

Título del Proyecto de Investigación
al que corresponde el Reporte Técnico:

Desarrollo de compósitos cerámicos nanoestructurados con vistas a su utilización clínica como implantes para la sustitución y reparación de tejidos óseos. RIPI2019ICB33

Tipo de financiamiento

Sin financiamiento

Fecha de Inicio: 08/01/2017
Fecha de Término: 08/01/2020

Tipo de Reporte

Parcial

Final

Autor (es) del reporte técnico:

Dr. Simón Yobanny Reyes López

TÍTULO DEL REPORTE TÉCNICO

Resumen del reporte técnico en español (máximo 250 palabras)

Un biomaterial es capaz de reemplazar la función de un órgano real, llegando a conferir propiedades de soporte, regeneración o resistencia. En la presente investigación se desarrolló un compósito en forma de membrana polimérica embebida de partículas de hidroxiapatita y alúmina para utilizarse como andamio y que permita la viabilidad celular. Se tiene como matriz de soporte a la poly ϵ -caprolactona (PCL) que es polímero biodegradable, la hidroxiapatita (HA) es el cerámico que contribuye en la mejora de las propiedades osteoconductoras y osteoregenerativas, mientras que la alúmina (Al_2O_3) aporta la dureza al compósito para su aplicación viable en la industria ortopédica. En la elaboración del compósito se realizó la síntesis de las partículas cerámicas por precipitación química, siendo después caracterizadas por espectroscopia IR, difracción de rayos X, mostrando la alta pureza de los materiales cerámicos obtenidos. Posteriormente por el método de electrohilado se realizaron compósitos fibrilares de PCL, PCL/HA, PCL/ Al_2O_3 , y PCL/HA/ Al_2O_3 . La morfología del compósito resultó en un entretejido de fibras con un diámetro 840 ± 230 nm. Los compósitos fueron sometidos a la prueba de citotoxicidad con el ensayo MTT, mostrando que ningún de los compósito resultó tóxico ($p=0.0001$); donde el compósito PCL/HA/ Al_2O_3 presentó mayor viabilidad celular con un 238%, demostrando su posible utilidad como material ortopédico, en relleno de fracturas, o imperfecciones óseas causadas por daños físicos.

Resumen del reporte técnico en inglés (máximo 250 palabras):

A biomaterial can replace the function of a real organ, conferring properties of support, regeneration, or resistance. In the present investigation, a composite was developed in the form of a polymeric membrane embedded with hydroxyapatite and alumina particles to be used as scaffolding and to allow cell viability. The support matrix is poly ϵ -caprolactone (PCL), which is a biodegradable polymer, hydroxyapatite (HA) is the ceramic that contributes to the improvement of osteoconductive and osteo-regenerative properties, while alumina (Al_2O_3) provides the hardness to the composite for its viable application in the orthopedic industry. In the elaboration of the composite the synthesis of the ceramic particles was carried out by chemical precipitation, being characterized by IR spectroscopy, X-ray diffraction, showing the high purity of the obtained ceramic materials. Subsequently, by the electrospinning method, fibrillary composites of PCL, PCL/HA, PCL/ Al_2O_3 , and

PCL/HA/Al₂O₃ were made. The morphology of the composite resulted in an interweaving of fibers with a diameter of 840 ± 230 nm. The composites were submitted to the MTT cytotoxicity test, showing that none of the composites were toxic ($p = 0.0001$); where the PCL/HA/Al₂O₃ composite showed greater cellular viability with 238%, demonstrating its possible usefulness as orthopedic material, in filling fractures, or bone imperfections caused by physical damage.

Palabras clave: viabilidad celular, polie-caprolactona, hidroxiapatita, alúmina.

Usuarios potenciales (del proyecto de investigación)

Reconocimientos

A la Q.F.B. Ana Karen Monreal Rodríguez por su apoyo en la realización de su tesis de licenciatura

1. Introducción

2. Planteamiento

El presente proyecto de investigación de obtención de compósitos nanoestructurados forma parte de las propuestas de investigación que he venido desarrollando desde el 2012 en el Instituto de Ciencias Biomédicas (ICB) de la Universidad Autónoma de Ciudad Juárez (UACJ). La obtención de dichos compósitos biomédicos atiende necesidades regionales de salud en el Estado de Chihuahua, donde el índice de pérdida de masa músculo-esquelética y hueso por lesiones de calor, representa un problema de salud que ha posicionado al Estado de Chihuahua en el 4º lugar nacional.

2.1 Antecedentes

Mediante síntesis química, pueden obtenerse cantidades importantes de polvos nanoestructurados, homogéneos, de alta área específica, con morfología reproducible, de buena capacidad de sinterizado y elevada pureza. En el siguiente proyecto de investigación, se desarrollará la innovación de nuevas rutas de procesamiento para la

obtención de fibras compuestas polímero-cerámico y fibras cerámicas densas, a partir de rutas de síntesis de partículas cerámicas propuestas y publicadas en mi trayectoria.

Los estudios de regeneración de tejido son campos de investigación que van creciendo y haciendo reales sus aplicaciones en medicina. De esta forma la reparación del cuerpo humano pasa de centrarse en una aproximación biónica, a una aproximación de la medicina regenerativa con dos vertientes, la ingeniería de tejidos y la terapia celular, que utilizan biomateriales de tercera generación (Laurencin, 1999; Sosnik, 2007; Volzone, 2008; Rodil, 2009). Los biomateriales cerámicos que son utilizados para la reparación y reemplazo de partes enfermas o dañadas de los sistemas músculo-esqueléticos, incluyen tres tipos básicos de biomateriales: cerámicas bioinertes, cerámicas bioactivas y cerámicas reabsorbibles. Las *cerámicas bioinertes* son aquellas que no se unen química o biológicamente al tejido, permitiendo la formación de una capa fibrosa alrededor del implante (alúmina y circonia). Las *cerámicas bioactivas* son las que poseen reactividad con el tejido vivo (biovidrios, los vitrocerámicos y las hidroxiapatitas). Las *cerámicas reabsorbibles* son aquellas que desaparecen a medida que se va regenerando el hueso como el fosfato tricálcico (Christel, 2006; Rodil, 2009; Maccauro, 2010).

Por consiguiente, es de suma importancia la obtención de materiales nanoestructurados cerámicos de alta densidad y porosos, lo cuales se pretenden obtener con la técnica de electrohilado. El electrohilado es una técnica que se basa en la utilización de campos electrostáticos para la producción de tejidos a partir de la unión y enlace de numerosas fibras en el orden de los nanómetros a micrómetros. La técnica del electrohilado permite la preparación también de materiales cerámicos y compuestos cerámico-polímero a partir de los precursores, con la particularidad de conferirles forma de fibra continua, con tamaños que oscilan desde unas pocas micras hasta las decenas de nanómetros, características necesarias de un biomaterial. Por lo tanto, la versatilidad de la técnica de electrohilado permitirá obtener biomateriales compuestos electrohilados y/o fibras cerámicas sinterizadas de soporte, realizando sólo pequeños cambios sobre el equipo básico y parámetros de proceso que permitan preparar fibras biocompatibles compuestas de dos o más materiales, fibras huecas o fibras con modificaciones en la superficie.

2.2 Marco teórico

Los materiales avanzados, particularmente las cerámicas avanzadas juegan un papel importante en el futuro de la economía de un país, generando desarrollo en el campo de la ciencia y tecnología. Con el uso de materiales avanzados como las biocerámicas en particular, se pueden recambiar muchas piezas de nuestro cuerpo. Las aplicaciones de las biocerámicas hoy en día están centradas en la fabricación de implantes que no deban soportar cargas, como es el caso de la cirugía del oído medio, en el relleno de defectos óseos tanto en cirugía bucal, así como en cirugía ortopédica y en el recubrimiento de implantes dentales y articulaciones metálicas. Las investigaciones científicas en biomateriales se concientizan de que no exista la posibilidad de una reacción química del implante con los tejidos vivos, sin conllevar un riesgo en el organismo. Los estudios de regeneración de tejido son campos de investigación que van creciendo y haciendo reales sus aplicaciones en medicina. De esta forma la reparación del cuerpo humano pasa de

centrarse en una aproximación biónica a hacerlo en una aproximación a la medicina regenerativa con dos vertientes, la ingeniería de tejidos y la terapia celular, que utilizan biomateriales de tercera generación.

El objetivo de la ingeniería tisular es el desarrollo de compuestos biológicos y biomateriales implantables en el organismo, con intención de reparar, mantener o mejorar la función de órganos y tejidos (Laurencin, 1999, Volzone, 2008). Atendiendo a la naturaleza del material artificial con el que se fabrica un implante, se puede establecer una clasificación en materiales cerámicos, metálicos, poliméricos o materiales compuestos.

Los biomateriales utilizados en implantes se dividen en tres grandes grupos: los biomateriales metálicos (titanio, aleación Co-Cr-Mo, acero), los biomateriales cerámicos (alúmina Al_2O_3 , circonia ZrO_2) y biomateriales poliméricos que son polímeros hidrofóbicos y bioabsorbibles a base de policaprolactona (PCL), ácidos poliláctico (PLA), poliglicólico (PGA) y polidioxanona (PDO) y que son estudiados en: reparación, relleno de tejidos y en sistemas de liberación controlada de drogas (Sosnik, 2007).

Los biomateriales metálicos son utilizados en implantes donde requiere el soporte de carga (dentales o artroplastias) debido a su alta resistencia mecánica, aunque se han aplicado también en tratamientos cardiovasculares. Los principales metales biocompatibles son acero inoxidable, aleaciones basadas en cobalto y aleaciones basadas en titanio (Rodil, 2009). Los biomateriales cerámicos son utilizados para la reparación y reemplazo de partes enfermas o dañadas de los sistemas músculo-esqueléticos. Estos incluyen tres tipos básicos de biomateriales: cerámicas bioinertes, cerámicas bioactivas y cerámicas reabsorbibles. Las *cerámicas bioinertes* son aquellas que no se unen química o biológicamente con el tejido permitiendo la formación de una capa fibrosa alrededor del implante (alúmina y circonia). Las *cerámicas bioactivas* son las que poseen reactividad con el tejido vivo (biovidrios, los vitrocerámicos y las hidroxiapatitas). Las *cerámicas reabsorbibles* son aquellas que desaparecen a medida que se va regenerando el hueso (fosfato tricálcico) (Rodil, 2009; Maccauro, 2010).

En la actualidad, la alúmina ha sido utilizada en la cirugía ortopédica. El cerámico de alúmina ha demostrado ser un buen material para cabezas femorales en componentes de la endoprótesis de cadera (Christel, 2006; Volzone, 2008). La Alúmina, circonia o Hidroxiapatita forman parte de los biocerámicos porosos y su objetivo es tener una mayor unión e interacción con el tejido. Sus poros poseen no menos de 100 ó 150 micrones de diámetro permitiendo que el tejido crezca. Si son menores, el tejido no alcanza a ingresar, la vascularidad se entorpece y el tejido se puede morir (Volzone, 2008). Los implantes se pueden dividir en primera, segunda y tercera generación. La primera generación consistió en materiales de baja densidad con una microestructura gruesa. El material cerámico de tercera generación, el cual se utiliza hoy en día, consiste en una alta densidad con un tamaño de grano pequeño, una pureza química elevada y una estructura cristalina estable (Thamaraiselvi, 2004). Por consiguiente es de suma importancia la obtención de materiales nanoestructurados de alta densidad, lo cuales se pretenden obtener con la técnica de electrohilado, técnica que permite la elaboración de membranas de fibras desde tamaños nanométricos a micrométricos. Una vez obtenidas las fibras serán tratadas térmicamente para obtener un material cerámico de alta densidad.

Alúmina

El cerámico óxido de aluminio o alúmina (Al_2O_3) es uno de los óxidos más estables debido a los enlaces iónicos y covalentes entre los átomos de Al y O. Se ha utilizado en implantes ortopédicos desde 1970 debido a su excelente biocompatibilidad, resistencia a la corrosión, alta dureza, resistencia al desgaste, resistencia a la fatiga, bajo coeficiente de fricción, estabilidad de fase y una resistencia mecánica suficiente para resistir la fatiga (Reyes, 2006). Las razones de la excelente resistencia al desgaste y comportamiento de fricción están asociados con la energía de superficie y suavidad de la superficie de este cerámico (Thamaraiselvi, 2004; Volzone, 2008).

En el periodo del 2004 al 2006, se empezó a trabajar un proceso de obtención de polvos de α -alúmina a 1100°C con área superficial de $108 \text{ m}^2/\text{g}$, mediante el desarrollo de una ruta metalorgánica que involucra la síntesis del precursor metalorgánico formiato de aluminio (Reyes, Serrato y Sugita, 2006). En la figura 1, se observa la típica morfología esférica de la alúmina, como resultado del proceso de secado por atomización llevado a cabo en esta ruta de procesamiento, con la que se obtienen partículas con un rango de diámetro de 0.1 a $6 \mu\text{m}$. Un acercamiento en la imagen muestra que las esferas de $\alpha\text{-Al}_2\text{O}_3$ están compuestas por partículas nanométricas del orden de 10 a 15 nm (figura 1 ampliación $35,000 \times$).

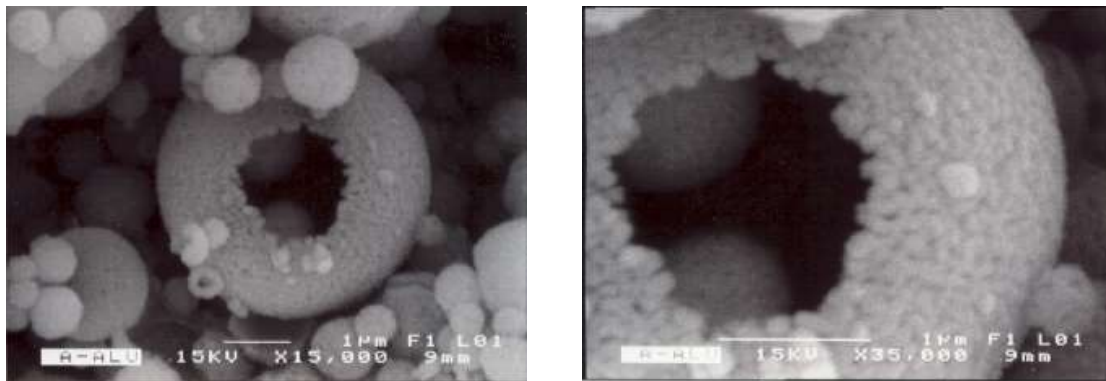


Figura 1. Fotografía MEB esfera de $\alpha\text{-Al}_2\text{O}_3$ calcinada a 1100°C (Reyes, 2006).

Al calentarse el precursor esférico ocurre a reducción significativa en el tamaño de las partículas y la formación de alfa-alúmina. Propiedades que originan una mejor ruta de procesamiento química de obtención de alúmina, debido a los bajos tiempos de síntesis, ya que evita pasos intermedios de reacción, condiciones de reflujo y de destilación; aunado a un proceso de secado rápido, que evita la precipitación del precursor, a diferencia de otros precursores utilizados en la obtención α -alúmina. Posteriormente se ha trabajado en la obtención de nanopartículas de alúmina, se partió de una solución gelada de formiato de aluminio, como material precursor el cual es posteriormente deshidratado y calcinado a una temperatura de 1100°C por una hora, para la formación de los aglomerados, en forma de una masa voluminosa, quebradiza y altamente frágil de una fase altamente porosa de $\alpha\text{-Al}_2\text{O}_3$ de $101 \text{ g}/\text{cm}^2$ como se muestra en la figura 2-a. Las dimensiones de las

nanopartículas están comprendidas en un rango aproximado de 50 a 250 nm, como se observa en la figura 2-b por microscopía electrónica de transmisión.

