la timidina (*Figura 2.13*), que durante la replicación celular, se incorpora al ADN reemplazando la timidina.

Los andamios fueron incubados con la solución de BrdU (según protocolo del fabricante) durante 2 hs a 37 °C a fin de que, el BrdU se incorpore al ADN de las células en proliferación. Posteriormente, las células fueron fijadas durante 30 minutos a temperatura ambiente. Esta etapa de desnaturalización fue necesaria para unir un anticuerpo al BrdU incorporado, que se realizó después de la fijación durante otros 30 minutos. Luego de varias etapas de lavado, se añadió una solución provista por el fabricante en el *Kit* para revelar y observar un cambio de color. La reacción se detuvo mediante el agregado de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1 M después de 5 minutos, la absorbancia se midió a 450 nm utilizando un lector de microplacas (PHOmo, Autobio Labtec Instruments).

#### 2.4.4.4 Tinción con los colorantes DAPI y Vibrant Blue

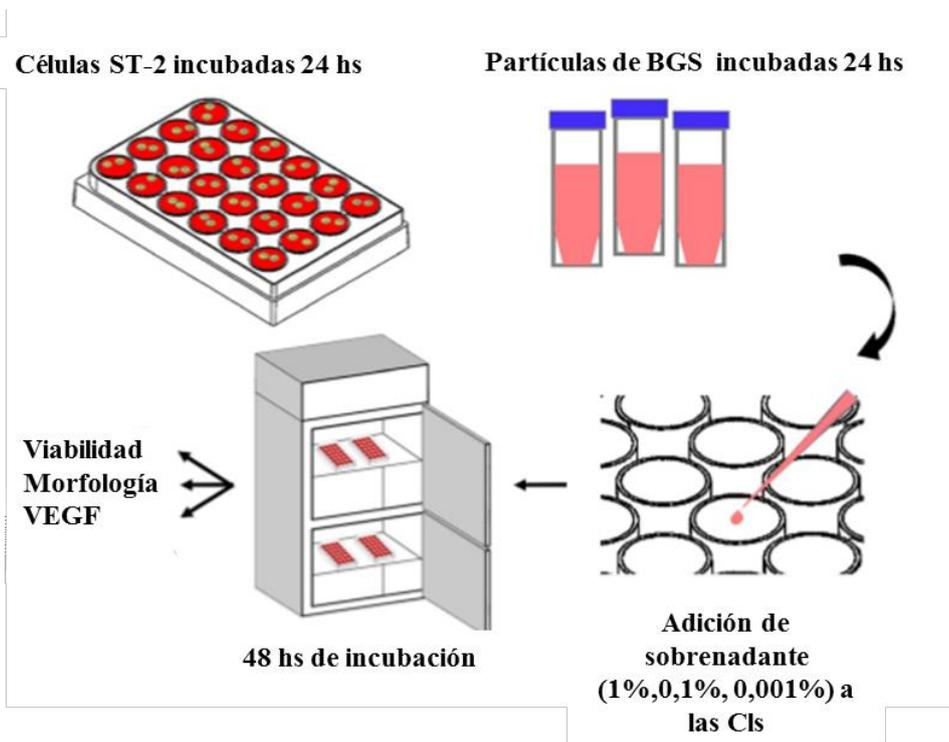
Para analizar la adhesión de células sobre los andamios con y sin partículas después de 24 y 48 hs de incubación. Se utilizó una solución de Vibrant Blue (Molecular Probes, Amsterdam), para teñir el citoplasma celular. Para ello se eliminó el medio de cultivo y 0,25 mL de solución de tinción (0,5% V/V) se adicionaron a las muestras dejándolas incubarse durante 30 minutos. Posteriormente, la solución se retiró y las muestras se lavaron con PBS. Se procedió a la fijación de las células en las superficies con paraformaldehído (3,7%V/V) para luego teñir con DAPI colorante fluorescente azul dihidrocloruro de 4', 6-diamidino-2-fenilindol, (Roche, Basilea, Suiza) para marcar los núcleos. Después de 5 minutos de incubación, la solución se retiró y las muestras se dejaron en PBS hasta el momento de la visualización microscópica utilizando un Microscopio de fluorescencia (Axio Scope, ZEISS, Alemania) [10].

#### b) *Métodos indirectos:*

A fin de testear la respuesta de células expuestas a los productos de disolución de los andamios se realizaron técnicas cualitativas y cuantitativas exponiendo células a extractos de concentraciones variables obtenidos a partir de los materiales.

El protocolo experimental se describe esquemáticamente en la *Figura 2.14*. Para llevar a cabo este ensayo se sembraron  $2,5 \times 10^5$  células ST-2 en 1 mL de MC en placas de 24 pocillos y se incubaron a 37 °C durante 24 hs. Paralelamente, se procedió a obtener los extractos, para ello se obtuvo un polvo por molienda de los andamios y 0,1 g del sólido obtenido se suspendió en 10 mL de MC para formar una suspensión al 1% P/V, la cual se incubó durante 24 hs en CCE, tales como las utilizadas para incubar las células. Transcurrido el tiempo indicado, la suspensión se centrifugó y el sobrenadante se dividió y diluyó para obtener suspensiones 0,1 y 0,01 % P/V de andamio en MC.

Después de 24 hs de cultivo, se eliminó el MC de las células, se les adicionaron los extractos a evaluar y los cultivos se incubaron por 48 hs. Las células incubadas en MC se utilizaron como control.



**Figura 2.14.** Esquema del protocolo utilizado para realizar ensayos indirectos en células ST-2.

#### 2.4.4.5 Tinción con Hematoxilina y Eosina

Para observar la morfología de células ST-2 luego de ser cultivadas en presencia de los productos de disolución de los andamios, se utilizó la técnica de tinción con H-E (hematoxilina y eosina). La hematoxilina al unirse a las moléculas de ADN/ARN genera un color azul oscuro o violeta y por otro lado la eosina al unirse con los aminoácidos/proteínas, incluidos los filamentos citoplásmicos a las membranas intracelulares los tiñe de rojo/rosa.

Con el objetivo de observar las mismas células cuya viabilidad se evaluó por WST-8, se descartó la solución y las células unidas a las placas fueron lavadas con PBS para luego ser fijadas utilizando una mezcla Fluoro-fix. Posteriormente, las muestras se lavaron con agua desionizada y se tiñó con hematoxilina durante 10 min, para eliminar el exceso de colorante sin adherir se realizó una secuencia de lavados, con agua. La solución de 0,1% de eosina en 90% de etanol se preparó en presencia de un 5% de ácido acético. Las muestras fueron teñidas con dicha solución durante 1–5 minutos. El excedente de colorante se eliminó mediante lavados con etanol al 95% y 100% y las muestras fueron observadas por microscopía óptica [11].

#### **2.4.4.6 Determinación de la Actividad de la Fosfatasa Alcalina**

La fosfatasa alcalina (ALP), es una enzima presente en las células y a su vez funciona como un marcador para la diferenciación osteogénica. La actividad de ALP se puede medir mediante la transformación enzimática de para-nitrofenilfosfato (pNPP), incoloro a p-nitrofenol (pNP) de color amarillo que puede detectarse colorimétricamente. Para realizar dicha determinación las células crecidas sobre los andamios se lisaron utilizando un buffer de lisis y los extractos obtenidos se centrifugaron. Una solución buffer de ALP se preparó disolviendo TRIS 0,1 M, MgCl<sub>2</sub> 2 mM y pNPP 9 mM en agua ultrapura a un pH entre 9,8 y 10 (ajustado con HCl). Una alícuota del sobrenadante del lisado celular se incubó junto con 100 µL de la solución tampón ALP a 37 °C durante 1 h. La reacción se detuvo mediante la adición de 650 µL de NaOH. La absorbancia se midió a 405 nm y 690 nm (absorbancia de fondo).

Dado que la transformación enzimática de pNPP está relacionada con el tiempo de incubación, la actividad ALP específica se calculó con respecto al tiempo de reacción.

#### **2.4.4.7 Detección del Factor de Crecimiento Endotelia Vascolar.**

La cantidad de VEGF secretada por células de la línea ST-2 de medula ósea de ratón se midió utilizando un Kit RayBio Mouse VEGF ELISA (*EnzymeLinked* Ensayo inmuno absorbente). Dicho ensayo puede medir con precisión la presencia de VEGF secretado por las células en los sobrenadantes de los cultivos mediante la participación de un anticuerpo específico para el VEGF de ratón.

El ensayo fue realizado de acuerdo con el protocolo suministrado por el fabricante. Brevemente, los sobrenadantes extraídos de los cultivos celulares junto con los estándares de concentraciones de VEGF conocidas fueron transferidos a una placa de 96 wells, suministrada con el kit (pre-recubierta con el anticuerpo específico para ratón). La interacción de las muestras con el anticuerpo se llevó a cabo durante 2,5 hs de incubación hasta la aparición de un cambio de color de azul a amarillo, detectado espectrofotométricamente a 450 nm utilizando un lector de microplacas (PHOmo, Anthos Mikrosysteme GmbH).

Dado que la intensidad de la solución coloreada es directamente proporcional a la concentración de VEGF secretada por las células ST-2, la técnica se utilizó para analizar

cómo se ve afectada la capacidad angiogénica de las células tratadas con los andamios a partir de la presencia de los nanomateriales [8].

#### 2.4.5 Análisis estadístico de los datos.

Todos los experimentos se repitieron al menos dos veces. Los valores obtenidos fueron expresados como el valor promedio de las réplicas y su desviación estándar. La significancia estadística fue analizada utilizando la prueba de *One-way-ANOVA*, las comparaciones múltiples se evaluaron mediante valores de p corregidos de acuerdo a la modificación de Bonferroni. El análisis estadístico se realizó con el programa Prims 7.2.

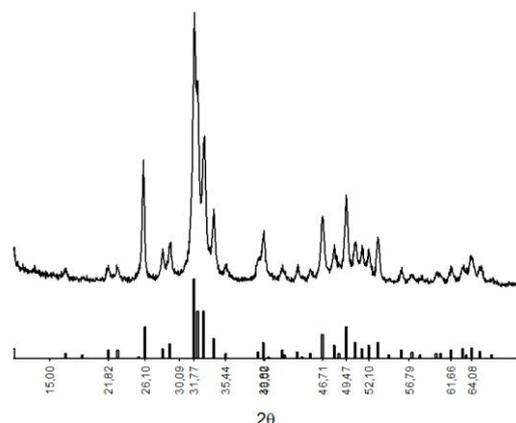
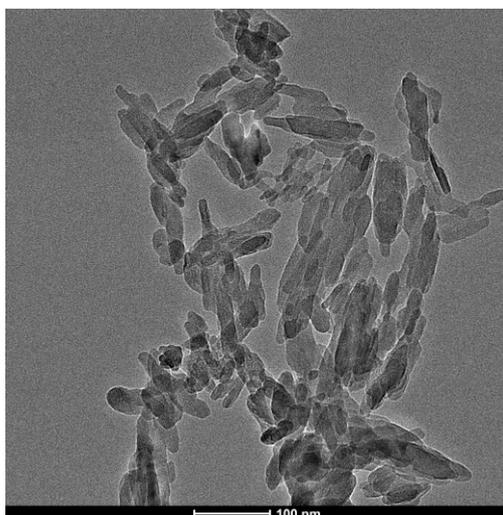
### Referencias

- [1] M. Mir *et al.*, “XRD, AFM, IR and TGA study of nanostructured hydroxyapatite,” *Mater. Res.*, vol. 15, no. 4, pp. 622–627, 2012.
- [2] H. Shin, J. Jung, S. Kim, and W. Lee, “XPS Analysis on chemical properties of calcium phosphate thin films and osteoblastic HOS cell responses,” *J Ind Eng Chem*, vol. 12, no. 3, pp. 476–483, 2006.
- [3] “materiales magneticos.” [Online]. Available: <https://es.slideshare.net/eber092168/materiales-magneticos-15653663>. [Accessed: 31-Jan-2020].
- [4] Q. Z. Chen, I. D. Thompson, and A. R. Boccaccini, “45S5 Bioglass®-derived glass-ceramic scaffolds for bone tissue engineering,” *Biomaterials*, vol. 27, no. 11, pp. 2414–2425, 2006.
- [5] “ISO - ISO 10993-5:2009 - Biological evaluation of medical devices — Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity.” [Online]. Available: <https://www.iso.org/standard/36406.html>. [Accessed: 31-Jan-2020].
- [6] P. R. Twentyman and M. Luscombe, “A study of some variables in a tetrazolium dye (MTT) based assay for cell growth and chemosensitivity,” *Br. J. Cancer*, vol. 56, no. 3, pp. 279–285, 1987.
- [7] Sigma-Aldrich, “Cell Counting Kit 8 - Product Information,” vol. 8, 2013.
- [8] P. Nooeaid *et al.*, “Development of bioactive glass based scaffolds for controlled antibiotic release in bone tissue engineering via biodegradable polymer layered

- coating,” *Biointerphases*, vol. 9, no. 4, p. 041001, 2014.
- [9] I. Manual, “Cell Proliferation ELISA, BrdU (chemiluminescence),” *E-Labdoc.Roche.Com*, no. 11, pp. 1–23, 2011.
- [10] W. Li *et al.*, “Antibacterial 45S5 Bioglass®-based scaffolds reinforced with genipin cross-linked gelatin for bone tissue engineering,” *J. Mater. Chem. B*, vol. 3, no. 16, pp. 3367–3378, Apr. 2015.
- [11] P. Balasubramanian, L. Hupa, B. Jokic, R. Detsch, A. Grünewald, and A. R. Boccaccini, “Angiogenic potential of boron-containing bioactive glasses: in vitro study,” *J. Mater. Sci.*, vol. 52, no. 15, pp. 8785–8792, 2017.

# Capítulo III

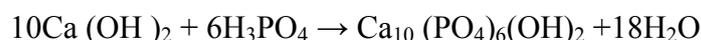
## Síntesis, caracterización y biocompatibilidad de nanocompositos a base de hidroxiapatita



### 3.1. Introducción

Como se mencionó previamente en el *Capítulo I* la importancia de obtener HA sintética de tamaño nanométrico radica en la necesidad de recrear las condiciones naturales de las cerámicas presentes en la estructura ósea. En la literatura se encuentran publicados varios métodos para la obtención de nanocristales a base de HA: deposición química húmeda, deposición biomimética, sol-gel y electrodeposición. Dependiendo de las técnicas y métodos utilizados en el proceso de síntesis es posible obtener diferentes morfologías, tamaños, estequiometrias y niveles de cristalinidad de las apatitas sintéticas [1], [2]. De todos los métodos mencionados, la técnica de deposición química húmeda es una de las más utilizada debido a su simplicidad y bajo costo, lo que también la hace adecuada para su utilización a nivel de producción industrial. Debido a las ventajas mencionadas, todos los protocolos de síntesis utilizados en el marco del presente trabajo de tesis doctoral involucraron métodos húmedos en fase acuosa.

**Deposición química húmeda:** Yagai y Aoki [3] propusieron la síntesis de nanocristales de HA(HAp) mediante la reacción de precipitación química húmeda siguiente:



La forma, el tamaño y la superficie específica de las nanopartículas de HA obtenidas por este método son muy sensibles a la velocidad de agregado de reactivo y a la temperatura de reacción. La velocidad de agregado de reactivo determina la pureza de la HAp sintetizada y está ligada fuertemente al valor de pH obtenido al final de la síntesis. Además, la temperatura de reacción determina si los cristales son monocristalinos o policristalinos. Las nanopartículas de HA sintetizadas a temperatura menores de 60 °C resultan ser monocristalinas. Por encima de esta temperatura los nanocristales se convierten en policristalinos.

**Deposición Biomimética:** Los fluidos biológicos simulados (SBF) a temperaturas fisiológicas y con una composición de sal inorgánica y pH similar a la del plasma de sangre humana, facilitan la nucleación espontánea y el crecimiento de HA carbonatadas (HAC) de tamaño nanométrico con características "similares al hueso". Estos métodos fueron utilizados por primera vez por Kokubo [4] para probar la similitud de

comportamiento en tubo de ensayo e *in vitro* de composiciones de cerámica de vidrio (dicho método será utilizado en los *Capítulos V y VI* para evaluar la bioactividad de los andamios 3D obtenidos). Esta HA biomimética en polvo se puede obtener a partir de nitrato de calcio tetrahidratado y de hidrógeno fosfato diamónico disueltas en SBF a 37 °C y pH = 7,4 mediante un proceso de precipitación química. El promedio de tamaños de los granos de polvo después de la sinterización suele ser inferior a la micra.

Por otro lado, como se discutió previamente en el *Capítulo I*, la incorporación de iones metálicos en las apatitas sintéticas permite modificar propiedades fisicoquímicas de las mismas; tales como su resistencia mecánica y su capacidad de disolución, entre otras [5],[6],[7]. En particular, ciertos iones metálicos tales como el  $Mg^{2+}$  y  $Zn^{2+}$ , participan e intervienen activamente durante el metabolismo óseo, por lo que una modificación de la fase HA con dichos iones permitiría posiblemente lograr una mejor aproximación a la estructura y composición de las apatitas biológicas. La incorporación de los iones  $Fe^{2+}/Fe^{3+}$ , dependiendo de las cantidades utilizadas, otorgaría a su vez propiedades magnéticas a los nanomateriales, esta estrategia de modificación de la HAp permitiría obtener nanocompuestos biocompatibles con propiedades superparamagnéticas. En la literatura se han empleado diversos métodos de síntesis para producir materiales de fosfato de calcio modificados con iones de Mg, Sr, Mn, Fe, Zn y Ag, que muestran características cristalinas, morfológicas y estequiométricas que dependen en gran medida del método de producción [8]–[10]. Pansieri *et al.* [11], [12] propusieron la síntesis de hidroxiapatita enriquecida con hierro (FeHAp). El material demostró ser biocompatible y tener la capacidad de mejorar la proliferación celular y la actividad de los osteoblastos *in vitro*. Para la incorporación de iones  $Fe^{2+}/Fe^{3+}$  en la estructura existen diversas metodologías de trabajo según lo descrito por Tampieri *et al.*: *método reductivo*, *método oxidativo*, o de *adición simultánea* [13].

*\*Método reductivo:* se utiliza la sal de  $FeCl_3 \cdot 6H_2O$  como fuente de iones  $Fe^{3+}$ , los cuales reemplazan sitios del ión  $Ca^{2+}$  durante la nucleación de la HAp. Este sistema se liofiliza para luego llevar a cabo un proceso reductor posterior que utiliza una mezcla gaseosa compuesta de Argón e Hidrógeno como atmósfera reductora a diferentes presiones, para convertir parte de los iones  $Fe^{3+}$  en iones de  $Fe^{2+}$ , los que se mantienen dentro de la red de la HAp.

*\*Método oxidativo:* utiliza la oxidación espontánea de iones  $Fe^{2+}$  debido a su capacidad de oxidarse con el oxígeno del ambiente. Se emplea la sal de  $FeCl_2 \cdot 4H_2O$  como fuente de iones  $Fe^{2+}$  en la síntesis de Ferrohdroxiapatita.

*\*Adición simultánea:* En esta estrategia de síntesis se agregan simultáneamente las sales de hierro  $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  y  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  como fuente de iones  $\text{Fe}^{2+}$  y  $\text{Fe}^{3+}$ , respectivamente. Dado que la forma más eficiente de controlar las cantidades de iones  $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$  incorporados en el material final se produce mediante este método, será el utilizado y descrito para la obtención de FeHAp.

A lo largo de este *Capítulo* se describirán los métodos de síntesis utilizados para la obtención de nanopartículas a base de hidroxiapatita, seguido de las adaptaciones llevadas a cabo para la incorporación de iones metálicos bi y trivalentes en la estructura de estos nanomateriales. Se discutirán los resultados de las caracterizaciones realizadas de los compositos obtenidos y los ensayos de biocompatibilidad testados en células fibroblásticas derivadas de ratón 3T3Balb-c.

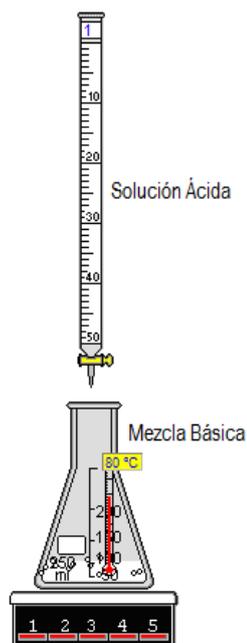
### ***3.2. Protocolos de síntesis para la obtención de HAp y su optimización para la incorporación de metales bi y trivalentes.***

A continuación se detallan los procedimientos experimentales empleados para la síntesis de HAp mediante la estrategia de deposición química húmeda

#### ***»Síntesis mediante goteo***

Dado que la velocidad de adición de los reactivos es un factor condicionante en el tamaño de las partículas y la composición de las fases obtenidas, se optimizó un método de síntesis por goteo.

Se calentó gradualmente una suspensión básica preparada a partir de 4,8 g de  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  en 40 mL de  $\text{H}_2\text{O}$  (MilliQ) hasta alcanzar  $80^\circ\text{C}$  utilizando una platina con agitación magnética (450 rpm). Al mismo tiempo se preparó una solución de 2,8 mL de  $\text{H}_3\text{PO}_4$  en 58 mL de agua MilliQ. Cuando la suspensión básica alcanzó la temperatura deseada, se goteó desde una bureta la solución de  $\text{H}_3\text{PO}_4$  a una velocidad controlada de 0,5 mL/min. Finalizado el goteo se mantuvo la temperatura de la mezcla durante 1 hora más. El montaje utilizado para la síntesis se esquematiza en la *Figura 3.1*.



**Figura 3.1.** Diseño experimental de la síntesis de HAp mediante el método de goteo.

El sólido obtenido se filtró mediante succión utilizando filtros hidrofílicos de  $0,22\mu\text{m}$ , se le realizaron 3 lavados con agua ultrapura y posteriormente se secó a  $80^{\circ}\text{C}$  durante 24hs para favorecer el proceso de secado.

### **»Síntesis mediante goteo de HAP enriquecida con iones metálicos**

De acuerdo a lo publicado en literatura, dependiendo del ion metálico a introducir en la estructura de la HA pueden utilizarse diversas estrategias experimentales. Durante el desarrollo de este trabajo, en una primera instancia se optimizaron los métodos para la obtención de FeHAp con propiedades magnéticas y posteriormente dichos métodos se adaptaron y utilizaron para la obtención de partículas modificadas con los iones magnesio y zinc.

Como se mencionó anteriormente, la forma más eficiente de controlar las cantidades de iones  $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$  incorporadas se produce mediante el método de adición simultánea. Por ello, se utilizaron métodos de goteo modificados a partir de la adición simultánea de iones para lograr la obtención de HAp modificada con Fe. Para evitar la formación de hidróxidos y óxidos del metal durante el agregado de las sales, el pH fue una variable a tener en cuenta. A su vez, otro factor que influyó en la morfología y tamaño de las nanopartículas sintetizadas fue la temperatura.

El método de goteo permitió diseñar un protocolo experimental que permite controlar el tamaño de los nanomateriales y a su vez reducir el tiempo de residencia de los iones

$\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$  en la solución alcalina, lo cual reduce la formación de hidróxidos y oxidación de los iones ferroso [14].

Para estudiar cómo se veían afectadas las propiedades magnéticas de los materiales obtenidos por variaciones en la temperatura de reacción, se realizaron síntesis a 65° C, 80°C y 95°C (límite superior para la variación de T ya que el solvente utilizado fue agua).

La síntesis se llevó a cabo de forma equivalente a la utilizada para obtener HAp; para ello 4,8 g de  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  se disolvieron en 40 mL de  $\text{H}_2\text{O}$ , la suspensión se calentó gradualmente hasta alcanzar la temperatura deseada bajo agitación magnética constante. Al mismo tiempo se preparó una solución que contenía 63 mL de agua MilliQ, 2,8 mL de  $\text{H}_3\text{PO}_4$ , 1,301 g de  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  y 1,2747 g de  $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ .

Para evitar la formación de óxidos u hidróxidos de hierro durante la preparación de la solución ácida se debió seguir un orden específico al adicionar los reactivos. Primero se agregó  $\text{H}_3\text{PO}_4$  al agua seguido de la sal de  $\text{Fe}^{+3}$  y por último la sal de  $\text{Fe}^{+2}$ , de forma de mantener los iones metálicos complejados con los iones fosfato generando una solución incolora. Antes de iniciar la síntesis se controló si en la solución persistía el color anaranjado, en cuyo caso se agregó más  $\text{H}_3\text{PO}_4$  para mantener al hierro en su forma iónica en solución.

La cantidad específica de cada sal de hierro utilizada se calculó a partir de la siguiente relación:

$$X = \frac{\text{moles Fe}^{2+} + \text{moles Fe}^{3+}}{\text{moles Ca}^{2+}} \quad (\text{Ec } 13)$$

Donde se fijaron los moles  $\text{Fe}^{2+}$  iguales a los moles de  $\text{Fe}^{3+}$ . Para realizar los cálculos se utilizó un valor de  $X=0,2$  ya que en estudios publicados en la bibliografía se informa que para ese valor, los materiales obtenidos presentan propiedades magnéticas [14]. Para calcular las cantidades necesarias de los reactivos se tomó el criterio de mantener la relación  $\text{Ca}/\text{P}=1,67$  constante (característica de la fase HA). Algunos autores sugieren que dado que los iones metálicos se intercambian por los iones  $\text{Ca}^{2+}$  en la estructura de la hidroxiapatita, es necesario calcular la cantidad de metal a adicionar modificando la

relación Ca/P inicial [15],[16]. Este factor se discutirá con más detalle al analizar las cantidades necesarias para la síntesis de ZnHAp.

La solución ácida se adicionó desde la bureta, mediante un goteo controlado de 0,5 mL/min manteniendo constante la temperatura y la agitación de la mezcla durante todo el proceso. En este caso la suspensión paso de un color blanco (debido al  $\text{Ca}(\text{OH})_2$ ) a un color amarronado ocasionado por la formación de las nanopartículas FeHAp. Una vez finalizado el agregado se mantuvo el calentamiento y la agitación durante 1 hora más. La separación y purificación del sólido se llevó a cabo mediante filtración por succión, se le realizaron 3 lavados con agua y se dejó secar en la estufa a 80°C durante 24 hs.

El método de síntesis para las partículas de HAp modificadas con magnesio y zinc fue equivalente al desarrollado para la obtención de FeHAp. En estos casos la temperatura de síntesis se fijó en 80 °C y las sales de los respectivos metales se disolvieron en la solución ácida. Las cantidades de sales a utilizar se calcularon de acuerdo a la fórmula:

$$X = \frac{\text{moles Me}^{2+}}{\text{moles Ca}^{2+}} \quad (\text{Ec 14})$$

En el caso de los nanomateriales modificados con Mg y Zn simultáneamente la fórmula utilizada fue:

$$X = \frac{\text{moles Mg}^{2+} + \text{moles Zn}^{2+}}{\text{moles Ca}^{2+}} \quad (\text{Ec 15})$$

La tabla 3.1 resume los reactivos y las cantidades utilizadas para la obtención de cada tipo de nanomaterial.

| <b>Partícula</b> | <b>X</b> | <b>Reactivo</b>                      | <b>Masa (g)</b> |
|------------------|----------|--------------------------------------|-----------------|
| FeHAp            | 0,2      | FeCl <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O | 1,2747          |
|                  |          | FeCl <sub>3</sub> .6H <sub>2</sub> O | 1,8301          |
| MgHAp            | 0,1      | MgCl <sub>2</sub>                    | 1,9314          |
| ZnHAp            | 0,1      | ZnCl <sub>2</sub>                    | 1,5810          |
| MgZnHAp          | 0,1      | MgCl <sub>2</sub>                    | 1,5542          |
|                  |          | ZnCl <sub>2</sub>                    | 1,2058          |

**Tabla 3.1 .** Tipos de nanopartículas sintetizadas y cantidades utilizadas.

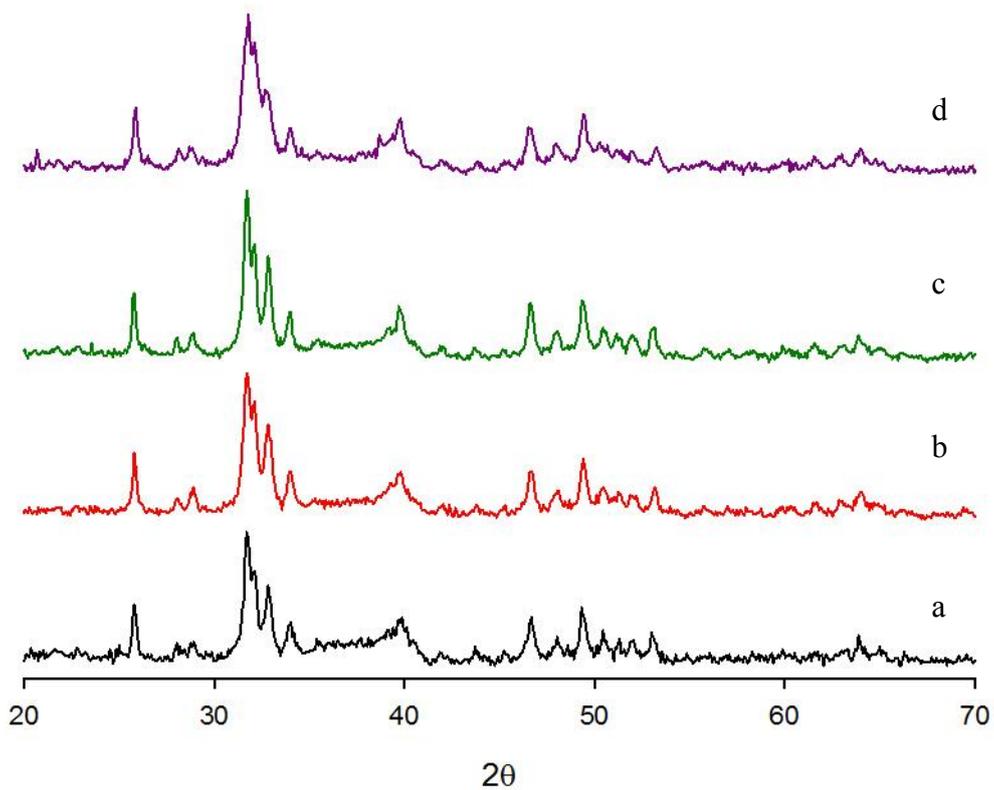
Para evaluar el efecto de modificar la relación Ca/P en presencia del/los ión/es metálicos, se realizó una síntesis bajo similares condiciones experimentales donde el agregado de  $Zn^{2+}$  se calculó a partir de (i) la relación  $(Ca^{2+} + Zn^{2+})/ P = 1,67$  y (ii) utilizando la ecuación (14) y la condición  $Ca/P=1,67$  constante. Los análisis de DRX mostraron que la deficiencia de calcio (condición (i)) favoreció la formación de una mezcla de distintas fases de CaP entre ellas HA, monetita y opeita. Sin embargo, como se verá en los siguientes apartados, el procedimiento (ii) permitió la obtención de HA como fase mayoritaria con poca presencia de impurezas. Por dicho motivo, todos los nanomateriales presentes en la Tabla 3.1 se obtuvieron fijando la relación de moles de calcio sobre los moles de fósforo en 1,67; independientemente de la presencia de los iones metálicos.

### ***3.3 Caracterización de los nanocompositos obtenidos.***

#### ***3.3.1 DRX***

Los patrones de difracción para todas las partículas mostraron picos que están de acuerdo con lo esperado para polvos de hidroxiapatita publicados en la literatura [17]. Según datos bibliográficos, los picos a  $2\theta$  de 26,1; 31,7; 32,92; 46,41 y 49,47 corresponden a los planos hkl 201, 210, 112, 203, 222, respectivamente, de la estructura hexagonal de la HA [18].

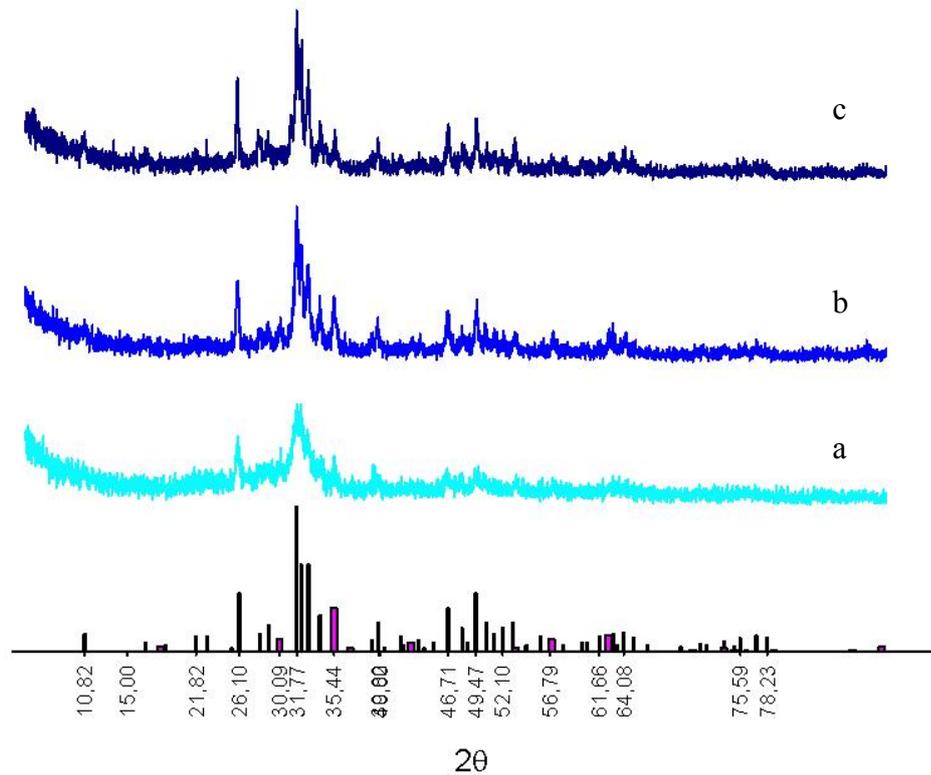
Como se muestra en la *Figura 3.2* las fases de impureza, como el fosfato tricálcico  $\alpha$  y  $\beta$  (TCP), no se encuentran presentes o lo están en niveles muy bajos, ya que no se observan contribuciones de los picos intensos de TCP a  $2\theta$  30,5 ° - 31,6 [19]. Además, el análisis de DRX no registró la presencia de sales co-cristalizadas dentro de límites detectables de 1 a 3% en peso. Estas observaciones sugirieron que durante el proceso de síntesis se forman principalmente dominios cristalinos de hidroxiapatita.



**Figura 3.2.** Difractogramas obtenidos de abajo hacia arriba: curva negra HAp (a), curva roja MgZnHAp(b), curva verde MgHAp(c), curva violeta ZnHAp (d).

En el caso de las muestras de FeHAp se puede hacer un análisis particular ya que, a parte de los picos característicos de la fase HA, a su vez se observan picos a  $2\theta$  de 30,09; 35,44; 56,79 correspondientes a los planos hkl 220, 311, 333 de la estructura cúbica de la magnetita (*Figura 3.3*) [14].

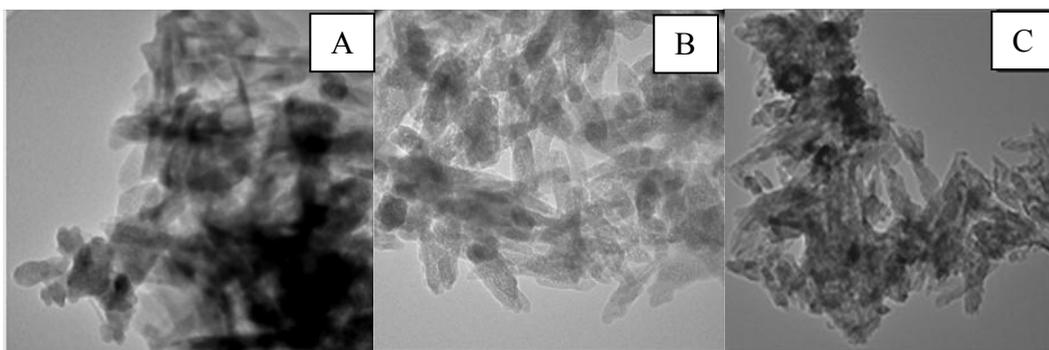
Por un lado, a medida que aumenta la temperatura de síntesis se puede distinguir que los picos correspondientes a la fase de HA a  $2\theta = 26,1; 31,7$  y  $32,92$  aumentan su intensidad y son más angostos, lo que indicaría un incremento en la cristalinidad de la fase de HA. A su vez, se observa que el pico a  $2\theta = 35,44$  perteneciente a la fase de magnetita aumenta con la temperatura de síntesis, presentando un máximo cuando la misma es de  $80^\circ\text{C}$ . Como se mostrará en las secciones siguientes, este hecho concuerda con que las muestras sintetizadas a dicha temperatura experimentan una magnetización de saturación mayor que las obtenidas a  $65^\circ$  y  $95^\circ\text{C}$ .



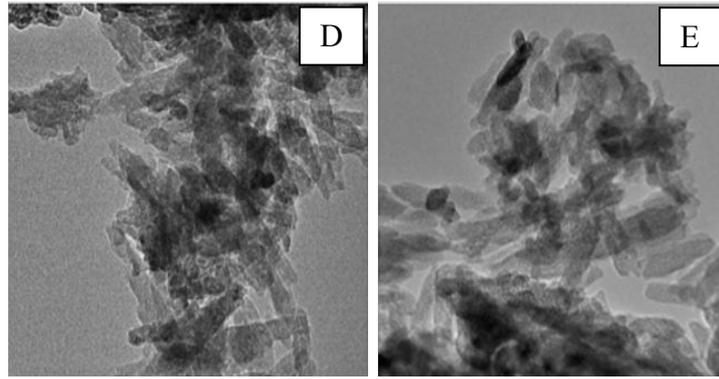
**Figura 1.3.** El difractograma celeste corresponde a las FeHAp sintetizada a 65°C (a), el azul a 80°C (b), y el azul oscuro a 95°C(c). El grafico de barras gris corresponde a los picos característicos de la fase HAp y el rosa a los picos característicos de la magnetita [14].

### 3.3.2 TEM acoplado a EDS.

Las micrografías TEM obtenidas para HAp, MgHAp, ZnHAp, MgZnHAp y FeHAp mostraron en todos los casos, la formación de nanopartículas cristalinas similares a nano-barras, con un espaciamiento reticular de 0,34nm, presentando un ancho de 10-20 nm y una longitud de entre 50 y 100 nm (*Figuras 3.4 y 3.5*), en línea con las propiedades morfológicas de HAp [20]. Desafortunadamente, debido al alto grado de aglomeración de las partículas, no fue posible obtener una distribución de sus tamaños.

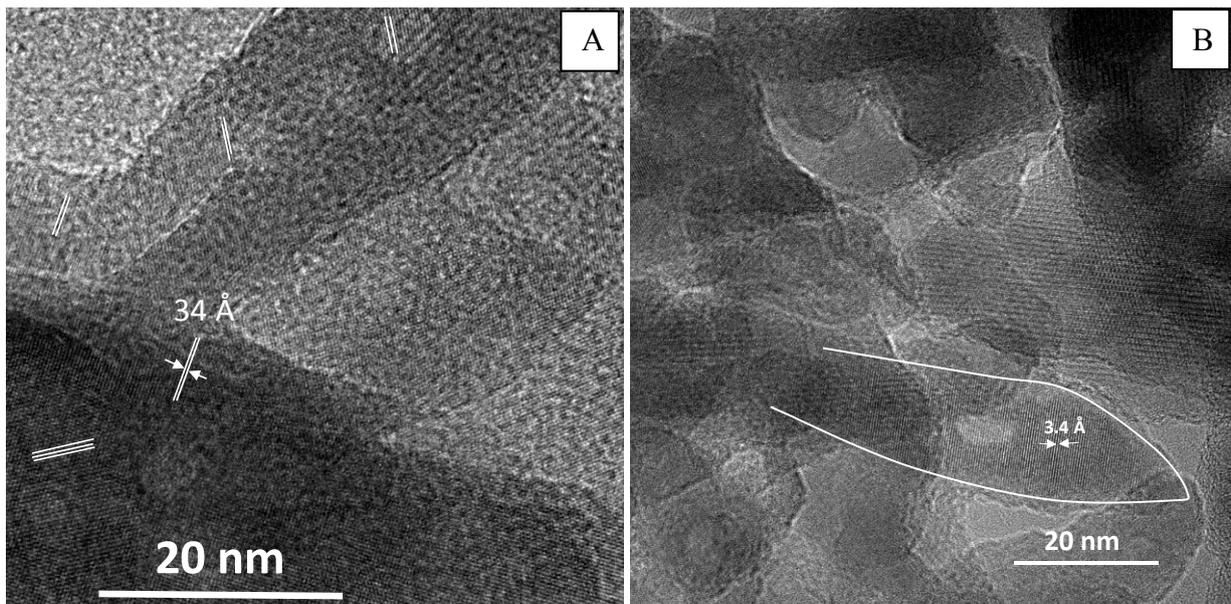


**Figura 3.4.** Micrografías TEM de similar magnificación obtenidas para A)HAp, B) MgHAp , C) FeHAp.



**Figura 3.5.** Micrografías TEM obtenidas para D) ZnHAp and E) MgZnHAp.

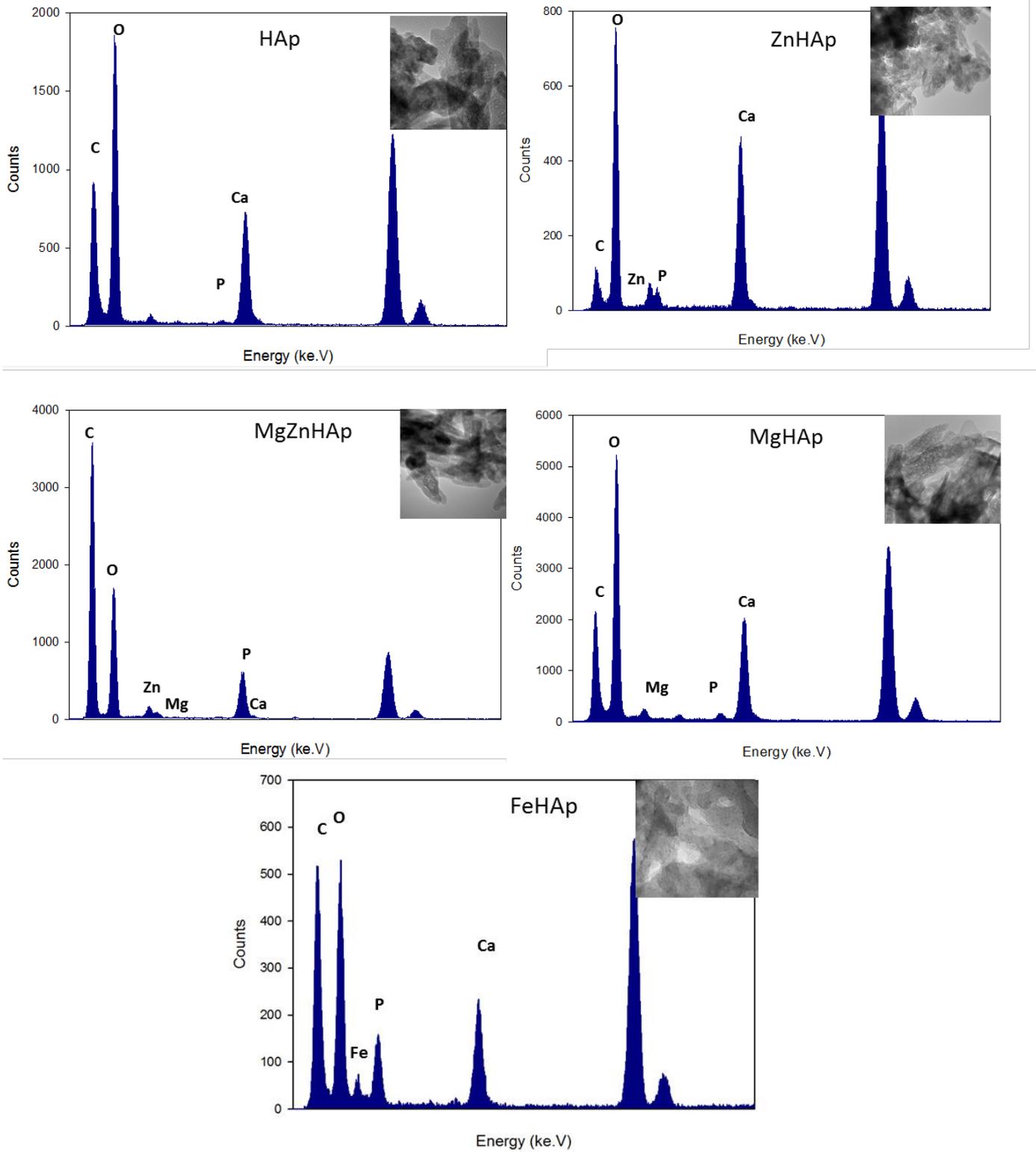
Los patrones de difracción de electrones de área seleccionada (SAED), ver *Figura 3.6*, mostraron en todos los casos distancias de planos cristalinos característicos para nanopartículas de HAp [21], [22]. Por simplicidad, en la figura solo se muestran los patrones obtenidos para HAp y MgZnHAp.



**Figura 3.6.** Micrografías TEM A) HAp, B) MgZnHAp.

Los patrones característicos para los planos (002) con distancias de 0,344 nm se encontraron presentes en todas las muestras. Sólo en las imágenes obtenidas para ZnHAp y HAp se pudo observar una separación de 0,816 nm característica de los planos (011) en la fase HA [21], [22].

Los análisis EDS realizados en la superficie de los nanomateriales confirmó la presencia de los metales en los mismos: Fe en FeHAp y Mg y Zn en ZnHAp, MgZnHAp y MgHAp, respectivamente.



**Figura 3.7.** Análisis EDS de izquierda a derecha HAp y ZnHAp (arriba), MgZnHAp y ZnHAp de izquierda a derecha (abajo) y FeHAp .

Si bien, dadas las condiciones de la superficie no fue posible realizar un cálculo cuantitativo de las cantidades presentes de cada metal en las muestras, cualitativamente se pudo observar que las partículas de MgZnHAp muestran preferentemente la presencia de Zn con respecto a cantidades mucho menores de Mg. La presencia de picos de Cu en los análisis de EDS se debe a los soportes utilizados para llevar a cabo la medición.

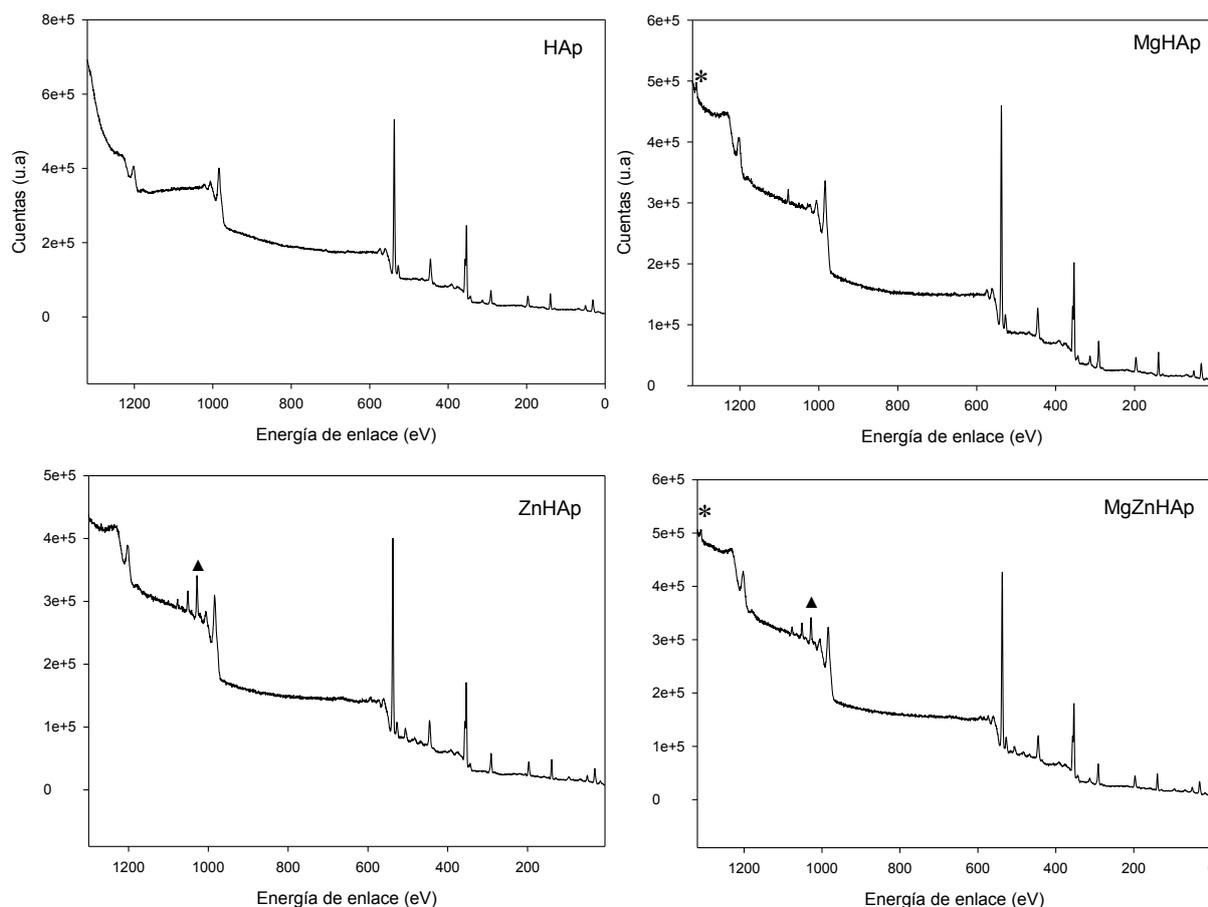
### 3.3.3 Espectroscopia Fotoelectrónica de rayos X

Los espectros de “sondeo” de los picos de XPS de todas las muestras presentaron las líneas principales para Ca, O y P, así como el pico de C1s a 284,6 eV (*Figura 3.8*). Debido a la presencia de óxidos de hierro superficiales, el análisis para las muestras de FeHAp se discutirá por separado mas adelante.

En todas las muestras se observaron los picos correspondientes a las líneas de Ca2p<sub>1/2</sub> y Ca2p<sub>3/2</sub> a 347,0 eV separadas por 3,5 eV, y las líneas de P 2p<sub>1/2</sub> y P 2p<sub>3/2</sub> a 133 eV separadas por 0,9 eV, características de las muestras de apatita. La deconvolución de los picos de O1s mostró la contribución del pico a 531,6 eV, correspondiente a oxígeno rodeado por un ambiente de fosfatos, oxidrilos o agua adsorbida [23], junto con otras contribuciones menos importantes a 532,8 eV, que pueden asignarse a materia orgánica espuria y carbonatos adsorbidos. De hecho, las señales de C1s tanto en la HAp como en la modificada con metales, mostraron una contribución de los átomos de C en un ambiente correspondiente a un carbonato con una energía de enlace, BE de sus siglas en inglés, de 289,0 eV [24]. Sin embargo, debido a la presencia de contaminación orgánica espúrea, cualquier análisis cuantitativo de esta contribución al pico de C1s se encuentra sujeto a un gran error. Las contribuciones debidas a MgO y ZnO en la señal correspondiente al O1s a 530,0 eV no se pueden descartar [25], ya que el área de pico en esta energía de enlace para las muestras de ZnHAp, MgHAp y MgZnHAp aumenta con respecto a lo observado para la HAp sin metales, ver *Tabla 3.2*.

Las muestras de MgHAp y ZnHAp también mostraron señales debidas a Mg 1s y Zn 2p, respectivamente, mientras que las muestras de MgZnHAp presentron ambas señales. Se realizó una deconvolución de las señales de Mg 1s y Zn 2p para identificar su entorno químico en la superficie de las partículas. Para ello, se utilizó una línea de base tipo Shirley con un 20% de linealidad permitida.

