

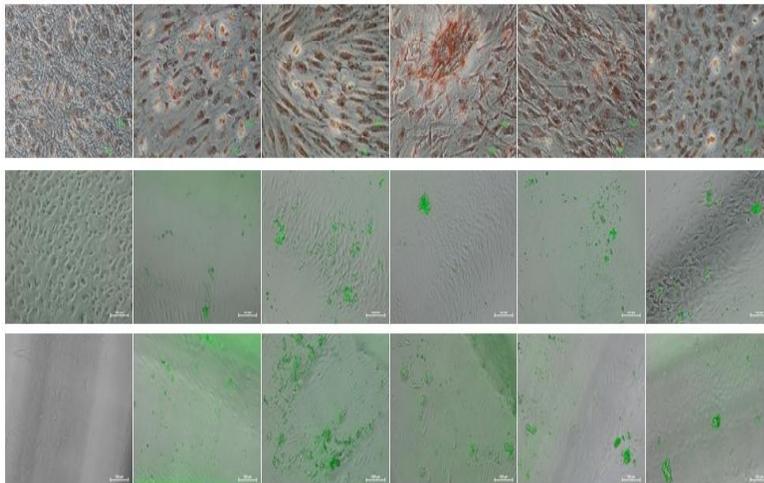


**VNiVERSiDAD
D SALAMANCA**



**FACULTAD DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE CIRUGÍA**

**DESARROLLO DE ANDAMIOS Y
MATERIALES PARA REGENERACIÓN DE
CARTÍLAGO SUBCONDRA**



**Angélica María Lara Núñez
Salamanca, 2017**

UNIVERSIDAD DE SALAMANCA
FACULTAD DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE CIRUGIA



**DESARROLLO DE ANDAMIOS Y MATERIALES PARA
REGENERACIÓN DE CARTÍLAGO SUBCONDRA**

TESIS DOCTORAL DE:

ANGÉLICA MARÍA LARA NÚÑEZ

BAJO LA DIRECCIÓN DE:

LUIS MARÍA RODRÍGUEZ LORENZO
JULIO SAN ROMÁN DEL BARRIO
JUAN FRANCISCO BLANCO BLANCO

Salamanca, 2017

Desarrollo de andamios y materiales para regeneración de cartílago subcondral

ANGÉLICA MARÍA LARA NÚÑEZ

Directores:

LUIS MARÍA RODRÍGUEZ LORENZO

JULIO SAN ROMÁN DEL BARRIO

JUAN FRANCISCO BLANCO BLANCO

Grupo de Biomateriales,

Instituto de Ciencia y Tecnología de Polímeros

Consejo Superior de Investigaciones Científicas

Departamento de Cirugía

Facultad de Medicina, USAL, Salamanca.



**Instituto de Ciencia y Tecnología de Polímeros
Departamento de Nanomateriales Poliméricos y Biomateriales**

**D. LUIS MARIA RODRIGUEZ LORENZO CIENTIFICO TITULAR DEL INSTITUTO
DE CIENCIA Y TECNOLOGIA DE POLIMEROS DEL CSIC,**

CERTIFICO:

Que el presente trabajo titulado **“Desarrollo de andamios y materiales para regeneración de cartílago subcondral”** ha sido realizado bajo mi dirección por la Ingeniera Angélica María Lara Núñez en el Instituto de Ciencia y Tecnología de Polímeros del CSIC, y reúne a mi juicio las condiciones de originalidad requeridas para optar al grado de Doctor por la Universidad de Salamanca.

Madrid, a 13 de Junio de 2017.

Fdo. Dr. D. Luis María Rodríguez Lorenzo.



**Instituto de Ciencia y Tecnología de Polímeros
Departamento de Nanomateriales Poliméricos y Biomateriales**

**D. JULIO SAN ROMÁN DEL BARRIO PROFESOR DE INVESTIGACIÓN DEL
INSTITUTO DE CIENCIA Y TECNOLOGIA DE POLIMEROS DEL CSIC,**

CERTIFICO:

Que el presente trabajo titulado **“Desarrollo de andamios y materiales para regeneración de cartílago subcondral”** ha sido realizado bajo mi dirección por la Ingeniera Angélica María Lara Núñez en el Instituto de Ciencia y Tecnología de Polímeros del CSIC, y reúne a mi juicio las condiciones de originalidad requeridas para optar al grado de Doctor por la Universidad de Salamanca.

Madrid, a 13 de Junio de 2017.

Fdo. Prof. Dr. D. Julio San Román Del Barrio.



UNIVERSIDAD DE SALAMANCA
Facultad de Medicina.

D. JUAN FRANCISCO BLANCO BLANCO, PROFESOR TITULAR DEL
DEPARTAMENTO DE CIRUGIA DE LA UNIVERSIDAD DE SALAMANCA,

CERTIFICO:

Que el presente trabajo titulado “**Desarrollo de andamios y materiales para regeneración de cartílago subcondral**” ha sido realizado bajo mi dirección por la Ingeniera Angélica María Lara Núñez en el Departamento de Cirugía de la Universidad de Salamanca, y reúne a mi juicio las condiciones de originalidad requeridas para optar al grado de Doctor por la Universidad de Salamanca.

Salamanca, a 13 de Junio de 2017.

Fdo. Dr. D. Juan Francisco Blanco Blanco.



**VNiVERSiDAD
D SALAMANCA**

CAMPUS DE EXCELENCIA INTERNACIONAL

DEPARTAMENTO DE CIRUGÍA

**D. FRANCISCO SANTIAGO LOZANO SÁNCHEZ, DIRECTOR DEL
DEPARTAMENTO DE CIRUGIA DE LA UNIVERSIDAD DE SALAMANCA,**

CERTIFICA:

Que el Trabajo Doctoral titulado “**Desarrollo de andamios y materiales para regeneración de cartílago subcondral**”, del que es autora Dña. Angélica María Lara Núñez, reúne los requisitos necesarios para su presentación y defensa ante el Tribunal Calificador para optar al **Grado de Doctor por la Universidad de Salamanca**.

Y para que así conste a los efectos oportunos, firma el presente Certificado en Salamanca, a trece de Junio de dos mil diecisiete.

Fdo.: D. Francisco Santiago Lozano Sánchez

AGRADECIMIENTOS

Hace varios años, mientras cursaba la asignatura de biomateriales, siempre soñé y me imaginé estudiado en España. Miraba una página por internet donde investigaban y anhelaba llegar allí y al cabo del tiempo, Dios me permitió cumplir este sueño: llegue a estudiar mi doctorado en Biomateriales en la Universidad de Salamanca y el desarrollo de mi tesis doctoral en el grupo de Biomateriales del CSIC.

Doy gracias a Dios por haberme acompañado todo el tiempo en el doctorado.

A mis directores de tesis: Gracias Luis porque de ti aprendí muchas cosas (eres mi padre en la ciencia) y estuviste conmigo desde el inicio. Gracias al Dr. Julio por sus aportes en la tesis y por haber estado pendiente de mí. Gracias al Dr. Blanco por su apoyo y colaboración. Al Dr de Pedro gracias por haberme llevado al CSIC y por haber estado pendiente de mí desde el inicio de la tesis.

A mis padres quiero darles las gracias por todo, ya que sin ellos no hubiera podido cumplir mi sueño.

A mis amigos y familiares, en especial a mis hermanos Juan y Vero, a mis tíos, abuelos, Oliver y mis amigos de la iglesia, gracias por su apoyo.

Gracias a mis amigos de química orgánica del CSIC que estuvieron siempre allí, en especial a Mauro.

Al grupo de Biomateriales del CSIC, gracias por sus aportes en la tesis y por los momentos compartidos. Gracias a Blanca y David por haber estado apoyándome desde el inicio. Gracias a Danielita por su amistad incondicional.

Gracias a Juan Parra, Mar Fernández y Raul Ibañez por su colaboración en la tesis.

INDICE

LISTA DE FIGURAS	5
LISTA DE TABLAS.....	18
LISTA DE ABREVIATURAS.....	21
CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN.....	23
1. TIPOS DE CARTILAGO	25
2. DEFECTOS QUE SE PUEDEN PRODUCIR EN EL CARTÍLAGO.....	
.....	28
3. PROBLEMÁTICA EN LA REGENERACIÓN DE FIBROCARTILAGO.....	
.....	30
4. APROXIMACIONES CLÍNICAS ACTUALES.....	31
5. APROXIMACIONES EXPERIMENTALES DE INGENIERÍA DE TEJIDOS.....	
.....	33
6. MATERIALES QUE SE ESTÁN UTILIZANDO	34
7. DESARROLLO DE ANDAMIOS Y MATERIALES PARA REGENERACIÓN DE CARTÍLAGO SUBCONDRALE	36
8. REFERENCIAS	39
CAPÍTULO 2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	45
1. OBJETIVOS EN LA PREPARACION DE APATITA Y APATITA CON DOSIS BAJAS DE ESTRONCIO	46

2. OBJETIVOS EN LA PREPARACIÓN DEL LACTATO DE QUITOSANO.....	47
.....	47
CAPÍTULO 3. PREPARACIÓN DE APATITA ENRIQUECIDA CON ESTRONCIO...	48
.....	48
1. INTRODUCCIÓN	49
2. OBJETIVOS DE ESTE CAPÍTULO	51
3. SÍNTESIS DE APATITAS DE CALCIO/ESTRONCIO.....	51
3.1. OBTENCIÓN DE LA HIDROXIAPATITA: $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$	51
3.1.A. TRATAMIENTO TÉRMICO A 600°C DE LA APATITA.....	59
3.2. APATITA ENRIQUECIDA CON Sr.....	64
3.2.A. SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE APATITAS CON DOSIS ALTAS DE Sr.....	64
3.2.B. TRATAMIENTO TÉRMICO A 600°C DE LAS MUESTRAS SINTETIZADAS CON EL 100, 80, 50 Y 20% DE ACETATO DE Sr.....	70
3.2.C. SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE APATITAS CON DOSIS BAJAS DE Sr.....	82
3.2.D. TRATAMIENTO TÉRMICO A 600°C DE LAS MUESTRAS SINTETIZADAS CON EL 0, 5, 10, 15 y 20% DE ACETATO DE Sr.....	92
.....	92
4. ESTUDIOS CELULARES.....	121
4.1. PRUEBAS DE CITOTOXICIDAD	121
4.1.A. ENSAYO MTT CON OSTEOSARCOMAS.....	122
4.1.B. ENSAYO MTT CON OSTEÓBLASTOS.....	123

4.2. ENSAYO 1: ROJO DE ALIZARINA	124
4.3. ENSAYO 2: OXTERIX.....	132
4.4. ENSAYO 3: RUNX2	141
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	150
6. REFERENCIAS.....	152
CAPÍTULO 4. LACTATO DE QUITOSANO.....	161
1. INTRODUCCIÓN.....	162
2. OBJETIVOS DE ESTE CAPÍTULO	165
2.1. OBJETIVO 1: SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE LACTATO DE QUITOSANO.....	165
2.2. OBJETIVO 2: ENTRECruzAMIENTO DEL LACTATO DE QUITOSANO	165
3. PROPIEDADES DE LOS MATERIALES.....	165
3.1. PROPIEDADES DEL QUITOSANO	165
3.2. PROPIEDADES DEL ÁCIDO LÁCTICO.....	165
4. SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DEL LACTATO DE QUITOSANO.....	165
4.1. CALENTAMIENTO A VACIO A 100°C DEL LACTATO DE QUITOSANO.....	177
4.2. CALENTAMIENTO A VACIO A 200°C DEL LACTATO DE QUITOSANO.....	188
5. ESTUDIOS CELULARES.....	196

5.1. ENSAYO MTT CON OSTEOSARCOMAS	196
6. DISCUSIÓN	197
7. REFERENCIAS.....	199
CAPÍTULO 5. CONCLUSIONES.....	207
1. CONCLUSIONES DE LA PREPARACIÓN DE APATITA ENRIQUECIDA CON ESTRONCIO	208
2. CONCLUSIONES DE LA PREPARACIÓN DE LACTATO DE QUITOSANO	210
3. CONCLUSION FINAL.....	210
APÉNDICE. TÉCNICAS Y METODOS	211

LISTA DE FIGURAS

CAPITULO 3

Figura 1. ATR de la apatita

Figura 2. DRX de la apatita

Figura 3. Pico a 002 (Eje Z del cristal hexagonal)

Figura 4. Curvas DTA/ TGA de la apatita

Figura 5. Imágenes de FE-SEM de la apatita a diferentes magnificaciones

Figura 6. Tamaño de partícula de la apatita

Figura 7. Isoterma obtenida en la medición del SSA de la apatita

Figura 8. ATR para el gel seco tomado de la hidroxiapatita, tratado térmicamente a 600°C durante 5 horas

Figura 9. DRX de la apatita calentada a 600°C

Figura 10. Tamaño del cristal de la apatita calentada a 600°C

Figura 11. Imágenes de FE-SEM de la apatita calentada 600°C a diferentes magnificaciones

Figura 12. Análisis elemental de la apatita calentada a 600°C por EDAX

Figura 13. Tamaño de la partícula de la apatita calentada a 600°C

Figura 14. ATR para las muestras sintetizadas con el 100, 80, 50 y 20% de acetato de Sr.

Figura 15. DRX de las muestras sintetizadas con el 100, 80, 50 y 20% de acetato de Sr

Figura 16. Curvas TGA para las muestras sintetizadas con el 100, 80, 50 y 20% de acetato de Sr

Figura 17. Imágenes de FE-SEM de la muestra sintetizada con el 100% de Acetato de Sr a diferentes magnificaciones

Figura 18. Imágenes de FE-SEM de la muestra sintetizada con el 20% de acetato de Sr a diferentes magnificaciones

Figura 19. ATR para las muestras sintetizadas con el 100, 80, 50 y 20% de acetato de Sr tratado térmicamente a 600°C durante 5 horas

Figura 20. DRX de las muestras sintetizadas con el 100, 80, 50 y 20% de acetato de Sr después del calentamiento a 600°C

Figura 21. Imágenes de FE-SEM de la muestra sintetizada con el 100% de acetato de Sr calentado a 600°C a diferentes magnificaciones

Figura 22. Imágenes de FE-SEM de la muestra sintetizada con el 80% de acetato de Sr calentado a 600°C a diferentes magnificaciones

Figura 23. Imágenes de FE-SEM de la muestra sintetizada con el 50% de acetato de Sr calentado a 600°C a diferentes magnificaciones

La figura 23 muestra imágenes de SEM, donde se ven estructuras aglomeradas de diferentes formas y tamaños que se unen formando agujeros

Figura 24. Imágenes de FE-SEM de la muestra sintetizada con el 20% de acetato de Sr calentado a 600°C a diferentes magnificaciones

Figura 25. % de Ca y de Sr de las muestras sintetizadas con el 100, 80, 50 y 20% de acetato de Sr después del calentamiento a 600°C

Figura 26. Tamaño de la partícula de la muestra sintetizada con el 100% de Acetato de Sr calentada a 600°C

Figura 27. Tamaño de la partícula de la muestra sintetizada con el 80% de Acetato de Sr calentada a 600°C

Figura 28. Tamaño de la partícula de la muestra sintetizada con el 50% de acetato de Sr calentada a 600°C

Figura 29. Tamaño de la partícula de la muestra sintetizada con el 20% de acetato de Sr calentada a 600°C

Figura 30. ATR para las muestras sintetizadas con el 0, 5, 10, 15 y 20% de acetato de Sr

Figura 31. DRX de las muestras sintetizadas con el 0, 5, 10, 15 y 20% de acetato de Sr

Figura 32. Curvas de TGA para las muestras sintetizadas con el 0, 5, 10, 15 y 20% de acetato de Sr

Figura 33. Tamaño de la partícula de la muestra sintetizada con el 0% de Acetato de Sr

Figura 34. Tamaño de la partícula de la muestra sintetizada con el 5% de Acetato de Sr

Figura 35. Tamaño de la partícula de la muestra sintetizada con el 10% de Acetato de Sr

Figura 36. Tamaño de la partícula de la muestra sintetizada con el 15% de Acetato de Sr

Figura 37. Tamaño de la partícula de la muestra sintetizada con el 20% de Acetato de Sr

Figura 38. Isotherma obtenida en la medición del SSA de la muestra sintetizada con el 0% de Sr

Figura 39. Isotherma obtenida en la medición del SSA de la muestra sintetizada con el 5% de Sr

Figura 40. Isotherma obtenida en la medición del SSA de la muestra sintetizada con el 10 % de Sr

Figura 41. Isotherma obtenida en la medición del SSA de la muestra sintetizada con el 15% de Sr

Figura 42. Isotherma obtenida en la medición del SSA de la muestra sintetizada con el 20% de Sr

Figura 43. ATR para las muestras sintetizadas con el 0, 5, 10, 15 y 20% de acetato de Sr calentado a 600°C

Figura 44. DRX de las muestras sintetizadas con el 0, 5, 10, 15 y 20% de acetato de Sr calentado a 600°C

Figura 45. Parámetros de Celdilla a para apatitas con dosis bajas de Sr calentadas a 600°C

Figura 46. Parámetros de Celdilla c para apatitas con dosis bajas de Sr calentadas a 600°C

Figura 47. Pico a 002% para la muestra sintetizada con el 0% de acetato de Sr calentada a 600°C

Figura 48. Pico a 002% para la muestra sintetizada con el 5% de acetato de Sr calentada a 600°C

Figura 49. Pico a 002% para la muestra sintetizada con el 10% de acetato de Sr calentada a 600°C

Figura 50. Pico a 002% para la muestra sintetizada con el 15% de acetato de Sr calentada a 600°C

Figura 51. Pico a 002% para la muestra sintetizada con el 20% de acetato de Sr calentada a 600°C

Figura 52. Imágenes de FE-SEM de la muestra sintetizada con el 0% de acetato de Sr calentada a 600°C a diferentes magnificaciones

Figura 53. Imágenes de FE-SEM de la muestra sintetizada con el 5% de acetato de Sr calentada a 600°C a diferentes magnificaciones

Figura 54. Imágenes de FE-SEM de la muestra sintetizada con el 10% de acetato de Sr calentada a 600°C a diferentes magnificaciones

Figura 56. Imágenes de FE-SEM de la muestra sintetizada con el 20% de acetato de Sr calentada a 600°C a diferentes magnificaciones

Figura 57. %Ca y Sr obtenido por EDAX para apatitas con dosis bajas de Sr calentadas a 600°C

Figura 58. Densidad en % de las muestras sintetizadas con el 0, 5, 10,15 y 20% de acetato de Sr calentados a 600°C

Figura 59. Promedio de HV y S de las muestras sintetizadas con el 0, 5, 10,15 y 20% de acetato de Sr calentados a 600°C

Figura 60. DRX de las muestras sintetizadas con el 0, 5, 10, 15 y 20% de acetato de Sr calentado a 1000°C

Figura 61. Tamaño de la partícula de la muestra sintetizada con el 0% de acetato de Sr calentada a 600°C

Figura 62. Tamaño de la partícula de la muestra sintetizada con el 5% de acetato de Sr calentada a 600°C

Figura 63. Tamaño de la partícula de la muestra sintetizada con el 10% de acetato de Sr calentada a 600°C

Figura 64. Tamaño de la partícula de la muestra sintetizada con el 15% de acetato de Sr calentada a 600°C

Figura 65. Tamaño de la partícula de la muestra sintetizada con el 20% de acetato de Sr calentada a 600°C

Figura 66. Tamaño de partícula d50 de las muestras con dosis bajas de Sr

Figura 67. Análisis de integridad de la muestra sintetizada con el 5% de acetato de Sr calentada a 600°C

Figura 68. Análisis de integridad de la muestra sintetizada con el 10% de acetato de Sr calentada a 600°C

Figura 69. Análisis de integridad de la muestra sintetizada con el 15% de acetato de Sr calentada a 600°C

Figura 70. Resultados del ensayo MTT para el control (C) y las muestras sintetizadas con el 0, 5,10,15 y 20% de acetato de Sr.

Figura 71. Resultados del ensayo MTT para el control (C) y las muestras sintetizadas con el 0, 5,10,15 y 20% de acetato de Sr

Figura 72. Ensayo con rojo de alizarina para Osteoblastos con respecto al TMX

Figura 73. Ensayo con rojo de alizarina para Osteoblastos con respecto a la muestra sintetizada con el 0% de acetato de Sr

Figura 74. Ensayo con rojo de alizarina para Osteoblastos con respecto a la muestra sintetizada con el 5% de acetato de Sr

Figura 75. Ensayo con rojo de alizarina para Osteoblastos con respecto a la muestra sintetizada con el 10% de acetato de Sr

Figura 76. Ensayo con rojo de alizarina para Osteoblastos con respecto a la muestra sintetizada con el 15% de acetato de Sr

Figura 77. Ensayo con rojo de alizarina para Osteoblastos con respecto a la muestra sintetizada con el 20% de acetato de Sr

Figura 78. Ensayo con rojo de alizarina para MSC en medio no osteoinductor con respecto al TMX

Figura 79. Ensayo con rojo de alizarina para MSC en medio no osteoinductor con respecto a la muestra sintetizada con el 0% de acetato de Sr

Figura 80. Ensayo con rojo de alizarina para MSC en medio no osteoinductor con respecto a la muestra sintetizada con el 5% de acetato de Sr

Figura 81. Ensayo con rojo de alizarina para MSC en medio no osteoinductor con respecto a la muestra sintetizada con el 10% de acetato de Sr

Figura 82. Ensayo con rojo de alizarina para MSC en medio no osteoinductor con respecto a la muestra sintetizada con el 15% de acetato de Sr

Figura 83. Ensayo con rojo de alizarina para MSC en medio no osteoinductor con respecto a la muestra sintetizada con el 20% de acetato de Sr

Figura 84. Ensayo con rojo de alizarina para MSC en medio osteoinductor con respecto al TMX

Figura 85. Ensayo con rojo de alizarina para MSC en medio osteoinductor con respecto a la muestra sintetizada con el 0% de acetato de Sr

Figura 86. Ensayo con rojo de alizarina para MSC en medio osteoinductor con respecto a la muestra sintetizada con el 5% de acetato de Sr

Figura 87. Ensayo con rojo de alizarina para MSC en medio osteoinductor con respecto a la muestra sintetizada con el 10% de acetato de Sr

Figura 88. Ensayo con rojo de alizarina para MSC en medio osteoinductor con respecto a la muestra sintetizada con el 15% de acetato de Sr

Figura 89. Ensayo con rojo de alizarina para MSC en medio osteoinductor con respecto a la muestra sintetizada con el 20% de acetato de Sr

Figura 90. Ensayo con Oxterix para osteoblastos con respecto al TMX

Figura 91. Ensayo con Oxterix para osteoblastos con respecto a la muestra sintetizada con el 0% de acetato de Sr

Figura 92. Ensayo con Oxterix para osteoblastos con respecto a la muestra sintetizada con el 5% de acetato de Sr

Figura 93. Ensayo con Oxterix para osteoblastos con respecto a la muestra sintetizada con el 10% de acetato de Sr

Figura 94. Ensayo con Oxterix para osteoblastos con respecto a la muestra sintetizada con el 15% de acetato de Sr

Figura 95. Ensayo con Oxterix para osteoblastos con respecto a la muestra sintetizada con el 20% de acetato de Sr

Figura 96. Ensayo con Oxterix para MSC en medio no osteoinductor con respecto al TMX

Figura 97. Ensayo con Oxterix para MSC en medio no osteoinductor con respecto a la muestra sintetizada con el 0% de acetato de Sr

Figura 98. Ensayo con Oxterix para MSC en medio no osteoinductor con respecto a la muestra sintetizada con el 5% de acetato de Sr

Figura 99. Ensayo con Oxterix para MSC en medio no osteoinductor con respecto a la muestra sintetizada con el 10% de acetato de Sr

Figura 100. Ensayo con Oxterix para MSC en medio no osteoinductor con respecto a la muestra sintetizada con el 15% de acetato de Sr

Figura 101. Ensayo con Oxterix para MSC en medio no osteoinductor con respecto a la muestra sintetizada con el 20% de acetato de Sr

Figura 102. Ensayo con Oxterix para MSC en medio osteoinductor con respecto al TMX

Figura 103. Ensayo con Oxterix para MSC en medio osteoinductor con respecto a la muestra sintetizada con el 0% de acetato de Sr

Figura 104. Ensayo con Oxterix para MSC en medio osteoinductor con respecto a la muestra sintetizada con el 5% de acetato de Sr

Figura 105. Ensayo con Oxterix para MSC en medio osteoinductor con respecto a la muestra sintetizada con el 10% de acetato de Sr

Figura 106. Ensayo con Oxterix para MSC en medio osteoinductor con respecto a la muestra sintetizada con el 15% de acetato de Sr

Figura 107. Ensayo con Oxterix para MSC en medio osteoinductor con respecto a la muestra sintetizada con el 20% de acetato de Sr

Figura 108. Ensayo con RUNX2 para osteoblastos con respecto al TMX

Figura 109. Ensayo con RUNX2 para osteoblastos con respecto a la muestra sintetizada con el 0% de acetato de Sr

Figura 110. Ensayo con RUNX2 para osteoblastos con respecto a la muestra sintetizada con el 5% de acetato de Sr

Figura 111. Ensayo con RUNX2 para osteoblastos con respecto a la muestra sintetizada con el 10% de acetato de Sr

Figura 112. Ensayo con RUNX2 para osteoblastos con respecto a la muestra sintetizada con el 15% de acetato de Sr

Figura 113. Ensayo con RUNX2 para osteoblastos con respecto a la muestra sintetizada con el 20% de acetato de Sr

Figura 114. Ensayo con RUNX2 para MSC en medio no osteoinductor con respecto al TMX

Figura 115. Ensayo con RUNX2 para MSC en medio no osteoinductor con respecto a la muestra sintetizada con el 0% de acetato de Sr

Figura 116. Ensayo con RUNX2 para MSC en medio no osteoinductor con respecto a la muestra sintetizada con el 5% de acetato de Sr

Figura 117. Ensayo con RUNX2 para MSC en medio no osteoinductor con respecto a la muestra sintetizada con el 10% de acetato de Sr

Figura 118. Ensayo con RUNX2 para MSC en medio no osteoinductor con respecto a la muestra sintetizada con el 15% de acetato de Sr

Figura 119. Ensayo con RUNX2 para MSC en medio no osteoinductor con respecto a la muestra sintetizada con el 20% de acetato de Sr

Figura 120. Ensayo con RUNX2 para MSC en medio osteoinductor con respecto al TMX

Figura 121. Ensayo con RUNX2 para MSC en medio osteoinductor con respecto a la muestra sintetizada con el 0% de acetato de Sr

Figura 122. Ensayo con RUNX2 para MSC en medio osteoinductor con respecto a la muestra sintetizada con el 5% de acetato de Sr

Figura 123. Ensayo con RUNX2 para MSC en medio osteoinductor con respecto a la muestra sintetizada con el 10% de acetato de Sr

Figura 124. Ensayo con RUNX2 para MSC en medio osteoinductor con respecto a la muestra sintetizada con el 15% de acetato de Sr

Figura 125. Ensayo con RUNX2 para MSC en medio osteoinductor con respecto a la muestra sintetizada con el 20% de acetato de Sr

CAPITULO 4

Figura 1. RMN del Quitosano

Figura 2. Andamios de lactato de quitosano

Figura 3. ATR del lactato de quitosano

Figura 4. DRX del lactato de quitosano

Figura 5. TGA del lactato de quitosano

Figura 6. Espectro de 1H-RMN del lactato de quitosano

Figura 7. Sustitución del ácido láctico en el quitosano

Figura 8. Análisis Elemental en el ChemDraw del lactato de quitosano

Figura 9. Imágenes de FE-SEM del lactato de quitosano a diferentes magnificaciones

Figura 10. Análisis de solubilidad del Lactato de Quitosano

Figura 11. Lactato de quitosano calentado a 100°C

Figura 12. ATR del lactato de quitosano calentado a vacío a 100°C

Figura 13. DRX del lactato de quitosano calentado a 100°C

Figura 14. Curvas DTA/TGA del lactato de quitosano calentado a vacío a 100°C

Figura 15. Espectro de 1H-RMN del lactato de quitosano calentado a vacío a 100°C

Figura 16. Sustitución del ácido láctico en el quitosano después del calentamiento a vacío a 100°C.

Figura 17. Imágenes de FE-SEM del lactato de quitosano calentado a vacío a 100°C a diferentes magnificaciones

Figura 18. Análisis de solubilidad del lactato de quitosano calentado a 100°C

Figura 19. ATR del lactato de Quitosano calentado a 100°C antes y después el análisis de solubilidad

Figura 20. Imágenes de FE-SEM del lactato de quitosano calentado a vacío a 100°C a diferentes magnificaciones después del análisis de solubilidad.

Figura 21. ATR del lactato de quitosano calentado a vacío a 200°C

Figura 22. Curvas DTA/TGA del lactato de quitosano calentado a vacío a 200°C

Figura 23. Imágenes de FE-SEM del lactato de quitosano calentado a vacío a 200°C a diferentes magnificaciones

Figura 24. Análisis de solubilidad del lactato de quitosano calentado a vacío a 200°C

Figura 25. ATR del lactato de quitosano calentado a 200°C antes y después del análisis de solubilidad de 28 días

Figura 26. Lactato de quitosano calentado a 200°C después del análisis de solubilidad de 28 días

Figura 27. Imágenes de FE-SEM del lactato de quitosano calentado a vacío a 200°C a diferentes magnificaciones después del análisis de solubilidad de 28 días.

Figura 28. Seguimiento de la banda a 1734 cm^{-1}

Figura 29. Resultados del ensayo MTT para el control (C) y el lactato de quitosano (LQ) calentado a 200°C.

APENDICE. TÉCNICAS Y METODOS

Figura 1. Síntesis de apatitas de calcio/Estroncio

Figura 2. Osteoblastos humanos en cultivo (subcultivo 6) transcurridas 48 h desde su siembra, bajo microscopio invertido de contraste de fases (Nikon ECLIPSE TS100; 200X).

Figura 3. Células madre humanas aisladas de medula ósea en cultivo (subcultivo 4) transcurridas 72 h desde su siembra, bajo microscopio invertido de contraste de fases (Nikon ECLIPSE TS100; 200X)

Figura 4. RMN del Quitosano

Figura 5. Síntesis del Lactato de Quitosano

LISTA DE TABLAS

CAPITULO 3

Tabla 1. % de CA y de P de la apatita

Tabla 2. Proporciones con dosis altas de acetato de Sr

Tabla 3. Microanálisis de las muestras sintetizadas con el 100, 80, 50 y 20% de acetato de Sr

Tabla 4. ICP para las muestras sintetizadas con el 100, 80, 50 y 20% de acetato de Sr

Tabla 5. Microanálisis de las muestras sintetizadas con el 100, 80, 50 y 20% de acetato de Sr después del calentamiento a 600°C.

Tabla 6. EDAX para las muestras sintetizadas con el 100, 80, 50 y 20% de acetato de Sr después del calentamiento a 600°C

Tabla 7. % de Ca hallado para las muestras sintetizadas con el 80, 50 y 20% de acetato de Sr después del calentamiento a 600°C

Tabla 8. % de Ca obtenido por ICP de las muestras sintetizadas con el 80, 50 y 20% de acetato de Sr después del calentamiento a 600°C

Tabla 9. Proporciones con dosis bajas de acetato de Sr

Tabla 10. Área de superficie específica de las muestras sintetizadas con el 0, 5, 10,15 y 20% de acetato de Sr

Tabla 11. Parámetros de Celda a de apatitas con dosis bajas de Sr calentadas a 600°C

Tabla 12. Parámetros de Celda c de apatitas con dosis bajas de Sr calentadas a 600°C

Tabla 13. EDAX para apatitas con dosis bajas de Sr calentadas a 600°C

Tabla 14. Porcentaje de Ca hallado en las apatitas con dosis bajas de Sr calentadas a 600°C

Tabla 15. Porcentaje obtenido de Ca por EDAX en las apatitas con dosis bajas de Sr calentadas a 600°C

Tabla 16. mg/kg de Ca, Sr y P obtenidos por ICP

Tabla 17. mg/kg de Ca, Sr y P obtenidos por ICP para las muestras sintetizadas con el 20 y 5% de acetato de Sr

Tabla 28. Densidad real de las muestras sintetizadas con el 0, 5, 10,15 y 20% de acetato de Sr calentados a 600°C

Tabla 19. Densidad aparente de las muestras sintetizadas con el 0, 5, 10,15 y 20% de acetato de Sr calentados a 600°C

Tabla 20. Densidad en % de las muestras sintetizadas con el 0, 5, 10,15 y 20% de acetato de Sr calentados a 600°C

Tabla 21. Porosidad con su desviación en % de las muestras sintetizadas con el 0, 5, 10,15 y 20% de acetato de Sr calentados a 600°C

Tabla 22. Resultados de dureza Vickers con su desviación de las muestras sintetizadas con el 0, 5, 10,15 y 20% de acetato de Sr calentados a 600°C

Tabla 23. %B-TCP hallado por el método Rietveld de las muestras sintetizadas con el 0, 5, 10,15 y 20% de acetato de Sr calentado a 1000°C

Tabla 24. %HA hallado por el método Rietveld de las muestras sintetizadas con el 0, 5, 10,15 y 20% de acetato de Sr calentado a 600°C

Tabla 25. Ecuaciones obtenidas de las muestras sintetizadas con el 0, 5, 10,15 y 20% de acetato de Sr

Tabla 26. Área de superficie especifica de las muestras con dosis bajas de Sr calentadas a 600°C

CAPITULO 4

Tabla 1. Integración de cada pico en la RMN del quitosano

Tabla 2. Densidad real del lactato de quitosano

Tabla 3. Densidad aparente del lactato de quitosano

Tabla 4. Densidad Real del lactato de quitosano calentado a 100°C

Tabla 5. Densidad Aparente del lactato de quitosano calentado a 100°C

Tabla 6. Densidad real del lactato de quitosano calentado a vacío a 200°C

Tabla 7. Densidad aparente del lactato de quitosano calentado a vacío a 200°C

APENDICE. TÉCNICAS Y MÉTODOS

Tabla 1. Reactivos utilizados en la síntesis de apatitas de Calcio y estroncio

Tabla 2. Proporciones de Acetato de Ca y de Acetato de Sr

Tabla 3. Integración de cada pico en la RMN del quitosano

LISTA DE ABREVIATURAS

AH: Ácido hialurónico

ANOVA: Análisis de la varianza

ATP: Adenosín trifosfato

ATR: Reflexión total atenuada

B-TCP: Beta-fosfato tricálcico

C: Carbono

Ca: Calcio

ρ : Densidad

d: Distribución

DMSO: Dimetilsulfóxido

DRX: Difracción de Rayos x

E: Empuje

EDAX: Espectrómetro de energía dispersiva

F_A: Fracción molar de unidades N-acetiladas

FBH: Fibroblastos humanos

FCF-2: Factor de crecimiento de fibroblastos-2

FCT- β 1: Factor de crecimiento β 1-transformante

FCT- β 3: Factor de crecimiento β 3-transformante

FE-SEM: Microscopio electrónico de Barrido de alta resolución con filamento de Emisión de Campo

g: Gravedad

GAGs: Glicosaminoglicanos

H: Hidrógeno

¹H: Protón

HA: Hidroxiapatita

HOb: Osteoblastos

HV: Dureza Vickers

I: Señales

ICP: Plasma Acoplado Inductivamente
m: Masa
M: Unidades Lactílo
M': Unidades Lactílo hidroxilado
MEC: Matriz extracelular
MPC: Matriz pericelular
MSC: Células madre mesenquimales
MTP-13: Metaloproteinasa-13
MTT: Bromuro de 3-(4.5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio
N: Nitrógeno
NHAc: Acetamida
O: Oxígeno
OH: Hidroxilo
PBS: Tampón fosfato salino
PGs: Proteoglicanos
PO₄: Fosfato
QS: Queratán sulfato
RMN: Resonancia magnética nuclear
SC: Sulfato de condroitina
Sr: Estroncio
SSA: Área de Superficie Específica
T: Unidad del Lactíl
T': Unidad del Lactíl hidroxilactado
TGA: Análisis termogravimétrico
TMX: Thermanox
V: Volumen

CAPITULO 1. INTRODUCCIÓN

El cartílago es un tejido conectivo de baja densidad celular, altamente especializado, que no posee vasos sanguíneos, ni nervios, ni vasos linfáticos[1] [2, 3]. Los cartílagos recubren las articulaciones y ayudan a dar soporte, permitiendo el movimiento articular sin dolor[3]. El cartílago presenta baja fricción, es resistente al desgaste, tiene una superficie adecuada para soportar peso pero tiene un inconveniente ya que posee una capacidad limitada de auto-reparación [1, 2, 4].

El cartílago está formado por condrocitos y condroblastos embebidos en su matriz extracelular. La matriz extracelular está constituida de un gel muy rico en agua y de moléculas denominadas proteoglicanos (PGs) que se encuentran encerradas en una red de fibras de colágeno distribuidas no homogéneamente a lo largo de la profundidad del cartílago articular [5]. Entre los PGs el agregano es el más predominante [6]. El monómero de agregano está compuesto en el núcleo de una proteína central la cual se une covalentemente con los glicosaminoglicanos (GAGs), el sulfato de condroitina (SC), queratán sulfato (QS) y oligosacaridos O- y N- ambos unidos[6]. Los monómeros de agregano interactúan con ácido hialurónico (AH) para formar agregados grandes que se estabilizan por las proteínas de enlace[6]. El agregano tiene abundantes cadenas polianiónicas hidrofílicas de QS, las cuales proporcionan resistencia al cartílago[6]. Estudios de articulaciones osteoartríticas han mostrado pérdida de agregano y QS en cartílagos articulares anormales[6].

La matriz extracelular (MEC) del cartílago articular es estructuralmente anisótropa y mecánicamente no es homogénea[7]. Presenta variaciones en la composición, la arquitectura de las fibras de colágeno, y en la morfología de la matriz pericelular (MPC) entre las zonas superficial, media y profunda [8].

El cartílago tiene un peso húmedo, en donde el fluido del tejido constituye casi el 80% de peso y el colágeno y los PGs constituyen el 60-80% y 20-40% de peso. [5].

Los PGs son los que resisten la deformación del cartílago durante la carga estática y logran la amortiguación y la repartición de las presiones en los huesos, mientras

que las fibras de colágeno son las que modulan la rigidez compresiva dinámica y tensil del tejido [5, 9].

Por otra parte, el cartílago está formado por condrocitos[7], cuya función es la de renovar la MEC y de condroblastos [7] cuya función es segregar fibras colágenas y sustancia intercelular (GAGs) [1].

Debido a la carga de la articulación, los condrocitos se exponen a un entorno biomecánico complejo, donde sus propiedades mecánicas son relativas a su MEC y a su MPC[8].

La remodelación patológica de los PGs, puede conducir a enfermedades graves, como la artrosis o la artritis reumatoidea [8].

1. TIPOS DE CARTÍLAGO

Hay tres tipos de cartílago que son, el Hialino o Articular, el Fibroso o fibrocartílago y el Elástico[10]. El cartílago hialino, es un tejido conectivo aneural [3] que no contiene nervios ni vasos sanguíneos y no está calcificado [3, 11]. Su estructura es relativamente simple, con un solo tipo de células presentes. El cartílago hialino se ubica en los extremos ventrales de las costillas[12], en la laringe, la tráquea y los bronquios, y en la superficie articular de los huesos [3]. Está cubierto externamente por una membrana fibrosa, llamada pericondrio [13], excepto en los extremos articulares de los huesos y también donde se encuentra directamente debajo de la piel, es decir, las orejas y la nariz [10, 14]. Esta membrana contiene vasos que le proporcionan nutrición al cartílago y células mesenquimiales que junto a andamios, permiten la construcción del cartílago hialino en ingeniería [13].

El cartílago hialino está formado por condrocitos[7], que son las células que producen la matriz[15]. Estas células son pequeñas con forma redondeada o sin puntas[3, 10, 15], en grupos de dos o más en una matriz biológica granular o casi homogénea[10, 16].

La MEC es una red 3D muy compleja[17]. Las células se observan en las cavidades de la matriz [9] y tienen forma de lagunas[3, 9]; en torno a estas, la matriz está dispuesta en líneas concéntricas, como si se hubiera formado en

porciones sucesivas alrededor de las células del cartílago[3, 9]. Esto constituye la llamada cápsula del espacio[9].

Cada laguna se observa histológicamente ocupada por una sola célula[9], aunque las células durante su división pueden contener dos, cuatro u ocho células [9] y es lo que se conoce como un grupo isogénico.

La mayor parte de la matriz hialina del cartílago, se compone de SC [5, 18, 19]. El SC es un polisacárido ácido, compuesto por unidades repetidas de disacáridos de N-acetilgalactosamina y ácido glucurónico [6]. Es el mayor componente de los GAGs y forma aproximadamente el 2% del peso seco de la MEC[19].

El cartílago hialino puede dividirse en no articular y en articular[15]. El Cartílago hialino no articular se localiza en las fosas nasales[14], en los cartílagos aritenoideo, cricoideo y tiroideo, en los anillos de la tráquea, en los cartílagos de los bronquios, y en la inserción esternal de las extremidades de las costillas[10, 12] y se diferencia del cartílago hialino articular, ya que este no sufre desgaste debido al soporte de peso y en que los defectos inducidos son condrales y no osteocondrales[15].

Los condrocitos aislados de cartílago no articular contienen mayores cantidades de inclusiones de lípidos y glucógeno debido al metabolismo lento de este tejido[15]. Investigaciones han mostrado diferencias en la estructura de la MEC aisladas desde cartílagos obtenidos de sitios anatómicos que soportan cargas de compresión y aquellos que no lo hacen[15]. La presencia de adenosín trifosfato (ATP) indica la recuperación de la MEC del cartílago articular y al mismo tiempo, la degradación de cartílago de otros sitios[15].

El Cartílago hialino articular, es que recubre las superficies de las articulaciones móviles[3].

El Cartílago hialino, tiene propiedades como la permeabilidad hidrodinámica, suavidad de la superficie articular y la rigidez, la cual es la que le permite tener una buena capacidad en la compresión[20]. La rigidez es proporcionada por las uniones entre el colágeno, el AH y los PGs. La estructura molecular de los PGs

está formada por una proteína en la parte central unida a GAGs[6]. Para formar la matriz, un extremo de la proteína se une a un polímero de AH. Esta molécula a su vez es capaz de unirse hasta con 200 PGs. El colágeno se une a las cadenas laterales de los GAGs[6].

El cartílago hialino tiene múltiples funciones, como brindar soporte elástico a diferentes estructuras[21], incluyendo los bronquios, la membrana nictitante (tercer párpado), los puntos de inserción de los extremos ventrales de las costillas en el esternón y las superficies de las articulaciones[10]. La elasticidad permite absorber los impactos y es muy importante especialmente en las articulaciones[21]. Otra función es la reducción de la fricción, en la cual las articulaciones constituyen superficies lisas para que las articulaciones se deslicen al moverse en lugar de crear rozamiento[21]. Esto se observa en el caso de las superficies de los cóndilos femorales, que se pueden acomodar a las cavidades glenoideas de la tibia, para amortiguar los golpes al caminar y los saltos, lográndose prevenir el desgaste por rozamiento y los movimientos de la articulación evitándose el dolor [3].

El cartílago hialino cumple una función muy importante en el embrión, ya que constituye su esqueleto temporal[10]. El crecimiento intersticial del cartílago hialino está regulado por la actividad de los condrocitos en las placas de crecimiento epifisario[22], lo cual posibilita la elongación de los huesos largos incluyendo la proliferación, diferenciación y apoptosis [22]. Muchas hormonas y factores de crecimiento intervienen en la regulación de este proceso[22].

La interacción entre los componentes del cartílago hialino constituye una característica biomecánica compleja difícil de producir o de sustituir [18]. El cartílago hialino tiene limitada capacidad de autorepararse [20] [1, 23]

Otro tipo de cartílago, es el fibrocartílago, que es un tejido más duro[10]. Este es una forma de transición entre el tejido conectivo denso y el cartílago hialino [10], Presenta un alto contenido de fibras de colágeno tipo I [24] y actúa como un amortiguador, proporcionando robustez sin impedir el movimiento[10]. Este se encuentra en la sínfisis púbica, trompa de Eustaquio, anillos de los discos

intervertebrales y en algunos ligamentos [10]. Este se deriva de zonas de tejido conectivo denso y cuenta con una matriz intercelular compuesta por sustancia fundamental amorfa rica en GAGs sulfatados (sobre todo CS) y también por fibras. El fibrocartílago está compuesto de matriz intercelular y células cartilaginosas o condrocitos que son los encargados de mantener la matriz intercelular. En este tipo de cartílago, los condroblastos son los responsables de la producción de la matriz intercelular.

Finalmente el otro tipo de cartílago es el elástico o cartílago amarillo [10] que está formado por colágeno tipo II y muchas fibras elásticas [10], las cuales se ramifican y le dan gran flexibilidad soportando de esta manera la flexión repetida. Se encuentra en la epiglotis (parte de la laringe), el pabellón auricular (oído externo) y en las trompas de Eustaquio[10]. Su proteína principal es la elastina.

El cartílago elástico se origina a partir de tejido mesenquimático. El pericondrio, un tejido conjuntivo muy condensado, se localiza en la periferia del tejido, es muy delgado y no es fácil ver grupos isogénicos (grupos de 2 a 4 condrocitos) [24].

La elasticidad, es la propiedad que le permite cumplir la función al cartílago elástico, ya que le posibilita soportar la deformación en zonas corporales sometidas a una fuerte tensión mecánica permitiendo mantener la forma de la estructura en donde se encuentra[10].

La matriz del cartílago elástico se observa como un entretejido denso de finas fibras elásticas [10] que son basófilas. Posee muchos grupos isógenos axiales y poríferos. [24]

2. DEFECTOS QUE SE PUEDEN PRODUCIR EN EL CARTÍLAGO

En el cartílago se pueden producir diferentes tipos de defectos debido a traumas por exceso de carga mecánica [25], ablación de un tumor, abrasión debido a la edad [26], obesidad y genética[25], los cuales conducen a un dolor constante y a limitaciones funcionales de las articulaciones causando serios problemas a nivel médico y social [26]. Parece que pequeñas lesiones pueden afectar fuertemente la

estructura y función del cartílago articular promoviendo el desarrollo de artrosis [26].

La artrosis es una enfermedad degenerativa y compleja de la articulación sinovial[25, 27], donde el daño del cartílago inicia en sus primeras etapas[28, 29]. Se inicia por un fallo de la red de colágeno en la zona superficial[28] donde hay una degradación de la matriz[30]. El daño mecánico en la osteoporosis, está acompañado por esclerosis del hueso subcondral[30], la degeneración de las estructuras periarticulares, formación de osteofitos [29] y está caracterizado por fisuras que penetran más profundamente el cartílago hasta llegar al hueso subcondral [28, 30], en donde se cizalla el cartílago calcificado hasta la zona que se ve este[28]. Por esto los estudios actuales se han basado en cambios[31], como el engrosamiento de la placa del hueso subcondral y en las distribuciones de su mineralización para saber sobre el progreso y desarrollo de la artrosis[30, 31]. En la artrosis, en tejidos como la membrana sinovial, ocurren reacciones inflamatorias e inmunológicas que contribuyen al desarrollo de la patología articular[32].

Los resultados de investigaciones mostraron que en etapas avanzadas de la artrosis, es donde se produce el engrosamiento de la placa del hueso subcondral y se dan los cambios en las distribuciones de su mineralización [28].

Cuando se presenta una reducción de la densidad mineral ósea en el hueso Subcondral se puede producir osteoporosis y está relacionada a la artrosis[29]. La aceleración de la osteoporosis debido a la artrosis, es el resultado de la insuficiencia de estrógenos o de hueso subcondral anormal[29].

Estos defectos degenerativos, son debidos a la ausencia de nervios y vasos sanguíneos en los tejidos del cartílago articular[1, 26]. Por lo tanto, los procesos en la reparación de tejidos, como la inflamación y la formación de coágulos de fibrina no suceden cuando se producen defectos en el cartílago[26]. Sólo los condrocitos y sinoviocitos que residen en el entorno local, pueden rellenar los defectos por proliferación lenta y por la deposición de la matriz [26].

La mayoría de las lesiones degenerativas en el cartílago, se producen dentro de las zonas de apoyo del compartimento medial de la rodilla y pueden causar en los pacientes incapacidad funcional [31, 33] acompañada de dolor y deformidad[31]. Estas se relacionan no solo a la edad, sino también al deporte[34]. Se hicieron estudios y se encontraron que las deficiencias del cartílago fueron mayores en personas que no hacen deporte que las que lo hacen, en este caso en jóvenes entre 17 a 34 años[34]. El deporte de alto giro mostro una mayor relación con la degeneración del cartílago que los deportes de bajo pivote[34].

Otros defectos del cartílago que se producen, son a nivel del ánulo fibroso en enfermedades de discos intervertebrales, debido a la edad y degeneración de estructuras[35].

3. PROBLEMÁTICA EN LA REGENERACIÓN DE FIBROCARILAGO

La reparación del cartílago ha tenido varios inconvenientes, debido a que únicamente un 3-10% de su volumen está ocupado por condrocitos y el volumen de MEC que debe ser mantenido metabólicamente por un condrocito es muy alto. Otro problema es que los condrocitos carecen de capacidad para migrar, lo que dificulta su capacidad para autorepararse[9, 36].

La matriz del cartílago tiene un inconveniente, ya que presenta grandes diferencias debido a las localizaciones anatómicas y a las diferentes zonas de una misma superficie articular.

El daño del cartílago, casi siempre requiere de intervención quirúrgica[1]. Entre las técnicas que se manejan se encuentran, la perforación subcondral, artroplastia de abrasión, implantación de tejido o de condrocitos autólogos [26]y reemplazo de la articulación protésica, las cuales se han utilizado para acelerar la curación del cartílago[1]. Sin embargo, estos tratamientos han tenido limitaciones debido al tiempo de vida útil de la prótesis, ya que tiene una duración limitada, la ausencia de implantes adecuados o la limitación de la movilidad de la zona donante[1].

En los defectos profundos del cartílago, en el hueso subcondral, tanto las células de la médula ósea, como las células contenidas en la sangre, pueden migrar a la superficie articular por sangrado llenando los huecos con una rápida proliferación y logrando la síntesis de la matriz[26]. Sin embargo, la matriz recién sintetizada es generalmente fibrosa[26]. Y el cartílago fibroso es inferior al cartílago hialino en cuanto a sus propiedades mecánicas[26, 37]. Esto es un problema, ya que en zonas donde se requiere una mayor resistencia a la compresión, como en los miembros inferiores, se necesita un buen soporte de carga.

Otro problema en la regeneración del cartílago, es a nivel de ingeniería de tejidos, ya que el crecimiento y maduración del biomaterial implantado en un entorno como la rodilla, debe ser muy rápido, pues este necesita soportar picos de fuerza que pueden ser siete veces los del peso corporal en donde la articulación puede sufrir un promedio de 5000 ciclos de carga durante las actividades diarias normales[37].

4. APROXIMACIONES CLÍNICAS ACTUALES

Actualmente, médicos y científicos han estado investigando y desarrollando nuevas técnicas para reemplazar las partes dañadas o sustituirlas regenerando el cartílago[26]. Entre las opciones quirúrgicas disponibles para tratar lesiones condrales profundas, están las técnicas de estimulación de la médula ósea en el tratamiento de microfracturas, terapias con condrocitos donde se implantan condrocitos autólogos y las terapias de reemplazo de tejidos como el trasplante autólogo osteocondral [33].

Según estudios, el tratamiento de microfractura y de trasplante autólogo osteocondral son adecuados para tratar lesiones condrales que se extienden hasta el hueso subcondral en tamaños menores a 2 y 4 cm²[33]. La implantación de condrocitos autólogos es un método adecuado para el tratamiento de lesiones condrales sintomáticas de más de 2 cm² en adultos, incluyendo los de 50 años de edad[33]. Los resultados no han mostrado diferencias significativas en cuanto a la eficacia del tratamiento de microfractura[33]. Las investigaciones revelaron que la

implantación de condrocitos autólogos y el trasplante autólogo osteocondral para defectos pequeños, muestran buenos resultados clínicos y funcionales a corto y mediano plazo[33].

Nuevas técnicas de segunda y tercera generación de implantes de condrocitos autólogos, parece ser actualmente la opción más sostenible de reparación de los tejidos y de mejores resultados clínicos a largo plazo para lesiones mayores de 4 cm², en comparación con el tratamiento de microfractura[33].

En el caso de la artrosis, se han venido estudiando y utilizando células adiposas derivadas de células madres obtenidas de conejos, para ver si se logra atenuar la progresión de la activación sinovial y la destrucción articular para mejorar el daño del cartílago [32].

Para acelerar la maduración del cartílago articular y poder ver sus características morfológicas y moleculares, se están haciendo ensayos en vivo combinando el factor de crecimiento de fibroblastos-2 (FCF-2) y el factor de crecimiento β 1-transformante (FCT- β 1)[37].

Para el tratamiento de los daños en los discos intervertebrales, se ha manejado las propiedades anabólicas de factores bioactivos sobre la formación de la matriz cartilaginosa por células del anulo fibroso[35].

Las células humanas del anulo fibroso, fueron obtenidas del tejido anulo fibroso lumbar degenerado y expandido en cultivo monocapa [35]. La diferenciación celular anulo fibroso y formación de la matriz fue iniciada mediante la formación de cultivos de pellets y estimulación con AH, suero humano, FCF-2, el factor de crecimiento β 3-transformante (FCT- β 3) y FCT- β 3/ FCF-2 hasta más de 4 semanas[35].

Los resultados mostraron que las células anulo fibroso estimuladas con suero humano, FCF-2 y más pronunciada con FCT - β 3 o FCT- β 3/ FCF-2 formaron una matriz cartilaginosa con una expresión significativamente mayor de las moléculas de la matriz y de la metaloproteinasa-13 (MTP-13)[35]. La estimulación de las células del anulo fibroso con FCT- β 3 fue acompañada por la inducción de

colágeno tipo X, sabiendo que las células del cartílago hipertrófico tienen un potencial de mineralización[35]. El AH no mostró ninguna característica condroinductiva[35]. Estos hallazgos sugieren que el suero humano, el FCF -2 y el FCT - β 3 como posibles candidatos para apoyar las estrategias de tratamiento biológico de los defectos del anillo fibroso[35].

A pesar de que los factores de crecimiento promueven una rápida maduración del cartílago mejorando ante todo en el caso de la rodilla el soporte de fuerzas durante las actividades de la vida diaria, tienen un problema, ya que pueden producir cáncer. Estudios han mostrado que el uso de factores de crecimiento de fibroblastos no solo pueden desarrollarlo, sino que pueden producir enfermedades en el esqueleto [38].

Otros estudios mostraron que el uso de factores de crecimiento transformante, en la regeneración de hueso en pacientes con cáncer de próstata, puede amplificar la capacidad de invasión celular en vivo y en vitro, estimulando la producción de células tumorales de moduladores bioquímicos conocidos[39].

Debido a lo anterior, actualmente se han estado haciendo investigaciones sobre materiales que den soluciones a estos problemas, para evitar el uso de estos factores de crecimiento, que logren no solo la regeneración del cartílago, sino el restablecimiento de sus funciones.

5. APROXIMACIONES EXPERIMENTALES DE INGENIERÍA DE TEJIDOS

La ingeniería de tejidos, ha sido una de las mejores alternativas para mejorar la reparación, regeneración, funcionalidad e integridad del tejido del cartílago dañado[1, 9, 40]. La ingeniería del hueso Subcondral busca la regeneración de los tejidos óseos en los casos donde la lesión es muy grande y los tejidos no pueden regenerarse por sí mismos[40] debido a tumores óseos, traumatismos que resultan en fracturas óseas, artrosis, osteoporosis, entre otros[40].

La ingeniería de tejidos del cartílago, permite evaluar poblaciones celulares apropiadas, señales celulares necesarias y materiales adecuados como andamios

biodegradables 3D [9] que actúan como una plataforma biomimética para los condrocitos[37], estimulando adhesión celular, proliferación y reconstrucción del tejido[1, 40].

La elección de los andamios es fundamental para lograr los objetivos de la ingeniería de cartílago[9, 40], ya que un buen biomaterial debe proporcionar adecuadas propiedades biomecánicas, de biocompatibilidad y un ambiente favorable para la unión de las células[9].

A pesar de lo anterior, actualmente todavía no se ha podido llegar a obtener el andamio deseado que repare el tejido del cartílago y que cumpla totalmente con sus funciones de matriz extracelular[1].

6. MATERIALES QUE SE ESTÁN UTILIZANDO

Muchos biomateriales biodegradables naturales y sintéticos han sido estudiados y utilizados para la construcción de andamios porosos en ingeniería del tejido del cartílago[1].

Entre los materiales utilizados como andamios, se ha utilizado sustitutos cerámicos debido a su bioactividad, a su unión directa al hueso y a su osteoinductividad, ya que promueven la generación de células óseas funcionales a partir de células madres indiferenciadas [40].

Actualmente se está utilizando la nano-hidroxiapatita, la cual tiene una excelente bioactividad, alta biocompatibilidad, fuerte plasticidad y excelentes propiedades mecánicas. Esta ha sido introducida en materiales biodegradables como un andamio ideal en ingeniería de tejido de hueso y cartílago[1]

Cuando se combina la nano-hidroxiapatita con otros materiales, la naturaleza hidrófila del colágeno puede mejorar la humectabilidad y la permeabilidad de los materiales, logrando ser un medio de cultivo favorable para adhesión celular[1].

Los resultados de investigaciones, han demostrado que la nano-hidroxiapatita combinada con otros materiales es capaz de mejorar las propiedades mecánicas de andamios[1].

Otros tipos de andamios utilizados en ingeniería del cartílago, son matrices acelulares de cartílagos, colágeno I, biopolímeros como el ácido poliláctico, el ácido poliglicólico[9], alginato, AH, hidrogeles peptídicos, entre otros [41].

Las hojas acelulares de cartílago y la estructura de los componentes naturales de tejido conservados, se han aplicado con éxito en la ingeniería del cartílago, junto con condrocitos maduros o médula ósea procedentes de células madre mesenquimales[32], utilizando un enfoque modelo sándwich[9]. Sin embargo, los procesos para la preparación de hojas acelulares de cartílago son complicados, ya que se dificulta obtener hojas acelulares de cartílago grandes[9].

Otro material que se está estudiando actualmente para compuestos es el estroncio (Sr), el cual puede influir en el cartílago del hueso subcondral debido a sus propiedades mecánicas y biológicas logrando un gran avance en el tratamiento médico de la artrosis[27]. Para el manejo de la artrosis y la osteoporosis, se está utilizando el relanato de estroncio que es un fármaco que actúa en la remodelación de hueso Subcondral[42]. Este se basa en proporcionar efectos opuestos en formación y regeneración ósea[27]. En estudios de la osteoporosis posmenopáusica, el estroncio mostro una reducción de fracturas vertebrales, no vertebrales y de cadera en pacientes entre 50 y 65 años, entre 70 y 80 años, mayores de 80 años y en pacientes sin fractura prevalente[27].

El relanato de estroncio, puede aumentar la replicación de preosteoblastos, la diferenciación de osteoblastos, la síntesis de colágeno tipo I [43]y la mineralización de la matriz ósea[42].

En modelos celulares y moleculares de la artrosis, el estroncio impidió la resorción del hueso subcondral y estimuló la síntesis de la matriz del cartílago[27]. Se hicieron experimentaciones en vivo en perros [43] donde se logró reducir el

progreso de la artrosis mediante la inhibición de la expresión de los mediadores de la degradación del cartílago y la esclerosis ósea[27].

Las mujeres tratadas con estroncio en osteoporosis posmenopáusica, los marcadores biológicos de la degradación del cartílago fueron reducidos significativamente y la progresión radiológica de la artrosis vertebral fue disminuida[27].

En estos momentos, se está haciendo pruebas con estroncio en etapas avanzadas (fase III) de la artrosis por su capacidad para reducir la progresión de la artrosis de rodilla y mejorar los síntomas de esta[27].

Aunque la administración del relanato de estroncio vía oral ha mostrado buenos resultados, tiene varios inconvenientes, ya que puede producir un nivel de dosis de estroncio en el plasma, absorción gastrointestinal, duración del tratamiento y limitación en la sustitución del calcio (Ca) por Sr en la apatita en el sitio esquelético debido a las dosis farmacológicas[44]. Otros estudios han mostrado que el relanato de estroncio no presenta una indicación clara en la prevalencia de formas orgánicas de estroncio sobre las inorgánicas[45]. La administración de una dosis prolongada de estroncio puede acumular Sr en el borde y dentro del hueso[45].

7. DESARROLLO DE ANDAMIOS Y MATERIALES PARA REGENERACIÓN DE CARTÍLAGO SUBCONDRA

Entre los injertos, ha sido una muy buena opción la hidroxiapatita ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$), esta biocerámica bioactiva es el compuesto más parecido al componente mineral de los huesos[40, 46-48]. Tiene la capacidad de proporcionar Ca y fosfato (PO_4) para la mineralización de la matriz [46].

Resultados de investigaciones, han mostrado que los mecanismos de formación de hidroxiapatita en la primera etapa, implican la adsorción de iones de Ca^{2+} sobre el sustrato cargado negativamente seguido por la unión de iones fósforo (P) al

Ca^{2+} absorbido formando una capa de hidroxiapatita[46]. Las uniones del Ca^{2+} al P se atribuyeron a los grupos hidroxilos(OH-)[46].

La hidroxiapatita es osteoconductiva ya que permite ser invadida por tejido conectivo[40], manteniendo en su interior las características de su origen, presentando muy buena biocompatibilidad con las demás estructuras[49, 50], no toxicidad y estabilidad termodinámica[51].

La hidroxiapatita se puede utilizar en polímeros, ya que presenta buena adherencia a los recubrimientos de estos, debido a que adsorbe muy bien moléculas orgánicas[51]. En el caso del quitosano, estudios demostraron que la incorporación de hidroxiapatita mejora la osteoconductividad y ayuda a aumentar la proliferación y la mineralización de osteoblastos cultivados[52].

Aunque la hidroxiapatita tiene excelentes propiedades, su uso se ha limitado, ya que ha presentado deficiencias mecánicas[49], pues la estructura de esta es quebradiza y puede sufrir rupturas en zonas donde se requiere un mayor soporte de carga. Debido a esto para el uso de la hidroxiapatita en la regeneración de cartílago y de hueso subcondral, se han estado estudiando y utilizando diferentes reactivos que puedan introducir iones [44, 48] para sustituir parte del Ca ayudando a reforzar la hidroxiapatita y mejorando sus propiedades. Entre los iones utilizados que reemplazan el Ca en la estructura de la hidroxiapatita se encuentran el Sr^{2+} , magnesio (Mg^{2+})[44] y silicio (Si^{4+})[46].

Debido a lo anterior, decidimos trabajar con acetato de estroncio ($\text{C}_4\text{H}_6\text{O}_4\text{Sr} \cdot \frac{1}{2} \text{H}_2\text{O}$) para introducir el Sr en la hidroxiapatita.

El Sr es un polvo cristalino de color blanco, que está presente en la fase mineral del hueso, especialmente en las regiones de alto recambio metabólico[53]. Este proporciona excelentes efectos para el crecimiento del hueso y tiene la capacidad de reducir la resorción ósea[44, 48, 54]. El Sr estimula la producción de colágeno [53] proporcionando resistencia a las fuerzas de comprensión [47, 50] y tiene otras propiedades como la solubilidad, no toxicidad y biocompatibilidad[55].

Resultados de estudios muestran que el Sr en la hidroxiapatita proporciona una alta solubilidad, una mayor resistencia a las fuerzas de compresión (similar a la del hueso sano humano), mejor osteointegración de implantes [47], mayor osteocompatibilidad que la hidroxiapatita sola [49], buena adhesión y proliferación celular sin presentar ningún efecto que perjudique la mineralización y formación de la matriz extracelular[47]. También se encontró que el Sr en la hidroxiapatita, mejora el crecimiento, la cristalinidad [47] y composición del cristal de hidroxiapatita[46]. Otros resultados muestran que la sustitución del Ca por Sr en la hidroxiapatita presenta un mayor módulo de Young que la hidroxiapatita pura[49].

Actualmente, se están haciendo investigaciones sobre materiales que se comporten como la MEC en ingeniería de tejido del cartílago, entre estos el quitosano ha sido una buena opción, ya que presenta propiedades como biocompatibilidad, biodegradabilidad y no citotoxicidad[52]. También presenta una alta afinidad a las células óseas y su estructura es similar a los GAGs[52]. Tiene una ventaja ya que tiene un bajo costo [41]. Estudios han mostrado que el quitosano y sus productos degradados intervienen en la síntesis de componentes articulares, incluyendo SC, AH, QS, y colágeno tipo II [41]. El quitosano presenta una naturaleza catiónica que se produce a partir de los grupos amino primario y proporciona una alta densidad de carga en una solución ácida[41]. Esta naturaleza catiónica le permite al quitosano entregar polianiones biológicamente activos como el DNA y GAGs[41].

Como la MEC necesita ser altamente hidrofílica y elástica se han venido buscando materiales que ayuden a mejorar estas propiedades. Es por esta razón que se quiso sintetizar y caracterizar el lactato de quitosano para construir un andamio 3D y ver los resultados.

Con respecto a lo anterior, con un andamio donde el Sr sustituya parte del Ca en la estructura de la apatita más el lactato de quitosano, se lograría obtener un cartílago elástico y duro, ya que el estroncio dentro de la apatita permitiría reforzar

el lactato de quitosano en una arquitectura 3D en la regeneración de cartílago y hueso Subcondral en ingeniería.

8. REFERENCIAS

- [1] Jia L, Duan Z, Fan D, Mi Y, Hui J, Chang L. Human-like collagen/nano-hydroxyapatite scaffolds for the culture of chondrocytes. *Materials Science and Engineering C*. 2013;33:727-34.
- [2] Redler LH, Caldwell JM, Schulz BM, Levine WN. Management of articular cartilage defects of the knee. *Physician and Sportsmedicine*. 2012;40:20-35.
- [3] Remya NS, Nair PD. Engineering cartilage tissue interfaces using a natural glycosaminoglycan hydrogel matrix - An in vitro study. *Materials Science and Engineering C*. 2013;33:575-82.
- [4] Bentley G, Bhamra JS, Gikas PD, Skinner JA, Carrington R, Briggs TW. Repair of osteochondral defects in joints-How to achieve success. *Injury*. 2013;44:S3-S10.
- [5] Halonen KS, Mononen ME, Jurvelin JS, Töyräs J, Korhonen RK. Importance of depth-wise distribution of collagen and proteoglycans in articular cartilage-A 3D finite element study of stresses and strains in human knee joint. *Journal of Biomechanics*. 2013.
- [6] Srichamroen A, Nakano T, Pietrasik Z, Ozimek L, Betti M. Chondroitin sulfate extraction from broiler chicken cartilage by tissue autolysis. *LWT - Food Science and Technology*. 2013;50:607-12.
- [7] Lu C, Wan Y, Cao J, Zhu X, Yu J, Zhou R, et al. Wnt-mediated reciprocal regulation between cartilage and bone development during endochondral ossification. *Bone*. 2013.
- [8] Pudlas M, Brauchle E, Klein TJ, Hutmacher DW, Schenke-Layland K. Non-invasive identification of proteoglycans and chondrocyte differentiation state by Raman microspectroscopy. *Journal of Biophotonics*. 2013;6:205-11.
- [9] Xue J, Feng B, Zheng R, Lu Y, Zhou G, Liu W, et al. Engineering ear-shaped cartilage using electrospun fibrous membranes of gelatin/polycaprolactone. *Biomaterials*. 2013;34:2624-31.

- [10] lo Iacono M, Anzalone R, Corrao S, Giuffrè M, di Stefano A, Giannuzzi P, et al. Perinatal and wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells in cartilage regenerative medicine and tissue engineering strategies. *Open Tissue Engineering and Regenerative Medicine Journal*. 2011;4:72-81.
- [11] Maier JA, Lo YT, Harfe BD. Foxa1 and Foxa2 Are Required for Formation of the Intervertebral Discs. *PLoS ONE*. 2013;8.
- [12] Ellis H. The ribs and intercostal spaces. *Anaesthesia and Intensive Care Medicine*. 2008;9:518-9.
- [13] Sterodimas A, De Faria J. Human auricular tissue engineering in an immunocompetent animal model. *Aesthetic Surgery Journal*. 2013;33:283-9.
- [14] Yenigun A, Meric A, Verim A, Ozucer B, Yasar H, Ozkul MH. Septal perforation repair: Mucosal regeneration technique. *European Archives of Oto-Rhino-Laryngology*. 2012;269:2505-10.
- [15] de Campos Ciccone C, Zuzzi DC, Neves LMG, Mendonça JS, Joazeiro PP, Esquisatto MAM. Effects of microcurrent stimulation on Hyaline cartilage repair in immature male rats (*Rattus norvegicus*). *BMC Complementary and Alternative Medicine*. 2013;13.
- [16] Nam J, Perera P, Rath B, Agarwal S. Dynamic regulation of bone morphogenetic proteins in engineered osteochondral constructs by biomechanical stimulation. *Tissue Engineering - Part A*. 2013;19:783-92.
- [17] Coburn JM, Gibson M, Monagle S, Patterson Z, Elisseeff JH. Bioinspired nanofibers support chondrogenesis for articular cartilage repair. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2012;109:10012-7.
- [18] Marcacci M, Filardo G, Kon E. Treatment of cartilage lesions: What works and why? *Injury*. 2013;44:S11-S5.
- [19] Tamaddon M, Walton RS, Brand DD, Czernuszka JT. Characterisation of freeze-dried type II collagen and chondroitin sulfate scaffolds. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*. 2013:1-13.
- [20] Ye K, Di Bella C, Myers DE, Choong PF. The osteochondral dilemma: Review of current management and future trends. *ANZ Journal of Surgery*. 2013.

- [21] Edelsten L, Jeffrey JE, Burgin LV, Aspden RM. Viscoelastic deformation of articular cartilage during impact loading. *Soft Matter*. 2010;6:5206-12.
- [22] Elbaradie KBY, Wang Y, Boyan BD, Schwartz Z. Sex-specific response of rat costochondral cartilage growth plate chondrocytes to 17 β -estradiol involves differential regulation of plasma membrane associated estrogen receptors. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*. 2013;1833:1165-72.
- [23] Saha S, Kirkham J, Wood D, Curran S, Yang XB. Informing future cartilage repair strategies: a comparative study of three different human cell types for cartilage tissue engineering. *Cell and Tissue Research*. 2013:1-13.
- [24] Kawase T, Shibata S, Katori Y, Ohtsuka A, Murakami G, Fujimiya M. Elastic fiber-mediated entheses in the human middle ear. *Journal of Anatomy*. 2012;221:331-40.
- [25] Salter Prof DM, Lee HS. Pathology and risk factors in osteoarthritis. *Journal of Medical Sciences (Taiwan)*. 2012;32:199-207.
- [26] Wu L, Cai X, Zhang S, Karperien M, Lin Y. Regeneration of articular cartilage by adipose tissue derived mesenchymal stem cells: Perspectives from stem cell biology and molecular medicine. *Journal of Cellular Physiology*. 2013;228:938-44.
- [27] Reginster JY, Pelousse F, Bruyère O. Is there potential for strontium ranelate in the management of osteoarthritis? *Clinical Practice*. 2013;10:201-7.
- [28] Anetzberger H, Mayer A, Glaser C, Lorenz S, Birkenmaier C, Müller-Gerbl M. Meniscectomy leads to early changes in the mineralization distribution of subchondral bone plate. *Knee Surgery, Sports Traumatology, Arthroscopy*. 2012:1-8.
- [29] Zhu S, Chen K, Lan Y, Zhang N, Jiang R, Hu J. Alendronate protects against articular cartilage erosion by inhibiting subchondral bone loss in ovariectomized rats. *Bone*. 2013;53:340-9.
- [30] Afara IO, Prasadam I, Crawford R, Xiao Y, Oloyede A. Near infrared (NIR) absorption spectra correlates with subchondral bone micro-CT parameters in osteoarthritic rat models. *Bone*. 2013;53:350-7.

