



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS
AVANZADOS
DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

UNIDAD ZACATENCO

**PROGRAMA DE DOCTORADO
EN NANOCIENCIAS Y NANOTECNOLOGÍA**

**Preparación de materiales compuestos de matriz polimérica y NPs
para su aplicación biomédica**

T E S I S

Que presenta

M. C. LUIS RUBÉN TORRES FERRER

Para obtener el Grado de

DOCTOR EN CIENCIAS

EN

NANOCIENCIAS Y NANOTECNOLOGÍA

Directores de Tesis:

**Dr. J. Gabriel Luna Bárcenas
Dr. Marco Antonio Meraz Ríos**

Ciudad de México

AGOSTO 2022

DEDICATORIA

Dedico con cariño esta tesis que es el fruto del esfuerzo, el estudio y la perseverancia, que con gran anhelo he esperado durante todo este tiempo para disfrutarlo con mis seres queridos:

A mis padres Ma. Teresa Ferrer Ceja y José Rubén Torres Ortiz por educarme y ser un ejemplo de superación y lucha.

A mi Madrina Ma. Teresa Pérez Mora[†] y hermana Lic. Jeny Lourdes Torres Ferrer[†] que con entrega inculcaron en mí el amor al estudio, dedicándome parte de su vida, siendo para mí inspiración.

A todas las personas[†] que sufrieron y perdieron la vida en esta pandemia COVID-19, que de manera valiente enfrentaron su enfermedad, esperanzadas en encontrar una solución médica, forzaron el desarrollo de la ciencia y de nuevos medicamentos.

AGRADECIMIENTO

Le agradezco a Dios por haberme acompañado y guiado a lo largo del Doctorado, por ser mi fortaleza en los momentos de debilidad y por brindarme una vida llena de aprendizajes y experiencias.

A todas las personas que con su compañía y apoyo impulsaron el desarrollo y crecimiento de este proyecto de tesis:

A mis Directores de tesis Dr. J. Gabriel Luna Barcenás y Dr. Marco Antonio Meraz Ríos por confiar en mí, brindarme sus consejos, apoyarme incondicionalmente y guiarme durante la elaboración de éste trabajo.

A la Dra. Astrid Giraldo Betancur, por su asesoría, gran apoyo y disposición, por compartir sus conocimientos y experiencia en cada momento. Gracias por dar solución a muchas de mis dudas.

A la Dra. Diana Ginette Zarate Triviño y al Dr. Jorge Luis Menchaca Arredondo por abrirme las puertas de la Universidad Autónoma de Nuevo León y el gran apoyo otorgado en la realización de pruebas y ensayos.

A las M. C. Reyna Araceli Mauricio Sánchez y M. C. Ma. del Pilar Figueroa Corona por sus asesorías y apoyo en el trabajo experimental de laboratorio y su disponibilidad para realizar análisis, ensayos y caracterizaciones.

A mi comité de tesis: Dr. J. Manuel Hernández Hernández, Dra. Ana Arizmendi Morquecho y Dr. J. Gerardo Cabañas por sus consejos y aportaciones enriqueciendo el proyecto.

A los asistentes de investigación que apoyaron en la caracterización, análisis y ensayos: M. C. Verónica Flores Casamayor, M. C. J. Juan Vélez Medina, M. C. Martín Adelaido Hernández Landaverde, M. C. Luz Ma. Reyna Avilés Arellano, J. A. Muñoz Salas y J. Eleazar Urbina Álvarez.

Al Dr. Alonso Concha Balderrama de CIMAV-Mty por su gran apoyo en la realización de análisis DRX y sus consejos en Refinamiento Rietveld.

A Roxana Yasmin De Lorenz Santos, Ana María Hernández Salinas, por su gran apoyo en los trámites realizados.

Al Coordinador del programa de Doctorado en Nanociencias y Nanotecnología de CINVESTAV, el Dr. Arturo Isaías Martínez Enriquez, por su apoyo.

A mis Profesores por su paciencia y las enseñanzas compartidas durante mi estancia en las aulas del CINVESTAV-ZACATENCO-QUERÉTARO.

A todos mis amigos y compañeros con mucho cariño les agradezco su gran apoyo brindado en el transcurso de mi formación.

A mis hermanos Luis Fernando Torres Ferrer y Luis Alejandro Torres Ferrer, y mis cuñadas Pamela Alejandra Cervantes Osegueda y Arlethe Talavera Monroy por su compañía, consejos y gran apoyo.

A CINVESTAV donde cultive el interés por la investigación y reconocí el compromiso del científico profesional preocupado por generar tecnología para el bien de la sociedad.

A CONACYT por su gran apoyo y aporte económico durante mi formación doctoral.

Resumen

El principal objetivo de este trabajo fue producir materiales compuestos a partir de polímeros como el alcohol polivinílico (PVA), alginato de sodio (SA) y quitosano (CS), usados como matriz para dispersar nanopartículas (NPs) metálicas y de óxidos metálicos.

Un sistema liberador de iones Ca^{2+} y PO_4^{3-} fue diseñado mediante el compuesto PVA-SA-NPs de vidrio bioactivo (VB). Las etapas para la obtención de las NPs VB fueron: 1) síntesis de las NPs VB, 2) lavado y calcinado de las NPs, 3) tratamiento térmico y 4) caracterización. La síntesis química se llevó a cabo combinando dos métodos, sol-gel y co-precipitación. Se aplicaron diversas estrategias de estabilización, evitando la aglomeración de las NPs durante su producción (modificación superficial con PEG e irradiación ultrasónica). El análisis químico se realizó mediante espectroscopias EDS y XPS, se obtuvo el radio hidrodinámico mediante DLS, se identificaron los grupos funcionales (FT-IR), su microestructura (DRX) y morfología (FE-SEM). Para el desarrollo de la matriz polimérica PVA-SA se aplicaron dos estrategias de entrecruzado, congelamiento-descongelamiento (C/D) y la adición de CaCl_2 . Se eligió el hidrogel matriz en función de los ensayos y pruebas realizadas: análisis de peso, deshidratación, hinchabilidad, mecánico de compresión y degradación hidrolítica. Los hidrogeles nanocompuestos se obtuvieron mezclando las NPs VB con las soluciones poliméricas precursoras de PVA y SA para su posterior gelificación. Se obtuvieron NPs VB con tamaños de diámetro en la escala nanométrica. Se identificó la acelerada formación de HAp en su superficie. El ensayo de bioactividad realizado a los hidrogeles nanocompuestos mostró que las NPs con diámetros hidrodinámicos más reducidos se dispersaron de forma homogénea en el hidrogel, generando mayores interacciones con las cadenas poliméricas, reduciendo sus dominios cristalinos y favoreciendo la nucleación de la HAp. Debido a sus propiedades bioactivas, el nanocompuesto desarrollado puede usarse como matriz soporte para el cultivo de células, implantes o apósitos en la ingeniería de tejido.

Las NPs de oro (AuNPs) se sintetizaron dentro de la solución precursora de CS y ácido acético, a partir de la reducción química de HAuCl_4 . Se adicionaron distintas

concentraciones del agente reductor (citrato de sodio, SC) para cumplir con una relación HAuCl_4/CS entre 0.1 a 5 mM. Las AuNPs se obtuvieron al calentar la solución, siendo estabilizadas por el polímero. Se obtuvieron soluciones coloreadas que fueron moldeadas mediante el método de colado. Las películas delgadas obtenidas, se caracterizaron a través de espectroscopias UV-Vis y FT-IR, microscopía electrónica de barrido de emisión de campo (FE-SEM), análisis termogravimétrico (TGA) y mediciones dieléctricas. Se observó una dependencia entre el tamaño de las AuNPs obtenidas y la relación HAuCl_4/CS . El tamaño de las NPs y su dispersión en el polímero fueron factores contundentes en la hidratación, temperatura Vogel y su conductividad. Las películas delgadas de CS – AuNPs mostraron propiedades de conductividad adecuadas para la identificación de biomoléculas en medio acuoso, excelentes para la producción de biosensores.

Abstract

The main objective of this work was to produce composite materials from polymers such as polyvinyl alcohol (PVA), sodium alginate (SA) and chitosan (CS), used as a matrix to disperse metal and metal oxide nanoparticles (NPs).

A release system for Ca^{2+} and PO_4^{3-} ions was designed using the PVA-SA-NPs bioactive glass (VB). The steps to obtain the VB NPs were: 1) synthesis of the NPs VB, 2) washing and calcination of the NPs, 3) heat treatment and 4) characterization. The chemical synthesis was carried out by combining two methods, sol-gel and coprecipitation. Various stabilization strategies were applied, avoiding the agglomeration of the NPs during their production (superficial modification with PEG and ultrasonic irradiation). The chemical analysis was performed by EDS and XPS spectroscopy, the hydrodynamic radius was obtained by DLS, the functional groups (FT-IR), their microstructure (XRD) and morphology (SEM) were identified. For the development of the PVA-SA polymeric matrix, two crosslinking strategies were applied, freeze-thaw (C/D) and the addition of CaCl_2 . The matrix hydrogel was chosen based on the assays and tests carried out: weight analysis, dehydration, swelling, mechanical compression and hydrolytic degradation. The nanocomposite hydrogels were obtained by mixing the VB NPs with the precursor polymeric solutions of PVA and SA for their subsequent

gelation. VB NPs with diameter sizes on the nanometer scale were obtained. The accelerated formation of HAp on its surface was identified. The bioactivity assay performed on the nanocomposite hydrogels showed that the NPs with smaller hydrodynamic diameters were dispersed homogeneously in the hydrogel, generating greater interactions with the polymer chains, reducing their crystalline domains and favoring HAp nucleation. Due to its bioactive properties, the developed nanocomposite can be used as a support matrix for cell culture, implants or dressings in tissue engineering.

Gold NPs (AuNPs) were synthesized within the precursor solution of CS and acetic acid, from the chemical reduction of HAuCl_4 . Different concentrations of the reducing agent (sodium citrate, SC) were added to comply with a HAuCl_4/CS ratio between 0.1 and 5 mM. The AuNPs were obtained by heating the solution, being stabilized by the polymer. Colored solutions were obtained which were molded by the casting method. The thin films obtained were characterized through UV-Vis and FT-IR spectroscopy, field emission scanning electron microscopy (FE-SEM), thermogravimetric analysis (TGA) and dielectric measurements. A dependence between the size of the AuNPs obtained and the HAuCl_4/CS ratio was observed. The size of the NPs and their dispersion in the polymer were key factors in the hydration, Vogel temperature and their conductivity. The CS-AuNPs thin films showed suitable conductivity properties for the identification of biomolecules in aqueous medium, excellent to produce biosensors.