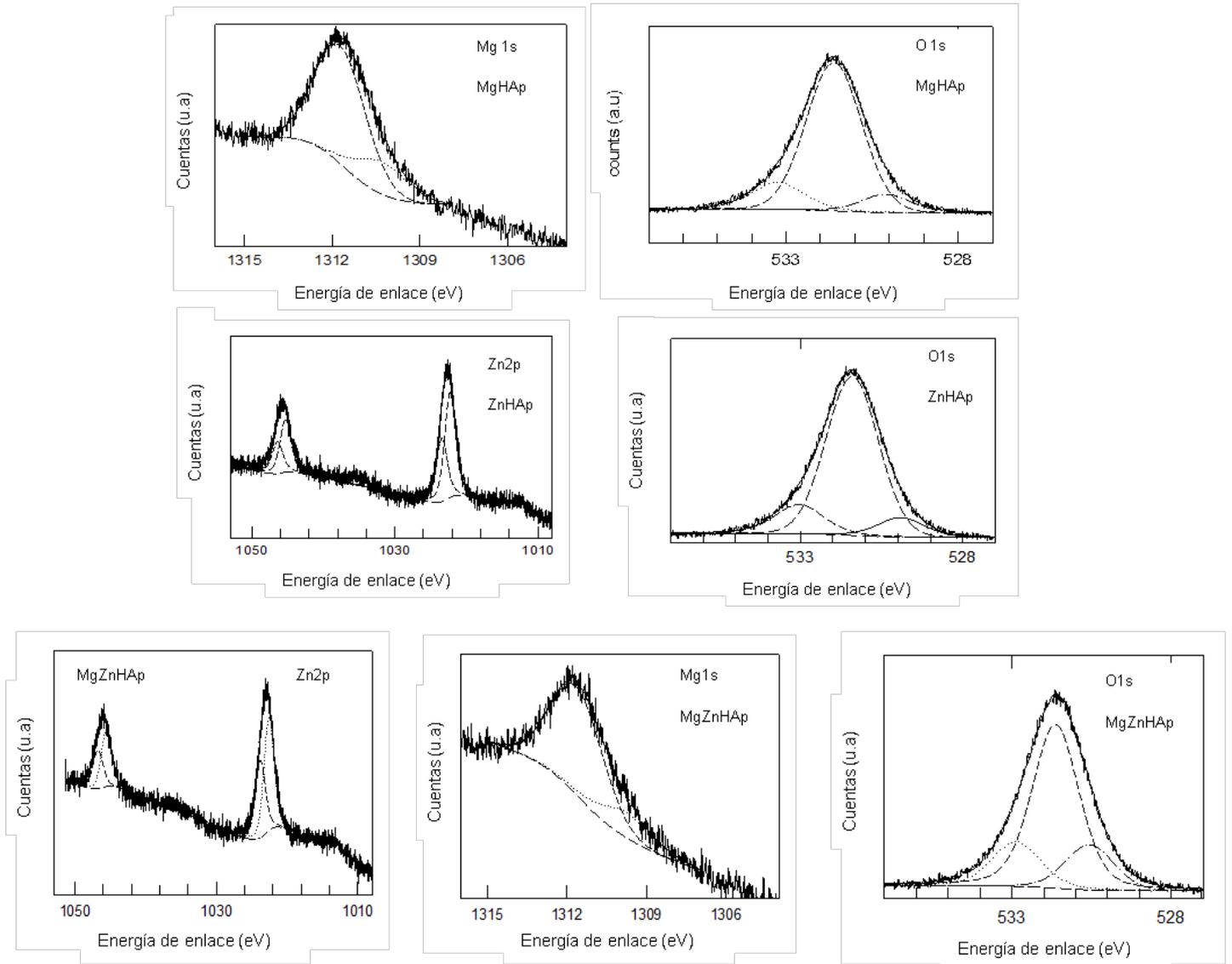
Las señales de Zn2p mostraron componentes de órbita de espín significativos con una separación de 23 eV. Se observaron dos contribuciones a la región de Zn 2p<sub>3/2</sub> una con energía de enlace de 1022 eV que podría asignarse a ZnO y una segunda contribución con 1023,4 eV características de las sales de Zn<sup>2+</sup> (NIST) [25]. El porcentaje de contribución de picos observado para el ZnO de 60% y el de Zn<sup>2+</sup> de 40% se mantuvo en ambas nanopartículas, ZnHAp y MgZnHAp.



**Figura 3.8.** Espectros *survey* XPS obtenidos para HAp, MgHAp, ZnHAp y MgZnHAp de izquierda a derecha y de arriba hacia abajo. Los símbolos ▲ y \* representan los picos correspondientes a Zn 2p y Mg 1s respectivamente.

Las nanopartículas MgHAp y MgZnHAp mostraron la contribución de picos con energía de enlace de 1304,2 y 1305,5 eV a las señales de Mg 1s, ver *Figura 3.9*, las cuales se pueden atribuir a MgO (aprox. 35%) y sales de Mg<sup>2+</sup> (aprox. 65%) (NIST), respectivamente como se muestra en la *Tabla 3.2*. Estos resultados sugieren que en la superficie de las partículas, Zn y Mg, están parcialmente oxidados. Sin embargo, mientras que el MgO contribuye en un 35% al total de Mg incorporado, el ZnO contribuye con un 60% al total de Zn incorporado.

Teniendo en cuenta los factores de sensibilidad experimentales para los diferentes elementos, se determinaron relaciones de superficie de P/Ca y O/Ca de 0,6 y 2,8 para HAp, en línea con los valores teóricos esperados de 0,6 y 2,6, respectivamente. El aumento de los valores de P/Ca y O/Ca (ver *Tabla 3.2*) observado para Zn y apatita modificada con Mg está en línea con la sustitución de iones  $\text{Ca}^{2+}$  por  $\text{Mg}^{2+}$  o  $\text{Zn}^{2+}$ .



**Figura 3.9.** Señales XPS de Zn2p, Mg1s y O1s en ZnHAp, MgHAp y MgZnHAp. Las líneas discontinuas representan las diferentes contribuciones a la señal principal.

Se sugiere en la bibliografía, que proporciones de  $(\text{Ca} + \text{Zn} + \text{Mg}) / \text{P} < 1,67$  son típicos de apatitas deficientes en calcio. Los valores de  $(\text{Ca} + \text{Zn} + \text{Mg}) / \text{P}$  de  $1,55 (\pm 0,1)$  y  $1,58 (\pm 0,1)$  observados para ZnHAp y MgZnHAp indican que cualquier deficiencia de

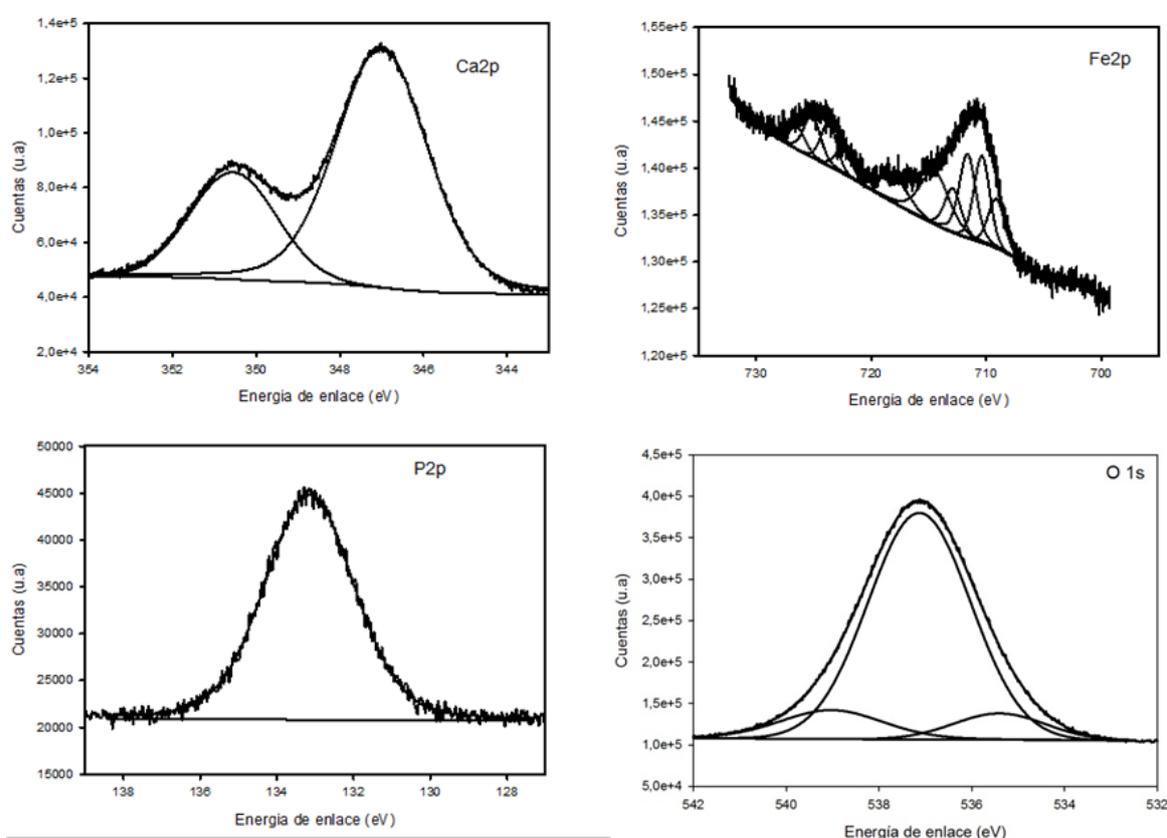
calcio en estos materiales no es muy significativa. En cambio un valor de  $(Ca + Zn + Mg) / P = 1,31 (\pm 0,1)$  en las muestras de MgHAp permite suponer una apatita claramente deficiente en calcio [26].

Las cantidades de Zn y Mg incorporadas, representadas en la *Tabla 3.2*, son entre un 15-25% menores de los valores esperados considerando la concentración analítica utilizada en los respectivos procedimientos de síntesis. Una baja incorporación de iones  $Mg^{2+}$  y  $Zn^{2+}$  en la red de HAp podría ser asignado a la distorsión de la red hexagonal debido al tamaño significativamente menor de los iones  $Mg^{2+}$  y  $Zn^{2+}$  con respecto a los iones de  $Ca^{2+}$  (con radios iónicos de 0,72; 0,74 y 0,99 Å, respectivamente) causando tensión de enlace y disminución de la cristalinidad [27].

|                     | HAp               | ZnHAp             | MgHAp             | MgZnHAp           |
|---------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| <b>O1s</b>          | 529,7 (< 8%)      | 529,9 (15%)       | 530,0 (14%)       | 530,6 (17%)       |
|                     | 531,0 (73%)       | 531,4 (76%)       | 531,2 (73%)       | 531,6 (65%)       |
|                     | 532,4 (19%)       | 533,0 (9%)        | 532,9 (13%)       | 532,9 (17%)       |
| <b>Zn</b>           | ----              | 1022,3 (62%)      | ----              | 1022,6 (59%)      |
|                     |                   | 1023,4 (38%)      |                   | 1023,8 (41%)      |
| <b>Mg</b>           | ----              | ----              | 1304,3 (35%)      | 1304,0 (37%)      |
|                     |                   |                   | 1305,6 (65%)      | 1305,3 (63%)      |
| <b>P/Ca</b>         | 0,6               | 0,7               | 0,8               | 0,7               |
| <b>O/Ca</b>         | 2,8               | 3,1               | 3,1               | 3,25              |
| <b>Zn:Ca</b>        | 0                 | 0,09              | ----              | 0,065             |
| <b>Mg:Ca</b>        | 0                 | ----              | 0,05              | 0,04              |
| <b>(Ca+Zn+Mg)/P</b> | 1,67( $\pm 0,1$ ) | 1,55( $\pm 0,1$ ) | 1,31( $\pm 0,1$ ) | 1,58( $\pm 0,1$ ) |

**Tabla 3.2** . Energía de enlace (en eV) y % de contribución (entre paréntesis) para las señales XPS de O1s, Ca2p, P2p, Zn2p y Mg1s en las nano partículas de HAp, ZnHAp, MgHAp y MgZnHAp.

Los espectros XPS de alta resolución obtenidos para las partículas FeHAp (*Figura 3.10*) se discuten por separado dado que los picos de Fe presentan ciertas particularidades a la hora de analizarlos. El análisis de los picos utilizando distribuciones amplias ha demostrado ser útil para la identificación de compuestos puros, pero de poco valor en la identificación de mezclas de compuestos debido a la superposición espectral de la mayoría de compuestos de  $\text{Fe}^{+3}$  que muestran energías de unión similares pero diferentes formas de los picos, intensidades y satélites. Se utilizó una línea de base tipo Shirley con un 20% permitido de linealidad y un ancho de banda a media altura (FWHM) de 1,7 eV para todos los picos, salvo para los satélites separados por 4,8-5 eV a los que se permitió un FWHM de 3 eV.



**Figura 3.10** Espectro XPS de alta resolución de las nanopartículas de FeHAp.

La deconvolución de los picos de O1s mostró una contribución de 81% de una banda a 531,6 eV, correspondiente a oxígeno en un ambiente de fosfatos [23], y otras contribuciones menos importantes a 529,9 (8%) y 533.5 (11%) eV características de los átomos de O en ambientes de óxido de hierro [25] y del oxígeno orgánico o proveniente de agua adsorbida, respectivamente.

|              | HAp              | FeHAp       |
|--------------|------------------|-------------|
| <b>O1s</b>   | 529,7 (< 8%)     | 529,9 (8%)  |
|              | 531,0 (73%)      | 531,6 (81%) |
|              | 532,4 (19%)      | 533,5 (11%) |
| <b>Fe</b>    | ----             | 710,6 (40%) |
|              |                  | 712,4 (36%) |
|              |                  | 714,9 (17%) |
|              |                  | 718,3 (7%)  |
| <b>Ca/P</b>  | 1.67( $\pm$ 0,1) | 1.14        |
| <b>O/Ca</b>  | 2,8              | 3,0         |
| <b>Fe:Ca</b> | 0                | 0,014       |

**Tabla 3.3 .** Energía de enlace (en eV) y% de contribución (entre paréntesis) para las señales XPS de O1s, Ca2p, P2p, Fe2p en las nano partículas de HAp, FeHAp.

Las señales de Fe2p muestran claramente las regiones Fe2p<sub>3/2</sub> y Fe2p<sub>1/2</sub>, separados aproximadamente por 13,0–13,3 eV, y la presencia de satélites desplazados por aproximadamente 5 eV, en concordancia con el comportamiento esperado para los óxidos de Fe y sus sales. Se descarta la presencia de Fe metálico. Del análisis se observa la contribución de picos Fe2p<sub>3/2</sub>, Fe2p<sub>1/2</sub> y satélite con BE de 712,4; 725 y 718,26 eV que son característicos de Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, mientras que aquellos con BE de 710,6, 723,6 y 714,9 eV son característicos de FeO y Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> [28]. La *Tabla 3.3* muestra la contribución relativa de los picos. De la relación de área de las contribuciones con BE de 712,4 y 710,6 eV a la banda Fe2p<sub>3/2</sub>, ver *Tabla 3.3*, se puede inferir una relación Fe<sup>3+</sup> : Fe<sup>2+</sup> de 0.9;1 muy similar a la relación analítica empleada en la síntesis.

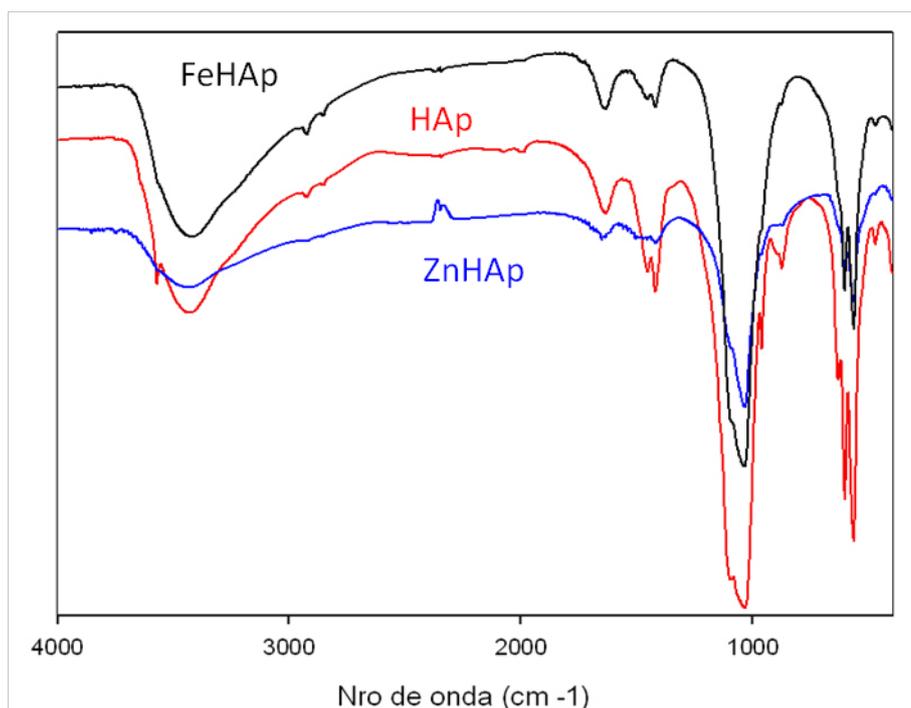
Si se toman en cuenta los factores de sensibilidad relativos a cada elemento, se pueden calcular las relaciones entre ellos, tal como se hizo anteriormente para las otras nanopartículas en base a HA. La *Tabla 3.3* muestra estas relaciones. La relación Ca/P =

1.14 es menor a 1,67, lo que indica la formación de una fase apatita claramente deficiente en Ca. Por otro lado, la relación O/Ca de 3,0 es similar a la esperada para la HA. En su conjunto, estos resultados parecen indicar que el Fe se encuentra como óxidos de  $\text{Fe}^{2+}$  y  $\text{Fe}^{3+}$  y magnetita en la superficie de la HAp, aunque del presente análisis no se puede descartar la formación de fosfatos de  $\text{Fe}^{2+}$ .

### 3.3.4 Espectroscopía IR

Las bandas de absorción a  $961\text{ cm}^{-1}$ ,  $1032\text{ cm}^{-1}$  y  $1088\text{ cm}^{-1}$  se pueden asignar a las bandas características del grupo  $\text{PO}_4^{3-}$ , y el pico en  $3570\text{ cm}^{-1}$  corresponde al estiramiento del grupo hidroxilo en la superficie de la nanopartícula [26].

Las bandas nítidas a  $632$  y  $3572\text{ cm}^{-1}$  son características de las vibraciones de grupos hidroxilo presentes en HA con alto grado de cristalinidad. Su ausencia sugiere una baja cristalinidad de los polvos, como en el caso de la FeHAp y la ZnHAp cuyos espectros se muestran en la *Figura 3.11*.



**Figura 3.11** Espectro IR HAp (rojo), FeHAp (negro), ZnHAp (azul), dado que las partículas de MgHAp y MgZnHAp muestran espectros similares a los obtenidos para ZnHAp solo se muestra este último.

### 3.3.5 Adsorción de Nitrógeno, DLS y Potencial Z

Las medidas de dispersión dinámica de luz en todos los casos arrojaron valores de radios hidrodinámicos grandes (ver *Tabla 3.4*), los cuales no coinciden con los tamaños

observados de las partículas mediante HRTEM. Esto refleja un alto grado de aglomeración de los nanomateriales en un pH de 7,4 y concentración salina 50 mM.

| <b>Partícula</b> | <b>Potencial Z<br/>(mV)</b> | <b>Área específica<br/>BET (m<sup>2</sup>g<sup>-1</sup>)</b> | <b>Radio<br/>hidrodinámico(nm)</b> |
|------------------|-----------------------------|--|------------------------------------|
| <b>HAp</b>       | -13,6 ± 0,8                 | 66,3 ± 0,1   | 2700± 800                          |
| <b>FeHAp</b>     | -20,4 ± 0,8                 | 84,44 ± 0,05   | 1321 ± 600                         |
| <b>MgHAp</b>     | -14,5 ± 0,6                 | 70,5 ± 0,1   | 2475 ± 991                         |
| <b>ZnHAp</b>     | -18 ± 1                     | 62,31 ± 0,06   | 1167 ± 276                         |
| <b>MgZnHAp</b>   | -15,8 ± 0,6                 | 65,00 ± 0,02   | 1229 ± 538                         |

**Tabla 3.4** . Resultados obtenidos para las medidas de DLS, potencial Z y adsorción de N<sub>2</sub>.

En todas los tipos de partículas modificadas con metales se pudo observar un cambio en la carga superficial de los nanomateriales, la incorporación del metal en todos los casos generó un aumento en la carga negativa superficial, en concordancia con la deficiencia en Ca<sup>2+</sup> observada para las HAp sustituidas con metales.

El aumento en el área específica de las partículas de HAp se ha asociado anteriormente a una disminución de la cristalinidad del material, eso al igual que los resultados de FTIR discutidos previamente indican una pérdida de la cristalinidad de las partículas por la introducción de los diferentes metales en su estructura, observandose un efecto mucho mayor por incorporación de iones hierro y magnesio.

### **3.3.6 MP-AES**

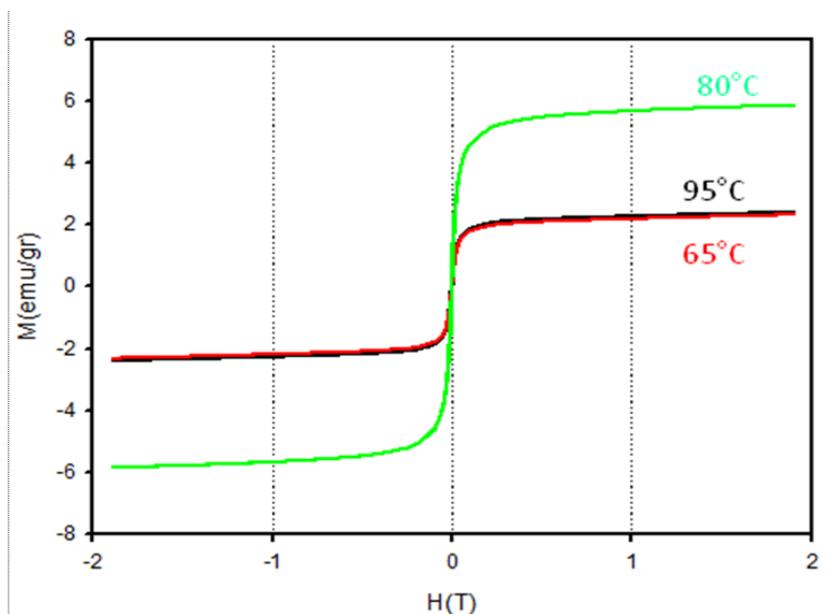
La composición de cada metal en las muestras expresadas en ng del metal por mg de muestra se muestra en la *Tabla 3.5*. En todas las muestras modificadas con magnesio, la cantidad de dicho metal estuvo siempre por debajo de la concentración analítica utilizada de MgCl<sub>2</sub> durante la síntesis, en línea con observaciones publicadas en la bibliografía, donde se informa que la cantidad de Mg incorporada en estructuras de HA tiende a ser menor de lo esperado debido a una desestabilización en la red de HAp provocada por el pequeño tamaño de Mg<sup>2+</sup> en comparación con los iones Ca<sup>2+</sup> [27].

| Partícula | ng Mg/mg de muestra | ngFe/mg de muestra | ng Zn/mg de muestra |
|-----------|---------------------|--------------------|---------------------|
| HAp       | < LD                | < LD               | < LD                |
| FeHAp     | < LD                | 5000               | < LD                |
| MgHAp     | 4578                | < LD               | < LD                |
| ZnHAp     | < LD                | < LD               | 43366               |
| MgZnHAp   | 2379                | < LD               | 31622               |

**Tabla 3.5.** Composición de los nanomateriales obtenida mediante MP-AES (<LD = debajo del límite de detección del equipo).

### 3.3.7 Magnetización versus campo aplicado

Las curvas de magnetización versus campo aplicado obtenidas muestran un típico comportamiento superparamagnético [11], es decir, con valores altos de magnetización de saturación ( $M_s$ ) y escasa magnetización remanente.



**Figura 3.12.** Curvas de magnetización vs campo aplicado obtenidas para los nanomateriales sintetizados a 65°C (rojo), 80°C (verde) y 95°C (negro).

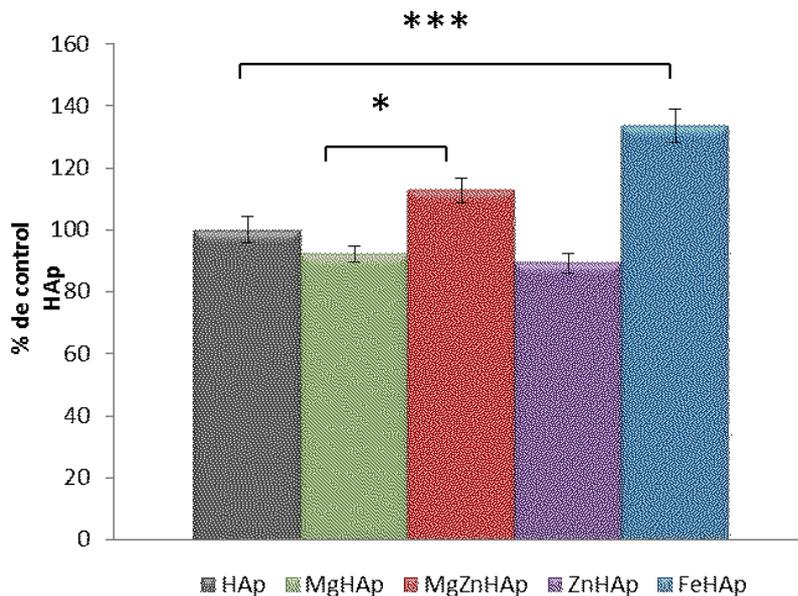
Los resultados de las curvas de magnetización (*Figura 3.12*) revelan que la temperatura óptima de síntesis para obtener propiedades magnéticas elevadas del material es de 80 °C, ya que la  $M_s$  tiene un valor de 5,8 emu/gr comparado con el valor de 2,3 emu/gr

obtenido para nanopartículas sintetizadas a 65 y 90 °C. Estos valores son mucho menores que el obtenido para nanopartículas de magnetita (73 emu/gr). Sin embargo, si se considera que el Fe se encuentra en concentraciones de 5000 ng/mg de muestra, es decir aproximadamente 0.5 % p/p, la magnetización introducida por los iones Fe resulta de importancia. En la bibliografía se informan valores de Ms del orden de 4-4,2 emu/gr para FeHAp obtenida por agregado simultáneo de especies de Fe a 40 °C [13].

### 3.4 Evaluación de la Biocompatibilidad de los materiales obtenidos en células fibroblásticas de ratón 3T3 Balb-c

#### 3.4.1 Viabilidad evaluada mediante la tinción con Naranja de Acridina

Los resultados de adhesión y proliferación celular sobre las superficies cubiertas por HAp mostraron una disminución en el porcentaje de células por área respecto al control (células incubadas sobre una superficie inerte) alcanzando un valor promedio de 83,98 % ± 12,12%. Se realizó un análisis comparativo entre las superficies tratadas con HAp y aquellas tratadas con HAp conteniendo metales (MeHAp), de forma de poder evidenciar el efecto generado por los metales presentes en las partículas. Las superficies de FeHAp mostraron un incremento del 33,67% ± 5,39% (p<0,001) respecto a la superficie de HAp, mientras que de superficies modificadas con ZnMgHAp mostraron incrementos del 12,85 % ± 3,95% (p<0,05). Por otro lado, superficies modificadas con MgHAp o ZnHAp no mostraron diferencias con respecto a las modificadas con HAp (Figura 3.13).



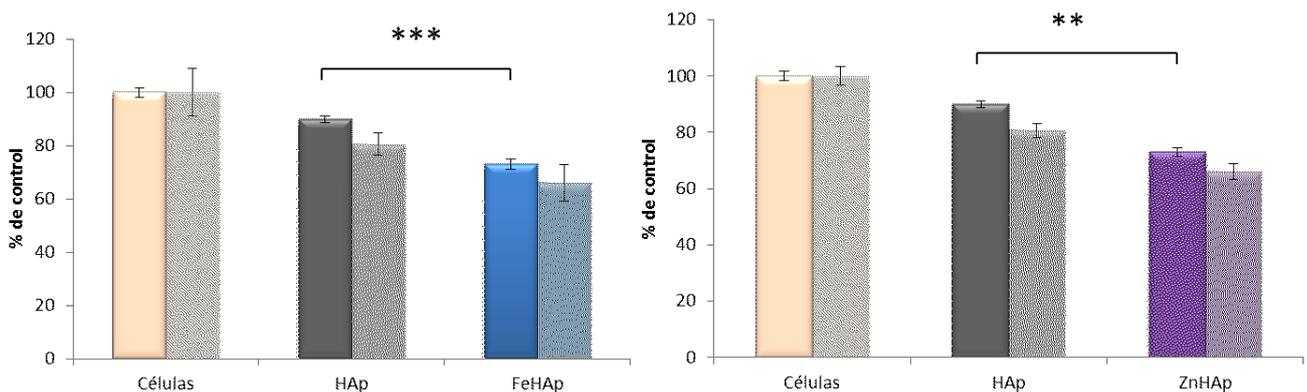
**Figura 3.13.** Viabilidad de células Balb-c incubadas por 24 hs sobre una superficie recubierta con MeHAp \*\*\*, diferencias significativas  $p < 0,001$ ; \*, diferencias significativas  $p < 0,05$ .

### 3.4.2 Estudio de actividad metabólica (MTT)

Se evaluó la actividad metabólica de células de la línea Balb-c luego de permanecer en contacto con la superficie de vidrio recubierta por las nanopartículas de ZnHAp y de FeHAp. Los resultados muestran que la respuesta celular para HAp fue significativamente menor con respecto al control de células crecidas sobre una superficie inerte, para los dos tiempos analizados.

Si bien la adición de los metales Fe y Zn separadamente, incide manifestando una disminución de la actividad metabólica estadísticamente significativa ( $p < 0,001$  y  $p < 0,01$ , respectivamente) respecto a HAp a las 24 hs, esa diferencia se ve minimizada luego de 48 hs (estadísticamente no significativa).

Cabe aclarar, que las superficies de MgHAp y MgZnHAp no pudieron ser analizadas mediante el ensayo de MTT, dada la interferencia de los iones  $Mg^{+2}$  con el método, tal como se discute en literatura [29]. El ensayo de incorporación del colorante Rojo Neutro tampoco resultó apto para medir la biocompatibilidad de estas partículas debido a su gran capacidad de adsorción del colorante que enmascaró los resultados.



**Figura 3.14 .** Resultados del ensayo MTT en células cultivadas sobre superficies tratadas con MeHAp, las series de color intenso corresponden a 24 hs de tratamiento y las de colores mas claros a 48hs. \*\*\*, diferencias significativas  $p < 0,001$ ; \*\*, diferencias significativas  $p < 0,01$ .

Dado la dificultad en determinar las bajas concentraciones de metales en las muestras por los métodos experimentales accesibles a nuestro grupo, sólo fue posible medir la

cantidad de iones liberados en PBS a 37 °C . Los estudios de disolución de los nanomateriales en condiciones estáticas revelaron bajas concentraciones de  $Me^{+n}$  en solución, no acumulativas con el pasar del tiempo. Esto podría indicar que las diferencias significativas observadas en la respuesta celular se deberían principalmente a una diferente disposición de los materiales sobre la superficie del vidrio. Este efecto podría deberse a diferencias en la carga superficial de los nanomateriales debido a la presencia de los metales, tal como se discutió en la sección 3.2.5.

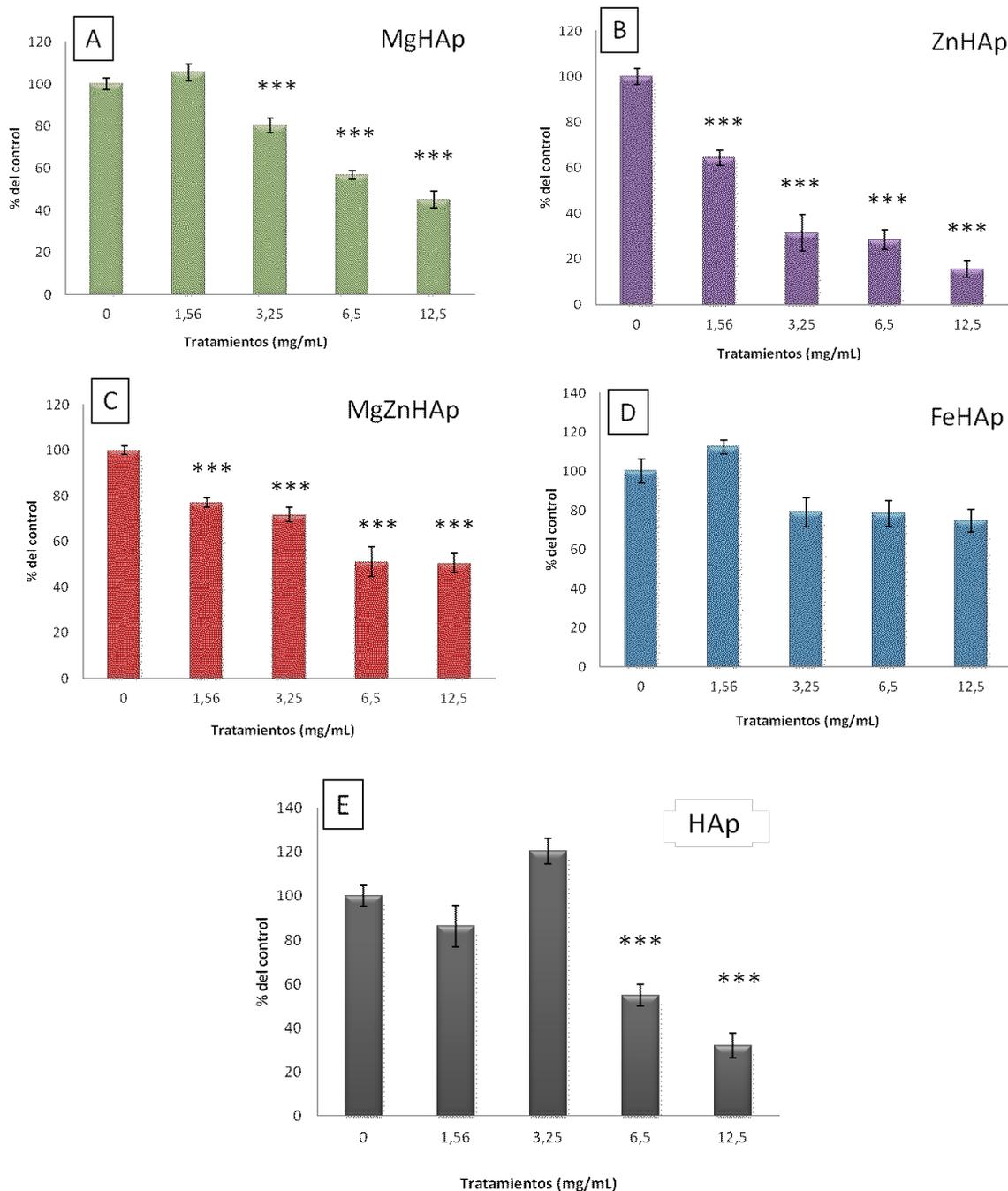
Cabe aclarar que los resultados de los ensayos realizados sobre las superficies con HAp y aquellas tratadas con HAp conteniendo metales (sección 3.3.1 y 3.3.2) revelan ciertas diferencias causadas por los diferentes iones capaces de afectar tanto la adhesión como la actividad metabólica celular. Esto podría deberse a la adhesión diferencial de las partículas sobre una superficie de vidrio (ensayo 3.3.1) o de plástico ( ensayo 3.3.2), como a su vez a una diferencia en la concentración de nanopartícula utilizada inicialmente. Además, se evidencia la necesidad de abordar los estudios de biocompatibilidad mediante ensayos que muestren diferentes aspectos del comportamiento celular.

### ***3.4.3 Respuesta celular a las diferentes concentraciones de nanomateriales***

Considerando la posible liberación de nanopartículas en base a HAp como producto de degradación y desgaste del andamio (estructura en 3 dimensiones) hacia los fluidos biológicos en la zona aledaña al implante, se evaluó la respuesta celular a las partículas en suspensión luego de 24 hs de exposición, como una medida preliminar de la posible interacción célula-nanomaterial. La Figura 3.15 (A-E) muestra la respuesta de las células Balb-c luego de 24hs de exposición a las diferentes concentraciones de los nanomateriales estudiados, evaluada mediante la tinción con el colorante naranja de acridina.

El análisis cuantitativo se realizó analizando el porcentaje de área cubierta por células en cada uno de los casos y para su mejor visualización se muestra como porcentaje respecto al control (células incubadas en ausencia de nanopartículas). Se observó una disminución significativa ( $p < 0,001$ ) de la adhesión y crecimiento celular a partir de 3,12 mg/mL de MgHAp, con una concentración EC50 (*effective concentration 50*, definida como la concentración de un compuesto que induce un 50% de reducción de la

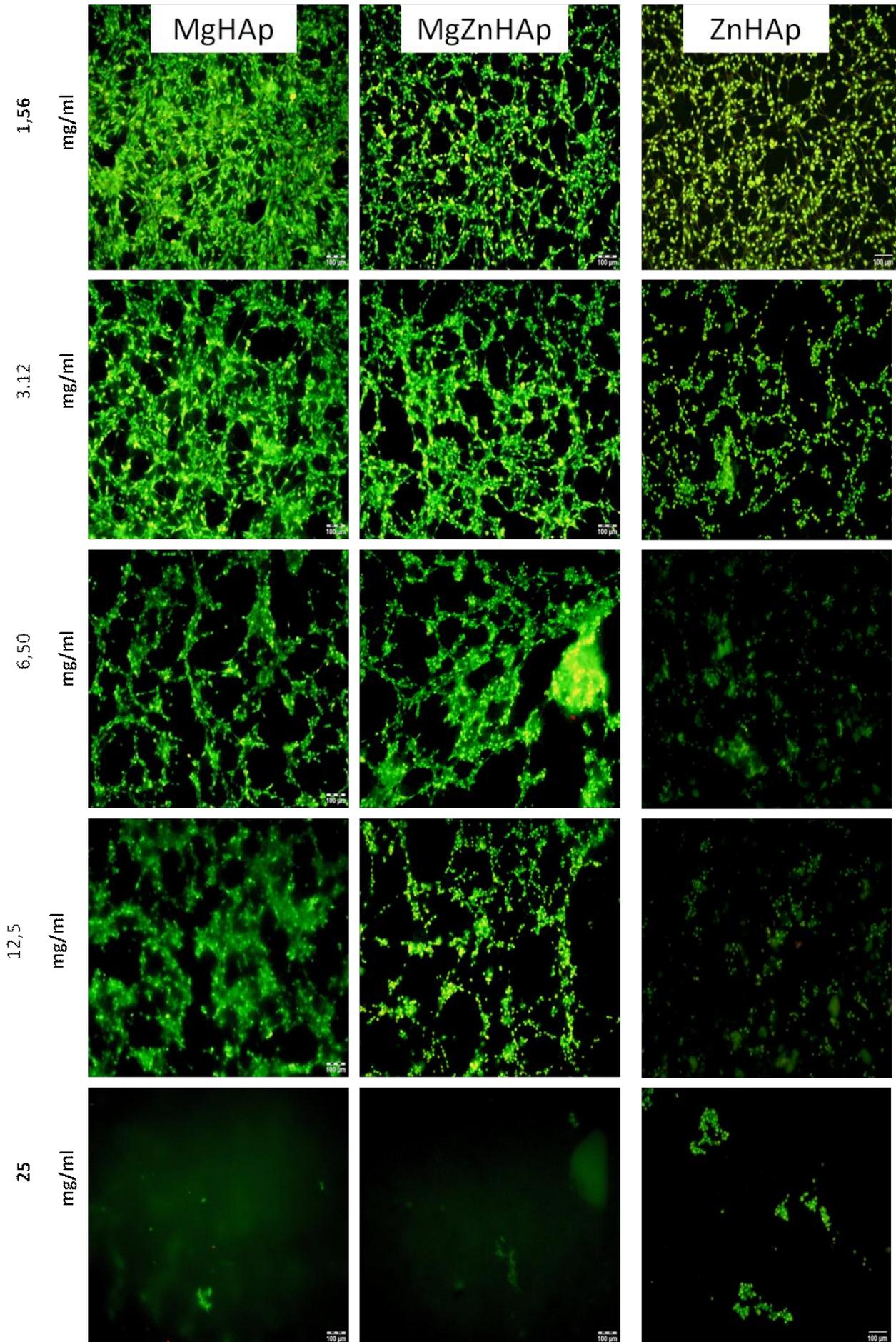
viabilidad celular) que se ubicaría entre 6,5-12,5 mg/mL (Figura 3.15 A). La respuesta celular para los tratamientos con ZnHAp (Figura 3.15 B) reveló una disminución significativa ( $p < 0,001$ ) a partir de 1,56 mg/mL, con una disminución de la viabilidad mayor del 50 % para las siguientes dosis estudiadas. El tratamiento con partículas conteniendo ambos metales (MgZnHAp) (Figura 3.15 C) mostró una EC50 entre 6,5-12,5 mg/ml cuyos porcentajes de viabilidad resultaron  $51,25\% \pm 6,70\%$  y  $50,66\% \pm 4,15\%$ , respectivamente similar a lo observado para MgHAp. Por otro lado, los resultados del tratamiento con FeHAp (Figura 3.15 D) evidenciaron un incremento mayor al 10% con respecto al control de células para la dosis de 1,56 mg/mL, para las siguientes tres dosis testeadas ( $\geq 3,25$  mg/mL) se observó una disminución de la viabilidad celular aunque no reveló diferencias estadísticamente significativas.

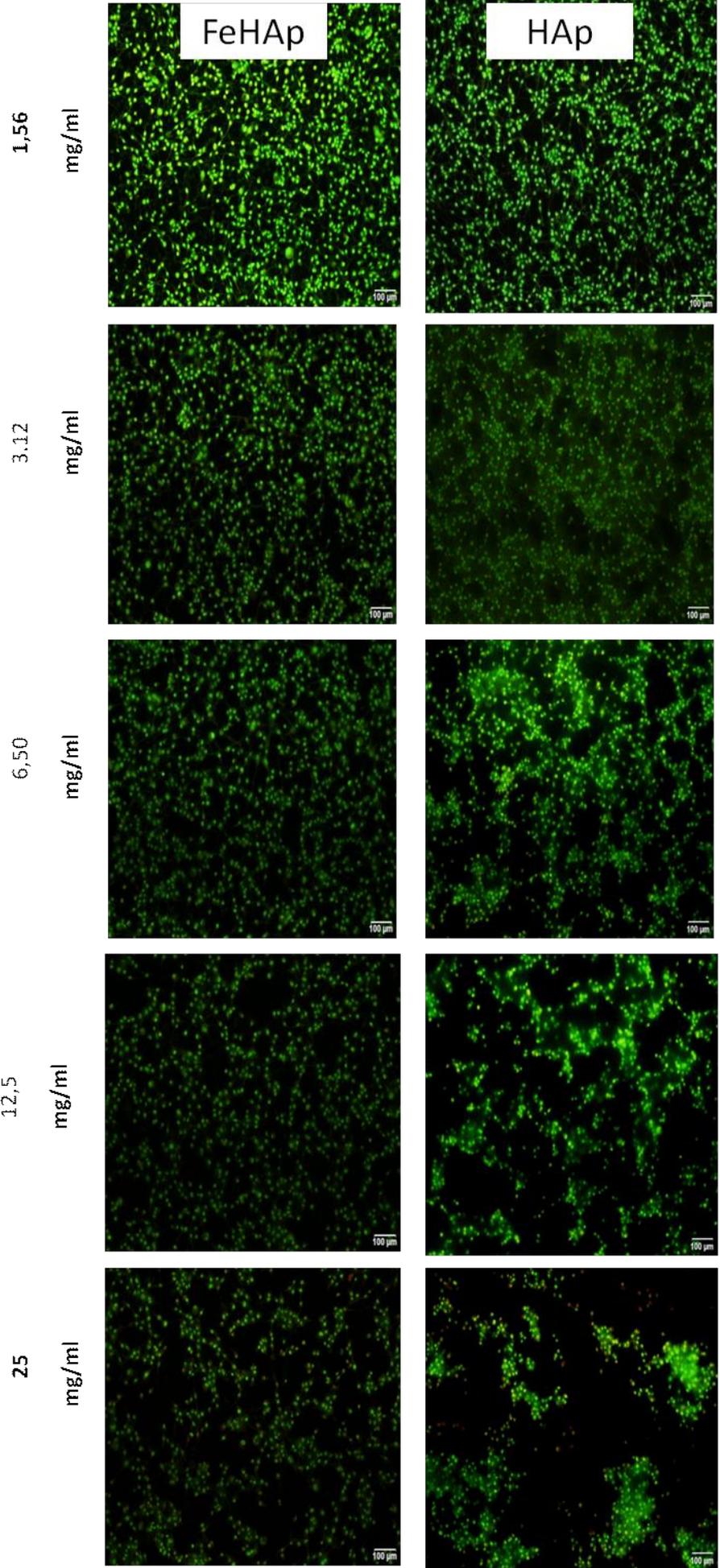


**Figura 3.15** (A-E) Viabilidad celular luego de 24hs de exposición a las diferentes concentraciones de los nanomateriales, evaluada mediante la tinción con el colorante naranja de acridina \*\*\*,  $p < 0,001$ ; diferencias significativas frente al control de células (0 mg/mL).

La fotomicrografías presentadas en la *Figura 3.16* muestran células Balb-c incubadas durante 24 hs en presencia de las diferentes concentraciones de nanopartículas. Se puede observar la variación de la densidad celular a medida que se va incrementando la dosis de cada nanomaterial. A fin de evaluar cualitativamente el comportamiento celular en una concentración similar a la que se utilizó para generar las superficies analizadas anteriormente (Sección 2.4.3.2) (representando la situación, extrema y muy poco probable, de una liberación total y al mismo tiempo, de las MeHAp adheridas) se realizaron los tratamientos con la dosis de 25 mg/mL. Como era de esperar, para esas dosis se observó una disminución de la adhesión y crecimiento celular, pero también se evidenció cierta asociación celular, formando islas de crecimiento observado principalmente para las partículas con Zn.

La elección de las dosis para este ensayo se encuentran en concordancia con el rango de concentración estimado a partir de la total disolución de los nanomateriales adsorbidos sobre las superficies de vidrio inerte. Esto representaría la situación de desprendimiento total y liberación de las nanopartículas conteniendo metales en los primeros tiempos de contacto.

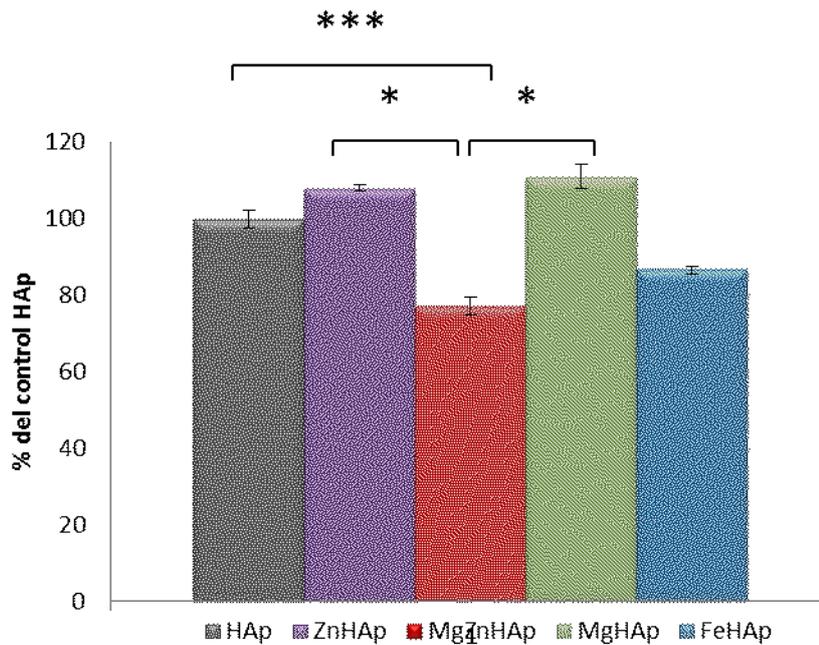




**Figura 3.16.** Fotomicrografías de las células Balb-c incubadas durante de 24 hs en presencia de suspensiones con diferentes concentraciones de nanopartículas MeHAp. Magnificación 100X.

Con el objetivo de evaluar la posible influencia de los metales adicionados a las nanopartículas, se realizó un análisis comparativo de la viabilidad celular entre las HAp con y sin metales luego de 24 hs de incubación con una dosis de 1,56 mg/mL (*Figura 3.17*).

Los promedios de viabilidad celular mostraron valores similares al control de HAp para ZnHAp y MgHAp. Sin embargo, los tratamientos con las partículas conteniendo ambos metales (MgZnHAp) presentaron una disminución del  $22,81 \pm 2,21\%$  respecto a la HAp ( $p < 0,001$ ) y del 30,81% y 33,80 % en relación a ZnHAp y MgHAp, respectivamente. Los cultivos celulares incubados en presencia de FeHAp mostraron, aunque no estadísticamente significativo, un leve descenso (cercano al 13%) de la viabilidad.



**Figura 3.17** Viabilidad celular luego de 24hs de exposición a 1,56 mg/mL de los nanomateriales, evaluada mediante la tinción con el colorante naranja de acridina \*\*\*, diferencias significativas  $p < 0,001$ .

### 3.5 Conclusiones parciales

- Se desarrollaron y optimizaron métodos sintéticos para la obtención de nanomateriales a base de hidroxiapatita modificada con iones metálicos bi y trivalentes.

- Mediante DRX y HRTEM fue posible determinar, que en todos los casos, la fase presente en forma mayoritaria fue HAp. En los materiales modificados con hierro a su vez se observaron picos característicos de óxidos magnéticos tales como magnetita y maghemita.
- Las micrografías de HRTEM obtenidas para HAp, MgHAp, ZnHAp, MgZnHAp y FeHAp mostraron en todos los casos, la formación de nanopartículas cristalinas similares a nano-barras. Debido al alto grado de aglomeración de las muestras no fue posible calcular una distribución de tamaño de los nanomateriales obtenidos.
- Los estudios de espectroscopía IR mostraron picos característicos de la HAp. La ausencia de los picos a  $632$  y  $3572\text{ cm}^{-1}$  característicos del grupo OH en hidroxiapatitas cristalinas indicaron una disminución en la cristalinidad de los materiales que contienen metales. Esto a su vez resultó en un aumento de las áreas superficiales de las partículas modificadas,
- Las técnicas de EDX y XPS demostraron la presencia de los metales y su estado de oxidación en los materiales obtenidos. En todos los casos se observaron picos característicos de los óxidos de hierro (718 eV), Mg (1304 eV) y Zn(1022 eV).
- Medidas de magnetización vs campo aplicado demostraron que la temperatura de síntesis influye en el comportamiento superparamagnético de las muestras. La temperatura a la cual la magnetización de saturación es máxima e igual a 4 emu/gr es de  $80^{\circ}\text{C}$ .
- Los ensayos de viabilidad celular en todos los casos analizados, revelaron una diferencia tanto en la proliferación y adhesión celular, como en la actividad metabólica para los cultivos celulares incubados en presencia de HAp con respecto a células sin tratamiento. Por otro lado, se observaron diferencias significativas al incorporar los distintos metales a la HAp, independientemente

de la metodología utilizada para generar cierta interacción entre los nanomateriales y los cultivos celulares. Estos efectos, podrían deberse a una diferencia en la forma en la que los materiales se adsorben o interactúan sobre la superficie del vidrio/plástico, generando diferentes topografías y rugosidades. Otro factor determinante podría deberse a una degradación diferencial de las nanopartículas de HAp conteniendo metales debido a su menor cristalinidad. La degradación de las nanopartículas daría lugar a la liberación de los iones metálicos al medio circundante.

### **Referencias**

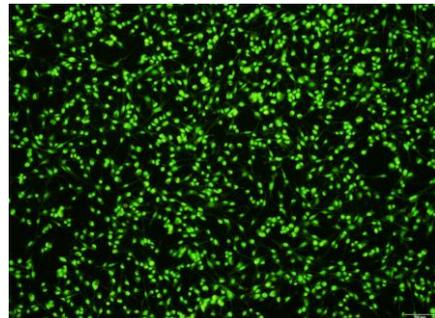
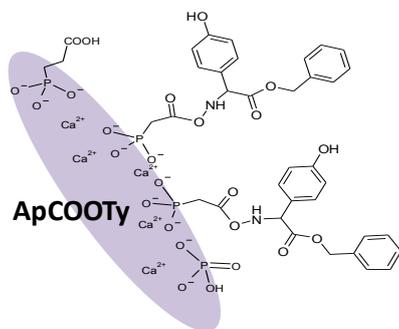
- [1] M. P. Ferraz, F. J. Monteiro, and C. M. Manuel, “Hydroxyapatite nanoparticles : A review of,” *J. Appl. Biomater.*, vol. 2, no. 2, pp. 74–80, 2004.
- [2] S. Koutsopoulos, “Synthesis and characterization of hydroxyapatite crystals: A review study on the analytical methods,” *Journal of Biomedical Materials Research*, vol. 62, no. 4. pp. 600–612, 2002.
- [3] E. Bouyer, F. Gitzhofer, and M. I. Boulos, “Morphological study of hydroxyapatite nanocrystal suspension.,” *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, vol. 11, no. 8, pp. 523–31, Aug. 2000.
- [4] T. Kokubo, “Apatite formation on surfaces of ceramics, metals and polymers in body environment,” *Acta Mater.*, vol. 46, no. 7, pp. 2519–2527, 1998.
- [5] M. E. Zilm *et al.*, “Hydroxyapatite substituted by transition metals: Experiment and theory,” *Phys. Chem. Chem. Phys.*, vol. 18, no. 24, pp. 16457–16465, 2016.
- [6] S. Adzila, M. Murad, and I. Sopyan, “Doping Metal into Calcium Phosphate Phase for Better Performance of Bone Implant Materials,” *Recent Patents Mater. Sci.*, vol. 5, no. 1, pp. 18–47, Jan. 2012.
- [7] Z. Evis and T. J. Webster, “Nanosize hydroxyapatite: doping with various ions,” *Adv. Appl. Ceram.*, vol. 110, no. 5, pp. 311–321, 2011.
- [8] E. Landi, G. Logroscino, L. Proietti, A. Tampieri, M. Sandri, and S. Sprio, “Biomimetic Mg-substituted hydroxyapatite: From synthesis to in vivo behaviour,” *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, vol. 19, no. 1, pp. 239–247, 2008.
- [9] H.-J. Seo, Y.-E. Cho, T. Kim, H.-I. Shin, and I.-S. Kwun, “Zinc may increase bone formation through stimulating cell proliferation, alkaline phosphatase

- activity and collagen synthesis in osteoblastic MC3T3-E1 cells,” *Nutr. Res. Pract.*, vol. 4, no. 5, p. 356, 2010.
- [10] V. Saxena, A. Hasan, and L. M. Pandey, “Effect of Zn/ZnO integration with hydroxyapatite: a review,” *Mater. Technol.*, 2018.
- [11] S. Panseri *et al.*, “Intrinsically superparamagnetic Fe-hydroxyapatite nanoparticles positively influence osteoblast-like cell behaviour,” *J. Nanobiotechnology*, vol. 10, no. 1, p. 1, 2012.
- [12] S. Panseri *et al.*, “Magnetic Hydroxyapatite bone substitutes to enhance tissue regeneration: Evaluation in vitro using osteoblast-like cells and in vivo in a bone defect,” *PLoS One*, vol. 7, no. 6, pp. 4–11, 2012.
- [13] A. Tampieri *et al.*, “Intrinsic magnetism and hyperthermia in bioactive Fe-doped hydroxyapatite,” *Acta Biomater.*, vol. 8, no. 2, pp. 843–851, 2012.
- [14] D. F. Mercado *et al.*, “Paramagnetic iron-doped hydroxyapatite nanoparticles with improved metal sorption properties. A bioorganic substrates-mediated synthesis,” *ACS Appl. Mater. Interfaces*, vol. 6, no. 6, pp. 3937–3946, 2014.
- [15] Y. Sogo, T. Sakurai, K. Onuma, and A. Ito, “The most appropriate (Ca+Zn)/P molar ratio to minimize the zinc content of ZnTCP/HAP ceramic used in the promotion of bone formation,” *J. Biomed. Mater. Res.*, vol. 62, no. 3, pp. 457–463, 2002.
- [16] S. Hayakawa *et al.*, “Structural characterization and protein adsorption property of hydroxyapatite particles modified with zinc ions,” *J. Am. Ceram. Soc.*, vol. 90, no. 2, pp. 565–569, 2007.
- [17] S. C. Ruiz-Mendoza, L. C. Moreno-Aldana, and E. Delgado-Mejía, “Abridged acid-base wet-milling synthesis of high purity hydroxyapatite,” *Mater. Res.*, vol. 11, no. 2, pp. 187–192, 2008.
- [18] M. Mir *et al.*, “XRD, AFM, IR and TGA study of nanostructured hydroxyapatite,” *Mater. Res.*, vol. 15, no. 4, pp. 622–627, 2012.
- [19] P. S. Prevéy, “X-Ray Diffraction Characterization of Crystallinity and Phase Composition in Plasma-Sprayed Hydroxyapatite Coatings,” vol. 9, no. September, pp. 369–376, 2000.
- [20] Z. Wang, Z. Xu, W. Zhao, and N. Sahai, “A potential mechanism for amino acid-controlled crystal growth of hydroxyapatite,” *J. Mater. Chem. B*, vol. 3, no. 47, pp. 9157–9167, 2015.
- [21] E. I. Suvorova and P. A. Buffat, “Electron diffraction from micro- and

- nanoparticles of hydroxyapatite,” *J. Microsc.*, vol. 196, no. 1, pp. 46–58, 1999.
- [22] E. I. Suvorova, P. A. Stadelmann, and P. A. Buffat, “HRTEM simulation in determination of thickness and grain misorientation for hydroxyapatite crystals,” *Crystallogr. Reports*, vol. 49, no. 3, pp. 343–352, 2004.
- [23] H. B. Lu, C. T. Campbell, D. J. Graham, and B. D. Ratner, “Surface characterization of hydroxyapatite and related calcium phosphates by XPS and TOF-SIMS,” *Anal. Chem.*, vol. 72, no. 13, pp. 2886–2894, 2000.
- [24] Nist, “NIST X-ray Photoelectron Spectroscopy Database, Version 4.1 (National Institute of Standards and Technology, Gaithersburg, 2012); [http://srdata.nist.gov/xps/.](http://srdata.nist.gov/xps/),” 2012.
- [25] and C. J. P. Alexander V. Naumkin, Anna Kraut-Vass, Stephen W. Gaarenstroom, “NIST X-ray Photoelectron Spectroscopy Database,” *Measurement Services Division of the National Institute of Standards and Technology (NIST)*, 2012. [Online]. Available: <http://srdata.nist.gov/xps/Default.aspx>. [Accessed: 31-Jan-2020].
- [26] L. Berzina-Cimdina and N. Borodajenko, “Research of Calcium Phosphates Using Fourier Transform Infrared Spectroscopy,” in *Infrared Spectroscopy - Materials Science, Engineering and Technology*, InTech, 2012.
- [27] M. Šupová, “Substituted hydroxyapatites for biomedical applications: A review,” *Ceram. Int.*, vol. 41, no. 8, pp. 9203–9231, 2015.
- [28] T. Yamashita and P. Hayes, “Analysis of XPS spectra of Fe 2+ and Fe 3+ ions in oxide materials,” *Appl. Surf. Sci.*, vol. 254, no. 8, pp. 2441–2449, Feb. 2008.
- [29] J. Fischer, M. H. Prosenc, M. Wolff, N. Hort, R. Willumeit, and F. Feyerabend, “Interference of magnesium corrosion with tetrazolium-based cytotoxicity assays,” *Acta Biomater.*, vol. 6, no. 5, pp. 1813–1823, 2010.