- [31] Wang CJ, Sun YC, Siu KK, Wu CT. Extracorporeal shockwave therapy shows site-specific effects in osteoarthritis of the knee in rats. *Journal of Surgical Research*. 2013.
- [32] van Lent P, van den Berg W. Mesenchymal stem cell therapy in osteoarthritis: Advanced tissue repair or intervention with smouldering synovial activation? *Arthritis Research & Therapy*. 2013.
- [33] van der Linden MH, Saris D, Bulstra SK, Buma P. [Treatment of cartilaginous defects in the knee: recommendations from the Dutch Orthopaedic Association]. *Behandeling van kraakbeendefecten in de knie: advies van de Nederlandse Orthopaedische Vereniging*. 2013;157.
- [34] Spahn G, Wolf J, Hofmann GO, Schiele R. Prevalence and Distribution of Knee Cartilage Lesions in Sportspersons and Non-Sportspersons: Results of a Retrospective Arthroscopic Study. *Häufigkeit und Verteilung von Knorpelschäden des Kniegelenks bei Sportlern und Nicht-Sportlern: Ergebnisse einer retrospektiven arthroskopischen Studie*. 2013.
- [35] Hegewald AA, Zouhair S, Endres M, Cabraja M, Woiciechowsky C, Thomé C, et al. Towards biological anulus repair: TGF- β 3, FGF-2 and human serum support matrix formation by human anulus fibrosus cells. *Tissue and Cell*. 2013;45:68-76.
- [36] Park H, Choi B, Hu J, Lee M. Injectable chitosan hyaluronic acid hydrogels for cartilage tissue engineering. *Acta Biomaterialia*. 2013;9:4779-86.
- [37] Khan IM, Francis L, Theobald PS, Perni S, Young RD, Prokopovich P, et al. In vitro growth factor-induced bio engineering of mature articular cartilage. *Biomaterials*. 2013;34:1478-87.
- [38] Dailey L, Ambrosetti D, Mansukhani A, Basilico C. Mechanisms underlying differential responses to FGF signaling. *Cytokine and Growth Factor Reviews*. 2005;16:233-47.
- [39] Karamanolakis D, Bogdanos J, Sourla A, Milathianakis C, Tsintavis A, Lembessis P, et al. Molecular evidence-based use of bone resorption-targeted therapy in prostate cancer patients at high risk for bone involvement. *Molecular Medicine*. 2002;8:667-75.

- [40] Deplaine H, Lebourg M, Ripalda P, Vidaurre A, Sanz-Ramos P, Mora G, et al. Biomimetic hydroxyapatite coating on pore walls improves osteointegration of poly(L-lactic acid) scaffolds. *Journal of Biomedical Materials Research - Part B Applied Biomaterials*. 2013;101 B:173-86.
- [41] Kim SE, Park JH, Cho YW, Chung H, Jeong SY, Lee EB, et al. Porous chitosan scaffold containing microspheres loaded with transforming growth factor- β 1: Implications for cartilage tissue engineering. *Journal of Controlled Release*. 2003;91:365-74.
- [42] Yu DG, Ding HF, Mao YQ, Liu M, Yu B, Zhao X, et al. Strontium ranelate reduces cartilage degeneration and subchondral bone remodeling in rat osteoarthritis model. *Acta Pharmacologica Sinica*. 2013;34:393-402.
- [43] Pelletier JP, Kapoor M, Fahmi H, Lajeunesse D, Blesius A, Maillet J, et al. Strontium ranelate reduces the progression of experimental dog osteoarthritis by inhibiting the expression of key proteases in cartilage and of IL-1 β in the synovium. *Annals of the Rheumatic Diseases*. 2013;72:250-7.
- [44] Landi E, Uggeri J, Medri V, Guizzardi S. Sr, Mg cosubstituted HA porous macro-granules: Potentialities as resorbable bone filler with antiosteoporotic functions. *Journal of Biomedical Materials Research - Part A*. 2013.
- [45] Jabłoński MB, Stefaniak EA, Darchuk L, Turzańska K, Gorzelak M, Kuduk R, et al. Microchemical investigation of bone derived from mice treated with strontium in different chemical forms using scanning electron microscopy and micro-Raman spectroscopy. *Microchemical Journal*. 2013;108:168-73.
- [46] Lindahl C, Engqvist H, Xia W. Effect of strontium ions on the early formation of biomimetic apatite on single crystalline rutile. *Applied Surface Science*. 2013;266:199-204.
- [47] Ravi ND, Balu R, Sampath Kumar TS. Strontium-substituted calcium deficient hydroxyapatite nanoparticles: Synthesis, characterization, and antibacterial properties. *Journal of the American Ceramic Society*. 2012;95:2700-8.
- [48] Pereiro I, Rodríguez-Valencia C, Serra C, Solla EL, Serra J, González P. Pulsed laser deposition of strontium-substituted hydroxyapatite coatings. *Applied Surface Science*. 2012;258:9192-7.

- [49] Ozeki K, Hoshino T, Aoki H, Masuzawa T. Phase Composition of Sputtered Film from a Mixture Target of Hydroxyapatite and Strontium-apatite. *Journal of Materials Science and Technology*. 2013;29:1-6.
- [50] Boanini E, Torricelli P, Fini M, Sima F, Serban N, Mihailescu IN, et al. Magnesium and strontium doped octacalcium phosphate thin films by matrix assisted pulsed laser evaporation. *Journal of Inorganic Biochemistry*. 2012;107:65-72.
- [51] Hiromoto S, Yamamoto A. High corrosion resistance of magnesium coated with hydroxyapatite directly synthesized in an aqueous solution. *Electrochimica Acta*. 2009;54:7085-93.
- [52] Van Hong Thien D, Hsiao SW, Ho MH, Li CH, Shih JL. Electrospun chitosan/hydroxyapatite nanofibers for bone tissue engineering. *Journal of Materials Science*. 2013;48:1640-5.
- [53] Capuccini C, Torricelli P, Boanini E, Gazzano M, Giardino R, Bigi A. Interaction of Sr-doped hydroxy apatite nanocrystals with osteoclast and osteoblast-like cells. *Journal of Biomedical Materials Research - Part A*. 2009;89:594-600.
- [54] Aina V, Lusvardi G, Annaz B, Gibson IR, Imrie FE, Malavasi G, et al. Magnesium- and strontium-co-substituted hydroxyapatite: the effects of doped-ions on the structure and chemico-physical properties. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*. 2012;23:2867-79.
- [55] Hulsart-Billström G, Xia W, Pankotai E, Weszl M, Carlsson E, Forster-Horváth C, et al. Osteogenic potential of Sr-doped calcium phosphate hollow spheres in vitro and in vivo. *Journal of Biomedical Materials Research - Part A*. 2013.

CAPÍTULO 2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

HIPÓTESIS

¿Si un andamio donde el estroncio sustituya parte del calcio en la estructura de la apatita más lactato de quitosano en una arquitectura 3D lograra la regeneración de Hueso Subcondral?

OBJETIVO DEL PROYECTO

La regeneración del cartílago hialino dañado no se produce de forma natural por falta de material biológico.

El objetivo de este proyecto es desarrollar un material que sea eficaz en la regeneración de cartílago subcondral y su interfaz con el cartílago hialino para evitar la necesidad de profundizar el daño al cartílago. Se preparará un dispositivo tridimensional con dos secciones diferenciadas. La parte más profunda estará basada en hidroxiapatita enriquecida con estroncio y la parte en contacto con el tejido hialino estará basada en lactato de quitosano.

OBJETIVOS PARTICULARES

1. OBJETIVOS EN LA PREPARACION DE APATITA Y APATITA CON DOSIS BAJAS DE ESTRONCIO

- SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE APATITA Y APATITA ENRIQUECIDA EN Sr.
- DIFERENTES RELACIONES Ca/Sr.
- ENSAYOS CELULARES PARA VER LA VIABILIDAD CELULAR CON CÉLULAS OSTEOLÁSTICAS DERIVADAS DE LA LÍNEA CELULAR HUMANA DE MG-63.
- ENSAYOS CELULARES CON OSTEOLÁSTOS FETALES HUMANOS Y CÉLULAS MADRE HUMANAS AISLADAS DE MÉDULA ÓSEA EN MEDIO NO OSTEOLÁSTICO Y OSTEOLÁSTICO PARA IDENTIFICAR MINERALIZACIÓN.

2. OBJETIVOS EN LA PREPARACIÓN DEL LACTATO DE QUITOSANO

- SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DEL LACTATO DE QUITOSANO.
- ENSAYOS CELULARES PARA VER LA VIABILIDAD CELULAR.

CAPÍTULO 3. PREPARACIÓN DE APATITA ENRIQUECIDA CON ESTRONCIO

1. INTRODUCCIÓN

A través de los años, debido a deficiencias del esqueleto humano por traumas, tumores o mal desarrollo, se ha venido tratando de buscar soluciones para reemplazar las partes dañadas o sustituirlas regenerando el hueso. Las que se han venido manejando obteniéndose muy buenos resultados son los injertos o sustitutos de huesos, que según Muschler y Lane, son cualquier material implantado que de forma aislada o en combinación con otros materiales, promueve la respuesta de consolidación ósea aportando actividad osteogénica, osteoconductora y osteoinductora en una zona localizada [1].

Entre los injertos artificiales, ha sido una muy buena opción la hidroxiapatita ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) [2-5], una de las sales de fosfato de calcio insoluble y bioactiva [6-9], que es el mineral constituyente de tejidos humanos duros como lo son huesos y dientes (aproximadamente el 50% en peso de los tejidos duros se compone de iones de calcio y fosfato) [10-18]. Esta se comporta como una estructura osteoconductiva [6] que permite ser invadida por tejido conectivo proveniente del hueso circundante para más adelante osificarse, manteniendo en su interior las características de su origen, presentando muy buena biocompatibilidad con las demás estructuras, no toxicidad y estabilidad química [10, 12, 19, 20].

Debido a su estructura quebradiza y frágil[4], esta biocerámica necesita mejorar sus propiedades mecánicas en zonas donde se requiere un mayor soporte de carga [21, 22]. Es por esta razón que introducir iones de silicio (Si^{2+}), magnesio (Mg^{2+}), estroncio (Sr^{2+}), carbonato (CO_3^{2-}), zinc (Zn^{2+}), cerio (Ce^{3+}), lantano (La^{3+}), itrio (Y^{3+}), entre otros, en la estructura de la hidroxiapatita (HA)[23-25], ha sido de gran ayuda para mejorar lo anterior, aportando además otras propiedades como la capacidad de intercambio de iones, capacidad de adsorción de proteínas [26, 27] o mejorando las propiedades de la hidroxiapatita a nivel mecánico como la resistencia [28] y biológico como la no citotoxicidad [25], biocompatibilidad, bioactividad, osteoconductividad [29], adhesión celular, proliferación de osteoblastos [18], promover la expresión de genes relacionados con osteoblastos, fosfatasa alcalina y células madres mesenquimales [26, 30, 31] y mejora la

solubilidad [29, 32] y la estabilidad térmica de la HA [33, 34]. Por esta razón se buscó introducir en este proyecto el estroncio en la estructura de la apatita sin que esta tuviera alteración. El estroncio es un polvo cristalino blanco que además de reforzar la HA, interviene en la biomineralización del hueso [23] y permite el crecimiento de los osteoblastos en su superficie logrando un mejor desarrollo de la matriz extracelular [35] en el tratamiento de la osteoporosis [23, 24]. El 98% del contenido total de Sr^{2+} en el cuerpo se pueden encontrar en el esqueleto [36]. El estroncio tiene muy buenas propiedades tales como la solubilidad, no toxicidad, biocompatibilidad, resistencia a la flexión y resistencia al impacto [35, 37, 38]. Actualmente se han estado sintetizando andamios de estroncio apatita de diferentes proporciones, dando resultados que varían según las dosis de Sr^{2+} . Si son bajas las dosis, mejora la replicación de las células pre-osteoblásticas y estimula la formación de hueso [33]. Si la dosis es alta, induce defecto de mineralización ósea [33]. Por lo tanto, la dosis de Sr^{2+} es un factor importante para la formación de hueso [33].

Investigadores han utilizado concentraciones de Sr^{2+} entre el 3% y 7%, donde los resultados mostraron una alta actividad y diferenciación celular para el 7% de concentración de Sr^{2+} [35]. Otros han trabajado con concentraciones de Sr^{2+} del 2, 5, 10 and 15 % mol donde llegaron a la conclusión de que entre mayor la dosis de Sr en la apatita, se disminuye el tamaño del cristal [39]. Otros investigadores trabajaron con el 5 y 10% de sustitución de Sr^{2+} en la apatita deficiente en Ca y tuvieron como resultados que el Sr en la apatita aumenta su estabilidad térmica e incrementa el volumen celular [40]. Otras sustituciones que se han manejado son las de 2.5, 5, 7.5 and 10 % de Sr en la hidroxiapatita, los cuales dieron como resultado un aumento en los parámetros de red [41].

En este proyecto se hicieron ensayos con diferentes proporciones de Sr^{2+} probando desde dosis altas del 100, 80, 50 y de 20% de Sr^{2+} hasta dosis más bajas del 0, 5, 10 y 15% de Sr^{2+} . Se espera que estas sustituciones de Sr^{2+} en la apatita, ayude a la regeneración de cartílago y hueso Subcondral en ingeniería.

2. OBJETIVOS DE ESTE CAPÍTULO

El objetivo fundamental de este trabajo es sintetizar andamios donde el Sr sustituya parte del Ca en la estructura de la apatita para la regeneración del cartílago Subcondral.

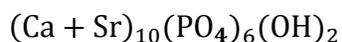
Para lograr lo anterior, se plantearon los siguientes objetivos parciales,

2.1. Objetivo 1: SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE APATITA

2.2. Objetivo 2: SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE APATITA ENRIQUECIDA EN Sr (DIFERENTES RELACIONES Ca/Sr)

3. SÍNTESIS DE APATITAS DE CALCIO/ESTRONCIO

Para la obtención de las apatitas de calcio/estroncio se utilizó la siguiente reacción de síntesis:



3.1. OBTENCIÓN DE LA HIDROXIAPATITA: $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$

Después de la síntesis de la hidroxiapatita se realizó su caracterización. Lo primero que se hizo para caracterizarla fue una reflexión total atenuada (ATR), la cual permitió observar sus grupos funcionales de la siguiente manera:

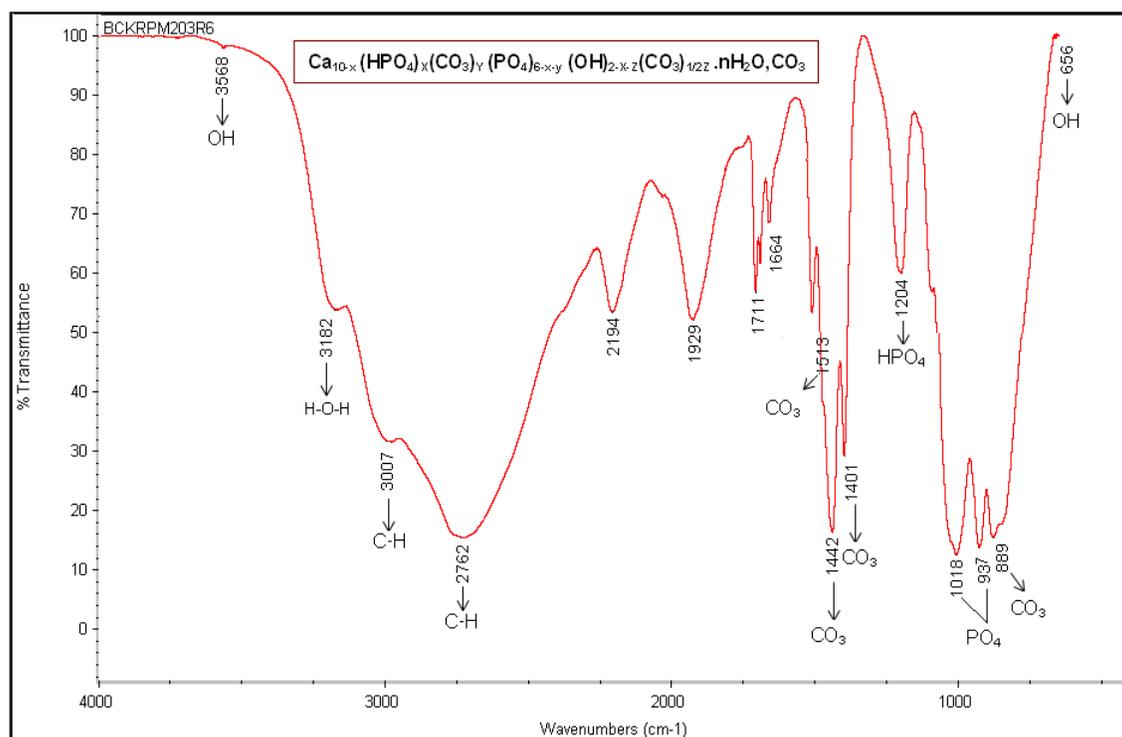


Figura 1. ATR de la apatita

Como se observa en la figura 1, el pico alrededor de 3568 cm^{-1} se debe a la amplitud de un grupo O-H[42, 43]. La banda ancha a 3182 cm^{-1} corresponde a agua[41]. Las bandas a 3007 y 2762 cm^{-1} se deben a grupos C-H[44, 45]. Las bandas a 2194 y 1711 cm^{-1} se deben a CO_2 [43, 46]. La banda 1929 cm^{-1} es el armónico del fosfato de 1018 cm^{-1} [42]. La banda a 1664 cm^{-1} puede ser agua[42, 47, 48]. Las bandas a 1513 , 1442 , 1401 y 889 cm^{-1} corresponden a carbonato[42, 43, 49]. La banda a 1204 cm^{-1} es un fosfato ácido[50]. Las bandas a 1018 y 937 cm^{-1} son los fosfatos[42] y la banda a 656 cm^{-1} corresponde a un OH-[42, 51].

Después de la ATR se hizo una Difracción de Rayos x (DRX) para seguir con la caracterización:

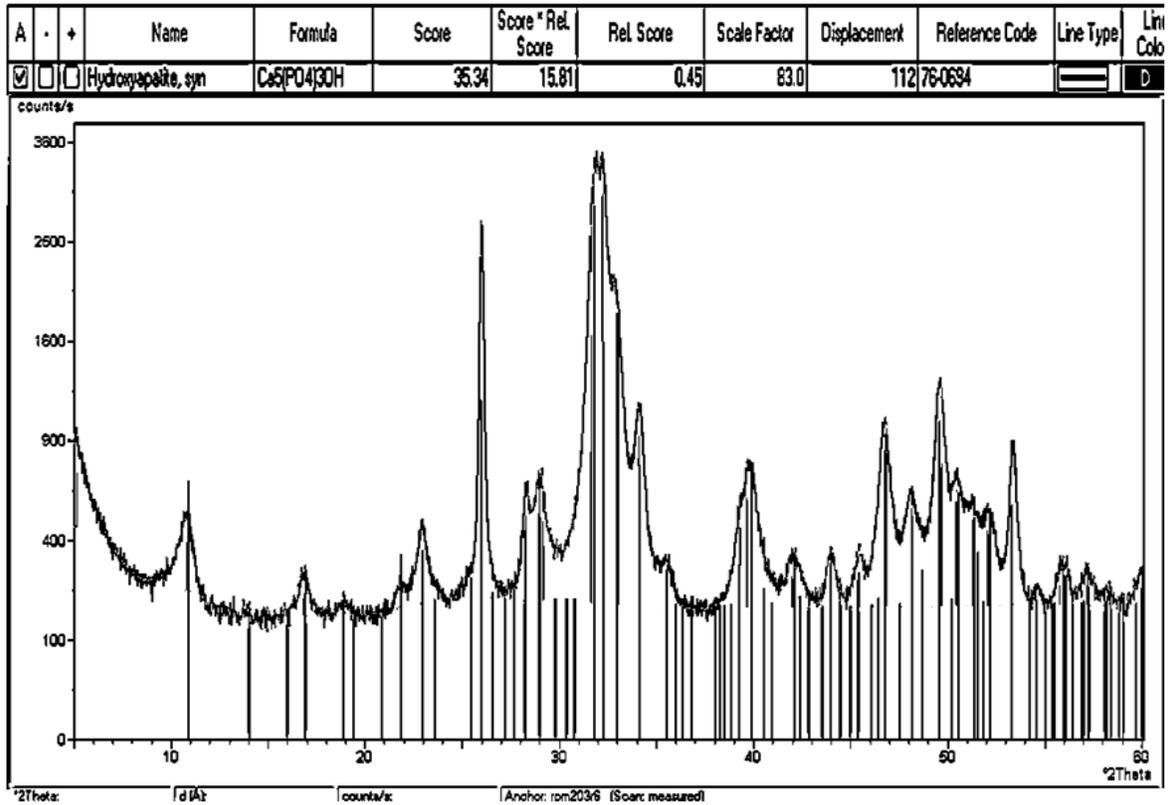


Figura 2. DRX de la apatita

Como se observa en la figura 2, se ve en una sola fase la apatita deficiente en Calcio. Todos los máximos en la escala 2θ (26° , 31° y 32°) son compatibles con apatita, no se ven máximos extraños, no hay compuestos cristalinos ajenos a la hidroxiapatita.

Tamaño del Cristal

Para ver el tamaño del cristal en la apatita se utilizó el programa de difracción de rayos x, donde se pudo observar el pico a 002 correspondiente al Eje Z del cristal hexagonal (ver figura 3):

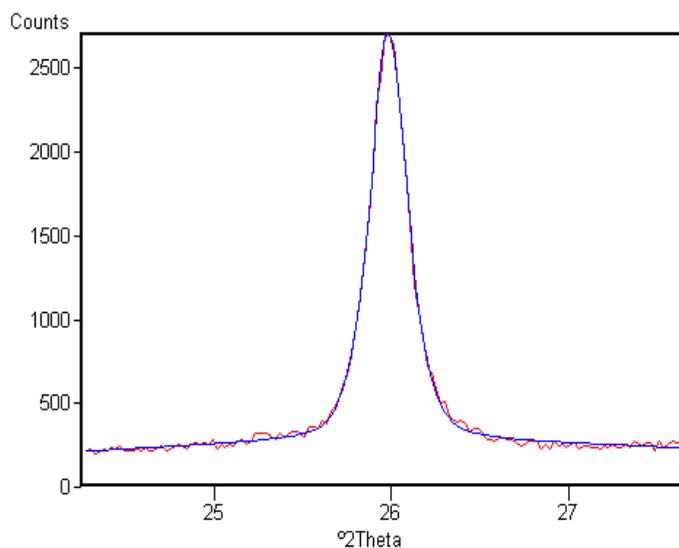


Figura 3. Pico a 002 (Eje Z del cristal hexagonal)

Dónde:

$$2\theta = 25.962$$

$$\text{Valor de referencia posición 002 (B std. (*2th))} = 0.133$$

$$\text{Anchura (B obs (*2Th))} = 0.231$$

$$\text{Tamaño del cristal} = 832 \text{ \AA}$$

Microanálisis

Con el fin de ver si había presencia de carbonato en la hidroxiapatita se decidió hacer un análisis elemental en el cual se confirmó su presencia ya que se encontró un % de carbono del 0.73.

Para ver la descomposición térmica de la apatita se hizo un Análisis termogravimétrico (TGA):

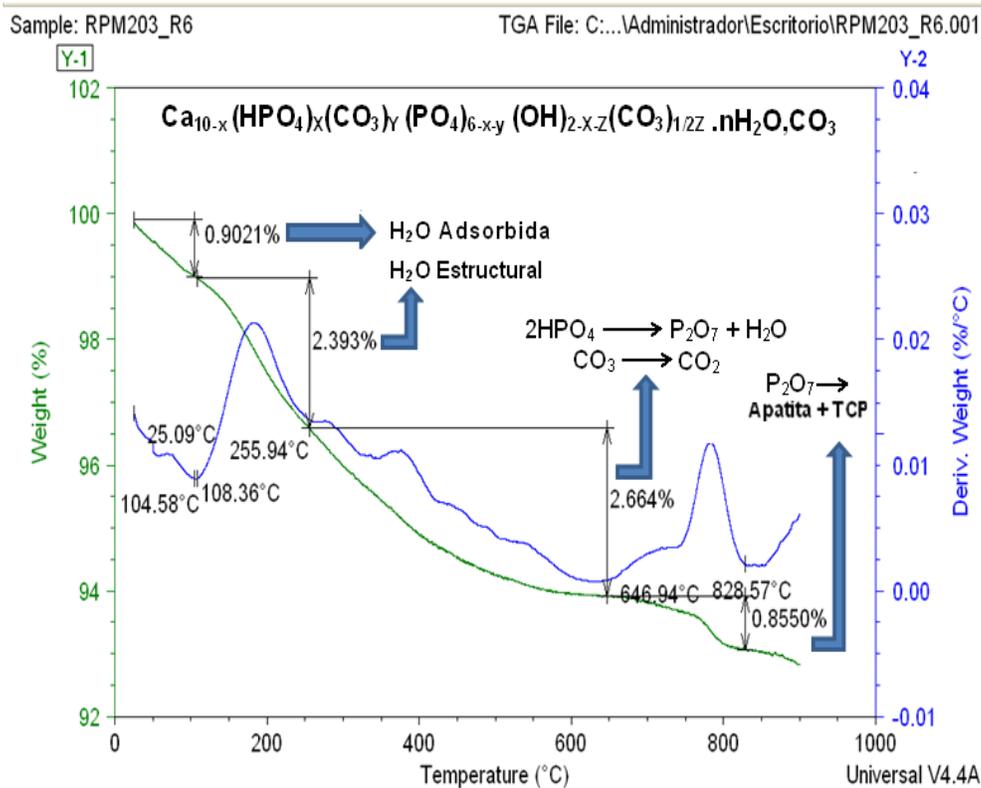


Figura 4. Curvas DTA/ TGA de la apatita

Como se observa en la figura 4, la curva de TGA presenta una transición térmica en el rango de temperatura de 25.09°C - 104.58°C, que corresponde a una pérdida de aproximadamente 0.9021% en peso que se debe a agua adsorbida[52]. Entre 108.36°C y 255.94°C con una pérdida de peso de 2.393% corresponde a agua estructural[52]. La caída entre 256°C y 647°C con una pérdida de peso de 2.664% se debe a fosfatos ácidos que se condensan y forman pirofosfato más agua [52, 53] y entre 647 y 828.57°C correspondiente a una pérdida de peso de 0.8550% se debe a la formación de β -TCP[52].

Microscopio electrónico de Barrido de alta resolución con filamento de Emisión de Campo (FE-SEM)

Con el fin de analizar la morfología de la superficie de la apatita a diferentes magnificaciones, se utilizó el FE-SEM, obteniéndose las siguientes imágenes:

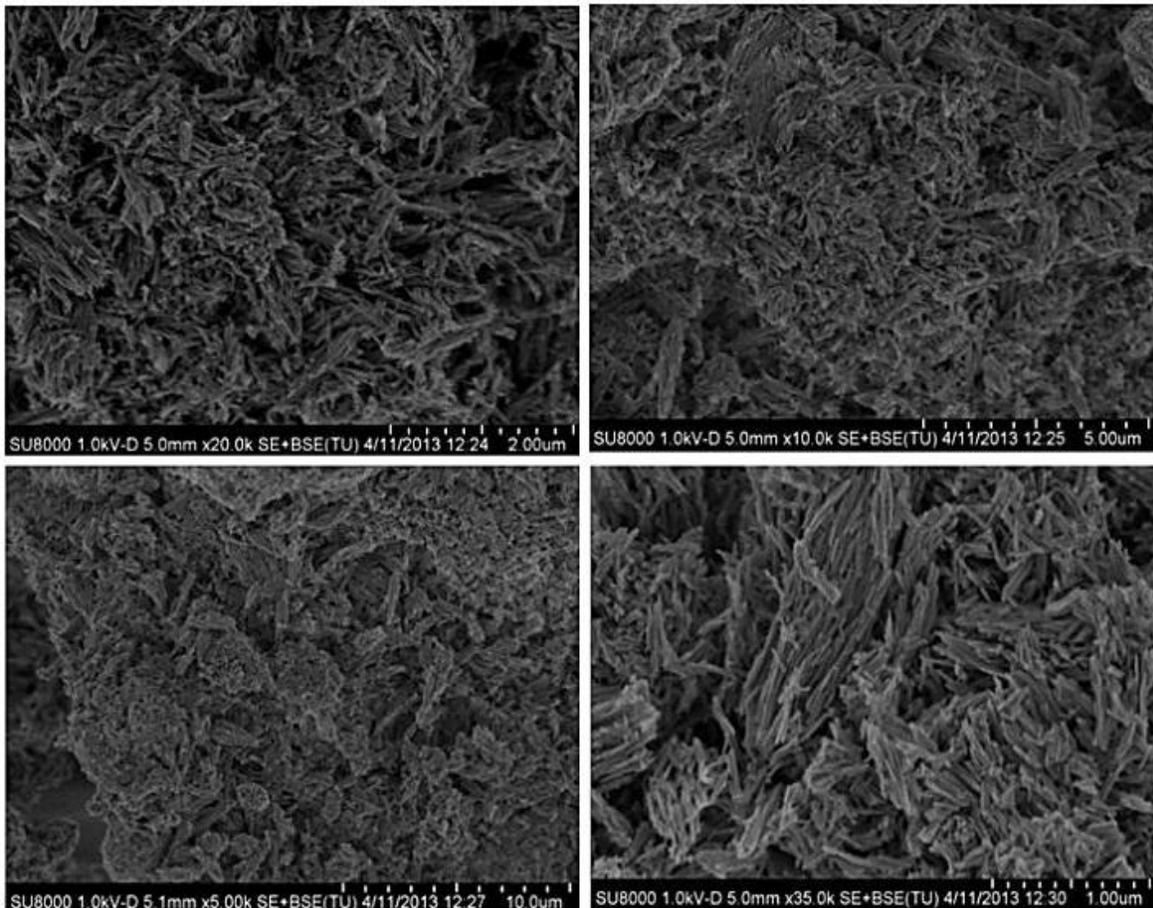


Figura 5. Imágenes de FE-SEM de la apatita a diferentes magnificaciones.

Las imágenes que se observan en la figura 5, muestran estructuras de diferentes formas y tamaños que tienden a aglomerarse formando agujeros. Se pueden ver los cristales con forma acicular entrecruzados entre sí.

Plasma Acoplado Inductivamente (ICP)

Para obtener el % de CA y de P que hay en la apatita, se utilizó el ICP obteniéndose los siguientes resultados:

nº Lab.		mg/Kg	mg/Kg	%	%
SGA-ICA	Ref.	Ca	P	Ca	P
143286	Apatita	304099.1	179622.1	30.41	17.96

Tabla 1. % de CA y de P de la apatita

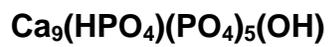
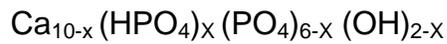
$$\frac{9 - X}{6} = Ca/P$$

$$9 - 6 \frac{Ca}{P} = X$$

$$9 - 6 (1.3084) = X$$

$$9 - 8 = X$$

$$1 = X$$



Coulter

Para hacer la medición del tamaño de partícula de la apatita, se utilizó el coulter, donde se obtuvo la siguiente gráfica:

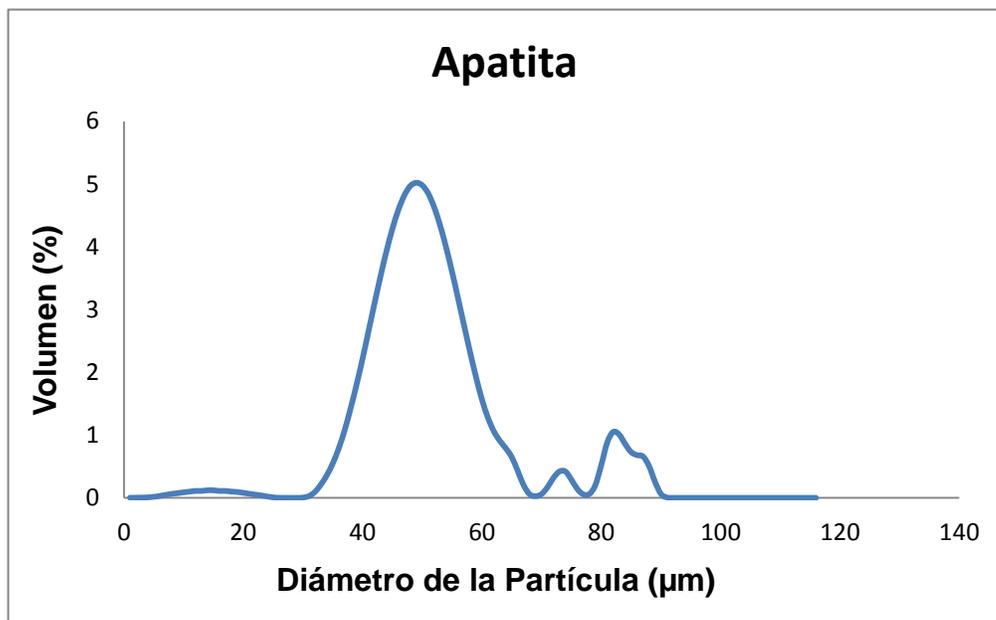


Figura 6. Tamaño de partícula de la apatita

Como se observa en la figura 6, se puede ver que el sistema es multimodal, ya que presenta varios picos.

Se obtuvieron las distribuciones (d):

d_{10} : 1.659

d_{50} : 4.086

d_{90} : 17.49

d_{10} = el 10% de las partículas mide 1.659 μm

d_{50} = el 50% de las partículas mide 4.086 μm

d_{90} : el 90% de las partículas mide 17.49 μm

Área de Superficie Específica (SSA)

Para medir el área de superficie específica de la apatita, los datos arrojados en el Micromeritics ASAP 2020 se analizaron con el modelo de BET, obteniéndose los siguientes resultados:

Área Se (m^2/g) = 95,1745

Tamaño poro (BJH des) en Å = 245,709

Cantidad de muestra en g = 0,3145

Isoterma:

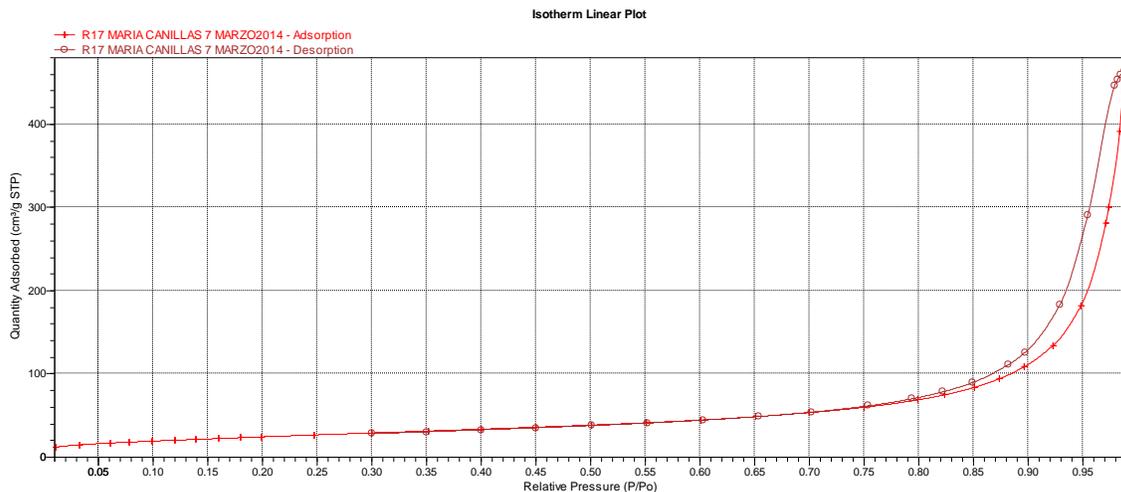


Figura 7. Isoterma obtenida en la medición del SSA de la apatita.

El resultado muestra un área específica de la apatita alta de 95,1745 m^2/g

3.1.A. TRATAMIENTO TÉRMICO A 600°C DE LA APATITA

Con el fin de eliminar acetatos y carbonatos que quedan de la síntesis de la apatita y para que se observe ésta en una sola fase, se decidió hacer un calentamiento a 600°C y se hizo su caracterización de la siguiente manera:

Reflexión total atenuada (ATR):

Después del calentamiento a 600° se hizo una ATR de la apatita, obteniéndose el siguiente espectro:

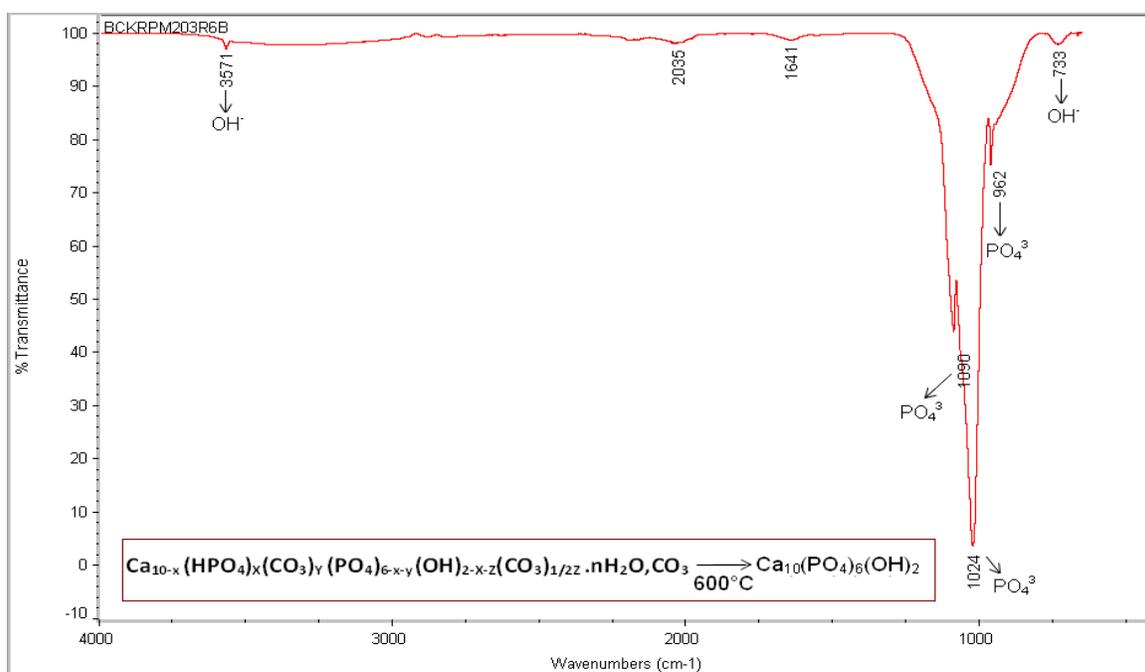


Figura 8. ATR para el gel seco tomado de la hidroxiapatita, tratado térmicamente a 600°C durante 5 horas.

Como se observa en la figura 8, aparece un pico a 3571cm⁻¹ que es un OH⁻ [42]. Se observa una banda a 2035 cm⁻¹ que corresponde al armónico del fosfato de 1024 cm⁻¹ [42]. Se ve una banda a 1641 cm⁻¹ que se debe a agua [42, 47]. Las bandas 1090, 1024 y 962 cm⁻¹ corresponden a los grupos fosfatos (PO₄³⁻)[54-56]. La banda de 733 cm⁻¹ puede ser agua fuera del plano[57]. Se comprueba con DRX.

Microanálisis

Se hizo un microanálisis a la apatita calentada a 600°C para ver si hubo presencia de carbono, donde se obtuvo un 0%, lo que comprueba la no existencia de carbonato.

Difracción de Rayos x (DRX):

Para confirmar si se había obtenido la apatita en una sola fase, se hizo una DRX, obteniéndose el siguiente diagrama:

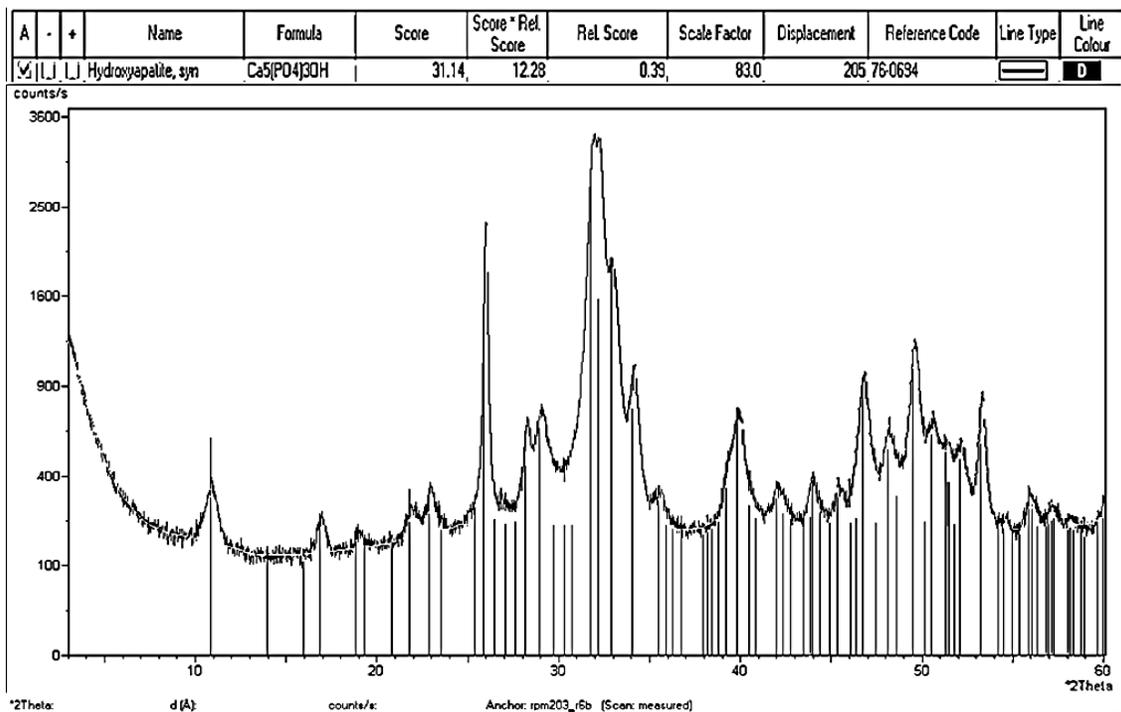


Figura 9. DRX de la apatita calentada a 600°C.

Como se observa en la figura 9, se ve la apatita en una sola fase. Todos los máximos en la escala 2θ (26, 31 y 32) son compatibles con apatita[58]. Se puede ver que los cristales no han crecido y por eso se ven máximos anchos.

Tamaño del Cristal

Para ver el tamaño del cristal de la apatita calentada a 600°C (ver figura 10), se utilizó el programa de DRX y se obtuvo lo siguiente:

El pico a 002 (Eje Z del cristal hexagonal)

$$2\theta = 25.994$$

$$\text{Valor de referencia posición 002 (B std. (*2\theta))} = 0.133$$

$$\text{Anchura (B obs (*2\theta))} = 0.234$$

$$\text{Tamaño del cristal} = 807 \text{ \AA}$$

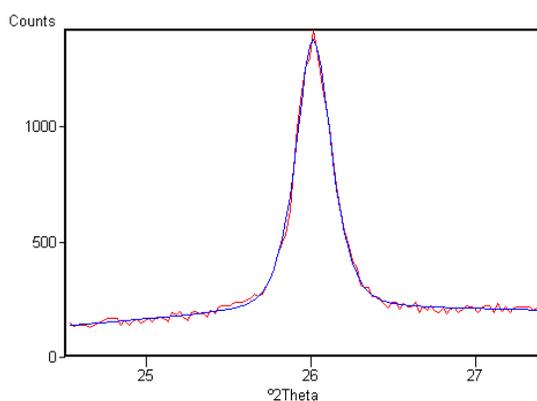


Figura 10. Tamaño del cristal de la apatita calentada a 600°C

Microscopio electrónico de Barrido de alta resolución con filamento de Emisión de Campo (FE-SEM)

Con el fin de analizar la morfología de la superficie de la apatita calentada a 600°C a diferentes magnificaciones, se utilizó el FE-SEM, obteniéndose las siguientes imágenes:

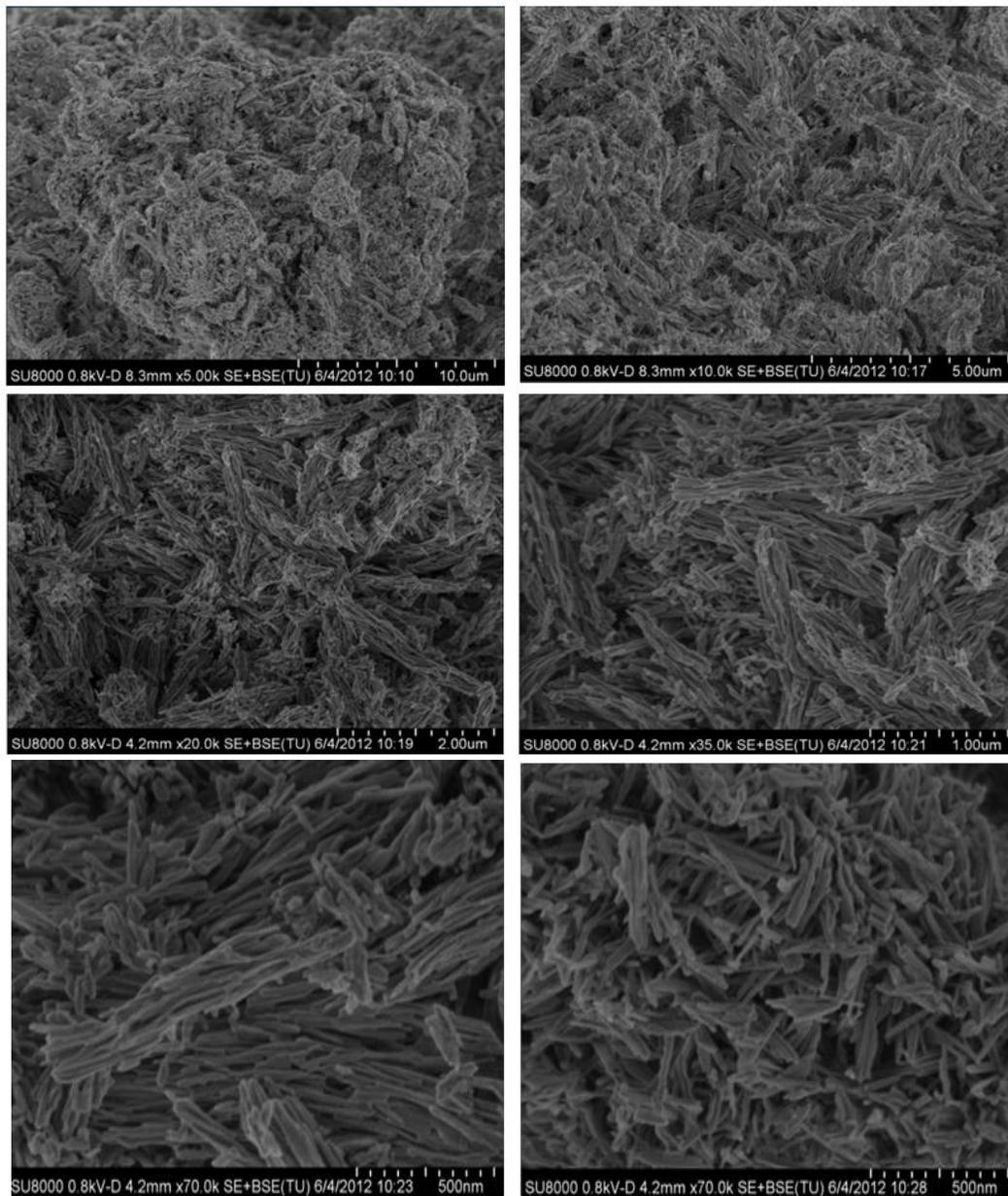


Figura 11. Imágenes de FE-SEM de la apatita calentada 600°C a diferentes magnificaciones.

Las imágenes que se observan en la figura 11, muestran cristales con diferentes formas y tamaños entrecruzados entre sí, que tienden a aglomerarse formando agujeros de diferentes tamaños.

Espectrómetro de energía dispersiva (EDAX del FE-SEM)

Para ver la composición de la apatita calentada a 600°C, se hizo un análisis elemental utilizando el EDAX en 3 puntos diferentes de la muestra, donde se obtuvo el siguiente gráfico:

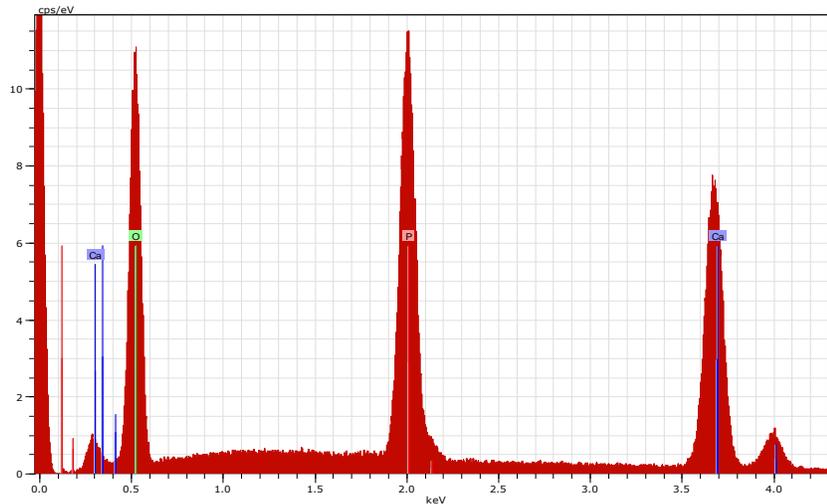


Figura 12. Análisis elemental de la apatita calentada a 600°C por EDAX

Se promediaron los resultados de EDAX correspondientes al Ca que se observa en la figura 12, donde se obtuvo un % en peso del 36.85.

Coulter

Al medir el tamaño de la partícula de la apatita calentada a 600°C se obtuvo la siguiente gráfica:

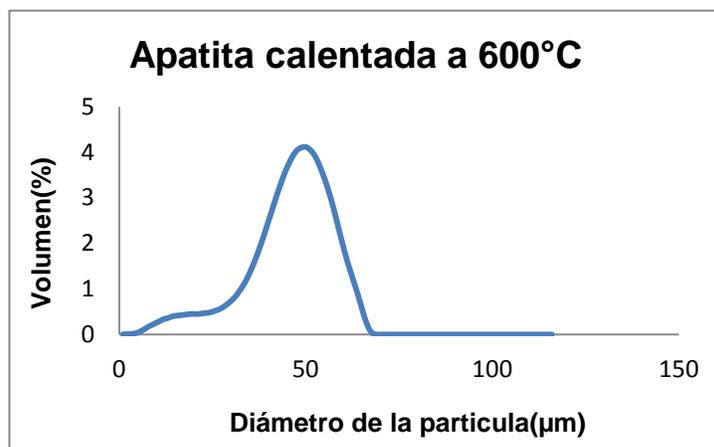


Figura 13. Tamaño de la partícula de la apatita calentada a 600°C

Como se observa en la figura 13, se puede ver que el sistema es bimodal, ya que presenta 2 picos.

Se obtuvieron las distribuciones:

d_{10} :0.621

d_{50} :3.225

d_{90} :9.055

d_{10} : el 10% de las partículas mide 0.621 μm

d_{50} : el 50% de las partículas mide 3.225 μm

d_{90} : el 90% de las partículas mide 9.055 μm

3.2. APATITA ENRIQUECIDA CON Sr

3.2.A. Síntesis y Caracterización de apatitas con dosis altas de Sr

Se sintetizaron apatitas con las siguientes proporciones:

Proporciones Acetato de Ca Hidratado (%)	Proporciones Acetato de Sr (%)
0	100
20	80
50	50
80	20

Tabla 2. Proporciones con dosis altas de acetato de Sr

Después de la síntesis, se realizó la caracterización de las muestras de la siguiente manera:

Reflexión total atenuada (ATR):

Se hizo una ATR para observar los grupos funcionales de las muestras, obteniéndose los siguientes espectros:

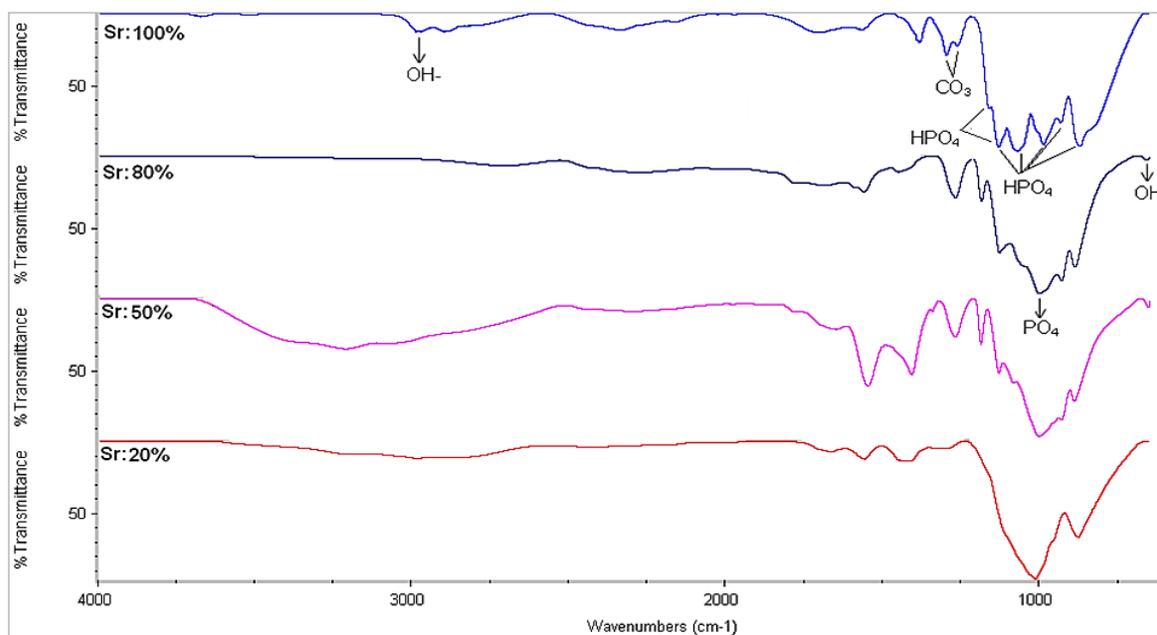


Figura 14. ATR para las muestras sintetizadas con el 100, 80, 50 y 20% de acetato de Sr.

Como se observa en la figura 14, aparece un pico de 2901 cm^{-1} que corresponde a un OH-[42]. Se observan unas bandas a 1385 y 1300 cm^{-1} que pueden ser carbonatos[49, 59]. Las bandas a 1265 , 1132 , 1073 , 989 y 872 cm^{-1} corresponden a fosfatos ácidos [50, 53, 60].

Microanálisis

Para ver si había presencia de carbonatos en las muestras, se hizo un análisis elemental, en el cual se obtuvo lo siguiente:

Muestra	C(%)	H(%)	N(%)
100% Sr	0.16	0	0
80% Sr	0.7	0.5	00
50% Sr	4.5	2.6	2.1
20% Sr	0.28	1.3	2.7

Tabla 3. Microanálisis de las muestras sintetizadas con el 100, 80, 50 y 20% de acetato de Sr

Como se observa en la tabla 3, en las muestras hay presencia de carbono, algunas contienen algo de hidrogeno y de nitrógeno.

Difracción de Rayos x (DRX):

Para ver que fases se obtuvieron en las muestras, se hizo una DRX, obteniéndose los siguientes diagramas:

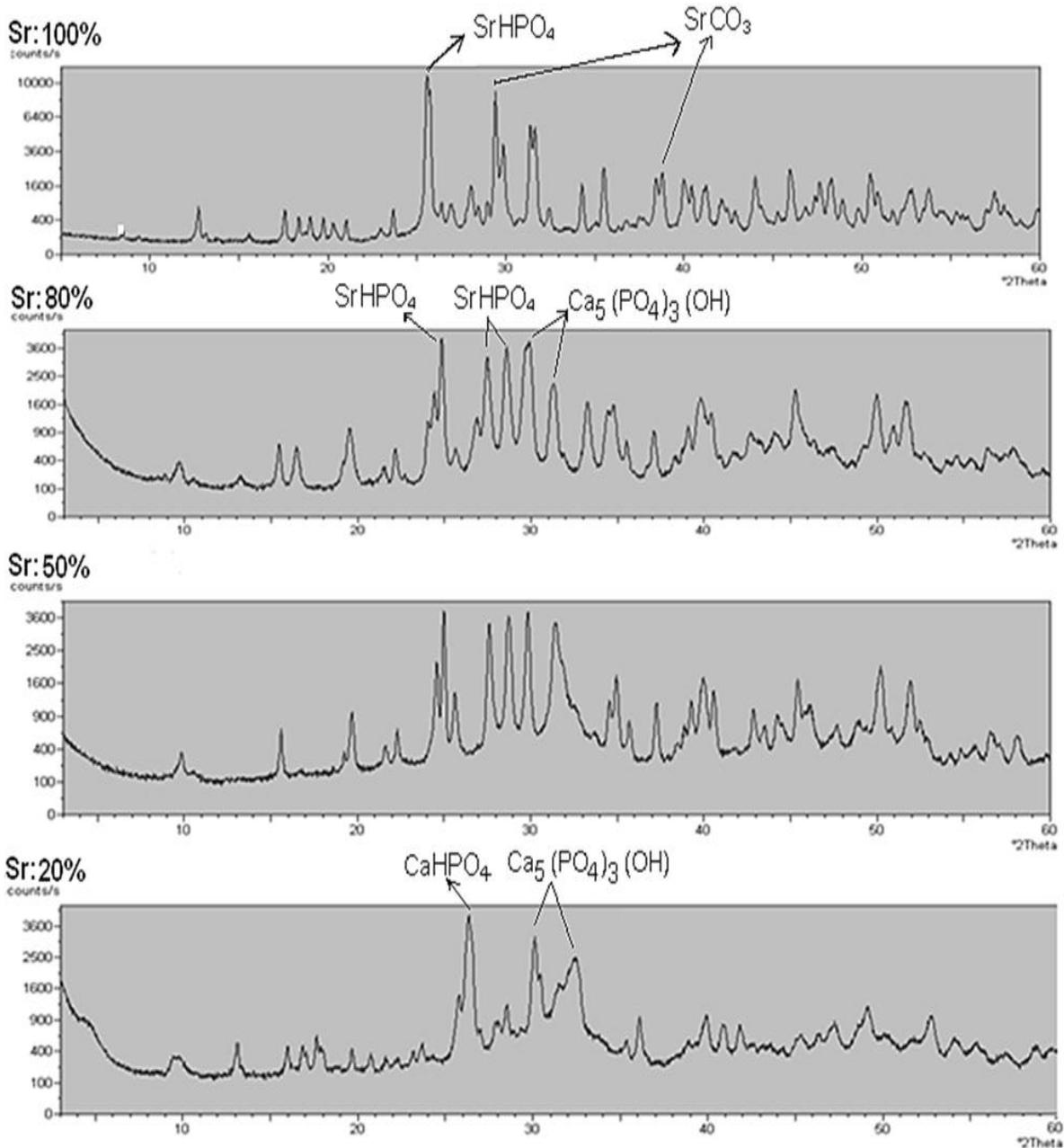


Figura 15. DRX de las muestras sintetizadas con el 100, 80, 50 y 20% de acetato de Sr

Como se observa en la figura 15, se ve más de una fase en las muestras. Se observa el SrHPO₄ en los picos 25.57°, 29.43°, 29.87°. Se ve carbonato de Sr en

los picos 29.64 y 38.5. Se observa la apatita en los picos 29°, 31° y 32° y se ve el CaHPO₄ en el pico 26.27°.

Análisis termogravimétrico (TGA)

Para ver la descomposición térmica de cada muestra, se hizo un TGA, obteniéndose las siguientes gráficas:

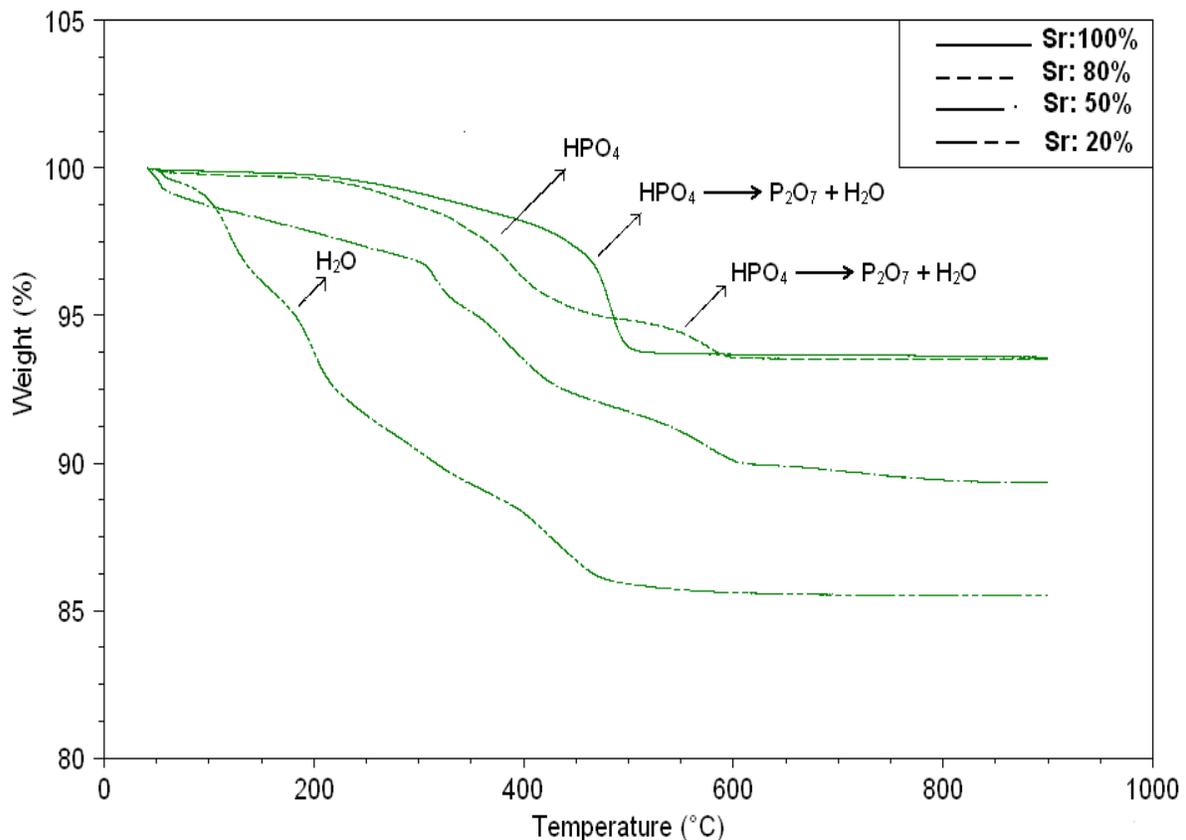


Figura 16. Curvas TGA para las muestras sintetizadas con el 100, 80, 50 y 20% de acetato de Sr

Como se observa en la figura 16, en la curva de TGA del 20% de Sr, se presenta una transición térmica en el rango de temperatura de 158.82 y 272.33 que se debe a agua estructural[52]. La caída que se observa entre 176.47°C – 383.33°C, corresponde a los fosfatos ácidos[52]. Entre 383.33°C y 534.69°C se presenta la condensación de los fosfatos ácidos que dan formación a pirofosfato + agua [52, 53].

Microscopio electrónico de Barrido de alta resolución con filamento de Emisión de Campo (FE-SEM)

Con el fin de analizar la morfología de la superficie de las muestras a diferentes magnificaciones, se utilizó el FE-SEM, obteniéndose las siguientes imágenes:

Muestra sintetizada con el 100% de Acetato de Sr:

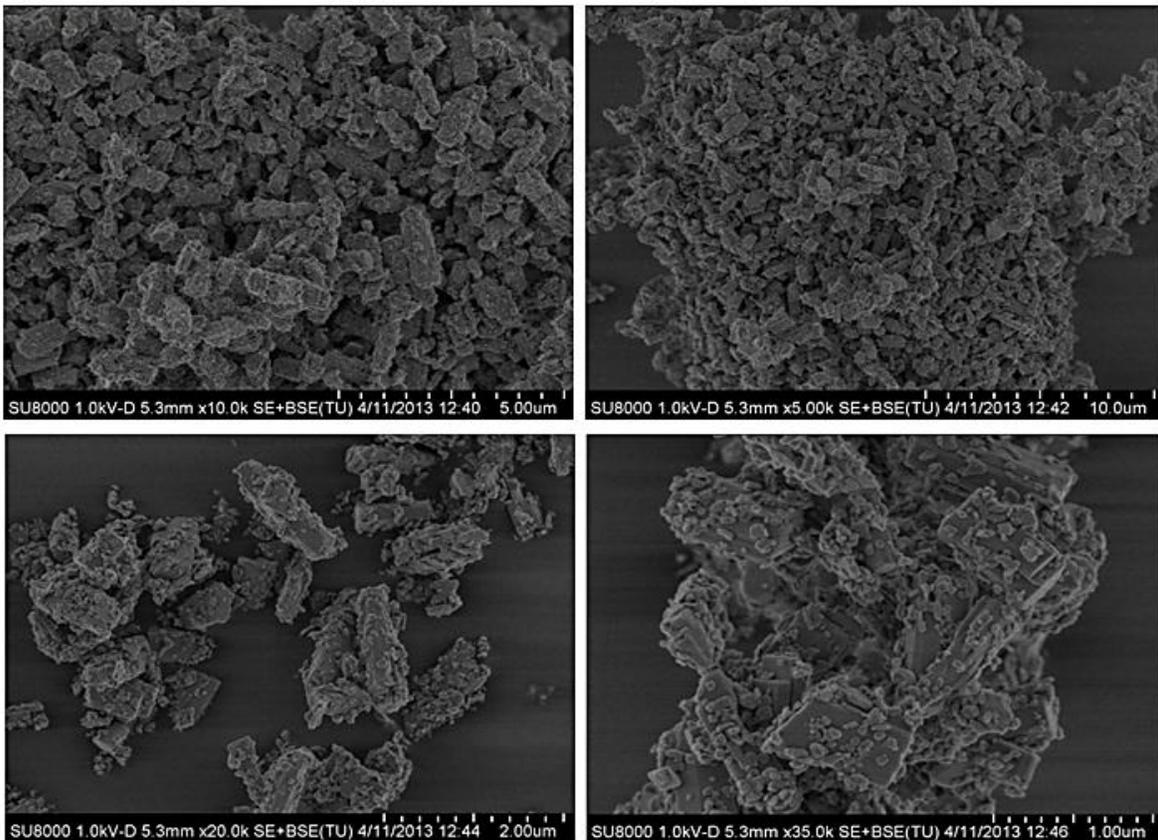


Figura 17. Imágenes de FE-SEM de la muestra sintetizada con el 100% de Acetato de Sr a diferentes magnificaciones

La figura 17 muestra imágenes de SEM, donde se ven los cristales de diferentes formas y tamaños que tienden a aglomerarse. Se ven estructuras pequeñas pegadas sobre los cristales.

Muestra sintetizada con el 20% de Acetato de Sr:

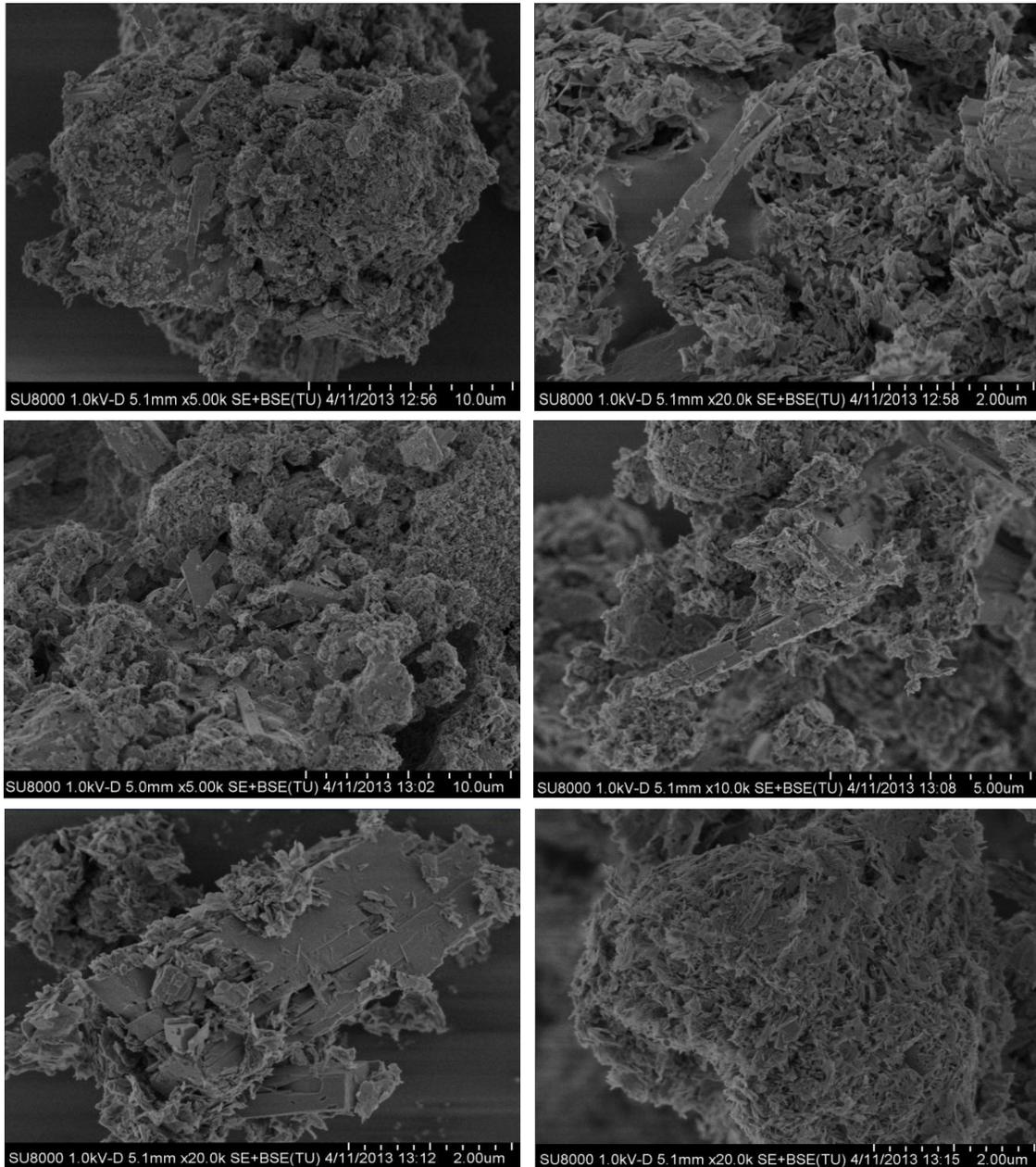


Figura 18. Imágenes de FE-SEM de la muestra sintetizada con el 20% de acetato de Sr a diferentes magnificaciones.

