



Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Ingeniería
Maestría en Ciencias (Nanotecnología)

Elaboración de un Material Compuesto Nanoestructurado Hidroxiapatita-Biopolímero con Aplicación Potencial como Implante de Tejido Cartilaginoso.

Tesis

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

Presenta:

Juan Eduardo Rubio Jerezano

Dirigido por:

Dr. Rodrigo Rafael Velázquez Castillo

Dr. Rodrigo Rafael Velázquez Castillo
Presidente

Dr. Rufino Nava Mendoza
Secretario

Dr. Eduardo Arturo Elizalde Peña
Vocal

Dra. Karen Esquivel Escalante
Suplente

Dr. Eric Mauricio Rivera Muñoz
Suplente

Centro Universitario, Querétaro, Qro.
Fecha de aprobación por el Consejo Universitario (Octubre 2019)
México

A mi madre Olga, gracias por el apoyo y el amor incondicional en cada paso que doy. A mi padre Eduardo, gracias por las enseñanzas y consejos que llevo conmigo siempre, aun cuando ya no estás con nosotros.

A mi novia Dulce, mi alma gemela, mi mejor amiga, mi razón de ser, gracias por el amor que compartimos y que me da fuerza para seguir adelante y me inspira a ser mejor cada día.

A mi familia, gracias por su cariño y sus palabras de aliento.

A mis profesoras y profesores que compartieron conmigo su conocimiento para poder llevar esta tesis a su final.

A mis compañeras y compañeros de posgrado, sin ell@s esta maestría no habría sido tan divertida y en especial a Ireri y a Eileen, por su ayuda en todas las clases, tareas, trámites y congresos que compartimos.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco profundamente a mi asesor el Dr. Rodrigo Velázquez Castillo, por su guía y apoyo durante mi estancia en la maestría.

También a mi comité tutorial conformado por el Dr. Rodrigo Velázquez Castillo, el Dr. Rufino Nava Mendoza, el Dr. Eduardo Elizalde Peña, la Dra. Karen Esquivel Escalante y el Dr. Eric Mauricio Rivera Muñoz por su tiempo, consejos, retroalimentación y comentarios.

Agradezco a mis maestros de posgrado el Dr. Rodrigo Velázquez, el Dr. Rufino Nava, la Dra. Ángeles Cuan, el Dr. Carlos Cortez, y a la Dra. Lucero Gomez por sus valiosas enseñanzas.

Se agradece enormemente la ayuda otorgada por la Dra. Dulce María Rivera Pastrana (UAQ) para la liofilización de las películas compuestas, a la Dra. Carmen Leticia Peza Ledesma (UNAM – CFATA) por su apoyo en la caracterización de los materiales, al Dr. Cristian Ramírez (UNAM – CFATA) por su apoyo en los análisis FTIR, a la MSc. Viviana Palos (UAQ) por su asesoría en el manejo de los equipos, al MSc. Pascual Alanís (UAQ) por su instrucción en los procesos de síntesis, al MSc. Fernando Morelos (UAQ) por su apoyo con los análisis de rayos-X, a la M. en I. Alicia del Real López (UNAM – CFATA) por su apoyo en microscopía electrónica y al M. en I. Gerardo Antonio Fonseca Hernández (UNAM – CFATA) por su apoyo para la realización de las pruebas mecánicas.

Los autores agradecen al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por su apoyo a lo largo de esta investigación, así como a FOFI-UAQ 2018-13 por el apoyo financiero.

ÍNDICE

1.	INTRODUCCIÓN.....	12
2.	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	13
3.	JUSTIFICACIÓN	14
4.	ESTADO DEL ARTE	18
4.1	ANTECEDENTES.....	18
4.2	FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA	22
4.2.1	<i>Hidroxiapatita (HAp)</i>	23
4.2.2	<i>Tejido Cartilaginoso</i>	23
5.	HIPÓTESIS.....	26
6.	OBJETIVOS	27
6.1	OBJETIVO GENERAL	27
6.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	27
7.	METODOLOGÍA	28
7.1	MATERIALES.....	28
7.1.1	<i>Nitrato de Calcio</i>	28
7.1.2	<i>Hidróxido de Potasio</i>	28
7.1.3	<i>Fosfato Dipotásico</i>	29
7.1.4	<i>Ácido Glutámico</i>	29
7.1.5	<i>Colágeno</i>	29
7.1.6	<i>Grenetina</i>	30
7.2	MÉTODOS.....	30
7.2.1	<i>Hidroxiapatita</i>	30
7.2.2	<i>Matriz de Colágeno / Grenetina</i>	32
7.2.3	<i>Compuesto Hidroxiapatita – Biopolímero</i>	33
8.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	36
8.1	DIFRACCIÓN DE RAYOS – X (XRD)	36
8.2	TAMAÑO DE CRISTALITO (DEBYE – SCHERRER Y WILLIAMSON – HALL)	39

8.3	MATRIZ DE COLÁGENO / GRENETINA	41
8.4	PELÍCULA COMPUESTA HIDROXIAPATITA – BIOPOLÍMERO.....	44
8.5	ANÁLISIS TERMOGRAVIMÉTRICO (TGA) Y CALORIMETRÍA DIFERENCIAL DE BARRIDO (DSC) ..	44
8.6	ESPECTROSCOPIA INFRARROJA CON TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR).....	50
8.7	MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO (SEM).....	61
8.8	PRUEBAS MECÁNICAS.....	70
9.	CONCLUSIONES.....	76
10.	REFERENCIAS	79
11.	APÉNDICE	86
11.1	PREPARACIÓN DEL BUFFER FOSFATO.....	86
11.2	PRUEBAS DE SOLUBILIDAD.....	86

Dirección General de Bibliotecas UAG

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Comparación del tamaño de cristalito de acuerdo al método utilizado.....41

Tabla 2. Frecuencias a las que se encuentran las bandas de distintos grupos funcionales dentro de los materiales compuestos sintetizados.....60

Tabla 3. Módulo de Young y esfuerzo máximo de las diferentes películas compuestas sintetizadas.....74

Dirección General de Bibliotecas UAO

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Ilustración del tejido cartilaginoso hialino presente en el cuerpo humano (Matta & Zakany, 2013).	24
Figura 2. Ubicación del tejido articular en una rodilla humana (Schmidler, 2018).	25
Figura 3. Proceso de síntesis hidrotérmal asistido por microondas para la hidroxiapatita.....	31
Figura 4. Proceso de síntesis de la matriz de colágeno/grenetina.....	33
Figura 5. Método de síntesis del nanomaterial compuesto HAp – Biopolímero.	35
Figura 6. Difractograma representativo de la hidroxiapatita obtenida. Se indican los índices de Miller (hkl) correspondientes a cada reflexión de Bragg de acuerdo al PDF ICDD-PDF#09-432.	36
Figura 7. ICDD-PDF#09-432 superpuesto sobre una de las muestras de HAp obtenidas en el estudio.	38
Figura 8. Gráfica Williamson – Hall $B_{tot}\cos\theta$ vs $\sin\theta$	40
Figura 9. Termograma TGA de HAp hexagonal; película colágeno – grenetina; película con 5% en peso de HAp hexagonal; película con 10% en peso de HAp hexagonal.	45
Figura 10. Termograma DSC de película colágeno – grenetina; película con 5% en peso de HAp; película con 10% en peso de HAp.	46
Figura 11. Termograma DSC del colágeno y la grenetina	47
Figura 12. Análisis TGA de HAp hexagonal; película con 5% en peso de HAp; película con 10% en peso de HAp; película con 5% en peso de HAp comercial; película con 10% en peso de HAp comercial.....	48

Figura 13. Análisis DSC de película con 5% en peso de HAp; película con 10% en peso de HAp; película con 10% en peso de HAp comercial; película con 5% en peso de HAp comercial.....	49
Figura 14. Estructura química del colágeno.....	51
Figura 15. Espectro FTIR del colágeno	52
Figura 16. Estructura química de la grenetina (Kommareddy, Shenoy, & Amiji, 2007).	53
Figura 17. Espectro FTIR de la grenetina	54
Figura 18. Vista transversal de la celda unitaria de la HAp hexagonal (Uskoković, 2015).....	54
Figura 19. Espectro FTIR de la HAp hexagonal altamente cristalina.....	55
Figura 20. Espectro FTIR del Colágeno, Grenetina, HAp y películas compuestas.	56
Figura 21. Acercamiento del espectro FTIR entre 3800 y 2750 cm^{-1} para el colágeno, la grenetina y las películas compuestas.	57
Figura 22. Acercamiento del espectro FTIR entre 1800 y 750 cm^{-1} para el colágeno, la grenetina y las películas compuestas.	59
Figura 23. Posible interacción entre los átomos superficiales de la HAp hexagonal y los grupos amida del colágeno y la grenetina.....	61
Figura 24. Micrografía SEM de las películas de colágeno / grenetina.	62
Figura 25. Micrografía SEM de las películas de 5 wt. % de HAp comercial.....	63
Figura 26. Micrografía SEM de las películas de 10 wt. % de HAp comercial.....	64

Figura 27. Micrografía SEM de las películas de 5 wt. % de HAp hexagonal altamente cristalina.....	65
Figura 28. Micrografía SEM de las películas de 10 wt. % de HAp hexagonal altamente cristalina.....	66
Figura 29. Micrografía SEM combinada de electrones secundarios y retrodispersados de las películas de 5 wt. % de HAp comercial.....	67
Figura 30. Micrografía SEM combinada de electrones secundarios y retrodispersados de las películas de 10 wt. % de HAp comercial.....	68
Figura 31. Micrografía SEM combinada de electrones secundarios y retrodispersados de las películas de 5 wt. % de HAp hexagonal altamente cristalina.	69
Figura 32. Micrografía SEM combinada de electrones secundarios y retrodispersados de las películas de 10 wt. % de HAp hexagonal altamente cristalina.....	70
Figura 33. Imagen probeta utilizada con medidas de acuerdo a la norma ASTM D638.	71
Figura 34. Gráficas de esfuerzo y deformación para películas de colágeno / grenetina y películas compuestas HAp comercial / biopolímero.....	72
Figura 35. Gráficas de esfuerzo y deformación para películas de colágeno / grenetina y películas compuestas HAp hexagonal / biopolímero.....	73
Figura 36. Gráficas de solubilidad de las películas compuestas sintetizadas.....	87

RESUMEN

En este trabajo se propone la obtención de un material compuesto nanoestructurado hidroxiapatita – biopolímero para ser utilizado como implante de tejido cartilaginoso. Se sintetizó una película de este material tratando de imitar las propiedades del cartílago hialino utilizando hidroxiapatita altamente biocompatible y un biopolímero similarmente biocompatible (por ejemplo, colágeno y grenetina). Para actuar como la fase inorgánica del compuesto, nanofibras de hidroxiapatita hexagonal altamente cristalina fueron sintetizadas, logrando una orientación cristalina preferencial en la dirección [001]. La orientación preferencial y la morfología de las nanofibras son extremadamente importantes ya que son relevantes para lograr la resistencia mecánica que necesita el implante. La fase orgánica, conformada por el biopolímero (colágeno / grenetina), otorga las características del cartílago hialino presente en el cuerpo humano. La concentración ideal de colágeno / grenetina se estableció entre 20 y 25% en peso para obtener una composición similar a la del cartílago hialino. Se añadió hidroxiapatita en concentraciones de 5% y 10% en peso, usando un sonotrodo para mejorar la actividad química y dispersar adecuadamente las nanofibras de hidroxiapatita; se usó una solución de fosfato para facilitar la unión entre las fases. Los análisis DSC y TGA muestran que se logró una interacción química entre las fases inorgánicas y orgánicas, también revelan a que temperatura se comienzan a degradar las películas y como la hidroxiapatita modifica algunas de las propiedades del material. Los análisis FTIR confirman la unión entre ambas fases con una posible interacción entre grupos amida de los biopolímeros y el calcio de la hidroxiapatita. Las micrografías SEM muestra una muy buena dispersión de la hidroxiapatita, una distribución homogénea de la misma y una excelente integración de las nanofibras con el biopolímero. Finalmente, las pruebas mecánicas muestran un comportamiento interesante por la manera en que las propiedades cambian al variar la concentración de hidroxiapatita en las películas compuestas.

(Palabras clave: Hidroxiapatita, Colágeno, Grenetina, Biomaterial, Cartílago hialino, Tejido cartilaginoso)

ABSTRACT

In this work, the obtention of a composite hydroxyapatite – biopolymer nanostructured material is proposed to be used as a cartilaginous tissue implant. By using highly biocompatible hydroxyapatite and a similarly biocompatible biopolymer (e.g. collagen) a film was synthesized trying to mimic the properties of hyaline cartilage. To act as the inorganic phase of the composite, highly crystalline hexagonal hydroxyapatite nanofibers were obtained, achieving a preferential crystalline orientation in the [001] direction. The preferential orientation and the morphology of the nanofibers are extremely important as it is believed the morphology modifies the mechanical strength of the composite material. The organic phase, made of the biopolymer (collagen/gelatin), delivers the features that mimic the hyaline cartilage present in the human body. The ideal collagen/gelatin concentration was established between 20 – 25 wt. % in order to obtain a similar composition to that of hyaline cartilage. Hydroxyapatite was added in concentrations of 5 wt. % and 10 wt. % using a sonotrode in order to enhance the chemical activity and properly disperse the hydroxyapatite nanofibers, a phosphate solution was used to enable the union between phases. DSC and TGA results show that a chemical interaction between the inorganic and organic phases is achieved, they also display the degradation temperature of the films and how hydroxyapatite modifies some properties of the material. FTIR analysis confirm the link between both phases by revealing an interaction between the biopolymer amide groups and the calcium present in hydroxyapatite. SEM images show a very good dispersion, homogeneous distribution and excellent integration of hydroxyapatite nanofibers with the biopolymer. Finally, the mechanical tests show an interesting behavior in the way the properties of the composite films change as the concentration of hydroxyapatite varies.

(Key words: Hydroxyapatite, Collagen, Gelatin, Biomaterial, Hyaline Cartilage, Cartilaginous Tissue)

1. INTRODUCCIÓN

Aún con los grandes avances en el campo de la medicina, la reparación del tejido cartilaginoso continúa siendo un gran reto. Existe una falta de biomateriales diseñados para reemplazar el tejido dañado y que sean capaces de promover la regeneración del cartílago (Yang, Zhang, Yue, & Khademhosseini, 2017).

La hidroxiapatita (HAp) sintética es biocompatible y bioactiva. Por esta razón, ha sido extensamente utilizada en el campo de la medicina como material de implante para la restauración de dientes y huesos dañados (Alanís-Gómez et al. 2016). Estas características le dan a la HAp el potencial para ser utilizada como base para la ingeniería de tejidos cartilagosos.

Al ser utilizada junto con un biopolímero, similarmente biocompatible, como el colágeno, se espera poder reproducir las propiedades mecánicas y estructurales del cartílago hialino el cual está localizado al final de los huesos, en las costillas, en la nariz, en la laringe, en la tráquea y en los bronquios (Paxton, Peckham, & Knibbs, 2018).

El tejido cartilaginoso está compuesto por una matriz extracelular (ECM) y por condrocitos, estos son los responsables de mantener la integridad del tejido. La ECM se compone de una red de colágeno y de proteoglicanos, en conjunto, estos determinan las propiedades mecánicas y las características físicas del cartílago (Aigner, et al., 2007). El colágeno es la proteína estructural más abundante dentro de la ECM. Alrededor del 90% del peso en seco del cartílago hialino es colágeno tipo II (Zhao, Jin, Cong, Liu, & Fu, 2013).

Por esta razón se eligió el colágeno y a una de sus formas parcialmente hidrolizadas (la grenetina) como los biopolímeros a utilizar en conjunto con la HAp para la síntesis del material que concierne a esta investigación

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El cartílago posee una capacidad muy limitada de auto-reparación y está sometido a muchos esfuerzos a lo largo de la vida, esto provoca un desgaste que se presenta en forma de distintos malestares, como dolor e incluso pérdida de la capacidad de movimiento (Ohyabu et al., 2010). Los defectos de la interfaz osteocondral generalmente involucran lesiones tanto de cartílago hialino (cartílago articular) como del hueso subcondral subyacente causados por traumatismos, enfermedades o por envejecimiento (Yang et al., 2017). Además, el cartílago hialino también se encuentra en zonas como la nariz, la cual, al ser afectada estructuralmente, requiere de cirugías reconstructivas para reemplazar el tejido cartilaginoso dañado.

Esta necesidad genera una búsqueda de nuevos métodos y materiales que buscan mejorar o reemplazar los procedimientos actuales, entre los que se encuentran la cirugía reconstructiva o artroplastia total de rodilla (Ohyabu et al., 2010). Aún con los grandes avances en el campo de la medicina regenerativa, la reparación de la interfaz osteocondral continúa siendo un gran reto. Esta ineficiencia se genera principalmente de la falta de biomateriales diseñados para reemplazar las zonas de tejido dañadas y que sean capaces de promover la regeneración del tejido (Yang et al., 2017).

Además, los procedimientos actuales para la reparación del tejido cartilaginoso requieren en ocasiones más de una cirugía, exponiendo al paciente a los problemas que involucra un procedimiento quirúrgico y su recuperación. En ocasiones también se requieren donantes y en caso de los autoinjertos, se causa la morbilidad del sitio donante del tejido (Yang et al., 2017).

3. JUSTIFICACIÓN

La creación de un material compuesto HAp-biopolímero como implante de tejido cartilaginoso ayudará al tratamiento de los defectos y lesiones en el cartílago hialino. Estos padecimientos involucran a las enfermedades reumáticas crónicas, incluyendo a la osteoartritis (OA) y también a las lesiones traumáticas.

La OA es una enfermedad crónico-degenerativa que destruye gradual y progresivamente el cartílago hialino que cubre la superficie articular de rodillas, caderas, hombros, manos, tobillos y columna vertebral. La osteoartritis es la enfermedad reumática crónica que más se presenta en México y en el mundo. Sus síntomas incluyen dolor, deformidad e incapacidad funcional de las articulaciones de mayor movilidad y que soportan más carga. Es un padecimiento multifactorial dentro de los que sobresalen la edad, sobrepeso, lesiones traumáticas, género y predisposición genética (Lavalle, 2010).

Cuando los defectos en el tejido cartilaginoso no son tratados, la articulación se deteriorará progresivamente, conduciendo a la OA y eventualmente desencadenando en una discapacidad (Chen et al., 2009). Los defectos y las lesiones relacionadas con el tejido cartilaginoso representan alrededor del 6% de las discapacidades en personas de 30 años o más en los Estados Unidos de América (Felson & Zhang, 1998).

La alta incidencia y prevalencia de la OA la han convertido en un problema de salud pública global. Esta enfermedad es padecida por alrededor del 15% de la población mundial mayor a los 60 años. Además, se calcula que la osteoartritis es de 10 a 12 veces más frecuente que la artritis reumatoide (Wieland, Michaelis, Kirschbaum, & Rudolphi, 2005). La presentación más significativa de la OA es la de rodilla y se incrementa a medida que aumenta la edad, 33% de los hombres y 53% de las mujeres mayores a los 80 años de edad presentan alguna evidencia de osteoartritis (Felson et al., 1987).

En México, la OA se considera la segunda causa de morbilidad en personas mayores a los 60 años según la Encuesta Nacional de Salud (ENSA) (Secretaría de Salud & Instituto Nacional de Salud Pública, 1998). La incidencia de la osteoartritis de cadera es de 88/100'000 personas al año y la de rodilla es de 240/100'000 personas por año siendo las mujeres las más afectadas con una incidencia de 1% en mujeres de 70 a 89 años de edad (Lavalle, 2010).

Estudios realizados con el fin de determinar los costos de enfermedades musculo-esqueléticas, reportan a la OA dentro de los primeros cuatro lugares en cuanto a demanda de atención, ubicándose dentro de los mismos cuatro niveles en cuanto a costos. Se estima que México destina 0.4% del PIB a la atención de enfermedades músculo-esqueléticas (Lavalle, 2010). En países desarrollados, como EUA, Canadá y Reino Unido, la carga económica de la osteoartritis es de aproximadamente 2.5% del producto interno bruto (PIB) (March & Bachmeier, 1997). Además, la osteoartritis es la enfermedad reumática crónica que más se presenta en México y en el mundo.

La pérdida de funcionalidad del cartílago articular debido a enfermedades crónicas o traumáticas pueden desencadenar en condiciones debilitantes u osteoartritis (Abbott, 2003). La reparación de defectos del cartílago articular es un gran reto en el área de cirugía ortopédica, debido a que muchas de las terapias regenerativas, como la condrectomía y el perforamiento subcondral presentan algunos problemas (Ohyabu et al., 2010).

De acuerdo con Yang et al. (2017), se presentan diversos problemas en los procedimientos e investigaciones actuales en cuanto a la generación de tejido cartilaginoso, estas dificultades se exponen a continuación:

El implante autólogo de condrocitos presenta los siguientes inconvenientes: escasos de una fuente de condrocitos, un largo periodo de recolección de condrocitos, dificultad para fijar la solución de condrocitos, ablación e hipertrofia del periostio, baja efectividad en pacientes de edad avanzada, incapacidad de reparar

la interface osteocondral y el cartílago en su totalidad ya que esto requiere de la reparación simultánea del hueso subcondral (Tuan, 2007), (Giannoni et al., 2005). Además, el fijar directamente un injerto de condrocitos en un sitio que posea una forma compleja es todo un desafío para los cirujanos (Chung, Mesa, Randolph, Yaremchuk, & Burdick, 2006).

En el caso de los aloinjertos, se sufre de una fuente limitada de tejido, rechazo, integración insuficiente, baja viabilidad de las células debido al almacenaje del injerto y la posibilidad de contagio de enfermedades. Los autoinjertos no sólo carecen de integración y de una fuente de tejido, también requieren de cirugías adicionales y producen la morbilidad del sitio donante (Yang et al., 2017).

La dificultad cuando se trata de desarrollar constructos cartilagosos artificiales que imiten las características del cartílago hialino, se basa en la simulación de las biofunciones únicas del cartílago hialino y de la interface osteocondral, las cuales son bastante complejas en composición y estructura.

Por último, al buscar obtener biomateriales en forma de matrices extracelulares (ECM), el reto se centra en generar materiales capaces de apoyar el crecimiento y proliferación de las células (andamios porosos), mantener los fenotipos de los condrocitos y osteoblastos además de promover la diferenciación de las células madre.

De acuerdo a lo anterior, en este trabajo se propone la creación de un material nanoestructurado biocompatible con base HAp – biopolímero que pueda sustituir y/o funcionar como implante de tejido cartilaginoso humano y que pueda aminorar los efectos del daño que sufren estos tejidos. Desde el punto de vista quirúrgico se puede eliminar el uso de materiales sintéticos que en ocasiones generan reacciones adversas ya que no están naturalmente presentes en el cuerpo humano, evitando así tratamientos adicionales que buscan evitar el rechazo del cuerpo a dichos materiales.

Desde la perspectiva de la recuperación, al no tener un material ajeno al cuerpo funcionando como cartílago, el rechazo será mucho menor por lo que el riesgo de sufrir una reacción adversa del sistema inmunológico disminuiría considerablemente. De esta forma se evita una reintervención quirúrgica y se logra una recuperación más rápida y con mínimos efectos secundarios.

Dirección General de Bibliotecas UAQ

4. Estado del Arte

4.1 Antecedentes

Las terapias actuales para reparación de cartílago son en su mayoría quirúrgicas e involucran procedimientos como: la estimulación de la médula ósea a través de una microfractura (Mithoefer, McAdams, Williams, Kreuz, & Mandelbaum, 2009), implantes autólogos de condrocitos (los cuales pueden o no contener biomateriales) (Harris, Siston, Pan, & Flanigan, 2010), autoinjertos y aloinjertos osteocondrales (Raikin, 2009), entre otros. Así mismo, células madre mesenquimales (MSC's) derivadas de la médula ósea han sido investigadas como células candidatas para la regeneración de tejido musculo-esquelético, incluyendo cartílago y hueso (Jančář et al., 2007), (Ikoma, Muneta, & Tanaka, 2000).

La estimulación de la médula ósea involucra un tratamiento a base de microfracturas en el cual se realizan pequeñas perforaciones a través del tejido cartilaginoso y del hueso subcondral con el fin de crear un flujo sanguíneo y de traer médula ósea desde los tejidos circundantes. Se espera una regeneración y remodelamiento del cartílago y del hueso debido a la introducción de células madre y biomoléculas en los defectos. Sin embargo, este procedimiento puede resultar en la generación de fibrocartílago el cual posee biofunciones inferiores a las del cartílago hialino (Galperin et al., 2013), (Kreuz et al., 2006).

El implante autólogo de condrocitos para regenerar el cartílago hialino ha sido utilizado a lo largo de dos décadas con resultados quirúrgicos hasta cierto punto satisfactorios (Yang et al., 2017). Los inconvenientes de este tipo de implantes incluyen la escases de una fuente de condrocitos, un largo periodo de recolección de condrocitos, dificultad para fijar la solución de condrocitos, ablación e hipertrofia del periostio, baja efectividad en pacientes de edad avanzada, incapacidad de reparar la interface osteocondral y el cartílago en su totalidad (Tuan, 2007), (Giannoni et al., 2005). Además, el fijar directamente un injerto de condrocitos en

un sitio que posea una forma compleja es todo un desafío para los cirujanos (Chung et al., 2006).

