

**Modificación de nanopartículas de hidroxiapatita con puntos de carbono  
para la fabricación de *scaffolds* multiescala**

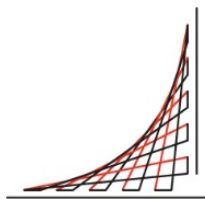
**Stefania Degiovanni Morales**

**Trabajo Dirigido**

**Marcela Cristina Múnera Ramírez, PhD  
Diana Consuelo Rodríguez Burbano, PhD**



**Universidad del  
Rosario**



**ESCUELA  
COLOMBIANA  
DE INGENIERÍA  
JULIO GARAVITO**

**UNIVERSIDAD DEL ROSARIO  
ESCUELA COLOMBIANA DE INGENIERÍA JULIO GARAVITO  
PROGRAMA DE INGENIERÍA BIOMÉDICA  
BOGOTÁ D.C  
2021**

## Agradecimientos

Agradezco a mis padres, Augusto y Alexandra quienes con su fortaleza, paciencia y amor son el motor que me impulsa cada día, que por su apoyo incondicional he logrado superar cada obstáculo y alcanzar cada meta propuesta. Todo lo que soy y he logrado es gracias a ustedes.

Agradezco a mi amiga Laura Neira, por ser un gran apoyo a lo largo de la carrera, por disfrutar y construir tantos momentos juntas. A Natalia González por ser uno de mis más grandes apoyos, impulsarme en el camino y por creer en mi incluso cuando yo no lo hacía.

Agradezco a mis tutoras, la doctora Diana Consuelo Rodríguez Burbano y la doctora Marcela Cristina Múnera Ramírez, quienes hicieron posible el desarrollo de este trabajo y me guiaron en todo el camino. Gracias por atender mis dudas, por compartir sus conocimiento y pasión por el trabajo que realizan. A Mayerly Natalia Ochoa Paipilla, con quien compartí a lo largo de todo el proceso de este trabajo dirigido, que se convirtió en una buena amiga, y quien fue un apoyo incondicional para la culminación de este proyecto. Al Doctor Alejandro Ondo, a Sonia Perilla, Juan Guarín y los demás compañeros del laboratorio de Bioquímica por brindarme toda la ayuda y el apoyo necesario a lo largo del trabajo.

Por último, gracias a la Universidad del Rosario y la Escuela Colombiana de Ingeniería Julio Garavito, por su calidad, por todos los conocimientos impartidos y las oportunidades brindadas a lo largo de esta carrera. A todos los profesores, administrativos y demás integrantes de cada institución por todos los conocimientos impartidos y ayudas que me permitieron formarme como Ingeniera Biomédica.

## Resumen

El uso de medicamentos, procedimientos quirúrgicos e injertos óseos, son las soluciones más utilizadas para el tratamiento de patologías y defectos óseos. Los injertos son el método más utilizado para el tratamiento de este tipo de defectos hoy en día, sin embargo esta solución presenta una serie de complicaciones que ha impulsado la búsqueda de nuevas soluciones más efectivas para el tratamiento de defectos óseos. Avances en el área de la ingeniería de tejidos ha permitido la fabricación de *scaffolds* con propiedades físicas y químicas que imiten a aquellas del hueso natural y que a su vez permitan la regeneración ósea. Con este fin, ha aumentado la necesidad de explorar nuevos materiales que permitan mejorar las propiedades mecánicas y biológicas de los *scaffolds*. Por ejemplo, la hidroxiapatita es un material comúnmente empleado para aplicaciones en la regeneración de tejido óseo por ser parte del componente mineral del hueso, que hace que este material se caracterice por tener propiedades similares a este tejido. Por otro lado, se ha encontrado que el uso de nanomateriales, como puntos de carbono, para la fabricación de *scaffolds* induce cambios en sus propiedades fisicoquímicas que puede brindar mejoras en las interacciones con células y tejidos, al promover la diferenciación y proliferación celular de células óseas y mejorar las propiedades mecánicas como la resistencia a la flexión y a la torsión. Los puntos de carbono, son nanomateriales fluorescentes que han generado un gran interés para aplicaciones biológicas gracias a sus propiedades ópticas y fisicoquímicas y a impulsado el estudio de estos para aplicaciones en la regeneración ósea.

En este trabajo se propone la síntesis de puntos de carbono embebidos en nanopartículas de hidroxiapatita y la evaluación preliminar de su citotoxicidad por medio de ensayo MTT con el fin de realizar una evaluación inicial de su potencial para el tratamiento de defectos óseos. Se busca dar inicio a una línea de investigación donde se realice el análisis del impacto en las propiedades bioactivas de scaffolds multiescala con la adición de puntos de carbono embebidos en nanopartículas de hidroxiapatita, con el fin de evaluar la viabilidad de este tipo de biomateriales para aplicaciones en la regeneración de tejidos óseos.

En el presente documento se detallan los procedimientos experimentales para sintetizar puntos de carbono y nanohidroxiapatita con puntos de carbono embebidos. Adicionalmente, ensayos celulares preliminares establecieron que los puntos de carbono embebidos en nanopartículas de hidroxiapatita presentaban una baja citotoxicidad, permitiendo la viabilidad celular de células Vero.

# Índice general

Agradecimientos . . . . .	I
Resumen . . . . .	II
<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
1.1. Planteamiento del problema . . . . .	1
1.2. Objetivos . . . . .	3
1.2.1. General . . . . .	3
1.2.2. Específicos . . . . .	3
1.3. Contribuciones . . . . .	3
1.4. Organización del documento . . . . .	4
<b>2. ESTADO DEL ARTE</b>	<b>5</b>
2.1. Propiedades del tejido óseo . . . . .	5
2.2. Regeneración del tejido óseo . . . . .	7
2.3. Scaffolds para regeneración ósea . . . . .	8
2.3.1. Hidroxiapatita para scaffolds óseos . . . . .	10
2.3.2. Scaffolds poliméricos . . . . .	12
2.3.3. Scaffolds compuestos . . . . .	13
2.3.4. Incorporación de nanomateriales en scaffolds óseos: Puntos de carbono .	15
2.3.5. Evaluación de la citotoxicidad . . . . .	16
<b>3. METODOLOGÍA</b>	<b>17</b>
3.1. Síntesis de puntos de carbono . . . . .	18
3.2. Síntesis de nanopartículas de hidroxiapatita embebidas con puntos de carbono .	18
3.3. Fabricación de scaffolds a base de PEG y puntos de carbono embebidos en nanopartículas de hidroxiapatita . . . . .	19
3.4. Pruebas de caracterización . . . . .	20
3.4.1. Espectrofotometría UV-Vis para la determinación de las propiedades de absorción y fluorescencia . . . . .	20
3.4.2. Ensayo MTT . . . . .	21
<b>4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	<b>23</b>
4.1. Caracterización de los puntos de carbono . . . . .	23
4.2. Caracterización de nanopartículas de hidroxiapatita embebidas con puntos de carbono . . . . .	26
4.3. Ensayo MTT . . . . .	29
4.4. <i>Scaffold</i> a base de PEG y puntos de carbono embebidos en nanohidroxiapatita	31

<b>5. CONCLUSIONES</b>	<b>33</b>
<b>6. RECOMENDACIONES Y TRABAJOS FUTUROS</b>	<b>34</b>
6.1. Recomendaciones . . . . .	34
6.2. Trabajos futuros . . . . .	34
<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>36</b>

# Índice de figuras

2.1. Estructura del tejido óseo [9]. . . . .	6
2.2. Estructura jerárquica del hueso partiendo del esqueleto micro-escala hasta el colágeno y hidroxiapatita nano-escala [30]. . . . .	6
2.3. Reducción de sal de tetrazolio a cristales de formazán. Tomada de [72]. . . . .	16
3.1. Diagrama de flujo de las etapas llevadas a cabo para la ejecución del trabajo. . . . .	17
3.2. Montaje goteo de ácido fosfórico en hidróxido de calcio para la síntesis de nanopartículas de hidroxiapatita embebidas con puntos de carbono. . . . .	19
3.3. Montaje espectrofotómetro FLAMES-S-XR1-ES - Ocean view. . . . .	20
3.4. Plato de 96 pozos utilizado para realizar ensayos MTT. . . . .	21
4.1. Fluorescencia de soluciones de puntos de carbono a diferentes concentraciones al ser excitadas a una longitud de onda de 365 nm. . . . .	24
4.2. Espectro de absorción de soluciones con puntos de carbono a diferentes concentraciones. . . . .	24
4.3. Espectro de emisión de una solución acuosa de puntos de carbono a 2.5 mg/mL. . . . .	25
4.4. Nanopartículas de hidroxiapatita embebidas con puntos de carbono al ser excitada a 365 nm. . . . .	26
4.5. Espectro de absorción de puntos de carbono y nanohidroxiapatita embebida con puntos de carbono. . . . .	27
4.6. Curva de calibración de los puntos de carbono. Se establece la concentración de puntos de carbono en función de la absorbancia. . . . .	28
4.7. Espectro de emisión de puntos de carbono y nanohidroxiapatita embebida con puntos de carbono excitadas a una longitud de onda de 320 nm. . . . .	29
4.8. Resultados obtenidos del ensayo MTT en las nanopartículas de hidroxiapatita y puntos de carbono sintetizadas. . . . .	30
4.9. Pasta obtenida luego de centrifugar la mezcla de PEG y nanohidroxiapatita. . . . .	32
4.10. Polvo obtenido del proceso de fabricación de <i>scaffolds</i> a base de PEG y puntos de carbono embebidos en nanopartículas de hidroxiapatita. . . . .	32

# Índice de tablas

2.1. Patologías óseas más comunes y sus cuadros clínicos. . . . .	7
2.3. Requisitos que deben cumplir los <i>scaffolds</i> para aplicaciones en la regeneración de tejidos óseos [11]. . . . .	8
2.2. Ventajas y desventajas de sustitutos óseos empleados para el tratamiento de defectos óseos [11]. . . . .	9
2.4. Comparación de las propiedades de la Hidroxiapatita y la Nanohidroxiapatita.	11
2.5. Propiedades más importantes que deben presentar los polímeros utilizados para la fabricación de <i>scaffolds</i> para regeneración ósea. . . . .	12
2.6. <i>Scaffolds</i> compuestos con hidroxiapatita y polímeros y su efecto en la regeneración de tejido óseo. . . . .	14
2.7. Materiales compuestos con puntos de carbono y sus propiedades. . . . .	15
4.1. Prueba ANOVA . . . . .	31

# Capítulo 1

## INTRODUCCIÓN

En este capítulo se presenta el contexto de este estudio, los objetivos planteados, las contribuciones y la organización del presente documento.

### 1.1 Planteamiento del problema

Los defectos óseos se definen como la falta de tejido óseo en un área determinada del cuerpo donde normalmente se encuentran este tipo de tejidos [1]. Estos se presentan debido a diferentes diagnósticos, como malformaciones congénitas, cáncer, traumas, por la presencia de infecciones o enfermedades como la osteoporosis [2].

Una de las enfermedades esqueléticas más comunes y generalizadas es la osteoporosis [3]. Cada año alrededor de 200,000,000 pacientes son diagnosticados con esta enfermedad y alrededor de 900,000,000 fracturas a causa de la misma ocurren a nivel mundial [3]. Los defectos óseos causados por enfermedades como la osteoporosis, se caracterizan por la disminución de la masa ósea y un deterioro de la micro-arquitectura de los huesos, lo que produce un aumento en la fragilidad y el riesgo de sufrir fracturas incluso al exponer a este tejido a fuerzas pequeñas [4].

Este tipo de enfermedades, significa una disminución de la calidad de vida de aquellas personas que las padecen, ya que representan una limitación para la ejecución de actividades y la presencia de dolor, creando así una demanda para estrategias nuevas y eficientes que presenten mejores resultados para los pacientes [5].

Los tejidos óseos presentan características de auto-reparación y regeneración, dadas por la acción de las principales células óseas: osteoclastos, osteoblastos y osteocitos [6]. Sin embargo, la capacidad de huesos lesionados para iniciar un proceso natural de curación y restaurar sus capacidades de carga es a menudo insuficiente, resultando en fracturas completas del hueso [7]. Defectos óseos más grandes, llamados defectos de tamaño crítico, requieren de intervenciones quirúrgicas para que el tejido óseo pueda ser reparado o regenerado [8].

Los injertos óseos son el método quirúrgico más comúnmente utilizado para el tratamiento de defectos óseos hoy en día [9]. Mas de dos millones de procedimientos de injertos óseos se realizan anualmente alrededor del mundo, lo que hace de estos procedimientos, el segundo trasplante de tejidos mas frecuente después de la transfusión de sangre [9].

Los injertos óseos se clasifican en tres categorías principales: autólogos, homólogos y heterólogos. Los injertos óseos autólogos o auto-injertos, son por excelencia los más implementados



debido a sus propiedades de osteoconducción, osteoinducción y osteogénesis, necesarias para la regeneración de hueso [10]. Los auto-injertos son obtenidos al extraer hueso de otra parte del propio cuerpo del paciente [11], lo que le proporciona a este tipo de injertos propiedades como histocompatibilidad, una ausencia de reacciones inmunológicas, y la capacidad de promover el proceso de regeneración ósea [12]. Por otro lado los injertos homólogos o aloinjertos y los injertos heterólogos o xenoinjertos, consisten en la extracción de hueso de un donante o de una especie diferente a la humana, respectivamente. Este tipo de injertos óseos han mostrado propiedades de osteoconductividad lo que los convierte en opciones viables para el tratamiento de defectos óseos [13].

Sin embargo, el uso de injertos óseos presenta una serie de limitaciones. Por un lado los autoinjertos presentan limitaciones relacionadas al proceso de obtención del injerto con el cual se pueden presentar complicaciones y dolor en el sitio donante, que puede resultar en el desarrollo de infecciones y adicionalmente se presenta una disponibilidad limitada de la cantidad de material que se puede obtener [14]. Por otro lado se ha encontrado que los aloinjertos y xenoinjertos tienden a provocar respuestas inmunogénicas con una tasa de rechazo alta, además de la posibilidad de transmisión de enfermedades provenientes del donante [14]. Debido a estas limitaciones se ha presentado una creciente demanda por nuevas estrategias que proporcionen mejores soluciones para el tratamiento de defectos óseos y que a su vez presenten las propiedades necesarias para promover el crecimiento y regeneración de hueso.

Avances en el área de los biomateriales y la ingeniería de tejidos han permitido la mejora de estrategias novedosas para la regeneración de tejidos óseos [15]. Se ha propuesto el uso de materiales como metales, cerámicos y polímeros de orígenes sintéticos y biológicos en la construcción de *scaffolds* para la regeneración de tejidos óseos [16]. Los *scaffolds* son estructuras porosas tridimensionales que permiten y estimulan la adhesión y proliferación celular en su superficie [17]. Dentro de los materiales propuestos, la reconstrucción de defectos óseos se puede ver beneficiada por la implementación de *scaffolds* biodegradables con la capacidad de integración en el tejido óseo circundante con el fin de permitir la regeneración natural del tejido óseo [18].

La ingeniería de tejidos ha permitido la fabricación de *scaffolds* que posean propiedades de cito-compatibilidad y que a su vez imiten las propiedades bioquímicas y mecánicas del hueso real, fomentando funciones biológicas similares con el fin de superar limitaciones como la escasez de donantes, reacciones inmunogénicas y la transmisión de infecciones [5]. A través del uso de *scaffolds* a base de biomateriales en el sitio lesionado, se ha estimulado la regeneración y la recuperación de la funcionalidad ósea [19], aprovechando la capacidad regenerativa innata del hueso y su potencial natural para reparar, remodelar y regenerarse a sí mismo [20].

Los *scaffolds* utilizados para la regeneración de tejidos óseos deben cumplir con una serie de propiedades, tales como biocompatibilidad, osteoinducción, así como propiedades mecánicas suficientes, una micro y macro porosidad y bio-reabsorbabilidad [21]. Los *scaffolds* cerámicos compuestos de hidroxiapatita han sido utilizados como sustitutos óseos al tener una estructura similar al componente mineral del hueso, sin embargo estos usualmente presentan fragilidad y una baja porosidad [22], por lo que se ha implementado el uso de polímeros para mejorar las propiedades biológicas y físico-químicas necesarias [21] en este tipo de *scaffolds* cerámicos.

En los últimos años, con el avance de la nanotecnología se ha sugerido la implementación de nanomateriales para aplicaciones biológicas. Se ha investigado el uso de nanomateriales como los puntos de carbono para la regeneración y reparación de defectos óseos [23]. Se ha

encontrado que la adición de estas nanopartículas potencialmente mejora las propiedades mecánicas, como la resistencia a la flexión y a la torsión y las propiedades bioactivas, como promover la adhesión, proliferación y diferenciación celular de los *scaffolds* utilizados para esta aplicación [23]. Este proyecto tiene como objetivo incorporar puntos de carbono en la síntesis de nanopartículas de hidroxiapatita y realizar una evaluación preliminar de su citotoxicidad. Se busca posteriormente incorporar las nanopartículas de hidroxiapatita embebidas con puntos de carbono en la fabricación de *scaffolds* multiescala, con el fin de dar inicio a la evaluación de la viabilidad de este tipo de biomateriales para aplicaciones en la regeneración de tejidos óseos.