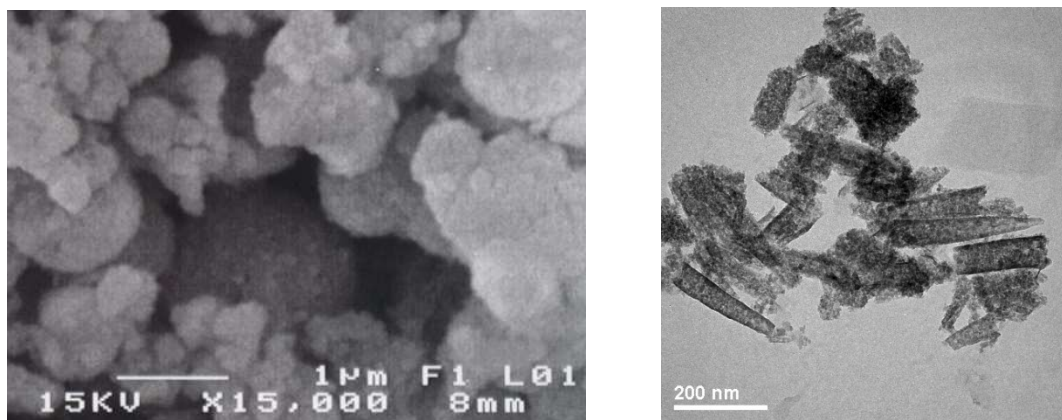


Figura 2. a) Imagen de MEB de aglomerados de α - Al_2O_3 y b) Imagen MET de acercamiento de Nanopartículas de α - Al_2O_3 (Reyes, 2013).

El grado de aglomeración es influenciado por la naturaleza de la sal metal-orgánica que forma un gel en solución, que al calcinarse produce una aglomeración típica de precursores orgánicos calcinados. Las nanopartículas obtenidas mediante esta técnica presentan este crecimiento principalmente por que la cantidad de carbono para recubrir las partículas nanométricas no fue suficiente para evitar este crecimiento. Por lo que actualmente se hace la adición de compuestos orgánicos como agentes estéricos, para propiciar un mayor contenido de carbono el cual impide el crecimiento de las partículas (Reyes, 2013).

Hidroxiapatita

La hidroxiapatita (HA) $\text{Ca}_{10-x}(\text{PO}_4)_x(\text{HPO}_4)_{6-x}(\text{OH})_{2-x}$ con $0 < x < 1$ es el principal componente inorgánico del hueso de los vertebrados; misma fase que también encontramos en la dentina y el esmalte dental. Esta apatita se encuentra presente en el hueso como un cristal plano de 20 a 80 nm de largo y de 2 a 5 nm de espesor, y se calcula que el 65% de la fracción mineral de hueso humano es la hidroxiapatita (Jaffe, 1996). Este fosfato de calcio, que se puede obtener de forma sintética con excelentes características de biocompatibilidad, estabilidad química, osteoconducción y bioactividad, aunado a una nula toxicidad; tales propiedades hacen de la hidroxiapatita (HA) una opción muy práctica para usos médicos. La HA se puede usar como reemplazo de partes pequeñas de hueso, relleno de cavidades en odontología, recubrimiento de superficies de metales para implantes, refuerzo en materiales compuestos y como liberador de medicamentos, entre otros (Bernache, 2003). La hidroxiapatita sintética no cerámica equivale a la porción mineral del hueso humano desde el punto de vista físico, químico y cristalográfico. Es un material que se reabsorbe lentamente actuando como matriz ósea sobre la que se va depositando el hueso nuevo formado. La Hidroxiapatita sintética de origen cerámico está constituida por partículas esféricas de alta densidad y gran pureza. Es un material muy biocompatible, no

reabsorbible que permite la aposición directa del hueso. El medio utilizado y las temperaturas aplicadas condicionaran la estructura cristalina, la porosidad y la solubilidad del producto resultante (Jaffe, 1996). Se han desarrollado muchas rutas para sintetizar hidroxiapatita usando métodos de hidrólisis, hidrotermales o precipitación. De estos métodos, la precipitación se caracteriza por su simplicidad, bajo costo y aplicación a nivel industrial (Narasaraju, 1996). En nuestro grupo de trabajo, la hidroxiapatita se obtiene por síntesis química, haciendo reaccionar soluciones acuosas de fosfato de amonio diácido y nitrato de calcio tetrahidratado, bajo control de parámetros tales como pH, orden de adición de los reactivos, temperatura de la mezcla y tiempo de reposo (Molina, 2012).

Titania

La titania o dióxido de titanio tiene diversas aplicaciones, dentro del área biomédica, es utilizado en implantes dentales debido a su alta resistencia a la corrosión, propiedades mecánicas y lo más importante, es considerado como un material biocompatible. Nanofibras de ácido poliláctico (PLA) y titania por medio de electrohilado podría ser utilizado como un material de bioreconocimiento de drogas anticancerígenas ya que en estudios se ha demostrado que el nanocompósito TiO₂-PLA facilita la unión de la droga daunorubicin al ADN promoviendo un reconocimiento molecular para la detección de células cancerosas (Macwan, 2011).

Los métodos de síntesis para la obtención de nanopolvos de Titania son rutas sol-gel modificadas. Una de las más rutas utilizadas consiste en partir de butóxido de titania, y suspenderlo en solventes no polares como el tolueno, para de ahí calentarlo lentamente a 2.5 K/min hasta alcanzar 573K durante 2 horas, bajo una presión controlada, posteriormente se deja enfriar hasta temperatura ambiente, para de ahí lavar con metanol y se dejar secar para la obtención de los polvos TiO₂ (Macwan, 2011). Otro de los métodos empleados utiliza alcóxidos de titania como precursores y mezclándolos con 2-propanol bajo atmosfera seca, para después agregar por goteo una disolución de agua y 2-propanol en agitación constante, hasta observar la formación de un gel amarillo controlando el pH utilizando hidróxido de amonio o ácido clorhídrico, posteriormente el gel es secado y calcinado por espacio de 6 horas bajo una atmosfera de oxígeno (Karami, 2010).

Circonia

El óxido de cinc (ZnO) es un óxido anfótero que tiene excelentes propiedades eléctricas y de estructura, es un material semiconductor que ha sido ampliamente utilizado como catalizador, dispositivo de electro-luminiscencia y fotoluminiscencia, sensor de gas, material farmacéutico, recubrimiento antirreflejo, electrodo transparente para células solares, varistor, protector *Uv* y actualmente como cerámicas bioinertes (Rodil, 2009; Maccauro, 2010).

Las reacciones de síntesis para la obtención de nanopartículas utilizan como precursores al oxiclورو de circonio octahidratado o alcóxidos de circonio, por el método sol gel y técnicas convencionales de precipitación, utilizando como agente quelantes al ácido cítrico, azúcares y como solvente etilenglicol, en una relación molar metal/quelante/solvente igual a 1/4/16.

Electrohilado

El electrohilado ha surgido como una técnica con gran potencial para la síntesis de una gran variedad de materiales de escalas nanométricas. El término electrohilado (“electrospinning” o “electrospun”) deriva de “hilado electrostático” y comenzó a usarse como tal en la década de los 90 (Li y Xia, 2004). Es una técnica que permite producir micro o nanoestructuras fibrosas, interconectadas entre sí. La formación de dichas estructuras se logra a partir del paso de una solución polimérica por un campo eléctrico, transformando un chorro de polímero en gotas con partículas dispersas que finalmente se transforman en fibras nanométricas por diferencia de cargas. Las fibras formadas son semejantes a una matriz extracelular, su estructura puede ser lisa, porosa o hueca (Li, 2006) y pueden tener un diámetro de 10nm a 10 μ m que confiere un área superficial de contacto alta (Nam, 2006).

La electrohidrodinámica envuelta en el proceso es altamente compleja (Li, 2006). Una forma sencilla de describirlo se muestra a continuación. Inicialmente se prepara una solución, que se coloca dentro de una jeringa cuya aguja se conecta a uno de los electrodos de una fuente de poder, que induce una carga en la superficie de la solución. El segundo electrodo se conecta al área de recolección que generalmente consiste en una placa. Una vez preparado el sistema, el proceso se inicia inyectando la solución con cierta velocidad y aplicando cierta cantidad de voltaje, los valores dependen de la viscosidad de la solución y pueden determinarse una vez que se observa la aparición del cono de Taylor. Se han desarrollado algunos métodos que permiten el control de la alineación de las nanofibras en cuanto a grado de ordenamiento y dirección tales como el control del campo eléctrico o el uso de un colector que gire (Ramakrishna, *et al.*, 2006). La colocación de los electrodos positivo y negativo y el voltaje proporcionado por la fuente de poder son clave para lograr el proceso, permite controlar el líquido y hacerlo viajar de un lugar a otro, secando el solvente utilizado y alargando el polímero, hasta la formación de la (ver figura 3).

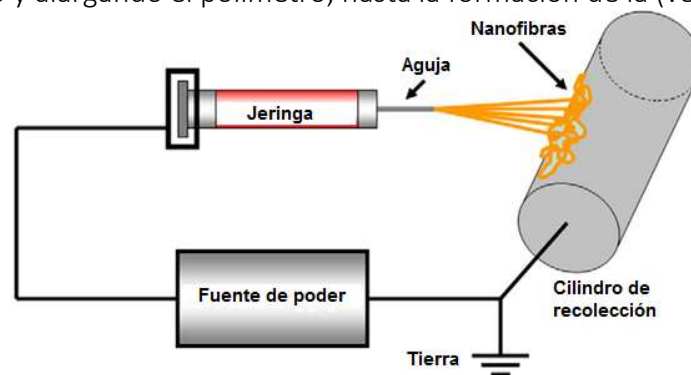


Figura 3. Esquema del proceso de la técnica de electrohilado (Modificado de Ho Kim, *et al.*, 2009).

Prácticamente cualquier polímero soluble con un peso molecular alto puede ser electrohilado, esto ha sido demostrado mediante una variedad de investigaciones (Ramakrishna, *et al.*, 2006). Aunque no se conoce a ciencia cierta la electrohidrodinámica del electrohilado de este tipo de materiales se sabe que los polímeros con alta

conductividad, resistencia química y de tensión permiten la fabricación de fibras ultrafinas con un tamaño de poro pequeño que pueden formar estructuras de una, dos y tres dimensiones y por tanto utilizarse como fibras ópticas, filtros o telas de protección (Subbiah, *et al.*, 2004).

Fabricación de fibras de alúmina por electrohilado

Diversas investigaciones han demostrado la variedad de materiales y factores que permiten la formación de nanofibras de α -alúmina mediante electrohilado, a continuación se citan algunos. Azad (2006) reporta la fabricación de nanofibras transparentes de alúmina mediante el electrohilado de una solución inorgánica-orgánica. Dicha solución se preparó a partir de 2, 4-pentadionato de aluminio $[\text{Al}(\text{CH}_3\text{COCHCOCH}_3)_3]$ en acetona y polivinilpirrolidona en etanol al 15%. Tuttle (2008) presenta una tesis sobre los distintos parámetros que afectan la síntesis de fibras y los determina con la formación de nanofibras de alúmina.

Yu, Guo, Zhu, Li, Zhang y Zhu (2012) prepararon nanofibras de alúmina mediante electrospinning a partir de una solución poliacrilonitrilo en N,N-Dimetilformamida al 10% y 2,4-pentadionato de aluminio en proporción 1:1. Posteriormente, las fibras se calcinaron a 1200°C durante 1h. Las fibras obtenidas antes de calciar tenían un diámetro de 500nm a 1 μm , eran lisas, cilíndricas y estaban distribuidas aleatoriamente. Después de someterlas a altas temperaturas su tamaño se redujo en aproximadamente 250nm, por lo que su diámetro se encontraba en un rango que iba de los 150 a 500nm.

Fabricación de PCL por electrohilado

En últimos años se ha demostrado la fabricación de nanofibras de poli- ϵ -caprolactona mediante electrohilado. A continuación, se describen algunas investigaciones de importancia. Nam (2006) realizó una tesis donde reporta la fabricación de nanofibras mediante electrohilado utilizando una solución de PCL en acetona al 12%, y 1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propanol (HFP) al 6.7%, se observó un grosor de aproximadamente 70 μm de fibras obtenidas. Van der Schueren y colaboradores (2011) realizaron estudios para proponer un solvente alternativo al cloroformo, típicamente utilizado en el electrohilado de PCL. Para esto realizaron disoluciones de PCL en cloroformo, ácido fórmico, ácido acético, metanol, etanol y combinaciones de ellos. La concentración del polímero fue de 10%, al utilizarse dos solventes las soluciones fueron preparados con estequiometrias de 1:3, 1:1 y 3:1. Las micrografías de microscopía electrónica reveló fibras en los rangos de 200 a 4000 nm para las relaciones usadas.

Actualmente no se reportado o usado esta metodología para la obtención de andamios de poli- ϵ -caprolactona-alúmina (PCL-AL), poli- ϵ -caprolactona-hidroxiapatita sintética (PCL-HA), PCL-HA-Alúmina, poli- ϵ -caprolactona-titania (PCL-TI) y poli- ϵ -caprolactona-circonia (PCL-ZI), PCL-HA-titania, PCL-HA-circonia o fibras cerámicas de alúmina-hidroxiapatita, titania-hidroxiapatita, circonia-hidroxiapatita o combinaciones de estos óxidos cerámicos. En trabajos preliminares de nuestro grupo trabajo se ha reportado un biomaterial nanoestructurado que permita combinar las propiedades de un material cerámico inerte y resistente como la $\alpha\text{-Al}_2\text{O}_3$, con un material polimérico con características biocompatibles, como poli ϵ -caprolactona, para su potencial uso a manera de

material de soporte biomédico modificando distintos parámetros de procesamiento de la técnica de electrohilado, en la figura 4 las micrografías de las fibras de PCL- Al_2O_3 obtenidas por MEB, es posible observar que las fibras son lisas, continuas, sin embargo se distribuyen al azar a lo largo del plano y su diámetro es variable de 0.3 a 1.5 μm (Reyes, 2013 y Vargas, 2013).

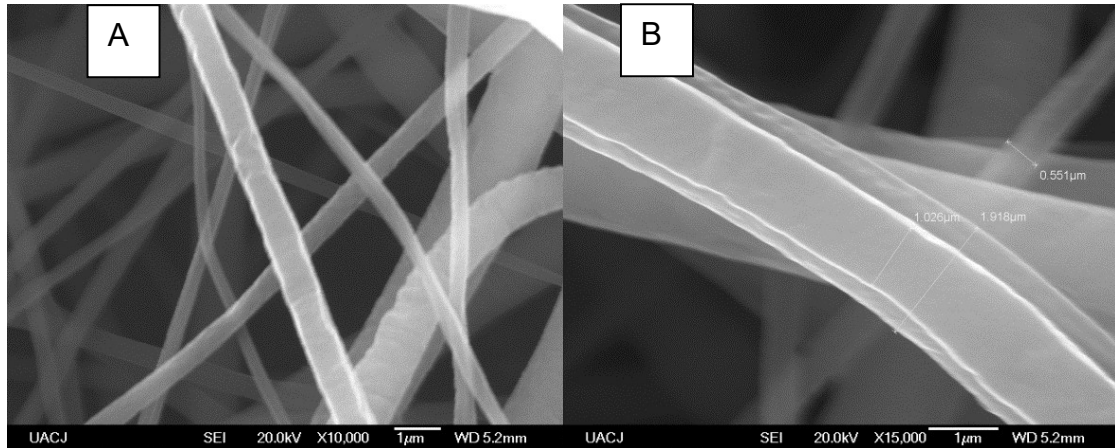


Figura 4. MEB de fibras PCL $\alpha\text{-Al}_2\text{O}_3$ de muestra 6. a) 10000x y b) 15000x (Reyes, 2013)..