En el caso de los aloinjertos, se sufre de una fuente limitada de tejido, rechazo, integración insuficiente, baja viabilidad de las células debido al almacenamiento del injerto y la posibilidad de contagio de enfermedades. Los autoinjertos no sólo carecen de integración y de una fuente de tejido, también requieren de cirugías adicionales y producen la morbilidad del sitio donante (Yang et al., 2017).

Existe también la síntesis de soportes porosos, los cuales constan de una esponja de colágeno la cual incorpora un compuesto, por ejemplo, hidroxiapatita/condroitín sulfato (pCol-HAp/ChS), que contiene materiales que se asemejan a matrices extracelulares en los tejidos óseos y cartilagosos, los cuales requieren de una alta resistencia a la compresión para ser usados en el área médica (Ohyabu et al., 2010).

El tratamiento de los pacientes con algún problema en el tejido cartilaginoso, a menudo requiere un implante con un diámetro de 3 cm o más, lo que hace muy complicado la preparación de un implante. Para estos casos, soportes para la interface hueso-cartilago han sido estudiados, utilizando colágeno y sulfato de condroitina los cuales poseen una resistencia a la compresión fácil de usar clínicamente (Ohyabu et al., 2010).

Según Yang et al. (2017), las dos principales maneras de abordar la reparación de la interface osteocondral y del cartílago hialino desde el punto de vista de la ingeniería de tejidos son:

Desarrollar constructos cartilagosos artificiales que imiten las características estructurales, las propiedades mecánicas y las funciones biológicas del tejido cartilaginoso. Por ejemplo, la generación de piezas de tejido tridimensional con una rigidez mecánica similar a la del cartílago hialino a través de la combinación de biopolímeros especialmente diseñados y tecnologías de manufactura avanzadas

(Moutos, Freed, & Guilak, 2007). No obstante, la simulación de las biofunciones únicas del cartílago hialino y de la interface osteocondral, las cuales son bastante complejas en composición y estructura, aún representa un gran reto.

El otro acercamiento se enfoca en la medicina regenerativa. La idea es obtener biomateriales adecuados en forma de matrices extracelulares (ECM) que promuevan el crecimiento, proliferación y diferenciación celular en la zona de los defectos lo que deja la tarea de regeneración de los tejidos a los procesos biológicos locales. En estos casos, los materiales de las matrices no tienen que ser tan resistentes como los tejidos nativos ya que sólo funcionan como ambientes temporales para que las células progenitoras, condrogénicas u osteogénicas, generen el cartílago. El reto en este caso es generar materiales capaces de apoyar el crecimiento y proliferación de las células, mantener los fenotipos de los condrocitos y osteoblastos, y también promover la diferenciación de las células madre (Yang et al., 2017).

Estudios biológicos han establecido que, además de satisfacer los requerimientos del material en cuanto a composición, se requiere de una estructura tridimensional porosa interconectada con el fin de permitir el acoplamiento, proliferación y diferenciación de las células, así como para proporcionar caminos para los biofluidos (Alonso-Sierra et al., 2017), (Ramay & Zhang, 2003).

A lo largo de la última década, la mezcla de materiales compuestos conformados por polímeros naturales y una fase cerámica reforzante y bioactiva, ha visto una mejora. Gracias a esto, algunos de estos materiales compuestos han logrado ser usados clínicamente. El colágeno es usado ampliamente como un biomaterial de andamiaje o soporte debido a sus propiedades biocompatibles y biodegradables, mientras que la HAp sintética, casi idéntica a la bioapatita del hueso, se ha utilizado ampliamente como un sustituto óseo artificial (Padmanabhan et al., 2015).

Así mismo, se ha encontrado que, al trasplantar colágeno, condroitinsulfato e hidroxapatita dentro de un defecto del cartílago hialino, se produce un efecto que promueve la regeneración del tejido cartilaginoso (Ikoma et al., 2000).

Para los fines de la presente investigación se requiere de hidroxapatita (HAp) hexagonal, altamente cristalina. Existen muchos métodos de síntesis reportados para la síntesis de HAp, entre estos métodos se pueden encontrar la síntesis hidrotermal, electrospinning o electrohilado, precipitación química e irradiación de microondas. Todos estos son capaces de generar HAp nanoestructurada, cada una con propiedades características otorgadas por la manera en que la hidroxapatita fue sintetizada (Méndez-Lozano et al., 2017).

Estudios previos han demostrado que algunos aminoácidos son capaces de inhibir el crecimiento de los cristales de HAp en algunas direcciones específicas, debido a la adsorción de estos aminoácidos en la superficie del cristal a través de atracción electrostática o de la formación de compuestos coordinados entre el calcio de la HAp y los grupos funcionales amino y carboxilo de los aminoácidos, lo cual influencia la morfología de los cristales de apatita (Chander & Fuerstenau, 1984).

Sin embargo, lo que más concierne a este trabajo es que se ha encontrado que algunas proteínas con alto contenido de ácido glutámico juegan un papel importante en la biomineralización de tejidos, esto se debe a la mencionada interacción entre grupos carboxilo y los iones de calcio en la superficie de los cristales de hidroxapatita (Zhang, Zhu, & Wang, 2005).

La creación de un material compuesto HAp-biopolímero como implante de tejido cartilaginoso ayudará al tratamiento de los defectos y lesiones en el cartílago hialino. Estos padecimientos involucran a las enfermedades reumáticas crónicas, incluyendo a la osteoartritis (OA) y también a las lesiones traumáticas.

4.2 Fundamentación teórica

A diferencia de la mayoría de los tejidos, el cartílago es avascular, es decir, no tiene vasos sanguíneos, y posee un conteo bajo de células. Por esta razón el cartílago carece de la habilidad de auto-curación ya que su naturaleza provoca una ausencia de nutrientes y de células progenitoras (Huey, Hu, & Athanasiou, 2012). De acuerdo con lo encontrado en la literatura, esta es la razón principal por la que se han obtenido resultados poco favorables al utilizar los tratamientos actuales (Adegawa et al., 2009), además, los condrocitos presentes en el tejido cartilaginoso son células altamente diferenciadas cuya capacidad de auto-reparación está severamente limitada.

La hidroxiapatita hexagonal sintética cuenta con excelentes propiedades de biocompatibilidad y bioactividad. Como consecuencia, la HAp sintética ha sido extensamente utilizada en el campo de las ciencias de la salud como material de implante para la restauración de dientes y huesos dañados (Alanís-Gómez et al., 2016). Estas características le dan a la HAp el potencial para ser utilizada como base para la ingeniería de tejidos cartilaginosos y al ser utilizada junto con un biopolímero, como el colágeno, se espera reproducir las propiedades mecánicas y estructurales del cartílago hialino.

Se espera obtener una HAp con un alto grado de cristalinidad y pureza utilizando un método de síntesis hidrotérmal asistido por microondas utilizando ácido glutámico como el agente guía del crecimiento cristalino de la HAp (Cabrera, Velázquez-Castillo, & Rivera-Muñoz, 2011).

Se ha encontrado que se pueden elaborar estructuras diferentes y jerárquicas de tejido duro durante el proceso de biomineralización, y estas están constituidas de diferentes morfologías de cristales de hidroxiapatita. Por esta razón muchos esfuerzos se han enfocado en el desarrollo de nuevos métodos de síntesis que permitan controlar la morfología de esos cristales. Este control es de suma importancia debido a que el control de la morfología de las partículas HAp a lo largo

del proceso de síntesis es crucial para las diferentes aplicaciones del material. Así mismo, las características estructurales determinan las propiedades micro y macroscópicas de la hidroxiapatita (Rivera-Muñoz, Velázquez-Castillo, & Cabrera-Torres, 2010).

4.2.1 Hidroxiapatita (HAp)

La hidroxiapatita (HAp) cuya fórmula química es $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, es el equivalente sintético más parecido químicamente al principal componente mineral presente en los huesos humanos, el cual es una apatita carbonatada de calcio con una deficiencia de grupos hidroxilo y que incluye pequeñas cantidades de materiales dopantes como el magnesio y el sodio que sustituyen al calcio. Más de veinte años de investigación han mostrado consistentemente que la HAp exhibe una excelente biocompatibilidad, bioactividad y, si es porosa, osteoconducción in vivo (Roeder, Converse, Leng, & Yue, 2006), (Ramay & Zhang, 2003).

4.2.2 Tejido Cartilaginoso

El tejido cartilaginoso (ver Figura 1) está compuesto por una matriz extracelular (ECM) y por células llamadas condrocitos, estas células son las responsables de mantener la integridad del tejido. La matriz extracelular se compone de una red de colágeno (II, IX y XI) compleja y de proteoglicanos (en su mayoría agregano). En conjunto, el colágeno y los proteoglicanos determinan las propiedades mecánicas y las características físicas del cartílago según su función (Aigner, Haag, Martin, & Buckwalter, 2007).

El colágeno es la proteína estructural más abundante dentro de la matriz extracelular. Alrededor del 90% del peso en seco del cartílago hialino es colágeno tipo II. La red de colágeno cruzada se compone de aproximadamente 70% de agua y le proporciona la forma y resistencia mecánica al cartílago durante la articulación (Zhao et al., 2013).

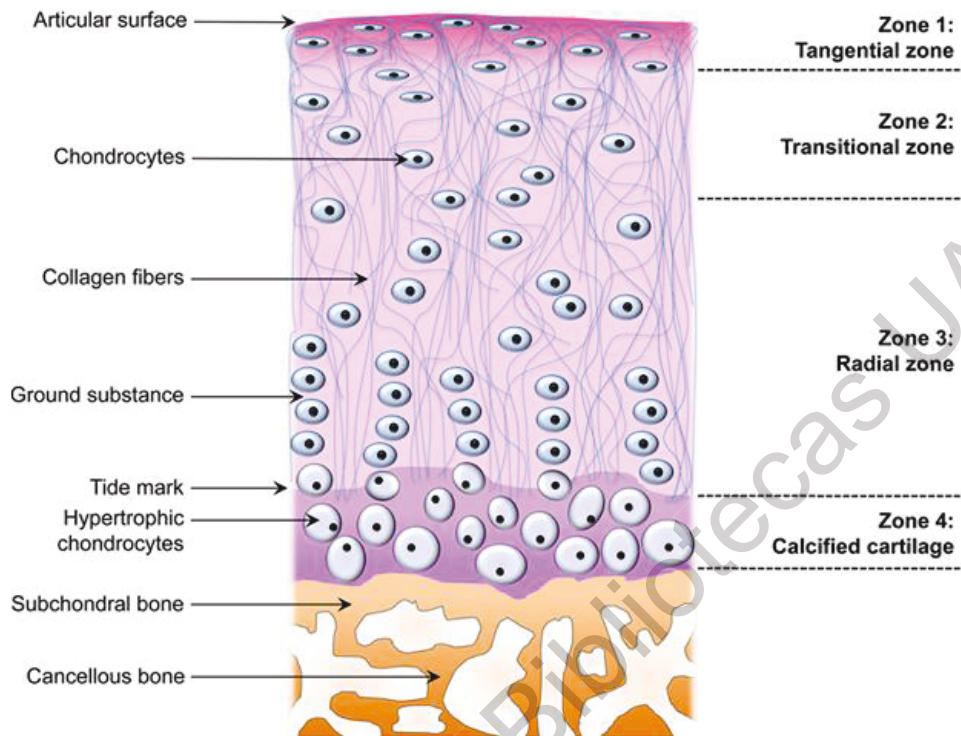


Figura 1. Ilustración del tejido cartilaginoso hialino presente en el cuerpo humano (Matta & Zakany, 2013).

De acuerdo con (Paxton et al., 2018), existen tres tipos de cartílago en el cuerpo humano:

- **Cartílago Hialino:** Es el más común, se encuentra en las costillas, nariz, laringe y tráquea. Es un precursor de los huesos.
- **Fibrocartílago:** Se encuentra en los discos intervertebrales, capsulas de las articulaciones y ligamentos.
- **Cartílago Elástico:** Se encuentra en el oído externo, en el canal auditivo del oído medio y en la epiglotis.

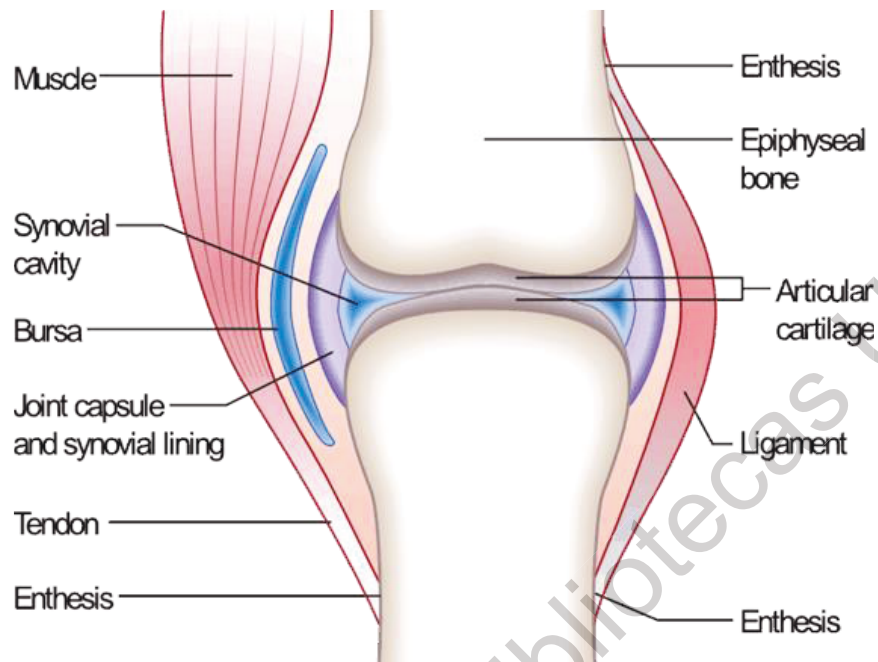


Figura 2. Ubicación del tejido articular en una rodilla humana (Schmidler, 2018).

El tejido cartilaginoso hialino es el más común y es el tipo de cartílago que forma al esqueleto embrionario. Permanece en la edad adulta en forma de cartílago articular localizado en las articulaciones al final de los huesos (ver Figura 2), al final de las costillas, en la nariz, en la laringe, en la tráquea y en los bronquios. Tiene una apariencia brillante de color entre blanco y azul y posee una alta resiliencia. El fibrocartílago es un tejido muy fuerte y tenaz, es similar a otros tejidos fibrosos, pero contiene condrocitos. El cartílago elástico es de color amarillo y es más flexible que los otros dos tipos de cartílago ya que contiene fibras elásticas además de colágeno (The Editors of Encyclopædia Britannica, 2018).

5. Hipótesis

La adición de las nanofibras de hidroxiapatita hexagonal, altamente cristalinas, obtenidas a partir de un método hidrotérmal asistido por microondas, a un biopolímero a través de un proceso sonoquímico, resultará en la obtención de un andamiaje que tendrá la resistencia mecánica necesaria para ofrecer el soporte mecánico y la flexibilidad necesarios para permitir la recuperación del tejido cartilaginoso hialino, además este material permitirá el flujo de células y nutrientes para favorecer dicha regeneración y que, con el paso del tiempo, el material de implante sea gradualmente sustituido por tejido cartilaginoso natural.

Dirección General de Bibliotecas UAG

6. Objetivos

6.1 Objetivo general

Obtener un material compuesto nanoestructurado con base HAp-biopolímeros que sea un andamiaje, el cual tendrá aplicaciones potenciales como material de implante o sustituto de tejido cartilaginoso para su uso en el área de la nanomedicina regenerativa.

6.2 Objetivos específicos

Aplicar un método de síntesis hidrotérmal asistido por microondas para obtener nanofibras de HAp con las características cristalinas requeridas para la formación de un biomaterial compuesto.

Desarrollar un material compuesto nanoestructurado, y lograr una unión, entre la fase inorgánica de la hidroxiapatita y la fase orgánica del biopolímero, a través de un tratamiento sónico, en la que exista una interacción química tal que genere propiedades mecánicas sinérgicas en el material compuesto.

Determinar las características estructurales y las propiedades mecánicas del material compuesto nanoestructurado, utilizando métodos de caracterización como el SEM, XRD, TGA, DSC y utilizando las normas ASTM para las pruebas mecánicas, con el fin de comprobar que posee las características adecuadas para ser usado posteriormente como sustituto y/o implante de tejido cartilaginoso.

7. Metodología

La síntesis de los materiales se llevó a cabo en el laboratorio de nanotecnología en la planta baja del Centro Académico Multidisciplinario de la Universidad Autónoma de Querétaro Campus Aeropuerto, localizado en Carretera a Chichimequillas s/n, Ejido Bolaños, C.P. 76140, Querétaro, Querétaro, México.

7.1 Materiales

7.1.1 Nitrato de Calcio

El nitrato de calcio es un compuesto inorgánico, cuya fórmula es $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, es una sal incolora y ha sido clasificado como un fuerte electrolito pero se espera que ocurra alguna asociación iónica en soluciones acuosas. Variaciones en la conductancia equivalente de acuerdo a la concentración, temperatura de dilución y a los espectros de absorción ultravioleta sugieren la presencia de efectos interiónicos (Irish & Walrafen, 1967). El nitrato de calcio es la fuente de iones calcio durante la síntesis de la HAp.

7.1.2 Hidróxido de Potasio

El hidróxido de potasio, KOH, actúa como precursor de varios compuestos en donde el potasio está presente, es la fuente de grupos OH para la HAp. Es utilizado en la manufactura de detergentes, fertilizante, papel y productos del petróleo. En el campo de la química orgánica el KOH actúa como una base y es utilizado en la síntesis de diversos compuestos orgánicos. También posee aplicaciones como electrolito en baterías. Es incompatible con ácidos, compuestos nitrogenados, metales alcalinos, magnesio, cobre, halógenos, azidas y anhídridos. El contacto con el aluminio, el estaño y el zinc provoca la liberación de hidrógeno (Aesar Alfa, 2018).

7.1.3 Fosfato Dipotásico

El fosfato dipotásico es una sal altamente soluble en agua que es comúnmente utilizada como fertilizante, aditivo alimenticio y como agente intermediario. Es una fuente común de fósforo y potasio. Su fórmula química es KH_2PO_4 (Branen, Davidson, Salminen, & Thorngate III, 2001). Durante la síntesis de hidroxiapatita, este compuesto será la fuente de grupos fosfato.

7.1.4 Ácido Glutámico

El ácido glutámico es un aminoácido cuya fórmula es $\text{C}_5\text{H}_9\text{NO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ es utilizado por casi todos los seres vivos para llevar a cabo la biosíntesis de proteínas. En el caso de las nanoestructuras, el ácido glutámico es usado para guiar el crecimiento de los cristales de HAp, además de que tiene influencia en la morfología de las nanoestructuras (Méndez-Lozano et al., 2017).

Una reacción de síntesis de hidroxiapatita sin ácido glutámico produce partículas con formas irregulares, diferentes tamaños y superficies ásperas. El crecimiento de los cristales se dio de forma aleatoria. Al añadir el ácido glutámico, se pueden obtener varias morfologías (como listones, nanoplacas y nanofibras) dependiendo de la concentración del ácido glutámico. El ácido glutámico permite que el cristal crezca preferencialmente en algunas direcciones, como consecuencia, las nanoestructuras adquieren formas definidas (Cabrera et al., 2011).

7.1.5 Colágeno

El colágeno es uno de los materiales estructurales primarios dentro de los animales vertebrados y además es la proteína más abundante en los mamíferos, conforma aproximadamente de 20 a 30% de las proteínas totales del cuerpo humano (Harkness, 1961). Está presente en tejidos que llevan a cabo funciones principalmente mecánicas y se puede considerar como uno de los biomateriales más útiles. Posee muy buena biocompatibilidad y es seguro utilizarlo debido a sus características biológicas, como la biodegradabilidad y la poca capacidad

antigénica, superiores a la de otros biopolímeros, como la albúmina. El colágeno desempeña un papel importante en la formación de tejidos y órganos y es un buen agente tensoactivo (Lee, Singla, & Lee, 2001).

La razón principal para usar colágeno en la biomedicina ortopédica es que el colágeno puede formar fibras de alta resistencia y estabilidad gracias a sus características de autoagregación y reticulación (Lee et al., 2001).

7.1.6 Grenetina

La grenetina es un producto de la hidrólisis parcial del colágeno (Zhou et al., 2012). Pero, a diferencia del colágeno, esta es más estable y genera menos reacciones antígenas por parte del cuerpo, es decir es más biocompatible (Babaei, Jahanshahi, & Rabiee, 2013). Además de que el menor costo, mayor disponibilidad y mejor biodegradabilidad le otorgan ventajas sobre el colágeno (Yanovska et al., 2016).

7.2 Métodos

7.2.1 Hidroxiapatita

Para llevar a cabo la síntesis de la hidroxiapatita se tomó como base el trabajo realizado por Alanís-Gomez (Alanís-Gómez et al., 2016). Se comenzó preparando dos soluciones acuosas. La primera de ácido glutámico ($C_5H_9NO_4 \cdot H_2O$) y nitrato de calcio ($Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$) en agua destilada. La segunda de hidróxido de potasio (KOH) y fosfato de potasio (KH_2PO_4) en agua destilada.

Posteriormente, la primera solución se agitó durante una hora iniciando la agitación a temperatura ambiente y alcanzando una temperatura de 41° C después de los 60 minutos de agitación. La segunda solución se agitó durante diez minutos iniciando la agitación a temperatura ambiente y alcanzando una temperatura de 35°C después de 10 minutos de agitación. Después del proceso de agitación, se mezclaron ambas soluciones en un vaso de precipitados y se agitó por 2 minutos

más. Se hizo una lectura de temperatura y pH a todas las soluciones después de finalizar el calentamiento y mezclado de las mismas. Posteriormente, la solución se vertió dentro de tubos de cuarzo los cuales fueron cerrados herméticamente y colocados dentro de contenedores de teflón.

La reacción se llevó a cabo cuando la solución fue sometida a un calentamiento en horno de microondas a una potencia de 1200W durante 85 minutos. Se calentó la mezcla hasta los 170°C con una curva de calentamiento de 11.33°C/min, la presión máxima de operación fue de 80 bares. Las fuerzas motrices para la formación de la hidroxiapatita fueron sólo los efectos termodinámicos y dispersantes propiciados por el microondas usando al ácido glutámico como guía para el crecimiento de los cristales. Se obtuvo un sólido blanco en forma de polvo el cual fue filtrado y lavado con alcohol etílico absoluto. Se dejó secar el polvo a temperatura ambiente y se obtuvo la hidroxiapatita mediante un raspado.

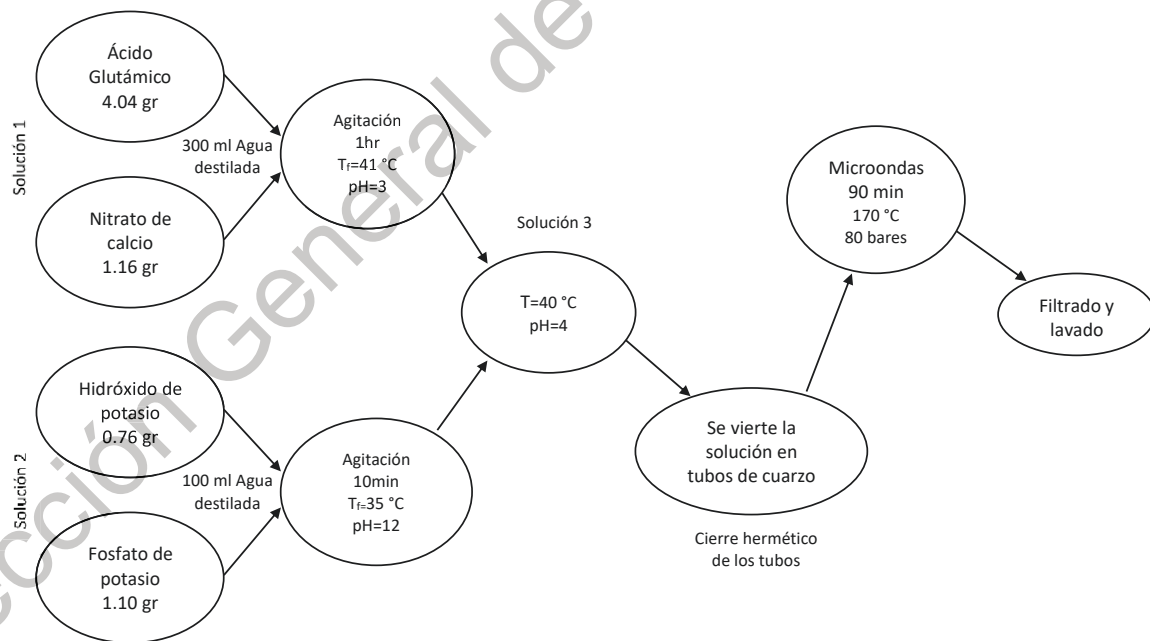


Figura 3. Proceso de síntesis hidrotermal asistido por microondas para la hidroxiapatita.