# Capítulo IV

## Modificación superficial de HAP



#### 4.1 Introducción

La funcionalización química de la superficie de hidroxiapatita es una estrategia ampliamente utilizada para mejorar la biocompatibilidad, la biomineralización y la especificidad biológica de la apatita sintética [1], [2].

Hasta la fecha, el esfuerzo principal hacia la funcionalización covalente se dirige a modificar los grupos superficiales disponibles de las apatitas cristalinas. Entre las diferentes estrategias reportadas se encuentran la síntesis de apatita en presencia de aminoácidos [2] [3], la policondensación de alcoxisilanos sustituidos en la superficie de apatita (proceso denominado silanización [4],[5] y la incorporación de organofosfonatos (RP (O) (OH) 2 con R = n- cadena de alquilo) [8,9].

La superficie de minerales, como vidrios y óxidos metálicos, contienen grupos hidroxilos M-OH superficiales capaces de desplazar los grupos alcóxidos de los alcoxisilanos dando lugar a la formación de enlaces M-O-Si covalentes. Si bien la silanización es un método sencillo y ampliamente utilizado, dada la baja proporción de grupos OH respecto de  $\text{PO}_4^{-3}$  presentes en la HAp, es lógico esperar un bajo grado de policondensación superficial de alcoxisilanos sustituidos en los nanomateriales a base de apatitas sintéticas [6],[7].

Por otro lado, se ha informado en la literatura, que la modificación superficial de apatitas con bajas concentraciones de ácidos organofosfónicos dá lugar a la formación de monocapas desordenadas de grupos organofosfónicos unidos covalentemente a través de enlaces P-O-P [6]. Además, la mezcla de fosfatos inorgánicos y alquilfosfonatos inorgánicos durante la síntesis de apatita genera materiales mesoporosos con superficie específica alta y una pérdida significativa de la cristalinidad [7]. Estos estudios están en línea con investigaciones que informan un efecto inhibitor a bajas concentraciones de fosfonatos hacia el crecimiento de los cristales de hidroxiapatita [8].

Entre las moléculas utilizadas para recubrir materiales de hidroxiapatita, aquellas que llevan grupos funcionales  $\text{COO}^-$  merecen una atención especial, ya que se ha demostrado que los carboxilatos promueven procesos biológicos importantes en la ingeniería de tejidos óseos, como la mejora de la carga de proteínas morfogenéticas y el factor de crecimiento de fibroblastos, necesarios para la promoción de la diferenciación y proliferación de osteoblastos [9] y la inducción de la mineralización de fosfato de calcio [10], [11]. Además, los grupos funcionales carboxilo pueden activarse fácilmente

para formar enlaces amida [12] con aminoácidos y proteínas para producir materiales de apatita con una especificidad biológica mejorada [2].

Por otro lado, la obtención de nanomateriales fluorescentes a base de hidroxiapatita es una herramienta prometedora en biomedicina particularmente en campos como el marcaje celular, imágenes y terapia de animales; y en la administración y liberación de fármacos. Sin embargo, pocas publicaciones en la literatura informan sobre su síntesis y propiedades [13]–[15].

En este *Capítulo* se llevará a cabo la modificación superficial de nanohidroxiapatita mediante dos métodos: (i) la silanización utilizando 3-aminopropiltrimetoxisilano como modificador de la superficie y (ii) la incorporación de ácido 3-fosfonopropiónico (CEPA).

Mediante diferentes técnicas de caracterización se intentará evaluar cuál de los dos métodos provee una superficie con un número apreciable de grupos funcionales que servirán de base para la funcionalización de los nanomateriales mediante enlaces covalentes con otras moléculas y biomoléculas. A su vez se describirán los resultados de ensayos de biocompatibilidad de nanopartículas modificadas superficialmente en células fibroblásticas 3T3 Balb-c comparando con los valores obtenidos para las nanopartículas de HAp sin recubrimiento.

A los materiales que resulten adecuados se les evaluará su interacción con la proteína BSA. A fin de probar la versatilidad de las partículas de  $\text{HApCOO}^-$  como precursores en la síntesis de materiales más complejos y considerando que las nanopartículas fluorescentes a base de hidroxiapatita son una herramienta prometedora, se procedió a derivatizar la  $\text{HApCOO}^-$  con el colorante fluorescente fucsina básica y el ester bencílico del aminoácido L-Tirosina. Estos compuestos se seleccionaron debido a que pueden ser sensados fácilmente aunque esten en bajas proporciones.

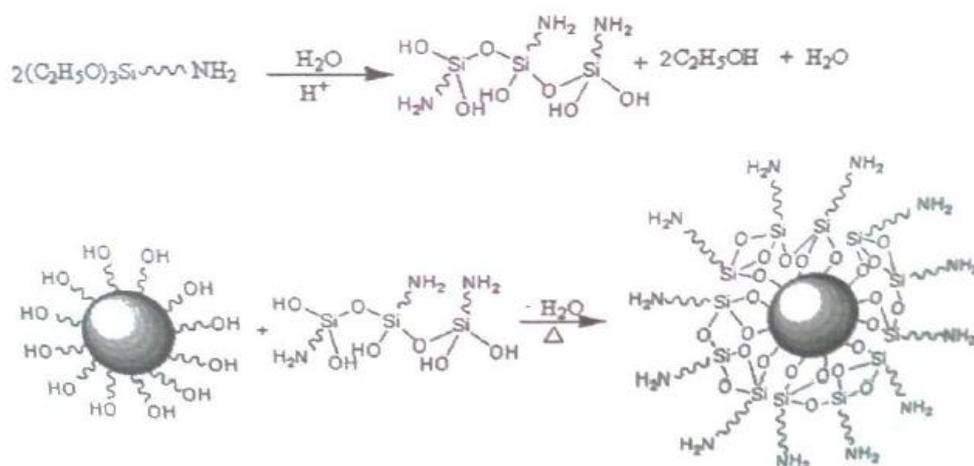
## ***4.2 Síntesis y caracterización de los nanocompositos obtenidos.***

### ***4.2.1 APTES como agente modificador de la superficie***

La elección del 3-aminopropiltrimetoxisilano (APTES) como agente modificador de la superficie de HAp se debió a sus características químicas determinadas por un grupo

amino reactivo y tres grupos metoxisilil hidrolizables. La naturaleza dual de este reactivo le permite unirse químicamente con minerales sólidos dotándolos de grupos funcionales orgánicos. La reactividad química de sus grupos funcionales lo convierte en un promotor de adhesión y un modificador de superficie (cambiando su hidrofobicidad, biocompatibilidad, etc). Por dichos motivos, las nanopartículas se silanizan con APTES para introducir un grupo amino terminal.

La *Figura 4.1* muestra los pasos de reacción concertados. El agua promueve la hidrólisis del grupo alcoxilano del APTES para reaccionar con los grupos hidroxilos que se encuentran en la superficie de la nanopartícula.

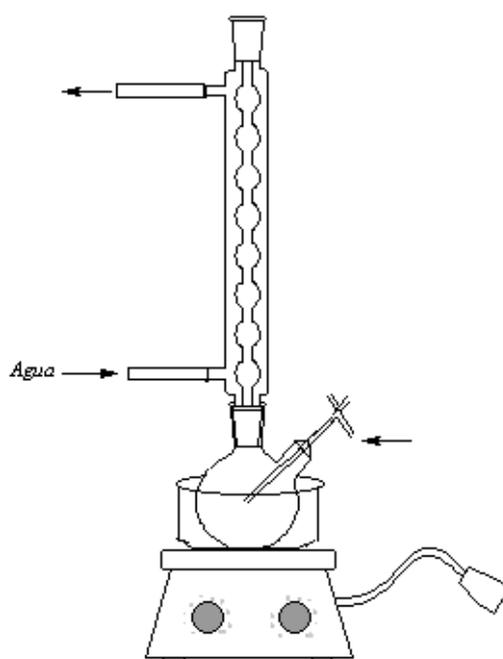


**Figura 4.1.** Esquema de funcionalización superficial con APTES

La silanización se puede llevar a cabo mediante diferentes procedimientos, las principales variaciones entre ellos suelen ser la temperatura de reacción y la polaridad de solvente utilizado. Como se discute en la literatura, a temperaturas de reacción entre 50 y 100°C se suele formar una capa de APTES totalmente condensada; a temperaturas intermedias de 150° C suelen oxidarse parcialmente los grupos terminales amina a amidas; a temperaturas de 200°C se produce la descomposición térmica de los silanos y la pérdida de los grupos amino terminales. Otros autores sugieren que se logran recubrimientos más estables si se utilizan solventes orgánicos no polares en el proceso de silanización [3]. En este trabajo se llevó a cabo el método de funcionalización a reflujo en etanol, utilizando una atmósfera inerte generada mediante el pasaje de una corriente de argón. Para ello se utilizó un balón de dos bocas, una de ellas contenía un

refrigerante para garantizar el reflujo y por la boca restante se hizo pasar la corriente de Argón (ver *Figura 4.2*).

Se pesaron 180 mg de nanopartículas de HA y fueron suspendidas en 200 mL de etanol absoluto. Para lograr aumentar la dispersión del sólido se sonicó la mezcla durante una hora. Posteriormente, se agregaron 8,5 mL de APTES seguidos de 2 mL de agua Milli Q con el objetivo de catalizar la reacción [16]. La temperatura del baño fue 150°C y la agitación se mantuvo constante a 50 rpm-durante 20 min. Se dejó pasar una corriente de Argón hasta que la suspensión entró en ebullición y el sistema se mantuvo en reflujo durante 24 horas.

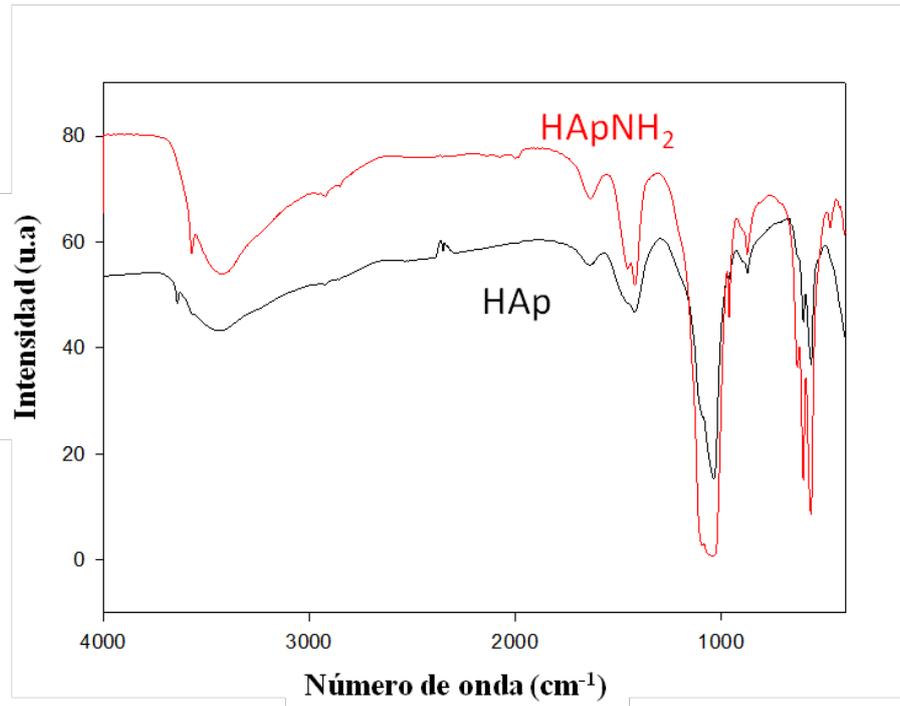


**Figura 4.2.** Equipo utilizado para la funcionalización superficial con APTES

El proceso de separación y purificación se llevó a cabo mediante filtración por succión. Para ello, el sólido se lavó 3 veces con agua Milli Q y 4 veces con MeOH, a fin de eliminar los restos de APTES que hayan podido quedar remanentes sin reaccionar. Posteriormente el sólido se secó en estufa por 12 horas a 60 °C – 70 °C.

#### **4.2.1.1 Espectroscopía FTIR**

La *Figura 4.3* muestra los espectros de FTIR obtenidos para las partículas de HAP funcionalizadas con APTES (HApNH<sub>2</sub>). En ambos casos, se pueden observar las señales características publicadas para la Hidroxiapatita [17].



**Figura 4.3.** Espectros FTIR obtenidos para HApNH<sub>2</sub> (rojo) y HAp (negro)

No se observan bandas en la zona de  $1327\text{ cm}^{-1}$  que puedan asignarse a estiramientos C-N, como tampoco se observan bandas en  $1480\text{ cm}^{-1}$  que puedan asignarse a los modos vibracionales del grupo amino del APTES, Sin embargo, la zona a  $1100\text{ cm}^{-1}$  correspondiente a los enlaces Si-O-Si se ve aumentada. En general el FTIR da una información cualitativa sobre la modificación efectiva de las partículas de HAp con APTES.

#### ***4.2.1.2 Dispersión dinámica de luz (DLS) y Movilidad electroforética***

Las medidas de DLS (*Tabla 4.1*), indicaron un alto grado de aglomeración de las muestras a pH 6 con una fuerza iónica ( $\mu$ ) de 0,1M. Trabajando bajo las mismas condiciones se realizaron medidas de movilidad electroforética, donde se puede observar que la presencia de APTES no provocó un cambio sustancial en la movilidad electroforética obtenida respecto de la HAp sin recubrimiento.

| Partícula          | Diámetro hidrodinámico (nm) | Desviación estándar (nm) | Movilidad electroforética ( $\mu\text{m cm/Vs}$ ) | Desviación estándar ( $\mu\text{m cm/Vs}$ ) |
|--------------------|-----------------------------|--------------------------|---|---|
| HAp                | 2009                        | $\pm 177$                | 0,84  | $\pm 0,35$                                  |
| HApNH <sub>2</sub> | 1794                        | $\pm 259$                | 0,81  | $\pm 0,24$                                  |

Tabla 4.1. Resultados de DLS y movilidad electroforética obtenidos a pH 6 y  $\mu=0,1\text{M}$

### 4.2.1.3 Espectroscopía Electrónica de rayos X (XPS)

El análisis de la composición elemental de la superficie se realizó por XPS. Se tomó un espectro de exploración entre 0 y 1100 eV, para reconocer las señales características de los elementos que conforman la superficie.

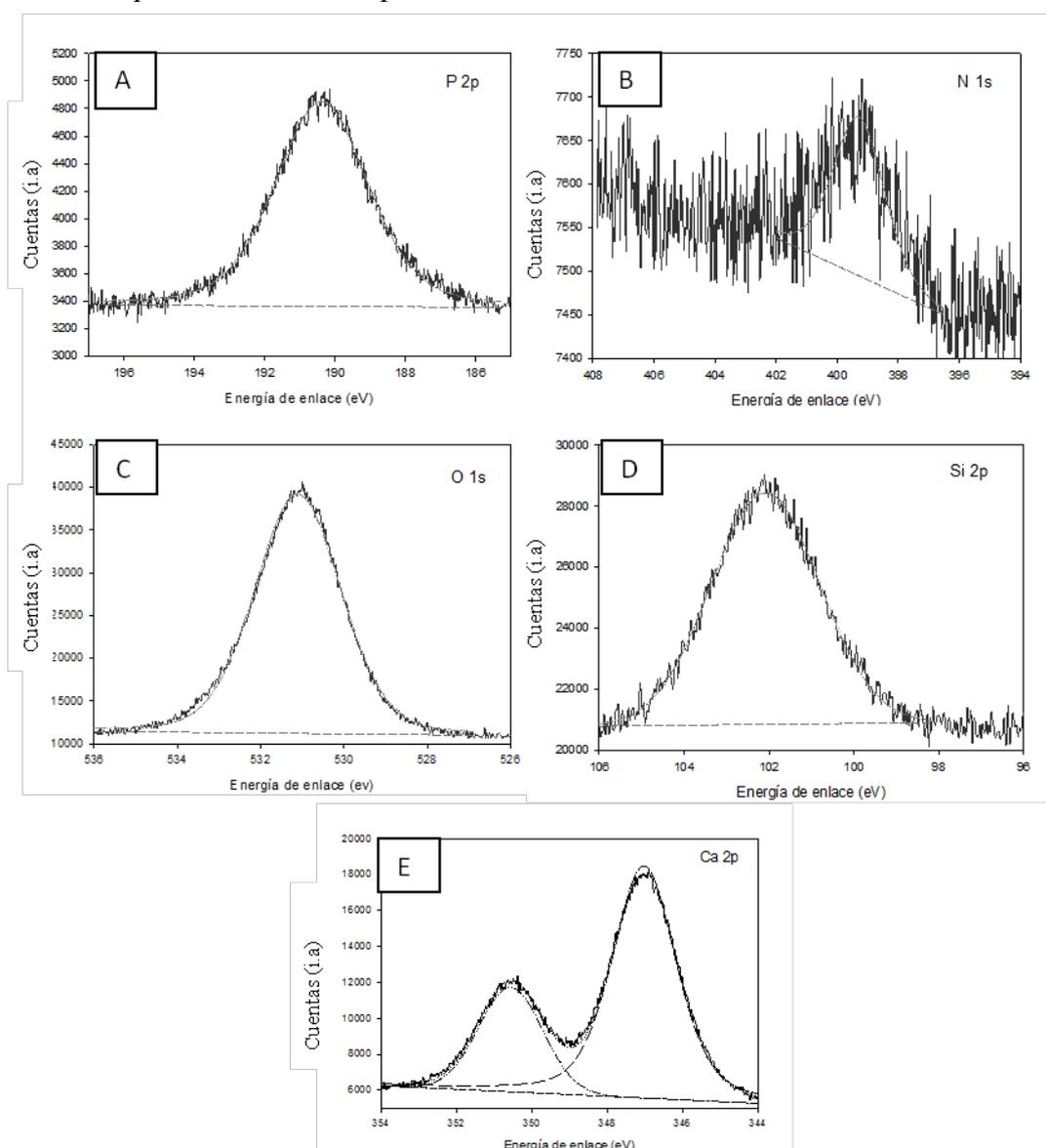


Figura 4.4. Espectros XPS de alta resolución obtenidos para la muestra de HApNH<sub>2</sub>

Se observaron picos de Ca 2p, O 1s, P 2p, C 1s, Si 2p y N 1s, los que se muestran en la *Figura 4.4*. A partir del corrimiento del pico de C 1s, se pudo determinar la generación de carga eléctrica sobre la superficie de las NPs, la que se corrigió considerando que el pico correspondiente al C 1s del C-adventicio aparece con energía de enlace de 284,6 eV. Para cada elemento de la superficie se realizó una deconvolución de las señales a fin de identificar su entorno químico.

Los picos de Ca 2p a 347,02 eV y 350,55 eV, correspondientes a Ca 2p<sub>1/2</sub> y Ca 2p<sub>3/2</sub>, respectivamente, junto con el pico del P 2p en 190,36 eV se deben a fosfato de calcio en apatitas (ver Capítulo III).

La deconvolución de los picos de O 1s muestran la contribución de pico 531,09 eV, el cual corresponde a Oxígeno rodeado de un entorno de fosfato, hidroxilos o agua adsorbida. El pico de N 1s a 399,28 eV se encuentra reportado en la literatura como característico de una unión C-NH<sub>2</sub> [18].

El Si 2p presenta un pico con energías de enlace de 102,08 eV que puede ser asignado a Si con estado de oxidación +2, formando parte de un compuesto coordinado de la forma Si(O)<sub>x</sub>.

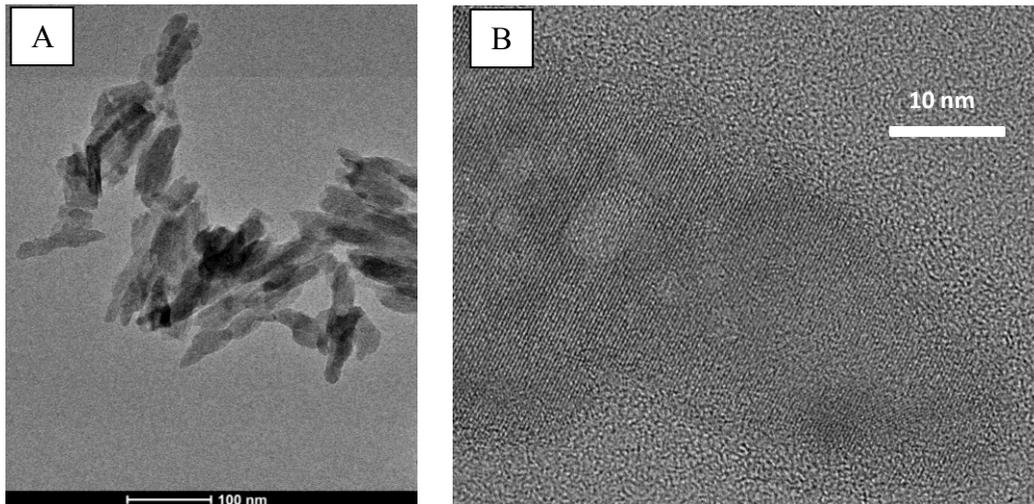
De acuerdo a estos resultados, la HAp estaría efectivamente funcionalizada con grupos propilamino terminales. Estos nanomateriales se denominarán HApNH<sub>2</sub>.

#### ***4.2.2 CEPA como agente modificador de la superficie***

Se desarrolló una nueva estrategia sintética utilizando ácido 3-fosfonopropiónico (CEPA) para obtener nanohidroxiapatita cubierta por grupos propionato superficiales (HApCOO<sup>-</sup>). Para la síntesis, se añadió gota a gota una solución de ácido fosfórico de 0,0981 g/mL en una suspensión de 0,125 g/mL Ca (OH)<sub>2</sub> para iniciar la formación de nano hidroxiapatita en un período de 30 minutos bajo agitación constante y calentamiento a 80 °C. Posteriormente, para analizar el efecto de agregar diferentes masas de CEPA se agregaron 0,016 o 0,0076 g del ácido por mL de mezcla manteniendo la suspensión en agitación constante a temperatura ambiente durante 3 horas, obteniendo así las partículas de HApCOO<sup>-</sup> (10%) y HApCOO<sup>-</sup> (5%), respectivamente. Finalmente, las partículas se separaron mediante filtración por succión, se lavaron 3 veces con H<sub>2</sub>O y el sólido remanente se dejó secar a 80 °C durante 24 hs.

#### 4.2.2.1 Microscopía electrónica de transmisión de alta resolución (HRTEM)

Las imágenes de microscopía electrónica de transmisión de alta resolución (HRTEM) de HAp, HApCOO<sup>-</sup> (5%) y HApCOO<sup>-</sup> (10%) revelaron la formación de nanopartículas de hidroxiapatita con forma de bastones altamente cristalinas con separaciones de planos de 0,34 nm en línea con los reportados para los planos de hidroxiapatita (002). [19].



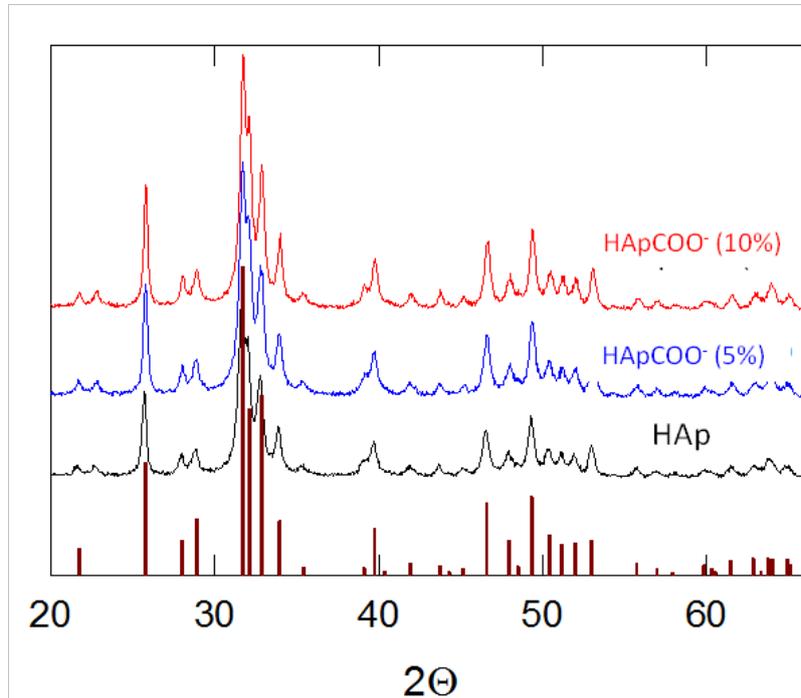
**Figura 4.5.** Micrografías HRTEM de HApCOO<sup>-</sup> (10%).

Debido a la aglomeración, no fue posible determinar la distribución del tamaño de las partículas. Sin embargo, puede apreciarse que los bastones tienen un ancho de 10-20 nm y una longitud de entre 50 y 100 nm. Más claramente, las imágenes de alta resolución magnificadas obtenidas para HAp, HApCOO<sup>-</sup> (5%) y HApCOO<sup>-</sup> (10%) muestran partículas en forma de bastones de aproximadamente 15, 10 y 20 nm de ancho, respectivamente, con separaciones de planos de 0,34 nm alineadas perpendicularmente al eje largo de la partícula.

#### 4.2.2.2 Difracción de rayos X (DRX)

Los difractogramas de DRX correspondientes de HAp, HApCOO<sup>-</sup> (5%) y HApCOO<sup>-</sup> (10%) representados en la *Figura 4.6*, mostraron patrones y anchos de pico característicos de los polvos de hidroxiapatita [20]. Las fases de impureza, como el fosfato tricálcico  $\alpha$  y  $\beta$  (TCP), no se encuentran presentes o se encuentran en niveles muy bajos, ya que no se observan contribuciones significativas de los picos más intensos de TCP en  $2\theta$  30,5-31,6 [21]. Estas observaciones sugieren claramente que se

forman principalmente dominios cristalinos de hidroxiapatita tras la adición tardía de 5 y 10% de CEPA durante la síntesis.

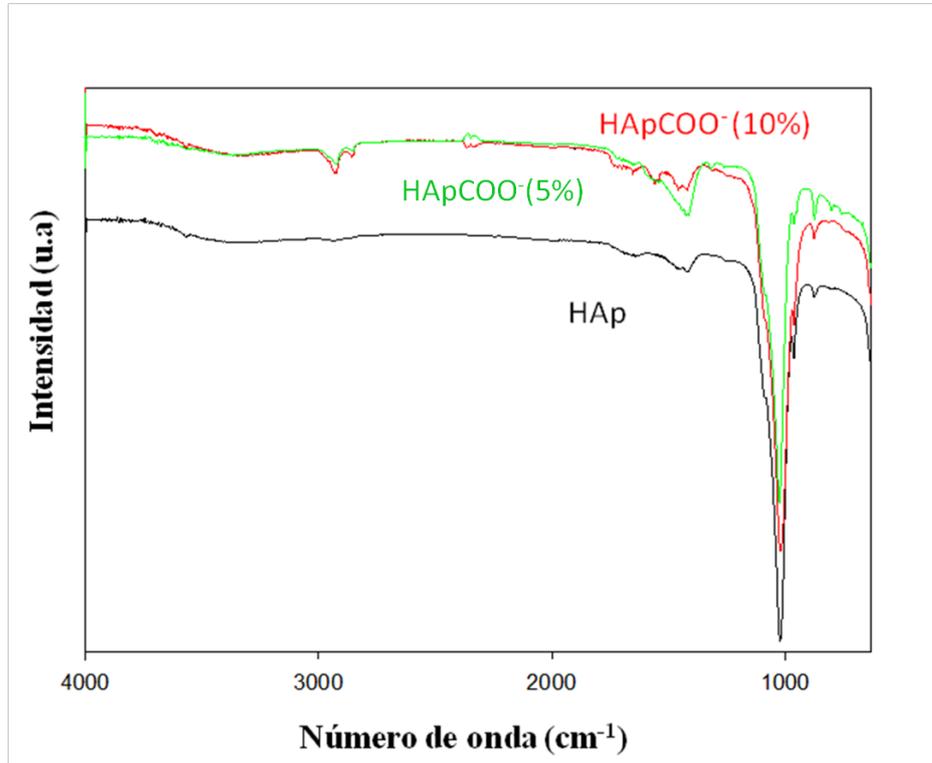


**Figura 4.6.** Difractogramas de rayos X de HAp, HApCOO<sup>-</sup> (5%) y HApCOO<sup>-</sup> (10%),. Las barras representan los patrones de referencia principales de hidroxiapatita sintética. [21]

### 4.2.2.3 Espectroscopía FTIR

La *Figura 4.7* muestra los espectros ATR-IR de HAp, HApCOO<sup>-</sup> (5%) y HApCOO<sup>-</sup> (10%). El espectro de HAp muestra los modos de vibración fundamentales de los grupos PO<sub>4</sub> de la estructura apatítica a aproximadamente 960 y 1030-1100 cm<sup>-1</sup>. Además, también se observan las pequeñas bandas en 875 y 1460-1420 cm<sup>-1</sup> atribuidas al carbonato residual del proceso de síntesis [22]. El espectro ATR-IR de HApCOO<sup>-</sup> (5%) y HApCOO<sup>-</sup> (10%) presentan bandas características de HAp. Sin embargo, mientras HApCOO<sup>-</sup> (5%) muestra principalmente estas bandas, el espectro de HApCOO<sup>-</sup> (10%) también muestra la presencia de nuevos picos en 2925-2850, 1440-1410, 1320 y 800 cm<sup>-1</sup> debido a la simetría de metileno y estiramientos asimétricos, estiramiento del grupo CO en sales de ácido carboxílico, [23] P-CH<sub>2</sub>R y vibraciones de CO [24], respectivamente, confirmando así la presencia de grupos propionato unidos a P en la superficie de HApCOO<sup>-</sup> (10%).

Teniendo en cuenta que  $\text{HApCOO}^-$  (10%) muestra la presencia de abundantes grupos de propionato unidos a la superficie de la HAp manteniendo la estructura cristalina de HAp, todos los estudios adicionales se realizaron con estas nanopartículas.



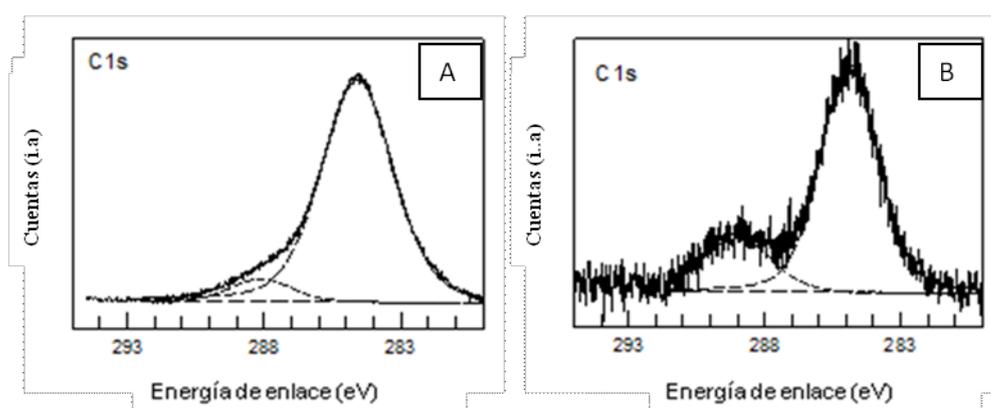
**Figura 4.7.** Espectros ATR-IR de (a) HAp (línea negra), (b)  $\text{HApCOO}^-$  (5%) (línea verde), y (c)  $\text{HApCOO}^-$  (10%) (línea roja).

#### 4.2.2.4 Espectroscopia Fotoelectrónica de rayos X

Los espectros de XPS de HAp y  $\text{HApCOO}^-$  (10%) presentaron las líneas principales del Ca, O, C y P. Teniendo en cuenta los factores de sensibilidad experimentales en relación con los diferentes elementos, se determinaron relaciones estequiométricas de superficie de  $\text{Ca}_1\text{P}_{0,6}\text{O}_{2,8}$  y  $\text{Ca}_1\text{P}_{0,55}\text{O}_{2,7}$  para HAp y  $\text{HApCOO}^-$  (10%), respectivamente. La relación Ca:P de HAp está en línea con la relación estequiométrica teórica de hidroxapatita esperada  $\text{Ca}_1\text{P}_{0,6}\text{O}_{2,6}$ , [25], mientras que la de  $\text{HApCOO}^-$  (10%) es casi 10% más alto, lo que sugiere una superficie ligeramente enriquecida con Ca.

Los polvos HAp y  $\text{HApCOO}^-$  (10%) muestran líneas de Ca  $2p_{1/2}$  y Ca  $2p_{3/2}$  a 347,0 eV separadas por 3,5 eV, y líneas de P  $2p_{1/2}$  y  $2p_{3/2}$  a 133 eV separadas por 0,9 eV, ver *Figura 4.8*, características de las fracciones de apatita como se discutió previamente en el *Capítulo III* durante la caracterización de los nanomateriales. Además, las señales XPS de O 1s para HAp y  $\text{HApCOO}^-$  (10%) muestran la mayor contribución (> 98%) de

una banda a 531,5 eV asignada a los átomos de oxígeno en los fosfatos [18]. Debido a que los picos de O1s tienden a ser amplios y la energía de unión de los grupos de superficie de interés se encuentra dentro de un rango muy estrecho, no es posible discriminar sin ambigüedad la contribución de oxígeno orgánico. Por otro lado, a pesar de que la contaminación orgánica puede enmascarar cualquier análisis serio del pico de C1s, los componentes O-C = O aparecen a 288,5 eV y pueden identificarse fácilmente. El pico C1s de HApCOO<sup>-</sup> (10%) muestra claramente una mayor contribución de carboxilatos, aproximadamente 21% del total de C que HAp (<7%), lo que también apoya la presencia de grupos de ácido propiónico en las muestras de HApCOO<sup>-</sup> (10%) .



**Figura 4.8.** Señales XPS de C1s obtenidos para la muestra de HAp (A) HApCOO<sup>-</sup> (10%) (B).

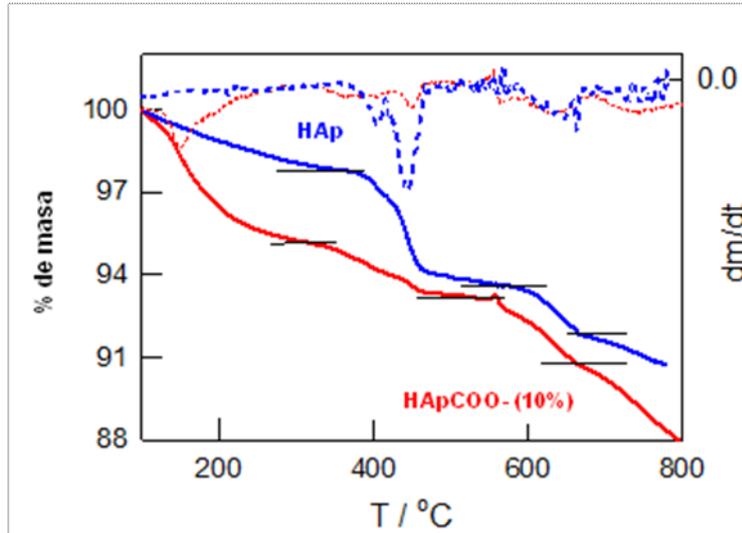
#### 4.2.2.5 Adsorción de N<sub>2</sub> y Potencial Z.

Las superficies específicas  $66,3 \pm 0,1$  y  $67,5 \pm 0,1$  m<sup>2</sup>/g, determinadas a partir de las isothermas de adsorción de N<sub>2</sub>(g) y su modelado según la isoterma de BET para HAp y HApCOO<sup>-</sup>(10%), respectivamente, son similares. Por otro lado, los valores de potencial Z en suspensiones acuosas de pH 6,6 y fuerza iónica 0,01 M obtenidos para HAp y HApCOO<sup>-</sup> (10%) fueron de  $-27 \pm 2$ , y  $-21 \pm 2$  mV, respectivamente. Las cargas superficiales negativas se reportan en la literatura para las hidroxiapatitas policristalinas puras con relaciones de Ca: P de 1,67 como se observa aquí para HAp [26].

#### 4.2.2.6 Análisis termogravimétrico

Las partículas de HApCOO<sup>-</sup> (10%) mostraron un patrón de pérdida de masa en función del aumento de temperatura en el intervalo entre 120 y 440 °C, diferente del observado

para las nanopartículas de HAp (*Figura 4.9*). Esta diferencia puede atribuirse a la presencia de materia orgánica. La pérdida de masa de 7% observada en este rango de temperatura puede asignarse a la oxidación de los grupos carboxilato terminales a  $\text{CO}_2$ . Sin embargo, la contribución de la pérdida de masa debido al agua adsorbida no puede ser ignorada.



**Figura 4.9.** TGA medidos en Atmósfera de oxígeno HAp (azul), HApCOO<sup>-</sup> (10%) (rojo)

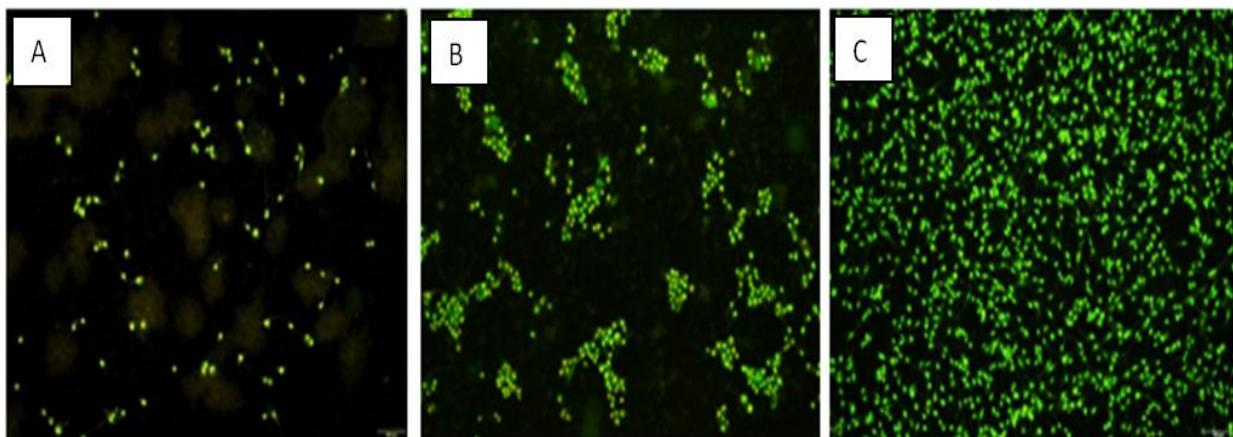
Además, se observó una pérdida adicional de 1,4% en el rango de temperatura entre 450-650 °C el cual puede ser atribuido a la eliminación de grupos de tipo carbonato superficiales, de acuerdo con lo obtenido para HAp. Por lo tanto, considerando que la masa de agua adsorbida podría estar en el mismo orden que la de HAp, se pueden estimar 0,055 moles de grupos de ácido propiónico por cada 100 g de HApCOO<sup>-</sup> (10%). Considerando el área de superficie específica medida de 67,5 m<sup>2</sup>/g para HApCOO<sup>-</sup> (10%), se estima un área de  $\sim 20 \text{ \AA}^2$  por grupo de ácido propiónico, valor que se encuentra en el orden del área de la sección transversal de los ácidos carboxílicos alifáticos en una película de interfaz agua / aire [27]. En su conjunto, estos resultados sugieren una superficie bien cubierta con CEPA.

#### ***4.2.2.7 Biocompatibilidad de HApCOO<sup>-</sup> (10%) evaluada en células fibroblásticas de ratón 3T3 Balb-c***

» *Tinción con colorante Naranja de acridina (AO).*

Para el estudio de la viabilidad de células 3T3 Balb-c crecidas sobre HAp y HApCOO<sup>-</sup> (10%) después de 24 hs de exposición se realizaron ensayos mediante el método de tinción con AO. Para este propósito, se sumergieron cubreobjetos de vidrio de 24 x 24 mm en suspensiones alcohólicas de nanopartículas de 23,0 g/L (HAp y HApCOO<sup>-</sup> (10%)), posteriormente el disolvente se evaporó y todo el sistema se esterilizó. Los cubreobjetos de vidrio se introdujeron en una placa de Petri de 10 cm que luego se sembró con  $5 \times 10^5$  células en suspensión. Después de 24 hs de incubación a 37°C en medio de cultivo completo y atmósfera húmeda de 5% de CO<sub>2</sub>, se descartó el medio, los cubreobjetos se lavaron dos veces con PBS y se tiñeron con colorante AO antes de la observación por microscopía de fluorescencia. Como controles negativos se usaron células 3T3Balb-c cultivadas en cubreobjetos de vidrio sin tratamiento.

La *Figura 4.10* muestra las imágenes microscópicas de células 3T3 Balb-c teñidas con AO cultivadas sobre HAp, y HApCOO<sup>-</sup> (10%). La viabilidad celular, dada como el porcentaje de la densidad celular con respecto al control, a modo de realizar un análisis comparativo se tomó como control a una superficie recubierta con HAp; mostró una proliferación mayor de  $42 \pm 9\%$  ( $p < 0,001$ ) para células cultivadas en HApCOO<sup>-</sup> (10%). Una proliferación celular más baja que los controles también se informa en la literatura de nanopartículas de hidroxiapatita sin recubrimiento, en línea con el comportamiento observado aquí para la HAp [28]–[30]. Ensayos *in vitro* reportados en cultivos de células de osteoblasto MC3T3-E1 y superficies de apatita [29], [30] sugieren que las células pueden estar sujetas a niveles cambiantes de iones de Ca<sup>2+</sup> y PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> debido a un rápido intercambio de iones en la superficie de apatita sin recubrimiento.



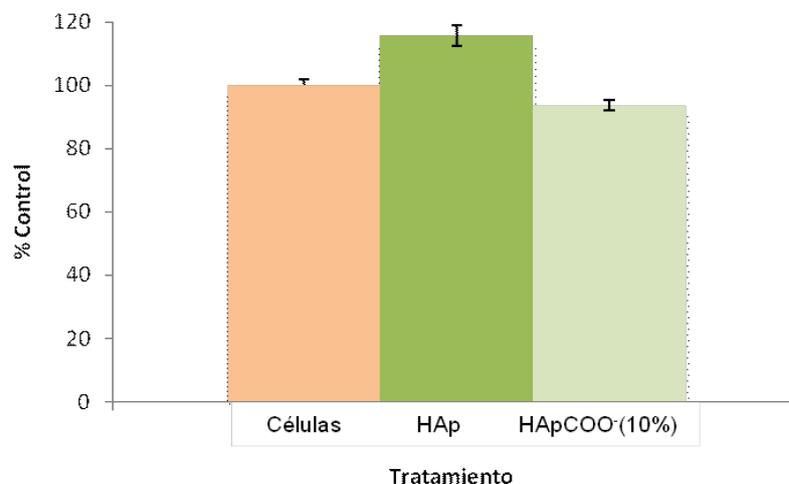
**Figura 4.10.** Imágenes microscópicas de células 3T3 Balb-c teñidas con AO y cultivadas sobre placas de vidrio recubiertas con A) HAp, B) HApCOO (10%) y C) control después de 24 h de incubación.

» *Ensayo de MTT.*

Se colocaron 50  $\mu\text{L}$  de suspensión etanólica de 11,5 g /L de HAp o  $\text{HApCOO}^-$  (10%) en pocillos individuales de una placa de 96 pocillos, se evaporó el solvente y todo el sistema se esterilizó. Se agregaron  $2,7 \times 10^4$  células por pocillo y se cultivaron a  $37^\circ\text{C}$  en una atmósfera húmeda con 5% de  $\text{CO}_2$  en medio de cultivo completo. Después de 24 hs de incubación, el medio de cultivo se descartó y cada pocillo se lavó dos veces con PBS luego se añadió medio fresco que contenía el reactivo MTT en una concentración final de 1 mg/mL. Después de 3 hs de incubación, la solución de MTT se desechó y las células se lavaron con PBS. El color se evidenció mediante la adición de 100  $\mu\text{L}$  de dimetilsulfóxido (DMSO) a cada pocillo para inducir la lisis celular y la disolución de los cristales de formazán. La placa se agitó durante 10 minutos y la absorbancia se midió a 560 nm utilizando un lector automático de placas ELISA (BioTek $\mu$ Quant). Dado que la absorbancia es directamente proporcional al número de células viables, la actividad de reducción de MTT se expresó como un porcentaje de las células de control,  $(A-B)/A \times 100$ , con A y B la absorbancia de las células de control y tratadas, respectivamente. Cada ensayo se repitió tres veces en experimentos independientes.

Los datos se analizaron utilizando la prueba ANOVA y se realizaron comparaciones múltiples utilizando los valores de p corregidos por el método de Bonferroni.

La *Figura 4.11* muestra un 15% de aumento ( $p < 0,001$ ) en la actividad mitocondrial para células crecidas sobre HAp con respecto al control (células cultivadas sin tratamiento), mientras que no se observaron diferencias significativas para  $\text{HApCOO}^-$  (10%).

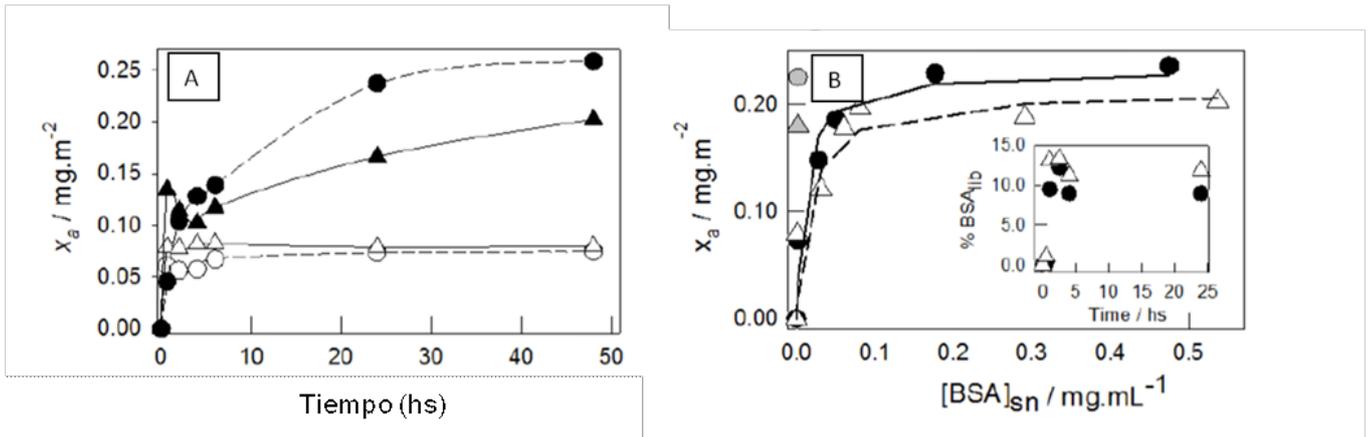


**Figura 4.11.** Ensayos de MTT en células 3T3 Balb-c después de 24 hs de exposición sobre HAp y  $\text{HApCOO}^-$ (10%)

Los resultados obtenidos evidencian la necesidad de llevar a cabo diferentes ensayos para abordar el análisis de biocompatibilidad de las nanopartículas. Además, en concordancia con lo reportado en la literatura, los ensayos que analizan directamente las células viables son más sensibles que los test indirectos el MTT como prueba para el efecto antiproliferativo de la hidroxiapatita [31]. A pesar de estas diferencias, ambos ensayos de viabilidad parecen indicar que el uso de CEPA para la modificación de la superficie de las nanopartículas de hidroxiapatita no produce efectos negativos hacia las células 3T3 Balb-c.

#### 4.2.2.8 Adsorción y cinética de liberación de BSA

Dado que la química de la superficie tiene grandes efectos sobre la adsorción de proteínas, se investigó y comparó la capacidad de adsorción de albúmina de suero bovino (BSA) para las partículas de HApCOO<sup>-</sup> (10%) y HAp a 37 °C. Para ello, se realizaron experimentos en serie en los que 10 mg de HAp o HApCOO<sup>-</sup> se introdujeron en tubos de polipropileno que contenían 10 mL de soluciones de BSA de concentraciones en el rango entre 50 y 600 µg/mL. La mezcla se dejó reposar entre 24 y 48 hs dependiendo de las concentraciones iniciales de BSA, a 37 °C y con agitación constante. Después de ese tiempo, 1 mL de la fase acuosa se centrifugó a 900 rpm durante 10 minutos y las proteínas sobrenadantes se cuantificaron mediante el método de Bradford [32]. Para ese propósito, se mezclaron alrededor de 40 a 500 µl de sobrenadante (dependiendo de la concentración a analizar) con 950 µL de solución azul de cumasi G250. Posteriormente se midió la absorbancia a 595 nm. Para cuantificar la concentración de BSA en solución, se utilizaron patrones para generar una curva de calibración de concentración-absorbancia a 595 nm. La cantidad de carga de BSA, X, se calculó en función del agotamiento de BSA en el volumen de solución V y la masa de partículas m utilizada en los experimentos de adsorción,  $X = ([\text{BSA}]_o - [\text{BSA}]_{sn}) \times V / m$ , con  $[\text{BSA}]_o$  y  $[\text{BSA}]_{sn}$ , las concentraciones de BSA inicial y la de la solución en equilibrio con las nanopartículas, respectivamente.



**Figura 4.12.** (A): muestra la adsorción de BSA ( $x_a$ ) en HAp (círculos) y HApCOO<sup>-</sup> (10%) (triángulos) en función del tiempo para las concentraciones iniciales de proteína  $[\text{BSA}]_0 = 0,05$  (símbolos abiertos) y  $0,6 \text{ mg} / \text{mL}$  (símbolos cerrados) en soluciones acuosas de pH 6,6 - 6,7. (B): Gráfico de la BSA adsorbida ( $x_a$ ) frente a la concentración de BSA restante en solución,  $[\text{BSA}]_{\text{sn}}$ , después de que no se absorba más proteína en los experimentos de adsorción dependientes del tiempo para HAp (círculos) y HApCOO<sup>-</sup> (10%) (triángulos), respectivamente. Las líneas completas y discontinuas representan el ajuste a la ecuación (1). Los símbolos grises representan los valores obtenidos de los experimentos de desorción mostrados en el recuadro. Recuadro de la figura B: % de desorción de BSA solución de PBS a pH 7,3 a partir de una carga de BSA de  $0,24 \text{ mg}/\text{m}^2$  para HAp (círculo) y  $0,20 \text{ mg}/\text{m}^2$  para HApCOO<sup>-</sup> (10%) respectivamente, en función del tiempo.