Otro trabajo preliminar de fibras electrohiladas es el de un biomaterial nanoestructurado de matriz polimérica de PCL con dos cerámicos, uno biocompatible como la hidroxiapatita y otro inerte y resistente como la $\alpha\text{-Al}_2\text{O}_3$, para su potencial uso a manera de material de soporte. Las micrografías de MEB de la figura 5 muestran la microestructura de las nanofibras de PCL-HA- $\alpha\text{-Al}_2\text{O}_3$ en diferentes aumentos. Las fibras son electrohiladas a una temperatura de 21° C y un voltaje de 8.1 Kv y una distancia de la aguja del inyector a la placa colectora de 12.5 cm. Las partículas más brillantes son de HA, mientras que las más opacas son de $\alpha\text{-Al}_2\text{O}_3$ de acuerdo con su análisis composicional de EDX.

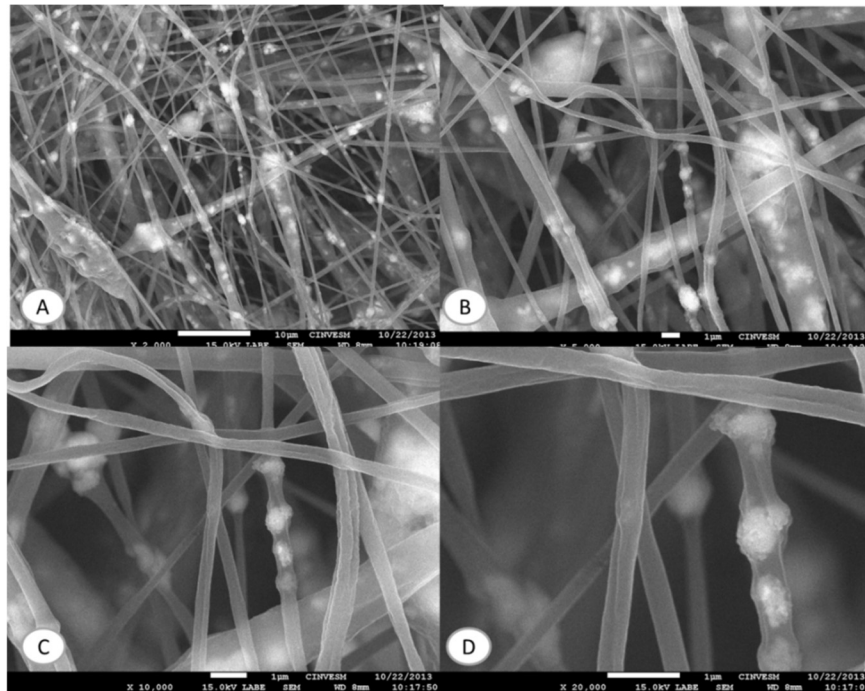


Figura 5. Micrografías de fibras de PCL-HA- Al_2O_3 en diferentes aumentos: (A) a 2000X, (B) a 5000X, (C) a 10000X y (D) a 20000X (Reyes, 2013 y Carrillo, 2014)..

3. Objetivos (general y específicos)

General

Generar información básica y necesaria para la obtención de materiales compuestos con fines biomédicos, combinando las técnicas de procesamiento cerámico y de obtención de fibras por electrohilado, con el fin de establecer rutas de producción de fibras compuestas: cerámico-polímero, cerámico-cerámico, para su aplicación en la reparación y reemplazo de partes enfermas de los sistemas músculo-esqueléticos.

Objetivos específicos

Optimizar los parámetros de obtención de nanofibras de polímero-cerámico por electrohilado y parámetros de sinterización de fibras polímero-cerámico en la obtención de fibras cerámicas para su aplicación como materiales óseos de reemplazo.

Estudiar las características tanto físicas, químicas, microestructurales y de biocompatibilidad de los nanocompuestos cerámicos y cerámico-polímero obtenidos.

Evaluar y analizar la biocompatibilidad de los compósitos nanoestructurados polímero-cerámico y/o cerámico-cerámico obtenidos.

Obtener biomateriales a los cuales se les compruebe su efectividad real mediante pruebas en *In vivo* con la colaboración del personal médico, veterinario y dental de nuestro instituto.

4. Metodología

Actualmente se buscan materiales de gran calidad, prácticos y baratos, que no sean de importación y que permitan al ser humano mejorar su calidad de vida en distintos aspectos. Como una opción para resolver dicha problemática se presenta la técnica de electrohilado, la cual emplea fuerzas eléctricas para producir fibras cerámicas o de polímeros con diámetros que miden desde 50 nanómetros.

A partir de lo anterior se propone primero la obtención de tres materiales compuestos de matriz polimérica por la técnica de electrohilado: Alúmina-Hidroxiapatita-Policaprolactona, de Alúmina-Titania-Hidroxiapatita-Policaprolactona, y Alúmina-Circonia-Hidroxiapatita-Policaprolactona. El uso de alfa-alúmina, titania o circonia surge de la necesidad de utilizar un material cerámico reforzante.

El segundo paso consiste en obtener tres materiales puramente cerámicos de alúmina e hidroxiapatita (Al-HA), de alúmina, titania e hidroxiapatita (Al-Ti-HA) y de alúmina, circonia e hidroxiapatita (Al-Zr-HA). Estos materiales cerámicos se obtendrán al dar un tratamiento térmico y de sinterizado a las fibras de matriz polimérica, para eliminar el material orgánico de la matriz y obtener membranas cerámicas densas con una pureza química elevada y una estructura cristalina estable.

Finalmente se analizará la viabilidad del uso biomédico con pruebas *In vivo* de los nanocompuestos de Alúmina-Hidroxiapatita-Policaprolactona, de Titania-Hidroxiapatita-Policaprolactona, Circonia-Hidroxiapatita-Policaprolactona, Alúmina-Hidroxiapatita, de Titania-Hidroxiapatita y de Circonia-Hidroxiapatita de acuerdo a las características presentadas.

5. Instituciones, organismos o empresas de los sectores social, público o productivo participantes (Si aplica)

No aplica

6. Resultados

6.1 Síntesis y caracterización de polvos cerámicos

Los espectros infrarrojos de las partículas cerámicas de hidroxiapatita (HA) y α -Alúmina (Al_2O_3) obtenidos según la metodología planteada por Reyes (2016), se presentan a continuación, donde se observa una buena definición de las bandas características de las materias primas sintetizadas, por lo cual los productos son de alta pureza y cristalinidad.

En el espectro de HA (Figura 6) se pueden identificar bandas de estiramiento para el grupo PO_4^{3-} en 345, 770, 1 020 cm^{-1} respectivamente, se observan bandas de estiramiento cristalino en 590, 640 cm^{-1} del grupo PO_4^{3-} presentes en la hidroxiapatita cristalina, y bandas de 3 500 cm^{-1} para el grupo OH^- .

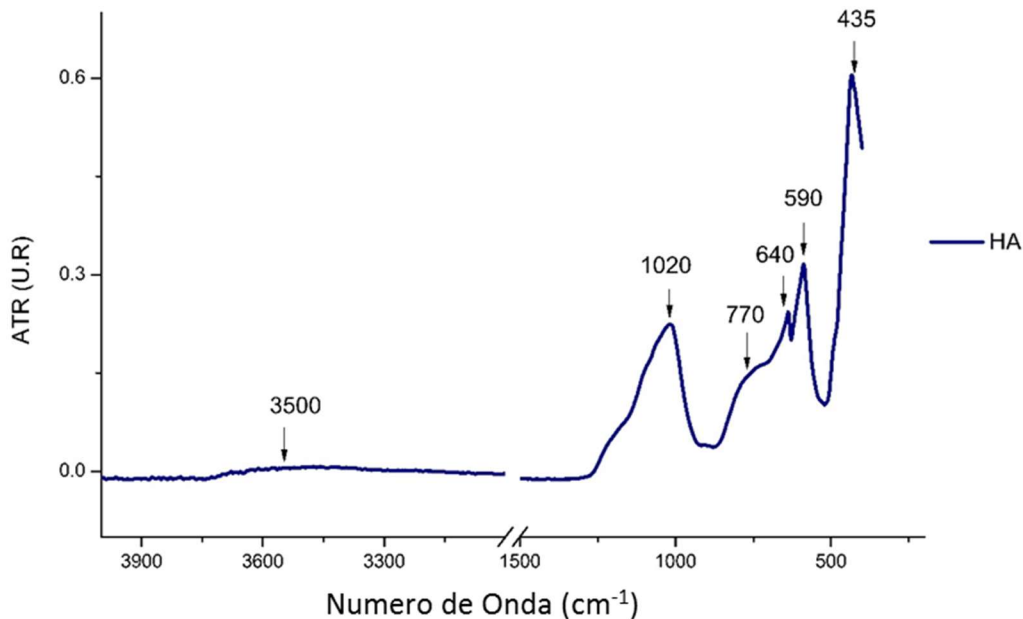


Figura 61. Identificación de grupos funcionales presentes en Hidroxiapatita (HA). ATR – reflexión total atenuado (por sus siglas en inglés), U.R. –unidades relativas.

En el espectro se observa la hidroxiapatita sintetizada que presenta bandas similares a las observadas en otros estudios como se muestra en la Tabla I reafirmando la formación de hidroxiapatita de fosfato, obtenido a partir de precipitación química de nitrato de calcio y fosfato de amonio di-básico.

La hidroxiapatita fosfátada obtenida de forma sintética presenta la misma composición química a la producida de forma natural por el cuerpo humano (García y Reyes, 2006), siendo posible su utilización para la elaboración de un material con características regenerativas. Por medio de la espectroscopia infrarroja mostrada en la Figura 6, se observa que en comparación con la literatura la hidroxiapatita elaborada no presenta carbonato de apatita, por la ausencia de bandas de 1 600 cm^{-1} en la presencia de CO_3^{2-} , mostrando que la hidroxiapatita obtenida es pura. Otras literaturas muestran variaciones en las vibraciones en el grupo PO_4 (962, 602, 564, 472, 1032 cm^{-1}) y para el OH^- (632 cm^{-1}). Poralan y colaboradores (2015) por su parte señalan vibraciones 500-620 cm^{-1} en la HA cristalina, además de bandas de 900 y 1 200 cm^{-1} para PO_4 , y vibración de 3 643 cm^{-1} en OH^- . Con respecto a la literatura la hidroxiapatita elaborada la cual presenta estructura cristalina y es corroborado con el espectro.

Tabla I. Longitudes de onda pertenecientes a la estructura química de la hidroxiapatita.

| Enlace | Hidroxiapatita sintetizada | Hossein (2008) | Martínez (2008) Sequeda (2012) |
|---------------------------------|----------------------------|------------------------|--------------------------------|
| PO ₄ v | 435 cm ⁻¹ | | 472 cm ⁻¹ |
| PO ₄ v | 590 cm ⁻¹ | 561 cm ⁻¹ | 564 cm ⁻¹ |
| PO ₄ v _{cr} | 640 cm ⁻¹ | 603 cm ⁻¹ | 602 cm ⁻¹ |
| PO ₄ v _{cr} | 770 cm ⁻¹ | | 962 cm ⁻¹ |
| PO ₄ v | 1 020 cm ⁻¹ | | 1 032 cm ⁻¹ |
| CO ₃ ⁻² v | | 1,600 cm ⁻¹ | 632 cm ⁻¹ |
| OH ⁻ v | 3,500cm ⁻¹ | 3,555 cm ⁻¹ | |
| OH ⁻ v | | 622 cm ⁻¹ | |

(v) estiramiento, (v_{cr}) estiramiento Cristalino

En el patrón de difracción de los polvos de hidroxiapatita sintetizados (Figura), se observa el pico principal de la hidroxiapatita, con la mayor intensidad a 31,5° correspondiente al plano (211), acompañado por dos de menor intensidad a 32° y 33° propios de los planos (112) y (300), algunos picos secundarios a 25,5°, 34°, 39,5°, 41,5° y 49° de los planos (002), (202), (310), (222) y (213); al compararse con la tarjeta estándar JCPDS-09-0432 para hidroxiapatita, muestra la hidroxiapatita obtenida picos bien definidos con una alta intensidad presentes en la morfología cristalina, obteniendo una hidroxiapatita pura y cristalina.

En conjunto el análisis de espectroscopia infrarroja y difracción de rayos X nos muestran que la hidroxiapatita elaborada es cristalina y pura, lo cual nos permite compararla con la hidroxiapatita del hueso, a diferencia de otras hidroxiapatitas sintéticas que tiene CO₃ el cual es utilizado para proveer mayor dureza, afectando a la solubilidad de la hidroxiapatita, y la interacción celular (Botero, 2016), siendo más viable la utilización de hidroxiapatita pura, para la obtención de un material más soluble, con mayor capacidad degradativas.

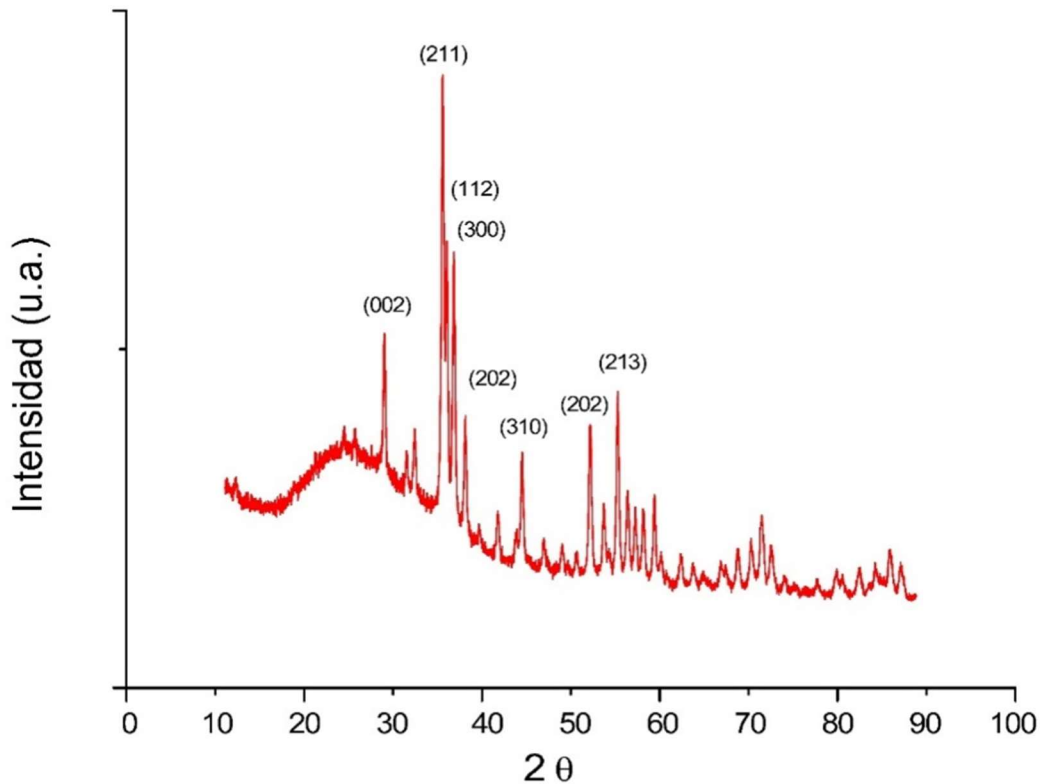


Figura 7. Identificación de fase cristalina de la hidroxiapatita sintetizada.

En la espectroscopia de α -Alúmina (Figura 8) se obtuvieron las vibraciones correspondientes a una estiramiento por flexión a 390 cm^{-1} del enlace de Al-O y un estiramiento por tensión del grupo Al-O $440, 570, 640\text{ cm}^{-1}$ las cuales son características de la fase alfa de la alúmina, como menciona Boumaza y colaboradores (2009), los cuales obtuvieron la formación de la α -alúmina entre las longitudes de $350\text{ a }650\text{ cm}^{-1}$ marcando que las bandas principales fueron a $386, 457, 484, 608\text{ y }645\text{ cm}^{-1}$ siendo la longitud de 386 cm^{-1} una flexión del Al_2O_3 y la longitud de 457 cm^{-1} el estiramiento de Al_2O_3 , mostrando que la α -alúmina obtenida es pura. En la Figura 9 se muestra el patrón de difracción de los polvos de α -alúmina después del proceso de sinterización, donde se observan los planos principales más intenso de la fase α -alúmina: con una intensidad de $65^\circ, 47.99^\circ, 39^\circ\text{ y }46.2^\circ$ correspondientes al plano (116), (113), (104) y (300), se observa en el difractograma picos con una intensidad media a $57.4^\circ\text{ y }75.4^\circ$ propias del plano (024) y (214) y picos secundarios con una intensidad a $28.5^\circ, 42.3^\circ, 57.4^\circ, 45.2^\circ\text{ y }86.3^\circ$ correspondientes al plano (012), (110), (018) y (119) (Reyes *et al.*, 2013) el cerámico sintetizado de α -alúmina presenta picos intensos y definidos de la fase α -alúmina pura y cristalina al compararse con la tarjeta estándar JCPDS 10-0173 para α -alúmina mostrando que la obtención de alúmina en fase alfa, la cual se caracteriza por ser un material con alta resistencia y mayor estabilidad que

permite su utilización como componente que aporte resistencia y dureza (Reyes. *et al*, 2013).