CONTENIDO

DEDICATORIA	<i>i</i>
AGRADECIMIENTO	<i>i</i>
Resumen	<i>iii</i>
Abstract	<i>iv</i>
Lista de Figuras	<i>ix</i>
Lista de Tablas	<i>xiii</i>
CAPITULO I. COMPUESTOS PVA – SA - NANOPARTÍCULAS DE VIDRIO BIOACTIVO .	15
1.1 Los materiales cerámicos	15
1.1.1 Definición y estructura química de los cerámicos	16
1.1.2 El estado vítreo (amorfo).....	17
1.1.3 Materiales Biocerámicos	19
1.1.4 Nanotecnología de los materiales cerámicos.....	22
1.1.5 Producción de nanomateriales	23
1.1.6 Los Vidrios Bioactivos (VB)	26
1.1.7 Nanopartículas de vidrio bioactivo (NPs VB)	28
1.1.7.1 Producción de nanopartículas de vidrio bioactivo (NPs VB)	30
1.1.8 Biomateriales compuestos con VB	34
1.1.8.1 Compuestos de matriz polimérica y NPs VB.....	37
1.1.8.2 Alcohol polivinílico (PVA).....	39
1.1.8.3 Alginato de sodio (SA)	40
CAPITULO II. COMPUESTO QUITOSANO – NANOPARTÍCULAS DE ORO	42
2.2 La importancia de las nanopartículas metálicas (MNPs)	42
2.2.1 Función de las MNPs en biosensores.....	42
2.2.2 Las nanopartículas de oro (AuNPs).....	43
2.2.3 Métodos para la síntesis de NMNPs.....	44
2.2.3.1 Reducción de iones metálicos en solución	45
2.2.3.2 Síntesis química de las AuNPs	46
2.2.4 Quitosano (CS)	46
2.2.4.1 Sistema CS-AuNPs para la fabricación de biosensores.....	49
CAPITULO III. PLANTEAMIENTO DEL PROYECTO	52

3.1 Justificación	52
3.2 Hipótesis 1	53
3.3 Hipótesis 2	53
3.4 Objetivo general	53
3.4.1 Objetivos particulares	53
CAPITULO IV. DESARROLLO EXPERIMENTAL	55
4.1 Materiales y métodos para la preparación de NPs VB	55
4.1.1 Precursores y reactivos	55
4.1.2 Métodos	55
4.1.2.1 Síntesis química de las NPs VB	55
4.1.2.2 Lavado, secado y calcinado de las NPs VB	57
4.1.3 Caracterización de las NPs VB	57
4.1.3.1 Determinación del tamaño de partícula	57
4.1.3.2 Identificación de grupos funcionales	58
4.1.3.3 Análisis microestructural	58
4.1.3.3.1 Análisis mediante Difracción de Rayos X	58
4.1.3.3.2 Refinamiento Rietveld	59
4.1.3.4 Análisis químico elemental	59
4.1.3.5 Análisis morfológico y composición química	60
4.2 Materiales y métodos para la preparación del compuesto PVA-SA-NPs VB.....	60
4.2.1 Precursores y reactivos para preparar los hidrogeles nanocompuestos	60
4.2.2 Métodos	61
4.2.2.1 Preparación de los hidrogeles de PVA-SA	61
4.2.2.2 Preparación de los Nanocompuestos de PVA-SA-NPs VB	62
4.2.3 Ensayos	63
4.2.3.1 Análisis de peso para los hidrogeles PVA-SA	63
4.2.3.2 Deshidratación y secado de los hidrogeles PVA-SA	63
4.2.3.3 Determinación del comportamiento de hinchabilidad	64
4.2.3.4 Ensayo mecánico de compresión en hidrogeles PVA-SA	64
4.2.3.5 Degradación hidrolítica de hidrogeles PVA-SA	65
4.2.3.6 Ensayo de bioactividad para Hidrogeles PVA-SA-NPs vidrio bioactivo	65
4.3 Materiales y métodos para la preparación de compuestos CS-AuNPs	66
4.3.1 Precursores y reactivos	66
4.3.2 Métodos	66
4.3.2.1 Preparación de las películas de CS-AuNPs	66
4.3.3 Caracterización de las películas CS-AuNPs	67

4.3.3.1 Mediciones FT-IR y análisis de morfología	67
4.3.3.2 Mediciones térmicas	67
4.3.3.3 Mediciones dieléctricas	67
CAPITULO V. ESTUDIO DEL COMPUESTO PVA – SA – NPs VB	68
5.1 Resultados y discusión de las NPs VB	68
5.1.1 Inspección visual	68
5.1.2 Análisis de tamaño de partícula	71
5.1.3 Análisis de grupos funcionales	74
5.1.4 Estudio microestructural DRX	86
5.1.5 Composición química	91
5.1.5.1 Espectroscopia fotoelectrónica de rayos X (XPS)	91
5.1.5.2 Espectroscopia de energía dispersiva de rayos X (EDS).....	103
5.1.6 Morfología.....	104
5.2 Resultados y discusión Matriz polimérica PVA – SA.....	105
5.2.1 Inspección visual de los hidrogeles PVA - SA	105
5.2.2 Peso de los hidrogeles	107
5.2.3 Deshidratación y secado de los hidrogeles	112
5.2.4 Comportamiento de hinchabilidad	115
5.2.5 Dureza de los hidrogeles	117
5.2.6 Degradación hidrolítica de los hidrogeles.....	120
5.3 Compuesto PVA – SA – NPs VB	122
5.3.1 Obtención de hidrogeles nanocompuestos	122
5.3.2 Nucleación de apatita (HAp) sobre los hidrogeles PVA-SA-NPs vidrio bioactivo. 124	
CAPITULO VI. ESTUDIO DEL COMPUESTO CS – AuNPs	128
6.1 Resultados y discusión.....	128
6.1.1 Análisis de grupos funcionales.....	128
6.1.2 Morfología.....	129
6.1.3 Análisis termogravimétrico.....	130
6.1.4. Conductividad.....	131
6.1.5 Propiedades dieléctricas.....	132
CAPITULO VII. CONCLUSIONES Y PUBLICACIONES	137

7.1 Conclusiones NPs VB	137
7.2 Conclusiones Compuesto PVA-SA-NPs VB.....	140
7.3 Conclusiones Compuesto CS – AuNPs	142
7.4 Publicaciones	143
CAPITULO VIII. PERSPECTIVAS	144
REFERENCIAS.....	146

Lista de Figuras

Figura 1. Representación gráfica en 2 dimensiones del comparativo en la estructura del a) Silicio cristalino y b) el vidrio [3].....	17
Figura 2. Elementos químicos utilizados en la producción de materiales biocerámicos [11].....	20
Figura 3. Clasificación de materiales biocerámicos según su reactividad [11].	22
Figura 4. Los enfoques Top – down y Bottom – up para la síntesis de NPs [20].....	25
Figura 5. Mecanismo de bioactividad sobre partículas de VB. 2) Formación de capa semipermeable de SiO ₂ y precipitación de apatita. 3) Inicio de población celular. 4) Proliferación celular y formación de hueso [24].	27
Figura 6. Uso de las NPs VB en la producción de diversos materiales bioactivos [30], [31], [35].	29
Figura 7. Etapas y productos obtenidos del proceso Sol-gel [54].....	32
Figura 8. a) Enlaces de hidrógeno entre grupos OH en cadenas poliméricas de PVA vecinas. b) Reacción de entrecruzamiento entre las cadenas poliméricas de PVA y glutaraldehído (GA) [103].	40
Figura 9. Entrecruzamiento de las cadenas de alginato mediante la coordinación del ión Ca ²⁺ y grupos carboxílicos [104], [105].	41
Figura 10. Esquema de un censado plasmónico convencional. A) La resonancia plasmónica de las MNPs en función de la longitud de onda (λ). Generación del pico de absorción por la interacción de los electrones superficiales con la luz. B) Acercamiento al pico λ^* y su desplazamiento conforme cambia el índice de refracción (η) del medio circundante, $\eta_1 < \eta_2$ [134].....	44

Figura 11. Estructura química de la quitina y quitosano [159].	47
Figura 12. Mecanismo de hinchamiento dependiente del pH en hidrogeles de CS [163].	48
Figura 13. Esquema de la interacción entre las cadenas de CS y la superficie de las AuNPs [181].	50
Figura 14. Métodos de preparación para películas de CS. A) Colado, B) Centrifugación, y C) Electrodeposición [159].	51
Figura 15. Ruta de síntesis química para la producción de NPs VB.	56
Figura 16. Tratamiento térmico para las NPs de vidrio bioactivo producidas.	57
Figura 17. Ruta de preparación para los compuestos PVA-SA y PVA-SA-NPs VB.	62
Figura 18. NPs VB obtenidas, apariencia física y algunas características observadas durante la síntesis química y el lavado.	68
Figura 19. Distribución de tamaño de diámetro hidrodinámico para NPs VB preparadas con 20, 30 and 40% mol CaO (3 mediciones para cada muestra, 60 segundos de retraso).	72
Figura 20. Espectros FT-IR obtenidos para NPS20, NPS30 y NPS40 en la región 4000 a 400 cm^{-1} .	75
Figura 21. Regiones del espectro FT-IR a) 4000 - 2800 cm^{-1} , b) 2000 - 1000 cm^{-1} and c) 1000 - 400 cm^{-1} .	76
Figura 22. Substracción de línea base, determinación del máximo y el FWHM a partir de la primera contribución de ν_4 del PO_4^{3-} . Desplazamiento de la segunda contribución de ν_4 del PO_4^{3-} .	84
Figura 23. Perfiles DRX obtenidos para NPS20, NPS30 y NPS40.	87
Figura 24. Deconvolución de pico para los niveles a) C 1s, b) Si 2p, c) P 2p, d) Ca 2p y e) O 1s correspondientes a NPS20 inferior, NPS30 central y NPS40 superior. La línea sólida es la tendencia y las líneas punteadas la deconvolución.	92
Figura 25. Morfología cuasi-esférica de las NPS40. Ampliación en la distribución de tamaños de partícula y morfología irregular causadas por la incrementada adición de CaNT.	105

Figura 26. Hidrogeles PVA – SA obtenidos a través las de mezclas 50:50 (S1) y 65:35 (S2) %v/v. Cada sistema se entrecruzo físicamente (C/D, línea inferior) y doblemente con iones Ca^{2+} (C/D y adición de CaCl_2 , línea superior).....	106
Figura 27. A) Expulsión del exudado desde el hidrogel, posterior al entrecruzado (C/D). B) Reducción del núcleo PVA conforme se incrementan los ciclos C/D, desde 2 hasta 4.	108
Figura 28. Pérdida de peso de los hidrogeles PVA – SA en función de los ciclos C/D otorgados para los sistestemas con entrecruzado físico (S1 y S1) y doble entrecruzado (S1- CaCl_2 y S2- CaCl_2).	110
Figura 29. Configuración núcleo PVA – coraza SA obtenido en los hidrogeles producidos con 3, 4 y 5 ciclos C/D. Separación de fases.	111
Figura 30. %W perdido en la deshidratación de los hidrogeles a 24 y 48 h.	112
Figura 31. Porcentaje de peso perdido en hidrogeles preparados con 2 ciclos C/D en los sistemas S1 y S2, entrecruzados físicamente y con adición de CaCl_2 . El ordenamiento de los datos evidencia una relación con el contenido de los polímeros.	114
Figura 32. Porcentaje de peso perdido en hidrogeles preparados con 2 ciclos C/D en los sistemas S1 y S2, entrecruzados físicamente y con adición de CaCl_2 . El ordenamiento de los datos evidencia una relación con la porosidad de los hidrogeles.....	114
Figura 33. Curvas de comportamiento relación de hichabilidad en función del tiempo para hidrogeles con 1 y 2 ciclos C/D, doblemente entrecruzados.	116
Figura 34. Ciclos de compresión mecánica aplicada en los hidrogeles de S1 y S2 preparados con 2 ciclos C/D. Los tenues scorresponden a S2 y los marcados a S1.	119
Figura 35. Ciclos de compresión mecánica aplicada en los hidrogeles de S1- CaCl_2 (línea continua) y S2- CaCl_2 (línea punteada) preparados con 1 y 2 ciclos C/D.	119
Figura 36. Comportamiento de la degradación en los hidrogeles preparados con 2 ciclos C/D, inmersos en SBF 15, 30 y 45 días. Relación entre su degradación con la composición y tamaño de poro.	121

