



Universidad autónoma de Querétaro  
Facultad de Ingeniería  
Maestría en Nanotecnología

Síntesis de nanoestructuras supra-biomoleculares para el encapsulamiento de  
ácidos nucleicos

Tesis

Que como parte de los requisitos para obtener el Grado de  
Maestro en Ciencias (Nanotecnología)

Presenta

Ana Patricia Santos Valente

Dirigido por:

Dr. Rufino Nava Mendoza

Co-dirigido por:

Dra. Luz María López Marín

Dr. Rufino Nava Mendoza  
Presidente

Dra. Luz María López Marín  
Secretario

Dra. María de los Ángeles Cuan Hernández  
Vocal

Dr. René García Contreras  
Suplente

Dra. Ana Angélica Feregrino Pérez  
Suplente

Handwritten signatures of the five members of the thesis committee, each on a horizontal line.

## RESUMEN

El campo de la ingeniería de tejidos ha ofrecido la posibilidad de regenerar nuevos tejidos para tratar una multitud de enfermedades y afecciones dentro del cuerpo humano. En la actualidad, los trasplantes de órganos representan el tratamiento adecuado para diversas enfermedades. A pesar de los avances en el proceso de trasplantes de órganos, alrededor del mundo existen muchas personas en espera de un trasplante y, debido a la escasez de órganos y tejidos de donantes, muchos mueren mientras están en la lista de espera. La nanotecnología ha permitido avances en el diagnóstico, tratamiento y liberación de fármacos en ingeniería de tejidos. Los entornos celulares y tisulares generalmente tienen componentes individuales en el rango de tamaño de nanómetros. Se prevé que la combinación de nanomateriales con andamios, junto con células que tengan la capacidad de diferenciarse en el tipo celular de interés, darán lugar a tejidos con propiedades únicas. Entre los diversos materiales que existen actualmente, los materiales de sílice mesoporosa han llamado la atención en el área de ingeniería de tejidos. Debido a las importantes características que estos presentan, podrían considerarse como parte de andamios en la regeneración de tejidos. Es por ello que la investigación de materiales mesoporosos en el área de ingeniería de tejidos es de suma importancia. En este trabajo se sintetizaron materiales de sílices mesoporosas con distintas morfologías, partiendo de la síntesis convencional por vía sol-gel de la sílice mesoporosa de tipo SBA-15 con algunas modificaciones. Se realizó una evaluación del grado de biocompatibilidad de las diferentes formas de sílices mesoporosas obtenidas, con el fin de explorar posibles aplicaciones en el campo de la ingeniería de tejidos. Los resultados obtenidos indican que la morfología de los materiales afecta en la citotoxicidad de fibroblastos gingivales humanos.

**(Palabras claves:** Nanotecnología, sílices mesoporosas, biocompatibilidad, ingeniería de tejidos)

## SUMMARY

The field of tissue engineering has offered the possibility of regenerating new tissue in order to treat a multitude of diseases and conditions within the human body. Currently, organ transplants represent the appropriate treatment for various diseases. Despite advances in the organ transplant process, many people are waiting for a transplant around the world and, due to a shortage of donor organs and tissues, many of them die while on the waiting list. Nanotechnology has allowed advances in the diagnosis, treatment and release of drugs in tissue engineering. Cellular and tissue environments generally have individual components in the nanometer size range. The combination of nanomaterials with scaffolds, along with cells that have the ability to differentiate into the cell type of interest, is expected to result in tissues with unique properties. Among the various materials that currently exist, mesoporous silica materials have attracted attention in the area of tissue engineering. Due to all the characteristics that these materials have, they could be considered as part of scaffolding in tissue regeneration. That is why the investigation of mesoporous materials in the area of tissue engineering is so important. In this work, materials of mesoporous silica with different morphologies were synthesized, starting from the conventional synthesis of mesoporous silica of the SBA-15 type by the sol-gel method with some modifications. An evaluation of the degree of biocompatibility of the different forms of mesoporous silica obtained was carried out, in order to explore possible applications in the field of tissue engineering. The results obtained indicate that the morphology of the materials affects the cytotoxicity on human gingival fibroblasts.

**(Key Words:** Nanotechnology, mesoporous silicas, biocompatibility, tissue engineering)

Dirección General de Bibliotecas UAQ

Para papá, mamá, Laura y Jose por estar presente en cada etapa importante de mi vida, por creer en mí y siempre buscar lo mejor para mi persona.

## AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el apoyo financiero recibido a través de una beca para la realización de este posgrado.

A la Dirección General de Asuntos del Personal Académico de la UNAM por el financiamiento parcial de este trabajo a través del proyecto PAPIIT IT203518.

A mis directores de tesis, el Dr. Rufino Nava Mendoza y la Dra. Luz María López por su apoyo, conocimiento y consejos en la realización de este trabajo de investigación.

Al resto de mis sinodales, la Dra. María de los Ángeles Cuan Hernández, el Dr. René García Contreras y la Dra. Ana Angélica Feregrino Pérez por sus aportaciones y sugerencias durante el desarrollo de la investigación.

A la M. en C. Lourdes Palma Tirado del Instituto de Neurobiología de la UNAM por su apoyo en la realización de las micrografías electrónicas de transmisión.

A la Dra. Carmen Peza Ledesma y la M. en I. Alicia del Real López del Centro de física aplicada y tecnología avanzada de la UNAM por los análisis de microscopía electrónica de barrido.

A la Dra. Luz María Avilés Arellano del CINVESTAV Querétaro por su apoyo con las mediciones de potencial zeta.

A los miembros y compañeros del Laboratorio de Nanobio-óptica.

A mis amigos Viviana, Fernando, Jesús, Nallely, Diana y José Carlos.

## ÍNDICE GENERAL

CONTENIDO

RESUMEN .....	I
SUMMARY .....	II
AGRADECIMIENTOS .....	IV
INDICE GENERAL .....	V
INDICE DE TABLA .....	VII
INDICE DE FIGURAS .....	VIII
1. INTRODUCCIÓN .....	1
2. ANTECEDENTES .....	4
2.1 Nanomedicina .....	4
2.2 Ingeniería de tejidos .....	5
2.3 Biomateriales para la regeneración de tejidos .....	5
2.4 Materiales de sílices mesoporosas .....	7
2.5 FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA .....	11
2.5.1 Materiales porosos .....	11
2.5.2 La estructura de materiales mesoporosos .....	12
2.5.3 Método SOL-GEL .....	13
2.5.4 Biocompatibilidad .....	14
2.5.5 Los materiales mesoporosos y la ingeniería de tejidos .....	16
3. JUSTIFICACIÓN .....	18
5. HIPÓTESIS .....	21
6. OBJETIVOS .....	21

Objetivo general: .....	21
Objetivos específicos:.....	21
<b>7. MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>22</b>
7.1 Síntesis de las sílices mesoporosas.....	23
7.2 Funcionalización de las partículas de sílice mesoporosa con el grupo – NH <sub>2</sub> .....	25
7.3 Protonación de partículas de sílice mesoporosa .....	26
7.4 Ensayos biológicos.....	26
7.4.1 Línea celular. ....	26
7.4.2 Curvas de calibración. ....	27
7.4.3 Ensayo MTT .....	28
7.4.4 Ensayos de viabilidad celular (MTT).....	29
7.5 Caracterización de los materiales.....	30
7.5.1 Difracción de Rayos-X (DRX) a bajos ángulos.....	30
7.5.2. Microscopía electrónica de transmisión (TEM) .....	31
7.5.3 Microscopía Electrónica de Barrido (SEM) .....	31
7.5.4 Espectroscopia de infrarrojo.....	31
<b>8. RESULTADOS.....</b>	<b>32</b>
8.1 Características físico-químicas.....	32
8.1.1 Difracción de rayos-X a bajos ángulos.....	32
8.1.2 Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM).....	35
8.1.3 Microscopía Electrónica de Barrido de Alta Resolución (HR-SEM).40	
8.1.4 Espectroscopía de Infrarrojo con Transformada de Fourier (FT-IR)43	
8.1.5 Potencial Zeta ( $\zeta$ ) .....	45

<b>8.2 Ensayos de viabilidad celular MTT .....</b>	<b>46</b>
<b>REFERENCIAS .....</b>	<b>54</b>

### ÍNDICE DE TABLA

Tabla 1. Condiciones de síntesis para la obtención de las diferentes morfologías de sílices mesoporosas .....	25
Tabla 2. Potencial zeta ( $\zeta$ ) de las sílices puras, aminadas e hidrofílicas .....	46

## INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Esquema simplificado del concepto de Ingeniería de tejidos .....	3
Figura 2. Las interacciones de los materiales mesoporosos con los sistemas biológicos y el papel de las propiedades fisicoquímicas en el proceso de nanoingeniería .....	10
Figura 3. Modelos estructurales típicos de poro de materiales mesoporosos ordenados: a P6mm, b Ia3d, c Pm3n, d Im3m, e Fd3m y f Fm3m .....	12
Figura 4. Esquema de reacción general del método sol-gel .....	14
Figura 5. Las propiedades de los materiales influyen en su biocompatibilidad .....	16
Figura 6. Esquema general de la estrategia experimental desarrollada .....	22
Figura 7. Esquema general de la síntesis de sílices mesoporosas con distintas morfología .....	24
Figura 8. Curvas de calibración obtenidas con el ensayo MTT para para todo el rango de concentraciones ensayadas (, 7500, 15000 y 30000 células/pozo) .....	29
Figura 9. Esquema del procedimiento de la exposición del material en cultivos de fibroblastos gingivales humanos (HGF).....	30
Figura 10. Patrón de difracción de rayos-X a bajos ángulos del material de sílice mesoporoso SBA-15 .....	33
Figura 11. Patrón de difracción de rayos-X a bajos ángulos de las diferentes morfologías de sílices mesoporosas sintetizadas .....	34
Figura 12. Imagen TEM del material de sílice mesoporoso SBA-15 .....	35
Figura 13. Imágenes de TEM de las muestras de sílice mesoporosa del tipo espuma (MCF) .....	36

Figura 14. Imágenes de TEM de las muestras de sílice mesoporosa del tipo placa.....	37
Figura 15. Imágenes de TEM de las muestras de sílice mesoporosa del tipo vesícula.....	38
Figura 16. Imágenes de TEM de las muestras de sílice mesoporosa sintetizadas con HCl 2M .....	39
Figura 17. Microscopia electrónica de barrido (SEM) de las muestras de sílice mesoporosa tipo espuma .....	40
Figura 18. Microscopia electrónica de barrido (SEM) de las muestras de sílice nanoporosa tipo placa .....	41
Figura 19. Microscopia electrónica de barrido (SEM) de las muestras de sílice nanoporosa tipo vesícula .....	42
Figura 20. Microscopia electrónica de barrido (SEM) de las muestras de sílice mesoporosa sintetizadas con HCl 2M .....	43
Figura 21. Espectro infrarrojo de las sílices mesoporosas puras y aminadas .....	44
Figura 22. Potencial zeta ( $\zeta$ ) de las sílices puras, aminadas e hidrofílicas .....	45
Figura 23. Ensayo MTT. Comparación de la viabilidad celular de HGF después de 24, 48 y 72 horas de exposición con distintas dosis de espuma de sílice mesocelular.....	47
Figura 24. Ensayo MTT. Comparación de la viabilidad celular de HGF después de 24, 48 y 72 horas de exposición con distintas dosis de la sílice mesoporosa tipo placa .....	48
Figura 25. Ensayo MTT. Comparación de la viabilidad celular de HGF después de 24, 48 y 72 horas de exposición con distintas dosis de la sílice mesoporosa tipo vesícula .....	49

Figura 26. Ensayo MTT. Comparación de la viabilidad celular de HGF después de 24, 48 y 72 horas de exposición con distintas dosis de la Sílice 4M .....	50
Figura 27. Ensayo MTT. Comparación de la viabilidad celular de HGF después de 24 horas de exposición con distintas dosis de sílices nanoporosas .....	50
Figura 28. Ensayo MTT. Comparación de la viabilidad celular de HGF después de 48 horas de exposición con distintas dosis de sílices nanoporosas .....	51
Figura 29. Ensayo MTT. Comparación de la viabilidad celular de HGF después de 72 horas de exposición con distintas dosis de sílices nanoporosas .....	51

Dirección General de Bibliotecas UAO

## 1. INTRODUCCIÓN

La nanotecnología es un campo interdisciplinario que cubre muchas áreas como la física, química, biología, ciencia de materiales, ingeniería mecánica y otras disciplinas relacionadas tanto de ingeniería como de ciencias de la vida. El creciente interés en las aplicaciones médicas de la nanotecnología ha llevado a la aparición de un campo llamado nanomedicina. La combinación de nanotecnología, biología molecular y medicina proporcionará técnicas más eficientes para la detección y diagnóstico de enfermedades a nivel celular. La nanomedicina utiliza herramientas moleculares y conocimiento molecular del cuerpo humano para diagnosticar, tratar y prevenir enfermedades y lesiones traumáticas, aliviar el dolor y preservar y mejorar la salud humana. En resumen, la nanomedicina es la aplicación de la nanotecnología a la medicina (Hibbs, Polytechni-, & Nelson, 2005).

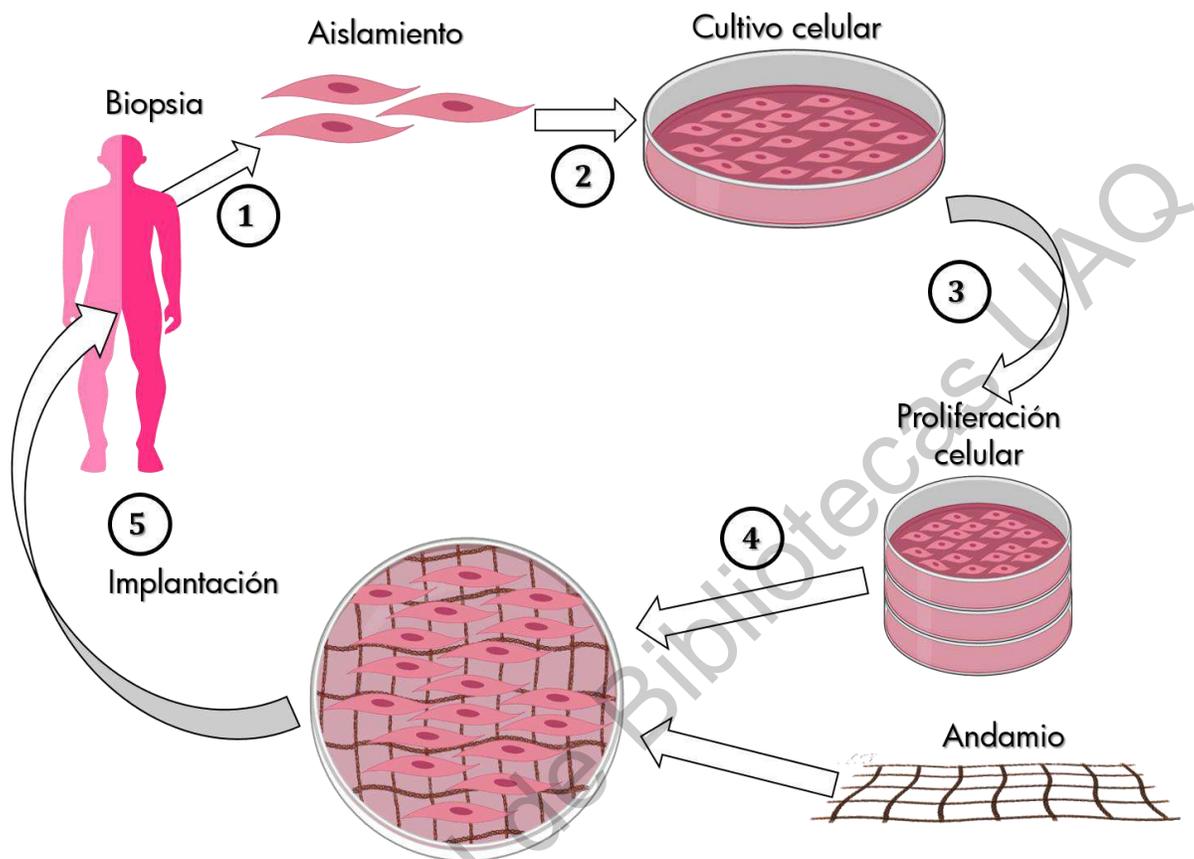
Actualmente una de las áreas científicas de mayor interés es la ingeniería de tejidos, la cual es un campo altamente multidisciplinario que ofrece oportunidades sin precedentes para restaurar, mantener o mejorar las funciones de los tejidos y órganos dañados (Langer & Vacanti, n.d.). Este campo se basa principalmente en el uso de estructuras artificiales porosas de dos o tres dimensiones (2-D o 3-D), conocidas como andamios, para proporcionar el ambiente adecuado para la restauración de tejidos y órganos. Estos andamios básicamente actúan como un dispositivo para la proliferación celular y la formación de tejidos con la ayuda de estímulos químicos como factores de crecimiento y otras biomoléculas o estímulos físicos (Martin, Wendt, & Heberer, 2004). En estos andamios células se cultivan *in vitro* para la formación de tejidos que pueden implantarse en un sitio dañado mediante el uso de los propios sistemas del cuerpo, donde se impulsa la integración de los tejidos *in vivo*. Esta combinación de células, andamios y señales se menciona como la tríada de la ingeniería de tejidos. La palabra andamio denota la estructura del biomaterial antes de que las células hayan sido sembradas (*in vitro* o *in vivo*). Los andamios actúan como una plantilla para la formación de tejido al permitir que

las células migren, se adhieran y produzcan tejido. Para renovar un tejido mediante ingeniería tisular, se requieren los siguientes tres componentes:

- 1) células, que se disocian y cosechan del tejido donante,
- 2) biomateriales como armazón: sustratos en los que las células se unen y proliferan para la formación de tejido, y
- 3) factores de crecimiento: sustancias que promueven la adhesión celular, la proliferación, la migración y la diferenciación regulando hacia arriba o hacia abajo la síntesis de proteínas, factores de crecimiento y receptores (Sudhakar et al., 2015).

A pesar del avance en la fabricación de varios andamios, todavía existe la necesidad de desarrollar una mejor matriz con una mejor eficacia para la regeneración de tejidos. Comúnmente, los andamios con un solo componente no pueden cumplir con todos los requisitos para una regeneración de tejidos altamente eficiente. Para disminuir estos inconvenientes inevitables, es altamente deseable una combinación de nanomateriales con andamios en ingeniería de tejidos para fabricar andamios ideales que imiten estructuralmente la matriz extracelular natural, que ofrece claves biomecánicas relevantes y entrega eficiente de factores bioactivos necesarios para la regeneración de tejidos (Padmanabhan & Kyriakides, 2015).

Uno de los materiales más utilizados son las nanopartículas de sílice mesoporosa (MSN, del inglés *mesoporous silica nanoparticles*) ya que se han aplicado intensamente en el campo de la nanomedicina debido a sus propiedades únicas, que incluyen un alta área superficial, tamaño y volumen de poro ajustables, fácil funcionalización y excelente biocompatibilidad (Croissant, Fatieiev, Almalik, & Khashab, 2018). Varias biomoléculas se conjugan en las superficies de las nanopartículas de sílice mesoporosa para construir sistemas de administración de fármacos que respondan a diversos estímulos, como pH, enzimas, luz, temperatura, etc. (Rahikkala et al., 2018).



**Figura 1.** Esquema simplificado del concepto de Ingeniería de tejidos. Adaptado de Noh et al., (2017)

Mientras tanto, la fácil funcionalización de las MSN también facilita el direccionamiento hacia un blanco o la entrega de cargos de múltiples cargas. La cinética de liberación inteligente y controlable de esas MSN sensibles a estímulos puede mejorar drásticamente la eficacia de la entrega y el efecto terapéutico. Además, el uso de imagenología se puede integrar fácilmente con las MSN ópticamente activas para controlar y guiar el proceso terapéutico.

Debido a los notables logros de las partículas de sílices mesoporosas en nanomedicina, se ha explorado su aplicación en la ingeniería de tejidos. Las MSN tienen algunas ventajas: en primer lugar, la alta bioactividad de óxidos del silicio y la excelente biocompatibilidad de las MSN han sido ampliamente reconocidas (Henstock, Canham, & Anderson, 2014). En segundo lugar, las MSN son

particularmente adecuadas para cargar diversos agentes bioactivos debido a su química altamente controlable, que permite la regulación flexible de la morfología de las partículas, el tamaño y el volumen de los poros e incluso la biodegradabilidad. Finalmente, la buena estabilidad y la fácil funcionalización de las MSN permiten diferentes combinaciones con diferentes andamios, ampliando así las perspectivas de sus aplicaciones.

