



Universidad Autónoma de Baja California
FACULTAD DE INGENIERÍA, ARQUITECTURA Y DISEÑO
Maestría y Doctorado en Ciencias e Ingeniería

**SÍNTESIS DE VIDRIOS BIOACTIVOS IMPREGNADOS CON
NANOPARTÍCULAS DE ÓXIDO DE ZINC COMO BIOMATERIAL
PARA LA REGENERACIÓN DE TEJIDO ÓSEO**

T E S I S

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE
MAESTRO EN INGENIERÍA**

PRESENTA

Carlos Edén Moreno Angulo

DIRECTOR

Dr. Priscy Alfredo Luque Morales

Ensenada, Baja California, México, Junio 2018

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA

FACULTAD DE INGENIERÍA, ARQUITECTURA Y DISEÑO

SINTESIS DE VIDROS BIOACTIVOS IMPREGNADOS CON NANOPARTÍCULAS DE ÓXIDO DE ZINC COMO BIOMATERIAL PARA LA REGENERACIÓN DE TEJIDO ÓSEO

TESIS

Que para obtener el grado de MAESTRO EN INGENIERÍA presenta:

CARLOS EDÉN MORENO ANGULO

Aprobada por:



Dr. Priscy Alfredo Luque Morales
Director de tesis



Dra. Amanda Carrillo Castillo
Codirector de tesis



Dra. María de los Ángeles Cosío León
Miembro del comité



Dra. Claudia Mariana Gómez Gutiérrez
Miembro del comité



Dr. Rubén Cesar Villarreal Sánchez
Miembro del comité

Ensenada, Baja California, México, Junio 2018

RESUMEN de la tesis de **CARLOS EDÉN MORENO ANGULO** presentada como requisito parcial para la obtención del grado MAESTRO EN INGENIERÍA del programa de Maestría y Doctorado en Ciencias e Ingeniería de la Universidad Autónoma de Baja California. Ensenada, Baja California, México, Junio del 2018.

**Síntesis de vidrios bioactivos impregnados con nanopartículas de óxido de zinc
como biomaterial para la regeneración de tejido óseo**

Aprobada por



Dra. Amanda Carrillo Castillo
Codirector de tesis



Dr. Priscy Alfredo Luque Morales
Director de tesis

Resumen:

En este trabajo se reporta la síntesis y caracterización de vidrios bioactivos (biovidrios), con diferentes concentraciones de nanopartículas de óxido de zinc (NP's ZnO) obtenidos por el método sol-gel/microondas, los biovidrios obtenidos por este método no necesitan altas temperaturas de fusión para su obtención y es posible sintetizarlos con mayor pureza y homogeneidad. Las nanopartículas con las cuales se reforzaron los biovidrios se obtuvieron por el método de química verde, el cual es amigable y seguro con el medio ambiente, esto, con la finalidad de mejorar las propiedades bioactivas y biológicas de los biovidrios, además, de añadirles propiedades antimicrobianas. Los materiales sintetizados se caracterizaron mediante las técnicas de Espectroscopia Infrarroja con Transformada de Fourier (FT-IR), Espectroscopia Ultravioleta-Visible (UV-Vis) y Difracción de Rayos X (DRX), esto con la finalidad de conocer sus propiedades químicas, ópticas y microestructurales. Los biovidrios se evaluaron toxicológicamente en cultivos de *Escherichia coli* y se sumergieron en un Fluido Fisiológico Simulado (SBF), el cual simula las condiciones del medio donde serán injertados (*in vitro*). Se observó la formación de apatita en diferentes intervalos de tiempo en el fluido y se caracterizaron de nuevo para determinar su bioactividad.

Palabras clave: Biovidrios (BG); Nanopartículas de óxido de zinc (NP's ZnO); Compuesto (BG-NP's ZnO); Biomaterial; Bioactividad; Biocompatibilidad.

**“Equipado con sus cinco sentidos, el hombre
explora el universo que lo rodea y a sus
aventuras las llama Ciencia.”**

Edwin Powell Hubble.

DEDICATORIA

En primer lugar, a Dios, por su misericordia, bondad y cuidarme en todo momento para poder alcanzar mis metas y escribir esta tesis, gracias por colocar en mi camino a cada una de las personas que han sido motivación y alegría a lo largo de mi vida y me alientan a ser mejor día con día.

A mis padres, Araceli Angulo Evans y Carlos R. Moreno López, por ser sinónimos de perseverancia, constancia, trabajo, pasión y apoyo. Además, por sus grandes esfuerzos en mi educación y crianza, por los valores que siempre me han inculcado con su ejemplo. A ustedes por su amor incondicional siempre.

A mi hermana, Araceli, por su amor y el tenerme siempre presente en sus oraciones deseándome bienestar y apoyándome para lograr mis objetivos, te quiero mucho.

Al resto de mis familiares, a los cuales aprecio y estimo mucho, gracias por brindarme su apoyo, consejos y motivaciones. Mi más grande admiración para ustedes.

A mis amigos por brindarme su aprecio, por sus consejos y su apoyo a lo largo de todo este tiempo, pero en especial por todas las experiencias vividas, a todos ustedes muchas gracias.

A mis profesores por el tiempo que me dedicaron y por tantas enseñanzas adquiridas las cuales han sido parte fundamental para llegar a este punto de mi vida académica y profesional.

DEDICATORIA ESPECIAL

A Karla Aracely Alvarez Bernal y Annya Araceli Moreno Alvarez, mi pequeña y hermosa familia, por ser mi motivación e inspiración cada día de mi vida, por su paciencia y apoyo. Pero, sobre todo, por su inmenso amor y la infinita felicidad que me brindan.

AGRADECIMIENTOS

El más profundo agradecimiento a mi asesor el Dr. Priscy Alfredo Luque Morales, por su guía y enseñanzas para la realización de este trabajo, además, por abrirme las puertas de su grupo de trabajo, brindándome la oportunidad de crecer, sino también, por su confianza, consejos y sus constantes muestras de apoyo.

A mi co-asesora la Dra. Amanda carrillo castillo, por su tiempo, enseñanzas, consejos y propuestas para llevar a cabo este trabajo de investigación, además, por su dedicación, paciencia y brindarme siempre su apoyo cuando era necesario. Muchas gracias.

A la Dra. Claudia Mariana Gómez Gutiérrez, por sus enseñanzas, por su tiempo y su valioso apoyo dentro y fuera de los laboratorios de la universidad, además, por brindarme su confianza.

A la Dra. María Cosío y el Dr. Rubén Villarreal gracias por su tiempo y disposición que siempre tuvieron hacia mi, por sus aportaciones, comentarios y preguntas, porque permitieron enriquecer este trabajo.

A la Facultad de Ingeniería, Arquitectura y Diseño de la Universidad Autónoma de Baja California, por brindarme sus instalaciones, equipos y herramientas, sin las cuales hubiese sido imposible la realización de este trabajo.

Mi agradecimiento a todos mis compañeros, por brindarme sus consejos, paciencia y apoyo, pero, sobre todo, por permitirme ser parte de esta maravillosa familia académica.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo recibido durante estos dos años, para llevar a cabo mis estudios de maestría dentro del programa de Maestría y Doctorado en Ciencias e Ingeniería (MyDCI) de la universidad autónoma de baja california campus Ensenada.

ÍNDICE TEMÁTICO

<i>DEDICATORIA</i>	V
<i>AGRADECIMIENTOS</i>	VI
<i>ÍNDICE TEMÁTICO</i>	VII
<i>ÍNDICE DE FIGURAS</i>	X
<i>ÍNDICE DE TABLAS</i>	XIII
CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN	2
1.1. Tejido óseo	3
1.2. Composición de los huesos	3
1.3. Estructura y funcionamiento de los huesos	4
1.4. Biomateriales	6
1.4.1. Biomateriales metálicos	7
1.4.2. Biomateriales poliméricos.....	7
1.4.3. Biomateriales cerámicos	7
1.4.4. Biomateriales compuestos.....	8
1.5. Biocompatibilidad	10
1.6. Bioactividad.....	10
1.7. Vidrios bioactivos.....	10
1.7.1. Estructura de los vidrios bioactivos	11
1.7.2. Síntesis de vidrios bioactivos por método de fusión.....	13
1.7.3. Síntesis de vidrios bioactivos por el método sol-gel.....	14
1.8. Materiales nanoestructurados	16
1.9. Nanopartículas de ZnO.....	17
1.9.1. Síntesis de nanopartículas por el método de química verde	18
1.10. Tratamientos térmicos	18
1.11. Técnica por microondas	19
1.12. Objetivo general	20
1.13. Objetivos específicos.....	20
CAPÍTULO II. FUNDAMENTOS Y TÉCNICAS	22
2.1. Espectroscopia Infrarroja con Transformada de Fourier (FT-IR).....	22
2.2. Espectroscopia de luz Ultravioleta y Visible (UV-Vis).....	24
2.3. Difracción de Rayos X (DRX).....	26
2.5. Fluido Fisiológico Simulado (SBF)	29

CAPÍTULO III. DESARROLLO EXPERIMENTAL	33
3.1. Síntesis de vidrios bioactivos (Bioglass 45S5)	33
3.1.1. Reactivos	33
3.1.2. Materiales-Equipo de laboratorio.....	34
3.1.3. Método	34
3.2. Síntesis de nanopartículas de óxido de zinc	38
3.2.1. Reactivos	38
3.2.2. Materiales/Equipo de laboratorio.....	38
3.2.3. Obtención de extracto o jugo de zanahoria	39
3.2.4. Síntesis de NP's de ZnO	39
3.3. Síntesis del compuesto BG-NP's ZnO	40
3.3.1. Método	41
3.4. Preparación de Fluido Fisiológico Simulado (SBF).....	42
3.4.1. Reactivos:.....	43
3.4.2. Materiales/Equipo de laboratorio.....	43
3.4.3. Método	44
3.5. Prueba de inhibición antimicrobiana	46
3.5.1. Cepa bacteriana	47
3.5.2. Preparación de medios de cultivo	47
3.5.3. Método	47
3.6. Prueba de bioactividad	48
3.7. Espectroscopia Infrarroja por Transformada de Fourier (FT-IR).....	48
3.8. Espectroscopia Ultravioleta Visible (UV-Vis).....	49
3.9. Difracción de Rayos X (DRX)	49
CAPÍTULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	51
4.1. Preparación de vidrios bioactivos y material compuesto	51
4.2. Caracterización de vidrios bioactivos 45S5	53
4.2.1. Espectroscopia Infrarroja por Transformada de Fourier (FT-IR)	53
4.2.2. Espectroscopia Ultravioleta Visible (UV-Vis).....	54
4.3. Caracterización de nanopartículas de óxido de zinc (NP's ZnO)	55
4.3.1. Espectroscopia Infrarroja por Transformada de Fourier (FT-IR)	55
4.3.2. Espectroscopia Ultravioleta Visible (UV-Vis).....	56
4.3.3. Difracción de Rayos X (DRX).....	56
4.4. Caracterización de los materiales compuestos (BG-NP's ZnO).....	58

4.4.1.	Espectroscopia Infrarroja por Transformada de Fourier (FT-IR)	58
4.4.2.	Espectroscopia Ultravioleta Visible (UV-Vis).....	59
4.4.3.	Difracción de Rayos X (DRX).....	59
4.5.	Caracterización después de la inmersión en Fluido Fisiológico Simulado.....	60
4.5.1.	Espectroscopía Infrarroja por Transformada de Fourier (FT-IR)	60
4.5.2.	Difracción de Rayos X (DRX).....	63
4.6.	Prueba de actividad antimicrobiana	64
CAPÍTULO V. CONCLUSIONES.....		67
BIBLIOGRAFÍA.....		69

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Esquema de corte longitudinal de un hueso, mostrando su estructura y sus componentes.....	5
Figura 2. Esquema organizacional de la clasificación de los materiales compuestos.	9
Figura 3. Presentación de los vidrios bioactivos como se encuentran actualmente en el mercado.	11
Figura 4. Unidades estructurales básicas SiO_4 unidas por los enlaces Si-O-Si, que forman los grupos de oxígenos enlazantes.....	12
Figura 5. Incorporación de los iones del modificador de red (Na^+), en la estructura de un vidrio con Na_2O y forman los grupos de oxígenos no enlazantes.....	13
Figura 6. Esquema general de la obtención de los vidrios bioactivos por el método de fusión.....	14
Figura 7. Esquema general del método sol-gel para vidrios bioactivos.....	15
Figura 8. Fase hexagonal de ZnO , estructura de wurtzita.....	17
Figura 9. Esquema general del funcionamiento de un horno de microondas.	19
Figura 10. Esquema básico del funcionamiento de un infrarrojo.	23
Figura 11. Spectrum two FT-IR con UATR (Perkin Elmer).	24
Figura 12. Esquema de un espectrofotómetro UV-Vis.....	25
Figura 13. Rango de la luz ultravioleta y visible en el espectro electromagnético.....	26
Figura 14. La interacción entre los rayos X al incidir en la estructura cristalina del material	28
Figura 15. Difractómetro de Rayos X RigaLab SmartLab.	28
Figura 16. Esquema representativo de las etapas del mecanismo de bioactividad propuesto por L. Hench y colaboradores	30
Figura 17. Esquema general de la metodología.	33
Figura 18. Mezcla de ácido nítrico con TEOS en agitación vigorosa.....	34
Figura 19. Adición de trietilfosfato a la mezcla inicial de ácido y TEOS.	35

Figura 20. Adición de NaOH, la solución policondensa formando un gel de color blanco.	35
Figura 21. Adición de NaCl ₂ al gel anteriormente formado.	36
Figura 22. Envejecimiento del gel durante 13 días y el polvo obtenido una vez secado en microondas y pulverizado en el mortero de ágata.	36
Figura 23. Horno de microondas Kenmore Countertop presente en laboratorio de bioingeniería de la UABC.	37
Figura 24. Obtención y filtrado del extracto de <i>Daucus carota</i> (zanahoria).	39
Figura 25. Baño maría y tratamiento térmico de las NP's ZnO.	40
Figura 26. Adición de nanopartículas de óxido de zinc, para formar el biomaterial compuesto.	41
Figura 27. Diagrama de flujo de la metodología para la síntesis de los compuestos.	42
Figura 28. Materiales sintetizados por método sol-gel/microondas, vidrio bioactivo 45S5 (BG) Compuesto BG-NP's ZnO (A), Compuesto BG-NP's ZnO (B), Compuesto BG-NP's ZnO (C).	52
Figura 29. Espectro FT-IR del biovidrio denominado 45S5 obtenido por el método sol gel/microondas.	53
Figura 30. Espectro UV-Vis obtenido de la caracterización de los biovidrios 45S5.	54
Figura 31. Espectro FT-IR de las nanopartículas de óxido de zinc sintetizadas por el método de química verde.	55
Figura 32. Espectro UV-Vis obtenido de la caracterización de las NP's ZnO.	56
Figura 33. Patrón de Difracción de Rayos X en polvo de NP's ZnO biosintetizadas. ...	57
Figura 34. Espectro FT-IR de los diferentes materiales compuestos BG-NP's ZnO.	58
Figura 35. Espectro UV-Vis obtenido de los tres compuestos sintetizados (A, B y C). ..	59
Figura 36. Espectro DRX del material compuesto C (BG-NP's ZnO).	60
Figura 37. Espectro FT-IR del vidrio 45S5 y los compuestos (A, B, C) después de 7 días en fluido fisiológico simulado.	62

Figura 38. Espectro FT-IR del vidrio 45S5 y los compuestos (A, B, C) después de 14 días en Fluido Fisiológico Simulado.....	62
Figura 39. Espectro FT-IR del vidrio 45S5 y los compuestos (A, B, C) después de 14 días en Fluido Fisiológico Simulado.....	63
Figura 40. Espectro DRX del compuesto C (BG-NP's ZnO), después de la inmersión en SBF.....	64
Figura 41. Fotografías que muestran la no inhibición de los materiales (BG, A, B) y la inhibición del material (C).	65

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Composición ósea.	4
Tabla 2. Comparación de los iones presentes en el plasma sanguíneo y los iones presentes en el Fluido Fisiológico Simulado.	29
Tabla 3. Tiempo de exposición a la radiación por microondas.....	37
Tabla 4. Reactivos para la preparación de SBF.	44
Tabla 5. Relaciones de composición en peso de los vidrios bioactivos y los materiales compuestos.....	51

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN

En la actualidad muchas enfermedades y lesiones relacionadas con el tejido óseo requieren de una intervención quirúrgica para implantar un biomaterial o un dispositivo médico. Lamentablemente, estos biomateriales o dispositivos no siempre están al alcance de toda la población, por lo que es necesaria la búsqueda de procedimientos que logren disminuir los costos de obtención de estos materiales, pero que sean igual de funcionales o en la idealidad de los casos, mejores que los disponibles actualmente en el mercado de los biomateriales [1].

En los últimos años, los índices de éxito de dichas intervenciones relacionadas con problemas o afecciones del tejido óseo son elevados, pero todavía hay aspectos mejorables entre los que cabe destacar el diseño de técnicas quirúrgicas menos agresivas, la anticipación del tratamiento de las enfermedades degenerativas y la mejora de los biomateriales y dispositivos implantables [2].

La implementación de los biomateriales en el campo biomédico se ha incrementado en los últimos años con el desarrollo de nuevas tecnologías. Los mayores avances se han producido en los últimos 40 años, donde el número de materiales y patentes aumentaron de manera significativa [3].

Desde el destacado anuncio durante 1971 de Hench con su descubrimiento del Bioglass (45S5), que no solo actúa como candidato inerte sino como poroso y que también es capaz de generar un vínculo químico cercano tanto con los tejidos circundantes como con los huesos, que prácticamente abrió el camino hacia el futuro para la generación del tejido óseo con biomateriales. En la última década, el diseño de los biomateriales está experimentando una gradual evolución desde la ingeniería de materiales hacia los dispositivos basados en la ingeniería de tejidos [4].

El cirujano dispone de muchas posibilidades para sustituir o reparar las afecciones del tejido óseo. Los sustitutos óseos forman parte en la actualidad del

armamento del cual el cirujano dispone para hacer frente a una afección ósea. Existen varias familias de ellos, la mayoría de origen sintético y algunos de origen biológico. La elección del sustituto óseo se realiza según muchos criterios, como la etiología, el estado local, el volumen que debe rellenarse, la edad del paciente, etcétera. También depende de la elección personal del cirujano en función de las ventajas e inconvenientes del sustituto óseo [5].

Para poder entender en forma más completa el proceso de reparación ósea, se deben considerar los mecanismos presentes en su fisiología normal. El hueso humano es un tejido dinámico y metabólicamente activo que sufre un proceso continuo de remodelado, lo que confiere al esqueleto su capacidad regenerativa y de adaptación funcional. Este proceso de remodelado a lo largo de la vida a través de la formación de nuevo tejido se produce por parte de los osteoblastos, y la resorción ósea, producida por osteoclastos [6].

1.1. Tejido óseo

El tejido óseo es un tejido conectivo especializado que forma el esqueleto, es el conjunto de células con extensas prolongaciones y materia orgánica, que presenta sales de calcio. Este es el elemento que le otorga la rigidez y la resistencia a los huesos. Este sirve al cuerpo con varios propósitos, entre ellos el de dar soporte, otorgándole una estructura rígida a los músculos; el de movimiento, la combinación de los músculos y los huesos por medio de los tendones permite los movimientos; el de otorgar protección, ya que el esqueleto forma cavidades protegiendo a distintos órganos internos y sirve como almacén de minerales, puesto que se depositan en los huesos, fundamentalmente calcio (Ca) y fosforo (P) [7].