La figura 18 muestra imágenes de SEM, donde se ven cristales de diferentes formas y tamaños que tienden a aglomerarse. Se ven estructuras pequeñas ancladas sobre los cristales.

Plasma Acoplado Inductivamente (ICP)

Para obtener la cantidad de Ca, Sr y de P en mg/Kg que hay en las muestras, se utilizó el ICP obteniéndose los siguientes resultados:

Muestra	Ca(mg/Kg)	Sr(mg/Kg)	P(mg/Kg)
100% Sr; 0%Ca	0.0	182500.0	171220
80% Sr; 20%Ca	26607.0	159450.0	148100
50% Sr; 50%Ca	85506.0	92000.0	127890
20% Sr; 80%Ca	163945.8	54125.0	187083.3

Tabla 4. ICP para las muestras sintetizadas con el 100, 80, 50 y 20% de acetato de Sr

3.2.B. TRATAMIENTO TÉRMICO A 600°C DE LAS MUESTRAS SINTETIZADAS CON EL 100, 80, 50 Y 20% DE ACETATO DE Sr

Con el fin de eliminar acetatos, carbonatos y otras impurezas que quedan de la síntesis, se decidió hacer un calentamiento a 600°C a cada muestra y se hizo su caracterización de la siguiente manera:

Reflexión total atenuada (ATR):

Para observar los grupos funcionales de las muestras calentadas a 600°C, se hizo una ATR a cada muestra obteniéndose los siguientes espectros:

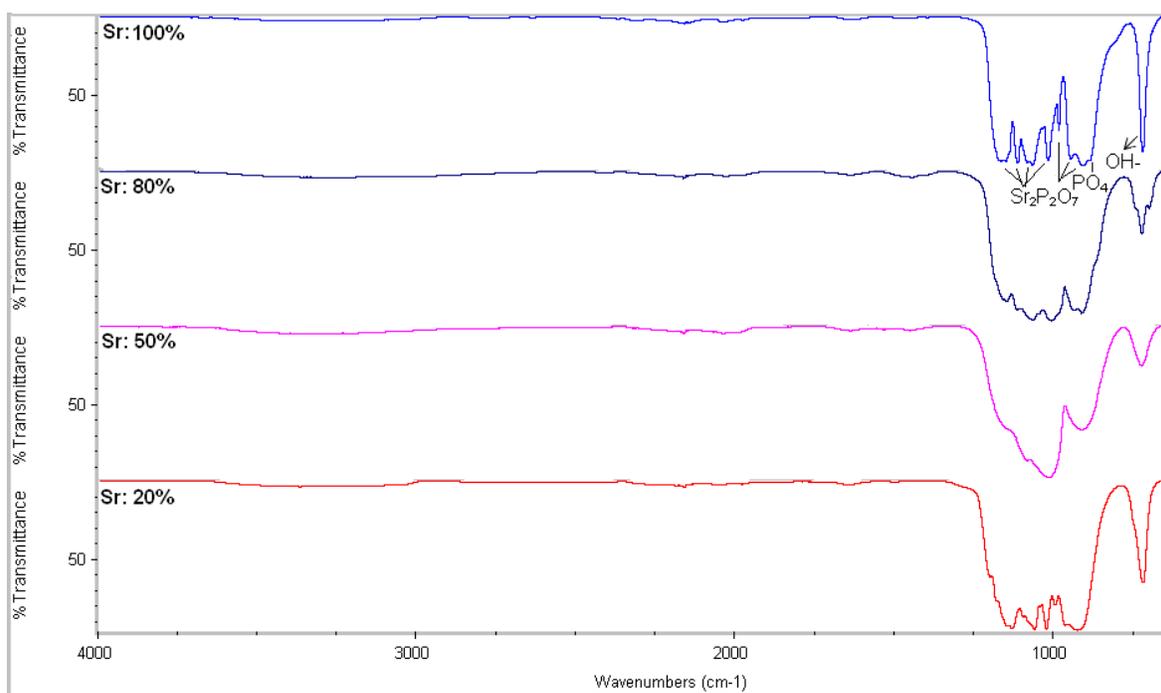


Figura 19. ATR para las muestras sintetizadas con el 100, 80, 50 y 20% de acetato de Sr tratado térmicamente a 600°C durante 5 horas

Como se observa en la figura 19, después del calentamiento a 600°C aparecen unas bandas a 1134, 1062, 1025, 1000 y 1085 cm⁻¹ que corresponden a pirofosfatos[61], la banda de 929 cm⁻¹ es un fosfato [62] y la banda a 723 cm⁻¹ es un OH-[51].

Microanálisis

Se hizo un microanálisis a las muestras calentadas a 600°C para ver si hubo presencia de carbono, donde se obtuvo lo siguiente:

Muestra	C(%)	H(%)	N(%)
100% Sr	0	0	0
80% Sr	0	0	0
50% Sr	0	0	0
20% Sr	0	0	0

Tabla 5. Microanálisis de las muestras sintetizadas con el 100, 80, 50 y 20% de acetato de Sr después del calentamiento a 600°C.

Como se observa en la tabla 5, después del calentamiento de 600°C ya no hay presencia ni de carbono, ni de hidrogeno, ni de nitrógeno, con lo cual se puede decir, que se ha eliminado lo que podía haber quedado de los reactivos precursores.

Difracción de Rayos x (DRX):

Para ver las fases que se obtuvieron en las muestras calentadas a 600°C, se hizo una DRX, obteniéndose los siguientes diagramas:

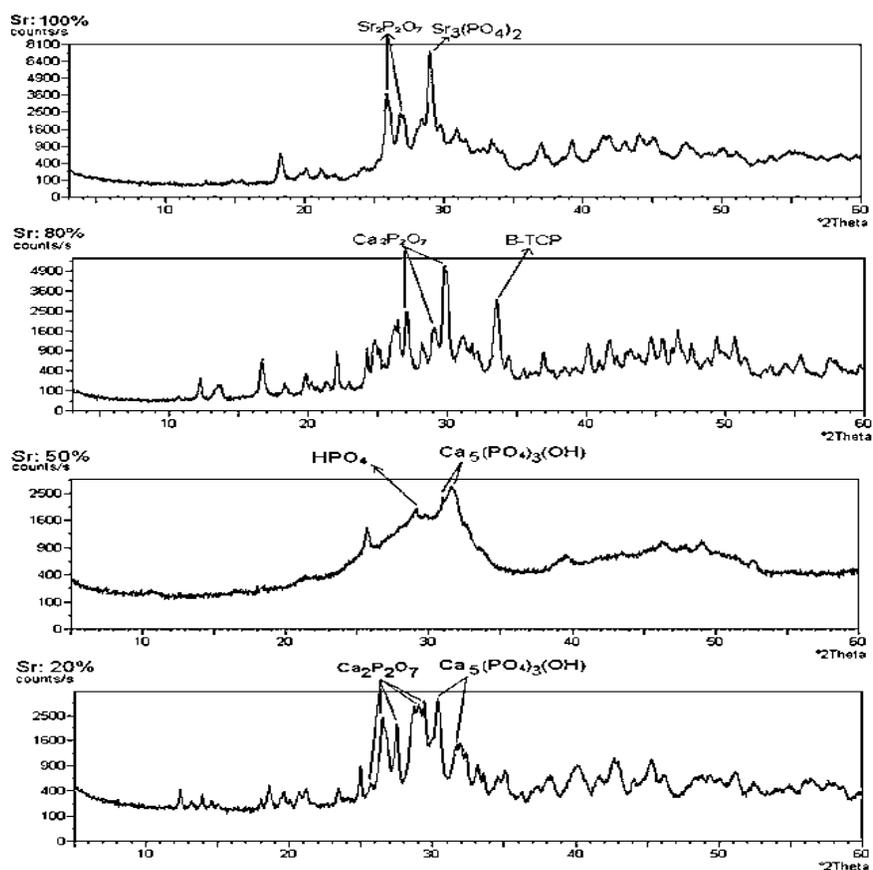


Figura 20. DRX de las muestras sintetizadas con el 100, 80, 50 y 20% de acetato de Sr después del calentamiento a 600°C

Como se observa en la figura 20, sigue apareciendo más de una fase en las muestras. En el 100% de acetato de Sr calentado a 600°C se observan unos picos máximos que corresponden al Sr₂P₂O₇ en los picos 25.85° y 26.08°. Se observa un Sr₃(PO₄)₂ en el pico que está a 29°. En el 80% de acetato de Sr calentado a 600°C se ve el Ca₂P₂O₇ en los picos 27.04°, 29.7° y 30° y se observa el B-TCP en

un pico máximo de 34.48° . En el 50% de acetato de Sr calentado a 600°C se observa la hidroxiapatita como componente principal, se ve en los picos 31.58° y 32° y se ve un pico máximo correspondiente al fosfato ácido a 29° . En el 20% de acetato de Sr calentado a 600°C se observan unos picos máximos correspondientes al $\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7$ en los picos 26.58° , 27.40° , 28.66° y 29.14° y se ve la apatita en los picos 31.58° y 32° .

Microscopio electrónico de Barrido de alta resolución con filamento de Emisión de Campo (FE-SEM)

Para analizar la morfología de la superficie de las muestras a diferentes magnificaciones, se utilizó el FE-SEM, obteniéndose las siguientes imágenes:

Muestra sintetizada con el 100% de acetato de Sr calentado a 600°C :

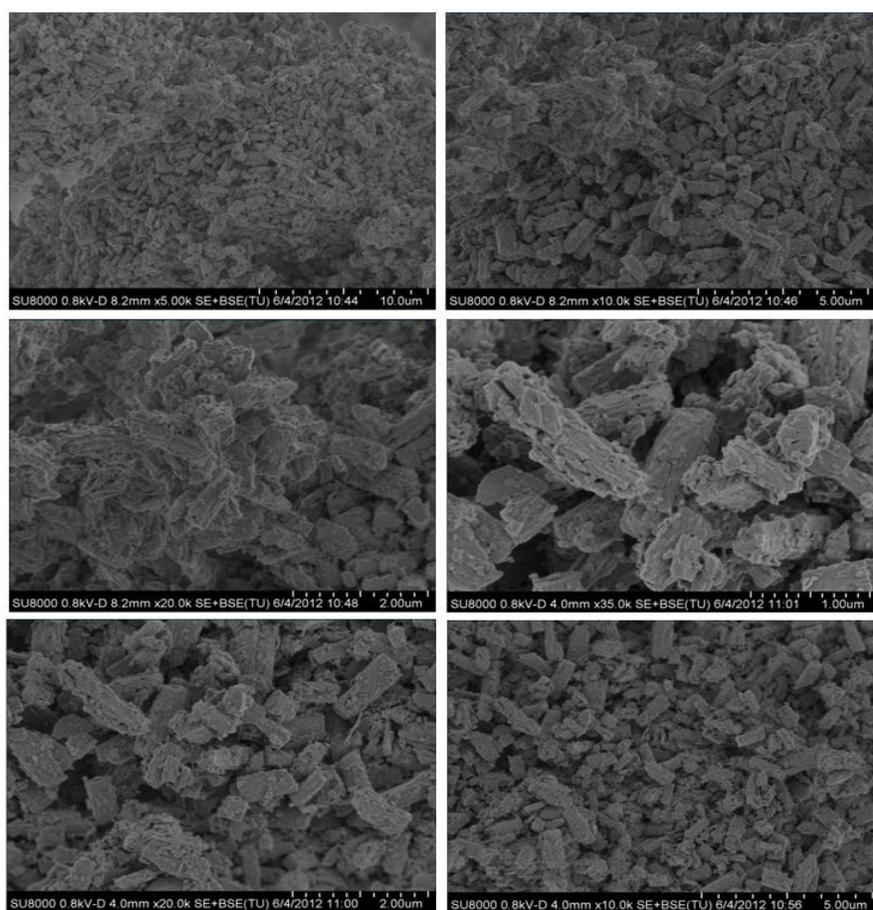


Figura 21. Imágenes de FE-SEM de la muestra sintetizada con el 100% de acetato de Sr calentado a 600°C a diferentes magnificaciones.

La figura 21 muestra imágenes de SEM, donde se ven cristales de diferentes formas y tamaños que tienden a aglomerarse formando agujeros. Se ven varias estructuras pequeñas ancladas sobre los cristales.

Muestra sintetizada con el 80% de acetato de Sr calentado a 600°C:

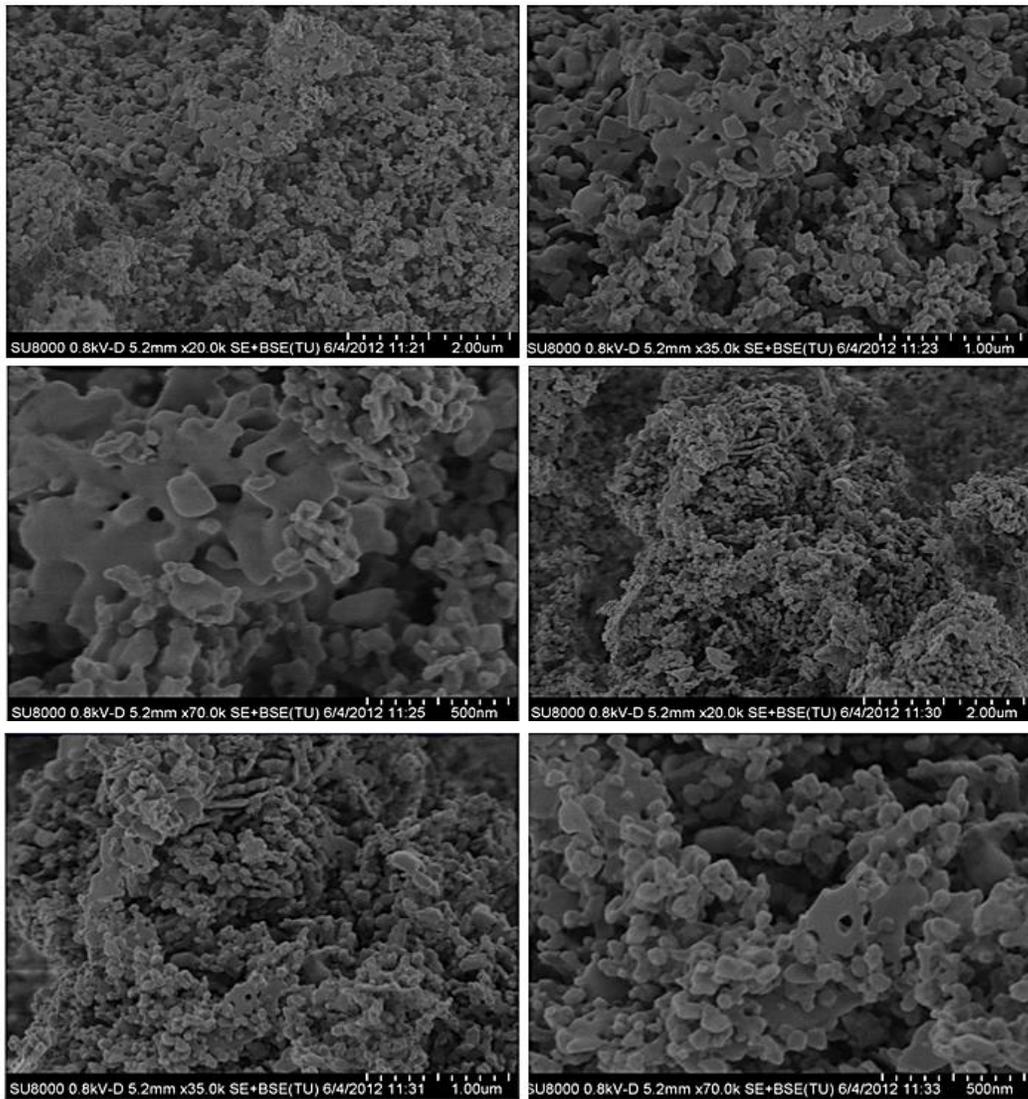


Figura 22. Imágenes de FE-SEM de la muestra sintetizada con el 80% de acetato de Sr calentado a 600°C a diferentes magnificaciones.

La figura 22 muestra imágenes de SEM, donde se ven estructuras aglomeradas en forma de piezas de rompecabezas las cuales se unen formando agujeros.

Muestra sintetizada con el 50% de acetato de Sr calentado a 600°C:

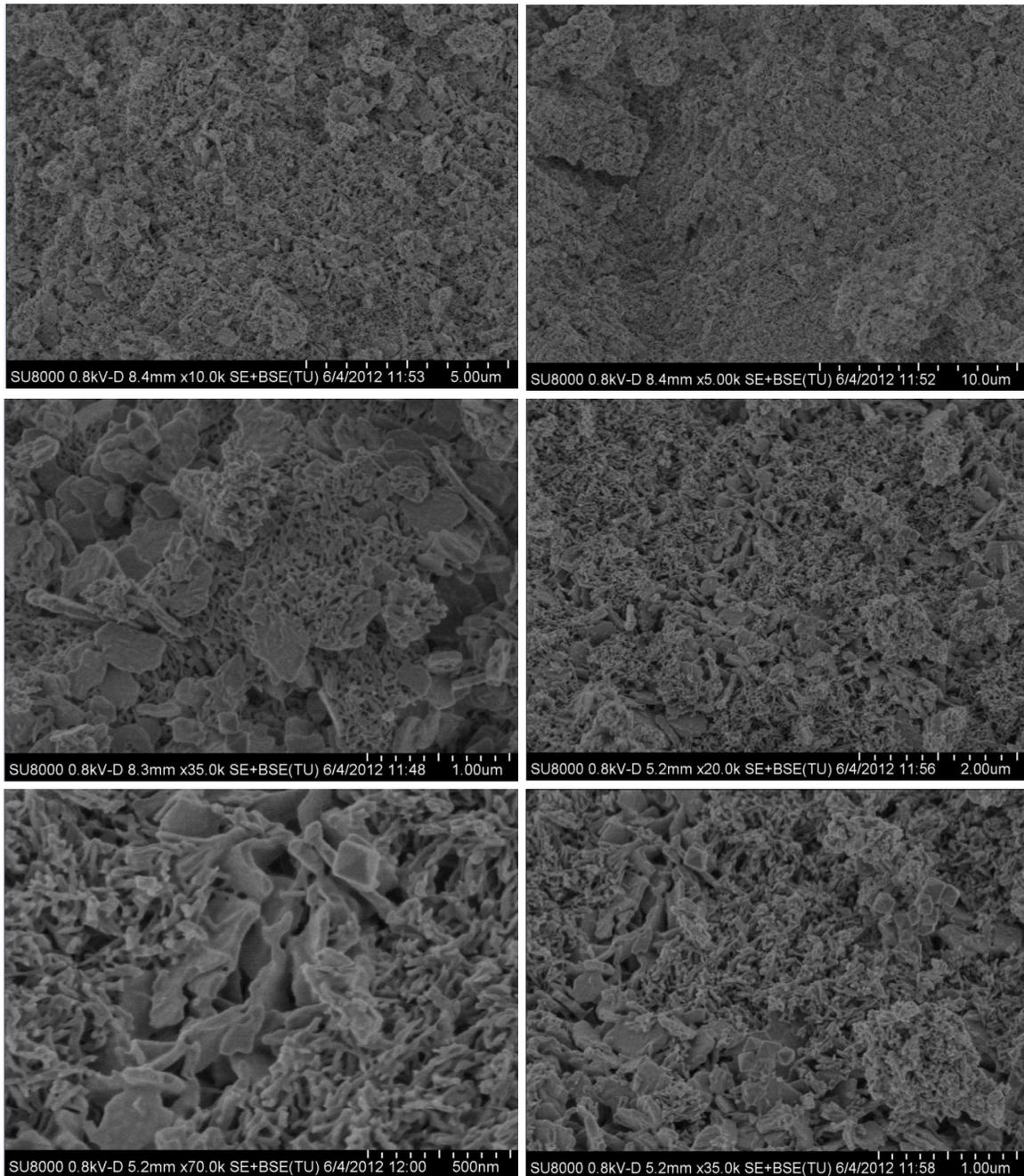


Figura 23. Imágenes de FE-SEM de la muestra sintetizada con el 50% de acetato de Sr calentado a 600°C a diferentes magnificaciones

La figura 23 muestra imágenes de SEM, donde se ven estructuras aglomeradas de diferentes formas y tamaños que se unen formando agujeros.

Muestra sintetizada con el 20% de acetato de Sr calentado a 600°C:

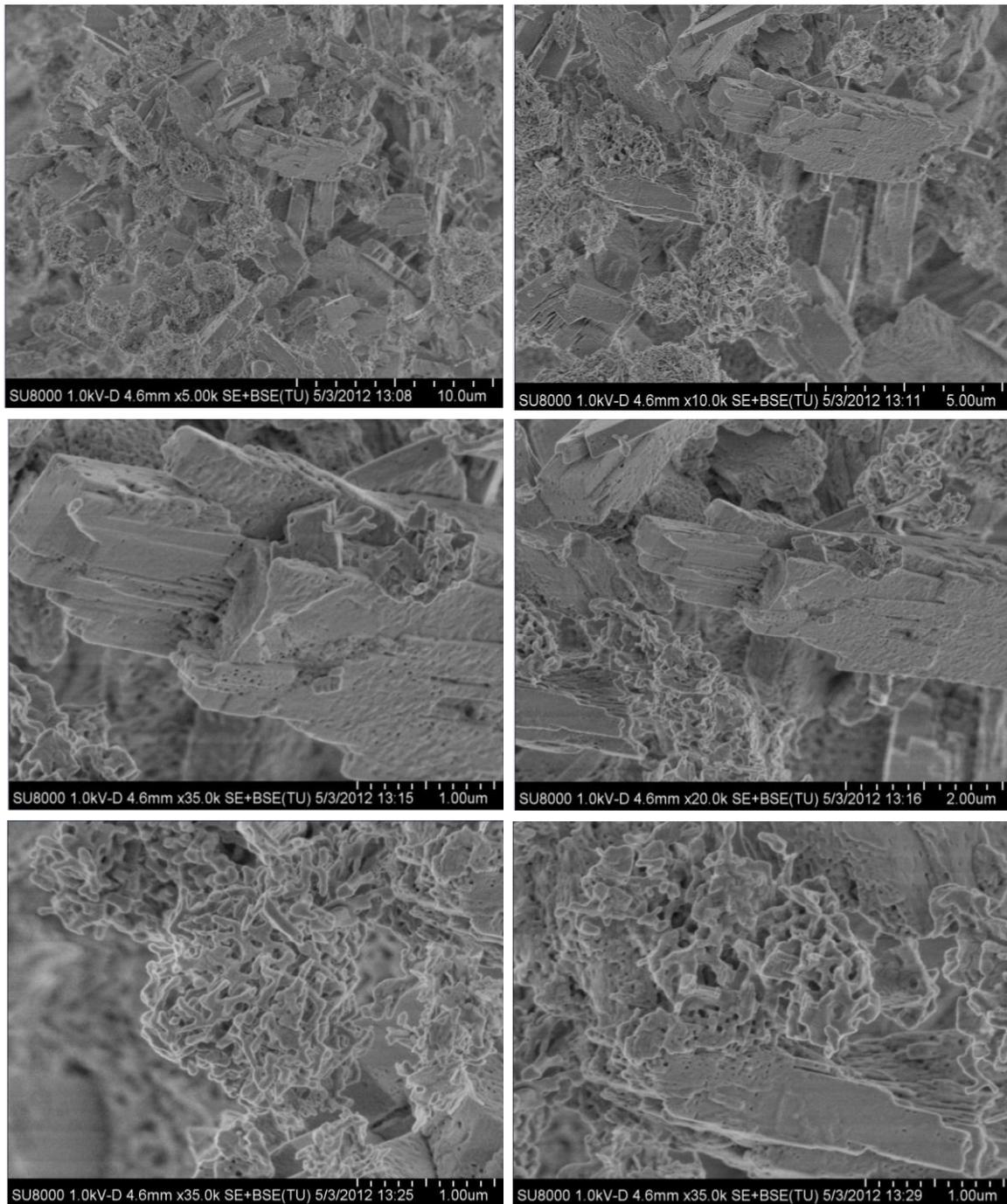


Figura 24. Imágenes de FE-SEM de la muestra sintetizada con el 20% de acetato de Sr calentado a 600°C a diferentes magnificaciones.

La figura 24 muestra imágenes de SEM, donde se ven dos tipos de estructuras, unas planas con algunos poros y otras aglomeradas de diferentes formas y tamaños que se unen formando agujeros.

Porcentaje de calcio hallado en las muestras con dosis altas de Sr:

Espectrómetro de energía dispersiva (EDAX del FE-SEM)

Se midió el EDAX en las muestras calentadas a 600°C en tres zonas diferentes para ver si el peso en % era similar en las tres zonas. Se promediaron los pesos y se obtuvieron los siguientes resultados:

Muestras calentadas a 600°C	Peso (%) Ca	Desviaciones	Peso (%) Sr	Desviaciones
100%Sr;0%Ca	0	0	59.81	0.53
80%Sr; 20%Ca	3.95	0.05	46.19	0.20
50%Sr; 50%Ca	13.75	0.05	33	0.14
20%Sr; 80%Ca	22.79	0.05	12.91	0.46

Tabla 6. EDAX para las muestras sintetizadas con el 100, 80, 50 y 20% de acetato de Sr después del calentamiento a 600°C

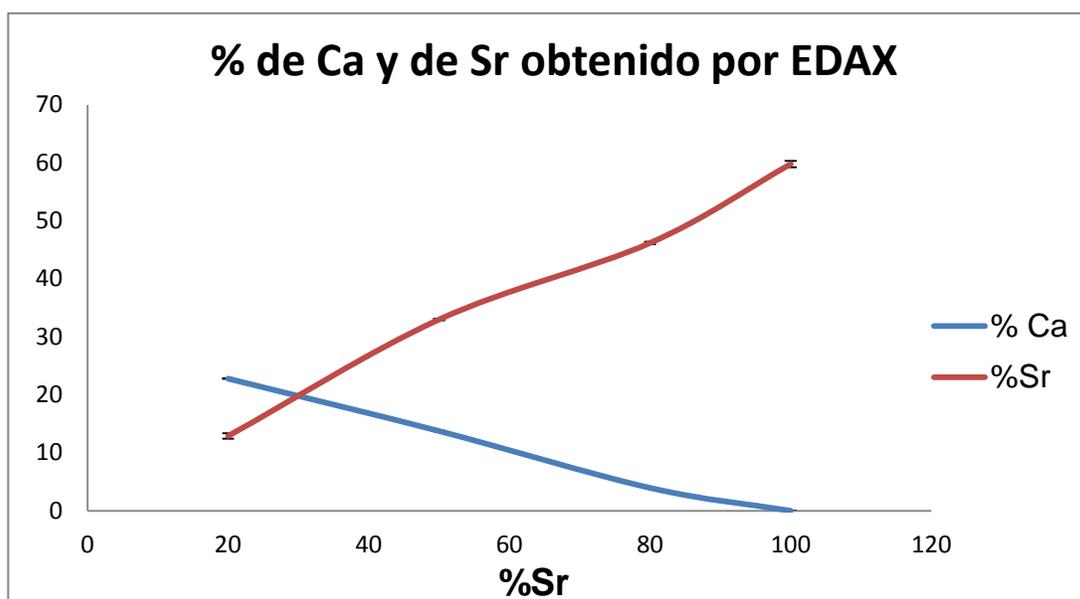


Figura 25. % de Ca y de Sr de las muestras sintetizadas con el 100, 80, 50 y 20% de acetato de Sr después del calentamiento a 600°C

Porcentaje hallado de calcio en las muestras			
$\frac{\%Ca}{\%Sr}$	80%Sr; 20%Ca: $\frac{20}{80} = 0.25$	50%Sr; 50%Ca: $\frac{50}{50} = 1$	20%Sr; 80%Ca: $\frac{80}{20} = 4$

Tabla 7. % de Ca hallado para las muestras sintetizadas con el 80, 50 y 20% de acetato de Sr después del calentamiento a 600°C

Porcentaje obtenido por ICP de calcio en las muestras			
$\frac{\%Ca}{\%Sr}$	80%Sr; 20%Ca: $\frac{3.95}{46.19} = 0.08$	50%Sr; 50%Ca: $\frac{13.75}{33} = 0.42$	20%Sr; 80%Ca: $\frac{22.79}{12.91} = 1.76$

Tabla 8. % de Ca obtenido por ICP de las muestras sintetizadas con el 80, 50 y 20% de acetato de Sr después del calentamiento a 600°C

Como se puede observar en la tabla 8, éstos resultados muestran que le entra a las muestras más Sr que Ca.

Coulter

Muestra sintetizada con el 100% de Acetato de Sr calentada a 600°C:

Al medir el tamaño de la partícula de la muestra, se obtuvo la siguiente gráfica:

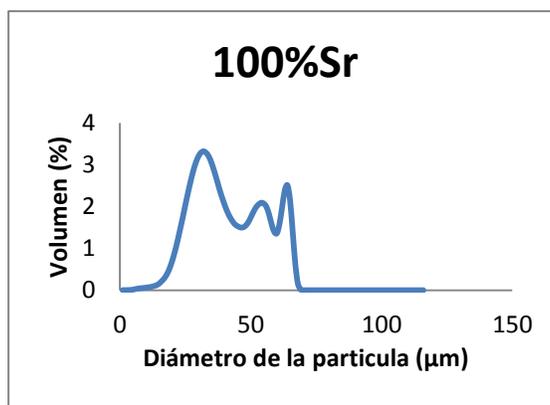


Figura 26. Tamaño de la partícula de la muestra sintetizada con el 100% de Acetato de Sr calentada a 600°C

Como se observa en la figura 26, se puede ver que el sistema es multimodal, ya que presenta 3 picos.

Se obtuvieron las distribuciones:

d_{10} : 0.407

d_{50} : 1.484

d_{90} : 12.59

d_{10} : el 10% de las partículas mide 0.407 μm

d_{50} : el 50% de las partículas mide 1.484 μm

d_{90} : el 90% de las partículas mide 12.59 μm

Muestra sintetizada con el 80% de acetato de Sr calentada a 600°C:

Al medir el tamaño de la partícula de la muestra, se obtuvo la siguiente gráfica:

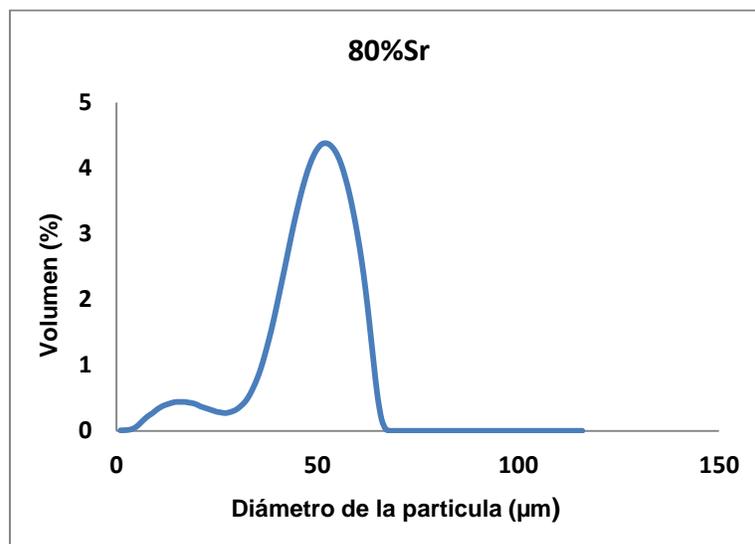


Figura 27. Tamaño de la partícula de la muestra sintetizada con el 80% de Acetato de Sr calentada a 600°C.

Como se observa en la figura 27, se puede ver que el sistema es bimodal, ya que presenta 2 picos.

Se obtuvieron las distribuciones:

d_{10} : 0.886

d_{50} : 4.031

d_{90} : 10.20

d_{10} : el 10% de las partículas mide 0.886 μm

d_{50} : el 50% de las partículas mide 4.031 μm

d_{90} : el 90% de las partículas mide 10.20 μm

Muestra sintetizada con el 50% de acetato de Sr calentada a 600°C:

Al medir el tamaño de la partícula de la muestra, se obtuvo la siguiente gráfica:

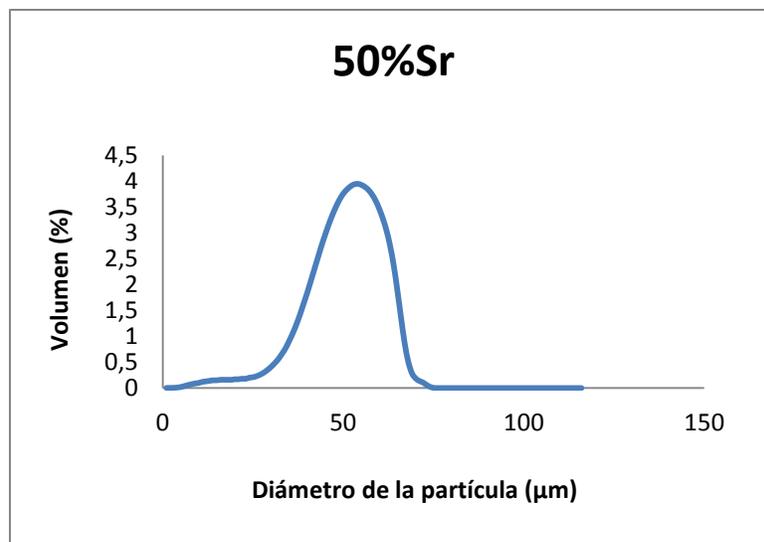


Figura 28. Tamaño de la partícula de la muestra sintetizada con el 50% de acetato de Sr calentada a 600°C

Como se observa en la figura 28, se puede ver que el sistema es monomodal, ya que presenta 1 pico.

Se obtuvieron las distribuciones:

d_{10} : 1.255

d_{50} : 4.786

d_{90} : 13.24

d_{10} : el 10% de las partículas mide 1.255 μm

d_{50} : el 50% de las partículas mide 4.786 μm

d_{90} : el 90% de las partículas mide 13.24 μm

Muestra sintetizada con el 20% de acetato de Sr calentada a 600°C:

Al medir el tamaño de la partícula de la muestra, se obtuvo la siguiente gráfica:

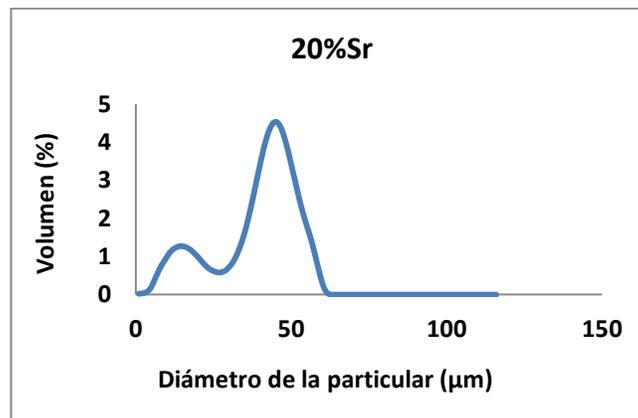


Figura 29. Tamaño de la partícula de la muestra sintetizada con el 20% de acetato de Sr calentada a 600°C

Como se observa en la figura 29, se puede ver que el sistema es bimodal, ya que presenta 2 picos.

Se obtuvieron las distribuciones:

d_{10} : 0.162

d_{50} : 2.029

d_{90} : 5.344

d_{10} : el 10% de las partículas mide 0.162 μm

d_{50} : el 50% de las partículas mide 2.029 μm

d_{90} : el 90% de las partículas mide 5.344 μm

3.2.C. SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE APATITAS CON DOSIS BAJAS DE Sr

Después de obtener resultados de las muestras con dosis altas de Sr, donde se observaron varias fases en su caracterización, se decidió hacer síntesis con dosis más bajas de acetato de Sr:

Proporciones Acetato de Ca Hidratado (%)	Proporciones Acetato de Sr (%)
100	0
95	5
90	10
85	15
80	20

Tabla 9. Proporciones con dosis bajas de acetato de Sr

De las pruebas iniciales, se volvió a sintetizar la apatita (0% acetato de Sr; 100% acetato de Ca) y el 20% de acetato de Sr, donde se le hicieron varios lavados y se caracterizó.

Reflexión total atenuada (ATR):

Después de la síntesis, se hizo una ATR para observar los grupos funcionales de las apatitas, donde se obtuvieron los siguientes espectros:

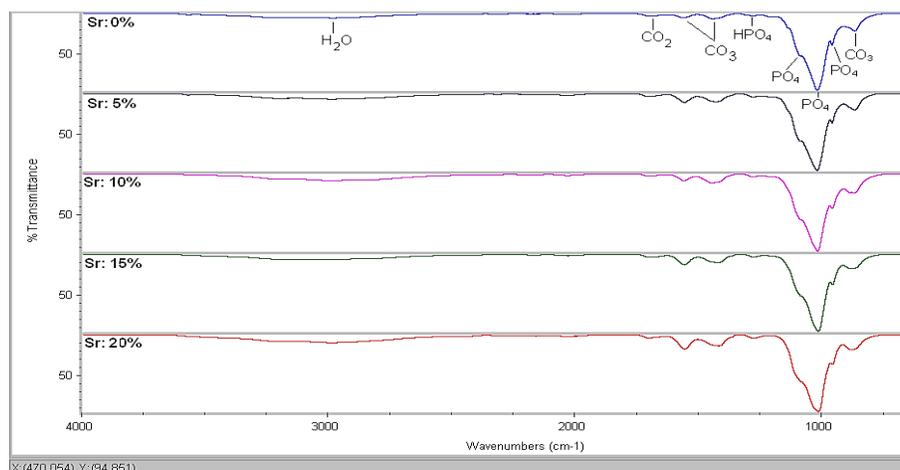


Figura 30. ATR para las muestras sintetizadas con el 0, 5, 10, 15 y 20% de acetato de Sr

Como se muestra en la figura 30, la banda de 3000 cm^{-1} es agua[57]. La banda a 1701 cm^{-1} es debido a vibraciones antisimétricas del CO_2 [43, 46]. Las bandas de 1563 , 1446 y 871 cm^{-1} son CaCO_3 [49, 63-65]. La banda a 1279 cm^{-1} es un HPO_4 [50] y las bandas 1096 , 1022 y 962 cm^{-1} son los fosfatos[50, 66, 67].

Difracción de Rayos x (DRX):

Para ver que fases se obtuvieron en las muestras con dosis más bajas de Sr, se hizo una DRX, obteniéndose los siguientes diagramas:

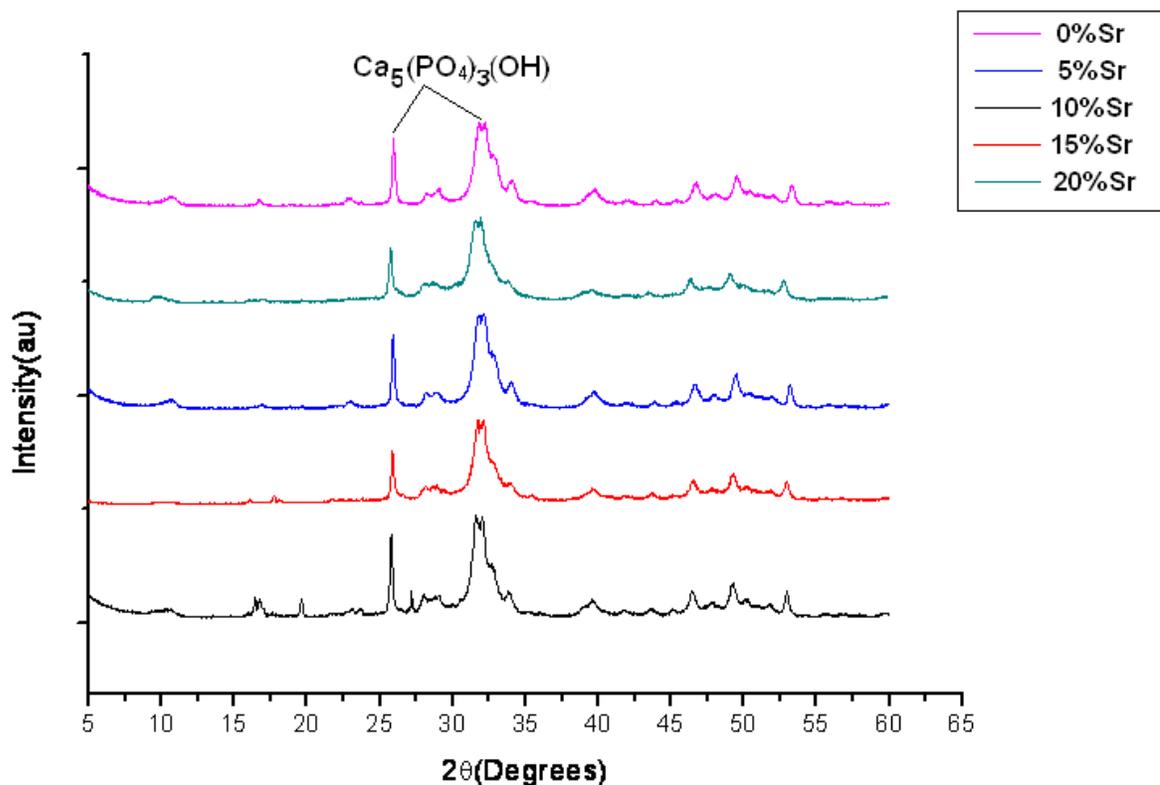


Figura 31. DRX de las muestras sintetizadas con el 0, 5, 10, 15 y 20% de acetato de Sr

Como se observa en la figura 31, se ve la apatita en una sola fase. Todos los máximos en la escala 2θ a 26° , 31° y 32° son compatibles con apatita[58].

Análisis termogravimétrico (TGA)

Para ver la descomposición térmica de las apatitas con dosis bajas de Sr, se hizo un Análisis termogravimétrico (TGA) a cada muestra obteniéndose los siguientes diagramas:

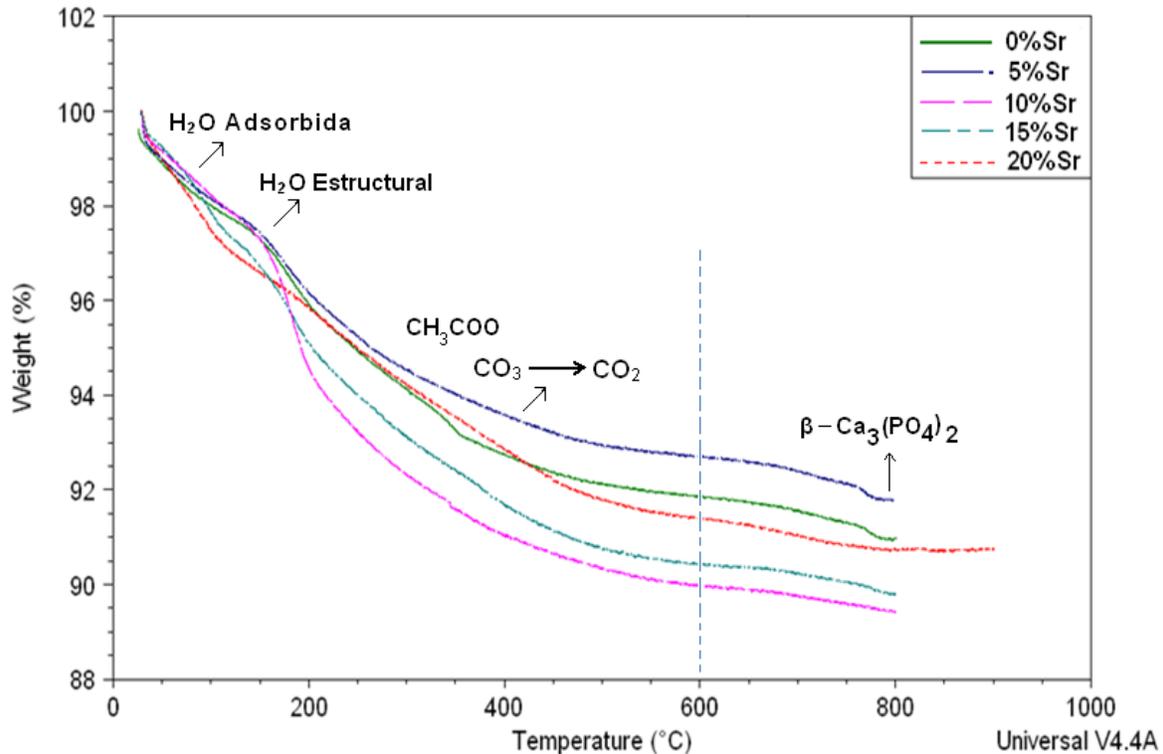


Figura 32. Curvas de TGA para las muestras sintetizadas con el 0, 5, 10, 15 y 20% de acetato de Sr

Como se observa en la figura 32, las curvas de TGA presentan una transición térmica en el rango de temperatura de 24.48°C - 108.36°C, que se debe a agua adsorbida[52]. Entre 123.50°C y 256°C corresponde a agua estructural[52]. La caída entre 256°C y 603°C puede ser debida a los restos de acetato que han quedado de la síntesis y a los grupos carbonatos [52, 53] y entre 603°C y 800°C se debe a la formación de β-TCP [52].

Coulter

Muestra sintetizada con el 0% de acetato de Sr:

Al medir el tamaño de la partícula de la muestra, se obtuvo la siguiente gráfica:

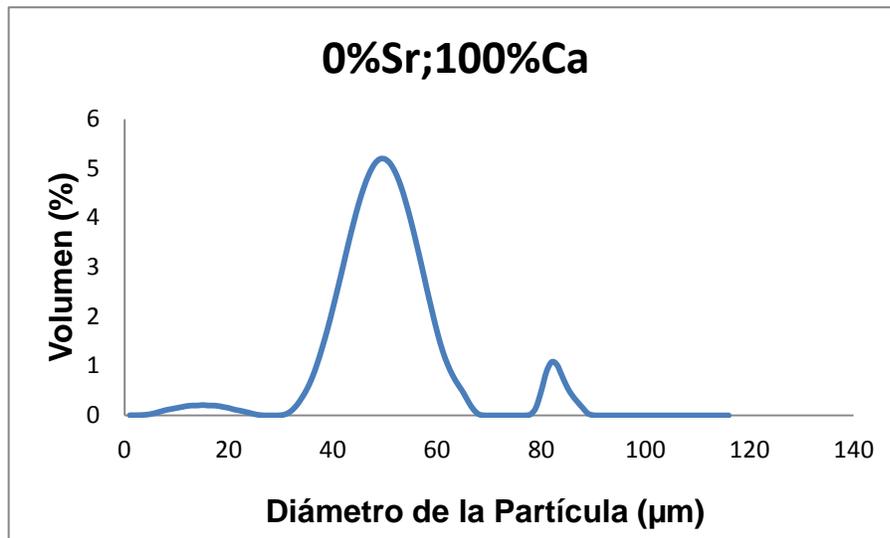


Figura 33. Tamaño de la partícula de la muestra sintetizada con el 0% de Acetato de Sr

Como se observa en la figura 33, se puede ver que el sistema es multimodal, ya que presenta 3 picos.

Se obtuvieron las distribuciones:

d_{10} : 1.589

d_{50} : 3.986

d_{90} : 11.26

d_{10} : el 10% de las partículas mide 1.589µm

d_{50} : el 50% de las partículas mide 3.986µm

d_{90} : el 90% de las partículas mide 11.26µm

Muestra sintetizada con el 5% de acetato de Sr:

Al medir el tamaño de la partícula de la muestra, se obtuvo la siguiente gráfica:

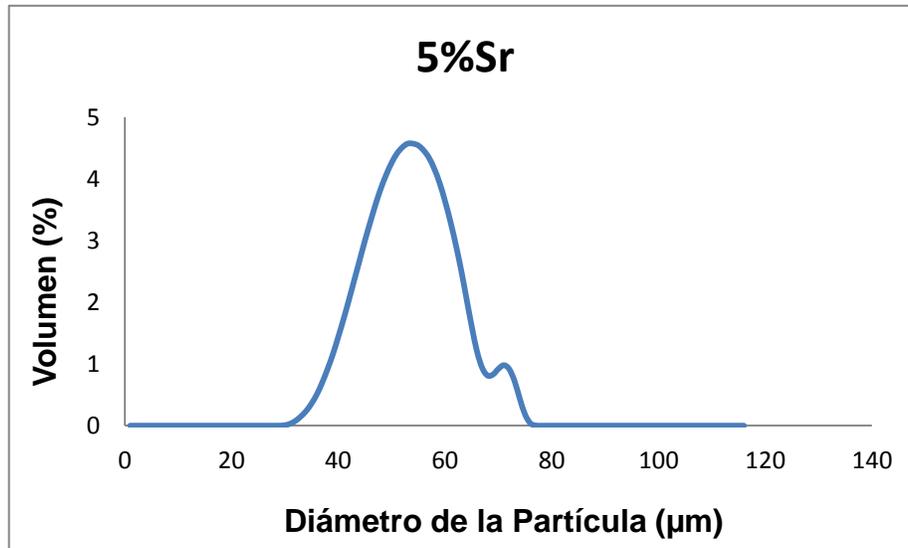


Figura 34. Tamaño de la partícula de la muestra sintetizada con el 5% de Acetato de Sr

Como se observa en la figura 34, se puede ver que el sistema es bimodal.

Se obtuvieron las distribuciones:

d_{10} : 2.064

d_{50} : 5.618

d_{90} : 15.37

d_{10} : el 10% de las partículas mide 2.064µm

d_{50} : el 50% de las partículas mide 5.618µm

d_{90} : el 90% de las partículas mide 15.37µm

Muestra sintetizada con el 10% de acetato de Sr:

Al medir el tamaño de la partícula de la muestra, se obtuvo la siguiente gráfica:

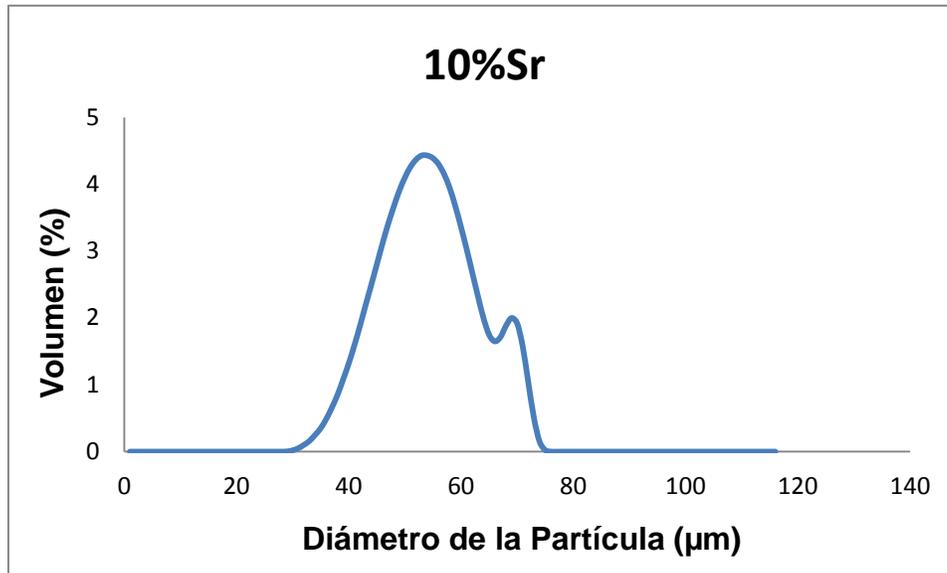


Figura 35. Tamaño de la partícula de la muestra sintetizada con el 10% de Acetato de Sr

Como se observa en la figura 35, se puede ver que el sistema es bimodal.

Se obtuvieron las distribuciones:

d_{10} : 2.117

d_{50} : 5.916

d_{90} : 19.72

d_{10} : el 10% de las partículas mide 2.117µm

d_{50} : el 50% de las partículas mide 5.916µm

d_{90} : el 90% de las partículas mide 19.72µm

Muestra sintetizada con el 15% de Acetato de Sr:

Al medir el tamaño de la partícula de la muestra, se obtuvo la siguiente gráfica:

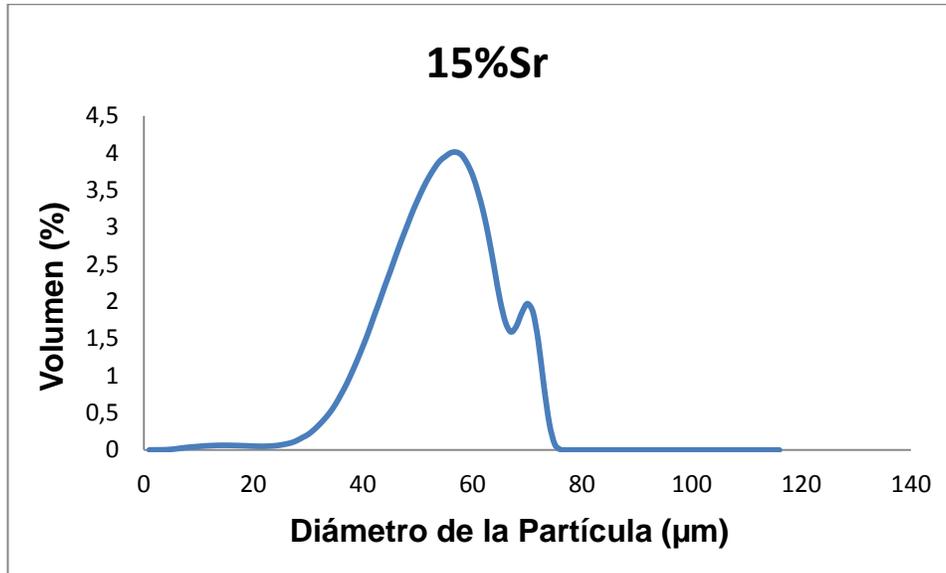


Figura 36. Tamaño de la partícula de la muestra sintetizada con el 15% de Acetato de Sr

Como se observa en la figura 36, se puede ver que el sistema es bimodal.

Se obtuvieron las distribuciones:

d_{10} : 1.748

d_{50} : 6.292

d_{90} : 20.86

d_{10} : el 10% de las partículas mide 1.748µm

d_{50} : el 50% de las partículas mide 6.292µm

d_{90} : el 90% de las partículas mide 20.86µm

Muestra sintetizada con el 20% de acetato de Sr:

Al medir el tamaño de la partícula de la muestra, se obtuvo la siguiente gráfica:

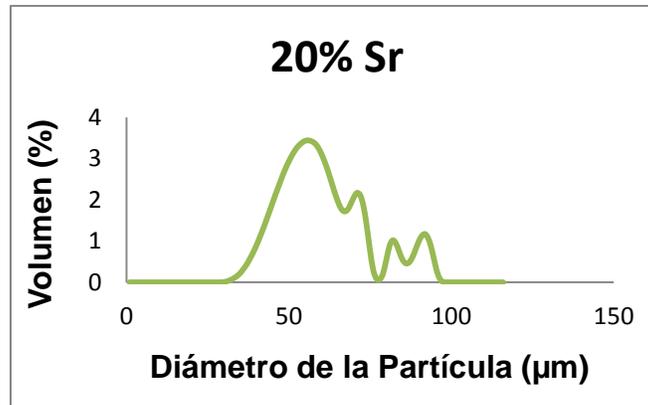


Figura 37. Tamaño de la partícula de la muestra sintetizada con el 20% de Acetato de Sr

Como se observa en la figura 37, se puede ver que el sistema es bimodal.

Se obtuvieron las distribuciones:

d_{10} : 2.541

d_{50} : 8.852

d_{90} : 87.05

d_{10} : el 10% de las partículas mide 2.541µm

d_{50} : el 50% de las partículas mide 8.852µm

d_{90} : el 90% de las partículas mide 87.05µm

Área de Superficie Específica (SSA)

Para medir el área de superficie específica de las apatitas con dosis bajas de Sr, los datos arrojados en el Micromeritics ASAP 2020 se analizaron con el modelo de BET, obteniéndose los siguientes resultados:

%Sr	AREA Ss (m ² /g)	Tamaño poro (BJH des) Å	Cantidad de muestra (g)
0	95,1745	245,709	0,3145
5	89,3842	279,720	0,3464
10	95,4093	255,310	0,4226
15	77,4423	304,263	0,3272
20	20,3545	278,424	0,2635

Tabla 10. Área de superficie específica de las muestras sintetizadas con el 0, 5, 10,15 y 20% de acetato de Sr

Isotermas:

Muestra sintetizada con el 0% de acetato de Sr

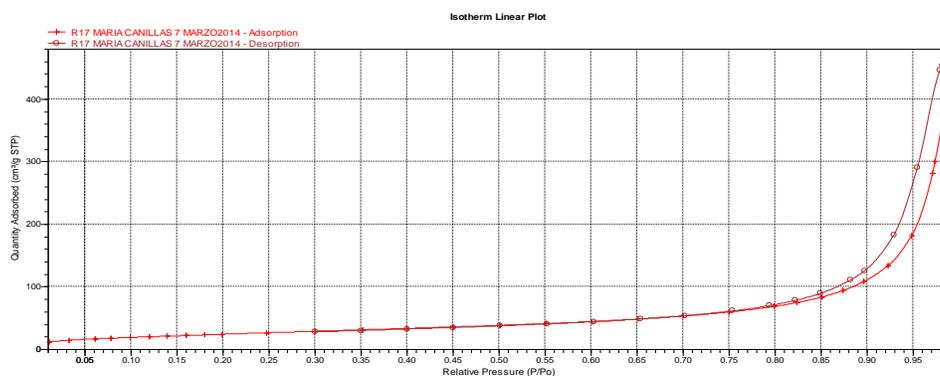


Figura 38. Isotherma obtenida en la medición del SSA de la muestra sintetizada con el 0% de Sr.

Muestra sintetizada con el 5% de acetato de Sr

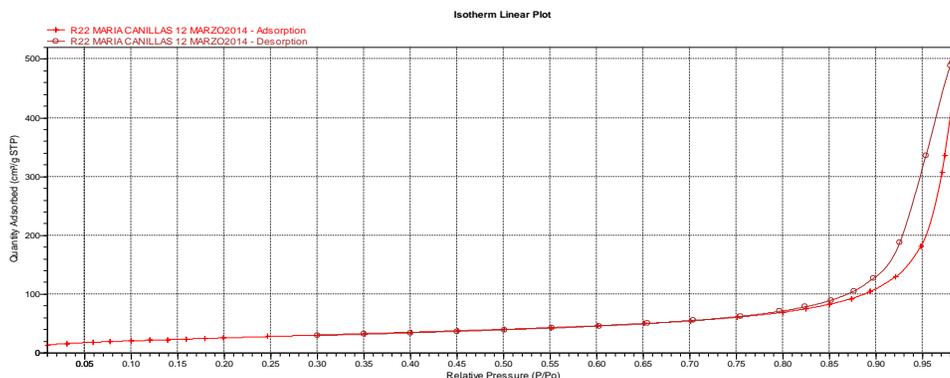


Figura 39. Isotherma obtenida en la medición del SSA de la muestra sintetizada con el 5% de Sr.

Muestra sintetizada con el 10% de acetato de Sr

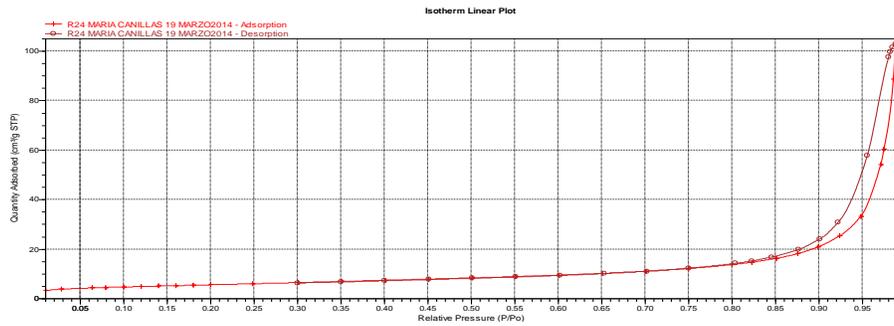


Figura 40. Isotherma obtenida en la medición del SSA de la muestra sintetizada con el 10 % de Sr.

Muestra sintetizada con el 15% de acetato de Sr

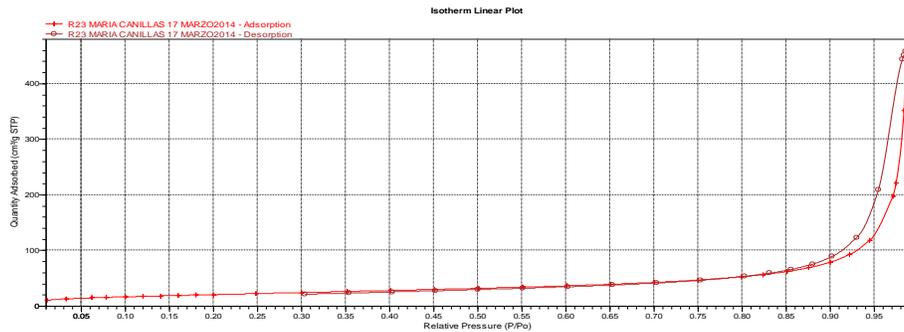


Figura 41. Isotherma obtenida en la medición del SSA de la muestra sintetizada con el 15% de Sr.

Muestra sintetizada con el 20% de acetato de Sr

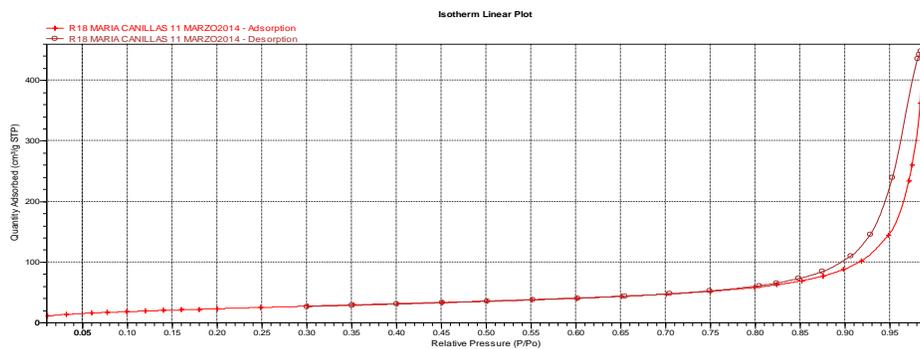


Figura 42. Isotherma obtenida en la medición del SSA de la muestra sintetizada con el 20% de Sr.

Como se observa en la tabla 10, las aéreas específicas de las muestras con dosis bajas de Sr son altas. Solo en la muestra del 20%Sr; 80%Ca fue más baja (20,3545).

3.2.D. TRATAMIENTO TÉRMICO A 600°C DE LAS MUESTRAS SINTETIZADAS CON EL 0, 5, 10, 15 Y 20% DE ACETATO DE Sr

Con el fin de eliminar acetatos y carbonatos que puedan quedar de la síntesis de las apatitas con dosis bajas de Sr y que se pueda observar la apatita en una sola fase en cada muestra, se decidió hacer un calentamiento a 600°C y se hizo su caracterización de la siguiente manera:

Reflexión total atenuada (ATR) muestras calentadas a 600°C:

Para observar los grupos funcionales de las apatitas con dosis bajas de estroncio calentadas a 600°C se hizo una ATR, obteniéndose los siguientes espectros:

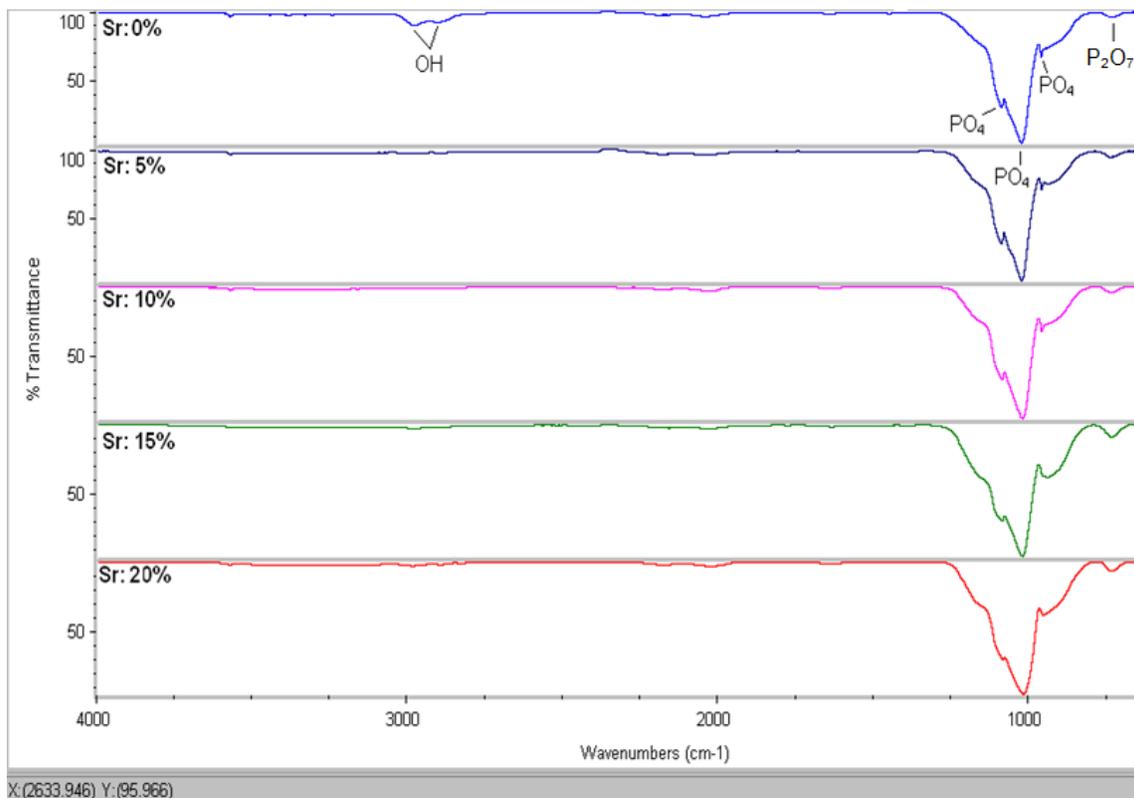


Figura 43. ATR para las muestras sintetizadas con el 0, 5, 10, 15 y 20% de acetato de Sr calentado a 600°C

Como se muestra en la figura 43, Las bandas de 2989 y 2901 cm^{-1} se deben a grupos OH-[50, 55]. Aparecen las bandas correspondientes a los fosfatos en 1090,1026 y 962 cm^{-1} [50, 66, 67] y la banda que se observa a 736 cm^{-1} puede ser debido a la permanencia del grupo $\text{P}_2\text{O}_7^{4-}$ [39].

Difracción de Rayos x (DRX) muestras calentadas a 600°C:

Para ver si se obtuvieron las apatitas en una sola fase, se hizo una DRX a cada muestra, obteniéndose los siguientes diagramas:

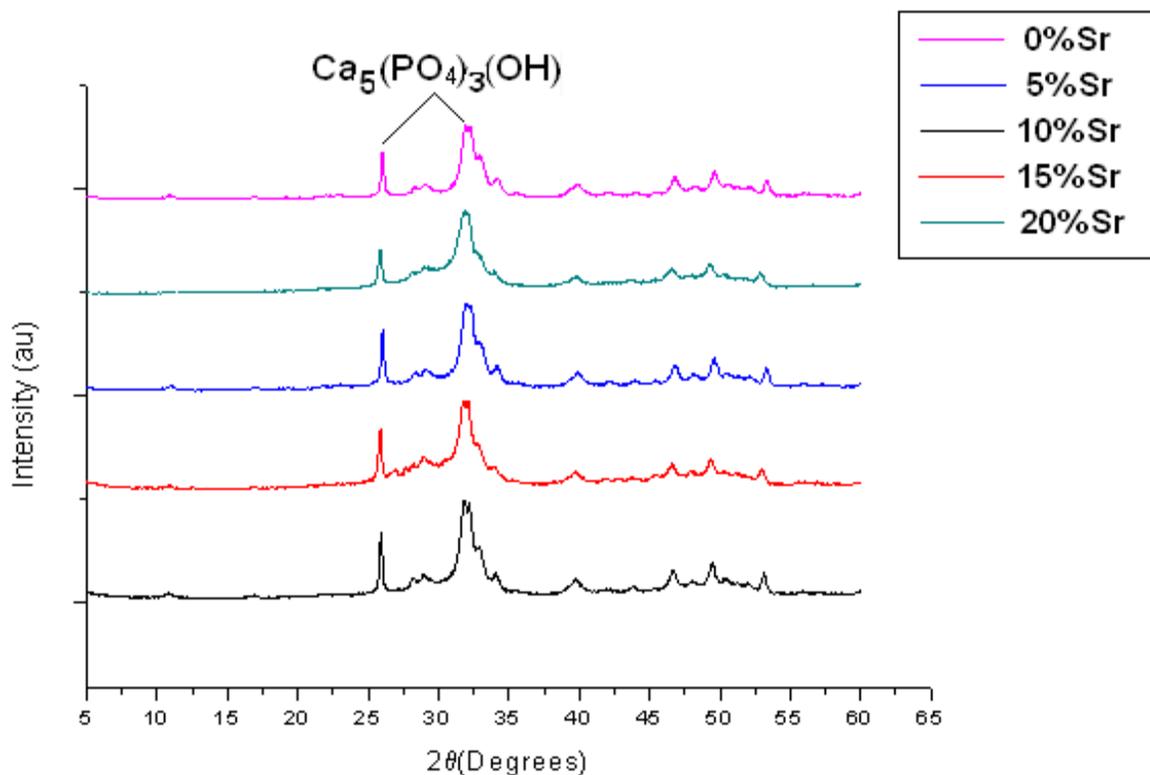


Figura 44. DRX de las muestras sintetizadas con el 0, 5, 10, 15 y 20% de acetato de Sr calentado a 600°C

Como se observa en la figura 44, se ve la apatita en una sola fase. Todos los máximos en la escala 2θ a 26°, 31° y 32° son compatibles con apatita[58].

Parámetros de celda

Se hicieron mediciones para hallar los parámetros de celdas a y c de las apatitas con dosis bajas de Sr calentadas a 600°C mediante DRX obteniéndose los siguientes resultados:

%Sr	a(Å)	S
0	9.439	0.003
5	9.447	0.005
10	9.462	0.006
15	9.60	0.02
20	9.65	0.02

Tabla 11. Parámetros de Celda a de apatitas con dosis bajas de Sr calentadas a 600°C

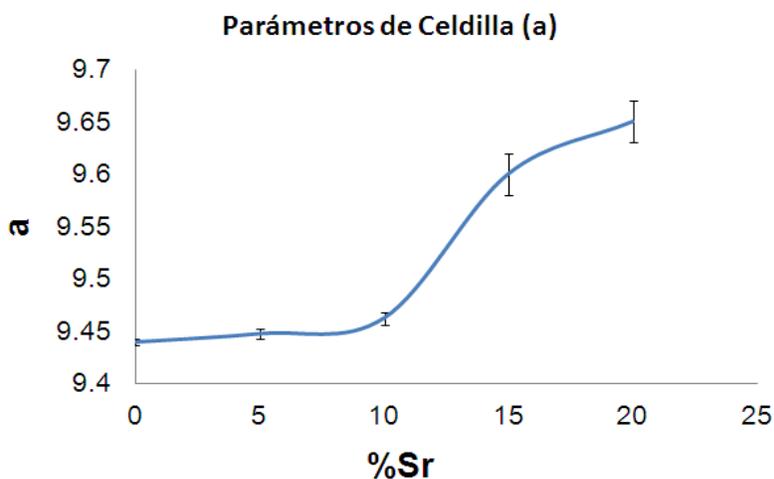


Figura 45. Parámetros de Celdilla a para apatitas con dosis bajas de Sr calentadas a 600°C

%Sr	c(Å)	S
0	6.885	0.002
5	6.89	0.03
10	6.906	0.004
15	6.92	0.02
20	6.97	0.02

Tabla 12. Parámetros de Celda c de apatitas con dosis bajas de Sr calentadas a 600°C

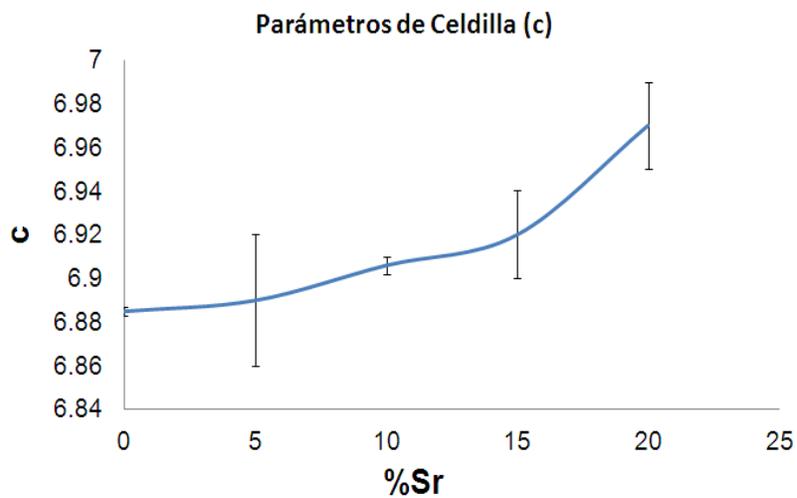


Figura 46. Parámetros de Celdilla c para apatitas con dosis bajas de Sr calentadas a 600°C

El Sr es mayor en radio iónico que el Ca.