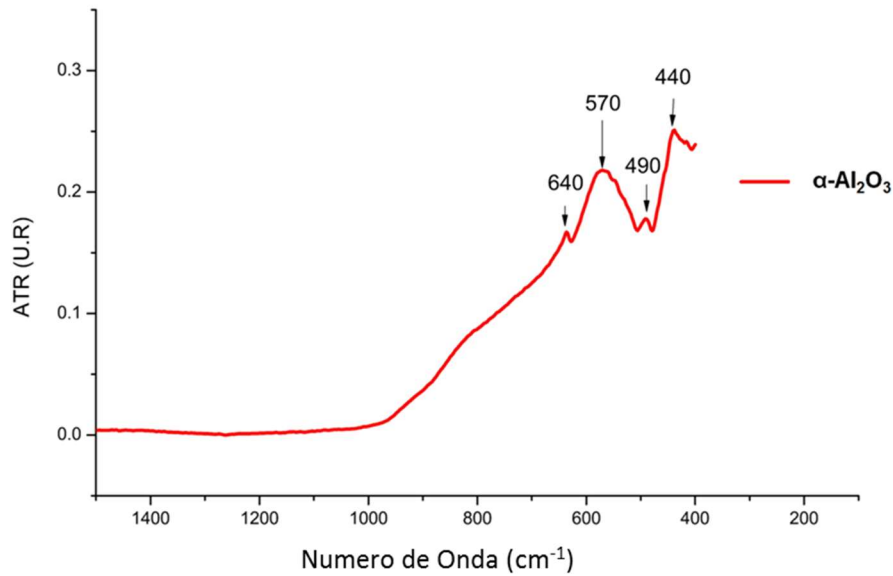


Figura 8. Identificación de grupos funcionales presentes en α -alúmina (Al_2O_3). Reflexión total atenuada por sus siglas en inglés (ATR), Unidades Relativas (U.R)

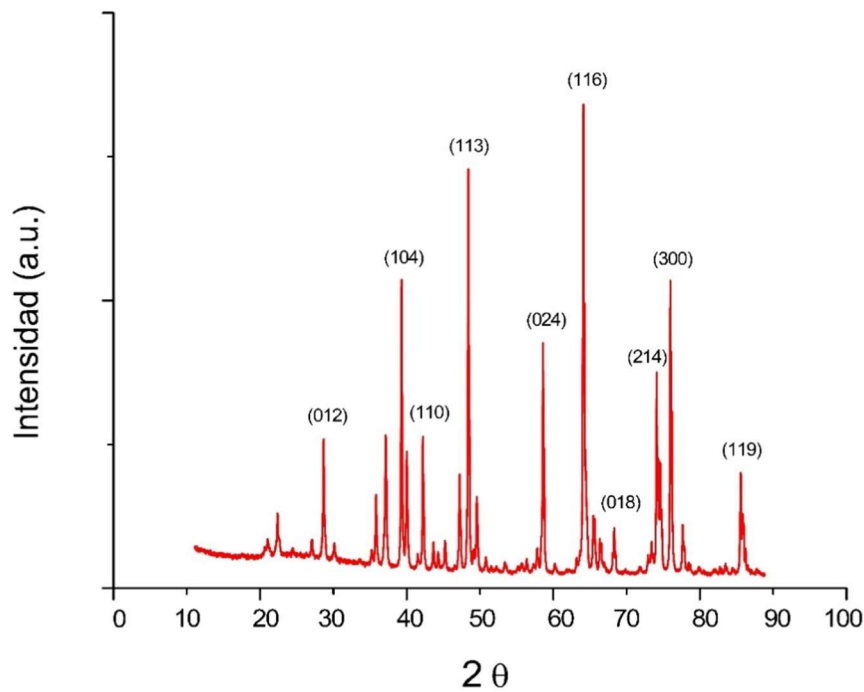


Figura 92. Identificación de fase cristalina de la α -alúmina sinterizada.

El análisis obtenido por Espectroscopia Infrarroja y difracción de rayos X nos muestran que el método de Fabiola Mejía (2015) nos permite obtener alúmina pura en fase alfa, la cual es de gran importancia, debido a que la fase la alfa presenta mayor dureza, a diferencia de otras fases que presenta la alúmina, contribuyendo a la elaboración de un andamio con mayor dureza.

6.2 Obtención de los compósitos

Para la obtención de fibras por el método de electrohilado se buscaron los parámetros adecuados, durante el proceso la formación del cono de Taylor definido nos indica que existe un rompimiento de la tensión superficial de la solución polimérica de la aguja al colector dando la formación de fibras constantes. Los parámetros observados para obtención de fibras de PCL, PCL-HA, PCL- α -Al₂O₃, y PCL-HA- α -Al₂O₃ se presentan en la Tabla II. Las fibras de PCL-HA utilizaron una distancia de 12 cm, con un voltaje de 11 Kv y un flujo de 10 μ l/min; en las fibras de PCL- α -Al₂O₃ la distancia se mantuvo, el voltaje disminuyó a 9 Kv y el flujo aumento a 13 μ l/min, debido a una mayor conductividad de la suspensión de la alúmina. Mientras que para las fibras de PCL-HA- α -Al₂O₃ fue necesario aplicar una mayor cantidad de flujo para la expulsión de la suspensión debido a la disminución de movilidad presentada por el aumento de la cerámico empleado, el aumento de voltaje provoca la expulsión de las partículas al cargarlas ayudando al flujo del polímero el cual es afectado por la humedad debido a las características hidrófobas presentadas por el polímero, dificultando la evaporación del solvente y el flujo de este, el aumento de la distancia es debido a que se busca una mayor volatilización del solvente y el alargamiento de las fibras, los parámetros utilizados influyen en la morfología que presentan las fibras, como se observa en las Figura 19 a la 23.

Tabla I. Parámetros para la obtención de fibras por el método de electrohilado

| Parámetros/ Compuestos | Distancia (cm) | Humedad (%) | Voltaje (Kv) | Flujo (μ l/min) |
|--|----------------|-------------|--------------|----------------------|
| PCL | 10 | | 8 | |
| PCL-HA | 12 | 35 | 11 | 10 |
| PCL- α -Al ₂ O ₃ | 12 | 39 | 9 | 13 |
| PCL-HA- α -Al ₂ O ₃ | 13.5 | 42 | 11 | 16 |

(PCL) Polye-caprolactona, (HA) Hidroxiapatita, (α -Al₂O₃) Alúmina

El método de electrohilado nos permite obtener fibras nanométricas las cuales son recolectadas en forma de membrana, obteniendo fibras de diferente tamaño el cual es

dado por la interacción de los parámetros de humedad, concentración, voltaje, distancia, el equilibrio de dichos parámetros permite la formación del cono de Taylor indicando la formación constante de fibras, para la formación se buscó controlaron los parámetros de voltaje, flujo y distancia para la obtención constante de fibras y formar una membrana polimérica. El aumento de concentración influye al cambiar la viscosidad de la solución, un aumento elevado de concentración provoca el crecimiento de la fibra y dificulta el proceso de electrohilado, necesitando el aumento de voltaje para poder romper las cadenas poliméricas de la solución, y causar el desprendimiento de la solución. El voltaje es utilizado para el rompimiento de la tensión superficial de la solución polimérica, la carga eléctrica causara el desprendimiento de la solución para la formación de fibras continuas, la sobrecarga causara que la solución sea dispersada de forma brusca hacia el colector provocando la obtención de gotas. La distancia influye en el tamaño de la fibra; su aumento provoca la prolongación de tiempo para el estiramiento de la fibra, permitiendo la volatilización del solvente, y la obtención de fibras más delgadas, la disminución de la distancia influye en el tiempo de volatilización provocando la formación de una película laminar. El control de la humedad no fue posible debido a la falta de equipo, los valores presentes en la Tabla VI permite la obtención de fibras constantes, lisas, y tubulares como se observan en las Figuras 20, 21, 22, 23 y 24 realizados por medio de MEB obteniendo membranas lisas, de morfología constante, con variedad de tamaños, este aspecto es influenciado por el método del electrohilado, y por las propiedades de los materiales usados. La obtención de fibras entrelazadas ayuda a la adhesión celular, facilitando el crecimiento celular (Park, *et al.*, 2011), la formación de los espacios membranales permite el flujo celular.

6.3 Composición química de los compósitos

Se realiza el estudio por espectroscopia infrarroja para reafirmar la composición de las membranas y la presencia de las partículas cerámicas que fueron suspendidas en la solución polimérica. En el espectro infrarrojo de Polye-caprolactona (Figura 10) presenta bandas por vibraciones de estiramiento asimétrico a $2,943\text{ cm}^{-1}$ para el grupo O-H, y estiramientos por deformación a $2,865\text{ cm}^{-1}$ para el grupo O-H, bandas de vibraciones por estiramiento a $1,720\text{ cm}^{-1}$ para C=O, bandas por estiramiento cristalino a $1\ 365, 1\ 470\text{ cm}^{-1}$ para el grupo C-O-C, y bandas de vibraciones por estiramiento asimétrico a $1\ 240, 1\ 110, 1\ 165, 960, 732, 450\text{ cm}^{-1}$ para el grupo C-O-C. Encontramos en la espectroscopia infrarroja de Polye-caprolactona vibraciones en $2800, 2650\text{ cm}^{-1}$ correspondiente de CH_2 , de 1650 cm^{-1} correspondiente de C=O, $1,490$ de $1,100\text{ cm}^{-1}$ correspondientes de COC, cm^{-1} , se observa en el espectro las bandas pertenecientes a los grupos funcionales que componen a la PCL.

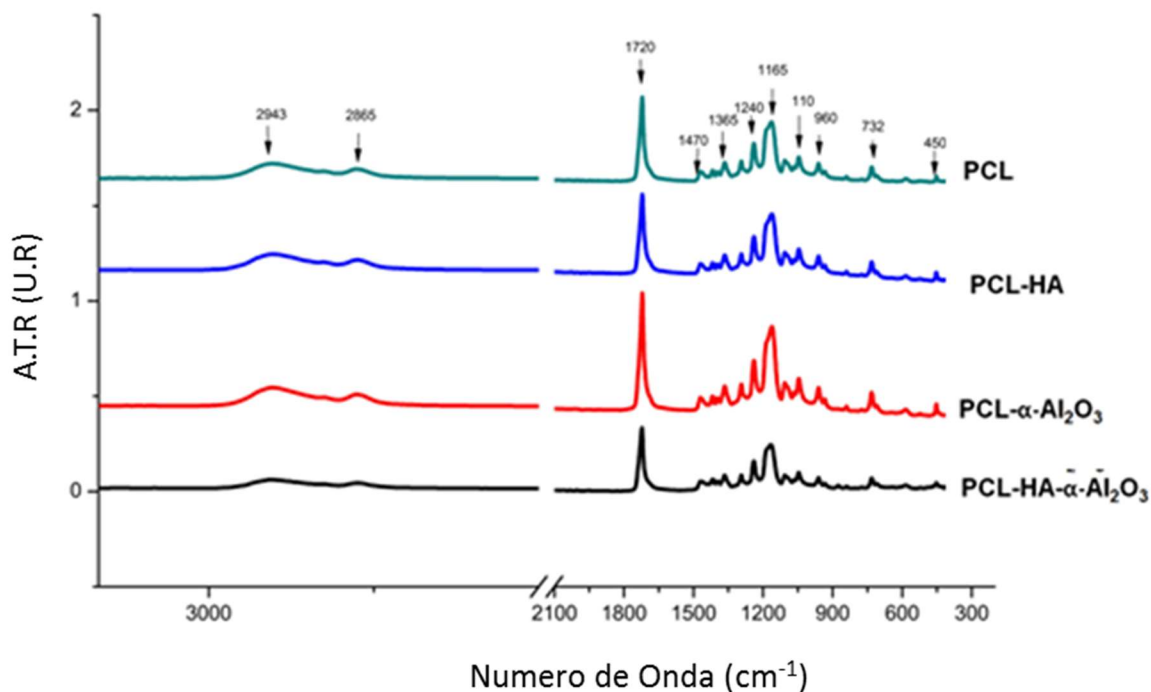


Figura 30. Identificación de grupos funcionales presentes en las membranas poliméricas. Reflexión total atenuada por sus siglas en inglés (ATR), Unidades Relativas (U.R), Polycaprolactona (PCL), Hidroxiapatita (HA), Alúmina (α - Al_2O_3).

En la Tabla III se observan las bandas de infrarrojo mostrando que todas las fibras presentan las mismas longitudes de onda esto es debido a que las partículas de alúmina e hidroxiapatita se encuentran en menor proporción en la suspensión polimérica, además que se encuentran embebidas en el polímero, la radiación infrarroja no penetra el material, y no es posible observar las vibraciones características de alúmina e hidroxiapatita, obteniendo las bandas vibracionales características de PCL.

Tabla II. Longitudes de Onda pertenecientes a la composición química de las fibras de PCL, PCL-HA, PCL-Al₂O₃, PCL-HA-Al₂O₃

| Tipo de Enlace | PCL de Onda (cm ⁻¹) | Log de Onda (cm ⁻¹) | PCL-HA de Onda (cm ⁻¹) | Log de Onda (cm ⁻¹) | PCL- Al ₂ O ₃ , Log de Onda (cm ⁻¹) | PCL-HA- Al ₂ O ₃ Log de Onda (cm ⁻¹) |
|-----------------------|------------------------------------|------------------------------------|---------------------------------------|------------------------------------|--|--|
| C-O-C ν_f | 450 | | 450 | | 450 | 450 |
| C-O-C ν | 732 | | 732 | | 732 | 732 |
| C-O-C ν | 960 | | 960 | | 960 | 960 |
| C-O-C ν | 1100 | | 1100 | | 1100 | 1100 |
| C=O ν_{cr} | 1165 | | 1165 | | 1165 | 1165 |
| C-O-C ν_f | 1240 | | 1240 | | 1240 | 1240 |
| C-O-C ν_f | 1365 | | 1365 | | 1365 | 1365 |
| C-O-C ν_f | 1470 | | 1470 | | 1470 | 1470 |
| C=O ν_{cr} | 1720 | | 1720 | | 1720 | 1720 |
| CH ₂ ν | 2865 | | 2865 | | 2865 | 2865 |
| CH ₂ ν | 2943 | | 2943 | | 2943 | 2943 |

(PCL) Polyε-caprolactona, (HA) Hidroxiapatita, (α-AL₂O₃) Alúmina, (ν) estiramiento, (ν_{cr}) estiramiento cristalino

6.4 Morfología de los compósitos

Compósito de PCL

En la Figura 11 se observa la microestructura de las fibras obtenidas de PCL, en donde se puede apreciar que las fibras no presentan el mismo diámetro. En la Figura 20 a), y b) se observan que las fibras son constantes, lisas, y que no muestran imperfecciones en su morfología presentando un tamaño fibrilar de $0,84 \pm 0,23 \mu\text{m}$.