1.2. Composición de los huesos

El hueso está compuesto por diversas células y por una matriz extracelular, cuyos principales componentes son colágeno tipo I, hidroxipatita y agua. En la Tabla 1 se

muestran los porcentajes y componentes óseos. Además, la composición del hueso depende de varios factores como la edad, genética, efectos ambientales y su localización dentro del cuerpo. En promedio dos tercios de sus componentes corresponden a la fase mineral es decir un 70% corresponde a la parte inorgánica (hidroxiapatita) y el resto a la fase orgánica (matriz extracelular) en un 22% y agua en un 8% [8,9].

Tabla 1. Composición ósea.

Materia inorgánica 70%	Hidroxiapatita (Carbonato de calcio, Fosfato de calcio)
Materia orgánica 22%	Componentes celulares y matriz extracelular (Colágeno I y V)
Agua 8%	

El componente inorgánico, está compuesto en un 95% de cristales de apatita análoga y en un 5% de otros minerales como sodio, potasio, estroncio, fluoruros, cloruros, entre otras. Estos cristales son producidos por los osteoblastos, y tienen un tamaño de 30 nm, se depositan entre las fibras de colágeno otorgándole rigidez al hueso. El componente orgánico está compuesto en mayor parte por colágenos tipo I y V, sintetizado por osteoblastos, esta proteína le confiere al hueso resistencia a la tracción, elasticidad y flexibilidad [10].

1.3. Estructura y funcionamiento de los huesos

El hueso se forma a través de tres tipos de células especializadas los fibroblastos, osteoblastos y osteocitos. Se pueden clasificar según su estructura, en esponjoso y compacto como se puede observar en la Figura 1, el hueso esponjoso, posee una estructura con una porosidad variable entre 50 y 90% interconectados. El hueso compacto es más denso que el esponjoso, con una porosidad de 5% y se encuentra en la superficie de las estructuras óseas y varía su espesor según su localización. El ostión es la unidad funcional del hueso, está compuesto de varias capas que crecen alrededor de

un canal llamado canal haversiano, en el cual se encuentran los vasos sanguíneos y las fibras nerviosas. Cada capa se conecta a través de conductos conocidos como lagunas, donde se encuentran los osteocitos que facilitan la comunicación celular [11].

Más allá de su clasificación a la estructura ósea se le puede adjudicar para su estudio una organización jerárquica, cuyo nivel más alto es el hueso órgano. Este se da como resultante de la sumatoria de los niveles que lo constituyen inferiormente, obteniendo un hueso funcional articulado con otros huesos [12].

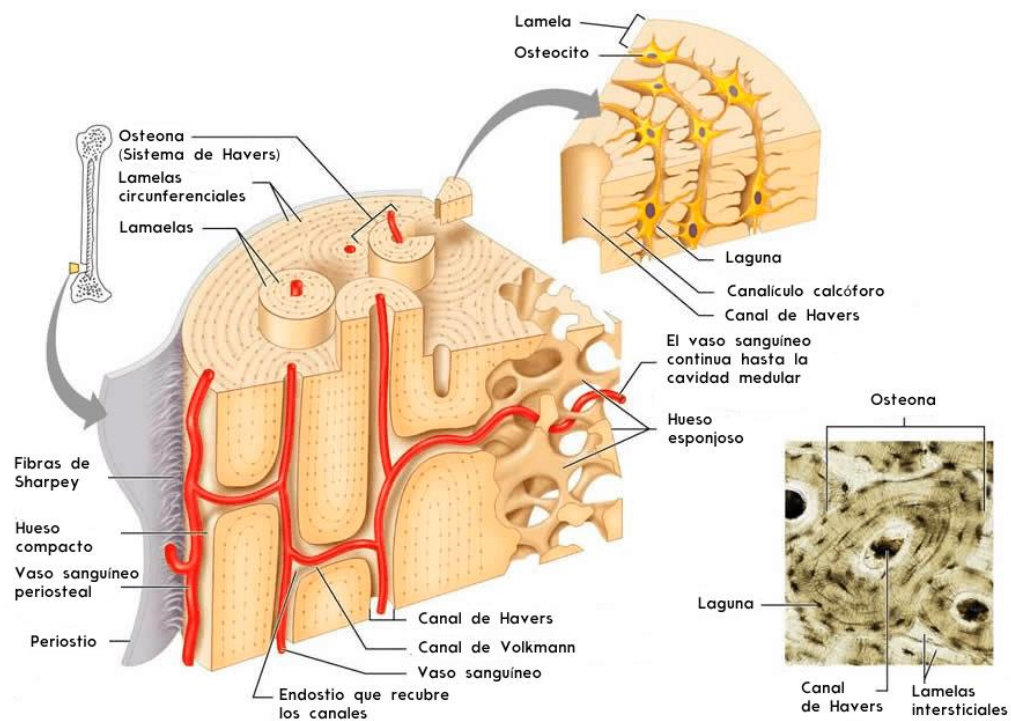


Figura 1. Esquema de corte longitudinal de un hueso, mostrando su estructura y sus componentes [13].

Al proceso de formación del hueso se le denomina osteogénesis y ocurre en 2 etapas, esto implica dos osificaciones diferentes, la primera, osificación endocondrala, este tipo de osificación da lugar a la formación de la mayoría de los huesos del cuerpo, esta osificación produce el cartílago a partir de la diferenciación de las células mesenquimales. Osificación intramembranosa este tipo de osificación se origina en

membranas mesenquimáticas, las células en estas membranas se diferencian a osteoblastos, luego elaboran matriz extracelular que posteriormente mineraliza durante el crecimiento, es en esta etapa donde se depositan los cristales de apatita que le otorgan la fuerza y rigidez característica del hueso [14].

1.4. Biomateriales

Un biomaterial es aquel material ideado para interactuar con los sistemas biológicos con el objetivo de evaluar, tratar, aumentar o sustituir cualquier tejido, órgano o función del cuerpo, principalmente los del cuerpo humano. El trabajo con biomateriales implica el diseño, desarrollo y elaboración de materiales capaces de tener un contacto íntimo con un tejido viviente, para producir una función específica con fines terapéuticos [15].

Los biomateriales pueden ser de origen sintético o biológico, en el primero de los casos podemos mencionar a los materiales metálicos, poliméricos, cerámicos y compuestos. En el segundo de los casos los biomateriales biológicos, por ejemplo, fragmentos de huesos, injertos de piel, matriz extracelular hasta células madres humanas o animales [16].

El objetivo principal de los biomateriales es reemplazar y/o restaurar una función o una parte de un tejido y al tratarse de un material que va a ser implantado en un organismo vivo, debe cumplir con ciertos requisitos o características: ser biocompatible, no ser tóxico, ni carcinógeno, ser químicamente estable y tener resistencia mecánica adecuada a la del tejido hospedero. A estas características, podemos añadir las de ser un material barato, con propiedades reproducibles y fácil de fabricar [17].

En la actualidad se experimentan materiales de diferente naturaleza para utilizarlos como implantes en distintos tejidos del cuerpo, tales como metales y sus aleaciones, polímeros naturales y sintéticos, biovidrios y cerámicos, además de algunas combinaciones entre ellos denominados materiales compuestos [18].

1.4.1. Biomateriales metálicos

Los biomateriales metálicos, junto con sus aleaciones, son los más utilizados para implantes ortopédicos (clavos, alambres, placas) e implantes dentales (tornillos), ya que deben poseer una gran resistencia al desgaste mecánico y ser capaces de soportar la carga adecuada para su función. El primer requisito para su utilización es que sean tolerados por el organismo, por lo que es muy importante la dosis que puedan aportar a los tejidos vivos [19].

Los metales más usados para la fabricación de estos implantes son: acero inoxidable, aleaciones de cobalto con cromo, molibdeno y níquel, titanio puro y sus aleaciones con aluminio y vanadio. Unas de las principales características a considerar son los costos de obtención [19].

1.4.2. Biomateriales poliméricos

Los materiales poliméricos son macromoléculas, principalmente orgánicas, formadas por la unión de moléculas más pequeñas llamadas monómeros. Generalmente son empleados para dispositivos cardiovasculares, prótesis faciales, partes de prótesis de oído, aplicaciones dentales, marcapasos, riñones, hígado y pulmones, así como en el reemplazo y mejora de tejidos blandos. Existe una gran variedad de polímeros biocompatibles. Los polímeros naturales, como la celulosa y polímeros sintéticos, como el polietileno de ultra alto peso molecular, policloruro de vinilo (PVC), nylon, silicona, entre otros. Las propiedades de estos materiales dependen ampliamente de su composición y estructura de las cadenas macromoleculares y su peso molecular. Una de sus principales desventajas es su baja resistencia al desgaste mecánico [20].

1.4.3. Biomateriales cerámicos

Los materiales cerámicos poseen una excelente biocompatibilidad y osteointegración, además, son los materiales más parecidos al componente mineral del

hueso, por lo que sus expectativas de aplicación son muy amplias, normalmente utilizados para reparaciones óseas y dentales, los cerámicos son materiales sólidos inorgánicos obtenidos mediante tratamientos térmicos. Ejemplos de ellos son, alúmina, vidrios, vidrio-cerámicos y porcelana, ampliamente usados en odontología para sustituir coronas, cementos vítreos y como rellenos. Sus ventajas principales son su alta resistencia a la corrosión y el parecido estructural que comparten con las estructuras óseas del cuerpo humano; pero una de sus principales desventajas es la carencia de propiedades mecánicas, ya que son muy frágiles y quebradizos [21].

1.4.4. Biomateriales compuestos

Los biomateriales compuestos se definen como las combinaciones de dos o más materiales, a partir de una unión química o no química. Estos materiales que forman el compuesto poseen propiedades mejores que las que presentan los materiales componentes por si solos. Los componentes del material compuesto no deben disolverse ni fusionarse completamente entre ellos, es decir, los materiales deben poderse identificar por medios físicos, ya que son heterogéneos y sus propiedades dependen de la orientación del material de refuerzo. Estos materiales surgen de la necesidad de obtener materiales que combinen las distintas propiedades de los materiales cerámicos, metálicos y poliméricos, a fin de compensar las debilidades que tienen cada material por separado con las fortalezas que ofrecen los otros [22].

Todos los materiales compuestos están estructurados por un agente reforzante y una matriz y pueden clasificarse en función del tipo de matriz y en función de la forma que posee el refuerzo (Figura 2).

- *Materiales compuestos de matriz metálica.* Estos materiales tienen una alta resistencia y muy bajo peso.

- *Materiales compuestos de matriz polimérica.* Son materiales con buenas propiedades mecánicas, resistentes a la corrosión y a los agentes químicos y pueden ser moldeados con facilidad.
- *Compuestos reforzados por partículas.* La fase dispersa es más dura y resistente que la matriz. En esencia, la matriz transfiere parte del esfuerzo aplicado a las partículas, las cuales soportan una parte de la carga.
- *Compuestos reforzados por fibras.* El objetivo de estos compuestos es conseguir materiales con una elevada resistencia a la fatiga, rigidez, a bajas y altas temperaturas, en sí, conseguir una mejor relación resistencia-peso.
- *Compuestos estructurales.* Un material compuesto estructural está formado tanto por materiales compuestos como por materiales homogéneos y sus propiedades no solo dependen de los materiales constituyentes sino también dependerán del diseño de los elementos estructurales.

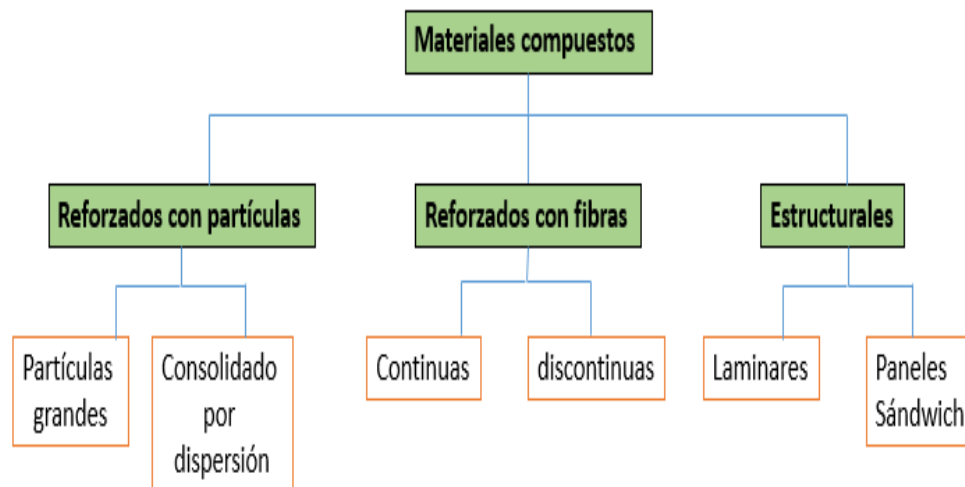


Figura 2. Esquema organizacional de la clasificación de los materiales compuestos [22].

1.5. Biocompatibilidad

Biocompatibilidad es la tolerancia biológica local de cualquier biomaterial, caracterizada por la ausencia de una respuesta inflamatoria aguda o crónica durante su implantación e incorporación, así como por la carencia de efectos nocivos sobre tejidos distantes. En sí, la biocompatibilidad es la integración al tejido huésped sin presentar efectos tóxicos o nocivos para la salud. La biocompatibilidad permite que el material sea aceptado por el organismo, por lo tanto, no hay rechazo del material o de sus productos de degradación [23].

1.6. Bioactividad

La bioactividad es la capacidad de un material para inducir, estimular, provocar o modular una acción biológica definida en el tejido receptor. Así, un material bioactivo es aquel que posibilita una respuesta biológica específica en su interfaz con los tejidos, favoreciendo el enlace de ambos [24].

1.7. Vidrios bioactivos

El primer vidrio bioactivo (biovidrio) estudiado fue el biovidrio (BG-45S5), de nombre comercial Bioglass® (Figura 3), creado por L. Hench en 1971 un profesor de la Universidad de Florida; este vidrio ha sido el más investigado para aplicaciones biomédicas, siendo utilizado en más de 1 millón de pacientes para reparar defectos óseos en la mandíbula y tratamientos ortopédicos. Este material es un vidrio de silicato basado en la red tridimensional de SiO_2 formada por vidrio, en la cual un átomo de silicio (Si) está coordinado con cuatro átomos de oxígeno (O), y además están presentes iones de fosfato (PO_4) y calcio (Ca). Se producía por el método de fusión y su composición específica es de 45% SiO_2 , 24.5% CaO , 24.5% Na_2O , 6% P_2O_5 porcentajes en peso. Se ha demostrado que es capaz estimular la neoformación de hueso *in vivo* y que promueve proliferación ósea en forma más rápida que HA sintética [25].

La utilización de biovidrios como material bioactivo se debió a la formación de cristales de apatita carbonada biológicamente activa, la cual presenta una estructura química similar a la fase mineral del hueso que favorece la unión directa entre el tejido hospedero y el implante después de entrar en contacto con fluidos fisiológicos. Cuando se implanta un vidrio bioactivo ocurre una secuencia de reacciones de interface entre tejido y material antes de su unión. Inicialmente se forman enlaces SiOH y luego la policondensación de SiOH para producir Si-O-Si, lo cual permite la adsorción de Ca, PO₄, CO₃ amorfo. Al tiempo se puede comprobar la presencia de cristales de hidroxycarbonato apatita (HCA) y adsorción de restos biológicos en capas de este material; posteriormente se da la activación de macrófagos y con ello la atracción de células madre, las cuales se diferencian en precursoras osteoblásticas iniciando el proceso de cristalización de la matriz ósea [26].



Figura 3. Presentación de los vidrios bioactivos como se encuentran actualmente en el mercado [27].

1.7.1. Estructura de los vidrios bioactivos

Los vidrios bioactivos poseen una estructura formada por una red de la sílice vítrea como la unión de unidades tetraédricas vecinas $[\text{SiO}_4]^{4-}$ para producir una

estructura reticular no cristalina, pero sólida. Los tetraedros están unidos entre sí por los 4 vértices con un átomo de Si en la posición central, dando lugar a una red tridimensional abierta y sin orden a largo alcance. En ella, cada átomo de silicio con una configuración electrónica externa $3s^2 3p^2$, pasa a un estado híbrido tetraédrico sp^3 con un electrón en cada híbrido. En esa situación se pueden presentar dos casos [28].

En el primero de los casos, cada átomo de oxígeno con una configuración electrónica $1s^2 2s^2 2p_x^2 2p_y^1 2p_z^1$, utiliza sus dos electrones desapareados en un enlace covalente con dos átomos de silicio vecinos (Figura 4), constituyendo así los llamados oxígenos enlazantes o BO.

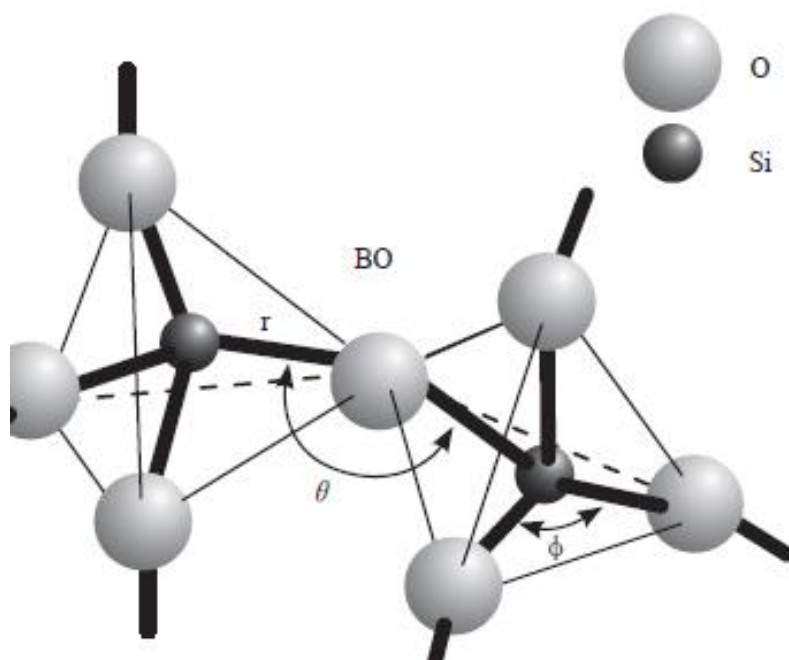


Figura 4. Unidades estructurales básicas SiO_4 unidas por los enlaces Si-O-Si, que forman los grupos de oxígenos enlazantes [29].

En el segundo caso, cada átomo de oxígeno utiliza uno de los electrones desapareados en un enlace covalente con un átomo de silicio vecino y el otro electrón permanece disponible para emparejarse con un ion alcalino (Figura 5). Este ion es

conocido como modificador de red (Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} , etc.) y el átomo de oxígeno en cuestión constituye el llamado oxígeno enlazaste o NBO.

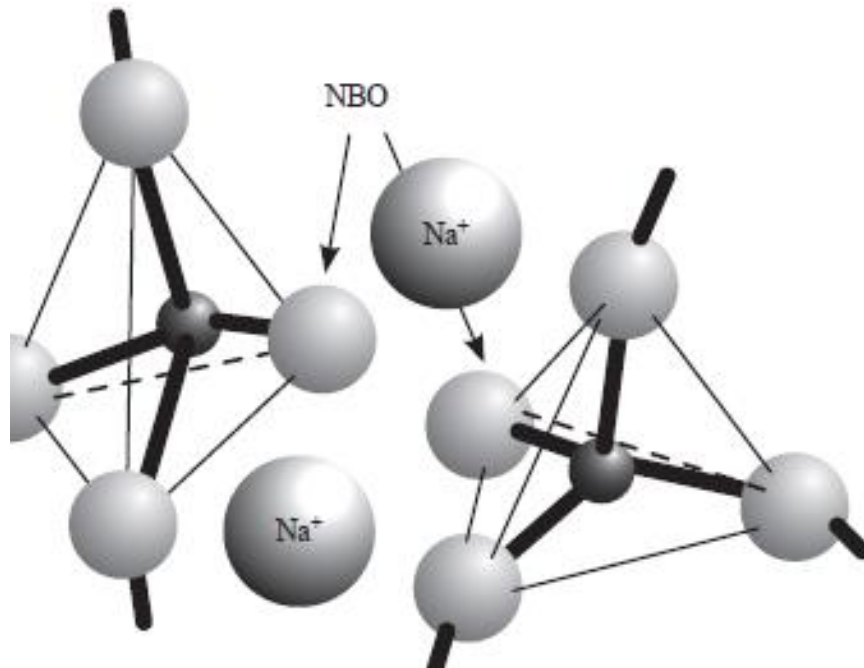


Figura 5. Incorporación de los iones del modificador de red (Na^+), en la estructura de un vidrio con Na_2O y forman los grupos de oxígenos no enlazantes [29].