Figura 37. Suspensión de las NPS20, NPS30, NPS40 y BG comercial en la solución de PVA – SA.	123
Figura 38. Pastillas nanocompuestas PVA – SA – NPs VB obtenidas.	123
Figura 39. Perfiles DRX de los hidrogeles nanocompuestos y sus referencias no ensayados.	125
Figura 40. Perfiles DRX de los hidrogeles nanocompuestos y sus referencias ensayados 14 días en solución de Hank's. La nucleación de apatita se puede monitorear a través del pico (2 1 1), localizado en $31.7^\circ 2\theta$	127
Figura 41. Espectro FT-IR de CS puro y compuestos CS/AuNPs con relación H _{AuCl₄} /SC (M/M, relación molar) de 0.1, 0.21, 1.2 y 5. Nótese que la región 3200 a 3500 cm^{-1} revela una sutil ampliación de las bandas vibracionales correspondientes al hidrogeno enlazado.	128
Figura 42. Micrografías SEM de las películas CS/AuNPs con relación molar H _{AuCl₄} /SC de a) 0.21 y b) 1.0; c) Histograma de la distribución de tamaño de partícula para la relación igual a 1.0; d) Dependencia de la absorción máxima en el espectro UV-Vis sobre la relación molar H _{AuCl₄} /SC.	129
Figura 43. Dependencia del contenido de agua sobre la relación molar H _{AuCl₄} /SC.	131
Figura 44. Dependencia de la conductividad DC sobre la relación molar H _{AuCl₄} /SC. El inserto muestra el espectro de impedancia obtenido a la temperatura indicada en el gráfico.	131
Figura 45. Dependencia del tiempo de relajación sobre la temperatura recíproca en películas recién preparadas (círculos) y recocidas (triángulos) para una relación molar H _{AuCl₄} /SC de 0.21. Nótese un ajuste lineal tipo Arrhenius asociado a la relajación σ (energía de activación 103.2 kJ/mol) y el ajuste no lineal VFT asociado a una relajación α (transición vítrea).	134
Figura 46. Dependencia de la temperatura Vogel sobre la relación molar H _{AuCl₄} /SC. Nótese que la transición vítrea de la mayoría de los polímeros amorfos es de 50-70 K más alta que T_0	134

Figura 47. Relación entre tamaño, área superficial y difusión de Ca^{2+} en las NPs VB, durante el tratamiento térmico. El Ca^{2+} se difunde en NPS20, mientras que en NPS40 se acumula en su superficie.	137
Figura 48. Composición y disposición de las distintas fases identificadas en las NPs VB.	139
Figura 49. Resumen de las características evaluadas en los hidrogeles PVA-SA y su ordenamiento de acuerdo a las propiedades fisicoquímicas y microestructurales.	141
Figura 50. Desarrollo de dominios cristalinos de calcio en el hidrogel PVA-SA-NPs VB. La liberación de iones Ca^{2+} desde NPs VB, permite el entrecruzado de las cadenas SA.	142

Lista de Tablas

Tabla 1. Composiciones de algunos vidrios bioactivos investigados en laboratorios [22].	26
Tabla 2. Polímeros comúnmente utilizados en la producción de materiales con aplicaciones de curación y sanación de heridas [81].	38
Tabla 3. Composiciones químicas y cantidades utilizadas de precursores experimentadas.	56
Tabla 4. Tipos de distribución y rangos de diámetro hidrodinámico en mediciones DLS para las NPs VB preparadas con 20, 30 and 40% mol CaO.	73
Tabla 5. Modos vibracionales y grupos funcionales identificados en las NP VB.	78
Tabla 6. Altura, posición del máximo y FWHM calculados a partir de la primera contribución ν_4 del PO_4^{3-}	85
Tabla 7. Parámetros de red y medio ancho del pico (FWHM) obtenidos por refinamiento Rietveld a partir de la hidroxiapatita 09-0432.	88
Tabla 8. Parámetros obtenidos de la deconvolución en cada nivel de NPS20, NPS30 y NP40. Pico (energía de enlace, eV) y área bajo la curva. N.A. (No aplica, igual a cero).	94

Tabla 9. Composición química obtenida mediante EDS de NPS20, NPS30 y NPS40 (%at.), promedio \pm desviación estandar (DE). Relación Ca/P obtenida a partir de la composición elemental, promedio \pm desviación estandar (DE).....	103
Tabla 10. Pesos promedio de los hidrogeles húmedos (W promedio), obtenidos a partir de 3 mediciones, W promedio \pm desviación estandar (DE).....	108
Tabla 11. Porcentaje en peso perdido (%W perdido) a 24 y 48 horas de deshidratación para los hidrogeles S1, S2, S1-CaCl ₂ y S2-CaCl ₂	112
Tabla 12. Valores de dureza (<i>gf</i>) obtenidos para los hidrogeles PVA-SA preparados con 1 y 2 ciclos (C/D), así como para sus homólogos doblemente entrecruzados.	118
Tabla 13. Porcentaje de peso perdido (%W perdido) en los hidrogeles con 2 ciclos C/D, por efecto de la degradación hidrolítica en SBF a 15, 30 y 45 días.....	121
Tabla 14. Intensidades del pico (2 1 1) antes (<i>I_o</i>) y despues del ensayo de bioactividad (<i>I_f</i>) por 14 días.	126

CAPITULO I. COMPUESTOS PVA – SA - NANOPARTÍCULAS DE VIDRIO BIOACTIVO

1.1 Los materiales cerámicos

Los cerámicos son el material más antiguo hecho por el hombre y han sido parte de la vida diaria en la civilización humana por miles de años. Mientras que en los albores, las cerámicas naturalmente disponibles tales como la piedra dura, hueso y pedernal fueron utilizadas para la fabricación de herramientas, con la llegada del fuego se hizo evidente que la arcilla suave y flexible podía llegar a transformarse en un material resistente, como por ejemplo la porcelana, los refractarios, los cementos y los vidrios [1]. Sin embargo, debido a la demanda de materiales con propiedades mecánicas, térmicas, eléctricas, tribológicas, ópticas y biológicas deseadas y altamente controladas, se promovió el desarrollo y uso práctico de ingeniería para la producción de cerámicos avanzados. Estos son producidos predominantemente a partir de compuestos puros de alúmina, titania, zirconia, magnesia y otros óxidos sintetizados químicamente a micro o nanoescala, así como a partir de carburos y nitruros de silicio, boro y aluminio, y una serie de elementos de transición. Las tecnologías usadas para su producción son amplias y diversas, considerando desde procesos a alta temperatura o métodos de química húmeda, implicando la hidrólisis y condensación a baja temperatura de silicatos y aluminatos. De esta manera, los cerámicos se presentan como una gran alternativa para cubrir las necesidades en diversos campos, su aplicación abarca desde los materiales estructurales tradicionales basados en silicatos tales como ladrillos, loza de barro, gres, porcelana y concreto, y los cerámicos funcionalmente avanzados de “alta tecnología” tales como recubrimientos aislantes para álabes en turbinas aeroespaciales de gas, cerámicos férricos para aplicaciones en sensores y actuadores, monocristales de diamante para futuros circuitos integrados basados en carbono, partes monolíticas bioconductoras, y además en los recubrimientos, para reconstrucción de hueso, implantes dentales y en endoprótesis de cadera [2].

Hoy es indispensable un mejor entendimiento de la estructura atómica y molecular para el desarrollo de nuevos materiales y el mejoramiento de los existentes. Como resultado, los materiales se están diseñando para satisfacer aplicaciones específicas, haciendo frente a la muy urgida industria y los retos de la sociedad en el mundo contemporáneo altamente competitivo. En este proceso, la tecnología de los cerámicos juega un rol particularmente importante y, por lo tanto, se ha convertido en un motor del progreso tecnológico [2].

1.1.1 Definición y estructura química de los cerámicos

Para entender el comportamiento y las propiedades de los materiales, es esencial conocer su estructura química. La estructura puede ser considerada en muchos niveles, todos ellos influyen en el comportamiento final. En el nivel más fino, la configuración electrónica afecta las propiedades tales como el color, la conductividad eléctrica y el comportamiento magnético. La disposición de los electrones en un átomo influye en su enlace con otros átomos y esto, a su vez, impacta en la estructura del cerámico. La mayoría de los cerámicos son compuestos de metales o metaloides y no metales. Generalmente son óxidos, nitruros y carburos, considerando al diamante y el grafito como cerámicos. Consisten de un arreglo interconectado de átomos y una combinación de enlaces químicos: covalente, iónico y algunas veces metálico [3]. Richerson [4] menciona que “la mayoría de los materiales sólidos que no se consideran metálicos, polímeros o derivados de plantas y animales, son cerámicos”, y de forma general, los cerámicos se consideran como sólidos inorgánicos no metálicos [5].

El arreglo de los átomos o iones en el material también requiere ser considerado. Los cerámicos cristalinos tienen un arreglo atómico muy regular, mientras que un cerámico no cristalino o amorfo (ejemplo, vidrio de óxidos) no tienen un orden de gran alcance, aunque localmente se pueden identificar algunos poliedros, ver la Figura 1. No solo la presencia de perfectas redes y estructuras ideales han sido consideradas, sino también la presencia de defectos estructurales que son inevitables en todos los materiales, incluso en los amorfos. Ejemplos de dichos defectos son las impurezas atómicas y dislocaciones [3].

1.1.2 El estado vítreo (amorfo)

Los sólidos generalmente presentan una estructura cristalina fuertemente cohesionada, que forma una red cristalina dispuesta en secuencias regulares que se repiten tridimensionalmente.

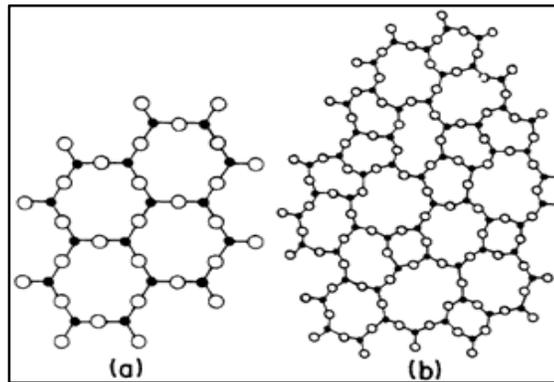


Figura 1. Representación gráfica en 2 dimensiones del comparativo en la estructura del a) Silicio cristalino y b) el vidrio [3].

Cuando un sólido se funde y convierte en líquido, pierde su estructura cristalina, pero sigue conservando la fuerza de enlace entre sus átomos, perdiéndola solo si éste pasa al estado gaseoso. Al enfriarse el líquido lentamente, el cuerpo se solidifica formando de nuevo una red cristalina rígidamente ordenada, correspondiendo al estado de mínima energía libre, el cristalino, puesto que es el más estable (Figura 1 a). En el caso particular de los vidrios, presentan un estado excepcional intermedio entre líquido y sólido, cuya red tridimensional no es regular, ni simétrica como la cristalina. Cuando los óxidos que forman vidrio son fundidos, se convierten en un líquido, perdiendo su estructura ordenada al igual que los demás sólidos; sin embargo, cuando se enfría rápidamente, se solidifica sin recuperar su estructura original, permaneciendo en estado amorfo o vítreo y presentado una red molecular desordenada, aunque no totalmente al azar. En estado vítreo, el material actúa como un sólido, pero conserva algunas características de líquido (su estructura con enlaces atómicos desordenados), por lo que es considerado como un líquido sub-enfriado o congelado, véase Figura 1 b [6]. La sociedad americana para el ensayo de los materiales (ASTM, American Society for Testing Materials), definió al vidrio como “un producto inorgánico de la fusión,

enfriado a una condición rígida sin cristalizar”. Sin embargo, existen muchos sistemas orgánicos vítreos que actualmente son bien conocidos, y más aún, la fusión no es la única alternativa para fabricar un vidrio [7]. Por lo tanto, es necesario introducir una definición alterna que considere el arreglo atómico (la estructura) en los vidrios, más que la naturaleza de los constituyentes y el proceso de fabricación. Como se indicó anteriormente, los vidrios deben mostrar desorden de largo alcance, típico de los líquidos, por lo que el vidrio también se puede definir como “un sólido con estructura de líquido”, “un sólido no cristalino” o simplemente como “un sólido amorfo”. Otra definición válida, según lo descrito por la teoría de red aleatoria de Zachariasen, un vidrio es “una sustancia que puede formar redes extendidas tridimensionales carentes de periodicidad con un contenido de energía comparable al de la correspondiente red cristalina” [7], [8].