El control de la velocidad de calentamiento y de enfriamiento dentro del reactor, así como el uso de ácido glutámico son críticos para controlar el crecimiento cristalino (Alanís-Gómez et al., 2016). Esto se debe a que el ácido glutámico guía el crecimiento del cristal hacia una orientación preferencial y la velocidad a la que se calienta y enfría la solución afecta la forma en que se acomodan las nanopartículas pudiendo formar esferas o placas en lugar de las fibras que se desea obtener. El procedimiento de elaboración de HAp puede ser observado en la Figura 3.

7.2.2 Matriz de Colágeno / Gernetina

La matriz de colágeno / gernetina fue preparada colocando 4.29 gr (concentración al 30%) de colágeno / gernetina a una razón de 1:1 ó 1:2 en 10 ml de agua destilada. El agua se calentó previamente a aproximadamente 50 °C para disminuir el aglutinamiento del colágeno provocado cuando este entra en contacto con el agua. La solución se agitó a velocidad moderada por 15 minutos, o hasta que se disolvió por completo a una temperatura de 50 °C. Con el fin de eliminar las burbujas generadas por la agitación, y mantener a la solución en estado líquido, se mantuvo la agitación y la temperatura durante 15 minutos más; pero utilizando velocidades de agitación bajas. Una purga de burbujas más profunda se llevó a cabo manualmente con la ayuda de una espátula. Es muy importante disminuir lo más posible la presencia de burbujas en la solución ya que estas pueden alterar significativamente las propiedades mecánicas de la matriz de colágeno ya que se asume de manera general que las porosidades tienden a debilitar los materiales al reducir su resistencia a las fracturas (Cohen-Tanugi & Grossman, 2014), (Roark & Young, 1989).

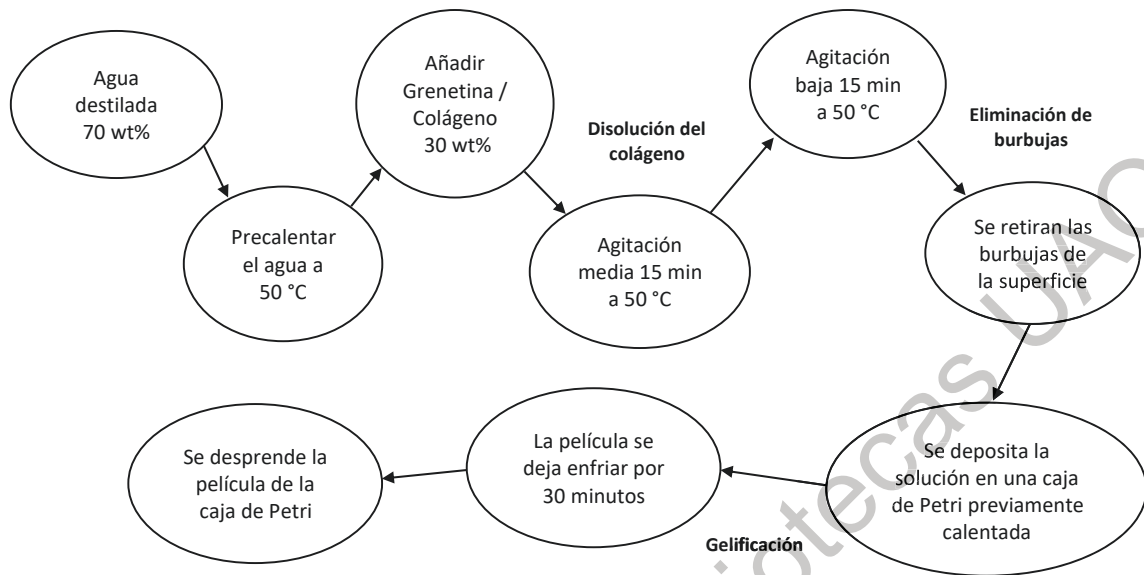


Figura 4. Proceso de síntesis de la matriz de colágeno/grenetina.

Posteriormente la solución fue depositada en una caja de Petri previamente calentada y se dejó enfriar la solución, sin moverse, durante 30 minutos para formar una película. Por último, se desprendió la película de la caja de Petri, se tapó y se selló con Parafilm para conservar la humedad. El procedimiento puede ser observado en la Figura 4.

7.2.3 Compuesto Hidroxiapatita – Biopolímero

La hidroxiapatita, fase inorgánica del material compuesto, y el colágeno / grenetina, fase orgánica del mismo, serán mezcladas a través de un proceso de sonicado el cual puede ser observado en la Figura 5. Este procedimiento modifica la forma en que se prepara la matriz de colágeno, ya que la síntesis del material compuesto requiere que la HAp sea añadida a la solución de colágeno antes de que esta se solidifique. El tratamiento de sonicado fue aplicado con el fin de aumentar la actividad química entre ambas fases y para dispersar las nanofibras de hidroxiapatita de manera adecuada. Un buffer fosfato fue utilizado como agente dispersante para fomentar aún más la unión entre fases (Alanis Gómez, 2018). Se utilizó un procesador ultrasónico UP200Ht de la marca Hielscher con una punta de

7 mm al 20% de amplitud, la amplitud máxima es de 70 μm y la proporción de la amplitud al utilizar la punta de 7 mm es de 1:2.5.

Al momento de sintetizar materiales compuestos HAp / colágeno, uno de los factores que controlan las propiedades del material es una fina dispersión de las partículas de HAp en la matriz de colágeno. Cuando las partículas de HAp se dispersan uniformemente en la matriz de colágeno, las propiedades del compuesto pueden mejorar significativamente. Sin embargo, resulta difícil lograr una dispersión homogénea de las partículas de HAp en el gel de colágeno. La aplicación de un proceso sonoquímico durante la síntesis de las películas HAp – colágeno / gretina proporciona una opción viable para lograr materiales compuestos con una dispersión homogénea (Padmanabhan et al., 2015).

El nanomaterial compósito HAp – Biopolímero fue sintetizado preparando una solución de colágeno / gretina con un porcentaje en peso del 20 o 25% (dependiendo de la concentración de HAp) en un buffer fosfato. El buffer fue calentado previamente a aproximadamente 50 °C para facilitar la disolución del biopolímero. La solución se agitó a velocidad moderada por 15 minutos a una temperatura de 50 °C.

Con el fin de eliminar las burbujas generadas por la agitación, y mantener a la solución en estado líquido, se mantuvo la agitación y la temperatura durante 15 minutos más; pero utilizando una velocidad de agitación lo más baja posible. Después se añadió 5 ó 10% de porcentaje en peso de hidroxiapatita altamente cristalina, la adición de HAp disminuye drásticamente la cantidad de burbujas presentes en la matriz colágeno/gretina por lo que no fue necesario retirar burbujas manualmente con una espátula.

El vaso con la solución fue transportado a una cama de hielo e inmediatamente se comenzó el sonicado. Se aplicaron 30 ciclos de 30 segundos cada uno con el sonotrodo configurado a una amplitud del 25%. Se eligió esta amplitud con el fin de lograr la dispersión deseada de la HAp en la solución y

fomentar la actividad química entre las fases orgánica e inorgánica sin alterar de manera considerable la integridad de las partículas del material nanoestructurado (Alanis Gómez, 2018). Después de cada ciclo de 30 segundos con el sonotrodo encendido, se dejaba de aplicar tratamiento sónico por diez segundos. Durante el procedimiento sónico la temperatura se mantuvo entre 45 y 55 °C para evitar, por un lado, la gelificación y, por el otro, la degradación de las proteínas del biopolímero. Para lograr el control de la temperatura, se midió la temperatura de la solución inmediatamente después de cada ciclo de tratamiento sónico. La cama de hielo utilizada se removía o se colocaba de acuerdo a las variaciones de temperatura (Alanis Gómez, 2018).

Posteriormente la solución fue depositada en una caja de Petri previamente calentada y se dejó enfriar, sin moverse, durante 30 minutos para formar la película. Por último, se desprendió la película de la caja de Petri, se tapó y se selló para conservar la humedad. La Figura 5 ilustra el procedimiento descrito.

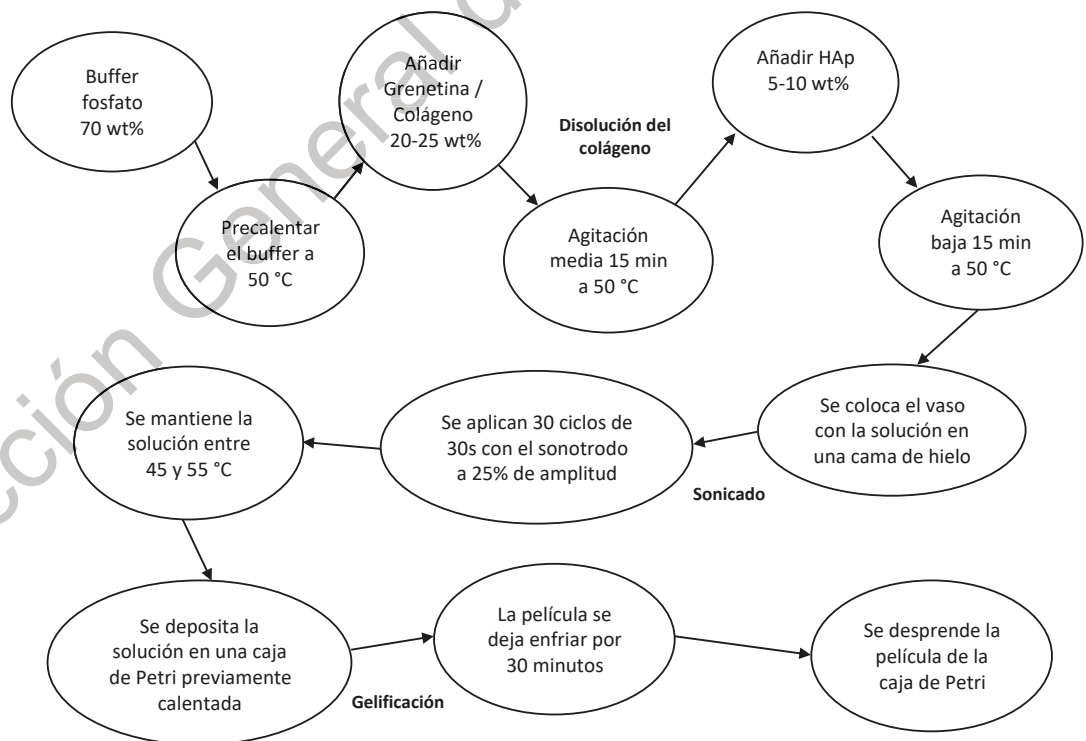


Figura 5. Método de síntesis del nanomaterial compuesto HAp – Biopolímero.

8. Resultados y discusión

8.1 Difracción de Rayos – X (XRD)

Se logro obtener una alta calidad cristalina y pureza en la HAp, a través de un método de síntesis hidrotérmal asistido por microondas utilizando ácido glutámico como agente para guiar el crecimiento cristalino, lo cual está reportado que produce mejores resultados en términos de obtener diferentes morfologías en las nanoestructuras de la HAp y en su cristalinidad (Cabrera et al., 2011).

Con el fin de identificar la especie de hidroxiapatita obtenida en la síntesis hidrotérmal asistida por microondas, se llevó a cabo un análisis XRD por polvos a las muestras sintetizadas. Se utilizó una radiación $\text{CuK}\alpha$ con una longitud de onda de 1.5406 Å. Todos los análisis fueron realizados en el intervalo angular de 5° a 80° del ángulo 2θ con un salto angular de 0.02° . Las muestras no fueron sometidas a ningún tipo de preparación con el fin de determinar una posible orientación preferencial de los cristales de hidroxiapatita.

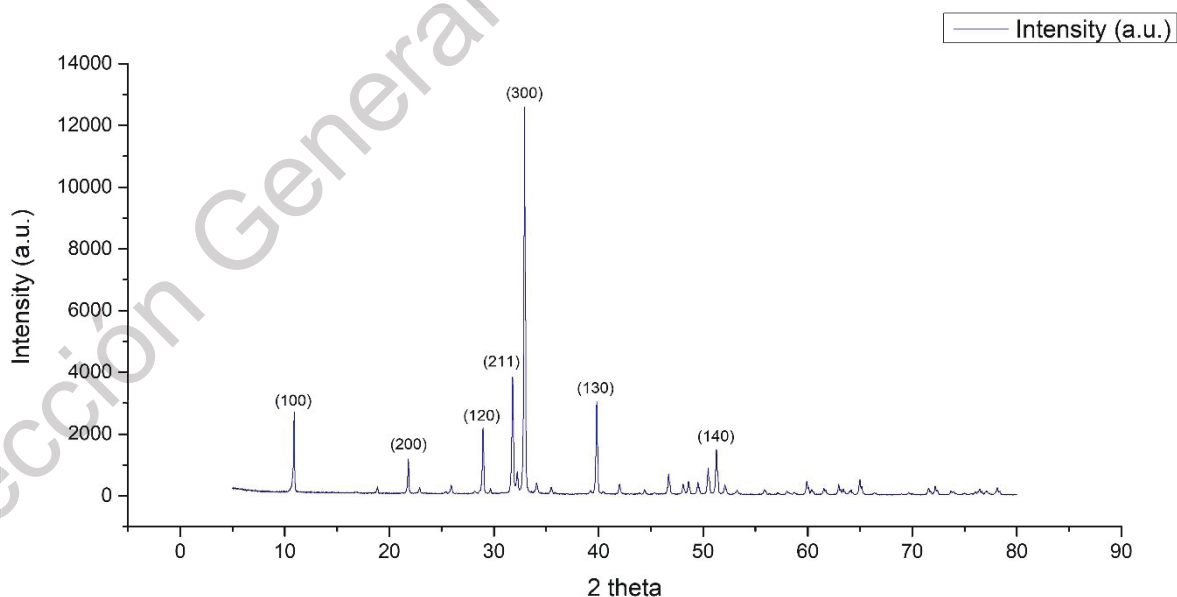


Figura 6. Difractograma representativo de la hidroxiapatita obtenida. Se indican los índices de Miller (hkl) correspondientes a cada reflexión de Bragg de acuerdo al PDF ICDD-PDF#09-432.

Los difractogramas muestran resultados similares para todas las muestras analizadas a excepción de una de ellas la cual fue contaminada durante el proceso de síntesis. Al comparar los difractogramas con los archivos de difracción de polvos (PDF) contenidos en el banco generado por el Centro de Datos de Difracción (ICDD) se observó que todas las muestras corresponden a la misma fase de hidroxiapatita hexagonal correspondiente al ICDD-PDF# 09-432. A partir de estos datos y sumando el hecho de que no se identificó otro componente cristalino en las muestras es posible asegurar que la HAp sintetizada posee una alta pureza. El difractograma mostrado en la Figura 6 es un ejemplo de los resultados obtenidos, los demás resultados presentan algunas variaciones en las intensidades que no afectan en la identificación de la fase cristalina de la hidroxiapatita sintetizada. A continuación, se detallan y analizan los resultados de la difracción de rayos – X.

Se puede observar en la Figura 6 que la HAp obtenida posee un alto grado de cristalinidad, evidenciado por la escasa presencia de ruido en el difractograma, las reflexiones de Bragg que están bien definidas, así como la intensidad de las mismas. Así mismo se puede apreciar un claro crecimiento cristalino preferencial producido por el incremento en número de los planos (300), lo cual resultó en un aumento en la intensidad de la reflexión de Bragg a 32.93° , siendo aproximadamente, tres veces mayor que la intensidad obtenida para la reflexión correspondiente a los planos (211), que de acuerdo al PDF antes mencionado, es la más intensa. Con lo anterior se concluye que la estructura cristalina de la HAp tiene una orientación cristalina preferencial en la dirección [300], mientras que las fibras de la hidroxiapatita crecen en la dirección [001] (Alanís-Gómez et al., 2016). Se puede considerar también que el tamaño de cristalito es relativamente grande al tomar en cuenta que las reflexiones son muy esbeltas, el tamaño de cristalito es calculado más adelante.

Al comparar los difractogramas con el PDF ICDD-PDF#09-432 (Figura 7), algunas reflexiones de Bragg presentan variaciones en su intensidad. Por ejemplo, en el PDF la reflexión más intensa corresponde a los planos (211) mientras que en

el difractograma de la Figura 7, esta reflexión sólo es de aproximadamente 30% de la intensidad de la reflexión producida por los planos (300). Se pueden percibir variaciones similares en la intensidad de otras reflexiones, como es el caso de aquellas producidas por los planos (100) y (200), las cuales también tuvieron un incremento en su intensidad. En contraste, la reflexión generada por los planos (002) presentó un decremento en su intensidad, según lo establecido en el PDF. De acuerdo con lo reportado por Alanís – Gomez (2016), esto se debe a una notable orientación cristalina preferencial sobre el eje “a” de la estructura cristalina de la HAp. Así mismo se reporta que la orientación cristalina preferencial y la alta cristalinidad del material son características logradas a través del uso del ácido glutámico como orientador del crecimiento cristalino, así como del control sobre la temperatura y la presión dentro del reactor (Alanís-Gómez et al., 2016).

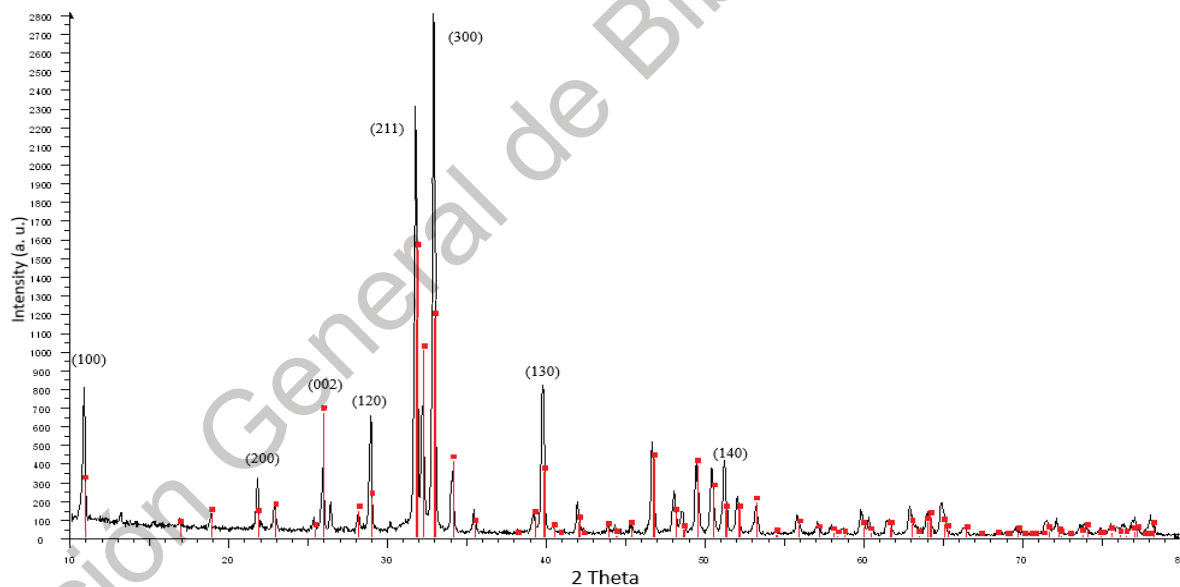


Figura 7. ICDD-PDF#09-432 superpuesto sobre una de las muestras de HAp obtenidas en el estudio.

8.2 Tamaño de cristalito (Debye – Scherrer y Williamson – Hall)

Se determino también el tamaño promedio de cristalito, L , de los cristales de la HAp a partir de los datos arrojados por el análisis XRD. La primera aproximación fue calculada en base a la ecuación de Debye-Scherrer, Ec. (1).

$$L = \frac{K \cdot \lambda}{W \cdot \cos \theta} \quad (1)$$

Donde: K = constante de Scherrer, dependiente de la forma del cristalito, oscilando en el rango $0.8 < K < 1.1$; para el caso de la HAp en cuestión se tomará un valor $K = 0.90$ (Ohyabu et al., 2009); λ es la longitud de onda de la radiación monocromática ($\lambda_{\alpha 1} = 1.5406 \text{ \AA}$). W es definida como el ancho de la reflexión de Bragg más intensa del difractograma, a la mitad de su altura (intensidad), y θ es la mitad del ángulo (2θ) en el que aparece dicha reflexión en el difractograma obtenido del análisis XRD (Ida, 2015; Langford & Wilson, 1978; Ungureanu, Angelescu, Ion, Stoian, & Rizescu, 2011). Al resolver la ecuación, utilizando la reflexión del plano (300), se obtiene un tamaño de cristalito de 38.0817 nm.

En la literatura, la medición del tamaño de cristalito de la HAp utilizando el mismo plano (300) como referencia, resulta ser muy similar, 24.8 nm (Ohyabu et al., 2009). La diferencia se atribuye a las diferentes morfologías en los agregados de la HAp y a la diferencia de calidad cristalina que se logra debido al método de síntesis utilizado.

Desafortunadamente, la ecuación de Debye – Scherrer no toma en cuenta la tensión en la red y esto resulta en una medición poco precisa del tamaño del cristalito. Para considerar la tensión en la estructura cristalina de la hidroxiapatita y obtener una mejor aproximación del tamaño de cristalito, se aplicó el método de Williamson-Hall, Ec. (2), a los datos obtenidos del análisis XRD.

$$\beta_{tot} \cdot \cos \theta = C\varepsilon \cdot \sin \theta + \frac{K \cdot \lambda}{L} \quad \beta_{tot} = \beta_L + \beta_\varepsilon = C\varepsilon \cdot \tan \theta + \frac{K \cdot \lambda}{L \cos \theta} \quad (2)$$

Donde: β_{tot} es el ancho total de la reflexión de Bragg a la mitad de su intensidad, el cual es producido por el aporte debido al tamaño promedio de cristalito (β_L) y por el aporte de la tensión de la red (β_ϵ). La $C\epsilon$ es el componente de tensión, el cual se obtiene de la pendiente de la línea en una gráfica $\beta\cos\theta$ vs $\text{sen}\theta$. Al sustituirla en la ecuación de la recta, Ec. (3):

$$y = mx + b \quad (3)$$

Al graficar después $\beta_{tot}\cos\theta$ contra $\text{sen}\theta$ (Figura 8), se obtiene la pendiente ($C\epsilon$) y la ordenada al origen ($K\lambda/L$), esta última permite la obtención del tamaño de cristalito (Barnes, Jacques, & Vickers, 2006), (Mote, Purushotham, & Dole, 2012). El tamaño resultante al aplicar el método Williamson-Hall fue de 63.0245 nm. Se puede observar el efecto de la tensión en la red al comparar los resultados obtenidos por ambos métodos (ver Tabla 1) y, lo que es más importante para este trabajo, una mejor estimación del tamaño de cristalito de la HAp sintetizada.

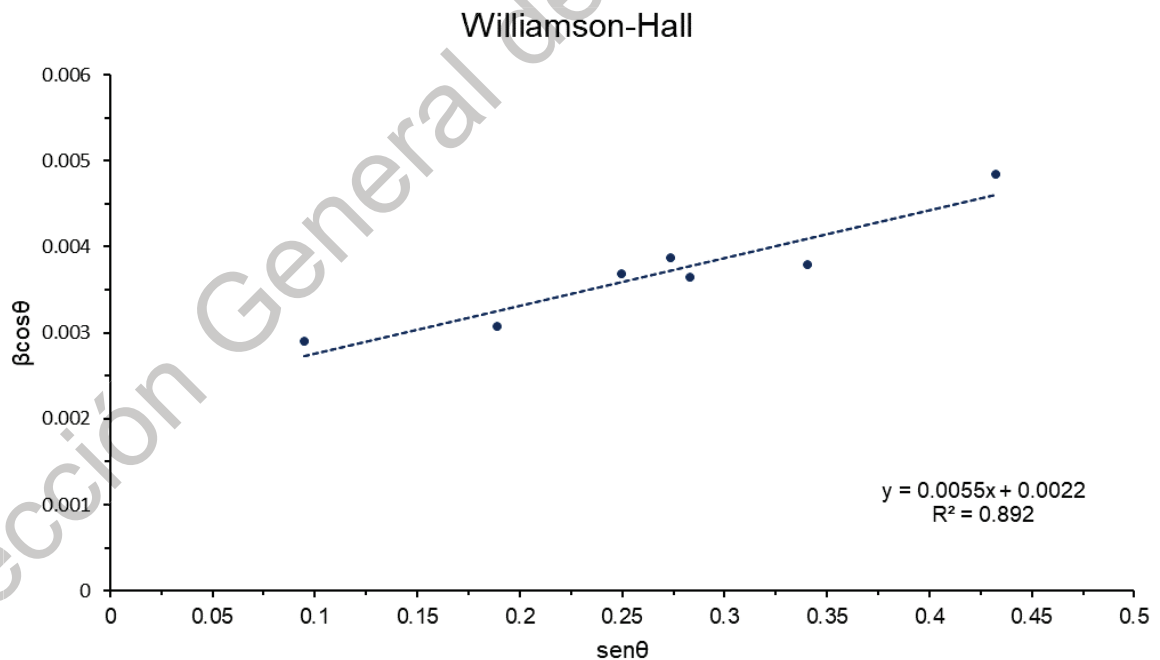


Figura 8. Gráfica Williamson – Hall $\beta_{tot}\cos\theta$ vs $\text{sen}\theta$.