1.7.2. Síntesis de vidrios bioactivos por método de fusión

Este método consiste en la fusión de una mezcla de reactivos, principalmente óxidos, a concentraciones molarmente adecuadas, seguidos de un enfriamiento rápido el cual produce un cambio en la viscosidad del fluido y por ello su solidificación (Figura 6). Las temperaturas para llevar a cabo este proceso superan los $1300\text{ }^{\circ}\text{C}$. Además, el sólido obtenido conserva la estructura desordenada del fluido por lo que el vidrio resultante puede definirse como un material sólido e inorgánico producto de la fusión y su enfriamiento hasta su rigidez sin que se haya producido la cristalización [30].

Los vidrios obtenidos por este método presentan muchas desventajas. Dado que cada componente precursor presenta distinto punto de fusión, en ocasiones la selección de precursores puede derivar en una distribución no homogénea y un grado de pureza bajo. Las principales desventajas son el uso de altas temperaturas, posibilidad de defectos como grietas, vetas, burbujas, escorias y su poca área superficial, los vidrios creados por fusión presentan un área superficial menor a $1 \text{ m}^2/\text{g}$ para partículas sin tratar y alrededor de $2 \text{ m}^2/\text{g}$ para partículas micrométricas [31].



Figura 6. Esquema general de la obtención de los vidrios bioactivos por el método de fusión [31].

1.7.3. Síntesis de vidrios bioactivos por el método sol-gel

El método sol-gel consiste en la formación y ensamblaje de nanopartículas de sílice a temperatura ambiente. Es un proceso basado en química suave en la que una solución que contiene los precursores (sol), los cuales experimentan reacciones de tipo

poliméricas o de policondensación para formar un gel. El gel es una red húmeda inorgánica, parecida a un polímero de cadena corta, el cual es secado y posteriormente tratado térmicamente para convertirse en un vidrio. En la Figura 7, se muestra el esquema general del método sol-gel y posteriormente se explican cada una de las etapas. Con el método sol-gel las propiedades estructurales y superficiales, como área superficial y porosidad, pueden ser finamente reguladas dependiendo de la composición y las condiciones de síntesis, pudiéndose obtener materiales nanoestructurados controlados, con un alto grado de pureza y homogeneidad [32].

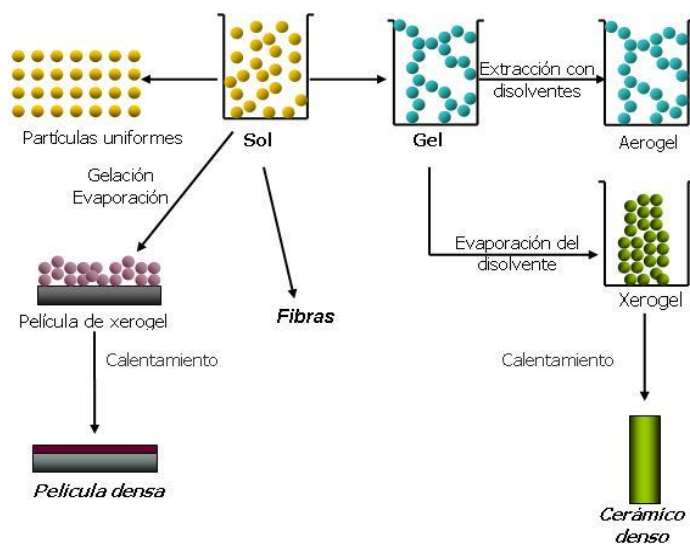


Figura 7. Esquema general del método sol-gel para vidrios bioactivos [32].

Una de las principales diferencias entre los vidrios sintetizados por sol-gel y por fusión está relacionada con el área superficial. Para los vidrios creados por sol-gel el área superficial puede llegar a 650 m²/gr, mientras que los vidrios creados por fusión presentan un área superficial alrededor de 2 m²/gr. La hidroxiapatita (HA), se deposita mucho más rápido en los biovidrios sintetizados por sol-gel porque permite la formación de una capa hidratada dentro del material, donde trazas biológicas pueden entrar, manteniendo su configuración estructural y actividad biológica. De esta manera, los vidrios sol-gel pueden convertirse en una parte indistinguible del tejido huésped [33].

Etapas del proceso o método sol-gel:

Etapa 1: Mezcla de precursores alcóxidos + hidrólisis del catalizador y condensación para producir un sol (nanopartículas primarias en solución).

Etapa 2: Aglomeración de partículas da inicio a la formación de enlaces y nanopartículas hasta que se forme el gel.

Etapa 3: Envejecimiento - fortalecimiento y contracción del gel.

Etapa 4: Secado y eliminación de subproductos de condensación que dejan nanoporos intersticiales.

Etapa 5: Estabilización y eliminación de nitratos, silanoles y eliminación de los poros intraparticulares, así como, el moldeado del gel a su forma deseada (películas delgadas, fibras, nanopartículas, esferas o polvos cerámicos), a través de diversos tratamientos térmicos.

1.8. Materiales nanoestructurados

Los materiales nanoestructurados son los pilares de la ciencia a escala nanométrica y la nanotecnología. La ciencia y la tecnología nanoestructurada es un área amplia e interdisciplinaria de la actividad de investigación y desarrollo que ha ido creciendo de manera exponencial en todo el mundo en los últimos años. Tiene el potencial de revolucionar la forma en que se crean los materiales, productos, el alcance, la naturaleza de las funciones que se puede acceder [34].

El término nanotecnología se emplea para describir la creación y manipulación de materiales con características estructurales dentro de la escala nanométrica ($1\text{nm} = 10^{-9}\text{ m}$), la cual abarca la producción y aplicación de materiales a escalas que van desde los átomos o moléculas individuales hasta materiales con dimensiones de 100 nm.

Dentro de esta escala las propiedades de los materiales tanto químicas como físicas son únicas, inesperadas y novedosas, en comparación con sus contrapartes a granel. Esto, debido a una mayor relación área de superficie/volumen [35].

1.9. Nanopartículas de ZnO

Las nanopartículas (NP's) inorgánicas tales como Ag, Au, Cu, CuO, TiO₂ y ZnO tienen profundas actividades antibacterianas. Los agentes antibacterianos se pueden clasificar en general en dos tipos, orgánicos e inorgánicos. Los materiales antibacterianos orgánicos a menudo son menos estables, particularmente a altas temperaturas y/o presiones en comparación con los agentes antibacterianos inorgánicos. Entre las NP's inorgánicas, las NP's de ZnO son de particular interés porque pueden prepararse fácilmente como un material barato y seguro para seres humanos y animales. Se usan ampliamente en la formulación de productos para el cuidado de la salud. Las NP's ZnO de estructura wurtzita (Figura 8), han entrado en el centro de atención científica en los últimos años debido a sus propiedades semiconductoras, propiedades únicas antibacterianas, antifúngicas, de curación de heridas y de filtrado UV, alta actividad catalítica y fotoquímica [36].

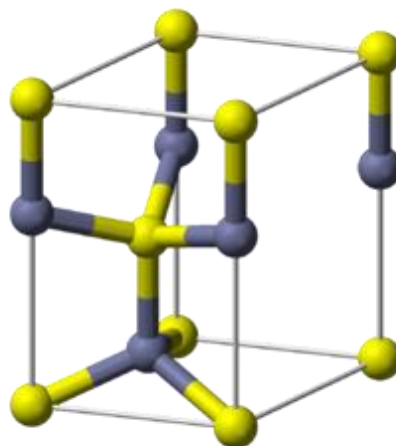


Figura 8. Fase hexagonal de ZnO, estructura de wurtzita [36].

1.9.1. Síntesis de nanopartículas por el método de química verde

Existen una gran variedad de métodos disponibles para la síntesis de NP's de ZnO, como la química húmeda, la microemulsión química, la hidrotermal, el proceso en fase vapor, la combustión asistida por microondas, solvothermal, química, precipitación directa y sonoquímica. En los últimos años, el aumento en la concientización sobre la química verde y otros procesos biológicos ha llevado al desarrollo de un enfoque ecológico para la síntesis de nanopartículas. Este enfoque biológico parece ser una alternativa rentable a los métodos de síntesis físicos y químicos utilizados convencionalmente. Además, las nanopartículas obtenidas por este método son no tóxicas, bioprotectas y biocompatibles. Es deseable especialmente para aplicaciones biomédicas tales como portadores de fármacos, cosméticos y rellenos en materiales médicos [37].

En el presente trabajo, las nanopartículas de ZnO se sintetizan utilizando el método de química verde, un método de costo competitivo, simple y ecológico. El método ecológico para la producción de NP's ZnO sin impurezas y de preparación rentable, utiliza los precursores de bajo costo como el nitrato de zinc hexahidratado y el producto natural *Daucus carota* a través de una ruta verde y simple.

1.10. Tratamientos térmicos

Se entiende por tratamiento térmico al conjunto de operaciones de calentamiento, permanencia y enfriamiento a las que se somete un material durante periodos de tiempo específicos, con la finalidad de cambiar su estructura y conseguir propiedades físicas y mecánicas requeridas para sus diferentes aplicaciones. También, se pueden eliminar residuos de las reacciones de síntesis y obtener un material más puro. Actualmente existe una gran variedad de equipos en los cuales se puede realizar el tratamiento térmico como, hornos, estufas, muflas y otros más [38].

1.11. Técnica por microondas

En años recientes, los estudios sobre el uso de la radiación de microondas (MW) en la síntesis y el procesamiento de materiales han atraído una gran atención, especialmente los relacionados con la sinterización de microondas. El esquema del funcionamiento de un horno de MW se muestra en la Figura 9. Entre varias ventajas, la sinterización MW puede proporcionar muestras de cerámica totalmente densas a temperaturas más bajas y tiempos más cortos que los necesarios para los procesos de sinterización convencionales. En realidad, cualquier material adecuado para el calentamiento MW es un candidato potencial para uno de los varios usos posibles de MW en síntesis o proceso de obtención, como, la producción de micro y nanoestructuras, revestimiento superficial, tratamiento térmico, producción de compuestos y materiales graduados funcionales, entre otros, que se han investigado actualmente [39].

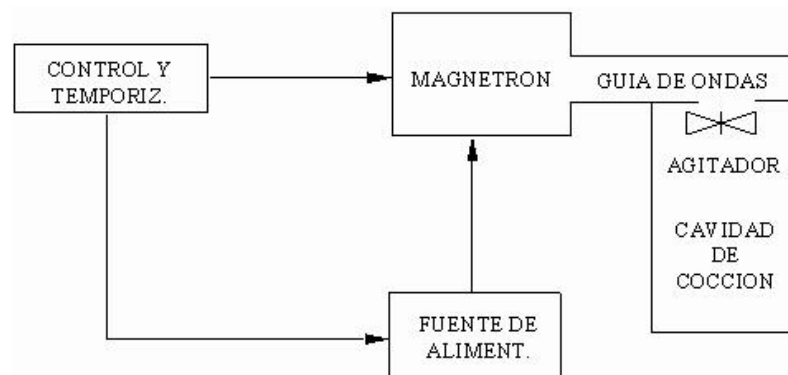


Figura 9. Esquema general del funcionamiento de un horno de microondas [40].

Las microondas son radiación electromagnética no ionizante, que no causa cambios en la estructura molecular, pero producen movimiento molecular, por migración de iones y rotación de dipolos en materiales dieléctricos, que generan fricción por las colisiones moleculares lo que hace que el material se caliente. Tiene un rango de frecuencia desde 300 MHz a 300 GHz y la correspondiente longitud de onda de 1 nm a 1 mm. La frecuencia más usada a nivel industrial y doméstico es la 2.45 GHz [40].

1.12. Objetivo general

Sintetizar vidrios bioactivos por el método sol-gel asistido por el proceso de microondas, incorporando nanopartículas de óxido de zinc obtenidas por un método de química verde, con la finalidad de mejorar sus propiedades bioactivas y biológicas, para aplicaciones biomédicas en la regeneración de tejido óseo.

1.13. Objetivos específicos

1. Síntesis de nanopartículas de óxido de zinc (NP's ZnO) por el método de química verde con *Daucus carota*.
2. Síntesis de vidrios bioactivos con la incorporación de NP's ZnO por método sol-gel asistido con microondas.
3. Caracterización fisicoquímica de los materiales sintetizados utilizando las técnicas:
 - Espectroscopia Infrarroja con Transformada de Fourier (FT-IR).
 - Espectroscopia Ultravioleta Visible (UV-Vis).
 - Difracción de Rayos-X (DRX).
4. Pruebas de actividad antimicrobiana (*Escherichia coli*).
5. Pruebas de bioactividad *in vitro* (Fluido Fisiológico Simulado).

CAPÍTULO II

FUNDAMENTOS

Y

TÉCNICAS

CAPÍTULO II. FUNDAMENTOS Y TÉCNICAS

En el presente capítulo, se describen los fundamentos de las técnicas fisicoquímicas y biológicas utilizadas para caracterizar y estudiar las propiedades de los materiales (vidrios bioactivos 45S5, NP's ZnO y el compuesto BG-NP's ZnO), sintetizados en este trabajo tesis.

2.1. Espectroscopia Infrarroja con Transformada de Fourier (FT-IR)

La Espectroscopia Infrarroja con Transformada de Fourier (FT-IR por sus siglas en inglés) es una técnica ampliamente utilizada en la caracterización de materiales debido a la información tanto cualitativa como cuantitativa que proporciona de la muestra en estudio [41].

El fundamento principal de la Espectroscopia Infrarroja (FT-IR) se basa en la capacidad de absorción de la radiación infrarroja que poseen las moléculas (según su vibración molecular). La región infrarroja va de los $14,000\text{ cm}^{-1}$ a los 10 cm^{-1} y por cuestiones de practicidad se divide en 3 regiones principales, en la región de IR cercano ($14,000\text{-}4000\text{ cm}^{-1}$), IR medio ($4,000\text{-}400\text{ cm}^{-1}$) e IR lejano ($400\text{-}20\text{ cm}^{-1}$). Cada región proporciona información diferente de la muestra a analizar, los equipos mayormente utilizados son los que abarcan la región del infrarrojo medio por la información cualitativa que proporciona de manera inmediata lo cual permite identificar los grupos funcionales presentes en la muestra [42].

Un equipo de espectroscopia infrarroja funciona con una pequeña muestra que es colocada en una celda infrarroja, donde es sometida a una fuente de luz infrarroja (Figura 10), la cual hace un barrido desde las longitudes de onda de 4000 cm^{-1} hasta 400 cm^{-1} en la región del infrarrojo medio. La intensidad de la luz transmitida a través de la muestra es medida en cada número de onda, lo que permite que la cantidad de luz absorbida por la muestra sea calculada por la diferencia entre la intensidad de la luz

antes y después de pasar por la celda de muestra. Esto se conoce como el espectro infrarrojo de la muestra [43].

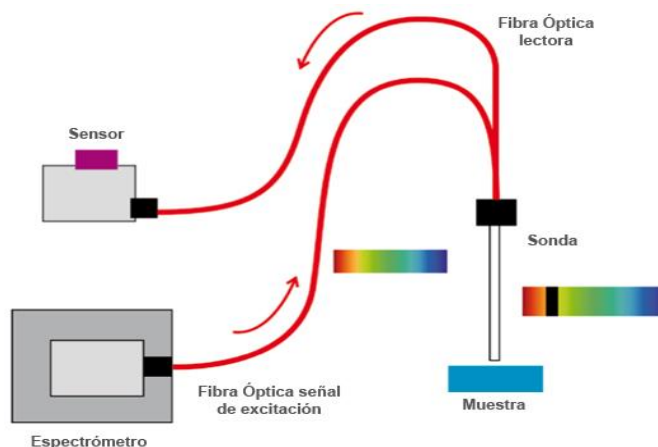


Figura 10. Esquema básico del funcionamiento de un infrarrojo [44].

El espectro vibracional de una molécula se considera una propiedad física única y por tanto característica de la molécula. Así, el espectro IR se puede usar como “huella dactilar” en la identificación de muestras desconocidas mediante la comparación de espectros de referencia [44].

En la región infrarroja del espectro, las frecuencias de resonancia de una molécula se deben a la presencia de grupos funcionales moleculares. Un grupo funcional es un grupo de dos o más átomos, enlazados de una manera específica. En la molécula de agua H_2O , el grupo funcional O-H es el que contribuye a la frecuencia de resonancia (vibración) alrededor de los 3450 cm^{-1} [45].

En los laboratorios de la universidad contamos con un Spectrum two FT-IR con UATR que se ilustra en la Figura 11, el cual abarca la región del infrarrojo medio y cuenta con un accesorio de reflectancia total atenuada (ATR por sus siglas en inglés).

La espectroscopia de reflexión interna se denomina más comúnmente como de reflexión total atenuada (ATR). La técnica, que se empezó a emplear hace medio siglo,

La reflexión interna se produce cuando una radiación infrarroja entra en un cristal ATR transmisor y de alto índice de refracción. 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 del analito. Es un accesorio versátil ideal para el análisis de sólidos, líquidos, pastas y geles [46].

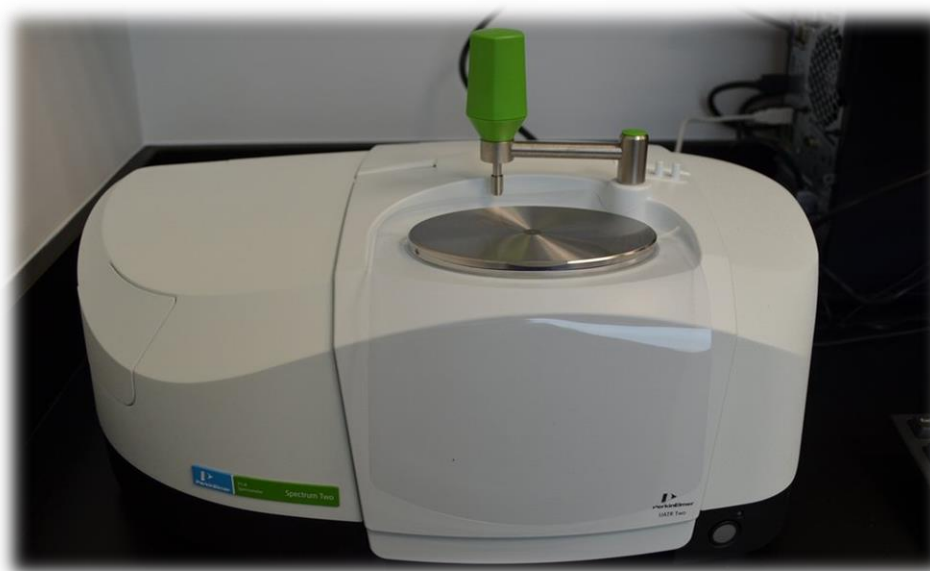


Figura 11. Spectrum two FT-IR con UATR (Perkin Elmer).

2.2. Espectroscopia de luz Ultravioleta y Visible (UV-Vis)

La espectroscopia de absorción de luz ultravioleta-visible es una de las técnicas más frecuentemente empleadas en el análisis químico. Las medidas en el rango de longitud de onda entre el visible y el ultravioleta poseen una amplia aplicación en la caracterización de materiales ya que brindan información cualitativa y cuantitativa acerca de una gran variedad de especies inorgánicas y orgánicas. En la Figura 12 se muestra un esquema general del funcionamiento del equipo [47].