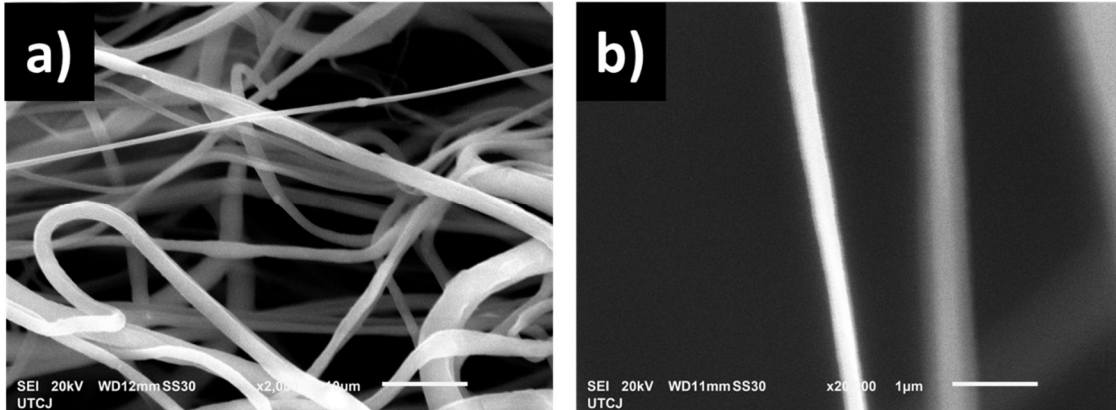


Figura 11. Morfología de Polyε-caprolactona 10% p/v observada por MEB a) 2 000X y b) 20 000X.

PCL-HA

Se observa que las fibras obtenidas de PCL-HA (Figura 12) son unidireccionales, con diámetros diferentes. En la Figura 21 b) se observa que la HA se encuentra embebida en la PCL reafirmando la presencia de HA, a pesar de que no fue posible su visualización en el espectro infrarrojo es posible la visualización de las partículas por medio de Microscopia Electrónica de Barrido (MEB), lo cual nos indica que la HA se encuentra dispersa en la solución del polímero, también se aprecia que la fibra es lisa y con forma tubular. Con un tamaño fibrilar de $0,96 \pm 0,32 \mu\text{m}$

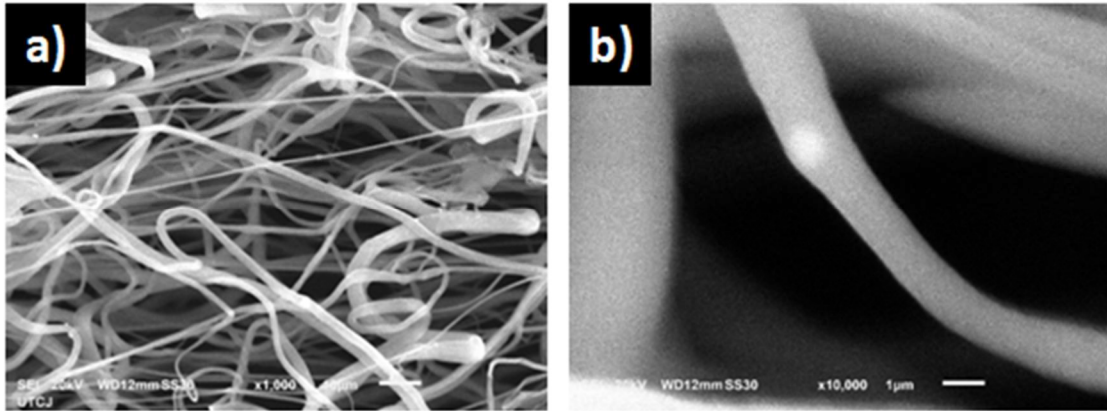


Figura 12. Morfología de fibras de PCL-HA 10% p/v observada por MEB, a) 1,000 X y b) 10,000 X.

PCL- α Al₂O₃

En la Figura 13 se muestran diferentes magnificaciones hechas por microscopía electrónica de barrido a una muestra de nanofibras de PCL al 10% con 2% de α -Al₂O₃. La micrografía Figura 13 a) otorga un panorama general de las fibras de la muestra, donde se encuentran muy pocos defectos, permitiendo observar una forma de huso, y que aumentan el diámetro promedio de las fibras. En la imagen 13 b) se observa a mayor detalle las partículas de α -Al₂O₃ que se encuentran en bebidas en la parte superior de la fibra. En las 2 micrografías que componen la figura es posible observar que las fibras son rugosa y continuas, sin embargo, se distribuyen al azar a lo largo del plano y su diámetro es variable. Además, se aprecian algunas aglomeraciones de α -Al₂O₃ en la parte externa de las fibras. Las fibras presentan un tamaño de $1,13 \pm 0,41 \mu\text{m}$

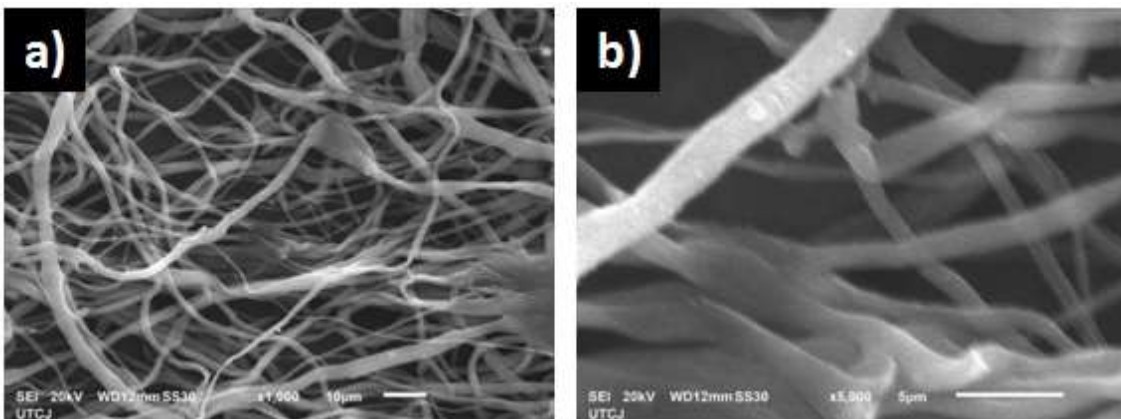


Figura13. Morfología de fibras de PCL-Al₂O₃ 10% p/v observada por MEB, (a) 1,000 X y (b) 5 000 X.

PCL-HA- α Al₂O₃

La Figura 14 y 15 se muestran la microestructura de las nanofibras de PCL-HA- α -Al₂O₃ en diferentes aumentos por medio de micrografías de Microscopía Electrónica de Barrido (MEB) mostrando contraste entre las partículas de HA y α -Al₂O₃ presentando un brillo por parte de la HA, mientras que las más opacas son por la presencia de la α -Al₂O₃, obteniendo fibras de un tamaño $1,39 \pm 0,64 \mu\text{m}$

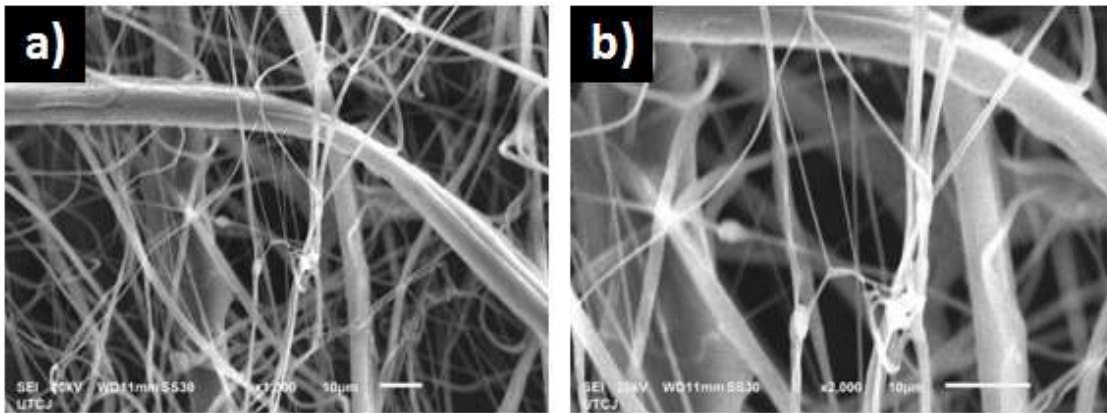


Figura14. Morfología de fibras de PCL-HA-Al₂O₃ 10% p/v observada por MEB, (a) 1,000 X y (b) 2 000 X

Se obtuvo mediante la técnica de espectrometría de energía dispersiva de rayos X (EDX) la composición química de las fibras (Figura 15 d), mostrando al carbón como el elemento predominante (57.12%) seguido del Oxígeno (26.94%), después calcio (8.95%), fósforo (4.19%) y aluminio (2.76%), siendo el carbón el compuesto predominante indicando la presencia de Polye-caprolactona, la presencia de calcio, fósforo, indica la presencia de hidroxiapatita presente y aluminio la presencia de alúmina, el oxígeno se muestra en dicho porcentaje ya que este es parte de los tres componentes. Se observa que no hay gran diferencia en los parámetros utilizados para la realización de fibras, pero se puede observar que las pequeñas diferencias son visibles en el tamaño de las fibras, uno de los parámetros que influye es el flujo en las fibras de PCL-HA- α -AL₂O₃, el cual es mayor, provocando un aumento en el tamaño de las fibras (Duque, *et al.*, 2014), a diferencia de los de PCL-HA y PCL- α -AL₂O₃ que poseen un flujo menor; mientras que la diferencia de tamaño en las fibras de PCL-HA y PCL- α -AL₂O₃ es debido a la conductividad eléctrica causando que las fibras de PCL- α -AL₂O₃ presenten mayor tamaño debido a que posee mayor conductividad eléctrica lo cual facilita mayor salida de la solución provocando un mayor tamaño de las fibras.

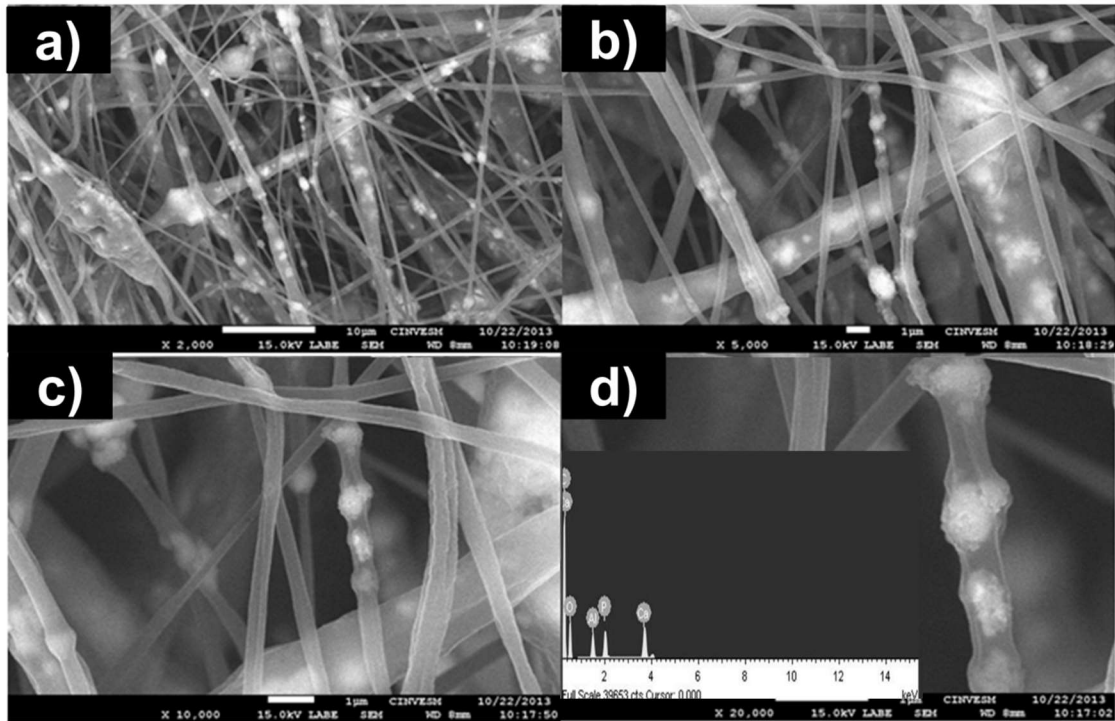


Figura 15. Morfología de las fibras de PCL-HA- Al_2O_3 10% p/v observada por MEB, a) 2,000 X, b) 5,000 X, c) 10,000 X, d) 20,000 X. y su composición química.

Análisis térmico

En el DSC realizado de PCL se observa un pico exotérmico a $62.35\text{ }^\circ\text{C}$, mientras que en PCL-HA esta aumenta a $62.38\text{ }^\circ\text{C}$ y con PCL- $\alpha\text{Al}_2\text{O}_3$ aumenta a $62.72\text{ }^\circ\text{C}$, observando que al introducir los cerámicos el punto de fusión aumenta, mostrando que las fibras de PCL- Al_2O_3 son las que necesitan una mayor aplicación de calor (Figura 16 a), mientras que en el proceso de cristalización ocurre a una menor temperatura en las fibras de PCL (Figura 16 b). En la Tabla IX se muestran los valores de entalpia de los procesos de cristalización y fusión a las temperaturas observadas. Obteniendo que la presencia de los cerámicos disminuye la pureza del material provocando la disminución del trabajo para llevar a un punto de fusión y cristalización del material, siendo importante conocer si el material es capaz de resistir las temperaturas presentes en el cuerpo humano, obteniendo que el material no es afectado por las altas temperaturas debido a que la temperatura máxima que puede llegar el cuerpo humano es de $41\text{-}42\text{ }^\circ\text{C}$, obteniendo que las membranas presentan propiedades cristalinas en el cuerpo humano al encontrarse a una temperatura de $37\text{ }^\circ\text{C}$ siendo esta temperatura normal en el cuerpo humano. Por lo cual se observa que el compuesto no se verá afectado por la temperatura del cuerpo humano.

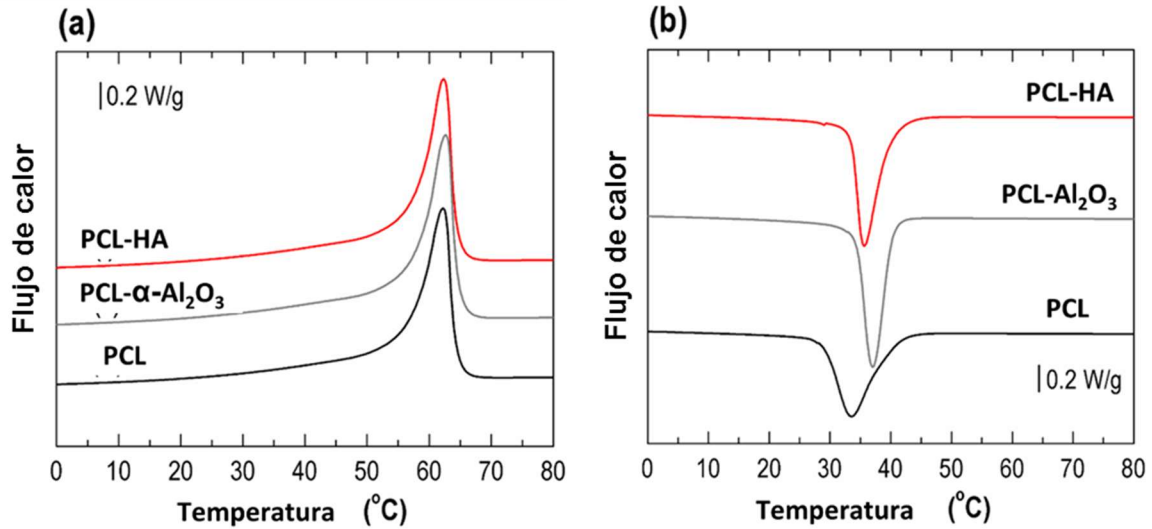


Figura 16 DSC Termograma de PCL-HA, PCL- α - Al_2O_3 y PCL. (a) incremento $10^\circ\text{C}/\text{min}$ y (b) decremento $10^\circ\text{C}/\text{min}$.