La *Figura 4.12. A* muestra la adsorción de BSA en función del tiempo en ambas partículas HAp y HApCOO<sup>-</sup> (10%) a dos concentraciones iniciales de solución,  $[\text{BSA}]_0 = 0,05$  y  $0,6 \text{ mg}/\text{mL}$ . En presencia de concentraciones bajas de  $[\text{BSA}]_0$ , tanto HAp como HApCOO<sup>-</sup> (10%) adsorben rápidamente la proteína y alcanzan cantidades adsorbidas similares después de 5 horas, de acuerdo con los informes publicados sobre la adsorción de BSA en cristales de hidroxiapatita [33]. Un aumento de diez veces en  $[\text{BSA}]_0$  lleva, en ambos casos, a una adsorción rápida y un proceso posterior más lento. Mientras que el régimen rápido inicial se atribuye a la superficie que actúa como un sumidero de las proteínas debido a las fuertes atracciones, la fuerte desaceleración en la adsorción después de un cierto tiempo se debe a la barrera de potencial que se genera por la presencia de proteínas ya adsorbidas [34]

La *Figura 4.12. B* muestra las isothermas de adsorción HAp y HApCOO<sup>-</sup> (10%), donde  $X_a$  es la cantidad de BSA adsorbida por unidad de superficie del sustrato y  $[\text{BSA}]_{\text{sn}}$ , es la concentración de BSA restante en solución después de que no se absorba más proteína en los experimentos de adsorción dependientes del tiempo.

A su vez, se realizaron experimentos de desorción de la BSA (Figura 4.12.B, recuadro), para lo que se incubaron 10 mg de las muestras cargadas con mayor concentración de BSA en 10 ml de solución tampón de fosfato ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  1,6 g/L,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,20 g/L, en  $\text{NaCl}$  8,18 g/L y  $\text{KCl}$  0,92 g/L). La mezcla se dejó reposar durante diferentes periodos de tiempo a 37 °C con agitación constante. Después de cada tiempo, se centrifugó a 900 rpm durante 10 minutos y se cuantificaron las proteínas en el sobrenadante.

Los experimentos de desorción realizados para las cargas de BSA más altas investigadas (0,24 mg / m<sup>2</sup> HAp y 0,20 mg / m<sup>2</sup> HApCOO<sup>-</sup>) indican que se produce una desorción de aproximadamente 10% después de tres horas que conducen a nuevos valores de  $X_a$  y  $[\text{BSA}]_{\text{sn}}$  (símbolos grises en la Figura 4.12 B). Ensayos en presencia de fosfatos inorgánicos que se adsorben de manera competitiva sobre la HAp y la HApCOO<sup>-</sup> (10%), arrojan resultados similares. Estos valores no coinciden con los de la isoterma de adsorción, en línea con una adsorción de BSA irreversible [34], [35]. Los puntos experimentales de las isotermas respectivas pueden ajustarse razonablemente ( $r^2 > 0,95$ ) a una isoterma de tipo Langmuir dada por la ecuación (1), donde:  $\kappa_m$  representa la masa máxima de BSA capaz de cubrir 1 m<sup>2</sup> de la superficie de las partículas, y K es la constante de afinidad. Se realizó un ajuste de los datos mostrados en la Figura 4.12 parte B con la ecuación (1).

$$x = \frac{K \times \kappa_m \times [\text{BSA}]_{\text{sn}}}{1 + K \times [\text{BSA}]_{\text{sn}}} \quad (\text{Ec 1})$$

Se obtuvieron valores de  $\kappa_m = (0,27 \pm 0,05)$  mg / m<sup>2</sup> y  $(0,21 \pm 0,04)$  mg/m<sup>2</sup> para HAp y HApCOO<sup>-</sup> (10%), respectivamente, dentro del rango publicado para superficies de hidroxiapatita cargadas negativamente a 37 °C [6]. Sin embargo, el hecho de que las diferencias observadas en los valores de  $\kappa_m$  tengan poca importancia y que los valores de K ((100 ± 50) y (61 ± 23) mg/ mL para HAp y HApCOO<sup>-</sup> (10%), respectivamente son casi coincidentes dentro del error experimental, apoyan fuertemente una afinidad BSA similar por ambas partículas. Estas observaciones están en línea con los informes de la literatura [39] sobre la BSA como una proteína de baja estabilidad interna capaz de adsorberse independientemente de las interacciones electrostáticas y los mecanismos de interacción hidrofóbica. La baja estabilidad interna de BSA permite a la proteína exponer sus grupos  $\text{NH}_3^+$  al acercarse a la superficie cargada negativamente, aumentando la eficiencia de la unión de BSA con superficies con potenciales Z negativos [34]–[38].

### ***4.2.3 Anclado de compuestos fluorescentes a la superficie de los nanomateriales a través de CEPA. Funcionalización con Tirosina (Tyr) y Fucsina básica (Fu)***

Las nanopartículas fluorescentes a base de hidroxiapatita son una herramienta prometedora tanto para diagnóstico, como para administración y liberación de fármacos como formas terapéuticas. Sin embargo, escasa es la información respecto a la síntesis y propiedades de hidroxiapatita fluorescentes capaces de ser excitadas a longitudes de onda entre 500-550 nm que emiten entre 600-700 nm [14], [15]. A fin de probar la versatilidad de las partículas de HApCOO<sup>-</sup> (10%) como precursores en la síntesis de materiales más complejos, se procedió a la derivatización de las mismas con el colorante fluorescente fucsina básica y el ester bencilico del aminoácido L-Tirosina. Estos compuestos se seleccionaron debido a que son biocompatibles y pueden ser sensados fácilmente aunque esten en bajas proporciones. A su vez, debido a la estructura química del mismo, el aminoácido L-Tirosina podría utilizarse como una sonda para sensar pH intracelular, dado que variaciones en el pH dan lugar a diferentes máximos de adsorción dentro de su espectro de fluorescencia, como así también se ve modificado su rendimiento cuántico de fluorescencia al variar la acidez del medio circundante [39].

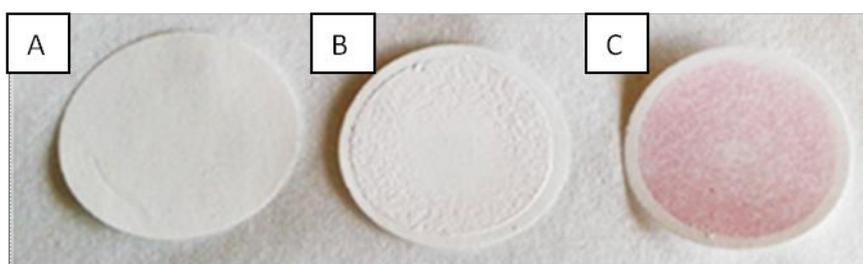
#### **4.2.3.1 Inmovilización de tirosina en HApCOO<sup>-</sup> (10%)**

La modificación con Tirosina (Ty) en las nanopartículas de HApCOO<sup>-</sup> (10%) se realizó a través de la reacción de acoplamiento entre los grupos carboxilato de las partículas y los grupos amina del aminoácido catalizado por dicitclohexilcarbodiimida (DCC) [40]. Para evitar reacciones secundarias de formación de polipéptidos se trabajó protegiendo el grupo carboxilo de la tirosina mediante la esterificación con alcohol bencilico. Para ello, se mezclaron 1,5 g de L-tirosina con 4 mL de HCl y 40 mL de alcohol bencilico. La solución resultante se mantuvo a 81 °C durante una hora antes de la extracción del producto con éter etílico y 10% de soluciones acuosas de HCl. El pH de la fase acuosa se ajustó a 9,09 por adición de NH<sub>4</sub>OH. El sólido de éster bencilico de tirosina precipitado se aisló por filtración con membranas hidrófilas de 0,22 μm y se lavó con etanol.

Para activar los grupos carboxílicos de las partículas, se agregaron 4 mg de N,N'-diciclohexilcarbodiimida (DCC) y 4 mg de N-hidroxisuccinimida (NHS) a 10 ml de una suspensión de etanol de HApCOO<sup>-</sup> (10%) (1 mg/mL), la mezcla se dejó en agitación a temperatura ambiente en la oscuridad durante 18 hs. Posteriormente, se agregaron 5 mg de éster bencílico de tirosina y se dejó que la reaccionar durante 72 hs con agitación constante antes de separar las partículas de la mezcla reactiva por filtración con una membrana hidrófila de 0,22 μm. Posteriormente, se realizaron exhaustivos lavados con etanol hasta que no se observó absorbancia a 350 nm en el líquido del sobrenadante. Las partículas modificadas en la superficie obtenidas, denotadas como HApCOOTyr, se secaron en la estufa a 60 °C durante 24 hs.

#### 4.2.3.2 Inmovilización de fucsina en HApCOO<sup>-</sup> (10%)

Las partículas de HApCOO<sup>-</sup> (10%) recién preparadas se derivatizaron con fucsina mediante la formación de un enlace amida, siguiendo un procedimiento similar al descrito para la derivación de tirosina pero agregando 2 mg de fucsina. Para eliminar las trazas de Fu adsorbidas, las nanopartículas conjugadas, HApCOOFu, se resuspendieron en etanol, se filtraron con filtros de 0,22 μm y se lavaron y el ciclo se repitió hasta que los líquidos de lavado no mostraron trazas de Fu por espectroscopia de absorción. Las partículas de HApCOOFu permanecieron como un filtrado rojo sólido en membranas de 0,22 μm, como se observa en la *Figura 4.13*.



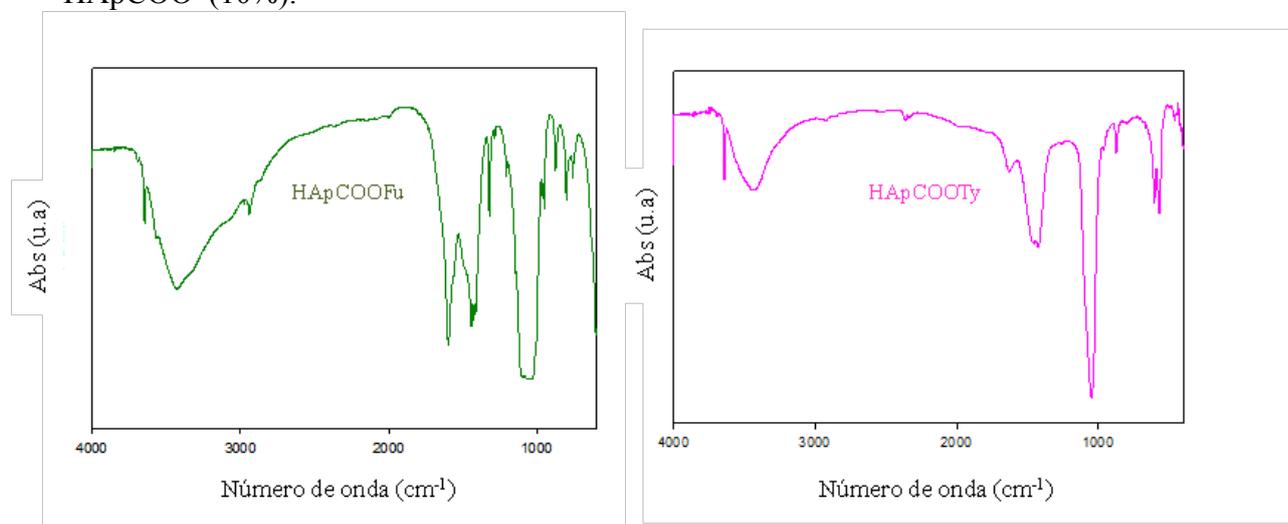
**Figura 4.13.** Filtrado sólido retenido en la membrana para A) Fu (colorante en solución), B) HApCOO<sup>-</sup> (10%) y C) HApCOOFu.

Los experimentos blanco realizados con Fucsina y HApCOO<sup>-</sup> (10%) en la ausencia de DCC y NHS muestran que el filtrado de fucsina libre no permanece en la membrana, es decir el colorante no se adsorbe físicamente sobre HApCOO<sup>-</sup> (10%) después de una

serie de lavados exhaustivos. Todas estas observaciones apoyan el recubrimiento covalente efectivo de  $\text{HApCOO}^-$  (10%) con Fu.

#### 4.2.3.3 Espectroscopía FTIR

Los espectros ATR de  $\text{HApCOOFu}$  y  $\text{HApCOOTy}$ , mostraron picos en 2930-2840, 1595, 1440-1420, 1320 y 800  $\text{cm}^{-1}$  ya atribuidos a la presencia de grupos de propionato unidos a P en la superficie HAp. El espectro de  $\text{HApCOOFu}$  también muestra picos bien definidos a 1320 y 760  $\text{cm}^{-1}$  debido los grupos de las funciones aromática de las uniones C-N y C-H y la torsión del anillo, respectivamente, los cuales pueden observarse en el espectro de la fucsina. Los picos a 1600 y 1560  $\text{cm}^{-1}$ , característicos del estiramiento de los enlaces C-O y N-H en las amidas, pueden asignarse a los enlaces amida que unen grupos carboxílicos del ácido propiónico con aminas de fucsina. Por otro lado,  $\text{HApCOOTy}$  muestra picos que aparecen en 1212, 1670-1630 y 1150  $\text{cm}^{-1}$ , característicos del estiramiento de las vibraciones de C-O en fenoles, y C=O en amidas, anillos aromáticos C-C y COC en ésteres alifáticos, respectivamente, en línea con la unión del éster bencílico de tirosina a través de enlaces amida a los grupos carboxilo de  $\text{HApCOO}^-$  (10%).

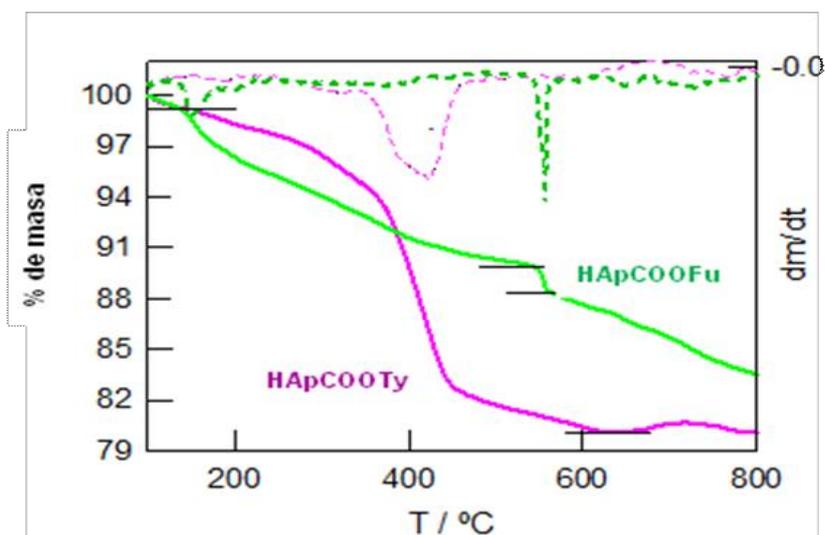


**Figura 4.14.** Espectros ATR-IR obtenidos para  $\text{HApCOOFu}$  (curva verde) y  $\text{HApCOOTy}$  (curva rosa).

#### 4.2.3.4 Análisis termogravimétrico y adsorción de $\text{N}_2$

Las curvas TGA de los polvos de  $\text{HApCOOFu}$  mostraron ~ 11% de pérdida de masa total entre 150 y 550 ° C, asignada a la pérdida de materia orgánica de enlace superficial (grupos de ácido propiónico superficial y fucsina unida) junto con agua adsorbida. A partir de la diferencia en la pérdida de masa en ese rango de temperatura entre

HApCOO<sup>-</sup> (10%) y HApCOOFu se pudo estimar que en las nanopartículas HApCOOFu hay alrededor del 4% de fucsina en masa. Por lo tanto, se puede estimar aproximadamente un recubrimiento de 0,013 moles de Fu / 100 g de partículas, es decir, casi la cuarta parte de los grupos terminales de ácido propiónico han sido derivatizados con fucsina.



**Figura 4.15.** TGA realizado en atmósfera de oxígeno de HApCOOFu (rosa), HApCOOTy (verde). Las líneas de puntos rosa y verde representan las respectivas derivadas.

Considerando que para las partículas de HApCOO<sup>-</sup> (10%) el área de superficie específica era de 67,5 m<sup>2</sup>/g, un promedio de área de 86 Å<sup>2</sup> se puede estimar aproximadamente por molécula de fucsina, lo que indica una distribución superficial de fucsina poco compacta.

Un análisis similar realizado para HApCOOTy (Figura 4.15), muestra una pérdida total de masa del 19% entre 150 y 640 °C. Esto indica que 0,042 moles de éster bencílico de tirosina se une a 100 g de partículas (corresponde a un 75% de los carboxilatos superficiales). Estos datos permitieron estimar un área de ~ 27 Å<sup>2</sup> por molécula de tirosina, lo que apoya una cobertura superficial eficiente.

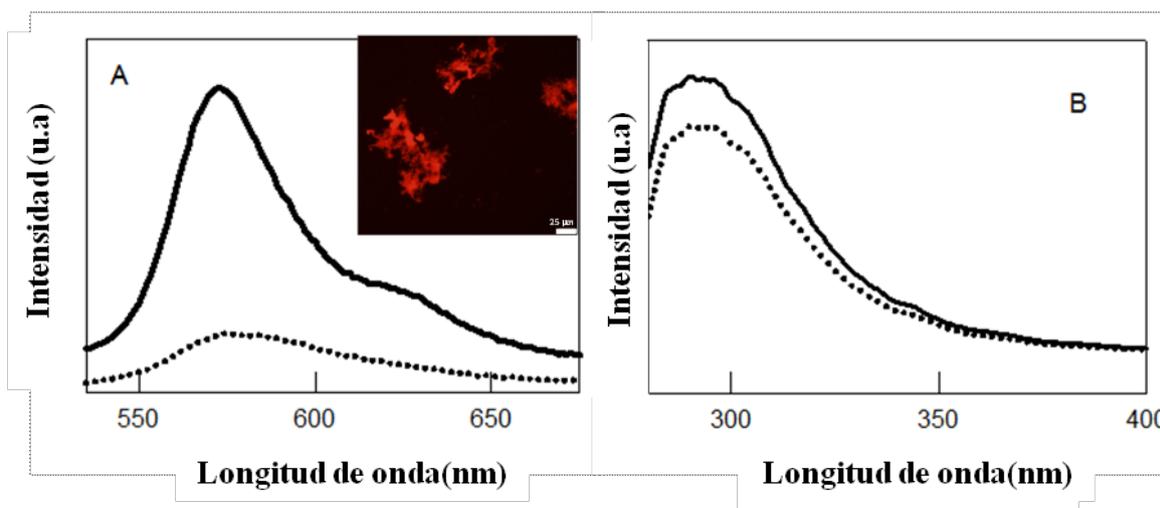
#### 4.2.3.5 Dispersión dinámica de luz

Tanto para la HApCOOFu como la HApCOOTy se pudo observar la misma tendencia a aglomerarse en suspensiones acuosas formando suspensiones muy inestables. Por lo tanto, las movibilidades electroforéticas y la agregación no pudieron medirse en disolventes acuosos. Sin embargo, los experimentos de DLS de HApCOOFu en etanol mostraron un tamaño hidrodinámico promedio de 400 ± 50 nm, soportando una

aglomeración baja de las partículas en este solvente, de acuerdo con la alta afinidad de la Fu libre por el etanol, y en línea con un recubrimiento eficiente de  $\text{HApCOO}^-$  (10%) con Fu.

#### 4.2.3.6 Fluorescencia

Suspensiones etanólicas de  $\text{HApCOOFu}$  y soluciones de fucsina en etanol de 0,1 de atenuación y absorbancia, respectivamente, a 510 nm, muestran espectros de fluorescencia similares. Sin embargo, la intensidad de fluorescencia de la Fu covalentemente unida a  $\text{HApCOO}^-$  (10%) es aproximadamente 5-7 veces mayor que la observada para la Fu libre. Este hecho, está de acuerdo con el comportamiento informado para la Fu en matrices sólidas, dado que la rigidez del anillo aromático implica un incremento en la intensidad de emisión del colorante [41]. La observación microscópica de los polvos de  $\text{HApCOOFu}$  depositados en un portaobjetos evidenciaron una marcada intensidad de fluorescencia, como se muestra en la imagen de fluorescencia en el inserto de la *Figura 4.16 A*.



**Figura 4.16.** Espectro de fluorescencia de A) una suspensión de etanol de  $\text{ApCOOFu}$  (—) y solución de Fu en etanol (...) obtenida por excitación a 510 nm de soluciones de absorbancia de 0,1 a esta longitud de onda. Inserto: Imagen de microscopía de epifluorescencia de nanopartículas  $\text{HApCOOFu}$  secas; B) Suspensión de  $\text{ApCOOTyr}$  en acetonitrilo (—) y solución de Tyr en acetonitrilo (...) obtenidas por excitación a 270 nm de soluciones de absorbancia 0,1 a esa longitud de onda.

Las suspensiones de acetonitrilo de  $\text{ApCOOTyr}$  de absorbancia  $\sim 0.1$  y las soluciones en acetonitrilo del éster bencílico de tirosina de 0,1 de absorbancia a 270 nm muestran espectros de fluorescencia e intensidad de fluorescencia similares dentro del error

experimental. Esta observación confirma la funcionalización covalente eficiente de la HApCOO<sup>-</sup>(10%) con el aminoácido tirosina.

### 4.3 Conclusiones parciales

- Se optimizó la síntesis de nanopartículas de hidroxiapatita funcionalizadas superficialmente mediante dos métodos diferentes. Por una lado, la silanización de HAp previamente sintetizada permitió, aunque con aparente baja eficiencia, la funcionalización con grupos amino terminales. Por otro lado, la incorporación de ácidos organofosfónicos en las etapas finales de síntesis de HAp dio lugar a nanopartículas de HAp con grupos ácido propiónico terminales unidos mediante enlaces P-O-P, denominadas HApCOO<sup>-</sup>. La incorporación de un 10% de ácido 3-fosfonopropiónico (CEPA), resultó ser óptima para la obtención de una cobertura eficiente de la superficie de la HAp.
- La caracterización exhaustiva de las partículas mediante espectroscopía IR, HRTEM, DRX, XPS, demostró el recubrimiento de las partículas con los organofosfonatos y un núcleo de hidroxiapatita de morfología y composición de fase similar a la obtenida para HAp.
- Las partículas HApCOO<sup>-</sup> (10%) no mostraron efectos citotóxicos en células 3T3Balb-c y a su vez presentaron una viabilidad celular y una actividad mitocondrial mejorada en comparación con HAp.
- Los abundantes grupos superficiales carboxilo presentes en HApCOO<sup>-</sup> (10%) facilitaron el anclado mediante enlaces amida estables con fucsina y el ester bencílico de la L-tirosina. Los polvos de hidroxiapatita unidos a fucsina muestran una fluorescencia diez veces más intensa que la fucsina libre, tanto en suspensiones de etanol como en forma sólida, expandiendo así los usos potenciales de las nanopartículas de hidroxiapatita como sensores fluorescentes.
- El recubrimiento de aminoácidos de alta densidad obtenido al unir covalentemente la tirosina a las partículas HApCOO<sup>-</sup> (10%) apoya el uso

potencial de estos materiales como plataformas para la unión de biomoléculas de interés en la regeneración de tejido óseo.

## Referencias

- [1] W. H. Lee, C. Y. Loo, and R. Rohanizadeh, “A review of chemical surface modification of bioceramics: Effects on protein adsorption and cellular response,” *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, vol. 122. Elsevier, pp. 823–834, 01-Oct-2014.
- [2] W. H. Lee, C. Y. Loo, K. L. Van, A. V. Zavgorodniy, and R. Rohanizadeh, “Modulating protein adsorption onto hydroxyapatite particles using different amino acid treatments,” *J. R. Soc. Interface*, vol. 9, no. 70, pp. 918–927, May 2012.
- [3] C. S. Goonasekera, K. S. Jack, J. J. Cooper-White, and L. Grøndahl, “Attachment of poly(acrylic acid) to 3-aminopropyltriethoxysilane surface-modified hydroxyapatite,” *J. Mater. Chem. B*, vol. 1, no. 42, pp. 5842–5852, Nov. 2013.
- [4] L. Russo *et al.*, “Carbonate hydroxyapatite functionalization: A comparative study towards (bio)molecules fixation,” *Interface Focus*, vol. 4, no. 1, Feb. 2014.
- [5] A. Baeza, I. Izquierdo-Barba, and M. Vallet-Regí, “Biotinylation of silicon-doped hydroxyapatite: A new approach to protein fixation for bone tissue regeneration,” *Acta Biomater.*, vol. 6, no. 3, pp. 743–749, Mar. 2010.
- [6] S. C. D’Andre and A. Y. Fadeev, “Covalent Surface Modification of Calcium Hydroxyapatite Using  $n$ -Alkyl- and  $n$ -Fluoroalkylphosphonic Acids,” *Langmuir*, vol. 19, no. 19, pp. 7904–7910, Sep. 2003.
- [7] L. El-Hammari *et al.*, “Organically modified porous hydroxyapatites: A comparison between alkylphosphonate grafting and citrate chelation,” *J. Solid State Chem.*, vol. 181, no. 4, pp. 848–854, 2008.
- [8] Z. Amjad, “The influence of polyphosphates, phosphonates, and poly(carboxylic acids) on the crystal growth of hydroxyapatite,” *Langmuir*, vol. 3, no. 6, pp. 1063–1069, Nov. 1987.
- [9] S. Ishihara, T. Matsumoto, T. Onoki, M. H. Uddin, T. Sohmura, and A. Nakahira, “Regulation of the protein-loading capacity of hydroxyapatite by

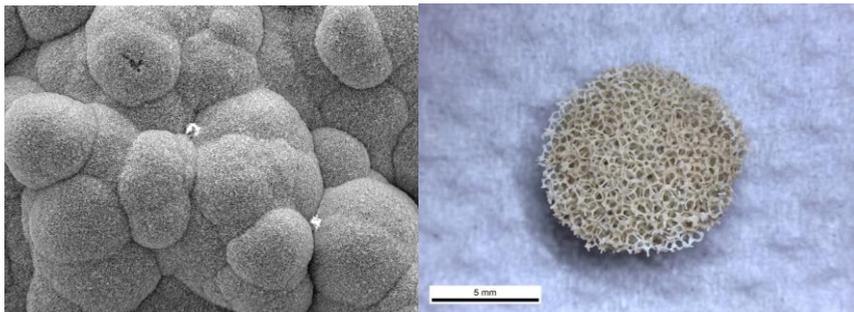
- mercaptosuccinic acid modification,” *Acta Biomater.*, vol. 6, no. 3, pp. 830–835, Mar. 2010.
- [10] T. Yokoi, M. Kawashita, and C. Ohtsuki, “Biomimetic mineralization of calcium phosphates in polymeric hydrogels containing carboxyl groups,” *J. Asian Ceram. Soc.*, vol. 1, no. 2, pp. 155–162, 2013.
- [11] G. Khang, *Handbook of intelligent scaffolds for tissue engineering and regenerative medicine*. .
- [12] E. Valeur and M. Bradley, “Amide bond formation: Beyond the myth of coupling reagents,” *Chemical Society Reviews*, vol. 38, no. 2, pp. 606–631, 2009.
- [13] M. Neumeier, L. A. Hails, S. A. Davis, S. Mann, and M. Epple, “Synthesis of fluorescent core-shell hydroxyapatite nanoparticles,” *J. Mater. Chem.*, vol. 21, no. 4, pp. 1250–1254, Jan. 2011.
- [14] H. Zeng, X. Li, F. Xie, L. Teng, and H. Chen, “Dextran-coated fluorapatite nanorods doped with lanthanides in labelling and directing osteogenic differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells,” *J. Mater. Chem. B*, vol. 2, no. 23, pp. 3609–3617, Jun. 2014.
- [15] H. Liu *et al.*, “Biocompatible Fluorescent Hydroxyapatite: Synthesis and Live Cell Imaging Applications,” *J. Phys. Chem. C*, vol. 115, no. 38, pp. 18538–18544, Sep. 2011.
- [16] S. Wang *et al.*, “Aminopropyltriethoxysilane-mediated surface functionalization of hydroxyapatite nanoparticles: synthesis, characterization, and in vitro toxicity assay,” *Int. J. Nanomedicine*, vol. 6, pp. 3449–59, 2011.
- [17] L. Berzina-Cimdina and N. Borodajenko, “Research of Calcium Phosphates Using Fourier Transform Infrared Spectroscopy,” in *Infrared Spectroscopy - Materials Science, Engineering and Technology*, InTech, 2012.
- [18] C. J. P. Alexander V. Naumkin, Anna Kraut-Vass, Stephen W. Gaarenstroom, “NIST X-ray Photoelectron Spectroscopy Database,” *Measurement Services Division of the National Institute of Standards and Technology (NIST)*, 2012. [Online]. Available: <http://srdata.nist.gov/xps/Default.aspx>. [Accessed: 31-Jan-2020].
- [19] Z. Wang, Z. Xu, W. Zhao, and N. Sahai, “A potential mechanism for amino acid-controlled crystal growth of hydroxyapatite,” *J. Mater. Chem. B*, vol. 3, no. 47, pp. 9157–9167, 2015.
- [20] S. C. Ruiz-mendoza, L. C. Moreno-aldana, and E. Delgado-mejía, “Abridged

- Acid-Base Wet-Milling Synthesis of High Purity Hydroxyapatite - 1 . Introduction and Literature Review 2 . Experimental Procedure,” vol. 11, no. 2, pp. 187–192, 2008.
- [21] P. S. Prevéy, “X-ray diffraction characterization of crystallinity and phase composition in plasma-sprayed hydroxyapatite coatings,” *J. Therm. Spray Technol.*, vol. 9, no. 3, pp. 369–376, 2000.
- [22] M. M. Figueiredo, J. A. F. Gamelas, and A. G. Martins, “Characterization of Bone and Bone-Based Graft Materials Using FTIR Spectroscopy,” in *Infrared Spectroscopy - Life and Biomedical Sciences*, InTech, 2012.
- [23] M. Ibrahim, A. Nada, & Diaa, and E. Kamal, “Density functional theory and FTIR spectroscopic study of carboxyl group,” 2005.
- [24] E. W. Lemmon, M. O. McLinden, and D. G. Friend, *NIST Chemistry WebBook, NIST Standard Reference Database*, no. 69. 2017.
- [25] B. C. Paul W. Brown, Ed., *Hydroxyapatite and Related Materials*, 1st ed. Boca Raton: CRC Press, 1994.
- [26] K. Kandori, S. Sawai, Y. Yamamoto, H. Saito, and T. Ishikawa, “Adsorption of albumin on calcium hydroxylapatite,” *Colloids and Surfaces*, vol. 68, no. 4, pp. 283–289, Nov. 1992.
- [27] R. Roque-Malherbe, “Handbook of Surfaces and Interfaces of Materials: zeolites,” *Handb. Surfaces Interfaces Mater.*, vol. 2, pp. 495–522, 2001.
- [28] Z. Shi, X. Huang, Y. Cai, R. Tang, and D. Yang, “Size effect of hydroxyapatite nanoparticles on proliferation and apoptosis of osteoblast-like cells,” *Acta Biomater.*, vol. 5, no. 1, pp. 338–345, Jan. 2009.
- [29] E. J. Tsang, C. K. Arakawa, P. A. Zuk, and B. M. Wu, “Osteoblast interactions within a biomimetic apatite microenvironment,” *Ann. Biomed. Eng.*, vol. 39, no. 4, pp. 1186–1200, Apr. 2011.
- [30] P. Pascaud, P. Gras, Y. Coppel, C. Rey, and S. Sarda, “Interaction between a Bisphosphonate, Tiludronate, and Biomimetic Nanocrystalline Apatites,” *Langmuir*, vol. 29, no. 7, pp. 2224–2232, Feb. 2013.
- [31] M. Theiszová, S. Jantová, J. Dragúnová, P. Grznárová, and M. Palou, “Comparison the cytotoxicity of hydroxyapatite measured by direct cell counting and MTT test in murine fibroblast NIH-3T3 cells,” *Biomed. Pap. Med. Fac. Univ. Palacky. Olomouc. Czech. Repub.*, vol. 149, no. 2, pp. 393–6, Dec. 2005.
- [32] M. M. Bradford, “A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram

- quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding,” *Anal. Biochem.*, vol. 72, no. 1–2, pp. 248–254, May 1976.
- [33] G. Yin, Z. Liu, J. Zhan, F. Ding, and N. Yuan, “Impacts of the surface charge property on protein adsorption on hydroxyapatite,” *Chem. Eng. J.*, vol. 87, no. 2, pp. 181–186, Jun. 2002.
- [34] P. Satzer, F. Svec, G. Sekot, and A. Jungbauer, “Protein adsorption onto nanoparticles induces conformational changes: Particle size dependency, kinetics, and mechanisms,” *Eng. Life Sci.*, vol. 16, no. 3, pp. 238–246, Apr. 2016.
- [35] M. J. Mura-Galelli, J. C. Voegel, S. Behr, E. F. Bres, and P. Schaaf, “Adsorption/desorption of human serum albumin on hydroxyapatite: A critical analysis of the Langmuir model,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 88, no. 13, pp. 5557–5561, 1991.
- [36] D. T. H. Wassell, R. C. Hall, and G. Embery, “Adsorption of bovine serum albumin onto hydroxyapatite,” *Biomaterials*, vol. 16, no. 9, pp. 697–702, 1995.
- [37] F. Meder *et al.*, “Protein adsorption on colloidal alumina particles functionalized with amino, carboxyl, sulfonate and phosphate groups,” *Acta Biomater.*, vol. 8, no. 3, pp. 1221–1229, Mar. 2012.
- [38] X. N. Hu and B. C. Yang, “Conformation change of bovine serum albumin induced by bioactive titanium metals and its effects on cell behaviors,” *J. Biomed. Mater. Res. - Part A*, vol. 102, no. 4, pp. 1053–1062, 2014.
- [39] L. Fowden *et al.*, “Effect of pH on Fluorescence of Tyrosine, Tryptophan and Related Compounds Fluorescence-excitation spectra The fractional absorption spectra at neutrality were found to correspond well with the fluorescence-excitation spectra both at neutrality and in,” Elsevier. Linko, P, 1958.
- [40] V. Viswanatha and V. J. Hruby, “Conversion of L-tyrosine to L-phenylalanine. Preparation of L-[3’,5’-13C2]phenylalanine,” *J. Org. Chem.*, vol. 45, no. 10, pp. 2010–2012, May 1980.
- [41] B. Pathrose, V. P. N. Nampoori, P. Radhakrishnan, and A. Mujeeb, “Measurement of Absolute Fluorescence Quantum Yield of Basic Fuchsin Solution Using a Dual-Beam Thermal Lens Technique,” *J. Fluoresc.*, vol. 24, no. 3, pp. 895–898, May 2014.

# Capítulo V

## Incorporación de HAp modificada con Fe en sustratos de vidrio bioactivo



## 5.1 Introducción

En los últimos años, la idea de diseñar biodispositivos manipulables biológicamente o activables *in situ* mediante la aplicación de un campo magnético externo ha resultado un gran desafío en la ingeniería de tejidos (IT). Como es bien sabido, las nanopartículas magnéticas (MNps) se utilizan en un amplio espectro de aplicaciones médicas [1] en particular, se han utilizado para la administración de fármacos [2],[3] o para resonancia magnética como agentes de contraste [4]. Por otra parte, las MNps se utilizan para la clasificación celular y la disposición de microtejidos mediante la aplicación de campos magnéticos [5]. El uso de fuerzas magnéticas para la ingeniería de tejidos, la denominada ingeniería de tejidos magnéticos (ITM) se ha probado en varias aplicaciones, como en el ensamblaje de músculos esqueléticos y de vasos sanguíneos de pequeño diámetro, la formación de tejido óseo o la diferenciación de células madre [1], [6]–[8].

En los últimos años, los andamios magnéticos se han propuesto en la literatura como estructuras que no solo son compatibles con la regeneración de tejidos, sino que también pueden activarse y funcionar como un imán que atrae nanopartículas magnéticas funcionalizadas inyectadas cerca de los andamios mejorando la regeneración de tejidos [9], [10]. Estas estructuras pueden verse como una "estación" fija, cuya magnetización puede activarse y desactivarse mediante campos magnéticos externos, proporcionando así una liberación programada de biofactores. Si bien, el proceso de guía magnética ya es bien conocido en nanomedicina, todavía no se aplica ampliamente en el campo de los andamios. Esta estrategia se ha desarrollado, principalmente, para el suministro de medicamentos y el tratamiento de hipertermia de tumores con el fin de aumentar la precisión espacial mediante la guía del nanomaterial por campos magnéticos externos, aumentando la eficacia de las terapias [1], [5], [8]. Hasta el momento, se utilizaron varias estrategias en la literatura para desarrollar andamios magnéticos, pero la mayoría de ellas involucraban biopolímeros, como la gelatina o el colágeno, combinados con nanopartículas de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  superparamagnéticas [11]–[13].

Los vidrios bioactivos, por otro lado, se han estudiado y utilizado ampliamente en aplicaciones de reparación ósea por poseer propiedades atractivas como material para construir andamios, tales como son su alta biocompatibilidad, bioactividad y la capacidad de inducir efectos osteogénicos y angiogénicos [14]–[16]. En la literatura, se

informa el desarrollo de materiales híbridos que combinan óxidos de hierro magnéticos con vidrios bioactivos que han mostrado resultados promisorios [17], [18].

A su vez, como se mencionó en el *Capítulo III*, los nanomateriales en base de HA de tamaño nanométrico son potencialmente aptos para imitar la estructura ósea natural. La introducción de Fe en la estructura de HA durante el proceso de síntesis puede mejorar las propiedades mecánicas de las apatitas y conferir propiedades magnéticas al material resultante. Por ello, nuestras investigaciones se centraron en crear andamios de vidrio bioactivo 45S5<sup>®</sup> (BG) recubiertos con FeHA (FeBG) y evaluar *in vitro* su posible aplicación en la regeneración ósea.

A lo largo de este *Capítulo* se describe el método de síntesis de los andamios de vidrio bioactivo 45S5<sup>®</sup> basado en la técnica de replicación de espuma descrita por Chen *et al.* [19] seguido de la modificación superficial de los mismos. El recubrimiento de los andamios se realizó por inmersión y posterior secado desarrollado en base al proceso descrito por Bock *et al.* [12] aunque en nuestro caso debió evaluarse la concentración óptima de las suspensiones de los nanomateriales y los tiempos de exposición.

Se exponen los resultados de la caracterización de los composites obtenidos mediante diversas técnicas. La microestructura y la porosidad del andamio se observó mediante SEM; La presencia de hierro se analizó por EDS y MP-AES; Los grupos funcionales fueron analizados por FTIR. La bioactividad del nuevo material se evaluó mediante un ensayo de mineralización. Las propiedades magnéticas de los materiales fueron evaluadas antes y después del recubrimiento mediante susceptibilidad magnética y magnetometría de muestra vibrante (VSM). La biocompatibilidad se evaluó en células MG-63 y en células ST-2 mediante ensayos de WST-8 y LDH y la morfología de las células se observó a partir de las imágenes de SEM. La liberación de iones hierro se evaluó a lo largo del tiempo y el efecto de dicha liberación se testeó evaluando la viabilidad y capacidad de secretar el VEGF al medio del cultivo en células ST-2.

## **5.2 Síntesis de andamios a base de vidrio 45S5<sup>®</sup>**

Para la fabricación de andamios de vidrio bioactivo, se siguió el método de replicación de la espuma descrito por Chen *et al.* [19]. La técnica permite producir andamios tridimensionales a base de vidrio bioactivo con una estructura porosa altamente interconectada similar al hueso esponjoso. Para ello se partió de un polvo de vidrio bioactivo comercial (de composición 45S5BG) con un tamaño de partícula de 4  $\mu\text{m}$ .

Para la preparación de la suspensión se utilizó como aglutinante alcohol polivinílico (PVA). La espuma de poliuretano (PU) disponible en el mercado con 45 ppi (poros por pulgada) sirvió como cuerpo de sacrificio; de esta forma la estructura interna de los poros del andamio obtenido respondería a las ppi provenientes de la espuma, por lo que la geometría del andamio solo podría verse influenciada por las dimensiones externas. Usando un dispositivo de corte redondo, se perforaron muestras cilíndricas de la espuma de PU con dimensiones de 7x12 mm (altura x diámetro). Para proporcionar una mejor adhesión de las partículas de vidrio bioactivo a la superficie de las muestras de espuma de PU, se trataron previamente en un baño de ultrasonidos con 70% en volumen de 2-propanol de forma de eliminar las contaminaciones residuales que quedan del proceso de fabricación de la esponja (aceite o polvo, entre otros). La espuma polimérica se sumergió en la suspensión 45S5BG preparada, la suspensión se infiltró en la estructura y las partículas de 45S5 BG se adhirieron a la superficie de la espuma.

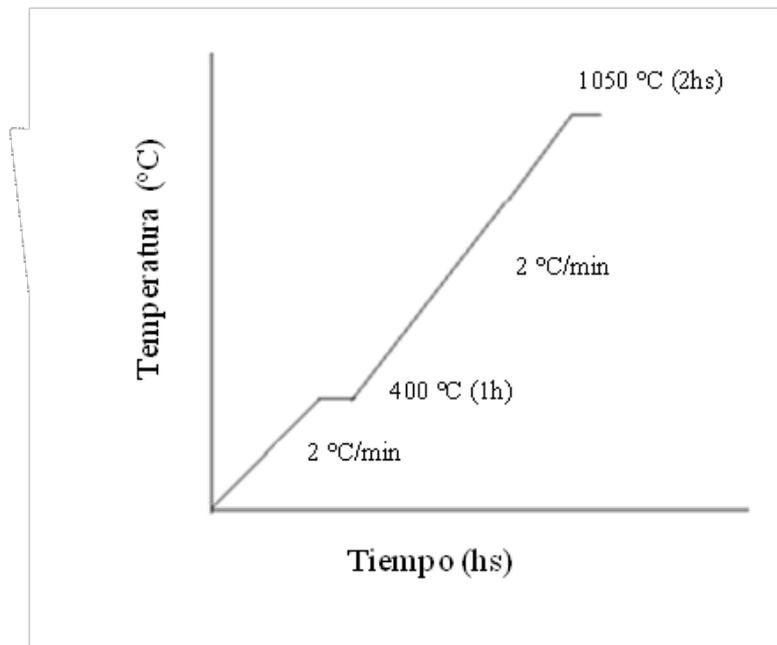


**Figura 5.1.** Esquema de la síntesis utilizada para la obtención de los andamios 3D a base de vidrio bioactivo 45S5<sup>®</sup>.

La suspensión se preparó de forma de contener 50% de polvo de vidrio bioactivo, 48% de agua ultrapura, 2% de dispersante (% P/P) para ello, el PVA se disolvió en agua a 80°C, después se dejó enfriar a temperatura ambiente, y se agregó el polvo de vidrio bioactivo. Para obtener una suspensión homogénea, los reactivos se añadieron lentamente paso a paso con agitación vigorosa utilizando un agitador magnético.

Las espumas de PU previamente tratadas se sumergieron luego en la suspensión, se recuperaron después de 5 minutos y se excurrieron para eliminar el exceso de suspensión. Se dejaron secar a 60 °C durante un mínimo de 2 hs, luego se llevó a cabo un doble recubrimiento para aumentar el espesor de la capa de 45S5 BG de forma de reducir la tasa de contracción y recibir una estabilidad mecánica mejorada, para lograr

una mejor manipulación de los andamios. Antes de la sinterización, las muestras se secaron de nuevo a 60 °C durante, al menos 24 hs. Finalmente, los cuerpos verdes obtenidos se trataron térmicamente para quemar la espuma polimérica, así como los componentes orgánicos de la suspensión y sinterizar la estructura de vidrio bioactivo. Para la sinterización, se eligió un perfil de sinterización progresiva, como se representa en la *Figura 5.2*.



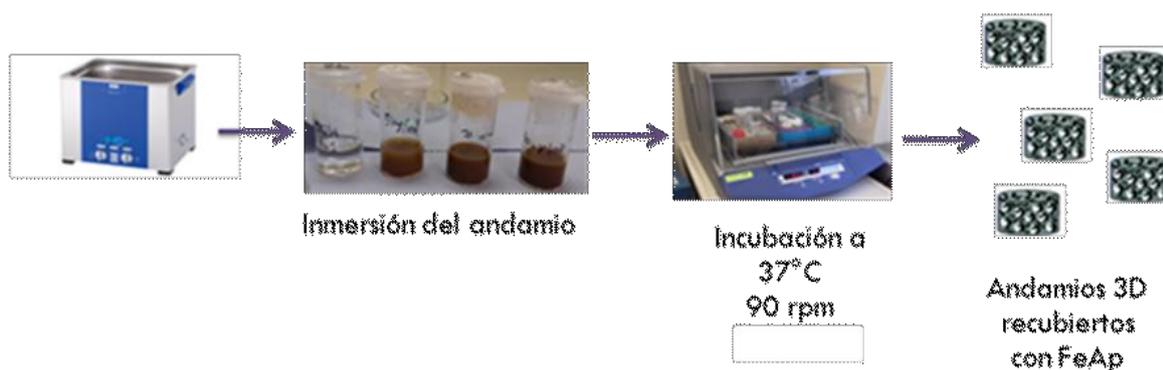
**Figura 5.2** Rampa de calentamiento utilizada.

En un primer paso, se aplicó una velocidad de calentamiento de 2 °C/min hasta 400 °C para quemar la estructura de la espuma. Después de 1 hora a 400 °C, se calentó hasta 1050 °C (2 °C/min) y se mantuvo por 2 hs a 1050 °C para densificar la estructura y completar el proceso de sinterización. Después de ello, los andamios se dejaron enfriar en el horno.

La sinterización produjo espumas porosas bioactivas a base de vidrio con un tamaño promedio de  $4,2 \pm 0,2$  mm de altura y  $8,6 \pm 0,4$  mm de diámetro, lo que implica una contracción de alrededor de 35% durante la sinterización. Para poder medir propiedades magnéticas de los materiales sin necesidad de pulverizar los andamios se sintetizaron muestras mediante el mismo proceso descrito anteriormente, pero partiendo de espumas con dimensiones de 7 x 4 mm (altura x diámetro).

### 5.3 Incorporación de los nanomateriales en los andamios mediante *Dip-coating*.

La modificación de la superficie del andamio se realizó mediante un recubrimiento por *Dip-coating* descrito por Bock *et al.* [12], la técnica se basa en un proceso de recubrimiento por inmersión que consiste en la inmersión de los andamios porosos de inspiración biológica en ferrofluidos biocompatibles. Los ferrofluidos son mezclas coloidales de partículas ferromagnéticas a nanoescala suspendidas en un fluido portador, generalmente un disolvente orgánico o agua. En la técnica de revestimiento por inmersión, la porosidad específica interconectada de los andamios permite que los ferrofluidos se inserten dentro de la estructura por capilaridad. En este caso los andamios se sumergieron en suspensiones etanólicas de FeHAp (se evaluaron diferentes concentraciones de nanopartículas 5, 10 y 23 mg/mL) durante diferentes tiempos de exposición (2, 10 y 30 min) en una incubadora a 37 °C y con una agitación constante de 90 rpm.



**Figura 5.3.** Esquema del método de inmersión y posterior secado.

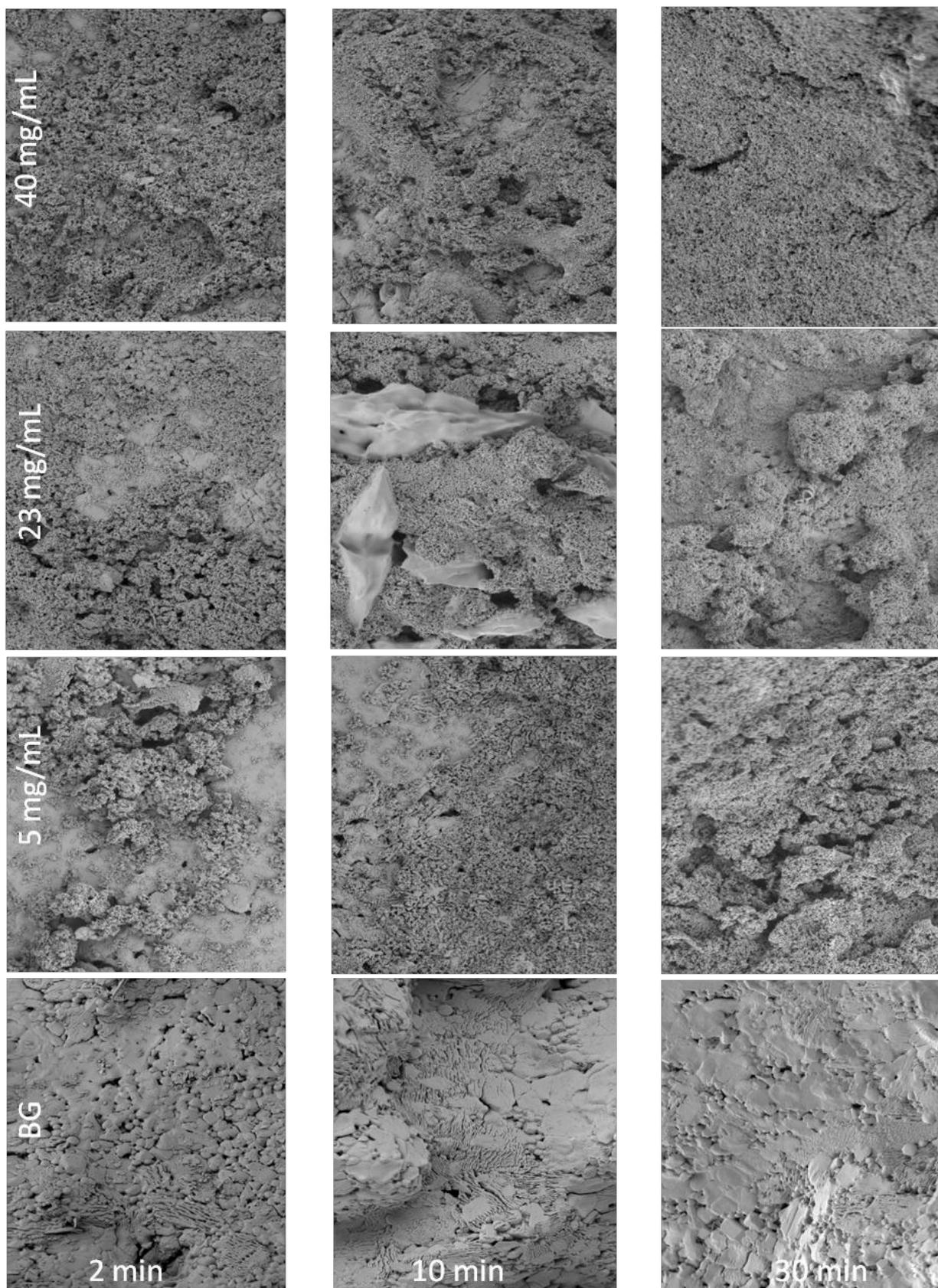
Después de dicho tiempo, los andamios se extrajeron y se escurrieron antes de dejarlos secar a temperatura ambiente por 24 hs. Debido a la precipitación de las partículas y a los posibles cambios en la concentración de las suspensiones, se recubrieron como máximo 3 andamios por suspensión.

### 5.4 Caracterización de los andamios obtenidos.

Mediante las técnicas de caracterización FTIR y DRX no fue posible detectar la presencia de los nanomateriales; esto pudo deberse a que la cantidad de material depositado en la superficie de los andamios fue baja, encontrándose por debajo del límite de detección experimental.

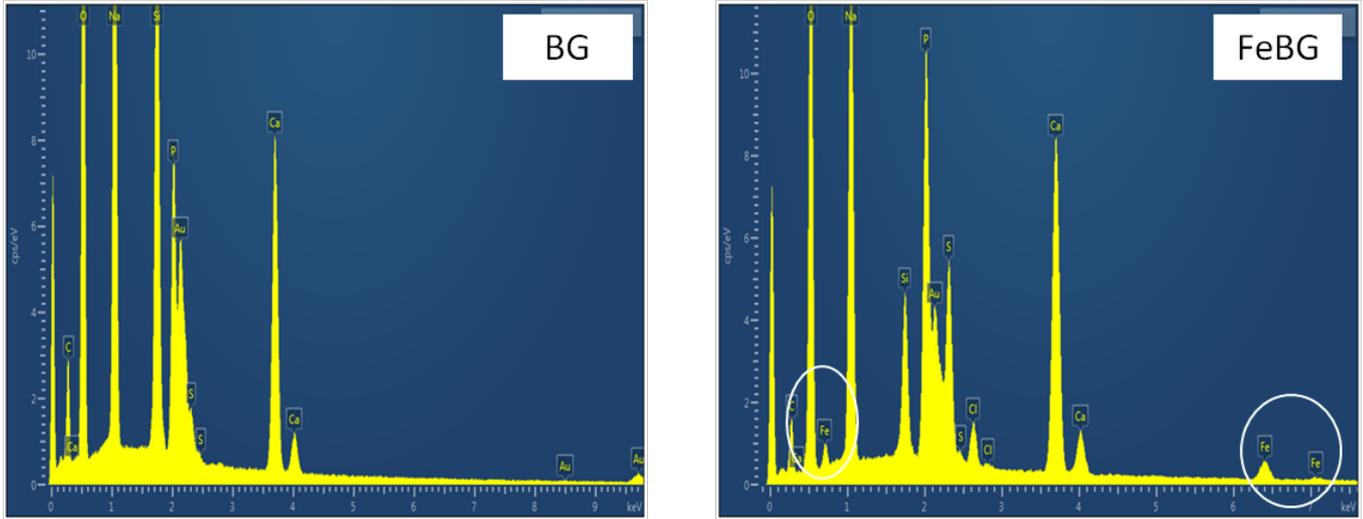
#### ***5.4.1 Microscopía electrónica de barrido acoplada a Espectrometría de dispersión de energía de rayos X***

La *Figura 5.4* muestra las micrografías obtenidas de los andamios antes y después del recubrimiento. Se tomó como óptima la concentración de 5mg/mL con un tiempo de exposición de 10 min, dado que bajo estas condiciones, los andamios presentan un buen recubrimiento con partículas dejando espacios sin cubrir por los cuales el 45S5 BG podría estar expuesto para reaccionar y presentar sus propiedades bioactivas.