El principio de la espectroscopia de UV-Vis involucra la absorción de radiación ultravioleta-visible por una molécula, causando la promoción de un electrón de un estado basal a un estado excitado [47].

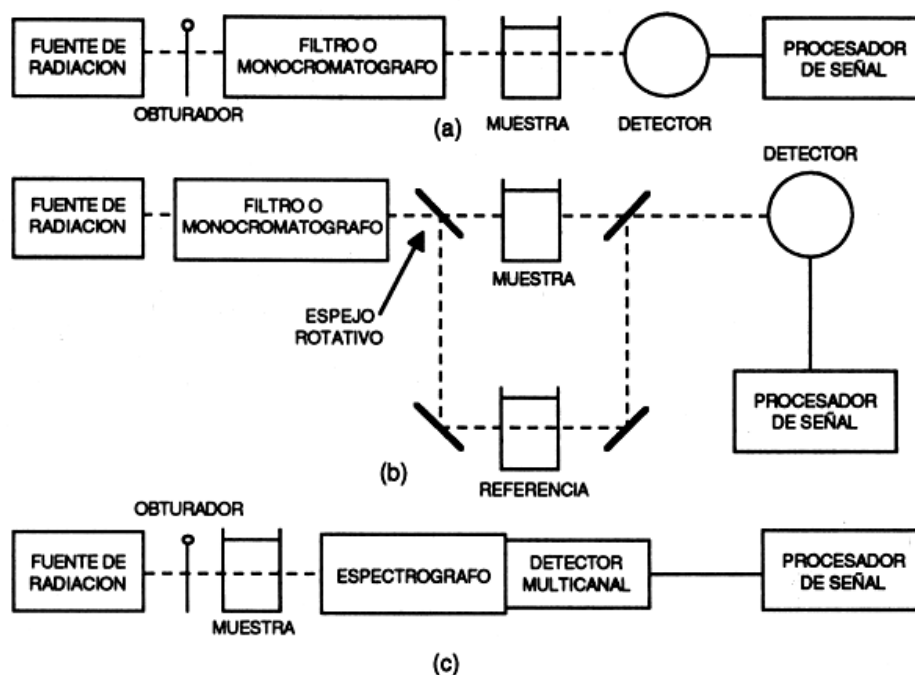


Figura 12. Esquema de un espectrofotómetro UV-Vis [48].

La longitud de onda está comprendida entre 190 y 800 nm (Figura 13). Cuando una radiación de cierta λ incide sobre una muestra se produce la absorción parcial de la misma, produciendo una transición en los niveles energéticos de la especie, y el resto de la radiación es transmitida ya sea por un átomo, una molécula o un ion y pasando éste a un estado excitado [49].

Es posible analizar un estado u otro de la sustancia y relacionarlo con la cantidad de especie activa presente en la muestra. Las bandas que se aprecian en un espectro de UV-Visible son anchas, ya que se superponen transiciones vibracionales y electrónicas, lo que implica tener que hacer una deconvolución para observar las demás bandas presentes. La excitación corresponde a los electrones de enlace; en consecuencia, los

picos de absorción pueden correlacionarse con los tipos de enlaces. Este hecho da validez a la espectroscopia de UV-Vis como técnica de identificación de grupos funcionales de una molécula [50].

En las medidas cuantitativas se aplica la ley de Lambert-Beer (Ec. 1), para determinar la concentración de la sustancia que absorbe a través de la cantidad de radiación transmitida o absorbida. El espectrofotómetro mide la transmitancia T (o la absorbancia $A = -\log T$) de la muestra presente en una celda transparente con un camino óptico conocido b . En general, la concentración c de la solución absorbente está relacionada linealmente con la absorbancia.

$$A = -\log T = \varepsilon \cdot b \cdot c \quad (\text{Ec. 1})$$

Donde A es la absorbancia medida, ε es el coeficiente de extinción molar y b , como se mencionó antes, el camino óptico o diámetro de la celda usada [51].

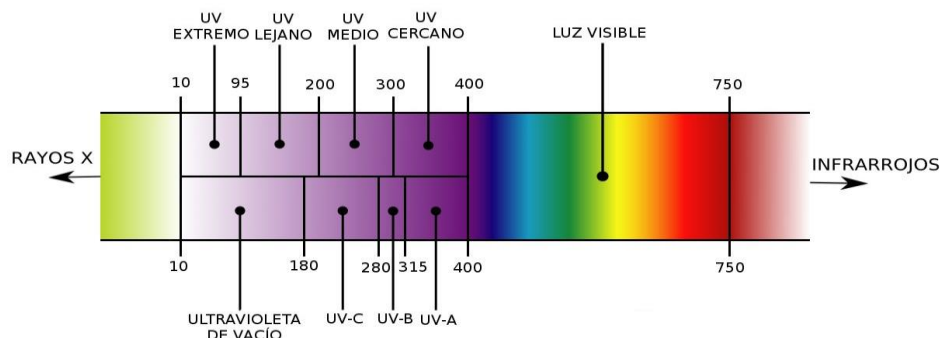


Figura 13. Rango de la luz ultravioleta y visible en el espectro electromagnético [52].

2.3. Difracción de Rayos X (DRX)

Desde su descubrimiento por el físico Von Laue en 1912, la Difracción de Rayos X se ha empleado ampliamente en la caracterización de materiales debido a que esta técnica proporciona un medio adecuado y práctico para la identificación cualitativa de compuestos cristalinos y sobre el ordenamiento y espaciado de los átomos en materiales

cristalinos. El método de Difracción de Rayos X en general y en particular de polvo cristalino es el único método analítico capaz de suministrar información cualitativa y cuantitativa sobre los compuestos cristalinos presentes en un sólido, basándose en el hecho de que cada sustancia cristalina presenta un diagrama de difracción único. Así, pueden compararse un diagrama de una muestra desconocida y el de una muestra patrón, y determinar su identidad y composición química [53].

Los rayos X son una radiación electromagnética de longitud de onda corta producida por el frenado de electrones de elevada energía o por transiciones de electrones que se encuentran en los orbitales internos de los átomos. El intervalo de longitudes de onda de los rayos X comprende desde aproximadamente 10^{-6} nm hasta 10 nm, sin embargo, la espectroscopia de rayos X convencional se limita, en su mayor parte, a la región de aproximadamente 0.01 nm a 2.5 nm [54].

La técnica consiste en hacer incidir un haz de rayos X sobre el sólido sujeto a estudio. La interacción entre el vector eléctrico de la radiación X y los electrones de la materia que atraviesa dan lugar a una dispersión. Al producirse la dispersión tienen lugar interferencias tanto constructivas como destructivas entre los rayos dispersados, ya que las distancias entre los centros de dispersión son del mismo orden de magnitud que la longitud de onda de la radiación [55].

El resultado es la difracción, que da lugar a un patrón de intensidades que puede interpretarse según la ubicación de los átomos en el cristal, por medio de la ley de Bragg. La misma postula que cuando un haz de rayos X incide sobre la superficie de un cristal formando un ángulo θ una porción del haz es dispersada por la capa de átomos de la superficie; la porción no dispersada del haz penetra en la segunda capa de átomos donde, nuevamente una fracción es dispersada y así sucesivamente con cada capa hasta la profundidad de aproximadamente 1000 nm, lo que lo hace una técnica másica. El efecto acumulativo de esta dispersión producida por los centros regularmente espaciados del cristal es la difracción del haz [56].

En 1912, W. L. Bragg trató la Difracción de Rayos X por cristales, como se muestra en la Figura 14. Un haz estrecho de radiación choca con la superficie del cristal formando un ángulo θ , la dispersión tiene lugar como consecuencia de la interacción de la radiación con los átomos. Los equipos utilizados en DRX se encuentran normalmente como el que se aprecia en la Figura 15.

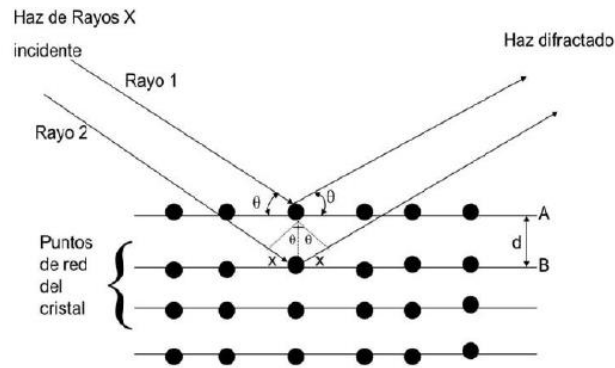


Figura 14. La interacción entre los rayos X al incidir en la estructura cristalina del material [57].

Se puede escribir que las condiciones para que tenga lugar una interferencia constructiva del haz que forma un ángulo θ con la superficie del cristal, son:

$$n\lambda = 2 d \sin \theta \quad (\text{Ec. 2})$$

Donde n es un número entero que representa el orden de la difracción y d es la distancia interplanar del cristal.



Figura 15. Difractómetro de Rayos X RigaLab SmartLab [58].

2.5. Fluido Fisiológico Simulado (SBF)

Los inicios o antecedentes del Fluido Fisiológico Simulado (por sus siglas en inglés SBF) datan desde principios de la década de los 80's con la investigación de Hench *et al.* la cual mostro que una capa rica en SiO₂ y una película de fosfato cálcico se forman en la superficie de Bioglass cuando se implanta en el entorno corporal, lo que permite la unión al hueso vivo, y que la formación *in vivo* de la película de fosfato cálcico puede reproducirse en una solución tampón de Tris hidroximetilaminometano y ácido clorhídrico (solución tampón Tris) a pH 7.4 [59].

Tabla 2. Comparación de los iones presentes en el plasma sanguíneo y los iones presentes en el Fluido Fisiológico Simulado.

Ion	Concentraciones de iones (mM)	
	Plasma sanguíneo	Fluido Fisiológico Simulado
Na ⁺	142.0	142.0
K ⁺	5.0	5.0
Mg ²⁺	1.5	1.5
Ca ²⁺	2.5	2.5
Cl ⁻	103.0	147.8
HCO ₃ ⁻	27.0	4.2
HPO ₄ ²⁻	1.0	1.0
SO ₄ ²⁻	0.5	0.5

Posteriormente, Kokubo *et al.* [60]. Utilizando la Difracción de Rayos X, identificaron esta capa de fosfato de calcio como apatito cristalino. Además, en 1990, mostraron que la formación de apatito *in vivo* en la superficie de la vitrocerámica puede reproducirse mediante la inmersión en un SBF, con concentraciones de iones casi iguales a las del plasma sanguíneo humano (Tabla 2), pero no en una solución tampón

Tris. Kokubo y Hench también confirmaron de forma independiente la formación de apatita en la superficie del vidrio de tipo Bioglass 45S5 en SBF [61].

El análisis detallado de la apatita superficial formada en SBF, mediante Difracción de Rayos X de película delgada, Espectroscopia Infrarroja por Transformada de Fourier, Microscopía Electrónica de Barrido y Microscopía Electrónica de Transmisión, mostró que era similar al mineral óseo en su composición y estructura [36]. Como resultado, se especuló que los osteoblastos podrían proliferar y diferenciarse preferentemente para producir apatita y colágeno en su superficie. Así, la apatita formada podría unirse a la superficie de la apatita, así como al hueso circundante. En la Figura 16 se observa el proceso de formación de apatita de los biovidrios en SBF. En consecuencia, se forma una unión química estrecha entre el material y el hueso vivo a través de la capa de apatita [62].

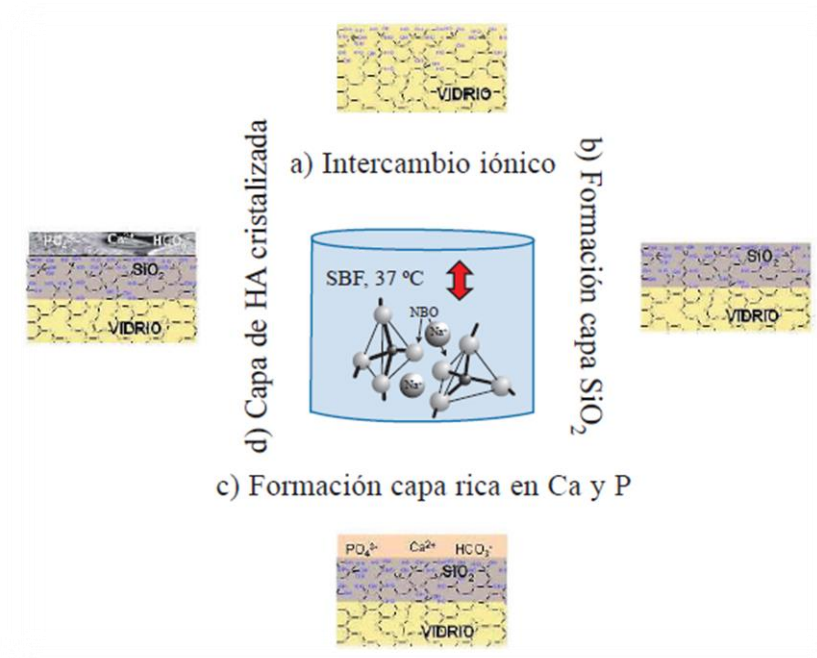


Figura 16. Esquema representativo de las etapas del mecanismo de bioactividad propuesto por L. Hench y colaboradores [63].

Con base en los resultados anteriores en el año de 1991 se propuso que el requisito esencial para que un material sintético se una al hueso vivo, este, debe formar una capa de apatita muy similar al hueso en su superficie al ser implantado en el cuerpo vivo, y que esta formación de apatita *in vivo* puede reproducirse en un SBF con concentraciones de iones casi iguales a las del plasma sanguíneo humano. Esto significa que la bioactividad ósea *in vivo* de un material puede predecirse mediante una prueba de bioactividad donde debe haber formación de apatita en su superficie en SBF. Desde entonces, la bioactividad ósea *in vivo* de diversos tipos de materiales se ha evaluado mediante la formación de apatita en SBF [64].

CAPÍTULO III

DESARROLLO EXPERIMENTAL

CAPÍTULO III. DESARROLLO EXPERIMENTAL

En este capítulo se explican las técnicas y materiales utilizados, así como los procedimientos de preparación y tratamiento para la obtención de los materiales de estudio de este trabajo. Se describe detalladamente aquello que tiene mayor importancia a la hora de entender los procedimientos experimentales utilizados.

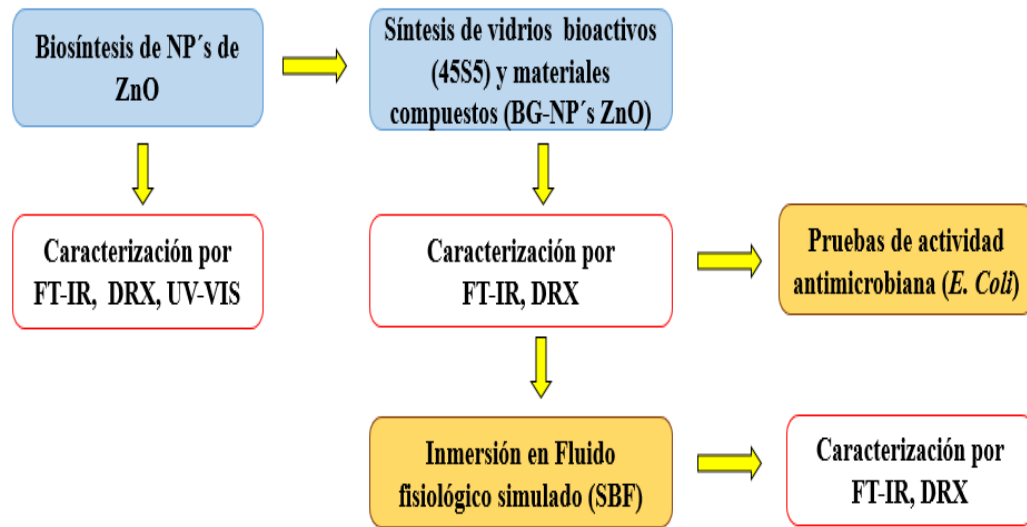


Figura 17. Esquema general de la metodología.

3.1. Síntesis de vidrios bioactivos (Bioglass 45S5)

Para ello se seguirá el procedimiento de síntesis establecido para la obtención de Bioglass 45S5 (BG) de la publicación “Sol–gel silica-based biomaterials and bone tissue regeneration” detallado a continuación [65].

3.1.1. Reactivos

- | | |
|--|---------------|
| • Trietilfosfato (TEP) | ALDRICH 99.8% |
| • Cloruro de calcio (CaCl ₂) | ALDRICH 99.3% |

- Ácido nítrico 0,1 M (HNO_3)
- Hidróxido de Sodio (NaOH) ALDRICH 98.4%
- Tetraetilortosilicato (TEOS) ALDRICH 99.8%
- Agua destilada.

3.1.2. Materiales-Equipo de laboratorio

- Vasos de precipitado 50, 100, 150.
- Pipetas.
- Probetas.
- Plancha de agitación.
- Agitadores magnéticos.
- Balanza analítica.
- Espátula.
- Termómetro de mercurio.
- Horno de microondas.

3.1.3. Método

1-. Se añaden 30 ml de ácido nítrico (HNO_3) 0.1 molar a un vaso de precipitado de 100 ml y se agrega 10.5 ml de tetraetilortosilicato (TEOS). El vaso se coloca en un agitador magnético para su agitación fuerte (500-700 RPM) por 1 hora a temperatura ambiente (Figura 18).

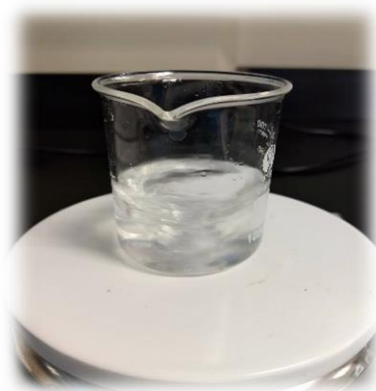


Figura 18. Mezcla de ácido nítrico con TEOS en agitación vigorosa.

2-. Transcurrida la primera hora se agrega 0.474 gr de trietilfosfato (TEP) y se agita durante 1 hora más (Figura 19).

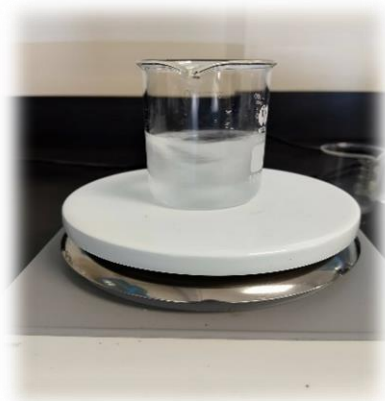


Figura 19. Adición de trietilfosfato a la mezcla inicial de ácido y TEOS.

3-. Transcurrida la segunda hora se agrega 0.974 gr de hidróxido de sodio (NaOH) previamente disueltos en 5 ml de agua destilada y esperar otra hora (Figura 20).



Figura 20. Adición de NaOH, la solución policondensa formando un gel de color blanco.

4-. Finalmente se agrega 2.986 gr de cloruro de calcio (CaCl_2) disueltos en 15 ml de agua destilada y se sigue agitando durante una hora más (Figura 21).

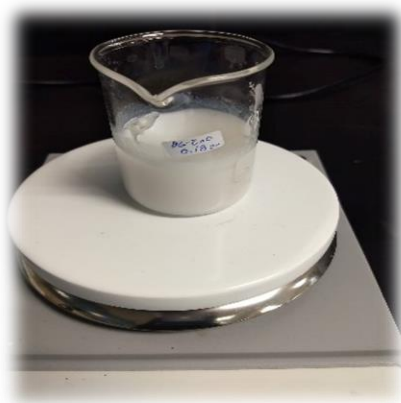


Figura 21. Adición de NaCl_2 al gel anteriormente formado.