Tabla IIIV. Propiedades termoquímicas de las fibras

| Fibras | T_m ($^\circ\text{C}$) | PCL ΔH_m (J/g) | T_c PCL ($^\circ\text{C}$) | ΔH_c (J/g) |
|------------------------------------|-------------------------------|------------------------|--------------------------------|--------------------|
| PCL | 62.35 | 43.08 | 33.66 | 54.65 |
| PCL-HA | 62.38 | 35.49 | 35.67 | 47.15 |
| PCL- $\alpha\text{Al}_2\text{O}_3$ | 62.72 | 35.62 | 37.06 | 48.96 |

(PCL) Polye-caprolactona, (HA) Hidroxiapatita, (α - Al_2O_3) Alúmina.

6.5 Citotoxicidad de los compósitos

Se observa en la Figura 17 la actividad biológica de las células al aplicar el material compuesto de PCL, se obtuvo que el material no causa muerte celular, obteniendo a las 24 h un crecimiento de 114% siendo mayor que el control; su aceptación es debido a la utilización del polímero como fuente de energía, ayudando la PCL en el crecimiento

celular; a las 48 h se observa una mayor aceptación del polímero al presentar un crecimiento de 122%, a las 72 h se observa un crecimiento de 227% donde se presenta la mayor proliferación, y a las 96 h una proliferación de 87%, y a las 120 h se observa que el crecimiento alcanzo una proliferación de 82%, la disminución que se observa a las 96 h es debido a la falta de área superficial causando que las células no puedan adherirse, evitando la metabolización de la membrana causando la falta de metabolitos para su proliferación, provocando el proceso de muerte celular.

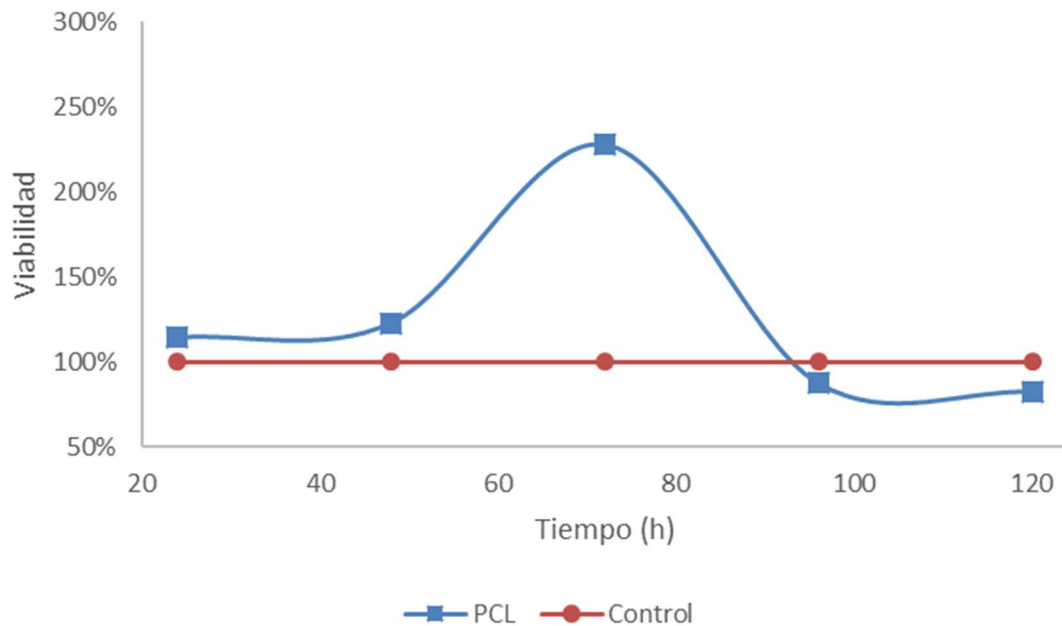


Figura17. Proliferación celular durante un periodo de 24h a 120 h de PCL.

En la prueba de viabilidad de la membrana de PCL con hidroxiapatita (HA) (Figura 18) se obtiene que no presenta toxicidad, debido que en periodo de 24 h se tiene una proliferación celular del 114%, a las 48 h la reproducción celular aumenta un 189% esta aceptación es debido a que la hidroxiapatita es un mineral que es útil para la fabricación de colágeno tipo I, el cual es utilizado para la fabricación de fibras celulares, a las 72 h la reproducción fue 231%, a las 96 h se ve un crecimiento de 78%, posteriormente a las 120 h se observa un crecimiento de 65%. la disminución de la proliferación observada a las 96 h es causada a la falta de espacio para la adhesión celular y la saturación de células en superficie de la membrana polimérica en bebida con partículas de Hidroxiapatita, la falta de contacto con la membrana causa la disminución de metabolitos provocando muerte celular por lo cual se ve afectado el pH del medio

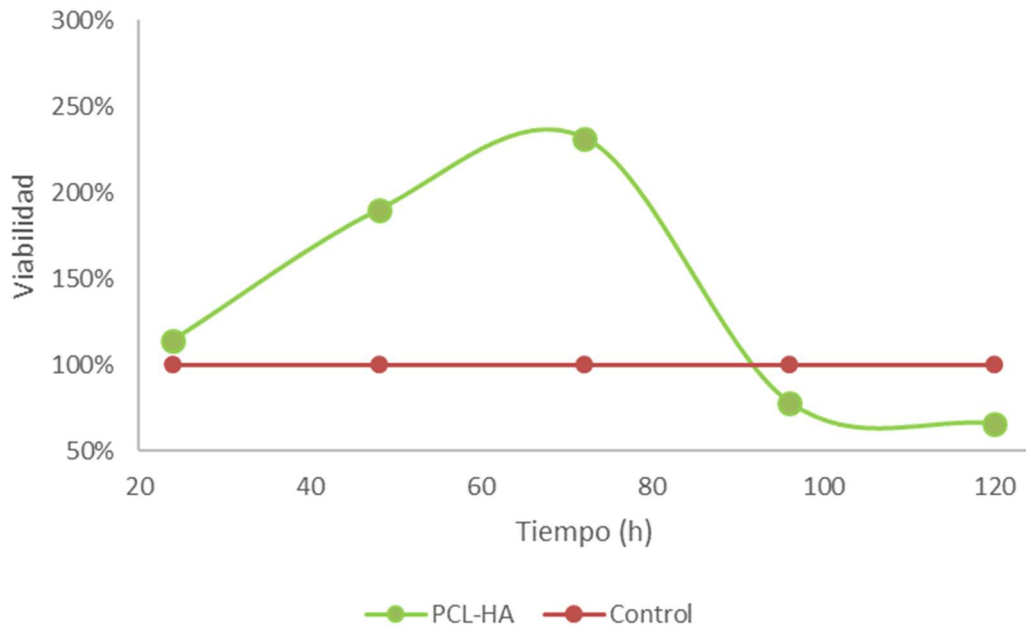


Figura18. Proliferación celular durante un periodo de 24h a 120 h de PCL-HA.

En la Figura 19 se muestra los resultados de viabilidad de la membrana polimérica embebida con partículas de Alúmina no presentan toxicidad debido a que a las 24 h se observa una proliferación celular de 143%, a las 48 h se observa una proliferación celular de 139% este incremento se debe a que las partículas de Alúmina dan una mayor firmeza a la membrana polimérica de PCL, facilitando la movilidad celular, a las 72 h se observa una proliferación de 219%, a las 96 h se observa una proliferación de 82%, a las 120 h se observa una proliferación de 71%, la disminución de proliferación celular presente a las 96 y 120 h es debido a que hay una menor área de contacto con la membrana celular causada por el incremento celular presentado a las 72 h.

En la Figura 20 se observa la viabilidad de la membrana polimérica de PCL con las partículas de Hidroxiapatita y Alúmina, presentando a las 24 h una gran compatibilidad teniendo una proliferación de 152%, mostrando la aceptación del compuesto siendo viable para la regeneración celular siendo una material que aporta minerales y nutrientes y resistente para la movilidad celular , a las 48 h se observa una proliferación de 161% manteniendo un crecimiento celular constante, a las 72 h se observa una proliferación de 238%, a las 96 h una proliferación de 104%, y a las 120 h una proliferación de 59% el decrecimiento presente a las 96 h es debido a la falta de área de superficie y contacto con el compuesto obteniendo.

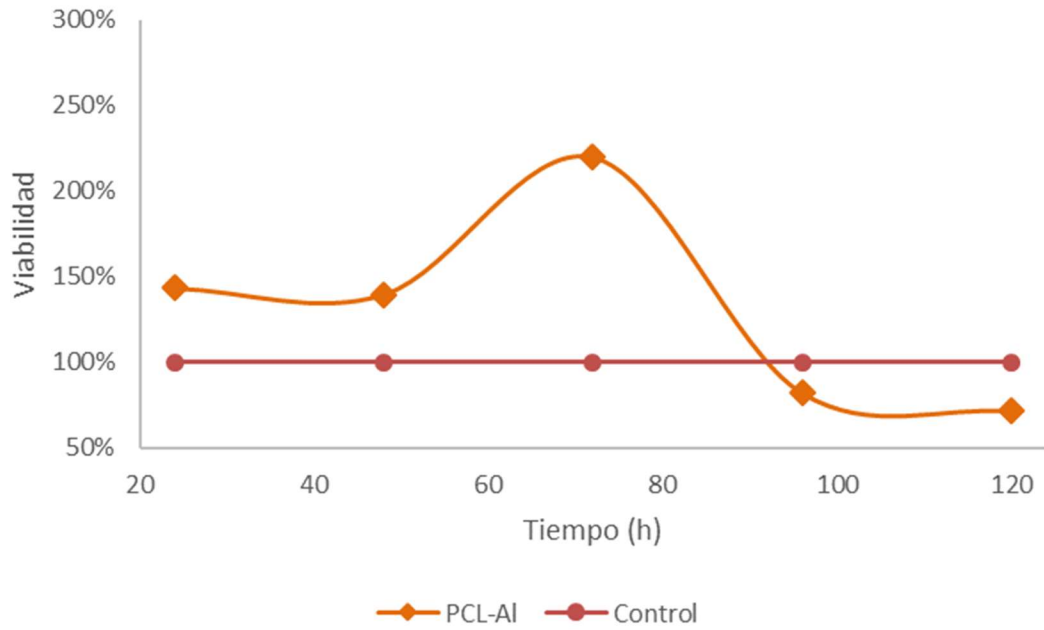


Figura 19 Proliferación celular durante un periodo de 24h a 120 h de PCL-Al₂O₃.

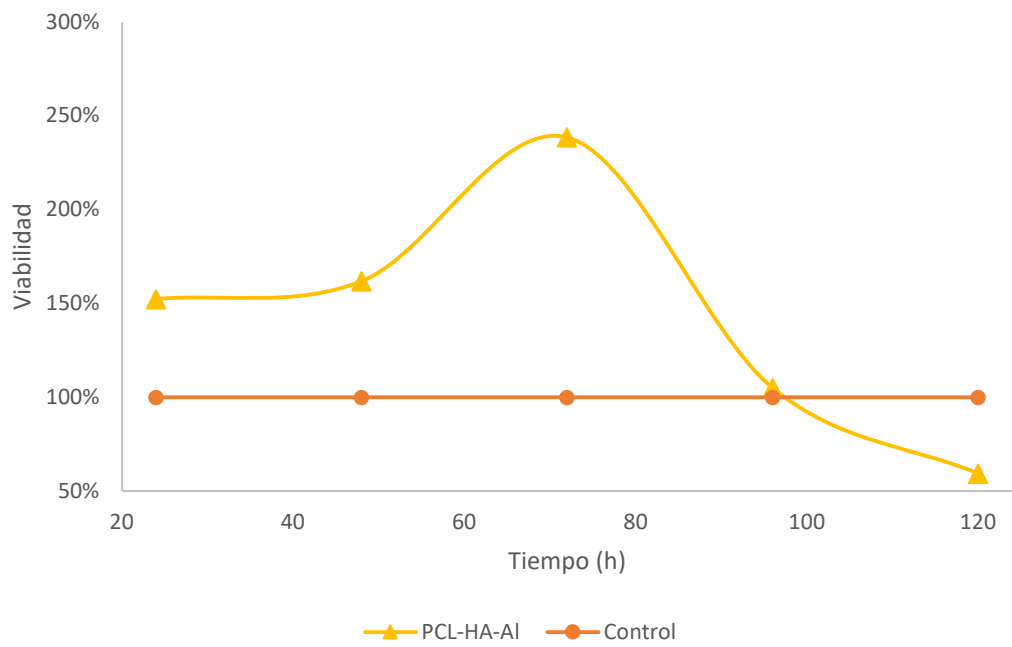


Figura 40. Proliferación celular durante un periodo de 24h a 120 h de fibras de PCL-HA-Al₂O₃

En el diagrama de viabilidad de la Figura 21 se observa que todos los compósitos favorecen el crecimiento celular, y no presenta efecto toxico, teniendo el compósito de PCL-HA-Al₂O₃ con la mayor proliferación a las 72 h con un valor de 238%, seguido del compósito de PCL-HA con una proliferación de 231%, a las 72 h, y el compósito de PCL-α Al₂O₃ una proliferación celular con un valor de 219%, seguido del compósito de PCL con un valor de 227%, en el análisis de datos se obtuvo un ANOVA con una significancia de 0.0001, F de 240.61, grados de libertad (gl) entre grupos de 19, y gl dentro de los grupos de 40, Obteniendo en el análisis de comparativas por Tukey que no existe diferencia en el crecimiento que se presentó a las 72 h en los compósitos de PCL-HA-Al₂O₃ y PCL-HA, los cuales presentan una mayor proliferación, mientras que los compósitos de PCL y PCL-Al₂O₃ presentan el mismo nivel de crecimiento célula, al ser parte del mismo grupo. A las 96 h se observar un descenso de proliferación celular para todos los compósitos, este descenso es provocado por la falta de área superficial la cual es necesaria para una adhesión celular, para que la célula extraiga de los nutrientes que aporta el compósito para el aumento de la proliferación celular, la falta de área superficial causa la muerte celular.

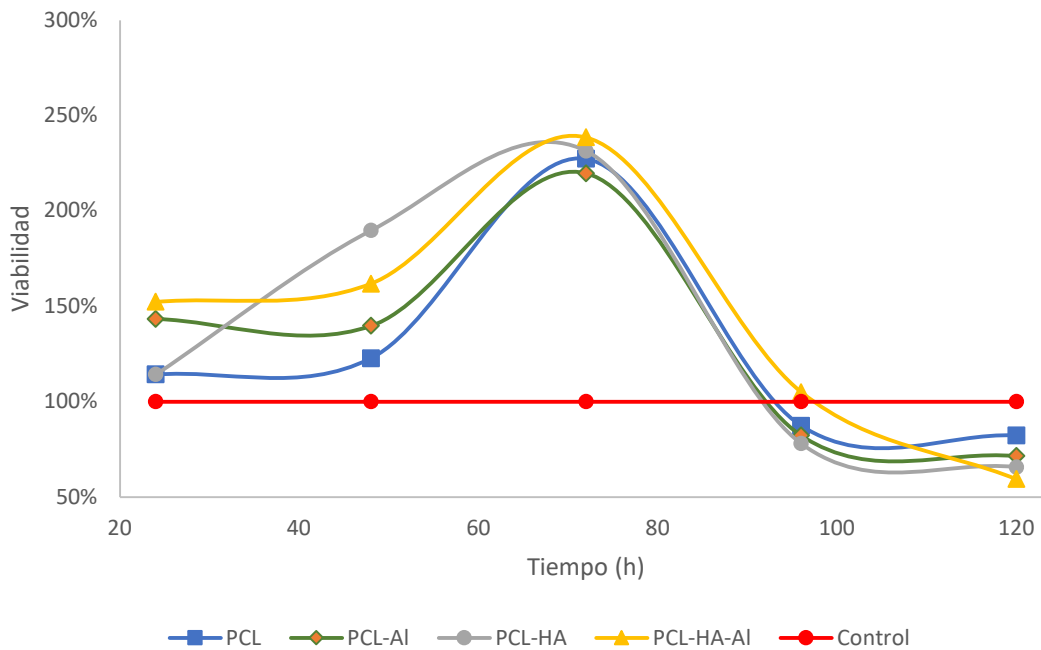


Figura21. Proliferación celular durante el periodo de 24h a 120 h

La HA la cual es conocida por su capacidad de conducción celular e inducción celular, al proveer al compósito iones de Ca, que ayuda a la suspensión de HPO₄²⁻ permitiendo la asimilación de los iones, al establecer estos intercambios químicos permite la formación de enlaces interfaciales en el tejido vivo, favoreciendo al proceso de integración y la formación de tejido (Londoño, 2006) Mientras que en el compósito de PCL y PCL-Al₂O₃ no

contiene compuestos que establezcan intercambios químicos, comenzando un proceso de oxidación de la PCL para la formación ácido láctico que es asimilado para transformarse en energía, mientras que la alúmina es inerte y esta no es metabolizada por las células obteniendo áreas de contacto donde no hay metabolitos para la célula.