Radio iónico del Sr: 1,13Å

Radio iónico del Ca: 0,99Å

Como se puede observar en las figuras 45 y 46, aumenta los parámetros de celda, lo que confirma que el Sr se ha introducido en la estructura de la apatita.

Tamaño del Cristal de las muestras calentadas a 600°C

Para ver el tamaño del cristal en las apatitas con dosis bajas de Sr calentadas a 600°C, se utilizó el programa de DRX, donde se pudo observar el pico a 002 correspondiente al Eje Z del cristal hexagonal de la siguiente forma:

Muestra sintetizada con el 0% de acetato de Sr calentada a 600°C (apatita):

Pico a 002 (Eje Z del cristal hexagonal)

$$2\theta = 26$$

Valor de referencia posición 002 (B std. (*2th))= 0.133

Anchura (B obs (*2Th))= 0.234

Tamaño del cristal= 807 Å

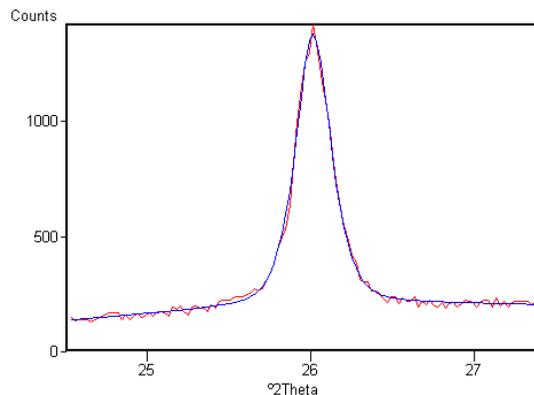


Figura 47. Pico a 002% para la muestra sintetizada con el 0% de acetato de Sr calentada a 600°C

Muestra sintetizada con el 5% de acetato de Sr calentada a 600°C:

Pico a 002 (Eje Z del cristal hexagonal)

$$2\theta = 26.006$$

Valor de referencia posición 002 (B std. (*2th))= 0.133

Anchura (B obs (*2Th))= 0.217

Tamaño del cristal= 971 Å

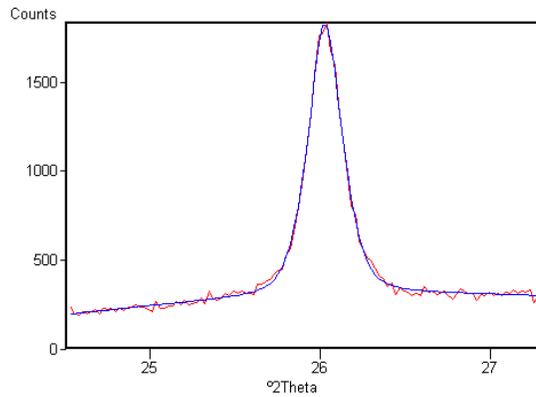


Figura 48. Pico a 002% para la muestra sintetizada con el 5% de acetato de Sr calentada a 600°C

Muestra sintetizada con el 10% de acetato de Sr calentada a 600°C:

Pico a 002(Eje Z del cristal hexagonal):

$$2\theta = 25.897$$

$$\text{Valor de referencia posición 002 (B std. (*2th))} = 0.133$$

$$\text{Anchura (B obs (*2Th))} = 0.211$$

$$\text{Tamaño del cristal} = 1045 \text{ \AA}$$

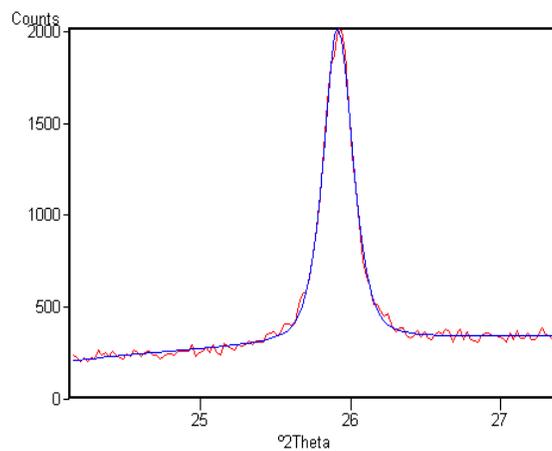


Figura 49. Pico a 002% para la muestra sintetizada con el 10% de acetato de Sr calentada a 600°C

Muestra sintetizada con el 15% de acetato de Sr calentada a 600°C:

Pico a 002(Eje Z del cristal hexagonal)

$$2\theta = 25.825$$

$$\text{Valor de referencia posición 002 (B std. (*2th))} = 0.133$$

$$\text{Anchura (B obs (*2Th))} = 0.228$$

$$\text{Tamaño del cristal} = 858 \text{ \AA}$$

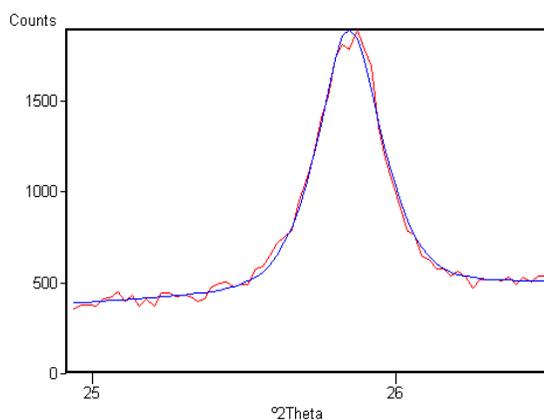


Figura 50. Pico a 002% para la muestra sintetizada con el 15% de acetato de Sr calentada a 600°C

Muestra sintetizada con el 20% de acetato de Sr calentada a 600°C:

Pico a 002(Eje Z del cristal hexagonal):

$$2\theta = 25.835$$

$$\text{Valor de referencia posición 002 (B std. (*2th))} = 0.133$$

$$\text{Anchura (B obs (*2Th))} = 0.268$$

$$\text{Tamaño del cristal} = 604 \text{ \AA}$$

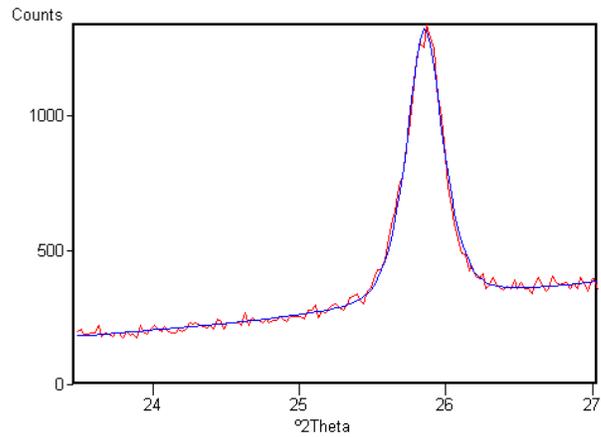


Figura 51. Pico a 002% para la muestra sintetizada con el 20% de acetato de Sr calentada a 600°C

Con respecto a la apatita, se puede observar que el acetato de estroncio aumento el tamaño del cristal en las muestras del 5, 10 y 15% de Sr.

Microscopio electrónico de Barrido con filamento de emisión de campo

Con el fin de analizar la porosidad de las apatitas con dosis bajas de Sr calentadas a 600°C a diferentes magnificaciones, se utilizó el FE-SEM y se observó la parte fracturada de cada pastilla de la siguiente manera:

FE-SEM para la muestra sintetizada con el 0% de acetato de Sr calentada a 600°C:

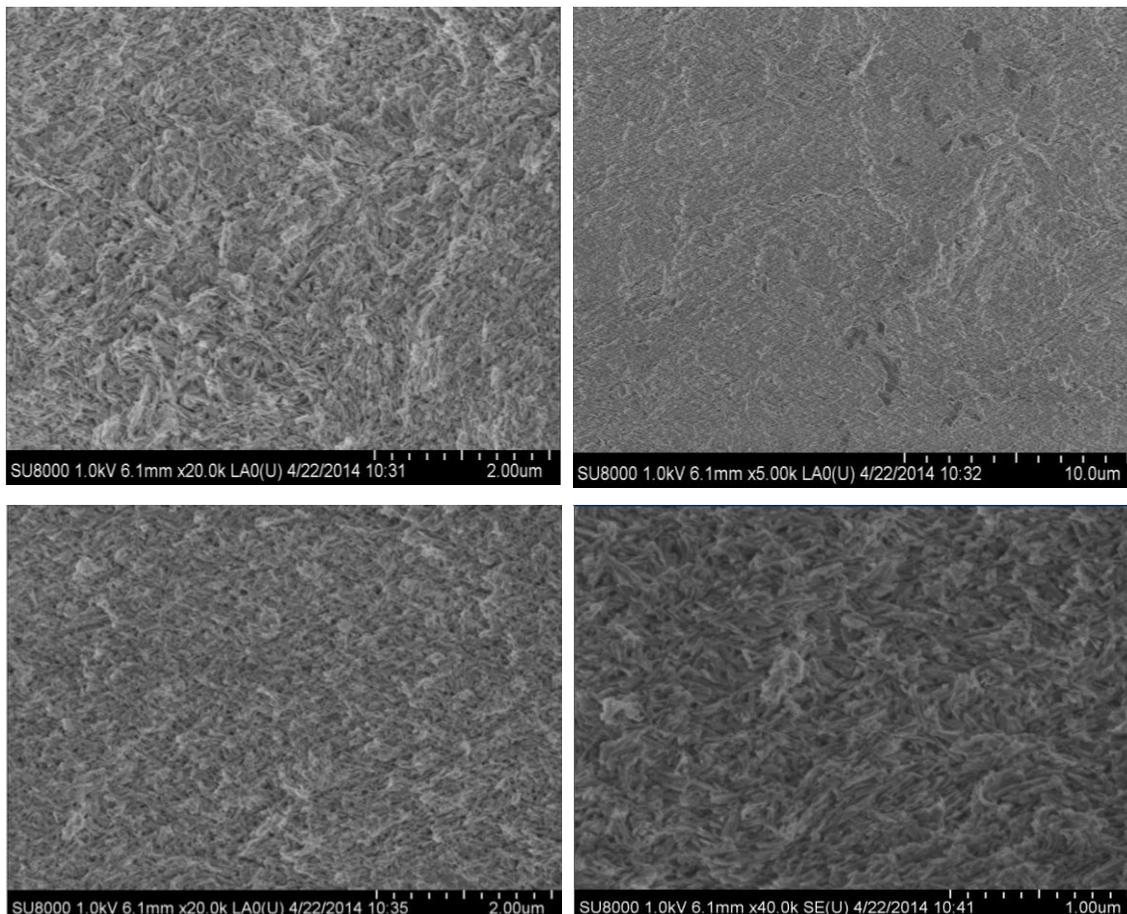


Figura 52. Imágenes de FE-SEM de la muestra sintetizada con el 0% de acetato de Sr calentada a 600°C a diferentes magnificaciones.

La figura 52 muestra imágenes de SEM, donde se ve poca porosidad y corresponde a 71.13% de la densidad obtenida.

FE-SEM para la muestra sintetizada con el 5% de acetato de Sr calentada a 600°C:

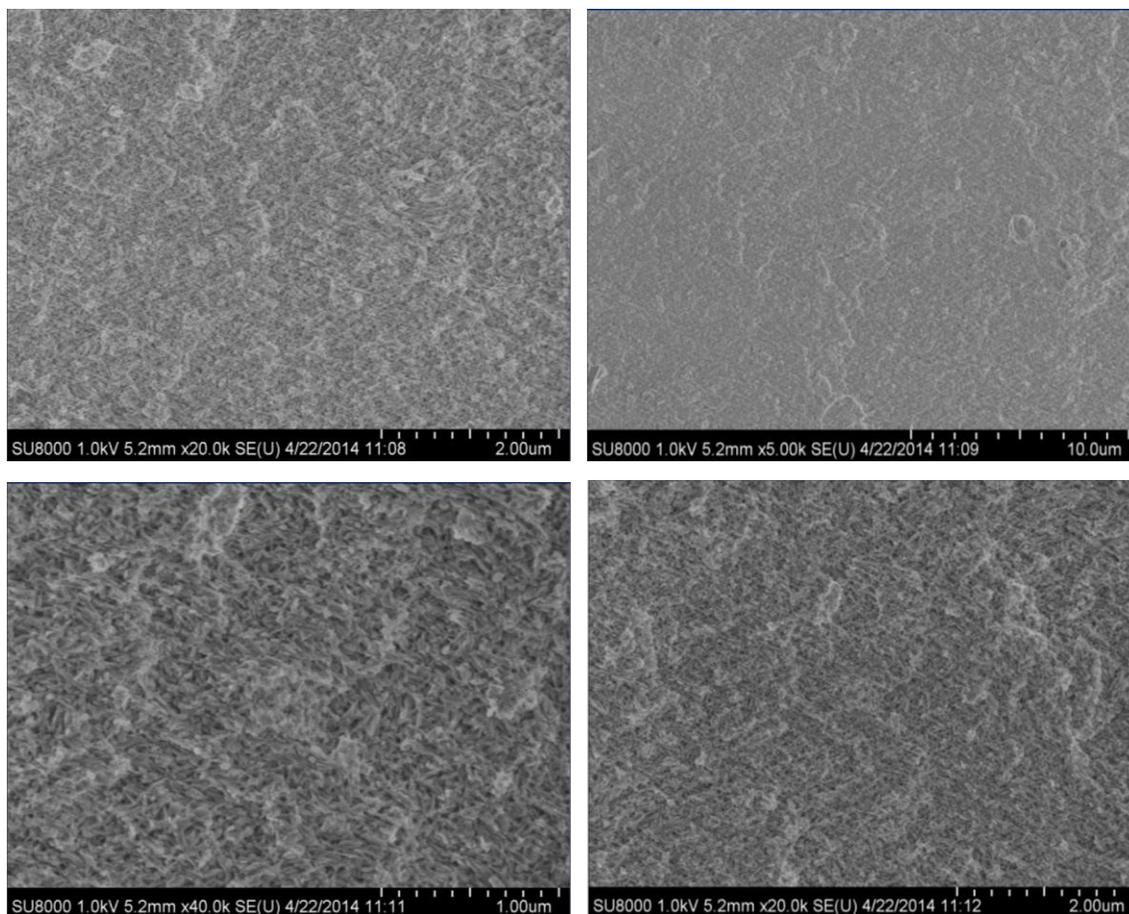


Figura 53. Imágenes de FE-SEM de la muestra sintetizada con el 5% de acetato de Sr calentada a 600°C a diferentes magnificaciones.

La figura 53 muestra imágenes de SEM, donde se ve poca porosidad y corresponde al 83.03% de la densidad obtenida.

FE-SEM para la muestra sintetizada con el 10% de acetato de Sr calentada a 600°C:

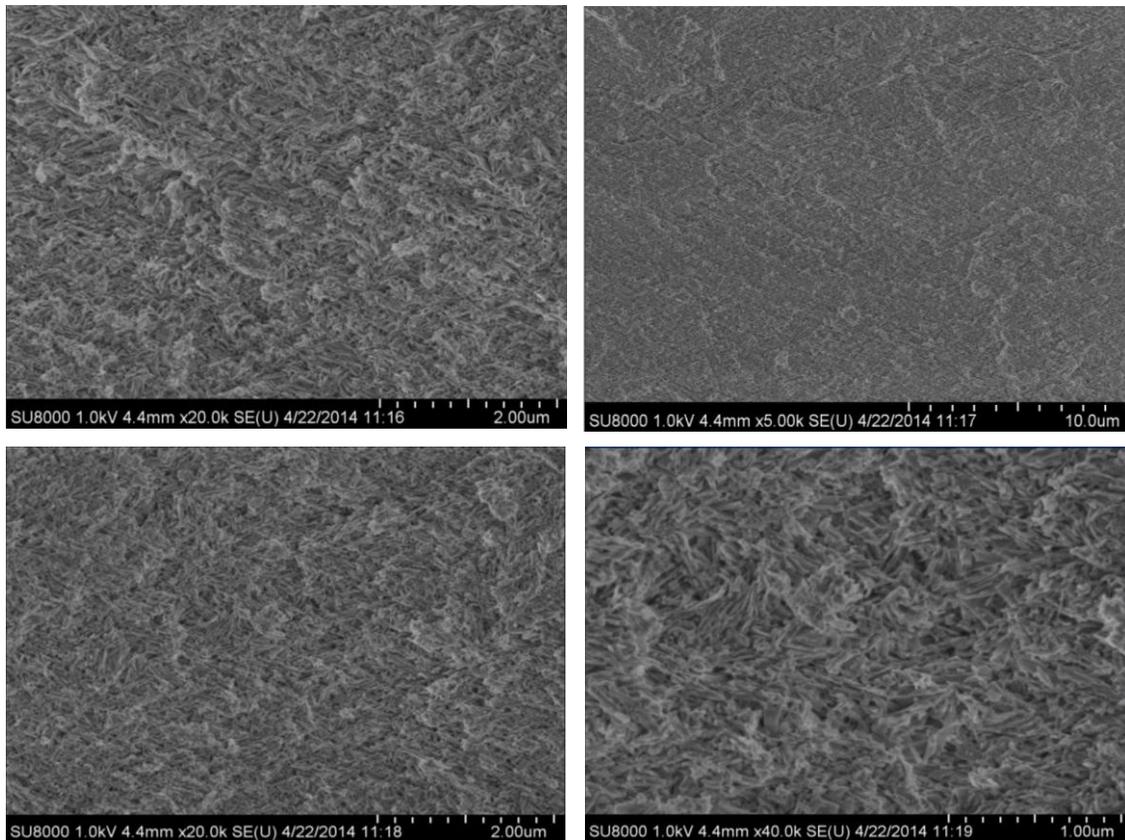


Figura 54. Imágenes de FE-SEM de la muestra sintetizada con el 10% de acetato de Sr calentada a 600°C a diferentes magnificaciones.

La figura 54 muestra imágenes de SEM, donde se ve poca porosidad y corresponde al 86.28% de la densidad obtenida.

FE-SEM para la muestra sintetizada con el 15% de acetato de Sr calentada a 600°C

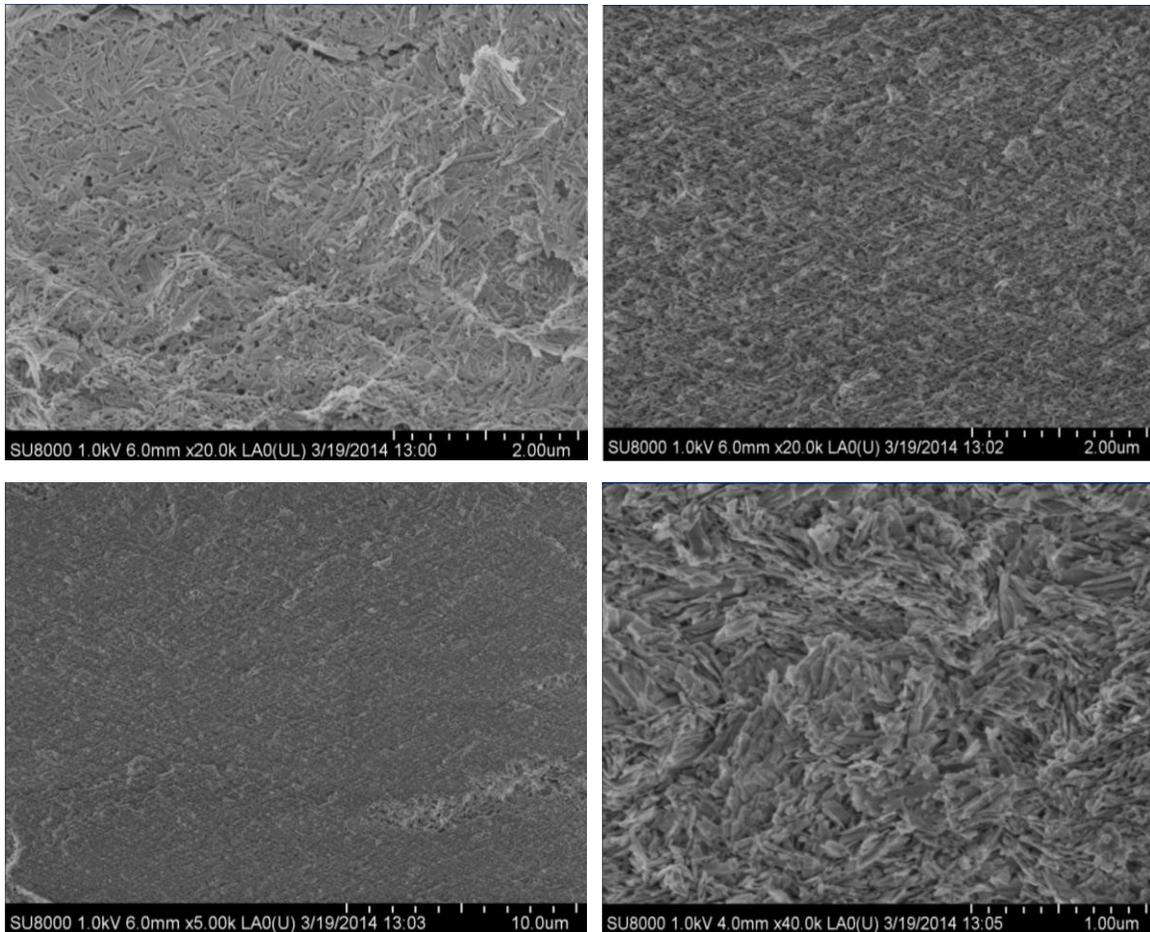


Figura 55. Imágenes de FE-SEM de la muestra sintetizada con el 15% de acetato de Sr calentada a 600°C a diferentes magnificaciones

La figura 55 muestra imágenes de SEM, donde se ve poca porosidad y corresponde al 87.18% de la densidad obtenida.

FE-SEM para la muestra sintetizada con el 20% de acetato de Sr calentada a 600°C:

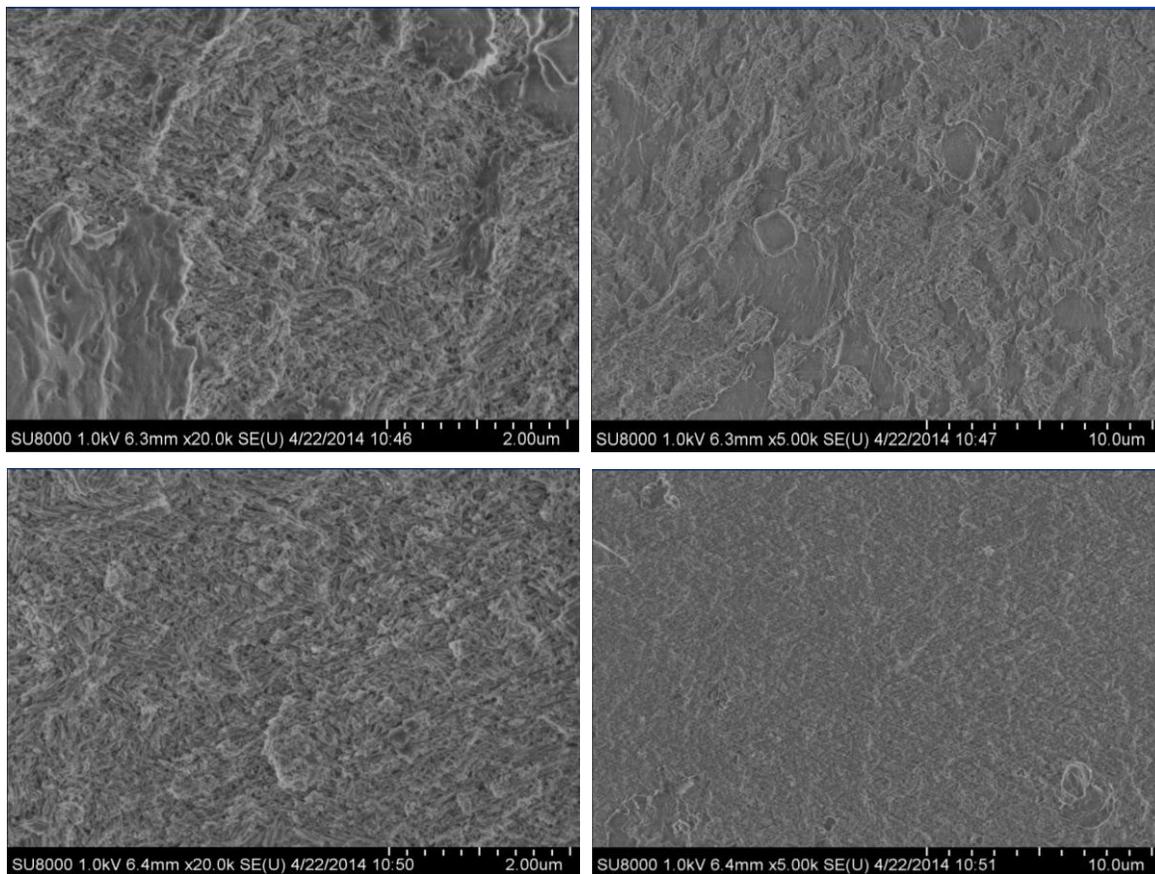


Figura 56. Imágenes de FE-SEM de la muestra sintetizada con el 20% de acetato de Sr calentada a 600°C a diferentes magnificaciones.

La figura 56 muestra imágenes de SEM, donde se ve poca porosidad y corresponde al 87.20% de la densidad obtenida.

Como se puede observar, hay poca porosidad en las muestras, las densidades altas están bien y concuerdan con los resultados obtenidos en el área de superficie específica.

EDAX del FE-SEM para apatitas con dosis bajas de Sr calentadas a 600°C

Se midió el EDAX en cada muestra en tres zonas diferentes, para ver si el peso en % era similar en las tres zonas. Se promediaron los pesos y se obtuvieron los siguientes resultados:

Muestras calentadas a 600°C	Peso (%) Ca	Desviaciones	Peso (%) Sr	Desviaciones
0%Sr;100%Ca	37	4.85	0	0
5%Sr; 95%Ca	32.20	1.31	4.34	0.12
10%Sr; 90%Ca	26.50	2.40	8.37	1.67
15%Sr; 85%Ca	27.10	0.70	11.93	0.58
20%Sr; 80%Ca	25.21	0.31	15.37	0.69

Tabla 13. EDAX para apatitas con dosis bajas de Sr calentadas a 600°C

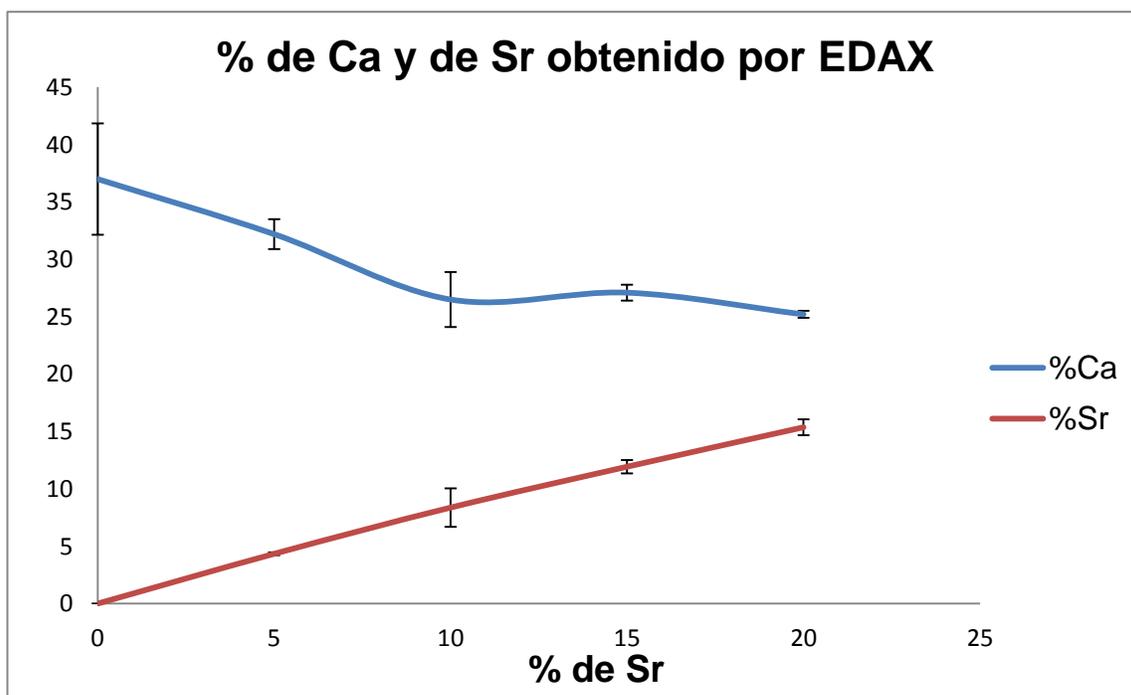


Figura 57. %Ca y Sr obtenido por EDAX para apatitas con dosis bajas de Sr calentadas a 600°C

Porcentaje hallado de calcio en las muestras				
	5%Sr; 95%Ca:	10%Sr; 90%Ca:	15%Sr; 85%Ca:	20%Sr; 80%Ca:
$\frac{\%Ca}{\%Sr}$	$\frac{95}{5} = 19$	$\frac{90}{10} = 9$	$\frac{85}{15} = 5.7$	$\frac{80}{20} = 4$

Tabla 14. Porcentaje de Ca hallado en las apatitas con dosis bajas de Sr calentadas a 600°C

Porcentaje obtenido por EDAX de calcio en las muestras				
	5%Sr; 95%Ca:	10%Sr; 90%Ca:	15%Sr; 85%Ca:	20%Sr; 80%Ca:
$\frac{\%Ca}{\%Sr}$	$\frac{32.20}{4.34} = 7.42$	$\frac{26.50}{8.37} = 3.16$	$\frac{27.10}{11.93} = 2.27$	$\frac{25.21}{15.37} = 1.64$

Tabla 15. Porcentaje obtenido de Ca por EDAX en las apatitas con dosis bajas de Sr calentadas a 600°C

Como se observa en la tabla 15, estos resultados muestran que le entra más estroncio a las muestras, que Calcio.

Plasma Acoplado Inductivamente (ICP) de las muestras calentadas a 600°C (obtención de ecuaciones)

Para obtener los mg/Kg de Ca, Sr y de P que hay en las apatitas con dosis bajas de Sr, se utilizó el ICP obteniéndose los siguientes resultados:

Muestra	Ca(mg/Kg)	Sr(mg/Kg)	P(mg/Kg)
0% Sr; 100%Ca	308489.0	0	194670.3
5% Sr; 95%Ca	272880.1	41878.6	195277.6
10% Sr; 90%Ca	258151.7	76176.9	194115.3
15% Sr; 85%Ca	228188.6	103003.8	190192.9
20% Sr; 80%Ca	208568.3	132461.2	182796.9

Tabla 16. mg/kg de Ca, Sr y P obtenidos por ICP

Plasma Acoplado Inductivamente (ICP) de las muestras calentadas a 600°C para comprobar la liberación de Ca y Sr en el MTT

Debido a que las muestras del 20% de acetato de Sr; 80% de acetato de Ca y del 5% de acetato de estroncio; 95% de acetato de calcio calentadas a 600°C mostraron una disminución en la viabilidad celular durante las 24 horas y 48 horas (ver MTT con Osteosarcomas), se les hizo un ensayo para ver si liberaban calcio o estroncio mediante ICP.

Se introdujo una pastilla de 0.2g del 20% de acetato de Sr; 80% acetato de Ca calentada a 600°C en 1ml de PBS y se le midió el pH inicialmente, a las 24, 48 horas y a los 7 días. Luego se introdujo una pastilla de 0.2g del 5% de acetato de Sr; 95% acetato de Ca calentada a 600°C en 1ml de PBS y se le midió el pH inicialmente, a las 24, 48 horas y a los 7 días:

Medición de pH Inicialmente:

pH del PBS=7.44

pH del 20% de acetato de Sr; 80% acetato de Ca calentada a 600°C = 7.41

pH del 5% de acetato de Sr; 95% acetato de Ca calentada a 600°C = 7.43

Medición de pH a las 24 horas:

pH del 20% de acetato de Sr; 80% acetato de Ca calentada a 600°C = 6.4

pH del 5% de acetato de Sr; 95% acetato de Ca calentada a 600°C = 6.037

Medición de pH a las 48 horas:

pH del 20% de acetato de Sr; 80% acetato de Ca calentada a 600°C = 7.12

pH del 5% de acetato de Sr; 95% acetato de Ca calentada a 600°C = 6.74

Medición de pH a los 7 días:

pH del 20% de acetato de Sr; 80% acetato de Ca calentada a 600°C = 7.24

pH del 5% de acetato de Sr; 95% acetato de Ca calentada a 600°C = 7.00

Comparando los pH con los resultados de MTT, vemos que coordina con la disminución en las 24 y 48 horas y en el aumento a los 7 días.

Se hizo un ICP y se obtuvieron los siguientes resultados:

Muestra	Ca(mg/L)	Sr(mg/L)	P(mg/L)
20% de acetato de Sr; 80% acetato de Ca calentado a 600°C	357.2	0.1	301.2
5% de acetato de Sr; 95% acetato de Ca calentado a 600°C	264.9	98.7	322.5

Tabla 17. mg/kg de Ca, Sr y P obtenidos por ICP para las muestras sintetizadas con el 20 y 5% de acetato de Sr

Picnómetro de Helio (Densidad Real) muestras calentadas a 600°C

Se hicieron 10 mediciones de la densidad en el picnómetro de helio de las muestras sintetizadas con el 0, 5, 10, 15 y 20% de acetato de Sr calentadas a 600°C con sus desviaciones y se promediaron obteniéndose los siguientes resultados:

%Sr	Densidad Real (g/cm ³)	S (Desviación)
0	2.84	0.03
5	2.77	0.02
10	2.77	0.03
15	2.73	0.03
20	2.89	0.03

Tabla 28. Densidad real de las muestras sintetizadas con el 0, 5, 10,15 y 20% de acetato de Sr calentados a 600°C

Método de Arquímedes (Densidad aparente) muestras calentadas a 600°C

Se hicieron 4 mediciones de la densidad a 4 pastillas en la balanza de las muestras sintetizadas con el 0, 5, 10, 15 y 20% de acetato de Sr calentadas a 600°C con sus desviaciones y se promediaron obteniéndose los siguientes resultados:

%Sr	Densidad Aparente (g/cm3)	S (Desviación)
0	2.02	0.01
5	2.52	0.01
10	2.30	0.01
15	2.38	0.01
20	2.39	0.02

Tabla 19. Densidad aparente de las muestras sintetizadas con el 0, 5, 10,15 y 20% de acetato de Sr calentados a 600°C

% Densidad

Teniendo la densidad aparente y la densidad real de cada muestra, se pudo calcular la densidad en % la siguiente manera:

$$\% \text{ Densidad} = \frac{\text{Densidad Aparente}}{\text{Densidad Real}} \times 100$$

%Sr	Densidad (%)	S (Desviación)
0	71.13	0.01
5	83.03	0.01
10	86.28	0.01
15	87.18	0.01
20	87.2	0.01

Tabla 20. Densidad en % de las muestras sintetizadas con el 0, 5, 10,15 y 20% de acetato de Sr calentados a 600°C

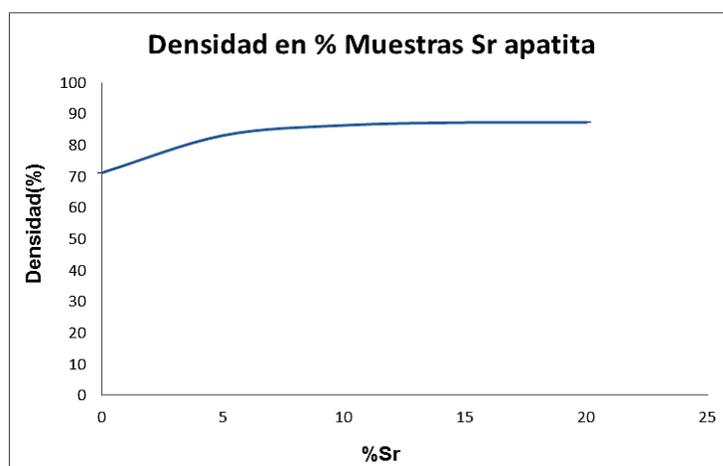


Figura 58. Densidad en % de las muestras sintetizadas con el 0, 5, 10,15 y 20% de acetato de Sr calentados a 600°C

Medición de la Porosidad muestras calentadas a 600°C

Teniendo las densidades en % se pudo calcular la porosidad para cada muestra de la siguiente forma:

$$\text{Porosidad} = 100 - (\% \text{ Densidad})$$

%Sr	Porosidad (%)
0	29
5	17
10	14
15	13
20	13

Tabla 21. Porosidad con su desviación en % de las muestras sintetizadas con el 0, 5, 10,15 y 20% de acetato de Sr calentados a 600°C

Prueba de dureza Vickers (HV) muestras calentadas a 600°C

Se promediaron las 4 medidas de HV por cada una de las 4 pastillas de cada muestra y lo mismo las desviaciones obteniéndose los siguientes resultados:

%Sr	Promedio de HV (MPa)	Promedio de la desviación (S)
0	345.31	13.31
5	336.54	10.47
10	284.75	8.64
15	334.73	13.21
20	348.09	10.95

Tabla 22. Resultados de dureza Vickers con su desviación de las muestras sintetizadas con el 0, 5, 10,15 y 20% de acetato de Sr calentados a 600°C

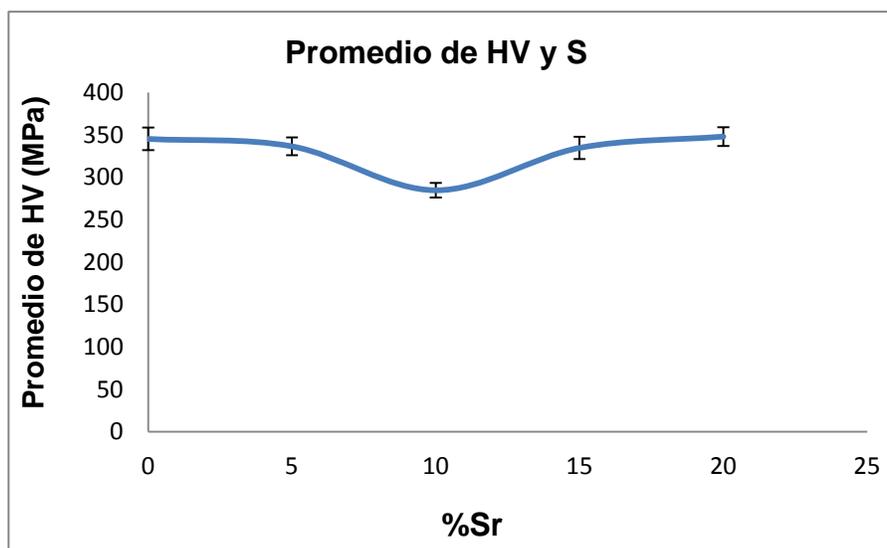
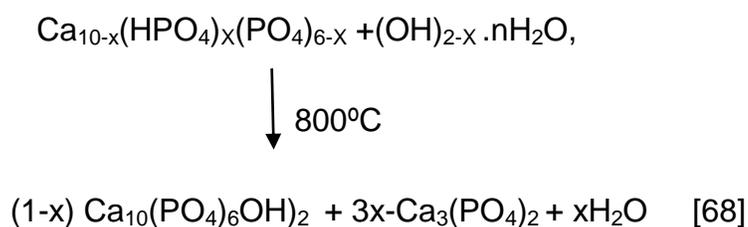


Figura 59. Promedio de HV y S de las muestras sintetizadas con el 0, 5, 10,15 y 20% de acetato de Sr calentados a 600°C

Análisis Químico

Reacción de descomposición térmica si se asume que no se tiene CO_3



Tratamiento térmico a 1000°C de las muestras sintetizadas con el 0, 5, 10,15 y 20% de acetato de sr

Se decidió hacer un calentamiento a las muestras con dosis bajas de estroncio en un pirolizador a 1000°C y se hizo su caracterización de la siguiente forma:

Difracción de Rayos x (DRX)

Se hizo una DRX para ver las fases que aparecen a las muestras, obteniéndose los siguientes diagramas:

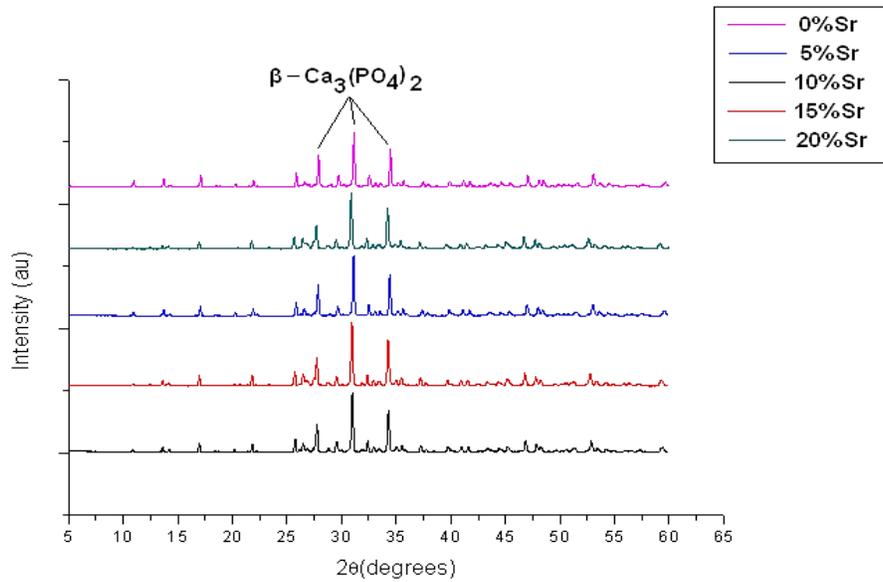


Figura 60. DRX de las muestras sintetizadas con el 0, 5, 10, 15 y 20% de acetato de Sr calentado a 1000°C.

Como se observa en la figura 60, se ve el β -TCP como fase primaria acompañado de la apatita.

%B-TCP y %HA

Se midió el %B-TCP de las muestras con dosis bajas de Sr calentadas a 1000°C y el %HA de las muestras calentadas a 600°C analizando el perfil completo del patrón de difracción de rayos X por el método Rietveld para obtener la ecuación que resulta en cada muestra de la siguiente forma:

%Sr	%B-TCP	S
0	96.80	0.06
5	97.90	0.07
10	96.70	0.09
15	98.67	0.03
20	97.60	0.03

Tabla 23. %B-TCP hallado por el método Rietveld de las muestras sintetizadas con el 0, 5, 10,15 y 20% de acetato de Sr calentado a 1000°C

%Sr	%HA	S
0	3.20	0.04
5	2.10	0.04
10	3.30	0.06
15	1.30	0.04
20	2.40	0.06

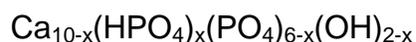
Tabla 24. %HA hallado por el método Rietveld de las muestras sintetizadas con el 0, 5, 10,15 y 20% de acetato de Sr calentado a 600°C

Los % de B-TCP y de HA que pueden observarse en las tablas 23 y 24 se rempazan y se obtiene la ecuación para cada muestra de la siguiente forma:

Apatita (muestra sintetizada con el 0%Sr):

$$\text{Ca/P} = ((1.5 * \%B\text{-TCP}) + (1.667 * \%HA))/100$$

$$x = 10 - (6 * \text{Ca/P})$$



Apatita sustituida por Sr:

$$\text{Ca+Sr/P} = ((1.5 * \%B\text{-TCP}) + (1.667 * \%SrHA))/100$$

$$x = 10 - (6 * (\text{Ca+Sr/P}))$$



% Sr	Ca+Sr/P	Ecuaciones Obtenidas
0	1.5053	$\text{Ca}_9(\text{HPO}_4)(\text{PO}_4)_5\text{OH}$
5	1.5035	$\text{Ca}_{8.41}\text{Sr}_{0.59}(\text{HPO}_4)(\text{PO}_4)_5\text{OH}$
10	1.5055	$\text{Ca}_{7.93}\text{Sr}_{1.07}(\text{HPO}_4)(\text{PO}_4)_5\text{OH}$
15	1.5017	$\text{Ca}_{7.46}\text{Sr}_{1.54}(\text{HPO}_4)(\text{PO}_4)_5\text{OH}$
20	1.5040	$\text{Ca}_7\text{Sr}_2(\text{HPO}_4)(\text{PO}_4)_5\text{OH}$

Tabla 25. Ecuaciones obtenidas de las muestras sintetizadas con el 0, 5, 10,15 y 20% de acetato de Sr

Técnica Coulter para las muestras calentadas a 600°C:

Muestra sintetizada con el 0% de acetato de Sr calentada a 600°C:

Al medir el tamaño de la partícula de la muestra sintetizada con el 0% de acetato de Sr calentada 600°C se obtuvo la siguiente gráfica:

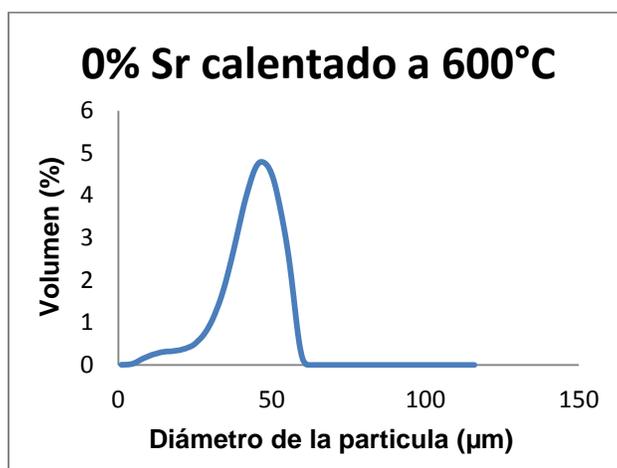


Figura 61. Tamaño de la partícula de la muestra sintetizada con el 0% de acetato de Sr calentada a 600°C

Como se observa en la figura 61, se puede ver que el sistema es monomodal, ya que presenta 1 pico.

Se obtuvieron las distribuciones:

d_{10} : 0.672

d_{50} : 2.512

d_{90} : 5.908

d_{10} : el 10% de las partículas mide 0.672µm

d_{50} : el 50% de las partículas mide 2.512µm

d_{90} : el 90% de las partículas mide 5.908µm

Muestra sintetizada con el 5% de acetato de Sr calentada a 600°C:

Al medir el tamaño de la partícula de la muestra sintetizada con el 5% de Acetato de Sr calentada 600°C se obtuvo la siguiente gráfica:

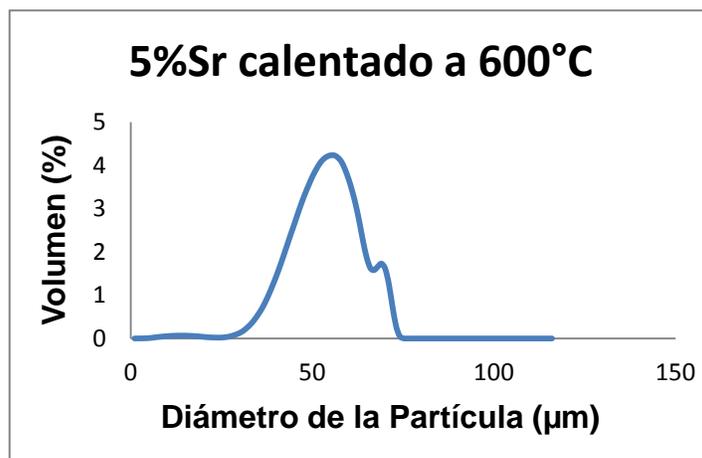


Figura 62. Tamaño de la partícula de la muestra sintetizada con el 5% de acetato de Sr calentada a 600°C

Como se observa en la figura 62, se puede ver que el sistema es bimodal, ya que presenta 2 picos.

Se obtuvieron las distribuciones:

d_{10} : 1.842

d_{50} : 5.909

d_{90} : 17.83

d_{10} : el 10% de las partículas mide 1.842µm

d_{50} : el 50% de las partículas mide 5.909µm

d_{90} : el 90% de las partículas mide 17.83µm

Muestra sintetizada con el 10% de acetato de Sr calentada a 600°C:

Al medir el tamaño de la partícula de la muestra sintetizada con el 10% de Acetato de Sr calentada 600°C se obtuvo la siguiente gráfica:

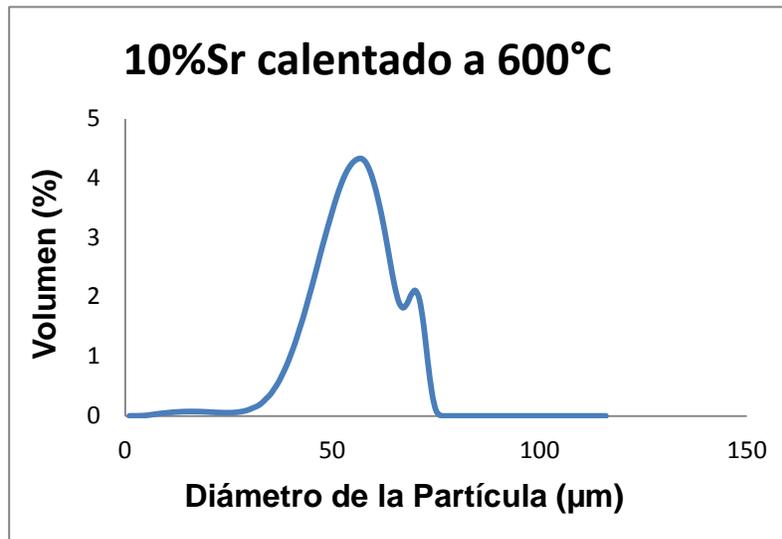


Figura 63. Tamaño de la partícula de la muestra sintetizada con el 10% de acetato de Sr calentada a 600°C

Como se observa en la figura 63, se puede ver que el sistema es bimodal, ya que presenta 2 picos.

Se obtuvieron las distribuciones:

d_{10} : 2.119

d_{50} : 6.813

d_{90} : 21.72

d_{10} : el 10% de las partículas mide 2.119µm

d_{50} : el 50% de las partículas mide 6.813µm

d_{90} : el 90% de las partículas mide 21.72µm

Muestra sintetizada con el 15% de acetato de Sr calentada a 600°C:

Al medir el tamaño de la partícula de la muestra sintetizada con el 15% de Acetato de Sr calentada 600°C se obtuvo la siguiente gráfica:

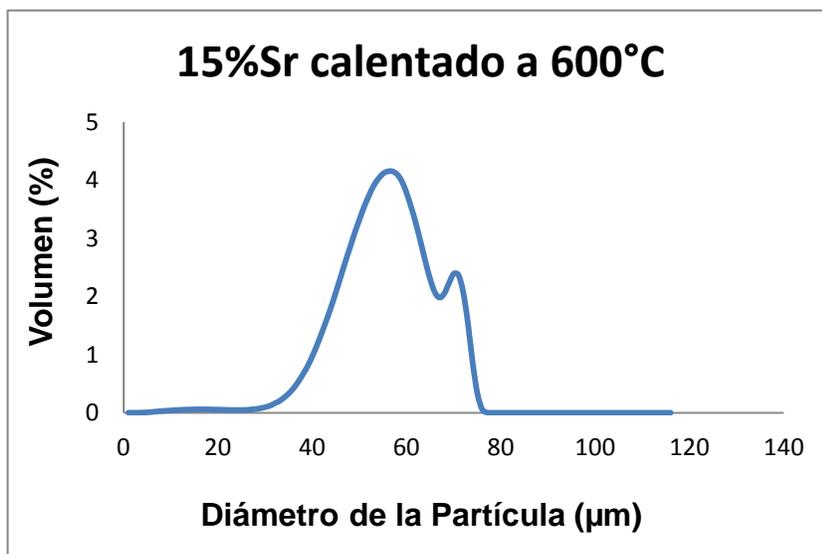


Figura 64. Tamaño de la partícula de la muestra sintetizada con el 15% de acetato de Sr calentada a 600°C

Como se observa en la figura 64, se puede ver que el sistema es bimodal, ya que presenta 2 picos.

Se obtuvieron las distribuciones:

d_{10} : 2.224

d_{50} : 7.202

d_{90} : 24.62

d_{10} : el 10% de las partículas mide 2.224µm

d_{50} : el 50% de las partículas mide 7.202µm

d_{90} : el 90% de las partículas mide 24.62µm

Muestra sintetizada con el 20% de acetato de Sr calentada a 600°C:

Al medir el tamaño de la partícula de la muestra sintetizada con el 20% de Acetato de Sr calentada 600°C se obtuvo la siguiente gráfica:

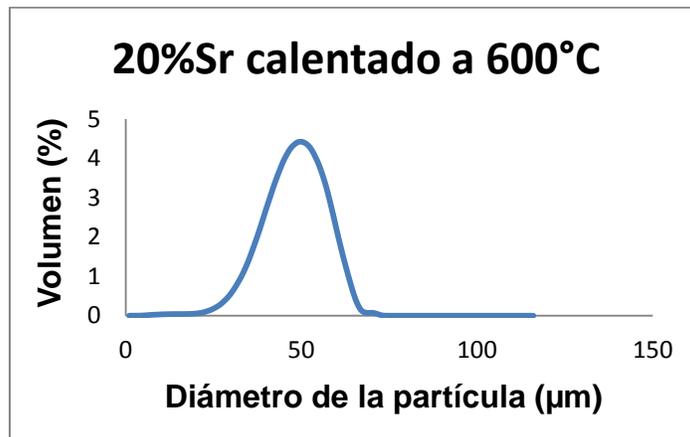


Figura 65. Tamaño de la partícula de la muestra sintetizada con el 20% de acetato de Sr calentada a 600°C

Como se observa en la figura 65, se puede ver que el sistema es monomodal, ya que presenta 1 pico.

Se obtuvieron las distribuciones:

d_{10} : 1.156

d_{50} : 3.574

d_{90} : 9.378

d_{10} : el 10% de las partículas mide 1.156µm

d_{50} : el 50% de las partículas mide 3.574µm

d_{90} : el 90% de las partículas mide 9.378µm

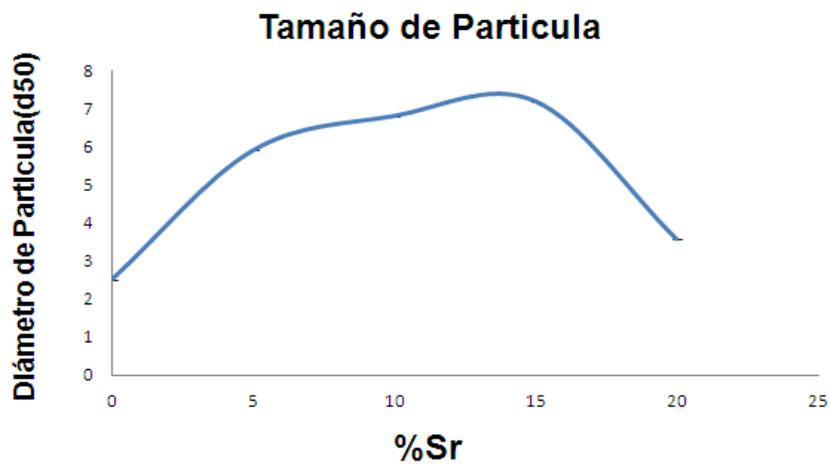


Figura 66. Tamaño de partícula d_{50} de las muestras con dosis bajas de Sr

Como se observa en la figura 66, hay un aumento en el diámetro de partícula (d50) para las muestras sintetizadas con el 5, 10 y 15% de acetato de Sr.

Área de Superficie Específica (SSA) muestras calentadas a 600°C

Para medir el área de superficie específica de las muestras con dosis baja de Sr, los datos arrojados en el Micromeritics ASAP 2020 se analizaron con el modelo de BET, obteniéndose los siguientes resultados:

%Sr	SSA(m²/g)
0	58,18
5	56,88
10	62,06
15	48,46
20	53,83

Tabla 26. Área de superficie específica de las muestras con dosis bajas de Sr calentadas a 600°C

Como se observa en la tabla 26, el área de superficie específica de la muestra del 10% de Sr aumento a 62,06 m²/g con respecto a la muestra que no contiene Sr (0%Sr) que fue de 58,18 m²/g. En la muestra del 5% no se produjo un aumento, el área de superficie específica fue de 56,88 m²/g y ya en dosis del 15 y 20% de Sr se disminuye a 48,46 m²/g para el 15% y a 53.83 m²/g para el 20% Sr.

Análisis de Integridad muestras calentadas a 600°C

Para el análisis de integridad se seleccionaron las muestras sintetizadas con el 5, 10 y 15% de acetato de Sr calentadas a 600°C. Las cuales mostraron los siguientes resultados:

Muestra sintetizada con el 5% de acetato de Sr calentada a 600°C:

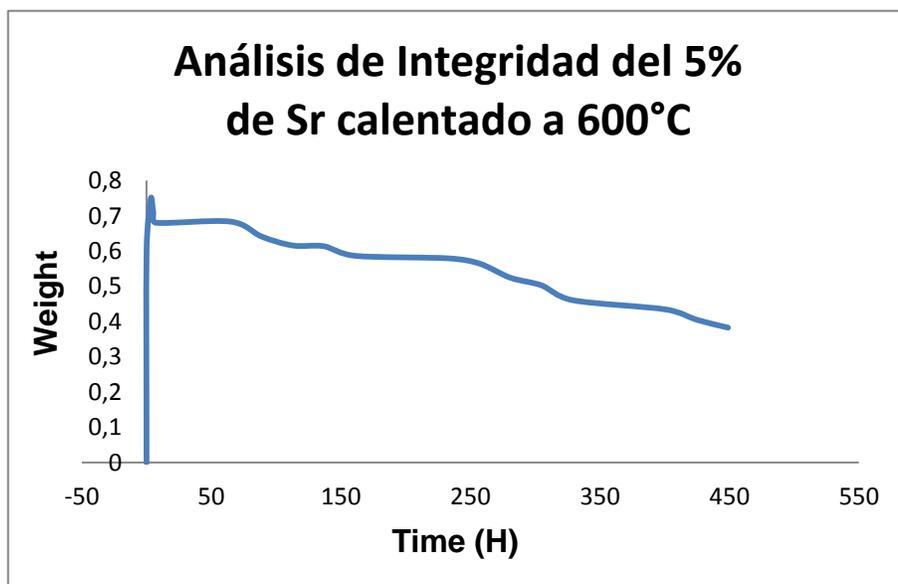


Figura 67. Análisis de integridad de la muestra sintetizada con el 5% de acetato de Sr calentada a 600°C

Muestra sintetizada con el 10% de acetato de Sr calentada a 600°C:

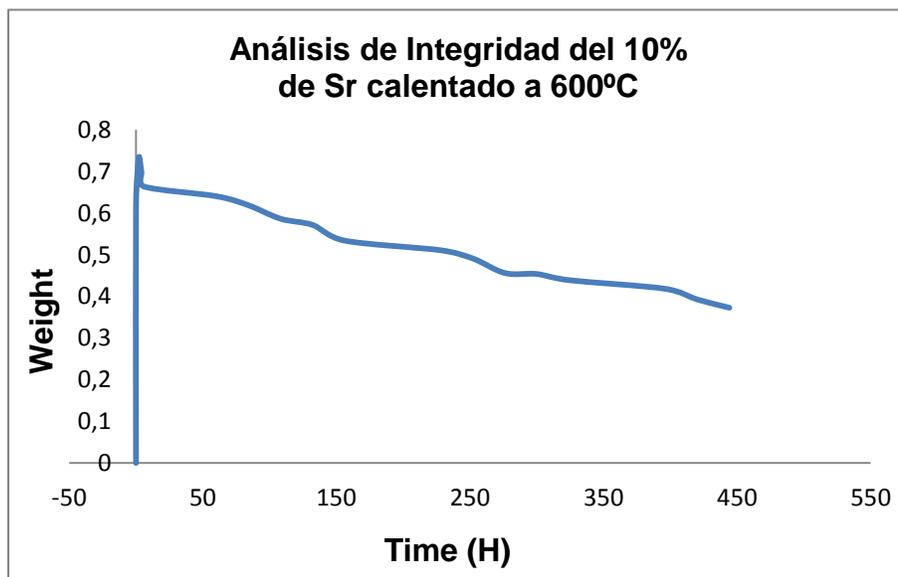


Figura 68. Análisis de integridad de la muestra sintetizada con el 10% de acetato de Sr calentada a 600°C

Muestra sintetizada con el 15% de acetato de Sr calentada a 600°C:

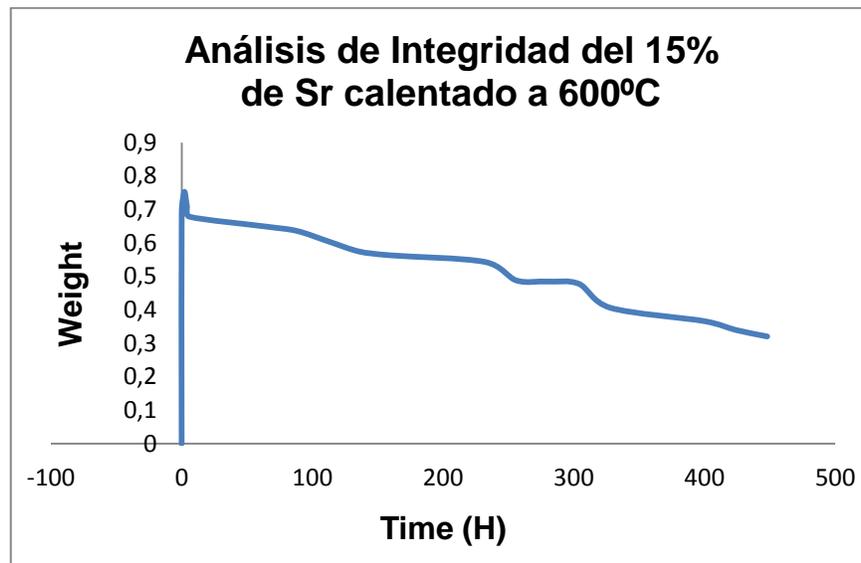


Figura 69. Análisis de integridad de la muestra sintetizada con el 15% de acetato de Sr calentada a 600°C

Como se puede observar en las figuras 67, 68 y 69, las muestras tienen el mismo comportamiento y no se degradaron en el día 20, con lo cual se pudieron hacer todos los ensayos de MTT.

4. ESTUDIOS CELULARES

4.1. PRUEBAS DE CITOTOXICIDAD

Para ver si los materiales son citotóxicos o no, se realizó los siguientes ensayos celulares:

4.1.A. ENSAYO MTT CON OSTEOSARCOMAS:

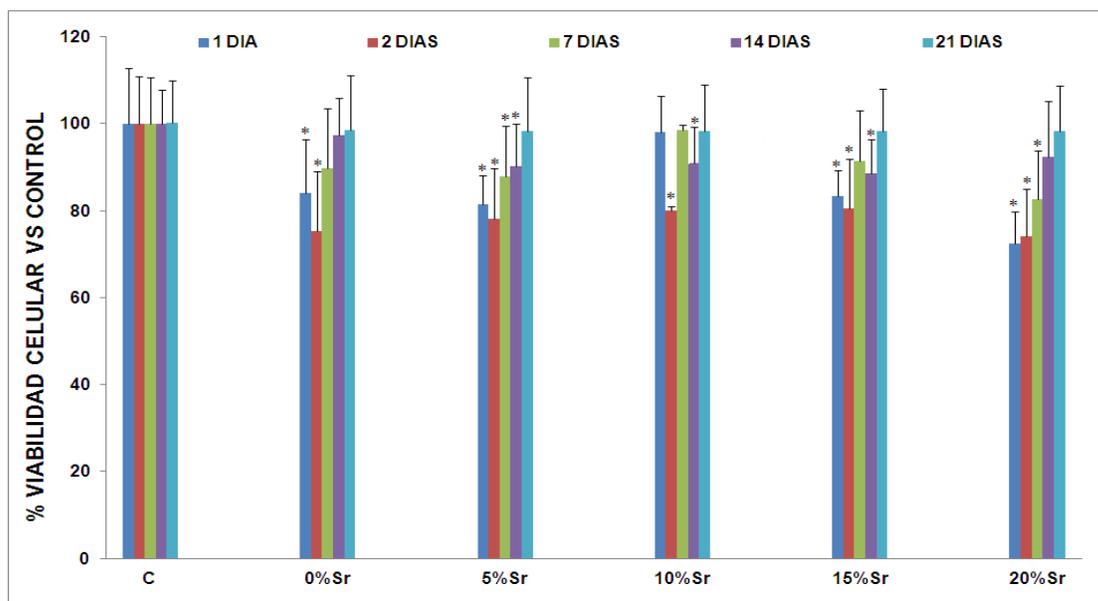


Figura 70. Resultados del ensayo MTT para el control (C) y las muestras sintetizadas con el 0, 5, 10, 15 y 20% de acetato de Sr.

Se representa la media \pm desviación estándar (n= 12) y el nivel de significación obtenido en los ANOVAs - Tukey frente al control donde *: $p < 0,05$

Este ensayo de MTT que se muestra en la figura 70, se realizó para ver si las muestras de apatita y apatita enriquecida con Sr a diferentes proporciones, presentan citotoxicidad para proceder con el cultivo de osteoblastos.

Como se puede observar en la figura 70, no se ha detectado niveles de citotoxicidad elevados en ninguna de las formulaciones estudiadas, alcanzando la viabilidad celular valores superiores al 72 % con respecto al control a 1, 2, 7, 14 y 21 días de estudio según cada caso. Esto indica que las muestras no son citotóxicas.

Las diferencias significativas, en donde los tratamientos fueron más bajos que el control puede ser atribuido al tiempo de cultivo, es decir a la prolongada permanencia de las células en el cultivo o al tipo de células con las que se hizo el análisis.

4.1.B. ENSAYO MTT CON OSTEOLASTOS:

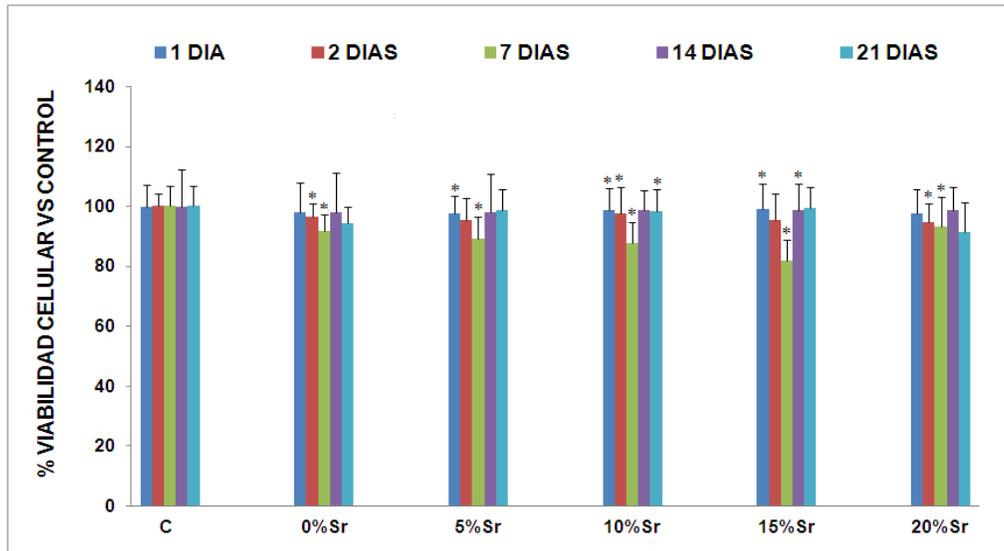


Figura 71. Resultados del ensayo MTT para el control (C) y las muestras sintetizadas con el 0, 5,10,15 y 20% de acetato de Sr

Se representa la media \pm desviación estándar (n= 14) y el nivel de significación obtenido en los ANOVAs - Tukey frente al control donde *: $p < 0,05$

Como se puede observar en la figura 71, no se ha detectado niveles de citotoxicidad en ninguna de las formulaciones estudiadas, alcanzando la viabilidad celular valores superiores al 82 % con respecto al control a 1, 2, 7, 14 y 21 días de estudio según cada caso. Comparando los resultados de este ensayo de MTT, con los resultados obtenidos con osteosarcomas, se puede ver que hay un aumento en la viabilidad celular (ver el MTT de osteosarcomas día 1 y 2), lo que puede llevar a pensar que el Sr en la apatita logra que se obtenga una mayor viabilidad en el caso de los osteoblastos.

La viabilidad fue significativamente casi igual que el control (98%) en las muestras sintetizadas con el 5, 10 y 15% de Sr en el primer día, en la muestra sintetizada con el 10% de acetato de Sr al segundo y a los 21 días y en la muestra sintetizada con el 15% de acetato de Sr a los 14 días. Esto se puede atribuir a los factores del tipo del material ya que puede haber liberación de Ca y/o Sr. Las diferencias

significativas más bajas con respecto al control pueden deberse al tiempo de cultivo en el que se hizo el análisis.