Una vez disuelto el último reactivo el vaso de precipitado es sellado con papel parafilm®, para su envejecimiento durante un periodo de 10 a 13 días, se observa como la solución se separa en 2 fases, una fase en un precipitado blanquizco y otra en un líquido viscoso sobrenadante en la parte superior (Figura 22). Pasado el periodo de envejecimiento, la solución se coloca a 70 °C en un baño maría de aceite durante 3 días para eliminar la fase líquida sobrenadante en la superficie, cuando se evapore por completo la fase líquida se obtiene un gel blanco el cual se coloca en otro vaso de precipitado se sella con papel filtro y se introduce a un microondas para su secado a diferentes intervalos de tiempo (Tabla 3).



Figura 22. Envejecimiento del gel durante 13 días y el polvo obtenido una vez secado en microondas y pulverizado en el mortero de ágata.

El horno de microondas utilizado en la síntesis de estos materiales es: Kenmore Countertop Microwave, modelo No. 721.65002400 Oven serial No. 409TA32065. 120 V o 60 Hz (Figura 23).



Figura 23. Horno de microondas Kenmore Countertop presente en laboratorio de bioingeniería de la UABC.

Tabla 3. Tiempo de exposición a la radiación por microondas.

Intervalo de exposición (Segundos)	Tiempo de reposo (Segundos)	Tiempo total de exposición (Minutos)
5	5	2
10	10	2
15	10	2
20	10	1
30	10	1

3.2. Síntesis de nanopartículas de óxido de zinc

La síntesis de NP's de ZnO se realizó con base en la metodología reportada en la publicación "Fruit peel extract mediated green synthesis of zinc oxide nanoparticles" descrita a continuación [66].

3.2.1. Reactivos

- Nitrato de zinc ($\text{Zn}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) ALDRICH 99.8%
- Extracto o jugo de zanahoria.
- Agua destilada.

3.2.2. Materiales/Equipo de laboratorio

- Vasos de precipitado 50, 200.
- Extractor de jugos.
- Bomba de vacío.
- Matraz kitasato.
- Embudo Büchner.
- Papel filtro whatman #1.
- Plancha de agitación.
- Agitadores magnéticos.
- Baño termostático.
- Espátula.
- Capsulas de porcelana.
- Mufla de calcinación.

3.2.3. Obtención de extracto o jugo de zanahoria

Para la obtención del extracto, las zanahorias se lavaron con agua destilada y se les removió su tallo. Las zanahorias lavadas y sin tallo se introducen al extractor para la obtención del jugo. Posteriormente, se tomaron 200 ml del jugo en un vaso de precipitado el cual se coloca a 90 °C en el baño termostático durante 1 hora. Transcurrida la hora el jugo se filtró con la ayuda de una bomba de vacío y utilizando papel filtro whatman #1. Finalmente, el extracto se almacena en una atmosfera seca a temperatura ambiente para su uso posterior (Figura 24).



Figura 24. Obtención y filtrado del extracto de *Daucus carota* (zanahoria).

3.2.4. Síntesis de NP's de ZnO

La síntesis de las NP's de ZnO se llevó a cabo colocando 2 gr de nitrato de zinc con 30 ml de extracto de zanahoria. Esta mezcla se agito durante 60 minutos y luego se colocó en un baño de agua a 60 °C hasta que la consistencia de la mezcla se asemejó a un caramelo vítreo, después de lo cual, se sometió a un tratamiento térmico a 400 °C

durante 40 minutos. Por último, la muestra resultante se molió en un polvo fino de color blanco (Figura 25).



Figura 25. Baño maría y tratamiento térmico de las NP's ZnO.

3.3. Síntesis del compuesto BG-NP's ZnO

La síntesis de vidrios bioactivos con la incorporación de nanopartículas de óxido de zinc se realiza con los mismos reactivos y materiales descritos anteriormente en el proceso de síntesis de los vidrios bioactivos, la única diferencia o el 5to paso es añadir la cantidad deseada de NP's de ZnO y agitarse durante 24 horas.

3.3.1. Método

5-. Finalmente, después de una hora transcurrida de agregar el último reactivo para la síntesis de los vidrios se agregan las nanopartículas de óxido de zinc (NP's ZnO), obtenidas previamente por el método de química verde y se dejan en agitación fuerte por un periodo de 24 horas para una completa homogenización de la solución (Figura 26).



Figura 26. Adición de nanopartículas de óxido de zinc, para formar el biomaterial compuesto.

Después de transcurridas las 24 horas en agitación, el vaso se sella con papel parafilm® y se deja envejecer durante 13 días, se observa como la solución se separa en 2 fases al igual que en el envejecimiento de los vidrios una fase es un precipitado blanquizo y otra fase en un líquido viscoso en la parte superior. Pasado el periodo de envejecimiento, la solución se colocó a 70 °C en un baño maría de aceite durante 3 días para eliminar la fase líquida sobrenadante en la superficie, cuando se evaporo por completo la parte líquida se obtuvo un gel blanco el cual se coloca en otro vaso de precipitado se sella con papel filtro y se introduce a un microondas para ser secado (Figura 27). El tiempo de exposición a microondas se observa en la Tabla 3. Como producto final se obtuvo un polvo blanco el cual fue molido con ayuda de un mortero para hacerlo más refinado.

Los vidrios y el compuesto se sumergen en un SBF el cual imita las condiciones del tejido huésped, durante 7, 14 y 21 días, para observar si tenemos la formación de hidroxiapatita y determinar su bioactividad.

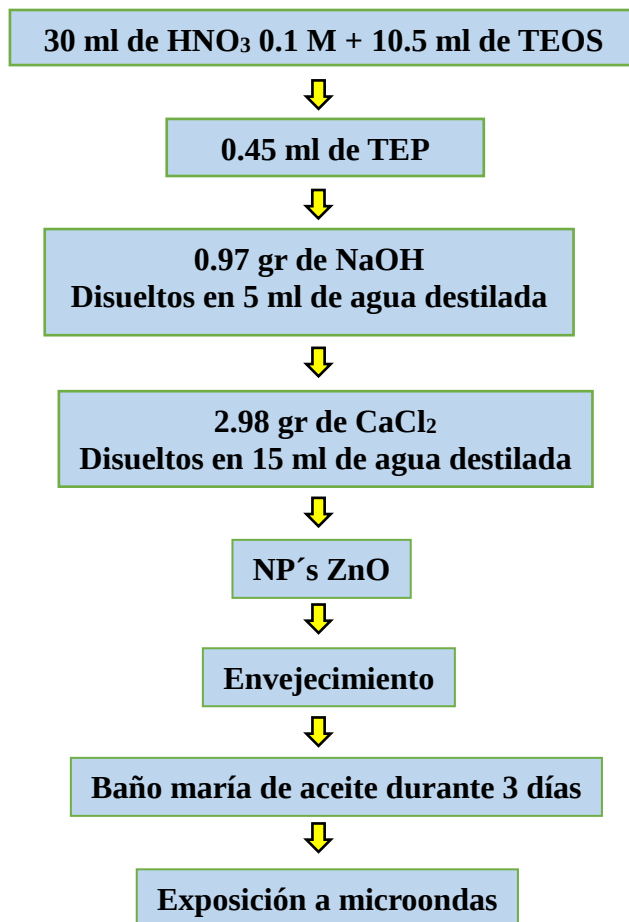


Figura 27. Diagrama de flujo de la metodología para la síntesis de los compuestos.

3.4. Preparación de Fluido Fisiológico Simulado (SBF)

La preparación del Fluido Fisiológico Simulado (SBF por sus siglas en inglés) se realizó siguiendo el procedimiento de la publicación “How useful SBF in predicting in vivo bone bioactivity?” que se detalla a continuación [67].

3.4.1. Reactivos:

- Cloruro de sodio (NaCl)
- Bicarbonato de sodio (NaHCO_3)
- Cloruro de potasio (KCl)
- Fosfato dipotásico trihidratado ($\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$)
- Cloruro de magnesio hexahidratado ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)
- Cloruro de calcio (CaCl_2)
- Sulfato de sodio (Na_2SO_4)
- Tris (hidroximetil) aminometano (Tris)
- Ácido clorhídrico (HCl) 1M
- Agua desionizada

Nota: Los reactivos deben ser previamente secados dadas las propiedades higroscópicas de algunos de ellos.

3.4.2. Materiales/Equipo de laboratorio

- Plancha de calentamiento con agitación (DIAB CVP-3250B)
- Vaso de precipitado de 1000 ml (plástico) (PYREX)
- Agitador magnético
- Termómetro de mercurio
- Potenciómetro
- Espátula
- Balanza analítica (Adventure pro Ohaus AV213)
- Papel encerado

3.4.3. Método

Tabla 4. Reactivos para la preparación de SBF.

Orden	Reactivo	Cantidad	Pureza (%)	Peso Molecular (gr/mol)
1	NaCl	8,035 gr	99,5	58,4430
2	NaHCO ₃	0,355 gr	99,5	84,0068
3	KCl	0,225 gr	99,5	74,5515
4	K ₂ HPO ₄ · 3H ₂ O	0,231 gr	99,0	228,2220
5	MgCl ₂ · 6H ₂ O	0,311 gr	98,0	203,3034
6	HCl 1M	39 ml	-	-
7	CaCl ₂	0,292 gr	95,0	110,9848
8	Na ₂ SO ₄	0,072 gr	99,0	142,0428
9	Tris	6,118 gr	99,0	121,1356
10	HCl 1M	0 – 5 ml	-	-

Debido a que el SBF está sobresaturado con respecto a apatita, un método de preparación inapropiado puede producir una precipitación de apatita en la solución. En todo momento se debe asegurar que la solución se mantenga incolora, transparente y que no presente ningún depósito en la superficie del recipiente. Si ocurre alguna precipitación, detener la preparación de SBF, descartar la solución y comenzar desde el lavado del equipo y preparar SBF nuevamente.

Para preparar 1000 ml de SBF, primero, poner 700 ml de agua desionizada con una barra de agitación magnética en un recipiente plástico de 1000 ml. Ubicar el recipiente en un baño de agua termorregulador sobre el agitador magnético y cubrirlo con un vidrio de reloj. Regular la temperatura del agua en el recipiente a 36.5 ± 1.5 °C bajo agitación [67].

Disolver los reactivos uno por uno, desde el primero al octavo, en el orden que aparece en la Tabla 4, teniendo en cuenta las siguientes indicaciones:

a) En la preparación de SBF, los contenedores de vidrio deben ser evitados y se recomienda utilizar contenedores de plástico con superficies lisas sin rayas, debido a que la nucleación de la apatita puede ser inducida en la superficie de un contenedor de vidrio o en los bordes de las rayas.

b) Nunca disolver varios reactivos simultáneamente. Disolver un reactivo sólo después que el anterior esté completamente disuelto.

c) Debido a que el reactivo CaCl_2 tiene un gran efecto en la precipitación de apatita, usualmente tiene forma granular y toma mucho tiempo disolver un granulo a la vez, disolver completamente cada gránulo antes de agregar el siguiente.

d) Ambientar la probeta con HCl 1M antes de medir el volumen correspondiente de HCl 1 Molar.

e) Medir los reactivos higroscópicos como KCl , $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, CaCl_2 y Na_2SO_4 en el período más corto posible [67].

Ajustar la temperatura de la solución a 36.5 ± 1.5 °C. Si la cantidad de solución es menor a 900 ml, añadir agua destilada hasta los 900 ml. Insertar el electrodo de pH en la solución. Justo antes de disolver el Tris, el pH de la solución debería ser de 2.0 ± 1.0 . Con la temperatura de la solución entre 35 y 38 °C, preferentemente entre 36 y 37 °C, disolver el Tris en la solución poco a poco, teniendo cuidado de notar el cambio de pH. Luego de añadir una pequeña cantidad de Tris, detenerse y esperar hasta que el reactivo añadido esté completamente disuelto y el pH se haya vuelto estable. Entonces añadir más Tris aumentando el pH gradualmente. Cuando el pH esté en el rango 7.25-7.35, asegurarse que la temperatura de la solución se mantiene en el rango deseado, de lo contrario ajustar y añadir más Tris hasta un pH menor a 7.45 [67].

Nota 1: no agregar una gran cantidad de Tris en la solución al mismo tiempo, debido a que un aumento radical en el pH local de la solución puede provocar la precipitación de fosfato de calcio.

Nota 2: el pH no debe aumentar por sobre 7.45 ± 0.01 a 36.5 ± 0.5 °C, teniendo en cuenta que el pH disminuye al aumentar la temperatura de la solución (el pH disminuye alrededor de 0.05 °C a 36.5 ± 0.5 °C).

Cuando el pH aumenta hasta 7.45 ± 0.01 , detener la disolución de Tris y añadir HCl 1M gota a gota para bajar el pH a 7.42 ± 0.01 , teniendo cuidado que el pH no baje de 7.4. Luego que el pH baje a 7.42 ± 0.01 , disolver el Tris restante poco a poco hasta que el pH aumente hasta 7.45. Si aún queda Tris, repetir el procedimiento con HCl 1M hasta disolver toda la cantidad de Tris, manteniendo el pH en el rango 7.42 – 7.45. Después de disolver todo el Tris, ajustar la temperatura de la solución a 36.5 ± 0.2 °C y ajustar el pH de la solución con HCl 1M gota a gota a 7.42 ± 0.01 . Finalmente ajustar el pH a 7.40 a 36.5 °C. Remover el electrodo de pH de la solución y lavarlo con agua destilada sobre la solución [67].

Poner la solución en un matraz de 1000 ml. Lavar la superficie del recipiente con agua destilada y añadir los lavados en el matraz varias veces, sujetando la barra de agitación magnética para prevenir que caiga en el matraz.

Añadir agua destilada hasta la línea marcada (no es necesario ajustar exactamente, debido a que el volumen disminuye luego de enfriarse), tapar el matraz y sellarlo con parafilm®. Agitar la solución y mantenerla en agua para enfriarla a 20 °C. Luego que la solución se haya enfriado, ajustar el volumen con agua destilada hasta la línea marcada [67].

3.5. Prueba de inhibición antimicrobiana

En el presente estudio, las actividades antimicrobianas in vitro se llevaron a cabo mediante el uso de un método de difusión de disco, con la cepa bacteriana de *Escherichia coli*.

3.5.1. Cepa bacteriana

La cepa de *Escherichia coli* (*E. coli*), empleada para realizar los ensayos de actividad antimicrobiana de los materiales sintetizados utilizados en este trabajo, es la TOP10 *E. coli*; cultivada en medio de cultivo LB (caldo de luria) y agar EMB (Medio definido con Eosina y azul de metileno) en una incubadora a 37 °C.

3.5.2. Preparación de medios de cultivo

1. Disolver la cantidad de medio necesario en un litro de agua destilada.
2. Mezclar con temperatura y agitación hasta que hidrate correctamente
3. Esterilizar en autoclave a 121 °C durante 15 minutos.
4. Para el caso del medio agar EMB, vaciarlo en cajas Petri estériles evitando la formación de burbuja.

3.5.3. Método

En el presente estudio, las actividades antimicrobianas in vitro se llevaron a cabo mediante el uso de un método de difusión de disco. Este método tenía el siguiente procedimiento: En primer lugar, se prepararon placas de Petri con 20 ml de agar estéril para bacterias. Los discos impregnados con los diferentes materiales sintetizados (BG, compuesto A, B y C), preparadas previamente a las concentraciones de 20 µg/ml, se colocaron asépticamente en placas Petri con controles apropiados.

Las pruebas se realizaron con 20 µg/ml por disco con tres réplicas. Los discos cargados se colocaron en la superficie del medio y se dejaron durante 30 minutos a temperatura ambiente para la difusión del compuesto. El control negativo se preparó usando el disolvente respectivo (agua destilada). La sensibilidad se registró midiendo la zona clara de inhibición del crecimiento de la superficie del agar alrededor de los discos en mm.

Para la realización de la prueba de bioactividad se utilizaron 0.50 gr del biovidrio-NP's ZnO y el biovidrio sin NP's, los materiales se sumergieron en 50 ml de SBF en un tubo de plástico (falcón). Los tubos se sellaron con parafilm® y se les colocó su respectiva tapa, se introdujeron a una incubadora a 37 °C por periodos de 7, 14 y 21 días.

Una vez transcurrido el periodo en la incubadora, las muestras se filtraron mediante una bomba de vacío y papel filtro, después de filtrar toda la solución se recuperó el papel filtro y se secó con la ayuda de una placa de calentamiento. El polvo resultante se raspó cuidadosamente del papel filtro con la ayuda de una espátula y colocado en un tubo eppendorf para su posterior caracterización.

3.6. Prueba de bioactividad

Para la realización de la prueba de bioactividad se utilizaron 0.50 gr del biovidrio-NP's ZnO y el biovidrio sin NP's, los materiales se sumergieron en 50 ml de SBF en un tubo de plástico (falcón). Los tubos se sellaron con parafilm® y se les colocó su respectiva tapa, se introdujeron a una incubadora a 37 °C por periodos de 7, 14 y 21 días.

Una vez transcurrido el periodo en la incubadora, las muestras se filtraron mediante una bomba de vacío y papel filtro, después de filtrar toda la solución se recuperó el papel filtro y se secó con la ayuda de una placa de calentamiento. El polvo resultante se raspó cuidadosamente del papel filtro con la ayuda de una espátula y colocado en un tubo eppendorf para su posterior caracterización.

3.7. Espectroscopia Infrarroja por Transformada de Fourier (FT-IR)

Los espectros FT-IR se obtuvieron empleando un espectrofotómetro infrarrojo Spectrum Two (Perkin Elmer) con detector directo en modo de transmitancia y resolución de 0.5 cm⁻¹. Las muestras se pusieron en contacto con reflectancia total atenuada horizontal (ATR, por sus siglas en inglés) a temperatura ambiente 20 °C y los espectros se consiguieron usando Spectrum en la versión 6.0 del software Lab.

Antes y después de cada lectura se limpió la superficie con alcohol etílico al 70% y se tomó de referencia un nuevo espectro de fondo del aire. Las mediciones se realizaron en modo transmitancia para cada una de las muestras, BG, BG-ZnOA, BG-ZnOB, BG-ZnOC, NP's ZnO.

3.8. Espectroscopia Ultravioleta Visible (UV-Vis)

Los espectros ultravioleta visibles se realizaron utilizando un espectrofotómetro UV-Vis modelo Hach DR5000. Las muestras analizadas se colocaron en una celda de plástico transparente y se suspendieron en 3 ml de agua destilada y se les hizo incidir un haz de luz en el rango de los 300 a 500 nm.

Antes de las lecturas de las muestras se realizó una corrida de muestra solo con agua destilada como blanco, para eliminar la absorbancia del agua destilada y solo obtener la absorbancia de las NP's que se suspendieron en ella.

3.9. Difracción de Rayos X (DRX)

Los estudios de Difracción de Rayos X se llevaron a cabo utilizando un Difractómetro de Rayos X D2-Phaser, Bruker. Las muestras seleccionadas fueron cargados en un soporte y se colocan en una placa de cuarzo para la exposición a la radiación Cu K- α de longitud de onda de 1.5406 Å. El difractómetro se hizo funcionar a 30 kV, 10 mA en un rango de 2θ de 10-50°, con un tamaño de paso de 0.02°, y un tiempo de recuento de 1 s/paso.

CAPÍTULO IV

**RESULTADOS
Y
DISCUSIÓN**

CAPÍTULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En el presente capítulo se describen los resultados obtenidos de las diferentes técnicas de caracterización que se realizaron a los materiales de estudio (nanopartículas de ZnO, biovidrios 45S5 y el material compuesto BG-NP's ZnO) en esta investigación, con el fin de determinar sus propiedades fisicoquímicas (estructura, morfología y composición química). Además, se muestran los resultados de la prueba de bioactividad *in vitro* de los biovidrios y el compuesto mediante la inmersión en Fluido Fisiológico Simulado en diferentes periodos de tiempo (7, 14 y 21 días).