En medicina, la aplicabilidad de las nanopartículas también debe evaluarse a fondo para su seguridad en los sistemas biológicos. Todas las propiedades fisicoquímicas en cuestión de las nanopartículas deben evaluarse para determinar su interacción con los orgánulos celulares, los tejidos celulares y los organismos. Tales investigaciones seguramente proporcionarán estrategias para desarrollar nuevas generaciones de productos no tóxicos que contengan nanopartículas. Además, estos estudios fundamentales ayudarán a generar nuevos criterios de aceptación y rechazo para aplicaciones in vivo (Chan, 2017).

Por lo tanto, el objetivo del presente trabajo es sintetizar diferentes morfologías de sílices nanoporosas y hacer una evaluación de cómo estas morfologías afectan en la biocompatibilidad y adherencia celular.

## **2. ANTECEDENTES**

### **2.1 Nanomedicina**

En los últimos años, la nanotecnología se ha introducido ampliamente en medicina y ciencias de la salud, originándose una nueva disciplina llamada nanomedicina. La nanomedicina se enfoca en el desarrollo de nuevas herramientas para tratar, diagnosticar y prevenir diversas enfermedades, estas herramientas incluyen desde la detección biológica, administración de fármacos, terapia génica, diagnóstico por imágenes hasta la ingeniería de tejidos (Barkalina, Charalambous, Jones, & Coward, 2014). Siendo esta última una de las áreas que mayor interés ha generado dentro de la comunidad científica.

## **2.2 Ingeniería de tejidos**

La ingeniería de tejidos, la cual se usa para crear, reparar y/o reemplazar células, tejidos y órganos mediante el uso de células y/o combinaciones de células con biomateriales y/o moléculas biológicamente activas y ayuda a producir materiales que se parecen mucho al tejido / tejidos nativos del cuerpo (Danie Kingsley, Ranjan, Dasgupta, & Saha, 2013). Se espera que dichos biomateriales proporcionen temporalmente un soporte (mecánico) suficiente, mientras sirven como matriz para la formación de nuevos tejidos por los cuales eventualmente serán reemplazados. Para dirigir eficazmente la regeneración de tejidos, se necesita el control sobre los procesos clave del destino de las células, como la adhesión, la proliferación, la migración y la diferenciación (Andrée, Barata, Sutthavas, Habibovic, & van Rijt, 2019).

Existen varios beneficios de usar técnicas de micro y nanofabricación para la ingeniería de tejidos, por ejemplo, la fabricación de andamios biomiméticos, la realización de experimentos y resultados más eficientes, y una mayor viabilidad e interacción de células / tejidos / órganos. La nanotecnología se puede utilizar para crear nanofibras, nanopatrones y nanopartículas de liberación controlada con aplicaciones en ingeniería de tejidos, para imitar tejidos nativos, ya que los biomateriales que se diseñarán tendrán un tamaño nanométrico, como fluidos extracelulares, médula ósea, tejidos cardíacos, etc. (Danie Kingsley et al., 2013).

## **2.3 Biomateriales para la regeneración de tejidos**

Sabemos que los biomateriales juegan un papel muy importante en el diseño de andamios para la regeneración de tejidos. Actúan como portadores de células, proporcionándoles la resistencia mecánica necesaria y las señales ambientales para lograr el éxito en la generación de los tejidos necesarios. Hay varios criterios que un biomaterial debe cumplir para servir con éxito como material de armazón de

tejido. Estas propiedades incluyen la resistencia mecánica deseada, la tasa de degradación, la porosidad, las propiedades de la superficie y la capacidad de moldeo. La elección del biomaterial para andamios tridimensionales (3D) también depende del tipo de células que se siembran, la biología deseada del tejido objetivo, los factores de crecimiento involucrados y cualquier problema de biocompatibilidad (Y. Li, Xiao, & Liu, 2016; Pérez, Won, Knowles, & Kim, 2013). Existen diferentes tipos de polímeros, incluidos los polímeros naturales y sintéticos que se han establecido como materiales adecuados para la regeneración de tejidos. Los polímeros naturales incluyen colágeno, alginato, quitosano, ácido hialurónico, seda y otros. Los polímeros sintéticos incluyen ácido poli (L-láctico) (PLLA), ácido poliglicólico (PGA), poli (óxido de etileno) (PEO) entre otros (Allo, Costa, Dixon, & Mequanint, 2012; Geiger, Li, & Friess, 2003; Zhu et al., 2014). Diferentes polímeros tienen diferentes atributos. Si bien los polímeros naturales son biocompatibles y biodegradables, lo que permite construir andamios con una excelente interacción célula-matriz, lograr una degradación personalizada es difícil con ellos (Asghari, Samiei, Adibkia, Akbarzadeh, & Davaran, 2017; Q. Li, Ma, & Gao, 2015; Parenteau-bareil, Gauvin, & Berthod, 2010). En contraste con esto, los materiales sintéticos pueden diseñarse para obtener propiedades predecibles y ajustables, pero generalmente tienen una baja bioactividad y bajas propiedades mecánicas (Allo et al., 2012; Pérez et al., 2013). Además de los polímeros, otros materiales como el fosfato de calcio (hidroxiapatita (HA), fosfato tricálcico  $\beta$ ) también se incorporan en los injertos de tejido, especialmente en los huesos para proporcionar resistencia y rigidez. El bioglass tiene osteoconductividad y rigidez pero es frágil (Liu et al., 2013; Rahaman et al., 2011). Los nanomateriales como el grafeno, los nanotubos de carbono, así como materiales inorgánicos, tales como nanopartículas de sílice mesoporosa, nanopartículas de óxido de hierro con propiedades superparamagnéticas, quantum dots, nanopartículas plasmónicas, o nanoclusters de oro, también sirven como buenos biomateriales, especialmente cuando se desea una buena resistencia y buena conductividad (Ghassemi et al., 2017; Kumar et al., 2016). Muchos de estos materiales a nanoescala tienen propiedades ópticas,

electrónicas y magnéticas únicas que dependen del tamaño y la forma, y estas propiedades dependen de los métodos de síntesis, purificación y caracterización (Pelaz et al., 2017).

Como no existe un biomaterial ideal, para superar las limitaciones de un biomaterial particular, a menudo se combinan sus ventajas. Se pueden combinar polímeros, biocerámicas, nanomateriales y otros biomateriales adecuados para lograr las propiedades deseadas y personalizadas.

#### **2.4 Materiales de sílices mesoporosas**

Entre los diversos biomateriales mencionados, los materiales de sílice mesoporosa se han convertido en una nueva generación de plataformas inorgánicas para aplicaciones biomédicas (Y. Zhou et al., 2018), debido a las importantes características que estos materiales presentan. Los materiales de sílices mesoporosos poseen una gran área superficial (800-1000 m<sup>2</sup>/g), un alto volumen de poros (0.5-1 cm<sup>3</sup>/g), una estructura mesoporosa bien definida con un diámetro de poro ordenado en el rango de 2-50 nm, una superficie interna/externa fácilmente modificable y una excelente estabilidad química/ térmica (Wang, 2009). Por lo tanto, desde su descubrimiento, los investigadores han prestado gran atención para explorar las interacciones de las partículas de sílice mesoporosa con los sistemas biológicos (Hao, Li, & Tang, 2017).

Explorar nuevas aplicaciones de materiales mesoporosos es una de las áreas de mayor interés, debido a su composición y estructura, es posible considerar este tipo de materiales como andamios o como parte esencial de andamios compuestos para la regeneración de tejidos duros (huesos y dientes). Para este tipo de aplicaciones, los materiales mesoporosos deben exhibir un comportamiento bioactivo (Vallet-Regí, Ruiz-González, Izquierdo-Barba, & González-Calbet, 2006).

La mayor parte de la investigación sobre materiales mesoporosos en ingeniería de tejidos se ha centrado en la diferenciación osteogénica y la formación de tejido óseo. Una de las primeras demostraciones del uso de estos materiales en la ingeniería de tejidos fue la fijación de nanopartículas de sílice mesoporosa en sustratos de titanio mediante ensamblaje capa por capa como tecnología de implante (Hu et al., 2010). La superficie modificada mejoró el comportamiento biológico de los osteoclastos. Los materiales de sílice mesoporosa se han utilizado para mejorar las propiedades mecánicas del biomaterial y como vehículos de administración de fármacos para la liberación sostenida y prolongada o para la administración intracelular de genes en la ingeniería del tejido óseo. Se ha demostrado que estos materiales mejoran las propiedades mecánicas de tracción de las fibras de ácido poli (láctico-co-glicólico) en hidrogeles, lo cual es importante para la regeneración de tejidos duros como el hueso (Mehrasa, Asadollahi, Ghaedi, Salehi, & Arpanaei, 2015). Se han generado varios andamios y partículas de compuestos de sílice para mejorar la cinética de suministro de fármacos para obtener una liberación de fármacos eficiente y sostenida (De Matos et al., 2013; Shi, Zhai, Zhao, Wu, & Chang, 2014; Rajendra K. Singh et al., 2015). Se han generado MSN funcionalizados con amina, cargados con fármacos bifosfonatos, incorporados en hidrogeles de colágeno y MSN con poros dilatados cargados con péptidos formadores de hueso (Luo et al., 2015), para una liberación de fármacos prolongada y eficiente a fin de mejorar la diferenciación osteogénica. MSN cargadas de dexametasona a las que se les injertó una proteína morfogenética ósea 2, mejoró la diferenciación osteogénica de células madre mesenquimales (X. Zhou et al., 2015). Además, *Kehr et al.* demostró la liberación controlada por difusión de un fármaco modelo fluorescente a partir de nanopartículas de sílice mesoporosa contenidas dentro de un andamio de hidrogel de alginato reticulado con calcio (Kehr et al., 2013). Un desarrollo muy reciente es el uso de esferas de sílice mesoporosas para la administración de múltiples fármacos que liberan iones de Si y un fármaco inductor de hipoxia para modular el microambiente químico y estimular la diferenciación ósea y la angiogénesis (Shi et al., 2015). La aplicación de partículas de sílice mesoporosas en la ingeniería de

tejidos impulsará nuevos desarrollos tecnológicos, así como la introducción de nuevos métodos y modelos para analizar la biofuncionalidad y el comportamiento. Los avances en el descubrimiento de fármacos y la investigación de células madre promoverán aún más la investigación de sílices mesoporosas y su aplicación médica. La ingeniería de tejidos interconecta la investigación dentro de diferentes disciplinas, lo que estimulará el desarrollo de la tecnología de materiales mesoporosos en la entrega de medicamentos, el diagnóstico y la detección molecular, lo que a su vez da lugar a nuevas herramientas para una mejor comprensión de la biología de las células y la ingeniería de tejidos (Rosenholm, Zhang, Linden, & Sahlgren, 2016).

Una clara ventaja de la nanotecnología es la capacidad de diseñar y optimizar las propiedades fisicoquímicas de los materiales. La modificación del tamaño, la forma y / o la química de superficie de los materiales permite que sus funcionalidades se adapten a los diferentes requerimientos (Hoshyar, Gray, Han, & Bao, 2016). Para aplicaciones biomédicas, el control preciso sobre el tamaño de las partículas, la forma, el tamaño de los poros y la geometría de los poros es muy importante (Tang, Li, & Chen, 2012), ya que pueden influir drásticamente en el comportamiento que tienen los materiales en los sistemas biológicos y podrían, en parte, determinar la biodistribución, la eliminación y la biocompatibilidad de los materiales in vivo (Huang et al., 2011).

Los estudios teóricos y experimentales sobre el diseño de sistemas basados en sílice mesoporosa han llevado a muchos hallazgos interesantes en los últimos años, especialmente en el rol del tamaño de partículas, la forma y la química de superficie de los materiales de sílice mesoporosa en el rendimiento biológico tanto in vitro como in vivo. Al alterar independientemente un parámetro mientras otros se mantienen constantes, los investigadores establecieron sistemáticamente el efecto de cada parámetro de las sílices mesoporosas en los sistemas biológicos, lo que nos permite saber si un parámetro es responsable de una respuesta biológica específica (Hao et al., 2017). Este tipo de estudios proporcionan herramientas

importantes que ayudan en la ingeniería de nanodispositivos a base de sílice mesoporosa para aplicaciones biológicas. (Fig. 1).

La forma de las nano y micropartículas influye esencialmente en las interacciones con los sistemas. Ciertas formas no esféricas, como las varillas alargadas y los discos, superan claramente a sus contrapartes esféricas en términos de escape de la fagocitosis y la unión firme al tejido diana. Además, se han informado alteraciones en la biodistribución, el tráfico celular, la respuesta inmune y la longevidad de la circulación. Sin embargo, estos hallazgos deben verse en contexto con otros parámetros. Las implicaciones de la forma son altamente multifactoriales y los parámetros como el tamaño, la textura, la química de superficie y las propiedades mecánicas deben considerarse en paralelo (Daum, Tscheka, Neumeyer, & Schneider, 2012).



**Figura 2.** Las interacciones de los materiales mesoporosos con los sistemas biológicos y el papel de las propiedades fisicoquímicas en el proceso de nanoingeniería. Adaptado de Singh, (2017).

## 2.5 FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA

### 2.5.1 Materiales porosos

Entre las diversas familias de materiales, los materiales porosos con mesoporos bien definidos dentro de la matriz del material son una gran clase de materiales objetivo. Sus características estructurales únicas, excelentes propiedades fisicoquímicas y amplias aplicaciones son siempre la frontera de la investigación en la comunidad de la ciencia. De acuerdo con la definición de la Unión Internacional de Química Pura y Aplicada (IUPAC), los materiales porosos se pueden dividir en tres categorías: *materiales microporosos* con un tamaño de poro inferior a 2 nm, *materiales mesoporosos* con un tamaño de poro de entre 2 y 50 nm, y *materiales macroporosos* con un tamaño de poro superior a 50 nm. Desde el punto de vista de la composición química, los materiales porosos se pueden dividir en materiales porosos híbridos orgánicos, inorgánicos y orgánicos/inorgánicos.

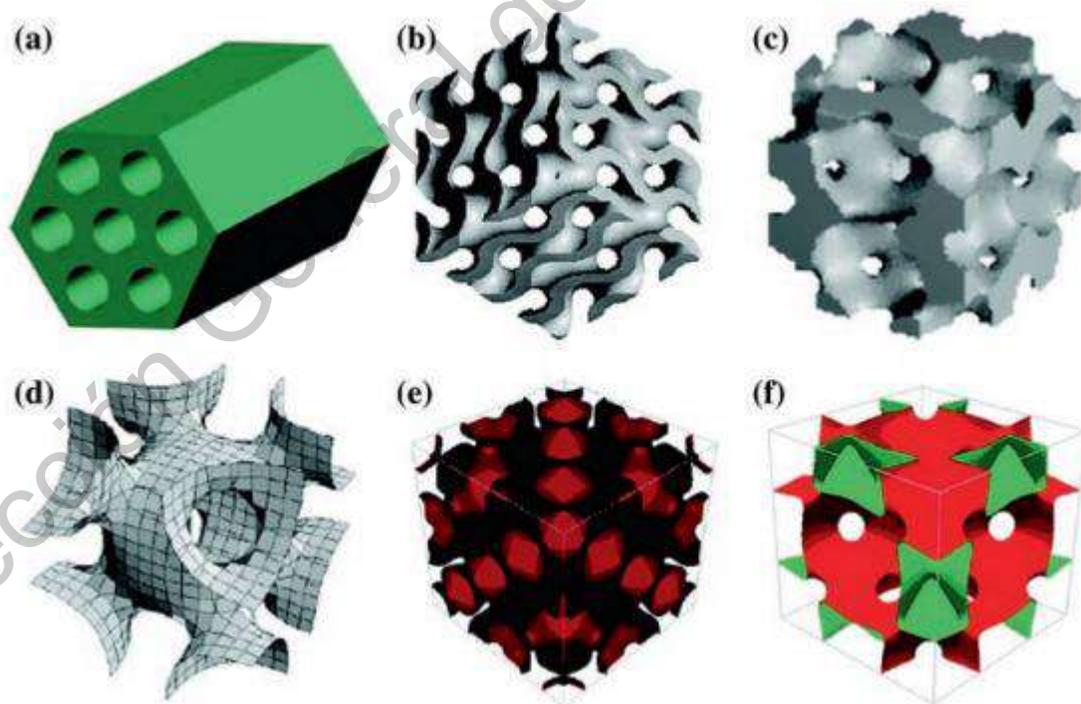
Como el primer material microporoso desarrollado, la zeolita ya ha alcanzado las aplicaciones industriales en el campo del petróleo y la catálisis química (Barkalina et al., 2014). Sin embargo, el tamaño de poro de la zeolita es generalmente más pequeño que 2 nm, lo que restringe severamente la difusión y catálisis de macromoléculas dentro de los poros. Sobre esta base, las investigaciones se han centrado en obtener materiales con poros grandes bien definidos (Gonzalez Solveyra & Szleifer, 2016).

Esta familia de materiales se caracteriza por su gran área superficial, gran volumen de poros, tamaño de poro y morfología controlada, superficie interna/externa fácilmente modificada. Es importante destacar que estos materiales mesoporosos

son un gran avance para resolver el problema crítico de la limitación del tamaño de los poros de la zeolita microporosa tradicional. Por lo tanto, los materiales mesoporosos han llamado la atención de la comunidad científica desde los campos de la física, química y biología.

### 2.5.2 La estructura de materiales mesoporosos

La microestructura de los materiales mesoporosos está influenciada principalmente por la interacción y el autoensamblaje cooperativo entre la plantilla orgánica y el precursor inorgánico. El control de la estructura de los materiales mesoporosos generalmente incluye la matriz de mesoporos y el tamaño del mismo. Al elegir diferentes surfactantes, concentraciones de precursores, tiempo de reacción / temperatura, etc., se pueden fabricar materiales mesoporosos con microestructuras abundantes (Fig. 1.3), como los mesoporos con las geometrías de  $P6mm$ ,  $Ia3d$ ,  $Pm3n$ ,  $Im3m$ ,  $Fd3m$ ,  $Fm3m$ , etc. (Wang, 2009).



**Figura 3.** Modelos estructurales típicos de poro de materiales mesoporosos ordenados: **a**  $P6mm$ , **b**  $Ia3d$ , **c**  $Pm3n$ , **d**  $Im3m$ , **e**  $Fd3m$  y **f**  $Fm3m$ . Adaptado de Chen, (2016).

Los tensioactivos se emplean generalmente como agentes de dirección estructural para fabricar materiales mesoporosos. Por lo tanto, el tipo y la estructura molecular de los surfactantes son importantes para la formación de estructuras mesoporosas (Chen, 2016).

### **2.5.3 Método SOL-GEL**

Los materiales híbridos orgánicos/inorgánicos preparados por el enfoque sol-gel se han convertido rápidamente en un nuevo campo de investigación fascinante en ciencia de los materiales. La explosión de actividad en esta área en las últimas dos décadas ha resultado en un tremendo progreso tanto en la comprensión fundamental del proceso de sol-gel como en el desarrollo y las aplicaciones de nuevos materiales híbridos orgánicos / inorgánicos. La química del sol-gel se ha investigado ampliamente desde la década de 1970, cuando se demostró que las reacciones de sol-gel producen una variedad de redes inorgánicas.

Otra ventaja del procedimiento sol-gel es su capacidad para producir sílice en diferentes formas, como geles moldeados, fibras hiladas, películas delgadas, jaulas moleculares, aerogeles, xerogeles, y materiales mesoporosos para una variedad de aplicaciones tales como gases y separaciones de líquidos, recubrimientos ópticos, películas protectoras, membranas y catálisis. Por lo tanto, cambiar las condiciones de polimerización y procesamiento de sol-gel es útil para controlar las propiedades globales de la sílice (Althman, 2012).

El proceso sol-gel implica la transformación de un sol en un gel. Un sol se define como un coloide de pequeñas partículas que se dispersan en un líquido. Por otro lado, un gel es una masa rígida no fluida y generalmente es una sustancia formada por una red continua que incluye una fase líquida continua. Por lo tanto, las reacciones sol-gel implican reacciones de hidrólisis y condensación de monómeros de alcóxido inorgánico para desarrollar partículas coloidales (sol) y, en consecuencia, convertirlas en una red (gel).

Los alcoxisilanos, como el tetrametilortosilicato (TMOS) y el tetraetilortosilicato (TEOS), se utilizan ampliamente para la producción de geles de sílice.

La figura 4 muestra las reacciones de hidrólisis y condensación involucradas de TEOS. La etapa de hidrólisis se lleva a cabo mediante la adición de agua a la solución TEOS en condiciones neutras, ácidas o básicas.