Algunas propiedades físicas de los vidrios son como las de un sólido. La densidad, las propiedades mecánicas y las propiedades térmicas de los vidrios son similares a sus correspondientes cristales. Sin embargo, los vidrios no tienen un marcado y bien definido punto de fusión. Los vidrios no se crecen en direcciones preferentes. En ausencia de fuerzas internas aplicadas, los vidrios son esencialmente isotrópicos. La isotropía de las propiedades físicas hace a los vidrios semejantes a los líquidos [7]. Por ejemplo, los cerámicos policristalinos, tienen una estructura conformada por muchos granos. El tamaño, la forma y la orientación juegan un importante rol en muchas de las propiedades macroscópicas de esos materiales, por ejemplo, la resistencia mecánica. En la mayoría de los cerámicos, existe más de una fase presente, cada fase tiene su propia estructura, composición y propiedades. El control del tipo, el tamaño, la distribución, y la cantidad de fases dentro del material provee un medio para controlar las propiedades. La microestructura resultante en un cerámico depende del proceso de fabricación utilizado. Por ejemplo, los cerámicos procesados mediante prensado en caliente comúnmente tienen muy pocos poros. Este no podría ser el caso de los materiales sinterizados [3].

El vidrio puede ser fabricado directamente a partir de cualquiera de los otros estados de la materia. Por ejemplo, la transformación de un sólido en un vidrio se puede lograr a través de colisiones a altas velocidades producido, por ejemplo, por una onda de choque durante un impacto o por irradiación con partículas de alta energía (desorden por irradiación). Los vidrios formados tras el choque de un meteorito con la tierra (tectitas), la fusión accidental del suelo producida por la caída de algún rayo sobre terrenos arenosos desérticos (fulgurita) o los formados tras una explosión nuclear, son claras muestras de este tipo de fenómeno [9]. Los vidrios pueden ser también preparados mediante depósito directamente a partir de la fase gaseosa. Este procedimiento consiste en evaporar al vacío los elementos formadores de vidrio mediante la aplicación de calor y condensarlos sobre un sustrato frío. Otro método para la obtención de un sólido a partir de la fase gaseosa es mediante el bombardeo iónico “sputtering”, donde el sólido se obtiene sobre una forma objetivo en la cual se inciden iones de alta velocidad, provenientes de un plasma de gas inerte, tal como el Argón.

Otro método para la preparación de vidrios es el proceso sol-gel. Este se lleva a cabo mediante un proceso de polimerización, en el cual una solución coloidal de partículas sólidas nanométricas se transforma en un gel y, posteriormente, en un material cerámico [7], [10]. Este tema será desarrollado con mayor profundidad en los siguientes apartados.

1.1.3 Materiales Biocerámicos

Los materiales cerámicos han surgido como una alternativa en aplicaciones médicas, para la obtención de biomateriales y producción de implantes. El principal avance en la investigación de los biomateriales cerámicos se ha logrado en países desarrollados, debido a la necesidad de proveer tratamiento clínico a una gran cantidad de pacientes. Los biomateriales pueden clasificarse de acuerdo con su origen en artificiales o sintéticos (metales, cerámicos y/o polímeros) y biológicos (de origen vegetal, animal o humano). Los materiales cerámicos para aplicaciones médicas fueron introducidos en el año de 1970 cuando se detectaron fallas de los materiales en uso, tales como el acero, las aleaciones de cobalto y polimetilmetacrilato [11].

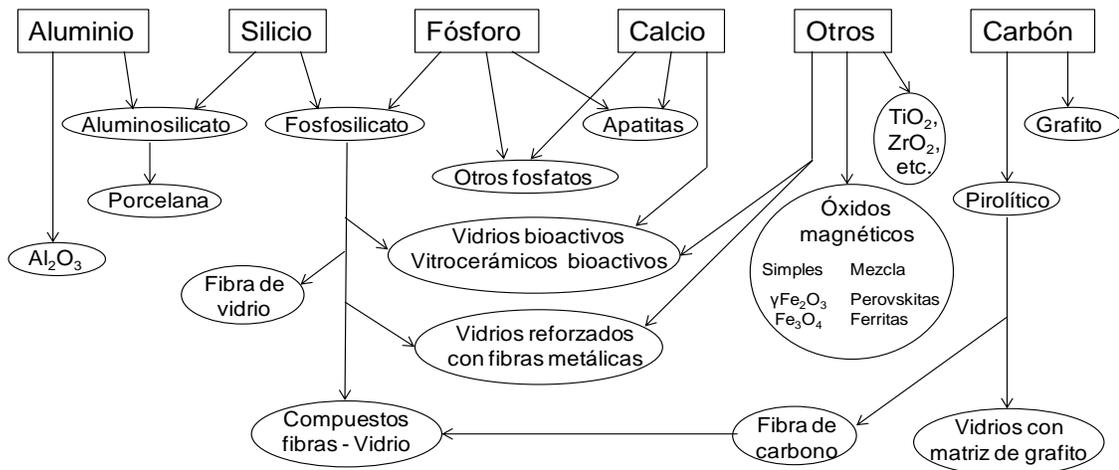


Figura 2. Elementos químicos utilizados en la producción de materiales biocerámicos [11].

Debido al efecto tóxico que producen en el organismo humano, solo algunos elementos químicos se utilizan actualmente en la producción de los biomateriales cerámicos; la Figura 2 muestra la clasificación de éstos de acuerdo con sus componentes.

La fragilidad de los biocerámicos muchas veces restringe su aplicación; sin embargo, algunos de ellos presentan características únicas que los convierten en excelentes candidatos para ambientes biológicos. Los biocerámicos, y los fosfatos en particular, son usados para manufacturar biomateriales debido a su alta biocompatibilidad e integración al hueso, ofreciendo materiales más afines al componente mineral del tejido. Los materiales cerámicos usados en cirugía reconstructiva pueden ser bionertes o bioactivos. Considerando la definición de bioactividad propuesta por Hulbert y colaboradores refiriéndose a los que permiten una respuesta biológica específica en su interfaz, la formación de enlaces entre el tejido y el material, como consecuencia de su reactividad química. A pesar de destacar la baja reactividad química en ambiente biológico de algunos biocerámicos como la alúmina (Al_2O_3) y la zirconia (ZrO_2), siendo casi inertes, no todos los son. Otros cerámicos presentan mayores velocidades de reacción en ambientes biológicos y producen sustancias indeseadas (por ejemplo, la corrosión de un material metálico) o puede

incrementar el producto de una reacción favorable, mediante la transformación química del material a un producto final deseado. Algunos factores que afectan la reactividad de las sustancias químicas y determinan fuertemente su cinética de reacción son [11]:

- Composición
- Tamaño de partícula
- Porosidad
- Área superficial
- Defectos
- Cristalinidad

La Figura 3 muestra la clasificación de los biocerámicos de acuerdo con su reactividad: 1) Inertes, 2) reabsorbibles y 3) de superficie bioactiva. Entre los reabsorbibles se encuentran los cerámicos y vitrocerámicos de apatita $(\text{PO}_4)_2\text{Ca}_3$ usados comúnmente como soporte o relleno de huecos y, que una vez implantados, son metabolizados por el organismo, permitiendo además la infiltración de tejidos. Por otra parte, los vidrios bioactivos (VB) y los materiales de hidroxapatita (HAp), $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, pertenecen a los que se absorben superficialmente. En éstos, se produce un enlace químico entre el tejido y la superficie del implante [12].

Para que sea posible la regeneración de tejido, se requiere implantar un cerámico bioactivo. De otra manera, si el cerámico es inerte, el tejido será remplazado por un material que el organismo pueda solo tolerar, pero no podrá regenerarse. Por lo que es necesario considerar su función al momento de formular y sintetizar los cerámicos, por ejemplo, la composición del componente mineral de tejido óseo es un carbonato de HAp no estequiométrico y, de acuerdo al modelo de biomineralización presente en la naturaleza, se acepta que la formación de tejido duro inicia a partir del fosfato de calcio amorfo que, después de una serie de etapas de equilibrio heterogéneo, alcanza las dimensiones críticas donde ocurre la cristalización de carbonato de HAp [11].

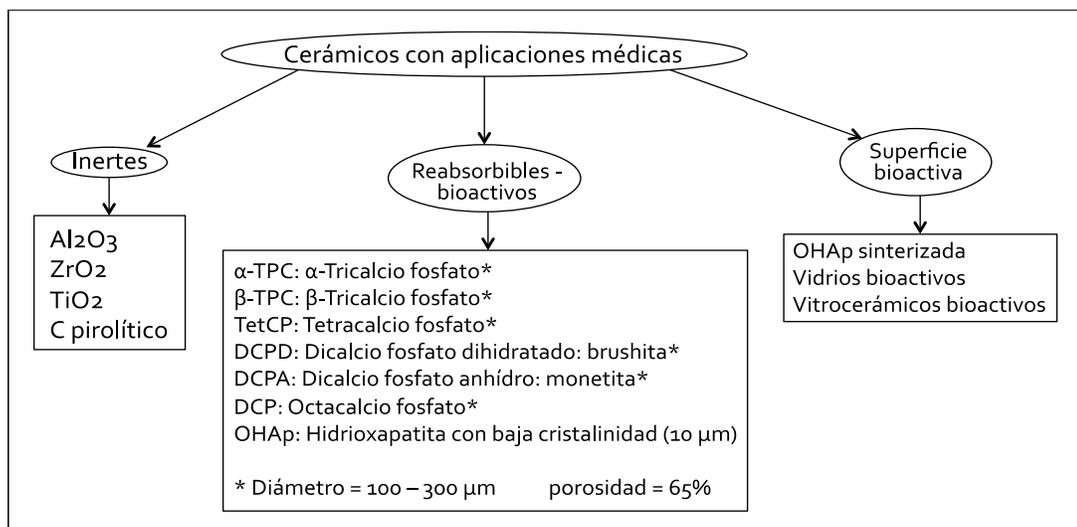


Figura 3. Clasificación de materiales biocerámicos según su reactividad [11].

1.1.4 Nanotecnología de los materiales cerámicos

La nanotecnología trata sobre las diferentes estructuras de la materia con dimensiones del orden de una milmillonésima (1×10^{-9}) parte del metro. La existencia de estructuras funcionales de dimensiones nanométricas no es nueva, han estado presentes en la Tierra desde el mismo origen de la vida. El efecto de la microestructura de tamaño nanométrico afecta a muchas propiedades de los materiales nanoestructurados en volumen, siendo posible la obtención de nuevas propiedades o aplicaciones novedosas [13].

En un nanomaterial, los granos moleculares tienen un tamaño máximo de 100 nm de diámetro y tienen poblaciones granulares menores a decenas de miles de átomos. Los granos de los nanomateriales son entre mil y cien veces más pequeños que los de un material común, y, además, dentro del mismo volumen, poseen el 0.001 por ciento de átomos. Esto reduce la cantidad de materia dentro de cada fragmento de material nanoestructurado y, como consecuencia, permite obtener propiedades y características nuevas. Como ejemplo, el silicio poroso nanoestructurado posee una morfología o distribución espacial de poros y cristalitos de silicio que resulta en propiedades singulares como luminiscencia, biodegradabilidad y bioactividad de interés en

aplicaciones biomédicas, que por otro lado su similar cristalino en volumen no posee [14].

Entre las ventajas que presentan las nanopartículas (NPs) cerámicas incluyen la fácil preparación, control de tamaño, forma y porosidad. En años recientes, se ha acelerado el desarrollo de nuevos materiales cerámicos para aplicaciones biomédicas. Se han procesado cerámicos a nanoescala tales como la HAp, carbonato de calcio (CaCO_3), zirconia (ZrO_2), óxido de silicio (SiO_2), óxido de titanio (TiO_2) y alumina (Al_2O_3), a partir de nuevos métodos de síntesis para mejorar sus propiedades fisicoquímicas, buscando además reducir su citotoxicidad en sistemas biológicos [15]. Entre sus características se destacan una estructura única, interesantes e inusuales propiedades óxido-reducción (Redox) y catalíticas, alta área superficial, buena estabilidad mecánica y biocompatibilidad, por lo que han atraído atención de la comunidad científica en el campo de terapias biomédicas, bio-imagenología y bio-censado [16]. La aplicación de éstas en la biomedicina también abarca la liberación de fármacos, iones y moléculas con función biológica, donde parámetros como la dosis y el tamaño son muy importantes [15]. Las NPs cerámicas pueden proteger diferentes biomacromoléculas tales como las enzimas contra la desnaturalización provocada en fluctuaciones de pH y temperatura externas. Dependiendo de su composición química, pueden exhibir magnetismo, propiedades ópticas y dieléctricas específicas [17]. También presentan características como alta estabilidad, alta capacidad de carga, fácil incorporación de sistemas hidrofílicos e hidrofóbicos, así como las diferentes rutas de administración (oral, inhalación, etc.) convirtiéndolas en una potencial herramienta para el control y administración de fármacos [15].