4.1. Preparación de vidrios bioactivos y material compuesto

Como se describe con anterioridad, en la presente investigación se realizó la síntesis de los biovidrios con la incorporación de NP's ZnO a diferentes proporciones en peso partiendo del biovidrio 45S5, obteniendo de esta manera 4 muestras distintas las cuales se observan a continuación en la Tabla 5.

Tabla 5. Relaciones de composición en peso de los vidrios bioactivos y los materiales compuestos.

Muestra	Composición % en peso	NP's ZnO (gr)
Biovidrio 45S5 (BG)	[SiO ₂ , CaO, Na ₂ O, P ₂ O ₅] 45% 24.5% 24.5% 6%	
Compuesto BG-NP's ZnO A	[SiO ₂ , CaO, Na ₂ O, P ₂ O ₅] 45% 24.5% 24.5% 6%	0.18
Compuesto BG-NP's ZnO B	[SiO ₂ , CaO, Na ₂ O, P ₂ O ₅] 45% 24.5% 24.5% 6%	0.20
Compuesto BG-NP's ZnO C	[SiO ₂ , CaO, Na ₂ O, P ₂ O ₅] 45% 24.5% 24.5% 6%	0.22

Estas muestras se obtuvieron por el método sol-gel asistido con microondas, después de ser tratados térmicamente con microondas las muestras se pulverizaron en un

mortero de ágata hasta obtener un polvo fino de color blanco, como se puede apreciar en la Figura 28.

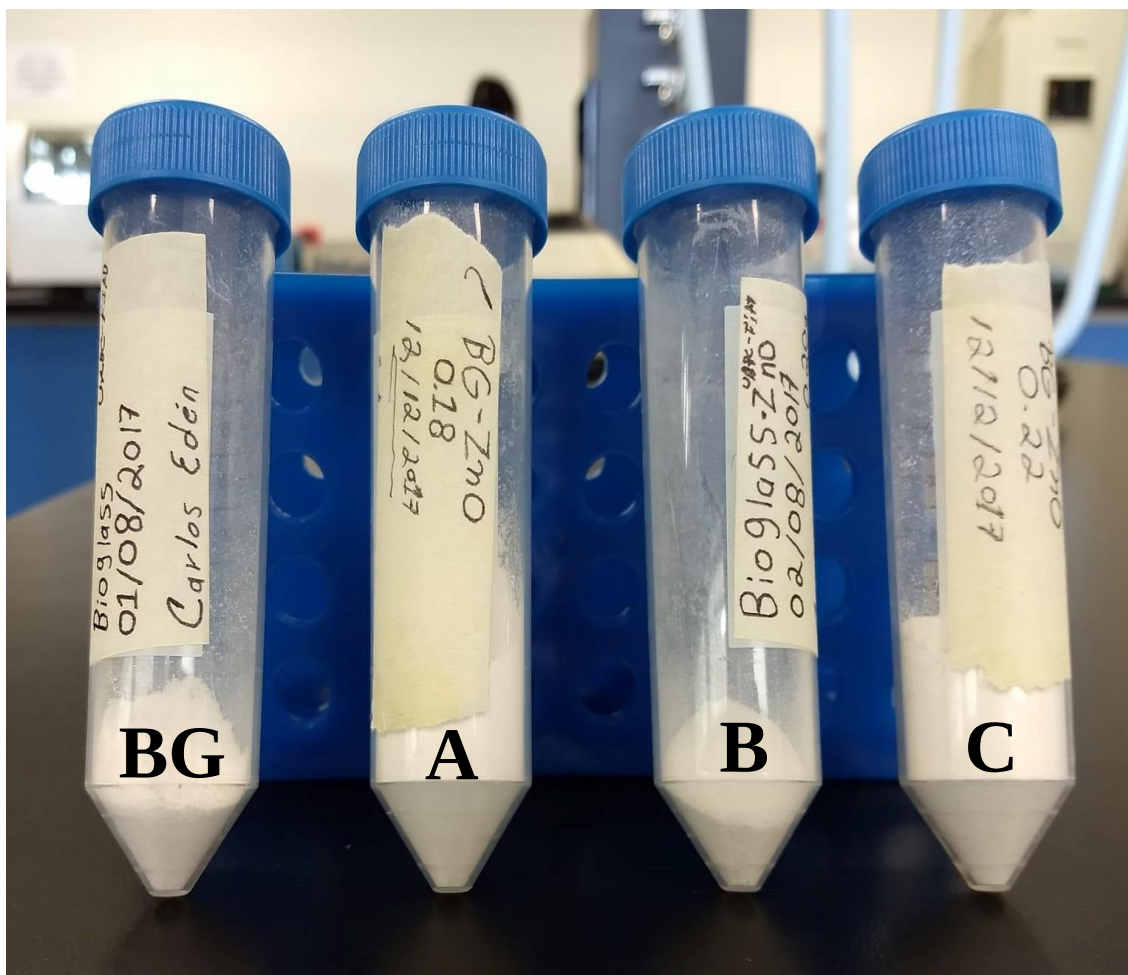


Figura 28. Materiales sintetizados por método sol-gel/microondas, vidrio bioactivo 45S5 (BG) Compuesto BG-NP's ZnO (A), Compuesto BG-NP's ZnO (B), Compuesto BG-NP's ZnO (C).

4.2. Caracterización de vidrios bioactivos 45S5

4.2.1. Espectroscopia Infrarroja por Transformada de Fourier (FT-IR)

En la Figura 29, se muestra el espectro FT-IR de los vidrios bioactivos obtenidos por el método sol-gel asistido con microondas. Se aprecian los enlaces [Si-O-Si] que son característicos de estos vidrios, los cuales aparecen entre las bandas 1000 cm^{-1} y 1100 cm^{-1} , estas bandas aparecen notablemente en el material sintetizado.

El enlace P-O se reporta en las bandas de 600 cm^{-1} , 570 cm^{-1} , apenas es notorio en los resultados debido a la resolución del equipo. La banda de 1200 cm^{-1} - 900 cm^{-1} corresponde a la absorción de los grupos SiO y PO. En la banda de los 1500 cm^{-1} - 1600 cm^{-1} se encuentra otra banda muy notoria que puede ser atribuida la absorción de agua. Además, se aprecia unas bandas entre 1300 cm^{-1} - 1450 cm^{-1} que corresponden a la presencia de carbonatos (CO) [68].

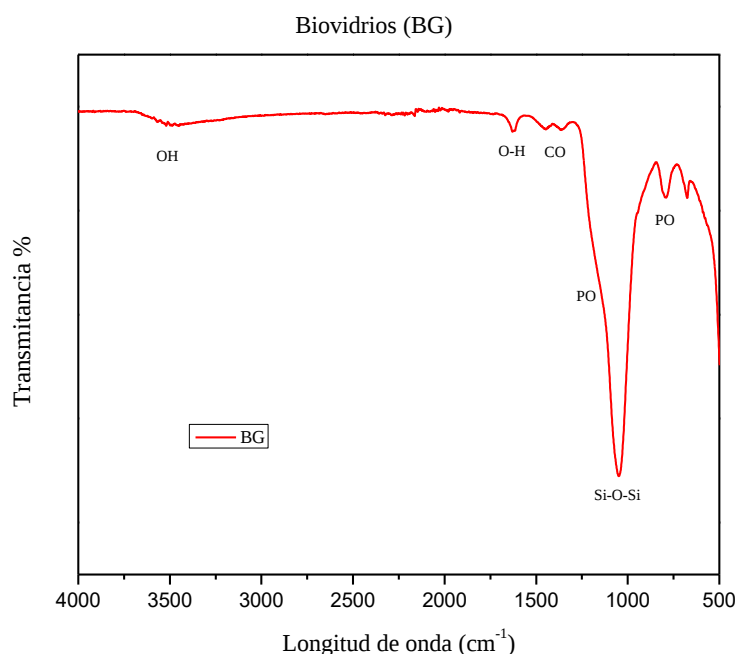


Figura 29. Espectro FT-IR del biovidrio denominado 45S5 obtenido por el método sol-gel/microondas.

4.2.2. Espectroscopia Ultravioleta Visible (UV-Vis)

El espectro de absorción UV-Vis a temperatura ambiente de los biovidrios 45S5 se muestra en la Figura 30. Los vidrios se dispersan en agua destilada con una concentración de 0.10 gr en 3 ml de agua en una celda de plástico, la cual, se introduce en el equipo para su análisis. Debido a la presencia de diferentes componentes en el material, no se puede apreciar un pico característico de los vidrios y no hay reportes en la literatura de su comportamiento en el espectro UV-Vis, esto se atribuye a la dificultad para identificar la presencia de las múltiples fases que presenta el material. El borde de absorción es único a lo largo de todo el espectro. Con este espectro se refuerza la presencia de los enlaces entre los compuestos que conforman al biovidrio, si bien, no es posible identificar con exactitud a alguno en específico, se presentan pequeños picos a la longitud de onda de los 365 a 371 nm, los cuales se atribuyen a la presencia de NP's ZnO.

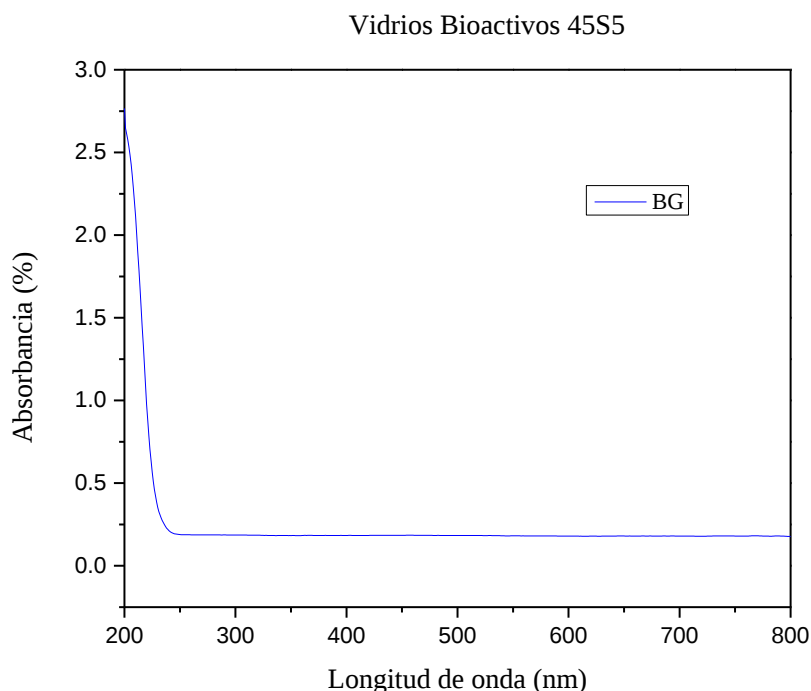


Figura 30. Espectro UV-Vis obtenido de la caracterización de los biovidrios 45S5.

4.3. Caracterización de nanopartículas de óxido de zinc (NP's ZnO)

4.3.1. Espectroscopia Infrarroja por Transformada de Fourier (FT-IR)

En la Figura 31, se muestra el espectro IR de las nanopartículas de ZnO obtenidas por el método de química verde, el espectro presenta una banda a 618 cm^{-1} , que es una señal asociada al modo vibracional de tensión del Zn-O, lo que confirma que el material es de hecho óxido de zinc. Además, se aprecian las bandas a 1644 , las cuales son enlaces dobles C=C o C=O. Las bandas a los 843 y 1378 cm^{-1} se atribuyen a los anillos aromáticos y sus grupos funcionales presentes en los carotenoides de la zanahoria. La banda que va de los 3000 cm^{-1} a 3500 cm^{-1} se podría asociar a la absorción de agua (se identifica enlaces sencillos de hidrógeno con otros elementos). Existen reportes de bandas a los 452 cm^{-1} correspondientes a los enlaces Zn-O, sin embargo, no se muestra debido a que la resolución del equipo comienza en los 600 cm^{-1} [69].

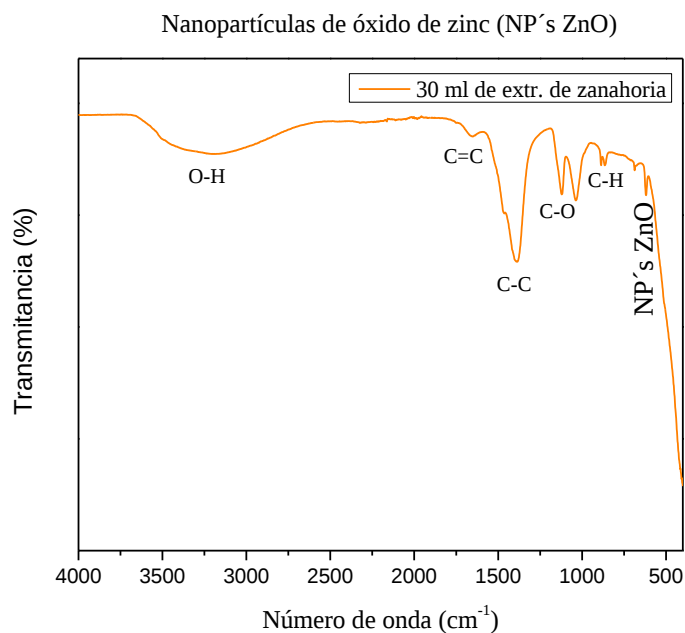


Figura 31. Espectro FT-IR de las nanopartículas de óxido de zinc sintetizadas por el método de química verde.

4.3.2. Espectroscopia Ultravioleta Visible (UV-Vis)

El espectro de absorción UV-Vis a temperatura ambiente de las ZnO-NP se muestra en la Figura 32. Las nanopartículas se dispersan en agua destilada con una concentración de 0.10 gr en 3 ml de agua, esta solución se colocó en una celda de plástico para realizar la medición de UV-Vis. El espectro revela un pico de absorción característico de ZnO a una longitud de onda de 370 nm, que puede asignarse a la absorción intrínseca del intervalo de banda de ZnO debido a las transiciones electrónicas desde la banda de valencia a la banda de conducción [70].

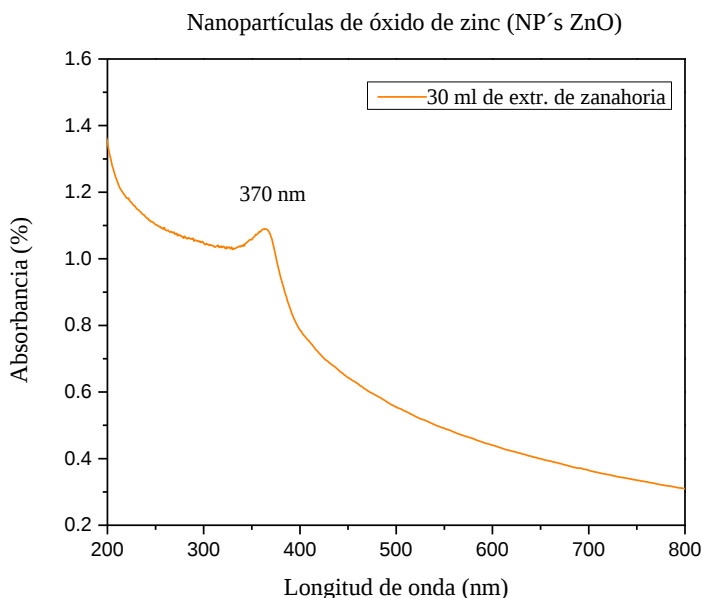


Figura 32. Espectro UV-Vis obtenido de la caracterización de las NP's ZnO.

4.3.3. Difracción de Rayos X (DRX)

El tamaño cristalino y las propiedades estructurales de las nanopartículas de ZnO se revelan mediante el uso de Difracción de Rayos X en polvo. La DRX se lleva a cabo con radiación Cu K α ($k = 0.1540$ nm) y 2 Theta varía desde 20° hasta 80°. El patrón DRX de nanopartículas de ZnO obtenidas por una biosíntesis a partir del extracto de *Daucus carota* (zanahoria) se muestra en la Figura 33. Todos los picos se confirman en

fase hexagonal de ZnO estructura de wurtzita en comparación con la tarjeta JCPDS N° 89-7102. El espectro muestra picos bien definidos a 2 theta, 31°, 34°, 36°, 48°, 56°, 63° y 68° respectivamente, que eran debido a las difracciones de los planos, (100), (002), (101), (102), (110), (103), (112), típico de ZnO en la estructura cristalina tipo wurtzita. Los picos de difracción nítidos y estrechos indican que el producto es de naturaleza cristalina [71]. El tamaño cristalino medio (D) de las partículas se determinó a partir de la medición de ensanchamiento de la línea DRX usando la ecuación de Scherrer.

$$D = 0.89 \lambda / (\beta \cos \theta) \quad (\text{Ec.3})$$

Donde λ es la longitud de onda (Cu $K\alpha$), β es el máximo de ancho en la mitad del pico presente a la línea ZnO (1 0 1) y θ es el ángulo de difracción. El tamaño del cristal calculado de las partículas de polvo es de aproximadamente 14 nm.

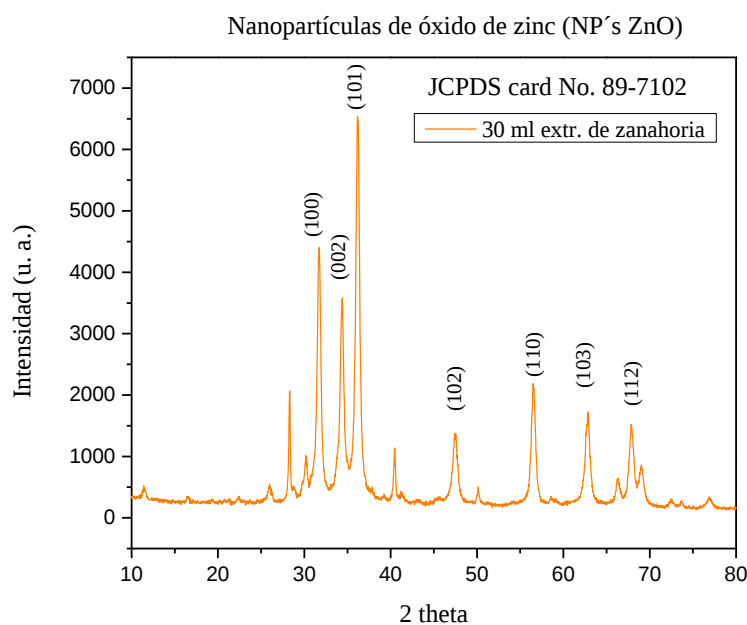


Figura 33. Patrón de Difracción de Rayos X en polvo de NP's ZnO biosintetizadas.

4.4. Caracterización de los materiales compuestos (BG-NP's ZnO)

4.4.1. Espectroscopia Infrarroja por Transformada de Fourier (FT-IR)

En el espectro FT-IR (Figura 34), de los materiales compuestos sintetizados. Se observan las bandas a los 1000 cm^{-1} y 1100 cm^{-1} que representan a los enlaces Si-O-Si, característicos de los vidrios bioactivos. Además, se aprecia la presencia de una banda en la región de 618 cm^{-1} del espectro que se asocia al modo vibracional del grupo Zn-O, esta banda indica la presencia de las NP's de ZnO. También, se pueden observar las bandas 600 cm^{-1} , 570 cm^{-1} , que se asocian a la presencia de enlaces P-O y otras bandas a 1200 cm^{-1} - 900 cm^{-1} que corresponden a la absorción de los grupos SiO y PO las cuales están presentes en el anterior espectro infrarrojo de los vidrios bioactivos sin la incorporación de las nanopartículas de óxido de zinc. El hecho de que aparezcan estas bandas nos indica que el material compuesto sintetizado, tenemos la presencia tanto de los vidrios como el de las nanopartículas de ZnO, la variación en la banda de las nanopartículas varía un poco debido a las diferencias de concentraciones.