4.2. ENSAYO 1: ROJO DE ALIZARINA

Los resultados obtenidos se presentan en la serie de micrográficas incluidas a continuación:

Ensayo con rojo de alizarina para Osteoblastos (tratamiento 1) con respecto al control negativo (TMX) y las muestras sintetizadas con el 0, 5, 10, 15 y 20% de acetato de Sr:

TMX:

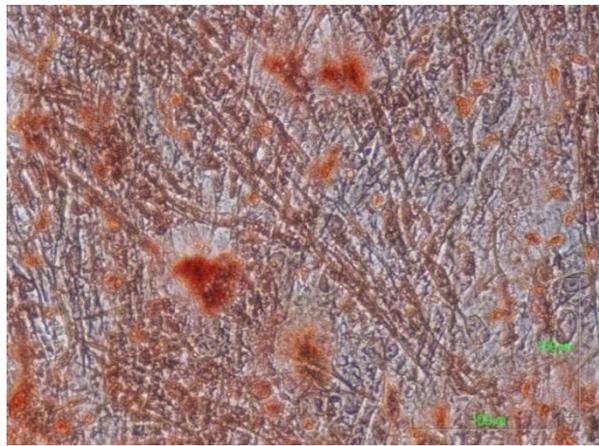


Figura 72. Ensayo con rojo de alizarina para Osteoblastos con respecto al TMX

Muestra sintetizada con el 0% de acetato de Sr:

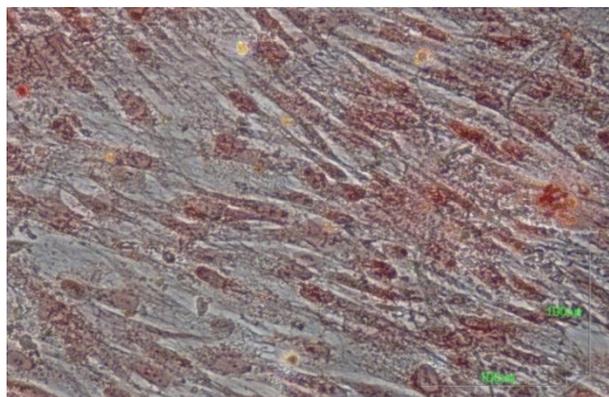


Figura 73. Ensayo con rojo de alizarina para Osteoblastos con respecto a la muestra sintetizada con el 0% de acetato de Sr

Muestra sintetizada con el 5% de acetato de Sr:

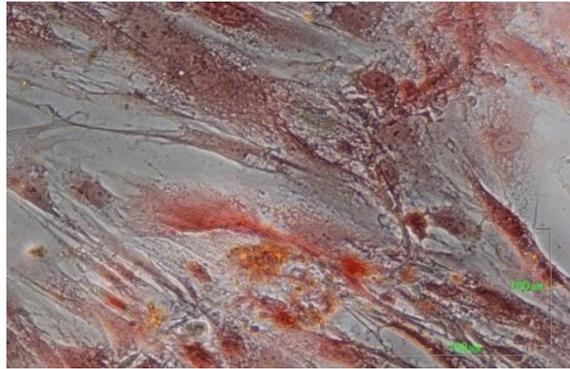


Figura 74. Ensayo con rojo de alizarina para Osteoblastos con respecto a la muestra sintetizada con el 5% de acetato de Sr

Muestra sintetizada con el 10% de acetato de Sr:

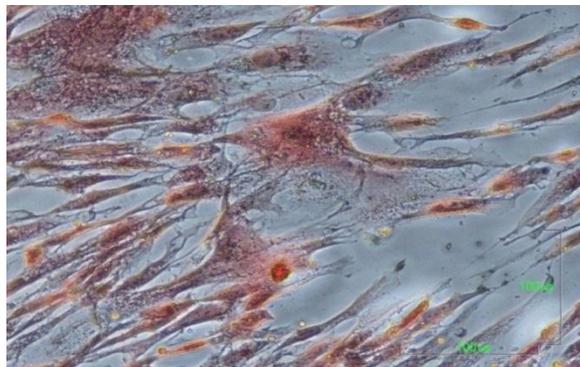


Figura 75. Ensayo con rojo de alizarina para Osteoblastos con respecto a la muestra sintetizada con el 10% de acetato de Sr

Muestra sintetizada con el 15% de acetato de Sr:

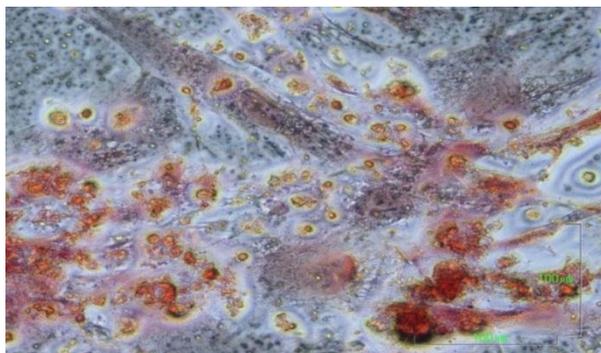


Figura 76. Ensayo con rojo de alizarina para Osteoblastos con respecto a la muestra sintetizada con el 15% de acetato de Sr

Muestra sintetizada con el 20% de acetato de Sr:

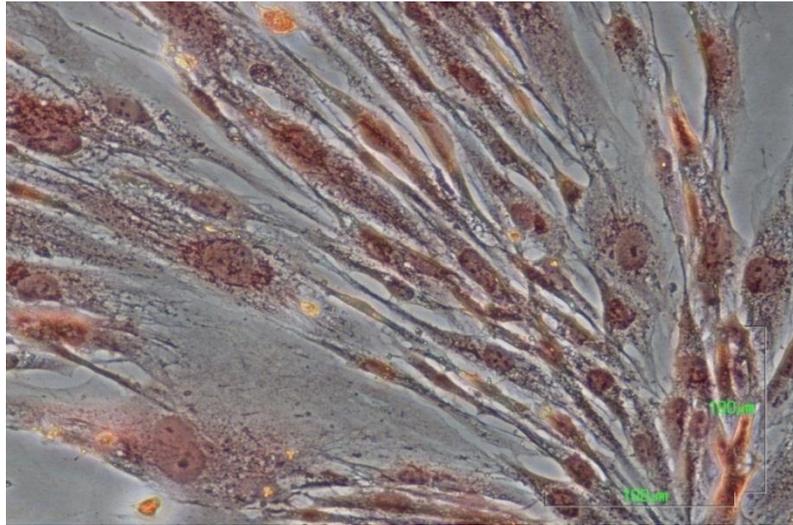


Figura 77. Ensayo con rojo de alizarina para Osteoblastos con respecto a la muestra sintetizada con el 20% de acetato de Sr

Ensayo con rojo de alizarina para MSC en medio no osteoinductor (tratamiento 2) con respecto al control negativo (TMX) y las muestras sintetizadas con el 0, 5, 10, 15 y 20% de acetato de Sr:

TMX:

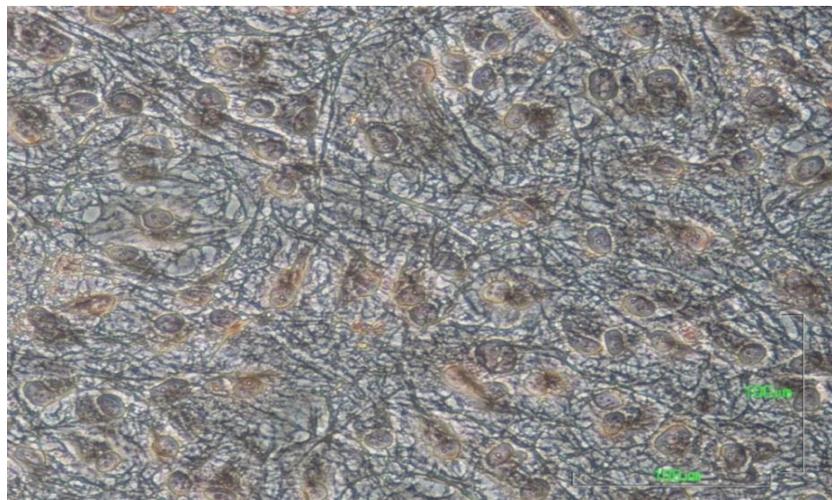


Figura 78. Ensayo con rojo de alizarina para MSC en medio no osteoinductor con respecto al TMX

Muestra sintetizada con el 0% de acetato de Sr:

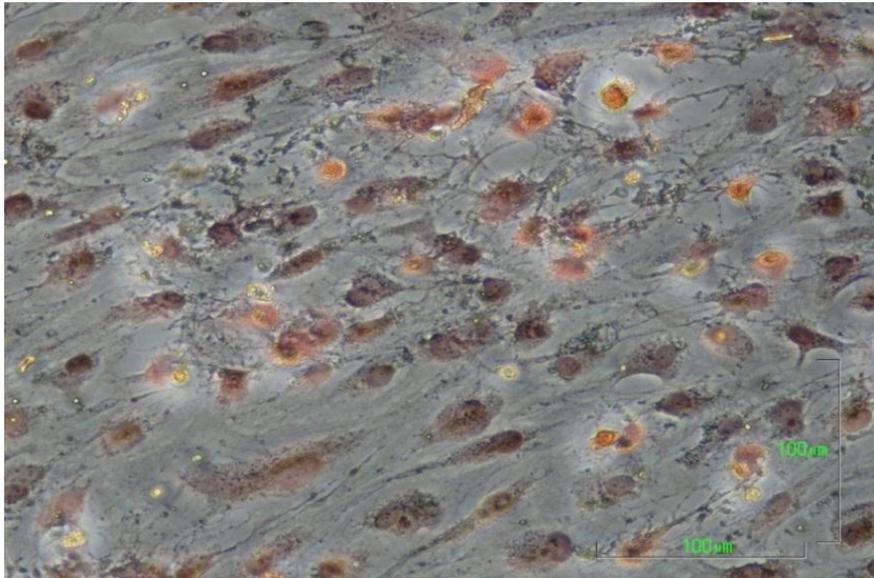


Figura 79. Ensayo con rojo de alizarina para MSC en medio no osteoinductor con respecto a la muestra sintetizada con el 0% de acetato de Sr

Muestra sintetizada con el 5% de acetato de Sr:

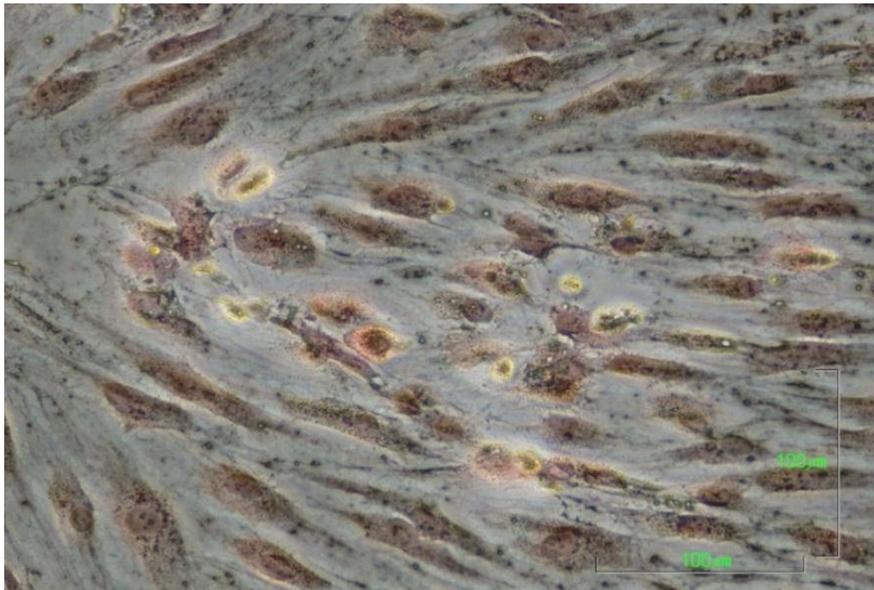


Figura 80. Ensayo con rojo de alizarina para MSC en medio no osteoinductor con respecto a la muestra sintetizada con el 5% de acetato de Sr

Muestra sintetizada con el 10% de acetato de Sr:



Figura 81. Ensayo con rojo de alizarina para MSC en medio no osteoinductor con respecto a la muestra sintetizada con el 10% de acetato de Sr

Muestra sintetizada con el 15% de acetato de Sr:

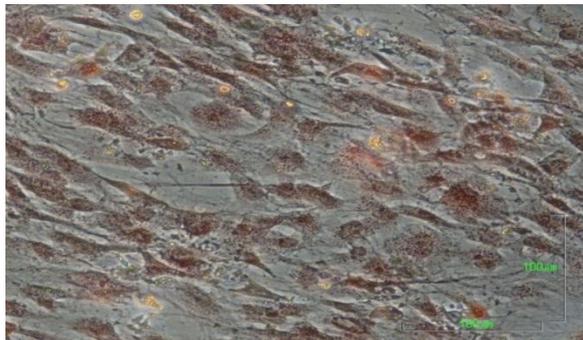


Figura 82. Ensayo con rojo de alizarina para MSC en medio no osteoinductor con respecto a la muestra sintetizada con el 15% de acetato de Sr

Muestra sintetizada con el 20% de acetato de Sr:



Figura 83. Ensayo con rojo de alizarina para MSC en medio no osteoinductor con respecto a la muestra sintetizada con el 20% de acetato de Sr

Ensayo con rojo de alizarina para MSC en medio osteoinductor (tratamiento 3) con respecto al control negativo (TMX) y las muestras sintetizadas con el 0, 5, 10, 15 y 20% de acetato de Sr:

TMX:

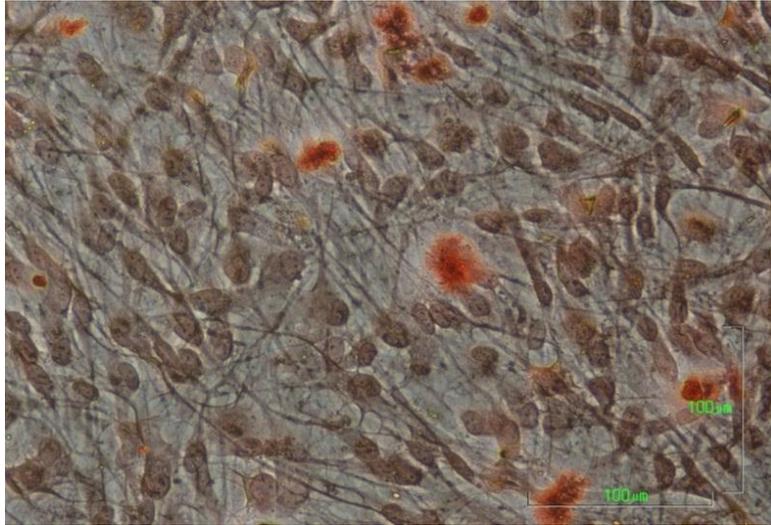


Figura 84. Ensayo con rojo de alizarina para MSC en medio osteoinductor con respecto al TMX

Muestra sintetizada con el 0% de acetato de Sr:

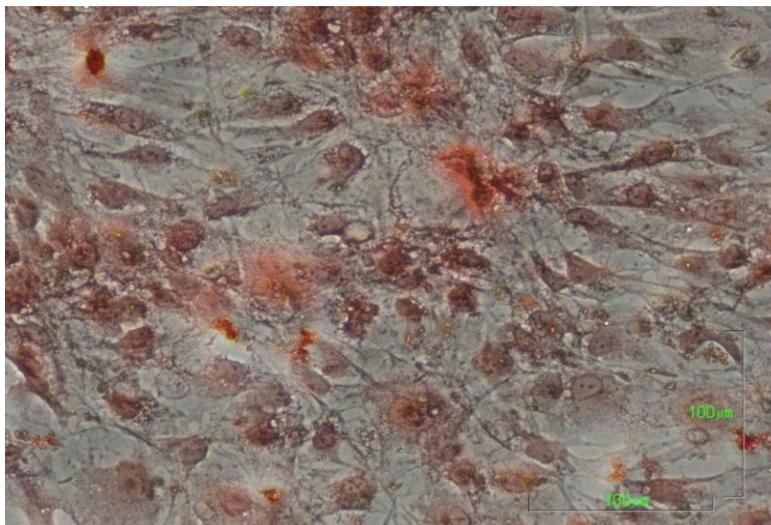


Figura 85. Ensayo con rojo de alizarina para MSC en medio osteoinductor con respecto a la muestra sintetizada con el 0% de acetato de Sr

Muestra sintetizada con el 5% de acetato de Sr:

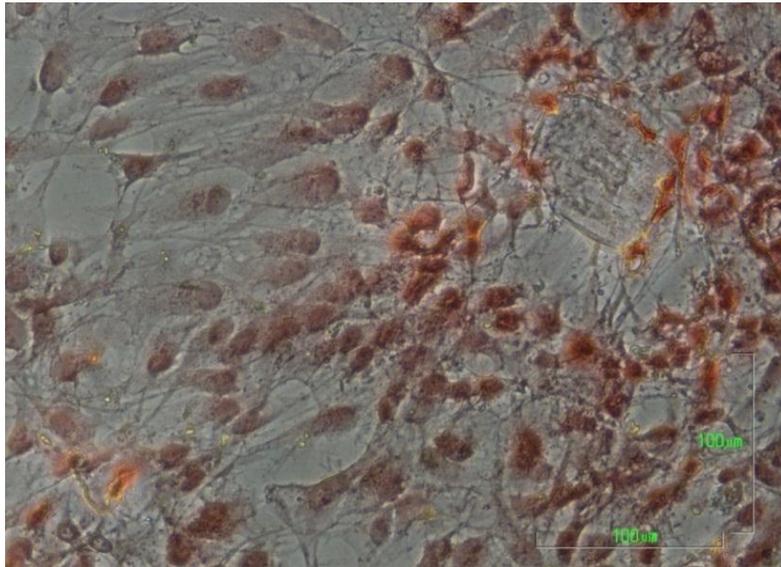


Figura 86. Ensayo con rojo de alizarina para MSC en medio osteoinductor con respecto a la muestra sintetizada con el 5% de acetato de Sr

Muestra sintetizada con el 10% de acetato de Sr:

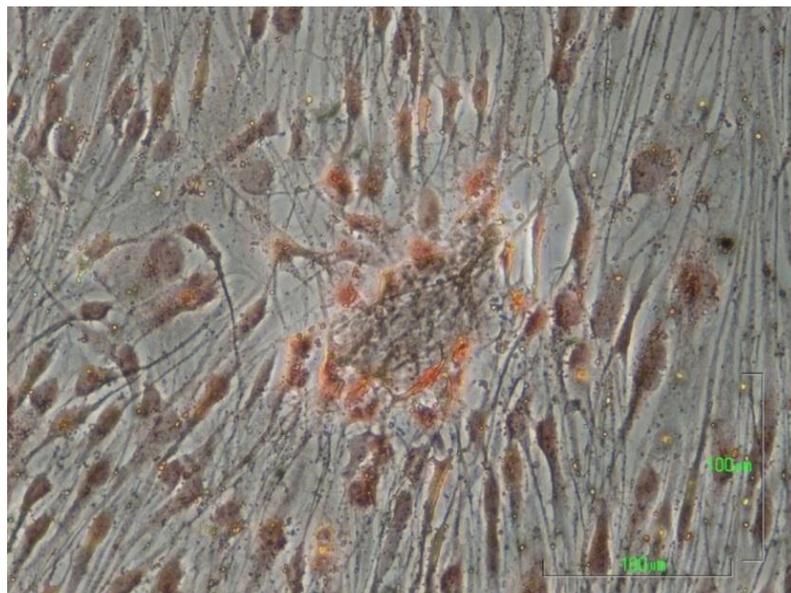


Figura 87. Ensayo con rojo de alizarina para MSC en medio osteoinductor con respecto a la muestra sintetizada con el 10% de acetato de Sr

Muestra sintetizada con el 15% de acetato de Sr:

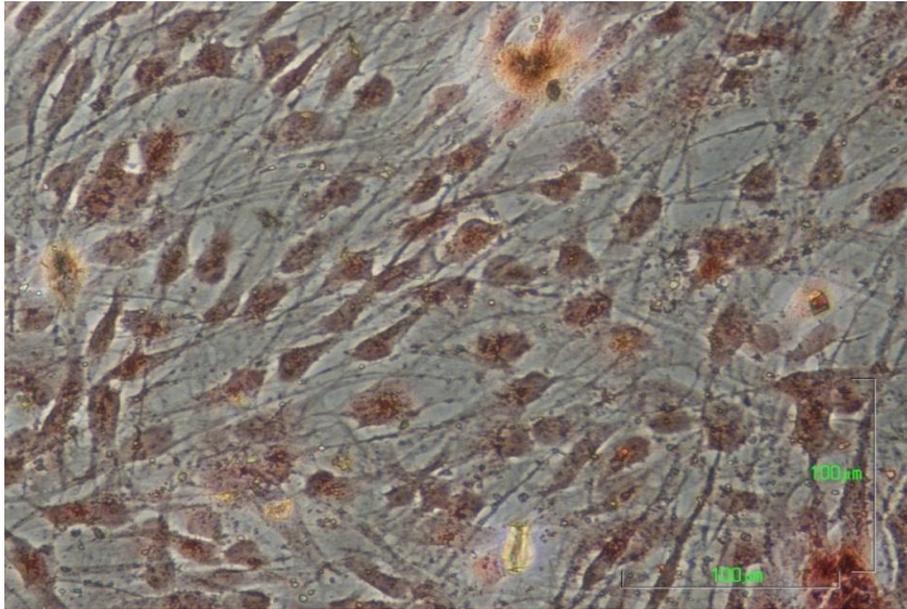


Figura 88. Ensayo con rojo de alizarina para MSC en medio osteoinductor con respecto a la muestra sintetizada con el 15% de acetato de Sr

Muestra sintetizada con el 20% de acetato de Sr:

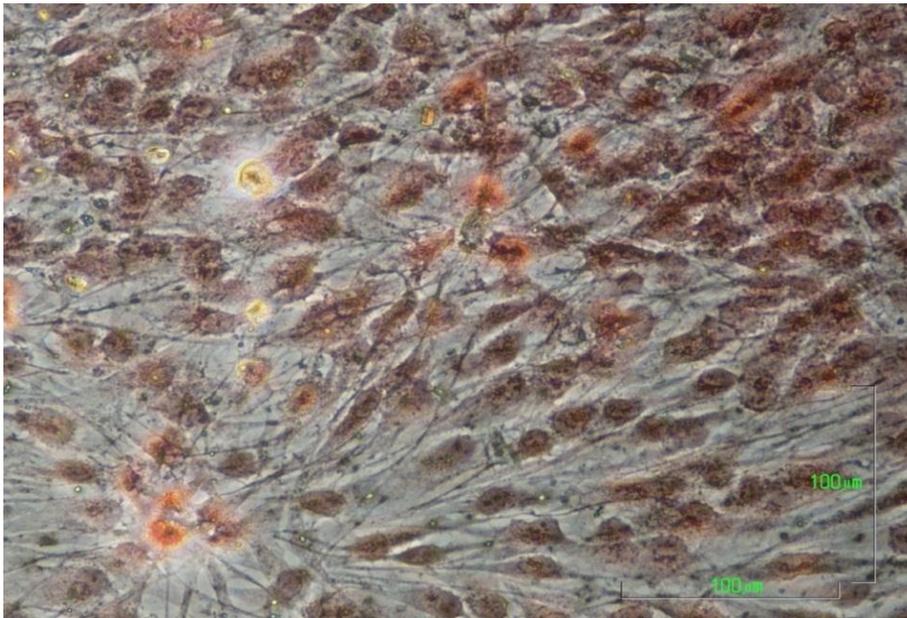


Figura 89. Ensayo con rojo de alizarina para MSC en medio osteoinductor con respecto a la muestra sintetizada con el 20% de acetato de Sr

Como puede verse en las figuras, se han detectado fenómenos de mineralización en la totalidad de las muestras de cultivos de osteoblastos (tratamiento 1), como era esperable para esta estirpe celular, y en la totalidad de las muestras de MSC mantenidas con medio de cultivo osteoinductor (tratamiento 3), lo que también era esperado debido a la diferenciación de esta estirpe celular por acción del medio de cultivo. En el caso de las muestras del tratamiento 2, células MSC en medio no osteoinductor, se han detectado también fenómenos de mineralización en todos los cultivos sembrados sobre los sistemas experimentales, pero no en los sembrados sobre el control negativo, por lo que puede asociarse este fenómeno a las características de dichos sistemas. Los fenómenos de mineralización se presentan independientemente de la cantidad de estroncio, si bien en la muestra sintetizada con el 20% de acetato de Sr son menos intensos.

4.3. ENSAYO 2: OXTERIX

Los resultados obtenidos se presentan en la serie de micrográficas incluidas a continuación, que son el resultado de la fusión mediante software de una imagen convencional de contraste de fases, y la imagen de fluorescencia del mismo campo:

Ensayo con Oxterix para osteoblastos (tratamiento 1) con respecto al control negativo (TMX) y las muestras sintetizadas con el 0, 5, 10, 15 y 20% de acetato de Sr:

TMX:

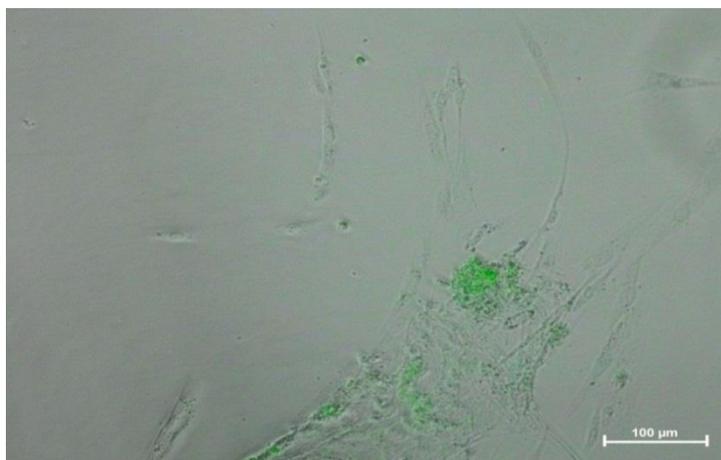


Figura 90. Ensayo con Oxterix para osteoblastos con respecto al TMX

Muestra sintetizada con el 0% de acetato de Sr:

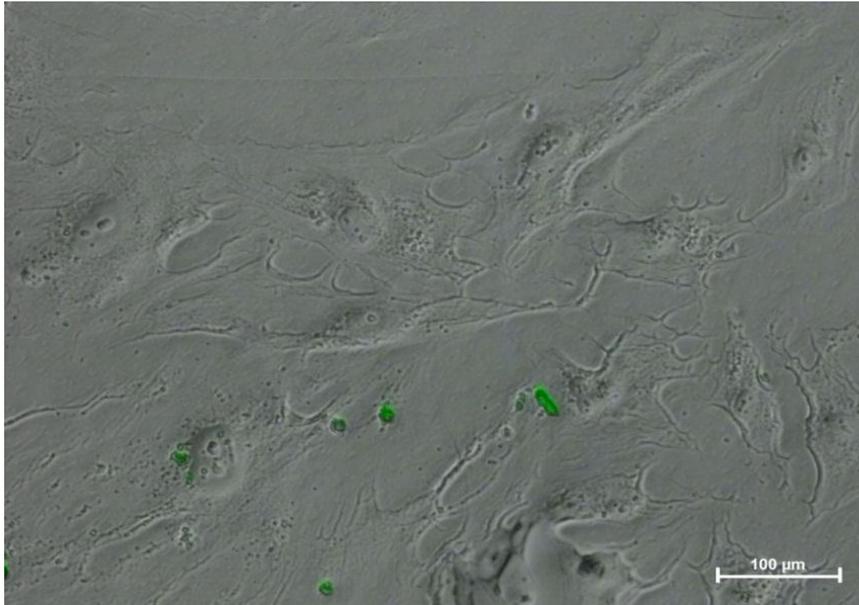


Figura 91. Ensayo con Oxytetrax para osteoblastos con respecto a la muestra sintetizada con el 0% de acetato de Sr

Muestra sintetizada con el 5% de acetato de Sr:



Figura 92. Ensayo con Oxytetrax para osteoblastos con respecto a la muestra sintetizada con el 5% de acetato de Sr

Muestra sintetizada con el 10% de acetato de Sr:



Figura 93. Ensayo con Oxterix para osteoblastos con respecto a la muestra sintetizada con el 10% de acetato de Sr

Muestra sintetizada con el 15% de acetato de Sr:



Figura 94. Ensayo con Oxterix para osteoblastos con respecto a la muestra sintetizada con el 15% de acetato de Sr

Muestra sintetizada con el 20% de acetato de Sr:

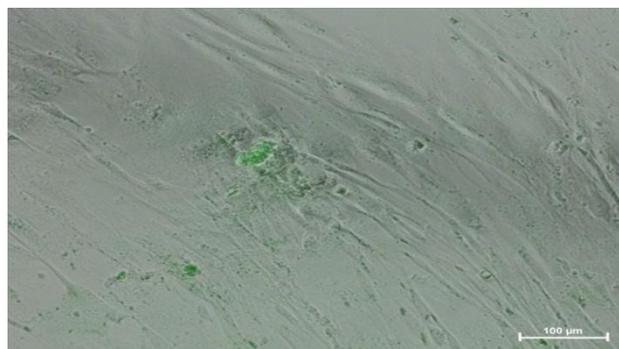


Figura 95. Ensayo con Oxterix para osteoblastos con respecto a la muestra sintetizada con el 20% de acetato de Sr

Ensayo con Oxterix para MSC en medio no osteoinductor (tratamiento 2) con respecto al control negativo (TMX) y las muestras sintetizadas con el 0, 5, 10, 15 y 20% de acetato de Sr:

TMX:



Figura 96. Ensayo con Oxterix para MSC en medio no osteoinductor con respecto al TMX

Muestra sintetizada con el 0% de acetato de Sr:



Figura 97. Ensayo con Oxterix para MSC en medio no osteoinductor con respecto a la muestra sintetizada con el 0% de acetato de Sr

Muestra sintetizada con el 5% de acetato de Sr:

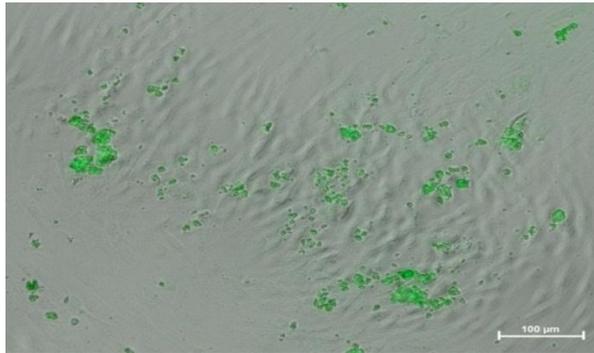


Figura 98. Ensayo con Oxtetrix para MSC en medio no osteoinductor con respecto a la muestra sintetizada con el 5% de acetato de Sr

Muestra sintetizada con el 10% de acetato de Sr::



Figura 99. Ensayo con Oxtetrix para MSC en medio no osteoinductor con respecto a la muestra sintetizada con el 10% de acetato de Sr

Muestra sintetizada con el 15% de acetato de Sr:

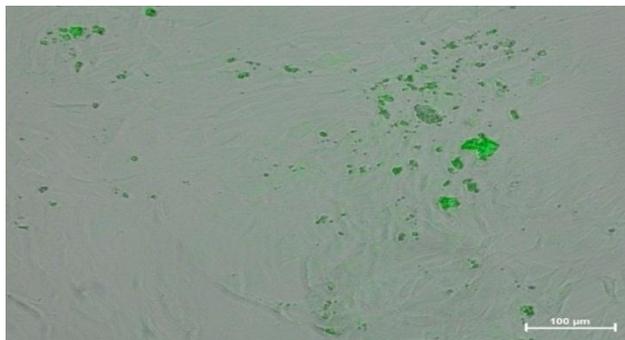


Figura 100. Ensayo con Oxtetrix para MSC en medio no osteoinductor con respecto a la muestra sintetizada con el 15% de acetato de Sr

Muestra sintetizada con el 20% de acetato de Sr:

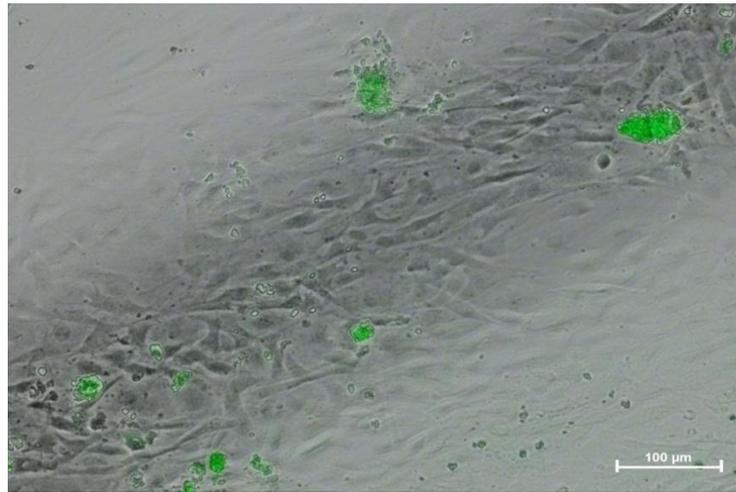


Figura 101. Ensayo con Oxterix para MSC en medio no osteoinductor con respecto a la muestra sintetizada con el 20% de acetato de Sr

Ensayo con Oxterix para MSC en medio osteoinductor (tratamiento 3) con respecto al control negativo (TMX) y las muestras sintetizadas con el 0, 5, 10, 15 y 20% de acetato de Sr:

TMX:

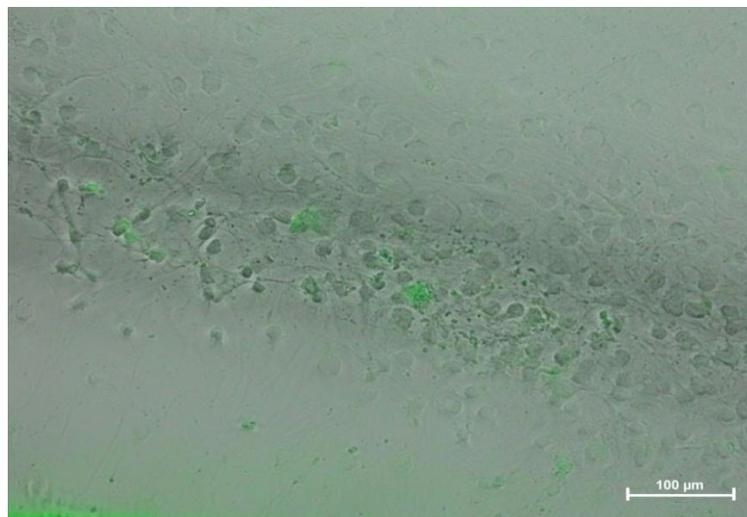


Figura 102. Ensayo con Oxterix para MSC en medio osteoinductor con respecto al TMX

Muestra sintetizada con el 0% de acetato de Sr:

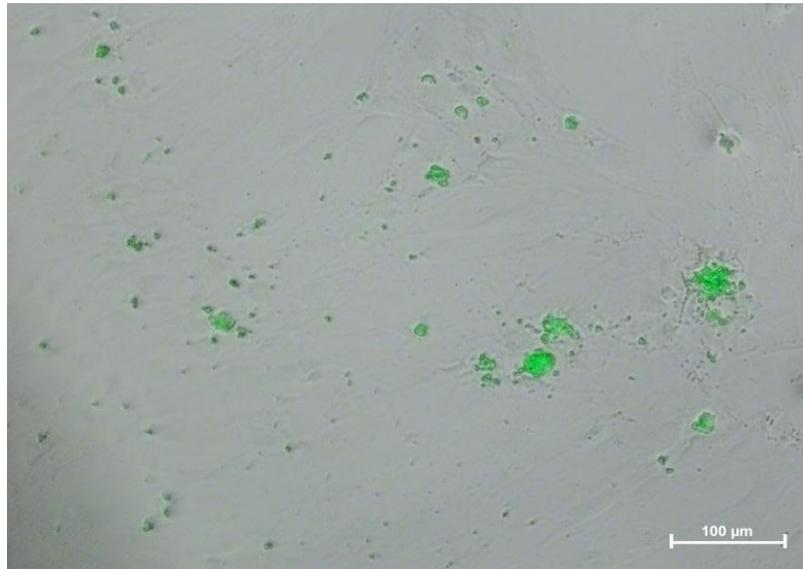


Figura 103. Ensayo con Oxterix para MSC en medio osteoinductor con respecto a la muestra sintetizada con el 0% de acetato de Sr

Muestra sintetizada con el 5% de acetato de Sr:

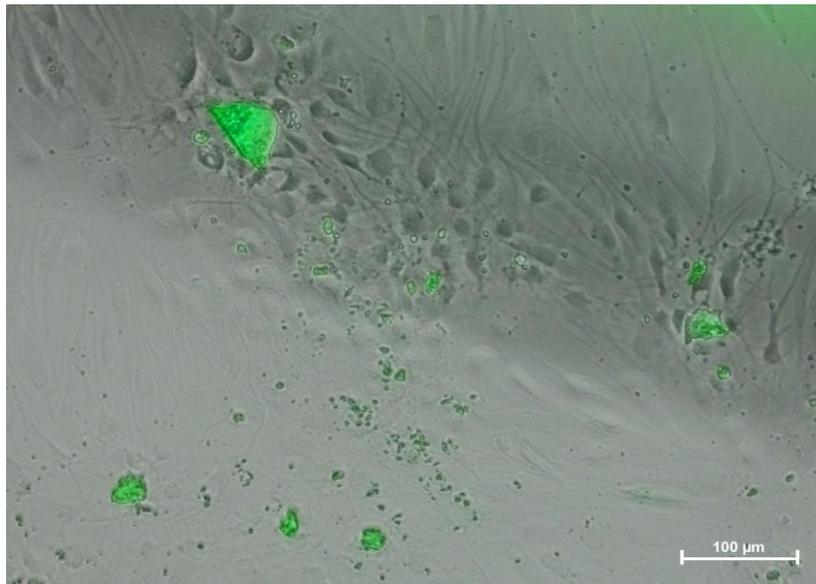


Figura 104. Ensayo con Oxterix para MSC en medio osteoinductor con respecto a la muestra sintetizada con el 5% de acetato de Sr

Muestra sintetizada con el 10% de acetato de Sr:

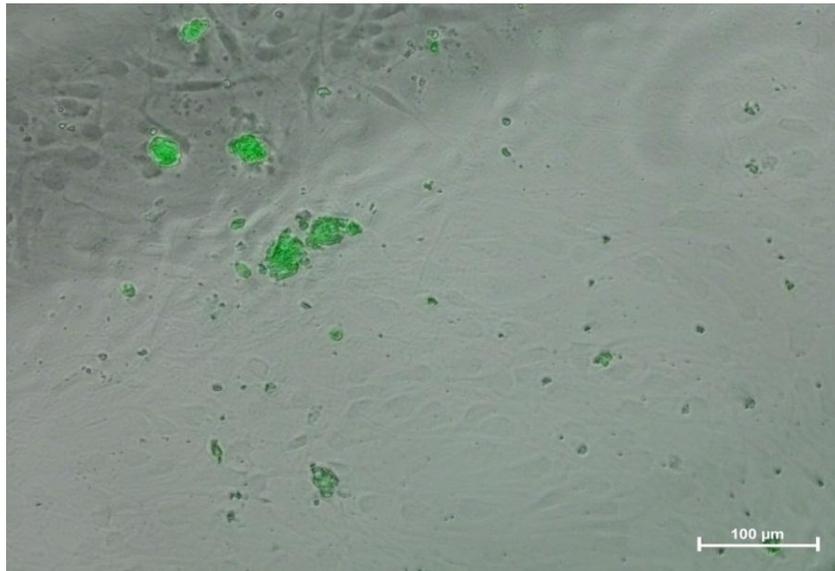


Figura 105. Ensayo con Oxterix para MSC en medio osteoinductor con respecto a la muestra sintetizada con el 10% de acetato de Sr

Muestra sintetizada con el 15% de acetato de Sr:

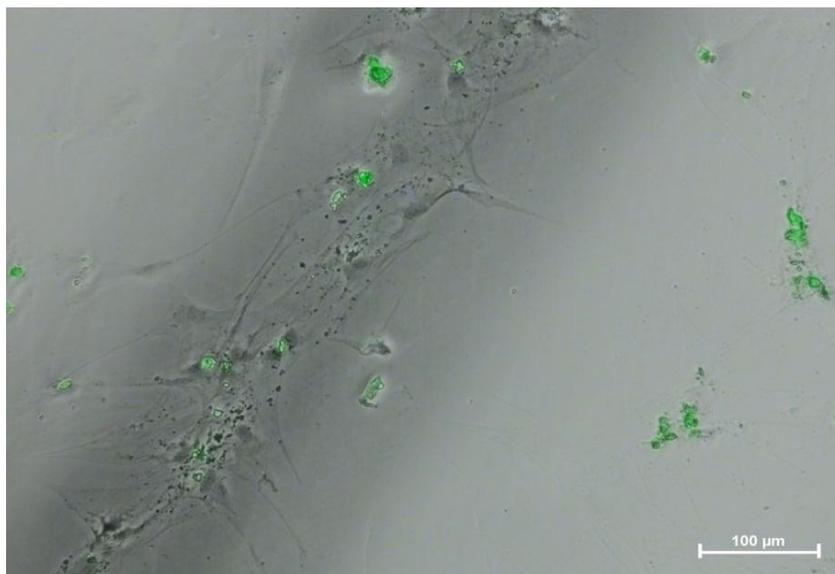


Figura 106. Ensayo con Oxterix para MSC en medio osteoinductor con respecto a la muestra sintetizada con el 15% de acetato de Sr

Muestra sintetizada con el 20% de acetato de Sr:

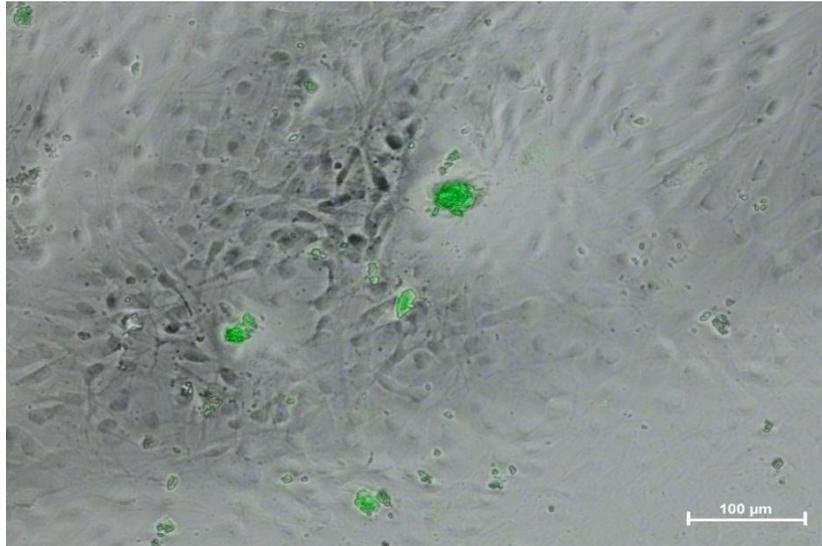


Figura 107. Ensayo con Oxytetrax para MSC en medio osteoinductor con respecto a la muestra sintetizada con el 20% de acetato de Sr

Al igual que en la técnica anterior, y como puede verse en las figuras, se han detectado fenómenos de mineralización en la totalidad de las muestras de cultivos de HOOb (tratamiento 1), como era esperable para esta estirpe celular, y en la totalidad de las muestras de MSC mantenidas con medio de cultivo osteoinductor (tratamiento 3), lo que también era esperado debido a la diferenciación de esta estirpe celular por acción del medio de cultivo. En el caso de las muestras del tratamiento 2, células MSC en medio no osteoinductor, se han detectado también fenómenos de mineralización en todos los cultivos sembrados sobre los sistemas experimentales, pero no en los sembrados sobre el control negativo, por lo que puede asociarse este fenómeno a las características de dichos sistemas. Los fenómenos de mineralización se presentan independientemente de la cantidad de estroncio, si bien en las muestras sintetizadas con el 5 y 10% de acetato de Sr se presenta una mayor intensidad.

4.4. ENSAYO 3: RUNX2

Los resultados obtenidos se presentan en la serie de micrográficas incluidas a continuación, que son el resultado de la fusión mediante software de una imagen convencional de contraste de fases, y la imagen de fluorescencia del mismo campo:

Ensayo con RUNX2 para osteoblastos (tratamiento 1) con respecto al control negativo (TMX) y las muestras sintetizadas con el 0, 5, 10, 15 y 20% de acetato de Sr:

TMX:

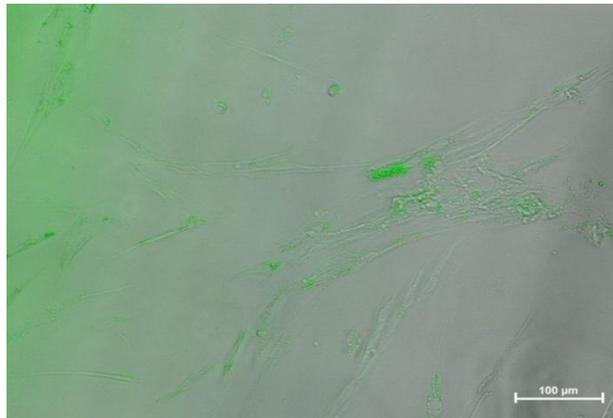


Figura 108. Ensayo con RUNX2 para osteoblastos con respecto al TMX

Muestra sintetizada con el 0% de acetato de Sr:



Figura 109. Ensayo con RUNX2 para osteoblastos con respecto a la muestra sintetizada con el 0% de acetato de Sr

Muestra sintetizada con el 5% de acetato de Sr:

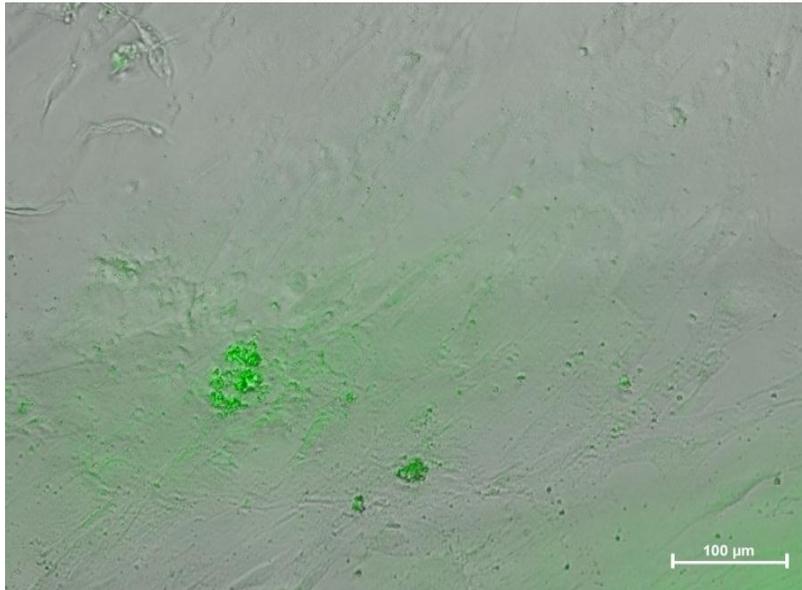


Figura 110. Ensayo con RUNX2 para osteoblastos con respecto a la muestra sintetizada con el 5% de acetato de Sr

Muestra sintetizada con el 10% de acetato de Sr:

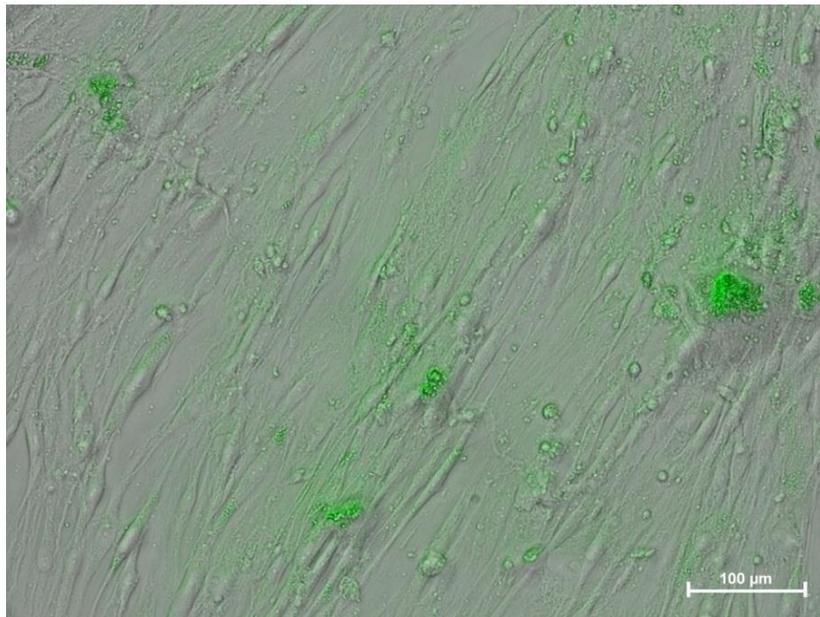


Figura 111. Ensayo con RUNX2 para osteoblastos con respecto a la muestra sintetizada con el 10% de acetato de Sr

Muestra sintetizada con el 15% de acetato de Sr:

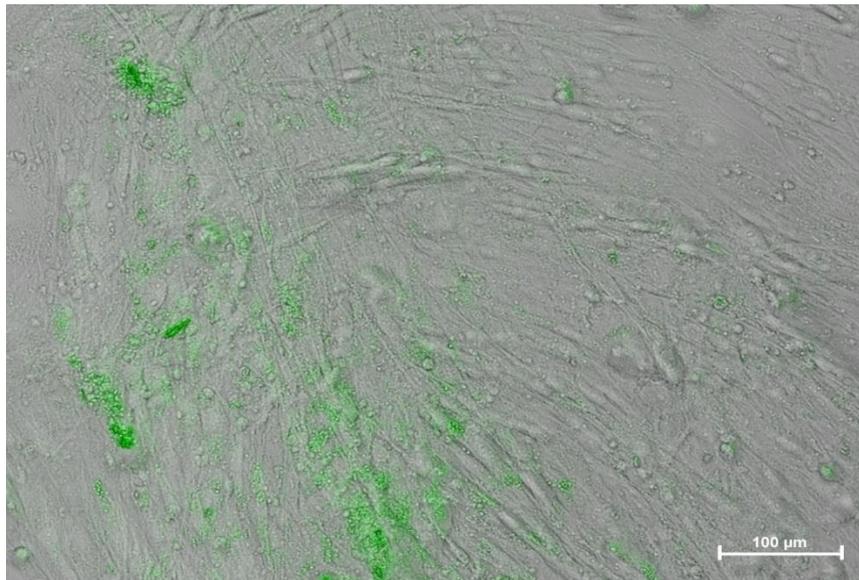


Figura 112. Ensayo con RUNX2 para osteoblastos con respecto a la muestra sintetizada con el 15% de acetato de Sr

Muestra sintetizada con el 20% de acetato de Sr:

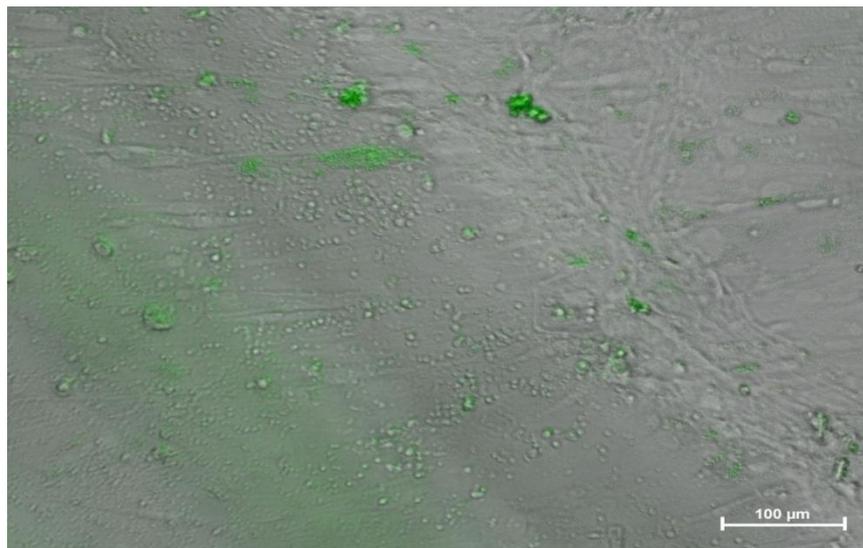


Figura 113. Ensayo con RUNX2 para osteoblastos con respecto a la muestra sintetizada con el 20% de acetato de Sr

Ensayo con RUNX2 para MSC en medio no osteoinductor (tratamiento 2) con respecto al control negativo (TMX) y las muestras sintetizadas con el 0, 5, 10, 15 y 20% de acetato de Sr:

TMX:

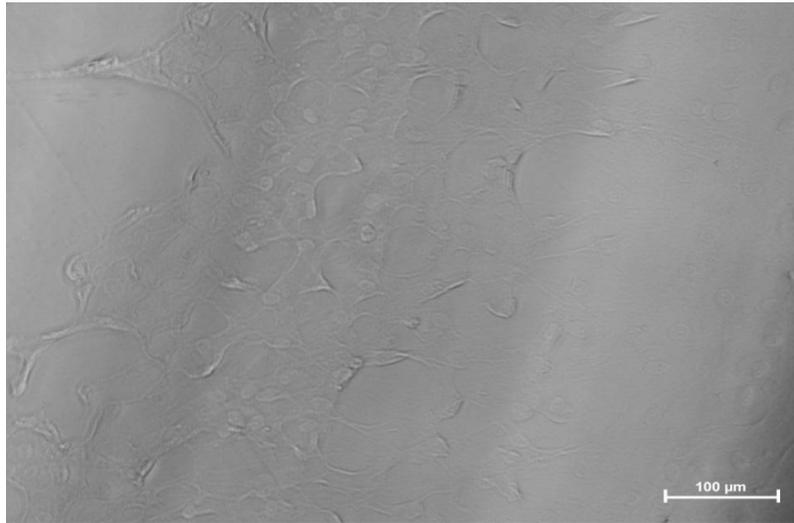


Figura 114. Ensayo con RUNX2 para MSC en medio no osteoinductor con respecto al TMX

Muestra sintetizada con el 0% de acetato de Sr:

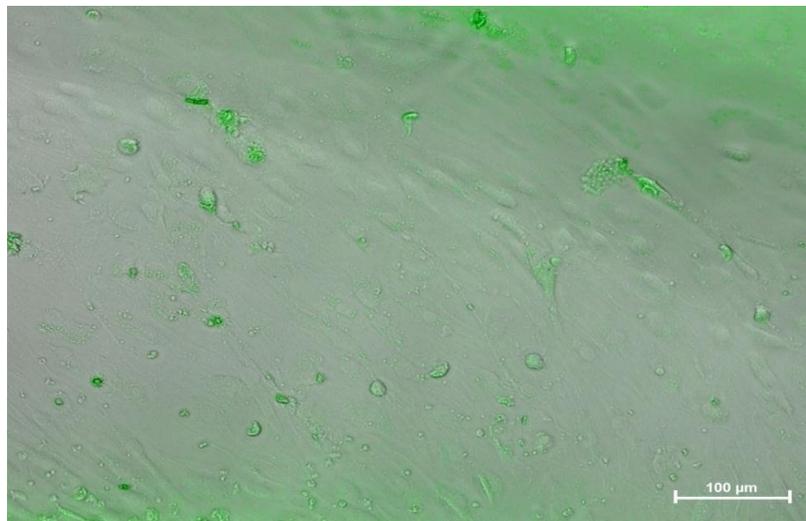


Figura 115. Ensayo con RUNX2 para MSC en medio no osteoinductor con respecto a la muestra sintetizada con el 0% de acetato de Sr

Muestra sintetizada con el 5% de acetato de Sr:

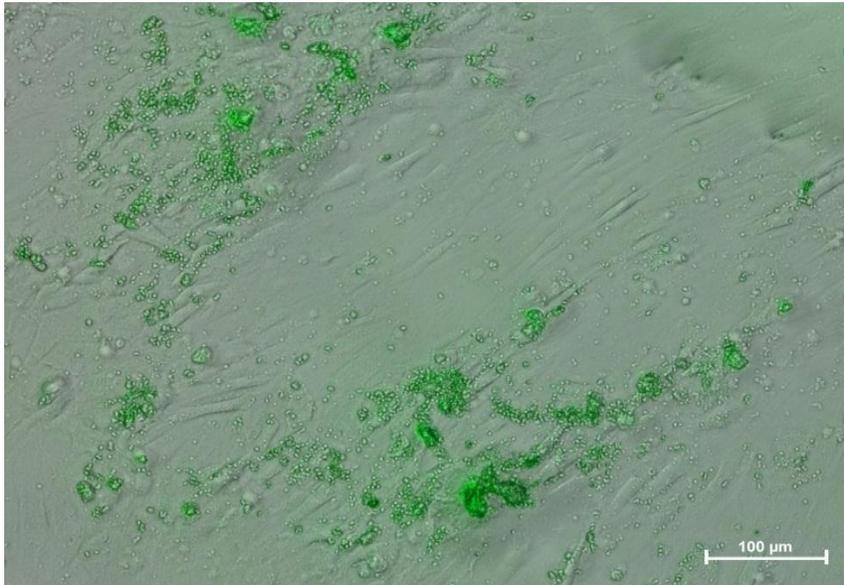


Figura 116. Ensayo con RUNX2 para MSC en medio no osteoinductor con respecto a la muestra sintetizada con el 5% de acetato de Sr

Muestra sintetizada con el 10% de acetato de Sr:

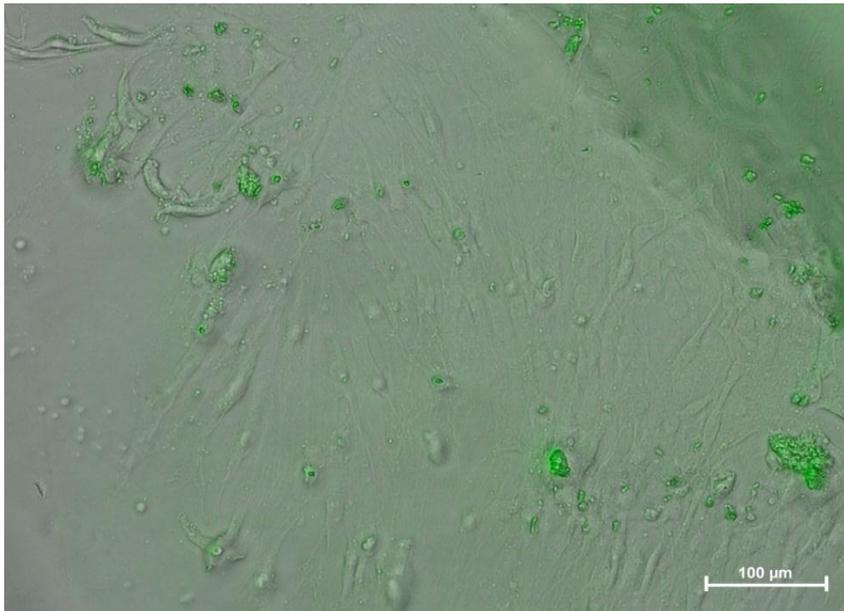


Figura 117. Ensayo con RUNX2 para MSC en medio no osteoinductor con respecto a la muestra sintetizada con el 10% de acetato de Sr

Muestra sintetizada con el 15% de acetato de Sr:

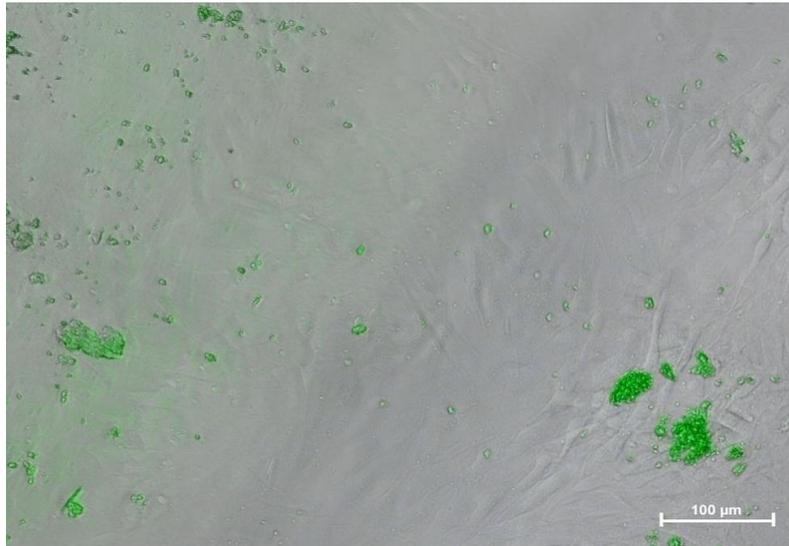


Figura 118. Ensayo con RUNX2 para MSC en medio no osteoinductor con respecto a la muestra sintetizada con el 15% de acetato de Sr

Muestra sintetizada con el 20% de acetato de Sr:

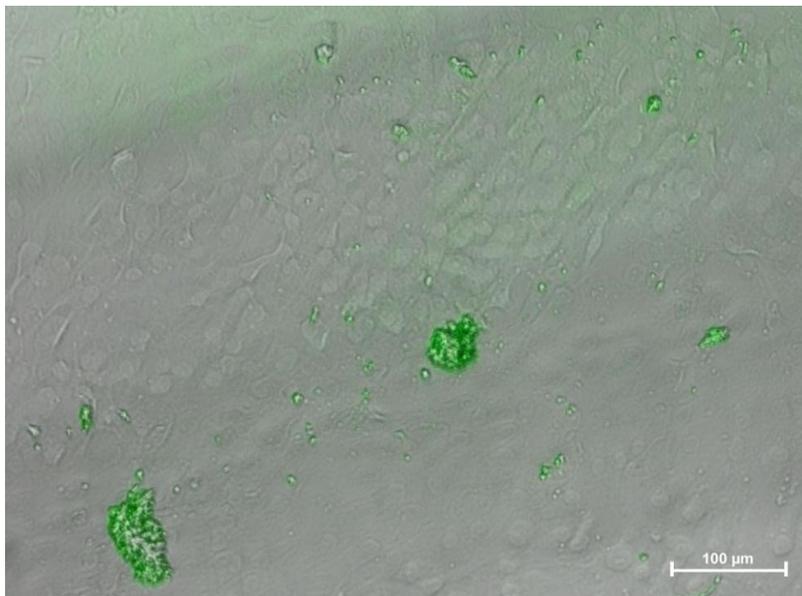


Figura 119. Ensayo con RUNX2 para MSC en medio no osteoinductor con respecto a la muestra sintetizada con el 20% de acetato de Sr

Ensayo con RUNX2 para MSC en medio osteoinductor (tratamiento 3) con respecto al control negativo (TMX) y las muestras sintetizadas con el 0, 5, 10, 15 y 20% de acetato de Sr:

TMX:

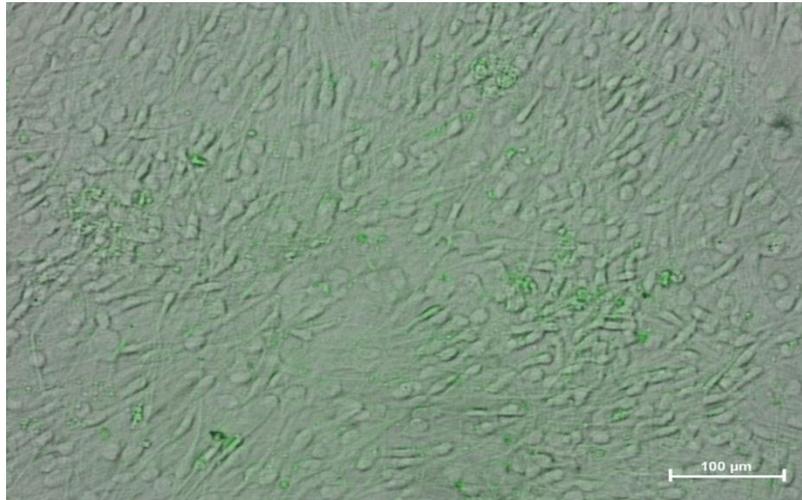


Figura 120. Ensayo con RUNX2 para MSC en medio osteoinductor con respecto al TMX

Muestra sintetizada con el 0% de acetato de Sr:

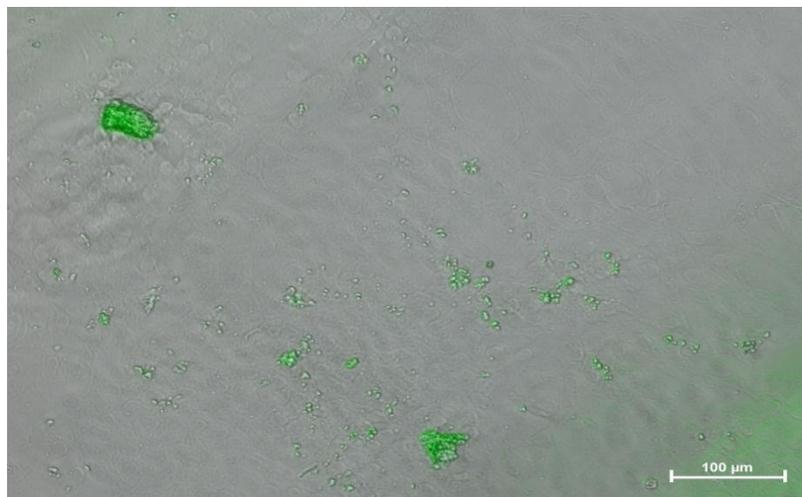


Figura 121. Ensayo con RUNX2 para MSC en medio osteoinductor con respecto a la muestra sintetizada con el 0% de acetato de Sr

Muestra sintetizada con el 5% de acetato de Sr:



Figura 122. Ensayo con RUNX2 para MSC en medio osteoinductor con respecto a la muestra sintetizada con el 5% de acetato de Sr

Muestra sintetizada con el 10% de acetato de Sr:

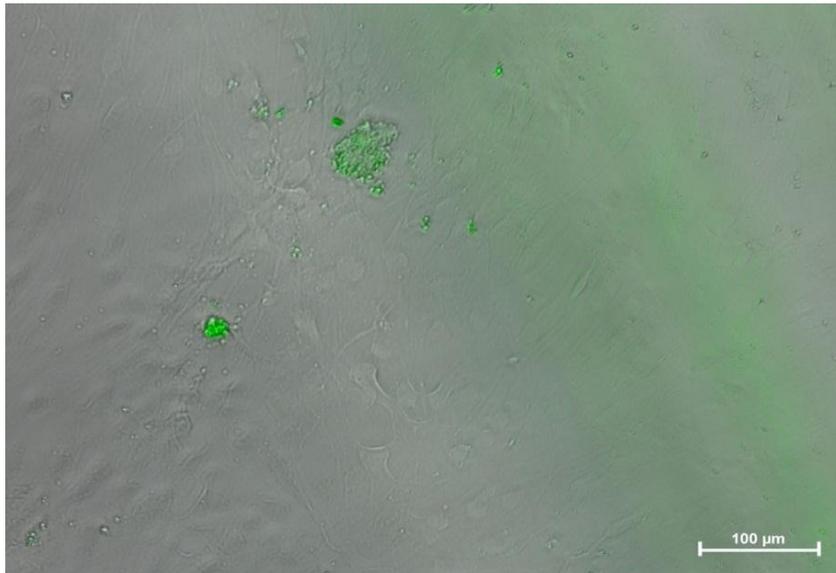


Figura 123. Ensayo con RUNX2 para MSC en medio osteoinductor con respecto a la muestra sintetizada con el 10% de acetato de Sr

Muestra sintetizada con el 15% de acetato de Sr:

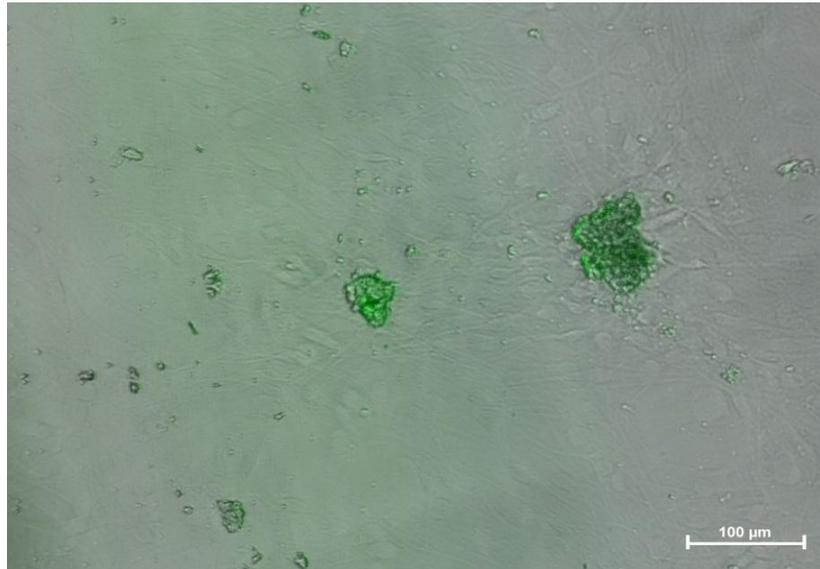


Figura 124. Ensayo con RUNX2 para MSC en medio osteoinductor con respecto a la muestra sintetizada con el 15% de acetato de Sr

Muestra sintetizada con el 20% de acetato de Sr:

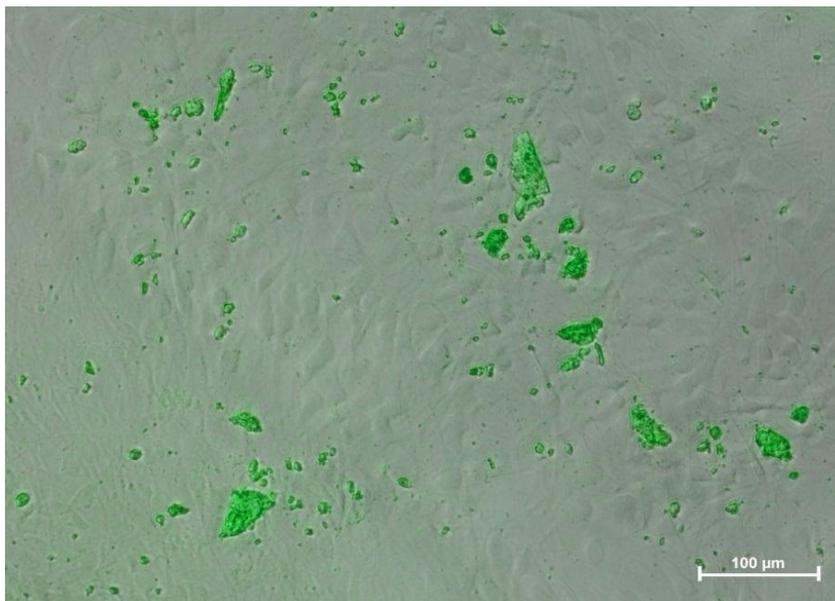


Figura 125. Ensayo con RUNX2 para MSC en medio osteoinductor con respecto a la muestra sintetizada con el 20% de acetato de Sr

Al igual que en la técnica anterior, y como puede verse en las figuras, se han detectado fenómenos de mineralización tras 21 días de cultivo en la totalidad de las muestras de cultivos de HOb (tratamiento 1), como era esperable para esta estirpe celular, y en la totalidad de las muestras de MSC mantenidas con medio de cultivo osteoinductor (tratamiento 3), lo que también era esperado debido a la diferenciación de esta estirpe celular por acción del medio de cultivo. En el caso de las muestras del tratamiento 2, células MSC en medio no osteoinductor, se han detectado también fenómenos de mineralización en todos los cultivos sembrados sobre los sistemas experimentales, pero no en los sembrados sobre el control negativo, por lo que puede asociarse este fenómeno a las características de dichos sistemas. Los fenómenos de mineralización se presentan independientemente de la cantidad de estroncio, si bien en las muestras sintetizadas con el 5, 10 y 15% de acetato de Sr se presenta una mayor intensidad.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Aunque el cartílago presenta baja fricción, es resistente al desgaste y tiene una superficie adecuada para soportar peso, tiene un inconveniente ya que posee una capacidad limitada de auto-reparación [69-71]. Cuando se presentan grandes defectos en el cartílago causados por traumas graves debido a la osteoartritis, por lo general no se curan espontáneamente, debido a que el cartílago no posee vasos sanguíneos, ni nervios, ni vasos linfáticos, lo cual hace que tenga una baja capacidad de regeneración. Con el fin de lograr la regeneración del cartílago, injertos óseos (autoinjerto o aloinjerto) se han venido utilizando para el tratamiento de grandes defectos en la cirugía ortopédica [72]. Sin embargo, estos han presentado problemas como el suministro limitado, el tiempo quirúrgico adicional, morbilidad del área donante, largo período de recuperación, y la transferencia de patógenos [72]. Debido a esto se han venido buscando otras soluciones, donde el uso de biocerámicas, entre estas, la hidroxiapatita, ha sido muy buena alternativa. Las cerámicas de fosfatos cálcicos se consideran materiales bioactivos según la definición propuesta por Williams en 1987, donde dice que es un “Material que

induce una actividad biológica específica” [73]. Las cerámicas de fosfato cálcico actúan interaccionando con el hueso - cartílago reabsorbiéndose más o menos lentamente dependiendo del tipo y de la porosidad del material[1]. Esto ha hecho que la hidroxiapatita pueda ser considerada como un material biocompatible [1, 12, 21, 74]. Debido a su estructura la han estado utilizando solo para relleno cavitario o como material de recubrimiento [21, 22]. Pero gracias al estroncio se ha podido reforzar y puede ser utilizada para regenerar cartílago y hueso Subcondral en ingeniería, en donde se necesita un buen soporte mecánico [74].