1.1.5 Producción de nanomateriales

Hoy día los científicos desarrollan novedosos materiales con mejores propiedades, mayor funcionalidad y menores costos de producción a los existentes, haciendo uso de una variedad de métodos físicos y químicos, clasificándolos en dos grandes grupos:

1) Procesos Top-down

El material es removido a partir de un objeto de gran escala, generando nanoestructuras mediante procesos físicos como son el triturado y la molienda, así como por ataque químico [18]. Otra técnica comúnmente utilizada es la litografía, que consiste en el desbaste de los materiales mediante un haz electrónico, iónico o de rayos X, siendo utilizada en la industria de los semiconductores para fabricar circuitos integrados y componentes optoelectrónicos. El material se fractura en partículas más pequeñas hasta alcanzar la nanoescala (molienda de alta energía), ver Figura 4. Es ampliamente usado para fabricar nanomateriales en forma de polvos [19]. Sin embargo, estos procesos no resultan ser la mejor opción para la producción de materiales de forma uniforme, sumando además un alto consumo energético. La imperfección de la estructura superficial obtenida por estos métodos, impacta significativamente sobre las propiedades físicas y la química superficial de las nanoestructuras y nanomateriales. Además, es bien sabido que, a través de estas técnicas, se generan daños en la red cristalina de los materiales [18].

2) Procesos Bottom-up

Los bloques de construcción (átomos o moléculas) se ensamblan formando mayores estructuras, alcanzando la nanoescala. Se lleva a cabo mediante numerosas vías, produciendo una gran variedad de nanomateriales, ver Figura 4. Estos procesos son preferidos para la producción de nanomateriales debido a su viabilidad para generar tamaños, formas y distribuciones uniformes [18]. Los tres principales procesos usados en la producción de nanopartículas cerámicas son: a) pirolisis, b) depósito químico de vapor, y c) precipitación controlada y sol-gel. La pirolisis es la combustión incompleta de compuestos orgánicos u organometálicos en atmósfera de oxígeno, llevada a cabo en una cámara de combustión, permitiendo la descomposición de los orgánicos a compuestos más simples y altamente reactivos para su posterior mezclado y precipitación como nanopartículas. Los procesos de depósito químico de vapor (CVD, por sus siglas en inglés Chemical Vapor Deposition) son comúnmente utilizados en la industria de los semiconductores para producir películas delgadas cerámicas de alta

pureza y, más recientemente, nanotubos de carbono (CNTs). En un proceso típico CVD, la superficie objetivo (oblea o sustrato) se expone a uno o más precursores volátiles, reaccionando y descomponiéndose sobre el sustrato para depositar el producto deseado. Algunos subproductos volátiles generados son removidos de la cámara de reacción mediante un flujo de gas. Los procesos de precipitación controlada y sol-gel presentan características similares. El primero se basa en un desplazamiento cuidadoso del equilibrio químico de un sistema metaestable (por ejemplo, una solución de sal metálica), conduciendo a la precipitación de muy finas partículas que se mantienen en suspensión. Se pueden producir diferentes morfologías variando las condiciones de proceso (temperatura, pH, impurezas, entre otros). Las partículas son recolectadas por centrifugación o liofilización para obtener polvos secos.

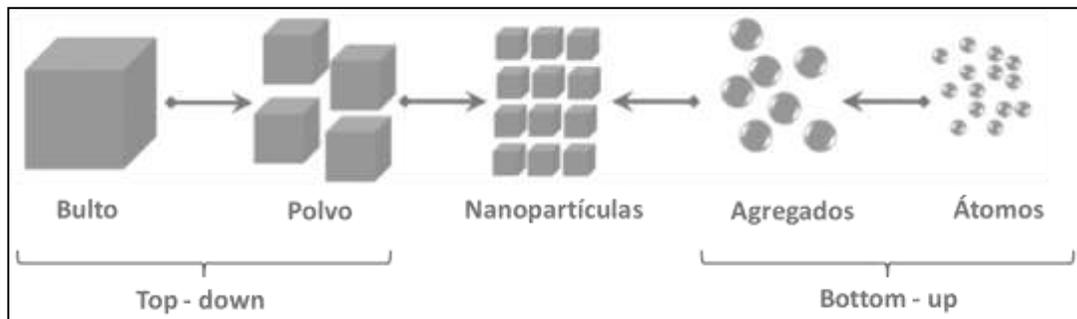


Figura 4. Los enfoques Top – down y Bottom – up para la síntesis de NPs [20].

En el proceso sol-gel, la producción del óxido metálico inicia desde una solución química (o “sol”), típicamente de alcóxidos metálicos (tal como el TEOS, tetraetil ortosilicato) y cloruros metálicos sometidos a reacciones de hidrólisis y policondensación. El sol evoluciona gradualmente hacia un sistema compuesto por fases líquidas y sólidas con morfologías que van desde partículas discretas hasta redes continuas de polímeros (gel). Éste es usado como precursor en la síntesis de polvos (por ejemplo, microesferas, nanoesféricas) o puede ser depositado sobre un sustrato, formando una película mediante dip o spin-coating. Los métodos de coprecipitación controlada y sol-gel son de bajo costo y permiten un buen control de la morfología y composición cuando se realizan a bajas temperaturas [21].

1.1.6 Los Vidrios Bioactivos (VB)

A partir del descubrimiento del vidrio bioactivo por Hench y colaboradores en 1971, características tales como alta bioactividad, osteoconducción y osteoestimulación han sido bien establecidas por numerosos investigadores, presentándolo como un sistema bioactivo conveniente para la reparación y regeneración ósea y dental [22]. La composición más investigada es el silicato “Bioglass 45S5® (BG)” conteniendo (en wt.%) 45% SiO₂, 24.5 % CaO, 24.5 % Na₂O y 6% P₂O₅ [22], [23]. Sin embargo, a través de los años muchas otras composiciones han sido desarrolladas con el propósito de mejorar la procesabilidad y la bioactividad. Algunas composiciones típicas de los vidrios bioactivos se presentan en la Tabla 1.

Tabla 1. Composiciones de algunos vidrios bioactivos investigados en laboratorios [22].

Composición	45S5	13-93	13-93B3	58S	S53P4	52S4.6	45S5F	46S6
Na ₂ O	24.5	6.0	5.5	0.0	23.0	21.6	24.5	24.0
K ₂ O	0.0	12.0	11.1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
MgO	0.0	5.0	4.6	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
CaO	24.5	20.0	18.5	32.6	20.0	21.6	12.3	24.0
SiO ₂	45.0	53.0	0.0	58.2	53.0	50.8	45.0	46.0
P ₂ O ₅	6.0	4.0	3.7	9.2	4.0	6.0	6.0	6.0
B ₂ O ₃	0.0	0.0	56.6	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
CaF ₂	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	12.2	0.0

El comportamiento del BG, fue estudiado mediante su implantación en el fémur de ratas. El equipo de Hench observó que después de 3 semana de implantado, se detectaron osteoblastos (células de hueso) en la interfaz, generando fibrillas de colágeno y mucopolisacáridos incorporados a la estructura superficial del implante (gel). Después de 6 semanas, se identificaron colonias de nueva HAp mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM). Simultáneamente se desarrolló la mineralización del fosfato de calcio dentro de la capa gelificada. Con el paso del tiempo, Hench observó que ambos frentes avanzaban hasta lograr la unión completa entre el hueso e implante. Después de 6 meses, en más de 21 monos implantados, Hench no observó ningún caso de ruptura en la interfase. Este análisis definió el mecanismo de bioactividad observado en los VB que han sido expuestos a los medios biológicos, presentando las siguientes etapas:

1) Inmediatamente a la exposición del vidrio al medio acuoso, se produce un cambio iónico



2) Después de 15 a 30 minutos se lixivia (percolación) el silicio en la superficie del vidrio.

3) Simultáneamente se forma una capa superficial de aproximadamente 0.2 micrómetros, rica en Ca^{2+} y P^{5+} . El ataque preferencial del silicio termina cuando se forma esta capa.

4) Posteriormente se forma una capa de 2 a 3 micrómetros de silicio por debajo de la de capa de Ca^{2+} y P^{5+} .

5) Cuando la solución se concentra en Ca^{2+} y P^{5+} , comienza a crecer la fina capa de $(\text{PO}_4)_2\text{Ca}_3$ superficial expuesta a la solución.

6) La capa de $(\text{PO}_4)_2\text{Ca}_3$ cristaliza en estructura de apatita con un tiempo de 1500 horas (aproximadamente 62 días) en solución ligeramente alcalina. Este fosfato cristalizado consolida la unión del vidrio al hueso [12]. El mecanismo de bioactividad se presenta en la Figura 5.

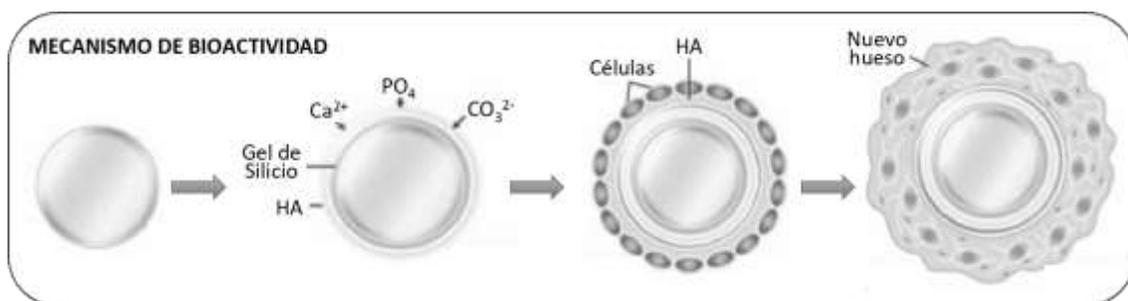


Figura 5. Mecanismo de bioactividad sobre partículas de VB. 2) Formación de capa semipermeable de SiO_2 y precipitación de apatita. 3) Inicio de población celular. 4) Proliferación celular y formación de hueso [24].

También se ha encontrado que los VB apoyan la actividad enzimática [25], la vascularización [26], [27], la adhesión osteoblastica, el crecimiento e inducción de la diferenciación de células mesenquimales a diferentes linajes [28], [29], aspectos extremadamente importantes para las aplicaciones de ingeniería de tejidos [30]. Por estas razones y más, los VB son ampliamente usados en aplicaciones biomédicas

debido a su habilidad para unirse al hueso e incluso a los tejidos blandos. Estos materiales son excelentes candidatos para la producción de andamios o soportes celulares, recubrimientos bioactivos sobre implantes ortopédicos y relleno óseo. Pueden implantarse en el cuerpo humano y suelen emplearse en craneoplastias, implantes de globos oculares artificiales, reparación de dientes y maxilares, cirugía cardio vascular, cirugía plástica, como bioelectrodos vítreos, en cirugía ortopédica y traumatología [12].

Diferente tipo de iones como boro, estroncio, magnesio y muchos otros pueden ser integrados a los VB, con la intención de mejorar la funcionalidad y bioactividad del vidrio. Aún más, la impurificación de VB con trazas de elementos se ha incrementado considerablemente con el afán de generar un efecto terapéutico específico adicional: por ejemplo, la plata ha sido usada para incrementar el efecto antibacterial en el biovidrio; el litio substituido en el BG ha mostrado un incremento en la proliferación celular y la actividad metabólica; los VB impurificados con cobre se han propuesto para estimular la angiogénesis como estrategia en la regeneración de hueso; los biovidrios que contienen cobalto con controlable liberación de iones se han desarrollado para imitar las condiciones hipóxicas y mejorar la angiogénesis; y los biovidrios que contienen zinc se están considerando para incrementar la proliferación de osteoblastos en el cultivo [22].