**Figura 5.4** Micrografías SEM obtenidas para andamios recubiertos con FeHAp variando la concentración de partículas y los tiempos de exposición (Magnificación 10.0 KX).

Mediante medidas de espectrometría de dispersión de energía de rayos X se pudo comprobar cualitativamente la presencia de Fe en la superficie de los andamios después del recubrimiento.



**Figura 5.5.** Análisis EDX de la supercie de los andamios antes y después del recubrimiento.

### 5.4.2 Porosidad

Dado que el grado de porosidad es un parámetro importante a determinar en los andamios sintéticos, se procedió a calcular la porosidad de los materiales obtenidos mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Porosidad} = (1 - \rho_{\text{muestra}} / \rho_{\text{material}}) \times 100$$

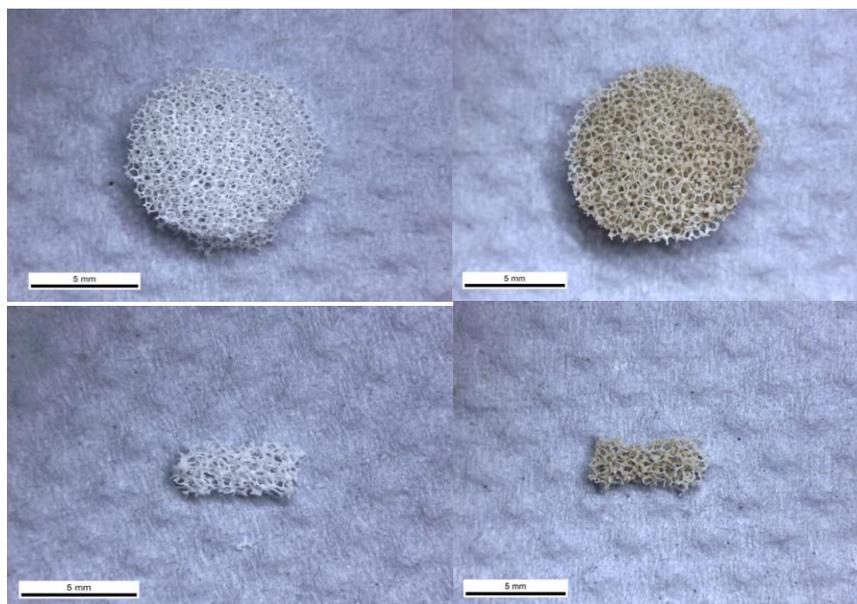
Donde la densidad del material,  $\rho_{\text{material}}$ , es  $2,7 \text{ g/cm}^3$  para Bioglass 45S5<sup>®</sup> [19] y la densidad de la muestra,  $\rho_{\text{muestra}}$ , se calculó a partir de las dimensiones y la masa de los cuerpos sinterizados. La Tabla 5.1 muestra los diferentes valores de las muestras medidas. Los cálculos indicaron una porosidad promedio de 93%, lo que concuerda con la literatura [19]. Para la investigación de la macro y microestructura de los andamios obtenidos se usaron microscopías electrónicas de barrido y microscopía óptica donde se observa que el tamaño de los poros está en valores de entre 250 y 500  $\mu\text{m}$

| Muestra | Masa (g) | Diámetro (cm) | Altura (cm) | $\rho$ muestra (g. cm <sup>-3</sup> ) | Porosidad (%) |
|---------|----------|---------------|-------------|---------------------------------------|---------------|
| BG1     | 0,0398   | 0,90          | 0,45        | 0,139                                 | 94,85         |
| BG2     | 0,0555   | 0,90          | 0,45        | 0,194                                 | 92,82         |
| BG3     | 0,0435   | 0,80          | 0,45        | 0,192                                 | 92,87         |
| BG4     | 0,0445   | 0,80          | 0,45        | 0,197                                 | 92,71         |
| FeBG1   | 0,0551   | 0,85          | 0,40        | 0,243                                 | 91,00         |
| FeBG2   | 0,0349   | 0,85          | 0,40        | 0,154                                 | 94,30         |
| FeBG3   | 0,0606   | 0,90          | 0,40        | 0,238                                 | 91,17         |
| FeBG4   | 0,0357   | 0,85          | 0,40        | 0,157                                 | 94,17         |

**Tabla 5.1.** Densidades obtenidas para las muestra, calculadas a partir de las dimensiones y la masa de los cuerpos sinterizados.

### 5.4.3 Microscopía óptica

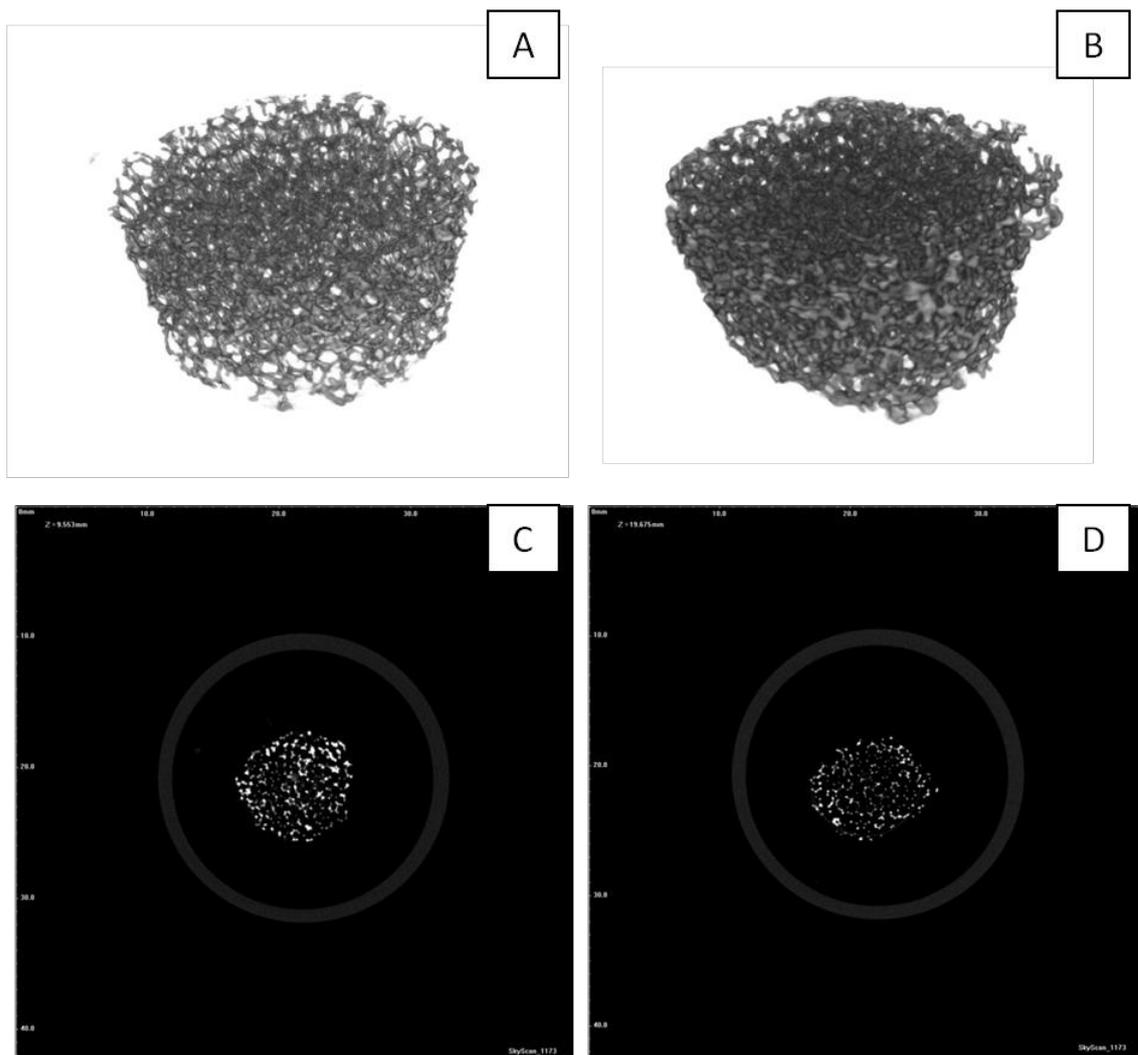
Se determinaron las dimensiones luego del sinterizado y se estimó una contracción del 35%. La presencia de los nanomateriales se pudo observar a simple vista por la coloración típica de los óxidos de hierro presentes.



**Figura 5.6.** Imágenes obtenidas mediante microscopía óptica de andamios sin recubrir (izquierda) y andamios recubiertos con FeHAp (derecha). Las imágenes inferiores corresponden al tamaño diseñado para medir propiedades magnéticas de los materiales.

#### 5.4.4 Microtomografía computada

Dado que para permitir y apoyar el crecimiento de tejido óseo, así como la vascularización, se requiere una estructura porosa interconectada del andamio [20] , junto con el tamaño de poro, que juega un papel clave para el suministro de nutrientes de las células, para los andamios obtenidos dichos parámetros se evaluaron mediante cortes transversales de reconstrucciones tomográficas (*Figura 5.7*).



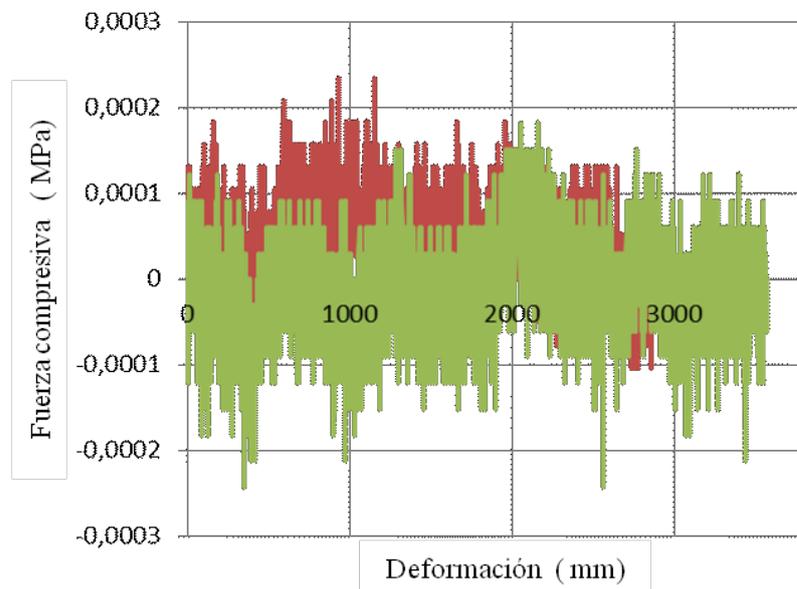
**Figura 5.7.** Las imágenes superiores se corresponden con reconstrucciones tomográficas 3D obtenidas para BG (A) FeBG (B), las imágenes inferiores corresponden a representaciones 2D de cortes transversales obtenidas para BG (C) y FeBG (D).

Tanto antes como después del recubrimiento se pudo observar un alto grado de interconexión entre los poros, así como también se estimó un tamaño de macroporo en

el rango de 250-500  $\mu\text{m}$ . En la literatura, el tamaño de poro medio óptimo se discute de manera controvertida, ya que influye en las propiedades mecánicas de los andamios [21]. Algunos estudios [22]–[24] afirman que no se requiere un tamaño de poro  $>100 \mu\text{m}$  para el crecimiento óseo, mientras que otros sugieren poros que exceden los 300  $\mu\text{m}$  [25]–[27] para permitir la formación y vascularización ósea; los valores obtenidos para los andamios fabricados se encuentran dentro de los rangos sugeridos.

#### 5.4.5 Resistencia mecánica

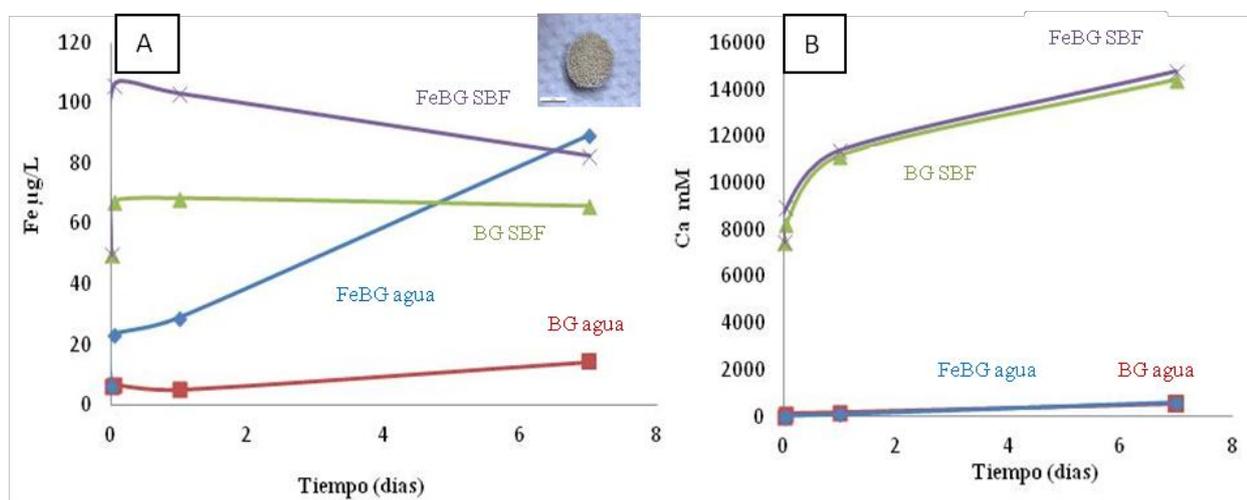
Los andamios fabricados mostraron una resistencia a la compresión muy baja (*Figura 5.8*), por lo cual no fue posible determinar un valor de módulo de Young. Valores de resistencia a la compresión cercanos a  $0,04 \pm 0,02 \text{ MPa}$  han sido informados en la literatura para materiales basados en el vidrio bioactivo 45S5 [19]. Estos valores son más bajos que los informados para el hueso esponjoso (entre 0,2 y 4 MPa) de densidad relativa del tejido de  $\sim 0,12$  [28]. Por ello, los andamios a base de vidrio bioactivo 45S5 resultan interesantes solo en aplicaciones sin carga.



**Figura 5.8** Resistencia a la compresión obtenida para andamios sin recubrir (curva roja) y andamios recubiertos con FeHAp (curva verde).

### 5.4.6 Espectroscopía de emisión atómica de plasma por microondas y medida de iones metálicos en solución vs tiempo

Para estudiar la estabilidad de los andamios de BG y FeBG obtenidos, estos se sumergieron en agua y en SBF durante diferentes tiempos (1 hora, 1 día y 7 días). Luego del tiempo estipulado, se separaron los andamios de la solución y los sobrenadantes se evaluaron mediante MP-AES. Las cantidades de hierro y calcio liberadas en los productos de disolución de los andamios antes y después del recubrimiento se muestran en la *Figura 5.8* A) y B). En el recuadro de la imagen A) se puede observar por microscopía óptica que el color del andamio de FeBG no se vio afectado luego de permanecer 7 días en SBF.



**Figura 5.8.** Perfiles de liberación de (A) Fe y (B) Ca luego de diferentes tiempos de inmersión para: BG en SBF (curvas verde), FeBG en SBF (curvas violeta), BG en agua (curvas roja) y FeBG en agua (curvas azul). Recuadro: imagen de FeBG obtenida mediante microscopio óptico luego de 7 días de inmersión en SBF.

Los perfiles de liberación de Ca obtenidos para ambas muestras fueron similares tanto en agua como en SBF, esto puede interpretarse dado que el mayor aporte de iones Ca a la solución se genera por el producto de la disolución de 45S5BG, si bien las partículas podrían aportar calcio, esa cantidad no sería significativa con respecto a la liberación producida por el vidrio.

Con respecto a la liberación de Fe se pudieron observar diferencias notables al comparar las cantidades del ión metálico liberadas por BG ó FeBG. Tanto en agua como en SBF la cantidad de Fe aumentó significativamente para las muestras recubiertas con FeHAp con respecto al control de vidrio sin recubrir en todos los tiempos estudiados. Debido a

estos resultados, se planteó la realización de ensayos de biocompatibilidad indirectos, a fin de evaluar el efecto de los iones liberados en las células en las vecindades de un implante y su capacidad de aumentar la angiogénesis.

#### 5.4.7 Susceptibilidad magnética

Los resultados de las digestiones ácidas de los andamios y las partículas se muestran en la Tabla 5.2. Como puede observarse, los andamios recubiertos con FeHAp vieron aumentada su concentración de Fe, respecto de aquellos sin recubrir. Este aumento está correlacionado con el incremento de la susceptibilidad magnética de los andamios FeBG respecto de los andamios BG que no presentan magnetismo.

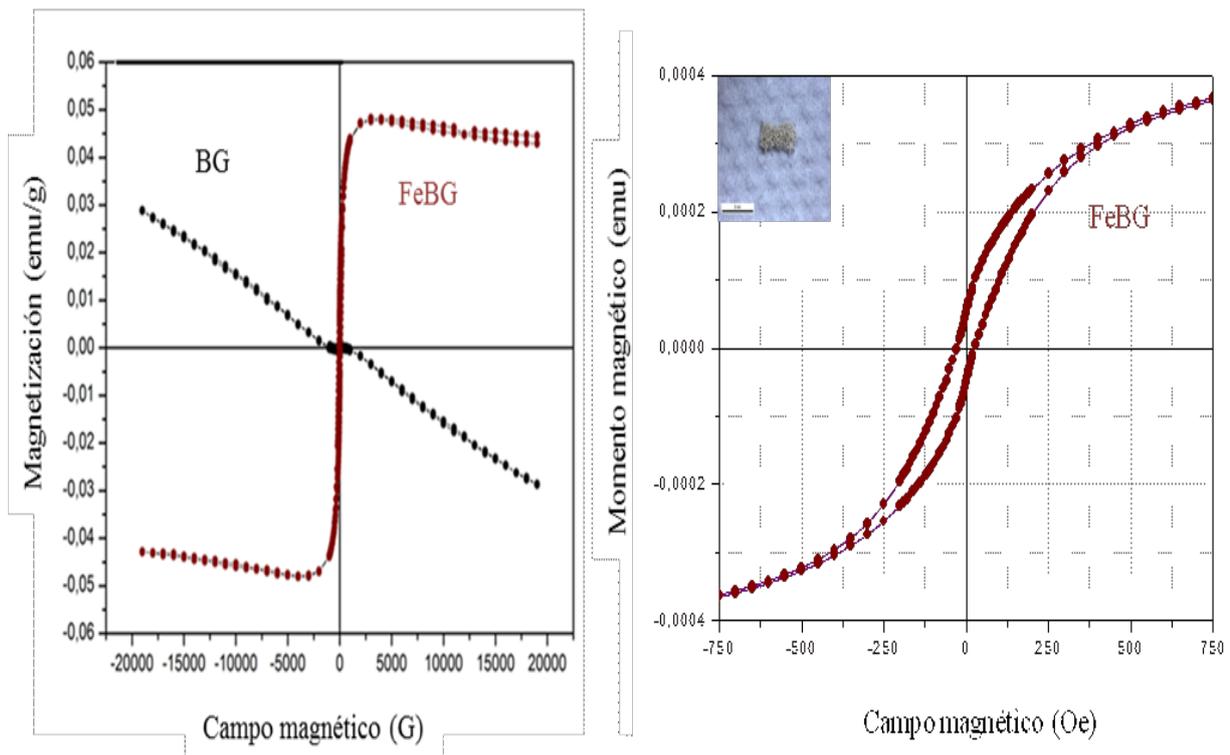
| Muestra | Fe ( $\mu\text{g/L}$ ) | ng Fe/ mg muestra | Susceptibilidad magnética volumétrica (SI) |
|---------|------------------------|-------------------|--|
| BG      | 14,49                  | 3,775             | $-3,67 \times 10^{-06}$                    |
| FeBG    | 339,05                 | 239,75            | $8,13 \times 10^{-04}$                     |
| FeHAp   | 8126,49                | 26817,4           | $6,79 \times 10^{-02}$                     |

**Tabla 5.2.** Cantidad de Fe en las muestras obtenida mediante MP-AES y medidas de susceptibilidad magnética volumétrica en unidades del sistema internacional.

#### 5.4.8 Magnetometría de muestra vibrante

Dado que para realizar las medidas de susceptibilidad magnética fue necesario pulverizar el material, se realizaron medidas de magnetometría de muestra vibrante en andamios de tamaño adaptado capaces de introducirse en el porta muestras sin necesidad de pulverizarlos previamente. De esta forma es posible evaluar la magnetización en la estructura porosa final. En la *Figura 5.9*, imagen A) se observan las curvas obtenidas para el andamio sin recubrir el cual muestra un típico comportamiento diamagnético mientras que los andamios recubiertos muestran un comportamiento superparamagnético. En la imagen B) se puede observar una pequeña histéresis del material en un campo cercano a 27 Oe. Como se mostró en el *Capítulo III*, la magnetización de saturación obtenida para las nanopartículas es de 4 emu/g, mientras

que la obtenida para FeBG es cerca de 100 veces menor, de aproximadamente 0,04 – 0,05 emu/g. Esta diferencia indica un bajo recubrimiento de los andamios con FeHAp. Una estrategia posible para aumentar la respuesta magnética del material sería realizar el recubrimiento en tandas sucesivas para poder incorporar mayor cantidad de nanopartículas magnéticas a la estructura del andamio.



**Figura 5.9.** Curvas de magnetización de saturación vs campo aplicado A) BG junto con FeBG variando el campo aplicado de entre  $2 \times 10^5$ -  $2 \times 10^5$  G. B) Curva obtenida para FeBG variando el campo externo de entre -750 a 750 Oe. El recuadro superior muestra la geometría del andamio diseñado para realizar la medida de VSM.

### 5.5 Ensayo de mineralización

Para determinar el impacto del recubrimiento de los andamios en la bioactividad de BG, se evaluó la formación de HA después de la inmersión de los andamios en fluido biológico simulado (SBF) de acuerdo con el protocolo desarrollado por Kokubo y Takadama [29]. Las concentraciones de iones utilizadas fueron acorde al SBF corregido (Tabla 5.3). Los andamios no recubiertos se analizaron como grupo de control.

|                         | [Na <sup>+</sup> ] | [K <sup>+</sup> ] | [Mg <sup>+2</sup> ] | [Ca <sup>+2</sup> ] | [Cl]  | [HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> ] | [HPO <sub>4</sub> <sup>-2</sup> ] | [SO <sub>4</sub> <sup>-2</sup> ] |
|-------------------------|--------------------|-------------------|---------------------|---------------------|-------|----------------------------------|-----------------------------------|----------------------------------|
| Plasma sanguíneo humano | 142.0              | 5.0               | 1.5                 | 2.5                 | 103.0 | 27.0                             | 1.0                               | 0.5                              |
| SBF original            | 142.0              | 5.0               | 1.5                 | 2.5                 | 148.8 | 4.2                              | 1.0                               | 0.5                              |
| SBF corregido (c-SBF)   | 142.0              | 5.0               | 1.5                 | 2.5                 | 147.8 | 4.2                              | 1.0                               | 0.5                              |
| SBF revisado (r-SBF)    | 142.0              | 5.0               | 1.5                 | 2.5                 | 103.0 | 27.0                             | 1.0                               | 0.5                              |
| SBF mejorado (m-SBF)    | 142.0              | 5.0               | 1.5                 | 2.5                 | 103.0 | 4.2                              | 1.0                               | 0.5                              |

**Tabla 5.3.** Tabla comparativa de la concentración de distintos iones presentes en el plasma sanguíneo y en diferentes soluciones SBF, unidad de concentración utilizada para todos ellos mM.

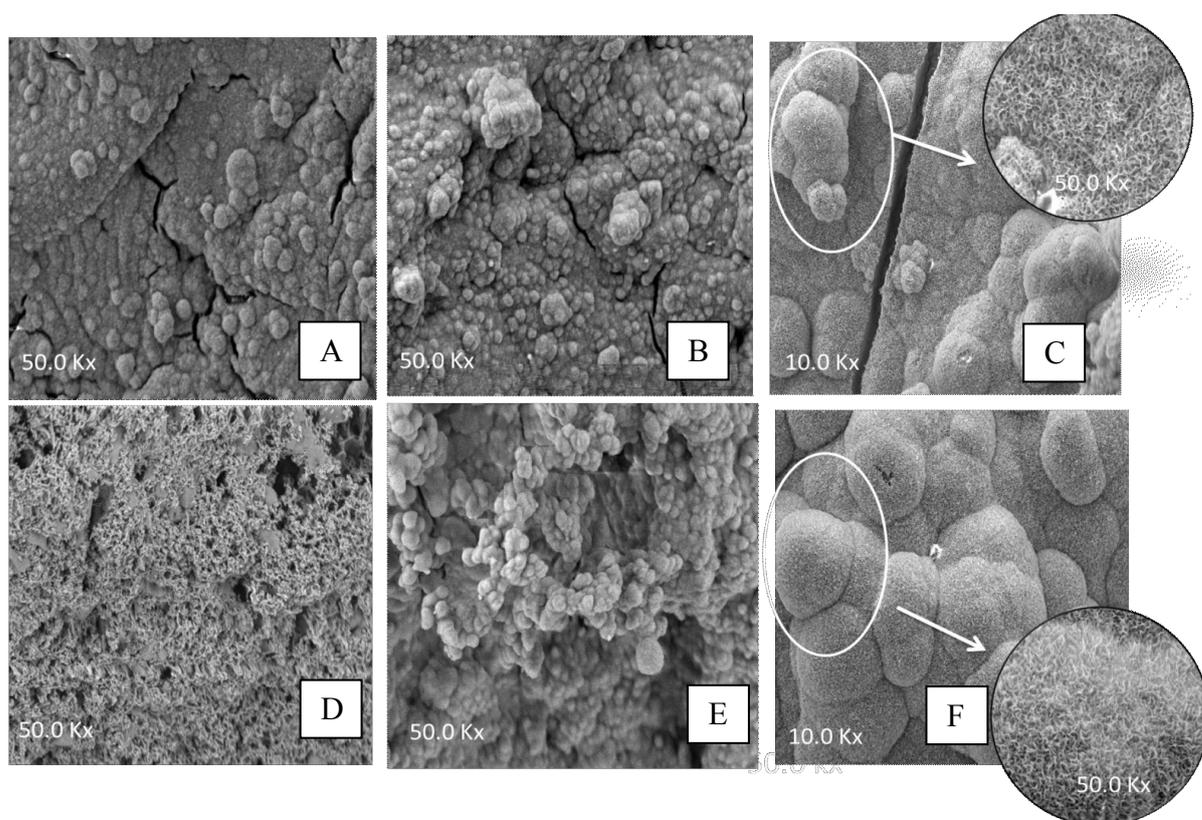
La solución de (SBF) se preparó siguiendo el método descrito por Kokubo [29]. Para preparar 1L de solución de SBF, se introdujeron 700ml de agua bidestilada en una botella de plástico y se calentaron hasta  $36,5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1,5\text{ }^{\circ}\text{C}$  con agitación magnética. Al alcanzar la temperatura deseada, se disolvieron de a uno los siguientes reactivos (en el orden indicado): cloruro de sodio, bicarbonato de sodio, cloruro de potasio, fosfato dibásico de potasio trihidratado, cloruro de magnesio hexahidratado, solución de HCl 1M, cloruro de calcio dihidratado y sulfato de sodio anhidro. Cuando todos los reactivos se disolvieron completamente se agregó agua hasta alcanzar los 900 ml y se comenzó a medir el pH de la solución (3510 pH meter Bibby Scientific Limited). Cuando la temperatura se mantuvo en los  $36,5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1,5\text{ }^{\circ}\text{C}$  y el pH alcanzó valores  $\leq 2$ , se agregó TRIS hasta alcanzar un pH cercano a  $7,30 \pm 0.05$ . Manteniendo la temperatura entre  $36,5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,5\text{ }^{\circ}\text{C}$  se volvió a agregar lentamente TRIS hasta alcanzar un pH de  $7,45 \pm 0.01$ , mediante el agregado de HCl (1M) el pH se llevó hasta  $7,42 \pm 0.01$  y el proceso se repitió hasta disolver completamente toda la masa de TRIS. El pH final de la solución se ajustó en 7,4 y el volumen se llevó a 1l con agua bidestilada.

Las muestras se introdujeron en frascos de polipropileno. Se utilizaron 30 ml de SBF por muestra, las que se dejaron en incubadora a  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Los tiempos de exposición de los andamios al SBF fueron de 1 hora, 1 día y 7 días y para simular condiciones *in vivo* la solución de SBF se reemplazó cada 48 hs. Después de cada período de exposición, se extrajeron las muestras, se enjuagaron con agua destilada 2 veces y se dejaron secar a

temperatura ambiente durante 48 hs para determinar la variación de pH en la solución, el % de masa (para la muestra a 7 días se evaluó el sobrenadante sin reemplazar la solución cada 48 hs) y evaluar su morfología por SEM. La formación de HA también se evaluó por espectroscopia FTIR y DRX.

### 5.5.1 Microscopía electrónica de barrido

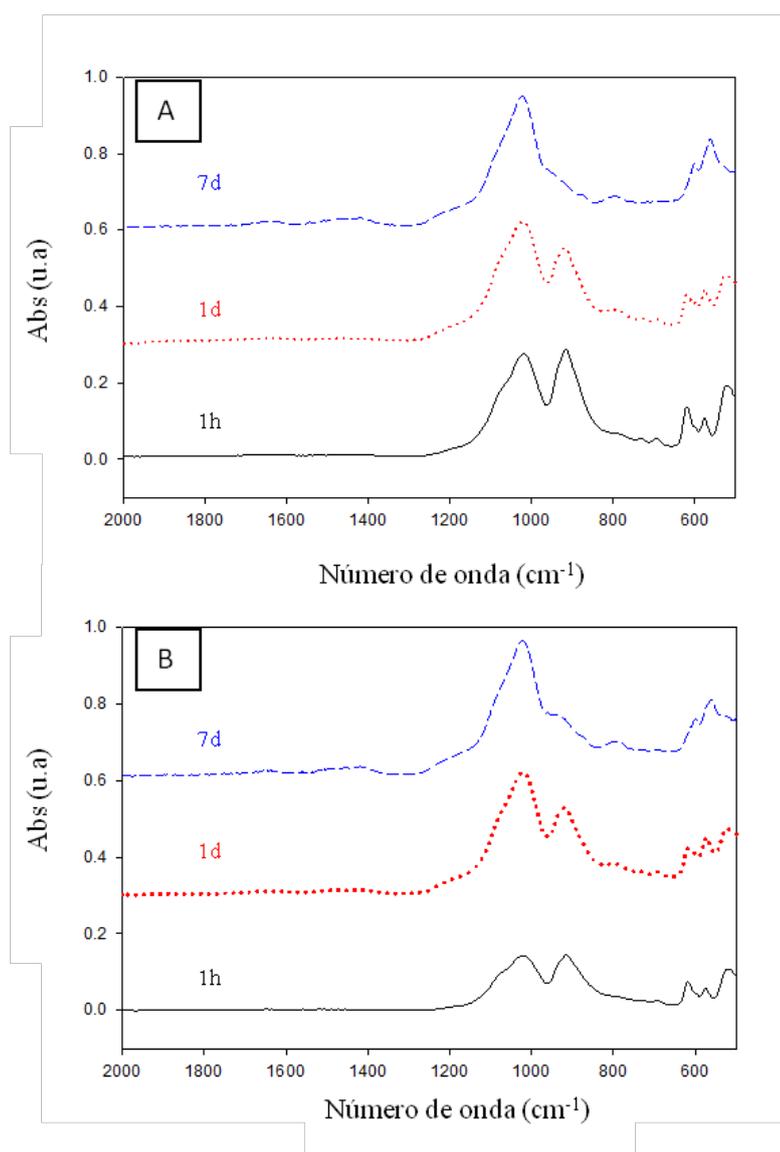
La *Figura 5.10* revela la morfología de la superficie típica de los andamios basados en BG 45S5 después de 1 hora, 1 día y 7 días de inmersión en SBF. Después de 1 día, los precipitados de fosfato de calcio cubren la superficie de manera homogénea, la cual es evaluada cualitativamente por la morfología típica tipo coliflor [30], [31]. La forma característica de HA se puede reconocer bien luego de 7 días en SBF. Con una magnificación mayor, la hidroxiapatita se puede identificar claramente por su estructura de coliflor con un tamaño de partícula de aproximadamente 3,5  $\mu\text{m}$ . Se pudo observar que al aumentar el tiempo de inmersión en SBF, las partículas recubrieron toda la superficie de los andamios sin notar diferencias en el recubrimiento entre BG y FeBG.



**Figura 5.10** Micrografías SEM obtenidas para BG a 1h A), 1d B) y 7 días C) de inmersión en SBF. Micrografías obtenidas para FeBG a 1h , 1d y 7 días se corresponden con las imágenes D), E) y F) respectivamente.

### 5.5.2 Espectroscopía FTIR

Los espectros FTIR de andamios a base de vidrio bioactivo 45S5 fabricados (*Figura 5.11*), muestran los cambios ocurridos durante la inmersión en SBF. Con el aumento del tiempo de inmersión, los picos a  $532\text{ cm}^{-1}$ ,  $621\text{ cm}^{-1}$  y  $926\text{ cm}^{-1}$  se reducen en intensidad y desaparecen después de 7 días, lo que implica cambios en la composición. El pico a  $455\text{ cm}^{-1}$  está ligeramente desplazado debido a la presencia de cationes en el biovidrio [32]. Además, aparecen nuevos picos, como el pico doble a  $570\text{ cm}^{-1}$  y  $600\text{ cm}^{-1}$ , que pueden atribuirse a las vibraciones de flexión de P-O relacionadas con el grupo  $\text{PO}_4^{3-}$  en HA cristalina [33]–[35]. El nuevo pico ancho entre  $1100\text{ cm}^{-1}$  y  $1000\text{ cm}^{-1}$  y el hombro pequeño a  $960\text{ cm}^{-1}$  pueden relacionarse con el estiramiento de la P-O en el grupo de fosfato [14], [33], [36]. El pico a  $800\text{ cm}^{-1}$  está relacionado con la formación de una capa rica en sílice. Los picos, que se desarrollan a  $875\text{ cm}^{-1}$  y en la región  $1500 - 1400\text{ cm}^{-1}$ , se pueden atribuir a las vibraciones de flexión y estiramiento de C-O de los grupos  $\text{CO}_3^{2-}$  en la capa de HAp carbonatada, respectivamente [35], [37].



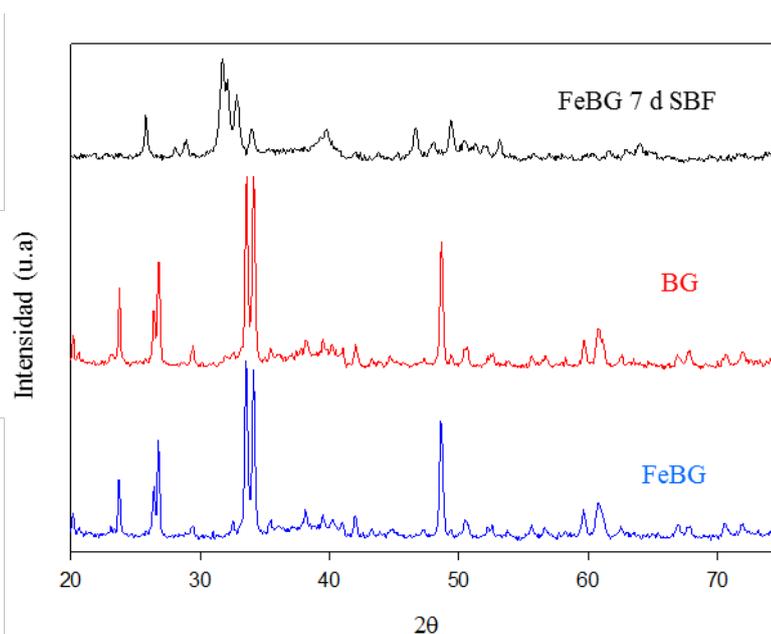
**Figura 5.11.** Espectros IR obtenidos a 1 hora (curva negra), 1 d (curva roja) y 7d (curva azul) para BG imagen A) y FeBG imagen B).

Los espectros obtenidos así como las micrografías SEM muestran que la bioactividad de los materiales no se ve afectada por la presencia de FeHAp en la superficie.

### 5.5.3 Difracción de rayos X

En la muestra de BG, se produce una cristalización extensa antes de la sinterización viscosa tal como se describe en la literatura [38] para biovidrios 45S5 BG y vidrios bioactivos relacionados. En la *Figura 5.12*, la ubicación angular de los picos como su intensidad relativa de las muestras BG y FeBG coinciden con el estándar # 22.1455 correspondiente a cristales de  $\text{Na}_2\text{Ca}_2\text{Si}_3\text{O}_9$ . La misma fase cristalina se formó e identificó en estudios previos sobre vidrios bioactivos sinterizados [38].

La muestra de FeBG solo mostró picos característicos de la fase  $\text{Na}_2\text{Ca}_2\text{Si}_3\text{O}_9$ , lo que podría deberse a la pequeña cantidad de nanopartículas FeHAp que forman parte del recubrimiento, que pueden estar por debajo del límite de detección de la técnica. Luego de 7 días en contacto con SBF, los andamios FeBG permiten distinguir la formación de HA luego del ensayo de bioactividad. El difractograma correspondiente muestra la disminución u ausencia de los picos pertenecientes a la fase cristalina del vidrio y la aparición de los picos característicos de la fase HA [39].



**Figura 5.12.** Difractogramas obtenidos para BG (curva roja) y FeBG (curva azul) sin exponer a SBF y FeBG después de 7 días en contacto con SBF (curva negra).

## ***5.6 Evaluación de la biocompatibilidad y osteoconductividad de los andamios recubiertos***

### ***5.6.1 En células tipo osteoblasticas humanas MG-63***

Para observar la interacción del material con las células se realizaron ensayos a 48 hs y 7 días de contacto.

La esterilización de los andamios se llevó a cabo mediante calentamiento a 160°C durante 2 hs. Posteriormente, dada la alta tasa de disolución del material y el incremento de pH generado como consecuencia de dicho proceso, fue necesario previo a poner en contacto los andamios con las células a analizar, realizar una pasivación del material. Para ello, los andamios se pusieron en una placa de 24 pocillos con 2 mL de medio de cultivo DMEM completo por andamio y luego se incubaron a 37°C con humedad del 95% en presencia de 10% de CO<sub>2</sub>. El medio de cultivo se cambió cada 24 hs y las muestras se lavaron con 2 ml de PBS. El pH del medio se midió cada vez y el proceso se finaliza cuando el pH alcanza un valor inferior a 8 en todas las muestras.

Una vez pasivados, los andamios se introdujeron en una placa de 24 pocillos y se sembraron 250.000 cls por andamio para ser incubadas en condiciones estándares durante los tiempos propuestos.

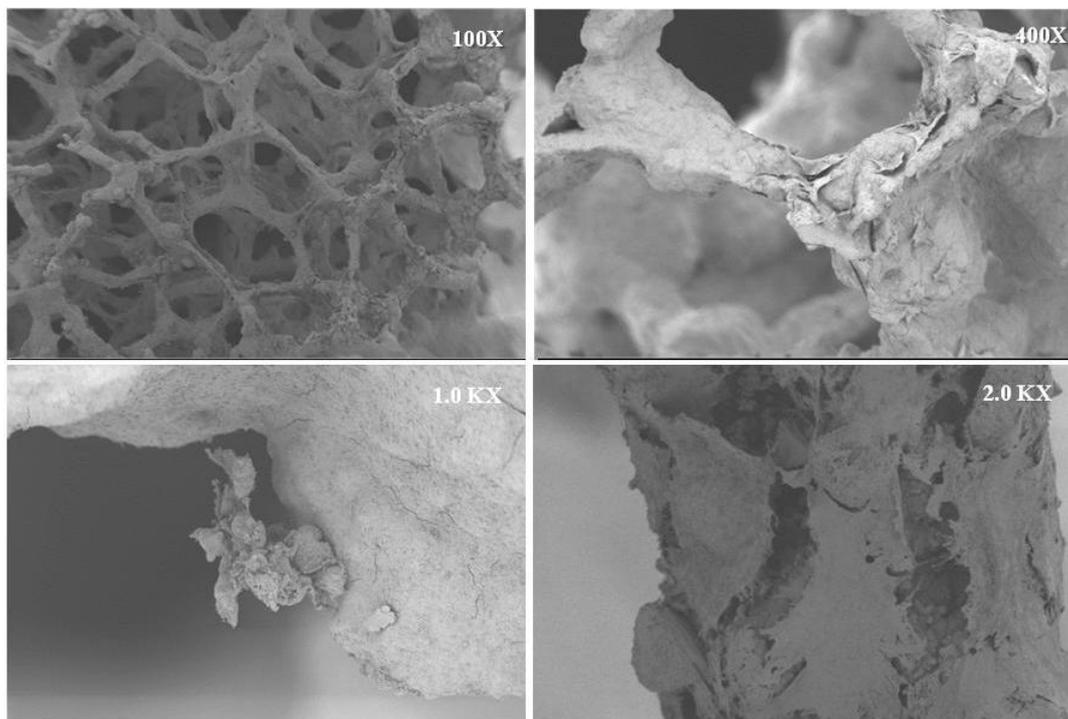
#### ***5.6.1.1 Microscopía electrónica de barrido***

La morfología celular después de diferentes períodos de incubación se observó por SEM. El medio de cultivo completo se retiró de las muestras y las mismas se lavaron con PBS. Se añadió una solución de fijación que contenía glutaraldehído y cacodilato de sodio a las muestras durante 1 hora. Después de eliminar la solución, se añadió otra solución de fijación que contenía glutaraldehído, cacodilato de sodio y paraformaldehído y se dejó estar durante 1 hora más. La solución se retiró y las muestras se colocaron en series de etanol para deshidratarse (a partir de 30% de etanol, hasta 50%, 70%, 80%, 90%, 95% y 100%). Luego, el 100% de etanol se reemplazó nuevamente por etanol fresco al 100% y las muestras se colocaron en un secador de punto crítico (Samdri PVT-3; Tousimis Research Corp., EE. UU.). Las muestras se recubrieron con oro antes del análisis SEM.

Como es sabido, cuando las células están en contacto con una superficie adecuada, se adhieren a la superficie y luego se extienden sobre la misma. Las proteínas de adhesión

son los principales actores que determinan estos procesos y en la calidad de la adhesión celular influyen enormemente la morfología, capacidad de proliferación y diferenciación de las células [40]. Proteínas de adhesión tales como fibronectina, osteopontina y la vitronectina se pueden adsorber *in vitro* del suero o *in vivo* a partir de fluidos biológicos, y sintetizados por células osteogénicas tras su adhesión sobre la superficie del biomaterial.

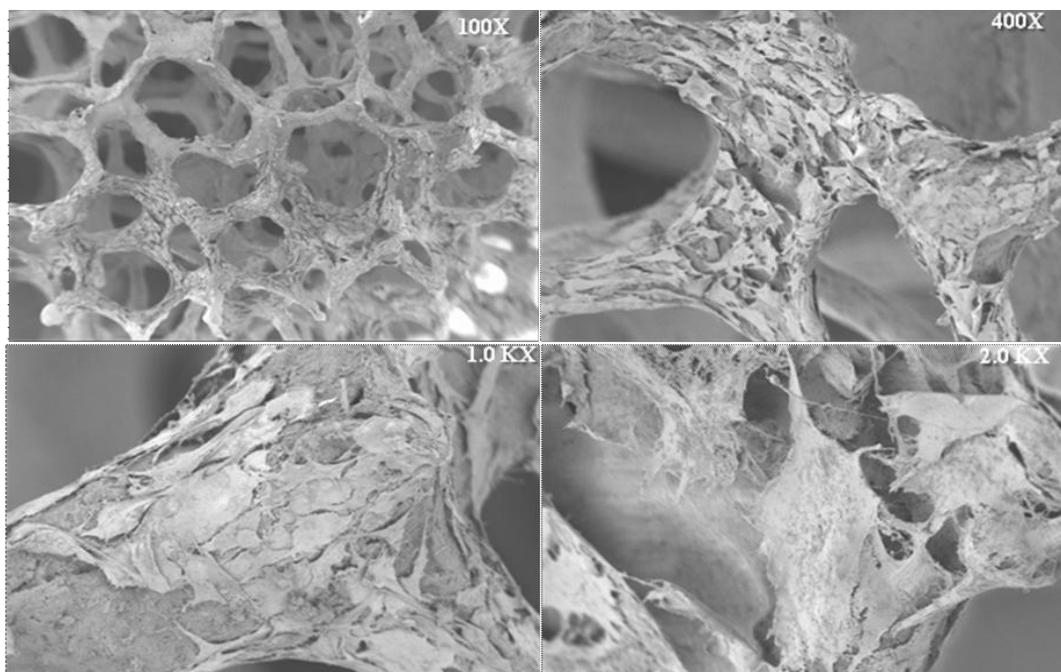
El proceso de adhesión luego induce la reorganización de los filamentos de actina, cambiando la forma de la célula y mediando la transducción de señales, a través de proteínas del citoesqueleto hasta llegar a la matriz nuclear. La adherencia en el proceso modifica así la expresión génica y determina la capacidad de proliferación y diferenciación de la célula.



**Figura 5.13.** Micrografías obtenidas para células MG-63 cultivadas sobre BG luego de 7 días de contacto a diferentes magnificaciones.

Como se puede observar en las micrografías obtenidas para los andamios sin recubrir *Figura 5.13* la superficie no se encontró completamente cubierta por las células luego de 7 días de contacto, a su vez distintas morfologías pueden observarse en la imagen demostrando que no todas las células se encontraban completamente adheridas y esparcidas sobre la superficie. La forma redondeada de las células podría deberse a zonas donde el incremento de pH del medio fue elevado (a pesar de que el material se encontraba pasivado) lo cual provocó un medio no propicio para el desarrollo celular.

Por otro lado las células cultivadas sobre andamios de FeBG mostraron una mayor adhesión y afinidad por la superficie del material como se puede ver en la *Figura 5.14* este efecto se observó tanto a las 48 hs como después de 7 días en contacto.

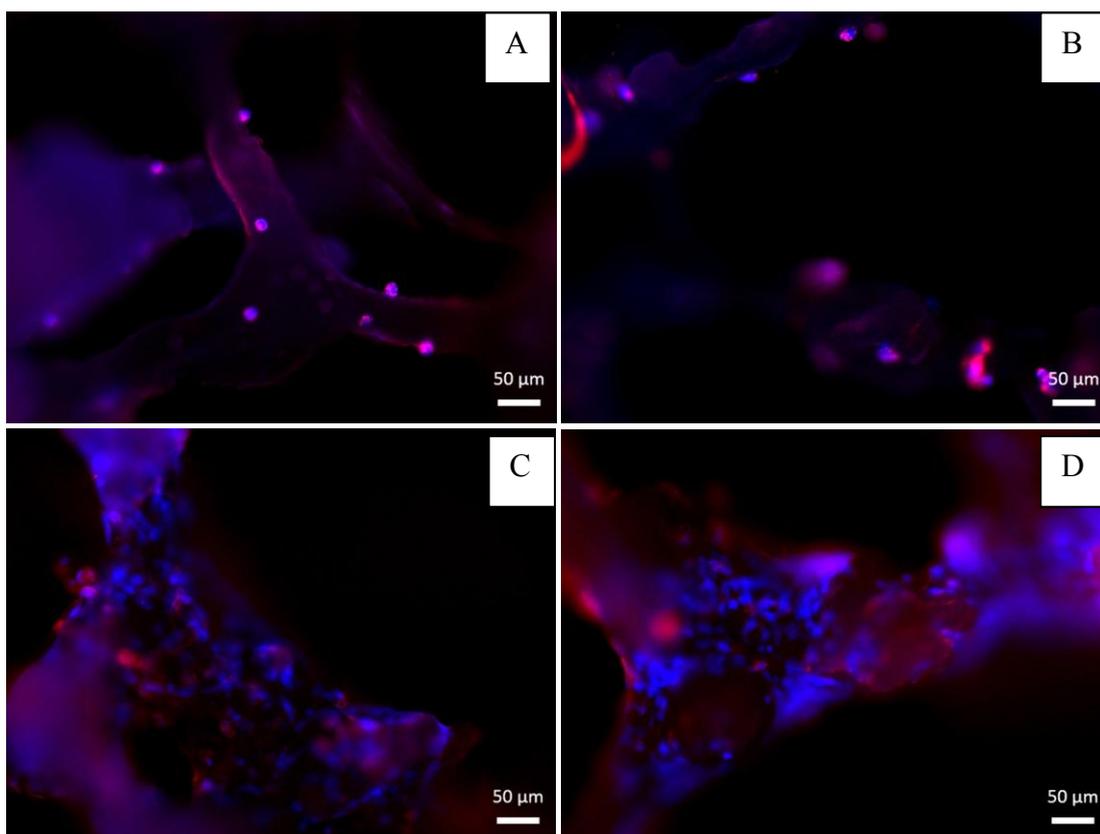


**Figura 5.14.** Micrografías obtenidas para células MG-63 cultivadas sobre FeBG luego de 7 días de contacto a diferentes magnificaciones

La distribución de las células sobre la superficie fue homogénea y se observó una mayor interconexión entre ellas. La morfología de las células observada fue completamente estirada.

### ***5.6.1.2 Tinción con DAPI y Vibrant Blue***

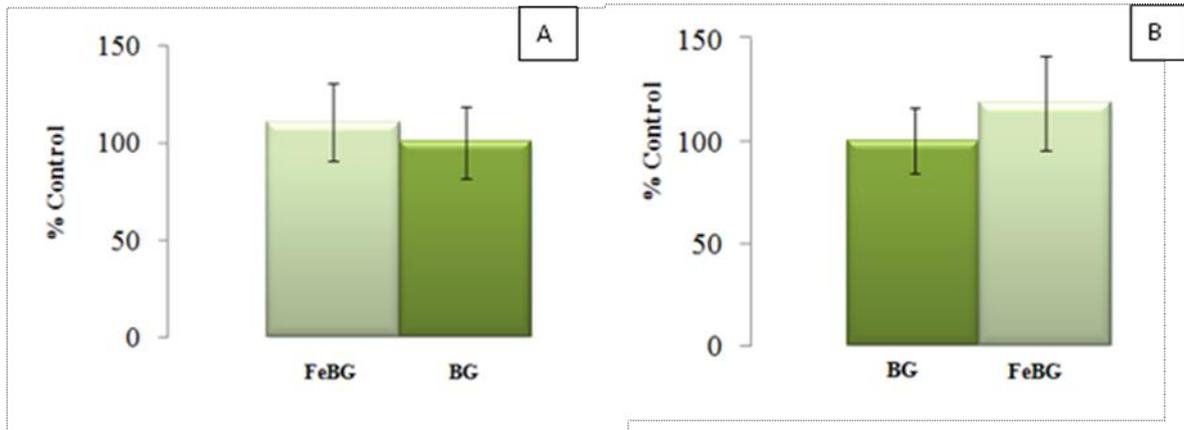
La tinción de las células adheridas a los andamios utilizando DAPI y Vibrant Blue durante ambos períodos de incubación no mostró diferencias cualitativamente significativas en los niveles de recubrimiento de la superficie de los andamios, con y sin incorporación de FeHAp (FeBG y BG, respectivamente)



**Figura 5.15.** Imágenes obtenidas mediante microscopía de fluorescencia (A) y (C) corresponde a células MG-63 cultivadas sobre BG durante 48hs y 7 días respectivamente. De forma equivalente las imágenes (B) y (D) corresponden a células cultivadas sobre FeBG.

### 5.6.1.3 Reducción oxidativa del WST-8

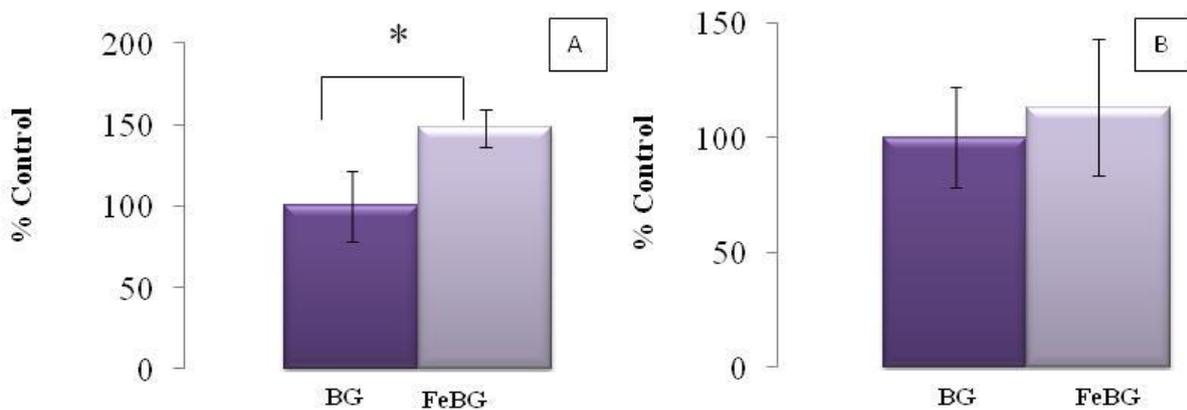
La respuesta celular mitocondrial medida tanto a las 48 hs como a los 7 días no mostró diferencias significativas entre las células tratadas con los andamios magnéticos y el control (andamios sin recubrir). Si bien la tendencia parecería mostrar un aumento en la actividad mitocondrial de las células cultivadas en presencia de FeBG, lo cual estaría en concordancia con los resultados observados en las imágenes SEM. Sin embargo, debido al error estándar de la media, las diferencias entre BG y FeBG no resultan ser estadísticamente significativas.



**Figura 5.16.** Resultados de la medida de reducción oxidativa de WST-8 a 48 hs de contacto (imagen A) y 7 días de contacto (imagen B).