Siempre para que un material funcione en la regeneración de cartilago, la tecnología de fijación no solo debe abordar la biocompatibilidad, sino también la curación del cartílago y la integridad mecánica [75].

Estudios histológicos de la hidroxiapatita, han demostrado que aunque no son materiales que puedan actuar como osteoinductores, pueden actuar como soporte del crecimiento óseo convirtiéndose en grandes osteoconductores [73, 74].

Este problema de inductividad, ha hecho que haya un interés significativo en el desarrollo de métodos de factores de acoplamiento osteogénico, actualmente están utilizando péptidos bioactivos, a la superficie de la HA para lograrlo [76], sin embargo investigadores han demostrado que es delicado ya que se variaría la estructura interna de la HA[76].

Para muchos investigadores la HA es la cerámica que tiene más poder osteogénico según estudios realizados con microrradiografías, pero por el contrario, tiene una gran estabilidad en el tiempo, cosa que se traduce por una muy lenta reabsorción. Esto ha dado lugar a que algunos autores propongan la utilización de materiales bifásicos, con la idea de que el implante se comporte con dos maneras de reabsorción: una rápida y una lenta [73]. Sin embargo en el estudio que hicieron en el Hospital Militar Central el Dr. Carlos J. Finlay y un grupo de especialistas en Ortopedia y Traumatología en el periodo comprendido entre 1988 y 2003, en el tratamiento de defectos óseos de las extremidades de origen tumoral o traumático donde usaron hidroxiapatita coralina® HAP-200 en 307 pacientes, en su experiencia clínica, pudieron observar que la baja velocidad de

reabsorción de la hidroxiapatita coralina® HAP-200 fue buena ya que confirió gran resistencia contra la actividad osteoclástica tumoral [77].

Debido a que se necesita ayudar al cartílago a regenerarse fue que surgió este proyecto. Como se obtuvo en una sola fase la apatita solo en la muestra sintetizada con 0% de acetato de Sr y varias fases en las muestras sintetizadas con el 100,80, 50 y 20% de acetato de Sr, se decidió probar con dosis más bajas de Sr ya que varias investigaciones han tenido como resultados que las dosis altas de Sr induce defecto de mineralización ósea y no mejora la replicación de las células pre-osteoblásticas ni estimula la formación de hueso. Es por esta razón que se decidió probar con dosis del 0, 5, 10, 15 y 20% de Sr. Como se le hicieron varios lavados a la muestra del 20% de acetato de Sr, se caracterizó y se obtuvo la apatita en una sola fase y se pudo utilizar.

Durante la síntesis de los materiales muchas veces quedan impurezas, es por esto que se decidió hacer los calentamientos a 600°C, donde se logró eliminar lo que quedaba de los reactivos obteniéndose en la caracterización espectros más limpios.

6. REFERENCIAS

- [1] Sánchez M. Injertos Óseos y Sustitutos en Traumatología y Cirugía Ortopédica. Medicina. 2005:16.
- [2] Prabhu M, Kavitha K, Sutha S, Manivasakan P, Rajrendran V, Kulandaivelu P, et al. Bioactivity of zirconium-substituted nanobioactive glass particles. Synthesis and Reactivity in Inorganic, Metal-Organic and Nano-Metal Chemistry. 2015;45:92-6.
- [3] Długoń E, Niemiec W, Frączek-Szczypta A, Jeleń P, Sitarz M, Błazewicz M. Spectroscopic studies of electrophoretically deposited hybrid HAp/CNT coatings on titanium. Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy. 2014;133:872-5.
- [4] Oyefusi A, Olanipekun O, Neelgund GM, Peterson D, Stone JM, Williams E, et al. Hydroxyapatite grafted carbon nanotubes and graphene nanosheets: Promising

bone implant materials. *Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. 2014;132:410-6.

[5] Fam Y, Imae T, Miras J, Martinez M, Esquena J. PH-dependent loading of Pt nanoparticles protected by dendrimer in calcium phosphate matrices. *Microporous and Mesoporous Materials*. 2014;198:161-9.

[6] Bramhe S, Kim TN, Balakrishnan A, Chu MC. Conversion from biowaste *Venerupis* clam shells to hydroxyapatite nanowires. *Materials Letters*. 2014;135:195-8.

[7] Arul KT, Ramya JR, Karthikeyan KR, Kalkura SN. A novel and rapid route to synthesize polyvinyl alcohol/calcium phosphate nanocomposite coatings by microwave assisted deposition. *Materials Letters*. 2014;135:191-4.

[8] Lv J, Zhang S, Wang S, Luo L, Huang H, Zhang J. Chemical transformation of zinc oxide nanoparticles as a result of interaction with hydroxyapatite. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. 2014;461:126-32.

[9] Fatehi K, Moztarzadeh F, Tahriri M, Khoshroo K, Heidari S, Sadeghi A. Biomimetic synthesis, characterization, and adhesion properties of bone-like apatite on heat and alkaline-treated titanium alloy. *Synthesis and Reactivity in Inorganic, Metal-Organic and Nano-Metal Chemistry*. 2014;44:1535-40.

[10] Ratner BH, A. *Biomaterials Science*. 1996:73-83.

[11] Bronzino J. *The Biomedical Engineering Handbook. Tissue Engineering and Artificial Organs*. 2006;3:24-2.

[12] Vallet R. Biocerámicas: Regeneradoras de hueso y portadoras de sustancias biológicamente activas. *Transatlántica de Investigación*. 2007;3:67.

[13] Peña D. Chitosan/calcium phosphate coating obtained by electrodeposition on titanium alloy. *Rev Fac Ing Univ Antioquia* 2010;54:15-23.

[14] Wen C, Cui Y, Chen X, Zong B, Dai WL. Reaction temperature controlled selective hydrogenation of dimethyl oxalate to methyl glycolate and ethylene glycol over copper-hydroxyapatite catalysts. *Applied Catalysis B: Environmental*. 2015;162:483-93.

[15] Gopi D, Sherif ESM, Rajeswari D, Kavitha L, Pramod R, Dwivedi J, et al. Evaluation of the mechanical and corrosion protection performance of

electrodeposited hydroxyapatite on the high energy electron beam treated titanium alloy. *Journal of Alloys and Compounds*. 2014;616:498-504.

[16] Mishra VK, Bhattacharjee BN, Parkash O, Kumar D, Rai SB. Mg-doped hydroxyapatite nanoplates for biomedical applications: A surfactant assisted microwave synthesis and spectroscopic investigations. *Journal of Alloys and Compounds*. 2014;614:283-8.

[17] Qu Z, Sun Y, Chen D, Wang Y. Possible sites of copper located on hydroxyapatite structure and the identification of active sites for formaldehyde oxidation. *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical*. 2014;393:182-90.

[18] Bueno VB, Bentini R, Catalani LH, Barbosa LRS, Petri DFS. Synthesis and characterization of xanthan-hydroxyapatite nanocomposites for cellular uptake. *Materials Science and Engineering C*. 2014;37:195-230.

[19] Martínez EP, J. Biomateriales en Cirugía. Servicio de Publicaciones Universidad de Oviedo. 1997:357-73.

[20] Zhang W, Chai Y, Cao N, Wang Y. Synthesis and characterization of selenium substituted hydroxyapatite via a hydrothermal procedure. *Materials Letters*. 2014;134:123-5.

[21] Vallet R. BIOCERÁMICAS. *Anales de la Real Sociedad Española de Química*. 2003;2:173-4.

[22] Ha NR, Yang ZX, Hwang KH, Kim TS, Lee JK. Improvement of the stability of hydroxyapatite through glass ceramic reinforcement. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*. 2010;10:3459-62.

[23] Gopi D, Murugan N, Ramya S, Kavitha L. Electrodeposition of a porous strontium-substituted hydroxyapatite/zinc oxide duplex layer on AZ91 magnesium alloy for orthopedic applications. *Journal of Materials Chemistry B*. 2014;2:5531-40.

[24] Gopi D, Ramya S, Rajeswari D, Karthikeyan P, Kavitha L. Strontium, cerium co-substituted hydroxyapatite nanoparticles: Synthesis, characterization, antibacterial activity towards prokaryotic strains and in vitro studies. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. 2014;451:172-80.

- [25] Pogosova MA, Provotorov DI, Eliseev AA, Jansen M, Kazin PE. Synthesis and characterization of the Bi-for-Ca substituted copper-based apatite pigments. *Dyes and Pigments*. 2015;113:96-101.
- [26] Newman SD, Lotfibakhshaiesh N, O'Donnell M, Walboomers XF, Horwood N, Jansen JA, et al. Enhanced osseous implant fixation with strontium-substituted bioactive glass coating. *Tissue Engineering - Part A*. 2014;20:1850-7.
- [27] Wang B, Lilja M, Ma T, Sørensen J, Steckel H, Ahuja R, et al. Theoretical and experimental study of the incorporation of tobramycin and strontium-ions into hydroxyapatite by means of co-precipitation. *Applied Surface Science*. 2014;314:376-83.
- [28] Tank KP, Jogiya BV, Kanchan DK, Joshi MJ. Dielectric properties of pure and strontium doped nano- hydroxyapatite. *Solid State Phenomena* 2014. p. 151-5.
- [29] Yin P, Feng FF, Lei T, Zhong XH, Jian XC. Osteoblastic cell response on biphasic fluorhydroxyapatite/strontium- substituted hydroxyapatite coatings. *Journal of Biomedical Materials Research - Part A*. 2014;102:621-7.
- [30] Zhang N, Zhai D, Chen L, Zou Z, Lin K, Chang J. Hydrothermal synthesis and characterization of Si and Sr co-substituted hydroxyapatite nanowires using strontium containing calcium silicate as precursors. *Materials Science and Engineering C*. 2014;37:286-91.
- [31] Xu J, Yang Y, Wan R, Shen Y, Zhang W. Hydrothermal preparation and characterization of ultralong strontium-substituted hydroxyapatite whiskers using acetamide as homogeneous precipitation reagent. *The Scientific World Journal*. 2014;2014.
- [32] Cox SC, Jamshidi P, Grover LM, Mallick KK. Preparation and characterisation of nanophase Sr, Mg, and Zn substituted hydroxyapatite by aqueous precipitation. *Materials Science and Engineering C*. 2014;35:106-14.
- [33] Gopi D, Ramya S, Rajeswari D, Surendiran M, Kavitha L. Development of strontium and magnesium substituted porous hydroxyapatite/poly(3,4-ethylenedioxythiophene) coating on surgical grade stainless steel and its bioactivity on osteoblast cells. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2014;114:234-40.

- [34] Buvaneswari G, Valsalan K. Single step conversion of β -TCP to Na-modified hydroxyapatite and its application in green chemical synthesis of α , β -unsaturated compounds. *Materials Letters*. 2014;134:252-5.
- [35] Ozeki K, Hoshino T, Aoki H, Masuzawa T. Phase Composition of Sputtered Film from a Mixture Target of Hydroxyapatite and Strontium-apatite. *Journal of Materials Science and Technology*. 2013;29:1-6.
- [36] Li ZY, Lam WM, Yang C, Xu B, Ni GX, Abbah SA, et al. Chemical composition, crystal size and lattice structural changes after incorporation of strontium into biomimetic apatite. *Biomaterials*. 2007;28:1452-60.
- [37] Lindahl C, Engqvist H, Xia W. Effect of strontium ions on the early formation of biomimetic apatite on single crystalline rutile. *Applied Surface Science*. 2013;266:199-204.
- [38] Manchón A. Síntesis y Caracterización de Cerámicas de Fosfato Cálcico Sustituidas con Iones de Estroncio, Silicio y Hierro. Tesis Doctoral - Universidad Rey Juan Carlos. 2011:53-5.
- [39] Mardziah CM, Sopyan I, Ramesh S. Strontium-doped hydroxyapatite nanopowder via sol-gel method: Effect of strontium concentration and calcination temperature on phase behavior. *Trends in Biomaterials and Artificial Organs*. 2009;23:105-13.
- [40] Ravi ND, Balu R, Sampath Kumar TS. Strontium-substituted calcium deficient hydroxyapatite nanoparticles: Synthesis, characterization, and antibacterial properties. *Journal of the American Ceramic Society*. 2012;95:2700-8.
- [41] Pereiro I, Rodríguez-Valencia C, Serra C, Solla EL, Serra J, González P. Pulsed laser deposition of strontium-substituted hydroxyapatite coatings. *Applied Surface Science*. 2012;258:9192-7.
- [42] Ramakrishnan R, Wilson P, Sivakumar T, Jemina I. A comparative study of hydroxyapatites synthesized using various fuels through aqueous and alcohol mediated combustion routes. *Ceramics International*. 2013;39:3519-32.
- [43] Fook ACBM, Aparecida AH, Fook MVL. Development of hydroxiapatite porous bioceramics for use as scaffolds for bone regeneration. *Revista Materia*. 2010;15:392-9.

- [44] K-Hasuwan PR, Kuanchertchoo N, Wetprasit N, Supaphol P. Hydroxyapatite/ovalbumin composite particles as model protein carriers for bone tissue engineering: I. Synthesis and characterization. *Materials Science and Engineering C*. 2012;32:758-62.
- [45] Shaltout AA, Allam MA, Moharram MA. FTIR spectroscopic, thermal and XRD characterization of hydroxyapatite from new natural sources. *Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. 2011;83:56-60.
- [46] Zhou M, Zhang L, Chen M, Qin Q. Infrared spectra and theoretical studies of the C₂O⁻³ anion isolated in solid argon. *Journal of Chemical Physics*. 2000;112:7089-94.
- [47] Adawy A, Abdel-Fattah WI. An efficient biomimetic coating methodology for a prosthetic alloy. *Materials Science and Engineering C*. 2013;33:1813-8.
- [48] Neira IS, Kolen'ko YV, Lebedev OI, Van Tendeloo G, Gupta HS, Matsushita N, et al. Rational synthesis of a nanocrystalline calcium phosphate cement exhibiting rapid conversion to hydroxyapatite. *Materials Science and Engineering C*. 2009;29:2124-32.
- [49] Chang MC, Tanaka J. FT-IR study for hydroxyapatite/collagen nanocomposite cross-linked by glutaraldehyde. *Biomaterials*. 2002;23:4811-8.
- [50] Nikpour MR, Rabiee SM, Jahanshahi M. Synthesis and characterization of hydroxyapatite/chitosan nanocomposite materials for medical engineering applications. *Composites Part B: Engineering*. 2012;43:1881-6.
- [51] Liao CJ, Lin FH, Chen KS, Sun JS. Thermal decomposition and reconstitution of hydroxyapatite in air atmosphere. *Biomaterials*. 1999;20:1807-13.
- [52] Singh S, Jonnalagadda SB. Synthesis of thermally stable metal substituted hydroxy apatites for the selective oxidation of light paraffins. *Bulletin of the Chemical Society of Ethiopia*. 2013;27:57-68.
- [53] Young RA, Holcomb DW. Role of acid phosphate in hydroxyapatite lattice expansion. *Calcified Tissue International*. 1984;36:60-3.
- [54] Rangel N, De Alva, E. SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE MATERIALES REFORZADOS (“COMPOSITES”) DE POLIURETANO

POROSO/HIDROXIAPATITA Revista iberoamericana de Polímeros. 2007;8:99-111

[55] Rabiee SM, Moztafzadeh F, Solati-Hashjin M. Synthesis and characterization of hydroxyapatite cement. *Journal of Molecular Structure*. 2010;969:172-5.

[56] Zhang CY, Chen J, Zhuang Z, Zhang T, Wang XP, Fang QF. In situ hybridization and characterization of fibrous hydroxyapatite/ chitosan nanocomposite. *Journal of Applied Polymer Science*. 2012;124:397-402.

[57] Britvin SN, Ferraris G, Ivaldi G, Bogdanova AN, Chukanov NV. Cattiite, $Mg_3(PO_4)_2 \cdot 22H_2O$, a new mineral from Zhelezny Mine (Kovdor Massif), Kola Peninsula, Russia). *Neues Jahrbuch fur Mineralogie, Monatshefte*. 2002:160-8.

[58] Gorodzha SN, Surmeneva MA, Surmenev RA, Gribennikov MV, Pichugin VF, Sharonova AA, et al. Wettability of Thin Silicate-Containing Hydroxyapatite Films Formed by RF-Magnetron Sputtering. *Russian Physics Journal*. 2014;56:1163-9.

[59] Li C, Sakata Y, Arai T, Domen K, Maruya K, Onishi T. Carbon monoxide and carbon dioxide adsorption on cerium oxide studied by Fourier-transform infrared spectroscopy. Part 1. - Formation of carbonate species on dehydroxylated CeO_2 , at room temperature. *Journal of the Chemical Society, Faraday Transactions 1: Physical Chemistry in Condensed Phases*. 1989;85:929-43.

[60] Almirall A, Larrecq G, Delgado JA, Martínez S, Planell JA, Ginebra MP. Fabrication of low temperature macroporous hydroxyapatite scaffolds by foaming and hydrolysis of an α -TCP paste. *Biomaterials*. 2004;25:3671-80.

[61] Yonggang Y, Wolke JGC, Yubao L, Jansen JA. Preparation and characterization of RF magnetron sputtered calcium pyrophosphate coatings. *Journal of Biomedical Materials Research - Part A*. 2006;76:744-52.

[62] Mohn D, Doebelin N, Tadier S, Bernabei RE, Luechinger NA, Stark WJ, et al. Reactivity of calcium phosphate nanoparticles prepared by flame spray synthesis as precursors for calcium phosphate cements. *Journal of Materials Chemistry*. 2011;21:13963-72.

[63] Jackson KDO. *Guide to Identifying Common Inorganic Fillers and Activators Using Vibrational Spectroscopy*. Brickendonbury, Hertford SG13 8NL, United Kingdom. 2012.

- [64] Ren FZ. Carbonated Apatite, Type-A or Type-B? *Key Engineering Materials*. 2011; 493-494.
- [65] Gunasekaran S, Anbalagan G. Spectroscopic characterization of natural calcite minerals. *Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. 2007;68:656-64.
- [66] Ślósarczyk A, Paszkiewicz Z, Paluszkiwicz C. FTIR and XRD evaluation of carbonated hydroxyapatite powders synthesized by wet methods. *Journal of Molecular Structure*. 2005;744-747:657-61.
- [67] Achchar M, Lamonier C, Ezzamarty A, Lakhdar M, Leglise J, Payen E. New apatite-based supports prepared by industrial phosphoric acid for HDS catalyst synthesis. *Comptes Rendus Chimie*. 2009;12:677-82.
- [68] Vallet-Regí M, Rodríguez-Lorenzo LM, Salinas AJ. Synthesis and characterisation of calcium deficient apatite. *Solid State Ionics*. 1997;101-103:1279-85.
- [69] Redler LH, Caldwell JM, Schulz BM, Levine WN. Management of articular cartilage defects of the knee. *Physician and Sportsmedicine*. 2012;40:20-35.
- [70] Bentley G, Bhamra JS, Gikas PD, Skinner JA, Carrington R, Briggs TW. Repair of osteochondral defects in joints-How to achieve success. *Injury*. 2013;44:S3-S10.
- [71] Jia L, Duan Z, Fan D, Mi Y, Hui J, Chang L. Human-like collagen/nano-hydroxyapatite scaffolds for the culture of chondrocytes. *Materials Science and Engineering C*. 2013;33:727-34.
- [72] Wang L, Fan H, Zhang ZY, Lou AJ, Pei GX, Jiang S, et al. Osteogenesis and angiogenesis of tissue-engineered bone constructed by prevascularized β -tricalcium phosphate scaffold and mesenchymal stem cells. *Biomaterials*. 2010;31:9452-61.
- [73] Williams D. *Definitions in Biomaterials*. Progress in Biomedical Engineering, Elsevier, Amsterdam. 1987.
- [74] Boanini E, Torricelli P, Fini M, Sima F, Serban N, Mihailescu IN, et al. Magnesium and strontium doped octacalcium phosphate thin films by matrix

assisted pulsed laser evaporation. *Journal of Inorganic Biochemistry*. 2012;107:65-72.

[75] Winslow BD, Shao H, Stewart RJ, Tresco PA. Biocompatibility of adhesive complex coacervates modeled after the sandcastle glue of *Phragmatopoma californica* for craniofacial reconstruction. *Biomaterials*. 2010;31:9373-81.

[76] Culpepper BK, Phipps MC, Bonvallet PP, Bellis SL. Enhancement of peptide coupling to hydroxyapatite and implant osseointegration through collagen mimetic peptide modified with a polyglutamate domain. *Biomaterials*. 2010;31:9586-94.

[77] Finlay C. Metodología de empleo de la hidroxiapatita coralina HAP-200 en Ortopedia y Traumatología. *Revista Cubana de Ortopedia y Traumatología, Hospital Militar Central, Ciudad de La Habana-Cuba*. 2005:35-40.

CAPÍTULO 4. LACTATO DE QUITOSANO

1. INTRODUCCIÓN

Actualmente se han venido haciendo síntesis de hidrogeles de quitosano añadiendo diferentes tipos de ácidos, como el acético, el orgánico monobásico[1], el clorhídrico, el fórmico, el glutámico, el cítrico, el láctico, entre otros[2], buscando la obtención de nuevas propiedades o buscando mejorar las propiedades ya existentes para tener éxito en aplicaciones biomédicas donde se puede utilizar el lactato de quitosano, como en el caso de los dispositivos de filtración, lentes de contacto suaves, sistemas de liberación de fármacos [2-5] y de genes, tratamiento y diagnóstico de enfermedades como el cáncer[6], apósitos para heridas, máscaras cosméticas para piel[7], andamios para ingeniería de tejidos[5, 8] de huesos, vasos sanguíneos y nervios [9] y medicina regenerativa [1]. En cuanto a la ingeniería de tejidos y la medicina regenerativa se han venido haciendo estudios para lograr que los andamios cumplan con la función de la matriz extracelular, donde las células puedan crecer y proliferar.

El quitosano es un polisacárido que presenta una naturaleza catiónica [10-12] que se produce a partir de los grupos amino primario y proporciona una alta densidad de carga en una solución ácida. Esta naturaleza catiónica le permite al quitosano entregar polianiones biológicamente activos[13]. Actualmente es un buen sistema para liberación de fármacos [12, 14-16]. Presenta propiedades como la biocompatibilidad [11, 12, 17-20], ya que es un buen soporte donde células como osteoblastos y condrocitos se pueden adherir[14] y proliferar de forma adecuada [21-31], osteoinductividad [32], hidrofiliidad, inmunogenicidad ya que puede actuar como un agente antimicrobial, ante todo como bactericida [11, 33-36], actividades antitumorales [37, 38], no toxicidad [11, 12, 33, 34, 39, 40], biodegradabilidad [11, 12, 17-20, 33, 39, 41, 42], de mucoadhesion [15, 37], la cual permite al quitosano cumplir la función de barrera intestinal, hemostáticas [32, 43], analgésicas, anticolesterolémico (controla el colesterol) [32], controla la hipertensión [32, 44] antioxidante[14] de bioadsorción[11, 12, 45-47] en el caso de medicamentos[48], biorreabsorción [49, 50] en el caso del calcio [32] y de

biorenovabilidad [1]. Estas propiedades dependen mucho del grado de desacetilación del quitosano [14], entre más alto mejor (>80%)[51].

El quitosano posee una gran versatilidad debido a sus características químicas, físicas[11, 52], biológicas y a sus propiedades mecánicas [14] que le permite ser transformado en membranas, fibras, filmes, sistemas de andamiaje porosos, micro o nanopartículas e hidrogeles[53].

La solubilización del quitosano al agregar una disolución ácida, facilita su manipulación en condiciones suaves, permitiendo así la interacción electrostática y unión a la estructura de proteínas y diferentes polianiones, como polímeros sintéticos, componentes de la matriz extracelular y ADN en la regeneración de hueso Subcondral en ingeniería [54].

Las unidades estructurales del quitosano sacarídicas, son la glucosamina y la N-acetil-glucosamina y están presentes en diferentes glicosaminoglicanos (GAGs)[54]. Estos GAGs que se encuentran en la matriz extracelular tienen una función muy importante en su organización y funcionamiento. Esto muestra que el quitosano puede ayudar a los GAGs en la regeneración del cartílago[5]. A diferencia de los GAGs, el quitosano presenta carácter básico y carga positiva a pH ácido, con lo cual puede interaccionar con la superficie celular y las proteínas plasmáticas, combinando interacciones específicas tipo GAGs con otras inespecíficas asociadas a su carga[51, 55].

El ácido láctico, es un ácido orgánico encontrado en varios productos de origen natural [56]. Al ser añadido a polímeros mejora la estabilidad hidrolítica y térmica, la degradación de la radiación y la biodegradación proporcionando propiedades termofísicas y otras propiedades como la solubilidad[41], miscibilidad y mecánicas[56], las cuales han sido útiles en la liberación de fármacos[41], andamios porosos biodegradables para la reconstrucción de matrices por daños de tejidos y órganos, entre otros[56].

Al lactato de quitosano se le ha podido demostrar la biocompatibilidad[41], hidrofiliidad[4, 15], biodegradabilidad, como un agente antibacterial [41] y también como un buen sistema de liberación de genes y medicamentos[2, 41].

El lactato de quitosano ha sido utilizado en andamios con cementos de fosfatos de calcio, donde se ha demostrado una alta resistencia mecánica [41]. Otros estudios mostraron que los fosfatos cálcicos proporcionan refuerzo a la matriz y osteoconductividad y que el quitosano modula la degradación y las propiedades mecánicas como la resistencia y tenacidad [57]. El quitosano en la hidroxapatita, incrementa la resistencia a la flexión y mejora la adhesión de osteoblastos [57] donde se ha logrado obtener como resultado, la integración rápida de estos compuestos en la estructura ósea, en la cual han sido transformados en hueso[58-65].

En este proyecto, se quiso sintetizar lactato de quitosano para que cumpliera con la función de la matriz extracelular en la regeneración de cartílago Subcondral en Ingeniería, para esto se añadió al quitosano una solución al 2% de ácido láctico, se introdujo en un criostato y se liofilizo. La idea es que estos criogeles biocompatibles, sean estables a corto plazo pero biodegradables a largo plazo en un medio fisiológico. Por este motivo se empleó el quitosano como matriz polimérica de los criogeles. Existen otras matrices poliméricas, que presentan características similares a las del quitosano que son el colágeno y la agarosa. La diferencia entre estas y el quitosano es que el quitosano es un buen sustrato alimenticio y es consumido rápidamente durante el desarrollo de las células cultivadas[53].

Los andamios sintetizados fueron estabilizados por tratamiento térmico, donde se hizo un calentamiento a vacío a 100°C y otro a 200°C, en el cual se produjo una conversión del enlace iónico entre aminos protonados sobre el quitosano y carboxilos desprotonados sobre ácido láctico a un enlace amida covalente[1].

Se hicieron análisis de solubilidad donde se pudo observar que el lactato de quitosano es hidrofílico e higroscópico, ya que aumento su peso al paso del tiempo.

2. OBJETIVOS DE ESTE CAPÍTULO

El objetivo fundamental de este trabajo es sintetizar andamios de lactato de quitosano para que cumpla la función de matriz extracelular en la regeneración del cartílago Subcondral en ingeniería.

Para lograr lo anterior, se plantearon los siguientes objetivos parciales,

2.1.Objetivo1: SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE LACTATO DE QUITOSANO

2.2.Objetivo 2: ENTRECruzamiento DEL LACTATO DE QUITOSANO

3. PROPIEDADES DE LOS MATERIALES

3.1. Propiedades del quitosano:

Biodegradable

No citotóxico

Alta afinidad a las células óseas

3.2. Propiedades del Ácido láctico:

Solubilidad

Miscibilidad

Mecánicas

4. SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DEL LACTATO DE QUITOSANO

El grado de desacetilación del quitosano se calculó por Resonancia magnética nuclear (RMN) de la siguiente forma:

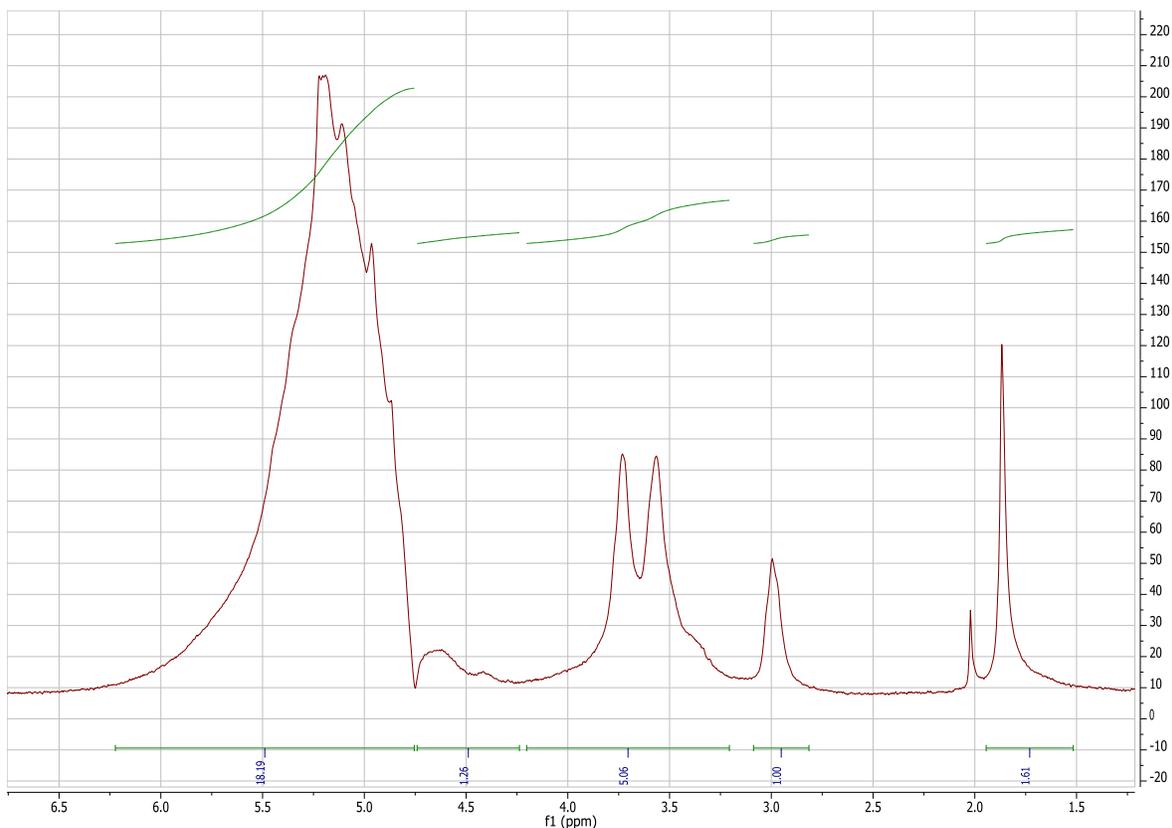


Figura 1. RMN del Quitosano

Picos	Integración de cada pico
a ≈ 5.20	$I_a = 18.19$
b ≈ 4.65	$I_b = 1.26$
c ≈ 4.2-3.21	$I_c = 5.06$
d ≈ 3	$I_d = 1.00$
e ≈ 1.86	$I_e = 1.61$

Tabla 1. Integración de cada pico en la RMN del quitosano

Teniendo la integración de cada pico en la RMN del quitosano mostrados en la tabla 1, se reemplaza en la ecuación y se obtiene la fracción molar de unidades N-acetiladas (F_A) de la siguiente forma:

$$F_A = 7(1.26 + 1.61) / [4(18.19 + 5.06 + 1.00) + 1.26 + 1.61] = 0.2011$$

Para calcular el grado de desacetilación se utiliza la siguiente formula [66]:

$$1 - F_A$$

$$1 - 0.2011 = 0.80$$

$$0.80 \times 100 = 80\%$$

El lactato de quitosano se sintetizó como se describe en el Apéndice. Tras liofilizar y cortar se obtuvieron los siguientes especímenes:

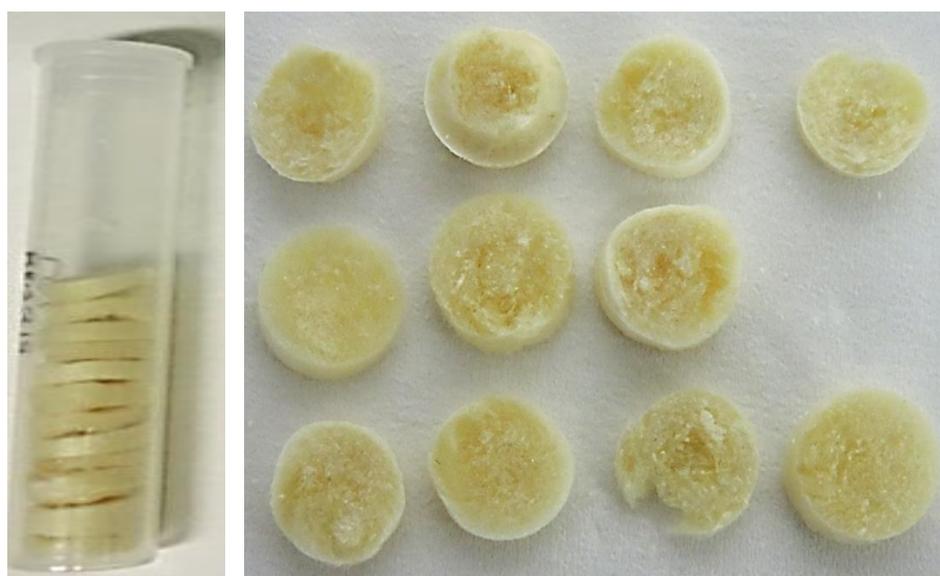
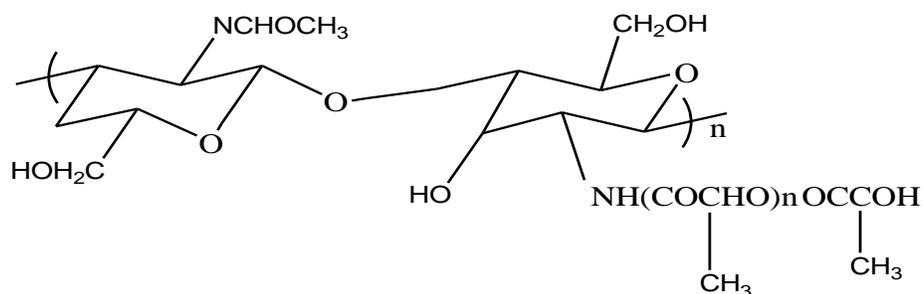
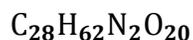


Figura 2. Andamios de lactato de quitosano

OBTENCIÓN DEL LACTATO DE QUITOSANO : $(C_{28}H_{62}N_2O_{20})$



Para la obtención del lactato de quitosano, se partió de la siguiente reacción de síntesis:



Después de la síntesis del lactato de quitosano se realizó su caracterización, de la siguiente forma:

Reflexión total atenuada (ATR):

Con el fin de observar los grupos funcionales del lactato de quitosano, se hizo un ATR obteniéndose el siguiente espectro:

Números de onda (cm ⁻¹)	Asignación
1734	-COOH
1631	CONH ₂ I
1568	CONH ₂ II
1311	CONH ₂ III

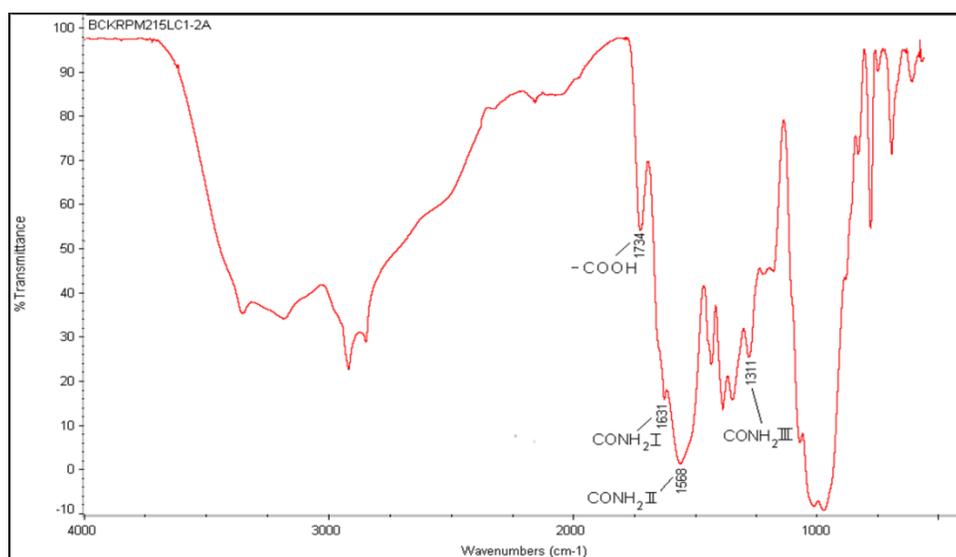


Figura 3. ATR del lactato de quitosano

En la figura 3 se aprecia el ATR del lactato de quitosano, donde se observa la banda de 1734 cm^{-1} correspondiente a los grupos carboxílicos de las cadenas laterales del ácido láctico [3], lo que indica que el gel ha formado un complejo iónico con el ácido láctico[3]. Se observa la amida I en la banda 1631 y la amida II en la banda 1568 cm^{-1} [3] unidas covalentemente con la sal de lactato [1] y se ve la banda 1312 cm^{-1} que se debe a la amida III[3].

DRX del Lactato de Quitosano:

Para ver la estructura y los picos que aparecen, se hizo una DRX, obteniéndose el siguiente diagrama:

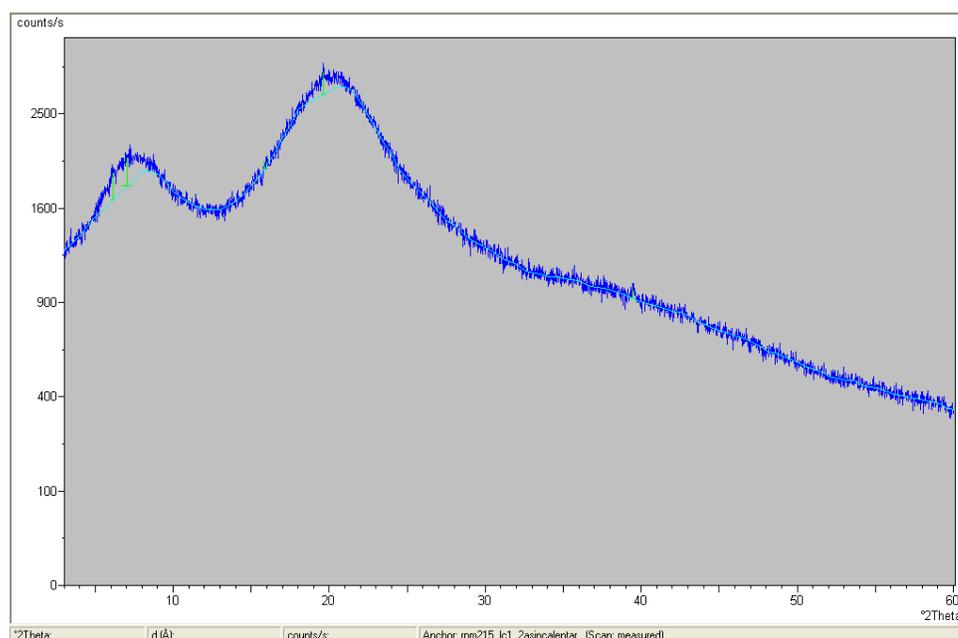


Figura 4. DRX del lactato de quitosano

Como se observa en la figura 4, se ve una estructura amorfa y se ven picos anchos en $2\theta = 7.33^\circ$ y $2\theta = 20^\circ$. El pico a 20° es el correspondiente al quitosano[2].

TGA del Lactato de Quitosano

Para ver la descomposición térmica de la muestra, se hizo un Análisis termogravimétrico obteniéndose el siguiente diagrama:

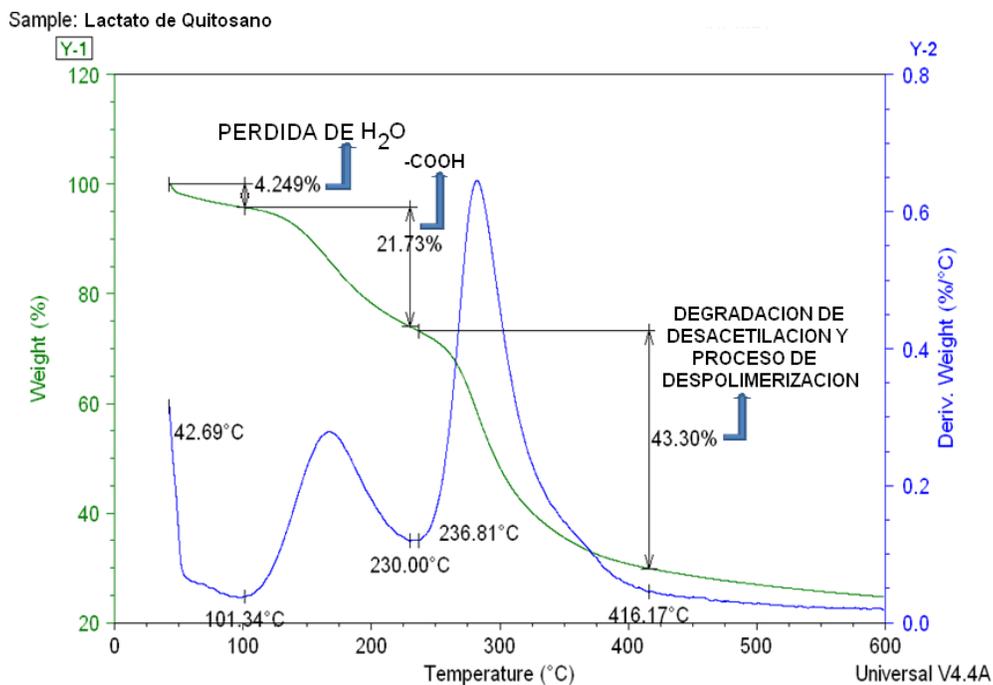


Figura 5. TGA del lactato de quitosano

Como se observa en la figura 5, la curva de TGA presenta una transición térmica en el rango de temperatura de 42.69°C – 101.34°C, con una pérdida de 4.25% en peso que se debe a la pérdida de agua de las moléculas del polímero[67]. Aparece otro pico entre 101.34°C – 230°C con una pérdida de peso de 21.73% que podría ser debido a los carboxilos del ácido láctico residual [67]. Entre 236.81°C y 416.17°C se presenta la mayor pérdida de peso que es de 43.30%, la cual se atribuye a la etapa de degradación de desacetilación y al proceso de despolimerización[67].

Espectro de 1H-RMN del Lactato de Quitosano

Con el fin de identificar los átomos y grupos de átomos del lactato de quitosano y para determinar su posición relativa en la molécula, se hizo una 1H-RMN, obteniéndose el siguiente espectro:

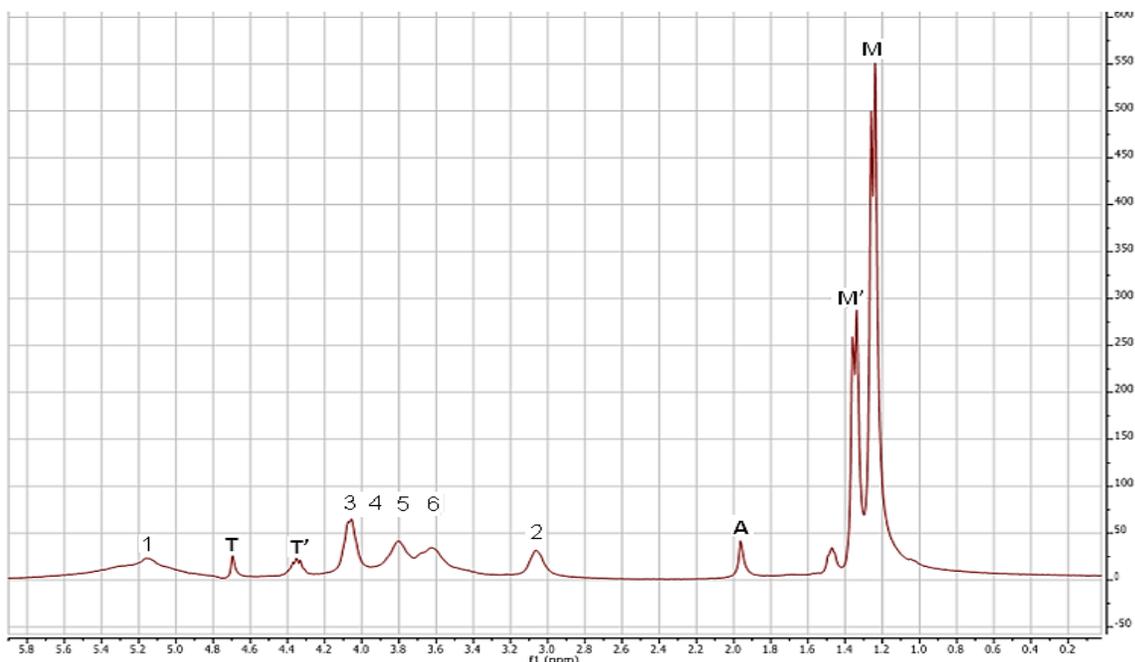
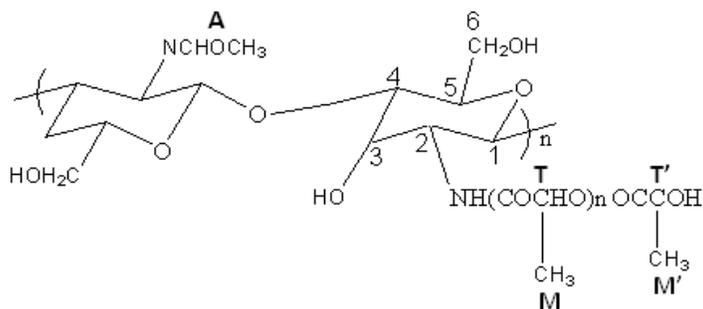


Figura 6. Espectro de 1H-RMN del lactato de quitosano

La figura 6 muestra el espectro de 1H-RMN del lactato de quitosano. Los picos característicos del lactato de quitosano asociados con quitosano y con un segmento del ácido láctico, muestran el desplazamiento químico característico del H-1 de la glucosamina entre 4.75 y 5.8 ppm (1) [3]. Se observa un desplazamiento entre 4.74 y 4.63 ppm que se debe a un -CH de la unidad del lactil (T) [3]. En 4.42 y 4.27 ppm se ve el -CH de la unidad del lactil hidroxilactado(T') [3]. Entre 3.33 y 4.15 ppm se observan H-3, H-4, H-5 y H6 (3 4 5 6) [3]. De 2.9 a 3.14 ppm se ve el H-2(2) [3]. A 1.96 ppm se observa la NHAc (acetamida) (A) [3]. Entre 1.3 a 1.4 ppm se ve el -CH3 de las unidades lactilo hidroxilado (M') y entre 0.7 a 1.3 ppm se observa el -CH3 de las unidades lactilo(M). El pico a 1.45 ppm se observa desplazado en la RMN del quitosano y se debe a agua.

23.66 → 100%

15.95 → %

% = 67.41

Microanálisis

Se hizo un análisis elemental para ver el contenido en % de carbono, hidrogeno y nitrógeno del lactato de quitosano, obteniéndose los siguientes resultados:

$\%C = 40.10$

$\%H = 7.53$

$\%N = 4.66$

Análisis Elemental en el ChemDraw

Para comparar los resultados del microanálisis y de TGA y confirmar la presencia de agua en el lactato de quitosano se utilizó el chemdraw, obteniéndose los siguientes resultados:

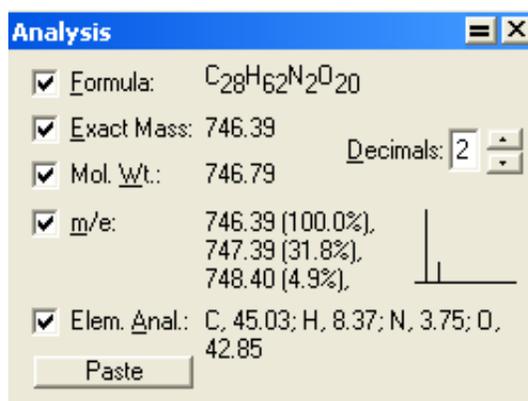
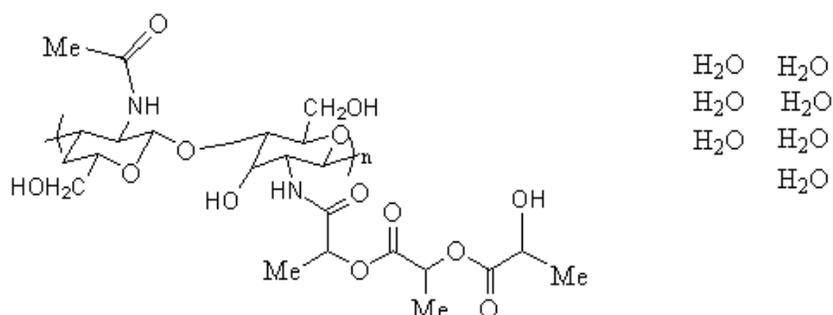


Figura 8. Análisis Elemental en el ChemDraw del lactato de quitosano

$\%C = 45.03$

$\%H = 8.37$

$\%N = 3.75$

$\%O = 42.85$

Estos resultados que se observan en la figura 8, muestran que hay agua en las moléculas del lactato de quitosano. Se observa el TGA y se ve la presencia de agua en la muestra entre 42°C y 101°C.

Microscopio electrónico de Barrido de alta resolución con filamento de Emisión de Campo (FE-SEM)

Se analizó la morfología de la superficie del lactato de quitosano y se midió el tamaño de los poros de la siguiente forma:

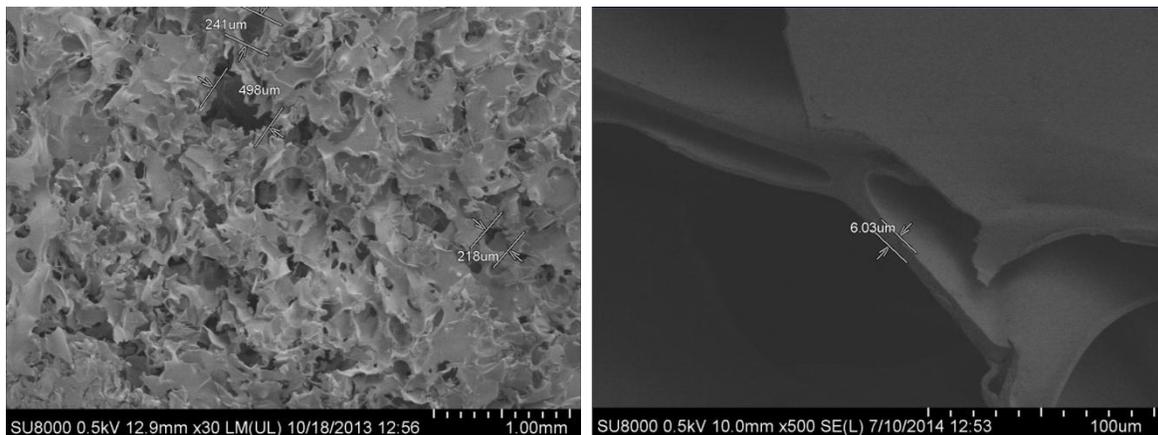


Figura 9. Imágenes de FE-SEM del lactato de quitosano a diferentes magnificaciones

Las imágenes de SEM del lactato de quitosano que se observan en la figura 9, muestran estructuras interconectadas formando agujeros de diferentes tamaños. Se pueden observar agujeros más pequeños dentro de los agujeros grandes (211, 190, 253, 353, 276, 241, 498 y 218 μm). Se pudo calcular el grosor de la estructura que es de 6.03 μm.

Análisis de solubilidad del Lactato de Quitosano

Para ver si el lactato de quitosano es hidrofílico y si aumenta o se quedaba estable su peso al paso del tiempo, se hizo un análisis de solubilidad a 4 trozos de cada muestra, obteniéndose los siguientes resultados:

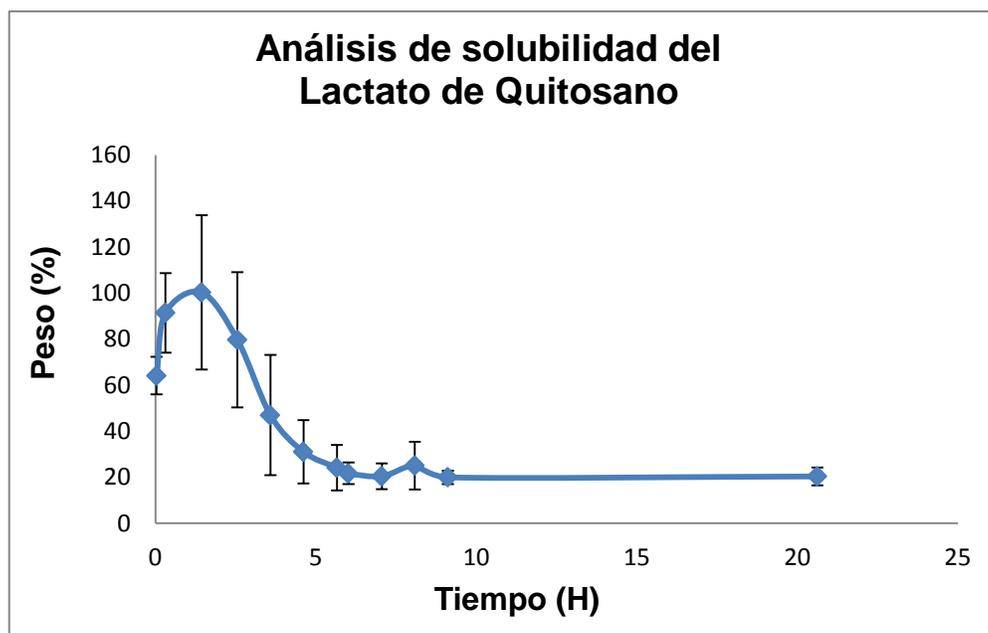


Figura 10. Análisis de solubilidad del Lactato de Quitosano

Como se puede observar en la figura 10, el lactato de quitosano se degrada muy rápido, la pérdida de peso es en 4 horas.

Picnómetro de Helio (Densidad Real) del lactato de quitosano

Se hicieron 10 mediciones de la densidad en el picnómetro de helio del lactato de quitosano con sus desviaciones y se promediaron obteniéndose los siguientes resultados mostrados en la tabla 2:

Densidad Real (g/cm ³)	S (Desviación)
1.7251	0.01

Tabla 2. Densidad real del lactato de quitosano

Método de Arquímedes (Densidad aparente) del lactato de quitosano

Se hicieron mediciones de la densidad a 3 trozos del lactato de quitosano y se promediaron y se calculó la desviación obteniéndose los siguientes resultados mostrados en la tabla 3:

Densidad Aparente (g/cm³)	S (Desviación)
0.94	0.006

Tabla 3. Densidad aparente del lactato de quitosano

% Densidad del lactato de quitosano

Teniendo la densidad real y la densidad aparente, se pudo calcular la densidad en % del lactato de quitosano de la siguiente forma:

$$\% \text{ Densidad} = \frac{\text{Densidad Aparente}}{\text{Densidad Real}} \times 100$$

$$\% \text{ Densidad del lactato de quitosano} = \frac{0.94}{1.7251} \times 100 = 54.50$$

Medición de la Porosidad del lactato de quitosano

Teniendo la densidad en % pudimos calcular la porosidad del lactato de quitosano de la siguiente manera:

$$\text{Porosidad} = 100 - (\% \text{ Densidad})$$

$$\text{Porosidad} = 100 - (54.50)$$

$$\text{Porosidad} = 45\%$$

ANÁLISIS TÉRMICO DEL LACTATO DE QUITOSANO

Para ver si las muestras entrecruzaban, se hicieron los siguientes calentamientos, obteniéndose los siguientes resultados:

4.1. CALENTAMIENTO A VACIO A 100°C DEL LACTATO DE QUITOSANO

Después del calentamiento, el lactato de quitosano mostro la siguiente apariencia:



Figura 11. Lactato de quitosano calentado a 100°C

Como se puede observar en la figura 11, se ve un andamio poroso, en el cual se pueden alojar las células.

Reflexión total atenuada (ATR) del lactato de quitosano calentado a vacío a 100°C:

Para ver el comportamiento del material después de ser calentado a 100°C, se hizo una ATR, obteniéndose el siguiente espectro:

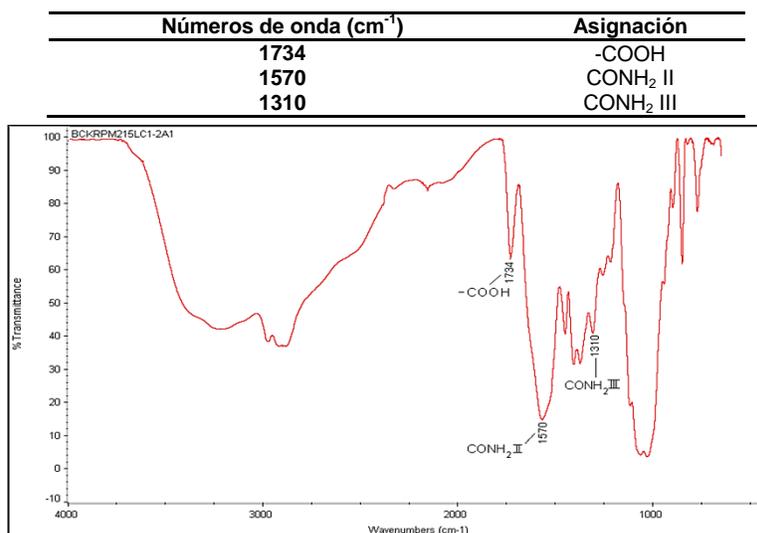


Figura 12. ATR del lactato de quitosano calentado a vacío a 100°C

En la Figura 12 se aprecia el ATR del lactato de quitosano, donde se observa la banda de 1734 cm^{-1} correspondiente a los grupos carboxílicos de las cadenas laterales del ácido láctico [3], lo que indica que el gel ha formado un complejo iónico con el ácido láctico[3]. Se observa la amida II en la banda 1570 cm^{-1} [3] unida covalentemente con la sal de lactato [1] y se ve la banda 1310 cm^{-1} que se debe a la amida III [3].

DRX del Lactato de Quitosano del lactato de quitosano calentado a vacío a 100°C:

Para ver la estructura y los picos que aparecen, se hizo una DRX, obteniéndose el siguiente diagrama:

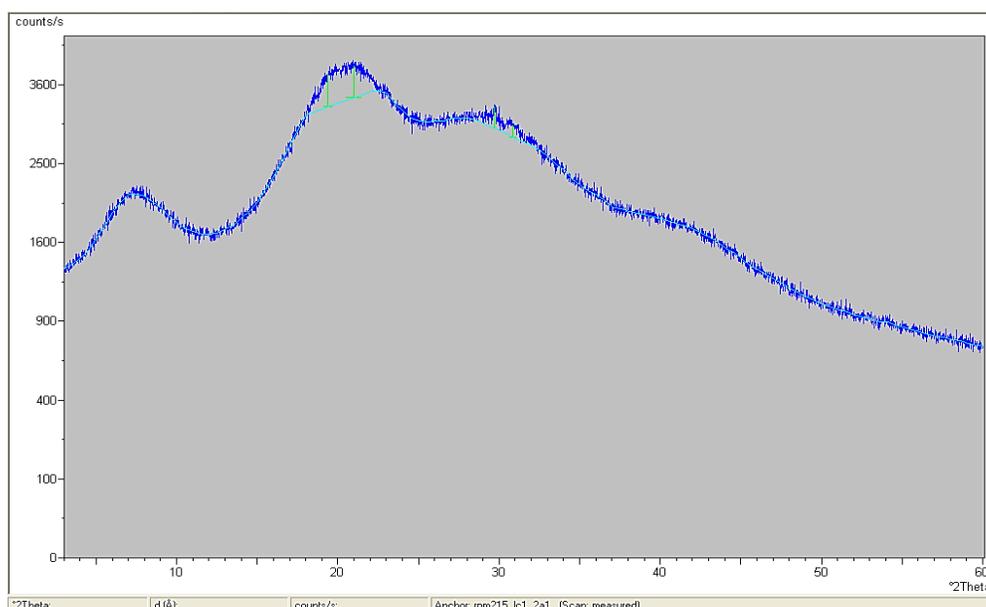


Figura 13. DRX del lactato de quitosano calentado a 100°C

Como se observa en la figura 13, se ve una estructura amorfa y se ven picos anchos en $2\theta = 7.53^\circ$, $2\theta = 20.87^\circ$, $2\theta = 29.71^\circ$ y $2\theta = 42^\circ$. Se ve un desplazamiento con respecto al lactato de quitosano que está sin calentar. El pico a 20.87° es el correspondiente al quitosano[2].

TGA del Lactato de Quitosano del lactato de quitosano calentado a vacío a 100°C

Para ver la descomposición térmica de la muestra, se hizo un Análisis termogravimétrico obteniéndose el siguiente diagrama:

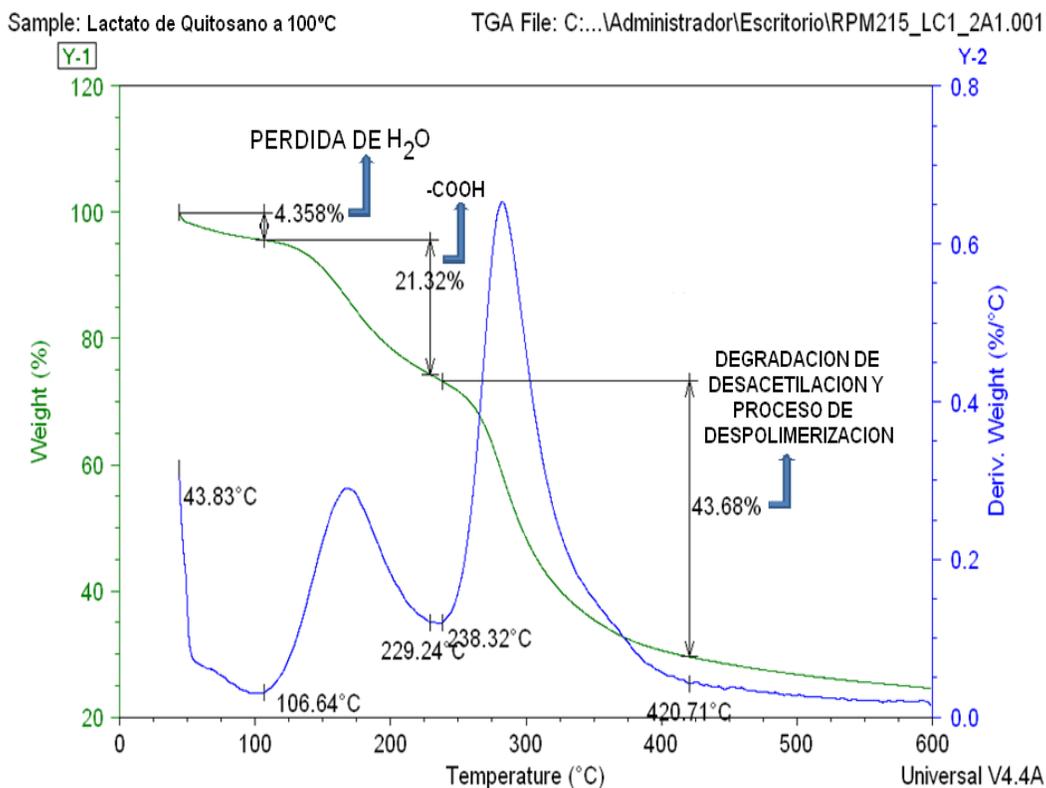


Figura 14. Curvas DTA/TGA del lactato de quitosano calentado a vacío a 100°C

Como se observa en la figura 14, la curva de TGA presenta una transición térmica en el rango de temperatura de 43.83°C – 106.64°C, con una pérdida del 4.36% en peso que se debe a la pérdida de agua de las moléculas del polímero[67]. Aparece otro pico entre 106.64°C - 229.24 °C con una pérdida de peso de 21.32% que podría ser debido a los carboxilos del ácido láctico residual [67]. Entre 238.32°C y 420.71°C se presenta la mayor pérdida de peso que es de 43.68%, la cual se atribuye a la etapa de degradación de desacetilación y al proceso de despolimerización[67].

Espectro de 1H-RMN del Lactato de Quitosano calentado a vacío A 100°C

Con el fin de identificar los átomos y grupos de átomos del lactato de quitosano calentado a 100°C y para determinar su posición relativa en la molécula, se hizo una 1H-RMN, obteniéndose el siguiente espectro:

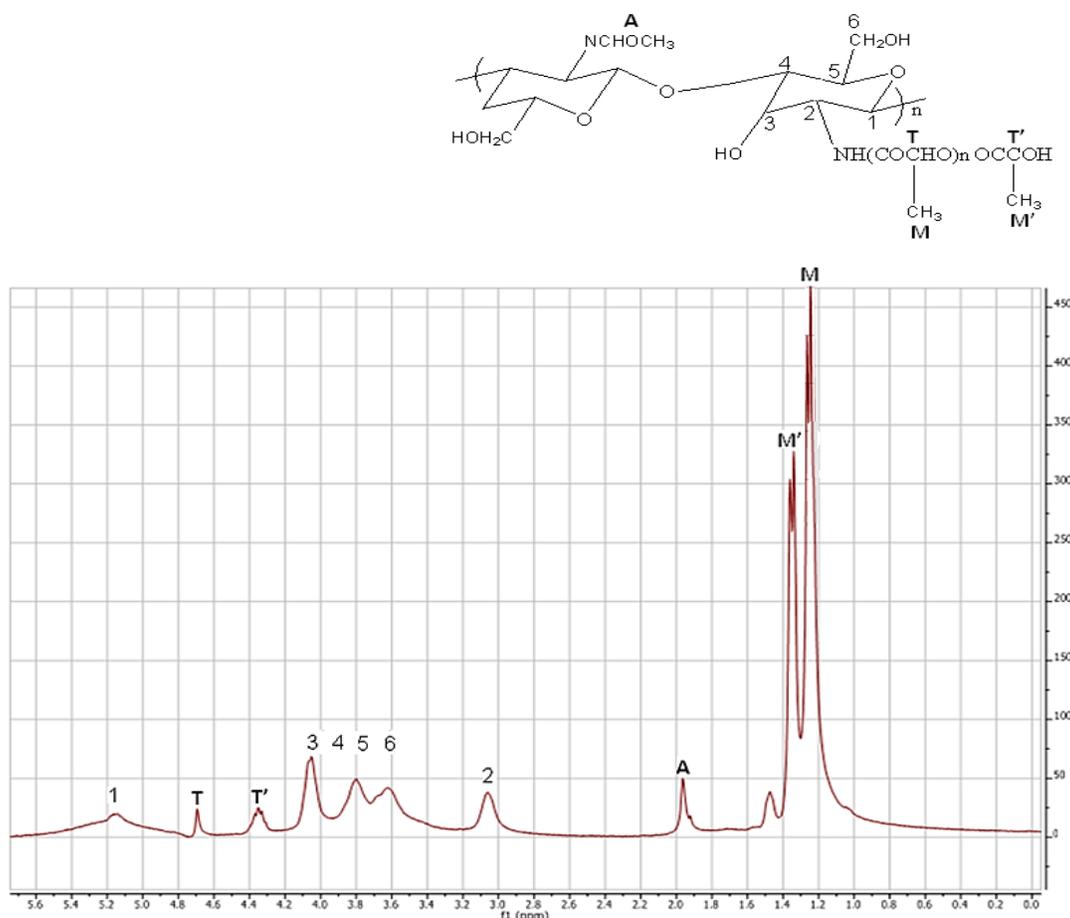


Figura 15. Espectro de 1H-RMN del lactato de quitosano calentado a vacío a 100°C

La figura 15 muestra el espectro de 1H-RMN del lactato de quitosano calentado a vacío a 100°C. Los picos característicos del lactato de quitosano asociados con quitosano y con un segmento del ácido láctico, muestran el desplazamiento químico del H-1 de la glucosamina entre 4.76 y 5.61 ppm (1) [3]. Se observa un desplazamiento entre 4.72 y 4.62 ppm que se debe a un -CH de la unidad del lactil (T) [3]. Se observa un desplazamiento entre 4.43y 4.27 ppm que se debe a

un -CH de la unidad del lactil hidroxilactado(**T'**) [3]. Entre 3.36 y 4.15 ppm se observan H-3, H-4, H-5 y H6 (3 4 5 6) [3]. De 2.96 a 3.16 ppm se ve el H-2 (2) [3]. A 1.96 ppm se observa la NHAc (acetamida) (**A**) [3]. Entre 1.3 a 1.4 ppm se ve el -CH3 de las unidades lactilo hidroxilado (**M'**) y entre 0.75 a 1.3 ppm se observa el -CH3 de las unidades lactilo(**M**). El pico a 1.45 ppm se observa desplazado en la RMN del quitosano y se debe a agua.

Grado de sustitución del ácido láctico en el quitosano después del calentamiento a vacío a 100°C

Para calcular la sustitución del ácido láctico en el quitosano calentado a 100°C se integró cada pico en la RMN de la siguiente forma:

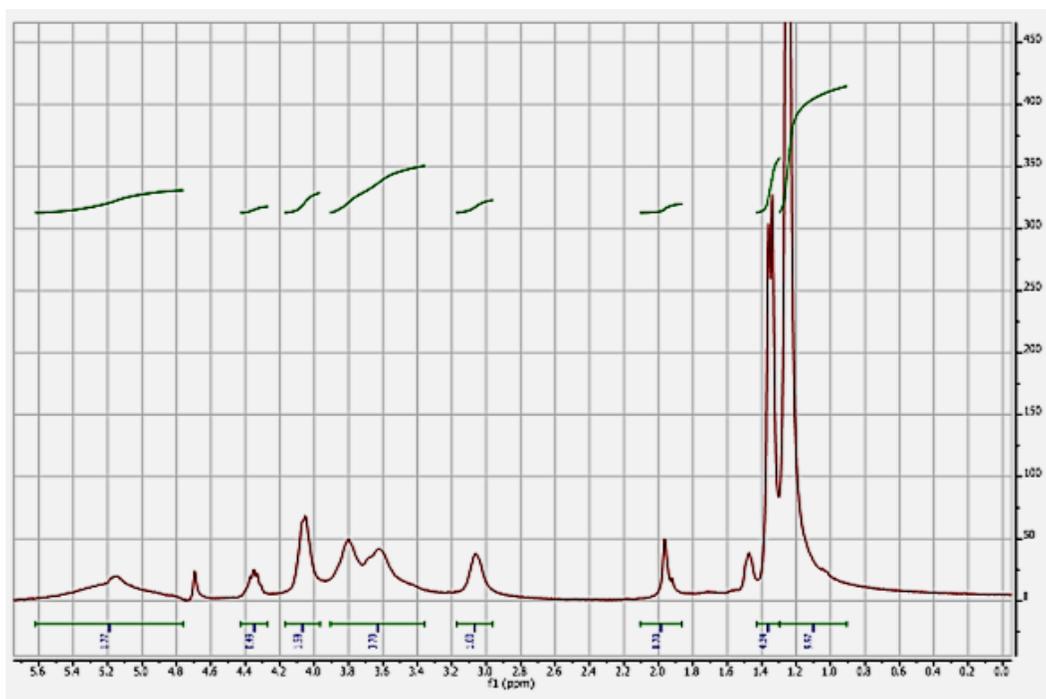


Figura 16. Sustitución del ácido láctico en el quitosano después del calentamiento a vacío a 100°C.