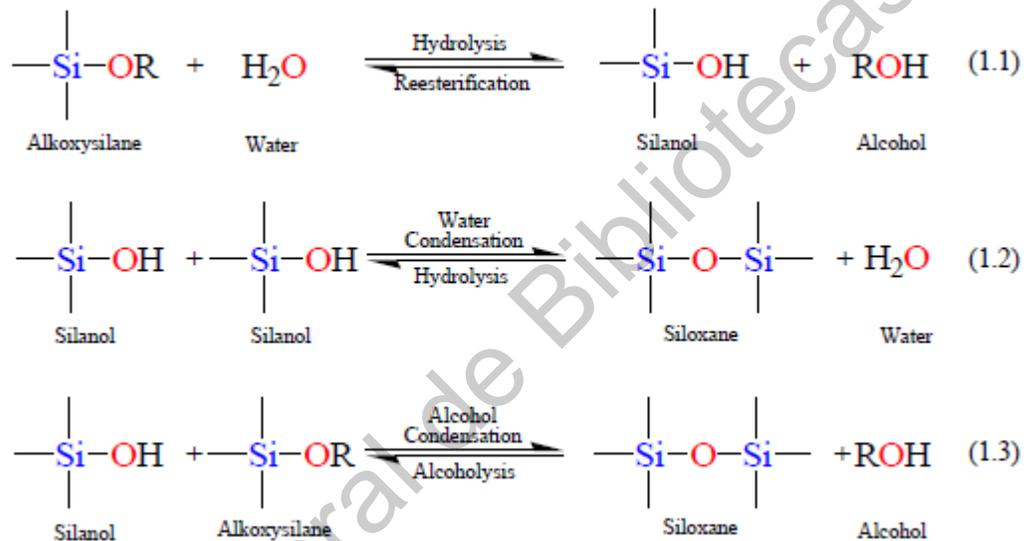


Figura 4. Esquema de reacción general del método sol-gel. Adaptado de Alothman, (2012)

#### 2.5.4 Biocompatibilidad

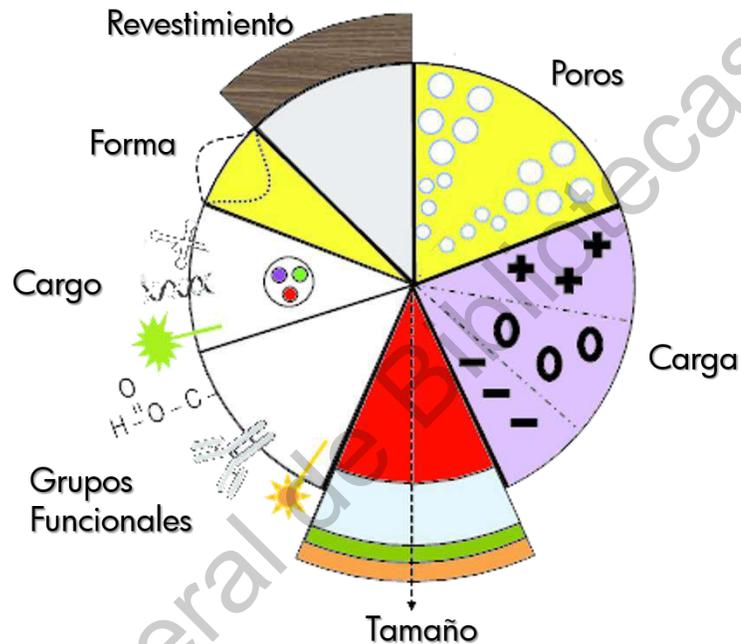
La biocompatibilidad de un material a largo plazo se refiere a la capacidad para realizar su función prevista, con el grado deseado de incorporación en el huésped, sin provocar efectos locales o sistémicos indeseables. Hablando en términos prácticos, la evaluación de la respuesta biológica de un biomaterial se lleva a cabo para determinar si el biomaterial funciona según lo previsto y no presenta un daño significativo para el paciente o usuario. Por lo tanto, el objetivo de la evaluación de

la respuesta biológica es predecir si un biomaterial, un dispositivo médico o una prótesis expresan algún daño potencial al paciente o usuario por condiciones de evaluación que simulan el uso clínico (Chandy, 2020).

En particular, los biomateriales han sido ampliamente investigados para las aplicaciones biomédicas, incluido el desarrollo de nuevas herramientas de diagnóstico como biosensores, terapias novedosas basadas en sistemas de administración de fármacos y andamios para ingeniería de tejidos (Karimi et al., 2015; Ketabchi, Naghibzadeh, Adabi, & Sara, 2016; Naghibzadeh & Adabi, 2014). Debido al uso cada vez más frecuente de biomateriales en diversos campos de la ciencia y la tecnología, han surgido preocupaciones sobre su seguridad, biocompatibilidad y toxicidad. Si bien existe un creciente interés en el uso de nanomateriales en diferentes campos, las preocupaciones de seguridad sobre su uso también están en aumento. Por lo tanto, existe una necesidad urgente de abordar estas preocupaciones y ampliar nuestro conocimiento sobre la seguridad, la biocompatibilidad y la toxicidad de los biomateriales. En aplicaciones biomédicas, en particular, existen serias preocupaciones sobre la seguridad y la biocompatibilidad de los biomateriales, considerando la posibilidad de una mayor interacción entre los biomateriales y el sistema biológico (Adabi et al., 2016).

Vale la pena señalar que las interacciones entre un material y un huésped están influenciadas por varios factores, incluidos los factores del huésped y las propiedades del material y el sitio y la duración de la exposición. Para comprender el tipo y la escala de estas interacciones, los biomateriales deben analizarse para determinar su posible toxicidad en una variedad de entornos in vitro e in vivo (Dobrovolskaia & Neil, 2007). En ingeniería de tejidos, la biocompatibilidad, o no citotoxicidad, es el requisito crítico para que un biomaterial pueda ser utilizado. Una biocompatibilidad exitosa indica que dichos materiales pueden usarse para desarrollar andamios específicos. Los andamios pueden cargarse con tipos celulares específicos, proteínas y/o antibióticos, y posteriormente implantarse para el desarrollo funcional de tejidos (Khan & Tanaka, 2018).

La biocompatibilidad, biodistribución y la eliminación de un biomaterial del cuerpo está determinada por sus propiedades químicas y físicas, incluido el origen, el tamaño, la forma, la carga superficial, porosidad, la concentración, dosis y también la vía de administración (Figura 5) (Foldvari & Bagonluri, 2008).



**Figura 5.** Las propiedades de los materiales influyen en su biocompatibilidad. Adaptado de Górski, (2015).

### 2.5.5 Los materiales mesoporosos y la ingeniería de tejidos

Las aplicaciones de los materiales mesoporosos en la ingeniería de tejidos van desde el desarrollo de materiales y el diseño químico hasta la comprensión básica del comportamiento biológico, el rastreo y la detección de células y moléculas, hasta la tecnología de administración de fármacos y, tal vez, incluso la optimización de las propiedades mecánicas de los biomateriales. Las áreas donde se puede utilizar estos materiales son infinitas, se pueden incorporar en andamios de tejido para la

generación de materiales biofuncionales, como vehículos de administración de fármacos inyectables o administrados por vía oral o incluso como contenedores celulares para la regeneración de básicamente todos los tejidos. Se pueden desarrollar para el seguimiento de células madre o la detección molecular. La degradabilidad de la sílice es un aspecto importante para cualquier formulación de partículas de sílice mesoporosa dirigida para uso clínico, y este es un aspecto que ha recibido una atención muy limitada hasta ahora. Los nuevos enfoques en medicina regenerativa apuntan a la ingeniería de tejidos in situ (Sengupta, Waldman, & Li, 2014) donde se utiliza un biomaterial para capturar y estimular la capacidad regenerativa inherente del tejido cuando se implanta en el organismo. Este enfoque evitará el uso de trasplantes no autólogos, la recolección de células madre o el aislamiento de células madre embrionarias y la engorrosa y costosa expansión y caracterización ex vivo de las células. La tecnología de las células madre pluripotentes inducidas (Takahashi & Yamanaka, 2006), donde las células adultas se reprograman en células madre, ofrece un medio adicional para estimular la regeneración en una situación en la que las células madre son escasas o no funcionan. Un desarrollo interesante sería la generación de andamios con geometrías personalizadas que coincidan con la lesión, lo que permitiría la liberación sintonizada y dirigida de factores de guía o reprogramación de células madre, además del control morfológico de la formación de tejido. Los avances recientes en la impresión 3D han permitido la impresión de materiales biocompatibles, células y componentes de soporte en tejidos vivos funcionales 3D y se está aplicando a la medicina regenerativa (Do, Khorsand, Geary, & Salem, 2015; S. V. Murphy & Atala, 2013, 2014). Otro desarrollo sería el diseño de andamios biofuncionales individualmente adaptados para la reprogramación in situ, el control y la diferenciación de células madre, donde la incorporación de partículas de sílice mesoporosas en la estructura impresa con nano y microgeometrías definidas, ofrecería el control temporal y espacial necesario de las señales biológicas celulares para guiar la formación de tejido funcional.

### 3. JUSTIFICACIÓN

El campo de la ingeniería de tejidos ha ofrecido la posibilidad de regenerar nuevos tejidos para tratar una multitud de enfermedades y afecciones dentro del cuerpo humano. Actualmente existe una necesidad socioeconómica de reparar o regenerar células, órganos y tejidos dañados con el uso de materiales más avanzados, técnicas y métodos centrados en la reconstitución de dichos sistemas sin efectos adversos.

La nanotecnología ha permitido avances en el diagnóstico, tratamiento y administración de medicamentos en la medicina regenerativa o ingeniería de tejidos. Los entornos celulares y tisulares generalmente tienen componentes individuales en el rango de tamaño de cinco a varios cientos de nanómetros. Se prevé que estos nanocomponentes individuales cuando se combinen con superestructuras llamadas andamios y junto con células que tengan la capacidad de diferenciarse en el tipo celular de interés, darán lugar a tejidos con propiedades únicas. Los avances en nanotecnología han comenzado a satisfacer esta necesidad de diseño a nanoescala en ingeniería de tejidos al permitir la fabricación de imitaciones estructurales nanoarquitectónicas de la matriz extracelular, la creación de superficies nanotopográficas y sistemas de liberación de fármacos nanoencapsulados (Goldberg, Langer, & Jia, 2007). Aunque se han logrado avances significativos en la comprensión de las propiedades químicas y biológicas de los biomateriales, hasta ahora un número muy limitado de este tipo de materiales ha satisfecho la demanda de necesidad clínica. Sin embargo, los biomateriales podrían ser clave para habilitar la tecnología para la medicina regenerativa y terapéutica. Se espera que dichos materiales proporcionen temporalmente un soporte suficiente (mecánico), mientras que sirven como una matriz para la formación de tejido nuevo por el cual eventualmente son reemplazados (Ravichandran, Sundaramurthi, Gandhi, Sethuraman, & Krishnan, 2014).

En comparación con otros materiales, las silices mesoporosas son particularmente atractivas debido a sus características estructurales únicas y excelentes

propiedades fisicoquímicas, es por esto que es posible considerar este tipo de materiales como andamios en la regeneración de tejidos. Para este tipo de aplicaciones, los materiales mesoporosos deben exhibir un comportamiento bioactivo, por lo que la biocompatibilidad, o no citotoxicidad, es un requisito crítico para que el biomaterial pueda ser utilizado o no.

A partir de lo expuesto, el objetivo de este trabajo es hacer una evaluación del grado de biocompatibilidad y adherencia celular de las diferentes formas de sílices mesoporosas obtenidas, con el fin de explorar posibles aplicaciones en el campo de la ingeniería de tejidos.

#### **4. DESCRIPCIÓN DE PROBLEMA**

El cuerpo humano tiene una capacidad limitada para autoregenerar correctamente la mayoría, si no todos, sus principales tejidos y órganos en caso de que la integridad original del tejido se haya dañado seriamente como resultado de trastornos médicos que involucran disfunción tisular o déficits devastadores. La ingeniería de tejidos y la medicina regenerativa prometen desarrollar nuevas terapias biológicas para tratar una amplia gama de enfermedades que actualmente son intratables. Además, en la mayoría de los casos, este tipo de investigación busca ayudar y acelerar el proceso regenerativo estimulando el potencial de curación inherente del paciente y, en un futuro, crear tejidos biológicos de reemplazo (o, más desafiante, órganos enteros) para reemplazar daños, deterioro o partes del cuerpo perdidas.

En la actualidad, los trasplantes de órganos representan el tratamiento adecuado para diversas enfermedades. Gracias a los trasplantes, se puede conservar y mejorar la calidad de la vida de quienes los requieren. A pesar de los avances en el proceso de trasplantes de órganos, alrededor del mundo existen muchas personas en espera de un trasplante. Debido a la aguda escasez de órganos y tejidos de

donantes, muchos mueren mientras están en la lista de espera. Actualmente, los tratamientos típicos para el reemplazo de tejido dañado o perdido se basan en el uso de autoinjertos y aloinjertos (Dlaska, Andersson, & Brittberg, 2015). Mientras que estas dos opciones funcionan bastante bien, los aloinjertos conllevan el riesgo de infecciones y el rechazo inmunitario del tejido u órgano transplantado, y los autoinjertos tienen problemas con la disponibilidad de tejidos donantes apropiados (Ravichandran et al., 2014).

Para eludir estos problemas, el campo de la ingeniería de tejidos ha explorado el uso de células madre y moléculas bioactivas en biomateriales para reparar el tejido dañado o enfermo (Ratner et al., 2013). Los biomateriales utilizados en la construcción de andamios juegan un papel muy importante por lo que deben cumplir una serie de requisitos tales como: permitir una estructura de poros con el fin de favorecer la integración y vascularización del tejido, ser biocompatibles, biodegradables y bioactivos, tener adecuadas propiedades mecánicas y una superficie química apropiada que favorezca la adhesión, diferenciación y proliferación celular.

La ingeniería de tejidos es una tecnología biomédica, que ayuda y aumenta la reparación y regeneración de tejidos dañados y deficientes. Emplea los principios de los campos de la ciencia de los materiales, la biología celular, el trasplante y la ingeniería en un esfuerzo por tratar o reemplazar los tejidos dañados. La ingeniería de tejidos y el desarrollo de tejidos u órganos complejos, como el corazón, los músculos, los riñones, el hígado y los pulmones, siguen siendo un hito distante en el siglo XXI. En general, existen cuatro desafíos principales en la ingeniería de tejidos que necesitan optimización. Estos incluyen biomateriales, fuentes celulares, vascularización de tejidos modificados y diseño de sistemas de administración de fármacos. Los biomateriales y las fuentes celulares deben ser específicos para la ingeniería de cada tejido u órgano.

Entre los diversos materiales que existen actualmente, los materiales de sílice mesoporosa han llamado la atención en el área de ingeniería de tejidos, debido a

las importantes características que estos materiales presentan, podrían considerarse como parte de andamios en la regeneración de tejidos. Es por ello que la investigación de materiales mesoporosos en el área de ingeniería de tejidos es de suma importancia.

## **5. HIPÓTESIS**

Mediante la modificación de las condiciones típicas para la síntesis de SBA-15 se obtendrán partículas de sílice nanoporosas de distintas morfologías, morfologías que tienen efecto en la biocompatibilidad y adherencia celular.

## **6. OBJETIVOS**

### **Objetivo general:**

Sintetizar partículas de sílices nanoporosas con distintas morfologías y evaluar su efecto en la biocompatibilidad y adherencia celular en fibroblastos gingivales humanos (HGF).

### **Objetivos específicos:**

Desarrollar una metodología experimental para la síntesis de sílices nanoporosas mediante el método sol-gel, utilizando un agente de hinchamiento para evaluar su efecto en el cambio de la morfología y tamaño de poro.

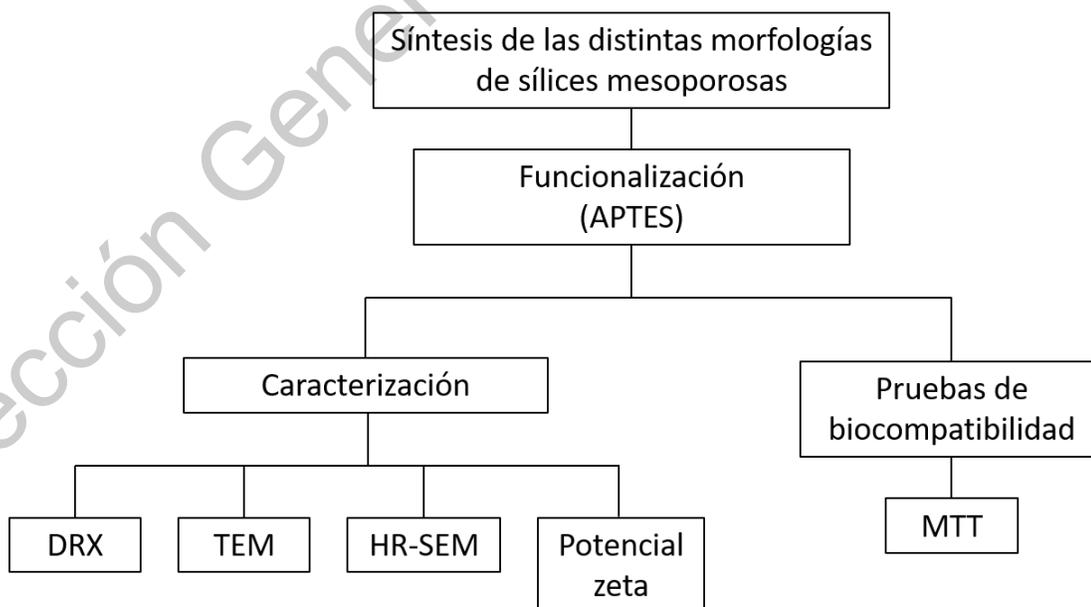
- Analizar las propiedades estructurales y texturales de las sílices nanoporosas sintetizadas.

- Funcionalizar las sílices nanoporosas con grupos amino
- Determinar las características fisicoquímicas de los materiales nanoporosos funcionalizados con grupos amino.
- Analizar la biocompatibilidad de las distintas sílices nanoporosas aminadas en células de fibroblastos gingivales humanos (HGF) utilizando la técnica colorimétrica de reducción del MTT (Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5- difeniltetrazol).
- Analizar la adherencia celular de las sílices nanoporosas aminadas en células de fibroblastos gingivales humanos.

## 7. MATERIALES Y MÉTODOS

El desarrollo de este proyecto, consistió en sintetizar partículas de sílices mesoporosas con morfologías distintas, caracterizar los materiales y evaluar su efecto en la biocompatibilidad en células

En el siguiente diagrama se observa la estrategia experimental desarrollada.



**Figura 6.** Esquema general de la estrategia experimental desarrollada.

## 7.1 Síntesis de las sílices mesoporosas

En la primera parte del trabajo experimental se sintetizaron diferentes morfologías de sílices mesoporosas por vía sol-gel usando el copolímero de tres bloques Pluronic (BASF, EO20-PO70-EO20, P123) como agente director de la estructura, tetraetil ortosilicato (TEOS, 98%, Aldrich) como la fuente de sílice y 1,3,5-Triisopropilbenceno (TIPB) como agente expansor de micelas para producir un hinchamiento de las micelas con el fin de obtener un cambio en la morfología y porosidad del material de sílice, partiendo de la síntesis convencional de la sílice mesoporosa de tipo SBA-15 con algunas modificaciones. Cambiando parámetros como la temperatura, acidez del medio y adicionando agentes expansores de micela, se obtuvieron cuatro sílices mesoporosas (Figura 6) que se denominaron: espuma mesocelular (MCF), Placa, Vesícula (2M) y Vesícula (4M).

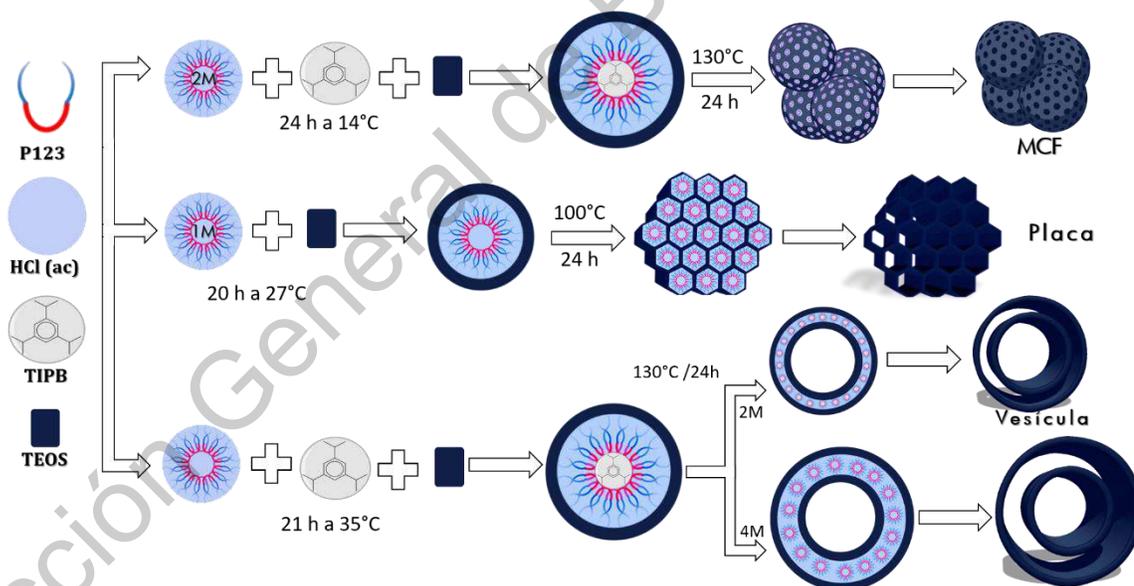
En una síntesis convencional, el copolímero de tres bloques se disuelve en una solución de agua (112.5 mL) y HCl 4M (75 mL) con agitación constante y a una temperatura de 35°C. Una vez completamente disuelto el P123, se inicia el proceso Sol-Gel mediante la adición del precursor de la sílice, el TEOS (11 mL). La reacción se realiza por 24 horas a 35°C y con agitación constante. Una vez transcurrido este tiempo se efectúa el proceso de madurado y la mezcla de reacción se transfiere a un recipiente de polipropileno y se calienta a 80°C durante 24 h sin agitación. Después de la síntesis, el sólido obtenido se recupera por filtración, se lava varias veces con agua destilada, se seca a 100°C y finalmente se calcina a 500°C durante 6h para eliminar el molde orgánico.