El tamaño de cristalito de la HAp es similar al reportado en la literatura (Rusu et al., 2005). Un tamaño de cristalito pequeño es importante debido a que la

resistencia de un material se incrementa a medida que el tamaño de cristalito decrece (Fang, Yang, Jia, & Zhang, 2008). Esto ocurre porque un cristal con un cristalito de tamaño más pequeño requiere de una mayor cantidad de dislocaciones para lograr una determinada cantidad de tensión plástica, entonces el cristal se vuelve más difícil de deformar debido a que los nudos de dislocaciones son más densos (Fleck, Ashby, & Hutchinson, 2003).

Por otro lado, un cristalito más pequeño afecta también la flexibilidad del material de forma que disminuye la capacidad del mismo para flexionarse.

Tabla 1. Comparación del tamaño de cristalito de acuerdo al método utilizado.

Método	Tamaño de Cristalito
Debye-Scherrer	38.0817 nm
Williamson-Hall	63.0245 nm

Además de obtener un tamaño de cristalito más preciso al utilizar el método Williamson – Hall, los resultados llevan a la conclusión de que existe una tensión considerable en la red cristalina de la hidroxiapatita debido a la diferencia entre resultados arrojados por los métodos Debye – Scherrer y Williamson – Hall, el método Williamson – Hall arroja un tamaño de cristalito de casi el doble de tamaño que el calculado por el método Debye – Scherrer.

8.3 Matriz de Colágeno / Grenetina

Se prepararon varias soluciones de colágeno / grenetina en agua destilada con el fin de conocer los efectos de la concentración de colágeno en la solución. Se realizaron ensayos con 0.10, 0.20, 0.30, 0.40, 1.0 y 4.29gr. El ensayo de 4.29 gr representa una concentración de 30% de colágeno / grenetina en la solución, esto es debido a que la red de colágeno cruzada se compone de aproximadamente 70% de agua y es esta concentración la que le proporciona la forma y resistencia mecánica al cartílago durante la articulación (Zhao et al., 2013).

Se observó que, a medida que la concentración de colágeno / gretina aumenta, los materiales se vuelven más difíciles de disolver debido al incremento en la concentración del soluto y al aumento de la viscosidad de la solución. Esto generó la necesidad de aumentar la temperatura a la que se llevó a cabo la agitación, así como la velocidad de agitación, con el fin de lograr que el colágeno / gretina se disolviera por completo. El aumento de la velocidad de agitación provocó que se formaran burbujas de aire dentro de la solución, lo cual no es deseable, ya que estas burbujas pueden alterar la resistencia de la matriz de colágeno posterior a la solidificación. Después de la completa disolución del soluto, se modificó la velocidad de agitación, se disminuyó al mínimo permitido por la viscosidad de la solución, esto con el fin de disminuir la formación de burbujas durante la preparación de la solución, lo que aumentó el tiempo de preparación.

Los resultados fueron los esperados; a medida que aumenta la concentración de colágeno / gretina, el material resultante aumenta su resistencia a la compresión y se torna menos elástico. La matriz de colágeno presenta una relación inversamente proporcional entre dureza y elasticidad.

Posterior a la elaboración del material, se realizaron pruebas de solubilidad en agua. Las muestras se suavizan al ser introducidas en agua y se vuelven líquidas cuando se les aplica calor. Esto es un posible indicador de una baja estabilidad del material si este llega a entrar en contacto con los líquidos presentes en el cuerpo y/o si estuviera expuesto a la temperatura promedio de un ser humano.

Todas las matrices muestran un comportamiento similar al ser expuestas al agua y a un aumento de temperatura, siendo la única variante el tiempo que estas tardan en suavizarse o en disolverse. Se tomará como ejemplo a la matriz con una concentración de colágeno / gretina del 30%, a temperatura ambiente (en este caso 23 °C) la matriz se hace bastante suave al ser sumergida en agua y aplicar agitación, su integridad estructural se pierde al aplicarle fuerza. Al calentar la muestra a 34 °C estando sumergida en agua, esta comienza a disolverse y, a los

37 °C, se encuentra completamente disuelta. Los resultados se aceleran al aumentar la temperatura o al aumentar la velocidad de agitación. La película que más tarde en disolverse fue la que contiene 5 wt. % de HAp hexagonal, los detalles de las pruebas de solubilidad pueden observarse en el apéndice 11.2.

Al dejar las muestras cubiertas en el laboratorio, las matrices desarrollan hongos, debido al contenido de materia orgánica (proteínas) en el colágeno y en la grenetina. Así mismo al ir perdiendo humedad progresivamente, las matrices se endurecen y pierden su elasticidad. Esto sugiere que, a pesar de que la presencia de agua altera significativamente las propiedades mecánicas del material, este requiere estar hidratado para evitar su endurecimiento y pérdida de flexibilidad. Estas observaciones hacen creer que se requiere encontrar un material con una permeabilidad adecuada para mantenerse hidratado sin perder sus propiedades mecánicas. También, el mantener en refrigeración las películas ayuda enormemente a mitigar el problema de los hongos y la deshidratación.

Posteriormente, la relación colágeno / grenetina fue modificada con el fin de determinar el efecto de cada uno de los dos biopolímeros en las características estructurales de la matriz, una razón 1:1 se había estado utilizando como base. Para establecer la proporción ideal para cada uno de los compuestos, se obtuvieron matrices con relaciones de colágeno / grenetina de 5:1, 2:1, 1.5:1, 1:1.5 y 1:2, manteniendo la concentración de la mezcla colágeno / grenetina de 30% en peso dentro de la solución. Las observaciones señalan que la grenetina es el compuesto con mayor influencia en las propiedades mecánicas de la matriz colágeno / grenetina ya que, al aumentar la concentración de la grenetina, la solución gelifica con mayor dureza y, al disminuir la concentración de grenetina, la película resulta más flexible. Además, para poder manipular cómodamente la película, se debe utilizar un mínimo de 10% en peso de grenetina. Si se usa menos grenetina, la matriz no puede mantener su forma sin romperse al despegarla de la caja de Petri.

Aun cuando es la grenetina la que le confiere la mayor parte de las características mecánicas a la película sintetizada, es deseable mantener la concentración de esta al mínimo. Esto se debe a que es el colágeno, no la grenetina, el compuesto más abundante en el cartilago hialino, sin considerar el agua (Zhao et al., 2013). La importancia de la presencia de colágeno no puede ser subestimada ya que los condrocitos prosperan en un ambiente rico en colágeno.

8.4 Película compuesta Hidroxiapatita – Biopolímero

Se fijó la concentración de colágeno en 10% para así poder variar la concentración de grenetina al cambiar los contenidos de hidroxiapatita. Se decidió hacerlo así, en lugar de utilizar el 10% en peso mínimo requerido de grenetina, para que las películas sintetizadas fueran menos vulnerables a los cambios de temperatura. Una concentración de colágeno de 10% en peso hace necesario el enfriamiento de la solución a menos de 20°C para que esta gelifique, cosa que no sucede con mayores concentraciones de grenetina. Cabe mencionar que una vez gelificada, la película con el mínimo de grenetina establecido, es capaz de mantener su forma a temperaturas mayores a 20°C.

Se sintetizaron dos tipos de películas compuestas HAp - Biopolímero, la primera con un 5% en peso de HAp y la segunda con un 10% en peso de HAp. El contenido de colágeno se fijó en 10% en peso, mientras que la concentración de grenetina varió de 15% en peso a 10% en peso.

8.5 Análisis Termogravimétrico (TGA) y Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC)

Al menos una de las películas HAp – biopolímero mostró una mejora aparente sobre las matrices de colágeno / grenetina. Aunque las películas compuestas todavía son solubles en un medio acuoso. En un intento inicial para confirmar este supuesto, se llevaron a cabo análisis TGA y DSC. Los parámetros para ambos análisis son idénticos, la temperatura inicial se ajustó a 25 °C con una

temperatura final de 400 °C, mientras que la rampa de calentamiento se estableció en 20 °C / min, las muestras fueron analizadas en una atmósfera de nitrógeno.

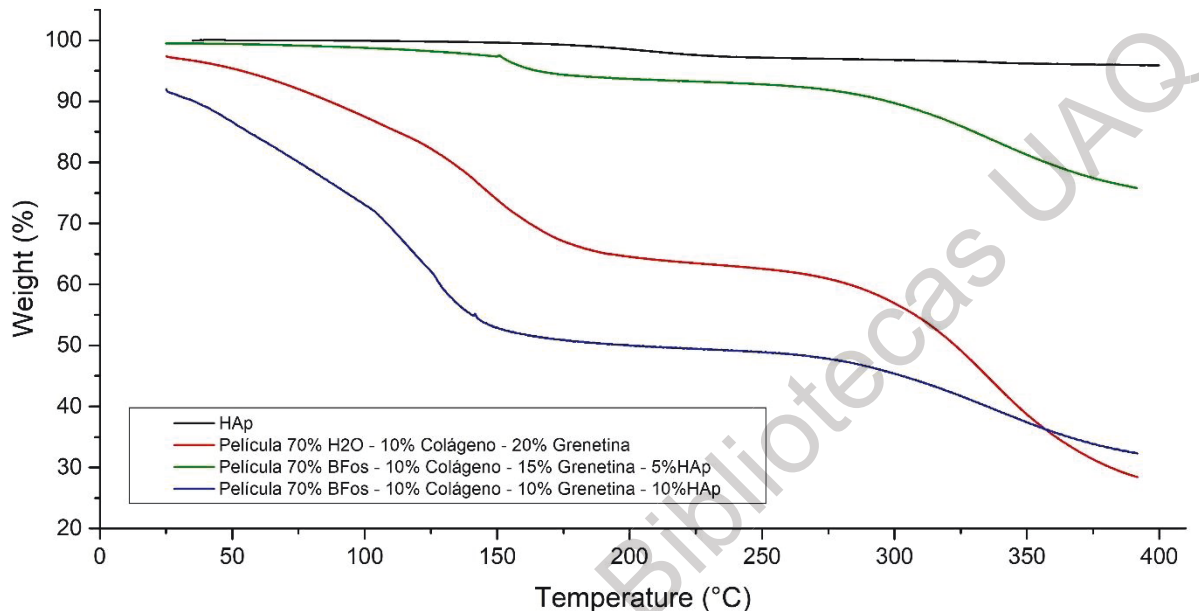


Figura 9. Termograma TGA de HAp hexagonal; película colágeno – grenetina; película con 5% en peso de HAp hexagonal; película con 10% en peso de HAp hexagonal.

El análisis TGA (ver Figura 9) parece confirmar la mejora, al menos para uno de los compuestos, ya que muestra cómo la película, con 10% en peso de colágeno, 15% en peso de grenetina y 5% en peso de HAp, se descompone a una velocidad mucho más lenta que la matriz de colágeno / grenetina. Esto da una idea de los resultados de cambiar las proporciones de los materiales en las películas compuestas y cómo la interacción entre colágeno, grenetina y HAp cambia la estabilidad térmica y la velocidad de descomposición de las películas. Es posible que las nanofibras de HAp al ser un cerámico, actúen como centros de calor y al estar dispersadas en la película de proteína, provoquen que ésta se descomponga a menor temperatura y más rápidamente, por ello un contenido mayor de nanofibras es menos estable. La morfología de partícula en la HAp comercial tiene menos área superficial, haciendo que este efecto disminuya.

El análisis DSC (ver Figura 10) muestra como las tres películas comienzan su proceso de deshidratación casi al mismo tiempo, con diferencia de apenas unos grados. La forma de la señal en el termograma nos indica que se trata de una pérdida de humedad y no de un cambio de estado del material. El cambio de estado, en este caso una fusión de las regiones cristalinas, se da entre los 100 y 125 °C, caracterizado por una señal más esbelta. El cambio de estado se presenta primero en la película con una concentración de 5% en peso de HAp, a la par de la película que sólo contiene colágeno y grenetina. Esto parece indicar que la película con la concentración de 10% en peso de HAp es más estable. Aun así, las películas sólo presentarían una pérdida de humedad a las temperaturas normales del cuerpo humano. Puede también argumentarse a favor de la película con 5% en peso de HAp, que es capaz de absorber más energía al momento de cambiar de estado.

Para fines de comparación, el análisis DSC del colágeno y la grenetina se muestra a continuación (ver Figura 11), los gráficos demuestran la diferencia en la absorción de energía entre los componentes por sí solos y las películas sintetizadas, favoreciendo a los productos sintetizados.

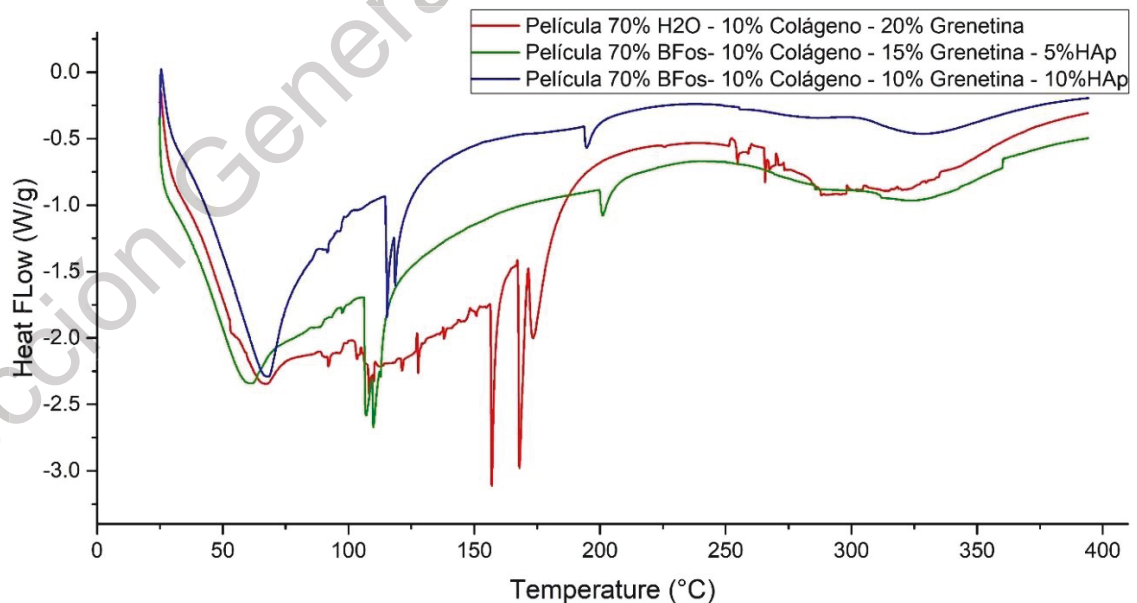


Figura 10. Termograma DSC de película colágeno – grenetina; película con 5% en peso de HAp; película con 10% en peso de HAp.

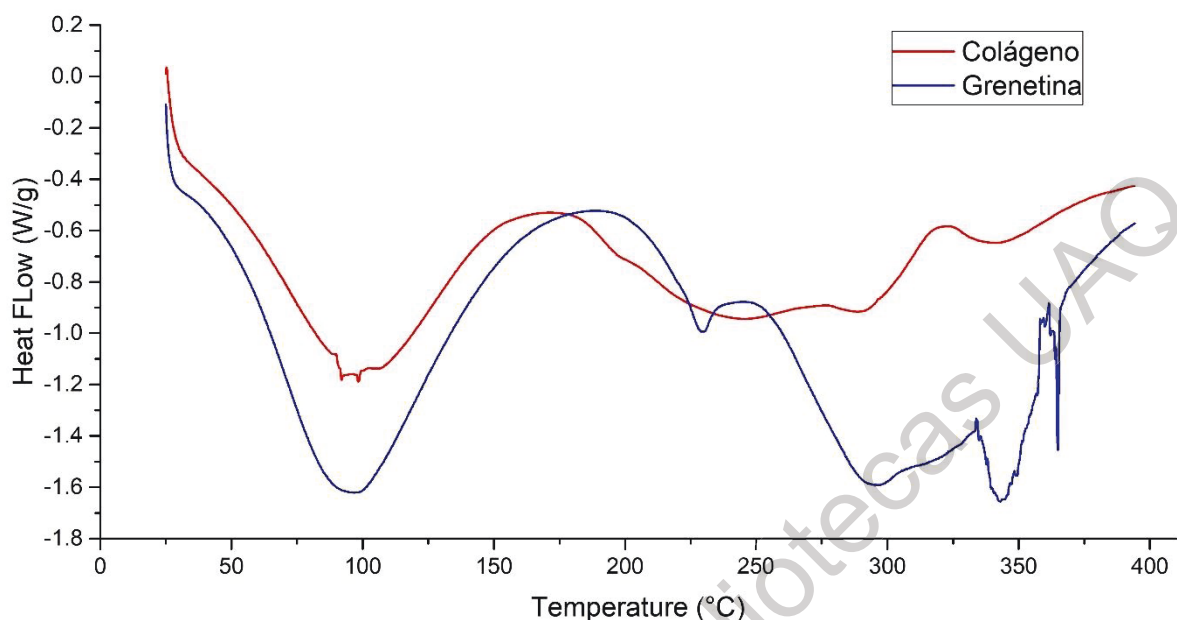


Figura 11. Termograma DSC del colágeno y la grenetina

Se sintetizaron también películas compuestas utilizando HAp de grado comercial. Esto con el fin de comparar el efecto de la cristalinidad de la HAp en el material. La HAp comercial, aunque idéntica en composición a la HAp sintetizada, no posee un crecimiento preferencial bien definido, además de que sus atributos, como su pureza y grado de cristalinidad, no son tan buenos como los de la HAp hexagonal altamente cristalina que se sintetizó.

El análisis TGA de las películas elaboradas con la HAp sintetizada y la HAp comercial puede ser observado en la Figura 12.

Como sucedió en el caso de las matrices y las películas compuestas, se puede observar como la película elaborada con 5% en peso de HAp sintetizada presenta una velocidad de degradación mucho más lenta que las otras 3 películas. También se puede concluir que esta película será mucho más estable a temperaturas normales del cuerpo humano presentando prácticamente una nula degradación al menos hasta los 50 °C.

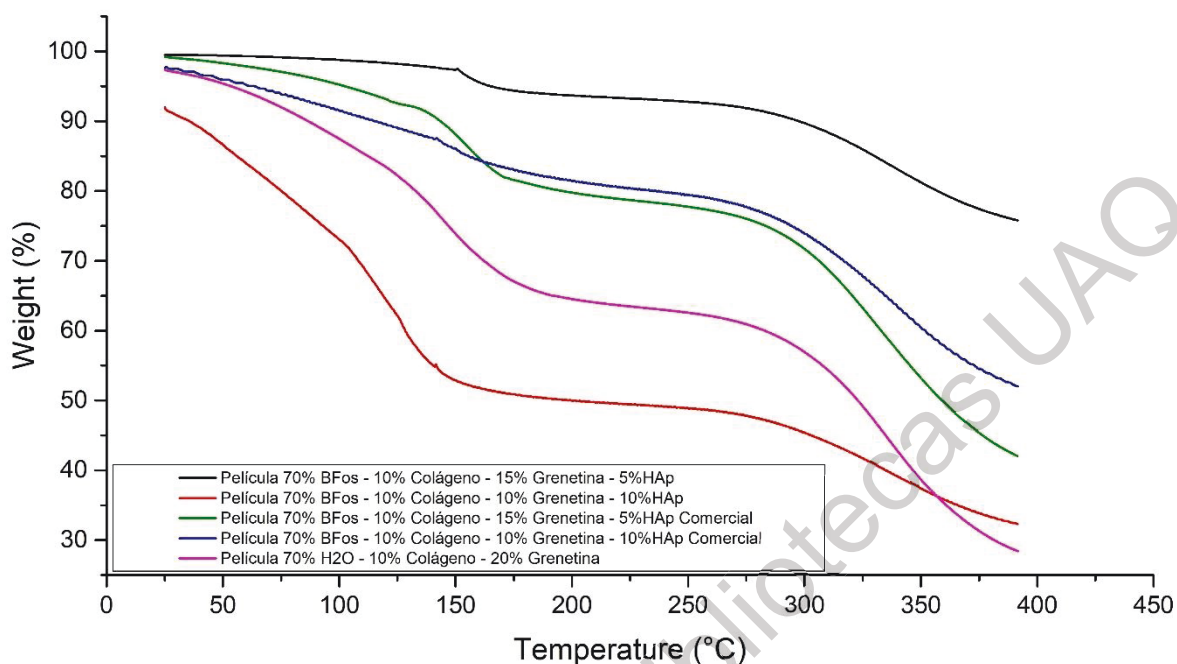


Figura 12. Análisis TGA de HAp hexagonal; película con 5% en peso de HAp; película con 10% en peso de HAp; película con 5% en peso de HAp comercial; película con 10% en peso de HAp comercial.

Por otro lado, la película con una concentración de 10% en peso de HAp sintetizada sigue siendo la más afectada por la aplicación de calor. En este caso y debido a la diferencia que se presenta con su contraparte de HAp comercial y la cuál no se repite en el caso de ambas películas con 5% en peso de HAp, puede ser que la muestra usada para la película elaborada con HAp sintetizada al 10% en peso, haya sido expuesta a una mayor o menor cantidad de humedad durante su almacenamiento, lo que alteraría los resultados del análisis.

El comportamiento de las películas preparadas con HAp comercial parece indicar que, al menos a las temperaturas presentes en el cuerpo humano, las películas con una concentración de 5% en peso de HAp son las más resistentes a la degradación lo que las hace más aptas para la aplicación como material de remplazo del tejido cartilaginoso, siendo la película elaborada con la HAp que se sintetizó la que presenta mejores propiedades.

Nuevamente el análisis DSC, el cual puede ser observado en la Figura 13, muestra como las películas comienzan su proceso de deshidratación casi al mismo tiempo, con diferencia de apenas unos grados. El cambio de estado se da entre los 100 y 125 °C. Observándose primero en la película con 5% en peso de HAp sintetizada y al final en la película con HAp comercial al 10% en peso, sugiriendo una mayor estabilidad para esta última, aunque irrelevante a temperaturas normales del cuerpo humano. Aun así, la ventaja en cuanto a absorción de energía la sigue teniendo la película con concentración de 5% en peso de HAp sintetizada.

Cabe mencionar que la película con 10% en peso de HAp comercial no presenta las mismas características en su termograma. Este comportamiento puede sugerir una mala preparación de la muestra, exceso o escases de humedad, o un enmascaramiento de las señales creado por ellas mismas.

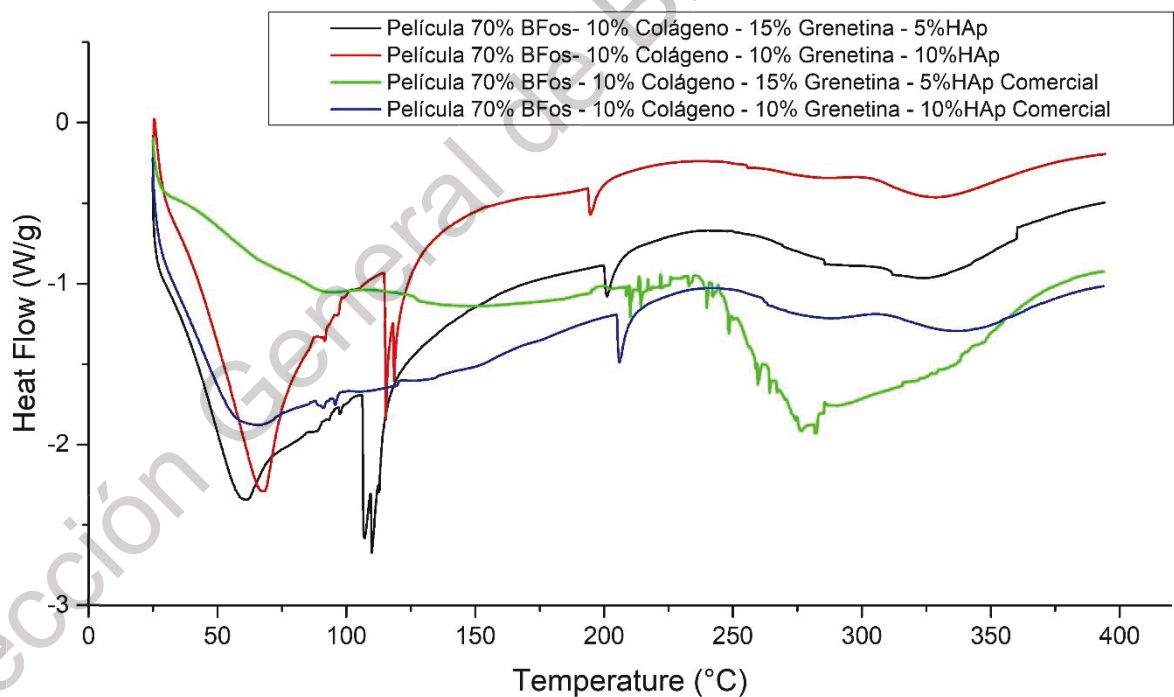


Figura 13. Análisis DSC de película con 5% en peso de HAp; película con 10% en peso de HAp; película con 10% en peso de HAp comercial; película con 5% en peso de HAp comercial.