Luego se sumaron todas las integrales de la molécula (área total):

$$1.77 + 0.49 + 1.58 + 3.70 + 1 + 0.70 + 4.34 + 9.97 = 23.55$$

Después se sumaron las áreas correspondientes al ácido láctico (área total del ácido láctico):

$$0.49+1.58+4.34+9.97=16.38$$

Teniendo el área total de la molécula y el área total del ácido láctico, se calculó el grado de sustitución del ácido láctico en el quitosano calentado a 100°C en % de la siguiente forma:

$$23.55 \longrightarrow 100\%$$

$$16.38 \longrightarrow \%$$

$$\% = 69.55$$

Microanálisis del lactato de quitosano calentado a vacío a 100°C

Se hizo un análisis elemental para ver el contenido en % de carbono, hidrogeno y nitrógeno al lactato de quitosano calentado a 100°C, obteniéndose los siguientes resultados:

$$\%C = 40.71$$

$$\%H = 7.30$$

$$\%N = 4.78$$

Estos resultados comparados con el análisis elemental del lactato de quitosano en el ChemDraw (ver figura 8), muestran que hay agua en las moléculas del lactato de quitosano calentado a 100°C. Se observa el TGA y se ve la presencia de agua en la muestra entre 44°C y 106°C.

Microscopio electrónico de Barrido de alta resolución con filamento de Emisión de Campo (FE-SEM) del lactato de quitosano calentado a vacío a 100°C

Se analizó la morfología de la superficie del lactato de quitosano calentado a 100°C y se midió el tamaño de los poros de la siguiente forma:

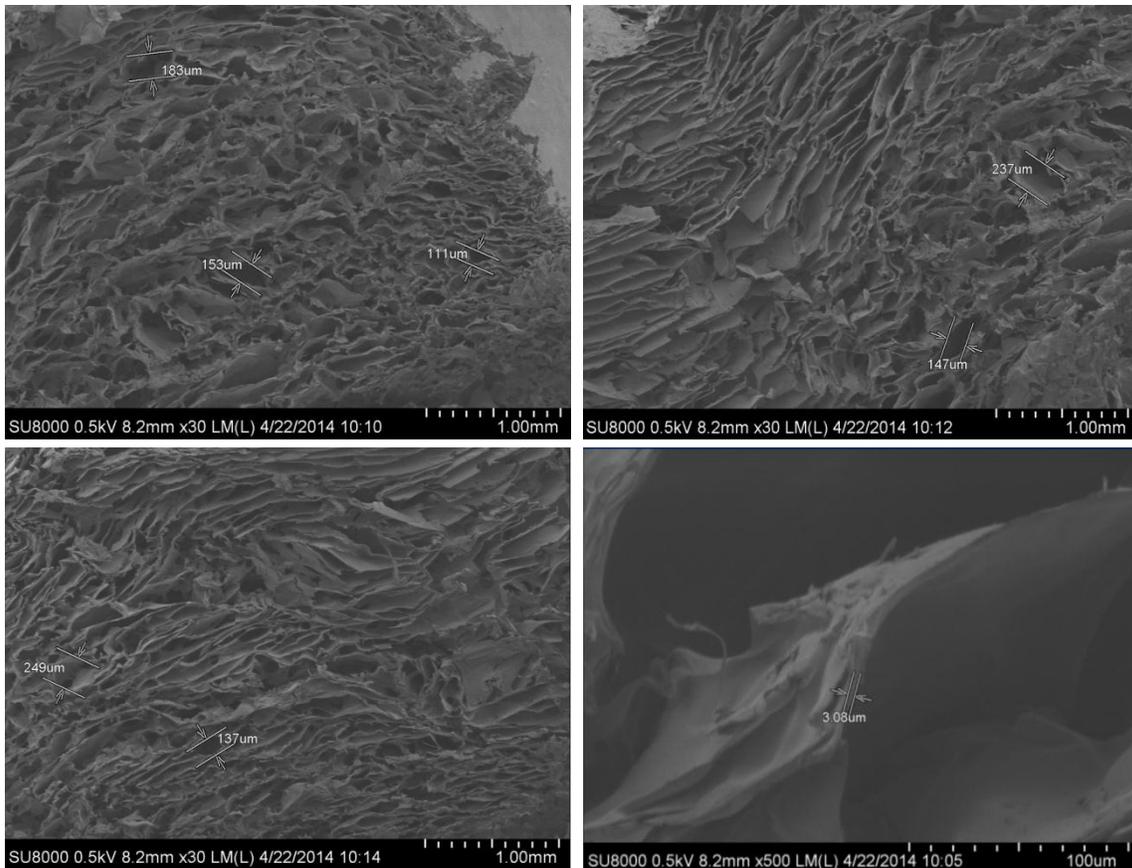


Figura 17. Imágenes de FE-SEM del lactato de quitosano calentado a vacío a 100°C a diferentes magnificaciones

Las imágenes de SEM del lactato de quitosano calentado a vacío a 100°C que se observan en la figura 17, muestran estructuras interconectadas aplanadas formando agujeros de diferentes tamaños. Se pueden observar agujeros más pequeños dentro de algunos agujeros grandes (183,237 y 249 μm). Se pudo calcular el grosor de la estructura que es de 3.08 μm .

Análisis de solubilidad del lactato de quitosano calentado a vacío a 100°C durante 9 días

Para ver si el lactato de quitosano calentado a 100°C es hidrofílico y si aumenta o se queda estable su peso al paso del tiempo, se hizo un análisis de solubilidad a 4 trozos de cada muestra, obteniéndose los siguientes resultados:

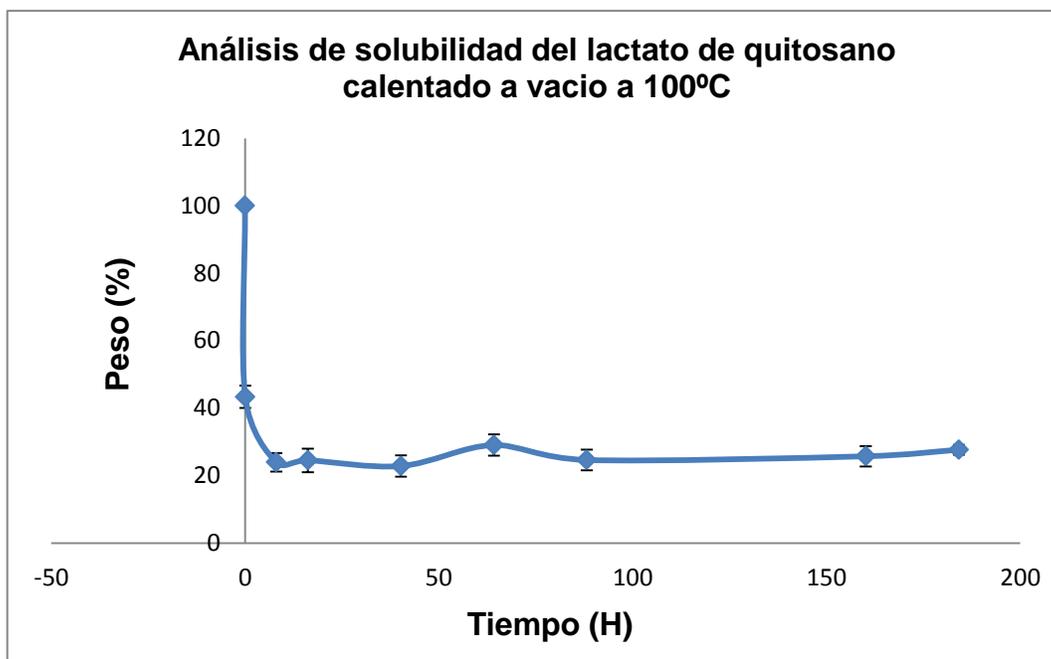


Figura 18. Análisis de solubilidad del lactato de quitosano calentado a 100°C

Como se puede observar en la figura 18, se degrada muy rápido el lactato de quitosano calentado a 100°C, su degradación empieza a las 9 horas.

ATR del lactato de Quitosano del día 5 en el análisis de solubilidad

Después de introducir el lactato de quitosano calentado a 100°C en PBS, se hizo una ATR para comparar con el lactato de quitosano calentado a 100°C que no se sumergió en PBS y se obtuvo los siguientes espectros:

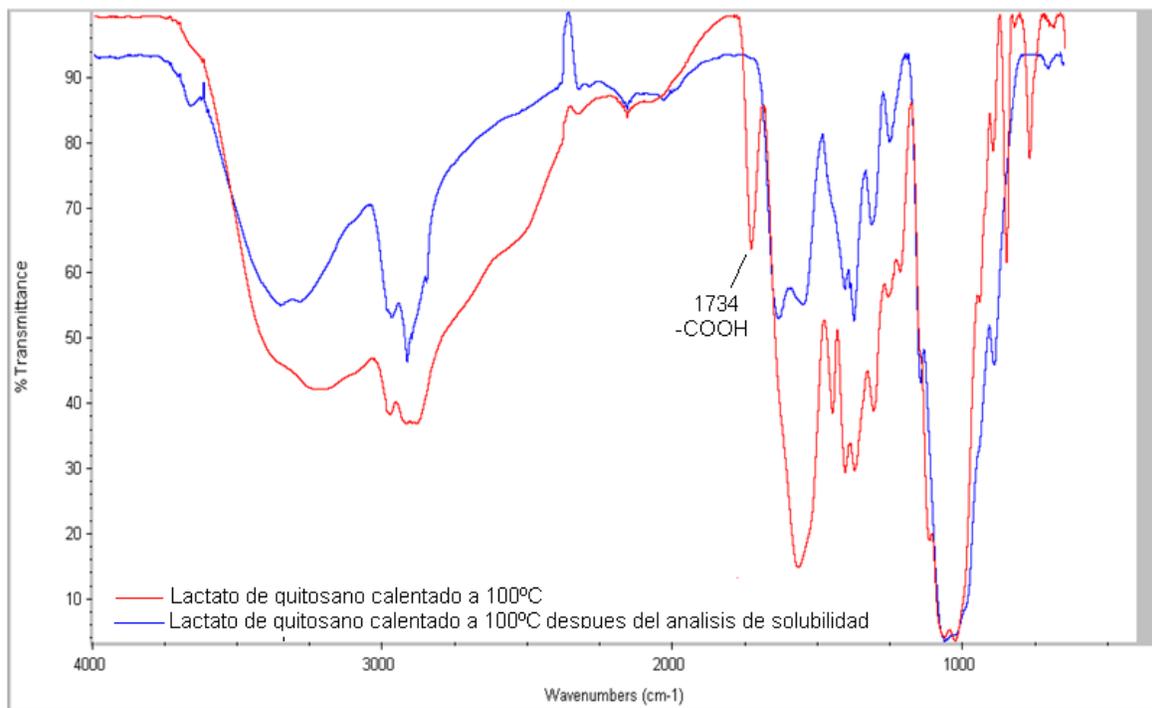


Figura 19. ATR del lactato de Quitosano calentado a 100°C antes y después el análisis de solubilidad

Como se observa en la figura 19, después del análisis de solubilidad del lactato de quitosano durante 5 días, se ven desplazamientos de los CH, CH₂ y CH₃ y de las amidas y desaparece la banca de 1734cm⁻¹ correspondiente a -COOH, lo que indica que la muestra se está degradando.

FE-SEM del lactato de quitosano calentado a 100°C después del análisis de solubilidad

Con el fin de analizar la morfología de la superficie del lactato de quitosano calentado a 100°C después del análisis de solubilidad a diferentes magnificaciones, se utilizó el FE-SEM, obteniéndose las siguientes imágenes:

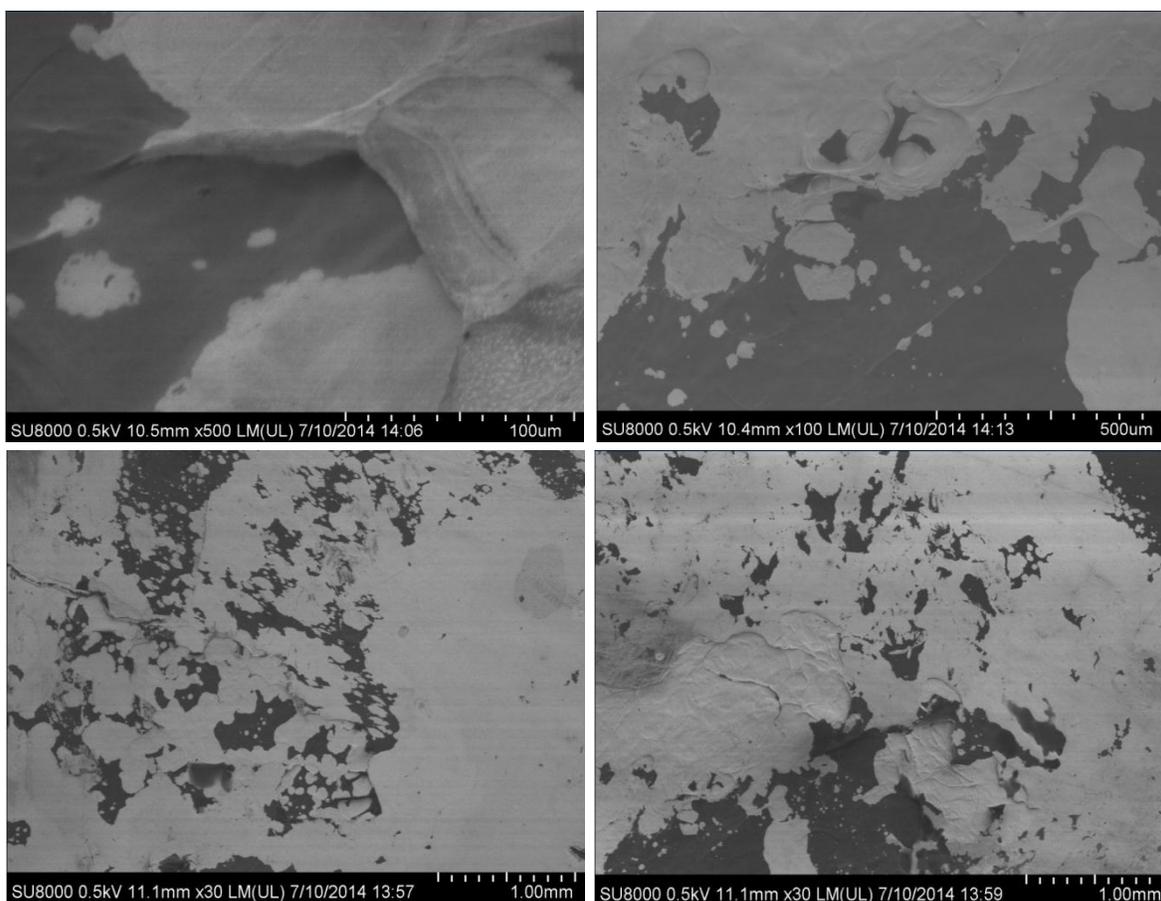


Figura 20. Imágenes de FE-SEM del lactato de quitosano calentado a vacío a 100°C a diferentes magnificaciones después del análisis de solubilidad.

Las imágenes de FE-SEM del lactato de quitosano calentado a vacío a 100°C después del análisis de solubilidad (figura 20), muestran estructuras de diferentes formas. Se pueden observar unas estructuras adheridas sobre otras.

Picnómetro de Helio (Densidad Real) del lactato de quitosano calentado a vacío a 100°C

Se hicieron 10 mediciones de la densidad en el picnómetro de helio del lactato de quitosano con sus desviaciones y se promediaron obteniéndose los siguientes resultados mostrados en la tabla 4:

Densidad Real (g/cm ³)	S (Desviación)
1.6523	0.01

Tabla 4. Densidad Real del lactato de quitosano calentado a 100°C

Método de Arquímedes (Densidad aparente) del lactato de quitosano calentado a vacío a 100°C

Se hicieron mediciones de la densidad a 3 trozos del lactato de quitosano y se promediaron y se calculó la desviación obteniéndose los siguientes resultados que se pueden ver en la tabla 5:

Densidad Aparente (g/cm ³)	S (Desviación)
0.82	0.01

Tabla 5. Densidad Aparente del lactato de quitosano calentado a 100°C

% Densidad del lactato de quitosano calentado a vacío a 100°C

La densidad en % se determinó de la siguiente manera:

$$\% \text{ Densidad} = \frac{\text{Densidad Aparente}}{\text{Densidad Real}} \times 100$$

$$\% \text{ Densidad} = \frac{0.82}{1.6523} \times 100 = 49.63$$

Medición de la Porosidad del lactato de quitosano calentado a vacío a 100°C

La medición de la porosidad del lactato de quitosano calentado a vacío a 100°C en % se determinó de la siguiente manera:

$$\text{Porosidad} = 100 - (\% \text{ Densidad})$$

$$\text{Porosidad} = 100 - 49.63$$

$$\text{Porosidad} = 50\%$$

4.2. CALENTAMIENTO A VACIO A 200°C DEL LACTATO DE QUITOSANO:

Después del calentamiento a 200°C del lactato de quitosano, se hizo su caracterización de la siguiente forma:

Reflexión total atenuada (ATR) del lactato de quitosano calentado a vacío a 200°C:

Con el fin de observar que sucedía con los grupos funcionales del lactato de quitosano después del calentamiento a 200°C, se hizo un ATR obteniéndose el siguiente espectro:

Números de onda (cm⁻¹)	Asignación
1734	-COOH
1650	CONH₂ I
1532	CONH₂ II
1372	CONH₂ III

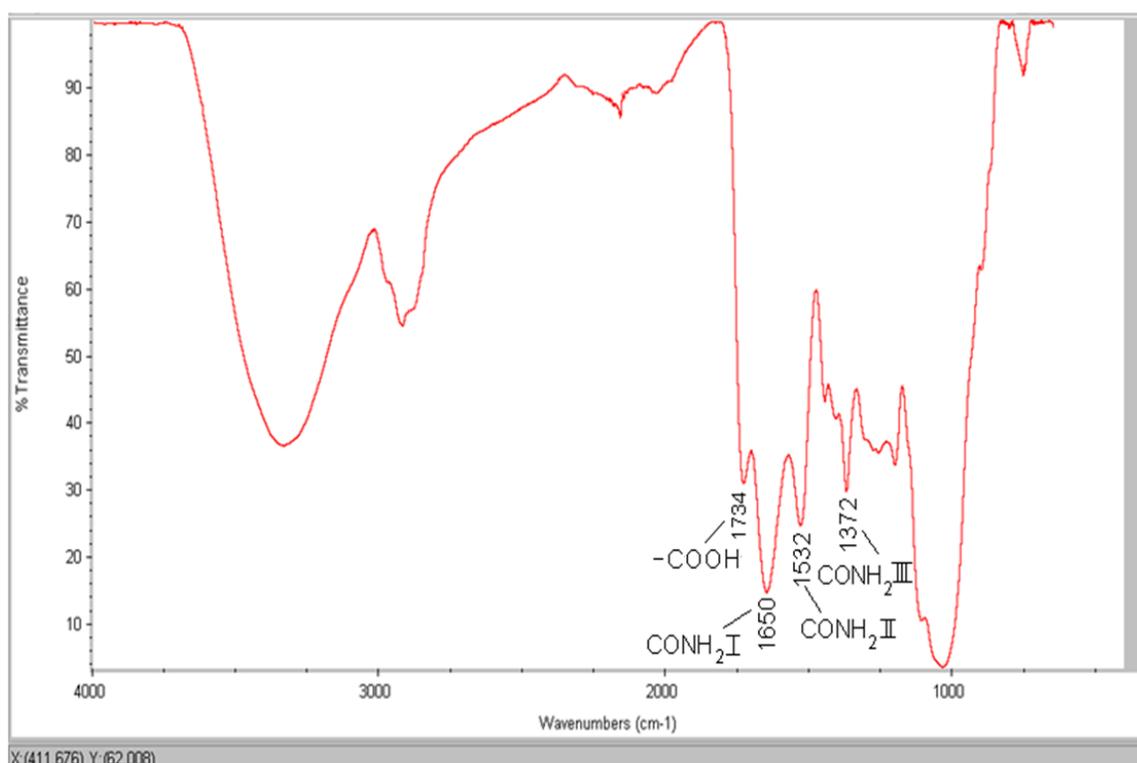


Figura 21. ATR del lactato de quitosano calentado a vacío a 200°C

En la Figura 21 se aprecia el ATR del lactato de quitosano, donde se observa la banda de 1734 cm^{-1} correspondiente a los grupos carboxílicos de las cadenas laterales del ácido láctico [3], lo que indica que el gel ha formado un complejo iónico con el ácido láctico[3]. Se observa la amida I en la banda 1650 y la amida II en la banda 1532 cm^{-1} [3] unidas covalentemente con la sal de lactato [1] y se ve la banda 1372 cm^{-1} que se debe a la amida III[3].

TGA del Lactato de Quitosano del lactato de quitosano calentado a vacío a 200°C

Para ver la descomposición térmica de la muestra, se hizo un Análisis termogravimétrico obteniéndose el siguiente diagrama:

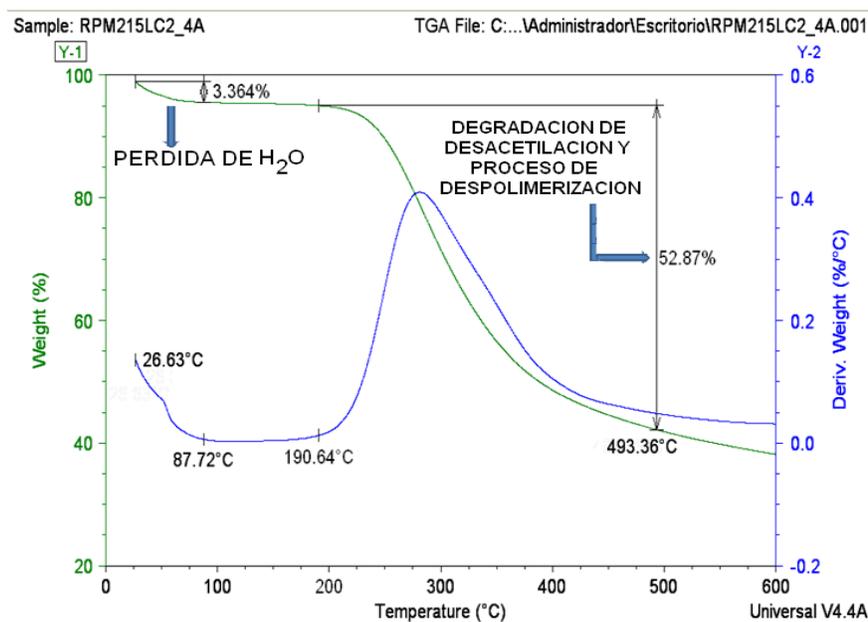


Figura 22. Curvas DTA/TGA del lactato de quitosano calentado a vacío a 200°C

Como se observa en la figura 22, la curva de TGA presenta una transición térmica en el rango de temperatura de 26.63°C – 87.72°C, con una pérdida del 3.36% en peso que se debe a la pérdida de agua de las moléculas del polímero[67]. Entre 190.64°C y 493.26°C se presenta la mayor pérdida de peso que es de 52.87%, la cual se atribuye a la etapa de degradación de desacetilación y al proceso de despolimerización[67].

Microanálisis del lactato de quitosano calentado a vacío a 200°C

Se hizo un análisis elemental para ver el contenido en % de carbono, hidrogeno y nitrógeno del lactato de quitosano, obteniéndose los siguientes resultados:

%C = 48.34

%H = 6.39

%N = 6.70

Estos resultados comparados con el análisis elemental del lactato de quitosano en el ChemDraw (ver figura 8), muestran que sigue habiendo agua en las moléculas del lactato de quitosano. Se observa el TGA y se ve la presencia de agua en la muestra entre 26°C y 88°C.

FE-SEM del lactato de quitosano calentado a vacío a 200°C

Se analizó la morfología de la superficie del lactato de quitosano calentado a 200°C y se midió el tamaño de los poros de la siguiente forma:

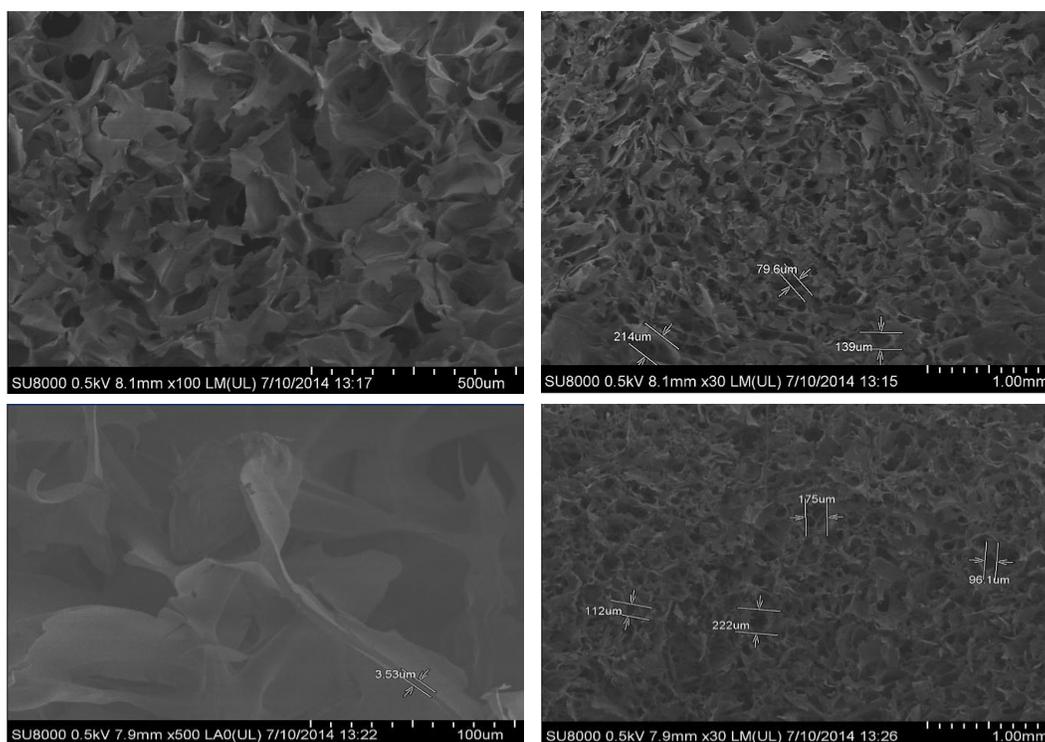


Figura 23. Imágenes de FE-SEM del lactato de quitosano calentado a vacío a 200°C a diferentes magnificaciones

Las imágenes de FE-SEM del lactato de quitosano calentado a vacío a 200°C que se observan en la figura 23, muestran estructuras interconectadas aplanadas formando agujeros de diferentes tamaños. Se pueden observar agujeros más pequeños dentro de algunos agujeros grandes (214,222 y 175 μm). Se pudo calcular el grosor de la estructura que es de 3.53 μm .

Análisis de solubilidad del lactato de quitosano calentado a vacío a 200°C

Para ver si el lactato de quitosano calentado a 200°C es hidrofílico y si aumenta o se queda estable su peso al paso del tiempo, se hizo un análisis de solubilidad a 4 trozos, obteniéndose los siguientes resultados:

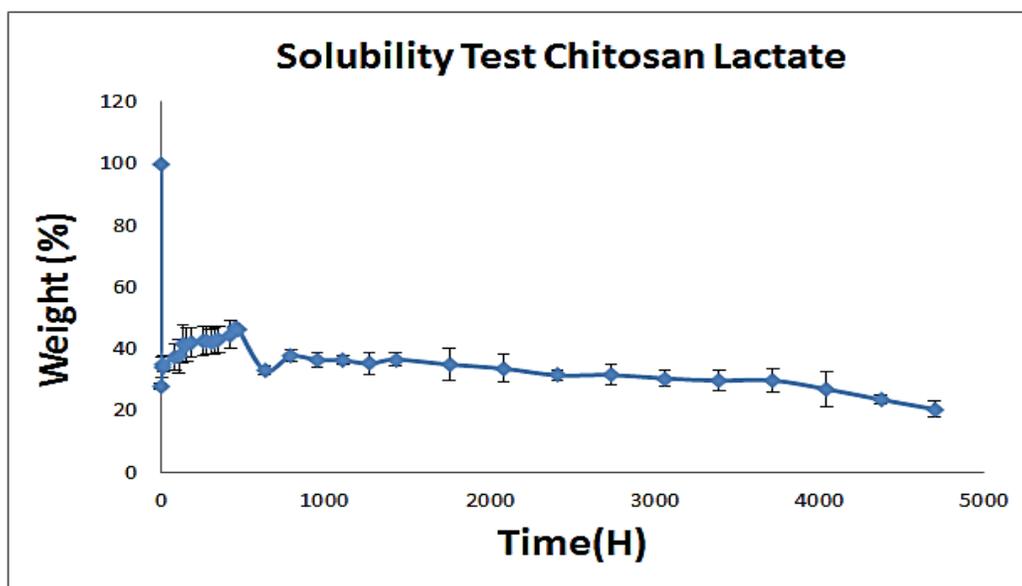


Figura 24. Análisis de solubilidad del lactato de quitosano calentado a vacío a 200°C

Como se puede observar en la figura 24, el lactato de quitosano calentado a 200°C no se degrada y se mantiene estable al paso del tiempo.

ATR del lactato de Quitosano calentado a 200°C después del análisis de solubilidad de 28 días

Después del análisis de solubilidad durante 28 días del lactato de quitosano calentado a 200°C, se hizo una ATR obteniéndose el siguiente espectro:

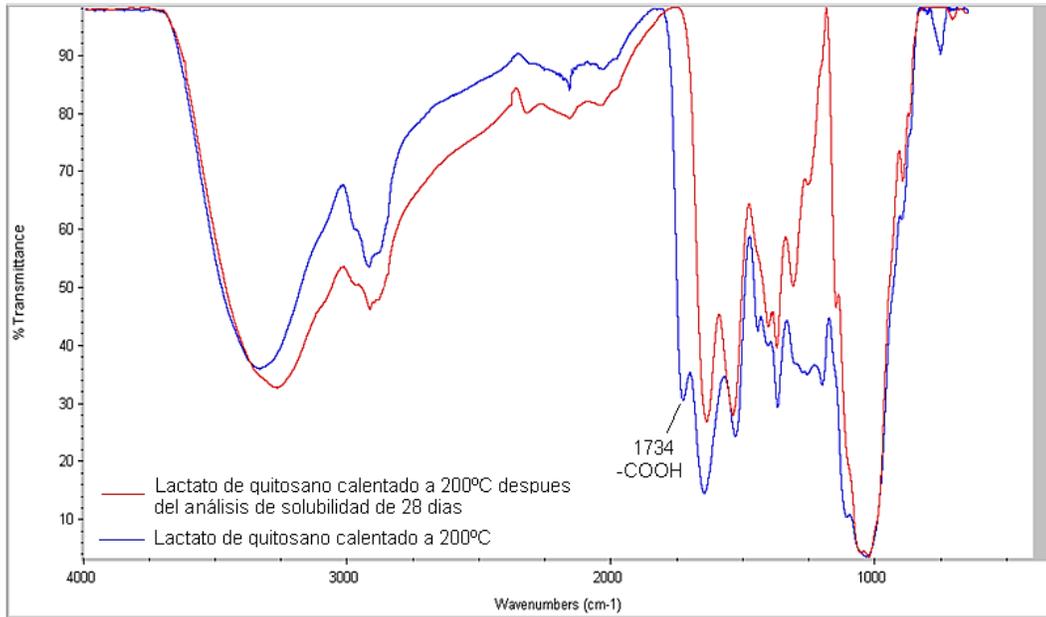


Figura 25. ATR del lactato de quitosano calentado a 200°C antes y después del análisis de solubilidad de 28 días

Como se observa en la figura 25, después del análisis de solubilidad del lactato de quitosano durante 28 días, se ven desplazamientos de los CH, CH₂ y CH₃ y de las amidas y desaparece la banca de 1734cm⁻¹ correspondiente a -COOH, lo que indica degradación de la muestra.

Imagen de un trozo de lactato de quitosano calentado a 200°C después del análisis de solubilidad de 28 días:



Figura 26. Lactato de quitosano calentado a 200°C después del análisis de solubilidad de 28 días

Como se observa en la figura 26, se ve que el lactato de quitosano calentado a 200°C no se degrada después de 28 días de estar sumergido en PBS y se pudo observar que retiene agua presentando un hinchamiento.

FE-SEM del lactato de quitosano calentado a 200°C después del análisis de solubilidad de 28 días

Se analizó la morfología de la superficie del lactato de quitosano calentado a 200°C después del análisis de solubilidad de 28 días y se midió el tamaño de los poros de la siguiente forma:

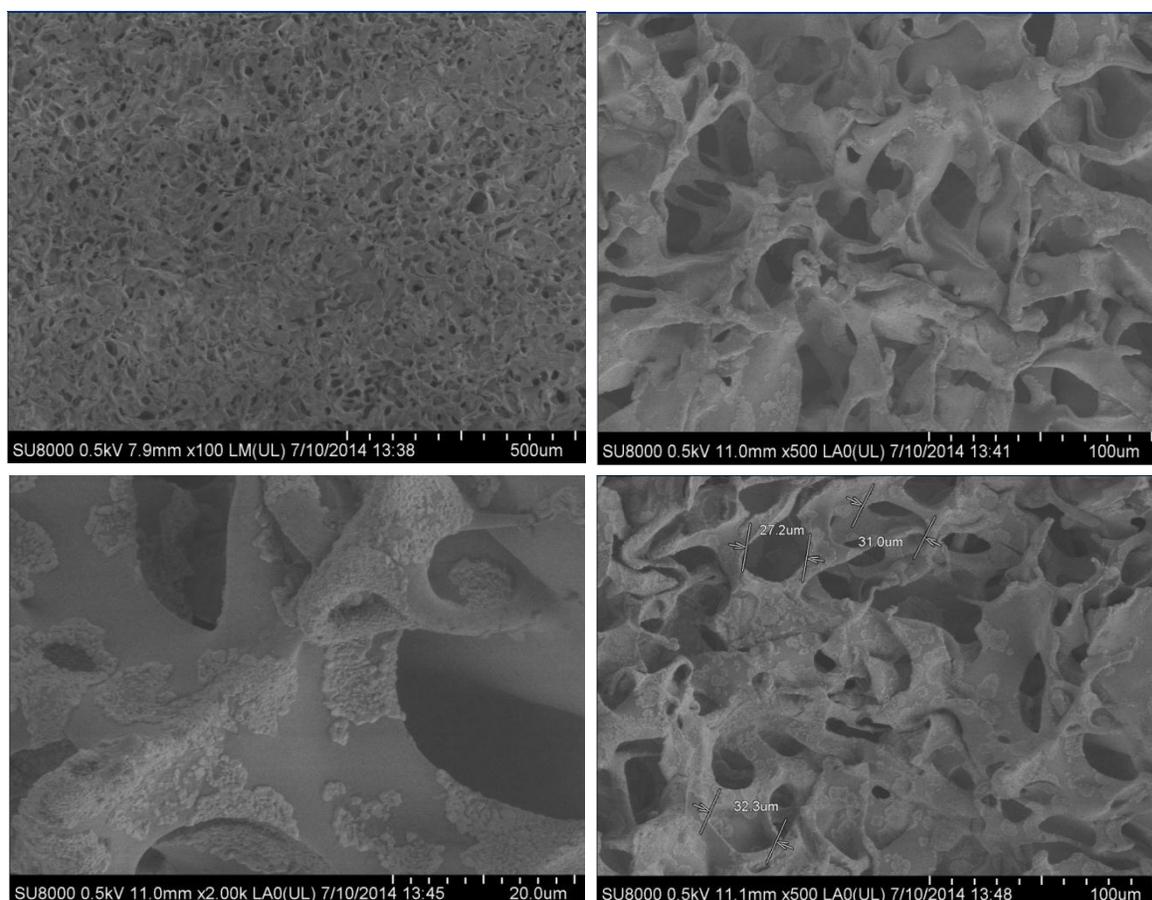


Figura 27. Imágenes de FE-SEM del lactato de quitosano calentado a vacío a 200°C a diferentes magnificaciones después del análisis de solubilidad de 28 días.

Las imágenes de FE-SEM del lactato de quitosano calentado a vacío a 200°C que se observan en la figura 27, muestran estructuras interconectadas formando

agujeros de diferentes tamaños. Se pueden observar agujeros más pequeños dentro de algunos agujeros grandes (27.2 y 31, um). Se pueden observar unas estructuras adheridas sobre otras.

Seguimiento en ATR de 3 trozos de Lactato de quitosano calentados a 200°C en PBS

Después de hacer el seguimiento por ATR de 3 trozos de lactato de quitosano calentados a 200°C en PBS, se obtuvieron los siguientes espectros:

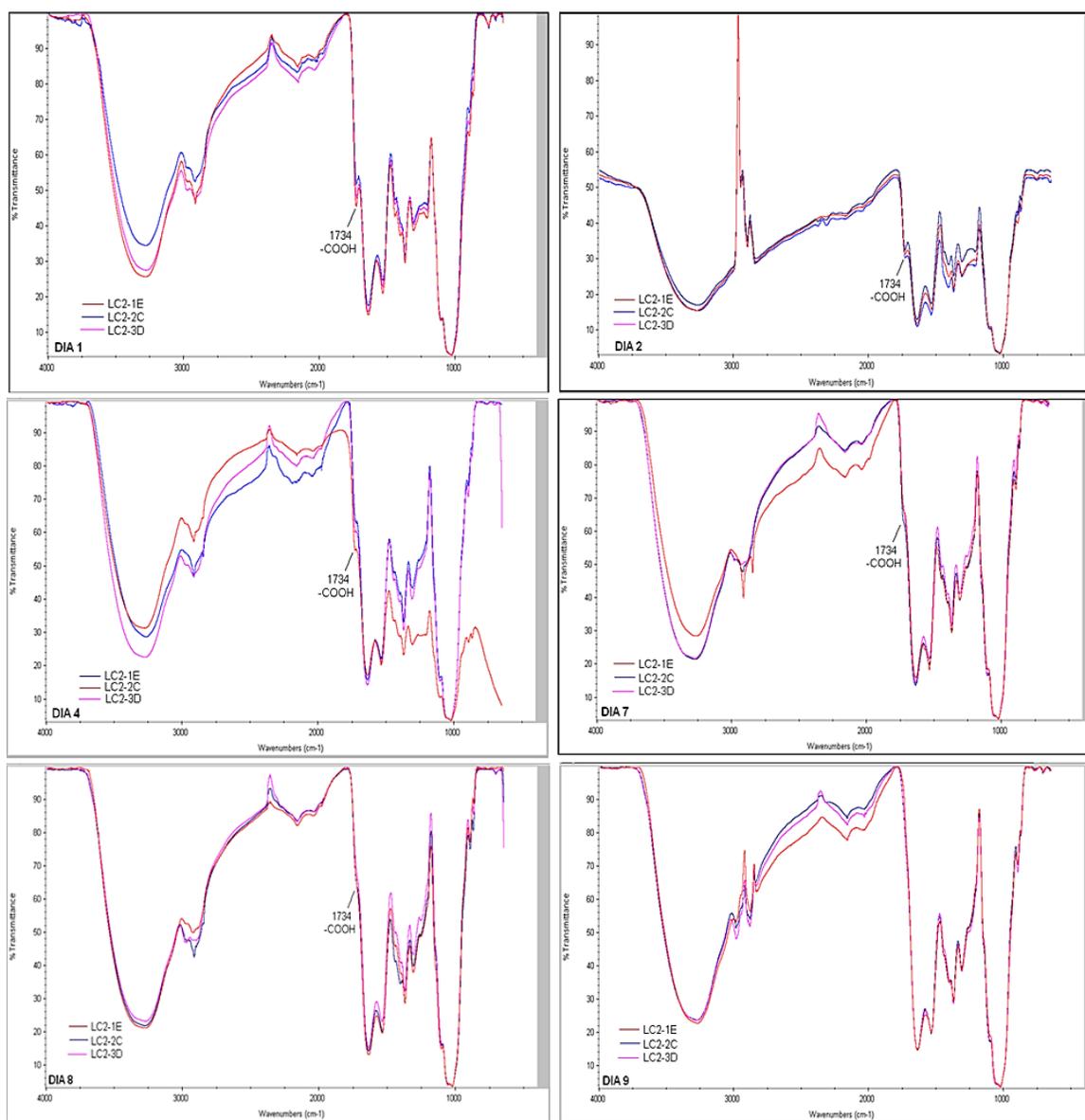


Figura 28. Seguimiento de la banda a 1734 cm⁻¹

Como se puede observar en la figura 28, la banda a 1734 cm^{-1} correspondiente a los grupos carboxílicos de las cadenas laterales del ácido láctico desaparece en el día 9, lo que indica que hubo una degradación en la muestra.

Picnómetro de Helio (Densidad Real) del lactato de quitosano calentado a vacío a 200°C

Se hicieron 10 mediciones de la densidad en el picnómetro de helio del lactato de quitosano con sus desviaciones y se promediaron obteniéndose los siguientes resultados mostrados en la tabla 6:

Densidad Real (g/cm³)	S (Desviación)
1.76	0.01

Tabla 6. Densidad real del lactato de quitosano calentado a vacío a 200°C

Método de Arquímedes (Densidad aparente) del lactato de quitosano calentado a vacío a 200°C

Se hicieron mediciones de la densidad a 3 trozos del lactato de quitosano y se promediaron y se calculó la desviación obteniéndose los siguientes resultados que se pueden observar en la tabla 7:

Densidad Aparente (g/cm³)	S (Desviación)
0.99	0.01

Tabla 7. Densidad aparente del lactato de quitosano calentado a vacío a 200°C

% Densidad del lactato de quitosano calentado a vacío a 200°C

La densidad en % se determinó de la siguiente manera:

$$\% \text{ Densidad} = \frac{\text{Densidad Aparente}}{\text{Densidad Real}} \times 100$$

$$\% \text{ Densidad} = \frac{0.99}{1.76} \times 100 = 56.04$$

Medición de la Porosidad del lactato de quitosano calentado a vacío a 200°C

La porosidad en % se determinó de la siguiente manera:

Porosidad = 100 - (% Densidad)

Porosidad = 100 - 56.04

Porosidad = 44%

5. ESTUDIOS CELULARES

Para ver si el lactato de quitosano es citotóxico se hicieron pruebas de citotoxicidad.

5.1. ENSAYO MTT CON OSTEOSARCOMAS:

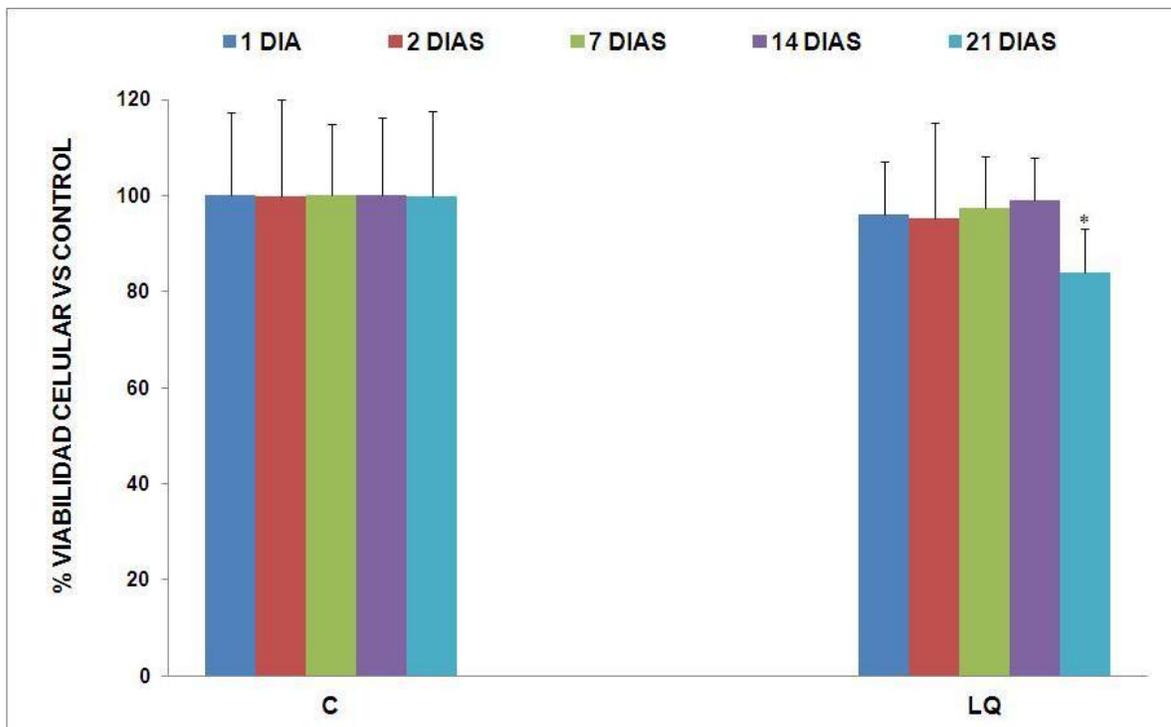


Figura 29. Resultados del ensayo MTT para el control (C) y el lactato de quitosano (LQ) calentado a 200°C.

Se representa la media \pm desviación estándar ($n = 8$) y el nivel de significación obtenido en los ANOVAs - Tukey frente al control donde *: $p < 0,05$

Este ensayo de MTT que se muestra en la figura 29, se realizó para ver si el lactato de quitosano calentado a 200°C , presenta citotoxicidad.

Como se puede observar en la figura 29, no se ha detectado niveles de citotoxicidad, alcanzando la viabilidad celular valores superiores al 84% con respecto al control a 1, 2, 7, 14 y 21 días de estudio. Esto indica que la muestra no es citotóxica.

La diferencia significativa que se ve a los 21 días con respecto al control, puede deberse al tiempo de cultivo, es decir a la prolongada permanencia de las células en el cultivo o al tipo de células con las que se hizo el análisis.

6. DISCUSIÓN

Al calcular el grado de desacetilación del quitosano, se ve un pico a 5.20 ppm, este tiene una área grande debido a que la desacetilación del quitosano es alta. Como hay unidades de la quitina y del quitosano no es un espectro puro.

La solubilidad y la viscosidad del quitosano dependen del grado de desacetilación[14, 68] y la degradación del polímero[53]. Aunque el quitosano no es soluble, se puede lograr su solubilidad disolviéndolo en una solución ácida a un pH por debajo de 6, formando sales solubles en agua como lo es el lactato de quitosano[69, 70]. Esto se da debido a que sus grupos amino ($-\text{NH}_2$) forman las sales de amonio correspondientes ($-\text{NH}_3^+$)[53]. La solubilidad del quitosano puede aumentar o disminuir el pH. Esto es porque a un pH bajo, los grupos amino del quitosano han sido protonados resultando en un polielectrolito catiónico soluble en agua[69-71]. Sin embargo si el pH es más alto de 6, los grupos aminos han sido desprotonados y pierden su carga, resultando en un polímero insoluble neutro. A un pH de 7.4 tiene baja solubilidad en solución acuosa[70]. Para resolver este problema, algunos quitosanos solubles derivados han sido desarrollados por la modificación de los grupos funcionales reactivos del quitosano o por la

despolimerización del quitosano[70, 72]. En el caso de este proyecto se utilizó un quitosano de bajo peso molecular y al disolverlo en una solución al 2% de ácido láctico a pH 6 se pudo observar que se disolvió bien.

Al hacerles los análisis de solubilidad a varios trozos de lactato de quitosano, estos presentaron hinchamiento, es decir, absorbieron agua al introducirlos en PBS. El calentamiento jugó un papel muy importante en este proyecto, tras los ensayos a 100°C, se pudo observar que los trozos de lactato de quitosano se degradaron rápido, mientras que los trozos calentados a 200°C presentaron un hinchamiento y se mantuvieron estables al paso del tiempo.

Sobre el lactato de quitosano no hay mucha información y los pocos artículos que hay de referencia, presentan errores en la RMN[1, 3], en uno de los artículos, dice que utilizaron cloroformo y metanol[1]. En este proyecto se hicieron disoluciones y no se logró disolver de ninguna manera ni con cloroformo, ni con metanol, se logró disolver únicamente con agua deuterada el lactato de quitosano y el lactato de quitosano calentado a 100°C. El lactato de quitosano calentado a 200°C no se logró disolver con ningún disolvente deuterado y no se pudo hacer la RMN. En la RMN, estos investigadores no desplazan la señal del disolvente [1, 3] y en uno de los artículos, integran las señales sin desplazarlo [3], al integrar tienen en cuenta este valor para hacer los cálculos de sustitución de ácido láctico en el quitosano[1]. En cuanto a el calentamiento a 100°C dicen que se logra eliminar en ATR la banda correspondiente a los grupos carboxílicos del ácido láctico residual y dicen que así se demuestra que se ha removido el ácido láctico residual y que se ha producido la conversión del enlace iónico en un enlace amida, lo que indica que la muestra entrecruza[1]. En este proyecto a cada trozo calentado a 100°C al hacerle el ATR, se observa que la banda correspondiente a los grupos carboxílicos del ácido láctico residual continua apareciendo. Al hacerle un seguimiento a los trozos calentados a 100°C en PBS, se pudo observar cada día en el ATR, que esta banda desaparece el día 5 y en los calentados a 200°C desaparece el día 9, lo que indica una degradación en la muestra.

El análisis elemental fue muy importante para demostrar la posible presencia de agua en las moléculas del polímero, gracias a programas como el ChemDraw se

pudo dibujar la molécula y ver su análisis elemental y se pudieron comparar los resultados con los de ATG.

El quitosano es biocompatible, pero investigaciones en perros mostraron que dosis altas de 200mg/Kg produce neumonía hemorrágica [70, 73].

Algunos investigadores dicen que el quitosano después de ser implantado al paso del tiempo produce inflamación, pero estudios donde se han realizado ensayos in vitro han demostrado una buena histocompatibilidad de este material, ya que el quitosano permitió el crecimiento y proliferación de células vasculares, neuronales, epiteliales, fibroblastos, osteoblastos y condrocitos[51]. Es por esta razón, que se ha considerado un biomaterial muy importante en ingeniería de tejidos [21, 22, 30]. Según los resultados, los materiales derivados de quitosano provocan una reacción de cuerpo extraño mínima y tiene como respuesta la formación de tejido granular con una angiogénesis acelerada[51]. En otros experimentos in vivo realizados, los implantes de quitosano se integran en el tejido receptor y los resultados obtenidos indican un alto grado de biocompatibilidad y aceptación tisular para los diferentes modelos de aplicación[51].

En unos estudios donde utilizaron quitosano con fosfatos de calcio, tuvieron muy buenos resultados comparados con otras investigaciones, en el cual se logró una mejor integración del implante con el uso de fosfatos de calcio en el quitosano y se logró evitar el rechazo por la generación de productos citotóxicos, generándose de esta manera una mejor regeneración ósea [74, 75].

7. REFERENCIAS

[1] Cooper A, Bhattarai N, Kievit FM, Rossol M, Zhang M. Electrospinning of chitosan derivative nanofibers with structural stability in an aqueous environment. *Physical Chemistry Chemical Physics*. 2011;13:9969-72.

[2] Cervera MF, Heinämäki J, de la Paz N, López O, Maunu SL, Virtanen T, et al. Effects of spray drying on physicochemical properties of chitosan acid salts. *AAPS PharmSciTech*. 2011;12:637-49.

- [3] Bhattarai N, Ramay HR, Chou SH, Zhang M. Chitosan and lactic acid-grafted chitosan nanoparticles as carriers for prolonged drug delivery. *International Journal of Nanomedicine*. 2006;1:181-7.
- [4] Yu F, Xi TF, Zhang SJ, Zhang ZX, Lai C. Preparation of chitosan lactate sponges with uniform vertical pores and fitted analysis of release medicine model in vitro. *Gaodeng Xuexiao Huaxue Xuebao/Chemical Journal of Chinese Universities*. 2012;33:843-9.
- [5] Kukolikova L, Bakos D, Alexy P, Hanzelova S, Zhong W. Optimization of the properties of chitosan lactate/hyaluronan film. *Journal of Applied Polymer Science*. 2006;100:1413-9.
- [6] Shukla SK, Mishra AK, Arotiba OA, Mamba BB. Chitosan-based nanomaterials: A state-of-the-art review. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2013;59:46-58.
- [7] Qu X, Wirsen A, Albertsson AC. Novel pH-sensitive chitosan hydrogels: Swelling behavior and states of water. *Polymer*. 2000;41:4589-98.
- [8] Hsieh SC, Tang CM, Huang WT, Hsieh LL, Lu CM, Chang CJ, et al. Comparison between two different methods of immobilizing NGF in poly(DL -lactic acid-co-glycolic acid) conduit for peripheral nerve regeneration by EDC/NHS/MES and genipin. *Journal of Biomedical Materials Research - Part A*. 2011;99 A:576-85.
- [9] Reverchon E, Adami R. Supercritical assisted atomization to produce nanostructured chitosan-hydroxyapatite microparticles for biomedical application. *Powder Technology*. 2013;246:441-7.
- [10] Baran T, Menteş A, Arslan H. Synthesis and characterization of water soluble O-carboxymethyl chitosan Schiff bases and Cu(II) complexes. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2015;72:94-103.
- [11] Kandile NG, Mohamed HM, Mohamed MI. New heterocycle modified chitosan adsorbent for metal ions (II) removal from aqueous systems. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2015;72:110-6.
- [12] Padilla-Rodríguez A, Hernández-Viezcás JA, Peralta-Videa JR, Gardea-Torresdey JL, Perales-Pérez O, Román-Velázquez FR. Synthesis of protonated

chitosan flakes for the removal of vanadium(III, IV and V) oxyanions from aqueous solutions. *Microchemical Journal*. 2015;118:1-11.

[13] Kim SE, Park JH, Cho YW, Chung H, Jeong SY, Lee EB, et al. Porous chitosan scaffold containing microspheres loaded with transforming growth factor- β 1: Implications for cartilage tissue engineering. *Journal of Controlled Release*. 2003;91:365-74.

[14] Zajęc A, Hanuza J, Wandas M, Dymińska L. Determination of N-acetylation degree in chitosan using Raman spectroscopy. *Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. 2015;134:114-20.

[15] El-Mahrouk GM, El-Gazayerly ON, Aboelwafa AA, Taha MS. Chitosan lactate wafer as a platform for the buccal delivery of tizanidine HCl: In vitro and in vivo performance. *International Journal of Pharmaceutics*. 2014;467:100-12.

[16] Fang J, Zhang Y, Yan S, Liu Z, He S, Cui L, et al. Poly(L-glutamic acid)/chitosan polyelectrolyte complex porous microspheres as cell microcarriers for cartilage regeneration. *Acta Biomaterialia*. 2014;10:276-88.

[17] Stănescu VN, Olteanu M, Florea-Spiroiu M, Pincu E, Meltzer V. Starch/chitosan film forming hydrogel. *Revue Roumaine de Chimie*. 2011;56:827-32.

[18] Abram AH, I. . Quitina y Quitosano: obtención, caracterización y aplicaciones. . Pontificia Universidad Católica del Perú, Fondo Editorial 2004.

[19] Ghanem AK, M. . Characterization of chitosan films for tissue engineering applications. *Applied Bionics and Biomechanics*. 2005;2.

[20] Safari J, Javadian L. Ultrasound assisted the green synthesis of 2-amino-4H-chromene derivatives catalyzed by Fe₃O₄-functionalized nanoparticles with chitosan as a novel and reusable magnetic catalyst. *Ultrasonics Sonochemistry*. 2015;22:341-8.

[21] Khor E, Lim LY. Implantable applications of chitin and chitosan. *Biomaterials*. 2003;24:2339-49.

[22] Chung TW, Lu YF, Wang SS, Lin YS, Chu SH. Growth of human endothelial cells on photochemically grafted Gly-Arg-Gly-Asp (GRGD) chitosans. *Biomaterials*. 2002;23:4803-9.

- [23] Fakhry A, Schneider GB, Zaharias R, Şenel S. Chitosan supports the initial attachment and spreading of osteoblasts preferentially over fibroblasts. *Biomaterials*. 2004;25:2075-9.
- [24] Lee JE, Kim KE, Kwon IC, Ahn HJ, Lee SH, Cho H, et al. Effects of the controlled-released TGF- β 1 from chitosan microspheres on chondrocytes cultured in a collagen/chitosan/glycosaminoglycan scaffold. *Biomaterials*. 2004;25:4163-73.
- [25] Wang YC, Lin MC, Wang DM, Hsieh HJ. Fabrication of a novel porous PGA-chitosan hybrid matrix for tissue engineering. *Biomaterials*. 2003;24:1047-57.
- [26] Hamilton V, Yuan Y, Rigney DA, Puckett AD, Ong JL, Yang Y, et al. Characterization of chitosan films and effects on fibroblast cell attachment and proliferation. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*. 2006;17:1373-81.
- [27] Huang Y, Onyeri S, Siewe M, Moshfeghian A, Madihally SV. In vitro characterization of chitosan-gelatin scaffolds for tissue engineering. *Biomaterials*. 2005;26:7616-27.
- [28] Dhiman HK, Ray AR, Panda AK. Characterization and evaluation of chitosan matrix for in vitro growth of MCF-7 breast cancer cell lines. *Biomaterials*. 2004;25:5147-54.
- [29] Freier T, Koh HS, Kazazian K, Shoichet MS. Controlling cell adhesion and degradation of chitosan films by N-acetylation. *Biomaterials*. 2005;26:5872-8.
- [30] Prasitsilp M, Jenwithisuk R, Kongsuwan K, Damrongchai N, Watts P. Cellular responses to chitosan in vitro: The importance of deacetylation. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*. 2000;11:773-8.
- [31] Tavakol S, Nikpour MR, Hoveizi E, Tavakol B, Rezayat SM, Adabi M, et al. Investigating the effects of particle size and chemical structure on cytotoxicity and bacteriostatic potential of nano hydroxyapatite/chitosan/silica and nano hydroxyapatite/chitosan/silver; as antibacterial bone substitutes. *Journal of Nanoparticle Research*. 2014;16.
- [32] Ezoddini-Ardakani FN, A. Histologic evaluation of chitosan as an accelerator of bone regeneration in microdrilled rat tibias. *Dent Res J (Isfahan)*. 2012;9:694–9.

- [33] Shao X, Cao B, Xu F, Xie S, Yu D, Wang H. Effect of postharvest application of chitosan combined with clove oil against citrus green mold. *Postharvest Biology and Technology*. 2015;99:37-43.
- [34] Dias MV, Machado Azevedo V, Borges SV, Soares NDFF, De Barros Fernandes RV, Marques JJ, et al. Development of chitosan/montmorillonite nanocomposites with encapsulated α -tocopherol. *Food Chemistry*. 2014;165:323-9.
- [35] Shibano M, Nishida S, Saito Y, Kamitakahara H, Takano T. Facile synthesis of acyl chitosan isothiocyanates and their application to porphyrin-appended chitosan derivative. *Carbohydrate Polymers*. 2014;113:279-85.
- [36] Ge H, Wang S. Thermal preparation of chitosan-acrylic acid superabsorbent: Optimization, characteristic and water absorbency. *Carbohydrate Polymers*. 2014;113:296-303.
- [37] Subramanian SB, Francis AP, Devasena T. Chitosan-starch nanocomposite particles as a drug carrier for the delivery of bis-desmethoxy curcumin analog. *Carbohydrate Polymers*. 2014;114:170-8.
- [38] Hadipour-Goudarzi E, Montazer M, Latifi M, Aghaji AAG. Electrospinning of chitosan/sericin/PVA nanofibers incorporated with in situ synthesis of nano silver. *Carbohydrate Polymers*. 2014;113:231-9.
- [39] Belcak-Cvitanovic A, Komes D, Karlović S, Djaković S, Špoljarić I, Mršić G, et al. Improving the controlled delivery formulations of caffeine in alginate hydrogel beads combined with pectin, carrageenan, chitosan and psyllium. *Food Chemistry*. 2015;167:378-86.
- [40] Liu Y, Wang J, Zhang H, Ma C, Liu J, Cao S, et al. Enhancement of proton conductivity of chitosan membrane enabled by sulfonated graphene oxide under both hydrated and anhydrous conditions. *Journal of Power Sources*. 2014;269:898-911.
- [41] Chen L. Preparation Chitosan Lactate-Hyaluronate Sponges with Unidirectional Porous Structure and Their Potential Uses Wound Dressings. *International Journal of Bioscience, Biochemistry and Bioinformatics*. 2014;4.

- [42] Peña D. Chitosan/calcium phosphate coating obtained by electrodeposition on titanium alloy. *Rev Fac Ing Univ Antioquia* 2010;54:15-23.
- [43] Zhou X, Kong M, Cheng XJ, Feng C, Li J, Li JJ, et al. In vitro and in vivo evaluation of chitosan microspheres with different deacetylation degree as potential embolic agent. *Carbohydrate Polymers*. 2014;113:304-13.
- [44] Benavides M. Quitina-Quitosana: Los Polimeros del Futuro. Servicio Nacional de Aprendizaje SENA Regional Valle - CDT ASTIN. 2002.
- [45] Wen Y, Ma J, Chen J, Shen C, Li H, Liu W. Carbonaceous sulfur-containing chitosan-Fe(III): A novel adsorbent for efficient removal of copper (II) from water. *Chemical Engineering Journal*. 2015;259:372-80.
- [46] Mi FL, Wu SJ, Lin FM. Adsorption of copper(II) ions by a chitosan-oxalate complex biosorbent. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2015;72:136-44.
- [47] Vakili M, Rafatullah M, Salamatinia B, Abdullah AZ, Ibrahim MH, Tan KB, et al. Application of chitosan and its derivatives as adsorbents for dye removal from water and wastewater: A review. *Carbohydrate Polymers*. 2014;113:115-30.
- [48] Kyzas GZ, Siafaka PI, Pavlidou EG, Chrissafis KJ, Bikiaris DN. Synthesis and adsorption application of succinyl-grafted chitosan for the simultaneous removal of zinc and cationic dye from binary hazardous mixtures. *Chemical Engineering Journal*. 2015;259:438-48.
- [49] Verma R, Gupta BD. Detection of heavy metal ions in contaminated water by surface plasmon resonance based optical fibre sensor using conducting polymer and chitosan. *Food Chemistry*. 2015;166:568-75.
- [50] Zang S, Dong G, Peng B, Xu J, Ma Z, Wang X, et al. A comparison of physicochemical properties of sterilized chitosan hydrogel and its applicability in a canine model of periodontal regeneration. *Carbohydrate Polymers*. 2014;113:240-8.
- [51] Abarrategui A. Estudio del Quitosano como Biomaterial Portador de rhbmp-2: desarrollo, caracterización y aplicabilidad en regeneración de tejido óseo. Tesis Doctoral - Universidad Complutense de Madrid. 2008.

- [52] Zhou Y, Fan M, Luo X, Huang L, Chen L. Acidic ionic liquid catalyzed crosslinking of oxycellulose with chitosan for advanced biocomposites. *Carbohydrate Polymers*. 2014;113:108-14.
- [53] Abadia J. Preparación y Caracterización Mecánica de Hidrogeles de Quitosano para Soporte de Células de Cartílago. Proyecto de Fin de carrera Especialidad: Química Industrial. 2010.
- [54] In KS, Sang YL, Yoon JP, Myung CL, Sang HL, Jue YL, et al. Homogeneous chitosan-PLGA composite fibrous scaffolds for tissue regeneration. *Journal of Biomedical Materials Research - Part A*. 2008;84:247-55.
- [55] Sastre R, de Aza, S. & San Román, J. Biomateriales para la salud. Faenza Editrice Ibérica- España- Portugal-Chile. 2004.
- [56] Södergård A, Stolt M. Properties of lactic acid based polymers and their correlation with composition. *Progress in Polymer Science (Oxford)*. 2002;27:1123-63.
- [57] Weir MD, Xu HHK. Osteoblastic induction on calcium phosphate cement-chitosan constructs for bone tissue engineering. *Journal of Biomedical Materials Research - Part A*. 2010;94:223-33.
- [58] Madhally SVM, H. W. . Porous chitosan scaffolds for tissue engineering. *Biomaterials* 1999;20:1133-42
- [59] Nettles DL, Elder SH, Gilbert JA. Potential use of chitosan as a cell scaffold material for cartilage tissue engineering. *Tissue Engineering*. 2002;8:1009-16.
- [60] Di Martino A, Sittinger M, Risbud MV. Chitosan: A versatile biopolymer for orthopaedic tissue-engineering. *Biomaterials*. 2005;26:5983-90.
- [61] Wang X, Ma J, Wang Y, He B. Bone repair in radii and tibias of rabbits with phosphorylated chitosan reinforced calcium phosphate cements. *Biomaterials*. 2002;23:4167-76.
- [62] Zhang Y, Ni M, Zhang M, Ratner B. Calcium phosphate-chitosan composite scaffolds for bone tissue engineering. *Tissue Engineering*. 2003;9:337-45.
- [63] Li Z, Yubao L, Aiping Y, Xuelin P, Xuejiang W, Xiang Z. Preparation and in vitro investigation of chitosan/nano-hydroxyapatite composite used as bone

substitute materials. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*. 2005;16:213-9.

[64] Hu Q, Li B, Wang M, Shen J. Preparation and characterization of biodegradable chitosan/hydroxyapatite nanocomposite rods via in situ hybridization: A potential material as internal fixation of bone fracture. *Biomaterials*. 2004;25:779-85.

[65] Lee YM, Park YJ, Lee SJ, Ku Y, Han SB, Choi SM, et al. Tissue Engineered Bone Formation Using Chitosan/Tricalcium Phosphate Sponges. *Journal of Periodontology*. 2000;71:410-7.

[66] Pastor de Abram A. Quitina y quitosano: Obtención, caracterización y aplicaciones. Pontificia Universidad Católica de Perú, Fondo Editorial. 2004.

[67] Yodkhum K, Phaechamud T. Thermal analysis of chitosan-lactate and chitosan-aluminum monostearate composite system. 2012. p. 278-81.

[68] Chatelet C, Damour O, Domard A. Influence of the degree of acetylation on some biological properties of chitosan films. *Biomaterials*. 2001;22:261-8.

[69] C. K. S. Pillai WP, C. P. Sharma. *Progress in Polymer Science*. 2009;34.

[70] Cardoso H. Effect of Chitosan Lactate on the formation of chitosan-DNA particles. Tesis Doctoral - Universidad de Coimbra. 2011.

[71] Kumar. MNVR. *Reactive and Functional Polymers*. Elsevier 2000;46.

[72] G. E. W. G. L. Bowlin MD. Ed (New York 2004).

[73] D. Alain DM. *Polymeric Biomaterials. Revised and Expanded* (CRC Press, 2001).

[74] Lee EJ, Shin DS, Kim HE, Kim HW, Koh YH, Jang JH. Membrane of hybrid chitosan-silica xerogel for guided bone regeneration. *Biomaterials*. 2009;30:743-50.

[75] R. Sastre SdA, J. San Román. . *Biomateriales*. CYTED Faenza Editrice Ibérica S L San Román 2003 2003:109-28.

CAPÍTULO 5. CONCLUSIONES

Los resultados de los trabajos experimentales recogidos en este proyecto han dado lugar a las siguientes conclusiones, que se presentan divididas en función de los capítulos.

1. CONCLUSIONES DE LA PREPARACIÓN DE APATITA ENRIQUECIDA CON ESTRONCIO

- Se ha logrado la obtención de la apatita en una sola fase a 600°C.
- En el calentamiento a 600°C se logra obtener las muestras libres de impurezas.
- Se ha funcionalizado la hidroxiapatita con iones Sr. Es posible la preparación de sistemas monofásicos con un contenido en estroncio de hasta el 20%.
- Hubo un aumento en los parámetros de celda, lo que confirma que el Sr se ha introducido en la estructura de la hidroxiapatita en todos los casos.
- El Sr aumenta el tamaño del cristal de la apatita en dosis del 5% de Sr a 971Å y del 10% de Sr a 1045Å.
- Hay un aumento del diámetro de partícula en dosis del 5, 10 y 15% de Sr.
- La sustitución de Sr en la apatita no aumento su dureza.
- No se observaron niveles de citotoxicidad en el MTT de osteoblastos en ninguna de las formulaciones estudiadas, alcanzando la viabilidad celular valores superiores al 82 % con respecto al control a 1, 2, 7, 14 y 21 días de estudio según cada caso. Comparando los resultados del MTT de osteoblastos, con los resultados obtenidos con osteosarcomas, se puede ver que hay un aumento en la viabilidad celular, lo que puede llevar a pensar que el Sr en la apatita logra que se obtenga una mejor viabilidad en el caso de los osteoblastos.

- En el ensayo con rojo de alizarina se detectaron fenómenos de mineralización en la totalidad de las muestras de cultivos de osteoblastos y en la totalidad de las muestras de MSC mantenidas con medio de cultivo osteoinductor. En el caso de las muestras con células MSC en medio no osteoinductor, se han detectado también fenómenos de mineralización en todos los cultivos sembrados sobre los sistemas experimentales, pero no en los sembrados sobre el control negativo, por lo que puede asociarse este fenómeno a las características de dichos sistemas. Los fenómenos de mineralización se presentan independientemente de la cantidad de estroncio, si bien en la formulación del 20% de Sr son menos intensos.
- En el ensayo con OXTERIX se detectaron fenómenos de diferenciación en la totalidad de las muestras de cultivos de HOb y en la totalidad de las muestras de MSC mantenidas con medio de cultivo osteoinductor. En el caso de las muestras con células MSC en medio no osteoinductor, se han detectado también fenómenos de mineralización en todos los cultivos sembrados sobre los sistemas experimentales, pero no en los sembrados sobre el control negativo, por lo que puede asociarse este fenómeno a las características de dichos sistemas. Los fenómenos de mineralización se presentan independientemente de la cantidad de estroncio, si bien en las formulaciones del 5 y 10% de Sr se presenta una mayor intensidad.
- En el ensayo con RUNX2 se detectaron fenómenos de diferenciación en la totalidad de las muestras de cultivos de HOb y en la totalidad de las muestras de MSC mantenidas con medio de cultivo osteoinductor. En el caso de las muestras con células MSC en medio no osteoinductor, se han detectado también fenómenos de mineralización en todos los cultivos sembrados sobre los sistemas experimentales, pero no en los sembrados sobre el control negativo, por lo que puede asociarse este fenómeno a las características de dichos sistemas. Los fenómenos de mineralización se presentan independientemente de la cantidad de estroncio, si bien en las formulaciones del 5, 10 y 15% de Sr se presenta una mayor intensidad.