En la síntesis de las diferentes morfologías de sílice mesoporosa el surfactante neutro pluronic P123 se disolvió en una solución de ácido clorhídrico (1M, 2M o 4M) y agua desionizada con agitación constante a 35°C. Una vez completamente disuelto el surfactante P123, se inicia el proceso Sol-Gel mediante la adición lenta del precursor de la sílice, el TEOS (8 mL). Cuando se usa el 1,3,5-

Triisopropilbenceno (TIPB) como agente expansor, este se adiciona lentamente antes de la adición del TEOS.

La reacción se mantiene a 14°C, 25° o 35°C con agitación constante durante 24 h. Una vez transcurrido este tiempo, en todos los casos la mezcla de reacción se transfiere a una autoclave de teflón y se calienta a una temperatura entre 80°C y 130°C durante 24 h sin agitación. Después de la síntesis, el sólido obtenido se recupera por filtración, se lava varias veces con agua destilada, se seca a 110°C por 18 h y finalmente se calcina a 550°C durante 4 h para eliminar el molde orgánico.

En la tabla 1 se resumen las diferentes condiciones utilizadas para la síntesis de las diferentes morfologías de sílices mesoporosas.



**Figura 7.** Esquema general de la síntesis de sílices mesoporosas con distintas morfologías.

**Tabla 1.** Condiciones de síntesis para la obtención de las diferentes morfologías de sílices mesoporosas

		MCF	Placa	Vesícula (2M)	Vesícula (4M)	SBA-15
Reactivos		P123 = 2.4 g HCl (2M) = 27 ml H <sub>2</sub> O = 57 ml TIPB = 1.2 ml TEOS = 8 ml	P123 = 1.4 g HCl (1M) = 60 ml TEOS = 3.2 ml	P123 = 3.5 g HCl (2M) = 106.67 ml H <sub>2</sub> O = 30.22 ml TIPB = 5.43 ml TEOS = 8 ml	P123 = 3.5 g HCl (4M) = 106.67 ml H <sub>2</sub> O = 30.22 ml TIPB = 5.43 ml TEOS = 8 ml	P123 = 4.8 g HCl (4M) = 75 ml H <sub>2</sub> O = 112.5 mL TEOS = 10 ml
Reacción	T(°C)	14	25	35	35	35
	T(h)	24	20	21	21	24
Madurado	T(°C)	130	100	130	130	80
	T(h)	24	24	24	24	24
Secado	T(°C)	110	110	110	110	110
	T(h)	18	18	18	18	18
Calcinado	T(°C)	550	550	550	550	550
	T(h)	5	5	5	5	5
Referencias		Cao et al., 2009	Ding et al., 2014	Zhou et al. 2007		Flodström et al., 2003

## 7.2 Funcionalización de las partículas de sílice mesoporosa con el grupo –NH<sub>2</sub>.

La funcionalización superficial de las partículas de sílice mesoporosa se realizó por el método de post-síntesis (ex-situ), es decir, a partir de sílices mesoporosas previamente sintetizadas, y se siguió el procedimiento descrito por Hernández-Morales y colaboradores (2012). Las partículas de sílice se dispersan en una solución de 3- aminopropil trietoxisilano (APTES) (precursor de los grupos funcionales NH<sub>2</sub>) en etanol. La cantidad de APTES se calculó para obtener 0.3 moles de APTES por cada mol de TEOS. La reacción se efectuó a temperatura ambiente y en atmósfera inerte de N<sub>2</sub> por 60 minutos. Posteriormente, se agregó agua desionizada y se mantuvo en agitación por 45 minutos. Se recuperó el sólido

por filtración, se lavó con agua desionizada, se secó a temperatura ambiente y posteriormente a 110 °C por 18 horas.

### **7.3 Protonación de partículas de sílice mesoporosa**

Posteriormente a la funcionalización con grupos amino, las partículas de sílice se protonaron para modificar la carga superficial de las partículas. Se pesaron 25 mg de partículas de sílice mesoporosa y se incubaron a 80°C por 10 min con 10 ml de una solución de 4% de hidróxido de amonio con 4% de peróxido de hidrógeno (1.4 ml amoniac, 1.2 ml de peróxido de hidrógeno, 7.4 ml de agua desionizada). Se centrifugó por 10 min a 4000 rpm y se descartó cuidadosamente el sobrenadante. Enseguida se hizo un lavado con 1 ml de agua desionizada y se centrifugó por 10 min a 4000 rpm y se descartó sobrenadante. Se agregaron 10 ml de solución de 0.4 M de ácido clorhídrico y 4% de peróxido de hidrógeno, (0.3 ml HCl, 1.2 ml de peróxido de hidrógeno, 8.5 ml de agua desionizada). Se incubó a 80°C por 10 min con esta solución para posteriormente centrifugar a 4000 rpm por 10 min. Se hizo otro lavado con 1 ml de agua desionizada (Liu, Stace-naughton, Jiang, & Brinker, 2009).

### **7.4 Ensayos biológicos.**

#### **7.4.1 Línea celular.**

Para los ensayos de biocompatibilidad y adherencia celular se utilizaron células de fibroblastos gingivales humanos (HGF por sus siglas en inglés). Se cultivaron en placas de 10 cm de diámetro en medio de cultivo DMEM rico en glucosa (Sigma-Aldrich) suplementado con antibiótico y antimicótico (100U/ml de penicilina G, 100 mg/ml de estreptomina; Sigma-Aldrich) y suero fetal bovino (FBS) (Sigma-Aldrich) al 10.0 % y se incubaron a 37° C con un 5.0 % de dióxido de carbono.

La línea celular se expandió para la obtención de los stocks correspondientes que fueron congelados para usos posteriores. Su crecimiento y morfología se controlaron bajo supervisión en un microscopio óptico.

Las células se recogieron mediante la adición de 2 ml de tripsina y 5 ml de PBS 1X se dejó actuar durante 5 minutos a 37°C y en una atmosfera húmeda de 5% CO<sub>2</sub>. Trascurrido ese tiempo, se añadió un volumen de 6-8 mL de medio de cultivo para neutralizar la acción de la tripsina. La mezcla se recogió en un tubo y se centrifugó a 2500 rpm 5 minutos. Se desechó el sobrenadante las células se resuspendieron en medio de cultivo, se tomó una alícuota con un volumen de 10 µL y se colocó en la cámara Neubauer para realizar el conteo de células viable y establecer el volumen necesario para cultivar dichas células a la concentración necesaria para realizar los posteriores estudios.

#### **7.4.2 Curvas de calibración.**

Previo a los ensayos de biocompatibilidad, se realizó un estudio en el que se estableció la relación entre el número de células viables y la absorbancia obtenida. De esta forma se pudo establecer la densidad inicial idónea para que, en placas de 24 pozos, las células pudiesen crecer durante, al menos una semana, sin que se induzca muerte celular natural. Estas densidades fueron, 3750, 7500, 15000 y 30000 células iniciales. Todos los ensayos de curvas de calibrado se realizaron por triplicado.

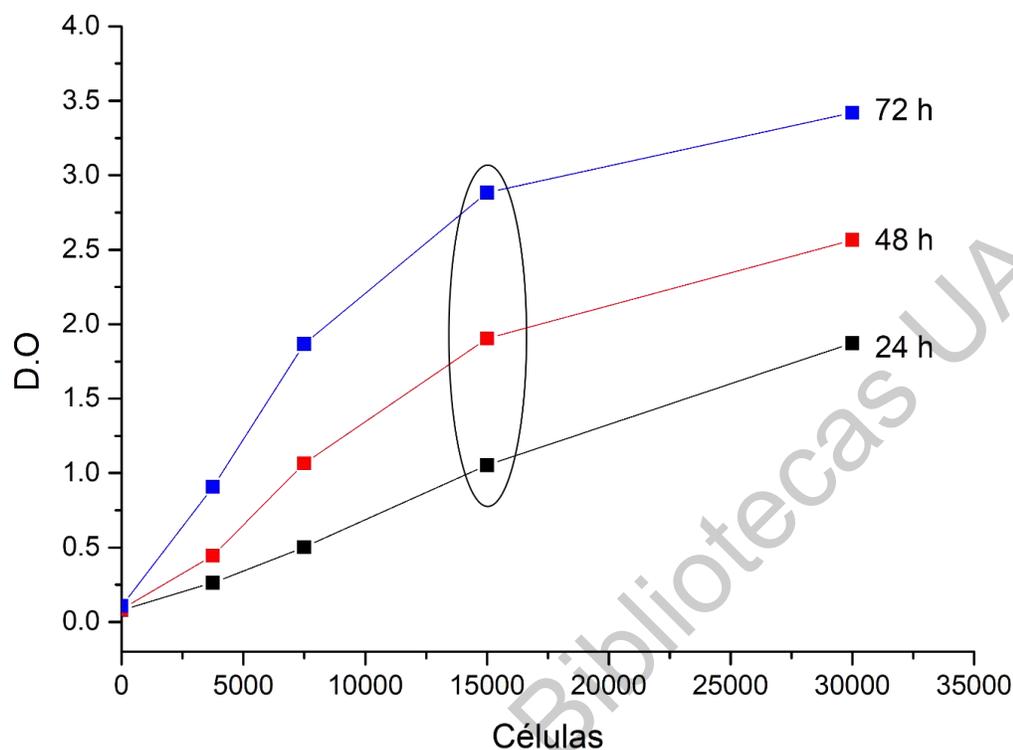
Como se mencionó las células HGF se sembraron a diferentes densidades en placas de 24 pozos, para establecer la cinética de proliferación a lo largo de 3 días. Para cuantificar dicho crecimiento se utilizó el ensayo MTT, que se describe a continuación.

### 7.4.3 Ensayo MTT

El ensayo se basa en la reducción metabólica del bromuro de 3-(4,5- dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT) realizada por la enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa, para generar un compuesto de color violeta (formazán), permitiendo determinar la funcionabilidad mitocondrial de las células tratadas mediante análisis de absorción de luz. En un cultivo de células monoclonales, la cantidad de células vivas es proporcional a la cantidad de formazán producido.

Para este ensayo, las células fueron tratadas con 5mg/mL de MTT, disuelto en PBS e incubadas a 37°C durante 3 horas. Tras este tiempo, las células fueron lavadas con PBS y tratadas con 500 µL de DMSO, solvente capaz de disolver el producto azul de formazán. La densidad óptica producida por este producto fue leída a una longitud de onda de 540 nm utilizando un lector de placas Varioskan™ y de esta manera se determinó el número de células viables en los pozos.

De esta forma se pudo establecer la densidad inicial de siembra idónea, de forma que, en placas de 24 pozos, las células pudiesen crecer durante, al menos una semana, sin que se observara muerte celular natural. Los resultados indicaron que 15,000 células/pozo era una densidad idónea para realizar los siguientes estudios durante 72 horas, sin llegar a una muerte celular, tal y como se muestra en la figura 7.



**Figura 8.** Curvas de calibración obtenidas con el ensayo MTT para para todo el rango de concentraciones ensayadas (, 7500, 15000 y 30000 células/pozo).

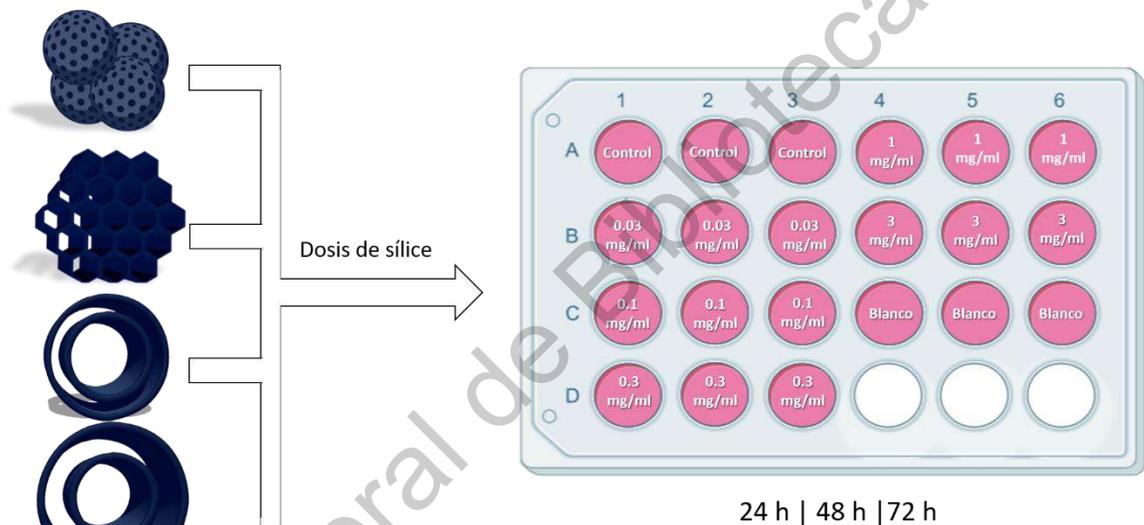
Los resultados obtenidos, sirvieron para la selección de la densidad celular adecuada para evaluar el impacto de las diferentes morfologías de sílice mesoporosa en la viabilidad celular.

#### 7.4.4 Ensayos de viabilidad celular (MTT)

##### 7.4.4.1 El efecto citotóxico de los materiales de sílice naoporosa

La biocompatibilidad de los materiales de sílices nanoporosos aminados se evaluó mediante ensayos de viabilidad MTT. Células de fibroblastos se cultivaron en medio DMEM suplementado con FBS al 10% y se mantuvieron a 37°C en una incubadora humidificada. Las células se cultivaron en placas de 24 pozos (15,000 células/pozo)

durante 24, 48 y 72h. Se cargaron diferentes concentraciones de sílice mesoporosa dentro de un intervalo logarítmico (3, 1, 0.3, 0.1, 0.03 y 0 mg/ml) en las placas (figura 8). Estos ensayos se hicieron por triplicado. Las células cultivadas en ausencia de partículas de sílice nanoporosa actuaron como controles. El procedimiento también se llevó a cabo en ausencia de células que se utilizó como blanco. Después de cultivarse durante 24, 48 y 72h, se determinó la viabilidad de las células mediante el ensayo de proliferación de MTT previamente descrito.



**Figura 9.** Esquema del procedimiento de la exposición del material en cultivos de fibroblastos gingivales humanos (HGF).

## 7.5 Caracterización de los materiales

### 7.5.1 Difracción de Rayos-X (DRX) a bajos ángulos.

La difracción de rayos X (DRX) a bajos ángulos se utilizó para verificar la formación de las estructuras mesoporosas en las diferentes sílices preparadas.

Las mediciones de los difractogramas de las muestras en polvo se registraron en un difractómetro Rigaku, modelo Ultima IV, utilizando radiación monocromática Cu K en el rango  $2\theta$  de  $0.5^\circ$  a  $10^\circ$ .

### **7.5.2. Microscopía electrónica de transmisión (TEM)**

La microscopía electrónica de transmisión permitió determinar la morfología (i.e. forma y/o presencia de aglomeraciones) y tamaño de partícula, junto con la distribución y ordenamiento de los poros de los materiales. La observación fue realizada en un microscopio electrónico de transmisión JEM-1010 (JEOL Co., Peabody), trabajando a 200 kv.

### **7.5.3 Microscopia Electrónica de Barrido (SEM)**

La microscopía electrónica de barrido facilita información acerca de la morfología y la superficie externa de los materiales sintetizados. La observación se realizó en un microscopio electrónico de barrido (SEM) marca Hitachi, modelo SU8230. Se prepararon las muestras realizando una dilución de 1:1 en agua destilada, y se colocaron en un portamuestras de aluminio, el cual se secó al vacío en un desecador.

### **7.5.4 Espectroscopia de infrarrojo**

Con el propósito de verificar la presencia del grupo funcional amino ( $-NH_2$ ) y los grupos funcionales principales de los metabolitos en la superficie de las sílices nanoporosas, a través de las vibraciones de los enlaces principales, se realizó la espectroscopía de infrarrojo con transformada de Fourier (FT-IR).

Los espectros de vibración de IR de las muestras en polvo se midieron en un espectrofotómetro Bruker Vector 33, en el rango de 400 a 4000  $cm^{-1}$ , con una resolución de 2  $cm^{-1}$ .

### **7.5.5 Potencial Z**

La estabilidad de las sílices mesoporosas se obtuvo mediante el análisis de potencial zeta. Medida de la magnitud de la repulsión o atracción electrostática entre las partículas.

Las muestras fueron diluidas (1:1) en 1 ml de agua destilada las cuales se colocaron en celdas DTS1070 (Malvern Instruments Ltd.). Las mediciones de movilidad electroforética fueron realizadas por triplicado en un analizador Malvern Zetasizer Nano Z el cual tiene una potencia de 100 VA, y un láser He-Ne 633nm, max. 4mW, y un rango de medición de 3.8 nm-100 micras (diámetro).

## **8. RESULTADOS**

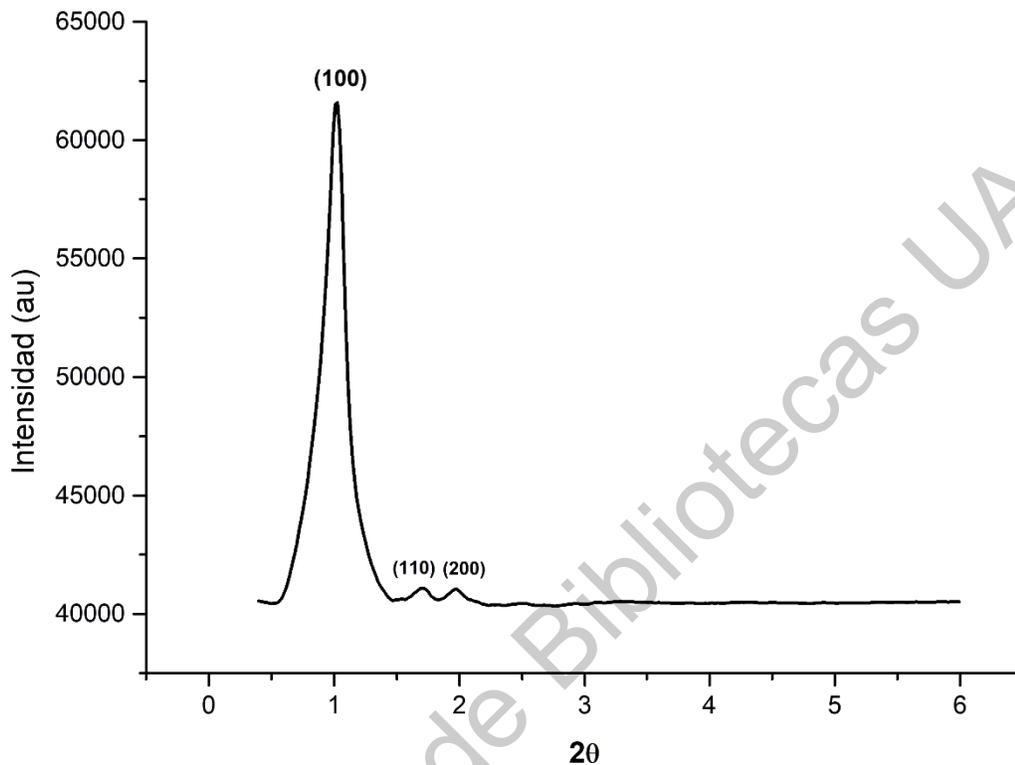
### **8.1 Características físico-químicas**

#### **8.1.1 Difracción de rayos-X a bajos ángulos**

Para determinar el orden y simetría de los poros de nuestros materiales se utilizó difracción de rayos-X a ángulos bajos.