Es importante mencionar que las películas elaboradas con HAp comercial presentan características físicas diferentes a las sintetizadas con la HAp altamente cristalina. Las que contienen HAp comercial mostraron ser considerablemente más difíciles de manipular al momento de despegarlas de la caja de Petri, son más suaves y tienden a romperse. Además, no presentan la misma flexibilidad que sus contrapartes de HAp altamente cristalina. Después de mantenerlas en refrigeración, las películas de HAp comercial se tornan menos flexibles.

8.6 Espectroscopía Infrarroja con Transformada de Fourier (FTIR)

La espectroscopía infrarroja se basa en la interacción de una onda electromagnética con un analito, esta onda electromagnética tiene una longitud de onda en el intervalo infrarrojo. La materia a analizar absorbe la energía aportada por las ondas, esto resulta en un cambio en la frecuencia de vibración de los enlaces de las moléculas que conforman a la muestra. Las moléculas absorberán la energía del haz de luz infrarroja cuando dicha energía incidente sea igual a la necesaria para que se provoque una transición vibracional en alguno de los enlaces de la molécula. Esta absorción de energía se traducirá en un salto en su frecuencia de vibración, la cual está cuantizada, dando como resultado una variación en la distancia de enlace, así, los átomos vibran a una distancia promedio mayor a la distancia común del enlace. Se dice entonces que el enlace ha pasado a otro estado energético que está cuantizado, conocido como estado excitado (Alanis Gómez, 2018).

De este análisis se obtiene un espectro, en donde se grafican los números de onda y la intensidad de las señales, la posición de las señales está asociada a los grupos funcionales o enlaces presentes en el material analizado.

Las interacciones químicas se determinan a través de la amplitud y la posición de las bandas de los grupos funcionales presentes en el analito, cuando existen varias interacciones químicas, la señal resultante es amplia o está desplazada, ya sea a la izquierda o a la derecha, del lugar donde comúnmente se

encuentra la banda de dicho grupo funcional. Si hay pocas interacciones, la señal se mostrará esbelta y en su posición normal dentro del espectro. La intensidad de la señal está relacionada de forma directamente proporcional con la concentración del grupo funcional observado.

Para este análisis se utilizó un espectrofotómetro PerkinElmer, Spectrum 100 FT-IR. El análisis se realizó colocando las muestras y/o películas directamente sobre el detector, presionando el polvo o la película siempre con la misma fuerza y sobre la misma área para evitar variaciones por concentración en las señales. La limpieza entre muestras se llevó a cabo con alcohol etílico.

Se analizaron muestras de la HAp hexagonal altamente cristalina, de colágeno, de grenetina y de las películas compuestas sintetizadas tanto con la HAp hexagonal de alta cristalinidad, así como con la HAp comercial.

En la Figura 14 se observa un modelo de la estructura química del colágeno, mostrando sus grupos funcionales.

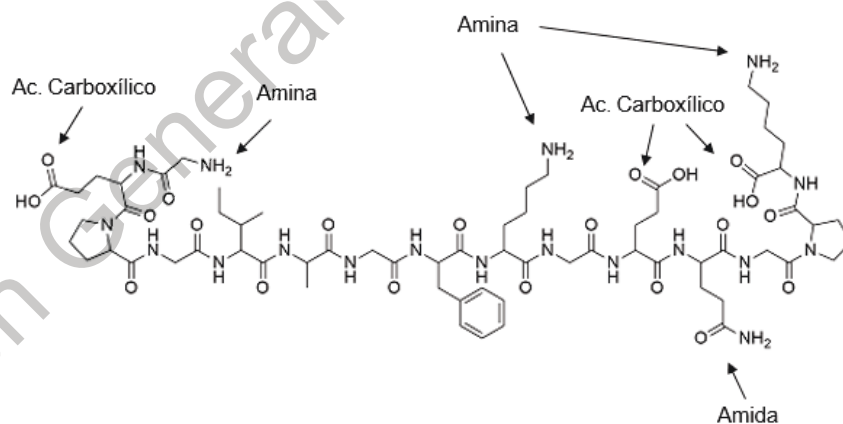


Figura 14. Estructura química del colágeno.

En la Figura 15 se pueden observar las bandas correspondientes a las diferentes amidas presentes en el colágeno 3279 cm⁻¹ (Amida A), 3078 cm⁻¹ (Amida B), 1633 cm⁻¹ (Amida I) y 1538 cm⁻¹ (Amida II). Destacan las señales encontradas

entre 3370 cm^{-1} y 3200 cm^{-1} correspondientes a los estiramientos del grupo NH_2 de las amidas primarias (Elsevier, 2018), así como la señal a 1633 cm^{-1} correspondiente a una amida I provocada por el grupo carbonilo de las amidas y la vibración del grupo NH_2 (Doyle, Bendit, & Blout, 1975). El estiramiento del enlace $\text{C} - \text{N}$ de las amidas se encuentra cerca de los 1410 cm^{-1} (Elsevier, 2018), esta señal observa en la muestra de colágeno con un leve desplazamiento, encontrándose en 1399 cm^{-1} .

También se puede observar evidencia de la presencia del grupo carboxilo en forma de la señal a 1446 cm^{-1} la cual representa la vibración $\text{C} - \text{OH}$ del ácido carboxílico presente en el colágeno (Elsevier, 2018). Así mismo la banda a 2980 cm^{-1} puede ser indicadora de ácido carboxílico.

Los grupos amino muestran una señal débil en los espectros FTIR en un rango muy cercano a los números de onda del grupo amida, por lo que no se alcanzan a percibir sus bandas.

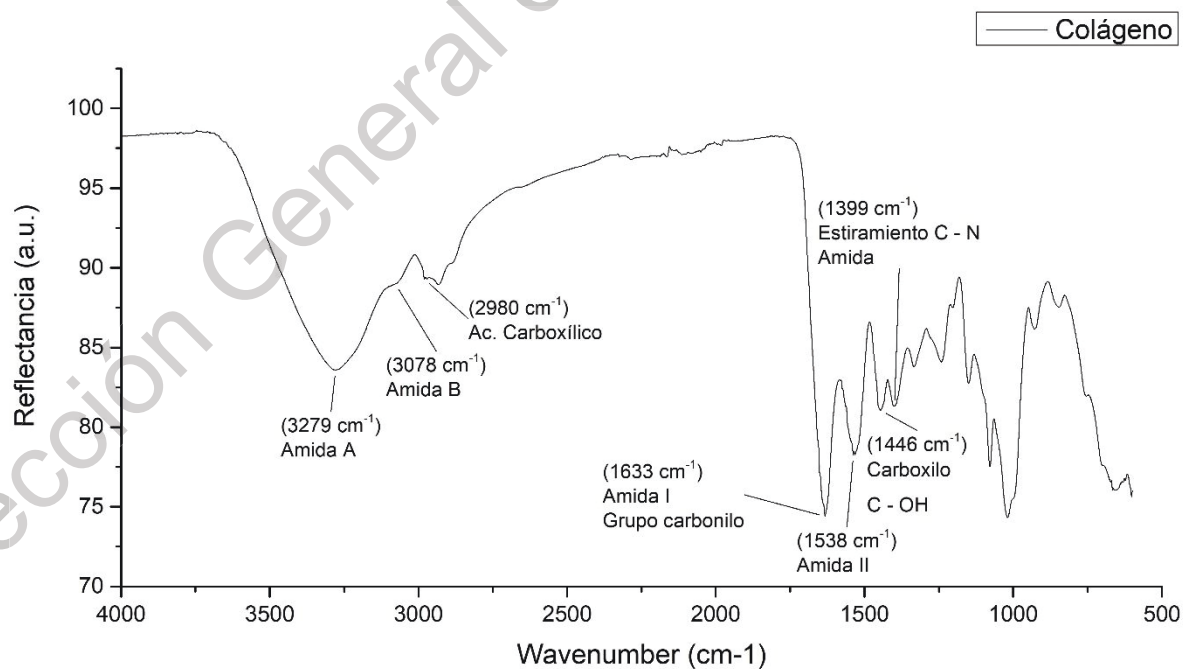


Figura 15. Espectro FTIR del colágeno

En la Figura 16 se observa un modelo de la estructura química de la grenetina, mostrando sus grupos funcionales.

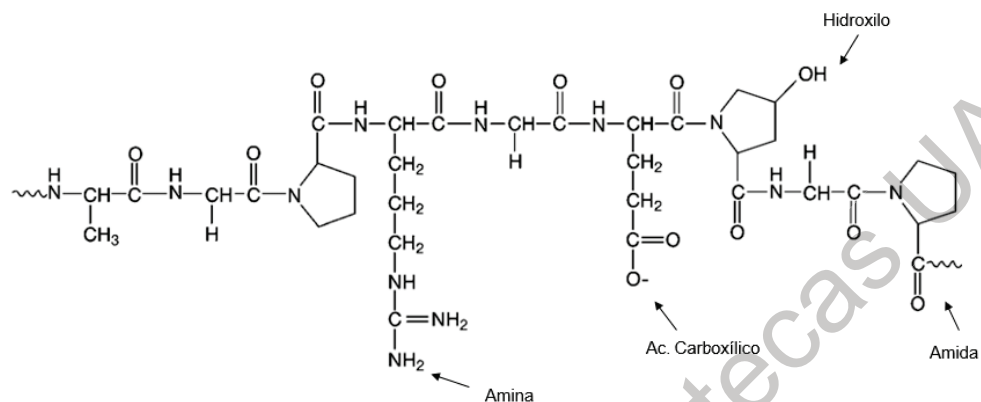


Figura 16. Estructura química de la grenetina (Kommareddy, Shenoy, & Amiji, 2007).

En la Figura 17 se observa el espectro FTIR de la grenetina, es parecido al del colágeno, ya que la grenetina es un derivado parcialmente hidrolizado del colágeno. Se observan las mismas señales prácticamente a los mismos números de onda debido a las similitudes entre ambas moléculas. Se puede observar un cambio en intensidad en las bandas del grupo Amida A en 3279 cm^{-1} siendo menos intensa la señal del espectro de la grenetina. Esto indica un cambio en la concentración de amidas tipo A probablemente a causa de la polimerización de la molécula donde las amidas A pierden un hidrógeno.

Así mismo, la banda de ácido carboxílico (2980 cm^{-1}), aunque se presenta más definida, es menos intensa en el espectro de la grenetina. Esto se debe probablemente a que la molécula de grenetina presenta un solo grupo carboxilo libre en su cadena a diferencia de los tres que se encuentran en la molécula de colágeno.

No es posible observar la banda de los grupos OH de la grenetina debido a que su posición en el espectro (3500 cm^{-1}) se traslapa con las señales del grupo amida, el cual es más intenso que el del grupo OH. Aunque es posible observar una ligera curvatura en las bandas a los 3500 cm^{-1} .

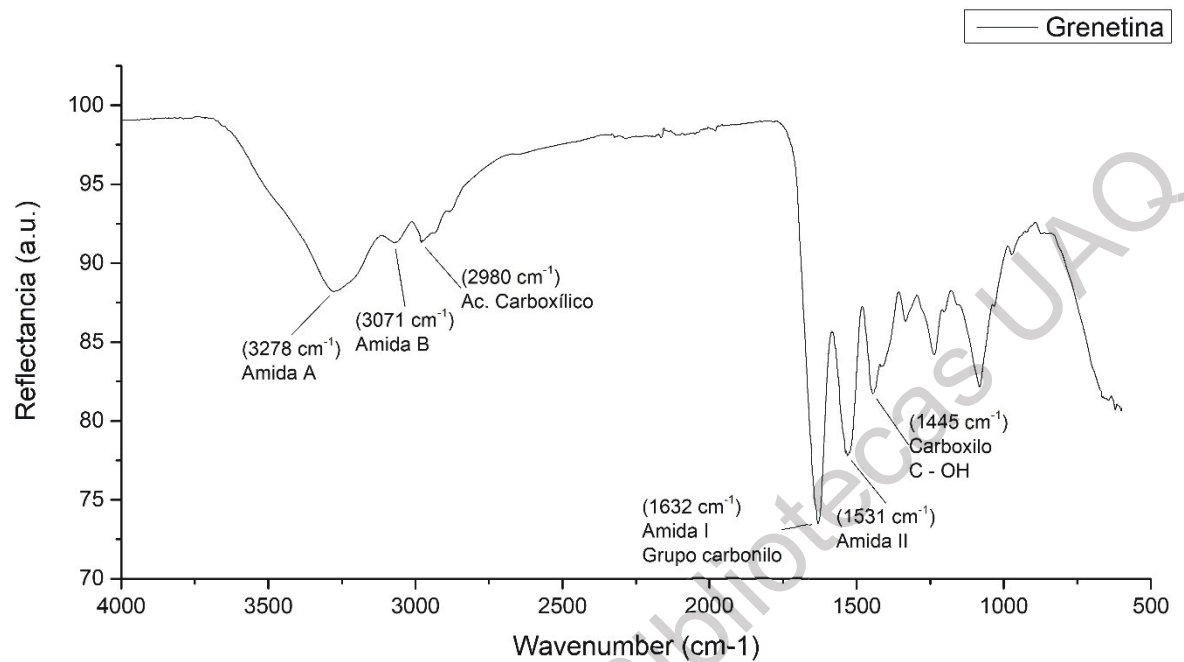


Figura 17. Espectro FTIR de la grenetina

En la Figura 18 se observa un modelo de la celda unitaria de la hidroxiapatita hexagonal, mostrando sus grupos funcionales.

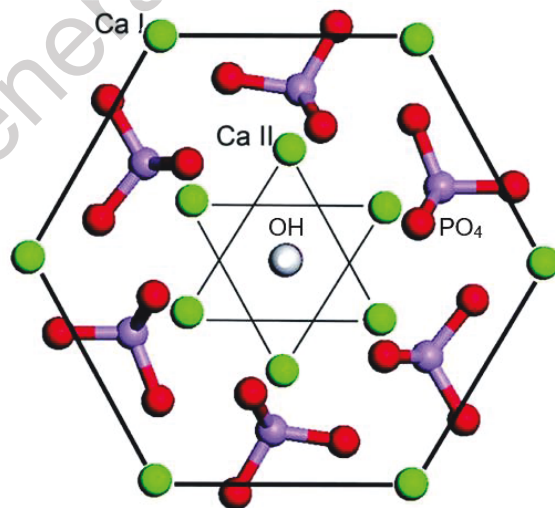


Figura 18. Vista transversal de la celda unitaria de la HAp hexagonal (Uskoković, 2015).

En la Figura 19 se puede observar el espectro FTIR de la HAp hexagonal altamente cristalina. En este espectro se destacan la banda a 3570 cm^{-1} correspondiente a los grupos OH y las señales a 1087 cm^{-1} y 1021 cm^{-1} que indican la deformación de los grupos fosfato (PO_4).

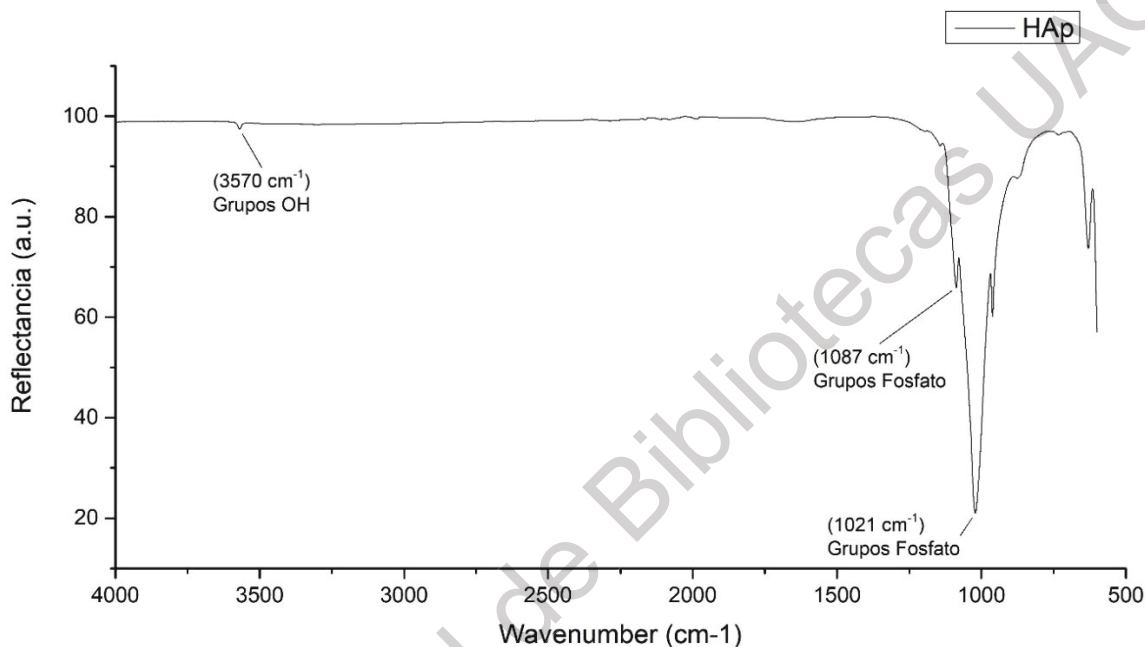


Figura 19. Espectro FTIR de la HAp hexagonal altamente cristalina

La Figura 20 muestra el espectro de los materiales utilizados, así como los espectros de las películas compuestas. Se traslapan las bandas entre 1000 y 1100 cm^{-1} modificando levemente la intensidad de las señales en las películas de material compuesto en función de la concentración de HAp.

Los cambios más relevantes se observan en las bandas localizadas alrededor de los 3300 cm^{-1} correspondientes al grupo amida y entre 1530 y 1540 cm^{-1} también del grupo amida. Se puede observar en ambos casos un desplazamiento de las señales, esto es indicativo de una interacción química del grupo amida de los biopolímeros, posiblemente con el calcio tipo I de la hidroxiapatita. Es importante resaltar que el desplazamiento observado en las bandas localizadas entre 1530 y 1540 cm^{-1} sólo se presenta en las películas compuestas sintetizadas con hidroxiapatita hexagonal altamente cristalina. Muy

probablemente el crecimiento cristalino preferencial de esta HAp y su morfología de fibra sean las causantes de este comportamiento. Los calcio tipo I se localizan en la superficie de las nanofibras, lo que facilita su interacción química con los grupos amida del biopolímero, a diferencia de los polvos en donde estos mismos iones de calcio no son tan superficiales. El calcio puede estar formando un enlace coordinado con pares de electrones libres, del nitrógeno o del oxígeno, en las amidas.

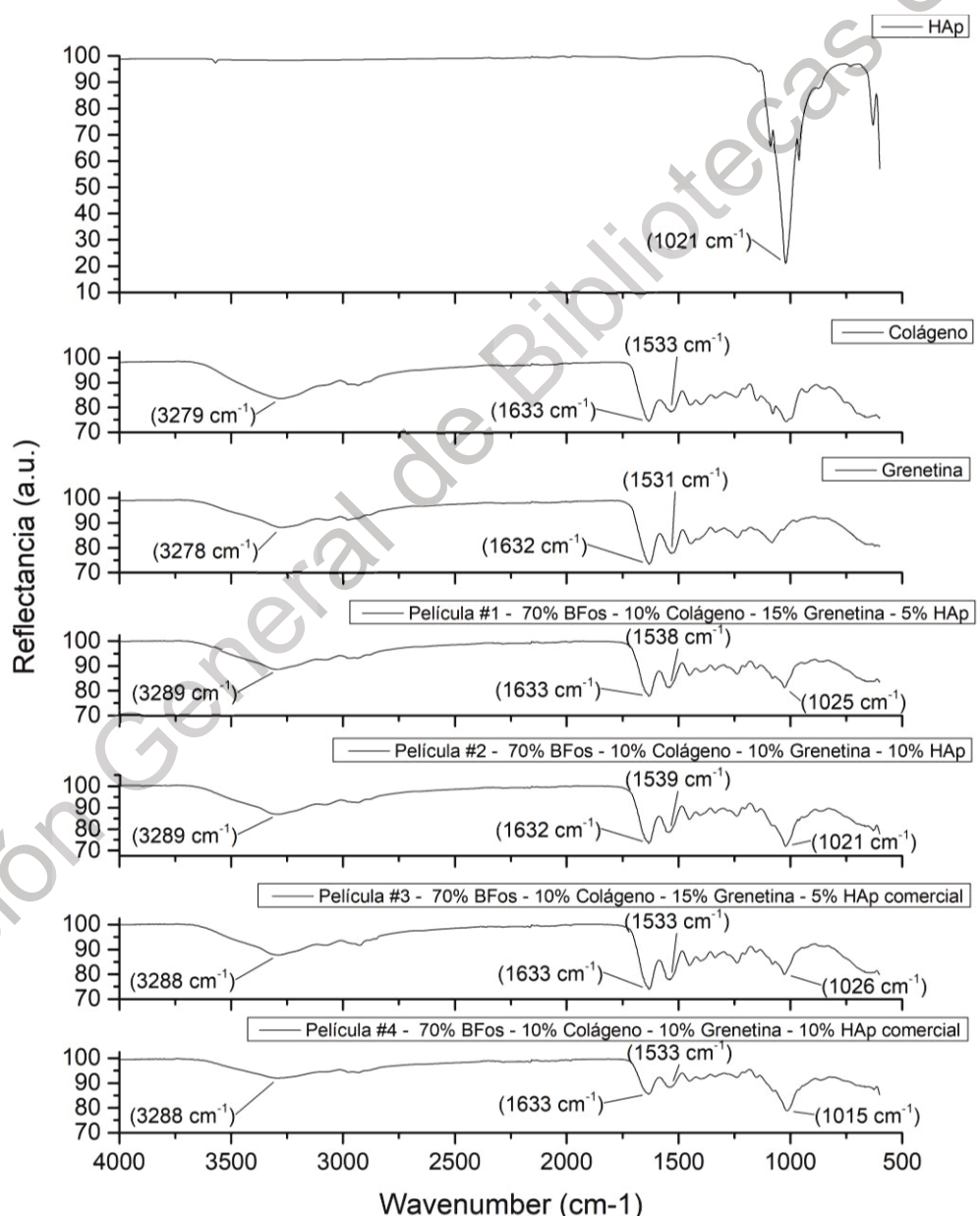


Figura 20. Espectro FTIR del Colágeno, Grenetina, HAp y películas compuestas.

La HAp comercial, al no contar con este crecimiento preferencial, tiene muy pocos átomos de calcio expuestos en la superficie para poder interactuar con los biopolímeros. Esto deja en evidencia una ventaja muy clara de las nanofibras de hidroxiapatita hexagonal altamente cristalina desarrollada por el grupo de trabajo.

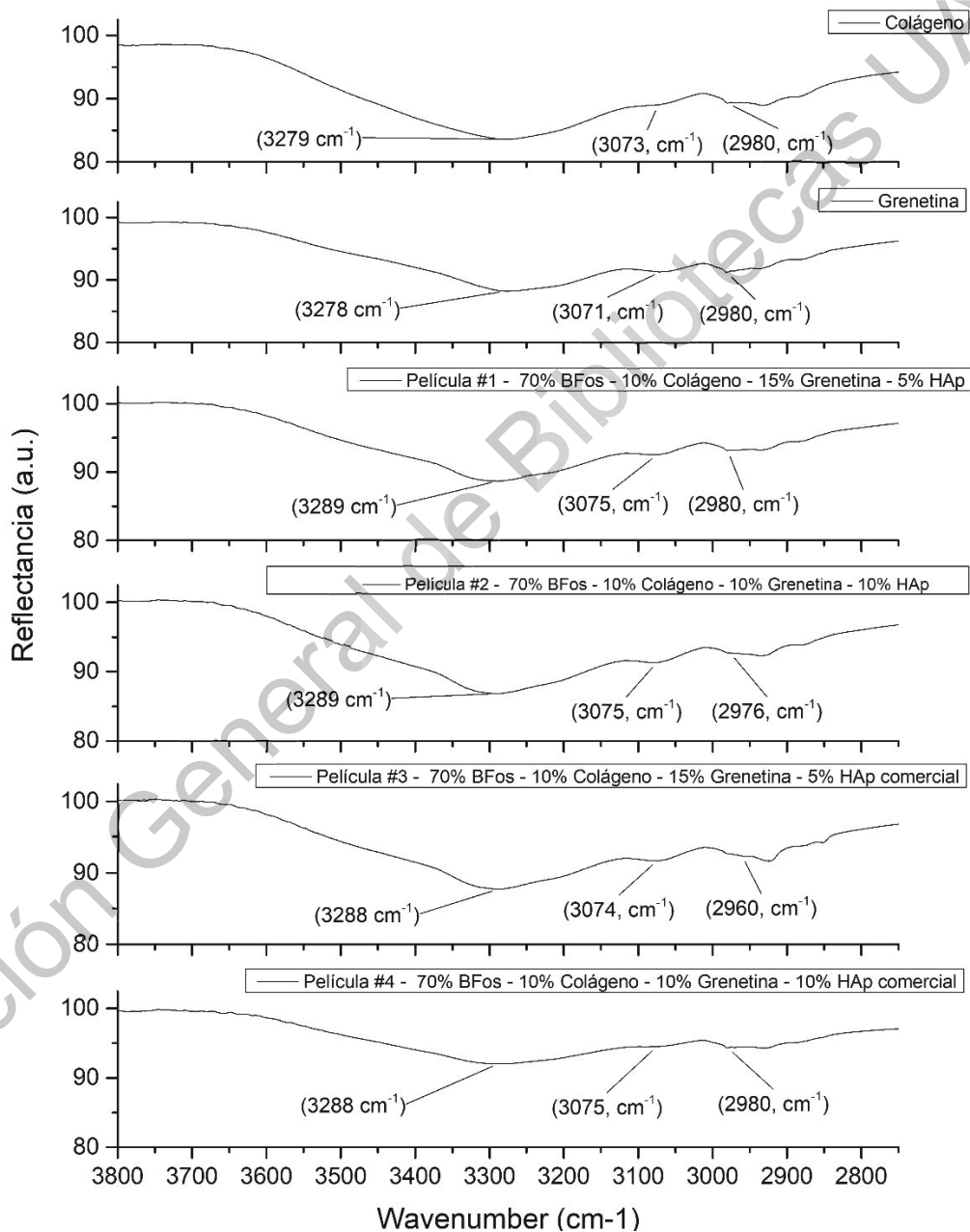


Figura 21. Acercamiento del espectro FTIR entre 3800 y 2750 cm⁻¹ para el colágeno, la grenetina y las películas compuestas.