## 1.2 Objetivos

Teniendo en cuenta el contexto mencionado, este trabajo plantea los siguientes objetivos.

### 1.2.1. General

Desarrollar un protocolo para la síntesis de puntos de carbono embebidos en nanopartículas de hidroxiapatita.

### 1.2.2. Específicos

1. Sintetizar y caracterizar nanopartículas de puntos de carbono por método de reacción por microondas.
2. Incorporar puntos de carbono en nanopartículas de hidroxiapatita.
3. Evaluar la citotoxicidad de puntos de carbono embebidos en nanopartículas de hidroxiapatita por método MTT.

## 1.3 Contribuciones

En el presente trabajo se encontró que el método de reacción por microondas utilizando ácido cítrico, etanol y dimetilformamida es efectivo para la síntesis de puntos de carbono fluorescentes que exhiben un color azul, los cuales presentan una banda de absorción que va desde los 200 a 300 nm y una banda de emisión que va desde los 380 a 500 nm. De igual forma se encontró que el método de precipitación continua basa en el procedimiento reportado por Mercado et al [24], es efectivo para la incorporación de puntos de carbono en nanopartículas de hidroxiapatita. Adicionalmente, células vero fueron incubadas en presencia del compuesto de puntos de carbono embebidos en nanohidroxiapatita sintetizado. Resultados de viabilidad celular demostraron una baja citotoxicidad del nanocompuesto conformado por nanohidroxiapatita y puntos de carbono.

Se espera emplear los puntos de carbono embebidos en nanopartículas de hidroxiapatita sintetizados para la fabricación de *scaffolds* multiescala y evaluar el impacto que tiene la modificación de nanopartículas de hidroxiapatita con puntos de carbono en las propiedades fisicoquímicas y biológicas de los *scaffolds*.

## 1.4 Organización del documento

El presente documento se divide en seis capítulos principales. En el primer capítulo se presenta la problemática que se busca resolver con la presente investigación, posteriormente se plantean los objetivos para abarcar dicha problemática y la organización del documento.

El segundo capítulo corresponde al estado del arte, en donde se establecen todos los conceptos necesarios para comprender la problemática y la solución propuesta. En el estado del arte se describen las propiedades del tejidos óseo y las patologías más comunes que lo pueden afectar. Posteriormente, se discuten las propiedades y el tipo de *scaffolds* de acuerdo a los distintos materiales que pueden ser implementados para su fabricación. Por último este capítulo discute la implementación de puntos de carbono y su potencial para aplicaciones en la regeneración de tejidos óseos.

En el tercer capítulo se presentan los materiales y la metodología llevada a cabo para el desarrollo de este proyecto. Se presentan los procedimientos experimentales llevados a cabo para la síntesis de puntos de carbono embebidos en nanopartículas de hidroxiapatita y su proceso de caracterización.

El cuarto capítulo discute los resultados obtenidos de este estudio, seguido por la conclusiones a las que se llegaron en base a estos.

Por último, en el capítulo seis se plantean los trabajos futuros que se pueden llegar a desarrollar en base a los resultados obtenidos seguida de la bibliografía que se utilizó a lo largo del documento.

## Capítulo 2

# ESTADO DEL ARTE

En este capítulo se presentan las propiedades del tejido óseo y algunas de las patologías óseas más comunes. También se discute el uso de *scaffolds* óseos para el tratamiento de defectos óseos y se realiza una descripción de los distintos tipos de *scaffolds* poliméricos compuestos con hidroxiapatita y sus propiedades. Adicionalmente, se presentan las propiedades de los puntos de carbono y las técnicas implementadas para la caracterización de sus propiedades ópticas y de su citotoxicidad.

### 2.1 Propiedades del tejido óseo

Los huesos son órganos rígidos capaces de soportar y proteger distintos órganos, así como facilitar la movilidad [25]. De acuerdo a su peso, el hueso está compuesto por aproximadamente un 65 % de minerales, conformado principalmente por hidroxiapatita; una parte orgánica entre 20 % a 25 %, conformado principalmente por colágeno tipo I y agua en un 10 % [26]. Los huesos son órganos polifacéticos compuestos de diferentes tipos de tejidos que pueden tener una estructura compacta (hueso cortical) o trabecular (hueso esponjoso) [27]. El hueso cortical consiste de una matriz densa y compacta que conforma la envoltura exterior del esqueleto. Esta matriz densa está construida por unidades de osteones recurrentes con fibras de colágeno ensambladas de manera concéntrica alrededor de un canal central que contiene vasos sanguíneos [28]. Esta estructura conformada por fibras de colágeno está orientada a lo largo de las líneas de carga óseas y proporciona resistencia a la torsión, flexión y fuerza compresiva [29]. El hueso esponjoso es aquel que se encuentra en el interior del tejido óseo y conforma las placas que cruzan las cavidades internas de esqueleto. Estas placas interconectadas están organizadas de manera jerárquica extendidas entre material sólido, trabéculas, laminillas y un compuesto de colágeno-hidroxiapatita [28]. El hueso trabecular exhibe un área superficial que permite la difusión de nutrientes y factores de crecimiento que permiten que este tipo de hueso juegue un papel importante en la remodelación ósea a comparación del hueso cortical [29]. La estructura del tejido óseo se puede observar en la Figura 2.1.

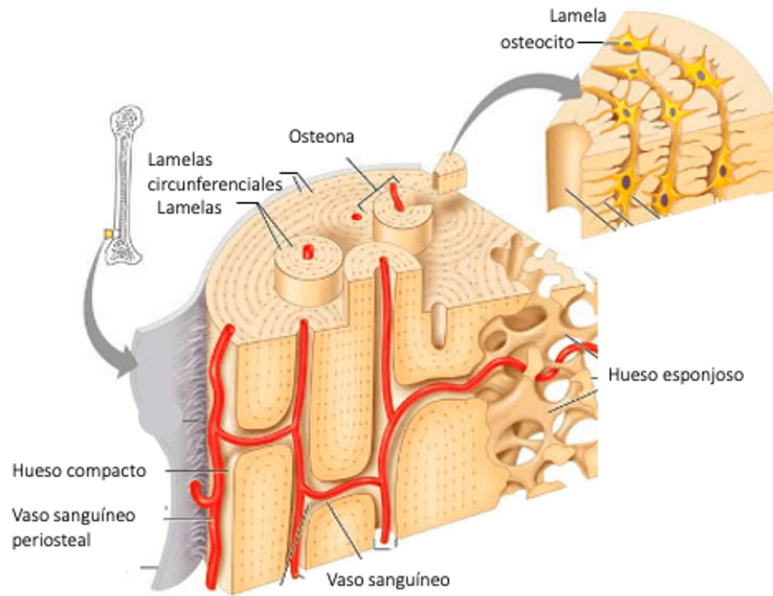


Figura 2.1: Estructura del tejido óseo [9].

La funcionalidad de los huesos se debe principalmente a la arquitectura jerárquica que los compone, esto quiere decir que su composición cuenta con estructuras en una escala milimétrica a estructuras en una escala nanométrica [30]. Al nivel nano-estructural, esta arquitectura jerárquica esta compuesta de componentes orgánicos y minerales, que consiste principalmente de una matriz de colágeno mineralizada con nanocristales de hidroxapatita, como se puede observar en la figura 2.2 [26].

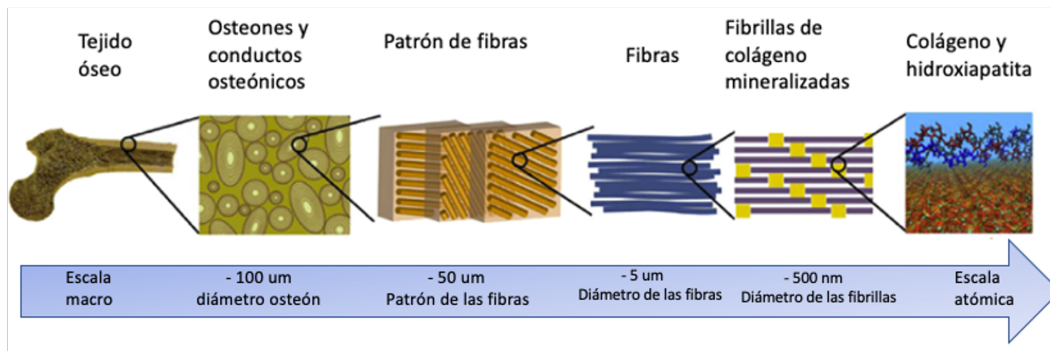


Figura 2.2: Estructura jerárquica del hueso partiendo del esqueleto micro-escala hasta el colágeno y hidroxapatita nano-escala [30].

Los huesos tienen distintos tipos de células tales como osteoclastos, osteoblastos, osteocitos y células de revestimiento óseo. Los osteoblastos se originan de células madre mesenquimales y los osteoclastos se originan de células madre hematopoyéticas [31]. El modelado y la remodelación ósea incluyen la función de los osteoclastos en la eliminación de la superficie ósea y la función de los osteoblastos en la precipitación de nueva matriz en el hueso. Este proceso

es el responsable de la protección de la funcionalidad del esqueleto y en la restauración de fracturas. Cualquier afectación en la funcionalidad de estas células podría resultar en el desarrollo de una patología ósea tales como enfermedad de Paget, displasia fibrosa, osteoartritis, osteoporosis y fracturas por fragilidad ósea [32].

## 2.2 Regeneración del tejido óseo

Los huesos poseen una capacidad intrínseca de regeneración, que hace parte del proceso de reparación en respuesta a daños o lesiones, así como durante la etapa de desarrollo o del remodelado continuo que ocurre durante la vida adulta [9]. Las fracturas son de los defectos óseos más comunes que se pueden llegar a presentar por condiciones que producen la fragilidad ósea. La regeneración ósea tras sufrir una fractura, consiste de tres fases principales: inflamación, producción y remodelación de hueso [33]. Al momento de la generación de una ruptura ósea, inicia un proceso de inflamación y coagulación en el sitio de la ruptura. Esta respuesta es la responsable de iniciar el proceso de formación de hueso nuevo. La producción de hueso inicia una vez la sangre coagulada es sustituida por cartílago y tejido fibroso. Este proceso incluye la proliferación y diferenciación de células mesenquimales y osteoprogenitoras y la osificación de la matriz extracelular del tejido [34]. Con el avance de la regeneración el cartílago y tejido fibroso es reemplazado por hueso. Por último, la remodelación ósea consisten de un proceso de activación, reabsorción y formación, donde el producto final será la formación de osteones [33].

Sin embargo, en defectos óseos de mayor tamaño ocasionados por traumas o enfermedades sistémicas como la osteoporosis (Algunas de las patologías óseas más comunes se pueden observar en la Tabla 2.1), fracturas patológicas o infecciones, la capacidad de regeneración ósea puede fallar, resultando en defectos permanentes que pueden llegar a ocasionar la pérdida de la función o movilidad [35]. De igual manera, con el paso de los años el tejido óseo va perdiendo esa capacidad regenerativa por lo que es necesario la búsqueda de tratamiento efectivos para este tipo de defectos [35].

Tabla 2.1: Patologías óseas más comunes y sus cuadros clínicos.

Patologías óseas más comunes	Cuadro clínico
Enfermedad de Paget [36]	Excesiva degradación y formación de tejido óseo.
Osteosarcoma [37]	Tumor óseo canceroso que puede producir hinchazón localizada y fragilidad ósea.
Osteoartritis [38]	Deterioro progresivo del cartílago articular que con el tiempo provoca la degradación del hueso sano.
Osteoporosis [39]	Disminución de la densidad de la masa ósea provocando la fragilidad de los huesos.

Debido a los defectos óseos que se pueden presentar y al impacto que estas tienen en la calidad de vida de las personas, se ha presentado un incremento en la búsqueda de nuevas estrategias y soluciones para el tratamiento de este tipo de defectos, con un enfoque en alternativas que permitan la regeneración ósea.

En la actualidad existen distintos sustitutos óseos implementados para el tratamiento de

defectos óseos. Los injertos óseos han sido la solución más implementada para esta aplicación gracias a sus propiedades osteoinductivas y osteoconductoras que permiten la regeneración del tejido óseo, sin embargo esta solución ha presentado una serie de desventajas tales como una disponibilidad limitada, rechazo del injerto por parte del paciente y la transmisión de enfermedades, lo que ha impulsado la búsqueda de nuevas soluciones para esta aplicación. Adicionalmente, se ha investigado el uso de distintos materiales biocompatibles tales como metales, cerámicos y polímeros que poseen propiedades y características que permiten que este tipo de materiales tengan potencial para favorecer la regeneración de tejido óseo. En la Tabla 2.2 se pueden observar las ventajas y desventajas de los sustitutos óseos utilizados para el tratamiento de defectos óseos.

### 2.3 Scaffolds para regeneración ósea

El uso de *scaffolds* para la regeneración ósea se ha convertido en un tema de gran interés en la comunidad científica debido a su gran potencial para fomentar la regeneración de tejidos debido a sus propiedades físicas y biológicas [40]. Patologías como osteosarcoma, osteoartritis, osteoporosis y Paget se han visto beneficiadas con el uso de *scaffolds* para el tratamiento de los defectos óseos que se pueden llegar a presentar por la presencia de éstas. El uso de scaffolds ha jugado un papel importante en la ingeniería de tejidos óseos. En la tabla 2.3 se resumen los requisitos que debe cumplir un *scaffold* para aplicaciones en la regeneración de tejidos óseo.

Tabla 2.3: Requisitos que deben cumplir los *scaffolds* para aplicaciones en la regeneración de tejidos óseos [11].

Requisitos de scaffolds para regeneración ósea	Importancia
Bioactividad	Capacidad de participar en reacciones biológicas
Biocompatibilidad	Capacidad de ser implantado sin iniciar una respuesta adversa
Osteoconductividad	Habilidad de proporcionar una estructura para la formación de hueso nuevo
Osteoinductividad	Capacidad de reclutar y diferenciar células mesenquimales
Propiedades fisicoquímicas	Influenciar comportamiento celular
Propiedades mecánicas	Soportar el área lesionada Influenciar comportamiento celular
Estructura 3D	Permitir y soportar la formación de tejido nuevo
Humectabilidad	Afecta la transferencia de oxígeno y nutrientes Promover la adhesión celular

La función de los *scaffolds* es actuar como una plantilla para el crecimiento de células osteoprogenitoras, promover la diferenciación de células madres mesenquimales en osteoblastos y apoyar la producción, organización y mantenimiento de la matriz extracelular [41].

El éxito del desarrollo de un tejido obtenido por medio de la ingeniería de tejidos depende en gran parte, de las propiedades de los materiales utilizados para la fabricación del scaffold y

Tabla 2.2: Ventajas y desventajas de sustitutos óseos empleados para el tratamiento de defectos óseos [11].

<b>Biomaterial</b>	<b>Ventajas</b>	<b>Desventajas</b>
Injertos autólogos	Osteoinductivo Osteoconductivos Osteogénico	Disponibilidad limitada Morbilidad del donante Vascularización inadecuada Reabsorción impredecible
Injerto alógenos	No se presenta morbilidad del donante Alta disponibilidad Osteoinductivos Osteoconductivos	Osteogenicidad limitada Incorporación lenta Vascularización inadecuada Rechazo del injerto Riesgo de transmisión de enfermedades
Injertos xenógrafos	Económicos No se presenta morbilidad del donante Alta disponibilidad Osteoinductivos Osteoconductivos	Osteogenicidad limitada Incorporación lenta Vascularización inadecuada Alta probabilidad de rechazo del injerto Riesgo de transmisión de enfermedades zoonóticas
Metales	Excelentes propiedades mecánicas Biocompatible Buena osteointegración Fabricación personalizada	Riesgo de corrosión Riesgo de toxicidad por iones metálicos Vascularización inadecuada Bioinerte
Cerámicos	Biocompatible Fabricación personalizada Buenas propiedades mecánicas Excelente resistencia a la corrosión	Frágil Baja elasticidad Vascularización inadecuada
Polímeros	Biocompatible Fabricación personalizada Buenas propiedades mecánicas	Vascularización inadecuada



de sus características morfológicas. Adicional a las características físico-químicas del material, el comportamiento mecánico de la estructura y el área superficial con la que interactúan las células, son factores importantes [42].