Generalmente, esta técnica se emplea para sólidos cristalinos, permitiendo determinar el tipo de fase cristalina, el tamaño de los cristales y la distribución de los átomos en la red. En el caso de materiales amorfos, tales como los materiales mesoestructurados de este trabajo, la disposición regular de los poros causa también la difracción de los rayos-X, obteniéndose reflexiones características de cada estructura tipo en la zona de bajos ángulos del espectro de difracción. De este modo, la difracción de rayos-X permite también determinar el ordenamiento de la mesoestructura.

La Figura 9 muestra el patrón de difracción de rayos-X a bajos ángulos del material de sílice mesoporosa del tipo SBA-15. En ella se presenta una primera reflexión muy intensa en  $1.0^\circ$  en  $2\theta$ , seguida por otras dos reflexiones muy débiles en  $1.7^\circ$  y  $2.0^\circ$  en  $2\theta$ , que de acuerdo a la literatura corresponden a las reflexiones (10 0), (1 1 0) y (2 0 0), respectivamente, asociadas con la simetría hexagonal.

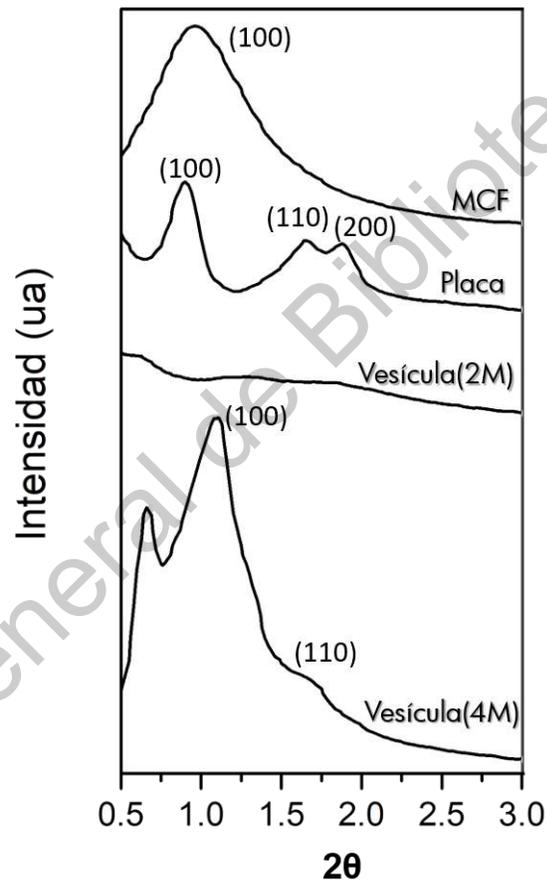


**Figura 10.** Patrón de difracción de rayos-X a bajos ángulos del material de sílice mesoporoso SBA-15.

La Figura 10 muestra los patrones de difracción de las diferentes morfologías de sílices mesoporosas sintetizadas. Para la espuma mesocelular (MCF) la adición del agente expansor de poro (TIPB) durante el proceso de síntesis provoca una disminución en la intensidad de la reflexión (1 0 0) en el difractograma y la ausencia de las reflexiones de baja intensidad (1 1 0) y (2 0 0). Algunos autores han establecido que la transición desde estructuras de ordenamiento hexagonal de canales paralelos hacia estructuras desordenadas en forma de espumas mesocelulares tiene lugar debido a un incremento en el tamaño de poro causado por agentes expansores de poro, los cuales pueden penetrar en el corazón hidrofóbico de la micela de surfactante, distorsionando el empaquetamiento hexagonal típico de la SBA-15. Esto provoca la separación de los nodos de las

micelas, que se agrupan de forma desordenada dando lugar a espumas mesocelulares.

El difractograma de la sílice mesoporosa tipo placa presenta reflexiones en  $2\theta = 0.96, 1.65$  y  $1.8$  indexados a los planos (100), (110) y (200), característico de una simetría de poros hexagonal, similar a la sílice mesoporosa SBA-15.



**Figura 11.** Patrón de difracción de rayos-X a bajos ángulos de las diferentes morfologías de sílices mesoporosas sintetizadas.

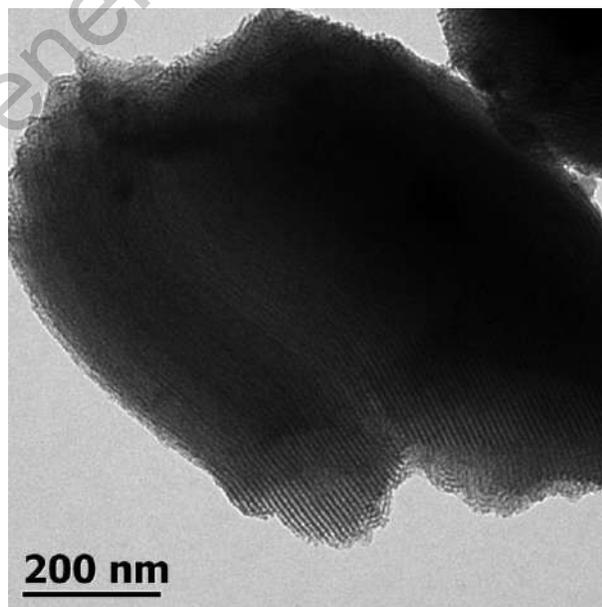
En el caso de la sílice mesoporosa tipo vesícula (2M), la cual también fue modificada añadiendo un agente expansor y cambiando las condiciones ácidas del medio (en el proceso de síntesis se utilizó ácido clorhídrico 2M), no pueden identificarse las

difracciones características observadas en la SBA-15 y la sílice mesoporosa tipo placa anteriormente mencionadas. Esto podría deberse a una pérdida en el ordenamiento estructural durante el proceso de expansión, dando lugar a materiales menos ordenados. En cambio, en la sílice mesoporosa tipo vesícula sintetizada utilizando una solución de ácido clorhídrico 4M, se observa una reflexión en (100) y una más débil en (110).

### 8.1.2 Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM)

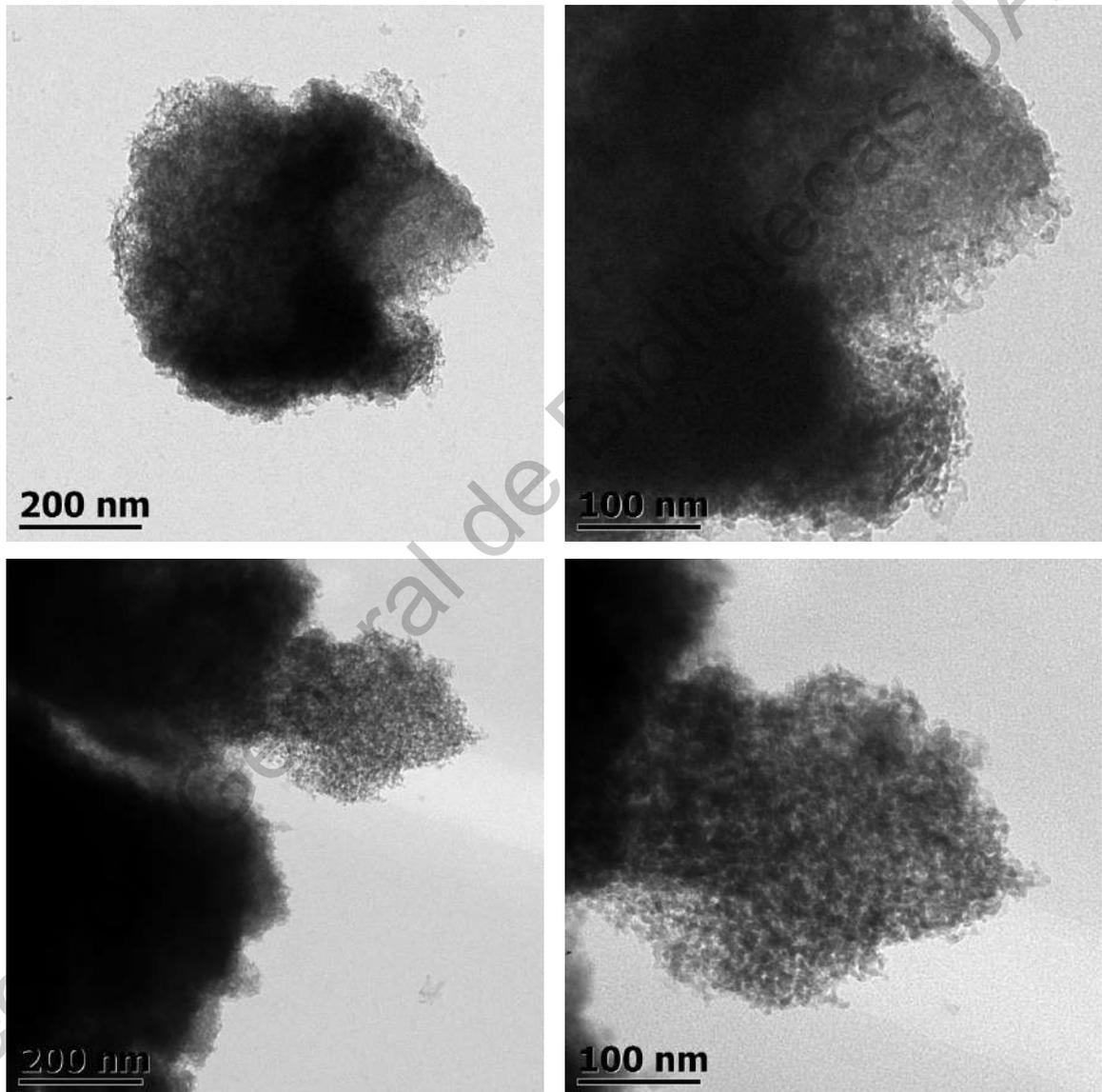
El tamaño y morfología de las partículas de las diferentes sílices mesoporosas preparadas en este estudio se determinó mediante microscopía electrónica de transmisión y microscopía electrónica de barrido de alta resolución.

Las micrografías electrónicas de transmisión observadas en la figura 11 revelan una estructura mesoporosa altamente ordenada con un arreglo hexagonal de poros uniformes y que corresponde a la estructura de la sílice mesoporosa SBA-15, lo cual corrobora lo observado por difracción de rayos-X a bajos ángulos.



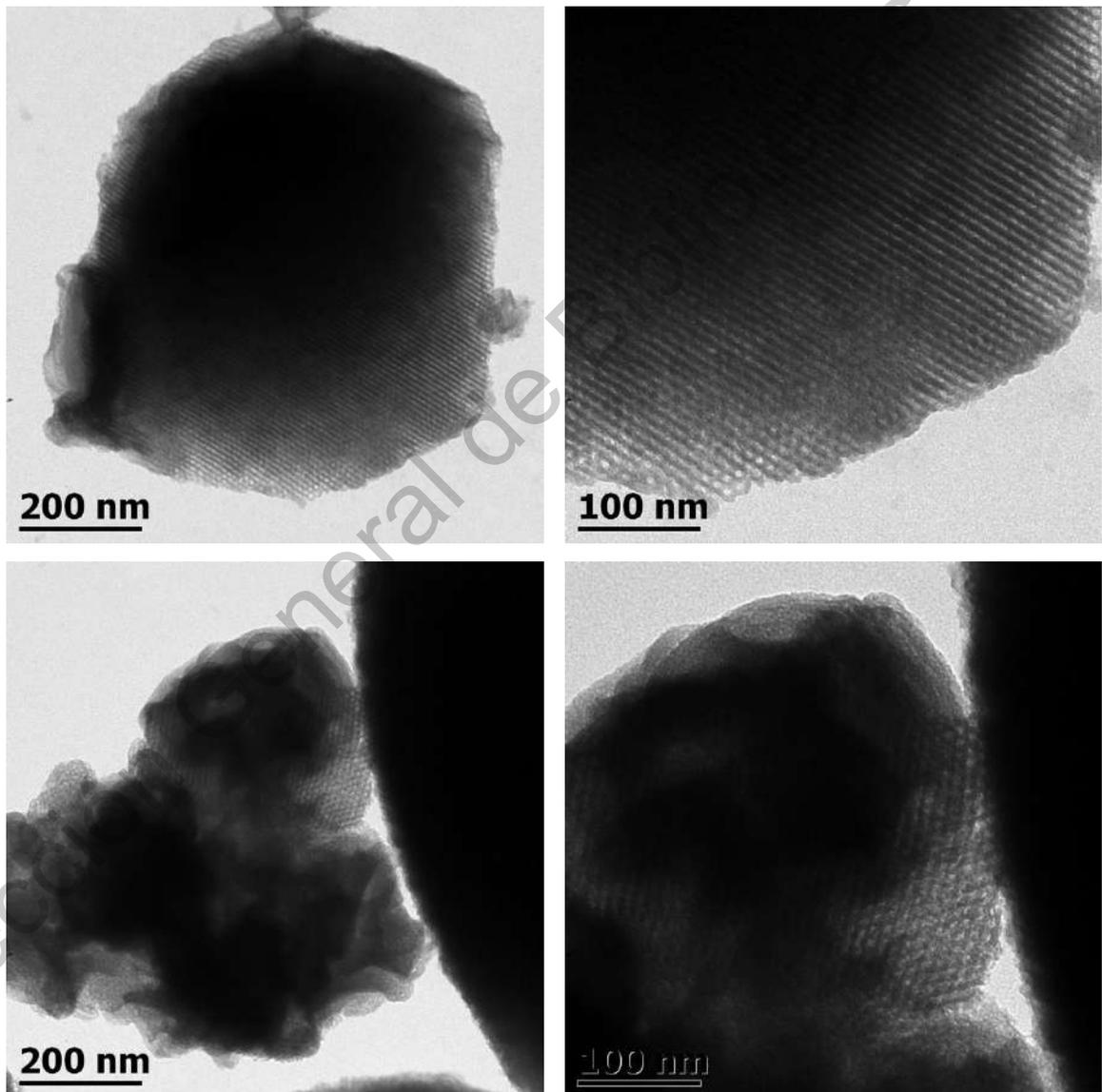
**Figura 12.** Imagen TEM del material de sílice mesoporoso SBA-15.

Las micrografías electrónicas de transmisión de la espuma mesocelular confirma que la adición de agentes expansores como el TIPB produce una disminución en la regularidad estructural de la SBA-15, como podemos observar en la figura 12 se muestran partículas irregulares porosas.



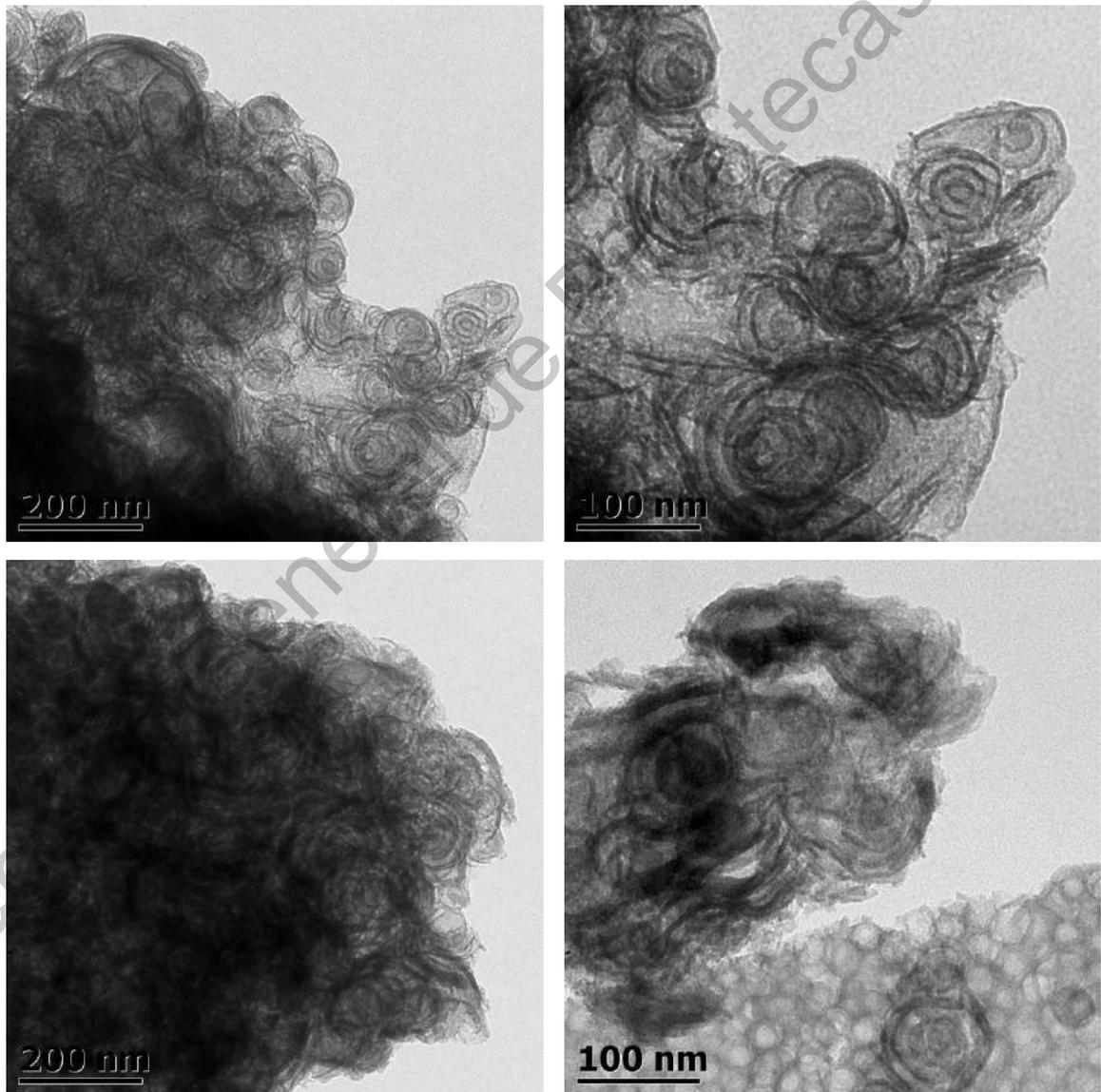
**Figura 13.** Imágenes de TEM de las muestras de sílice mesoporosa del tipo espuma (MCF).

Las imágenes de TEM de la sílice mesoporosa tipo placa (figura 13) muestran poros bien ordenados dispuestos en una estructura hexagonal similar a la SBA-15, sin embargo, la morfología plaquetaria muestra canales de poros más cortos en comparación con la SBA-15 sintetizada de manera convencional, la cual como se ha observado posee una morfología de canales de poros muy largos.



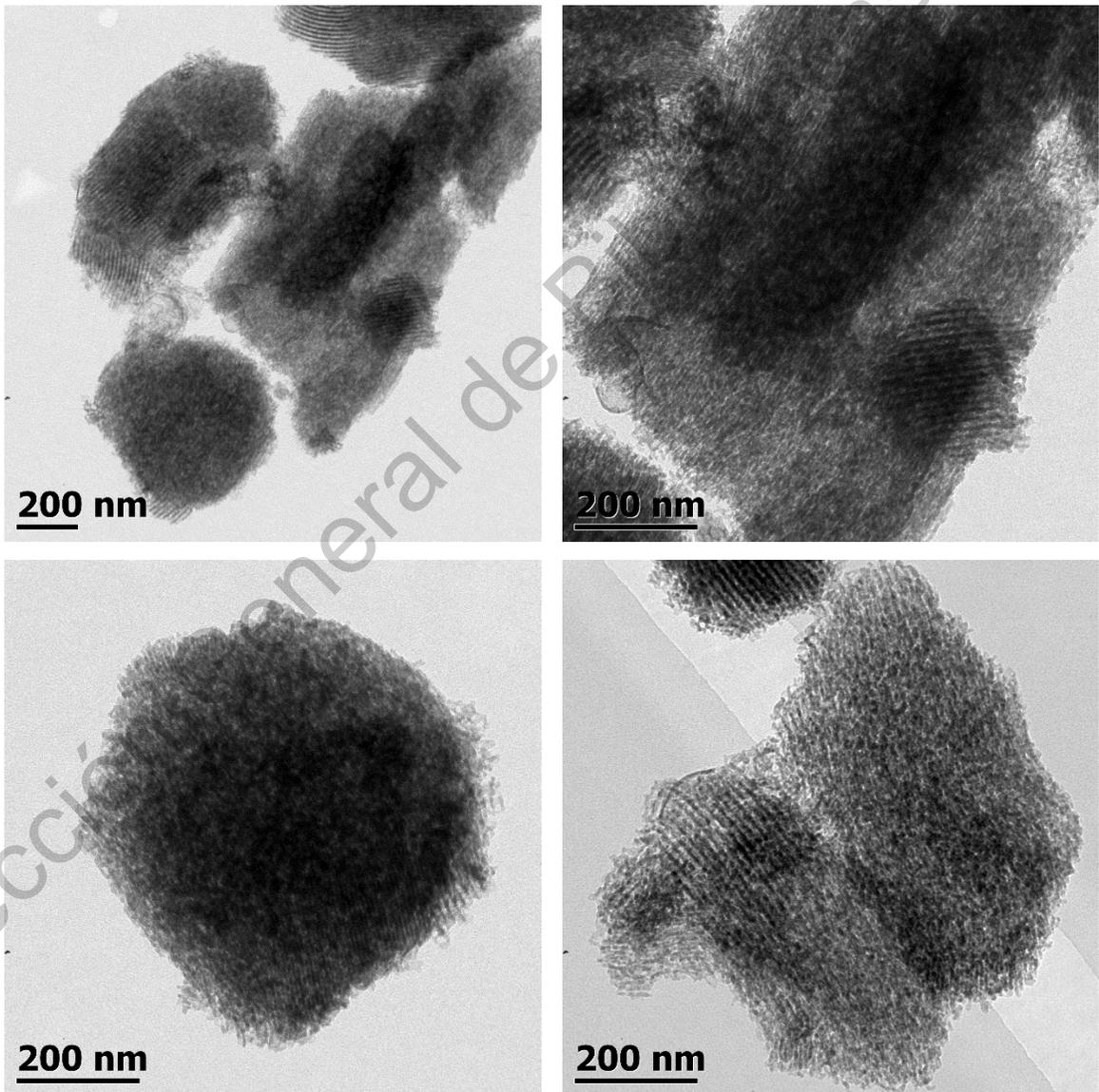
**Figura 14.** Imágenes de TEM de las muestras de sílice mesoporosa del tipo placa.