Para poder observar más claramente los desplazamientos en las bandas del espectro, la Figura 21 muestra un acercamiento en la zona entre 3800 cm^{-1} y 2750 cm^{-1} . En esta imagen, además de observar el desplazamiento antes mencionado de la señal cerca de los 3300 cm^{-1} , se pueden observar cambios en las señales correspondientes al grupo amida B ($\approx 3070\text{ cm}^{-1}$) y al ácido carboxílico ($\approx 2980\text{ cm}^{-1}$). El grupo amida muestra un ligero desplazamiento mientras que la banda del ácido carboxílico no presenta alteraciones significativas, excepto en la película con 5 wt. % de HAp comercial, probablemente causa de la combinación de señales.

Como complemento a la imagen anterior, la Figura 22 muestra un acercamiento en la zona entre 1800 cm^{-1} y 750 cm^{-1} . En esta imagen, además de observar el desplazamiento indicado anteriormente de la señal entre 1530 y 1540 cm^{-1} del grupo amida, se pueden observar cambios en la señal correspondiente al grupo carboxilo (entre 1440 y 1455 cm^{-1}). Nuevamente se muestra un desplazamiento de las bandas, lo que indica una interacción química entre los componentes del material compuesto, de nuevo, es probable que la interacción se dé con los átomos de calcio tipo I en la superficie de la HAp.

Las señales alrededor de los 1020 cm^{-1} correspondientes al grupo fosfato de la Hidroxiapatita y al benceno del colágeno y las que se encuentran cerca de los 1080 cm^{-1} correspondientes a los pirroles de la grenetina se traslapan dificultando la interpretación de las bandas. Se observa un desplazamiento en los números de onda, pero es difícil saber si es por la combinación de las bandas o por una interacción química entre los componentes de la película.

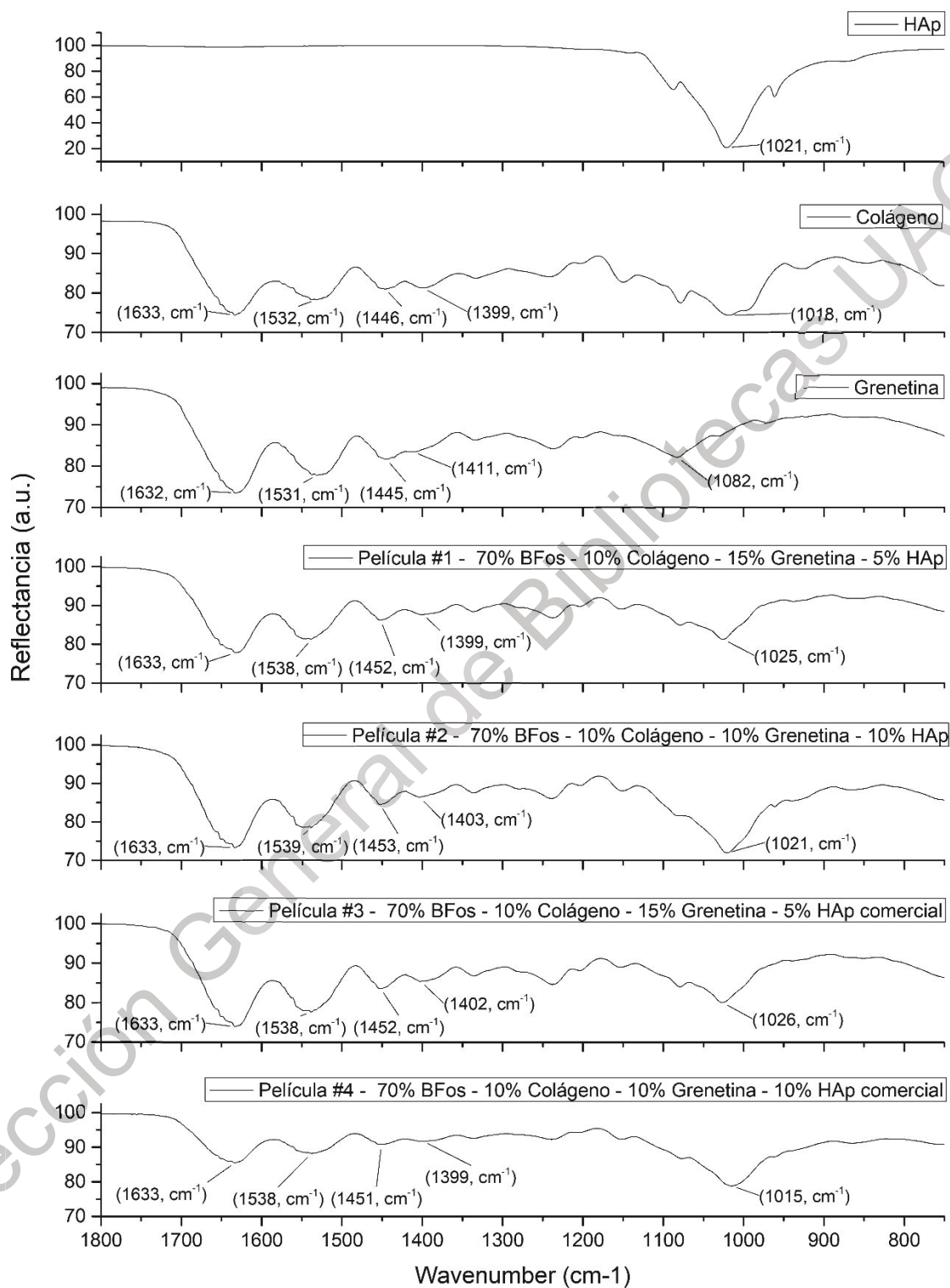


Figura 22. Acercamiento del espectro FTIR entre 1800 y 750 cm⁻¹ para el colágeno, la grenetina y las películas compuestas.

A continuación, en la Tabla 2, se observan las posiciones de las bandas de los diferentes grupos funcionales presentes en los materiales analizados.

Tabla 2. Frecuencias a las que se encuentran las bandas de distintos grupos funcionales dentro de los materiales compuestos sintetizados.

Muestra / Grupo funcional	Grupos OH	Amida A	Amida B	Ácido Carboxílico	Amida I	Amida II
Colágeno	-	3279	3073	2980	1633	1538
Grenetina	-	3278	3071	2980	1632	1531
HAp Hex	3570	-	-	-	-	-
HAp Hex 5%	-	3289	3075	2980	1633	1538
HAp Hex 10%	-	3289	3075	2976	1633	1539
HAp Com 5%	-	3288	3074	2960	1633	1538
HAp Com 10%	-	3288	3075	2980	1633	1538

Muestra / Grupo funcional	Carboxilo (C-OH)	Amida (C-N)	Fosfato	Pirrol	Fosfato	Benceno
Colágeno	1446	1399	-	-	-	1018
Grenetina	1445	1411	-	1082	-	-
HAp Hex	-	-	1087	-	1021	-
HAp Hex 5%	1452	1399	-	-	1025	-
HAp Hex 10%	1453	1403	-	-	1021	-
HAp Com 5%	1452	1402	-	-	1026	-
HAp Com 10%	1451	1399	-	-	1015	-

La Figura 23 muestra la forma en que pueden estar interactuando la fase orgánica e inorgánica del material compuesto sintetizado.

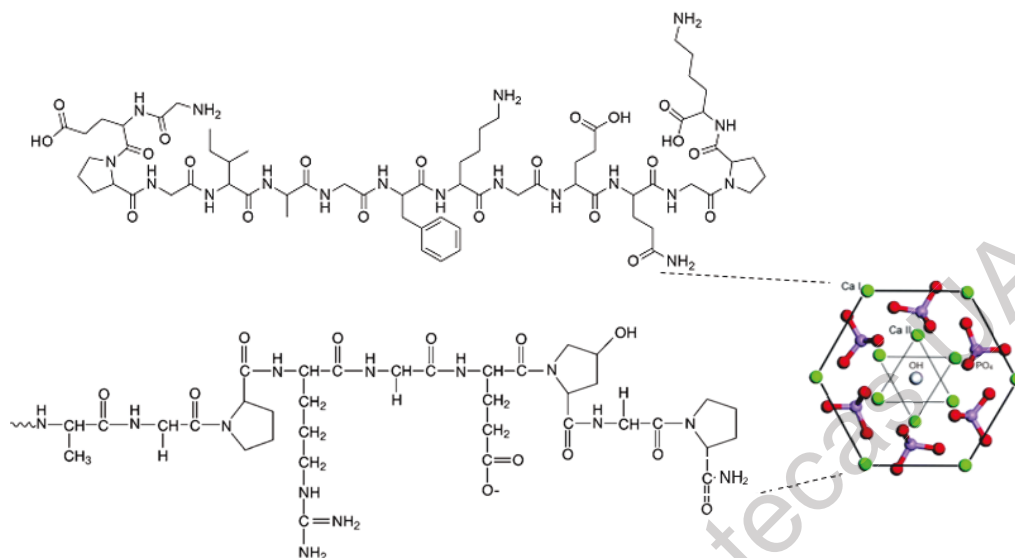


Figura 23. Posible interacción entre los átomos superficiales de la HAp hexagonal y los grupos amida del colágeno y la grenetina.

8.7 Microscopía Electrónica de Barrido (SEM)

El microscopio electrónico de barrido (SEM) funciona al emitir un haz de electrones, ya sea por acción termo-iónica o por el efecto de un campo eléctrico muy fuerte. El haz de electrones es emitido y pasa a través de lentes electromagnéticas condensadoras, donde es enfocado. El haz oscila produciendo un barrido sobre la superficie del analito donde la interacción entre el haz de electrones y la muestra generan electrones secundarios, electrones retrodispersados, electrones Auger, rayos X característicos, electrones elásticamente dispersados, electrones inelásticamente dispersados y fotones con diferentes energías. Los electrones secundarios y retrodispersados son recolectados por un detector de electrones y son utilizados para formar una imagen del objeto a analizar. Si el número de electrones que alcanzan la muestra no es igual al número de electrones que se separan de ella, entonces el analito acumulará una carga. Este fenómeno de carga afecta la calidad de la imagen de forma negativa. Para evitar la carga de la muestra, algunos de los analitos son cubiertos

por una capa muy delgada de metal (Alanis Gómez, 2018; Jokerst, Donley, Cahoon, & Jones, 2017).

Para el análisis en SEM, las películas compuestas nanoestructuradas fueron fijadas en un portamuestras cilíndrico metálico utilizando cinta de carbón, el portamuestras fue limpiado y pulido previamente para evitar la contaminación del analito. El análisis fue llevado a cabo utilizando un microscopio electrónico de barrido marca JEOL modelo JSM-6060LV, empleando un voltaje de aceleración de 15 kV y las imágenes se construyeron utilizando electrones secundarios.

La Figura 24 muestra la micrografía de una de las películas elaboradas únicamente de colágeno / grenetina. Se puede observar una superficie homogénea e irregular, ya que los biopolímeros no generan superficies lisas.

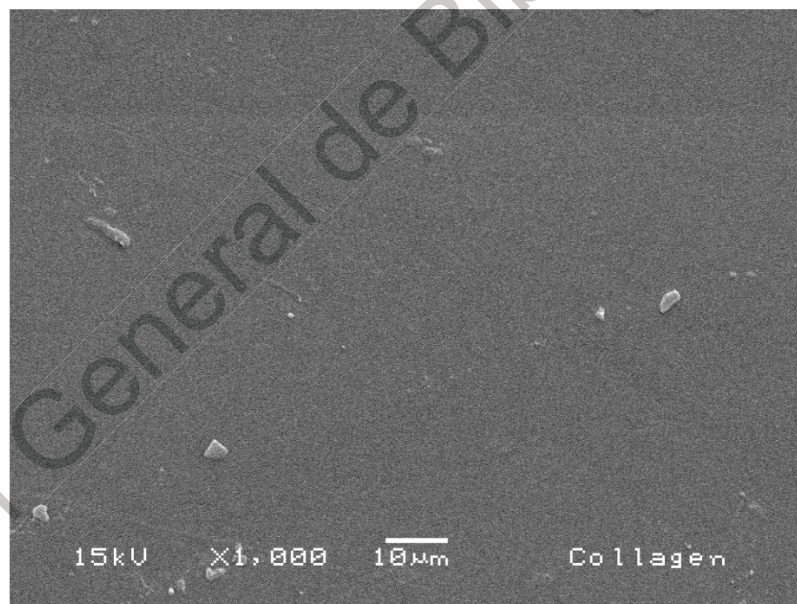


Figura 24. Micrografía SEM de las películas de colágeno / grenetina.

En la Figura 25 se puede observar la superficie de una de las películas compuestas nanoestructuradas, en este caso con 5 wt. % de HAp comercial. Se pueden observar, encerradas dentro de círculos, las partículas de HAp comercial distribuidas en la superficie de la película, además de abultamientos en la superficie

del material que indican la presencia de más de estas estructuras, marcados con flechas. Se puede suponer que los abultamientos representan la presencia de partículas de HAp al no encontrarse los mismos en las micrografías de la película de colágeno / gnetina.

Se observa una dispersión homogénea, lograda gracias al uso del sonotrodo. También se aprecia un recubrimiento muy bueno de las partículas por parte de los biopolímeros y una buena adherencia entre fases, que probablemente afecte de manera positiva la resistencia mecánica del material.

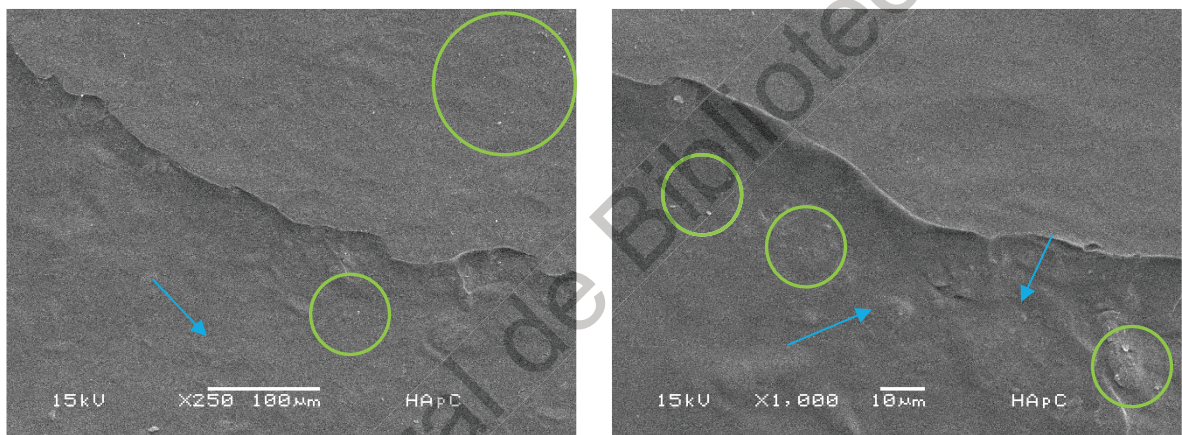


Figura 25. Micrografía SEM de las películas de 5 wt. % de HAp comercial.

En el caso de las películas con 10 wt. % de contenido de HAp comercial, la distribución homogénea de las partículas, así como su presencia, es mucho más notable. Las micrografías para estas películas pueden ser observadas en la Figura 26. En las imágenes se aprecia una mejor dispersión de las partículas de hidroxiapatita comercial y se pueden distinguir mejor los abultamientos causados por estas mismas partículas. Se sobresaltan las partículas de la superficie menos evidentes con círculos y los abultamientos con flechas.



Figura 26. Micrografía SEM de las películas de 10 wt. % de HAp comercial.

Las micrografías de las películas con 5 wt. % de HAp hexagonal altamente cristalina pueden ser observadas en la Figura 27. Dado que en estas imágenes son menos notorias las nanofibras de HAp, estas fueron marcadas con una flecha para facilitar su localización, algunas de las nanofibras sólo se pueden apreciar como abultamientos en la superficie de la película. Aun así, se observa una muy buena integración y adherencia de las nanofibras al biopolímero, así como un excelente recubrimiento de la HAp.

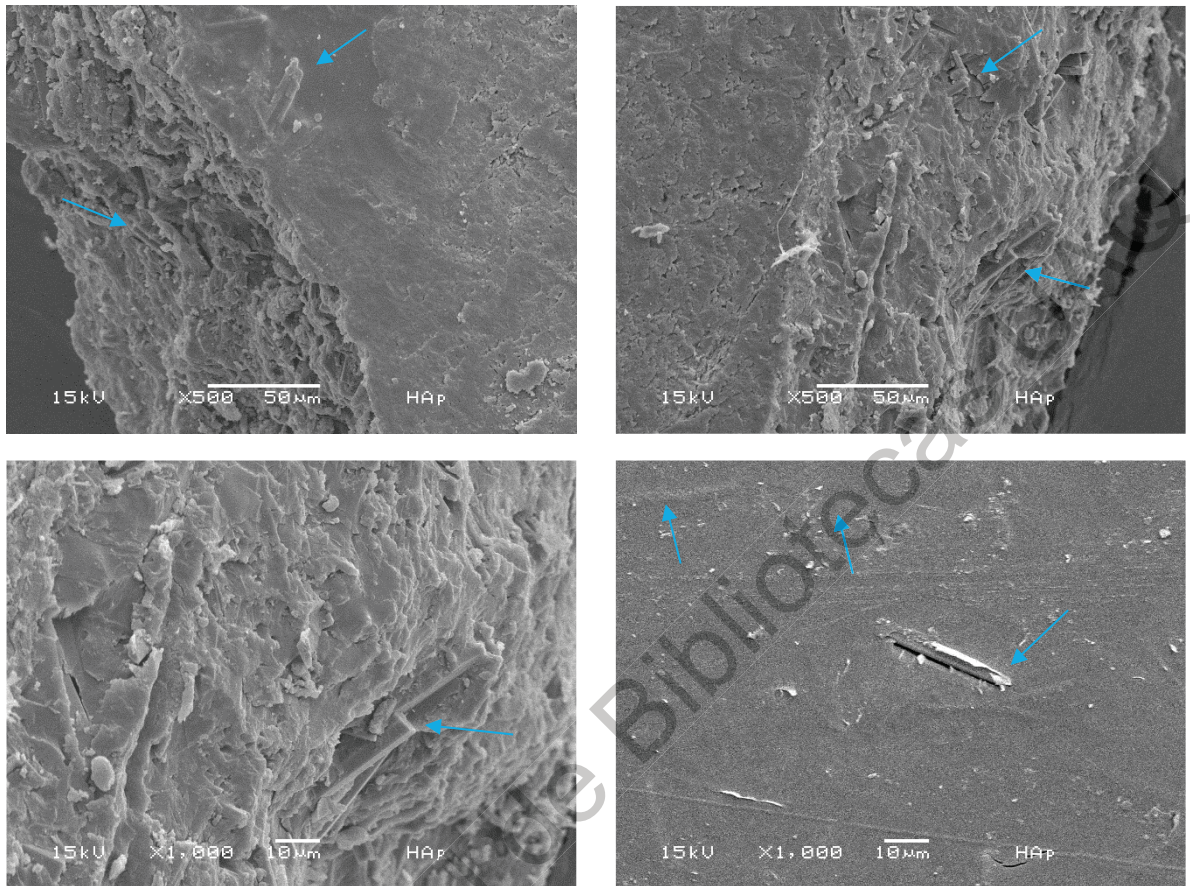


Figura 27. Micrografía SEM de las películas de 5 wt. % de HAp hexagonal altamente cristalina.

La Figura 28 muestra las micrografías de las películas con 10 wt. % de HAp hexagonal altamente cristalina donde se pueden apreciar las fibras completamente embebidas a los biopolímeros, así como su capacidad de conservar su integridad después del proceso de síntesis. Se observa una muy buena dispersión de las nanofibras, así como una distribución bastante homogénea. El recubrimiento por parte de los biopolímeros es muy bueno y las nanofibras aparentan una adherencia muy buena con la fase orgánica.

Una gran parte de las nanofibras se conservaron intactas, sin que se hubiesen fracturado o agrietado debido al tratamiento sónico. Esto es importante debido a que, al conservarse las nanofibras sin rupturas, se incrementa la

posibilidad de que su presencia favorezca el aumento de resistencia mecánica del material compuesto.

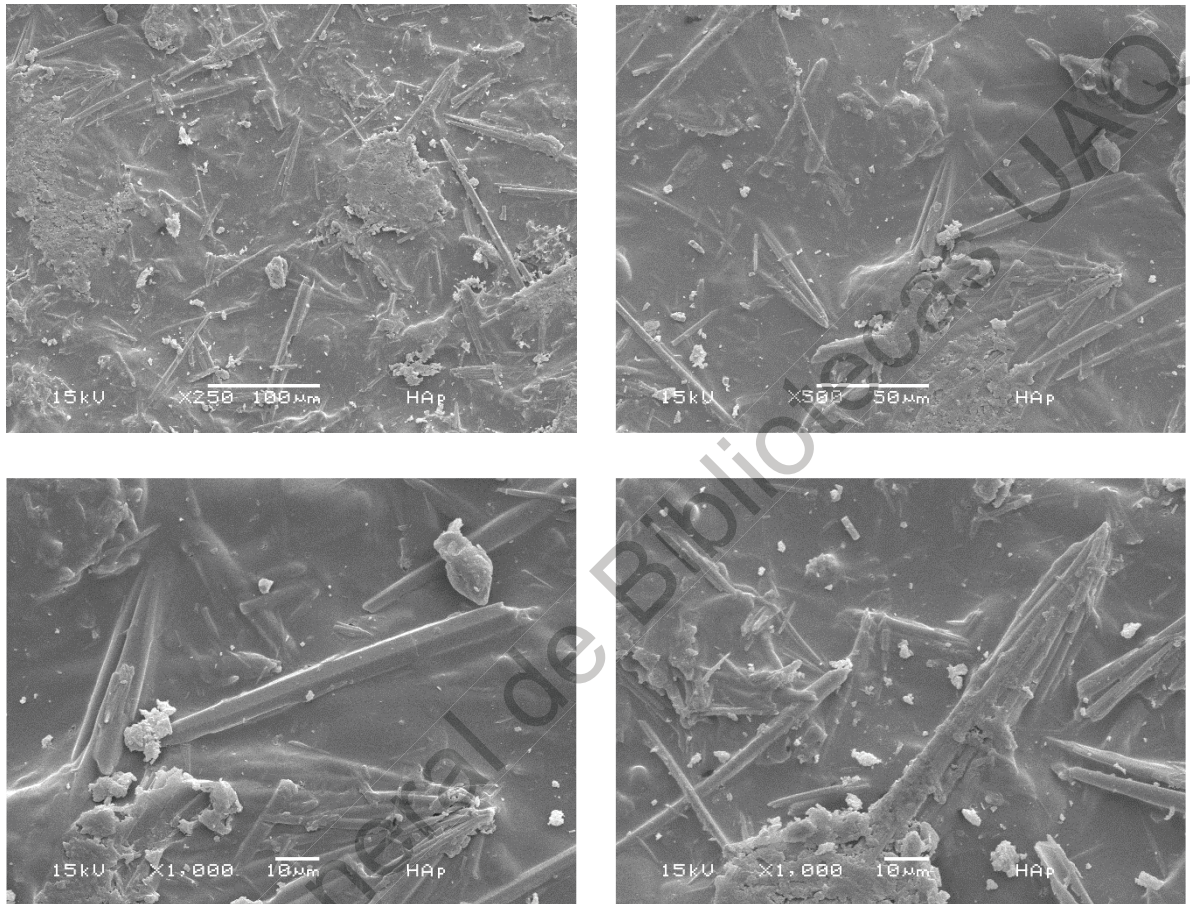


Figura 28. Micrografía SEM de las películas de 10 wt. % de HAp hexagonal altamente cristalina.