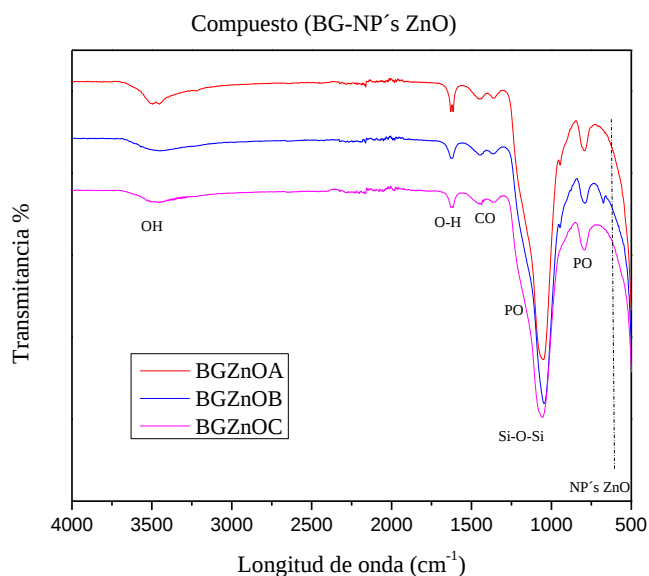


Figura 34. Espectro FT-IR de los diferentes materiales compuestos BG-NP's ZnO.

4.4.2. Espectroscopia Ultravioleta Visible (UV-Vis)

El espectro de absorción UV-Vis a temperatura ambiente de las ZnO-NP se muestra en la Figura 35. Las nanopartículas se dispersan en agua destilada con una concentración de 0.10 gr en 3 ml de agua, esta solución se colocó en una celda de plástico para realizar la medición de UV-Vis. El espectro revela un pico de absorción característico de ZnO a una longitud de onda de 365 a 370 nm, que puede asignarse a la absorción intrínseca del intervalo de banda de ZnO debido a las transiciones electrónicas desde la banda de valencia a la banda de conducción y se presenta en los 3 compuestos, lo cual nos indica la presencia de ZnO en los materiales.

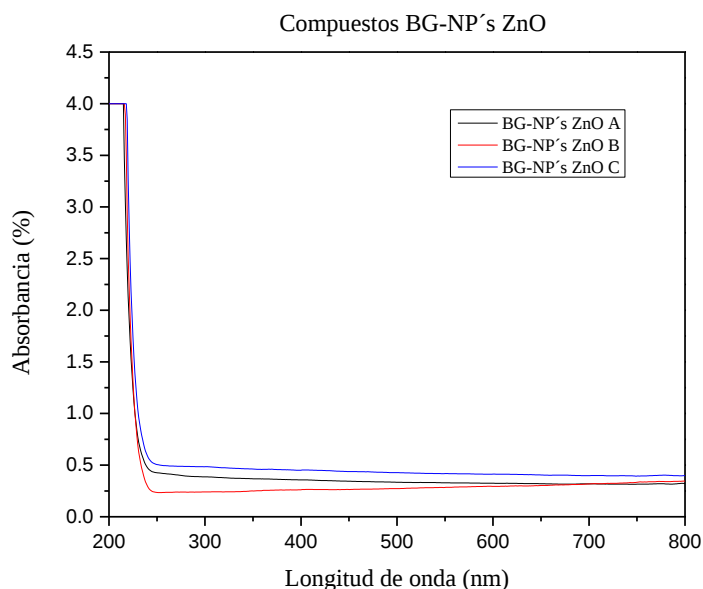


Figura 35. Espectro UV-Vis obtenido de los tres compuestos sintetizados (A, B y C).

4.4.3. Difracción de Rayos X (DRX)

En el espectro DRX obtenido del material compuesto C (Figura 36), se observan claramente los picos de difracción $2\theta = 31^\circ, 48^\circ, 56^\circ$, respectivamente, los cuales se deben a la difracción de los planos, (100), (102), (110). Como se confirmó anteriormente, la aparición de estos picos corresponde a la fase wurtzita de óxido de zinc. Los picos se observan clara y nítidamente, por lo que es posible identificar con

certeza que corresponden a la fase hexagonal wurtzita de ZnO, lo cual nos indica que la incorporación de las nanopartículas de ZnO, no modificaron su ordenamiento cristalográfico al interaccionar con las diferentes fases de los vidrios.

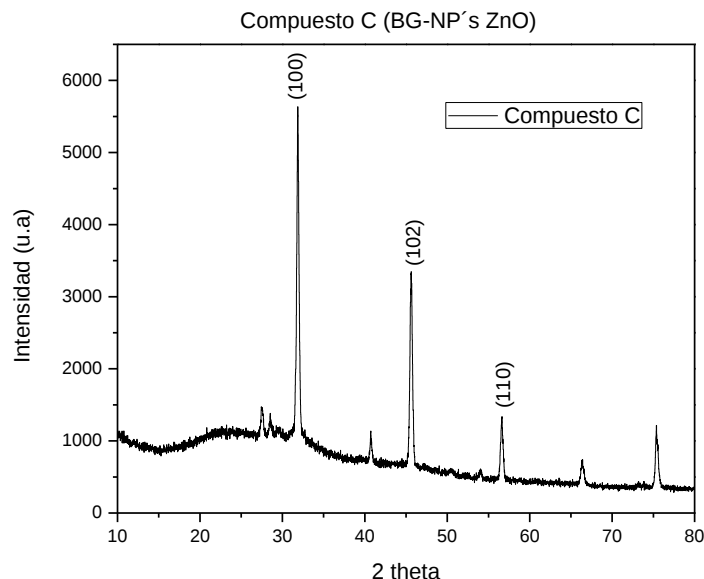


Figura 36. Espectro DRX del material compuesto C (BG-NP's ZnO).

4.5. Caracterización después de la inmersión en Fluido Fisiológico Simulado (SBF)

4.5.1. Espectroscopía Infrarroja por Transformada de Fourier (FT-IR)

Los espectros FT-IR de los biovidrios y de los materiales compuestos, después de su inmersión en SBF durante diferentes intervalos de tiempo se muestran a continuación.

Primero se caracterizaron los materiales que se sometieron a la prueba de bioactividad en SBF durante el periodo de 7 días, el cual se muestra en la Figura 37, las bandas a los 1200 cm^{-1} y 790 cm^{-1} , las cuales son correspondientes a la formación de grupos fosfato respectivamente y las bandas entre 1300 cm^{-1} y 1450 cm^{-1} , que se atribuyen a la presencia de grupos carbonatos, tuvieron un crecimiento y una mayor atenuación, después de haber interactuado con el SBF. El crecimiento de estas bandas

nos indica la formación de una capa de apatita sobre la superficie de nuestros materiales. Además, la banda presente entre los 3500 cm^{-1} y 4000 cm^{-1} , correspondiente a los grupos OH, presenta una disminución, esto, se debe al intercambio iónico entre los materiales y el fluido [72].

El espectro de los materiales después de haber sido sumergidos en SBF durante un periodo de tiempo de 14 días, se muestra en la Figura 38, y al igual que en el espectro de los 7 días en inmersión, presento un crecimiento y una mayor definición en las bandas de 1200 cm^{-1} , 790 cm^{-1} , 1300 cm^{-1} y 1450 cm^{-1} , que corresponden a los grupos fosfatos y carbonatos (en el caso de las ultimas 2), pero en el espectro de los 14 días se presenta un crecimiento mayor con respecto al de los 7 días, lo cual nos indica que nuestros materiales siguieron formado una capa de apatita durante el periodo posterior a los 7 primeros días en contacto con el SBF.

Por último, se muestra el espectro infrarrojo obtenido de la inmersión de los materiales en SBF durante el periodo de 21 días (Figura 39). Al igual que en los espectros anteriores de la inmersión de los materiales se observa el crecimiento de las bandas correspondientes a los grupos fosfatos y carbonatos (1200 cm^{-1} , 790 cm^{-1} , 1300 cm^{-1} y 1450 cm^{-1}), producto de la formación de una capa de apatita en la superficie de los materiales al entrar en contacto con el fluido fisiológico. Se puede observar que el material compuesto C (BG-NP's ZnO 0.22), presenta mejor bioactividad por su incremento en las bandas de fosfatos y carbonatos, lo que indica que existe una mayor formación de apatita en su superficie al entrar en contacto con el SBF.

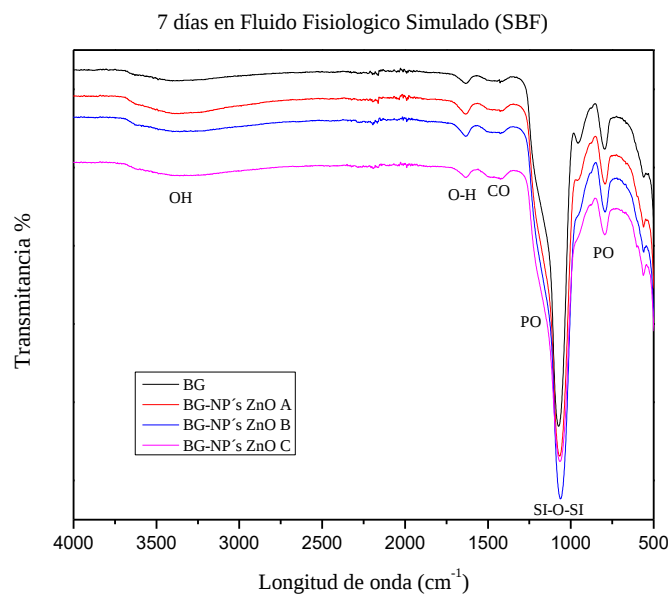


Figura 37. Espectro FT-IR del vidrio 45S5 y los compuestos (A, B, C) después de 7 días en Fluido Fisiológico Simulado.

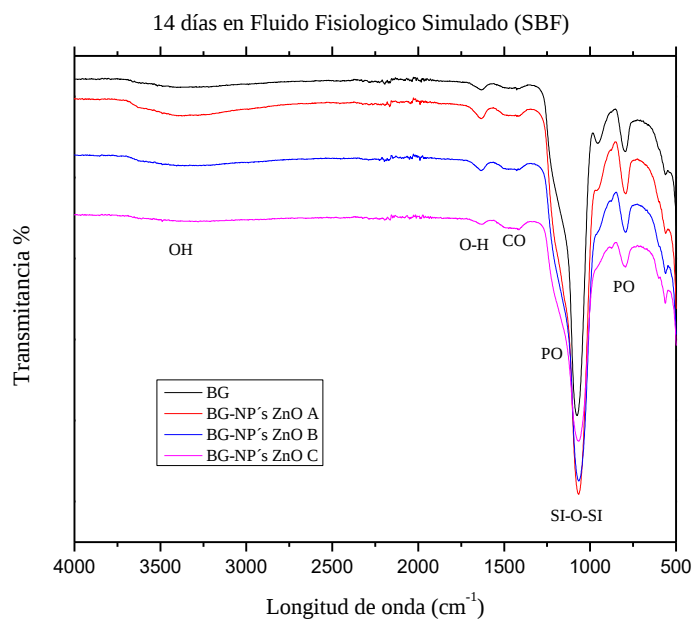


Figura 38. Espectro FT-IR del vidrio 45S5 y los compuestos (A, B, C) después de 14 días en Fluido Fisiológico Simulado.

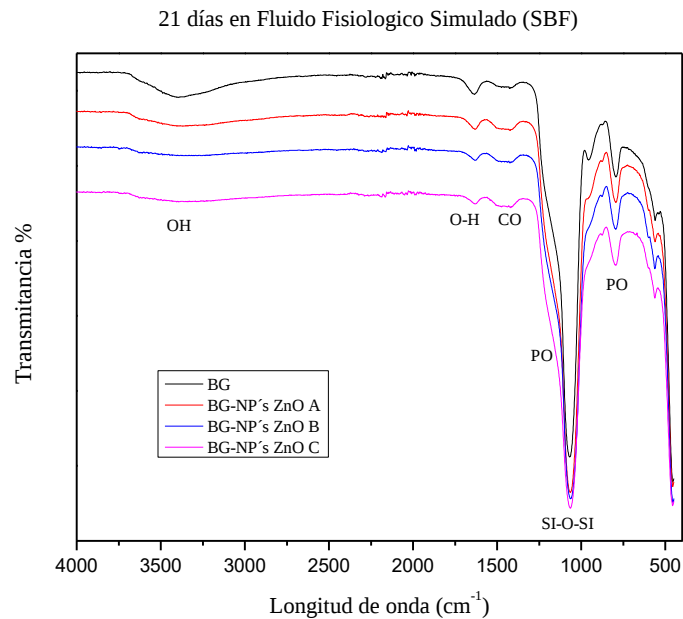


Figura 39. Espectro FT-IR del vidrio 45S5 y los compuestos (A, B, C) después de 14 días en Fluido Fisiológico Simulado.

4.5.2. Difracción de Rayos X (DRX)

Después de haber caracterizado los materiales, posterior a la prueba de bioactividad en Fluido Fisiológico Simulado por Espectroscopia Infrarroja con Transformada de Fourier, determinamos que el compuesto más bioactivo es el compuesto C, por lo cual se decidió realizar su caracterización por Difracción de Rayos X con la finalidad de estudiar su estructura cristalina.

El espectro DRX del compuesto C (Figura 40), muestran la aparición de los picos de difracción característicos de la HA a los 14 días de la inmersión en SBF, estos picos aparecen en $2\theta = 26-29^\circ$, $31^\circ-33^\circ$ y $42^\circ-55^\circ$ [73].

El material compuesto conservo su fase amorfa y la aparición de los picos correspondientes a la HA, esto confirma la formación de la capa de HA sobre el material al entrar en contacto con el SBF. Además, los picos característicos de la nanopartícula

de óxido de zinc ya no aparecen tan nítidamente como en el espectro antes de su inmersión en SBF.

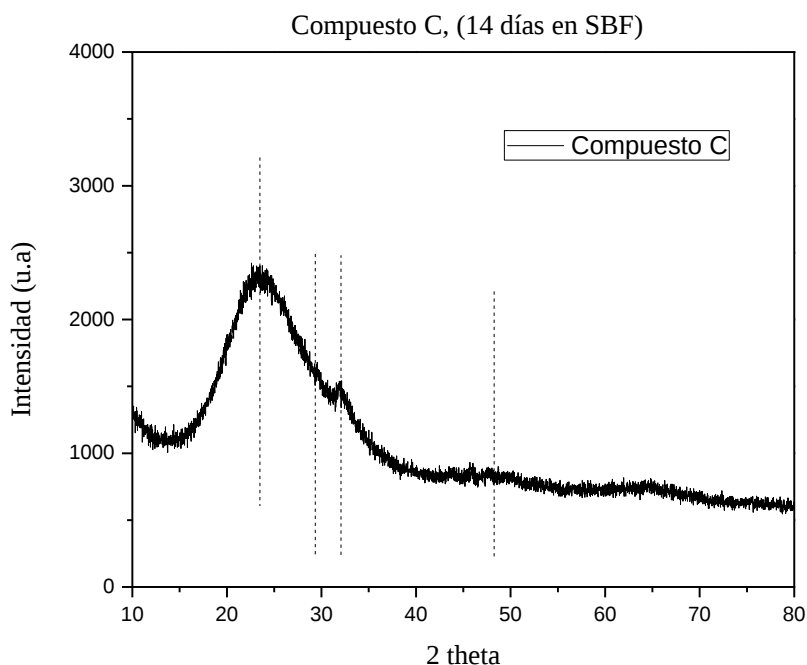


Figura 40. Espectro DRX del compuesto C (BG-NP's ZnO), después de la inmersión en SBF.

4.6. Prueba de actividad antimicrobiana

La actividad antimicrobiana de los materiales sintetizados, se realizó con la bacteria *E. coli*, utilizando una concentración de 20 $\mu\text{g/ml}$ de cada material, primero se siembra la cepa en las cajas Petri previamente preparadas con caldo LB y Agar, los discos se sumergieron en la solución y se colocan en las cajas Petri, se dejan 30 minutos a temperatura ambiente para la difusión de los materiales, posterior a la media hora, se introdujeron a la incubadora a 37 °C durante 24 horas para observar su inhibición.

Como se muestra en la Figura 41, los materiales (BG, A Y B) no presentaron una inhibición, mientras que, el compuesto C, presento una inhibición de $1\text{mm} \pm 0.01 \text{ mm}$. La poca inhibición que presenta el material puede deberse a la poca concentración que

se utilizó, por lo que se recomienda realizar los estudios con una mayor concentración de los materiales.

Las actividades antimicrobianas de los materiales hacia bacterias dependen del tamaño de partícula, concentración de polvo, morfología, área de superficie específica, entre otras.

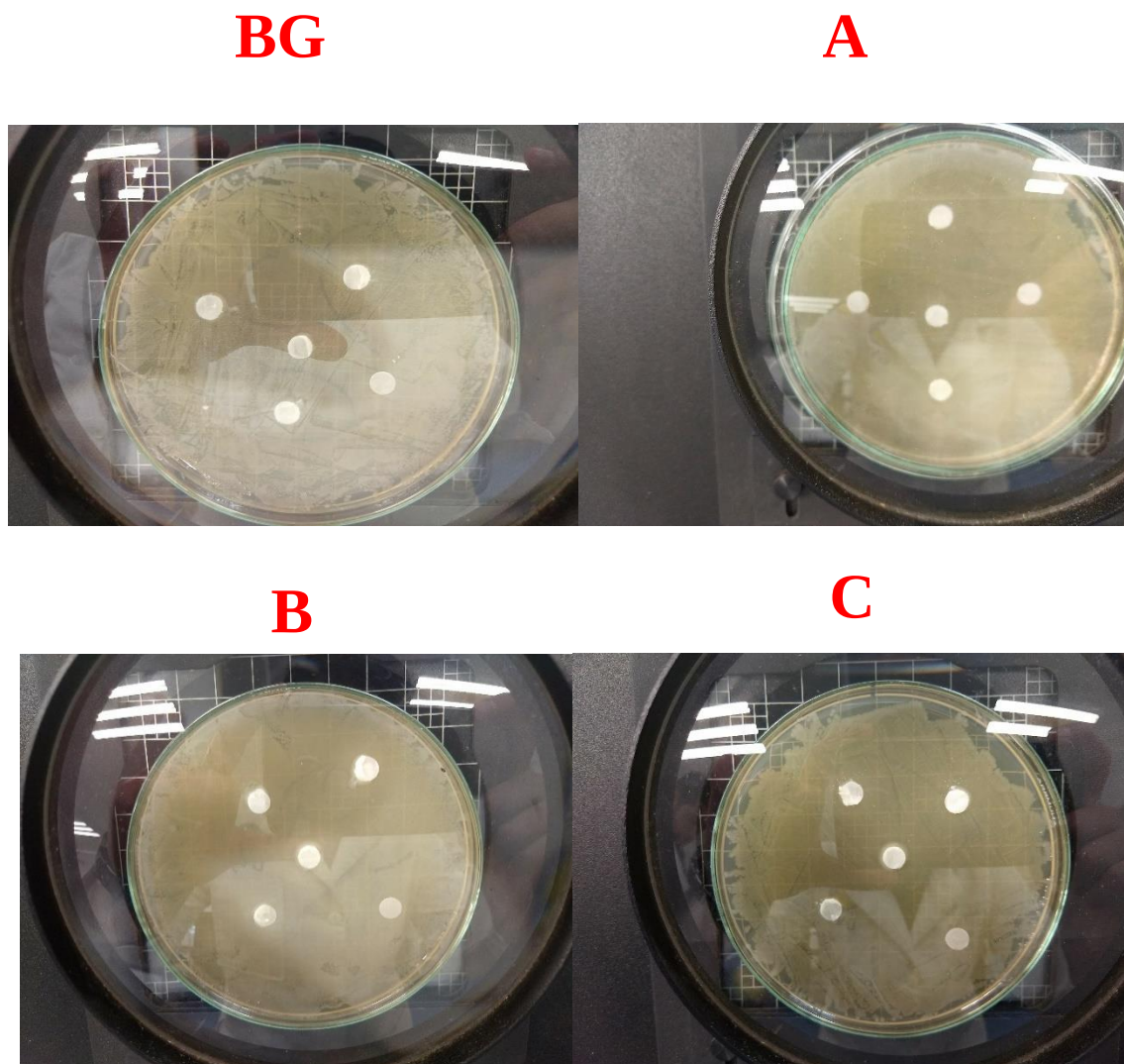


Figura 41. Fotografías que muestran la no inhibición de los materiales (BG, A, B) y la inhibición del material (C).