En las micrográficas electrónicas de la sílice mesoporosa tipo vesícula sintetizada con HCl 4M (Figura 14), claramente se observa una morfología de racimos vesiculares de múltiples capas. Cabe destacar que la sílice vesicular tiende a formar grupos aglomerados de vesículas en lugar de partículas vesiculares separadas. Normalmente, la agregación es un problema importante en la síntesis de partículas de sílice, que ocurre principalmente por condensación de grupos silanol (Si-OH) en la superficie de las partículas de sílice individuales.



**Figura 15.** Imágenes de TEM de las muestras de sílice mesoporosa del tipo vesícula.

En cambio, para la sílice mesoporosa sintetizada con HCl 2M, se observa una morfología completamente diferente a la esperada, se esperaba obtener sílices mesoporosas de tipo vesícula con vesículas más grandes que la sintetizadas usando una solución de HCl 2M. La figura 15 muestra partículas con morfología irregulares y diferentes tamaños, se observa cierto arreglo de poros y algunos canales, lo cual explica las reflexiones mostradas en la difracción de rayos-X a bajos ángulos.

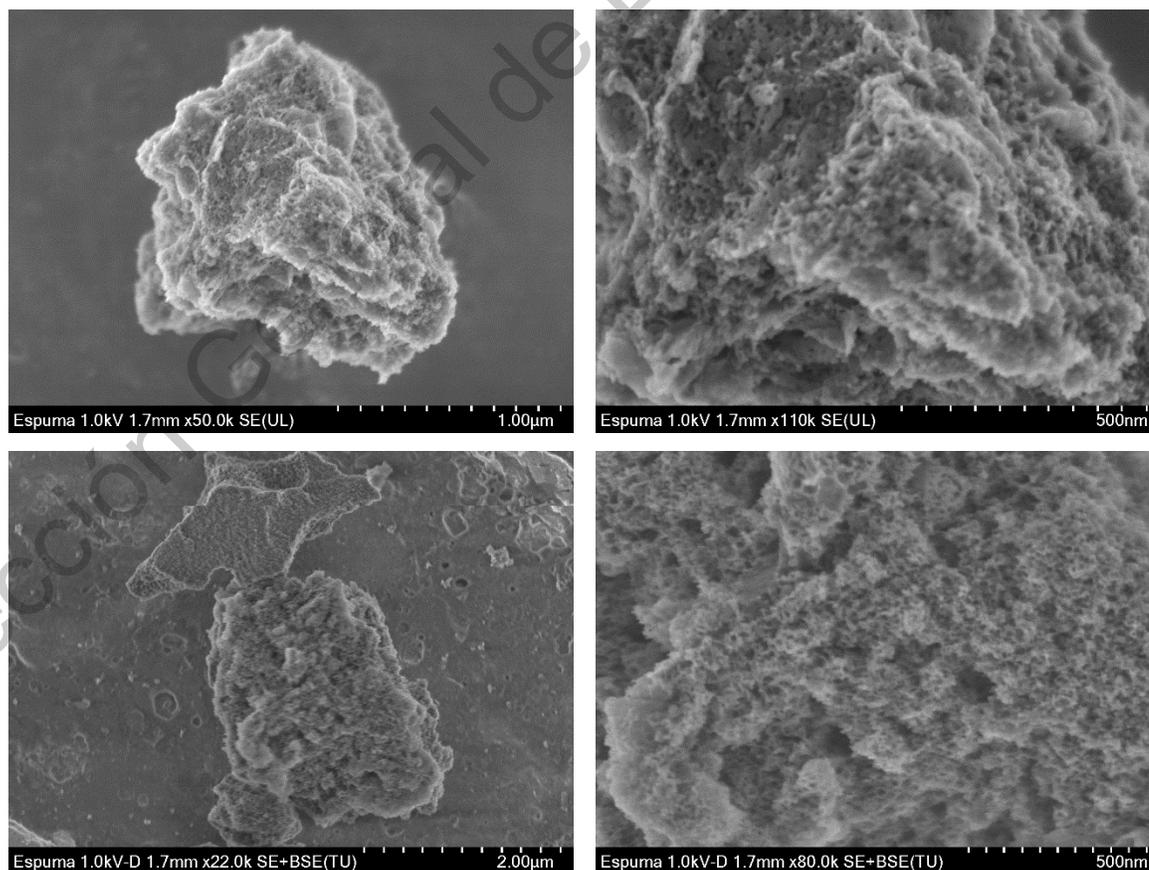


**Figura 16.** Imágenes de TEM de las muestras de sílice mesoporosa sintetizadas con HCl 2M.

### 8.1.3 Microscopía electrónica de barrido de alta resolución por emisión de campo (HR-SEM)

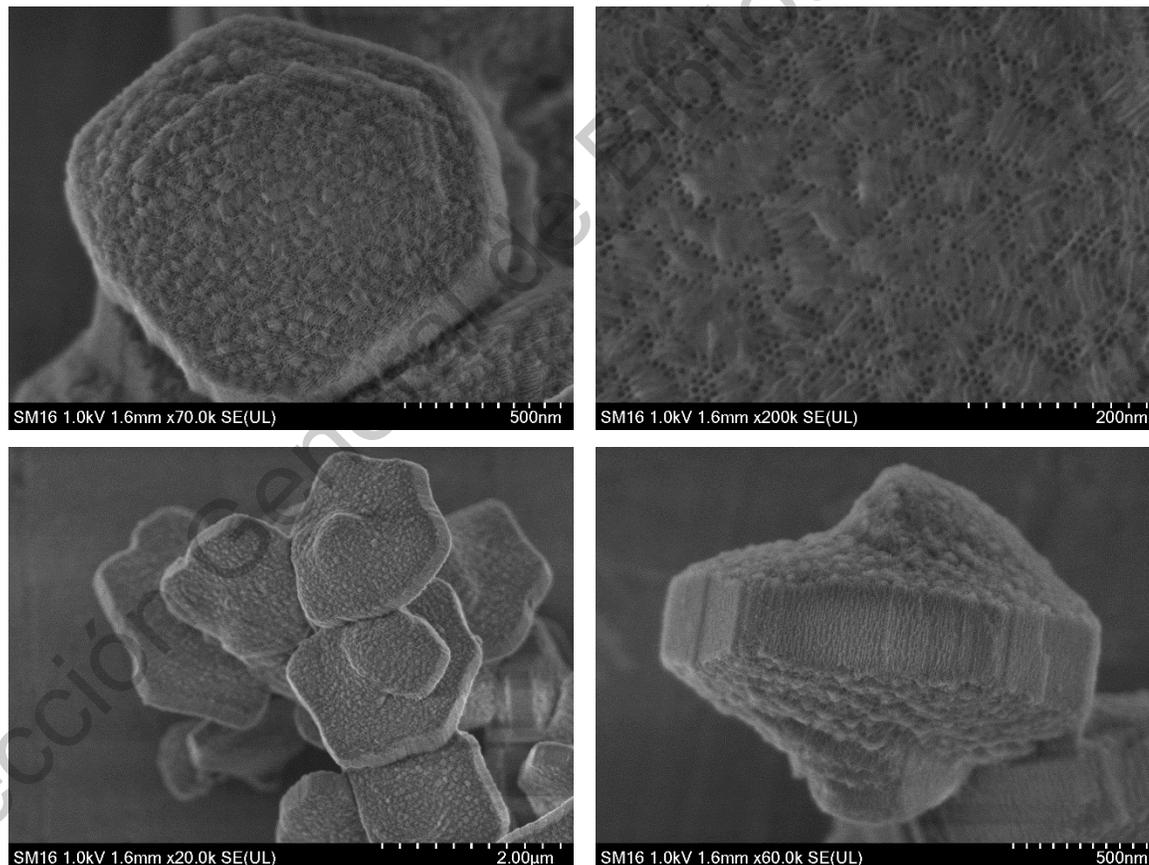
Los análisis por microscopía electrónica de barrido de alta resolución (HR-SEM) fueron realizados para observar el tamaño, morfología y porosidad de los materiales sintetizados.

Las imágenes HR-SEM de las espumas mesocelulares confirma la presencia de grandes mesoporos (con tamaños de 20 a 30 nm) observándose partículas irregulares muy porosas, morfología característica de las espumas mesocelulares, con tamaños que van desde 1 a 2  $\mu\text{m}$ .



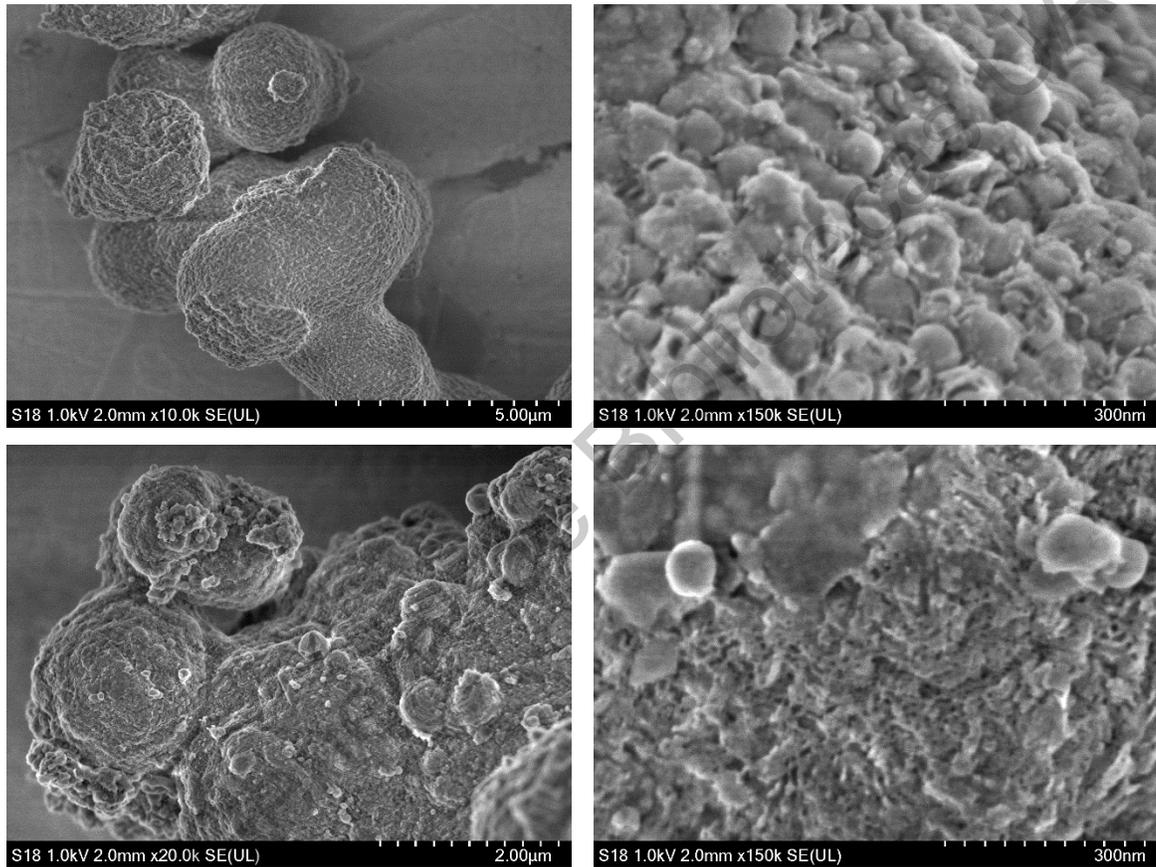
**Figura 17.** Microscopia electrónica de barrido (SEM) de las muestras de sílice mesoporosa tipo espuma.

Las imágenes de HR-SEM de la sílice mesoporosa tipo placa exhiben una morfología hexagonal similar a las plaquetas como se observa en la figura 17. Se pueden observar los poros ordenados confirmados en los análisis de difracción de Rayos-X a bajos ángulos. El tamaño de los poros es aproximadamente de 5 nm y el ancho y grosor promedio de las plaquetas son de 800 y 1200 nm, respectivamente.



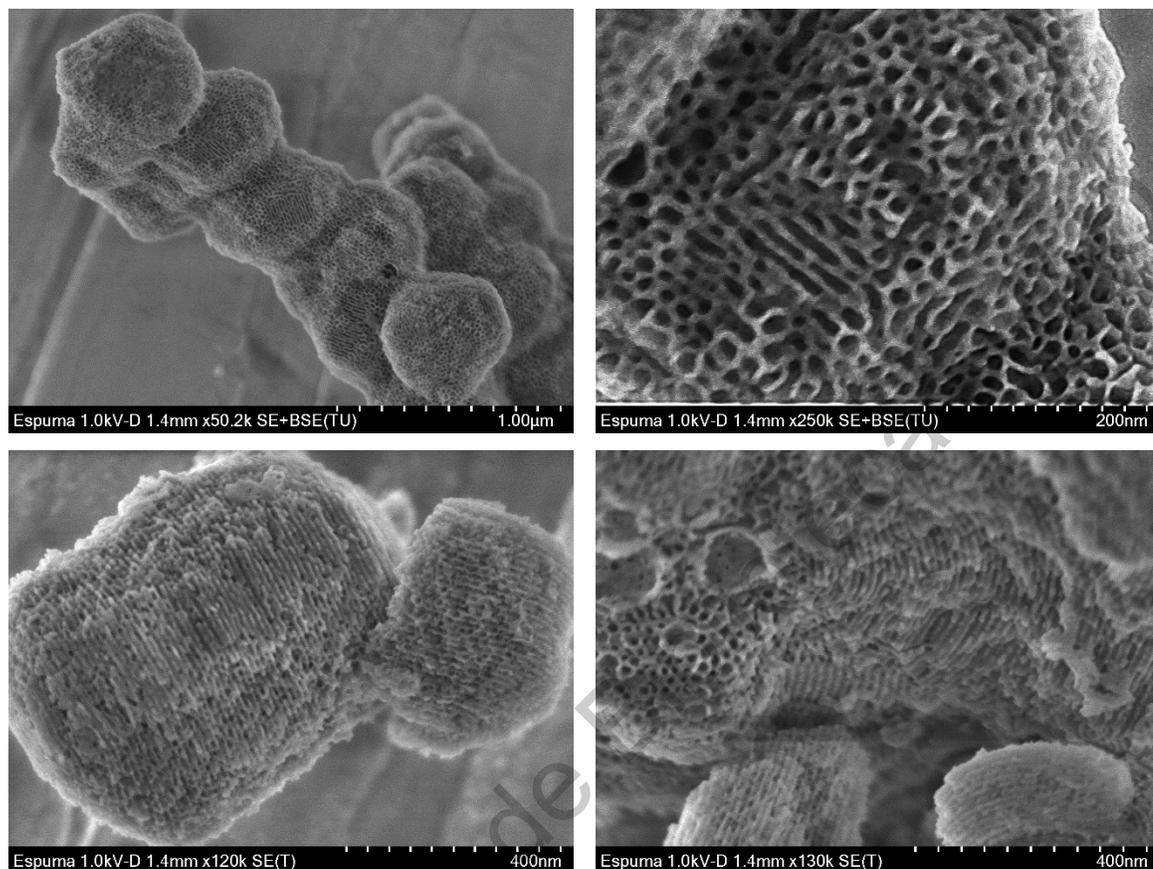
**Figura 18.** Microscopia electrónica de barrido (SEM) de las muestras de sílice nanoporosa tipo placa.

Las sílices mesoporosas tipo vesículas presentan morfologías irregulares muy aglomeradas, como también se observó en las micrografías electrónicas de barrido. Los tamaños de estas partículas son de alrededor de 3 a 5  $\mu\text{m}$  (figura 18).



**Figura 19.** Microscopia electrónica de barrido (SEM) de las muestras de sílice nanoporosa tipo vesícula.

En las imágenes SEM de la sílice mesoporosa sintetizada con HCl 4M, se observan partículas interconectadas con tamaño de poros muy grandes alrededor de 40 a 50 nm. Hasta donde sabemos, este tipo de sílices mesoporosas con estas morfologías de partículas, no han sido reportadas en la literatura



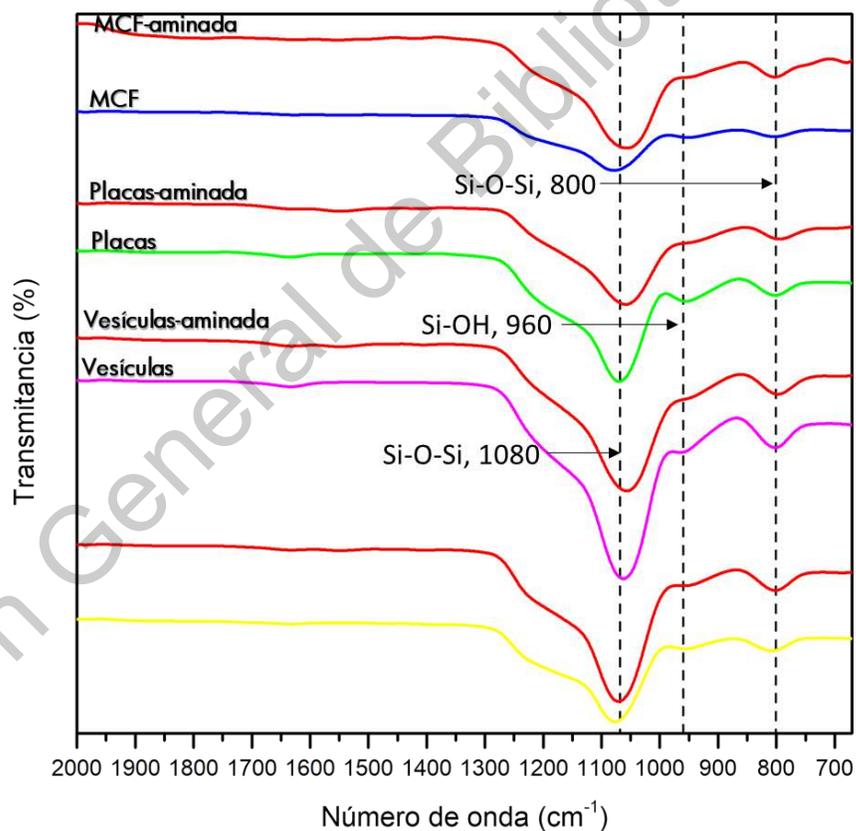
**Figura 20.** Microscopia electrónica de barrido (SEM) de las muestras de sílice mesoporosa sintetizadas con HCl 2M.

#### 8.1.4 Espectroscopía de Infrarrojo con Transformada de Fourier (FT-IR)

Las frecuencias vibracionales y sus respectivas funciones en la estructura de las sílices mesoporosa se investigaron mediante espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR), en el rango de  $4000$  a  $400\text{ cm}^{-1}$  (Figura 20). Los espectros de infrarrojo para todas las muestras tienen un denominador común, la banda intensa a  $1080\text{ cm}^{-1}$  asociada con las vibraciones por estiramiento asimétrico del enlace Si-O-Si, revelando la existencia de una red densa de sílice, dónde los átomos de oxígeno constituyen el puente entre dos átomos vecinos de silicio. Las vibraciones por estiramiento simétrico a  $800\text{ cm}^{-1}$  se asignaron a las flexiones Si-O-

Si. La banda a  $960\text{ cm}^{-1}$  fue atribuida a las vibraciones por estiramiento de los enlaces O-H de los de los grupos silanoles (Si-OH).