En general, se aprecia una buena dispersión de las nanofibras de hidroxiapatita dentro de los biopolímeros, así como una distribución homogénea y una buena adherencia entre fases. Esta adherencia, probablemente producto de la interacción entre grupos amino y el calcio tipo I de la HAp, da sustento a lo previamente discutido en el análisis FTIR sobre las interacciones entre la fase orgánica e inorgánica del material compuesto. Además, se observa que la superficie de las nanofibras de HAp son muy lisas y amplias, dejando expuestos a los iones de calcio, favoreciendo así la interacción química.

Con el fin de confirmar lo observado en el SEM, se obtuvieron también, micrografías combinadas de electrones secundarios y retrodispersados, estas muestran una imagen más profunda de los materiales compuestos sintetizados que la generada por electrones secundarios.

En la Figura 29 se puede observar la superficie de la película con 5 wt. % de HAp comercial. Se observa más claramente la dispersión homogénea de las partículas, así como el recubrimiento de las mismas por el biopolímero.

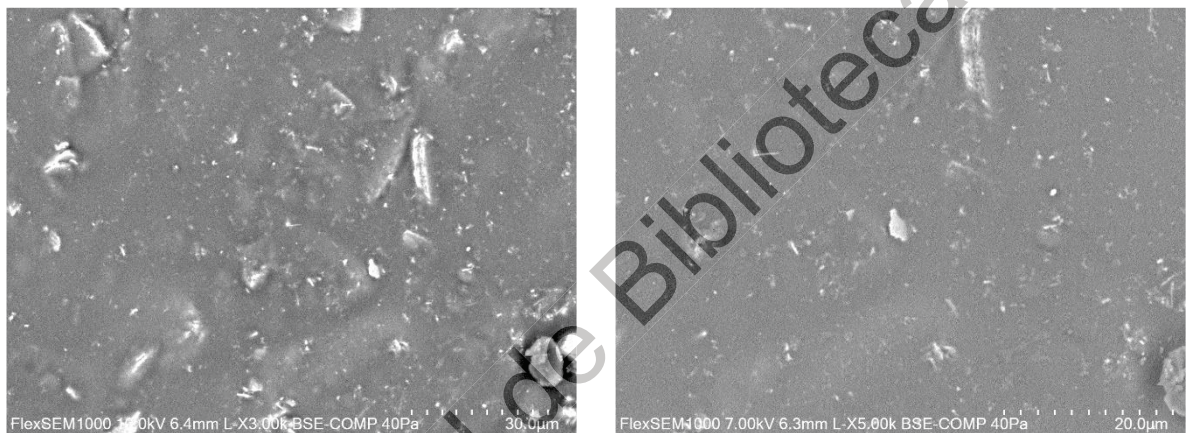


Figura 29. Micrografía SEM combinada de electrones secundarios y retrodispersados de las películas de 5 wt. % de HAp comercial.

Las micrografías combinadas de las películas con 10 wt. % de contenido de HAp comercial se muestran en la Figura 30, la distribución homogénea de las partículas es más evidente, se observan también más partículas de HAp. Se reafirma la buena dispersión de las partículas de hidroxiapatita comercial además de que es más sencillo apreciar los abultamientos causados por estas mismas partículas.

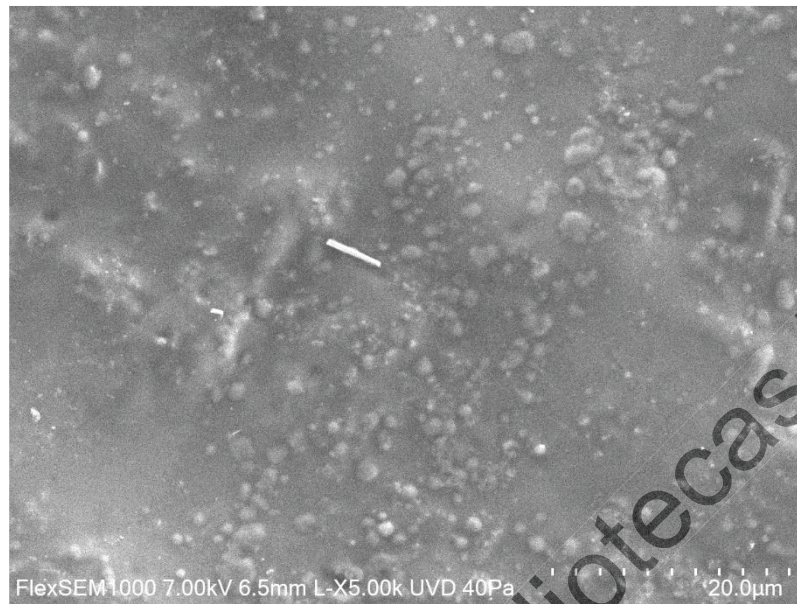


Figura 30. Micrografía SEM combinada de electrones secundarios y retrodispersados de las películas de 10 wt. % de HAp comercial.

La Figura 31 muestra las micrografías combinadas de las películas compuestas con 5 wt. % de HAp hexagonal altamente cristalina.

A diferencia de las micrografías obtenidas a partir de electrones secundarios, ahora es posible observar claramente la presencia y buena dispersión de las nanofibras de HAp. Se observa como es el caso en todas las películas, una distribución homogénea y una muy buena integración de ambas fases, así como una excelente adherencia y recubrimiento de las nanofibras.

Se observa también a detalle una de las fibras de HAp, como esta está embebida en el biopolímero, así como una medida aproximada del ancho de la fibra. La medida de 1.648 μm representa una fibra que está formada por muchas más nanofibras de HAp hexagonal en su interior tal como lo menciona la literatura (Alanís-Gómez et al., 2016; Alanis Gómez, 2018).

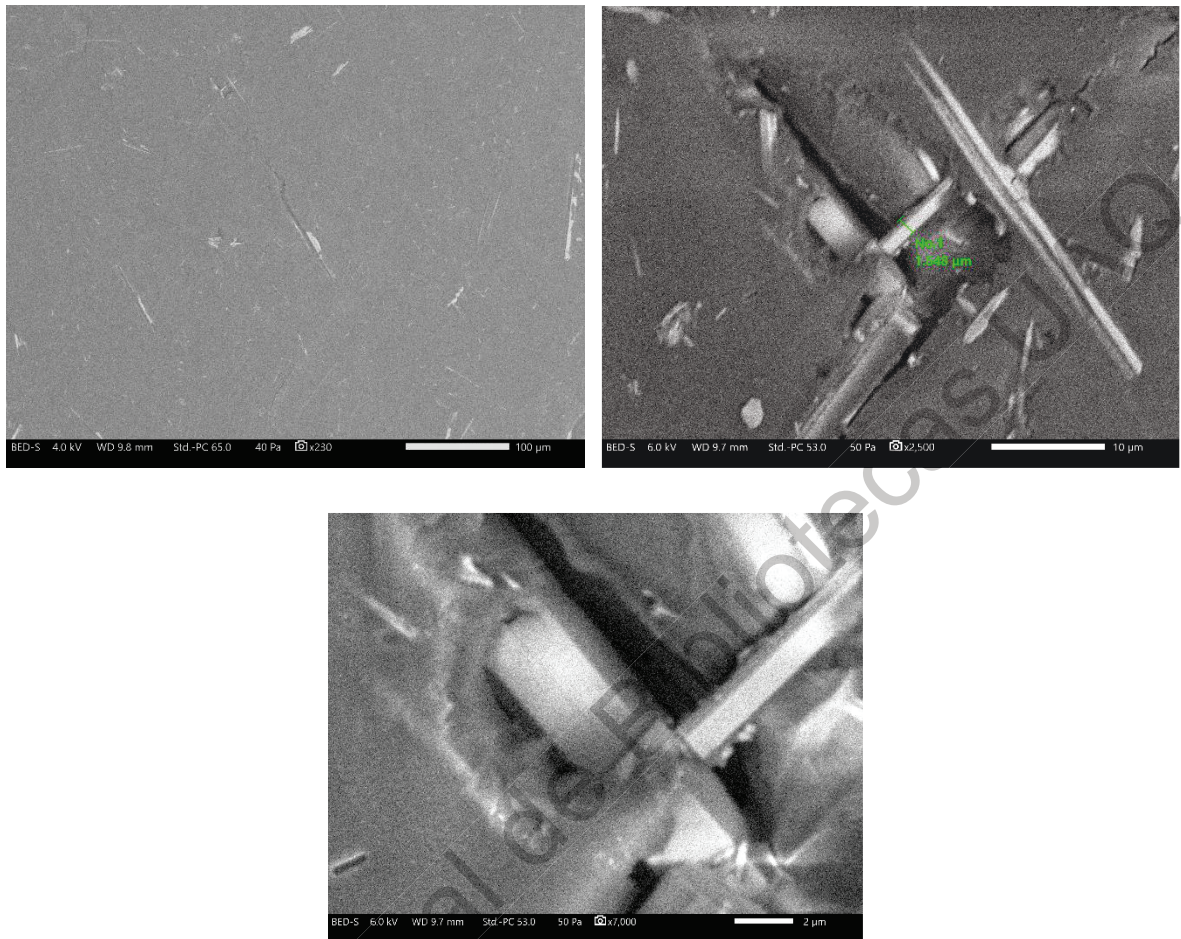


Figura 31. Micrografía SEM combinada de electrones secundarios y retrodispersados de las películas de 5 wt. % de HAp hexagonal altamente cristalina.

Las micrografías combinadas de la Figura 32 muestran a las películas con 10 wt. % de HAp hexagonal altamente cristalina donde se pueden apreciar las nanofibras homogéneamente distribuidas en toda la película, así como el efecto del sonificado en la dispersión de las mismas. Además, existe una buena integración de las fibras en el biopolímero.

Aunque gran parte de las nanofibras se conservaron intactas, se pueden observar fracturas y roturas en algunas de ellas lo que indica que se requieren modificar las variables del tratamiento sónico, probablemente se solucione disminuyendo la amplitud y con ello la energía del tratamiento.

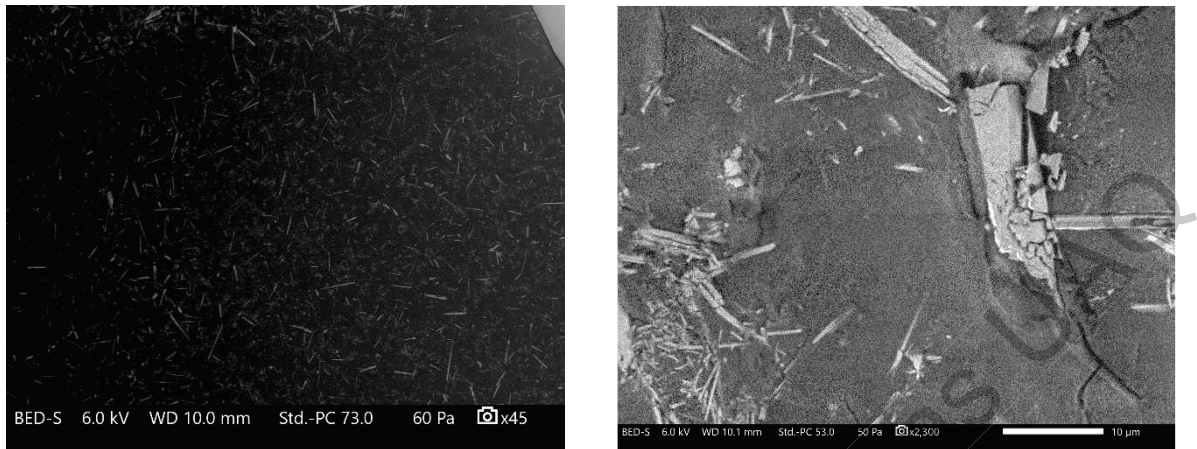


Figura 32. Micrografía SEM combinada de electrones secundarios y retrodispersados de las películas de 10 wt. % de HAp hexagonal altamente cristalina.

Las micrografías combinadas confirman lo encontrado por las micrografías de electrones secundarios. Todas las películas muestran una buena dispersión, una distribución homogénea, así como una buena integración y adherencia entre las fases orgánicas e inorgánicas del material compuesto nanoestructurado.

8.8 Pruebas Mecánicas

Las pruebas mecánicas se basan en ensayos destructivos mediante la aplicación de una fuerza externa la cual somete a los materiales de estudio a esfuerzos cada vez más grandes hasta lograr su deformación y ruptura. Estas pruebas son utilizadas para determinar las propiedades de dureza, elasticidad, fragilidad y plasticidad de los analitos.

En las pruebas de tensión en física e ingeniería, se denomina tensión mecánica a la fuerza por unidad de área en el entorno de un punto material sobre una superficie real o imaginaria de un medio continuo. La definición anterior se aplica tanto a fuerzas localizadas como fuerzas distribuidas, uniformemente o no, que actúan sobre una superficie (Alanis Gómez, 2018).

Para este análisis se utilizó como base la norma ASTM D638 para películas poliméricas delgadas. Las películas fueron sometidas a una carga uniaxial de

tensión continuamente creciente hasta que el material llegó a la falla. Durante toda la prueba, se registraron tanto la carga como el alargamiento resultante de la película por causa de dicha carga. Los ensayos mecánicos fueron realizados en una máquina universal de pruebas mecánicas Zwick / Roell Z005 con una celda de carga de 5 KN y una velocidad de deformación de 1mm / min. Se fabricaron 5 probetas para cada una de las películas compuestas nanoestructuradas analizadas. Las películas fueron cortadas con las medidas establecidas por la norma ASTM D638 como se puede observar en la Figura 33.

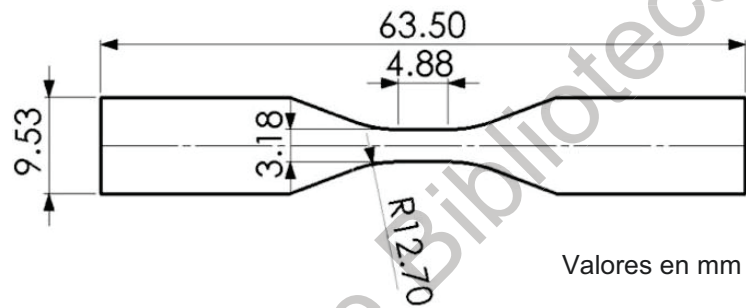


Figura 33. Imagen probeta utilizada con medidas de acuerdo a la norma ASTM D638.

La Figura 34 muestra las gráficas de esfuerzo y deformación obtenidas en las pruebas mecánicas para las películas de colágeno / grenetina y para los materiales compuestos elaborados con HAp comercial. La gráfica para la mezcla colágeno-grenetina mostró un comportamiento de un polímero elastomérico, que es propio de un biopolímero. Al agregar las partículas de HAp comercial, se hace evidente que, aunque aumenta la resistencia del material, también se incrementa su rigidez, con una escasa región plástica. Esto habla de compuestos rígidos, frágiles y quebradizos.

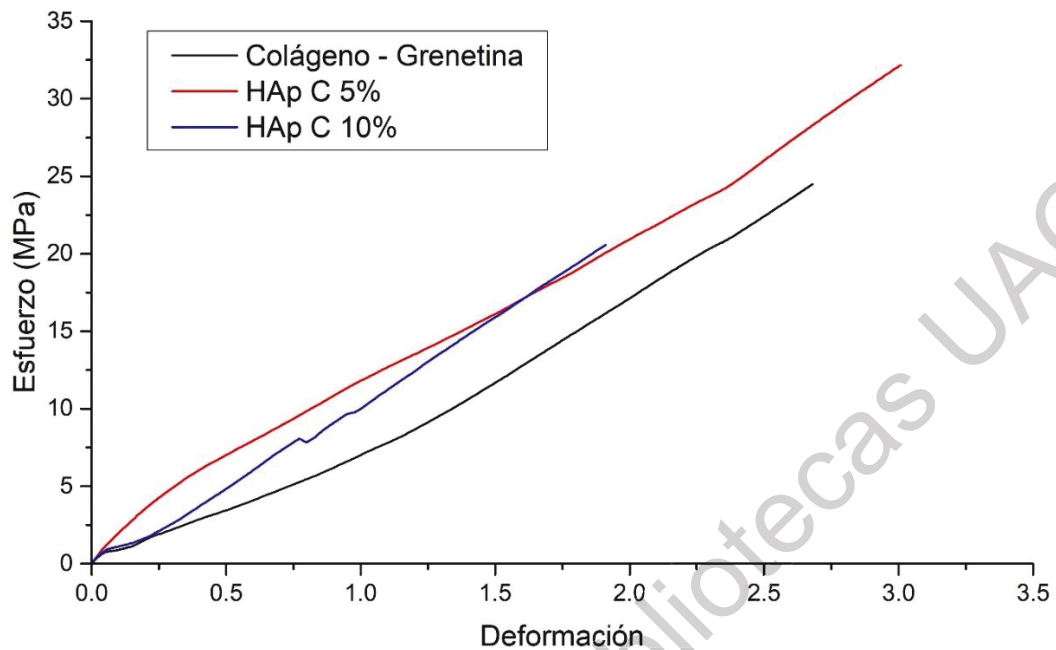


Figura 34. Gráficas de esfuerzo y deformación para películas de colágeno / grenetina y películas compuestas HAp comercial / biopolímero.

La mayor resistencia al esfuerzo se presenta en la película con 5 wt. % de HAp comercial, pero, el aumento en la concentración de hidroxiapatita muestra un deterioro de la resistencia ya el esfuerzo aplicado a la película compuesta con 10 wt. % de HAp comercial es considerablemente menor al momento de la falla. Esto parece indicar una saturación de partículas de HAp comercial en el material, ya que se puede observar una mejora en las propiedades mecánicas de la película con 5 wt. % de hidroxiapatita comercial con respecto a la película de colágeno / grenetina, pero no así con la película con 10 wt. % de HAp comercial.

En el caso de las películas compuestas donde se utilizó la hidroxiapatita hexagonal altamente cristalina, cuyas gráficas se pueden observar en la Figura 35, se puede observar, al menos en la muestra con 5 wt. % de HAp, que se alcanza el límite elástico y presenta una región plástica mucho más extensa típica de un material más deformable, lo que nos habla de un material más flexible. Es notorio un decremento de la resistencia a la tensión de este material con respecto a la

película de colágeno / grenetina, pero se aprecia un incremento en el módulo de Young.

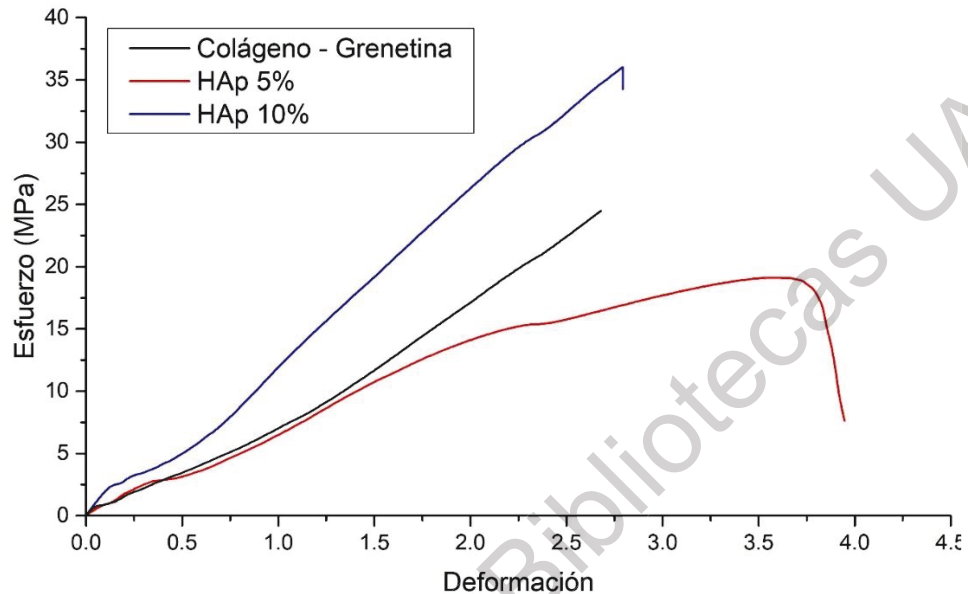


Figura 35. Gráficas de esfuerzo y deformación para películas de colágeno / grenetina y películas compuestas HAp hexagonal / biopolímero.

Al incrementar la concentración de nanofibras de HAp hasta 10 wt. % se observa un comportamiento del material muy similar a la película de colágeno / grenetina, pero con una mejora considerable en cuanto a su resistencia. Por otro lado, la capacidad de deformarse de esta película se vio afectado por la cantidad de HAp. Lo que es normal dado que la HAp es un material cerámico y se comporta como tal.

La Tabla 3 muestra una comparación del módulo de Young y el esfuerzo máximo de todas las películas sintetizadas. Mientras más pequeño es el módulo de elasticidad de Young, mayor elasticidad y, por lo tanto, menos rigidez, posee el material. El esfuerzo máximo nos dice que tan resistente es la muestra a la aplicación de una fuerza, mientras mayor es el número, más resistente es la película.

Tabla 3. Módulo de Young y esfuerzo máximo de las diferentes películas compuestas sintetizadas.

Muestra	Módulo de Young (MPa)	Esfuerzo Máximo (MPa)	Relación Resistencia / Elasticidad
Colágeno – Grenetina	607.28	39.37	0.0648
HAp Comercial 5 %	1221.38	40.43	0.0331
HAp Comercial 10 %	964.52	27.05	0.0280
HAp Hexagonal 5 %	804.59	19.11	0.0237
HAp Hexagonal 10 %	1093.87	33.00	0.0301

El comportamiento frágil de los biopolímeros con la HAp comercial es típico de la inclusión de un material cerámico. Las películas pierden elasticidad y se vuelven más frágiles. Curiosamente se puede observar un incremento en la elasticidad de la película al pasar de una concentración de 5 wt. % de HAp comercial a 10 wt. %, aumenta la elasticidad un 21%. Pero se observa una disminución de la resistencia de un 33%.

Sucede lo contrario al aumentar el porcentaje en peso de la hidroxiapatita hexagonal altamente cristalina. Al pasar de 5 a 10 wt. % la película pierde elasticidad, a razón de un 35.95 %. Al mismo tiempo aumenta su resistencia en un 72.68 %. Es evidente que las nanofibras no vuelven tan rígidas a las películas como lo hacen las partículas de la HAp comercial.

Probablemente la proporción más adecuada es la que contiene una concentración de 10 wt. % de HAp hexagonal, ya que, presenta un buen balance entre resistencia y elasticidad, muy similar al logrado con la concentración de 5 wt. % de HAp comercial. Pero a diferencia de la HAp comercial, parece sugerir que el uso de la hidroxiapatita hexagonal en la creación del material compuesto aumenta considerablemente la resistencia sin afectar tan seriamente la elasticidad.

La diferencia en el comportamiento mecánico de los materiales compuestos al aumentar la concentración de hidroxiapatita, tanto comercial como hexagonal, puede ser atribuido a una mejor interacción química entre las nanofibras de HAp con el biopolímero, debido a su morfología y a su crecimiento preferencial. Esto abre las puertas a una búsqueda de la concentración de HAp adecuada en la que se maximicen tanto elasticidad como resistencia.

Estudios previos reportan la creación de bioandamios cartilaginosos con módulos de Young entre 191.7 y 660 kPa tras ser analizados con una técnica de hendidura por microscopio de fuerza atómica (Onofrillo et al., 2018). Lamentablemente, todas las muestras en este trabajo fueron analizadas mecánicamente después de un proceso de secado con el fin de facilitar los ensayos en la máquina universal disponible. Esto afecta los valores tanto del módulo de Young como del esfuerzo, lo que los hace difícilmente comparables con otros materiales cartilaginosos, pero da camino a un estudio futuro en donde se pueda realizar un análisis mecánico utilizando muestras húmedas tal como se aplicarían en un escenario quirúrgico.

9. Conclusiones

Se obtuvo un material compuesto nanoestructurado hecho a base de hidroxiapatita – biopolímero que se espera pueda ser utilizado posteriormente como un implante de tejido cartilaginoso hialino que favorezca su regeneración. Sus usos comprenderían el área de las ciencias de la salud, en el tratamiento de enfermedades reumáticas crónico-degenerativas como la osteoartritis, tratamiento de lesiones en el área de traumatología y ortopedia, así como en el área de cirugía reconstructiva. El uso de los productos significará una mejora de los tratamientos que buscan devolver la salud a los pacientes que sufren alguna enfermedad o lesión del tejido cartilaginoso.

Se logró la síntesis de nanofibras de HAp hexagonal altamente cristalina y pura, con una orientación cristalina preferencial en la dirección [300]. El tamaño de cristalito de la misma resultó ser del orden de los nanómetros por lo cual posee una resistencia a la deformación aceptable. Es decir, la hidroxiapatita sintetizada cuenta con las características deseables para la síntesis del compuesto HAp – biopolímero. Las matrices de colágeno / gretina sintetizadas establecen el contenido mínimo de gretina en 10% en peso para poder lograr características mecánicas adecuadas que permitan su manipulación, limitando así a la película compuesta HAp – biopolímero a un máximo de 10% en peso de HAp y fijando en 10% en peso la concentración del colágeno para todas las muestras.