CAPÍTULO V
CONCLUSIONES

CAPÍTULO V. CONCLUSIONES

Se sintetizó nanopartículas de óxido de zinc por el método biológico de química verde, las NP's ZnO mostraron la fase wurtzita de óxido de zinc, con un tamaño de nanopartícula de 14 nm. La morfología y tamaño de partícula es el deseado, ya que la fase hexagonal de tipo wurtzita es la que se reporta en la literatura con mayor bioactividad.

Es posible sintetizar biomateriales en el sistema cuaternario $\text{SiO}_2\text{-CaO-Na}_2\text{O-P}_2\text{O}_5$ y controlar la incorporación de nanopartículas metálicas (NP's ZnO), mediante la técnica sol-gel asistida con microondas. Los materiales sintetizados presentan las proporciones elementales deseadas, son principalmente amorfos y poseen una gran área superficial.

En este trabajo de tesis se han sintetizado y caracterizado, 4 materiales (BG 45S5, BG-NP's ZnO A, NP's ZnO B, NP's ZnO C) con y sin nanopartículas de óxido de zinc, obtenidos por el método sol-gel asistido con microondas, con el fin de ser utilizadas en la reparación o regeneración de tejido óseo.

La incorporación de nanopartículas de ZnO a los vidrios bioactivos, nos permite obtener materiales compuestos con mejores propiedades bioactivas *in vitro*, en comparación a los vidrios puros, tanto en si capacidad de inducir la formación de apatita tipo ósea, como la capacidad de inhibición antimicrobiana.

Pese a que el procedimiento de síntesis utilizado para la obtención de estos materiales demora alrededor de 15 a 17 días en realizarse, es un proceso reproducible, fácil y confiable a la hora de realizar modificación. Mediante, el tratamiento térmico por microondas se logró optimizar el tiempo de síntesis en al menos 1 día, al reducir el tiempo de secado del material, el cual se hace normalmente a 500-800 °C durante un día. con el horno de microondas convencional toma un máximo de media hora para el secado.

Los materiales demostraron ser biocompatibles *in vitro*, ya que durante la inmersión en SBF presentaron la formación de una capa de hidroxiapatita en su superficie, lo que, según con lo establecido en 1991 y reportado en la literatura, se correlaciona directamente con la biocompatibilidad del material.

Con los resultados obtenidos y sumando el hecho que las nanopartículas de óxido de zinc son más baratas en relación con las provenientes de otros metales como la plata, oro y titanio, se recomienda continuar con el estudio de la incorporación de NP's ZnO en biomateriales para otorgar propiedades antimicrobianas.

La técnica de microondas se reporta en la literatura que induce la porosidad en los materiales por lo cual aumenta su área superficial, además, la radiación por microondas no presentó efectos negativos sobre la biocompatibilidad del material, ya que, en los resultados obtenidos por las diferentes técnicas de caracterización, se comprobó la formación de una capa de HA similar al hueso en la superficie del material al entrar en contacto con el SBF.

Después de la caracterización por FT-IR de los materiales posterior a la inmersión en SBF, el compuesto C (BG-NP's ZnO) dopado con la cantidad de 0.22 mg de nanopartículas de óxido de zinc, presentó una mayor bioactividad que los demás materiales en la inmersión a los 21 días en SBF, al presentar bandas más prolongadas y definidas de los grupos fosfatos y carbonatos respectivamente.

BIBLIOGRAFÍA

1. Afsarimanesh, N., Mukhopadhyay, S. C., & Kruger, M. (2018). Sensing Technologies for Monitoring of Bone-Health: A Review. *Sensors and Actuators A: Physical*. <https://doi.org/10.1016/j.sna.2018.03.027>.
2. Teti, A., & Teitelbaum, S. L. (2018). Congenital disorders of bone and blood. *Bone*. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2018.03.002>.
3. Glendenning, P., Chubb, S. P., & Vasikaran, S. (2018). Clinical utility of bone turnover markers in the management of common metabolic bone diseases in adult. *Clinica Chimica Acta*. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2018.03.009>.
4. Bielby, R., Jones, E., & McGonagle, D. (2007). The role of mesenchymal stem cells in maintenance and repair of bone. *Injury*, 38(1), S26-S32.
5. Weiner, S., & Wagner, H. D. (1998). The material bone: structure-mechanical function relations. *Annual Review of Materials Science*, 28(1), 271-298.
6. Timchenko, E. V., Zherdeva, L. A., Timchenko, P. E., Volova, L. T., & Ponomareva, U. V. (2015). Detailed analysis of the structural changes of bone matrix during the demineralization process using raman spectroscopy. *Physics Procedia*, 73, 221-227.
7. Sommerfeldt, D., & Rubin, C. (2001). Biology of bone and how it orchestrates the form and function of the skeleton. *European Spine Journal*, 10(2), S86-S95.
8. Kohli, N., Ho, S., Brown, S. J., Sawadkar, P., Sharma, V., Snow, M., & García-Gareta, E. (2018). Bone remodelling in vitro: Where are we headed? -A review on the current understanding of mimicking physiological bone remodelling

and inflammation in vitro and the future strategies for testing biomaterials in vitro. *Bone*, 3(2), 1012-1020.

9. Boskey, A. L. (2006). Mineralization, structure and function of bone. *Dynamics of bone and cartilage metabolism. Principles and Clinical Applications*, 2, 201-209.
10. Duplomb, L., Dagouassat, M., Jourdon, P., & Heymann, D. (2007). Concise review: embryonic stem cells: a new tool to study osteoblast and osteoclast differentiation. *Stem Cells*, 25(3), 544-552.
11. Potier, E., Noailly, J., & Ito, K. (2010). Directing bone marrow-derived stromal cell function with mechanics. *Journal of Biomechanics*, 43(5), 807-817.
12. Rizzoli, R. (Ed.). (2011). *Atlas of postmenopausal osteoporosis*. Springer Science & Business Media, 10(2), S86-S95.
13. Salgado, A. J., Coutinho, O. P., & Reis, R. L. (2004). Bone tissue engineering: state of the art and future trends. *Macromolecular Bioscience*, 4(8), 743-765.
14. Hernandez-Gil, I. F. T., Gracia, M. A., del Canto Pingarrón, M., & Jerez, L. B. (2006). Physiological bases of bone regeneration I. Histology and physiology of bone tissue. *Med Oral*, 11, E47-51.
15. Scarano, A., Degidi, M., Iezzi, G., Pecora, G., Piattelli, M., Orsini, G., & Piattelli, A. (2006). Maxillary sinus augmentation with different biomaterials: a comparative histologic and histomorphometric study in man. *Implant Dentistry*, 15(2), 197-207.

16. Briguglio, F., Isola, G., Lapi, M., Briguglio, R., & Briguglio, E. (2009). Valutazione dell'uso di un biomateriale nel trattamento dei difetti parodontali infraossei. *Italian Oral Surgery*, 8(5), 247-255.
17. Durán, J., Alarcón, C., & Velásquez, D. (2012). Application of biological based biomaterials, bioactive molecules and tissue engineering in periodontal plastic surgery. A review. *Rev. Clin. Periodoncia Implantol. Rehabil. Oral*, 5(3), 144-151.
18. B. Ratner, A. Hoffman, F. Schoen and J. Lemons. (1986). *Biomaterials science. an introduction to materials in medicine*. Academic Press, San Diego, USA. 6(8), 2874-2888.
19. Staiger, M. P., Pietak, A. M., Huadmai, J., & Dias, G. (2006). Magnesium and its alloys as orthopedic biomaterials: a review. *Biomaterials*, 27(9), 1728-1734.
20. Anselme, K. (2000). Osteoblast adhesion on biomaterials. *Biomaterials*, 21(7), 667-681.
21. Wang, Y., Kim, H. J., Vunjak-Novakovic, G., & Kaplan, D. L. (2006). Stem cell-based tissue engineering with silk biomaterials. *Biomaterials*, 27(36), 6064-6082.
22. Schmidt, C. E., & Baier, J. M. (2000). Acellular vascular tissues: natural biomaterials for tissue repair and tissue engineering. *Biomaterials*, 21(22), 2215-2231.
23. Williams, D. F. (2008). On the mechanisms of biocompatibility. *Biomaterials*, 29(20), 2941-2953.

24. Ohura, K., Ikenaga, M., Nakamura, T., Yamamuro, T., Ebisawa, Y., Kokubo, T., & Oka, M. (1991). A heat generating bioactive glass–ceramic for hyperthermia. *Journal of Applied Biomaterials*, 2(3), 153-159.
25. Jones, J. R. (2015). Reprint of: Review of bioactive glass: From Hench to hybrids. *Acta Biomaterialia*, 23, S53-S82.
26. Xynos, I. D., Edgar, A. J., Buttery, L. D., Hench, L. L., & Polak, J. M. (2001). Gene expression profiling of human osteoblasts following treatment with the ionic products of Bioglass® 45S5 dissolution. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 55(2), 151-157.
27. Biodinámica® (2018) consultado el 20 de abril del 2018, obtenido de: <http://www.bdpdental.pt/index.php/esES/ionomeros/autocurable>.
28. Ma, P. X., & Elisseeff, J. (Eds.). (2005). *Scaffolding in tissue engineering*. CRC Press. International Standard Book Number, 13 978-1.
29. Aguiar, H., Serra, J., & González, P. (2011). Los vidrios bioactivos en el mundo de los biomateriales. In *Anales de Química*, (Vol. 107, No. 3).
30. Willett, S. D. (1997). Inverse modeling of annealing of fission tracks in apatite; 1, A controlled random search method. *American Journal of Science*, 297(10), 939-969.
31. Donelick, R. A. (1993). U.S. Patent No. 5, 267,274. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office.
32. Arcos, D., & Vallet-Regí, M. (2010). Sol–gel silica-based biomaterials and bone tissue regeneration. *Acta Biomaterialia*, 6(8), 2874-2888.

33. Zheng, K., & Boccaccini, A. R. (2017). Sol-gel processing of bioactive glass nanoparticles: a review. *Advances in Colloid and Interface*, (pp. 41-62).
34. Sahoo, S. K., & Labhasetwar, V. (2003). Nanotech approaches to drug delivery and imaging. *Drug Discovery Today*, 8(24), 1112-1120.
35. Pelletier, D. A., Suresh, A. K., Holton, G. A., McKeown, C. K., Wang, W., Gu, B. & Brown, S. D. (2010). Effects of engineered cerium oxide nanoparticles on bacterial growth and viability. *Applied and Environmental Microbiology*, 76(24), 7981-7989.
36. Nagajyothi, P. C., An, T. M., Sreekanth, T. V. M., Lee, J. I., Lee, D. J., & Lee, K. D. (2013). Green route biosynthesis: Characterization and catalytic activity of ZnO nanoparticles. *Materials Letters*, 108, 160-163.
37. Lakshmeesha, T. R., Sateesh, M. K., Prasad, B. D., Sharma, S. C., Kavyashree, D., Chandrasekhar, M., & Nagabhushana, H. (2014). Reactivity of crystalline ZnO superstructures against fungi and bacterial pathogens: synthesized using Nerium oleander leaf extract. *Crystal Growth & Design*, 14(8), 4068-4079.
38. Alpert, N. L., Keiser, W. E., & Szymanski, H. A. (2012). *IR: Theory and practice of infrared spectroscopy*. Springer Science & Business Media, 2(5), 874-888.
39. Carvalho-Jr, W. M., Souza, F. L., Santos, S. F., & Bobet, J. L. (2018). Rapid microwave-assisted synthesis of zirconium aluminide. *Materials Chemistry and Physics*, 211, 249-257.
40. De la Hoz, A., & Loupy, A. (Eds.). (2013). *Microwaves in organic synthesis*, 2 volume set. John Wiley & Sons, 7, 119-125.

41. Jamróiewicz, M. (2012). Application of the near-infrared spectroscopy in the pharmaceutical technology. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 66, 1-10.
42. Bacsik, Z., Mink, J., & Keresztury, G. (2004). FT-IR spectroscopy of the atmosphere. I. Principles and methods. *Applied Spectroscopy Reviews*, 39(3), 295-363.
43. Berthomieu, C., & Hienerwadel, R. (2009). Fourier transform infrared (FT-IR) spectroscopy. *Photosynthesis Research*, 101(2-3), 157-170.
44. Hoffmann, F. M. (1983). Infrared reflection-absorption spectroscopy of adsorbed molecules. *Surface Science Reports*, 3(2-3), 107-192.
45. Barnes, R., & Dhanoa, M. (1988). Advances in near infra-red calibration development and transfer. *Food Science and Technology Today*, 2, 143-6.
46. Perkin Elmer (2004) Technical note, FT-IR spectroscopy, consultado 5 de abril del 2018. La información fue obtenida de la tienda en línea de PerkinElmer https://shop.perkinelmer.com/Content/technicalinfo/tch_atraccessories.pdf 2004
47. Skoog, D. A., Holler, F. J., & Nieman, T. A. (2001). Principios de análisis instrumental (No. 543.4/. 5). McGraw-Hill Interamericana de España.
48. Giusti, M. M., & Wrolstad, R. E. (2001). Characterization and measurement of anthocyanins by UV-Visible spectroscopy. *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*, 148, 106-109.
49. Silverstein, R. M., & Bassler, G. C. (1962). Spectrometric identification of organic compounds. *Journal of Chemical Education*, 39(11), 546.

50. Hasegawa, M., & Horie, K. (2001). Photophysics, photochemistry, and optical properties of polyimides. *Progress in Polymer Science*, 26(2), 259-335.
51. Perkampus, H. H. (2013). *UV-Vis Spectroscopy and its Applications*. Springer Science & Business Media, 32(1-3), 20-27.
52. Schoonheydt, R. A. (2010). UV-Vis-NIR spectroscopy and microscopy of heterogeneous catalysts. *Chemical Society Reviews*, 39(12), 5051-5066.
53. Wang, G. C., & Lu, T. M. (2014). X-Ray diffraction. In *RHEED Transmission Mode and Pole Figures*, (pp. 55-71). Springer, New York, NY.
54. Goldstein, J. I., Newbury, D. E., Echlin, P., Joy, D. C., Lyman, C. E., Lifshin, E., & Michael, J. R. (2003). Quantitative X-ray analysis: the basics. In *Scanning Electron Microscopy and X-ray Microanalysis*, (pp. 391-451). Springer, Boston, MA.
55. Ou, X., Xiong, X., Zheng, F., Yang, C., Lin, Z., Hu, R., & Liu, M. (2016). In situ X-ray diffraction characterization of NbS₂ nanosheets as the anode material for sodium ion batteries. *Journal of Power Sources*, 325, 410-416.
56. Houck, J. C., & Denicola, L. A. (2000). ISIS: An interactive spectral interpretation system for high resolution X-ray spectroscopy. In *Astronomical Data Analysis Software and Systems IX*, (Vol. 216, p. 591).
57. Unakar, N. J., Tsui, J. Y., & Harding, C. V. (1981). Scanning electron microscopy. *Ophthalmic Research*, 13(1), 20-35.
58. Utsunomiya, S., & Ewing, R. C. (2003). Application of high-angle annular dark field scanning transmission electron microscopy, scanning transmission electron microscopy-energy dispersive X-ray spectrometry, and energy-filtered

transmission electron microscopy to the characterization of nanoparticles in the environment. *Environmental Science & Technology*, 37(4), 786-791.

59. Ogino, M., Ohuchi, F., & Hench, L. L. (1980). Compositional dependence of the formation of calcium phosphate films on bioglass. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 14(1), 55-64.
60. Kokubo, T., Ohtsuki, C., Kotani, S., Kitsugi, T., & Yamamuro, T. (1989). surface structure of bioactive glass-ceramic a-w implanted into sheep and human vertebra. In *Bioceramics. Proc. 2 nd Int. Symp. Ceramics in Medicine*, (Vol. 2, pp. 113-120).
61. Kokubo, T., Kushitani, H., Sakka, S., Kitsugi, T., & Yamamuro, T. (1990). Solutions able to reproduce in vivo surface structure changes in bioactive glass ceramic A W3. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 24(6), 721-734.
62. Filgueiras, M. R., La Torre, G., & Hench, L. L. (1993). Solution effects on the surface reactions of a bioactive glass. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 27(4), 445-453.
63. Kokubo, T., Ito, S., Huang, Z. T., Hayashi, T., Sakka, S., Kitsugi, T., & Yamamuro, T. (1990). Ca, P rich layer formed on high strength bioactive glassceramic A W. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 24(3), 331-343.
64. Takadama, H., Hashimoto, M., Mizuno, M., & Kokubo, T. (2004). Round-robin test of SBF for in vitro measurement of apatite-forming ability of synthetic materials. *Phosphorus Research Bulletin*, 17, 119-125.

65. Arcos, D., & Vallet-Regí, M. (2010). Sol–gel silica-based biomaterials and bone tissue regeneration. *Acta Biomaterialia*, 6(8), 2874-2888.
66. Nava, O. J., Soto-Robles, C. A., Gómez-Gutiérrez, C. M., Vilchis-Nestor, A. R., Castro-Beltrán, A., Olivas, A., & Luque, P. A. (2017). Fruit peel extract mediated green synthesis of zinc oxide nanoparticles. *Journal of Molecular Structure*, 1147, 1-6.
67. Kokubo, T., & Takadama, H. (2006). How useful is SBF in predicting in vivo bone bioactivity. *Biomaterials*, 27(15), 2907-2915.
68. Ma, J., Chen, C. Z., Wang, D. G., Meng, X. G., & Shi, J. Z. (2010). Influence of the sintering temperature on the structural feature and bioactivity of sol–gel derived $\text{SiO}_2\text{--CaO--P}_2\text{O}_5$ bioglass. *Ceramics International*, 36(6), 1911-1916.
69. Saraswathi, V. S., Tatsugi, J., Shin, P. K., & Santhakumar, K. (2017). Facile biosynthesis, characterization, and solar assisted photocatalytic effect of ZnO nanoparticles mediated by leaves of *L. speciosa*. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 167, 89-98.
70. Azizi, S., Namvar, F., Mohamad, R., Tahir, P. M., & Mahdavi, M. (2015). Facile biosynthesis and characterization of palm pollen stabilized ZnO nanoparticles. *Materials Letters*, 148, 106-109.
71. Li, Z., Zhou, Z., Yun, G., Shi, K., Lv, X., & Yang, B. (2013). High-performance solid-state supercapacitors based on graphene-ZnO hybrid nanocomposites. *Nanoscale Research Letters*, 8(1), 473.
72. Serra, J., González, P., Liste, S., Serra, C., Chiussi, S., León, B., & Hupa, M. (2003). FT-IR and XPS studies of bioactive silica-based glasses. *Journal of Non-Crystalline Solids*, 332(1-3), 20-27.

73. Hench, L. L., & Andersson, Ö. (1993). Bioactive glasses. In *An Introduction to Bioceramics*, (pp. 41-62).