La obtención de HA pura nos permite tener un compósito el cual presenta iones que le proporcionan la capacidad de sustitución parcial o completa de iones de PO_4 por HPO_4^{2-} , Ca^{2+} por K^+ o Mg^{2+} , OH^- por F^- , Cl^- , Br^- proporcionando su propiedad de solubilidad contribuyendo a la utilización del cerámico como fuente intercambiable de iones los cuales intervendrá en la metabolización celular ayudando a la integración del compósito, mientras que la alúmina permanecerá inerte, proveyendo más soporte en el compósito, el cual facilitara la movilidad celular. La alúmina no presenta radicales libre y la obtención de la fase alfa nos permite tener un cerámico que tiene como característica una gran estabilidad a diferencia de las otras fases que puede presentar la alúmina siendo posible la formación de complejos mononucleares estables con fosfato, fluoruro, sulfatos y silicato con alúmina, compitiendo con las reacciones de hidrolisis en soluciones de fosfato predominando la precipitación causando poca interacción con las células presentes en el medio atribuyéndole una menor viabilidad celular .

Es viable la obtención de los compósitos fibrilares para su utilización como andamio debido a su similitud con las fibras que se encuentran presentes en el tejido muscular, permitiendo así su asimilación por estructuras celulares como los fibroblastos, los cuales pertenecen al tejido conectivo y se encuentran encargados de la elaboración y reparación de la matriz extracelular, para su cicatrización (Arenas, 2010) , al secretar colágeno para mantener la estructura biología del tejido, por lo cual la oxidación de la PCL para la fabricación de ácido láctico ayudara a la formación de ATP, dicha energía será utilizada para diferentes procesos metabólicos de la célula, entre ellos el proceso de fabricación de fibras de colágeno y la proliferación celular.

En la Figura 22 se observa las fibras de PCL después del contacto celular por 48 h mostrando que al estar en contacto los fibroblastos con el compósito empezó un proceso de mineralización, formando estructuras de diferentes tamaños y formas, la formación de calcificaciones puede darse en forma de un nido de células en el proceso de degeneración (proceso de muerte celular) de un trombo sanguíneo o de fibras de colágeno. Cuando degeneran las células, los cristales de fosfato de calcio pueden depositarse dentro de la célula, primero dentro de las mitocondrias a causa de la mayor permeabilidad de las membranas celulares. De esta forma la célula en degeneración que sirve como nido puede iniciar la calcificación de un tejido (Olivares y Ovalle Castro, 2001). Es posible que al comparar con el ensayo de toxicidad la disminución se haya dado por el proceso de mineralización al degenerase las células para la formación de un tejido.

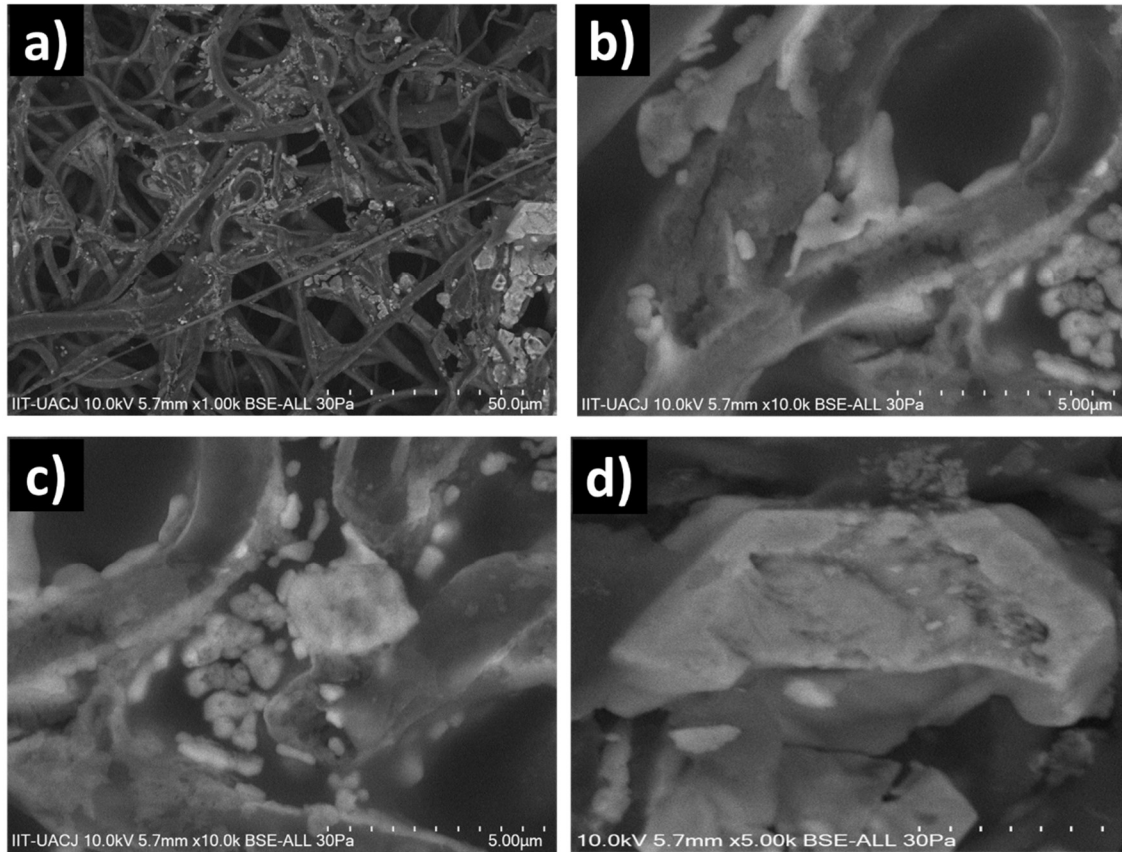


Figura 22 Mineralización celular en fibras de PCL observada por MEB a) X1 000 y b) X20 000, c) 10 000 X y d) 50 000 X

En el compósito de PCL-Al₂O₃ en contacto con las células fibroblásticas comenzaron un proceso de mineralización como se observar en la figura 23, por medio de la mineralización se puede observar ciertos nódulos los cuales presentan diferentes morfologías producidos por las células. Al ser la alúmina un cerámico que permite la adhesión, proliferación y el proceso de mineralización (Kitamura et al., 2004). El proceso de mineralización ocurre cuando las vesículas crean un ambiente específico para la deposición de minerales, en la formación de cristales de Ca²⁺ y P en la superficie interna de la membrana celular, y ser liberados de la matriz celular. Los cristales son utilizados como plantilla para la formación de matrices cristalinas, que conducen a la calcificación tisular, siendo las interacciones sutiles entre los dominios de proteínas con carga negativa, en fosfolípidos aniónicos y complejos minerales cruciales en la propagación de las matrices cristalinas, permitiendo el proceso de mineralización en el compósito de PCL-Al₂O₃(Buchet et al., 2003). La producción de cristales o nódulos es menor debido a que la alúmina no presenta interacción química con las células, debido a que la alúmina es inerte y no permite la

adsorción completa del compuesto, evitando la multiformación de cristales, mostrándose en menor cantidad a diferencia del compuesto de PCL.

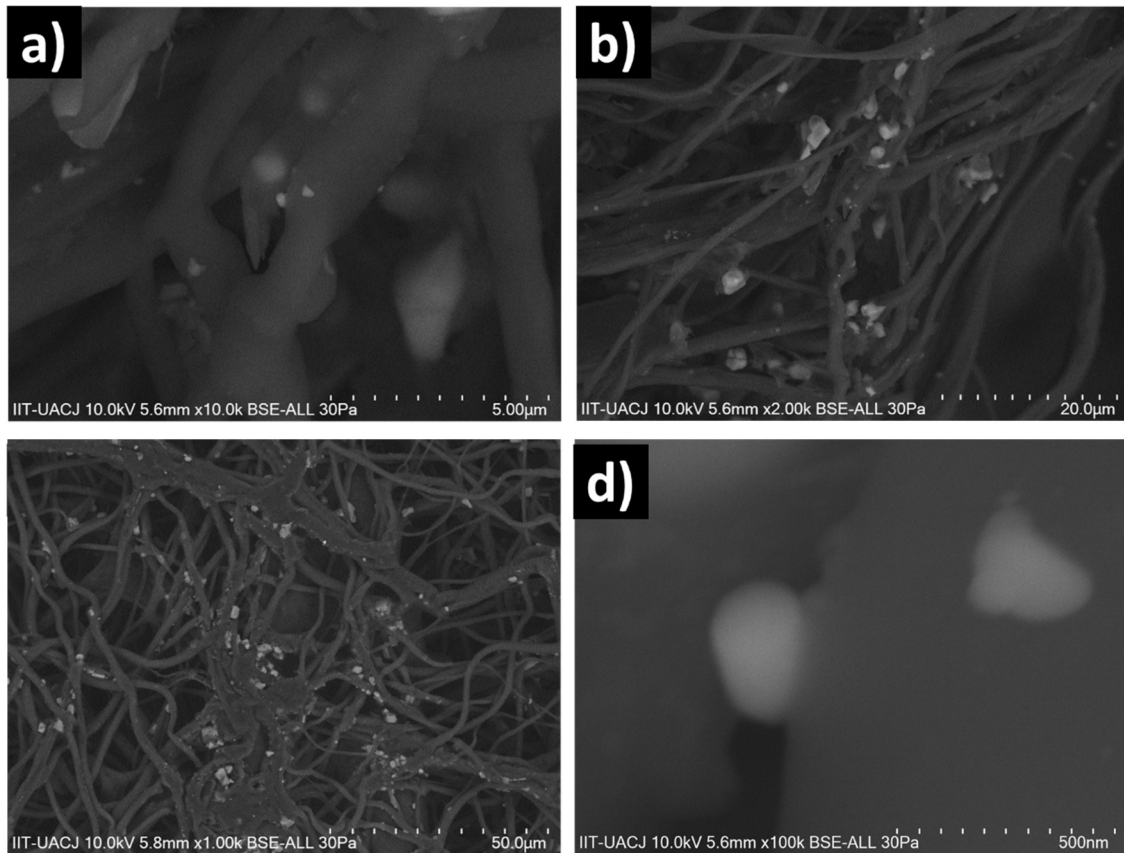


Figura 23. Mineralización celular en fibras de PCL-Al₂O₃ observada por MEB a) X1 000 y b) X20 000, c) 10 000 X y d) 50 000 X

El compuesto de PCL-HA al estar en contacto con células fibroblásticas produce un proceso de mineralización, como se observa en la figura 24. La formación de cristales y la presencia de vesículas contribuyen al proceso de mineralización. La hidroxiapatita (HA) es adsorbida y forma cristales en forma de agujas en la superficie interna de la membrana, para posteriormente ser liberados de la matriz celular, los cristales son utilizados como plantilla para la formación de matrices cristalinas, que conducen a la calcificación tisular (Olivares & Ovalle Castro, 2001)

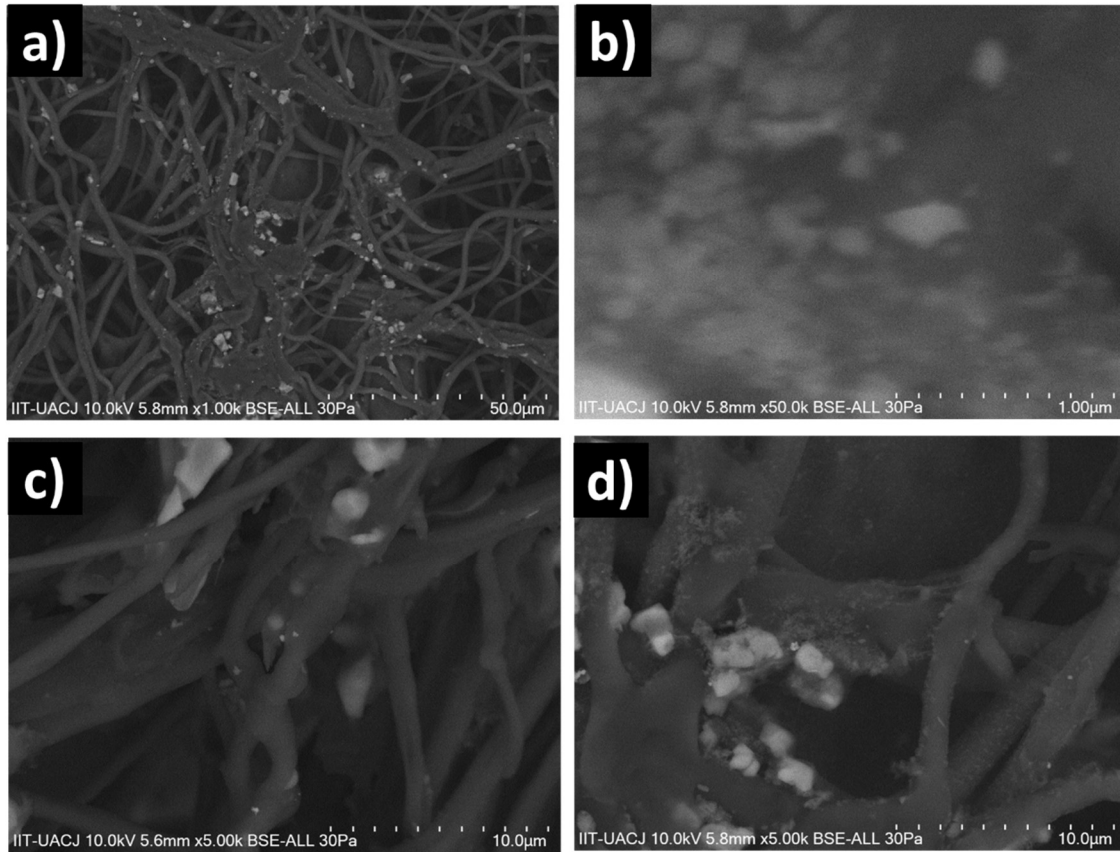


Figura24. Mineralización celular en fibras de PCL-HA observada por MEB a) X1 000 y b) X20 000, c) 10 000 X y d) 50 000 X

En el compuesto de PCL-HA- Al_2O_3 en la Figura 25 muestra que no solo permite la adhesión y proliferación celular, sino que además permite la mineralización, formando cristales de mayor tamaño a diferencia de los presentes en el compuesto de PCL- Al_2O_3 . La influencia de Ca^{2+} en las vesículas promueve la actividad de los canales iónicos formando colágeno, como se muestra en la Figura 25 c) a 10,000 X, donde la formación de fibras de colágeno se da, enredándose en las fibras del compuesto. Las fibras de colágeno podrían influir en la inicialización y progresión de la formación de minerales (Buchet et al., 2003).