Una de las propiedades más importantes que debe tener un *scaffold* para aplicaciones en la ingeniería de tejidos, es que debe ser biocompatible, con el fin de evitar una respuesta inflamatoria severa que cause rechazo por parte del cuerpo. Debe poseer una propiedades químicas superficiales que permitan la adhesión, proliferación y migración celular. Adicionalmente, el scaffold debe tener propiedades mecánicas similares a las del tejido huésped en el que se va a implantar y debe ser lo suficientemente fuerte para permitir su manipulación durante el proceso de implantación. Adicionalmente, debe ser tridimensional, con una red de poros interconectados que favorezca el transporte celular y de nutrientes [42].

En la actualidad existen distintas técnicas para la fabricación de *scaffolds* implementados en la ingeniería de tejidos. Las técnicas de fabricación para scaffolds dependen de las propiedades morfológicas y de la superficie del material utilizado, al igual que de la función propuesta para dicha aplicación. Algunas de las técnicas más utilizadas incluyen liofilización (secado por congelación), separación de fases inducida térmicamente, laminación por membranas, disolución y colada con lixiviación de partículas, método de mezcla directa, método de soporte de espacios, entre otras [42].

El método de soporte de espacios es considerado como una de las opciones más viables para la fabricación de *scaffolds* porosos. Este método consiste en la implementación de partículas de polvo temporales para la formación de poros en la fabricación de *scaffolds*. Este método se divide en 4 etapas principales: la primera etapa consiste en introducir las partículas de polvo a la mezcla base para la fabricación del *scaffold*. En la segunda etapa se realiza una compactación del *scaffold* utilizando un troquel, seguido a esto se remueven las partículas de polvo introducidas al principio del proceso. Por último se procesan los *scaffolds* obtenidos de acuerdo al tamaño y la forma necesarios para la aplicación determinada [43]. Este método ha sido implementado para la fabricación de *scaffolds* a base de polietilenglicol (PEG) y nanohidroxiapatita [44].

Para aplicaciones de regeneración ósea se ha investigado el uso de materiales como cerámicos y polímeros gracias a su capacidad para imitar las propiedades naturales del hueso. El uso de la hidroxiapatita para la fabricación de *scaffolds* para la regeneración ósea ha sido ampliamente investigado debido a la similitud de las propiedades físicas y biológicas con el hueso, sin embargo usualmente estos *scaffolds* presentan una alta fragilidad por lo que se ha implementado el uso de polímeros para mejorar estas propiedades. A continuación se presentan las ventajas del uso de la hidroxiapatita y los polímeros para la fabricación de *scaffolds* para la ingeniería de tejidos óseos.

### 2.3.1. Hidroxiapatita para scaffolds óseos

La hidroxiapatita puede ser obtenida de fuentes naturales tales como huesos de pescado, conchas marinas, cáscaras de huevo, entre otras, o por fuentes sintéticas mediante la implementación de diferentes técnicas de síntesis tales como precipitación, hidrólisis y síntesis hidrotermal [45]. La ruta sintética involucra el uso de sales precursoras de calcio y fosfato tales como hidróxido de calcio y ácido fosfórico. El método de precipitación continua rápida es uno de los métodos más implementados para la síntesis de hidroxiapatita gracias a su facilidad y corto tiempo de reacción. Este método de síntesis consiste en una mezcla rápida de

dos soluciones acuosas de fuentes de calcio y fosfato que permita la interacción de partículas mediante movimiento molecular y agitación física. La mezcla rápida implementada en este proceso promueve el choque de partículas, que genera una agrupación de éstas para formar otras de mayor tamaño [46].

La hidroxiapatita al ser un mineral que comprende alrededor del 50 % del peso del tejido óseo, posee propiedades de osteoconducción y osteointegración [47]. Gracias a la composición de hidroxiapatita en el hueso, y a sus propiedades de biocompatibilidad, bioactividad, alta capacidad de osteoconducción y su capacidad de no generar un reacción inmunogénica, se ha considerado este biocerámico para el tratamiento de defectos óseos [5]. Estudios realizados, han demostrado que con el paso del tiempo la hidroxiapatita empleada en aplicaciones de tratamiento óseo, ha presentado una disminución de sus propiedades mecánicas, lo que compromete la fuerza intrínseca del hueso [48], limitando de esa manera sus aplicaciones.

El uso de la hidroxiapatita en una escala nanométrica ha permitido la mejora de la citocompatibilidad y la capacidad de formación de hueso de este biocerámico. La nano-estructura de los materiales ofrece una gran relación superficie/volumen, lo que aumenta la tasa de reabsorción [49]. Adicionalmente, se ha encontrado que a una escala nanométrica se evidencian mejoras en las características funcionales de la hidroxiapatita en comparación con la hidroxiapatita a una escala micrométrica. Se han evidenciado mejoras en la capacidad de promover la adhesión y proliferación de osteoblastos, osteointegración y deposición de calcio en sus superficies [45]. En la tabla 2.4 se pueden observar una comparación entre las propiedades de la hidroxiapatita a una escala micrométrica y nanométrica. Sin embargo, a pesar de las propiedades que posee este material que lo hace adecuado para su uso en aplicaciones de regeneración ósea, existen ciertas limitaciones como su fragilidad, altas tasas de deformación y su baja capacidad de biodegradación controlada que induce la investigación de materiales compuesto para mejorar dichas propiedades [50].

Tabla 2.4: Comparación de las propiedades de la Hidroxiapatita y la Nanohidroxiapatita.

	<b>Hidroxiapatita [50],[45]</b>	<b>Nanohidroxiapatita [50][27]</b>
<b>Propiedades</b>	<p><b>Ventajas</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>Biocompatibilidad</li> <li>Osteoconductiva</li> <li>Excelentes interacciones celulares</li> </ul> <p><b>Desventajas</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>Fragilidad</li> <li>Altas tasa de deformación</li> <li>Baja capacidad de biodegradación</li> </ul>	<p><b>Ventajas</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>Mejora en la biocompatibilidad</li> <li>Mejora las propiedades osteoconductoras</li> <li>Promueve la adhesión y proliferación celular</li> </ul> <p><b>Desventajas</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>Fragilidad</li> <li>Alta tasa de deformación</li> <li>Baja capacidad de biodegradación</li> </ul>

### 2.3.2. Scaffolds poliméricos

Los polímeros biodegradables empleados para la fabricación de *scaffolds* para la regeneración ósea pueden ser clasificados en dos categorías: de origen natural y de origen sintético. En la Tabla 2.5 se presentan las propiedades más importantes que deben presentar los polímeros más empleados para aplicaciones de regeneración ósea.

Tabla 2.5: Propiedades más importantes que deben presentar los polímeros utilizados para la fabricación de *scaffolds* para regeneración ósea.

Propiedades	Polímeros
Biocompatibilidad	<b>Polímeros naturales</b> Colágeno, Seda, Alginato, Quitosano
	<b>Polímeros sintéticos</b> Ácido poliglicólico (PGA), Ácido poliláctico (PLA), Ácido poliláctico-co-glicólico (PLGA), Polietilenglicol (PEG)
Biodegradabilidad	<b>Polímeros naturales</b> Seda, Alginato, Quitosano
	<b>Polímeros sintéticos</b> Ácido poliglicólico (PGA), Ácido poliláctico (PLA), Ácido poliláctico-co-glicólico (PLGA)
Buenas propiedades mecánicas	<b>Polímeros naturales</b> Seda, Alginato
	<b>Polímeros sintéticos</b> Ácido poliláctico (PLA), Ácido poliláctico-co-glicólico (PLGA)
Osteoconductor	<b>Polímeros naturales</b> Colágeno
	<b>Polímeros sintéticos</b> Ácido poliláctico (PLA), Ácido poliláctico-co-glicólico (PLGA)
Superficie hidrofílica	<b>Polímeros naturales</b> Colágeno, Alginato
	<b>Polímeros sintéticos</b> Polietilenglicol (PEG)

Dentro de los polímeros naturales se encuentra el colágeno, componente principal del tejido conectivo animal y debido a sus propiedades, se ha investigado ampliamente para aplicaciones biomédicas. Los materiales a base de colágeno son adecuados para *scaffolds* óseos y de cartílago [11]. El colágeno tipo I es una molécula de gran interés para la regeneración ósea debido a

su gran abundancia en el hueso natural. Este polímero presenta excelente biocompatibilidad, tasa de degradación e interacciones celulares favorables con otras macromoléculas orgánicas. Los scaffolds a base de colágeno se utilizan en la regeneración de tejidos óseos, ya sea en esponjas, láminas delgadas, geles o fibras. Este polímero tiene propiedades favorables para la regeneración de tejidos óseos, como su estructura porosa, la permeabilidad y la estabilidad *in vivo*. Adicionalmente, los *scaffolds* a base de colágeno apoyan la deposición de células, como osteoblastos y fibroblastos, y una vez implantados, facilitan el crecimiento del tejido [29].

Por otro parte la seda, el alginato y el quitosano son polímeros de origen natural que gracias a sus propiedades como, resistencia mecánica, biocompatibilidad, biodegradabilidad y capacidad para promover la adhesión y proliferación celular, los hace aptos para aplicaciones en la regeneración ósea.

Dentro de los polímeros sintéticos más usados se encuentra el ácido poliglicólico (PGA) que es un polímero termoplástico biodegradable. El PGA exhibe excelentes propiedades mecánicas, una excelente tasa de degradación y biocompatibilidad. Estudios han encontrado que *scaffolds* a base de PGA mostraron una buena reabsorción y la porosidad necesaria para permitir la adhesión y proliferación celular, sin embargo, su rigidez y su riesgo de provocar una respuesta inflamatoria debido a la naturaleza ácida de los subproductos de su degradación han restringido sus aplicaciones biomédicas [51]. La fuerza mecánica del PGA se reduce poco tiempo después de la implantación [27].

El ácido poliláctico (PLA) es un poliéster termoplástico biodegradable que posee buenas propiedades mecánicas y buena biocompatibilidad [52]. Este tipo de polímeros ha sido utilizado para la fabricación de *scaffolds* gracias a que se reabsorbe con facilidad, tiene propiedades de ductilidad y es fácil de procesar, sin embargo no exhibe buenas propiedades de osteoinducción por lo que debe ser combinado con otros materiales como la hidroxiapatita para ser empleado para aplicaciones de ingeniería de tejidos óseos [21]. El PLA es un polímero hidrofóbico y su degradación puede tardar entre meses y años después de ser implantado [27]. La tasa de degradación de polímeros como el PGA y PLA puede ser modificada realizando mezclas copoliméricas, como es el caso del ácido poliláctico-co-glicólico (PLGA)[27]. El PLGA es un copolímero conformado por PLA y PGA, que se caracteriza por sus buenas propiedades mecánicas, biodegradabilidad y biocompatibilidad, que lo hace ideal para aplicaciones de regeneración ósea [53]. Esta combinación polimérica permite ajustar la tasa de degradación de acuerdo a la aplicación [27].

El polietilenglicol (PEG) es un poliéter no degradable, que presenta una excelente biocompatibilidad y alta hidrofiliidad en su superficie, que favorecen la absorción de proteínas y la adhesión celular, que lo hacen apto para aplicaciones en ingeniería de tejidos [52].

El uso de polímeros permite el diseño de la porosidad, la tasa de degradación y las propiedades mecánicas de los *scaffolds* de acuerdo a la necesidad dependiendo del sitio de aplicación [54]. Sin embargo al ser utilizados solos presentan una baja capacidad de carga, por lo que se busca la combinación de polímeros con biocerámicas para mejorar las propiedades de los scaffolds [55].

### 2.3.3. Scaffolds compuestos

Aunque la hidroxiapatita es osteogénica y osteoconductiva, tiene una naturaleza frágil que dificulta su fabricación en diferentes formas y tamaños [51]. Al combinar polímeros y cerámicos como la hidroxiapatita (HA) en la fabricación de scaffolds para la regeneración de tejidos

óseos, se logra replicar las propiedades del hueso natural y cumplir con los requerimientos necesarios de un *scaffold* como sustituto óseo [55]. Esta combinación permite la mejora de las propiedades mecánicas y bioactivas ofreciendo mejores resultados para aplicaciones de regeneración de tejido óseo [55].

Se ha encontrado que la síntesis de *scaffolds* poliméricos compuestos con HA presentan una mejora en sus propiedades mecánicas (resistencia a la torsión y flexión) y biológicas (Actividad osteogénica), así como una disminución de los efectos adversos presentados de la degradación polimérica [27]. *Scaffolds* a base de HA y polímeros naturales como el colágeno y el quitosano, han presentado mejoras en sus propiedades mecánicas, biocompatibilidad, aumento de la osteoinductividad y formación ósea [7], [56]. Una mejora en la citocompatibilidad mejorando la adhesión y proliferación celular [51]. De igual manera el uso de polímeros sintéticos como el PLA para la fabricación de *scaffolds* ha mostrado mejoras en la osteoconductividad y formación ósea, reduciendo la respuesta inflamatoria al ser implantado [57]. Diversos estudios han reportado que los *Scaffolds* a base de PLGA y HA han mostrado excelentes propiedades de biocompatibilidad, un incremento en la osteoconductividad y osteoinductividad y la adhesión de osteoblastos que lo convierte en un *scaffold* ideal para la regeneración ósea [58]. En la Tabla 2.6 se pueden observar algunos de los *scaffolds* compuestos que se han implementado para la regeneración ósea y las ventajas que se han reportado.

Tabla 2.6: *Scaffolds* compuestos con hidroxiapatita y polímeros y su efecto en la regeneración de tejido óseo.

<b><i>Scaffold</i> compuesto</b>	<b>Impacto en la regeneración ósea</b>
Quitosano/HA [59]	Demostró una buena viabilidad, adhesión y proliferación celular Alta actividad de fosfatasa alcalina que promueve la diferenciación condrogénica
Colágeno/HA [60]	Promueve la diferenciación osteogénica Mejora en las propiedades mecánicas
Alginato/Colágeno/HA [61]	Viabilidad celular de fibroblastos Promueve la adhesión y proliferación de osteoblastos
PLA/HA [57]	Osteoconductividad Biocompatibilidad Tasa alta de reabsorción
PLGA/HA [62]	Biocompatibilidad Osteoconductividad Adhesión y proliferación de osteoblastos
PEG/HA [44]	Osteoconductividad Viabilidad, adhesión y proliferación de fibroblastos

### 2.3.4. Incorporación de nanomateriales en scaffolds óseos: Puntos de carbono

La posibilidad de mejorar scaffolds de polímeros biodegradables y nanohidroxiapatita puede encontrarse en la adición de puntos de carbono (PC). Estas nanopartículas fluorescentes basadas en carbono son estructuras biocompatibles con una gran área superficial que puede ser aprovechada para conjugar medicamentos o biomoléculas que favorezcan el proceso de reconstrucción de la masa ósea o disminuir la tasa de descomposición de los huesos [63]. De igual manera se ha encontrado que la implementación de estas nanopartículas a base de carbono mejoran la propiedades mecánicas, promueven la actividad osteogénica de los *scaffolds* y ayudan a una distribución uniforme de la hidroxiapatita en la matriz polimérica para una regeneración ósea más eficiente [23]. Los PC son nanomateriales de un tamaño aproximado de 10 nm [23]. Gracias a sus propiedades fisicoquímicas y ópticas estas nanopartículas son consideradas ideales para aplicaciones biológicas [64].

Debido a sus propiedades, los PC se han implementado para la regeneración ósea y reparación de defectos óseos. La adición de estas nanopartículas en la fabricación de *scaffolds* óseos a base de hidroxiapatita, ha demostrado mejoras en la actividad biológica, en términos de la adhesión de osteoblastos, la diferenciación osteogénica y la proliferación celular [65]. Adicionalmente, se ha observado una mejora en las propiedades mecánicas e interacciones intermoleculares de estos *scaffolds*, dada por la distribución uniforme de dichas nanopartículas, que permite su efectividad en la regeneración ósea [23]. Investigaciones recientes han estudiado el uso de compuestos a base de PC y polímeros para la fabricación de *scaffolds*. En la Tabla 2.7, se pueden observar los materiales compuestos con PC y sus propiedades. Wang et al. [66] estudiaron la fabricación de *scaffolds* a base de PC, hidroxiapatita y acetato de polivinilo (PVA, por sus siglas en inglés). Se encontró que los *scaffolds* fabricados exhibían propiedades de biocompatibilidad y una alta viabilidad celular en sus superficies. Por otro lado Sarkar et al. desarrollaron un material a base de PC, carboximetilcelulosa e hidroxiapatita, el cual exhibió una buena biocompatibilidad, adhesión y proliferación celular que favorecen la regeneración ósea [67]. Nejlá et al. fabricaron películas a base de PC y policaprolactona (PCL), las cuales exhibían propiedades de bioactividad, biocompatibilidad y una buena viabilidad celular de osteoblastos obteniendo resultados prometedores para la regeneración de tejido óseo [68].

Tabla 2.7: Materiales compuestos con puntos de carbono y sus propiedades.