#### 5.6.1.4 Medida de la actividad Lactato Deshidrogenasa

El incremento en la actividad lactato deshidrogenasa observado para FeBG con respecto a los andamios sin recubrimiento a las 48hs de cultivo reveló una diferencia estadísticamente significativa ( $p < 0,05$ ). Diferencia no observada a los 7 días de contacto.

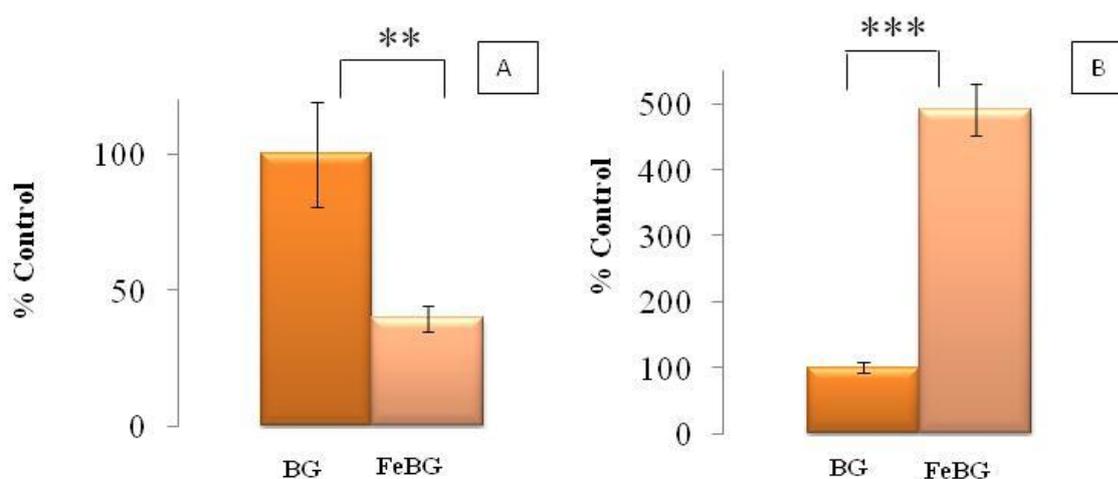


**Figura 5.17.** Resultados de la medida de LDH a 48 hs de contacto (imagen A) y 7 días de contacto (imagen B).

#### 5.6.1.5 Incorporación de Bromodesoxiuridina

Dado que las medidas de LDH representan una medida indirecta de la proliferación celular, se realizaron ensayos de incorporación de BrdU donde un aumento en la

cantidad incorporada de dicho reactivo se encuentra directamente relacionado con un aumento en la proliferación celular. Los resultados obtenidos muestran en la *Figura 5.18*, que a tan sólo 48 hs de contacto con la superficie del andamio con nanopartículas magnéticas (A) los cultivos celulares no evidencian una mejora de la proliferación respecto a aquellos cultivados sobre BG. Sin embargo, luego de 7 días de contacto (B) esta tendencia se modifica, es decir los andamios FeBG evidencian un aumento significativo ( $p < 0,001$ ) de la proliferación celular respecto a aquellos no magnéticos.



**Figura 5.18.** Resultados de la incorporación de BrdU luego de 48 hs de contacto (imagen A) y 7 días de contacto (imagen B).

Los andamios no magnéticos en base a BG ya son aceptados como convencionales para su utilización como sustitutos en injertos óseos. Los resultados observados para los FeBG evidencian a largos plazos una mejora considerable en la proliferación celular superando el efecto inicial (48hs) que podría deberse a una liberación diferencial, respecto a BG, de algunos de los componentes del material del andamio. Cabe aclarar que la diferente tendencia observada para el tiempo de 48 hs entre los ensayos de LDH y BrdU podría deberse a una diferencia en la siembra del cultivo celular.

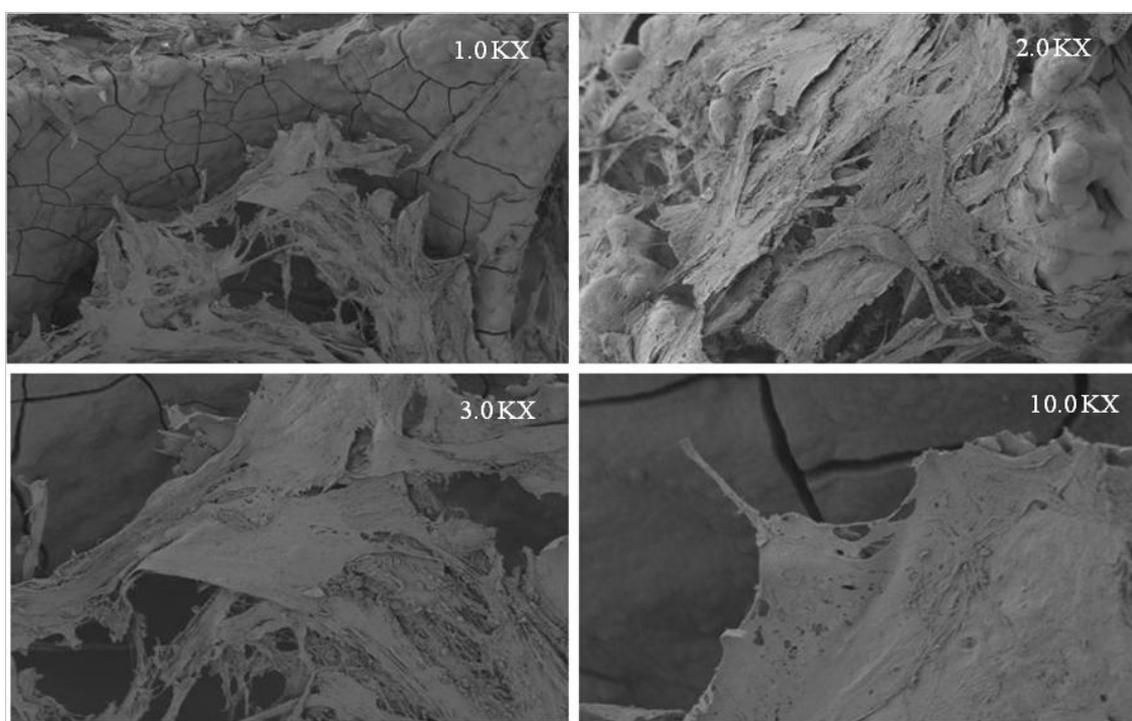
### 5.6.2 En células de médula ósea de ratón ST-2

Dado que en los materiales implantables es necesario evaluar tiempos largos de contacto de forma de tener una estimación de cómo sería la interacción del material con las células en el organismo, para este tipo celular se utilizaron 14 días de contacto.

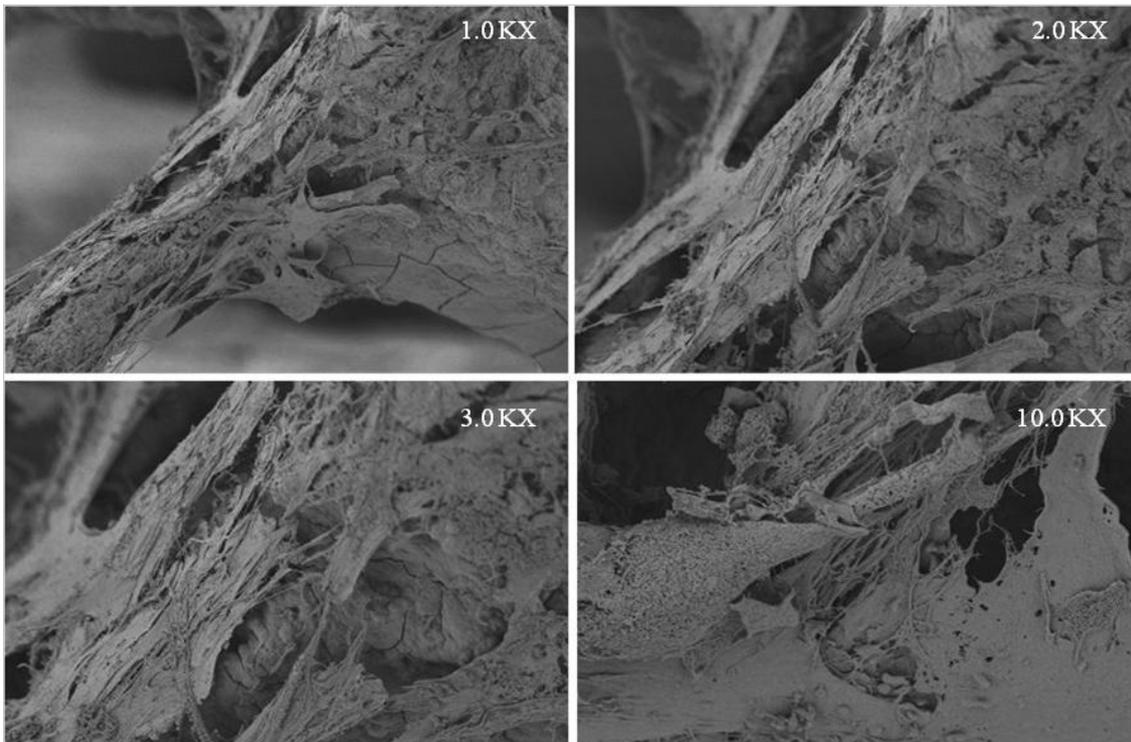
La esterilización de los andamios se llevó a cabo mediante calentamiento a 160°C durante 2 hs. Posteriormente, se pasivó el material siguiendo el procedimiento descrito con anterioridad (sección 5.6.1). Finalmente, los andamios pasivados se introdujeron en una placa de 24 pocillos y se sembraron 250.000 células por andamio, para ser incubadas en condiciones estándares durante el tiempo propuesto.

### 5.6.2.1 Microscopía electrónica de barrido

Las micrografías SEM mostraron una morfología celular completamente estirada propia de las células en estudio tanto en los andamios con o sin recubrimiento (ver *Figuras 5.19 y 5.20*) típica de observar en las superficies de materiales biocompatibles.



**Figura 5.19.** Micrografías obtenidas para células ST-2 cultivadas sobre BG luego de 14 días de contacto a diferentes magnificaciones.

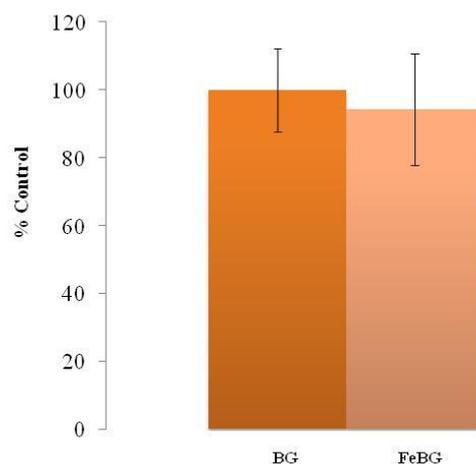


**Figura 5.20.** Micrografías obtenidas para células ST-2 cultivadas sobre FeBG luego de 14 días de contacto a diferentes magnificaciones.

Las imágenes muestran una mayor interconexión entre las células cultivadas sobre FeBG así como una mejor interacción entre la superficie del material y las células. A mayores magnificaciones es posible notar que sobre la superficie del BG (Fig 5.19) las células presentan escasas prolongaciones citoplasmáticas que favorezcan su adhesión.

### 5.6.2.2 Reducción oxidativa del WST-8

Si bien la tendencia parecería mostrar una disminución en la actividad mitocondrial de las células tratadas con FeBG luego de 14 días de contacto, al considerar el error estándar de la media, las diferencias no resultan ser estadísticamente significativas.



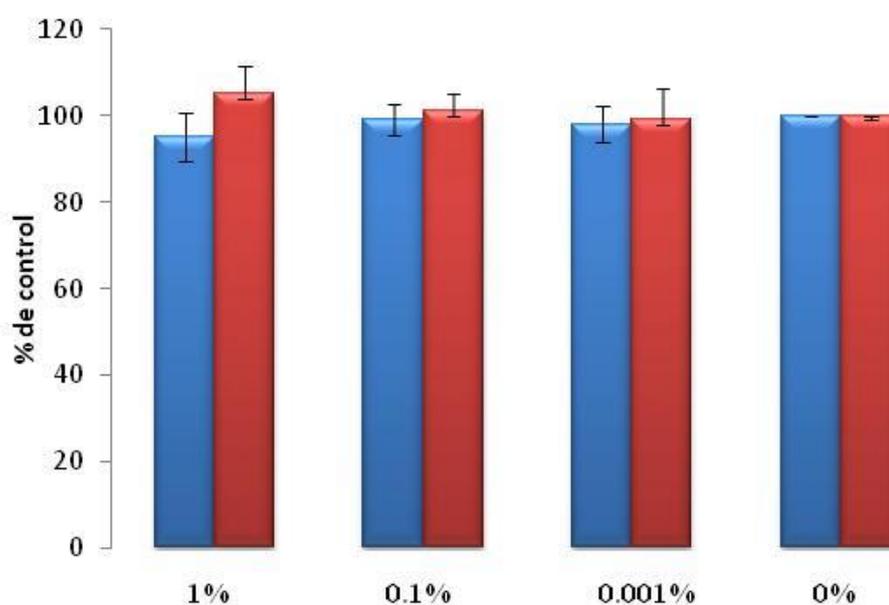
**Figura 5.21.** Resultados de la medida de reducción oxidativa de WST-8 de células ST-2

### 5.6.3 Ensayos de biocompatibilidad indirecto evaluando extractos obtenidos de FeBG en células de médula ósea de ratón ST-2

Tal como se observó en la sección 4.4 del corriente *Capítulo*, los ensayos de disolución de los andamios FeBG producen la liberación de iones hierro en diferentes medios, incrementando con el tiempo de exposición. Por ello, se planteó el estudio del efecto que podría ocasionar dicha liberación de iones en células mesenquimáticas de ratón ST-2. El análisis se realizó a partir de los extractos obtenidos mediante la disolución parcial de los andamios, el protocolo experimental utilizado para los ensayos indirectos se describió previamente en el *Capítulo II*, particularmente en la *sección 2.4.4 b)*.

#### 5.6.3.1 Reducción oxidativa del WST-8

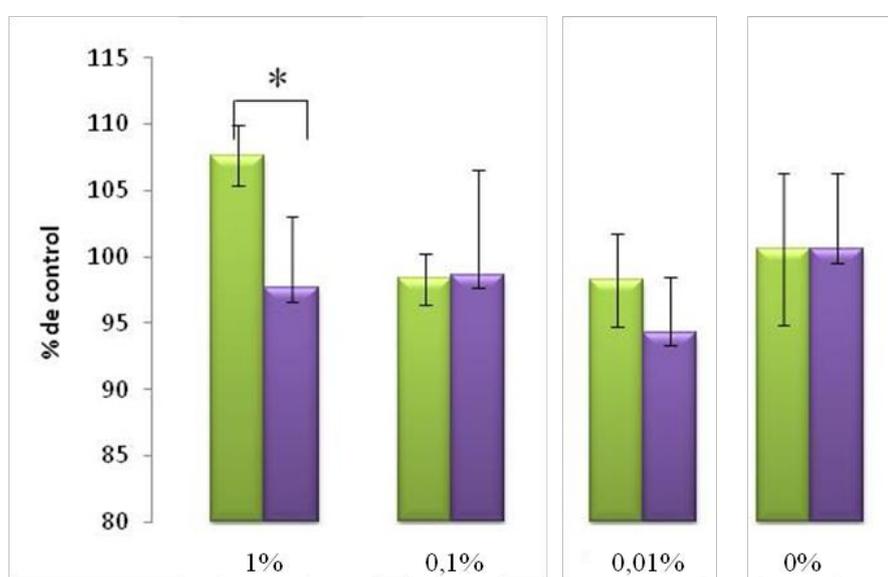
La respuesta celular mitocondrial medida para las células tratadas con los extractos luego de 48 hs de contacto no mostró diferencias significativas entre las células tratadas con los andamios magnéticos y el control de andamios sin recubrir para todas las condiciones estudiadas.



**Figura 5.22.** Resultados de la medida de reducción oxidativa de WST-8 en células ST-2, tratadas con extractos de BG (serie roja) y extractos de FeBG (serie azul).

### 5.6.3.2 Detección del factor de crecimiento endotelial vascular

En la *Figura 5.23*, se muestra la liberación de VEGF a partir de células ST-2 cultivadas en CCM con diferentes concentraciones de extractos. En todos los casos hubo una disminución en la expresión de factor de crecimiento endotelial para las células tratadas con extractos de FeBG con respecto a las tratadas con BG, dicha disminución fue sólo significativa ( $p < 0,05$ ) en la concentración de extracto igual a 1%p/v.

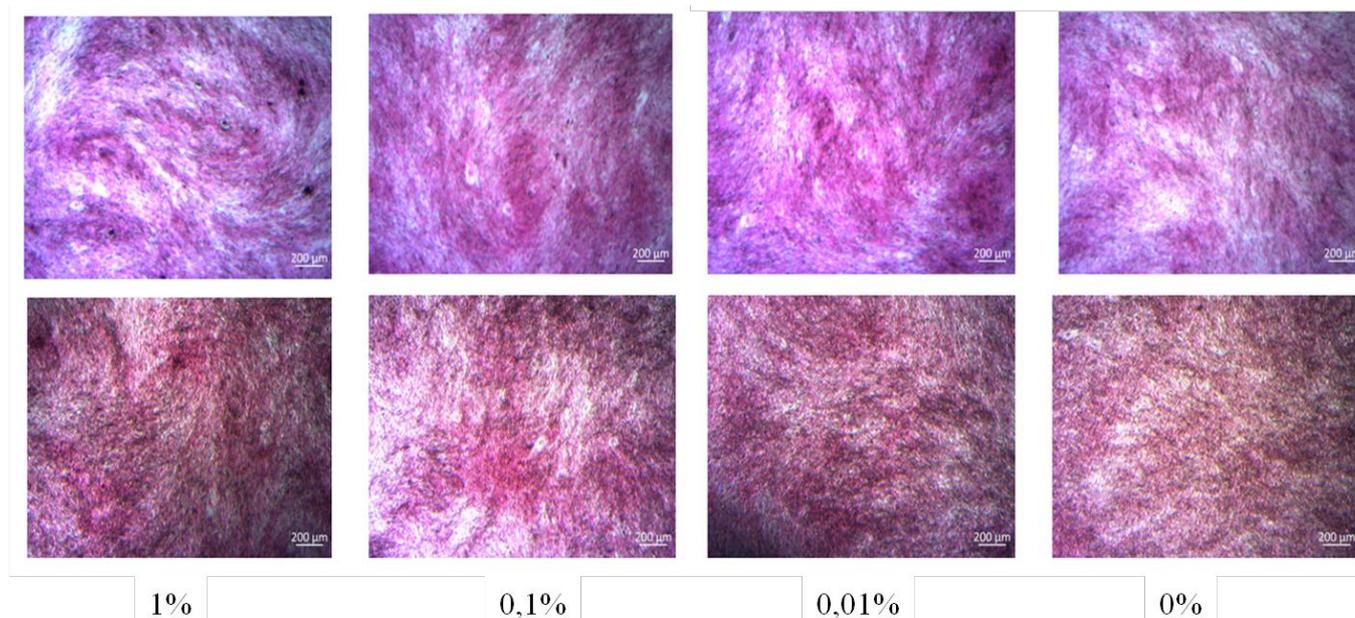


**Figura 5.23.** Resultados de la detección de VEGF en células ST-2, tratadas con extractos de BG (serie verde) y extractos de FeBG (serie violeta).

### 5.6.3.3 Tinción con Hematoxilina y eosina

Imágenes de microscopía óptica de células ST-2 teñidas con H & E cultivadas en presencia de distintas concentraciones de los extractos obtenidos a partir de la disolución de los andamios se muestran en la *Figura 5.24*.

En las imágenes se puede observar que las células exhibieron su fenotipo característico, mostrando su morfología normal y una gran adherencia a la placa de cultivo. Como puede observarse no se encontraron diferencias significativas entre en la morfología y la adhesión de las células ST-2 tratadas con los distintas concentraciones de extractos tanto de los andamios sin recubrir como de los recubiertos.



**Figura 5.24.** Imágenes de microscopía óptica obtenidas para células ST-2, tratadas con distintas concentraciones de extractos de BG (imágenes superiores) y extractos de FeBG (imágenes inferiores).

### 5.7 Conclusiones parciales

- Se sintetizaron andamios tridimensionales a base de vidrio bioactivo 45S5<sup>®</sup>. Se optimizaron las condiciones de recubrimiento de dichos andamios con FeHAp mediante el método de *dip-coating* variando los tiempos de exposición y la concentración de las suspensiones utilizadas, encontrando como óptimas las condiciones de concentración igual a 5 mg/mL y un tiempo de exposición de 10 minutos.
- Las propiedades magnéticas del material se probaron en la estructura y el polvo de los andamios. Se observó una susceptibilidad magnética volumétrica de 0,0679 y una respuesta superparamagnética en el andamio de FeBG. Se determinó una pequeña histéresis del material trabajando en un campo aplicado de 27 Oe, la saturación magnética obtenida previamente para las partículas fue de 0,4 emu/gr y se observaron valores entre 0,04-0,05 emu/gr en los andamios después del revestimiento.

- La bioactividad después de la inmersión en SBF no se vio afectada debido a la presencia de FeHAp en los andamios, pudiendo observarse la formación de estructuras de tipo coliflor en andamios con y sin recubrimiento.
- Los ensayos de viabilidad directos, tanto en células MG-63 y ST-2, mostraron resultados similares (dentro del error estadístico) entre los andamios antes y después del recubrimiento con FeHAp.
- Se observó una mejor adhesión y proliferación de las células sobre la superficie de andamios FeBG.

### **Referencias**

- [1] K. Wu, D. Su, J. Liu, R. Saha, and J. P. Wang, “Magnetic nanoparticles in nanomedicine: A review of recent advances,” *Nanotechnology*, vol. 30, no. 50, Sep. 2019.
- [2] P. S. Williams, F. Carpino, and M. Zborowski, “Magnetic nanoparticle drug carriers and their study by quadrupole magnetic field-flow fractionation,” in *Molecular Pharmaceutics*, 2009, vol. 6, no. 5, pp. 1290–1306.
- [3] R. Tietze *et al.*, “Efficient drug-delivery using magnetic nanoparticles - biodistribution and therapeutic effects in tumour bearing rabbits,” *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.*, vol. 9, no. 7, pp. 961–971, Oct. 2013.
- [4] R. Tietze *et al.*, “Visualization of superparamagnetic nanoparticles in vascular tissue using X $\mu$ CT and histology,” *Histochem. Cell Biol.*, vol. 135, no. 2, pp. 153–158, Feb. 2011.
- [5] C. Alexiou *et al.*, “Cancer therapy with drug loaded magnetic nanoparticlesmagnetic drug targeting,” in *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 2011, vol. 323, no. 10, pp. 1404–1407.
- [6] Y. Yamamoto *et al.*, “Preparation of artificial skeletal muscle tissues by a magnetic force-based tissue engineering technique,” *J. Biosci. Bioeng.*, vol. 108, no. 6, pp. 538–543, Dec. 2009.
- [7] R. Sensenig, Y. Sapir, C. MacDonald, S. Cohen, and B. Polyak, “Magnetic nanoparticle-based approaches to locally target therapy and enhance tissue

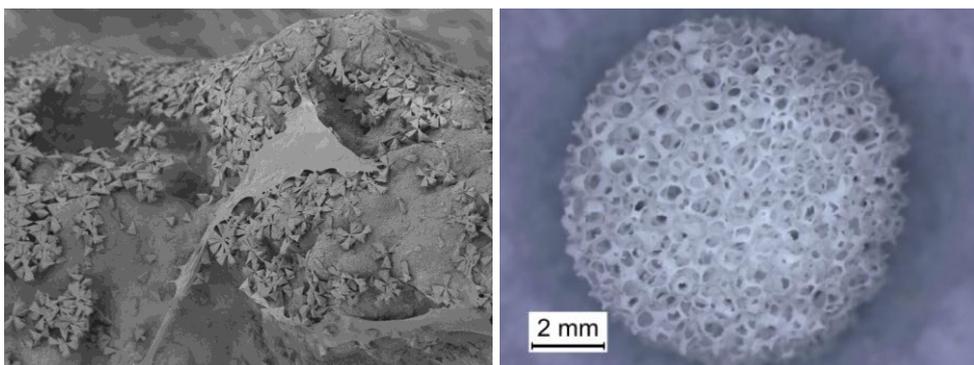
- regeneration in vivo,” *Nanomedicine*, vol. 7, no. 9. pp. 1425–1442, Sep-2012.
- [8] H. Perea, J. Aigner, J. T. Heverhagen, U. Hopfner, and E. Wintermantel, “Vascular tissue engineering with magnetic nanoparticles: Seeing deeper,” *J. Tissue Eng. Regen. Med.*, vol. 1, no. 4, pp. 318–321, Jul. 2007.
- [9] S. Panseri *et al.*, “Innovative magnetic scaffolds for orthopedic tissue engineering,” *J. Biomed. Mater. Res. Part A*, p. n/a-n/a, 2012.
- [10] A. Tampieri *et al.*, “A conceptually new type of bio-hybrid scaffold for bone regeneration,” *Nanotechnology*, vol. 22, no. 1, Jan. 2011.
- [11] S. H. Hu, T. Y. Liu, C. H. Tsai, and S. Y. Chen, “Preparation and characterization of magnetic ferroscaffolds for tissue engineering,” *J. Magn. Magn. Mater.*, vol. 310, no. 2 SUPPL. PART 3, pp. 2871–2873, 2007.
- [12] N. Bock *et al.*, “A novel route in bone tissue engineering: Magnetic biomimetic scaffolds,” *Acta Biomater.*, vol. 6, no. 3, pp. 786–796, 2010.
- [13] A. Gloria *et al.*, “Magnetic poly(1-caprolactone)/iron-doped hydroxyapatite nanocomposite substrates for advanced bone tissue engineering,” *J. R. Soc. Interface*, vol. 10, no. 80, 2013.
- [14] I. Rehman, J. C. Knowles, and W. Bonfield, “Analysis of in vitro reaction layers formed on Bioglass □ using thin-film X-ray diffraction and ATR-FTIR microspectroscopy,” 1997.
- [15] L. L. Hench, D. E. Day, W. Höland, and V. M. Rheinberger, “Glass and Medicine,” *Int. J. Appl. Glas. Sci.*, vol. 1, no. 1, pp. 104–117, 2010.
- [16] J. R. Jones, “Review of bioactive glass: From Hench to hybrids,” *Acta Biomater.*, vol. 9, no. 1, pp. 4457–4486, 2013.
- [17] I. J. Macha *et al.*, “In vitro bioactivity and stem cells attachment of three-dimensionally ordered macroporous bioactive glass incorporating iron oxides,” *J. Non. Cryst. Solids*, vol. 452, pp. 62–73, Nov. 2016.
- [18] S. Kargozar, M. Mozafari, S. Hamzehlou, H. W. Kim, and F. Baino, “Mesoporous bioactive glasses (MBGs) in cancer therapy: Full of hope and promise,” *Mater. Lett.*, vol. 251, pp. 241–246, Sep. 2019.
- [19] Q. Z. Chen, I. D. Thompson, and A. R. Boccaccini, “45S5 Bioglass®-derived glass-ceramic scaffolds for bone tissue engineering,” *Biomaterials*, vol. 27, no. 11, pp. 2414–2425, 2006.
- [20] Y. Kuboki *et al.*, “BMP-induced osteogenesis on the surface of hydroxyapatite with geometrically feasible and nonfeasible structures: Topology of

- osteogenesis,” *J. Biomed. Mater. Res.*, vol. 39, no. 2, pp. 190–199, Feb. 1998.
- [21] A. J. Salgado, O. P. Coutinho, and R. L. Reis, “Bone tissue engineering: State of the art and future trends,” *Macromolecular Bioscience*, vol. 4, no. 8, pp. 743–765, 09-Aug-2004.
- [22] J. J. Klawitter, J. G. Bagwell, A. M. Weinstein, B. W. Sauer, and J. R. Pruitt, “An evaluation of bone growth into porous high density polyethylene,” *J. Biomed. Mater. Res.*, vol. 10, no. 2, pp. 311–323, 1976.
- [23] S. F. Hulbert, F. A. Young, R. S. Mathews, J. J. Klawitter, C. D. Talbert, and F. H. Stelling, “Potential of ceramic materials as permanently implantable skeletal prostheses,” *J. Biomed. Mater. Res.*, vol. 4, no. 3, pp. 433–456, 1970.
- [24] A. I. Itl, H. O. Ylmen, C. Ekholm, K. H. Karlsson, and H. T. Aro, “Pore diameter of more than 100  $\mu\text{m}$  is not requisite for bone ingrowth in rabbits,” *J. Biomed. Mater. Res.*, vol. 58, no. 6, pp. 679–683, 2001.
- [25] V. Karageorgiou and D. Kaplan, “Porosity of 3D biomaterial scaffolds and osteogenesis,” *Biomaterials*, vol. 26, no. 27, Elsevier BV, pp. 5474–5491, 2005.
- [26] C. M. Murphy, M. G. Haugh, and F. J. O’Brien, “The effect of mean pore size on cell attachment, proliferation and migration in collagen-glycosaminoglycan scaffolds for bone tissue engineering,” *Biomaterials*, vol. 31, no. 3, pp. 461–466, Jan. 2010.
- [27] F. P. W. Melchels, A. M. C. Barradas, C. A. Van Blitterswijk, J. De Boer, J. Feijen, and D. W. Grijpma, “Effects of the architecture of tissue engineering scaffolds on cell seeding and culturing,” *Acta Biomater.*, vol. 6, no. 11, pp. 4208–4217, Nov. 2010.
- [28] A. R. Amini, C. T. Laurencin, and S. P. Nukavarapu, “Bone tissue engineering: Recent advances and challenges,” *Crit. Rev. Biomed. Eng.*, vol. 40, no. 5, pp. 363–408, 2012.
- [29] T. Kobubo, and H. Takadama, “How useful is SBF in predicting in vivo bone bioactivity?” vol. 27, pp. 2907–2915, 2006.
- [30] J. M. Oliveira *et al.*, “Macroporous hydroxyapatite scaffolds for bone tissue engineering applications: Physicochemical characterization and assessment of rat bone marrow stromal cell viability,” *J. Biomed. Mater. Res. - Part A*, vol. 91, no. 1, pp. 175–186, 2009.
- [31] Y. Yusufoglu and M. Akinc, “Deposition of carbonated hydroxyapatite (CO<sub>3</sub>HAp) on poly(methylmethacrylate) surfaces by decomposition of calcium-

- EDTA chelate,” *J. Am. Ceram. Soc.*, vol. 91, no. 10, pp. 3147–3153, Oct. 2008.
- [32] M. Cerruti, D. Greenspan, and K. Powers, “Effect of pH and ionic strength on the reactivity of Bioglass® 45S5,” *Biomaterials*, vol. 26, no. 14, pp. 1665–1674, 2005.
- [33] S. Koutsopoulos, “Synthesis and characterization of hydroxyapatite crystals: A review study on the analytical methods,” no. February, pp. 31–34, 2002.
- [34] H. Wang *et al.*, “Biocompatibility and osteogenic capacity of borosilicate bioactive glass scaffolds loaded with Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> magnetic nanoparticles,” *J. Mater. Chem. B*, vol. 3, no. 21, pp. 4377–4387, 2015.
- [35] E. Szarawara, B. Trybalska, M. Cichocin, A. Stoch, W. Jastrze, and A. Broz, “FTIR monitoring of the growth of the carbonate containing apatite layers from simulated and natural body fluids,” vol. 512, pp. 287–294, 1999.
- [36] Y. M. Moustafa, “Infrared spectra of sodium phosphate glasses,” vol. 240, no. March, pp. 144–153, 1998.
- [37] S. Koutsopoulos and E. Dalas, “Hydroxyapatite crystallization in the presence of serine, tyrosine and hydroxyproline amino acids with polar side groups,” *J. Cryst. Growth*, vol. 216, no. 1, pp. 443–449, 2000.
- [38] D. C. Clupper, J. E. Gough, M. M. Hall, A. G. Clare, W. C. LaCourse, and L. L. Hench, “In vitro bioactivity of S520 glass fibers and initial assessment of osteoblast attachment,” *J. Biomed. Mater. Res.*, vol. 67A, no. 1, pp. 285–294, Oct. 2003.
- [39] T. A. Fuierer, M. LoRe, S. A. Puckett, and G. H. Nancollas, “A Mineralization Adsorption and Mobility Study of Hydroxyapatite Surfaces in the Presence of Zinc and Magnesium Ions,” *Langmuir*, vol. 10, no. 12, pp. 4721–4725, Dec. 1994.
- [40] S. Verrier, J. J. Blaker, V. Maquet, L. L. Hench, and A. R. Boccaccini, “PDLLA/Bioglass® composites for soft-tissue and hard-tissue engineering: An in vitro cell biology assessment,” *Biomaterials*, vol. 25, no. 15, pp. 3013–3021, 2004.

# Capítulo VI

## Incorporación de HAp /HAp modificada con Mg y Zn en sustratos de vidrio bioactivo



## **6.1 Introducción**

Como se discutió previamente, debido a que el fosfato de calcio presente en el hueso no es un material homogéneo y la presencia de trazas de algunos iones metálicos ( $Mg^{+2}$ ,  $Zn^{+2}$ ,  $K^{+1}$ ,  $Sr^{+2}$ ) en la composición de las apatitas biológicas ayudan al proceso de disolución en la remodelación ósea [1]–[3] se desarrolló la síntesis y caracterización de nanomateriales tales como MgHAp, ZnHAp y MgZnHAp, las que se describieron en el *Capítulo III*. La elección de dichos iones metálicos se fundamentó en datos bibliográficos donde la síntesis de vidrios bioactivos con composiciones variables de los iones  $Mg^{+2}$  y  $Zn^{+2}$  ha sido ampliamente evaluada como estrategia para aumentar las propiedades angiogénicas y osteogénicas de los biomateriales [4]–[8].

Durante el desarrollo de este trabajo de tesis doctoral se planteó la combinación de las propiedades de las matrices tridimensionales a base de 45S5 BG con las propiedades de los nanomateriales a base de hidroxiapatita modificados con iones metálicos.

A lo largo de este *Capítulo* se expondrán los resultados de la obtención y caracterización de los andamios recubiertos con nanopartículas de HAp, MgHAp, ZnHAp y MgZnHAp.

La microestructura y la porosidad del andamio se observó mediante SEM; La presencia de los metales en las muestras se analizó por MP-AES. La bioactividad de los nuevos materiales se evaluó mediante el ensayo de mineralización y la biocompatibilidad se evaluó en células MG-63 y en células ST-2 mediante ensayos de WST-8 y LDH. La morfología de las células se observó mediante SEM. Se realizaron medidas de la actividad de la fosfatasa alcalina para evaluar una posible diferenciación celular inducida por los materiales. Se realizaron ensayos de biocompatibilidad indirectos en células ST-2 a partir de extractos obtenidos de los productos de disolución de los andamios, evaluando la viabilidad celular junto con la capacidad angiogénica de dichas células al estar en contacto con los extractos.

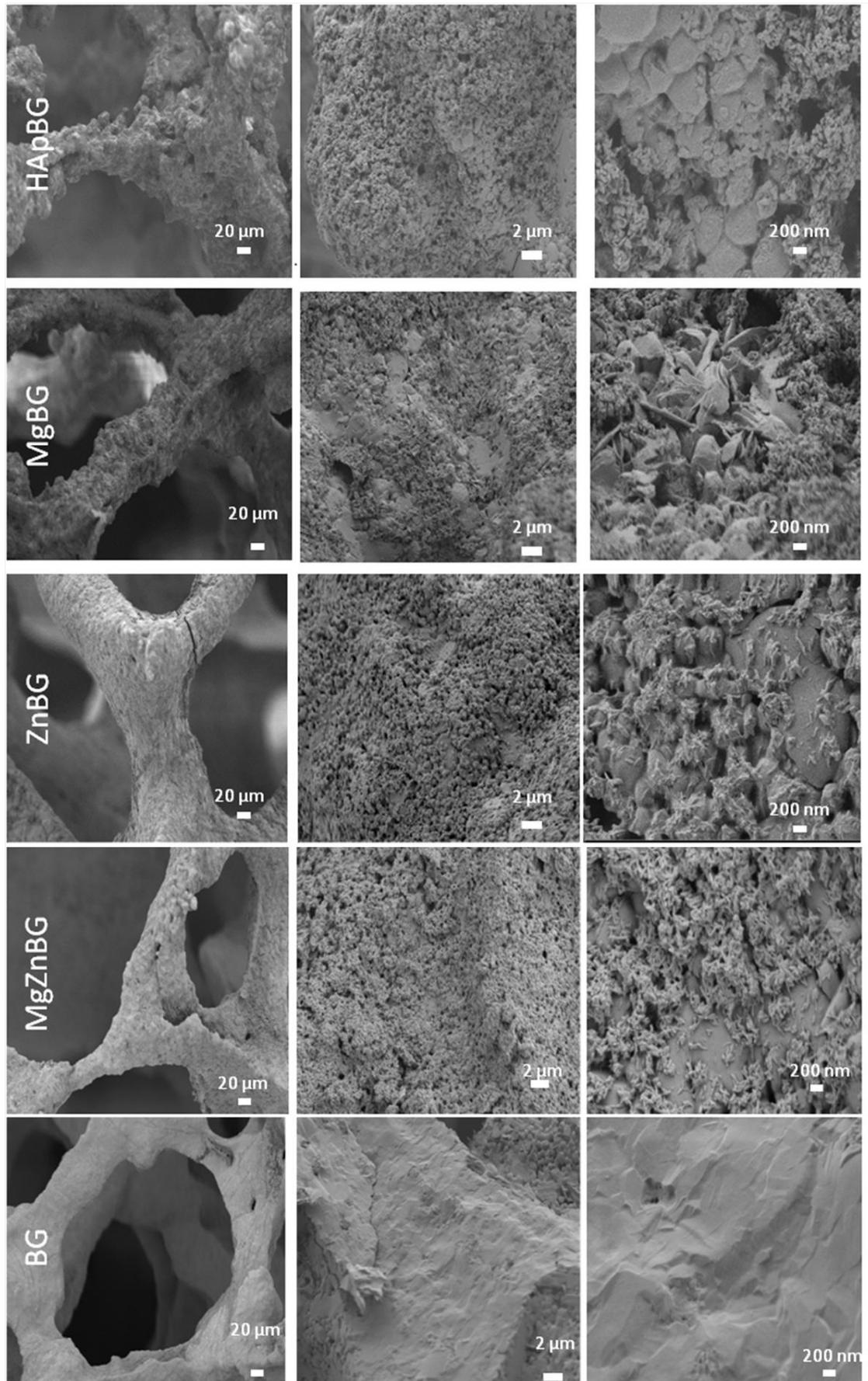
## **6.2 Incorporación de los nanomateriales en los andamios mediante Dip-coating**

El recubrimiento se realizó de forma equivalente al procedimiento descrito en el *Capítulo V*. Para ello se utilizaron las condiciones optimizadas que involucran en todos los casos, suspensiones etanólicas de 5 mg/mL de nanopartículas y un tiempo de exposición de 10 min.

### ***6.3 Caracterización de los andamios obtenidos.***

#### ***6.3.1 Microscopía electrónica de barrido***

La presencia de los nanomateriales en la superficie de BG se pudo observar mediante el análisis de imágenes SEM, como se puede ver en la *Figura 6.1*. Todas las imágenes muestran un cambio en la morfología de la superficie del andamio. La forma de nanobastones de las nanopartículas (ver *Capítulo III*) son fácilmente identificables en estas imágenes, lo cual indica que el proceso de recubrimiento fue exitoso.

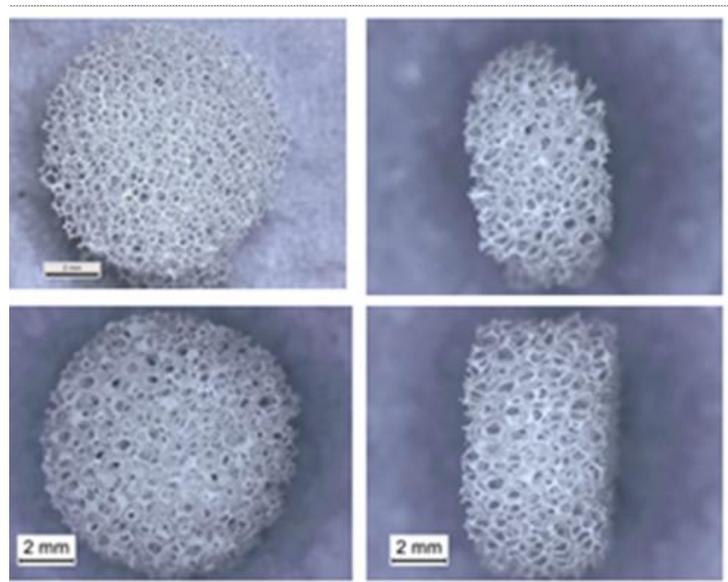


**Figura 6.1.** Micrografías SEM de andamios recubiertos con los distintos tipos de nanomateriales obtenidas a diferentes magnificaciones.

### 6.3.2 Porosidad y microscopía óptica

El cálculo de la porosidad de los materiales se realizó de forma equivalente a la utilizada en la sección 5.3.2 del *Capítulo V*. De acuerdo a lo descrito previamente, después del proceso de sinterización se observa una reducción del 40% en las muestras, el tamaño final obtenido fue de 8,33 mm de diámetro con 4,33 de espesor.

La porosidad de las muestras varió entre 92-94% según los valores reportados anteriormente para los andamios de biovidrio, tal como se espera para un recubrimiento muy delgado los mismos. Se tomaron imágenes de microscopio óptico para observar la porosidad y el tamaño de los andamios (*Figura 6.2*).



**Figura 6.2.** Imágenes obtenidas mediante microscopía óptica de andamios sin recubrir (arriba) y andamios de Mg-ZnBG (abajo). Dado que para el resto de las partículas se obtuvieron imágenes similares solo se muestran las muestras recubiertas con MgZnHAp (ver **Anexo**).

### 6.3.3 Espectroscopia de emisión atómica de plasma por microondas

En todas las muestras, el Mg estuvo siempre por debajo de las cantidades determinadas de Zn, en línea con las proporciones de Zn y Mg observadas en MgHAp, ZnHAp y MgZnHAp hecho que se encuentra relacionado con el pequeño tamaño del ión  $Mg^{+2}$  en comparación con los iones  $Ca^{+2}$  [9] tal como se discutió en el *Capítulo III* (sección 3.2.3). Las composiciones de Zn y Mg en las muestras expresadas en ng por mg de andamio se detallan en la Tabla 6.1.

| Muestra | ng Mg/ mg muestra | ng Zn/ mg muestra  |
|---------|-------------------|--------------------|
| BG      | 84 ( $\pm 5$ )    | 0                  |
| MgZnBG  | 84 ( $\pm 6$ )    | 850( $\pm 250$ )   |
| MgBG    | 93 ( $\pm 3$ )    | 0                  |
| ZnBG    | 84( $\pm 10$ )    | 1040 ( $\pm 300$ ) |

**Tabla 6.1.** Composición de Mg y Zn en los andamios expresada en ng del metal por mg de muestra. Valores obtenidos por MP-AES.

Considerando el contenido de Zn en las nanopartículas, puede estimarse que el recubrimiento del andamio de biovidrio con nanopartículas es del orden de 0,0856 y 0,1563 p/p para ZnBG y MgZnBG, respectivamente. El recubrimiento de los andamios de biovidrio con MgHAp estimado es muy bajo, del orden de 0,0022 p/p si se toma la diferencia entre lo aportado por el biovidrio y el valor observado para MgBG. Sin embargo, esta estimación está sujeta a mucho error, ya que el método parece poco sensible a este elemento.

La presencia de las nanopartículas de HAp, MgHAp, ZnHAp y MgZnHAp no pudo detectarse mediante FTIR y DRX, probablemente debido a la baja cobertura de los andamios con las nanopartículas.

#### **6.4 Ensayo de mineralización**

Como ya se describió anteriormente, el comportamiento bioactivo de los biomateriales es un aspecto importante que describe su capacidad de enlace óseo, tal como se discutió en la sección 5.4 del *Capítulo V*. La bioactividad de los materiales fue evaluada a partir del ensayo de mineralización siguiendo el protocolo descrito por Kokubo [10]. Se consideraron tiempos de inmersión en SBF de 1 hora, 1 día y 7 días, luego de los cuales las muestras se retiraron y analizaron en términos de formación de hidroxiapatita amorfa en la superficie. Para la caracterización óptica del proceso de biomineralización, se usó SEM y la composición química se confirmó mediante FTIR y DRX.

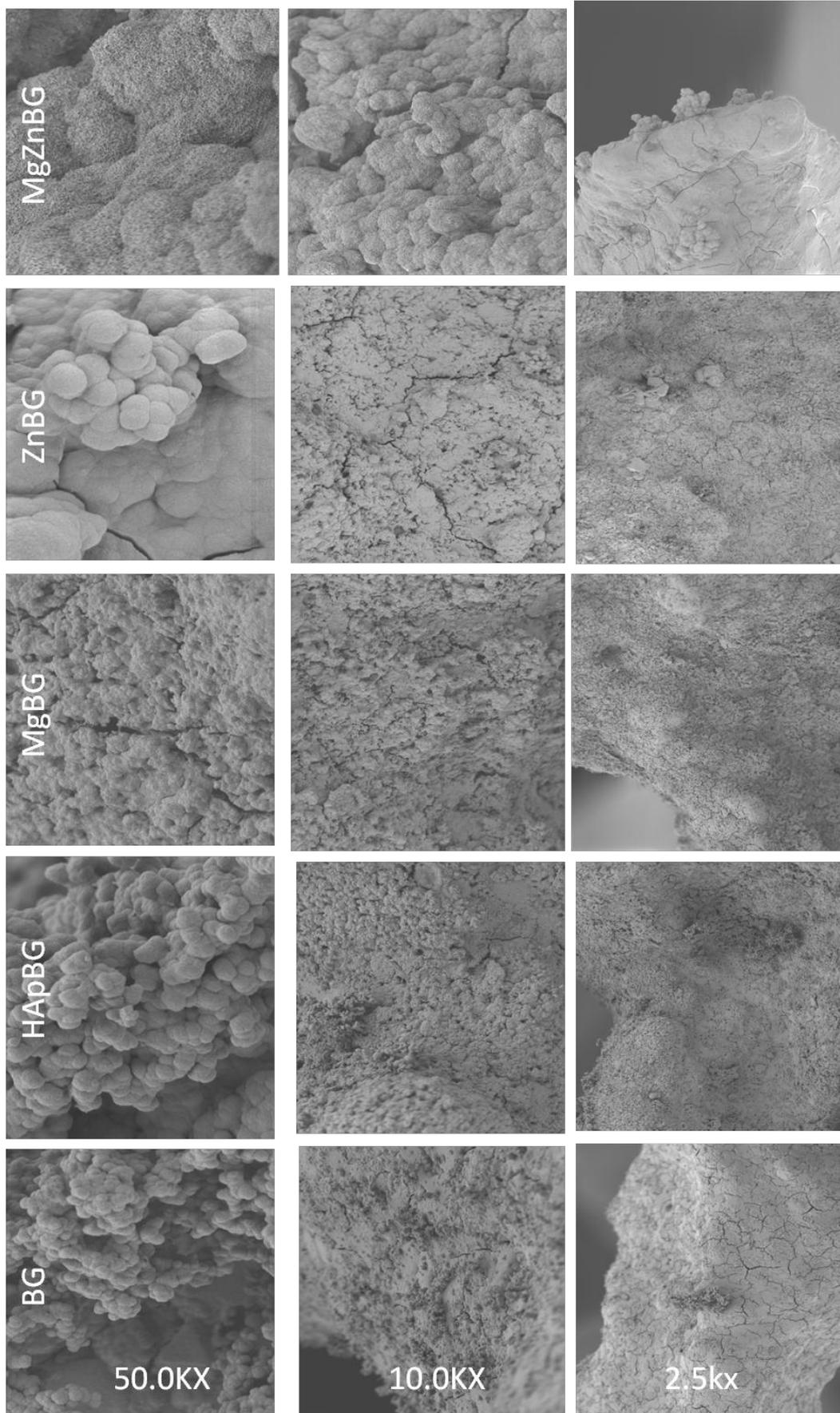
##### **6.4.1 Microscopía electrónica de barrido**

Como se discutió previamente, los precipitados de fosfato de calcio cubren la superficie de los andamios de BG de manera homogénea luego de 1 día en contacto con SBF.

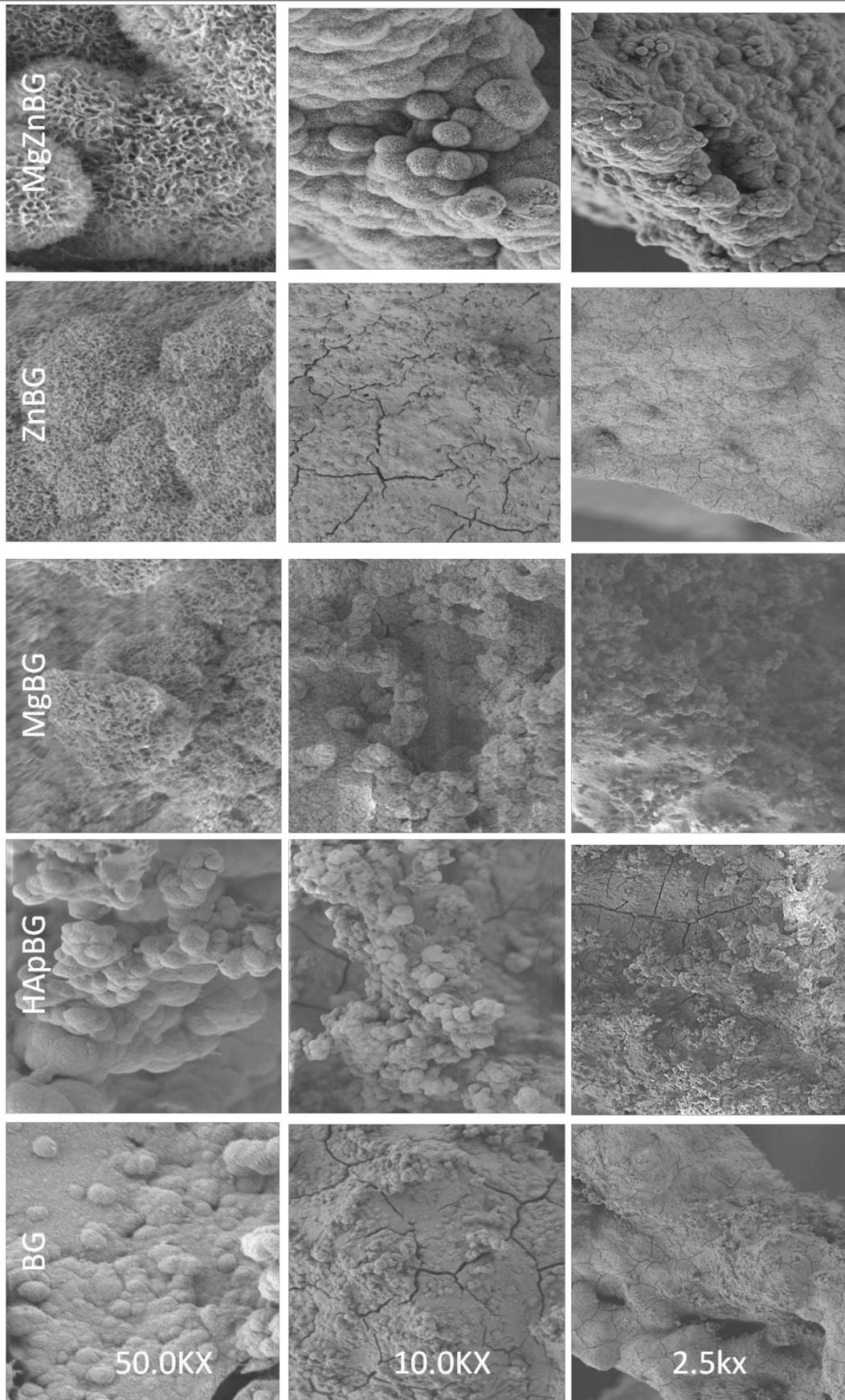
Dicha cobertura es evaluada cualitativamente por la morfología típica del tipo coliflor con un tamaño de partícula de aproximadamente 3,5  $\mu\text{m}$  [11][12]. Esta forma característica de HA se puede reconocer bien con mayor magnificación del microscopio, luego de 7 días en contacto con SBF para todos los andamios, exceptuando las muestras de MgZnBG (ver *Figura 6.3*). Al aumentar el tiempo de inmersión en SBF, toda la superficie se recubrió por una capa densa de apatita con estructuras del tipo coliflor.

En las imágenes SEM obtenidas luego de 1 día de inmersión en SBF se observa que los precipitados de fosfato de calcio con morfología típica cubren la superficie de los andamios MgZnBG de forma homogénea. En cambio, para BG se observaron estas estructuras recién después de 7 días de incubación, ver *Figura 6.4*. Esta observación puede sugerir que el proceso de mineralización es más rápido / más alto en BG después de haber sido recubierto con nanopartículas de MgZnHAp. Entre las posibles causas de este incremento podrían citarse la capacidad de las nanoestructuras de actuar como centro de nucleación y la disolución de Zn y Mg aportando iones para la precipitación de HA[13]. Los otros andamios mostraron resultados comparables con el control BG.

Para tiempos de inmersión en SBF mayores a 7 días, todos los andamios mostraron su superficie cubierta con una densa capa de apatita con estructura de coliflor. Todas estas muestras mostraron el mismo patrón de difracción, espectro FTIR y morfología de la superficie.



**Figura 6.3.** Micrografías SEM obtenidas de andamios recubiertos con los diferentes tipos de nanomateriales luego de 1 día de inmersión en SBF.