Finalmente, la banda correspondiente a los silanoles libres superficiales que aparece en  $960\text{ cm}^{-1}$  decrece en intensidad o no se observa en los espectros de infrarrojo de las sílices funcionalizadas. Esto sugiere que efectivamente hubo una reacción entre los silanoles superficiales y los grupos etóxidos de las moléculas de APTES, dando una evidencia de la incorporación de las moléculas orgánicas en los materiales síliceos porosos.



**Figura 21.** Espectro infrarrojo de las sílices mesoporosas puras y aminadas.

### 8.1.5 Potencial zeta ( $\zeta$ )

Los resultados de potencial zeta ( $\zeta$ ) que se presentan en la figura 21 muestran que no hubo un cambio significativo en la carga superficial de las sílices del tipo espuma mesocelular (MCF) y las sílices tipo vesícula sintetizada con HCl (2M) puras y funcionalizadas. Para las sílices del tipo placa y vesícula (4M) funcionalizadas, se observó un potencial más negativo reduciéndose casi a la mitad con respecto a las sílices puras. En cambio, para las sílices funcionalizadas que recibieron un tratamiento por medio de incubaciones en una solución alcalina, seguida por una solución ácida, de acuerdo con el método de Liu et al. (2009), se observa un potencial muy positivo para todas las sílices tratadas. En la tabla 2 se resumen los datos obtenidos de potencial zeta ( $\zeta$ ) de las sílices mesoporosas puras, funcionalizadas y protonadas.

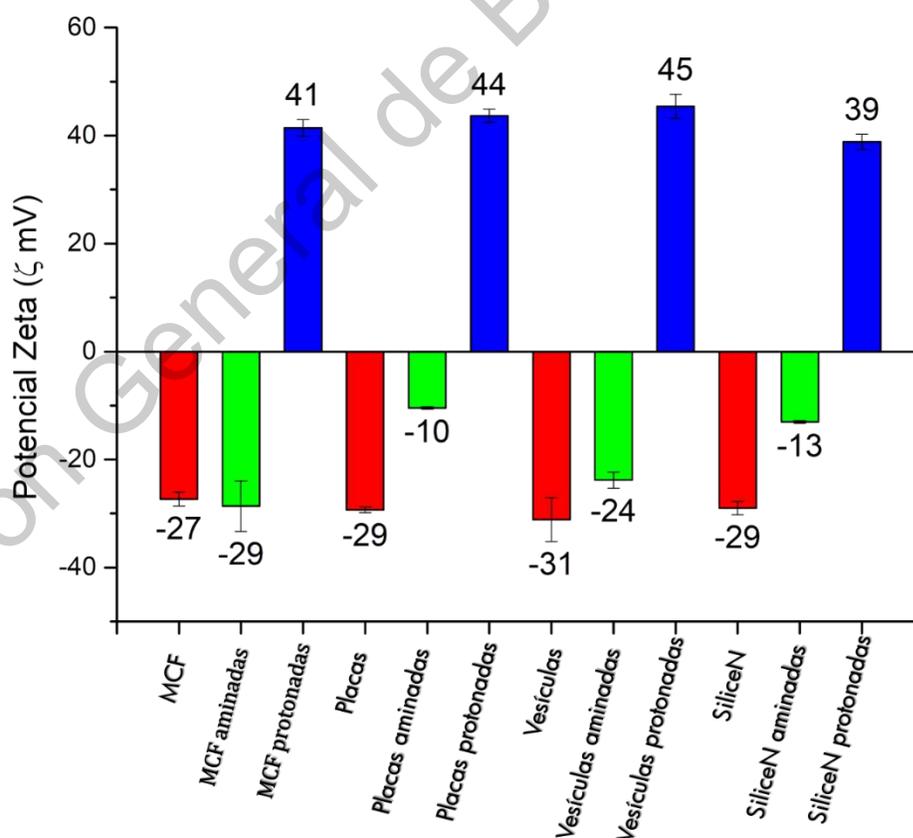


Figura 22. Potencial zeta ( $\zeta$ ) de las sílices puras, aminadas y protonadas.

**Tabla 2.** Potencial zeta ( $\zeta$ ) de las sílices puras, aminadas y protonadas.

Sílice	Pura	Aminada	Protonada
MCF	-27.33	-28.63	41
Placas	-29.30	-10.47	44
Vesículas	-31.13	-23.80	45
Sílice N	-29.03	-13.07	39

## 8.2 Ensayos de viabilidad celular MTT

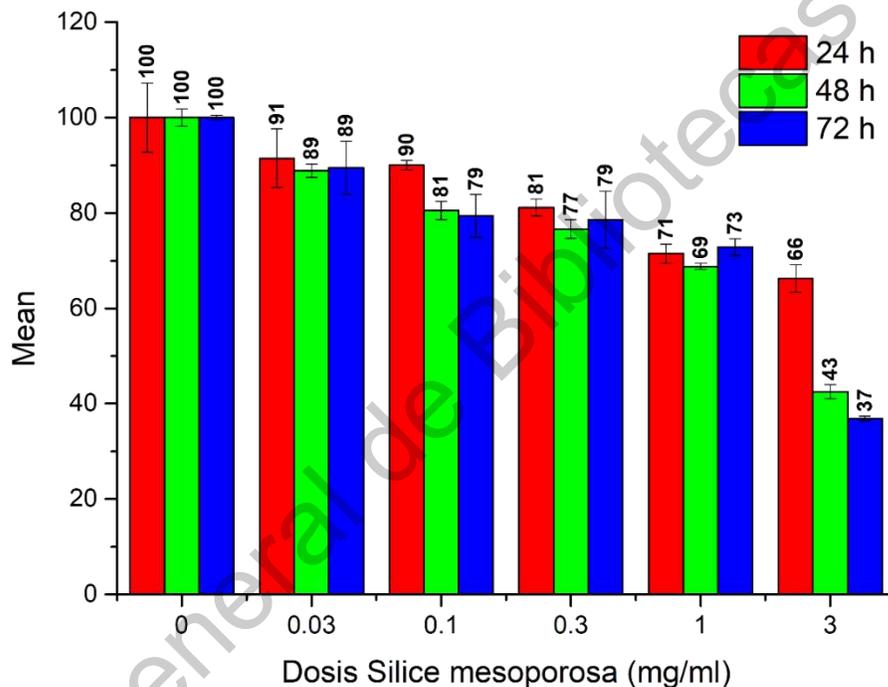
La viabilidad celular de las células HGF después de ser expuestas a distintas concentraciones de materiales de sílice mesoporosa se determinó mediante el ensayo MTT. Para todas las sílices mesoporosas, la concentración tuvo una gran repercusión en la viabilidad celular como se puede observar en las figuras 22, 23, 21 y 25.

Para la espuma mesocelular (MCF) se observa que a concentraciones bajas de material (0.03 y 0.1 mg/ml) la viabilidad celular se mantiene en alrededor de 90% a las 24 horas disminuyendo gradualmente después de 72 horas sin diferencias significativas en la viabilidad celular.

Conforme se aumenta la concentración a 0.3 y 1 mg/mL la viabilidad disminuye al 70% durante los 3 días, lo cual se traduce en una baja toxicidad del material a esas concentraciones.

Sin embargo, a concentraciones de 3 mg/ml la viabilidad celular se redujo a un 66% a las 24 horas y continuó reduciéndose hasta 37% después de 72 horas, como se puede observar, el grado de citotoxicidad es directamente proporcional a la concentración del material expuesto, por lo que es lógico que, a concentraciones mayores de material, mayor es el grado de muerte celular.

Otra de las posibles razones por la que la viabilidad celular disminuya a dosis de material más altas es la posible obstrucción de la respiración celular por el material depositado sobre las células, causando una mayor muerte. Cabe mencionar que nuestros resultados concuerdan con lo reportado en la literatura con respecto a las dosis no citotóxicas para MSNs.

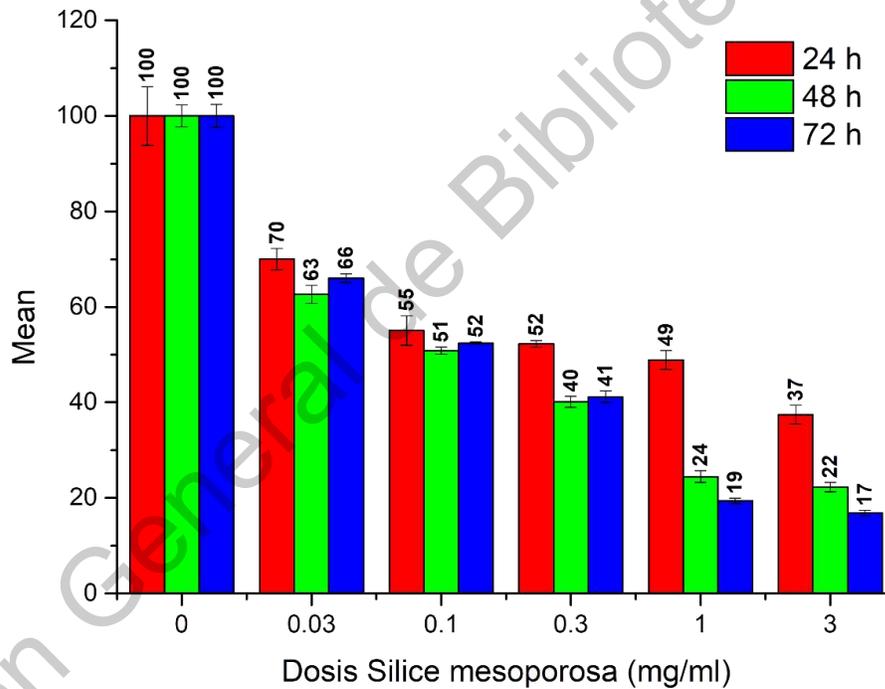


**Figura 23.** Ensayo del MTT. Comparación de la viabilidad celular de HGF después de 24, 48 y 72 horas de exposición con distintas dosis de espuma de sílice mesocelular.

La figura 23 muestra los resultados del ensayo MTT para las sílices mesoporosas tipo placas. A la concentración más baja (0.03 mg/ml), los niveles de viabilidad ya son del 70% después de 24 horas, en comparación con las espumas mesocelulares que mantenían una viabilidad del 90%. Conforme se aumenta la concentración de material expuesto el porcentaje de viabilidad disminuye a menos del 50%, por lo que las sílices mesoporosas tipo placa son materiales que presentan un alto nivel

de toxicidad, por tanto, la morfología del material sí afecta en cómo interactúan con las células.

Los ensayos realizados con la sílice mesoporosa tipo vesícula (figura 24) presenta resultados similares a la de las espumas mesocelulares, manteniendo la viabilidad celular entre el 90 y 70% a concentraciones bajas durante los 3 días de la prueba, por lo que también esta sílice presente baja toxicidad con células HGF.

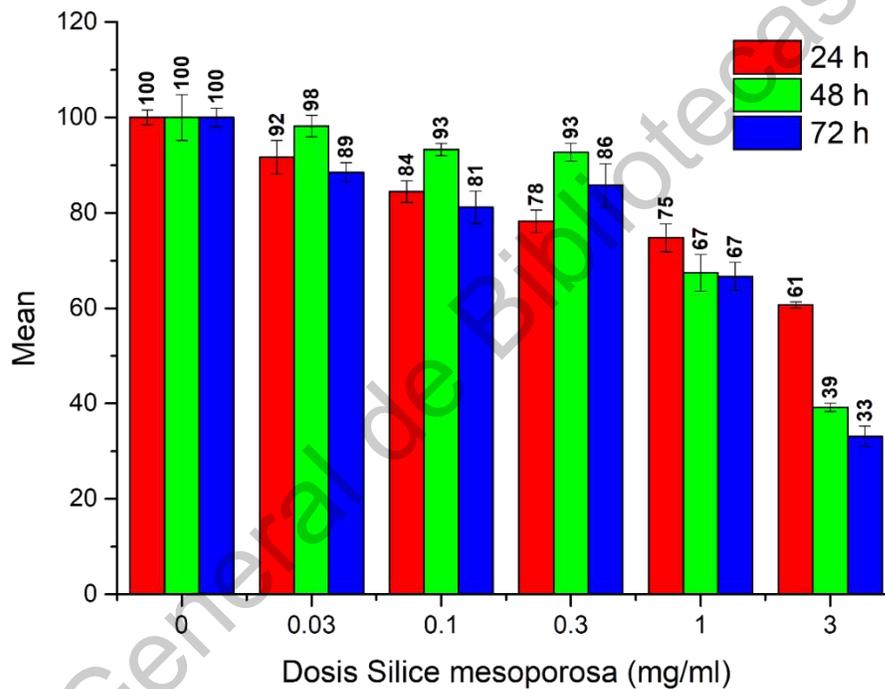


**Figura 24.** Ensayo MTT. Comparación de la viabilidad celular de HGF después de 24, 48 y 72 horas de exposición con distintas dosis de la sílice mesoporosa tipo placa.

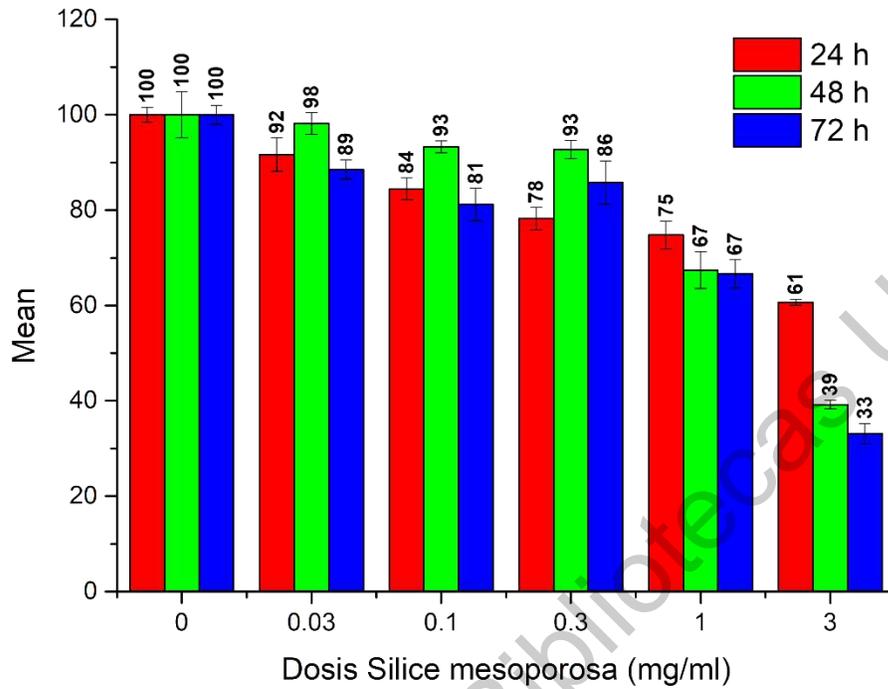
De la misma manera que la espuma mesocelular y la sílice tipo vesícula, los ensayos de viabilidad celular de la sílice mesoporosa sintetizada utilizando HCl 4M muestran que es una sílice muy biocompatible (Figura 25). A concentraciones bajas de

material (0.03 a 0.3 mg/ml) mantiene una viabilidad celular entre el 98 y 80%, y de acuerdo a los resultados obtenidos esta es la sílice más biocompatible.

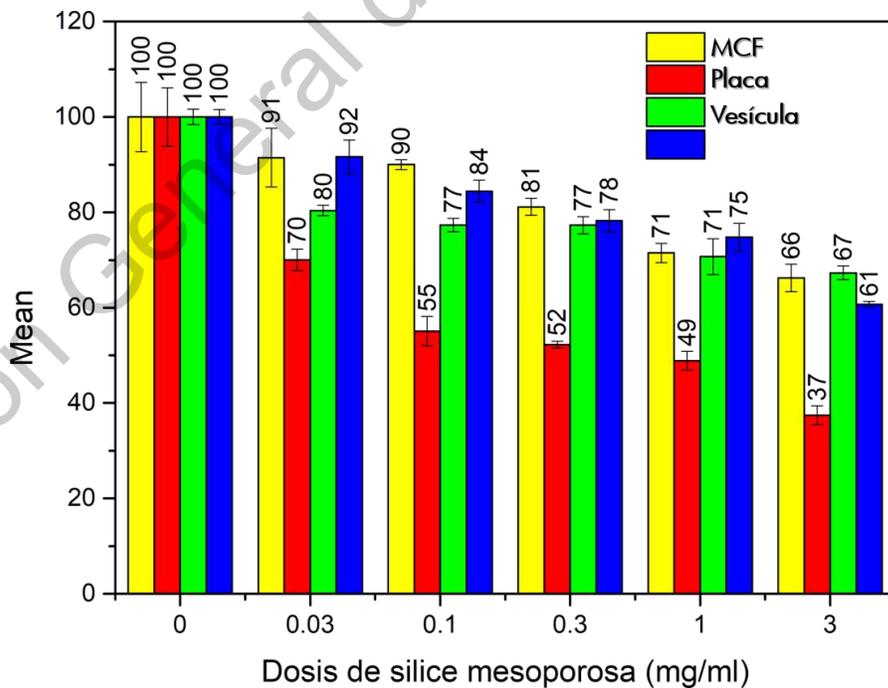
En la figura 26, 27 y 28 se muestran las gráficas comparativas de las diferentes morfologías de sílices mesoporosas con los distintos tiempos de exposición.



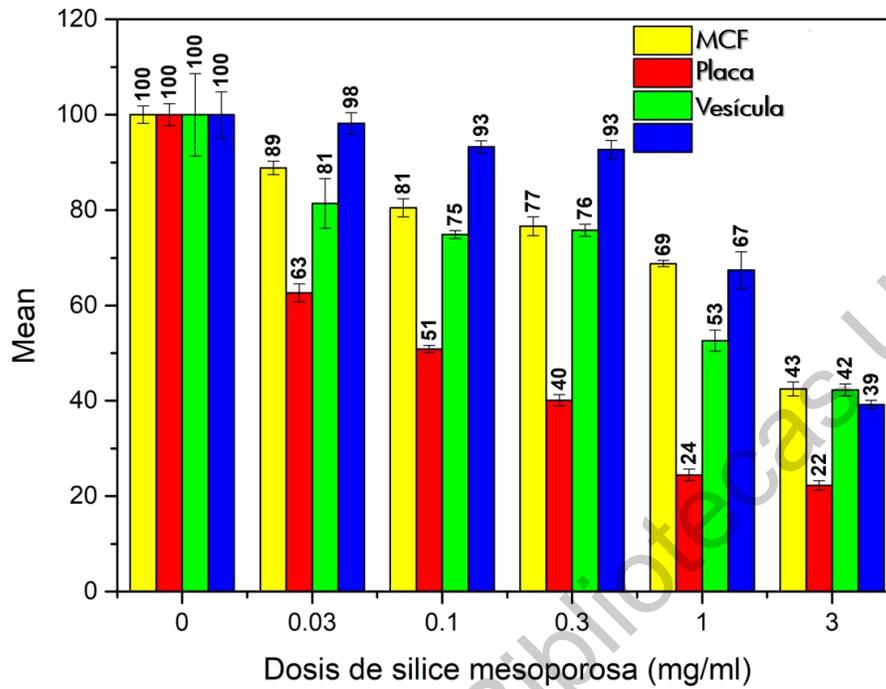
**Figura 25.** Ensayo MTT. Comparación de la viabilidad celular de HGF después de 24, 48 y 72 horas de exposición con distintas dosis de la sílice mesoporosa tipo vesícula.



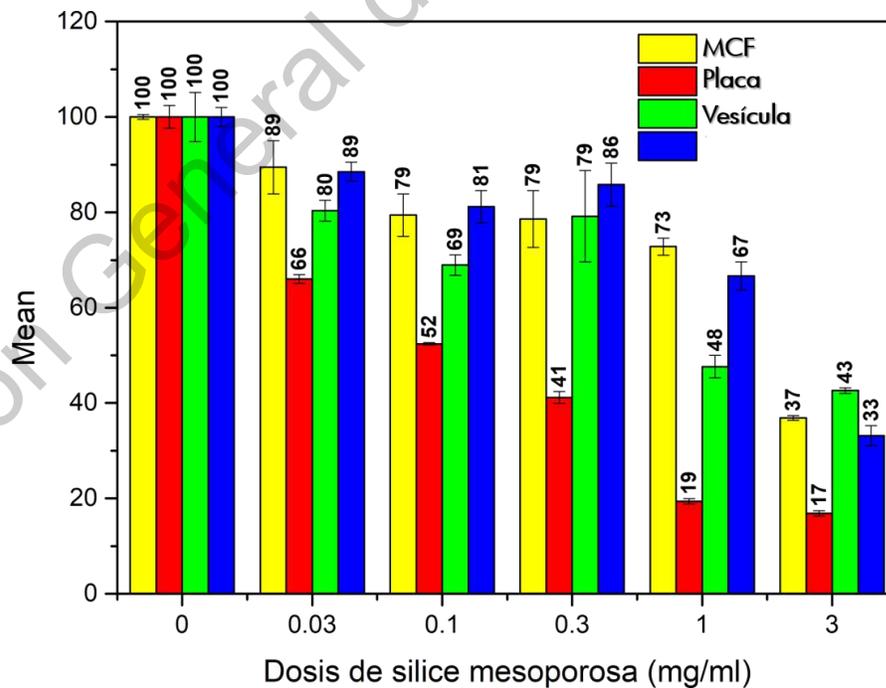
**Figura 26.** Ensayo MTT. Comparación de la viabilidad celular de HGF después de 24, 48 y 72 horas de exposición con distintas dosis de la Sílice 4M.