Compuesto	Propiedades
PC/HA/PVA [66]	Demostró una buena Biocompatibilidad Alta tasa de viabilidad celular
PC/HA/carboximetilcelulosa [67]	Demostró una buena Biocompatibilidad Adhesión y proliferación celular
PC/PCL [68]	Demostró una buena Biocompatibilidad Viabilidad celular Bioactividad

En la actualidad existen distintos métodos para la síntesis de puntos de carbono dentro de los cuales se encuentran la asistencia ultrasónica, asistencia microplasmática, carbonización,

métodos hidrotermales y métodos por reacción por microondas [69].

El método de síntesis por microondas, es un método que puede proporcionar un calentamiento homogéneo, eficiente y rápido y que conduce a velocidades de reacción más rápidas, empleado para la síntesis de nanopartículas a base de carbono fluorescentes con una distribución de tamaño uniforme [69].

Debido a que los puntos de carbono son nanomateriales fluorescentes es necesario realizar una caracterización de sus propiedades ópticas para lo cual puede ser empleada la Espectroscopia UV-Visible y la espectroscopia de fluorescencia. Para la Espectroscopia UV-Vis las transiciones que resultan de la absorción de radiación en esta región del espectro hacen referencia a transiciones electrónicas entre niveles de menor a mayor energía. Cuando los electrones excitados se relajan ocurre una transición electrónica de un nivel de mayor energía a uno de menor energía, en este proceso se liberan fotones generando un espectro de radiación electromagnética a diferentes longitudes de onda, llamado espectro de emisión [70].

### 2.3.5. Evaluación de la citotoxicidad

Es de gran importancia determinar el comportamiento biológico *in vitro* de los materiales utilizados en aplicaciones biológicas para determinar la biocompatibilidad de estos. Existen distintas pruebas para analizar el comportamiento biológico de distintos materiales tales como el ensayo MTT.

El ensayo MTT es empleado para medir la actividad metabólica celular como un indicador de la viabilidad, proliferación y citotoxicidad celular [71]. Este ensayo colorimétrico se basa en la reducción de una sal de tetrazolio amarilla a cristales de formazán morados por medio de células activas metabólicamente (Figura 2.3). Cuando las células mueren, estas pierden la habilidad de convertir MTT en formazan, por lo que la presencia de color sirve como un indicador de células viables [72]. Debido a que las células viables con un metabolismo activo tienen la capacidad de convertir MTT en formazán morado con una absorbancia con un máximo cercano a los 570 nm, se mide la absorbancia de los pozos sembrados como indicador de la presencia de células viables.

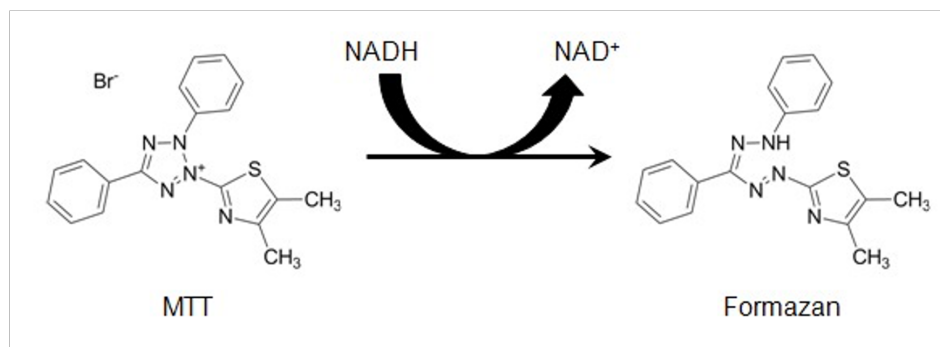


Figura 2.3: Reducción de sal de tetrazolio a cristales de formazán. Tomada de [72].

## Capítulo 3

# METODOLOGÍA

Dados los objetivos específicos de este trabajo se plantearon 5 etapas para el desarrollo del mismo. En la figura 3.1, se puede observar el diagrama de flujo del proceso que se llevo a cabo para la ejecución del proyecto. Este esta compuesto de 5 etapas principales, la primera consiste en la síntesis de puntos de carbono (PCs) por método de reacción por microondas, seguido a esto se realiza la síntesis de nanopartículas de hidroxapatita (nHA) embebida con PCs y se procede a realizar pruebas de caracterización de las propiedades ópticas de las nanopartículas sintetizadas. En la siguiente etapa se realiza la síntesis de *scaffolds* a base de polietilenglicol (PEG) y la nHA embebida con los PCs y se procede a realizar la evaluación y caracterización de los mismos.

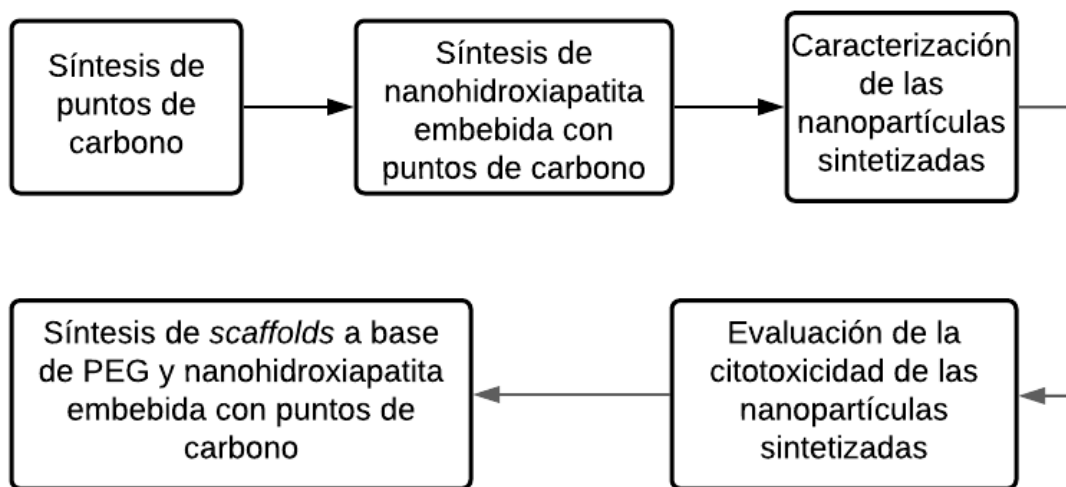


Figura 3.1: Diagrama de flujo de las etapas llevadas a cabo para la ejecución del trabajo.



### 3.1 Síntesis de puntos de carbono

La obtención de puntos de carbono se llevo a cabo por método de reacción por microondas y esta compuesta de tres etapas principales: síntesis, lavado y secado. Los materiales utilizados en este procedimiento fueron ácido cítrico (Scharlau) como precursor orgánico, mientras que etanol absoluto al 99 % (Scharlau) y N,N-Dimetilformamida (Sharlau) fueron empleados como solventes.

En primer lugar, en la etapa de síntesis, se dispersó 1.5 g de ácido cítrico en una solución 1:1 (vol:vol) de etanol y N,N-dimetilformamida. La solución resultante fue sonicada por 5 minutos y luego se introdujo en el reactor de síntesis de microondas MONOWAVE 50 (Anton Paar, Austria), utilizando el método AFAP (As fast as posible), con una temperatura de 175°C por 5 min. El método de reacción por microondas permite acelerar el proceso de síntesis en comparación a otros métodos de calentamiento [73].

La solución obtenida del proceso de síntesis pasa por una etapa de lavado para eliminar el precursor orgánico no reaccionado. En esta etapa la solución fue centrifugada a 10,000 rpm por 10 minutos, seguido a esto se filtró con un filtro de 0.20  $\mu\text{m}$  (Minisart NY 25, PTFE) y por un último fue sometida a un proceso de diálisis por 24 horas. Finalmente el producto obtenido se seca en un horno (UM100, Memmert, Países Bajos) a 125°C por 12 horas [73].

Con el fin de evaluar las propiedades ópticas (absorción y fluorescencia) en función de la concentración, se prepararon soluciones acuosas de puntos de carbono a diferentes concentraciones (40 mg/mL, 20mg/mL, 10mg/mL y 5mg/mL).

### 3.2 Síntesis de nanopartículas de hidroxiapatita embebidas con puntos de carbono

El método de síntesis de nanopartículas de hidroxiapatita esta basado en el procedimiento reportado por Mercado et al [24]. En este procedimiento una suspensión de hidróxido de calcio (2.5 gramos en 20 mL de agua destilada, Emsure) se agitó y calentó hasta alcanzar una temperatura de 85°C. Se inició un goteo de 30 mL de una solución de ácido fosfórico (2.22 gramos de ácido fosfórico en agua destilada, Sigma-Aldrich) en la suspensión de hidróxido de calcio manteniendo una agitación y temperatura constante hasta obtener una suspensión de nanohidroxiapatita (Figura 3.2). El precipitado fue separado por centrifugación a 4000 rpm por 10 minutos, seguido de un lavado con agua destilada y etanol. Se secó a 110°C por 12 horas.

Para la incorporación de puntos de carbono en las nanopartículas de hidroxiapatita se realizó una modificación al procedimiento descrito anteriormente, en donde el goteo se realizó con una solución de 30 mL compuesta de una solución de ácido fosfórico a una concentración de 75 mg/mL y una solución de puntos de carbono a una concentración de 40 mg/mL.

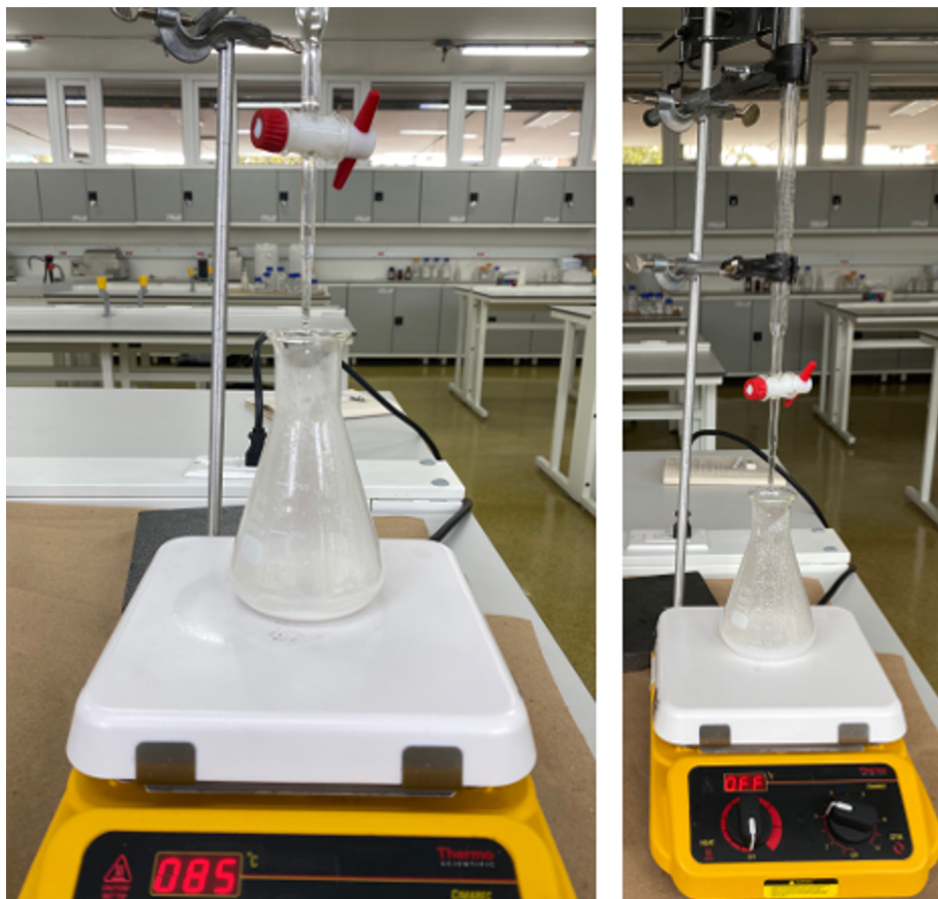


Figura 3.2: Montaje goteo de ácido fosfórico en hidróxido de calcio para la síntesis de nanopartículas de hidroxiapatita embebidas con puntos de carbono.

### 3.3 Fabricación de scaffolds a base de PEG y puntos de carbono embebidos en nanopartículas de hidroxiapatita

El método para la fabricación de *scaffolds* a base de PEG y puntos de carbono embebidos en nanopartículas de hidroxiapatita está basado en el procedimiento reportado por Kumar et al [44]. En este procedimiento se implementó el método de mezcla directa y el método de soporte de espacios. Se utilizó metanol, agua destilada, Polietilenglicol (PEG) y la nanohidroxiapatita embebida con puntos de carbono sintetizada anteriormente.

En este procedimiento se realizó la mezcla de una solución de nanohidroxiapatita (2 gramos de nanohidroxiapatita en 50 mL de metanol) y una solución de PEG (25 % p/p de nanohidroxiapatita en 50 mL de agua destilada) bajo agitación constante durante 4 horas y después de esto se ubica la solución en una plancha de calentamiento a una temperatura de 40°C durante 2 horas. Seguido a esto se centrifugó la solución a 5000 rpm y se elimina el sobrenadante restante. El precipitado obtenido se secó en un horno a 80° por 24 horas y por último se colocó en un horno a 200°C durante 6 horas. El polvo seco obtenido del tratamiento térmico anterior, se moldea con la ayuda de un troquel siguiendo el método de soporte espacial, con el fin de obtener los *scaffolds* deseados.

Como método de prueba se realizó el procedimiento a escala donde se utilizaron 0.5 gramos de nanohidroxiapatita en 12.5 mL de metanol y una suspensión de 0.125 gramos de PEG en 12.5 mL de agua destilada.

### 3.4 Pruebas de caracterización

Se realizó la caracterización de las propiedades ópticas y un estudio preliminar de citotoxicidad de los productos obtenidos de los procesos de síntesis realizados. En el caso de las propiedades ópticas se realizó espectrofotometría UV-Vis y para los estudios de citotoxicidad un ensayo MTT.

#### 3.4.1. Espectrofotometría UV-Vis para la determinación de las propiedades de absorción y fluorescencia

Los espectros de absorción UV-Vis de las nanopartículas sintetizadas se midieron en el espectrofotómetro FLAMES-S-XR1-ES con ayuda del software Ocean View (Figura 3.3). Las mediciones se tomaron en un rango de longitud de onda desde 200 nm a 800 nm usando una celda de cuarzo de 1 cm de paso óptico.



Figura 3.3: Montaje espectrofotómetro FLAMES-S-XR1-ES - Ocean view.

Los datos obtenidos de Ocean View fueron tratados con el software Origin Lab para obtener las gráficas de absorbancia en función de la longitud de onda y finalmente obtener una curva de calibración que permita conocer la concentración de puntos de carbono obtenida en función de la absorbancia.

Los espectros de fluorescencia se midieron en un Lector Multimodal Cytation 3 (Bio Tek). Las mediciones del espectro de fluorescencia se realizaron sobre las mismas soluciones empleadas para obtener el espectro de absorción. Se realizó un estudio de la fluorescencia en función de la longitud de onda de excitación.

### 3.4.2. Ensayo MTT

La citotoxicidad de las nanopartículas sintetizadas se analizó por medio de un ensayo MTT, con soluciones acuosas de puntos de carbono y de nanopartículas de hidroxiapatita a diferentes concentraciones (500, 250, 125, 75 y 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ).

Células epiteliales del riñón (células Vero) se sembraron en una placa de 96 pozos (Figura 3.4) y se incubaron a  $37^\circ\text{C}$  en un ambiente de 5% de  $\text{CO}_2$  por una noche. Se introdujo la solución de puntos de carbono y la solución de puntos de carbono embebidos en nanopartículas de hidroxiapatita con diferentes concentraciones (500, 250, 125, 75, 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , de cada solución) en distintos pozos de la placa y se cultiva por 24 horas. Luego de ser incubadas se agregaron 20  $\mu\text{L}$  de solución MTT a cada pozo utilizado y se cultivó por 4 horas a  $37^\circ\text{C}$ . Seguido a eso se retiró la solución de MTT agregada con anterioridad y se agregaron 200  $\mu\text{L}$  de DMSO para disolver las sales de formazan. Finalmente, se leyó la densidad óptica a 560 nm y se restó el fondo a 670 nm. Se espera que la densidad óptica esté directamente relacionada con la cantidad celular [73].