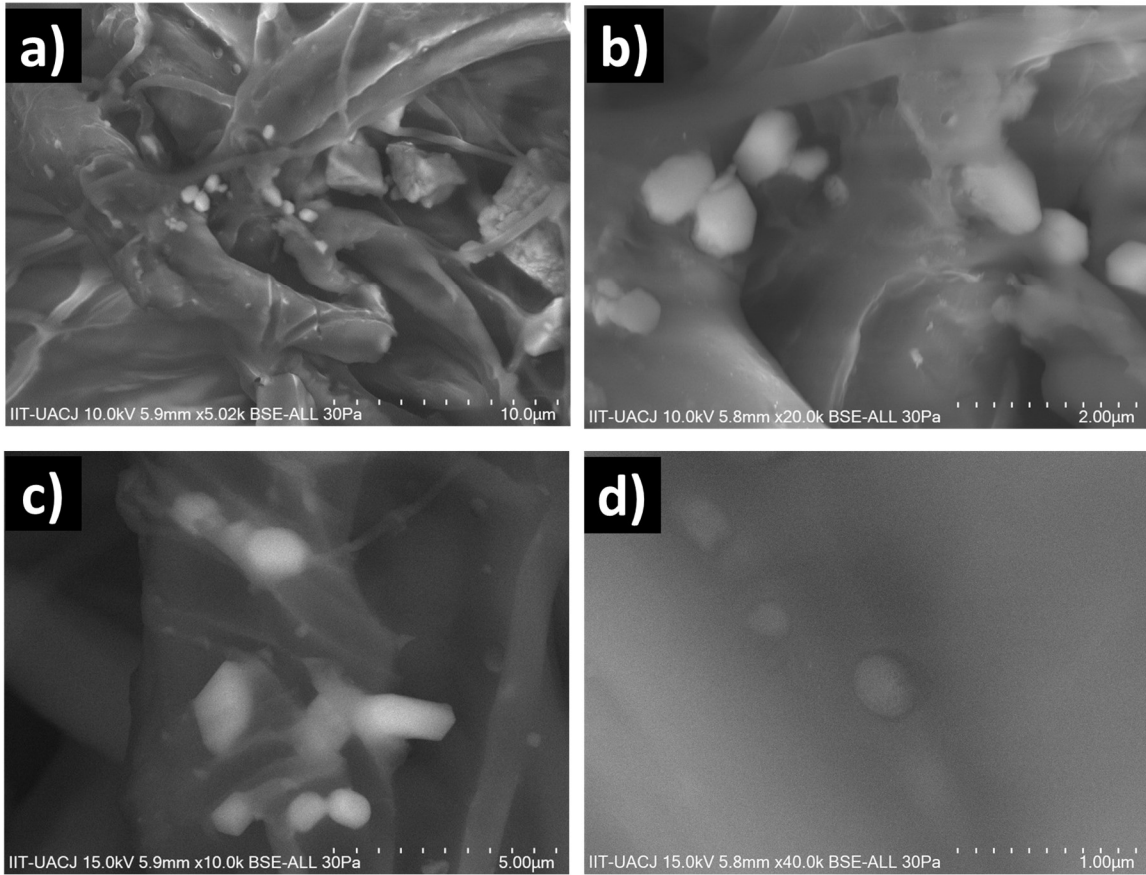


Figura 25. Mineralización celular en fibras de PCL-HA- Al_2O_3 observada por MEB a) X1 000 y b) X20 000, c) 10 000 X y d) 50 000 X.

7 Productos generados

Artículos

1. *Ana Karen Monrreal-Rodríguez, Jesús Alberto Garibay-Alvarado, Claudia Lucía Vargas-Requena, Simón Yobanny Reyes-López, In vitro evaluation of poly-ε-caprolactone-hydroxyapatite-alumina electrospun fibers on the fibroblast's proliferation, Results in Materials, Volume 6, 2020, 100091, pp 1-9. ISSN 2590-048X, DOI: [10.1016/j.rinma.2020.100091](https://doi.org/10.1016/j.rinma.2020.100091).*

Tesis

1. Tesis Licenciatura: **Q.F.B. Ana Karen Monrreal Rodríguez**
Título Tesis: Ensayo de adhesión celular em fibras de PCL-HA-AIO3
Lugar y fecha: ICB-UACJ, Cd. Juárez, Mayo 2018.

Congresos

1. Descripción XXIX International Materials Research Congress
Trabajo "POLY-E-caprolactone-hydroxyapatite-alumina fibers on the fibroblasts proliferation." -P
Lugar y Fecha Cancun, Mexico, 15-20 Agosto 2021.
2. Descripción Congreso Internacional de Investigación Academia Journals
Trabajo "Adhesión celular en fibras de PCL, PCL-HA, PCL-AIO3, PCLA-HAAI2O3. -O
Lugar y Fecha Cd. Juárez, 03 abril 2018.
3. Descripción 5to Encuentro de Jóvenes Investigadores del estado de Chihuahua
Trabajo "Ensayo de adhesión celular en fibras de PCL-HA, PCL- α Al₂O₃, PCL-HA- α Al₂O₃" -O
Lugar y fecha Cd. Juárez, Chihuahua 07-08 Septiembre 2017
4. Descripción X International Conference on Surfaces, Materials and Vacuum
Trabajo "Obtention of PCL-HA-AL₂O₃ Fibers" -O
Lugar y fecha Cd. Juárez, Chihuahua 25-29 Septiembre 2017

8 Conclusiones

Se obtuvieron partículas de hidroxiapatita pura y cristalina, y de alúmina en su fase alfa, permite su utilización en la formación de un compuesto fibrilar formado principalmente por PCL.

Se realizaron los diferentes compósitos membranales uno de PCL, PCL-HA, PCL-Al₂O₃, y PCL-HA-Al₂O₃, obtenidas por el método de electrohilado, mostrando por el ensayo de MTT que no presentan toxicidad, obteniendo que el compósito con mayor proliferación es la membrana de PCL-HA-Al₂O₃ a las 72 h.

El compósito PCL después del contacto celular muestra mayor mineralización, seguido de los compósitos PCL-HA y PCL-Al₂O₃. El compósito PCL-HA-Al₂O₃ no solo permite la adhesión y proliferación celular, sino que además permite la mineralización y la formación de fibras de colágeno.

9 Mecanismos de transferencia. (Si aplica)

No aplica

10 Contribución e impacto del proyecto

11 Impacto económico, social y/o ambiental en la región

12 Referencias (bibliografía)

1. Bernache, D., Heughebaert, M. "Sintering of Calcium Phosphate Hydroxyapatite $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ I. Calcination and Particle Growth". *J. Eur. Ceram. Soc.* 23 (2003) 229-241.
2. Cao, W., Hench, L. "Bioactive Materials". *Ceram. Intl.* 22: (1996) 493-507.
3. Carrillo, L. "Primeros Estudios de la Biocompatibilidad de Nanofibras de Policaprolactona-Hidroxiapatita- α -Alúmina obtenidas por Electrohilado". Tesis Licenciatura en Biología. Instituto de Ciencias Biomédicas de la Universidad Autónoma de Ciudad Juárez (2013).
4. Chih-Peng Lin, and Ting-Tai Lee. "Preparation of Nanometer-Sized α -Alumina Powders by Calcining an Emulsion of Boehmite and Oleic Acid". *J. Am. Ceram. Soc.*, 85 [1] (2002) 129-33.
5. Christel, P. [et al.]. "Biomechanical compatibility and design of ceramic implants for orthopedic surgery". *Annals of the New York academy of sciences.* (523): (2006) 234-256.
6. Flinn R. y Trojan P. "Materiales de Ingeniería y sus Aplicaciones". Editorial Mac Graw Hill. México (1979).
7. Griffin, R. A., Frost, R. R., Au A. K., Robinson G. D., Shimp, N. F. "Illinois State Geological Survey". *Environmental Geology Notes*, vol. 79, 1977 168.
8. Hansan-Türkez; Baak-Togar; Taner-Arabaci. 2011. Evaluation of genotoxicity after application of Listerine on human lymphocytes by micronucleus and single cell gel electrophoresis assays. [On line] *Toxicology and Industrial Health* 28(3): 271-275.
9. Helios E., Rihicka. "The Content and Chemical Forms of Heavy Metals in The River Sediments of the Cracow Area the Role of Clay Minerals". *Environmental Technology*, vol. 4, 1983 12.
10. Hovhannisyan, G. Fluorescence in situ hybridization in combination with the comet assay and micronucleus test in genetic toxicology. [On line] *Molecular Cytogenetics* (2010) Vol. 3:17
11. Jaffe, W. L. "Current Concepts Review-Total Hip Arthroplasty with Hydroxyapatite-Coated Prostheses". *The Journal of Bone & Joint Surgery*, 78(12), 1996 1918-34.
12. Karami, A. "Synthesis of TiO_2 Nano Powder by the Sol-Gel Method and Its Use as a Photocatalyst". *J. Iran. Chem. Soc.*, Vol. 7, Suppl., July 2010, pp. S154-S160.
13. Kingery, W. "Introduction to Ceramics". Second Edition. John Wiley & Sons, New York. 1976 pp.78-79, 448-514,532-40.
14. Kisin, E.; [et al.]. Genotoxicity of carbon nanofibers: Are they potentially more or less dangerous than carbon nanotubes or asbestos? *Toxicology and Applied Pharmacology* (2011) 252:1-10
15. Laurencin, C. [et al.]. "Tissue Engineering: Orthopedic Applications". *Annual Review of Biomedical Applications*. Vol. 1, 1999, p. 19-46.

16. Lord, M. S., Tsoi, B., Gunawan, C., Yang, W., Amal, R. y Whitelock, M. "Anti-angiogenic Activity of Heparin Functionalized Cerium Oxide Nanoparticles". ELSEVIER.34: (2013) 8808-8818pp.
17. Maccauro, G. [et al.]. "In Vivo Characterization Of Zirconia Toughened Alumina Material: A Comparative Animal Study". Int J Immunopathol Pharmacol. Vol. 23 (2010) pp.841-6.
18. Macwan, D. P., Dave, P. N., Chaturvedi, S. "A Review on Nano-TiO₂ Sol-gel Type Syntheses and its Applications". J Mater Sci (2011) 46:3669-3686.
19. Molina, A. "Elaboración de Nanofibras Biocompatibles de Poli-(ε)-Caprolactona-Hidroxiapatita por Electrohilado". Tesis Licenciatura en Química. Instituto de Ciencias Biomédicas de la Universidad Autónoma de Ciudad Juárez (2013).
20. Moreira, S.; [et al.]. BC nanofibres: In vitro study of genotoxicity and cell proliferation. [On line] Toxicology Letters (2009) 189:235-241
21. Müller-Mai C., Stupp S., Voigt C., Gross U. "Nanoapatite and Organoapatite implants in Bone: Histology and Ultrastructure of the Interface". J. Biom. Mat. Res. 29 (1995) 9-18.
22. Narasaraju T. S. B., Phebe D. E. "Review: Some Physico-Chemical Aspects of Hydroxylapatite". J. Mater. Sci. 31 (1996) 1-21
23. Naya, M.; Kobayashi, N.; Mizuno, K.; Matsumoto, K.; Ema, M.; Nakanishi, J.. Evaluation of the genotoxic potential of single-wall carbon nanotubes by using a battery of in vitro and in vivo genotoxicity assays. [On line] Regulatory Toxicology and Pharmacology. (2011) Vol. 61: 192-19.
24. Pareja, N., [et al.]. A. Síntesis y Caracterización de Hidroxiapatita Microporosa, Comparación con un Producto Comercial". Revista Facultad de Ing. Universidad de Antioquia. 2008, pp. 67-76.
25. Patnaik, P. "Handbook of Inorganic Chemicals". New York: McGraw-Hill (2002).
26. Ratner, B. and Hoffman, A. "Biomaterials Science: an Introduction to Materials in Medicine". Academic Press. USA 1996. 473.
27. Reyes, S., "Síntesis Metal-Orgánica de alfa-Alúmina a partir de Aluminio", Tesis de Maestría, Instituto de Investigaciones Metalúrgicas de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo (2006).

28. Reyes, S., Serrato, J., Sugita S. "Low-Temperature Formation of Alpha Alumina Powders Via Metalorganic Synthesis". Adv. In Tech. of Mat. Proc. J. (ATM), Vol. 8 [1] (2006) 55-62.
29. Reyes, S., "Estudio Químico Estructural del Proceso de Vitricación en Cerámicas Triaxiales" Tesis de Doctorado, Instituto de Investigaciones Metalúrgicas de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo (2012).
30. Reyes, S., Serrato, J., Sugita S. Sanitaryware Microstructural Characterization, Spinel and Mullite Relationship" Journal of Ceramic Processing Research. Vol. 14, No. 4, (2013) 492-497.
31. Reyes, S., Serrato, J., Sugita S. "Analysis of the phase transformation of aluminum formate $\text{Al}(\text{O}_2\text{CH})_3$ to α -alumina by Raman and infrared spectroscopy" Journal of Ceramic Processing Research. Vol. 14, No. 5, (2013) 627-631.
32. Reyes, S., Martinez A., The Ring-Opening Polymerization of epsilon-Caprolactone Catalyzed by Molybdenum Trioxide: A Kinetic Approach Study Using NMR and DSC Data. Macromol. Symp. Wiley (2013), Vol. 325-326, [1] 21-37.
33. Rodil, S., [et al.]. "Modificación Superficial de Biomateriales Metálicos". RLMM. 29 (2): (2009) 67-83.
34. Schübbe, S.; [et al.]. Size-Dependent Localization and Quantitative Evaluation of the Intracellular Migration of Silica Nanoparticles in Caco-2 Cells. Chemistry of Materials (2012) 24: 914-923
35. Srivastava, Tyagi R., Pant N., Pal N. "Studies on the Removal of Some Toxic Metal Ions from Aqueous Solutions and Industrial Waste. Part I". Environmental Technology, vol. 10, 1989 3.
36. Sosnik A. "Diseño de Biomateriales Inyectables Para Aplicaciones Biomédicas y Farmacéuticas: pasado, presente y futuro de los implantes generados in situ". Ars.Pharm 2007; 48 (1); 83-102.
37. Tejs S. The Ames test: a methodological short review. [On line] Enviromental Biotechnology (2008).4(1): 7-14
38. Thamaraiselvi, T., Rajeswari, S. "Biological Avaluation of Bioceramic Materials- a review". Sbaoi. 18(1): 2004 9-17.
39. Vargas N. "Elaboración de Nanofibras de Alfa-Alúmina y Poli-Épsilon-Caprolactona por Electrohilado" Tesis Licenciatura en Química. Instituto de Ciencias Biomédicas de la Universidad Autónoma de Ciudad Juárez (2013).
40. Volzone, C. "Biocerámicos Utilizados en Aplicaciones Médicas y Odontológicas". Cerámica y Cristal. 142. 2008. ISSN 03250229.

41. Willman, G. "Medical Grade Hydroxyapatite: State of the art." Brit. Cer. Trans. 95 (1996). (5): pp. 212-216.
42. Zalacain, M.; Sierrasesúmaga, L.; Patiño, A. 2005. El ensayo de micronúcleos como medida de inestabilidad genética inducida por agentes genotóxicos. (Revisiones). [En línea] Anales del Sistema Sanitario de Navarra 28(2): 227-236.

13 Anexos

13.2 Taxonomía de los Roles de Colaborador (con las actividades logradas)

| Roles | Definición de los roles | Nombre de él(la) investigador(a) | Figura | Grado de contribución | Actividades logradas durante el proyecto | Tiempo promedio semanal (en horas) dedicado al proyecto |
|-------------|-------------------------|----------------------------------|----------|-----------------------|--|---|
| Responsable | responsable | Dr. Simón Yobanny Reyes López | Director | Doctorado | Director | 20 |

13.2.A Estudiantes participantes en el proyecto

| Nombre de estudiante(s) | Matrícula | Tiempo promedio semanal (en horas) dedicado al proyecto | Actividades logradas en la ejecución del proyecto |
|-------------------------------------|-----------|---|---|
| <i>Ana Karen Monrreal-Rodríguez</i> | 119123 | 10 | Tesis |