2. CONCLUSIONES DE LA PREPARACIÓN DE LACTATO DE QUITOSANO

- Con la RMN se pudo calcular la sustitución de ácido láctico en el quitosano, con la cual se obtuvo una sustitución más alta del 70% para la muestra calentada a vacío a 100°C con respecto al lactato de quitosano que esta sin calentar.
- Se observa en el análisis de solubilidad que el lactato de quitosano es hidrofílico e higroscópico ya que inicialmente aumenta su peso a medida que pasa el tiempo y que el lactato de quitosano calentado a vacío a 100°C está entrecruzando, ya que hubo un aumento en la menor pérdida de peso con respecto al lactato de quitosano que esta sin calentar.
- En el análisis de solubilidad del lactato de quitosano calentado a vacío a 200°C se observa que la muestra se mantiene en estado sólido más de 21 días, donde se ha mantenido su peso ya que no baja del peso inicial.
- En el MTT que se hizo con osteosarcomas, hay una viabilidad celular superior al 84% con respecto al control a 1, 2, 7, 14 y 21 días, lo que indica que el lactato de quitosano calentado a 200°C no es citotóxico.

3. CONCLUSIÓN FINAL

Las apatitas sustituidas con el 0, 5, 10, 15 y 20% de Sr por Ca, han sido obtenidas sin la presencia de fases secundarias. Una sustitución del 5% de Sr por Ca, es la composición más eficaz para fines de mineralización. Según las propiedades que presenta el lactato de quitosano calentado a 200°C, se puede decir que puede cumplir con las funciones de matriz extracelular donde las células pueden crecer y proliferar.

APENDICE. TÉCNICAS Y MÉTODOS

TECNICAS Y MÉTODOS UTILIZADOS EN LA SINTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE LAS APATITAS DE CALCIO/ESTRONCIO

Para la síntesis de apatitas de Calcio/Estroncio se utilizaron los reactivos mostrados en la tabla 1.

Nombre	Formula	Proveedor	Pureza (%)
Acetato de Calcio hidratado	$C_4H_6CaO_4 \cdot xH_2O$	Aldrich	99
Fosfato de Amonio Dibásico	$H_9N_2O_4P$	Fluka	99
Acetato de Estroncio	$C_4H_6O_4Sr$	Aldrich	99.995

Tabla 1. Reactivos utilizados en la síntesis de apatitas de Calcio y estroncio

Para la síntesis de las apatitas, primero se hizo una solución de acetato de calcio hidratado y/o de acetato de estroncio. Luego se hizo una solución de fosfato de amonio dibásico y cuando se disolvió se agregó gota a gota a la solución de acetato de calcio y/o la de acetato de estroncio.

Después que se agregó la solución de fosfato de amonio dibásico a la solución de acetato de calcio hidratado y/o de acetato de estroncio se dejó agitando a una velocidad de agitación de 600 RPM a una temperatura de 25°C durante 7 horas, luego se aumentó la temperatura a 40°C a una velocidad de 680RPM durante 17 horas. Después se hizo otro incremento de temperatura a 75°C a una velocidad de 780 RPM durante 7 horas, luego se filtró, se lavó con agua desionizada, se volvió a filtrar y se dejó en un horno a 60°C durante 16 horas, luego se aumentó la temperatura a 100°C durante 17 horas y finalmente se hizo la caracterización de las apatitas (ver figura 1)

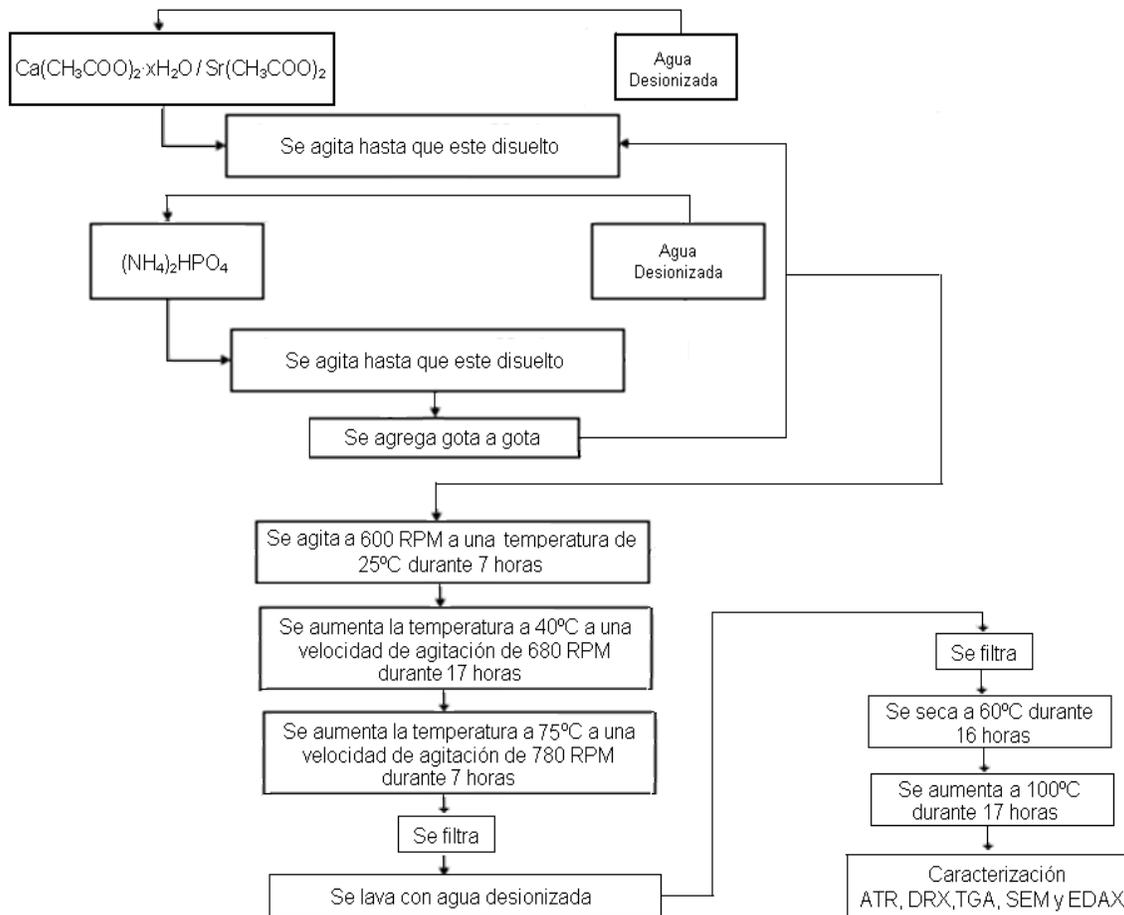


Figura1. Síntesis de apatitas de calcio/Estroncio

Para ver qué resultados se obtenían al sintetizar apatitas con proporciones altas de Acetato de Ca y de Acetato de Sr, se hizo la siguiente elección inicial:

Proporciones Acetato de Ca (%)	Proporciones Acetato de Sr (%)
100	0
80	20
50	50
20	80
0	100

Tabla 2. Proporciones de Acetato de Ca y de Acetato de Sr

Molino Rotatorio:

Después de que se sintetizó la hidroxiapatita y la apatita enriquecida en Sr, se introdujo cada material en un molino rotatorio durante 5 horas a una velocidad de 290 RPM. Después se colocó a secar cada muestra en un horno a 60°C durante la noche.

Reflexión total atenuada (ATR):

El ATR es una técnica de muestreo utilizada en el IR, la cual se produce cuando una radiación infrarroja entra en un cristal de diamante ATR transmisor y de alto índice de refracción[1]. El cristal está diseñado para permitir una reflexión interna total que crea una onda evanescente sobre la superficie del cristal. Esta onda se extiende a la muestra que se mantiene en contacto íntimo con el cristal, registrándose el espectro de infrarrojo de la muestra.

Las muestras Sr apatita se colocan en la parte superior del cristal y se presionan hacia abajo para tener un buen contacto ya que el haz de IR recoge una señal que pasa unas pocas micras en la muestra antes de que se refleje.

Los espectros de infrarrojo por Transformada de Fourier han sido registrados en un espectrómetro Perkin Elmer Spectrum One, con una resolución de 4 cm⁻¹.

Parámetros utilizados:

Rango de Inicio: 4000 cm⁻¹

Rango final: 650cm⁻¹

Tipo de escaneado: Background

Número de escáneres: 16

Resolución: 2

Microanálisis

El microanálisis es una técnica para análisis elemental, que realiza desde un análisis cualitativo, comprobando la existencia de un solo elemento, hasta un análisis cuantitativo de carbono, hidrógeno, nitrógeno y azufre permitiendo determinar homogeneidad y pureza para la identificación de la propia muestra[2].

Se utiliza para las mediciones:

- Un analizador leco-932
- Una balanza mettler toledo ultra micro umx2

Condiciones de las muestras:

- Estado físico: Se analizaron muestras sólidas.
- Cantidad de muestra: Entre 10 y 20 mg.
- Homogeneidad: Debido a que la cantidad de muestra empleada en los análisis fue muy pequeña, ésta fue representativa de la sustancia a analizar, para garantizar la homogeneidad y estabilidad de la muestra.
- Manipulación de la muestra: Para garantizar la calidad de la pesada; las muestras sólidas se pulverizaron bien hasta que quedo un polvo fino.

Para este proyecto se utilizó el microanálisis en % para confirmar la presencia de carbono, hidrogeno y nitrógeno en las muestras.

Difracción de Rayos x (DRX):

La difracción de Rayos X es una técnica no destructiva muy útil para la caracterización estructural de los materiales. En ella un haz de rayos X monocromático incidente se desvía de su dirección original por interacción con el material irradiado[3].

Esta técnica se basa en la relación establecida por Bragg entre el ángulo de incidencia de la radiación (θ), su longitud de onda (λ) y la distancia entre planos cristalinos del material[3].

$$n\lambda = 2d\sin \theta$$

Las mediciones se hicieron en un equipo Bruker D8 Advance dotado de una fuente de rayos X con blanco de cobre, con espejo de Göbel (haz paralelo), pudiendo trabajar con un detector de centelleo o Vantec.

El tipo Vantec es un detector de posición que ofrece una alta sensibilidad para un tiempo de medida muy corto permitiendo el análisis in situ de reacciones o transiciones de fases cristalinas[3].

El método utilizado es el de polvo policristalino. Los ensayos pueden realizarse en el intervalo de ángulos de $2\theta \geq 1$ (WAXS).

El equipo dispone de una cámara de temperatura que permite estudiar los cambios en la estructura cristalina de un material tanto en condiciones isotérmicas como en condiciones dinámicas en un intervalo de temperatura que va desde -80°C hasta 250°C.

Con este dispositivo el intervalo de ángulos en los se puede realizar los ensayos es de $2\theta \geq 3^\circ$.

Parámetros utilizados:

Rango de ángulos (2θ) = 5 – 60

Velocidad: 0.2 – 0.5 seg

Incremento: $0.024^\circ = 40$ puntos

Parámetros de celda

El parámetro de red hace referencia a la distancia constante entre las celdas unitarias en una estructura cristalina. Las estructuras o redes en tres dimensiones generalmente tienen tres parámetros de red, a, b y c. Sin embargo, en el caso especial de redes cúbicas, todos los parámetros son iguales, con lo cual nos referimos a ellos como a. Del mismo modo, en las estructuras cristalinas hexagonales, los parámetros a y b son iguales, por lo que únicamente se considera a y c [4].

Los parámetros de celda teóricos son $a = 0.9418$ y $c = 0.6884$ nm [4].

Se hicieron mediciones para hallar los parámetros de celdas a y c de cada muestra calentada a 600°C mediante DRX.

Tamaño del Cristal

El tamaño del cristal, se calcula con la ecuación de Debye-Scherrer [5-7]:

$$d = \frac{K\lambda}{w \cos\theta}$$

Donde

d: Es la dimensión cristalina.

K: Es la constante de Scherrer (K=0,9).

w: representa el ancho total a la mitad del valor máximo (FWHMs).

λ :Es la longitud de onda de difracción (1,5405 Å).

θ : Es el ángulo de difracción (002) hkl[6].

Análisis termogravimétrico (TGA)

Para el análisis termogravimétrico (TGA) se utilizó un equipo de TA-Q500 de TA Instruments. A este equipo está acoplado un analizador de masas de Pfeiffer Vacuum ThermoStar que permitió analizar los productos de descomposición de la muestra.

El TGA se define como la técnica en la cual se mide la variación de masa de una muestra frente al tiempo o a la temperatura, mientras se somete a un programa de temperatura controlado en una atmósfera específica[8].

El TGA permite detectar procesos en los que se produce una variación de masa tales como: descomposición, sublimación, reducción, desorción, adsorción, etc[8].

Esta técnica fue muy útil para observar la descomposición térmica de los materiales, ya que las descomposiciones ocurrieron a temperaturas muy

separadas donde se pueden calcular la pérdida en porcentaje de masa en distintas temperaturas de descomposición.

Para este proyecto se utilizó un programa de temperatura isoterma, el cual mantuvo la temperatura constante durante un tiempo determinado.

La atmósfera en la que se realizaron las medidas fue nitrógeno (N₂).

En el TGA se analizaron muestras sólidas en polvo. La cantidad de muestra que se analizó en el TGA fue entre 7 a 11 miligramos aproximadamente.

Parámetros utilizados

Rampa: 10°C/min

Isoterma: 900

Atmosfera: N₂ de 50 ml min⁻¹

Microscopio electrónico de Barrido de alta resolución con filamento de Emisión de Campo (FE-SEM)

El Microscopio electrónico de Barrido de alta resolución con filamento de Emisión de Campo (FE-SEM), permite el estudio y caracterización de muestras con detalles muy pequeños, de unos pocos nanómetros.

Este microscopio debe funcionar siempre en alto vacío y las muestras deben estar secas para el análisis.

El microscopio está equipado con 4 detectores, lo que permite realizar imágenes de electrones transmitidos (en campo claro y campo oscuro), de electrones secundarios y de electrones retrodispersados; así como también, combinaciones de éstos dos últimos. Los electrones retrodispersados y los secundarios son recogidos por un contador de centelleo que emite un pulso de luz a la llegada del electrón. La luz emitida es reconvertida a una señal eléctrica y ampliada por el fotoamplificador que pasa a un vídeo amplificador y posteriormente a la pantalla[9].

Este microscopio puede lograr una alta resolución en la imagen a un voltaje ultra bajo de sólo 1,3 nM a 1,0 kV, el control total de corriente de la sonda de 1 pA a más de 5nA; permite la observación de especímenes sensibles[9].

Se utilizó un FE-SEM Hitachi SU8000, con el cual se analizó la morfología de la superficie de los materiales.

Como las muestras de apatita y apatita enriquecida con estroncio son conductoras, no se necesitó metalizar ya que no presentan restricción alguna en cuanto a las condiciones de medida [9].

El FE-SEM nos permitió ver la adhesión celular. Para este caso se metalizaron las muestras con oro paladio antes de verlas por el FE-SEM.

El FE-SEM dispone de un sistema de microanálisis por energías dispersivas de rayos X (EDAX) marca Bruker modelo Quantax 200, el cual detecta los rayos x generados permitiendo realizar un análisis espectrográfico de la composición de la muestra. Este tiene unos detectores SDD que pueden alcanzar desde 10.000 hasta 100.000 recuentos por segundo[9].

Para este proyecto se hizo EDAX en 3 puntos diferentes de cada muestra para el análisis elemental de Sr, C, Ca, P y O.

Plasma Acoplado Inductivamente (ICP)

El Plasma Acoplado inductivamente es una técnica que permite medir elementos metálicos y semimetálicos. Se basa en la vaporización, disociación, ionización y excitación de los diferentes elementos químicos de una muestra en el interior de un plasma[10].

Durante el proceso de desexcitación de los átomos neutros e iones en el interior de un plasma, se producen las emisiones de radiación electromagnética en la zona del UV-visible. Estas radiaciones, características de cada elemento, se separan en función de su longitud de onda y finalmente se mide su intensidad. La

selección de la longitud de onda nos permite determinar el metal cualitativamente, mientras que la intensidad de la radiación emitida nos proporcionará la información para poder cuantificarlo[10].

Procedimiento para la medición:

La muestra vegetal fresca se limpia con un detergente suave, se lava con agua corriente y finalmente con agua destilada.

Se coloca en bandeja en una estufa a 70° C durante 24 horas hasta desecación total. Posteriormente, se tritura la muestra para que quede pulverulenta.

Se pesa 1 gramo de la muestra triturada y se agrega a un matraz de ataque de 100 cc.; se añaden 10cc. de ácido nítrico concentrado y se deja un mínimo de 5 horas para que se ataque en frío ; se continua el ataque en baño caliente de arena a una temperatura de unos 100° C , una vez se ha desprendido los vapores nitrosos (color marrón denso), cuando toda materia orgánica ha quedado destruída y el líquido queda transparente se retira del baño y se dejan enfriar los matraces.

Una vez fríos se añaden 2 cc. de ácido perclórico y se colocan de nuevo los matraces en el baño a una temperatura aproximada de unos 200° C ; empezarán a desprenderse vapores blancos densos de perclórico y cuando cesan de desprenderse y el líquido está transparente e incoloro pero con una sedimentación en el fondo del matraz, se retiran del baño.

A continuación se agrega a los matraces agua destilada muy caliente para facilitar la disolución del precipitado y se calienta en mechero agitando continuamente para su disolución total.

Se coloca un matraz de 50cc y sobre él un embudo de papel de filtro, se pasa agua caliente para humedecer el papel y lavar los matraces, agua que inmediatamente se desecha.

A continuación se filtra sobre dichos matraces, procurando lavar los matraces de ataque con el agua caliente al menos cuatro veces. Se enrasa el matraz de 50cc y la muestra para análisis.

En este extracto es donde se determinó el P, Ca y el Sr.

Se utilizó un equipo Espectrómetro de emisión por plasma ICP, marca Perkin-Elmer modelo 4300 DV

Con los resultados obtenidos por ICP (mg/Kg de Ca, Sr y P), se pudo llegar a las siguientes ecuaciones:

Muestra sintetizada con el 0% de acetato de Sr; 100% acetato de Ca:

Peso molecular Ca = 40.078 g/mol

Peso molecular Sr = 87.62 g/mol

Peso molecular P = 30.9738 g/mol

$$\frac{\text{mg Ca}}{\text{Peso molecular del Ca}} = \text{mMoles de Ca}$$

$$\frac{\text{mg Sr}}{\text{Peso molecular del Sr}} = \text{mMoles de Sr}$$

$$\frac{\text{mgP}}{\text{Peso molecular del P}} = \text{mMoles de P}$$

$$\frac{\text{Moles de Ca} + \text{Moles de Sr}}{\text{Moles de P}} = \text{Ca} + \text{Sr/P}$$

$$\frac{\text{mMoles de Ca}}{\text{mMoles de P}} = \text{Ca/P}$$

$$\frac{304099.1}{40.078} = 7587.68 \text{ mMoles de Ca}$$

$$\frac{179622.1}{30.9738} = 5799.16 \text{ mMoles de P}$$

$$\frac{7587.68}{5799.16} = 1.3084 = \text{Ca/P}$$

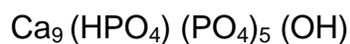
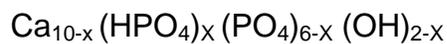
$$\frac{9 - X}{6} = \text{Ca/P}$$

$$9 - 6 \frac{\text{Ca}}{\text{P}} = X$$

$$9 - 6 (1.3084) = X$$

$$9 - 8 = X$$

$$1 = X$$



Muestra sintetizada con el 0% de acetato de Sr; 100% acetato de Ca calentada a 600°C:

$$\frac{308489}{40.078} = 7697.21 \text{ mMoles de Ca}$$

$$\frac{194670.3}{30.9738} = 6284.9989 \text{ mMoles de P}$$

$$\frac{7697.21}{6284.100} = \text{Ca/P}$$

$$1.22 = \text{Ca/P}$$

$$\text{mMoles de Ca} = 7697.21$$

Numero de átomos de Ca:

$$7697.21 \longrightarrow 9$$

$$7697.21 \quad x$$

$$x=9$$

Muestra sintetizada con el 5% de acetato de Sr; 95% acetato de Ca calentada a 600°C:

$$\frac{272880.1}{40.078} = 6808.72 \text{ mMoles de Ca}$$

$$\frac{41878.6}{87.62} = 477.96 \text{ mMoles de Sr}$$

$$\frac{195277.6}{30.9738} = 6304.60 \text{ mMoles de P}$$

$$1.15 = \text{Ca} + \text{Sr/P}$$

$$m\text{Moles de Ca} + m\text{Moles de Sr} = 7286.68$$

Numero de átomos de Ca:

$$7286.68 \longrightarrow 9$$

$$6808.72 \quad x$$

$$x = 8.41$$

Numero de átomos de Sr:

$$7286.68 \longrightarrow 9$$

$$477.96 \quad x$$

$$x = 0.59$$

Relación Ca + Sr:



Muestra sintetizada con el 10% de acetato de Sr; 90% acetato de Ca calentada a 600°C:

$$\frac{258151.7}{40.078} = 6441.23 \text{ mMoles de Ca}$$

$$\frac{76176.9}{87.62} = 869.40 \text{ mMoles de Sr}$$

$$\frac{194115.3}{30.9738} = 6267.08 \text{ mMoles de P}$$

$$1.16 = \text{Ca} + \text{Sr/P}$$

$$\text{mMoles de Ca} + \text{mMoles de Sr} = 7310.63$$

Numero de átomos de Ca:

$$7310.63 \longrightarrow 9$$

$$6441.23 \quad x$$

$$x = 7.93$$

Numero de átomos de Sr:

$$7310.63 \longrightarrow 9$$

$$869.40 \quad x$$

$$x = 1.07$$

Relación Ca + Sr:



Muestra sintetizada con el 15% de acetato de Sr; 85% acetato de Ca calentada a 600°C:

$$\frac{228188.6}{40.078} = 5693.61 \text{ mMoles de Ca}$$

$$\frac{103003.8}{87.62} = 1175.57 \text{ mMoles de Sr}$$

$$\frac{190192.9}{30.9738} = 6140.44 \text{ mMoles de P}$$

$$1.12 = \text{Ca} + \text{Sr/P}$$

$$\text{mMoles de Ca} + \text{mMoles de Sr} = 6869.18$$

Numero de átomos de Ca:

$$6869.18 \longrightarrow 9$$

$$5693.61 \quad x$$

$$x = 7.46$$

Numero de átomos de Sr:

$$6869.18 \longrightarrow 9$$

$$1175.57 \quad x$$

$$x = 1.54$$

Relación Ca + Sr:



Muestra sintetizada con el 20% de acetato de Sr; 80% acetato de Ca calentada a 600°C:

$$\frac{208568.3}{40.078} = 5204.06 \text{ mMoles de Ca}$$

$$\frac{132461.2}{87.62} = 1511.77 \text{ mMoles de Sr}$$

$$\frac{182796.9}{30.9738} = 5901.66 \text{ mMoles de P}$$

$$1.14 = \text{Ca} + \text{Sr/P}$$

$$m\text{Moles de Ca} + m\text{Moles de Sr} = 6715.83$$

Numero de átomos de Ca:

$$6715.83 \longrightarrow 9$$

$$5204.06 \quad x$$

$$x = 7$$

Numero de átomos de Sr:

$$6715.83 \longrightarrow 9$$

$$1511.77 \quad x$$

$$x = 2$$

Relación Ca + Sr:



Muestras elegidas para ver la liberación de Ca y Sr:

Muestra sintetizada con el 20% de acetato de Sr; 80% acetato de Ca calentada a 600°C:

$$\frac{357.2}{40.078} = 8.9126 \text{ mMoles de Ca}$$

$$\frac{0.1}{87.62} = 0.0011 \text{ mMoles de Sr}$$

$$8.9126 + 0.0011 = 8.9137$$

Ca:

$$8.9137 \rightarrow 10$$

$$8.9126 \rightarrow X$$

$$X = 9.9987$$

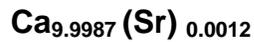
Sr:

$$8.9137 \rightarrow 10$$

$$0.0011 \rightarrow X$$

$$X = 0.0012$$

Relación Ca + Sr:



Muestra sintetizada con el 5% de acetato de Sr; 95% acetato de Ca calentada a 600°C:

$$\frac{264.9}{40.078} = 6.6096 \text{ mMoles de Ca}$$

$$\frac{98.7}{87.62} = 1.1264 \text{ mMoles de Sr}$$

$$6.6096 + 1.1264 = 7.736$$

Ca:

$$7.736 \rightarrow 10$$

$$6.6096 \rightarrow X$$

$$X = 8.5439$$

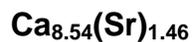
Sr:

$$7.736 \rightarrow 10$$

$$1.1264 \rightarrow X$$

$$X = 1.4560$$

Relación Ca + Sr:



Los resultados de ICP muestran que hay algo de liberación de Sr. Lo que puede confirmar la disminución en el MTT en las 24 y 48 horas (ya cuando pasan los días que hay más liberación de Ca y Sr aumenta la viabilidad celular).

Picnómetro de Helio (Densidad Real)

El Picnómetro de Helio es un equipo que permite medir la densidad real (skeletal density) de materiales de polvo fino, pellets o sólidos monolíticos ó fragmentados mediante el desplazamiento de gas Helio[11].

El rango de medida del equipo está comprendido entre 0,01 cm³ y 350 cm³.

Antes de hacer las mediciones se cogió cada muestra y se trituro bien hasta que quedara en un polvo fino, luego se introdujo en un cubilete y luego al picnómetro. Se utilizó un picnómetro de helio AccuPyc 1330.

Parámetros Utilizados:

Cantidad de Muestra: 0.20 g

Purgas: 10

Presión: 19.500

Método de Arquímedes (Densidad aparente)

La densidad por Arquímedes (densidad aparente) se refiere a que todo cuerpo sumergido en el seno de un fluido, sufre una fuerza ascendente (empuje) cuyo valor es igual al peso del fluido desalojado por el cuerpo[12-14].

Para hacer las mediciones se colocó en el plato de la balanza un vaso con agua desionizada, donde se sumergió cada muestra sin producir derramamiento de agua. Luego se taro la balanza con el vaso con agua (se colocó en cero la balanza en estado de carga). Finalmente se introdujo la muestra en el agua y se determinó su densidad.

Medición de la densidad:

Cuando se colocó el vaso de agua sobre la balanza de un solo platillo y se sumergió cada muestra en él, el agua ejerció un empuje E sobre la muestra. Según el principio de Arquímedes, el módulo de este empuje es[14]:

$$E = V_{\text{muestra}} * \rho_{\text{agua}} * g = \frac{m_{\text{muestra}}}{\rho_{\text{muestra}}} * \rho_{\text{agua}} * g$$

E= Empuje
 ρ = Densidad
V= Volumen
g = Gravedad
m = Masa

Según la tercera ley de Newton de acción y reacción, la muestra reaccionará sobre el agua y el vaso con una fuerza igual y opuesta. Es decir, cuando se sumergió la muestra en agua, la balanza incremento su valor en una magnitud igual a m_E [14]:

$$m_E = \frac{E}{g} = V_{muestra} * \rho_{agua} = \frac{m_{muestra}}{\rho_{muestra}} * \rho_{agua}$$

Se despeja y se obtiene la densidad:

$$\rho_{muestra} = \frac{m_{muestra}}{m_E} * \rho_{agua}$$

Densidad en %

La densidad en % se calculó en función de la densidad aparente y la densidad real[15], de la siguiente manera:

$$\% \text{ Densidad} = \frac{\text{Densidad Aparente}}{\text{Densidad Real}} \times 100$$

Medición de la Porosidad

La porosidad se calculó en función de la densidad en %: [15]

Porosidad = 100 - (% Densidad) [16]

Por ESEM se pudo ver la porosidad.

Prueba de dureza Vickers

El principio básico del ensayo de dureza Vickers, es observar en la muestra su capacidad de resistir a la deformación plástica de una fuente estándar[17].

El penetrador tiene forma de pirámide regular de base cuadrada.

El penetrador incide perpendicularmente sobre la superficie de la muestra a ensayar bajo la acción de una carga constante y a una velocidad controlada.

La dureza se debe a dos efectos: elásticos y plásticos[17].

La dureza se define como la presión media ejercida sobre el área de contacto del penetrador con la superficie de la muestra cuando la carga está aplicada y el penetrador en reposo[17].

La dureza se calcula mediante la siguiente ecuación[17]:

$$MH = 2 \operatorname{sen} 68^\circ P/d^2$$

Sus unidades son en MPa = $N/m^2 \times 10^6$

P = Fuerza

d = Deformación

La fuerza del indentador fue de 100 Pondios (P)

100 P= 9.618 Newtons (N)[17]

Se le hizo la prueba de dureza Vickers a 4 pastillas de cada muestra calentada a 600°C. Se midió 5 indentaciones por pastilla.

%B-TCP y %HA

Se midió el %B-TCP de las muestras calentadas a 1000°C y el %HA de las muestras calentadas a 600°C analizando el perfil completo del patrón de difracción de rayos X por el método Rietveld para obtener la ecuación que resulta en cada muestra[7].

Técnica Coulter

La técnica Coulter de dispersión de luz, nos permite la medición del tamaño de la partícula en μm . Esta técnica se basa en partículas iluminadas que sirven a las fuentes de radiación secundaria y se relaciona con su tamaño. Cuando el tamaño de partículas en suspensión es muy pequeño con respecto a la longitud de onda

de la luz, o cuando el índice de refracción de las partículas está muy cerca al medio, las ecuaciones de Rayleigh y Gans pueden ser utilizadas[18, 19].

Cuando las partículas son esféricas e intrínsecamente isotrópicas se debe recurrir a la teoría de Mie que es una técnica muy compleja. Gracias a los ordenadores electrónicos, la medición del tamaño de la partícula ha sido más fácil y varias tabulaciones de las funciones de Mie se han podido utilizar[18, 19].

Si el sistema de dispersión de luz no es monodisperso, es decir, no todas las partículas son del mismo tamaño, el tamaño de partícula obtenido representará un valor medio, relacionado pero no idéntico con el tamaño de partícula Peso-Promedio. Estos promedios están obligados a diferir con las formas de las partículas, la distribución del tamaño de partícula y el grado de no isotropía[18, 19].

Las medidas se tomaron en un equipo Coulter LS230.

Parámetros Utilizados:

Cantidad de muestra: 200mg en 20 ml de agua destilada.

Eluyente: Agua destilada/Etanol

Densidad muestra: 1.01

Área de Superficie Específica (SSA)

Para medir el área de superficie específica se utilizó un Micromeritics ASAP 2020. Antes de las mediciones, todas las muestras se insertaron en la célula en forma de polvo y se activaron a vacío (presión residual 10^{-3} Torr) a temperatura ambiente durante 12 h con el fin de eliminar los contaminantes atmosféricos adsorbidos.

Para la determinación de SSA, los datos se analizaron con el modelo de BET. Este se basa en la adsorción de un gas inerte a baja temperatura sobre una superficie sólida, y permite evaluar la superficie total de la muestra[6, 20]. El cálculo se realiza mediante la siguiente ecuación[20]:

$$\frac{P}{Va(P_0 - P)} = \frac{1}{VmC} + \frac{C - 1}{VmC} + \frac{(P)}{P_0}$$

Dónde:

Va: Es la cantidad de gas adsorbido a la presión P.

Vm: Es la cantidad de gas adsorbido cuando toda la superficie está cubierta por una capa monomolecular del gas.

C: Es una constante.

P0: Es la presión de saturación del gas.

Condiciones del Análisis:

Temperatura desgasificación: 100°C durante 1200min.

Isoterma mesoporosa de adsorción N₂ y área BET para todas las muestras.

Análisis de Integridad

El análisis de integridad se hizo para ver si las muestras se mantenían en PBS o si se degradaban. Esto se realizó antes de los ensayos celulares. Se seleccionaron 3 muestras y se puso cada muestra en 30cm de PBS y se les hicieron mediciones del peso durante 20 días. Se midió el peso en la mañana y en la tarde del primer día y luego cada día hasta el día 20.

Determinación del pH de las muestras:

Para medir el pH de las muestras se utilizó un pH-metro Crison GLP 2. Se calibró el electrodo del pH-metro utilizando primero un tampón pH 4, 0 y luego uno de pH 7,0.

Cuando ya estuvo calibrado el pH-metro, se colocó el electrodo de pH en cada disolución, se esperó un tiempo hasta que se estabilizó el pH.

Pirolizador:

Después de la caracterización de cada muestra, se decidió un calentamiento a 600°C, antes de hacerlo, se tomó unos trozos de cada muestra y se trituraron hasta que quedaron en polvo fino, después se introdujo cada muestra bien esparcida hasta llenar la mitad de cada alúmina crucible y se hizo cada

calentamiento en un horno pirolizador a una temperatura constante de 600°C durante 5 horas a una velocidad de 10°C/min.

Luego se cogieron otros trozos de cada muestra, se trituraron bien hasta que quedo cada muestra en polvo fino y se hizo un calentamiento a 1000°C de cada muestra.

Para los ensayos celulares se tomó 25g de cada muestra y se le añadió 25ml de agua desionizada, luego se agregó 25ml de agua desionizada a un mortero de ágata y 5% de tween 80, se trituro y se introdujo en un horno a 60°C hasta que estuvo bien seco. Después se trituro cada muestra y se hicieron 21 pastillas de 0.2g, las cuales se introdujeron en grupos de 6 en una alúmina crucible al pirolizador donde se hizo primeramente una rampa de calentamiento a 400°C durante una hora a una velocidad de 2°C/min y otra a 600°C durante dos horas a una velocidad de 10°C/min.

Microscopio invertido de contraste de fases Nikon ECLIPSE modelo TS100:

El microscopio invertido de contraste de fases Nikon ECLIPSE modelo TS100, es un microscopio utilizado actualmente a nivel científico ya que permite observar células vivas.

Nikon tiene un modelo binocular TS100 y un modelo triocular TS100-F el cual viene con un puerto de fotografía que acepta la línea de cámaras digitales Digital Sight, los sistemas microfotográficos series FX-III o cámaras CCTV.

Tanto el TS100 como el TS100-F aceptan el aditamento de Epí-fluorescencia, el cual se ha convertido en un accesorio requerido para varias aplicaciones.

Este microscopio tiene una unidad externa de contraste de fases de intensidad completa. Con este sistema, un anillo de fases es incorporado al cuerpo del microscopio en lugar de incorporarlo al objetivo, permitiendo el uso de objetivos especializados sin anillos de fase que permite la captura de imágenes de alta calidad.

Ya que no hay pérdida de intensidad debido al anillo de fase, se pueden capturar con intensidad completa imágenes fluorescentes, confocales e imágenes TIRF usando el mismo objetivo así como brindando observación de contraste de fases. Todos los cubos estándar de Nikon (más de 35 cubos en lista) se pueden colocar en este aditamento, el cual soporta dos cubos. Una tercera posición con un bloqueador de luz automático permite la transición a campo claro o contraste de fases.

ENSAYOS CELULARES

Los ensayos celulares se hicieron en el laboratorio de Células del Instituto de Ciencia y Tecnología de Polímeros del CSIC y la Unidad de Investigación Clínica y Biopatología Experimental del Hospital Provincial de Ávila.

Ensayos celulares hechos en el laboratorio de Células del Instituto de Ciencia y Tecnología de Polímeros del CSIC:

PRUEBAS DE CITOTOXICIDAD

Medida de la viabilidad celular utilizando el ensayo de MTT (ensayo indirecto)

El reactivo MTT ((3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5 difeniltetrazolium)), es transformado a azul formazan por la deshidrogenasa mitocondrial. Esta enzima solamente está presente en células vivas, por tanto el color azul que aparece es proporcional al nº de células viables[21].

Este ensayo se utilizó para estudiar el efecto de los productos que la apatita y las muestras de apatita enriquecida con Sr pueda liberar cuando está en contacto con medio de cultivo fresco (productos de degradación, monómero residual, etc.[22]).

Se hizo un MTT a las muestras con Osteosarcomas para mirar si los materiales presentan citotoxicidad antes de trabajar con osteoblastos.

Antes del análisis, se colocaron dos pastillas de cada material a esterilizar en óxido de etileno, como el estudio es para osteosarcomas, se utilizó un medio SEMI

fresco y estéril con una composición de 1% de Penisilina/ Estreptomicina, 1% de NEA (Aminoácido esencial), 2% de L Glutamida (200mMol). Se pusieron 5 ml de este medio a cada material. Luego se tomaron dos tubos y se puso 5 ml de medio SEMI a cada tubo que se llamó control (C). Se dejaron las muestras y el control a 37°C y en agitación.

A determinados intervalos de tiempo (1, 2, 7, 14 y 21 días) se retiró este medio que es lo que se conoce como “eluyente”, se congelo y se repuso con medio SEMI fresco. Cuando se tuvieron los eluyentes a los diferentes tiempos se comenzó el protocolo siguiente:

1. Primer día:

- Se sembraron 9×10^4 células/mL en una placa de 96 pocillos. Una de las columnas quedo libre para servir de blanco.
- Se Tripsinizo 3 frascos, que fueron los necesarios para obtener la densidad indicada, (frasco de 75 cm³ necesita como 4 ml de tripsina-edta). Se dejó 5 min a 37 °C. Cuando estuvieron levantadas se neutralizo la tripsina con 4 ml de medio fresco.
- Se Centrifugo a 3000 rpm durante 10 min.
- Se eliminó el sobrenadante.
- Se añadió 1 ml de medio fresco completo con fibroblastos humanos (FBH).
- Se contó las células levantadas utilizando cámara de Neubauer y Trypan Blue que tiñe de azul aquellas células que estén vivas, o el contador automático de Invitrogen.
- Se colocó 100 µl de suspensión de células en cada pocillo y se incubo durante 24 horas a 37°C.

2. Segundo día:

- Se eliminó el medio de los pocillos una vez transcurridas las 24 horas. Se Colocó en cada pocillo 100µl de los eluyentes correspondientes medio semi a una fila (previamente descongelados y filtrados).
- Se incubo a 37°C durante 24 h.

3. Tercer día:

- Se preparó una disolución de MTT en PBS: 0.050 g de MTT en 10 ml de PBS.
- Se diluyó este MTT al 10% en medio semi fresco.
- Se retiró los eluyentes de los pocillos.
- Se añadió 100 µl de la disolución anterior a cada pocillo.
- Se incubó durante 3 horas a 37°C.
- Se retiró el MTT y se añadió 100 µl de dimetilsulfóxido (DMSO), que disuelve los cristales de formazan en la mitocondria de la célula.
- Se Leyó la absorbancia a 570 nm.

Cuando se realizó la lectura, a los valores de absorbancia recogidos se les resto los valores obtenidos para el blanco y se relativizaron con respecto a los medidos para el control negativo, TMX, a partir de la formula siguiente[21]:

$$\%TMX = \frac{DO_s - DO_B}{DO_C} \times 100$$

Donde,

DO_s, DO_B y DO_C son las medidas de densidad óptica de la muestra, el blanco (MEM introducido en pocillos sin células) y el control [21]. Posteriormente se realizó una serie de análisis de la varianza (ANOVA-TUKEY) empleando el paquete estadístico Statistica™, con el fin de comparar los resultados obtenidos para las formulaciones problema con respecto a este control.

Se hizo un MTT in vitro con células osteoblasticas derivadas de la línea celular humana de MG-63 a las muestras. Se sacaron los eluyentes del congelador hasta que estuvieron bien descongelados y se siguió el mismo protocolo anterior.

Ensayos celulares hechos en la Unidad de Investigación Clínica y Biopatología Experimental del Hospital Provincial de Ávila:

Controles y Formulaciones:

Como control negativo se utilizó Thermanox (TMX, Nunc) que son discos de 13 mm de diámetro suministrados por Labclinics.

Las muestras que se utilizaron fueron las sintetizadas con el 0, 5 10, 15 y 20% de Sr.

Lineas Celulares

Para los ensayos se utilizaron Osteoblastos fetales humanos, pase 6 (HOb; Health Protection Agency Culture Collections -HPAC- 406-05f) que se pueden observar en la figura 2.

Se ha escogido este cultivo primario debido a las aplicaciones propuestas para este tipo de materiales.

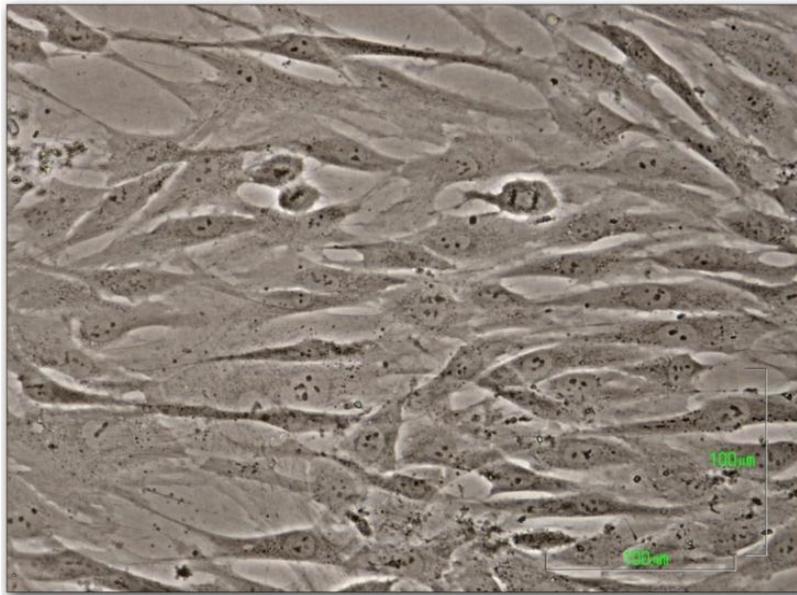


Figura 2. Osteoblastos humanos en cultivo (subcultivo 6) transcurridas 48 h desde su siembra, bajo microscopio invertido de contraste de fases (Nikon ECLIPSE TS100; 200X).

Células madre humanas aisladas de medula ósea, pase 4 (MSC) que pueden observarse en la figura 3:

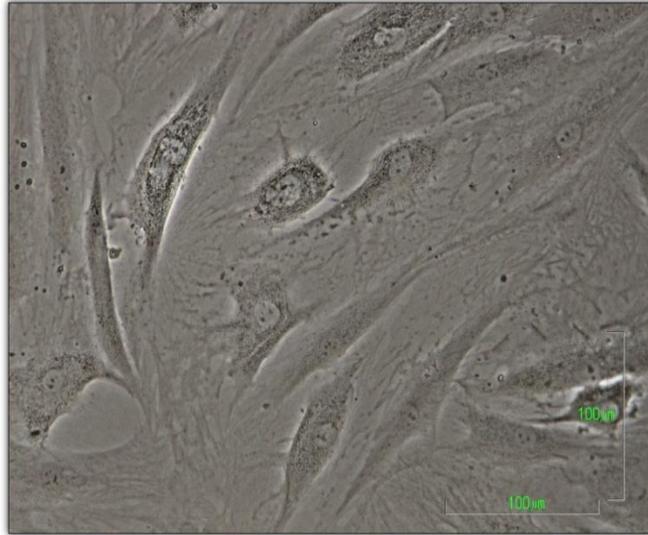


Figura 3. Células madre humanas aisladas de medula ósea en cultivo (subcultivo 4) transcurridas 72 h desde su siembra, bajo microscopio invertido de contraste de fases (Nikon ECLIPSE TS100; 200X).

El mantenimiento de ambas líneas celulares se llevó a cabo realizando los pases antes de alcanzar el 80-90% de la confluencia, transcurrido un periodo de entre 4 y 5 días después de realizar la siembra, utilizando para ello una disolución de tripsina (0,5 g/l) y ácido etilendiaminotetracético (EDTA; 0,2 g/l) en una solución salina balanceada de Hank, con el fin de liberar las uniones intercelulares y las de las células con la superficie de cultivo.

Medios de cultivo y reactivos:

Como medios de cultivo y reactivos se utilizaron los siguientes:

- Medio de cultivo para osteoblastos, DMEM/F12 HAM con HEPES (SIGMA D8437), suplementado con penicilina/estepomicina (SIGMA P0781) y suero fetal bovino (10%, GIBCO 10270-106).

- Medio de cultivo no osteogénico para MSC, DMEM (SIGMA D6171) suplementado con L-glutamina (SIGMA), penicilina/estrepomicina (SIGMA P0781) y suero fetal bovino (20%, GIBCO 10270-106).
- Medio de cultivo osteogénico para MSC, MODM (Mesenchymal Stem Cell Osteogenic Differentiation Medium, SCIENCECELL), suplementado con 25 ml de suero fetal bovino (SCIENCECELL, Cat. No. 0025), 5 ml de suplemento de diferenciación osteogénica para células madre mesenquimales (SCIENCECELL, Cat. No. 7532-5) y 5 ml de una disolución de penicilina/estrepomicina (SCIENCECELL).
- Solución salina de Dulbecco tamponada con fosfato (PBS, SIGMA D8537).
- Disolución de tripsina (0,5 g/l) y ácido etilendiaminotetracético (EDTA; 0,2 g/l) en una solución salina balanceada de Hank (Tripsina-EDTA; SIGMA).

Ensayo 1: Rojo de Alizarina

Con el objetivo de identificar los depósitos de calcio formados en cultivos in vitro de células de una línea de osteoblastos (HOb; tratamiento experimental 1) y en una estirpe indiferenciada (MSC), en medio no osteogénico (tratamiento experimental 2) y osteogénico (tratamiento experimental 3) se realizó una tinción con Rojo de Alizarina 40 mM pH 4,2 (Sigma). El Rojo de Alizarina es un marcador de primeras etapas (días 10–16 de un cultivo in vitro) de mineralización de matriz, fundamental en la formación de matriz extracelular calcificada.

El protocolo que se siguió fue el siguiente:

Se hizo una siembra de células utilizando el medio de cultivo completo fresco específico para cada uno de los tres tratamientos experimentales definidos, a una concentración de 5×10^4 células/ml, sobre las muestras ($n=2$) introducidas en placas de 24 pocillos (1 ml de concentrado de células/pocillo).

Se realizó una incubación durante 15 días a 37 °C en una atmósfera con un 5% de CO₂, cambiando el medio cada 3 días.

Se retiró el contenido de los pocillos, añadiendo en su lugar el reactivo Rojo Alizarina. La biomineralización se evaluó transcurridos 15 días de cultivo, momento en el que se retiró el sobrenadante, fijando las células con formaldehído

al 4%. Posteriormente, las muestras fueron lavadas y teñidas con rojo de alizarina durante 20 minutos. Finalmente se lavaron con agua destilada para retirar el exceso de colorante.

La observación se realizó en un microscopio Nikon ECLIPSE TS100, y la captura y análisis de las imágenes utilizando un sistema, asociado a dicho microscopio, constituido por un captor Nikon DS-Fi1 y un monitor Digital Sight DS-L2.

Ensayo 2: OXterix

Con el objetivo de identificar los depósitos de calcio formados en cultivos in vitro de células de una línea de osteoblastos (HOb; tratamiento experimental 1) y en una estirpe indiferenciada (MSC), en medio no osteogénico (tratamiento experimental 2) y osteogénico (tratamiento experimental 3) se llevó a cabo otro ensayo utilizando como anticuerpo para marcadores osteogénicos Anti-Sp7/Osterix (Abcam ChiP Grade ab22552).

El protocolo que se siguió fue el siguiente:

Se hizo una siembra de células utilizando el medio de cultivo completo fresco específico para cada uno de los tres tratamientos experimentales definidos, a una concentración de 5×10^4 células/ml, sobre las muestras ($n=2$) introducidas en placas de 24 pocillos (1 ml de concentrado de células/pocillo).

Se realizó una incubación durante 15 días a 37 °C en una atmósfera con un 5% de CO₂, cambiando el medio cada 3 días.

Se retiró el contenido de los pocillos y se hizo lo siguiente:

- Fijación: 1 ml formaldehído 4% (Panreac) por pocillo.
- Incubación durante 1h a temperatura ambiente.
- Lavado con PBS.
- Permeabilización con TritonX (0,05% en PBS).
- Incubación durante 20 minutos a 37°C en agitación.
- Adición del anticuerpo primario Osterix (dilución 1/500).

- Incubación durante 24h.
- Lavados con PBS x4, 5 min.
- Adición del anticuerpo secundario (en condiciones bajas de luz) anti-IL-6 (Abcam ab6672).
- Lavados con PBS x4, 10 min.

La observación se realizó en un microscopio Nikon ECLIPSE TS100, utilizando el anillo de fase que viene con este microscopio, el cual permitió la captura de las imágenes fluorescentes con intensidad completa.

Ensayo 3: Runx2

Con el objetivo de identificar los depósitos de calcio formados en cultivos in vitro de células de una línea de osteoblastos (HOb; tratamiento experimental 1) y en una estirpe indiferenciada (MSC), en medio no osteogénico (tratamiento experimental 2) y osteogénico (tratamiento experimental 3) se llevó a cabo otro ensayo utilizando como anticuerpo para marcadores osteogénicos Anti-RUNX2 (Sigma SAB1412668).

El protocolo que se siguió fue el siguiente:

Se hizo una siembra de células utilizando el medio de cultivo completo fresco específico para cada uno de los tres tratamientos experimentales definidos, a una concentración de 5×10^4 células/ml, sobre las muestras (n=2) introducidas en placas de 24 pocillos (1 ml de concentrado de células/pocillo).

Se realizó una incubación durante 21 días a 37 °C en una atmósfera con un 5% de CO₂, cambiando el medio cada 3 días.

Se retiró el contenido de los pocillos y se hizo lo siguiente:

- Fijación: 1 ml formaldehído 4% (Panreac) por pocillo.
- Incubación durante 1h a temperatura ambiente.
- Lavado con PBS.
- Permeabilización con TritonX (0,05% en PBS).
- Incubación durante 20 minutos a 37°C en agitación.

- Adición del anticuerpo primario Anti-RUNX2 (10µg/ml).
- Incubación durante 24h.
- Lavados con PBS x4, 5 min.
- Adición del anticuerpo secundario (en condiciones bajas de luz) anti-IL-6 (Abcam ab6672).
- Lavados con PBS x4, 10 min.

La observación se realizó en un microscopio Nikon ECLIPSE TS100, utilizando el anillo de fase que viene con este microscopio, el cual permitió la captura de las imágenes fluorescentes con intensidad completa.

TECNICAS Y MÉTODOS UTILIZADOS EN LA SINTESIS Y CARACTERIZACIÓN DEL LACTATO DE QUITOSANO

Para la síntesis del lactato de quitosano se utilizaron los siguientes reactivos:

Ácido Láctico:

Ácido DL Láctico

Ácido Propiónico 2-hidroxi

Fórmula: C₃H₆O₃

Peso molecular: 90,08 g/mol

Concentración: 90%

(R08M068) (Acros)

Quitosano de bajo peso molecular:

Poli (D-glucosamina)

Quitina desacetilada

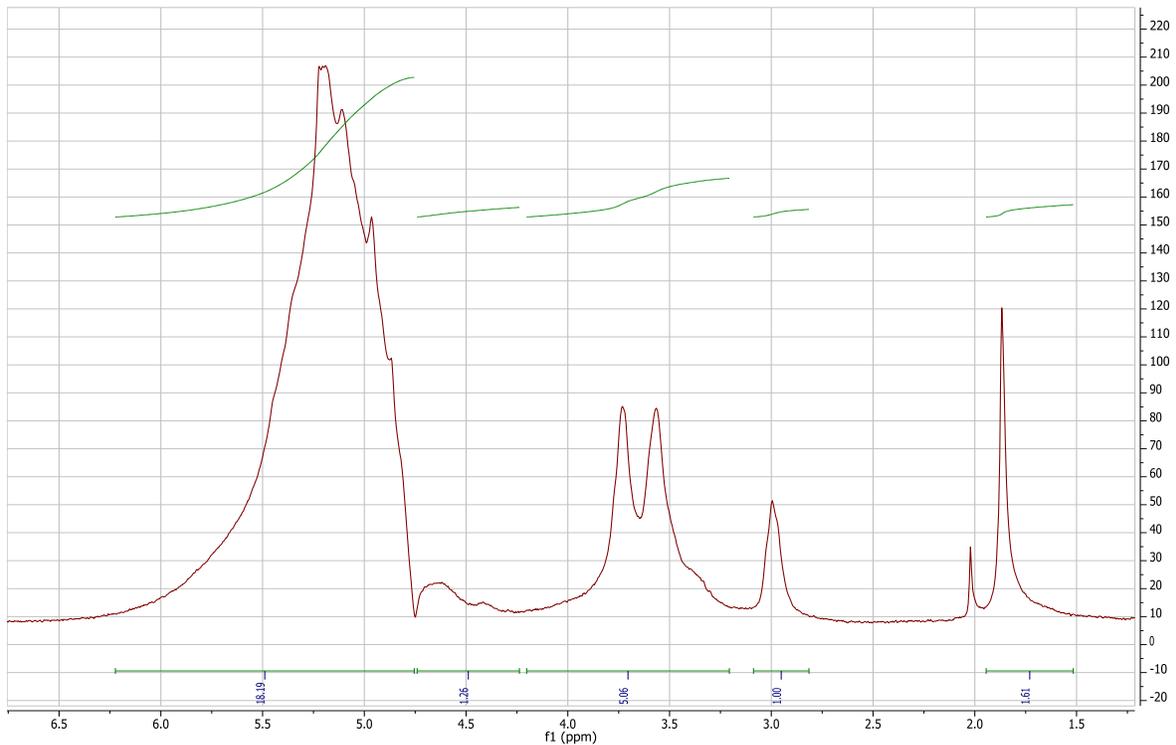


Figura 4. RMN del Quitosano

La obtención de las señales (I) que se pueden observar en la figura 4, permitió calcular la fracción molar de unidades N-acetiladas (F_A) de la siguiente forma:

$$F_A = 7(I_b + I_e) / [4(I_a + I_c + I_d) + I_b + I_e] \quad [23]$$

Picos	Integración de cada pico
a ≈ 5.20	$I_a = 18.19$
b ≈ 4.65	$I_b = 1.26$
c ≈ 4.2-3.21	$I_c = 5.06$
d ≈ 3	$I_d = 1.00$
e ≈ 1.86	$I_e = 1.61$

Tabla 3. Integración de cada pico en la RMN del quitosano

Teniendo la integración de cada pico en la RMN del quitosano mostrados en la tabla 3, se reemplaza en la ecuación y se obtiene:

$$F_A = 7(1.26 + 1.61) / [4(18.19 + 5.06 + 1.00) + 1.26 + 1.61] = 0.2011$$

Para calcular el grado de desacetilación se utiliza la siguiente formula [23]:

$$1 - F_A$$

$$1 - 0.2011 = 0.80$$

$$0.80 \times 100 = 80\%$$

Peso molecular: 70 kDa

(R12M112P1) (Aldrich)

Estos materiales se adquirieron con el mayor grado de pureza.

Materiales sintetizados en el laboratorio

Para la síntesis del Lactato de Quitosano se aplicó el siguiente procedimiento:

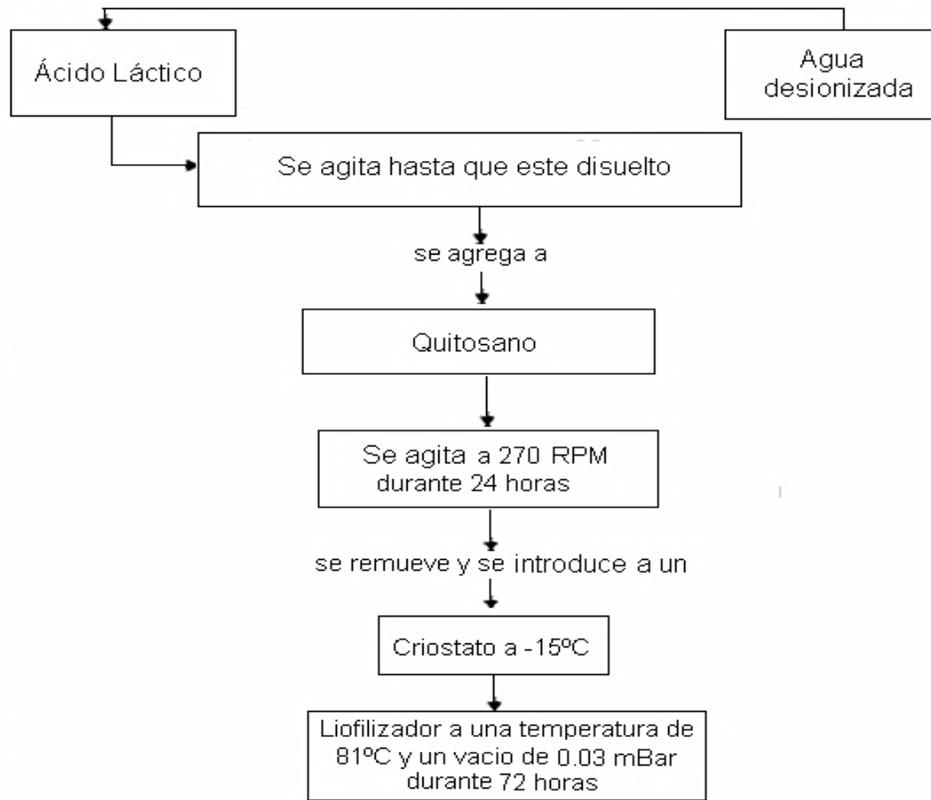


Figura 5. Síntesis del Lactato de Quitosano

Como se muestra en la figura 5, al quitosano se le agrego una solución al 2% de ácido láctico y se dejó agitando sobre la noche. Al día siguiente se introdujo en un criostato. Al otro día se liofilizo y se cortó en trozos antes del tratamiento térmico a vacío.

Reflexión total atenuada (ATR):

Las muestras de lactato de quitosano se colocan en la parte superior del cristal y se presionan hacia abajo para tener un buen contacto ya que el haz de IR recoge una señal que pasa unas pocas micras en la muestra antes de que se refleje.

Condiciones Utilizadas en el equipo:

Rango de Inicio: 4000 cm⁻¹

Rango final: 650cm⁻¹

Tipo de escaneado: Background

Número de escáneres: 16

Resolución: 2

Se le hizo un seguimiento a 3 trozos del lactato de quitosano calentados a 200°C. Se introdujeron en 30cm de PBS y cada día se sacaron y se secaron en un horno a 37°C para analizarlos por ATR y poder ver cuando la banda que esta alrededor de 1734 cm⁻¹ correspondiente a los grupos carboxílicos desaparecía.

Difracción de Rayos x (DRX):

Se hizo una DRX a las muestras de lactato de quitosano siguiendo el mismo procedimiento que el de las apatitas.

Análisis termogravimétrico (TGA)

Se hizo un TGA para analizar los productos de descomposición de las muestras de lactato de quitosano. Se utilizó el mismo procedimiento que el de las apatitas.

En el TGA se analizaron muestras sólidas en polvo. La cantidad de muestra que se analizó en el TGA fue entre 3 a 10 miligramos.

Parámetros utilizados

Rampa: 10°C/min

Isoterma: 600

Atmosfera: N₂ de 50 ml min⁻¹

Resonancia Magnética Nuclear (RMN)

La resonancia magnética nuclear es una técnica que tiene como objetivo determinar la composición y microestructura de las cadenas poliméricas, tanto en solución como en estado sólido y el estudio de los mecanismos de polimerización y análisis morfológico de las macromoléculas[21, 24, 25].

En este proyecto se utilizó la RMN para identificar átomos y grupos de átomos en las macromoléculas, y además para determinar su posición relativa en la molécula.

El análisis de la estructura química se ha determinado espectroscópicamente mediante resonancia magnética nuclear de protón (¹H RMN), usando un espectrómetro Bruker 500, el cual opera a 500 MHz por protón, a temperatura ambiente.

Las muestras se disolvieron en agua deuterada (D₂O).

Con la RMN se pudo calcular el grado de sustitución del ácido láctico (%) en el quitosano. Primero se integró cada pico, luego se sumaron todas las integrales de la molécula (área total) y aparte se sumaron las áreas correspondientes al ácido láctico (área total del ácido láctico) y se hizo la siguiente regla de tres:

Área total —————> 100%

Área total ácido láctico ———> %

Microanálisis

Se utilizó el microanálisis para ver el contenido en % de carbono, hidrogeno y nitrógeno en las muestras de lactato de quitosano con el mismo procedimiento que el de las apatitas.

Análisis Elemental por ChemDraw

El ChemDraw es un programa, en el cual se puede dibujar moléculas y se puede obtener el análisis elemental en % de carbono, hidrogeno, nitrógeno y oxígeno. En este proyecto fue muy útil, ya que se pudo comparar los resultados arrojados con los del microanálisis y de TGA y se pudo confirmar la presencia de agua en las moléculas.

Microscopio electrónico de Barrido de alta resolución con filamento de Emisión de Campo (FE-SEM)

Se utilizó un FE-SEM Hitachi SU8000, con el cual se analizó la morfología de la superficie de los andamios de lactato de quitosano y se midió el tamaño de los poros.

Análisis de Solubilidad

El análisis de solubilidad se realizó para ver si los andamios de lactato de quitosano son hidrofílicos y si aumentaban o se quedaba estable su peso al paso del tiempo. Se hizo el análisis de solubilidad a 4 trozos de cada muestra. Para este análisis se introdujo cada trozo en 30cm de PBS y se les hicieron mediciones del peso en diferentes intervalos de tiempo. Se midió el peso en la mañana y en la tarde del primer día y luego cada día hasta que la muestra se fue degradando. Cada día se hizo medición del pH.

Determinación del pH de las muestras:

Para medir el pH de los andamios de lactato de quitosano en PBS se utilizó un pH-metro Crison GLP 2. Se calibró el electrodo del pH-metro utilizando primero un tampón pH 4, 0 y luego uno de pH 7,0.

Cuando ya estuvo calibrado el pH-metro, se colocó el electrodo de pH en cada disolución, se esperó un tiempo hasta que se estabilizo el pH.

Picnómetro de Helio (Densidad Real)

Antes de hacer las mediciones en el picnómetro de helio, se cogió cada muestra y se cortó en trozos muy pequeños, luego se introdujo en un cubilete y luego al picnómetro.

Parámetros Utilizados:

Cantidad de Muestra: 0.07 g

Purgas: 10

Presión: 19.500

Método de Arquímedes (Densidad aparente)

Se obtuvo la densidad por el método de Arquímedes (densidad aparente) de las muestras de lactato de quitosano de la misma forma que se obtuvo la de las apatitas.

Densidad en %

La densidad en % de las muestras del lactato de quitosano se calculó en función de la densidad aparente y la densidad real[15] :

$$\% \text{ Densidad} = \frac{\text{Densidad Aparente}}{\text{Densidad Real}} \times 100$$

Medición de la Porosidad

La porosidad de las muestras de lactato de quitosano se calculó en función de la densidad en % [15]:

$$\text{Porosidad} = 100 - (\% \text{ Densidad}) \quad [16]$$

Por ESEM se pudo ver la porosidad.

Análisis térmico del lactato de quitosano

Para ver el comportamiento del material, se hizo un calentamiento primero a 100°C y luego a 200°C.

Calentamiento a vacío a 100°C del lactato de quitosano

Se hizo un calentamiento a vacío a 100°C a varios trozos de lactato de quitosano durante tres horas y se caracterizó.

Calentamiento a vacío a 200°C del lactato de quitosano

Se hizo un calentamiento a vacío a 200°C a varios trozos de lactato de quitosano durante tres horas y se caracterizó.

ENSAYOS CELULARES

Los ensayos celulares se hicieron en el laboratorio de Células del Instituto de Ciencia y Tecnología de Polímeros del CSIC.

PRUEBAS DE CITOTOXICIDAD

Medida de la viabilidad celular utilizando el ensayo de MTT (ensayo indirecto)

Se hizo un MTT a las muestras con Osteosarcomas para mirar si los materiales presentan citotoxicidad.

Antes del análisis, se colocaron dos pastillas del lactato de quitosano calentado a vacío a 200°C a esterilizar con radiación ultravioleta(UV), como el estudio es para osteosarcomas, se utilizó un medio SEMI fresco y estéril con una composición de 1% de Penisilina/ Estreptomina, 1% de NEA (Aminoácido esencial), 2% de L Glutamida (200mMol). Se pusieron 5 ml de este medio a cada material. Luego se tomaron dos tubos y se puso 5 ml de medio SEMI a cada tubo que se llamó control (C). Se dejaron las muestras y el control a 37°C y en agitación.

A determinados intervalos de tiempo (1, 2, 7, 14 y 21 días) se retiró el eluyente, se congelo y se repuso con medio SEMI fresco. Cuando se tuvieron los eluyentes a los diferentes tiempos se comenzó el protocolo siguiente:

1. Primer día:

- Se sembraron 9×10^4 células/mL en una placa de 96 pocillos. Una de las columnas quedo libre para servir de blanco.
- Se Tripsinizo 3 frascos, que fueron los necesarios para obtener la densidad indicada, (frasco de 75 cm³ necesita como 4 ml de tripsina-edta). Se dejó 5 min a 37 °C. Cuando estuvieron levantadas se neutralizo la tripsina con 4 ml de medio fresco.
- Se Centrifugo a 3000 rpm durante 10 min.
- Se eliminó el sobrenadante.
- Se añadió 1 ml de medio fresco completo con fibroblastos humanos (FBH).
- Se contó las células levantadas utilizando cámara de Neubauer y Trypan Blue que tiñe de azul aquellas células que estén vivas, o el contador automático de Invitrogen.
- Se colocó 100 µl de suspensión de células en cada pocillo y se incubo durante 24 horas a 37°C.

2. Segundo día:

- Se eliminó el medio de los pocillos una vez transcurridas las 24 horas. Se Colocó en cada pocillo 100µl de los eluyentes correspondientes medio semi a una fila (previamente descongelados y filtrados).
- Se incubo a 37°C durante 24 h.

3. Tercer día:

- Se preparó una disolución de MTT en PBS: 0.050 g de MTT en 10 ml de PBS.
- Se diluyo este MTT al 10% en medio semi fresco.
- Se retiró los eluyentes de los pocillos.
- Se añadió 100 µl de la disolución anterior a cada pocillo.

- Se incubo durante 3 horas a 37°C.
- Se retiró el MTT y se añadió 100 µl de dimetilsulfósido (DMSO), que disuelve los cristales de formazan en la mitocondria de la célula.
- Se Leyó la absorbancia a 570 nm.

Cuando se realizó la lectura, a los valores de absorbancia recogidos se les resto los valores obtenidos para el blanco y se relativizaron con respecto a los medidos para el control negativo, TMX, a partir de la formula siguiente[21]:

$$\%TMX = \frac{DO_s - DO_B}{DO_c} \times 100$$

Donde,

DO_s, DO_B y DO_c son las medidas de densidad óptica de la muestra, el blanco (MEM introducido en pocillos sin células) y el control[21]. Posteriormente se realizó una serie de análisis de la varianza (ANOVA) empleando el paquete estadístico Statistica™, con el fin de comparar los resultados obtenidos para las formulaciones problema con respecto a este control.

REFERENCIAS

- [1] Núñez A, Triana, L. Espectroscopía de IR/ATR UAEM-UNAM 2014.
- [2] Barbero E. Microanálisis. Centro de Química Orgánica Lora-Tamayo. 2014.
- [3] Chojnacka J. Difracción de Rayos X. Instituto de Ciencia y Tecnología de Polímeros Centro de Química Orgánica Manuel Lora-Tamayo. 2014.
- [4] Martínez AE, H.E. . Caracterización estructural y morfológica de hidroxiapatita nanoestructurada: estudio comparativo de diferentes métodos de síntesis. *Superficies y Vacío* 2008.;21:18-21.
- [5] Londoño M, Echavarría A. Características cristaloquímicas de la hidroxiapatita sintética tratada a diferentes temperaturas. *Revista EIA*, ISSN 1794-1237. 2006;5:112.

- [6] Aina V, Bergandi L, Lusvardi G, Malavasi G, Imrie FE, Gibson IR, et al. Sr-containing hydroxyapatite: Morphologies of HA crystals and bioactivity on osteoblast cells. *Materials Science and Engineering C*. 2013;33:1132-42.
- [7] Vallet-Regí M, Rodríguez-Lorenzo LM, Salinas AJ. Synthesis and characterisation of calcium deficient apatite. *Solid State Ionics*. 1997;101-103:1279-85.
- [8] Chojnacka J. Análisis termogravimétrico Instituto de Ciencia y Tecnología de Polímeros Centro de Química Orgánica Manuel Lora-Tamayo. 2014.
- [9] Gómez D. Microscopio electrónico de barrido de alta resolución con filamento de emisión de campo. Instituto de Ciencia y Tecnología de Polímeros Centro de Química Orgánica Manuel Lora-Tamayo. 2014.
- [10] Allen E. Soluble metals and semi-metals in nitric acid mixture + hot perchloric. *Chemical Analysis of Ecological Materials* Blackwell Scientific Publications Oxford Instrumental Methods for Analysis of Soils and Plant Tissue, Soil Science Society of America 1989;2.
- [11] Trias M. Picnómetro de helio. Biomateriales, Biomecánica e Ingeniería de Tejidos (BIBITE) Universitat Politècnica de Catalunya Barcelona-España 2014.
- [12] Pérez H. Principio de Arquímedes. Física general Grupo Editorial Patria edición 4. 2011.
- [13] Hewitt P. Principio de Arquímedes. Conceptos de Física, Editorial Limusa SA de CV. 2009.
- [14] Tippens P. Principio de Arquímedes. FÍSICA conceptos y aplicaciones, Editorial: MCGRAW HILL, edición 7. 2011.
- [15] Silva J. Smart Systems for Tissue Engineering: Combinig natural and synthetic origin polymers. Consejo Superior de Investigaciones Científicas- Instituto de Ciencia y Tecnología de Polímeros Departamento de Biomateriales. 2008:46.
- [16] Almirall A, Larrecq G, Delgado JA, Martínez S, Planell JA, Ginebra MP. Fabrication of low temperature macroporous hydroxyapatite scaffolds by foaming and hydrolysis of an α -TCP paste. *Biomaterials*. 2004;25:3671-80.

- [17] Benavente R. Microdureza. Estado Sólido de Polímeros, Propiedades Mecánicas Master de Alta especialización en Plásticos y Cauchos (UIMP-CSIC) 2009;2:27-31.
- [18] Alderliesten M. A Nomenclature For Mean Particle Diameters. Analytical Proceedings, Royal Society of Chemistry, London, England. 1984;21.
- [19] Irani RR CC. Size: Measurement, Interpretation and Application. John Wiley and Sons, Inc, New York-London. 1963.
- [20] Nielsen M, Fisk, M. Data report: specific surface area and physical properties of subsurface basalt samples from the east flank of Juan de Fuca Ridge. Integrated Ocean Drilling Program. 2008; 301:2.
- [21] Parra J. Sistemas macromoleculares con actividad farmacológica, análisis in vitro de su biocompatibilidad y bioactividad a nivel celular. Instituto de Ciencia y Tecnología de Polímeros-Departamento de Química Macromolecular, Complejo Hospitalario de Ávila- Hospital Provincial Unidad de Investigación Clínica y Biopatología Experimental. 2006:96-8.
- [22] Niu QX, Zhao CY, Jing ZA. An evaluation of the colorimetric assays based on enzymatic reactions used in the measurement of human natural cytotoxicity. Journal of Immunological Methods. 2001;251:11-9.
- [23] Pastor de Abram A. Quitina y quitosano: Obtención, caracterización y aplicaciones. Pontificia Universidad Católica de Perú, Fondo Editorial. 2004.
- [24] Bovey FA. Comprehensive polymer science: The synthesis, characterization, reactions and applications of polymers. . Oxford, Pergamon Press, 1989 Chapter XVII, . 1989:339-76.
- [25] McBrierty VJ. Comprehensive polymer science: The synthesis, characterization, reactions and applications of polymers. . Oxford, Pergamon Press, Chapter XIX. 1989.:397-428.