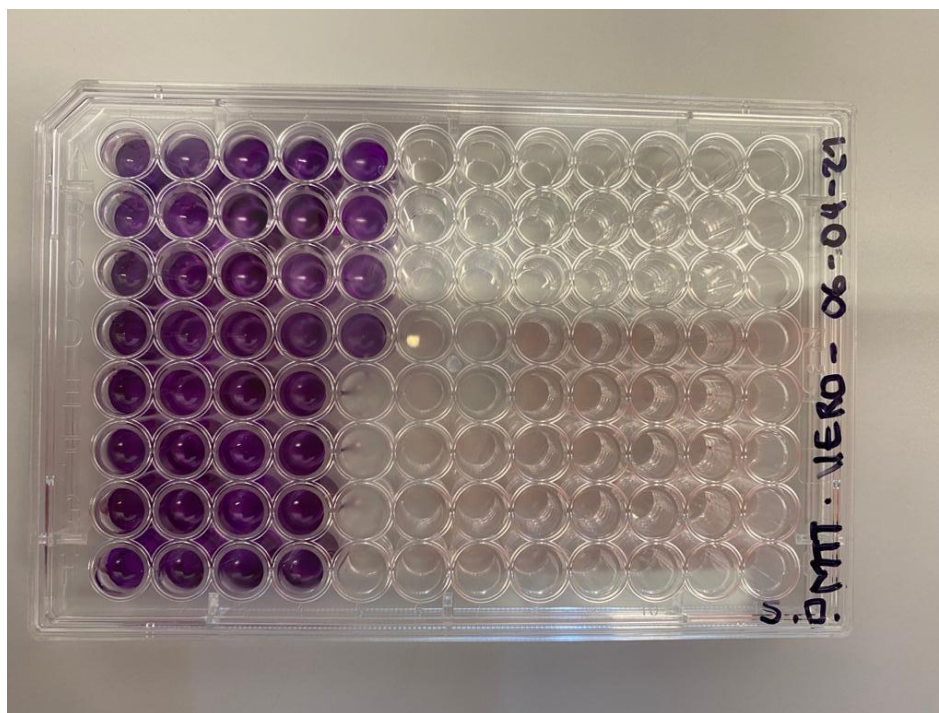


Figura 3.4: Plato de 96 pozos utilizado para realizar ensayos MTT.

Se utilizaron células Vero, ya que a todo tipo de material utilizado para aplicaciones biomédicas se deben realizar estudios de viabilidad y citotoxicidad en la mayor cantidad de líneas celulares posibles. Diferentes líneas celulares y contextos biológicos para evaluar su biocompatibilidad. Se empezó con células del riñón ya que hay reportes de que se puede presentar una biodistribución del material y puede llegar a acumularse en el riñón, por lo que es importante evaluar la citotoxicidad que puedan presentar estos materiales al entrar en contacto con este tejido [74].

Para analizar los resultados obtenidos del ensayo MTT se realizó una prueba ANOVA

con el fin de determinar si se encontraban diferencias significativas entre la viabilidad celular presentada al exponer las células Vero a soluciones acuosas de puntos de carbono y soluciones acuosas de nanohidroxiapatita embebida con puntos de carbono a diferentes concentraciones. Se estableció una hipótesis nula que establece que las medias de la viabilidad celular obtenida para estas muestras son iguales. De acuerdo a los resultados obtenidos de la prueba ANOVA se acepta o rechaza la hipótesis nula planteada.

## Capítulo 4

# RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En este capítulo se presentan los resultados obtenidos del proceso de síntesis de puntos de carbono por reacción de microondas y la síntesis de las nanopartículas de hidroxiapatita embebidas con puntos de carbono por método de precipitación rápida. Adicionalmente, se presentan los resultados obtenidos de la caracterización de las propiedades ópticas de las nanopartículas sintetizadas y por último la evaluación de su citotoxicidad en líneas celulares vero por medio de un ensayo MTT.

### 4.1 Caracterización de los puntos de carbono

La solución obtenida de la síntesis de puntos de carbono a una temperatura de 175°C, al ser excitada a una longitud de onda de 365 nm, exhibe una fluorescencia azul (Figura 4.1). Esto indica la presencia de partículas fluorescente a base de carbono, y permite decir que el método de síntesis por microondas a 175°C favorece la formación de puntos de carbono fluorescentes. Al diluir la solución de los puntos de carbono, sintetizada a partir de ácido cítrico, etanol y N,N dimetilformamida, (40 mg/mL, 20mg/mL, 10mg/mL y 5mg/mL), se puede observar como varía la fluorescencia de las soluciones en función de la concentración de puntos de carbono al ser excitadas a una longitud de onda de 365 nm (Figura 4.1).

El espectro de absorción de los puntos de carbono se muestra en la Figura 4.2. Se puede observar como para cada concentración, hay una banda de absorción centrada a la longitud de onda de mayor transición [75]. Se observa que los máximos de la banda de absorción de las distintas concentraciones oscilan entre los 220 y 300 nm. Esto se da ya que estas longitudes de onda tienen la energía necesaria para excitar los electrones de los puntos de carbono de un estado de menor a mayor energía. Esta banda de absorción se atribuye a transiciones electrónicas relacionadas al enlace C=O de los grupos carboxilo aportados por el ácido cítrico. Se presenta un corrimiento en la banda de absorción en función de la concentración de puntos de carbono debido a que a mayor concentración se presentan más puentes de Hidrógeno de los grupos C=O con el solvente (agua). Este corrimiento ocurre por las vibraciones presentadas por la formación de estos puentes de hidrógeno entre el agua y los grupos carboxilo, que provoca transiciones electrónicas a menores niveles de energía provocando el corrimiento de la banda hacia mayores longitudes de onda. Esta información es necesaria para poder obtener las longitudes de onda a las que al excitar las nanopartículas se da la mayor fluorescencia.

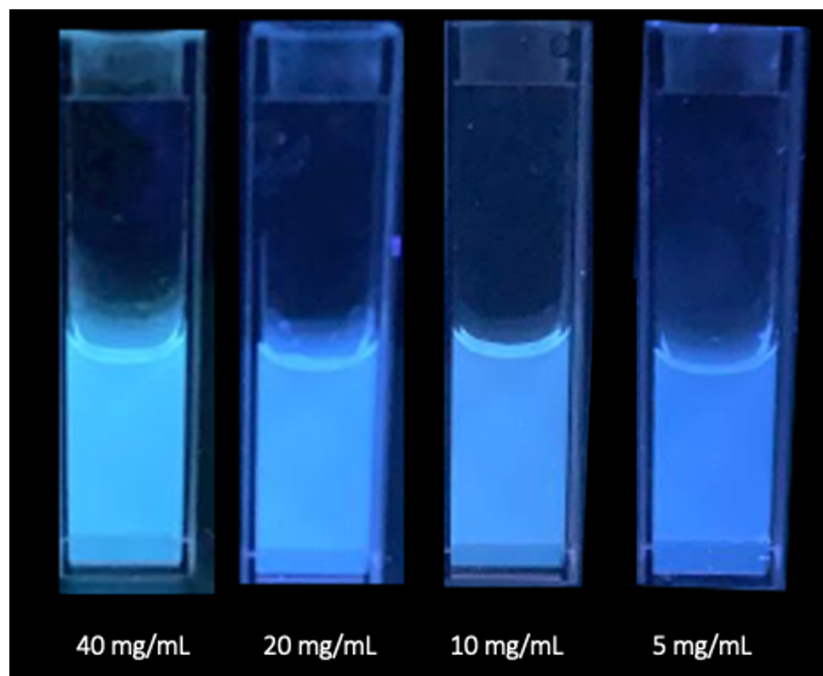


Figura 4.1: Fluorescencia de soluciones de puntos de carbono a diferentes concentraciones al ser excitadas a una longitud de onda de 365 nm.

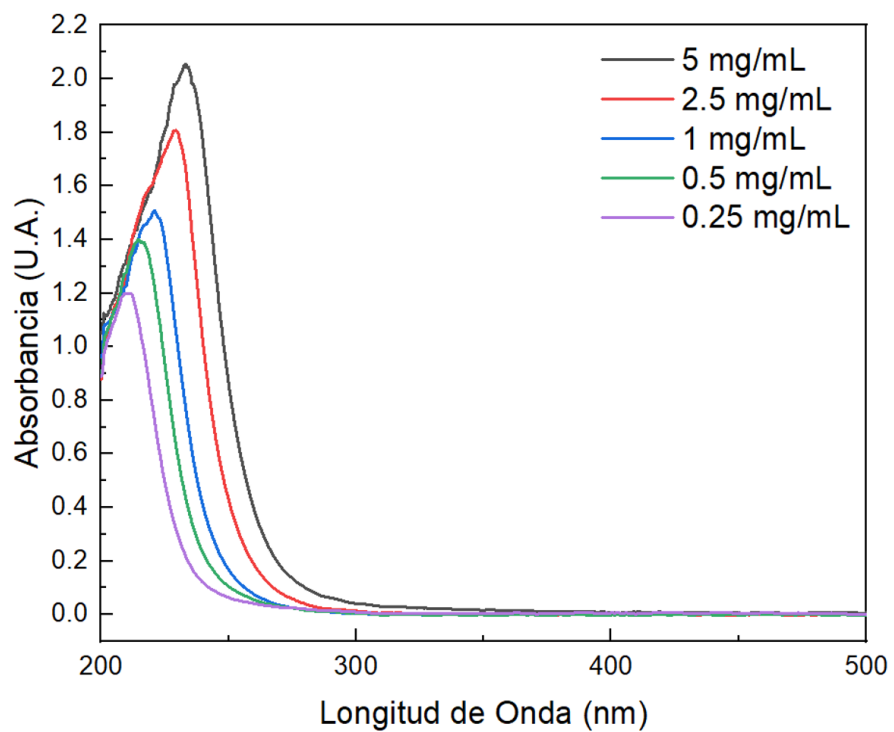


Figura 4.2: Espectro de absorción de soluciones con puntos de carbono a diferentes concentraciones.

Los espectros de emisión son obtenidos al excitar los puntos de carbono a longitudes de onda con la energía suficiente para lograr la excitación de sus electrones de un nivel de menor a uno de mayor energía. Dependiendo del nivel de energía que los electrones logren alcanzar se presentará una emisión a determinada longitud de onda. El espectro de emisión de una solución de puntos de carbono a una concentración de 2.5 mg/mL al ser excitada a diferentes longitudes de onda se puede observar en la Figura 4.3. A una longitud de onda de excitación de 280 nm los PC presentan un espectro de emisión, que abarca la generación de fotones de luz entre los 300 y 400 nm. Se observa una dependencia de la longitud de excitación con la emisión, a medida que se aumenta la longitud de onda de excitación se evidencia un corrimiento de la banda de emisión a mayores longitudes de onda. Valores de excitación cercanos a una longitud de onda de 240 nm producirá una mayor emisión. Esta información permite conocer a que longitudes de onda deben ser excitadas las nanopartículas para obtener la mayor intensidad de fluorescencia posible. Esta característica puede ser utilizada para hacer un seguimiento de un *scaffold* compuesto con puntos de carbono al ser implantado, aprovechando estas propiedades fluorescentes.

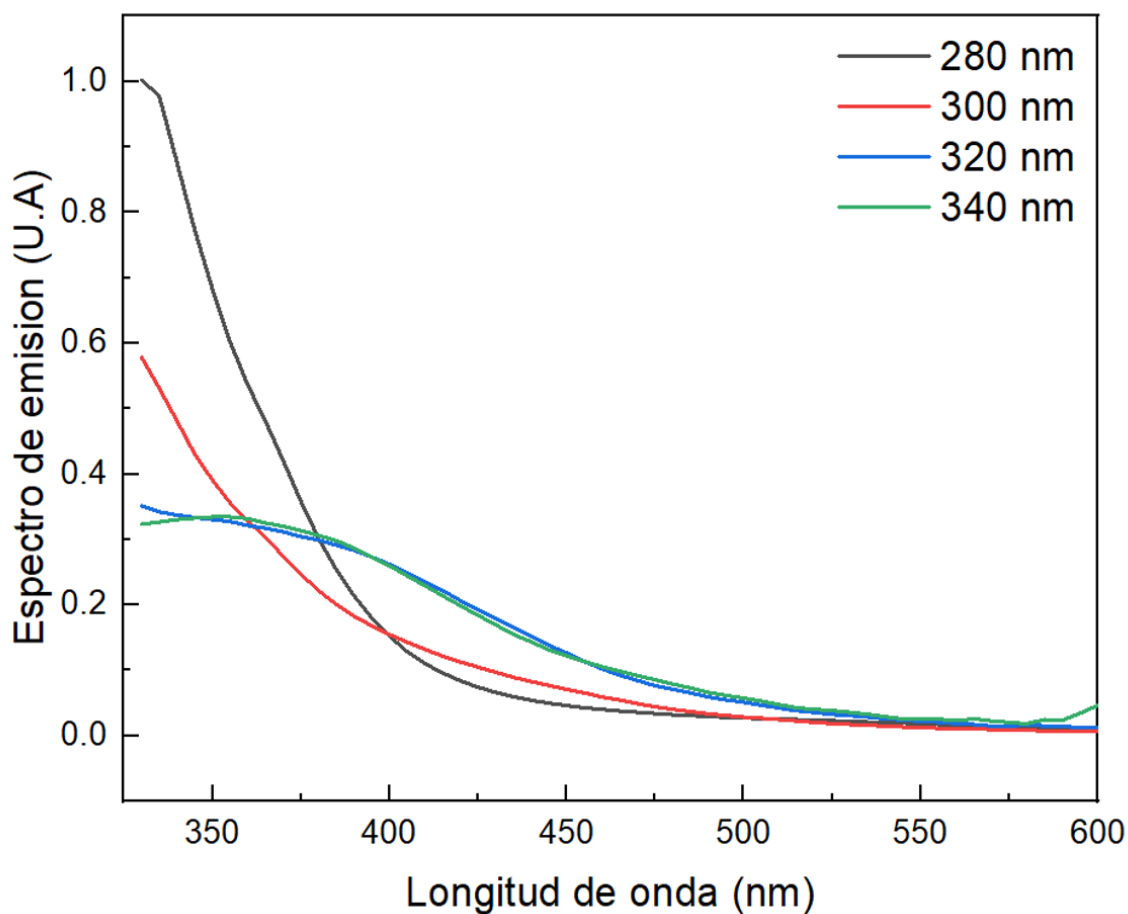


Figura 4.3: Espectro de emisión de una solución acuosa de puntos de carbono a 2.5 mg/mL.



## 4.2 Caracterización de nanopartículas de hidroxiapatita embebidas con puntos de carbono

El método de precipitación rápida mostró ser un método efectivo para lograr la incorporación de puntos de carbono en las nanopartículas de hidroxiapatita. En la Figura 4.4 se pueden observar las nanopartículas de hidroxiapatita al ser excitadas con una longitud de onda de 365 nm. Se logran observar unos puntos fluorescentes de color azul que indican la incorporación efectiva de los puntos de carbono durante el proceso de síntesis. Esto indica que las nanopartículas de hidroxiapatita adquirieron las propiedades ópticas de los puntos de carbono permitiendo su fluorescencia al ser excitadas a longitudes de onda que van desde los 200 a 300 nm.

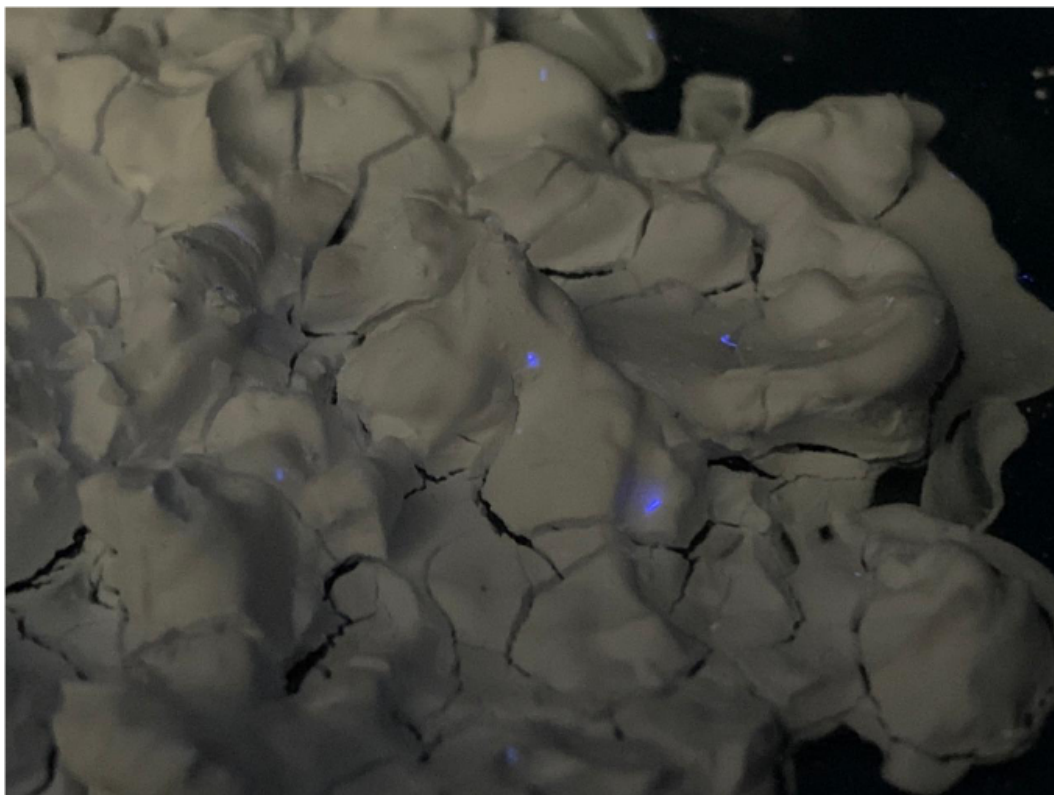


Figura 4.4: Nanopartículas de hidroxiapatita embebidas con puntos de carbono al ser excitada a 365 nm.