La fase inorgánica del compuesto, conformada por la HAp, pudo ser adicionada a la fase orgánica, representada por el colágeno y la gretina, a través de un tratamiento sónico, lo cual permitió una dispersión homogénea de las fibras en la matriz proteica. Las películas compuestas HAp – biopolímero sintetizadas demostraron tener características mecánicas diferentes a las películas que sólo contienen colágeno y gretina. Las películas compuestas mostraron resultados diversos en los análisis TGA y DSC. Por un lado, el análisis TGA mostró que al menos una de las películas compuestas se degrada a un ritmo mucho más lento que sus contrapartes de colágeno / gretina; por otro lado, el análisis DSC mostró

que la matriz de colágeno / gretina absorbe más energía para fundir sus regiones cristalinas, lo que sugiere una mayor cristalinidad y una mejor estabilidad al aumentar la temperatura.

Al comparar las películas compuestas utilizando la HAp sintetizada y la comercial, se observa una ventaja en el caso de la película con concentración de 5% en peso de HAp altamente cristalina. Se puede decir esto ya que, según el análisis TGA, esta se degrada a una razón mucho más lenta que las demás películas y el análisis DSC muestra, para esta misma película, una mayor absorción de energía al momento de fundir sus regiones cristalinas. Esto indica una mayor estabilidad del material al ser sometido a incrementos de temperatura.

Se puede observar a través de los análisis FTIR que existen interacciones químicas entre las fases orgánica e inorgánica. También se puede argumentar que la hidroxiapatita desarrollada por el grupo de trabajo, con su alta cristalinidad, morfología y crecimiento preferencial, favorece estas interacciones, lo que la hace más adecuada para ser utilizada como parte de las películas compuestas ya que estas interacciones están aportando a las propiedades mecánicas del biomaterial compuesto nanoestructurado.

El análisis SEM revela una muy buena dispersión, así como integración, tanto de las partículas como de las nanofibras de HAp. Se observa también una distribución bastante homogénea de la hidroxiapatita en el biopolímero y apoya la evidencia de los espectros FTIR al observarse una buena interacción entre las fases orgánica e inorgánica.

Por último, las pruebas mecánicas muestran resultados interesantes para las películas con 5 wt. % de HAp comercial y 10 wt. % de HAp. Ambas películas muestran un buen balance elasticidad resistencia, característica que se espera del tejido cartilaginoso. También se observa un comportamiento más favorable para las películas elaboradas con hidroxiapatita hexagonal altamente cristalina, debido a su comportamiento al aumentar la concentración de HAp. Estos resultados abren las

puertas para análisis mecánicos futuros en donde se puedan comparar con los esfuerzos realizados por otros grupos de investigación.

Dirección General de Bibliotecas UAQ

10. REFERENCIAS

- Abbott, A. (2003). Biology's new dimension. *Nature*, 424(6951), 870–872. <https://doi.org/10.1038/424870a>
- Adegawa, T., Ohyabu, Y., Uemura, T., Yoshioka, T., Shinozaki, K., & Tanaka, J. (2009). Preparation and Characterization of Porous Scaffolds Consisted of Hydroxyapatite, Polysaccharides and Collagen for Cartilage Tissue Engineering. *Key Engineering Materials - KEY ENG MAT*, 396–398, 707–710.
- Aesar Alfa, . (2018). 44273 Potassium hydroxide, 99.98% (metals basis), 85% min.
- Aigner, T., Haag, J., Martin, J., & Buckwalter, J. (2007). Osteoarthritis: Aging of Matrix and Cells - Going for a Remedy. *Current Drug Targets*, 8(2), 325–331. <https://doi.org/doi:10.2174/138945007779940070>
- Alanís-Gómez, J. R., Rivera-Muñoz, E. M., Cervantes-Medina, J. S., Almanza-Reyes, H., Nava-Mendoza, R., Cortes-Romero, C., & Velázquez-Castillo, R. (2016). Synthesis of Micro and Nano-Sized Hydroxyapatite Fibers Through the Microwave Assisted Hydrothermal Method. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 16(7), 7557–7566. <https://doi.org/10.1166/jnn.2016.12829>
- Alanis Gómez, R. P. (2018). *Elaboración de un material compuesto Quitosano-HAp con aplicaciones potenciales en la regeneración de tejido óseo*. Universidad Autónoma de Queretaro.
- Alonso-Sierra, S., Velázquez-Castillo, R., Millán-Malo, B., Nava, R., Bucio, L., Manzano-Ramírez, A., ... Rivera-Muñoz, E. M. (2017). Interconnected porosity analysis by 3D X-ray microtomography and mechanical behavior of biomimetic organic-inorganic composite materials. *Materials Science and Engineering C*, 80, 45–53. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2017.05.106>
- Babaei, Z., Jahanshahi, M., & Rabiee, S. M. (2013). The fabrication of nanocomposites via calcium phosphate formation on gelatin–chitosan network and the gelatin influence on the properties of biphasic composites. *Materials Science and Engineering: C*, 33(1), 370–375. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.msec.2012.08.053>
- Barnes, P., Jacques, S., & Vickers, M. (2006). Determination of Size and Strain. Department of Chemistry, University College London. Retrieved from <http://pd.chem.ucl.ac.uk/pdnn/peaks/sizedet.htm>
- Branen, A. L., Davidson, P. M., Salminen, S., & Thorngate III, J. H. (Eds.). (2001). *Food Additives* (2nd ed.). New York: Marcel Dekker. <https://doi.org/https://doi.org/10.1201/9780824741709>
- Cabrera, J. L., Velázquez-Castillo, R., & Rivera-Muñoz, E. M. (2011). Synthesis of Hydroxyapatite Nanostructures Using Microwave Heating. *Journal of*

Nanoscience and Nanotechnology, 11(6), 5555–5561.
<https://doi.org/doi:10.1166/jnn.2011.3433>

- Chander, S., & Fuerstenau, D. W. (1984). Solubility and Interfacial Properties of Hydroxyapatite: A Review. In D. N. Misra (Ed.), *Adsorption on and Surface Chemistry of Hydroxyapatite* (pp. 29–49). Boston, MA: Springer US.
- Chen, H., Sun, J., Hoemann, C. D., Lascau-Coman, V., Ouyang, W., McKee, M. D., ... Buschmann, M. D. (2009). Drilling and microfracture lead to different bone structure and necrosis during bone-marrow stimulation for cartilage repair. *Journal of Orthopaedic Research*, 27(11), 1432–1438.
<https://doi.org/10.1002/jor.20905>
- Chung, C., Mesa, J., Randolph, M. A., Yaremchuk, M., & Burdick, J. A. (2006). Influence of gel properties on neocartilage formation by auricular chondrocytes photoencapsulated in hyaluronic acid networks. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 77A(3), 518–525. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.30660>
- Cohen-Tanugi, D., & Grossman, J. C. (2014). Mechanical Strength of Nanoporous Graphene as a Desalination Membrane. *Nano Letters*, 14(11), 6171–6178.
<https://doi.org/10.1021/nl502399y>
- Doyle, B. B., Bendit, E. G., & Blout, E. R. (1975). Infrared spectroscopy of collagen and collagen-like polypeptides. *Biopolymers*, 14(5), 937–957.
<https://doi.org/10.1002/bip.1975.360140505>
- Elsevier. (2018). IR and Raman Spectra & Structure Correlations: Characteristic Group Frequencies. In *Infrared and Raman Spectroscopy* (pp. 85–134).
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-804162-8.00006-9>
- Fang, F., Yang, W., Jia, C., & Zhang, F. C. (2008). Effect of crystallite size on the deformation and fracture of poly(vinylidene fluoride-trifluorethylene) ferroelectric copolymer films under uniaxial tension. *Polymer Engineering & Science*, 48(12), 2335–2339. <https://doi.org/10.1002/pen.21185>
- Felson, D. T., Naimark, A., Anderson, J., Kazis, L., Castelli, W., & Meenan, R. F. (1987). The prevalence of knee osteoarthritis in the elderly. the framingham osteoarthritis study. *Arthritis & Rheumatism*, 30(8), 914–918.
<https://doi.org/10.1002/art.1780300811>
- Felson, D. T., & Zhang, Y. (1998). An update on the epidemiology of knee and hip osteoarthritis with a view to prevention. *Arthritis and Rheumatism*, 41(8), 1343–1355.
[https://doi.org/10.1002/1529-0131\(199808\)41:8<1343::AID-ART3>3.0.CO;2-9](https://doi.org/10.1002/1529-0131(199808)41:8<1343::AID-ART3>3.0.CO;2-9)
- Fleck, N. A., Ashby, M. F., & Hutchinson, J. W. (2003). The role of geometrically necessary dislocations in giving material strengthening. *Scripta Materialia*,

- 48(2), 179–183. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S1359-6462\(02\)00338-X](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S1359-6462(02)00338-X)
- Galperin, A., Oldinski, R. A., Florczyk, S. J., Bryers, J. D., Zhang, M., & Ratner, B. D. (2013). Integrated Bi-Layered Scaffold for Osteochondral Tissue Engineering. *Advanced Healthcare Materials*, 2(6), 872–883. <https://doi.org/10.1002/adhm.201200345>
- Giannoni, P., Pagano, A., Maggi, E., Arbicò, R., Randazzo, N., Grandizio, M., ... Dozin, B. (2005). Autologous chondrocyte implantation (ACI) for aged patients: development of the proper cell expansion conditions for possible therapeutic applications. *Osteoarthritis and Cartilage*, 13(7), 589–600. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.joca.2005.02.015>
- Harkness, R. D. (1961). Biological Functions of Collagen. *Biological Reviews*, 36(4), 399–455. <https://doi.org/10.1111/j.1469-185X.1961.tb01596.x>
- Harris, J. D., Siston, R. A., Pan, X., & Flanigan, D. C. (2010). Autologous chondrocyte implantation: A systematic review. *Journal of Bone and Joint Surgery - Series A*, 92(12), 2220–2233. <https://doi.org/10.2106/JBJS.J.00049>
- Huey, D. J., Hu, J. C., & Athanasiou, K. A. (2012). Unlike Bone, Cartilage Regeneration Remains Elusive. *Science*, 338(6109), 917–921. <https://doi.org/10.1126/science.1222454>
- Ida, T. (2015). Chapter 6 Diffraction from small crystallites. Graduate School of Engineering, Nagoya Institute of Technology. Retrieved from <http://www.crl.nitech.ac.jp/~ida/education/CrystalStructureAnalysis/6/6e.pdf>
- Ikoma, T., Muneta, T., & Tanaka, M. (2000). Fabrication and Animal Experiment of Nanocomposites of Hydroxyapatite Collagen and Polysaccharides. In *Bioceramics 13* (Vol. 192, pp. 487–490). Trans Tech Publications Ltd. <https://doi.org/10.4028/www.scientific.net/KEM.192-195.487>
- Irish, D. E., & Walrafen, G. E. (1967). Raman and Infrared Spectral Studies of Aqueous Calcium Nitrate Solutions. *The Journal of Chemical Physics*, 46(1), 378–384. <https://doi.org/10.1063/1.1840398>
- Jančář, J., Slovíková, A., Amler, E., Krupa, P., Kecová, H., Plánka, L., ... Nečas, A. (2007). Mechanical response of porous scaffolds for cartilage engineering. *Physiological Research*, 56(SUPPL. 1).
- Jokerst, N. M., Donley, C., Cahoon, J., & Jones, J. (2017). Scanning Electron Microscopy: Basic Function. Retrieved August 16, 2018, from <https://www.coursera.org/lecture/nanotechnology/scanning-electron-microscopy-basic-function-WE2fL?authMode=login>
- Kommareddy, S., Shenoy, D. B., & Amiji, M. M. (2007). Gelatin Nanoparticles and

Their Biofunctionalization. In *Nanotechnologies for the Life Sciences*. American Cancer Society. <https://doi.org/10.1002/9783527610419.ntls0011>

- Kreuz, P. C., Steinwachs, M. R., Erggelet, C., Krause, S. J., Konrad, G., Uhl, M., & Südkamp, N. (2006). Results after microfracture of full-thickness chondral defects in different compartments in the knee. *Osteoarthritis and Cartilage*, 14(11), 1119–1125. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.joca.2006.05.003>
- Langford, J. I., & Wilson, A. J. C. (1978). Scherrer after sixty years: A survey and some new results in the determination of crystallite size. *Journal of Applied Crystallography*, 11(2), 102–113. <https://doi.org/10.1107/S0021889878012844>
- Lavalle, C. (2010). Osteoarthritis. Retrieved from http://www.facmed.unam.mx/sms/temas/2010/06_jun_2k10.pdf
- Lee, C. H., Singla, A., & Lee, Y. (2001). Biomedical applications of collagen. *International Journal of Pharmaceutics*, 221(1), 1–22. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0378-5173\(01\)00691-3](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0378-5173(01)00691-3)
- March, L. M., & Bachmeier, C. J. M. (1997). 10 Economics of osteoarthritis: a global perspective. *Baillière's Clinical Rheumatology*, 11(4), 817–834. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0950-3579\(97\)80011-8](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0950-3579(97)80011-8)
- Matta, C., & Zakany, R. (2013). Calcium signalling in chondrogenesis: implications for cartilage repair. *Frontiers in Bioscience (Scholar Edition)*, 5, 305–324. <https://doi.org/10.2741/s374>
- Méndez-Lozano, N., Velázquez-Castillo, R., Rivera-Muñoz, E. M., Bucio-Galindo, L., Mondragón-Galicia, G., Manzano-Ramírez, A., ... Apátiga-Castro, L. M. (2017). Crystal growth and structural analysis of hydroxyapatite nanofibers synthesized by the hydrothermal microwave-assisted method. *Ceramics International*, 43(1, Part A), 451–457. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2016.09.179>
- Mithoefer, K., McAdams, T., Williams, R. J., Kreuz, P. C., & Mandelbaum, B. R. (2009). Clinical Efficacy of the Microfracture Technique for Articular Cartilage Repair in the Knee: An Evidence-Based Systematic Analysis. *The American Journal of Sports Medicine*, 37(10), 2053–2063. <https://doi.org/10.1177/0363546508328414>
- Mote, V. D., Purushotham, Y., & Dole, B. N. (2012). Williamson-Hall analysis in estimation of lattice strain in nanometer-sized ZnO particles. *Journal of Theoretical and Applied Physics*, 6(1), 6. <https://doi.org/10.1186/2251-7235-6-6>
- Moutos, F. T., Freed, L. E., & Guilak, F. (2007). A biomimetic three-dimensional woven composite scaffold for functional tissue engineering of cartilage. *Nature Materials*, 6, 162. Retrieved from <https://doi.org/10.1038/nmat1822>

- Ohyabu, Y., Adegawa, T., Yoshioka, T., Ikoma, T., Shinozaki, K., Uemura, T., & Tanaka, J. (2009). A Collagen Sponge Incorporating a Hydroxyapatite/Chondroitinsulfate Composite as a Scaffold for Cartilage Tissue Engineering. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, 20(13), 1861–1874. <https://doi.org/10.1163/156856208X386462>
- Ohyabu, Y., Adegawa, T., Yoshioka, T., Ikoma, T., Uemura, T., & Tanaka, J. (2010). Cartilage regeneration using a porous scaffold, a collagen sponge incorporating a hydroxyapatite/chondroitinsulfate composite. *Materials Science and Engineering: B*, 173(1), 204–207. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.mseb.2009.12.008>
- Onofrillo, C., Duchi, S., O’Connell, C. D., Blanchard, R., O’Connor, A. J., Scott, M., ... Bella, C. Di. (2018). Biofabrication of human articular cartilage: a path towards the development of a clinical treatment. *Biofabrication*, 10(4), 45006. <https://doi.org/10.1088/1758-5090/aad8d9>
- Padmanabhan, S. K., Salvatore, L., Gervaso, F., Catalano, M., Taurino, A., Sannino, A., & Licciulli, A. (2015). Synthesis and Characterization of Collagen Scaffolds Reinforced by Eggshell Derived Hydroxyapatite for Tissue Engineering. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 15(1).
- Paxton, S., Peckham, M., & Knibbs, A. (2018). Cartilage. Retrieved from www.histology.leeds.ac.uk/bone/cartilage_types.php
- Raikin, S. M. (2009). Fresh Osteochondral Allografts for Large-Volume Cystic Osteochondral Defects of the Talus, C, 2818–2826.
- Ramay, H. R., & Zhang, M. (2003). Preparation of porous hydroxyapatite scaffolds by combination of the gel-casting and polymer sponge methods. *Biomaterials*, 24(19), 3293–3302. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0142-9612\(03\)00171-6](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0142-9612(03)00171-6)
- Rivera-Muñoz, E. M., Velázquez-Castillo, R., & Cabrera-Torres, J. L. (2010). Morphological Analysis of Hydroxyapatite Particels Obtained by Different Methods. *THERMEC* 2009, 638, 681–686. <https://doi.org/10.4028/www.scientific.net/MSF.638-642.681>
- Roark, R. J., & Young, W. C. (1989). Roark’s Formulas for Stress and Strain.
- Roeder, R. K., Converse, G. L., Leng, H., & Yue, W. (2006). Kinetic Effects on Hydroxyapatite Whiskers Synthesized by the Chelate Decomposition Method. *Journal of the American Ceramic Society*, 89(7), 2096–2104. <https://doi.org/10.1111/j.1551-2916.2006.01067.x>
- Rusu, V. M., Ng, C.-H., Wilke, M., Tiersch, B., Fratzi, P., & Peter, M. G. (2005). Size-controlled hydroxyapatite nanoparticles as self-organized organic–inorganic

- composite materials. *Biomaterials*, 26(26), 5414–5426. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2005.01.051>
- Schmidler, C. (2018). Osteoarthritis (Degenerative Joint Disease). Retrieved from <https://www.healthpages.org/health-a-z/osteoarthritis-degenerative-joint-disease/>
- Secretaría de Salud, ., & Instituto Nacional de Salud Pública, . (1998). *Encuesta Nacional de Salud ENSA II*.
- The Editors of Encyclopædia Britannica, . (2018). Cartilage. Retrieved from <https://www.britannica.com/science/cartilage#ref213485>
- Tuan, R. S. (2007). A second-generation autologous chondrocyte implantation approach to the treatment of focal articular cartilage defects. *Arthritis Research and Therapy*, 9(5), 2–5. <https://doi.org/10.1186/ar2310>
- Ungureanu, D. N., Angelescu, N., Ion, R. M., Stoian, E. V., & Rizescu, C. Z. (2011). Synthesis and Characterization of Hydroxyapatite Nanopowders by Chemical Precipitation. In *Proceeding of 10th WSEAS International Conference on Electronics, Hardware, Wireless and Optical Communications, and 10th WSEAS International Conference on Signal Processing, Robotics and Automation, and 3rd WSEAS International Conference on Nanotechnology* (pp. 296–301). Stevens Point, Wisconsin, USA: World Scientific and Engineering Academy and Society (WSEAS). Retrieved from <http://dl.acm.org/citation.cfm?id=1959586.1959642>
- Uskoković, V. (2015). The role of hydroxyl channel in defining selected physicochemical peculiarities exhibited by hydroxyapatite. *RSC Adv.*, 5(46), 36614–36633. <https://doi.org/10.1039/C4RA17180B>
- Wieland, H. A., Michaelis, M., Kirschbaum, B. J., & Rudolphi, K. A. (2005). Osteoarthritis — an untreatable disease? *Nature Reviews Drug Discovery*, 4(4), 331–344. <https://doi.org/10.1038/nrd1693>
- Yang, J., Zhang, Y. S., Yue, K., & Khademhosseini, A. (2017). Cell-laden hydrogels for osteochondral and cartilage tissue engineering. *Acta Biomaterialia*, 57, 1–25. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.actbio.2017.01.036>
- Yanovska, A., Kuznetsov, V., Stanislavov, A., Husak, E., Pogorielov, M., Starikov, V., ... Danilchenko, S. (2016). Synthesis and characterization of hydroxyapatite-gelatine composite materials for orthopaedic application. *Materials Chemistry and Physics*, 183, 93–100. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.matchemphys.2016.08.006>
- Zhang, H. G., Zhu, Q., & Wang, Y. (2005). Morphologically Controlled Synthesis of Hydroxyapatite with Partial Substitution of Fluorine. *Chemistry of Materials*,

17(23), 5824–5830.

Zhao, W., Jin, X., Cong, Y., Liu, Y., & Fu, J. (2013). Degradable natural polymer hydrogels for articular cartilage tissue engineering. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 88(3), 327–339. <https://doi.org/10.1002/jctb.3970>

Zhou, Y., Zhao, Y., Wang, L., Xu, L., Zhai, M., & Wei, S. (2012). Radiation synthesis and characterization of nanosilver/gelatin/carboxymethyl chitosan hydrogel. *Radiation Physics and Chemistry*, 81(5), 553–560. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.radphyschem.2012.01.014>

Dirección General de Bibliotecas UNQ

11. APÉNDICE

11.1 Preparación del Buffer Fosfato

Se elaboró una solución de fosfato con el fin de crear un buffer en el cual la síntesis del material pudiera llevarse a cabo sin afectar las condiciones de pH deseadas.

Para obtener el buffer se hicieron dos soluciones, en la primera se disolvieron 0.2684 gr. de Na_2HPO_4 y se aforó a 10 ml. con agua destilada (Solución 1).

Para la segunda solución se disolvieron 0.6903 gr. de NaH_2PO_4 y se aforó a 50 ml. con agua destilada (Solución 2).

Posteriormente se tomaron 6.15 ml. de la solución 1, 43.85 ml. de la solución 2 y se aforaron a 100 ml. con agua destilada.

11.2 Pruebas de Solubilidad

Se colocaron muestras de las películas sintetizadas, así como de la matriz colágeno / grenetina, en vasos de precipitados con 30 ml. de agua destilada a una temperatura que varió de 23 a 37 °C y fueron sometidas a una agitación moderada hasta su completa disolución. Todas las muestras fueron cortadas de forma cuadrada con lados de 5 mm y un espesor de entre 0.4 y 0.45 mm todas con el mismo peso inicial de 0.05 g.

Las muestras fueron pesadas antes de ser colocadas dentro del vaso de precipitados y se registró su peso. Las muestras fueron introducidas dentro del vaso de precipitados y se comenzó la agitación. Cada minuto, la muestra se retiraba del vaso y se pesaba para registrar la ganancia o pérdida de peso de la misma, este proceso se repitió hasta que ya no existía una muestra recuperable dentro del vaso de precipitados. Por cada medición del peso de la muestra, se medía también la temperatura del agua dentro del vaso.

Los resultados fueron graficados y se pueden observar en la

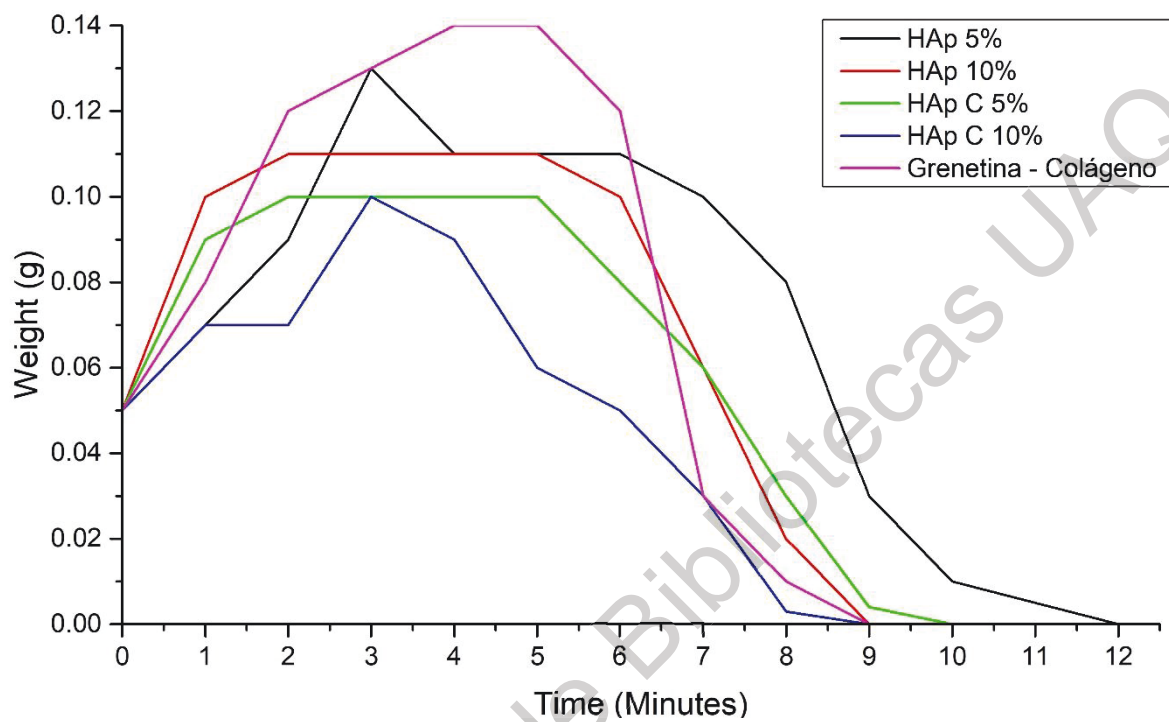


Figura 36. Gráficas de solubilidad de las películas compuestas sintetizadas.