1.1.7 Nanopartículas de vidrio bioactivo (NPs VB)

La reducción de tamaño a escala nanométrica de los VB conduce a una nueva familia de biomateriales nanoestructurados, presentando un mejor desempeño en aplicaciones biomédicas y brindando nuevas oportunidades de aplicación. La mayor área superficial específica de las NPs permite, no solo una liberación más rápida de iones, sino también una mayor adsorción de proteínas y, por lo tanto, una incrementada bioactividad, comparada con la mostrada por sus similares a micro y macro escala [31]. Existen evidencias en la literatura de un acelerado depósito de apatita y mineralización de tejido óseo y dental cuando se encuentran en contacto con partículas a nanoescala, opuesto a lo observado con micropartículas, considerando que la estructura ósea exhibe

características a nanoescala conformada por una mezcla adecuada de fibrilos de colágeno y nanocristales de hidroxiapatita. Se ha mostrado que, imitando la nanoestructura del hueso sobre la superficie del material sintético implantado, se incrementa la adhesión de células y su proliferación [32], [33]. Algunos trabajos de investigación demuestran además la eficiencia de las NPs VB como sistemas de liberación, no solo de iones (Ca^{2+} , PO_4^{3-} , Ag^+ , etc.), sino también de biomoléculas (fármacos terapéuticos, proteínas, hormonas, factores de crecimiento y péptidos) [34]. El uso de NPs también favorece el diseño de nuevos materiales y sus aplicaciones biomédicas. La Figura 6 muestra la posibilidad de utilizar las NPs en la fabricación de nuevos materiales, clasificados de acuerdo a la dimensión en: NPs (0D), fibras (1D), recubrimientos (2D), andamios e hidrogeles (3D) bioactivos.



Figura 6. Uso de las NPs VB en la producción de diversos materiales bioactivos [30], [31], [35].

Las NPs pueden ser depositadas sobre superficies metálicas, cerámicas o poliméricas. El control espacial de las regiones donde se dispersan las NPs, puede producir superficies bioactivas con patrones específicos. Además, es posible controlar el espesor de los recubrimientos, utilizando por ejemplo tecnología capa por capa [36]. Recientes estudios demuestran la viabilidad del contacto entre BG con tejido exterior al sistema esquelético, incluyendo investigaciones de vascularización, cicatrización de heridas y reparación de tejido cardíaco, pulmonar, nervioso, gastrointestinal, tracto urinario y laringe usando BG en varias formas de partículas, fibras y nanopartículas con y sin componentes poliméricos. Los usos de los VB se extienden también a las

aplicaciones cosméticas y de cuidado dental. Por ejemplo, se añade vidrio bioactivo en forma de partículas a la pasta dental [37], [38], ungüentos y como agentes de mineralización. También son producidos materiales compuestos que contienen NPs o andamiajes (scaffolds) de fibras electrohiladas [39].

1.1.7.1 Producción de nanopartículas de vidrio bioactivo (NPs VB)

Las técnicas más comunes mencionadas por la literatura para la producción de VB son: 1) Síntesis en fase gaseosa, 2) microemulsión y 3) sol-gel.

1) Síntesis en fase gaseosa. Permite la producción a gran escala de nanopartículas (alta velocidad). Usa precursores metal-orgánicos para producir nanopartículas a temperaturas mayores de los 1000°C. El principio básico de todos los métodos de síntesis en fase gas es la formación de núcleos moleculares, seguido por su condensación y coalescencia inducidas por el subsecuente crecimiento de nanopartículas en regiones de alta temperatura. El factor más decisivo para el tamaño de partícula final es el tiempo de residencia promedio de las partículas en las regiones de alta temperatura. Altas velocidades de enfriamiento (>1000 K/s) y tiempos cortos de residencia (1 ms) permiten la formación de las nanopartículas. Uno de los más exitosos métodos de síntesis en fase gas es la síntesis de rociado térmico (flame spray) [31]. Una adaptación de este proceso ha demostrado ser muy exitoso y permite el uso de precursores líquidos orgánicos cargados con metales en lugar de precursores gaseosos [40]–[42]. En este proceso, el precursor líquido es dispersado por oxígeno sobre una boquilla, formando un rociado que será posteriormente calcinado. Conforme el precursor es calentado, los constituyentes orgánicos combustionan completamente produciendo agua y dióxido de carbono, mientras que los constituyentes metálicos se oxidan para formar las NPs [31]. Los sistemas de carboxilatos metálicos son precursores muy convenientes permitiendo la síntesis de NPs de óxido de casi cualquier composición [42]. Adicionalmente, las sales orgánico-metálicas son altamente estables en aire, toleran humedad y, lo más importante, que son completamente miscibles uno con otro. Permite la producción de cualquier tipo de NP, mezclando óxidos con alta homogeneidad química. Además, el rápido enfriamiento, después de la formación de las NPs, puede preservar el estado amorfo del material [43], [44].

2) Microemulsión. Técnica adecuada para obtener NPs inorgánicas con mínima aglomeración [45]. Utilizada comúnmente para sintetizar exitosamente NPs de óxidos y carbonatos [46]–[49]. Se define como una dispersión isotrópica transparente y termodinámicamente estable de dos líquidos inmiscibles, tales como agua y aceite estabilizados por moléculas surfactantes en la interfaz agua/aceite. En microemulsiones agua/aceite, las gotas nanométricas de agua son dispersadas en la fase continua hidrocarbonada y rodeada por la monocapa de moléculas surfactantes [50]. Las gotas acuosas que contienen los precursores, actúan como minireactores o nanoreactores y, al chocar entre ellas, producen las reacciones químicas generando los productos. Las partículas precursoras de hidróxidos u oxalatos son primero formadas en un sistema de microemulsión. Después del secado y calcinación del polvo precursor a una temperatura apropiada, se obtiene el sistema óxido deseado. Las técnicas de microemulsión son capaces de liberar partículas de tamaño nanométrico de composición orgánica e inorgánica con mínima aglomeración, ya que la reacción se lleva a cabo en dominios de tamaño nanométrico. Sin embargo, las principales desventajas de la técnica de microemulsión son el bajo rendimiento de producción y el uso de grandes cantidades de aceite y de surfactante [31].

3) Método sol-gel. Es una técnica vía húmeda para elaborar materiales cerámicos y vítreos. Mediante el proceso sol-gel, una suspensión de partículas coloidales puede ser gelificada para formar un sólido. Este método es muy atractivo porque los materiales se obtienen a baja temperatura. Todas sus propiedades estructurales, texturales, electrónicas y morfológicas pueden ser modificadas durante el paso de "sol" a "gel" [51]. Además, este método es flexible para la elaboración de materiales cerámicos en polvos, fibras, monolitos, películas [52], [53], etc. La Figura 7, muestra las etapas del método sol-gel, así como los diferentes productos que se pueden obtener. Debido a las características especiales de los productos sol-gel, dichos materiales han logrado incursionar en varias disciplinas por su amplia gama de aplicaciones, tal como en la industria optoelectrónica y en la biomedica [52].

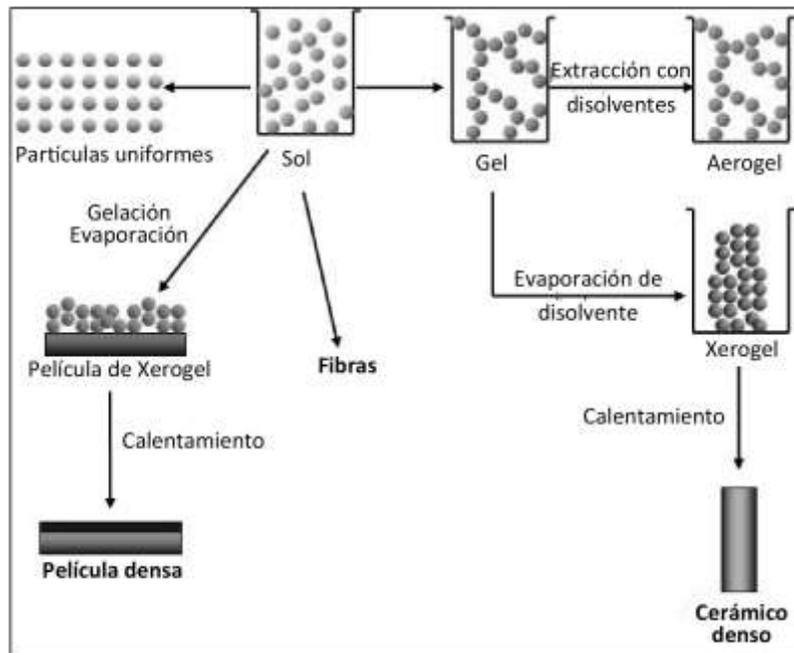
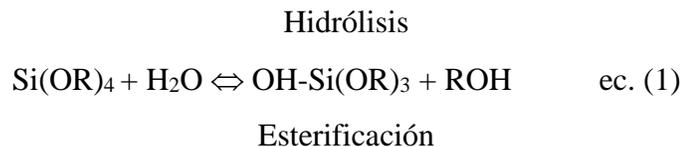


Figura 7. Etapas y productos obtenidos del proceso Sol-gel [54].

El proceso sol-gel utiliza como precursores las sales o los alcóxidos metálicos. Para la preparación de los geles de SiO_2 , se utilizan precursores del tipo alcóxido metálico que tienen un ligando orgánico adjunto a un átomo metálico o metaloide. Las opciones comúnmente utilizadas en la preparación de estos geles son el tetrametoxisilano $\text{Si}(\text{OCH}_3)_4$, y el tetraetoxisilano $\text{Si}(\text{OC}_2\text{H}_5)_4$ (o Tetraetil-ortosilicato), conocidos como TMOS y TEOS, respectivamente [54]. Los geles de silicato son sintetizados por hidrólisis monomérica y emplean un ácido (ejemplo, HCl) o base (ejemplo NH_3) como catalizador, dependiendo del producto cerámico que se desea obtener [55]. Por ejemplo, la reacción de hidrólisis para el TEOS es:

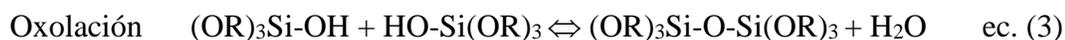


Dependiendo de la cantidad de agua y el catalizador presente, la hidrólisis puede llegar a la finalización (de tal manera que todos los grupos OR son remplazados por OH) obteniendo el ácido silícico [56]:



o puede detenerse mientras el metal es parcialmente hidrolizado, $\text{Si(OR)}_{4-n}(\text{OH})_n$. Dos moléculas parcialmente hidrolizadas pueden unirse entre sí a través de las siguientes reacciones:

Condensación hidrolítica



Hidrólisis

Condensación alcohólica



(4)

Alcohólisis

El proceso de condensación forma enlaces siloxano (Si-O-Si) liberando una molécula de agua o alcohol [54].

A través del proceso de Stöber y, usando hidróxido de amonio como catalizador, es posible producir las NPs de SiO_2 , incrementando el pH por arriba del punto isoeléctrico del SiO_2 soluble (ácido silícico), causando la repulsión entre las nuevas partículas formadas y produciendo la policondensación. El tamaño final de las partículas de SiO_2 esférico puede controlarse a través de parámetros como el pH, el tipo de alcóxido de silicio y la temperatura de la reacción [57].

Aún cuando la producción de partículas de SiO_2 es una tarea común, no lo es la síntesis de NPs VB. La integración de calcio a la composición puede ser un reto. El nitrato de calcio es usualmente integrado como fuente de calcio; sin embargo, el calcio no es incorporado al interior de las nanopartículas hasta que son calentadas a 400°C [58]. Como consecuencia, la cantidad de calcio entrante a las nanopartículas es dependiente de su difusión. Además, cuando un polímero o surfactante es usado como

agente director del crecimiento, se mejora la dispersión y forma esférica de las NPs, con la correspondiente afectación en la difusión del calcio, limitando su cantidad al interior del vidrio [59].