De igual forma se realizó la caracterización de las propiedades ópticas de las nanopartículas de hidroxiapatita embebidas con puntos de carbono (nHA-PC) sintetizadas con el procedimiento descrito en la sección 3.2 con el fin de verificar la incorporación de los puntos de carbono en las nanopartículas de hidroxiapatita. En la Figura 4.5 se puede observar la comparación entre el espectro de absorción de los puntos de carbono y las nanopartículas de nanohidroxiapatita embebidas con puntos de carbono.

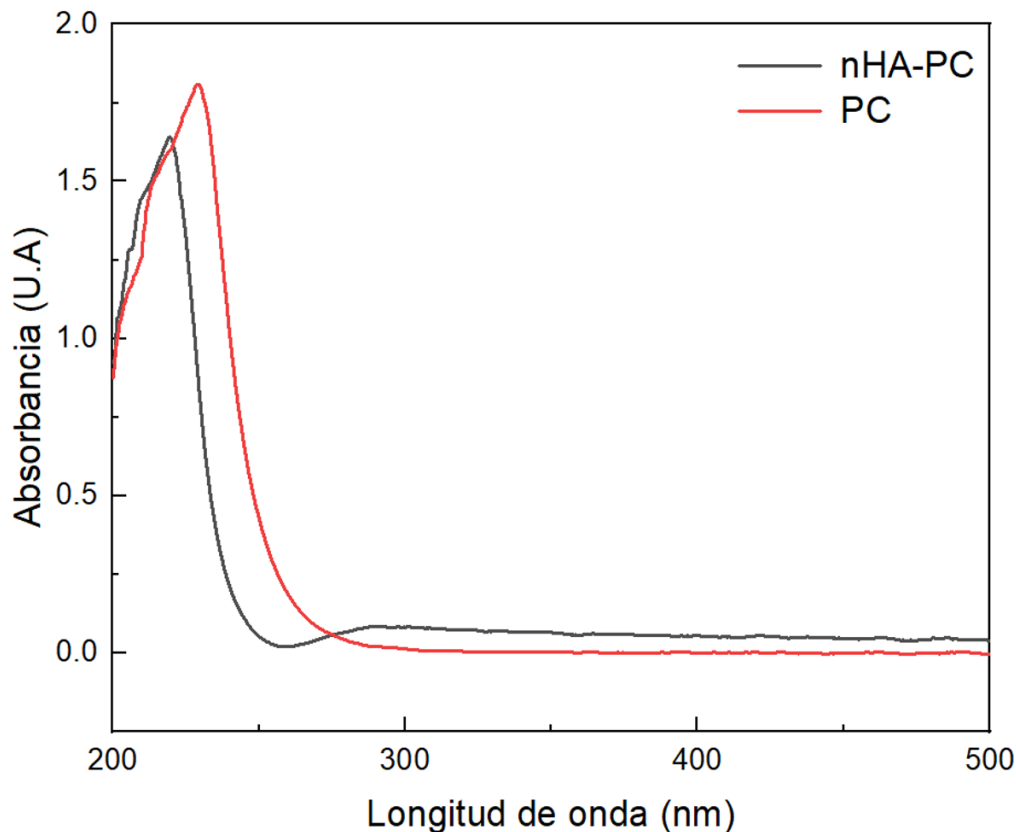


Figura 4.5: Espectro de absorción de puntos de carbono y nanohidroxiapatita embebida con puntos de carbono.

Se evidencia como el espectro de absorción de los puntos de carbono es mayor al de la nHA-PC, esto es debido a que la concentración de puntos de carbono en la nanohidroxiapatita es menor. Esto se puede presentar ya que en el proceso de síntesis la totalidad de los puntos de carbono utilizados, no se incorporaron a las partículas de hidroxiapatita. Adicionalmente, se puede observar un corrimiento en la banda de absorción obtenida para los puntos de carbono y la nanohidroxiapatita embebida con puntos de carbono. Este corrimiento se debe a que la banda de absorción se presenta gracias a que los grupos C=O de los puntos de carbono hacen puentes de hidrógeno con el solvente. Al estar embebidos en la nanohidroxiapatita se genera una banda de absorción menor. De acuerdo a los espectros de absorción obtenidos de los puntos de carbono a diferentes concentraciones se construyó una curva de calibración que permite conocer la concentración de puntos de carbono que se encuentra en determinada solución de acuerdo a su absorbancia. Utilizando la curva de calibración de la Figura 4.6 y el espectro de absorción de la nHA-PC se puede hacer un cálculo de la cantidad de puntos de carbono que se incorporaron de manera efectiva en las nanopartículas de hidroxiapatita. En la Figura 4.5 se puede observar que la absorbancia máxima de las nanopartículas de hidroxiapatita embebidas con puntos de carbono tienen un valor aproximado de 1.65. De acuerdo a la curva de calibración de la Figura 4.6 este valor de absorbancia está asociado a una concentración aproximada de 1.7 mg/mL de puntos de carbono. Teniendo en cuenta que

masa = volumen x concentración, y el volumen de la solución fue de 10 mL, se puede decir que en esa solución de nanohidroxiapatita embebida con puntos de carbono se encuentra una cantidad aproximada de 17 mg de puntos de carbono. Este calculo permite establecer que durante la síntesis de las nanopartículas de hidroxiapatita embebidas con puntos de carbono se incorporaron aproximadamente el 68 % de los puntos de carbono adicionados inicialmente. De acuerdo a estos resultados se puede decir que el método de precipitación continua empleado para la incorporación de puntos de carbono en las nanopartículas de hidroxiapatita mostró resultados prometedores para cumplir con dicho objetivo. Sin embargo se requieren de diversas técnicas de caracterización para confirmar este hecho.

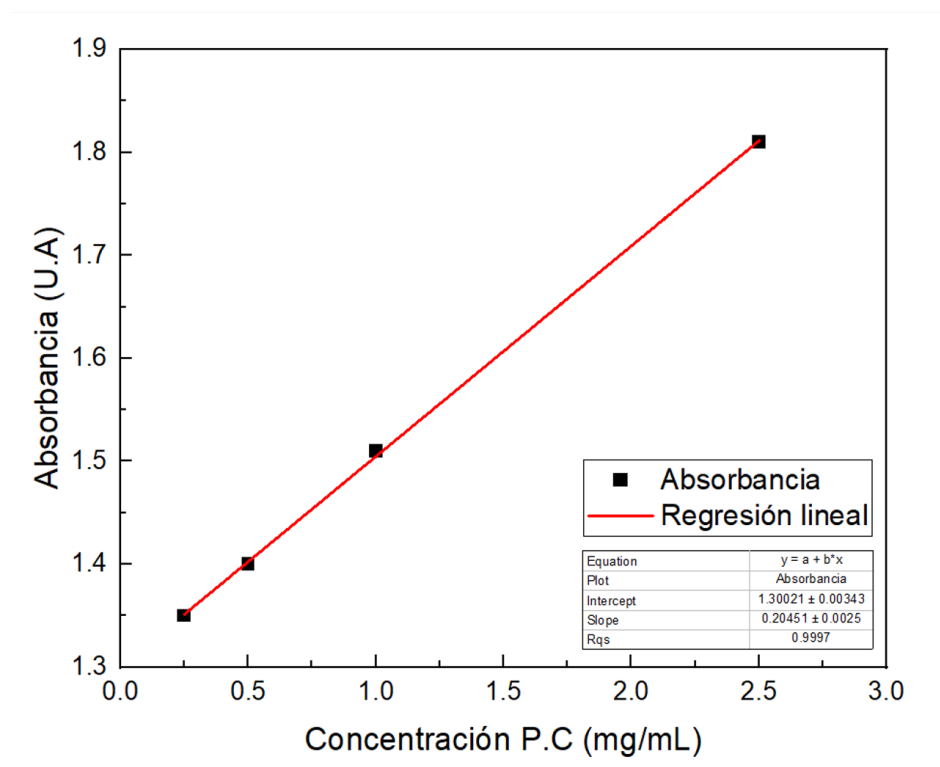


Figura 4.6: Curva de calibración de los puntos de carbono. Se establece la concentración de puntos de carbono en función de la absorbancia.

En la Figura 4.7 se puede observar la comparación entre el espectro de emisión obtenido de los puntos de carbono y de las nanopartículas de nanohidroxiapatita embebidas con puntos de carbono a una concentración de 2.5 mg/mL al ser excitados a una longitud de onda de 320 nm, donde la curva sólida representa los puntos de carbono y la curva punteada la nHA-PC. En esta gráfica se representa la intensidad de emisión (eje Y) como función de la longitud de onda (eje X).

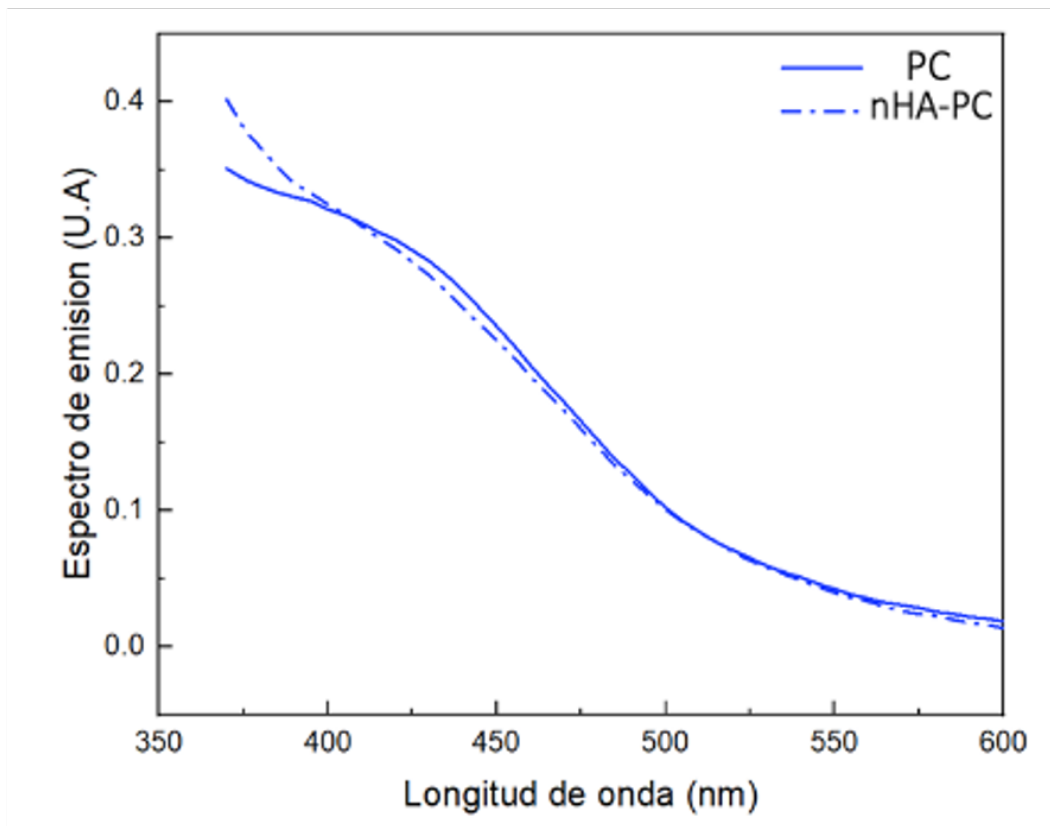


Figura 4.7: Espectro de emisión de puntos de carbono y nanohidroxiapatita embebida con puntos de carbono excitadas a una longitud de onda de 320 nm.

Se puede observar que los espectros de ambas muestras tienen una curva de emisión similar, lo que indica que lo que emite son los puntos de carbono considerando a este como el fluoróforo de ambas muestras. Estas curvas de emisión nos indican que los fluoróforos de ambas muestras tienen un comportamiento similar, es decir que son los mismos puntos de carbono los que están provocando estas propiedades fluorescentes en las muestras de nanohidroxiapatita. Se observa que la banda de emisión va desde los 380 a los 500 nm aproximadamente, lo que explica el color azul exhibido al excitar los puntos de carbono a una longitud de onda de 365 nm. Las propiedades fluorescentes adquiridas por las nanopartículas de hidroxiapatita gracias a la incorporación de puntos de carbono puede tener aplicaciones en la liberación de medicamentos gracias a la presencia de enlaces fotosensibles. Adicionalmente se puede utilizar esta propiedad para realizar un seguimiento en la degradación del material y estimar la tasa de degradación del mismo.

### 4.3 Ensayo MTT

Se utilizó una línea celular de células Vero para llevar a cabo el ensayo de citotoxicidad. Es de gran importancia evaluar la citotoxicidad en diferentes líneas celulares con el fin de obtener más información de la biocompatibilidad de las nanopartículas sintetizadas. El análisis de la citotoxicidad en células epiteliales del riñón (células Vero) es de gran importancia ya

que en pruebas *in vivo* se ha reportado una biodistribución de las nanopartículas que puede resultar en la acumulación de éstas en órganos como el riñón, por lo que es útil conocer su biocompatibilidad en este tipo de tejidos [76].

En la Figura 4.8 se puede observar el resultado del ensayo MTT realizado en donde las barras representan las viabilidad celular de las células Vero al ser expuestas a una solución de nanopartículas de hidroxiapatita (nHA) y una solución de nanopartículas de hidroxiapatita embebidas con puntos de carbono (nHA-PC). El ensayo se llevo a cabo con diferentes concentraciones de cada solución (0, 50, 75, 125, 250 y 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). Se realizaron tres repeticiones del ensayo para cada concentración de cada solución analizada, las cuales se promediaron y normalizaron. Teniendo en cuenta que el control (0  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) no contiene ninguna de las nanopartículas sintetizadas se establece que una viabilidad celular completa equivale a 1.

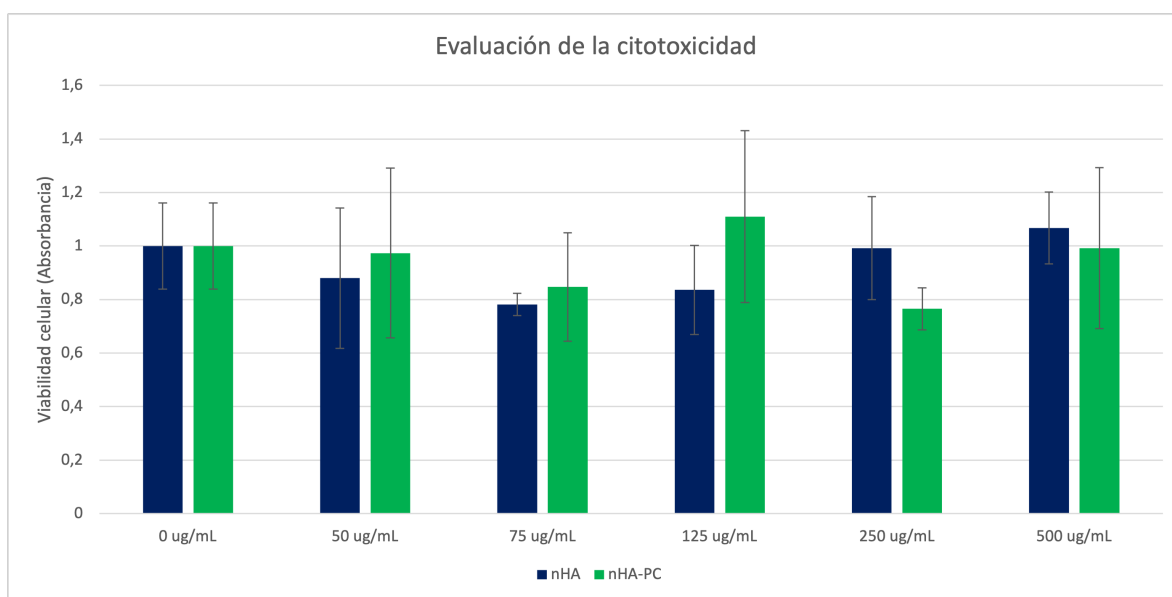


Figura 4.8: Resultados obtenidos del ensayo MTT en las nanopartículas de hidroxiapatita y puntos de carbono sintetizadas.