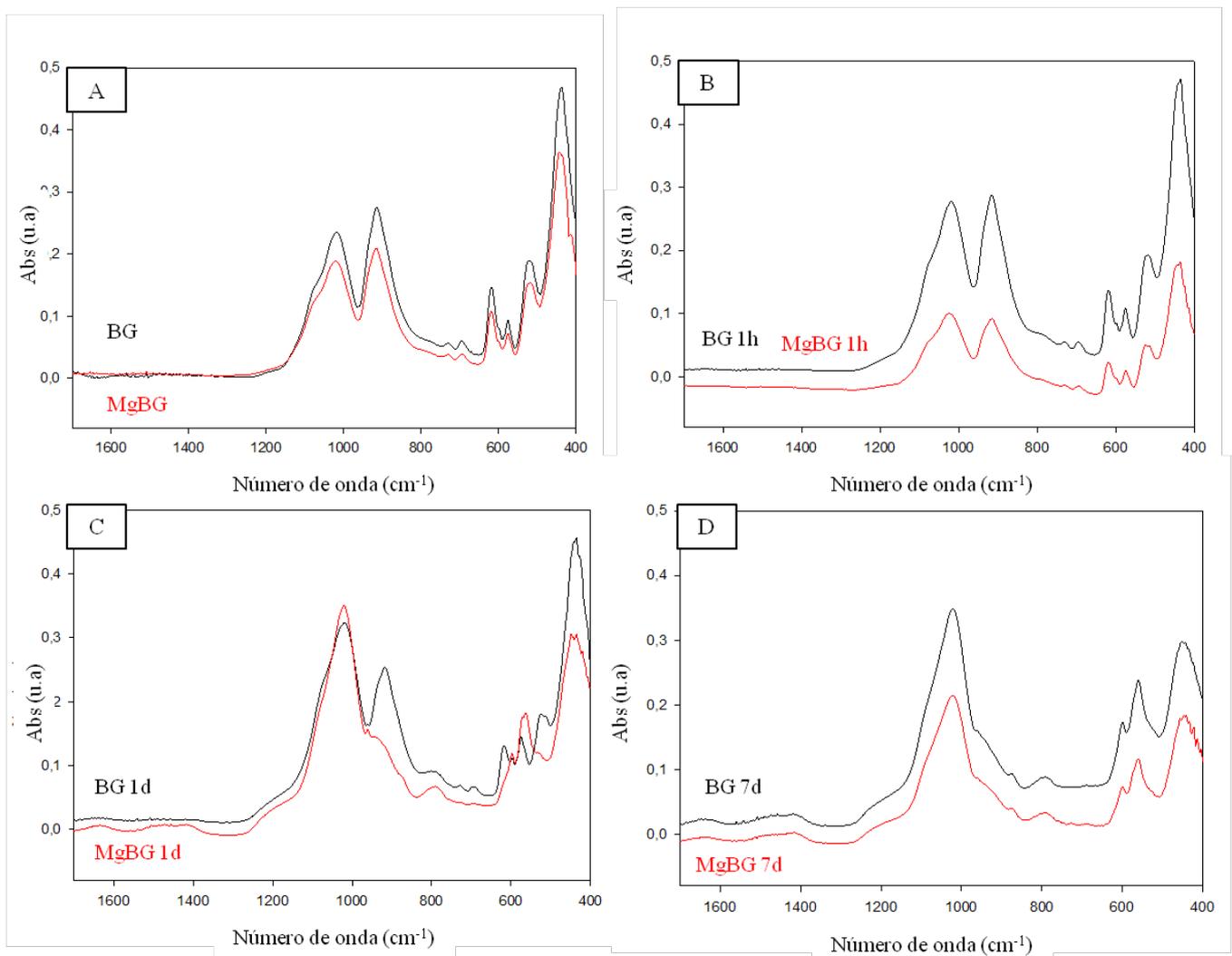


**Figura 6.4.** Micrografías SEM obtenidas de andamios recubiertos con los diferentes tipos de nanomateriales luego de 7 días de inmersión en SBF.

### 6.4.2 Espectroscopia FTIR

El vidrio bioactivo puro 45S5 muestra picos típicos a  $455\text{ cm}^{-1}$  y en la región entre  $1000\text{ cm}^{-1}$  y  $1100\text{ cm}^{-1}$  (ver Figura 6.5 (A)) asignados a la flexión y estiramiento de Si-O-Si en la red de vidrio [14], [15]. Sin embargo, el estiramiento P-O también contribuye a la absorción en la región entre  $1100\text{ cm}^{-1}$  y  $1000\text{ cm}^{-1}$  [16]. Según la literatura [17], la presencia de picos posicionados en  $455\text{ cm}^{-1}$ ,  $532\text{ cm}^{-1}$  y  $621\text{ cm}^{-1}$  atribuidos a los modos de vibración Si-O-Si de fases cristalinas son indicativos de una alta cristalinidad de los andamios bioactivos a base de vidrio 45S5.

El pico a  $926\text{ cm}^{-1}$  puede asignarse al modo vibracional del enlace Si-O- (oxígeno sin puente), generado por la presencia de los cationes modificadores de red  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Na}^+$ , tal como se discutió oportunamente [15], [16].



**Figura 6.5.** Espectros IR obtenidos para BG (curva negra) y MgZnBG (curva roja) a diferentes tiempos de inmersión en SBF: sin sumergir A), después de 1 hora B), 1 día C) y 7 días D).

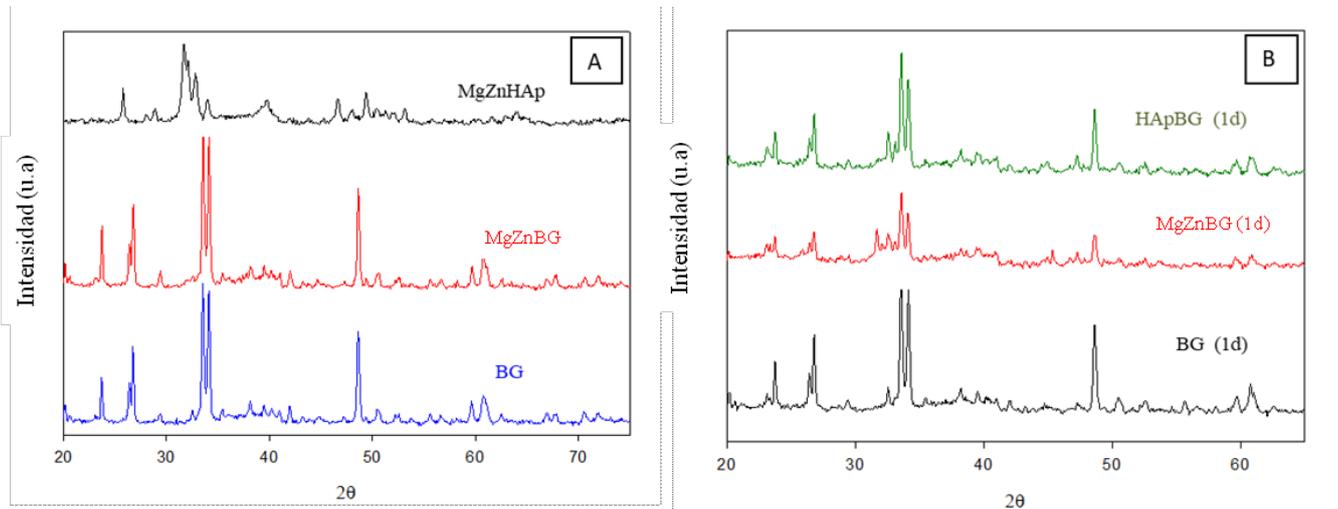
Con el aumento del tiempo de inmersión, en el caso de las muestras de BG y los andamios recubiertos con HAp, ZnHAp y MgHAp los picos conspicuos a  $532\text{ cm}^{-1}$ ,  $621\text{ cm}^{-1}$  y  $926\text{ cm}^{-1}$  se reducen en intensidad y desaparecen después de 7 días, lo que implica cambios en la composición. Dado que los espectros de FTIR obtenidos a distintos tiempos de inmersión en SBF de los andamios ZnBG y MgBG son muy similares al de BG, en la *Figura 6.5* solo se muestran los espectros de BG y de MgZnBG, el resto de las imágenes se encuentran en el **Anexo**. En las muestras de MgZnBG dicha modificación en los picos puede observarse luego de las 24 hs de estar sumergido en SBF. El pico a  $455\text{ cm}^{-1}$  está ligeramente desplazado debido a la presencia de cationes [18]. Además, aparecen nuevos picos significativos. Los nuevos picos a  $570\text{ cm}^{-1}$  y  $600\text{ cm}^{-1}$  que pueden atribuirse a las vibraciones de flexión de PO relacionadas con el grupo  $\text{PO}_4^{3-}$  en HA cristalina [19]–[21]; el pico ancho entre  $1100\text{ cm}^{-1}$  y  $1000\text{ cm}^{-1}$  y el hombro pequeño a  $960\text{ cm}^{-1}$  pueden relacionarse con el estiramiento P-O en el grupo de fosfato; el pico a  $800\text{ cm}^{-1}$  está relacionado con la formación de una capa rica en sílice [18]; los picos a  $875\text{ cm}^{-1}$  y en la región  $1500 - 1400\text{ cm}^{-1}$ , pueden atribuirse a las vibraciones de flexión y estiramiento de CO de los grupos  $\text{CO}_3^{2-}$  en la capa de HA carbonatada [19].

Los resultados concuerdan con lo observado cualitativamente mediante imágenes SEM donde la bioactividad parecería ser mayor o más rápida en el caso de las muestras recubiertas con MgZnHAp.

### 6.4.3 Difracción de rayos X

Tal como se discutió en el *Capítulo V*, BG presenta un difractograma que coincide con el del estándar # 22.1455 (ver *Figura 6.6*) lo que indica la formación de una fase cristalina de  $\text{Na}_2\text{Ca}_2\text{Si}_3\text{O}_9$  en el andamio de BG [22], [23]. Todas las muestras antes de estar inmersas en SBF solo mostraron picos característicos de esta fase [23] como consecuencia de la baja cobertura de los andamios con las nanopartículas en base a HAp. La ausencia inicial de fases de HA, nos permite observar su formación luego del ensayo de bioactividad. Efectivamente, después de 1 día de sumergir los andamios en SBF (ver *Figura 6.6 B*), las muestras MgZnBG muestran los picos característicos pertenecientes a la HA a  $2\Theta$  cercano a  $31,2$  junto con aquellos del biovidrio que se ven disminuidos. En el resto de las muestras, dicho comportamiento se observó recién luego

de los 7 días en SBF. Estas observaciones son concordantes con lo observado a partir de los espectros de FTIR [13].



**Figura 6.6.** Difractogramas obtenidos para los andamios (A) antes y luego de 1 día de estar sumergidos en SBF (B). Se agregó el difractograma de las nanopartículas MgZnHAp para facilitar la comparación de los espectros de los andamios con el de la fase de HA.

## 6.5 Evaluación de la biocompatibilidad y osteoconductividad de los andamios recubiertos

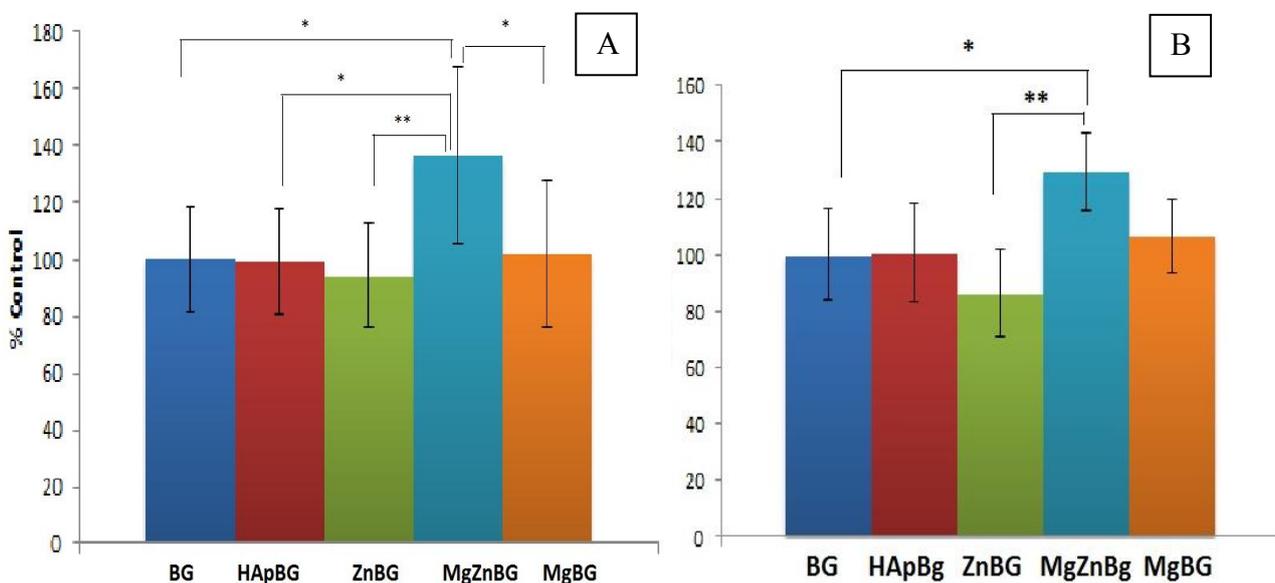
### 6.5.1 En células tipo osteoblasticas humanas MG-63

Para observar la interacción del material con las células se utilizaron 48 hs y 7 días de contacto.

La esterilización de los andamios se llevó a cabo mediante calentamiento a  $160^{\circ}\text{C}$  durante 2 hs. Posteriormente se realizó la pasivación del material, tal como se describió en el *Capítulo V*. Resumiendo, los andamios se pusieron en una placa de 24 pocillos con 2 ml de medio de cultivo DMEM con 10% de suero fetal bovino por andamio y luego se incubaron a  $37^{\circ}\text{C}$  con humedad del 95% en presencia de 10% de  $\text{CO}_2$ . El medio se cambió cada 24 hs y al finalizar el proceso las muestras se lavaron con 2 ml de PBS. El pH del medio se midió cada vez que se cambió el medio de cultivo y el proceso finalizó cuando el pH alcanzó un valor inferior a 8 en todas las muestras. Luego de la pasivación, los andamios se introdujeron en una placa de 24 pocillos y se sembraron 250.000 cels por andamio.

### 6.5.1.1 Reducción oxidativa del WST-8

Las muestras recubiertas con MgZnHAp fueron las únicas que mostraron un aumento significativo en la viabilidad de las células con un valor de  $p < 0,05$  después de 48 horas y de 7 días de incubación con respecto al control de BG, dicho incremento mostró una significancia mayor ( $p < 0,01$ ) con respecto a los andamios de ZnBG para los tiempos de cultivo evaluados. Para las muestras recubiertas con otras nanopartículas las diferencias en la viabilidad respecto del control fueron estadísticamente no significativas como se muestra en la *Figura 6.7*.

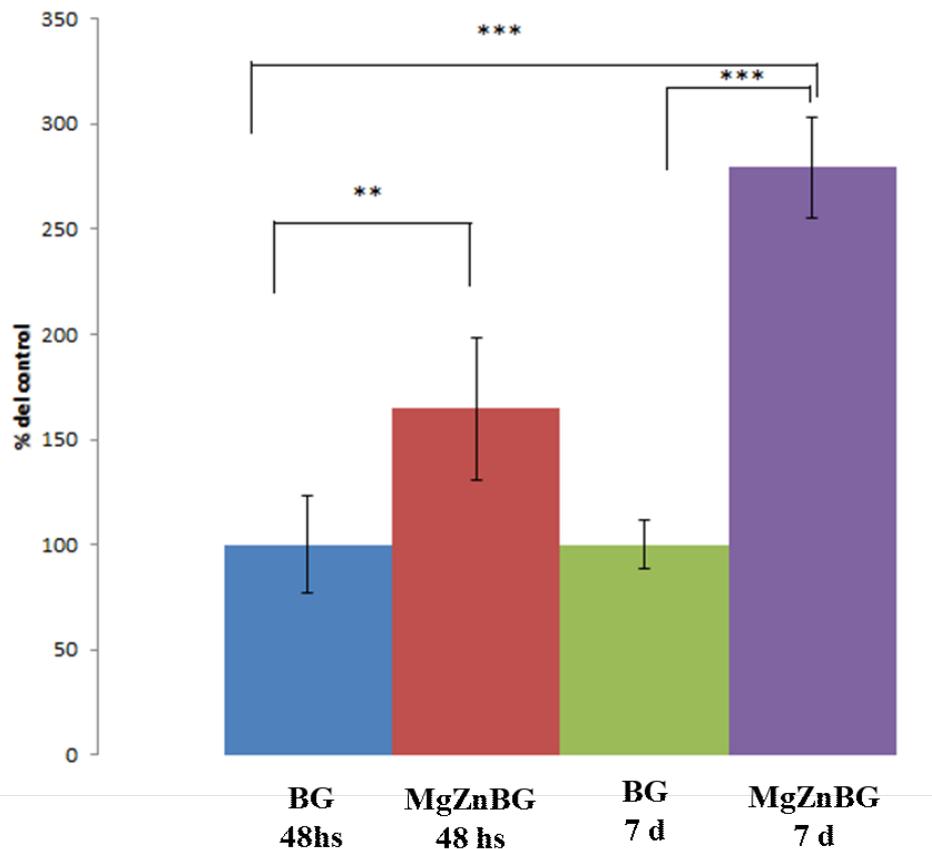


**Figura 6.7.** Resultados del ensayo WST-8 expresados como porcentaje de control luego de 48 horas (A) y 7 días (B) de incubación.

El incremento de la viabilidad celular en las muestras tratadas con MgZnBG podría estar relacionado con la mayor bioactividad observada en los ensayos de mineralización para estos andamios, lo que favorece la interacción de las células con el implante. Por estos motivos, si bien los ensayos se realizaron en todos los tipos de andamios recubiertos, a continuación solo se mostrarán los resultados de los ensayos obtenidos para las muestras de MgZnBG utilizando BG como control, el resto de los resultados obtenidos se encuentran como información complementaria en el **Anexo** del presente capítulo.

### 6.5.1.2 Incorporación de Bromodesoxiuridina

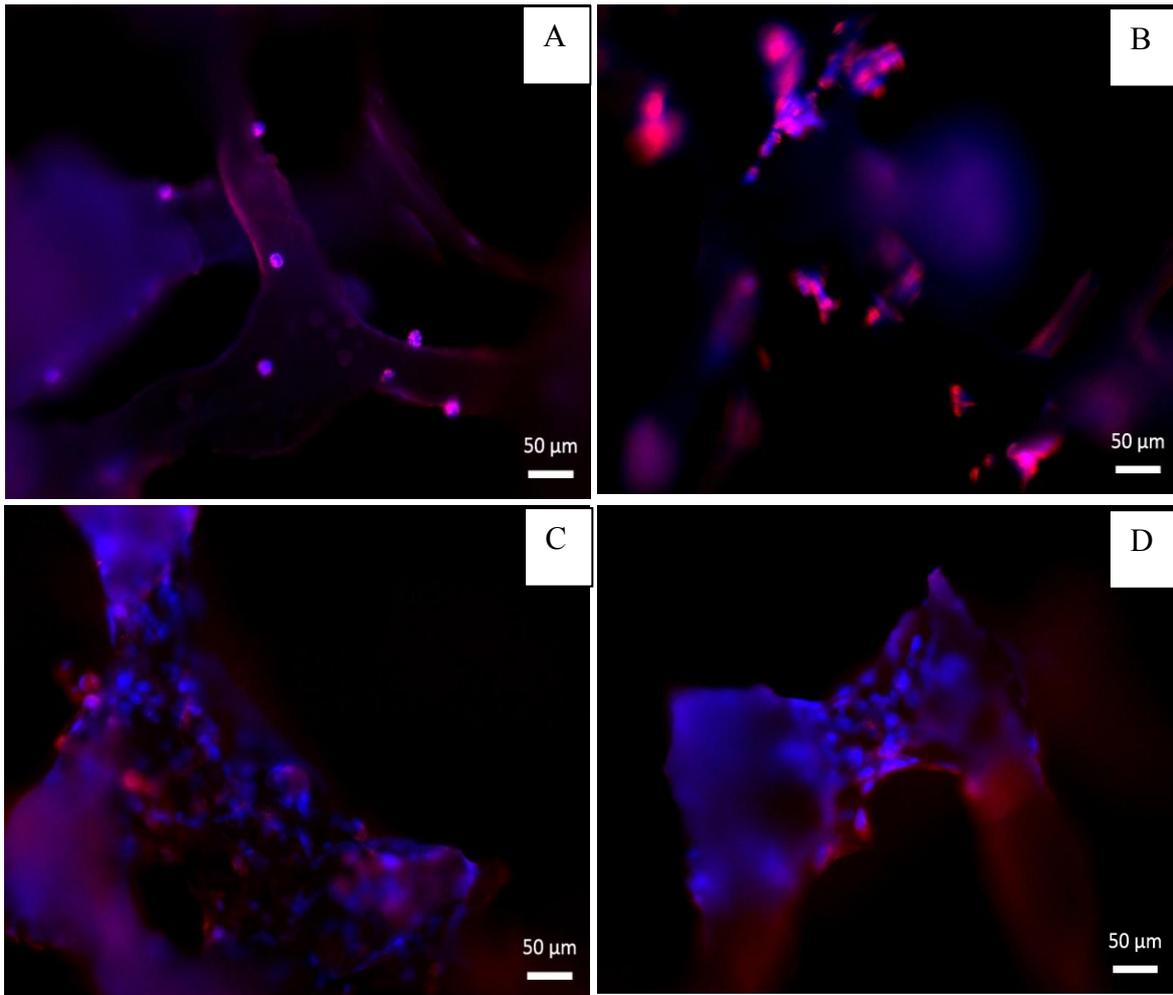
De acuerdo con los resultados de WTS-8, solo se observó un aumento significativo de la proliferación celular en las muestras recubiertas con MgZnHAp en ambos períodos de incubación. Esta observación sugiere que el recubrimiento de los biovidrios con MgZnHAp podría ser una estrategia para aumentar la viabilidad y la proliferación de células de tipo osteoblástico. En efecto, el incremento observado para MgZnBG luego de 7 días de cultivo fue significativo ( $p < 0,001$ ) con respecto al control de BG tanto a las 48 hs como a los 7 días.



**Figura 6.8.** Resultados de la incorporación de BrdU luego de 48 hs y 7 días de contacto.

### 6.5.1.3 Tinción con DAPI y Vibrant Blue

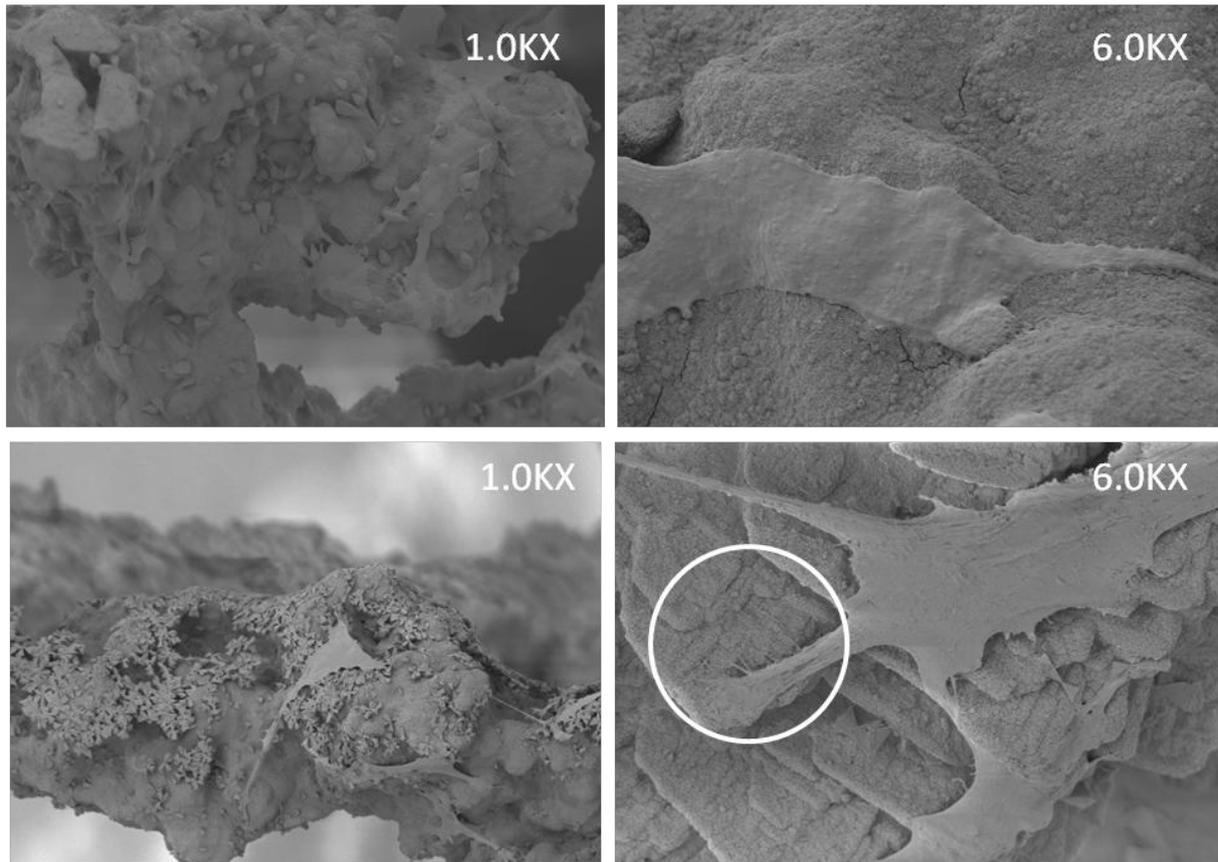
La tinción de las células adheridas a los andamios utilizando DAPI y Vibrant Blue luego de 48hs de contacto parecería mostrar un aumento en la cantidad de células adheridas a la superficie de los andamios MgZnBG con respecto a lo observado para BG sin recubrir (*Figura 6.19*).



**Figura 6.9.** Imágenes obtenidas mediante microscopía de fluorescencia A) y C) corresponde a células MG-63 cultivadas sobre BG durante 48hs y 7 días respectivamente. De forma equivalente las imágenes B) y C) se corresponden a células cultivadas sobre MgZnBG.

#### 6.5.1.4 Microscopía electrónica de barrido

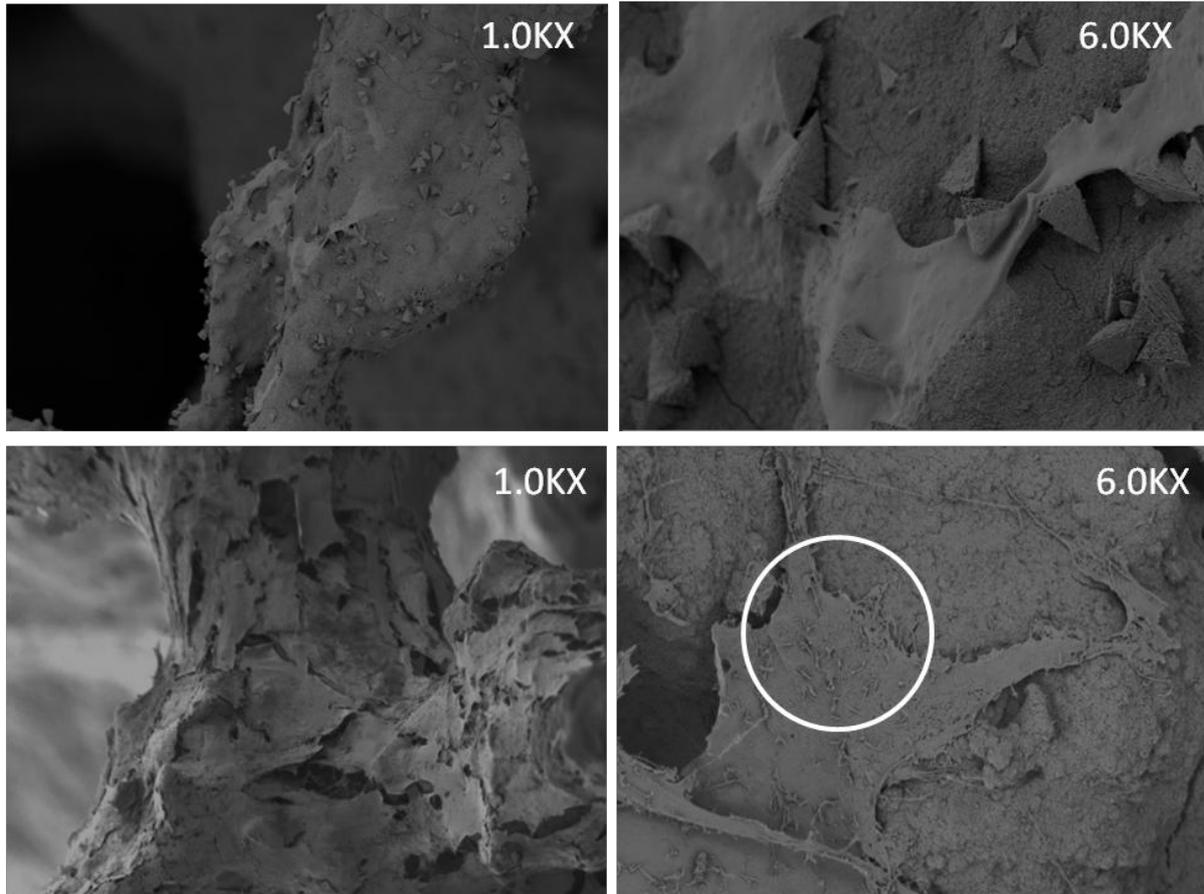
Las micrografías electrónicas de barrido de células MG-63 cultivadas en soportes de BG y MgZnBG se muestran a continuación (*Figura 6.10*). Dichas imágenes se tomaron después de 48 horas en contacto para estudiar la primera interacción de las células con el material.



**Figura 6.10.** Micrografías SEM obtenidas para células MG-63 cultivadas durante 48 hs sobre la superficie de andamios BG (imagen superior) y sobre andamios de MgZnBG (imagen inferior).

Se observó una morfología adecuada para el tipo celular utilizado en las dos condiciones evaluadas, tal como se espera para superficies biocompatibles. Sin embargo, en las muestras de MgZnBG se observan prolongaciones citoplasmáticas mostrando una gran adhesión de la célula al material.

Las imágenes SEM de muestras de MgZnBG luego de 7 días de cultivo, ver Figura 6.11, permiten observar con mayor nitidez las prolongaciones antes mencionadas y una buena interconexión entre las células (zona marcada en la microfotografía), las que cubren la superficie del andamio de forma homogénea. En cambio, las imágenes SEM de muestras de BG luego de 7 días de cultivo muestran que las células solo se encontraban dispersas en algunas zonas.



**Figura 6.11.** Micrografías SEM obtenidas para células MG-63 cultivadas durante 7 días sobre la superficie de andamios BG (imagen superior) y sobre andamios de MgZnBG (imagen inferior).

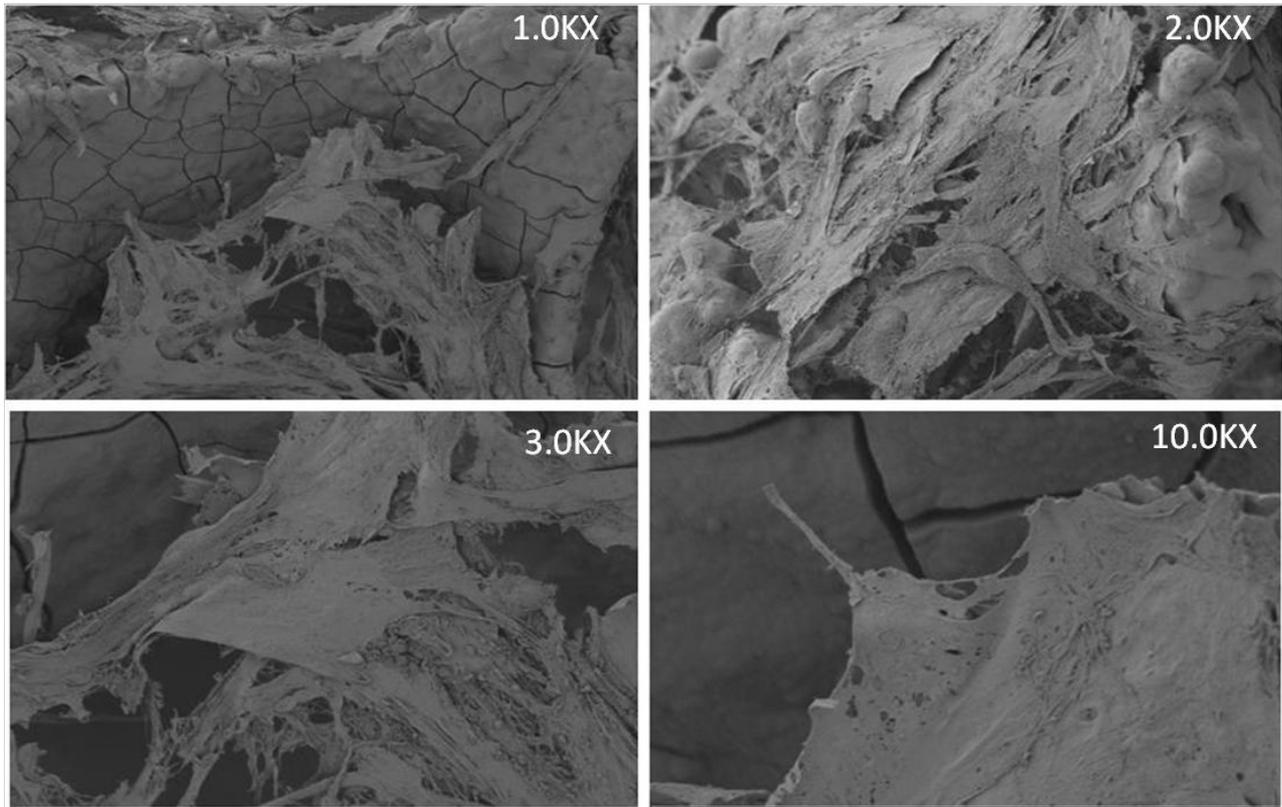
### ***6.5.2 En células de médula ósea de ratón ST-2***

Dado que resulta necesario evaluar la interacción del biomaterial con las células a tiempos largos de forma de prever la reacción en el organismo, se estudió la interacción con células de ratón ST-2 luego de 14 días de contacto.

La esterilización de los andamios se llevó a cabo mediante calentamiento a 160°C durante 2 hs. Posteriormente, se pasivó el material siguiendo el procedimiento descrito con anterioridad (sección 6.5.1). Finalmente, los andamios pasivados se introdujeron en una placa de 24 pocillos y se sembraron 250.000 células por andamio.

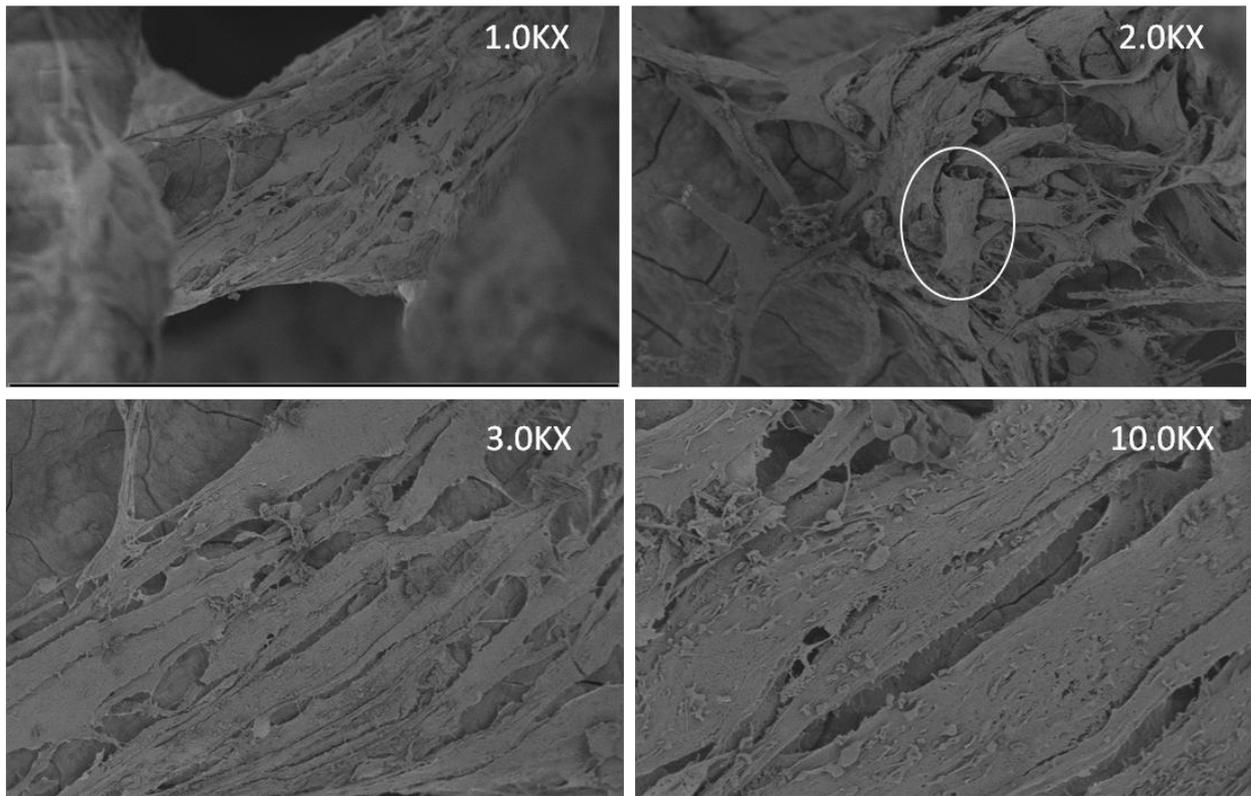
#### ***6.5.2.1 Microscopía electrónica de barrido***

Las micrografías SEM mostraron la morfología característica a esta línea celular tanto en los andamios BG como MgZnHAp (ver Figuras 6.12 y 6.13).



**Figura 6.12.** Micrografías obtenidas para células ST-2 cultivadas sobre BG luego de 14 días de contacto a diferentes magnificaciones.

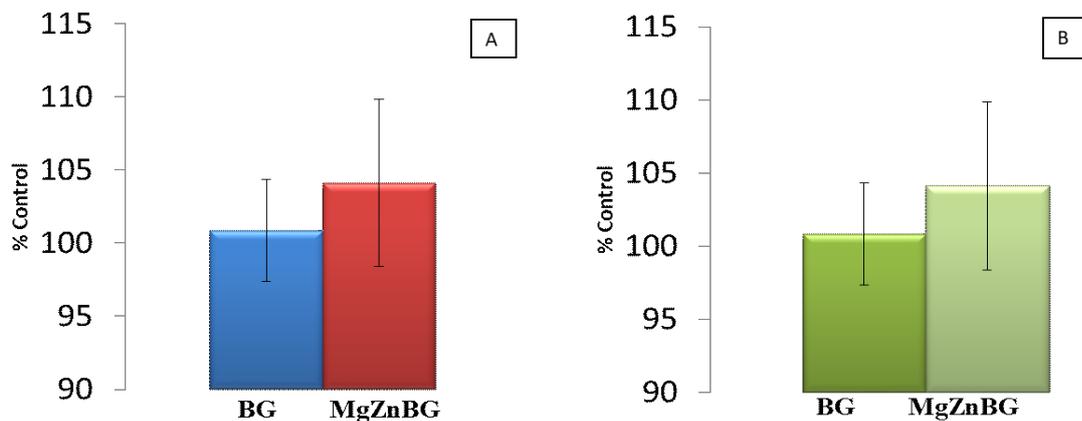
Sin embargo, las imágenes muestran una mayor interconexión entre las células cultivadas sobre MgZnBG, así como una mejor interacción entre la superficie del material y las células. A mayores magnificaciones es posible notar que sobre la superficie del vidrio sin recubrir con nanopartículas, las células parecerían estar apoyadas y no muestran prolongaciones citoplasmáticas que favorezcan la adhesión. Por otro lado, se observa un leve cambio en la morfología celular, las células cultivadas sobre los andamios recubiertos poseen una forma poliédrica (zona marcada en la *Figura 6.13*), la cual según datos de la literatura, corresponde a la morfología que adquiere este tipo de célula al diferenciarse a osteoblasto. Este indicio podría sugerir que el recubrimiento del andamio con las partículas de MgZnHAp podría estimular la diferenciación osteoblástica de células mesenquimáticas.



**Figura 6.13.** Micrografías obtenidas para células ST-2 cultivadas sobre MgZnBG luego de 14 días de contacto a diferentes magnificaciones.

### 6.5.2.2 Reducción oxidativa del WST-8 y medidas de la actividad Lactato Deshidrogenas

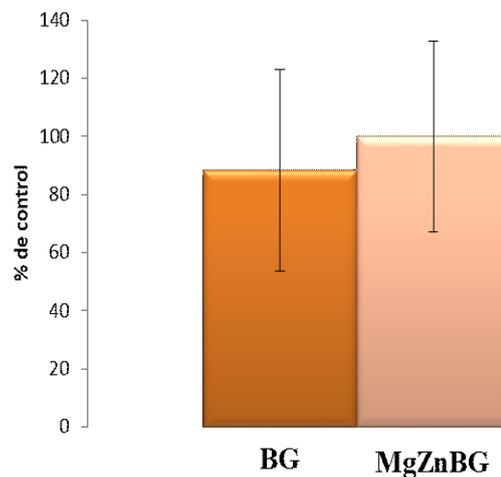
Los resultados obtenidos de los estudios luego de 14 días de incubación parecerían mostrar un aumento en la actividad mitocondrial y en la proliferación celular de las células cultivadas sobre MgZnBG con respecto al control de BG. Sin embargo, debido al error estadístico, las diferencias no resultaron ser significativas (*Figura 6.14*).



**Figura 6.14.** Resultados de la medida de reducción oxidativa de WST-8 ( A) y resultados de las medidas de LDH (B) de células ST-2 luego de 14 días de contacto.

### ***6.5.2.3 Diferenciación osteoblastica, medida de la actividad de la Fosfatasa Alcalina***

Para confirmar las observaciones obtenidas a partir de las imágenes de SEM donde la morfología celular demostraba un posible proceso de diferenciación celular, se determinó la actividad de la fosfatasa alcalina (ALP) (*Figura 6.15*). Dicha actividad es considerada como uno de los marcadores de diferenciación celular [24],[25].



**Figura 6.15.** Resultados de la medida de ALP .

Dada la gran variabilidad propia del ensayo, no fue posible sacar una conclusión fehaciente sobre la capacidad de MgZnBG de inducir la diferenciación celular de las células de médula ósea de ratón ST-2.

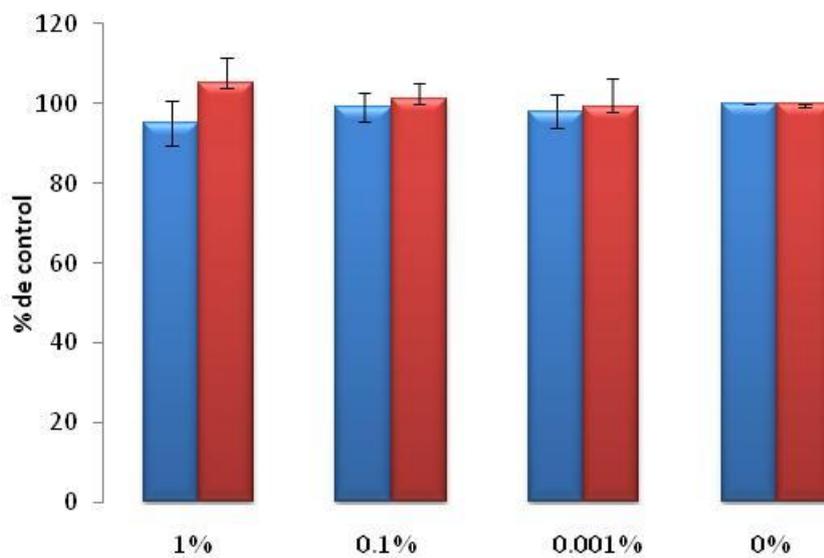
### ***6.5.3 Ensayos de biocompatibilidad indirecto evaluando extractos obtenidos de andamios recubiertos en células de médula ósea de ratón ST-2***

El protocolo experimental utilizado para los ensayos indirectos fue equivalente al utilizado y descrito en la sección 5.6.3 del *Capítulo V*, con la diferencia de que en lugar de sembrar 1.000.000 células ST-2 se sembraron 250.000 en 1 mL de medio de cultivo

completo en placas de 24 pocillos incubándose a 37 °C en un ambiente humidificado de 95% de aire y 5% de CO<sub>2</sub> durante 24 hs.

### 6.5.3.1 Reducción oxidativa del WST-8

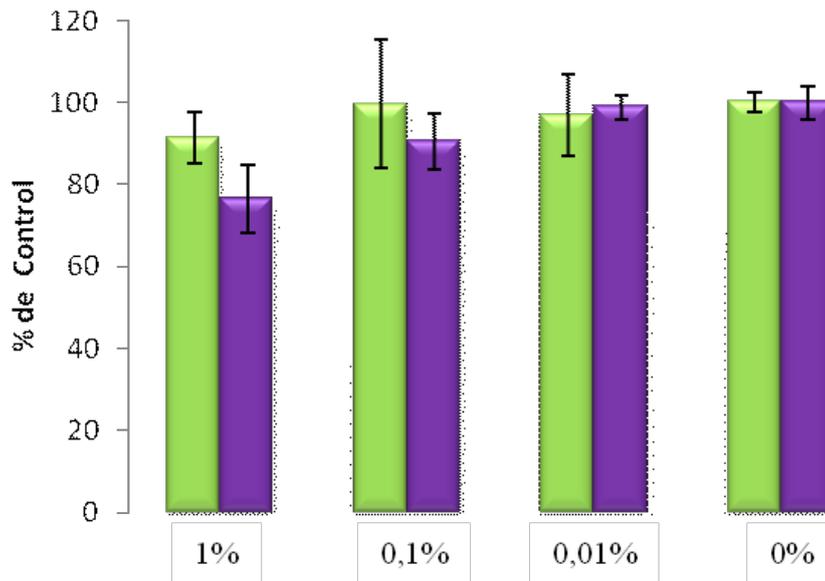
La respuesta celular mitocondrial medida para las células tratadas con los extractos de BG y MgZnBG luego de 48 hs de contacto no mostró diferencias significativas. luego de 48 hs de contacto no mostró diferencias significativas, en todos los casos comparando entre concentraciones iguales de extracto (*Figura 6.16*).



**Figura 6.16.** Resultados de la medida de reducción oxidativa de WST-8 en células ST-2, tratadas con extractos de BG (serie azul) y extractos de MgZnBG (serie roja).

### 6.5.3.2 Detección del factor de crecimiento endotelial vascular

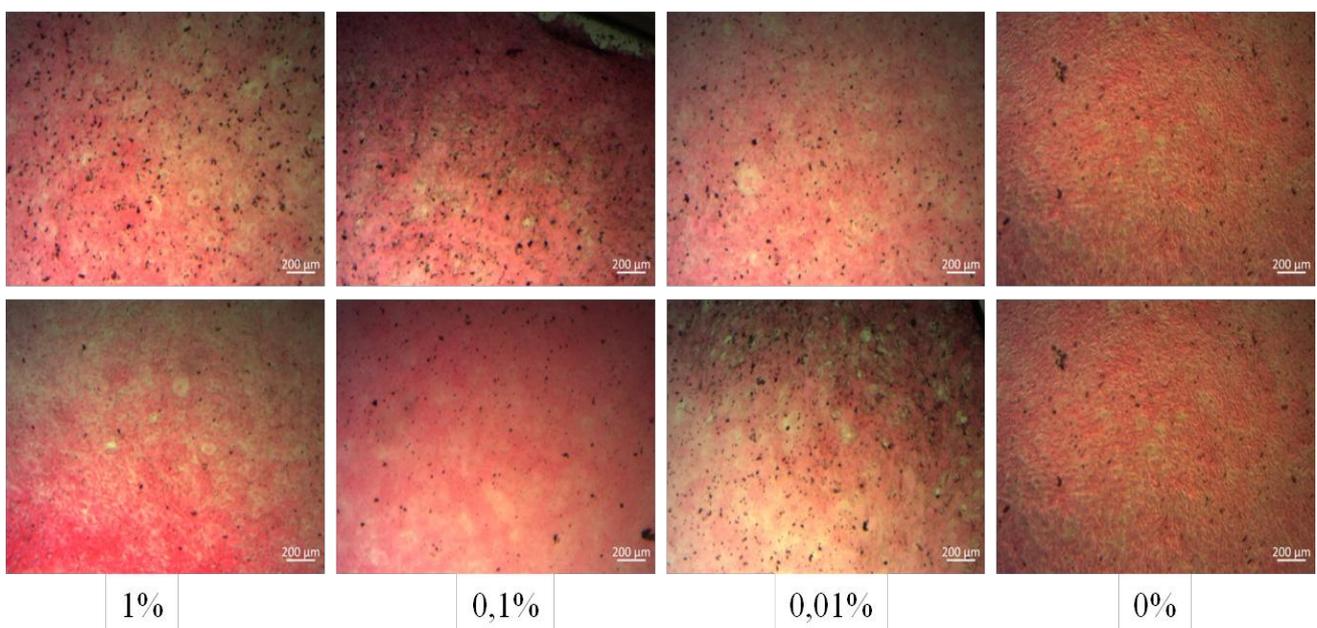
En la *Figura 6.17*, se muestra la liberación de VEGF a partir de células ST-2 cultivadas con diferentes concentraciones de extractos. Si bien, en todos los casos parece haber una disminución en la expresión de factor de crecimiento endotelial para las células tratadas con extractos de MgZnBG con respecto a las tratadas con BG, dicha diferencia no resultó ser significativa.



**Figura 6.17.** Resultados de la detección de VEGF en células ST-2, tratadas con diferentes cantidades de extractos de BG (serie verde) y extractos de MgZnBG (serie violeta).

### 6.5.3.3 Tinción con Hematoxilina y Eosina

Las imágenes de microscopía óptica de células ST-2 cultivadas en presencia de las concentraciones de extractos utilizadas y luego teñidas con H & E se muestran en la *Figura 6.18*.



**Figura 6.18.** Imágenes de microscopía óptica obtenidas para células ST-2, tratadas con distintas concentraciones de extractos de BG (imágenes superiores) y extractos de MgZnBG (imágenes inferiores)

En las imágenes se puede observar que las células mostrando una gran adherencia a la placa de cultivo en todos los casos. Como puede observarse, los extractos de BG y MgZnBG no mostraron efectos citotóxicos que afecten la adhesión de las células ST-2 tratadas con los distintas concentraciones de extractos.

## ***6.6 Conclusiones parciales***

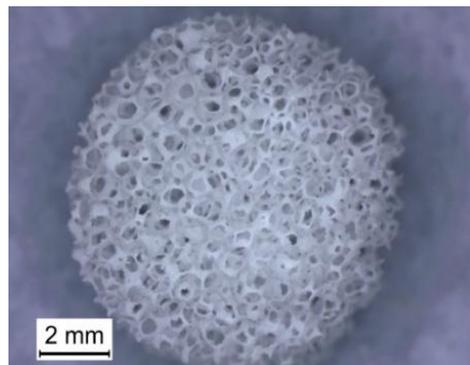
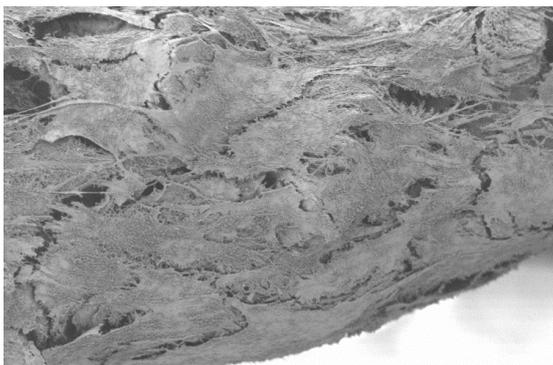
- Se optimizó la síntesis y recubrimiento de implantes de biovidrio 45S5<sup>®</sup> con nanopartículas de HAp, MgHAp, ZnHAp y MgZnHAp.
- Los ensayos de bioactividad demostraron que para las partículas de MgZnHAp parece haber un incremento de la misma en períodos cortos de exposición (1d).
- Los ensayos realizados en células MG-63 mostraron un incremento significativo tanto en la viabilidad como en la proliferación celular para las aquellas células incubadas con los andamios MgZnBG.
- Además, las medidas de secreción del VEGF no mostraron diferencias estadísticamente significativas entre los andamios BG y MgZnBG. En este aspecto, tampoco pudo observarse una diferencia significativa en la capacidad osteogénica de ambos andamios. Para determinar si efectivamente sobre la superficie de los mismos, se induce la diferenciación celular en futuros ensayos podrían evaluarse otros marcadores más precisos de la diferenciación como los son la osteocalcina, o el colágeno tipo I.
- Los resultados obtenidos sugieren que los andamios recubiertos con MgZnHAp son un potencial biomaterial para su utilización en la reparación del tejido óseo. Cabría analizar las respuestas biológicas para distintos grados de cobertura de los biovidrios con estas nanopartículas.