Recientemente Hong et al. [60] han llevado a cabo trabajos de investigación para producir NPs de silicatos bioactivos mediante la combinación del proceso sol-gel y la coprecipitación. El proceso consiste en realizar la mezcla de precursores en ambiente ácido, la precipitación de las partículas en condición alcalina y un proceso de secado (freeze drying, liofilización). Mediante este proceso, fue posible la obtención de NPs con tamaños entre 40 y 70 nm. Chen et al. [61] investigaron los efectos de diferentes morfologías sobre la bioactividad, in vitro, de NPs VB correspondientes al sistema CaO – P₂O₅ – SiO₂. Se reportó que no solo el área superficial y el tamaño de poro juegan un papel importante en la bioactividad, también la morfología superficial.

Otros trabajos de investigación también han desarrollado NPs VB utilizando surfactantes y aditivos para formar las partículas y prevenir su aglomeración. Por ejemplo, Luz y Mano han mostrado que la adición de polietilenglicol (PEG, por sus siglas en inglés) de diferentes pesos moleculares al final del proceso sol-gel (modificación superficial) induce un cambio en la morfología de las NPs; cadenas moleculares más pequeñas resultaron en la formación de partículas densas, mientras que cadenas mayores resultaron en partículas huecas más aglomeradas [62].

1.1.8 Biomateriales compuestos con VB

La mayoría de las tecnologías modernas requiere materiales con una combinación inusual de propiedades imposibles de conseguir con los metales, las cerámicas y los polímeros convencionales. El desarrollo de materiales compuestos brinda la oportunidad de obtener propiedades excepcionales mediante la combinación de dos o más materiales. Por lo tanto, un material compuesto es multifásico, es decir, sus fases son químicamente distintas y separadas por una interface. La mayor parte de los materiales compuestos están formados por dos fases; una llamada “matriz” que es continua, envolviendo a la otra fase denominada “dispersa”. Como consecuencia, las

propiedades de los materiales compuestos dependen fuertemente de las propiedades de las fases constituyentes, de sus proporciones relativas y de la forma, tamaño, distribución y orientación de la fase dispersa. La mayoría de los materiales compuestos se han creado para mejorar la combinación de propiedades mecánicas tales como rigidez, tenacidad a la fractura y resistencia a la tensión a temperatura ambiente y a elevadas temperaturas [63]. Sin embargo, la integración de la fase dispersa también puede influir sobre propiedades ópticas, térmicas, magnéticas, bioactivas, etc. Los materiales compuestos pueden tener matriz cerámica, metálica o polimérica, y pueden reforzarse con partículas, fibras o estructuras laminadas.

Los nanocompuestos son estructuras conformadas por varias fases, en las cuales alguna de ellas tiene por lo menos una dimensión en el orden de los nanómetros. Esta clase de materiales pueden ser diseñados para reunir varias funciones a la vez y sus propiedades son comúnmente superiores a los compuestos convencionales a microescala [64]. Son manufacturados distribuyendo partículas nanométricas en una matriz y las ventajas de tener una fase dispersa de tamaño pequeño son amplias y útiles. Por ejemplo, la interacción de interface entre las partículas y la matriz es fundamental para las propiedades mecánicas, y esta interacción incrementa con la reducción del tamaño de partícula. Otro aspecto a considerar es la geometría de las nanopartículas. Como ejemplos se pueden mencionar plaqueta (platos) o partículas laminares, nanotubos, nanofibras, nanopartículas huecas, esféricas, poliedrales, y núcleo-coraza (core shell), las cuales tienen gran influencia sobre las propiedades, afectando la energía superficial y la relación superficie-volumen establecida entre la matriz y el material disperso [64].

En años recientes muchos grupos de investigación han desarrollado materiales compuestos para la ingeniería de tejidos mezclando partículas de VB y algunos polímeros [65]–[69]. Con la intención de producir superficies bioactivas, en uno de los estudios se obtuvieron partículas de VB preparadas mediante la técnica de fusión-enfriamiento y su posterior molienda mecánica, presentando un tamaño de partícula en el orden de los micrómetros. Estas partículas (menos del 20 % en peso) fungieron como

fase dispersa de una matriz polimérica, resultando en superficies bioactivas y propiedades mecánicas no uniformes [70]–[72]. Se observó que el incremento en el contenido de VB afectó seriamente las propiedades mecánicas de los materiales compuestos, debido a los grandes defectos en la interfaz partículas de VB - matriz polimérica. Además, se identificaron deficiencias en su desempeño biológico cuando las células cultivadas sobre estos materiales tendían a no atarse, ni proliferar uniformemente, generando la falla del material compuesto. Las dimensiones de las partículas y su distribución en la matriz polimérica no proveían de una superficie con propiedades fisicoquímicas homogéneas (a escala celular) ni el medio adecuado (rugosidad, arquitectura, humedad, composición química, etc.) para la adaptación celular. Se identificó que solo las regiones con rugosidad y humectación, generadas por la aglomeración de partículas, incentivaron la adherencia celular [72], [73]. Ante estos retos, en investigaciones subsecuentes se planteó el uso de NPs VB como una posible solución. Las NPs pueden dispersarse uniformemente en una matriz polimérica consiguiendo propiedades superficiales uniformes. Además, la alta área superficial de las NPs mejora la interacción superficial entre el vidrio bioactivo y la matriz biopolimérica, disminuyendo el efecto de la separación de fases e incrementando la bioactividad [74]. Peter y colaboradores fabricaron NPs VB mediante el método sol-gel, que fueron mezcladas con quitosano y gelatina para obtener andamios (soportes celulares) con microporos de 150-300 micrometros de diámetros. Los andamios obtenidos mostraron mejor degradación e hinchamiento en medio biológico, incrementando la adsorción de proteínas, buena dispersión y adherencia celular, incrementando con el contenido de las NPs. Estos materiales fueron propuestos como candidatos potenciales para la regeneración de hueso alveolar [75].

Los VB ofrecen ser un potencial sistema de liberación de iones, por ejemplo, dentro de soportes celulares (scaffolds) para la regeneración de tejido, debido a su habilidad para incorporar una gran variedad de elementos y a sus propiedades para controlar su disolución dentro de los fluidos fisiológicos [76]. Sin embargo, como un sistema integrado, los materiales compuestos cerámico-polímero pueden utilizarse para la producción de apósitos, suturas y parches en el tratamiento de heridas o lesiones. El

uso de agentes bioactivos tópicos en forma de soluciones, cremas y ungüentos para la liberación de fármacos, iones o biomoléculas a la herida no es muy efectivo debido a que el fluido se absorbe rápidamente y, en el proceso, pierde sus características reológicas convirtiéndose en fluido movable [77]. Por tanto, el uso de materiales sólidos es preferido en el caso de heridas exudativas, brindando una mejor administración exudada y prolongada permanencia en el sitio de la herida. A diferencia de los apósitos tradicionales como gazas y algodón, que no toman parte activa en el proceso de curación de la herida, los apósitos avanzados son diseñados para tener actividad biológica por sí mismos o liberando constituyentes bioactivos incorporados [77]. Los fármacos y moléculas terapéuticas incorporadas juegan un papel activo en el proceso de curación de heridas, tanto como agentes de limpieza y desbridamiento (aseo quirúrgico, eliminación tejido muerto, dañado o infectado para mejorar la salubridad) removiendo el tejido necrótico, o como fármaco antimicrobial previniendo o tratando la infección mediante la integración de factores de crecimiento que apoyan la regeneración de tejido. Los apósitos poliméricos bioadhesivos (sintéticos, semisintéticos y naturales) son potencialmente usados en el tratamiento de infecciones locales logrando concentraciones locales incrementadas de antibióticos, mientras se evitan dosis suficientemente altas, así se reduce la exposición del paciente a un exceso de fármacos, a más del requerido en el sitio de herida [78].

1.1.8.1 Compuestos de matriz polimérica y NPs VB

Los materiales compuestos conformados por polímeros, tanto sintéticos y de origen natural, han sido reportados para la liberación controlada de fármacos, iones o biomoléculas al sitio de herida. Mediante el control del grado de hinchamiento, densidad de entrecruzamiento y velocidad de degradación, la cinética de liberación puede ser ajustada con la finalidad de programar la liberación de fármaco o ion deseado [79]. La liberación a partir de las formulaciones poliméricas es controlada por uno o más procesos físicos incluyendo: 1) hidratación del polímero por los fluidos, 2) hinchamiento para formar el gel, 3) difusión del fármaco/ion mediante la matriz polimérica y 4) erosión/degradación eventual del sistema polimérico [78], [80]. Tras el contacto del material seco con la superficie de la herida húmeda, el exudado penetra a la matriz polimérica. Esto causa hidratación y eventualmente hinchamiento

del apósito para formar un sistema de liberación sobre la superficie de la herida [81].

Los polímeros empleados en la formulación de estos materiales pueden ser divididos de acuerdo con su origen y acción biológica en polímeros naturales inertes, naturales bioactivos y sintéticos. La Tabla 2 muestra una breve revisión de éstos.

Tabla 2. Polímeros comúnmente utilizados en la producción de materiales con aplicaciones de curación y sanación de heridas [81].

POLÍMEROS COMUNMENTE UTILIZADOS	
NATURALES	Carboximetilcelulosa Fibroína de seda Pectina Carragenina
SINTÉTICOS	Óxido de polietileno Polivinil alcohol Ácido poli(L-láctico) Polietilenglicol Poliuretano
BIOACTIVOS	Colágeno Gelatina Ácido hialurónico Quitosano Alginato de Sodio

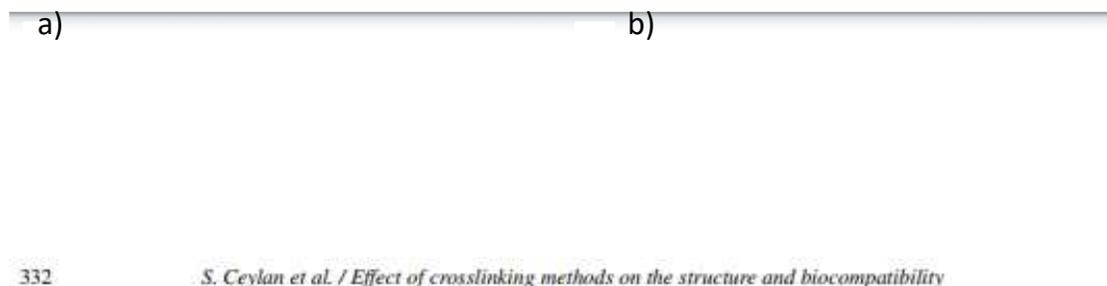
Los polímeros naturales inertes pueden ser obtenidos a partir de plantas, fuentes bacterianas, fúngicas o animales y son comúnmente usadas debido a su biocompatibilidad y biodegradabilidad. La celulosa bacterial es un exopolisacárido natural puro producido por géneros microbianos específicos. La buena biocompatibilidad, hemocompatibilidad, resistencia mecánica, microporosidad y biodegradabilidad, hace a este material uno de los materiales poliméricos naturales más usados para el cuidado de heridas [82]. La celulosa bacterial es usada especialmente como un scaffold/matriz soporte para apósitos en el tratamiento de heridas crónicas, debido a que posee muchas de las características de un apósito ideal.

Se sabe que promueve el desbridamiento autolítico, reduce el dolor y acelera la granulación, asegurando efectivamente la curación de la herida [83]. Los polímeros naturales bioactivos son también comúnmente usados debido a su biocompatibilidad y biodegradabilidad, pero aún más, debido a que tienen un efecto terapéutico en una o más etapas de la curación de las heridas. La mayoría de ellos forman parte de la matriz natural del cuerpo (matriz extracelular) o contienen componentes que poseen actividad fisiológica como parte del proceso natural de curación de las heridas. Los materiales poliméricos bioactivos más comunes para la producción de apósitos incluyen al colágeno (y gelatina), ácido hialurónico, quitosano y alginato de sodio [81]. Los polímeros sintéticos comúnmente empleados en apósitos incluyen alcohol polivinílico (PVA), óxido de polietileno (PEO) y poliuretano. Su naturaleza hidrofílica imparte importantes características funcionales en la curación de heridas como la capacidad para absorber humedad y la transmisión de vapor de agua que permite mantener el ambiente húmedo de la herida mientras evita la colección de excesivos exudados. Además, son generalmente adhesivos, permitiendo una residencia (permanencia) prolongada, presentan biocompatibilidad y poseen mayor resistencia mecánica que los naturales. Los polímeros sintéticos pueden ser procesados usando varias técnicas tales como electrospinning (electrohilado) y la síntesis de hidrogeles [84]. Comúnmente, los materiales sintéticos son usados en combinación con polímeros naturales o bioactivos para mejorar las propiedades mecánicas del apósito final, como en el caso de las felpas (mantas) de nanofibras electrohiladas compuestas de poliuretano y dextrano o polietilenglicol y quitosano [85], [86].