Se realizó la prueba ANOVA con el fin de analizar los resultados obtenidos del ensayo MTT. En esta prueba estadística se busca determinar si existen diferencias significativas entre las medias de la viabilidad celular que presentaron las soluciones de nHA y las soluciones de nHA-PC al ser analizadas a diferentes concentraciones. Para el análisis de la prueba ANOVA se establece como hipótesis nula que las medias de la viabilidad celular de las dos soluciones a diferentes concentraciones son iguales. De los resultados obtenidos en esta prueba estadística se dice que si el valor de la estadística F es mayor al valor crítico de F ( $F > F_{\text{crit}}$ ) se rechaza la hipótesis nula [77].

De acuerdo a los resultados de la prueba estadística (Tabla 4.1) se puede observar que  $F < F_{\text{crit}}$ , es decir que no se encontraron diferencias significativas en la viabilidad celular presentada al exponer las células Vero a nanopartículas de hidroxiapatita y a nanopartículas de hidroxiapatita embebidas con puntos de carbono. Esto se da en gran parte ya que las células están expuestas en su gran mayoría los átomos de la nanohidroxiapatita más que a los átomos de los puntos de carbono, considerando que los últimos están embebidos dentro de la

nanohidroxiapatita. Al comparar la viabilidad celular obtenida de las soluciones a diferentes concentraciones con el control, se puede establecer que las nHA y las nHA-PC presentaron una baja citotoxicidad al tener valores de viabilidad cercanos al control.

Adicionalmente, en base a los resultados obtenidos de la prueba ANOVA se puede decir que las concentraciones de 125  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de la solución de nHA-PC y 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de la solución de nHA, que superan el 100% de viabilidad se debe un valor grande de la desviación estándar, sin embargo por la prueba ANOVA se sabe que no hay diferencias significativas entre las medias de las dos soluciones de nanopartículas a diferentes concentraciones.

Tabla 4.1: Prueba ANOVA

<b>Fuente de Variación</b>	<b>SS</b>	<b>df</b>	<b>MS</b>	<b>F</b>	<b>P-valor</b>	<b>F crit</b>
Entre Grupos	0,449714	11	0,040883	0,906047	0,549632	2,236419
En los Grupos	1,037818	23	0,045122			
Total	1,487533	34				

#### 4.4 *Scaffold* a base de PEG y puntos de carbono embebidos en nanohidroxiapatita

Con el fin de dar inicio a la evaluación de la viabilidad de este tipo de biomateriales para aplicaciones en la regeneración de tejidos óseos, se propone la fabricación de un *scaffold* a base de PEG y puntos de carbono embebidos en nanopartículas de hidroxiapatita por medio del procedimiento descrito en la sección 3.3. En primer lugar se obtuvo el precipitado resultante del proceso de centrifugación (Figura 4.9). Finalmente tras pasar por un tratamiento térmico, se obtuvo un polvo compuesto por PEG y puntos de carbono embebidos en nanopartículas de hidroxiapatita (Figura 4.10).

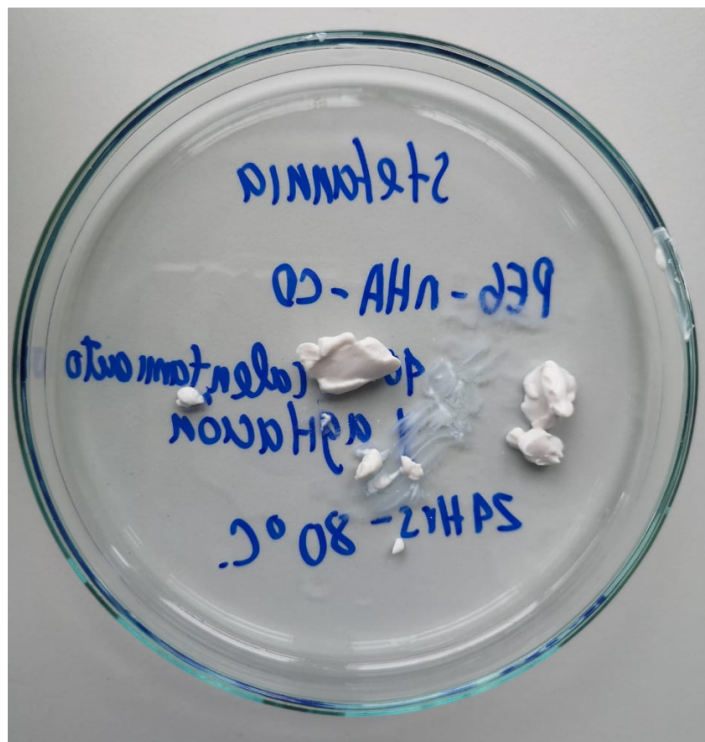


Figura 4.9: Pasta obtenida luego de centrifugar la mezcla de PEG y nanohidroxiapatita.

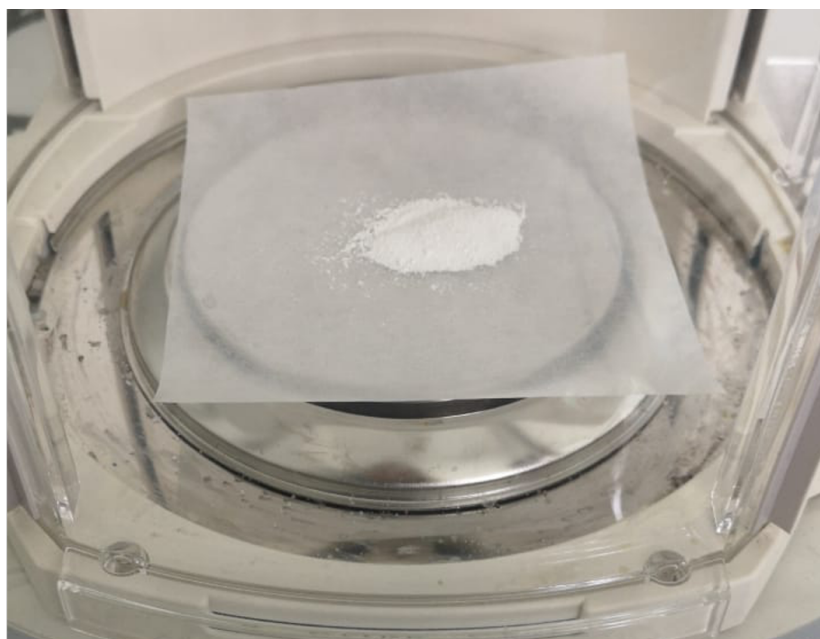


Figura 4.10: Polvo obtenido del proceso de fabricación de *scaffolds* a base de PEG y puntos de carbono embebidos en nanopartículas de hidroxiapatita.

## Capítulo 5

# CONCLUSIONES

De acuerdo a los objetivos de este proyecto, enfocados a la modificación de nanopartículas de hidroxiapatita con puntos de carbono se logró la síntesis de nanohidroxiapatita embebida con puntos de carbono y una evaluación preliminar de su citotoxicidad. Se realizó la síntesis de puntos de carbono por método de reacción por microondas que exhibían una absorción a longitudes de onda entre los 200 y 300 nm y una emisión a longitudes de onda entre los 300 y 450 nm. El uso de etanol y dimetilformamida como solventes para la síntesis de los puntos de carbono, tienen un impacto significativo en las propiedades ópticas presentadas por los mismos. Las propiedades de fluorescencia se atribuyen a los grupos funcionales presentes en estos solventes utilizados. De igual forma se realizó la síntesis de nanohidroxiapatita embebida con puntos de carbono por método de precipitación rápida que presentaron una absorción a longitudes de onda entre los 200 y 250 nm. Se pudo confirmar la incorporación de puntos de carbono en las nanopartículas de hidroxiapatita por medio de los espectros de emisión obtenidos, donde se evidencia una curva de emisión con un comportamiento del fluoróforo similar, donde se presentó una emisión a longitudes de onda entre 380 y 500 nm.

De acuerdo a los resultados obtenidos del ensayo MTT realizado, se identifica que los puntos de carbono y la nanohidroxiapatita presentan una baja citotoxicidad que permite la viabilidad celular de células Vero y su actividad metabólica. Este resultado representa una información inicial de la biocompatibilidad de estas nanopartículas.



## Capítulo 6

# RECOMENDACIONES Y TRABAJOS FUTUROS

### 6.1 Recomendaciones

Para obtener mejores resultados con este estudio es importante realizar distintas técnicas de caracterización que permitan determinar las propiedades bioactivas y las propiedades morfológicas de las nanopartículas sintetizadas, tales como microscopia electrónica de barrido (SEM), espectrofotometría de transformada de Fourier (FTIR) y difracción de rayos X (XRD). Se propone evaluar la citotoxicidad de los puntos de carbono embebidos en nanopartículas de hidroxiapatita en distintas líneas celulares, tales como fibroblastos, osteoblastos, osteoclastos y osteocitos, con el fin de obtener una mayor información acerca de la biocompatibilidad de estas nanopartículas.

Adicionalmente, con el fin de determinar si el método propuesto para la fabricación del *scaffold* es el indicado para la aplicación propuesta, se debe realizar una caracterización del *scaffold* obtenido, con el fin de determinar si estos cuentan con las características morfológicas y propiedades mecánicas y biológicas adecuadas para el tratamiento de defectos óseos.

### 6.2 Trabajos futuros

En términos generales, a corto plazo se plantea culminar la fabricación de los *scaffolds* a base de PEG y puntos de carbono embebidos en nanopartículas de hidroxiapatita y realizar pruebas de caracterización de las propiedades ópticas y morfológicas de los mismos. Así mismo, se plantea evaluar la citotoxicidad de los *scaffolds* fabricados por medio de ensayo MTT utilizando fibroblastos, que son células encontradas en el tejido conectivo cuya función principal es segregar proteínas de colágeno utilizadas para conformar el marco estructural de muchos tejidos como el tejido óseo.

A mediano plazo, se busca optimizar la cantidad de puntos de carbono empleada para la síntesis de nanohidroxiapatita de acuerdo a sus propiedades mecánicas y su cambio ante la presencia de puntos de carbono.

Por último, a largo plazo se propone la realización de pruebas *in vitro* con diferentes cultivos celulares tales como líneas celulares de osteoblastos, y evaluar su adhesión, proliferación y diferenciación celular. De igual forma se propone realizar estudios *in vivo* en modelos de

animales con osteoporosis para analizar el comportamiento, comprobar la efectividad y aplicabilidad de los scaffolds a base de PEG y nanohidroxiapatita embebida con puntos de carbono para el tratamiento de defectos óseos.

# Bibliografía

- [1] D. Smrke, P. Roman, M. Veselko y B. Gubi, «Treatment of Bone Defects — Allogenic Platelet Gel and Autologous Bone Technique,» *Regenerative Medicine and Tissue Engineering*, 2013. DOI: 10.5772/55987.
- [2] I. H. Dologo, D. Rahmatika, J. A. Pawitan, I. K. Liem, T. Kurniawati, T. Kispay y F. Mujadid, «Allogeneic umbilical cord-derived mesenchymal stem cells for treating critical-sized bone defects: a translational study,» *European Journal of Orthopaedic Surgery and Traumatology*, n.º 0123456789, 2020, ISSN: 14321068. DOI: 10.1007/s00590-020-02765-5.
- [3] Y. Xie, L. Zhang, Q. Xiong, Y. Gao, W. Ge y P. Tang, «Bench-to-bedside strategies for osteoporotic fracture: From osteoimmunology to mechanosensation,» *Bone res*, vol. 7, n.º 25, 2019.
- [4] Gestarsalud, *La osteoporosis en Colombia amerita un programa prioritario en salud pública / Gestarsalud*, 2020. dirección: <https://gestarsalud.com/2020/10/20/la-osteoporosis-en-%20colombia-amerita-un-programa-prioritario-en-salud-%20publica/>.
- [5] F. Maia, V. Correlo, J. Oliveira y R. Reis, *Natural origin materials for bone tissue engineering: Properties, processing, and performance*. 2019, págs. 535-558, ISBN: 9780128098806. DOI: 10.1016/c2015-0-02433-9.
- [6] C. Galli, G. Passeri y G. M. MacAluso, «Critical reviews in oral biology medicine: Osteocytes and WNT: The mechanical control of bone formation,» *Journal of Dental Research*, vol. 89, n.º 4, págs. 331-343, 2010, ISSN: 00220345. DOI: 10.1177/0022034510363963.
- [7] A. Atala, R. Lanza, A. Mikos G y R. Nerem, *Preclinical bone repair models in regenerative medicine*. 2019, págs. 761-767.
- [8] K. Rambina, «Biom mineralization and bone regeneration,» en *Principles of regenerative medicine 3rd ed*, 2019, págs. 853-866.
- [9] R. Dimitriou, E. Jones, D. McGonagle y P. Giannoudis, «Bone regeneration: current concepts and future directions,» *BMC Med*, vol. 9, n.º 66, 2011.
- [10] T. Bauer y G. Muschler, «Bone graft materials: an overview of the basic science,» *Clin. Orthop. Relat. Res*, vol. 371, págs. 10-27, 2000.
- [11] H. Pereira, I. Cengiz, F. Silva, R. Reis y J. Oliveira, «Scaffolds and coatings for bone regeneration,» *J Mater Sci Mater Med*, vol. 31, n.º 27, 2020.

- [12] A. Amini, C. Laurencin y S. Nukavarapu, «Bone tissue engineering: Recent advances and challenges,» *Crit Rev Biomed Eng.*, vol. 40, págs. 363-408, 2012.
- [13] A. Herforf, E. Stoffella y C. Stanford, «Bone grafts and bone substitute materials,» en *Principles and practice of single implant and restorations*, 2014, págs. 75-86.
- [14] W. Wang y K. W. Yeung, «Bone grafts and biomaterials substitutes for bone defect repair: A review,» *Bioactive Materials*, vol. 2, n.º 4, págs. 224-247, 2017, ISSN: 2452199X. DOI: 10.1016/j.bioactmat.2017.05.007.
- [15] B. Lowe, J. G. Hardy y L. J. Walsh, «Optimizing Nanohydroxyapatite Nanocomposites for Bone Tissue Engineering,» *ACS Omega*, vol. 5, n.º 1, págs. 1-9, 2019.
- [16] S. Lee, G. Lim, J. Lee, A. Atala y J. Yoo, «In vitro evaluation of a poly(lactide-co-glycolide)/collagen composite scaffold for bone regeneration,» *Biomaterials*, vol. 27, págs. 3466-3472, 2006.
- [17] T. Ghassemi y E. al, «Current Concepts in Scaffolding for Bone Tissue Engineering,» *The archives of bone and joint surgery*, vol. 6, n.º 2, págs. 90-99, 2018.
- [18] M. Meskinfam, S. Bertoldi, N. Albanese, A. Cerri, M. C. Tanzi, R. Imani, N. Baheiraei, M. Farokhi y S. Farè, «Polyurethane foam/nano hydroxyapatite composite as a suitable scaffold for bone tissue regeneration,» *Materials Science and Engineering C*, vol. 82, n.º July 2017, págs. 130-140, 2018, ISSN: 09284931. DOI: 10.1016/j.msec.2017.08.064.
- [19] Y. Zhu y W. Wagner, «Design principles in biomaterials and scaffolds,» en *Principles of regenerative medicine 3rd ed*, 2019, págs. 505-522.
- [20] F. O'Brien, «Biomaterials and scaffolds for tissue engineering,» *Materials today*, vol. 14, n.º 3, págs. 88-95, 2011.
- [21] S. Morelli, S. Salerno, J. Holopainen, M. Ritala y L. De Bartolo, «Osteogenic and osteoclastogenic differentiation of co-cultured cells in polylactic acid-nanohydroxyapatite fiber scaffolds,» *Journal of Biotechnology*, vol. 204, págs. 53-62, 2015.
- [22] P. Waite, R. Morawetz, H. Zeiger y J. Pincock, «Reconstruction of cranial defects with porous hydroxyapatite block,» *Neurosurgery*, vol. 25, págs. 214-217, 1989.
- [23] R. Eivazzadeh-Keihan, A. Maleki, M. de la Guardia, M. S. Bani, K. K. Chenab, P. Pashazadeh-Panahi, B. Baradaran, A. Mokhtarzadeh y M. R. Hamblin, «Carbon based nanomaterials for tissue engineering of bone: Building new bone on small black scaffolds: A review,» *Journal of Advanced Research*, vol. 18, n.º March, págs. 185-201, 2019, ISSN: 20901232. DOI: 10.1016/j.jare.2019.03.011.
- [24] D. F. Mercado, G. Magnacca, M. Malandrino, A. Rubert, E. Montoneri, L. Celi, A. Bianco Prevot y M. C. Gonzalez, «Paramagnetic iron-doped hydroxyapatite nanoparticles with improved metal sorption properties. A bioorganic substrates-mediated synthesis,» *ACS Applied Materials and Interfaces*, vol. 6, n.º 6, págs. 3937-3946, 2014, ISSN: 19448252. DOI: 10.1021/am405217j.
- [25] J. Bilezikian, L. Raisz y T. Martin, «Principles of bone biology,» *Academic press*, págs. 3-28, 2008.
- [26] D. B. Burr y O. Akkus, *Bone Morphology and Organization*. Elsevier Inc., 2013, págs. 3-25, ISBN: 9780124160156. DOI: 10.1016/B978-0-12-416015-6.00001-0.