## Referencias

- [1] M. E. Zilm *et al.*, “Hydroxyapatite substituted by transition metals: Experiment and theory,” *Phys. Chem. Chem. Phys.*, vol. 18, no. 24, pp. 16457–16465, 2016.
- [2] S. Hayakawa *et al.*, “Structural characterization and protein adsorption property of hydroxyapatite particles modified with zinc ions,” *J. Am. Ceram. Soc.*, vol. 90, no. 2, pp. 565–569, 2007.
- [3] N. J. Lakhkar, I. H. Lee, H. W. Kim, V. Salih, I. B. Wall, and J. C. Knowles, “Bone formation controlled by biologically relevant inorganic ions: Role and controlled delivery from phosphate-based glasses,” *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 65, no. 4, pp. 405–420, 2013.
- [4] H. Storrie and S. I. Stupp, “Cellular response to zinc-containing organoapatite: An in vitro study of proliferation, alkaline phosphatase activity and biomineralization,” *Biomaterials*, vol. 26, no. 27, pp. 5492–5499, 2005.
- [5] H. Zreiqat *et al.*, “Mechanisms of magnesium-stimulated adhesion of osteoblastic cells to commonly used orthopaedic implants,” *J. Biomed. Mater. Res.*, vol. 62, no. 2, pp. 175–184, 2002.
- [6] C. M. Serre, M. Papillard, P. Chavassieux, J. C. Voegel, and G. Boivin, “Influence of magnesium substitution on a collagen-apatite biomaterial on the production of a calcifying matrix by human osteoblasts,” *J. Biomed. Mater. Res.*, vol. 42, no. 4, pp. 626–633, 1998.
- [7] Y. Yu, G. Jin, Y. Xue, D. Wang, X. Liu, and J. Sun, “Multifunctions of dual Zn/Mg ion co-implanted titanium on osteogenesis, angiogenesis and bacteria inhibition for dental implants,” *Acta Biomater.*, vol. 49, pp. 590–603, 2017.
- [8] S. Yoshizawa, A. Brown, A. Barchowsky, and C. Sfeir, “Magnesium ion stimulation of bone marrow stromal cells enhances osteogenic activity, simulating the effect of magnesium alloy degradation,” *Acta Biomater.*, vol. 10, no. 6, pp. 2834–2842, 2014.
- [9] M. Šupová, “Substituted hydroxyapatites for biomedical applications: A review,” *Ceram. Int.*, vol. 41, no. 8, pp. 9203–9231, 2015.
- [10] T. K. Å and H. Takadama, “How useful is SBF in predicting in vivo bone bioactivity? \$,” vol. 27, pp. 2907–2915, 2006.
- [11] J. M. Oliveira *et al.*, “Macroporous hydroxyapatite scaffolds for bone tissue engineering applications: Physicochemical characterization and assessment of rat bone marrow stromal cell viability,” *J. Biomed. Mater. Res. - Part A*, vol. 91, no. 1, pp. 175–186, 2009.
- [12] Y. Yusufoglu and M. Akinc, “Deposition of carbonated hydroxyapatite (CO<sub>3</sub>HAp) on poly(methylmethacrylate) surfaces by decomposition of calcium-EDTA chelate,” *J. Am. Ceram. Soc.*, vol. 91, no. 10, pp. 3147–3153, Oct. 2008.
- [13] T. A. Fuierer, M. LoRe, S. A. Puckett, and G. H. Nancollas, “A Mineralization Adsorption and Mobility Study of Hydroxyapatite Surfaces in the Presence of Zinc and Magnesium Ions,” *Langmuir*, vol. 10, no. 12, pp. 4721–4725, Dec.

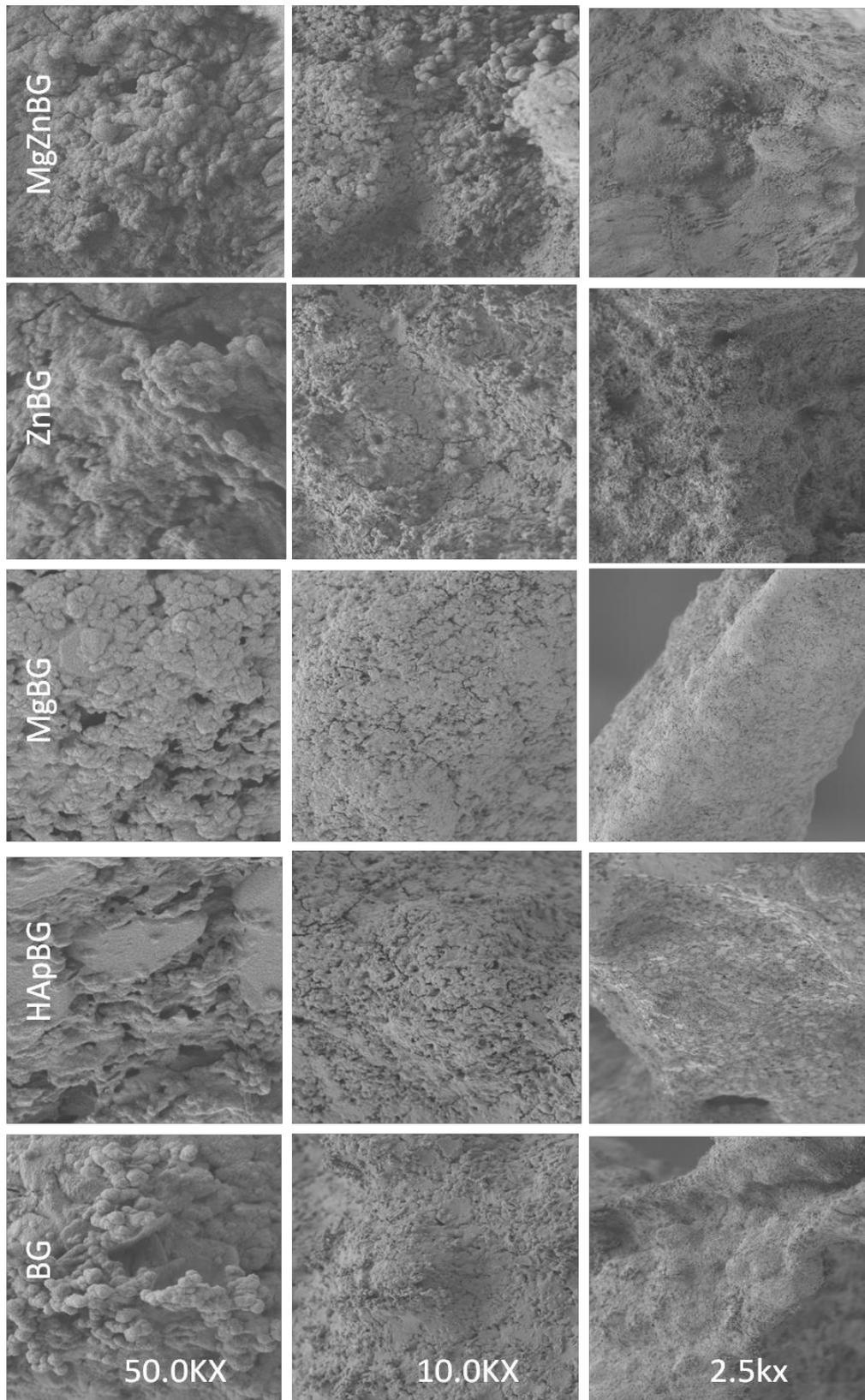
- 1994.
- [14] O. P. Filho, G. P. La Torre, and L. L. Hench, "Effect of crystallization on apatite-layer formation of bioactive glass 45S5," *J. Biomed. Mater. Res.*, vol. 30, no. 4, pp. 509–514, Apr. 1996.
- [15] M. R. Filgueiras, G. La Torre, and L. L. Hench, "Solution effects on the surface reactions of a bioactive glass," vol. 27, pp. 445–453, 1993.
- [16] B. Marelli, C. E. Ghezzi, J. E. Barralet, A. R. Boccaccini, and S. N. Nazhat, "Three-Dimensional Mineralization of Dense Nanofibrillar Collagen–Bioglass Hybrid Scaffolds," *Biomacromolecules*, vol. 11, no. 6, pp. 1470–1479, Jun. 2010.
- [17] L. M. Mukundan, R. Nirmal, D. Vaikkath, and P. D. Nair, "A new synthesis route to high surface area sol gel bioactive glass through alcohol washing: a preliminary study," *Biomatter*, vol. 3, no. 2, Apr. 2013.
- [18] M. Cerruti, D. Greenspan, and K. Powers, "Effect of pH and ionic strength on the reactivity of Bioglass® 45S5," *Biomaterials*, vol. 26, no. 14, pp. 1665–1674, 2005.
- [19] S. Koutsopoulos, "Synthesis and characterization of hydroxyapatite crystals: A review study on the analytical methods," *Journal of Biomedical Materials Research*, vol. 62, no. 4, pp. 600–612, 2002.
- [20] K. Lin *et al.*, "Biomimetic hydroxyapatite porous microspheres with co-substituted essential trace elements: Surfactant-free hydrothermal synthesis, enhanced degradation and drug release," *J. Mater. Chem.*, vol. 21, no. 41, pp. 16558–16565, 2011.
- [21] E. Szarawara, B. Trybalska, M. Cichocin, A. Stoch, W. Jastrze, and A. Broz, "FTIR monitoring of the growth of the carbonate containing apatite layers from simulated and natural body fluids," vol. 512, pp. 287–294, 1999.
- [22] D. C. Clupper, J. E. Gough, M. M. Hall, A. G. Clare, W. C. LaCourse, and L. L. Hench, "In vitro bioactivity of S520 glass fibers and initial assessment of osteoblast attachment," *J. Biomed. Mater. Res.*, vol. 67A, no. 1, pp. 285–294, Oct. 2003.
- [23] D. C. Clupper and L. L. Hench, "Crystallization kinetics of tape cast bioactive glass 45S5," *J. Non. Cryst. Solids*, vol. 318, no. 1–2, pp. 43–48, 2003.
- [24] N. Jaiswal, S. E. Haynesworth, A. I. Caplan, and S. P. Bruder, "Osteogenic differentiation of purified, culture-expanded human mesenchymal stem cells in vitro," *J. Cell. Biochem.*, vol. 64, no. 2, pp. 295–312, Feb. 1997.
- [25] M. V. Hillsley and J. A. Frangos, "Alkaline phosphatase in osteoblasts is down-regulated by pulsatile fluid flow," *Calcif. Tissue Int.*, vol. 60, no. 1, pp. 48–53, Jan. 1997.

# Anexo



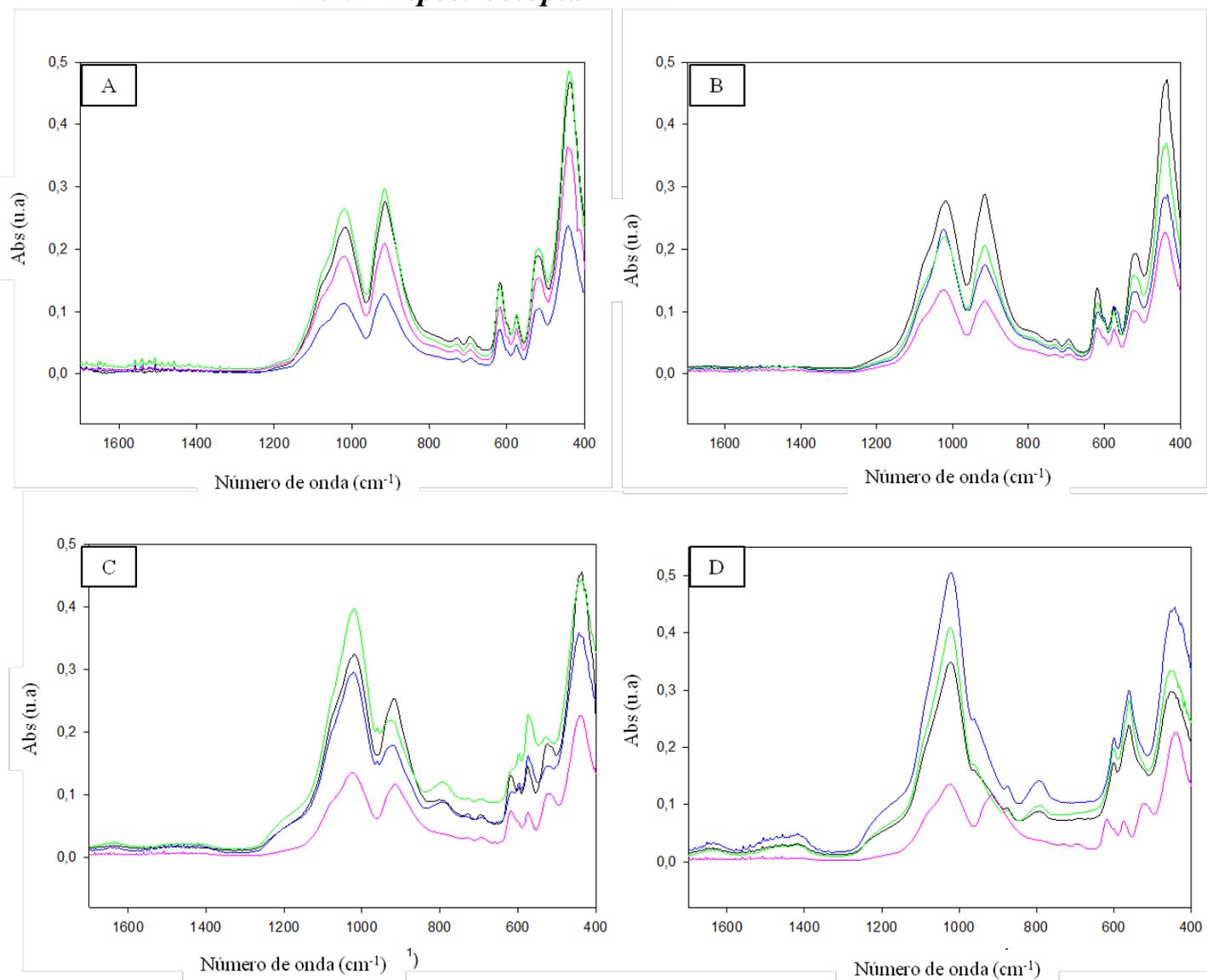
## A. 1. Ensayo de mineralización.

### A.1.1 Microscopía electrónica de barrido.



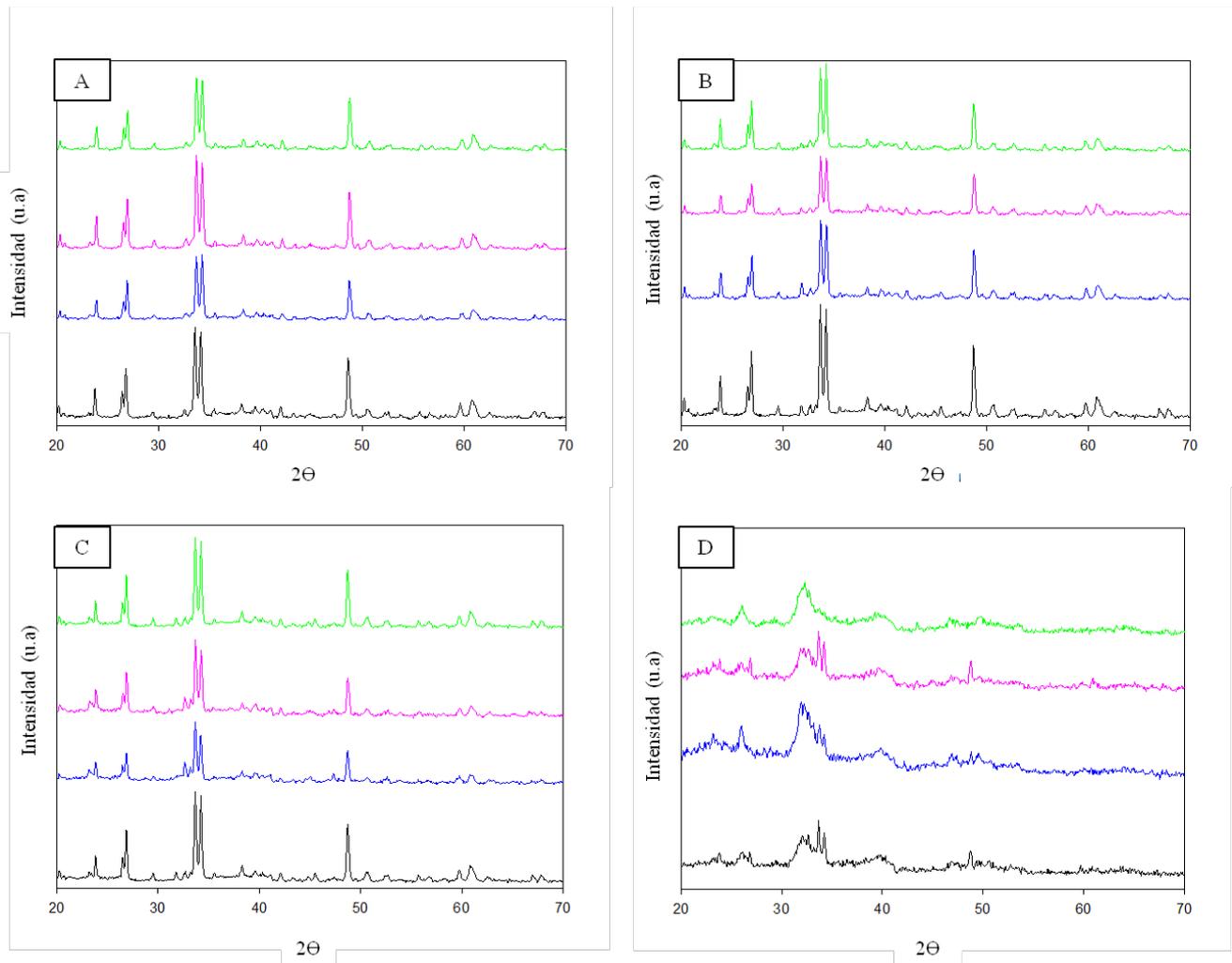
**Figura A.1.** Micrografías SEM obtenidas de andamios recubiertos con los diferentes tipos de nanomateriales luego de 1 hora de inmersión en SBF

### A.1.2 Espectroscopia FTIR



**Figura A.2.** Espectros IR obtenidos para BG (curva negra), HApBG (curva azul), MgBG (curva rosa) y ZnBG (curva verde) a diferentes tiempos de inmersión en SBF: sin sumergir (A), después de 1 hora (B), 1 día (C) y 7 días (D).

### A.2.3 Difracción de rayos X

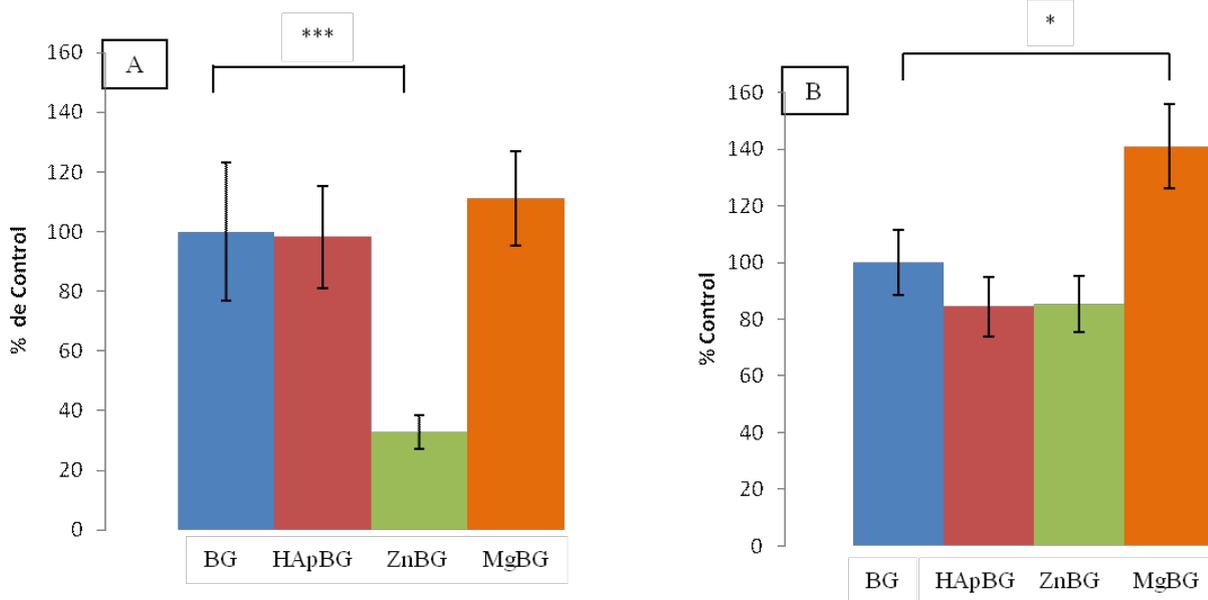


**Figura A3** Difractogramas obtenidos para para BG (curva negra), HApBG (curva azul), MgBG (curva rosa) y ZnBG (curva verde) a diferentes tiempos de inmersión en SBF: sin sumergir (A), después de 1 hora (B), 1 días (C) y 7 días (D).

## A.2 Evaluación de la biocompatibilidad y osteoconductividad de los andamios recubiertos

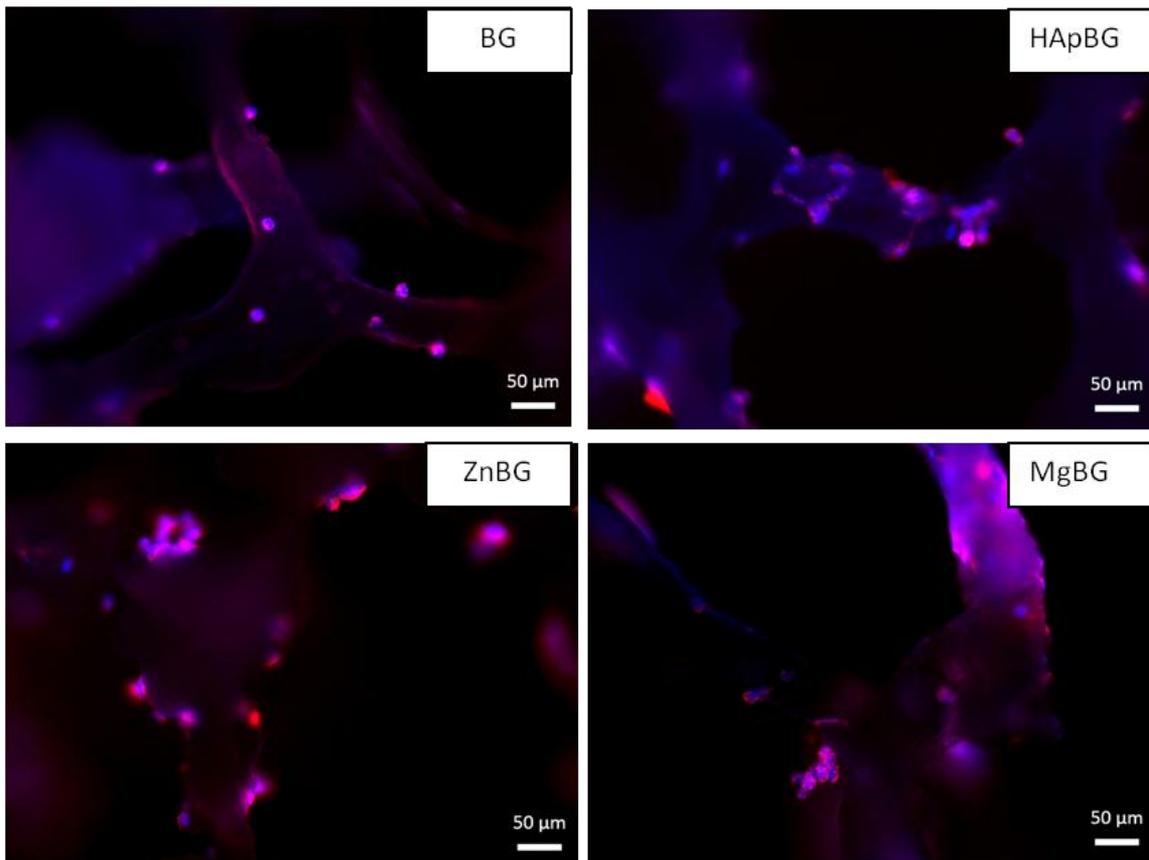
### A.2.1 En células tipo osteoblasticas humanas MG-63

#### A.2.1.1 Incorporación de Bromodesoxiuridina

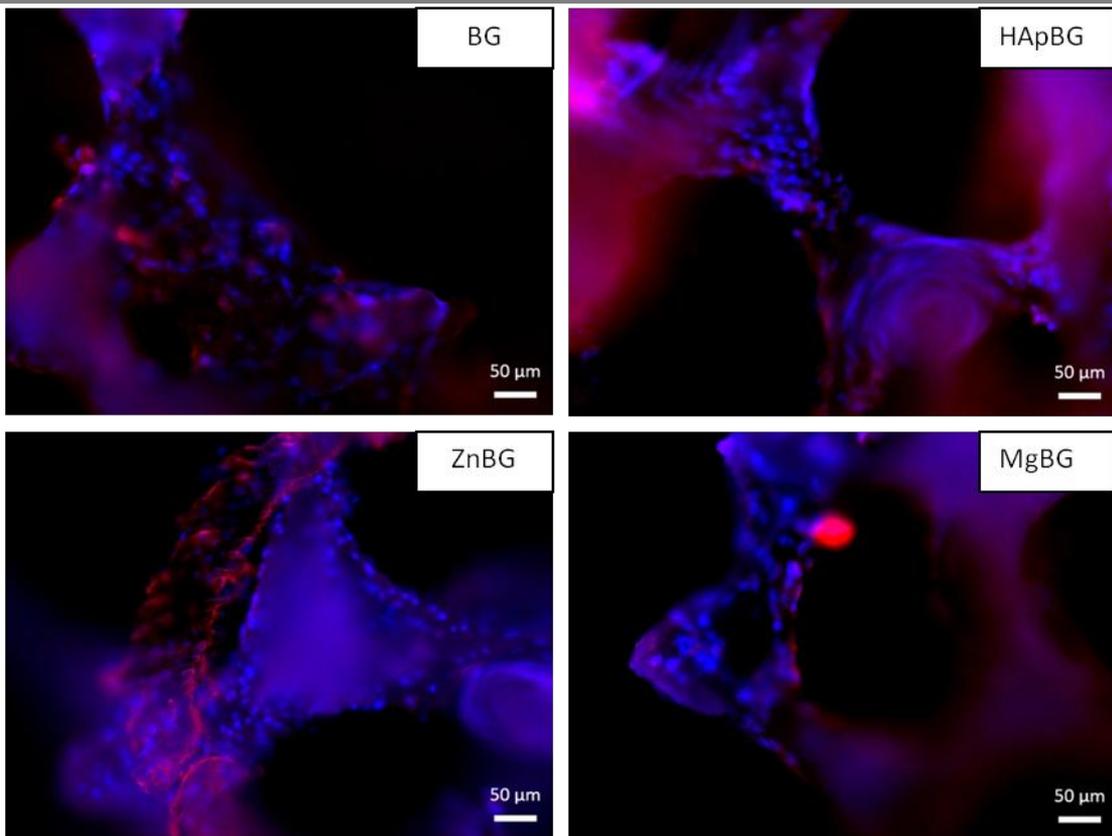


**Figura A.4.** Resultados de la incorporación de BrdU luego de 48 hs (A) y 7 días de contacto (B).

### A.2.1.2 Tinción con DAPI y Vibrant Blue

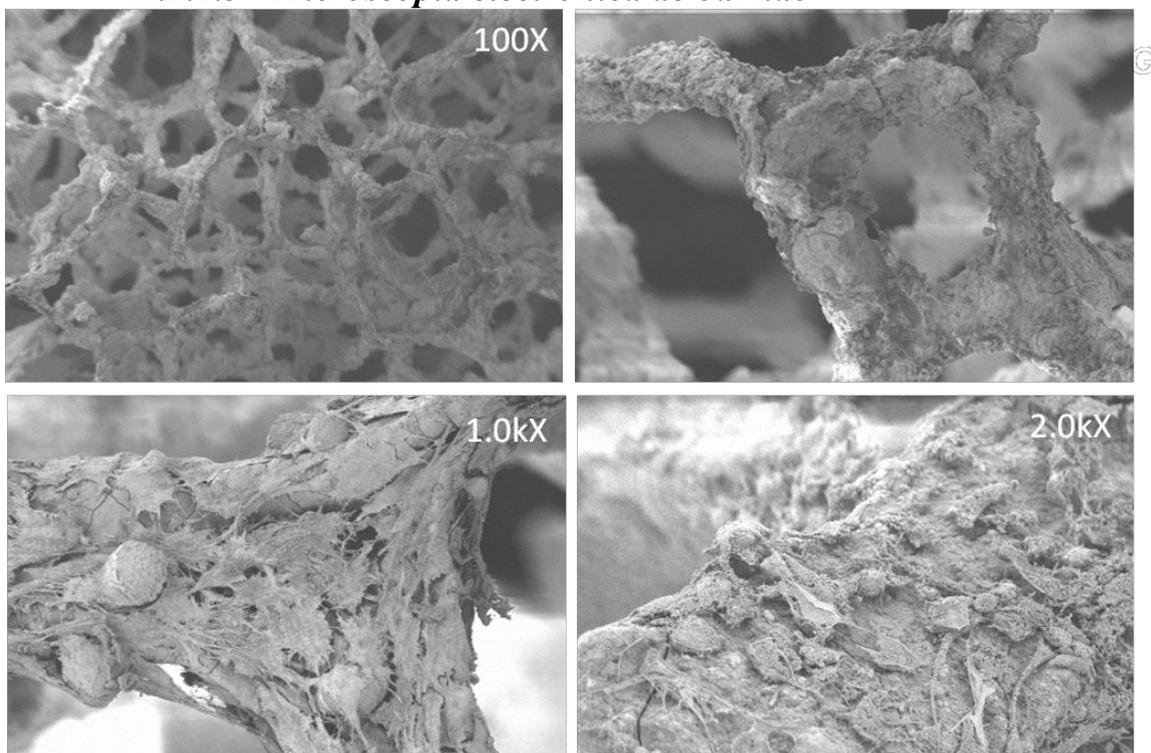


**Figura A.5** Imágenes obtenidas mediante microscopía de fluorescencia de células MG-63 cultivadas sobre los andamios recubiertos luego de 48 hs de contacto.

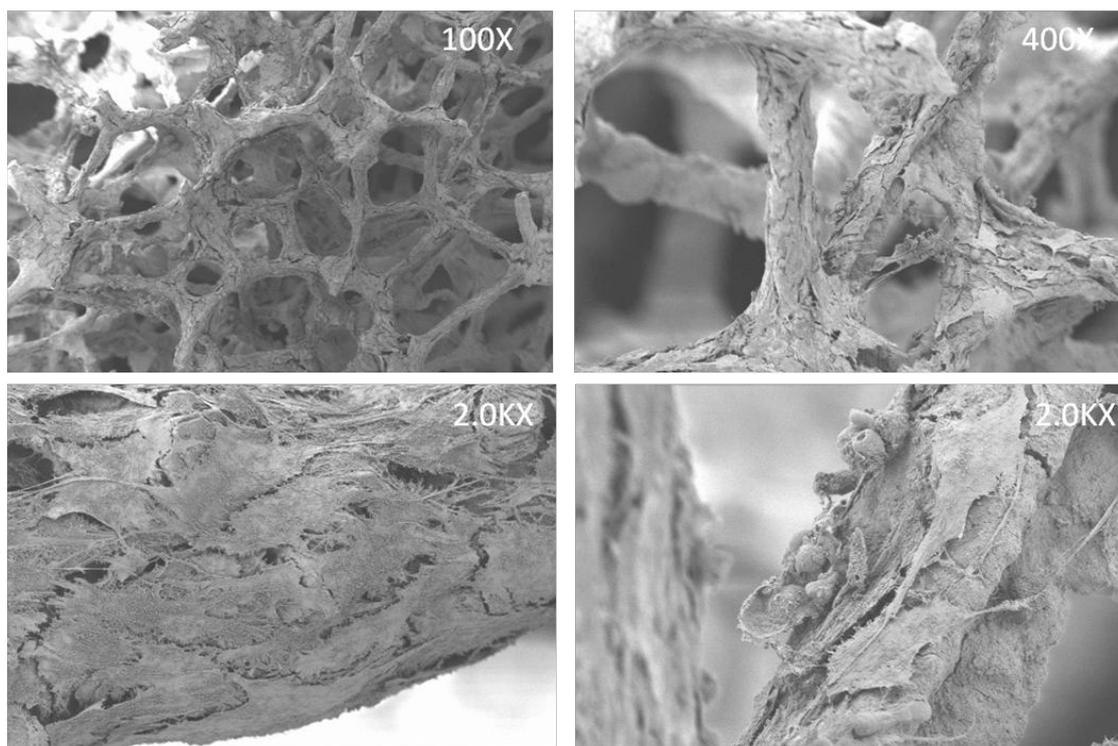


**Figura A.6** Imágenes obtenidas mediante microscopía de fluorescencia de células MG-63 cultivadas sobre los andamios recubiertos luego de 7 días de contacto. .

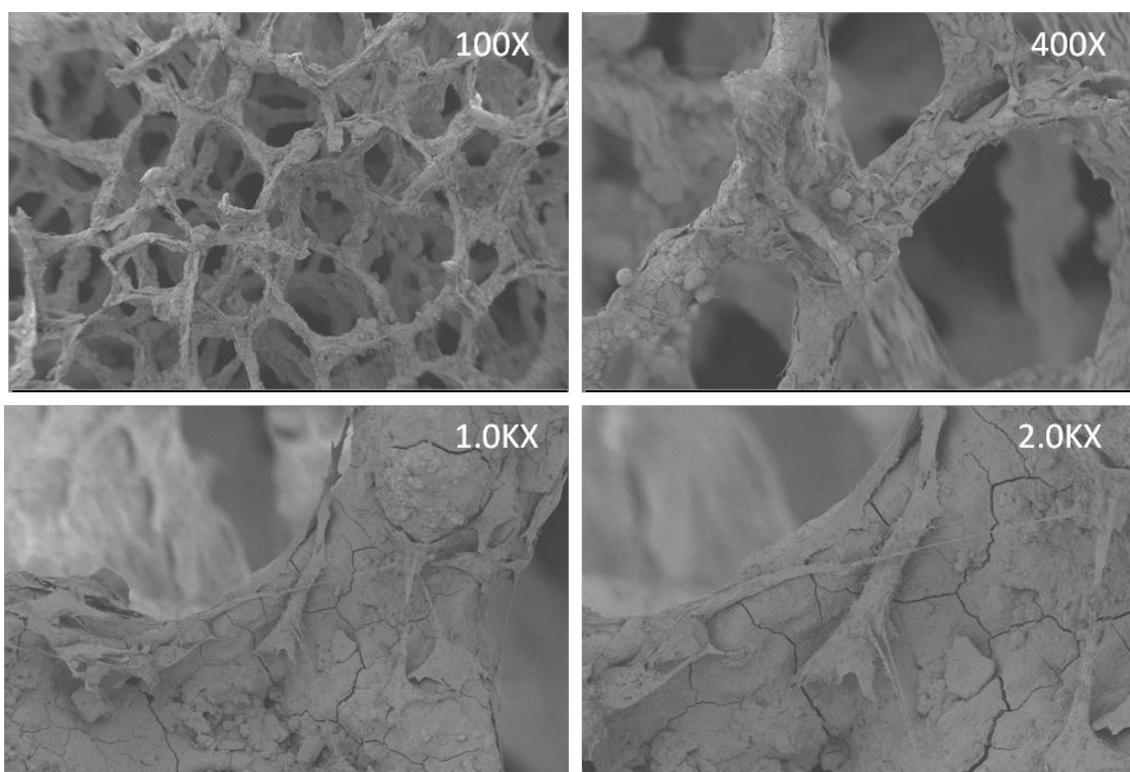
### A.2.1.3 Microscopía electrónica de barrido



**Figura A.7.** Micrografías SEM obtenidas para células MG-63 cultivadas durante 7 días sobre la superficie de andamios HApBG.



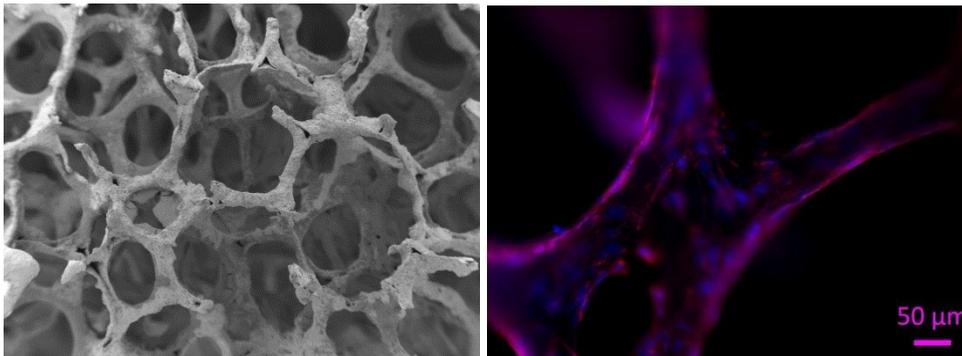
**Figura A.8.** Micrografías SEM obtenidas para células MG-63 cultivadas durante 7 días sobre la superficie de andamios MgBG.



**Figura A.9.** Micrografías SEM obtenidas para células MG-63 cultivadas durante 7 días sobre la superficie de andamios ZnBG.

# Capítulo VII

## Conclusiones finales



### 7.1 Conclusiones finales y futuros trabajos

El presente trabajo de tesis doctoral ha descrito un enfoque diferente al diseñar andamios compuestos para su aplicación en ingeniería de tejidos óseos, partiendo de la combinación de soportes a base de biovidrio 45S5<sup>®</sup> y nanomateriales a base de hidroxiapatita modificados con metales bi y trivalentes, y/o biomoléculas.

Para ello, en una primera instancia, se desarrollaron y optimizaron diferentes métodos de síntesis para la obtención de los nanomateriales en fase húmeda. La caracterización de los mismos se llevó a cabo en forma exhaustiva mediante diversas técnicas. Dentro de los resultados principales obtenidos se encontró que en todos los casos, la fase cristalina presente en forma mayoritaria fue HA, así como en los materiales modificados con hierro a su vez se observó la presencia de óxidos magnéticos tales como magnetita y maghemita. Los estudios de espectroscopia infrarroja, junto con los valores obtenidos del área superficial de las partículas modificadas, indicaron una disminución en la cristalinidad de los materiales que contenían metales. Este resultado podría resultar en una mejora de la biodegradabilidad de las apatitas sintéticas. En el caso de los nanomateriales FeHAp, medidas de magnetización vs campo aplicado demostraron que la temperatura de síntesis influenciaba el comportamiento superparamagnético de las muestras, obteniéndose 4 emu/gr para la magnetización de saturación máxima a 80°C. Los materiales fueron testeados *in vitro*, evaluando la viabilidad de células 3T3Balb-c. En todos los casos analizados, se observaron diferencias significativas al incorporar los distintos metales a la HAp, independientemente de la metodología utilizada para generar la interacción entre los nanomateriales y los cultivos celulares. Estos efectos podrían deberse a una diferencia en la forma en la que cada material se adsorbe o interactúa sobre la superficie del vidrio/plástico utilizado como superficie soporte, generando consecuentemente diferentes topografías y rugosidades.

Por otro lado, se logró la optimización de la síntesis de nanopartículas de hidroxiapatita funcionalizadas superficialmente mediante dos métodos diferentes. (1) La silanización de HAp previamente sintetizada que permitió, aunque con aparente baja eficiencia, la funcionalización con grupos amino terminales. (2) La incorporación de ácidos organofosfónicos en las etapas finales de síntesis de HAp dio lugar a nanopartículas de HAp con grupos ácido propiónico terminales unidos mediante enlaces P-O-P, denominadas HApCOO<sup>-</sup>. La incorporación de un 10% de ácido 3-fosfonopropiónico (CEPA) resultó ser la óptima para la obtención de una cobertura eficiente de la

superficie de la HAp. La caracterización exhaustiva de las partículas mediante diversas técnicas, demostró el recubrimiento de las mismas con los organofosfonatos y un núcleo de hidroxiapatita de morfología y composición de fase similar a la obtenida para HAp sin recubrir. Estudios *in vitro* de los materiales analizados demostraron que las partículas HApCOO<sup>-</sup> (10%) no mostraban efectos citotóxicos en células 3T3Balb-c. A partir de los grupos carboxilo presentes en la superficie de los materiales, se logró el anclado de compuestos fluorescentes (el colorante fucsina básica y el ester bencílico de la L-tirosina) mediante enlaces amida estables, expandiendo así los usos potenciales de las nanopartículas de hidroxiapatita como sensores fluorescentes. A su vez, la alta densidad de recubrimiento con aminoácidos obtenido al unir covalentemente la tirosina a las partículas HApCOO<sup>-</sup> (10%) apoya el uso potencial de estos materiales como plataformas para la unión de biomoléculas de interés en la regeneración de tejido óseo.

En una segunda instancia del trabajo, se sintetizaron andamios tridimensionales a base de vidrio bioactivo 45S5<sup>®</sup> mediante el método de replicación de la esponja. Se obtuvieron andamios con un alto grado de porosidad (~94%) y gran interconexión entre los poros. Mediante MCT y SEM se pudo determinar un tamaño de poro de entre 250-500  $\mu\text{m}$ , adecuado para favorecer procesos de vascularización y formación de hueso nuevo. El alto grado de porosidad obtenido se vio acompañado con una baja resistencia mecánica a la compresión de los materiales. Si bien los andamios diseñados no se encontraban preparados para ser utilizados en aplicaciones de carga, en futuros trabajos se podría lograr una optimización de las propiedades mecánicas de los mismos mediante un incremento de las etapas de recubrimiento durante el proceso de síntesis.

Las condiciones de recubrimiento de los andamios mediante el método de *dip-coating* óptimas resultaron ser suspensiones de nanopartículas cercanas a 5 mg/mL y tiempos de exposición de 10 minutos. Los andamios recubiertos con FeHAp mostraron propiedades magnéticas en forma de polvo y en su estructura original; en estos se observó una susceptibilidad magnética volumétrica de 0,0679 y una respuesta superparamagnética observándose una pequeña histéresis del material trabajando en un campo aplicado de 27 Oe. Es de destacar que mientras la saturación magnética obtenida para las nanopartículas de FeHAp fue de 0,4 emu/gr, la de los andamios fue 100 veces inferior por gramo del material. Una mejora en la respuesta magnética de los materiales podría lograrse incrementando el grado de recubrimiento de los andamios con FeHAp. Estudios de bioactividad, después de la inmersión en SBF, mostraron que la misma no

se vio afectada debido a la presencia de los nanomateriales en los andamios, pudiendo observarse la formación de estructuras de HA características del tipo coliflor. La respuesta de células MG-63 y ST-2 crecidas sobre los andamios antes y después del recubrimiento no mostraron resultados estadísticamente significativos, aunque mediante SEM se observó una mejor adhesión y proliferación de aquellas células cultivadas sobre la superficie de andamios FeBG. Los resultados obtenidos sugieren que los andamios recubiertos con FeHAp son un potencial biomaterial con propiedades magnéticas que podría ser utilizado en posibles aplicaciones de la ingeniería de tejidos.

Por otro lado, se optimizó la síntesis y recubrimiento de implantes de biovidrio 45S5<sup>®</sup> con nanopartículas de HAp, MgHAp, ZnHAp y MgZnHAp. Si bien los materiales obtenidos fueron caracterizados exhaustivamente mediante diversas técnicas, el ensayo de mineralización reveló una diferencia en el comportamiento de los andamios recubiertos con MgZnHAp, mostrando un incremento de su bioactividad en períodos cortos de exposición (1 día). A su vez, los ensayos de biocompatibilidad de los implantes en células MG-63 mostraron un incremento significativo tanto en la viabilidad como en la proliferación celular para las células incubadas con MgZnBG en los tiempos de incubación analizados. Los estudios para testear la capacidad angiogénica de los materiales no mostraron diferencias estadísticamente significativas entre los andamios BG y MgZnBG. En este aspecto, tampoco pudo observarse una diferencia significativa en la capacidad osteogénica de ambos andamios, una razón para esta observación es probablemente el tiempo de incubación limitado investigado (14 días). Para determinar si efectivamente sobre la superficie de los mismos, se induce la diferenciación celular, en futuros trabajos se pondrían evaluar otros marcadores de la diferenciación más precisos como son la osteocalcina, o el colágeno tipo I. Los resultados obtenidos sugieren que los andamios recubiertos con MgZnHAp son un biomaterial potencial para su utilización en la reparación del tejido óseo. Cabría analizar las respuestas biológicas para distintos grados de cobertura de los biovidrios con estas nanopartículas.

En general, los resultados de esta tesis han demostrado el desarrollo exitoso de andamios compuestos basados en nanomateriales a base de hidroxiapatita modificada y vidrio bioactivo 45S5<sup>®</sup>. Los resultados proporcionan una base bien fundada para futuras investigaciones en este campo, como se describió anteriormente.

## 7.2 *Actividades complementarias*

### 7.2.1 *Publicaciones científicas*

#### 7.2.1.1 *Trabajos publicados*

“Bioactive glass (45S5)-based 3D scaffolds coated with magnesium and zinc-loaded hydroxyapatite nanoparticles for tissue engineering applications” María Laura Dittler, Irem Unalan, Alina Grünewald, Ana M. Beltrán, Claudia A. Grillo, Rainer Destch, Mónica C. Gonzalez; Aldo R. Boccaccini. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, Volume 182, 110346, 2019.

“Nanohydroxyapatite exerts antitumor effects by preventing cellular proliferation and migration in glioma cells.” Roxana, Gorjod; Soledad, Porte Alcon; María Laura Dittler; Mónica Cristina Gonzalez; Mónica L Kotler. *Toxicological Sciences*, Volume 169, Issue 1, Páginas 34–42, 2019.

#### 7.2.1.2 *Trabajos en redacción*

“A new method for obtain magnetic 3D scaffolds based on Bioactive glass (45S5) coated with iron-loaded hydroxyapatite nanoparticles with magnetic tissue engineering applications.” María Laura Dittler; Gerhard, Frank; Harald, Unterweger; Pedro, Mendoza Zelis; Alina, Grünewald; Rainer, Destch; Monica Cristina, Gonzalez; Aldo R. Boccaccini.

“Phosphonopropionic Acid Coatings as Platforms for the Efficient Grafting of Molecules and Biomolecules to Hydroxyapatite Nanoparticles.” María Laura Dittler; Hernán B., Rodriguez; Giulliana, Magnacca; Claudia A., Grillo; Mónica Cristina, Gonzalez.

### 7.2.2 *Participaciones en eventos científicos*

Tema: “Bioactive glass 45S5® 3D scaffolds coated with nanoparticles of magnesium and zinc-loaded hydroxyapatite as new type of materials for tissue engineer applications”

Nombre y lugar del evento: “Materials Science and Engineering Congress (MSE)”, Darmstadt University of Technology, Alemania.

Año de realización del mismo: 2018

Presentación en calidad de exposición oral.

Tema: “A new method for obtaining magnetic Bioactive glass 45S5® 3D scaffolds modified with nanoparticles of iron-loaded hydroxyapatite, characterization, and evaluation of its biocompatibility in different types of cells”

Nombre y lugar del evento: “Congreso Internacional de Metalurgia y Materiales

SAM-CONAMET 2018”, San Carlos de Bariloche, Argentina.

Año de realización del mismo: 2018  
Presentación en calidad de exposición oral.

Tema: “Desarrollo de nanocompositos basados en la hidroxiapatita con potenciales aplicaciones en Ingeniería de Tejidos”.  
Nombre y lugar del evento: X Jornada de Becarios del INIFTA 2015, La Plata, Buenos Aires.  
Año de realización del mismo: 2015  
Presentación en calidad de exposición oral.

Tema: Síntesis y caracterización de nanocompositos basados en la hidroxiapatita dopada con metales y biomoléculas con potenciales aplicaciones en Ingeniería de Tejidos”  
Nombre y lugar del evento: “Primera Jornada de Tesistas de la Fac. De Cs. Exactas”, La Plata, Buenos Aires.  
Año de realización del mismo: 2015  
Presentación en calidad de exposición oral.

Tema: “Desarrollo de nanocompositos basados en la hidroxiapatita / hidroxiapatita dopada con Fe y biomoléculas como materiales de recubrimiento de andamios para implantes ortopédicos”.  
Nombre y lugar del evento: IX Jornada de Becarios del INIFTA 2014, La Plata, Buenos Aires.  
Año de realización del mismo: 2014  
Presentación en calidad de exposición oral

Título del trabajo: Development of Bioactive Bioglass scaffolds coated with iron-loaded hydroxyapatite nanocomposites as potential biomaterials for bone tissue repair.  
Autores: M. Laura Dittler, Mónica C. Gonzalez, Aldo R. Boccaccini.  
Nombre y lugar del evento: KMM-VIN 7th Industrial Workshop on Biomaterials, Erlangen, Alemania.  
Año de realización del mismo: 2017  
Presentación en calidad de Exposición oral corta y poster.

Título del trabajo: Evaluación de los efectos inducidos por nano-hidroxiapatita modificada con iones metálicos ( $\text{Fe}^{+2}/\text{Fe}^{+3}$ ;  $\text{Zn}^{+2}$ ) en células de mamíferos.  
Autores: M. Laura Dittler, Claudia A. Grillo, Mónica C. Gonzalez.  
Nombre y lugar del evento: Workshop Iberoamericano sobre Biomateriales para Aplicaciones Médicas, La Plata, Argentina.  
Año de realización del mismo: 2017  
Presentación en calidad de Poster.

Título del trabajo: Andamios de Biovidrio 45S5® recubiertos con nanohidroxiapatita magnética.  
Autores: M. Laura Dittler, Aldo R. Boccaccini, Mónica C. Gonzalez.  
Nombre y lugar del evento: XVII Encuentro de Superficies y Materiales Nanoestructurados – NANO 2017, San Carlos de Bariloche, Argentina.  
Año de realización del mismo: 2017

Presentación en calidad de Poster

Título del trabajo: Efficient surface derivatization of Hydroxyapatite nanoparticles with tissue-engineering applications.

Autores: M. Laura Dittler, Claudia A. Grillo, Mónica C. Gonzalez.

Nombre y lugar del evento: 9º Congreso Latinoamericano de Órganos Artificiales y Biomateriales, Foz de Iguazu, Brasil

Año de realización del mismo: 2016

Presentación en calidad de Poster

Título del trabajo: Toxicidad in vitro de nanoparticulas de hidroxiapatita en distintos tipos celulares.

Conferencia Nano 2016

Autores: R. M. Gorjod; A. Alaimo; S. Porte Alcon ; María Laura Dittler; Monica Gonzalez; M.L Kotler.

Nombre y lugar del evento: Conferencia Nano 2016, ciudad autónoma de Buenos Aires.

Año de realización del mismo: 2016

Presentación en calidad de Poster

Título del trabajo: Obtención de nanomateriales a base de hidroxiapatita modificados superficialmente con posibles aplicaciones en implantes ortopédicos.

Autores: M.Laura Dittler, Hernan B. Rodriguez, Mónica C. Gonzalez.

Nombre y lugar del evento: Conferencia Nano 2016, ciudad autónoma de Buenos Aires.

Año de realización del mismo: 2016

Presentación en calidad de Poster

Título del trabajo: Nanomaterials based on metal-doped hydroxyapatite with potential applications in orthopedic implants

Autores: M.Laura Dittler, M.Laura Dell'Arciprete, D. Fabio Mercado, Mónica C. Gonzalez.

Nombre y lugar del evento: VI Conferencia internacional de Ciencia y Tecnología de Materiales Compuestos (COMAT 2015), ciudad autónoma de Buenos Aires.

Año de realización del mismo: 2015

Presentación en calidad de Poster.

Título del trabajo: Síntesis y caracterización de nanomateriales a base de hidroxiapatita copada con Zn y sustratos bioorganicos.

Autores: Maria Laura Dittler, Giuliana Magnacca, Alessandra Bianco Prevot, Mónica Gonzalez.

Nombre y lugar del evento: NANOCORDOBA2014, ciudad de Córdoba.

Año de realización del mismo: 2014

Presentación en calidad de Poster.

### ***7.2.3 Estadías de investigación***

Estadía de Investigación en el Instituto de Biomateriales Departamento de Ingeniería y Ciencia de los Materiales, Universidad de Erlangen-Nuremberg, Alemania becada por Programa ALEARG (MED/DAAD) Convocatoria 2010 becas tipo "A" Investigación doctoral de corta duración en Alemania.

Desde el 11/06/2017 hasta el 11/12/2017.

Estadía de Investigación en el Instituto de Biomateriales, Universidad de Erlangen-Nuremberg, Alemania becada parcialmente por el Instituto de Biomateriales, Departamento de Ingeniería y Ciencia de los Materiales.

Desde el 3/10/2016 hasta el 4/12/2016.

Estadía de Investigación en la Universidad de Torino, Italia becada por el proyecto "Isolation, Characterization and screening of environmental applications of Bio-Organic substances obtained from urban biomasses (EnvironBOS)" – Financiado por la Unión Europea. Proyecto No. 269128, Marie Curie Actions- IRSES International Research Staff Exchange Scheme.

Desde el 16/05/2014 hasta el 16/07/2014.

#### **7.2.4 Cursos de postgrado**

Nombre: "Fotoquímica de Xenobióticos"  
 Duración: Del 5 al 9 de Septiembre de 2016.  
 Asistido o aprobado: Aprobado.  
 Institución: Fac. Ciencias Exactas, UNLP.  
 Carga horaria: 20 hs

Nombre: "Biomateriales".  
 Duración: 23 de Febrero al 6 de Marzo de 2015.  
 Asistido o aprobado: Aprobado.  
 Nota: 9 (nueve)  
 Institución: Escuela Complutense Latinoamericana.  
 Carga horaria: 60 hs

Nombre: "Metabolismo mineral y enfermedades óseas metabólicas".  
 Duración: 13 de Agosto al 27 de Noviembre de 2014.  
 Asistido o aprobado: Aprobado.  
 Nota: 8.5 (ocho cincuenta)  
 Institución: Fac. Ciencias Exactas, UNLP.  
 Carga horaria: 45 hs

Nombre: "Nanomateriales Magnéticos. Aplicaciones a la Biomedicina".  
 Duración: Agosto a Diciembre de 2014.  
 Asistido o aprobado: Aprobado.  
 Institución: Fac. Ciencias Exactas, UNLP.  
 Carga horaria: 60 hs

Nombre: “Introducción a la epistemología y a la filosofía de la ciencia”.  
Duración: 20 de Agosto al 8 de Octubre de 2014.  
Asistido o aprobado: Aprobado.  
Nota: 8 (ocho)  
Institución: Fac. Ciencias Exactas, UNLP.  
Carga horaria: 30 hs

Nombre: “Fundamentos y aplicaciones de las microscopías de efecto túnel (STM) y de fuerzas atómicas (AFM)”.  
Duración: Del 14 al 15 de Agosto de 2014.  
Asistido o aprobado: Aprobado.  
Institución: Fac. Ciencias Exactas, UNLP.  
Carga horaria: 15hs