**Figura 27.** Ensayo MTT. Comparación de la viabilidad celular de HGF después de 24 horas de exposición con distintas dosis de sílices nanoporosas.



**Figura 28.** Ensayo MTT. Comparación de la viabilidad celular de HGF después de 48 horas de exposición con distintas dosis de sílices nanoporosas.



**Figura 29.** Ensayo MTT. Comparación de la viabilidad celular de HGF después de 72 horas de exposición con distintas dosis de sílices nanoporosas.

## CONCLUSIONES

La propuesta inicial de este trabajo de investigación era sintetizar partículas de sílice mesoporosa del tipo SBA-15 con nanoporos más grandes para la encapsulación de ácidos nucleicos, sin embargo, en la experimentación al intentar agrandar los poros encontramos que la estructura característica de la SBA-15 se perdía dando lugar a distintas morfologías del material de sílice, morfologías que resultaron interesantes para aplicaciones potenciales en la ingeniería de tejidos. A partir de esto, la investigación se centró en hacer una evaluación del grado de biocompatibilidad de las diferentes formas de sílices nanoporosas obtenidas, con el fin de explorar posibles aplicaciones en el campo de la ingeniería de tejidos.

La modificación de las condiciones experimentales típicas (temperatura, condiciones ácidas y adición de agentes de hinchamiento) utilizadas para la síntesis de la SBA-15, permitió la obtención de partículas de sílices nanoporosas con distintas morfologías. Así, se logró preparar: espumas mesocelulares (MCF), sílice mesoporosa tipo placa (SMP), sílice mesoporosa tipo vesícula (SMV), y una nueva morfología de sílice mesoporosa (NSM) con tamaños de poros entre 40 y 50 nm, hasta ahora no reportada en la literatura. Las cuatro sílices mesoporosas manifestaron diferencias bien marcadas tanto en la morfología de las partículas como en su tamaño y en su porosidad, como así lo demostraron los resultados en las imágenes de microscopía electrónica de barrido y transmisión, y los difractogramas de rayos-X a bajos ángulos.

Las frecuencias vibracionales en los espectros de infrarrojo constataron la existencia de los enlaces siloxanos (Si-O-Si) y de los grupos silanoles (Si-OH), pertenecientes a la sílice y verificaron la funcionalización exitosa de las sílices mesoporosas con los grupos amino

Los resultados de los ensayos MTT demostraron que las diferentes sílices mesoporosas obtenidas en este estudio; con sus diferentes morfologías de partículas, diferente tamaño de partículas y diferentes porosidades; poseen un

efecto claramente marcado en la biocompatibilidad en células de fibroblastos gingivales humanos.

Entre las sílices mesoporosas estudiadas, la sílice mesoporosa tipo placa presentó el mayor efecto citotóxico en células de fibroblastos gingivales humanos, mientras que la nueva sílice mesoporosa (desarrollada por primera vez en este estudio) manifestó un mayor grado de biocompatibilidad.

### **PERSPECTIVAS FUTURAS**

A partir de los resultados y discusiones presentados en esta tesis de maestría, las perspectivas del trabajo se orientan en las siguientes direcciones.

En un primer plano estarían los trabajos destinados a completar los aspectos de caracterización de las partículas de sílice mesoporosa sintetizadas, especialmente la nueva sílice encontrada. Se podría estudiar las propiedades texturales de los materiales mediante isothermas de adsorción-desorción de N<sub>2</sub> a 77° K, estas propiedades incluyen el área específica y la distribución del tamaño de poro.

En un segundo plano se encontrarían los estudios biológicos complementarios, estos incluyen las pruebas de adherencia celular, ensayos de bioactividad, y la confirmación de ausencia de sustancias citotóxicas.

Los estudios preliminares obtenidos en esta tesis abren el camino para continuar explorando las posibilidades de uso de los materiales de sílice mesoporosa como materiales de partida para fabricar andamios que permitan reemplazar, reparar y mejorar la función de los tejidos u órganos dañados o faltantes. Funcionalizando la superficie de tales estructuras con moléculas que actúen como señales capaces de atraer a las células implicadas en los procesos de formación de tejido.

## REFERENCIAS

- Allo, B. A., Costa, D. O., Dixon, S. J., & Mequanint, K. (2012). Functional Biomaterials Bioactive and Biodegradable Nanocomposites and Hybrid Biomaterials for Bone Regeneration, 432–463.  
<https://doi.org/10.3390/jfb3020432>
- Alothman, Z. A. (2012). A review: Fundamental aspects of silicate mesoporous materials. *Materials*, 5(12), 2874–2902. <https://doi.org/10.3390/ma5122874>
- Andrée, L., Barata, D., Sutthavas, P., Habibovic, P., & van Rijt, S. (2019). Guiding mesenchymal stem cell differentiation using mesoporous silica nanoparticle-based films. *Acta Biomaterialia*, (xxxx), 1–11.  
<https://doi.org/10.1016/j.actbio.2019.07.008>
- Asghari, F., Samiei, M., Adibkia, K., Akbarzadeh, A., & Davaran, S. (2017). Biodegradable and biocompatible polymers for tissue engineering application : a review, 1401(December). <https://doi.org/10.3109/21691401.2016.1146731>
- Barkalina, N., Charalambous, C., Jones, C., & Coward, K. (2014). Nanotechnology in reproductive medicine: Emerging applications of nanomaterials. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, 10(5), 921–938.  
<https://doi.org/10.1016/j.nano.2014.01.001>
- Chan, W. C. W. (2017). Nanomedicine 2.0.  
<https://doi.org/10.1021/acs.accounts.6b00629>
- Chandy, T. (2020). *tissue engineering. Biointegration of Medical Implant Materials*. Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-102680-9.00012-3>
- Chen, Y. (2016). *Design, Synthesis, Multifunctionalization and Biomedical Applications of Multifunctional Mesoporous Silica-Based Drug Delivery Nanosystems*. <https://doi.org/10.1007/978-3-662-48622-1>
- Croissant, J. G., Fatieiev, Y., Almalik, A., & Khashab, N. M. (2018). Mesoporous

Silica and Organosilica Nanoparticles : Physical Chemistry , Biosafety , Delivery Strategies , and Biomedical Applications, 1700831, 1–75.  
<https://doi.org/10.1002/adhm.201700831>

Danie Kingsley, J., Ranjan, S., Dasgupta, N., & Saha, P. (2013). Nanotechnology for tissue engineering: Need, techniques and applications. *Journal of Pharmacy Research*, 7(2), 200–204. <https://doi.org/10.1016/j.jopr.2013.02.021>

Daum, N., Tscheka, C., Neumeyer, A., & Schneider, M. (2012). Novel approaches for drug delivery systems in nanomedicine: Effects of particle design and shape. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology*, 4(1), 52–65. <https://doi.org/10.1002/wnan.165>

De Matos, M. B. C., Piedade, A. P., Alvarez-Lorenzo, C., Concheiro, A., Braga, M. E. M., & De Sousa, H. C. (2013). Dexamethasone-loaded poly(É-caprolactone)/silica nanoparticles composites prepared by supercritical CO<sub>2</sub> foaming/mixing and deposition. *International Journal of Pharmaceutics*, 456(2), 269–281. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2013.08.042>

Dlaska, C. E., Andersson, G., & Brittberg, M. (2015). Clinical Translation in Tissue Engineering — The Surgeon ' s View. *Current Molecular Biology Reports*, 61–70. <https://doi.org/10.1007/s40610-015-0013-3>

Do, A. V., Khorsand, B., Geary, S. M., & Salem, A. K. (2015). 3D Printing of Scaffolds for Tissue Regeneration Applications. *Advanced Healthcare Materials*, 4(12), 1742–1762. <https://doi.org/10.1002/adhm.201500168>

Dobrovolskaia, M. A., & Neil, S. E. M. (2007). Immunological properties of engineered nanomaterials. *Nature Nanotechnology*, 2, 469–478.  
<https://doi.org/https://doi.org/10.1038/nnano.2007.223>

Foldvari, M., & Bagonluri, M. (2008). Carbon nanotubes as functional excipients for nanomedicines : II . Drug delivery and biocompatibility issues, 4, 183–200.  
<https://doi.org/10.1016/j.nano.2008.04.003>

- Geiger, M., Li, R. H., & Friess, W. (2003). Collagen sponges for bone regeneration with rhBMP-2, *55*, 1613–1629. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2003.08.010>
- Goldberg, M., Langer, R., & Jia, X. (2007). Nanostructured materials for applications in drug delivery and tissue engineering. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, *18*(3), 241–268. <https://doi.org/10.1163/156856207779996931>
- Gonzalez Solveyra, E., & Szleifer, I. (2016). What is the role of curvature on the properties of nanomaterials for biomedical applications? *Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology*, *8*(3), 334–354. <https://doi.org/10.1002/wnan.1365>
- Górski, K. (2015). Nanobiotechnology in reproduction – pros and cons . A review, 179–192.
- Hao, N., Li, L., & Tang, F. (2017). Roles of particle size, shape and surface chemistry of mesoporous silica nanomaterials on biological systems. *International Materials Reviews*, *62*(2), 57–77. <https://doi.org/10.1080/09506608.2016.1190118>
- Henstock, J. R., Canham, L. T., & Anderson, S. I. (2014). Silicon: the evolution of its use in biomaterials. *ACTA BIOMATERIALIA*, (September). <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2014.09.025>
- Hibbs, A. R., Polytechni-, E., & Nelson, B. (2005). Nanotechnology, nanomedicine and nanosurgery, 243–246. <https://doi.org/10.1016/j.ijsu.2005.10.007>
- Hoshyar, N., Gray, S., Han, H., & Bao, G. (2016). The effect of nanoparticle size on in vivo pharmacokinetics and cellular interaction. *Nanomedicine*, *11*(6), 673–692. <https://doi.org/10.2217/nnm.16.5>
- Hu, Y., Cai, K., Luo, Z., & Jandt, K. D. (2010). Layer-by-layer assembly of  $\beta$ -estradiol loaded mesoporous silica nanoparticles on titanium substrates and its implication for bone homeostasis. *Advanced Materials*, *22*(37), 4146–4150.

<https://doi.org/10.1002/adma.201000854>

Huang, X., Li, L., Liu, T., Hao, N., Liu, H., Chen, D., & Tang, F. (2011). The shape effect of mesoporous silica nanoparticles on biodistribution, clearance, and biocompatibility in vivo. *ACS Nano*, 5(7), 5390–5399.

<https://doi.org/10.1021/nn200365a>

Journal, A. I., Adabi, M., Naghibzadeh, M., Adabi, M., Zarrinfard, M. A., Esnaashari, S. S., ... Faridi-majidi, R. (2016). Biocompatibility and nanostructured materials : applications in nanomedicine, 1401(June).

<https://doi.org/10.1080/21691401.2016.1178134>

Karimi, M. A., Pourhakkak, P., Adabi, M., Firoozi, S., Adabi, M., & Naghibzadeh, M. (2015). Using an artificial neural network for the evaluation of the parameters controlling PVA / chitosan electrospun nanofibers diameter, 15(2), 127–138.

<https://doi.org/10.1515/epoly-2014-0198>

Kehr, N. S., Prasetyanto, E. A., Benson, K., Ergün, B., Galstyan, A., & Galla, H. J. (2013). Periodic mesoporous organosilica-based nanocomposite hydrogels as three-dimensional scaffolds. *Angewandte Chemie - International Edition*, 52(4), 1156–1160.

<https://doi.org/10.1002/anie.201206951>

Ketabchi, N., Naghibzadeh, M., Adabi, M., & Sara, S. (2016). Preparation and optimization of chitosan / polyethylene oxide nanofiber diameter using artificial neural networks. *Neural Computing and Applications*.

<https://doi.org/10.1007/s00521-016-2212-0>

Khan, F., & Tanaka, M. (2018). Designing Smart Biomaterials for Tissue Engineering, 1–14. <https://doi.org/10.3390/ijms19010017>

Langer, R., & Vacanti, J. P. (n.d.). - ARTICLES Tissue Engineering.

Li, Q., Ma, L., & Gao, C. (2015). Biomaterials for in situ tissue regeneration : development and perspectives. *Journal of Materials Chemistry B*, (863).

<https://doi.org/10.1039/C5TB01863C>

- Li, Y., Xiao, Y., & Liu, C. (2016). The Horizon of Materiobiology : A Perspective on Material-Guided Cell Behaviors and Tissue Engineering. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.6b00654>
- Liu, J., Stace-naughton, A., Jiang, X., & Brinker, C. J. (2009). Porous Nanoparticle Supported Lipid Bilayers ( Protocells ) as Delivery Vehicles, 1354–1355.
- Luo, Z., Deng, Y., Zhang, R., Wang, M., Bai, Y., Zhao, Q., ... Wei, S. (2015). Peptide-laden mesoporous silica nanoparticles with promoted bioactivity and osteo-differentiation ability for bone tissue engineering. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 131, 73–82. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2015.04.043>
- Martin, I., Wendt, D., & Heberer, M. (2004). The role of bioreactors in tissue engineering, 22(2), 10–12. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2003.12.001>
- Mehrasa, M., Asadollahi, M. A., Ghaedi, K., Salehi, H., & Arpanaei, A. (2015). Electrospun aligned PLGA and PLGA/gelatin nanofibers embedded with silica nanoparticles for tissue engineering. *International Journal of Biological Macromolecules*, 79, 687–695. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2015.05.050>
- Murphy, S. V., & Atala, A. (2013). Organ engineering - combining stem cells, biomaterials, and bioreactors to produce bioengineered organs for transplantation. *BioEssays*, 35(3), 163–172. <https://doi.org/10.1002/bies.201200062>
- Murphy, S. V., & Atala, A. (2014). 3D bioprinting of tissues and organs. *Nature Biotechnology*, 32(8), 773–785. <https://doi.org/10.1038/nbt.2958>
- Naghizadeh, M., & Adabi, M. (2014). Evaluation of Effective Electrospinning Parameters Controlling Gelatin Nanofibers Diameter via Modelling Artificial Neural Networks, 15(4), 767–777. <https://doi.org/10.1007/s12221-014-0767-x>
- Padmanabhan, J., & Kyriakides, T. R. (2015). Nanomaterials, Inflammation, and Tissue Engineering, 7(June), 14–17. <https://doi.org/10.1002/wnan.1320>

- Parenteau-bareil, R., Gauvin, R., & Berthod, F. (2010). Collagen-Based Biomaterials for Tissue Engineering Applications, 1863–1887. <https://doi.org/10.3390/ma3031863>
- Pelaz, B., Alexiou, C., Alvarez-puebla, R. A., Alves, F., Andrews, A. M., Ashraf, Φ. S., ... Udugama, B. N. (2017). Nano Focus Diverse Applications of Nanomedicine. <https://doi.org/10.1021/acsnano.6b06040>
- Pérez, R. A., Won, J., Knowles, J. C., & Kim, H. (2013). Naturally and synthetic smart composite biomaterials for tissue regeneration ☆. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 65(4), 471–496. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2012.03.009>
- Rahikkala, A., Pereira, S. A. P., Figueiredo, P., Passos, M. L. C., Araújo, A. R. T. S., Saraiva, M. L. M. F. S., & Santos, H. A. (2018). Mesoporous Silica Nanoparticles for Targeted and Stimuli- Responsive Delivery of Chemotherapeutics : A Review, 1800020, 1–33. <https://doi.org/10.1002/adbi.201800020>
- Ravichandran, R., Sundaramurthi, D., Gandhi, S., Sethuraman, S., & Krishnan, U. M. (2014). Microporous and Mesoporous Materials Bioinspired hybrid mesoporous silica – gelatin sandwich construct for bone tissue engineering. *MICROPOROUS AND MESOPOROUS MATERIALS*, 187, 53–62. <https://doi.org/10.1016/j.micromeso.2013.12.018>
- Rosenholm, J. M., Zhang, J., Linden, M., & Sahlgren, C. (2016). Mesoporous silica nanoparticles in tissue engineering - A perspective. *Nanomedicine*, 11(4), 391–402. <https://doi.org/10.2217/nnm.15.212>
- Sengupta, D., Waldman, S. D., & Li, S. (2014). From in vitro to in situ tissue engineering. *Annals of Biomedical Engineering*, 42(7), 1537–1545. <https://doi.org/10.1007/s10439-014-1022-8>
- Shi, M., Zhai, D., Zhao, L., Wu, C., & Chang, J. (2014). Nanosized mesoporous bioactive glass/poly(lactic-co-glycolic acid) composite-coated CaSiO<sub>3</sub>

- scaffolds with multifunctional properties for bone tissue engineering. *BioMed Research International*, 2014. <https://doi.org/10.1155/2014/323046>
- Shi, M., Zhou, Y., Shao, J., Chen, Z., Song, B., Chang, J., ... Xiao, Y. (2015). Stimulation of osteogenesis and angiogenesis of hBMSCs by delivering Si ions and functional drug from mesoporous silica nanospheres. *Acta Biomaterialia*, 21, 178–189. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2015.04.019>
- Singh, Rajendra K., Jin, G. Z., Mahapatra, C., Patel, K. D., Chrzanowski, W., & Kim, H. W. (2015). Mesoporous silica-layered biopolymer hybrid nanofibrous scaffold: A novel nanobiomatrix platform for therapeutics delivery and bone regeneration. *ACS Applied Materials and Interfaces*, 7(15), 8088–8098. <https://doi.org/10.1021/acsami.5b00692>
- Singh, Rajendra Kumar, Patel, K. D., Leong, K. W., & Kim, H. (2017). Progress in Nanotheranostics Based on Mesoporous Silica Nanomaterial Platforms Progress in Nanotheranostics Based on Mesoporous Silica Nanomaterial Platforms. <https://doi.org/10.1021/acsami.6b16505>
- Sudhakar, C. K., Upadhyay, N., Verma, A., Jain, A., Charyulu, R. N., & Jain, S. (2015). Chapter 1. Nanomedicine and Tissue Engineering. *Nanotechnology Applications for Tissue Engineering*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-32889-0.00001-7>
- Takahashi, K., & Yamanaka, S. (2006). Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors. *Cell*, 126(4), 663–676. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.07.024>
- Tang, F., Li, L., & Chen, D. (2012). Mesoporous silica nanoparticles: Synthesis, biocompatibility and drug delivery. *Advanced Materials*, 24(12), 1504–1534. <https://doi.org/10.1002/adma.201104763>
- Vallet-Regí, M., Ruiz-González, L., Izquierdo-Barba, I., & González-Calbet, J. M. (2006). Revisiting silica based ordered mesoporous materials: Medical

applications. *Journal of Materials Chemistry*, 16(1), 26–31.

<https://doi.org/10.1039/b509744d>

Wang, S. (2009). Ordered mesoporous materials for drug delivery. *Microporous and Mesoporous Materials*, 117(1–2), 1–9.

<https://doi.org/10.1016/j.micromeso.2008.07.002>

Zhou, X., Feng, W., Qiu, K., Chen, L., Wang, W., Nie, W., ... He, C. (2015). BMP-2 Derived Peptide and Dexamethasone Incorporated Mesoporous Silica Nanoparticles for Enhanced Osteogenic Differentiation of Bone Mesenchymal Stem Cells. *ACS Applied Materials and Interfaces*, 7(29), 15777–15789.

<https://doi.org/10.1021/acsami.5b02636>

Zhou, Y., Quan, G., Wu, Q., Zhang, X., Niu, B., Wu, B., ... Wu, C. (2018).

Mesoporous silica nanoparticles for drug and gene delivery. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 8(2), 165–177.

<https://doi.org/10.1016/j.apsb.2018.01.007>

Zhu, M., Zhu, Y., Ni, B., Xie, N., Lu, X., Shi, J., ... Guo, X. (2014). Mesoporous Silica Nanoparticles / Hydroxyapatite Composite Coated Implants to Locally Inhibit Osteoclastic Activity. <https://doi.org/10.1021/am405013t>