- [27] C. I. Codrea, A.-M. Croitoru, C. C. Baciú, A. Melinescu, D. Ficaí, V. Fruth y A. Ficaí, «Advances in Osteoporotic Bone Tissue Engineering,» *Clinical Medicine*, vol. 10, 2021. DOI: 10.3390/jcm10020253.
- [28] T. Gonzalez-fernandez, P. Sikorski y J. K. Leach, «Bio-instructive materials for musculoskeletal regeneration,» *Acta Biomaterialia*, vol. 96, págs. 20-34, 2019, ISSN: 1742-7061. DOI: 10.1016/j.actbio.2019.07.014.
- [29] N. Tripathy, E. Perumal, R. Ahmad, J. E. Song y G. Khang, «Hybrid composite biomaterials,» en *Principles of regenerative medicine 3rd ed*, 2019, págs. 695-714.
- [30] A. K. Nair, A. Gautieri, S.-W. Chang y M. J. Buehler, «Molecular mechanics of mineralized collagen fibrils in bone,» *Nature Communications volume*, vol. 4, n.º 1724, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1038/ncomms2720>.
- [31] C. Rubin, W. R. Thompson, C. T. Rubin y J. Rubin, «Mechanical Regulation of Signaling Pathways in Bone,» *Gene*, vol. 503, n.º 2, págs. 179-193, 2012, ISSN: 0378-1119. DOI: 10.1016/j.gene.2012.04.076.
- [32] M. Tobeiha, M. H. Moghadasian, N. Amin y S. Jafarnejad, «RANKL/RANK/OPG Pathway: A Mechanism Involved in Exercise-Induced Bone Remodeling,» *BioMed Research International*, vol. 2020, 2020, ISSN: 23146141. DOI: 10.1155/2020/6910312.
- [33] M. Ansari, «Bone tissue regeneration: biology, strategies and interface studies,» *Progress in Biomaterials*, vol. 8, n.º 4, págs. 223-237, 2019, ISSN: 2194-0509. DOI: 10.1007/s40204-019-00125-z.
- [34] K. Arvidson, B. M. Abdallah, L. A. Applegate, N. Baldini, E. Cenni, E. Gomez-Barrena, D. Granchi, M. Kassem, Y. T. Konttinen, K. Mustafa, D. P. Pioletti, T. Sillat y A. Finne-Wistrand, «Bone regeneration and stem cells,» eng, *Journal of cellular and molecular medicine*, vol. 15, n.º 4, págs. 718-746, abr. de 2011, ISSN: 1582-4934 (Electronic). DOI: 10.1111/j.1582-4934.2010.01224.x.
- [35] M. Orciani, M. Fini, R. Di Primio y M. Mattioli-Belmonte, «Biofabrication and Bone Tissue Regeneration: Cell Source, Approaches, and Challenges,» *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, vol. 5, pág. 17, 2017, ISSN: 2296-4185. DOI: 10.3389/fbioe.2017.00017.
- [36] R. D. Utiger, *Paget disease of bone*, 2020. dirección: <https://www.britannica.com/science/Paget-disease-of-bone>.
- [37] D. Tafti y N. D. Cecava, *Fibrous Dysplasia*. StatPearls Publishing, 2021.
- [38] B. Abramoff y F. E. Caldera, «Osteoarthritis: Pathology, Diagnosis, and Treatment Options,» *Medical Clinics of North America*, vol. 104, n.º 2, págs. 293-311, 2020, ISSN: 0025-7125. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.mcna.2019.10.007>.
- [39] Y. Liu, P. Yu, X. Peng, Q. Huang, M. Ding, Y. Chen, R. Jin, J. Xie, C. Zhao y J. Li, «Hexapeptide-conjugated calcitonin for targeted therapy of osteoporosis,» *Journal of Controlled Release*, vol. 304, págs. 39-50, 2019, ISSN: 0168-3659. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2019.04.042>.
- [40] J. S. Capes, H. Y. Ando y R. E. Cameron, «Fabrication of polymeric scaffolds,» *Journal of material science:materials in medicine*, vol. 16, págs. 1069-1075, 2005.

- [41] G. Tetteh, A. S. Khan, R. M. Delaine-Smith, G. C. Reilly e I. U. Rehman, «Electrospun polyurethane/hydroxyapatite bioactive Scaffolds for bone tissue engineering: The role of solvent and hydroxyapatite particles,» *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, vol. 39, págs. 95-110, 2014, ISSN: 18780180. DOI: 10.1016/j.jmbbm.2014.06.019.
- [42] J. J. Pavón Palacio, A. Pesquet, M. Echeverry Rendon y S. M. Robledo Restrepo, «Processing, biological characterization and test to natural and synthetic polymer scaffolds for bone and cartilaginous tissue engineering,» *Revista politécnica*, 2014.
- [43] B. Arifvianto y J. Zhou, «Fabrication of Metallic Biomedical Scaffolds with the Space Holder Method: A Review.,» eng, *Materials (Basel, Switzerland)*, vol. 7, n.º 5, págs. 3588-3622, mayo de 2014, ISSN: 1996-1944 (Print). DOI: 10.3390/ma7053588.
- [44] P. Kumar, B. S. Dehiya y A. Sindhu, «Synthesis and characterization of nHA-PEG and nBG-PEG scaffolds for hard tissue engineering applications,» *Ceramics International*, vol. 45, n.º 7, págs. 8370-8379, 2019, ISSN: 02728842. DOI: 10.1016/j.ceramint.2019.01.145.
- [45] A. Szcze, L. Ho y E. Chibowski, «Synthesis of hydroxyapatite for biomedical applications,» vol. 249, n.º April, págs. 321-330, 2017. DOI: 10.1016/j.cis.2017.04.007.
- [46] H. Peng, J. Wang, S. Lv, J. Wen y J.-F. Chen, «Synthesis and characterization of hydroxyapatite nanoparticles prepared by a high-gravity precipitation method,» *Ceramics International*, vol. 41, n.º 10, Part B, págs. 14340-14349, 2015, ISSN: 0272-8842. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2015.07.067>.
- [47] T. Roberts y A. Rosenbaum, «Bone grafts, bone substitutes and orthobiologics: The bridge between basic science and clinical advancements in fracture healing,» *Organogenesis*, vol. 8, págs. 114-124, 2012.
- [48] J. S. Carson y M. P. Bostrom, «Synthetic bone scaffolds and fracture repair,» *Injury*, vol. 38, n.º SUPPL. 1, 2007, ISSN: 00201383. DOI: 10.1016/j.injury.2007.02.008.
- [49] C. Shuai, Y. Nie, C. Gao, P. Feng, J. Zhuang, Y. Zhou y S. Peng, «The microstructure evolution of nanohydroxapatite powder sintered for bone tissue engineering,» *Journal of Experimental Nanoscience*, vol. 8, n.º 5, págs. 762-773, 2013, ISSN: 17458099. DOI: 10.1080/17458080.2011.606507.
- [50] R. E. McMahon, L. Wang, R. Skoracki y A. B. Mathur, «Development of nanomaterials for bone repair and regeneration,» *Journal of Biomedical Materials Research - Part B Applied Biomaterials*, vol. 101 B, n.º 2, págs. 387-397, 2013, ISSN: 15524973. DOI: 10.1002/jbm.b.32823.
- [51] N. Ramesh, S. C. Moratti y G. J. Dias, «Hydroxyapatite–polymer biocomposites for bone regeneration: A review of current trends,» *Journal of Biomedical Materials Research - Part B Applied Biomaterials*, vol. 106, n.º 5, págs. 2046-2057, 2018, ISSN: 15524981. DOI: 10.1002/jbm.b.33950.
- [52] M. C. Hacker, J. Krieghoff y A. G. Mikos, «Synthetic polymers,» en *Principles of regenerative medicine 3rd ed*, 2019, págs. 559-590.

- [53] N. Aboudzadeh, M. Imani, M. A. Shokrgozar, A. Khavandi, J. Javadpour, Y. Shafieyan y M. Farokhi, «Fabrication and characterization of poly(D,L-lactide-co-glycolide)/hydroxyapatite nanocomposite scaffolds for bone tissue regeneration,» *Journal of Biomedical Materials Research - Part A*, vol. 94, n.º 1, págs. 137-145, 2010, ISSN: 15493296. DOI: 10.1002/jbm.a.32673.
- [54] F. A. Sheikh, H. W. Ju, B. M. Moon, O. J. Lee, J.-H. Kim, H. J. Park, D. W. Kim, D.-K. Kim, J. E. Jang, G. Khang y C. H. Park, «Hybrid scaffolds based on PLGA and silk for bone tissue engineering,» *J Tissue Eng Regen Med*, vol. 10, n.º 3, págs. 209-221, 2015, ISSN: 23256621. DOI: 10.1002/term. arXiv: NIHMS150003.
- [55] G. Turnbull, J. Clarke, F. Picard, P. Riches, L. Jia, F. Han, B. Li y W. Shu, «3D bioactive composite scaffolds for bone tissue engineering,» *Bioactive Materials*, vol. 3, n.º 3, págs. 278-314, 2018, ISSN: 2452199X. DOI: 10.1016/j.bioactmat.2017.10.001.
- [56] K. Maji, S. Dasgupta, K. Pramanik y A. Bissoyi, «Preparation and characterization of gelatin-chitosan-nano $\beta$ -TCP based scaffold for orthopaedic application,» *Materials Science and Engineering: C*, vol. 86, 2018. DOI: 10.1016/j.msec.2018.02.001.
- [57] H. Zhang, X. Mao, Z. Du, W. Jiang, X. Han, D. Zhao, D. Han y Q. Li, «Three dimensional printed macroporous polylactic acid/hydroxyapatite composite scaffolds for promoting bone formation in a critical-size rat calvarial defect model,» *Science and Technology of Advanced Materials*, vol. 17, págs. 136-148, 2016. DOI: 10.1080/14686996.2016.1145532.
- [58] Y. Zhao, Z. Li, Y. Jiang, H. Liu, Z. Wang, B. Yang y Q. Lin, «Bioinspired mineral hydrogels as nanocomposite scaffolds for the promotion of osteogenic marker expression and the induction of bone regeneration in osteoporosis,» *El sevier Acta Biomaterialia*, págs. 614-626, 2020.
- [59] J. Oliveira, M. Rodriguez, S. Silva, P. Malafaya, M. Gomez, C. Viegas, I. Dias, J. Azevedo, J. Mano y R. Reis, «Novel hydroxyapatite/chitosan bilayered scaffold for osteochondral tissue engineering applications,» *Biomaterials*, vol. 27, n.º 36, págs. 6123-6137, 2006.
- [60] M. Kikuchi, S. Itoh, S. Ichinose, K. Shinomiya y J. Tanaka, «Self-organization mechanism in bone like hydroxyapatite/collagen nanocomposite synthesized in vitro and its biological reaction in vivo,» *Biomaterials*, vol. 22, n.º 13, págs. 1705-1711, 2001.
- [61] S. Zhang, F. Cui, S. Liao, Y. Zhu y L. Han, «Synthesis and biocompatibility of porous nanohydroxyapatite/collagen/alginate composite,» *J Mater Sci Mater Med*, vol. 14, n.º 7, págs. 641-645, 2003.
- [62] S. Petricca, K. Marra y P. Kumta, «Chemical synthesis of poly(-lactic-co-glycolic acid)/hydroxyapatite composites for orthopaedic applications,» *Acta Biomaterialia*, vol. 2, n.º 3, págs. 277-286, 2006.
- [63] D. Shao, M. Lu, D. Xu, X. Zheng, Y. Pan, Y. Song, J. Xu, M. Li, M. Zhang, J. Li, G. Chi, L. Chen y B. Yang, «Carbon dots for tracking and promoting the osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells,» *Biomaterials Science*, vol. 5, n.º 9, págs. 1820-1827, 2017, ISSN: 20474849. DOI: 10.1039/c7bm00358g.

- [64] X. T. Zheng, A. Ananthanarayanan, K. Q. Luo y P. Chen, «Glowing graphene quantum dots and carbon dots: Properties, syntheses, and biological applications,» *Small*, vol. 11, n.º 14, págs. 1620-1636, 2015, ISSN: 16136829. DOI: 10.1002/sm11.201402648.
- [65] S. Gogoi, M. Kumar, B. B. Mandal y N. Karak, «A renewable resource based carbon dot decorated hydroxyapatite nanohybrid and its fabrication with waterborne hyperbranched polyurethane for bone tissue engineering,» *RSC Adv.*, vol. 6, n.º 31, págs. 26 066-26 076, 2016. DOI: 10.1039/C6RA02341J.
- [66] Y. Wang, Y. Xue, J. Wang, Y. Zhu, X. Wang, X. Zhang, Y. Zhu, J. Liao, X. Li, X. Wu y W. Chen, «Biocompatible and photoluminescent carbon dots/hydroxyapatite/PVA dual-network composite hydrogel scaffold and their properties,» *Journal of Polymer Research*, vol. 26, n.º 11, págs. 6-11, 2019, ISSN: 15728935. DOI: 10.1007/s10965-019-1907-1.
- [67] C. Sarkar, A. R. Chowdhuri, A. Kumar, D. Laha, S. Garai, J. Chakraborty y S. K. Sahu, «One pot synthesis of carbon dots decorated carboxymethyl cellulose- hydroxyapatite nanocomposite for drug delivery, tissue engineering and Fe<sup>3+</sup> ion sensing,» *Carbohydrate Polymers*, vol. 181, págs. 710-718, 2018, ISSN: 0144-8617. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.11.091>.
- [68] N. B. Erdal y M. Hakkarainen, «Construction of Bioactive and Reinforced Bioresorbable Nanocomposites by Reduced Nano-Graphene Oxide Carbon Dots,» *Biomacromolecules*, vol. 19, n.º 3, págs. 1074-1081, 2018, ISSN: 15264602. DOI: 10.1021/acs.biomac.8b00207.
- [69] Q. Xiao, Y. Liang, F. Zhu, S. Lu y S. Huang, «Microwave-assisted one-pot synthesis of highly luminescent N-doped carbon dots for cellular imaging and multi-ion probing,» *Microchimica Acta*, vol. 184, n.º 7, págs. 2429-2438, 2017, ISSN: 14365073. DOI: 10.1007/s00604-017-2242-z.
- [70] M. Akash y K. Rehman, *Molecular Emission Spectroscopy*. 2020.
- [71] Merck, *Protocol guide: MTT assay for cell viability and proliferation*, 2021. dirección: <https://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/protocols/biology/roche/cell-proliferation-kit-i-mtt.html>.
- [72] T. L. Riss, R. A. Moravec, A. L. Niles, S. Duellman, H. A. Benink, T. J. Worzella y L. Minor, *The assay guidance manual*, M. S, S. GS, G. A y E. al, eds. 2013.
- [73] D. Gao, X. Liu, D. Jiang, H. Zhao, Y. Zhu, X. Chen, H. Luo, H. Fan y X. Zhang, «Exploring of multicolor emissive carbon dots with novel double emission mechanism,» *Sensors and Actuators, B: Chemical*, vol. 277, n.º September, págs. 373-380, 2018, ISSN: 09254005. DOI: 10.1016/j.snb.2018.09.031.
- [74] K. Pollinger, R. Hennig, S. Bauer, M. Breunig, J. Tessmar, A. Buschauer, R. Witzgall y A. Goepferich, «Biodistribution of Quantum Dots in the Kidney After Intravenous Injection,» *Journal of nanoscience and nanotechnology*, vol. 14, págs. 3313-9, mayo de 2014. DOI: 10.1166/jnn.2014.8716.
- [75] D. L. Pavia, G. M. Lampman, G. S. Kriz y J. R. Vyvyan, *Introduction to spectroscopy*. Brooks/Cole, Cengage learning, 2010, págs. 655, ISBN: 9780495114789.



- [76] C. J. Gil, M. L. Tomov, A. S. Theus, A. Cetnar, M. Mahmoudi y V. Serpooshan, «In Vivo Tracking of Tissue Engineered Constructs.,» eng, *Micromachines*, vol. 10, n.º 7, jul. de 2019, ISSN: 2072-666X (Print). DOI: 10.3390/mi10070474.
- [77] G. González-Rodríguez, A. Colubi y M. Á. Gil, «Fuzzy data treated as functional data: A one-way ANOVA test approach,» *Computational Statistics and Data Analysis*, vol. 56, n.º 4, págs. 943-955, 2012, ISSN: 01679473. DOI: 10.1016/j.csda.2010.06.013.