1.1.8.2 Alcohol polivinílico (PVA)

El alcohol polivinílico es un polímero sintético soluble en agua ampliamente usado en la industria debido a sus múltiples características incluyendo biocompatibilidad y biodegradabilidad [87]–[90]. Además, es un buen formador de membranas y geles, adhesivo y emulsificante [91], [92]. Es un polímero altamente hidrofílico y sus propiedades son fuertemente influenciadas por el nivel de humedad. Se hincha o incluso puede ser disuelto al contacto con agua líquida, siendo esta su principal cualidad [92]; siendo necesario el entrecruzado químico o térmico de sus grupos hidroxilo, reduciendo su solubilidad y permitiendo además mejorar las propiedades

mecánicas, la estabilidad térmica y la consolidación del material [93]–[95]. Su estructura molecular se conforma de grupos alcoholes secundarios unidos a una cadena lineal hidrocarbonada facilitando su entrecruzado [96]. El método “Congelamiento-Descongelamiento (C/D)” es la vía física más usada [97], [98]. Este proceso consiste en congelar (hasta aprox. -20°C) y descongelar (a temperatura ambiente) la solución de PVA por ciclos repetidos, creando regiones de alta concentración polimérica y permitiendo que entren en contacto las cadenas por un tiempo prolongado y reduciendo la distancia de separación entre ellas. De esta manera se promueve la formación de enlaces de hidrógeno entre los grupos hidroxilo tanto intra/intermolecular y la reorganización de las cadenas poliméricas en dominios cristalinos [96], [99], [100], ver Figura 8 a). Los hidrogeles preparados por la vía física no usan entrecruzantes orgánicos tóxicos [101]. El entrecruzamiento químico usa diferentes agentes, tales como glutaraldehído, glioxal, ácido maléico, ácido cítrico, trimetafosfato de trisodio, dianhidruros, ácido succínico y ácido sulfosuccinico [102], ver Figura 8 b).



332

S. Ceylan et al. / Effect of crosslinking methods on the structure and biocompatibility

A)



B)

Figura 8. a) Enlaces de hidrógeno entre grupos OH en cadenas poliméricas de PVA vecinas. b) Reacción de entrecruzamiento entre las cadenas poliméricas de PVA y glutaraldehído (GA) [103].

1.1.8.3 Alginato de sodio (SA)

Probablemente sea el polímero de mayor aplicación en las ciencias biomédicas y la bioingeniería debido a su biocompatibilidad, bioadsorción y fácil gelación. Se usa típicamente como hidrogel en la biomedicina, incluyendo aplicaciones como la sanación de heridas, liberación de fármacos/iones y otras aplicaciones propias de la ingeniería de tejidos [79]. Es reconocido por ser un copolímero aniónico no ramificado,

extraído a partir de los constituyentes del alga parda (Brown), compuesto por dos unidades monoméricas unidas: 1) ácido β -D-manurónico (M) y 2) ácido α -L-gulurónico (G). El alginato de sodio es soluble en agua e inestable, por lo que no es viable su uso para el proceso de adsorción directamente. Con la finalidad de superar esta dificultad, surgen las estrategias de entrecruzamiento, logrando aumentar su estabilidad y capacidad de adsorción [104]. El método comúnmente utilizado para su producción consiste en mezclar una solución acuosa de alginato con un agente entrecruzante iónico, tal como los cationes divalentes (por ejemplo, Ca^{2+}). La interacción ocurre entre las regiones ricas de ácido gulurónico de las cadenas poliméricas adyacentes, resultando una estructura en forma de “caja de huevo” [105], [106], ver Figura 9. La composición en los segmentos gulurónicos (peso molecular y relación manurónico/gulurónico) y la duración del entrecruzamiento afectaran fuertemente la calidad de la matriz formada. Cuando los hidrogeles están procesados a partir de alginato rico en residuos gulurónicos, los geles resultantes tienden a ser rígidos, mientras que los geles más elásticos se producen a partir de alginatos con bajo contenido de ácido gulurónico [107]. La habilidad de los iones calcio (Ca^{2+}) entrecruzando las cadenas de alginato presentan a éste polímero como un material ideal en la producción de andamios o soportes celulares dentro de la ingeniería de tejido [108].

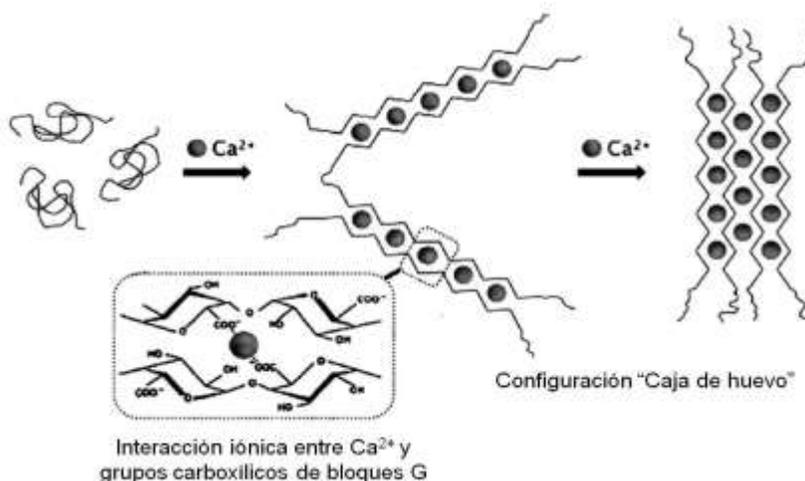


Figura 9. Entrecruzamiento de las cadenas de alginato mediante la coordinación del ion Ca^{2+} y grupos carboxílicos [104], [105].

CAPITULO II. COMPUESTO QUITOSANO – NANOPARTÍCULAS DE ORO

2.2 La importancia de las nanopartículas metálicas (MNPs)

La fusión de la nanotecnología y la ciencia de los materiales ha incentivado el desarrollo de nuevos nanocompuestos con propiedades térmicas, catalíticas, eléctricas, ópticas y mecánicas altamente mejoradas, comparadas con las mostradas por los materiales convencionales [109]–[112]. Los metales nobles, en estado coloidal, han sido ampliamente estudiados principalmente debido a su eficiencia en terapias y diagnosis [113], [114]. Debido a su pequeño tamaño, sus mayores áreas superficiales y habilidad para asistir en procesos de transferencia electrónica, las nanopartículas de metales nobles (NMNPs), especialmente Au y Pt, son excelentes candidatos para su uso y aplicación en sensores electroquímicos [115]–[117]. Su biocompatibilidad con células y tejidos ha sugerido una amplia aplicación en diagnosis [109]. Los biosensores de NMNPs han mostrado un papel importante en el mejoramiento de la precisión y especificidad, brindando una ventaja sobre los métodos de diagnosis biomolecular existentes [118], [119].

2.2.1 Función de las MNPs en biosensores

Un biosensor es una herramienta que monitorea reacciones químicas o biológicas, produciendo una señal proporcional a la concentración del analito. El principio básico de operación consiste en la interacción generada entre el elemento biológico con el analito produciendo cambios físicos y químicos, siendo censados por el transductor o detector y produciendo una señal proporcional a la concentración del analito [120]. Por ejemplo, el biosensado de importantes analitos clínicos juega un papel crucial en la vida humana para el monitoreo y diagnóstico de varias enfermedades. El desarrollo de biosensores sensibles, selectivos y de bajo costo es de gran importancia para la detección temprana de enfermedades [121]. Otros campos como son la industria de los alimentos y protección ambiental requieren pruebas de detección claras, rápidas y de bajo costo, monitoreando bacterias y otros patógenos en alimentos y agua contaminada [122], [123]. Con el avance en la nanotecnología y nanomedicina se han desarrollado sistemas de detección conformados por MNPs, cubriendo además el requerimiento en

la reducción de sus dimensiones (miniaturización) para una mejor portabilidad [124]. Las MNPs tienen una combinación exclusiva de propiedades tales como biocompatibilidad, mayor área superficial y buena conductividad, presentándose como candidatos ideales en la producción de sensores piezoeléctricos [125], mejorando los sitios de bioreconocimiento y la inmovilización del receptor, la eficiencia catalítica, la transferencia electrónica, la biocompatibilidad, etc. Las principales ventajas de los sensores compuestos por MNPs son: 1) Amplificación significativa de la señal, 2) Mayor sensibilidad y, 3) Mejoramiento en la detección y cuantificación de biomoléculas y diferentes iones [126], [127]. Las MNPs definen su función en el sensor de acuerdo con los cambios físicos o electroquímicos que ocurren después de enlazarse al analito biomolecular y al receptor inmovilizado sobre su superficie, actuando como plataforma de inmovilización [125], acelerador de la transferencia electrónica [128], catalizador de reacción entre materiales quimioluminiscentes con sus substratos [129], amplificador de cambios de masa [130] y mejorador de cambios en el índice de refracción [131]. Pueden fungir como “cables electrónicos” en biosensores electroquímicos, además de inmovilizar a los bioreceptores, permitiendo a los electrones producidos en las reacciones ser transportados a los electrodos de censado o convertir otros cambios fisicoquímicos en señales medibles proporcionales a la concentración del analito [128].

2.2.2 Las nanopartículas de oro (AuNPs)

Las AuNPs esféricas destacan debido a sus propiedades optoelectrónicas dependientes de su tamaño y forma, área superficial, excelente biocompatibilidad y baja toxicidad [132]. Además de otras propiedades importantes como son el plasmón de resonancia superficial (SPR) y la habilidad para apagar (quench) la fluorescencia. Conforme se incrementa el tamaño de su diámetro de 1 a 100 nm exhiben un rango de colores (por ejemplo, café, rojo y púrpura) en solución acuosa y, generalmente, muestran un pico de absorción entre 500 y 550 nm dependiendo de su tamaño [133]. Cuando se inciden fotones a las AuNPs, los electrones superficiales se excitan y esta banda de absorción (banda de plasmón superficial) incrementa debido a la oscilación colectiva de los electrones en la banda de conducción, ver Figura 10.

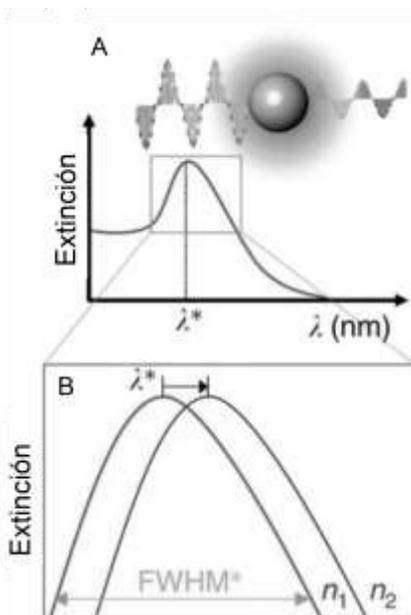


Figura 10. Esquema de un sensor plasmónico convencional. A) La resonancia plasmónica de las MNPs en función de la longitud de onda (λ). Generación del pico de absorción por la interacción de los electrones superficiales con la luz. B) Acercamiento al pico λ^* y su desplazamiento conforme cambia el índice de refracción (η) del medio circundante, $\eta_1 < \eta_2$ [134].

Esta banda no es visible para NPs menores a 2 nm y los materiales en volumen; pero el tamaño no es el único factor que influye sobre ella, existen otros parámetros tales como la forma, el solvente, el ligando superficial, la carga del núcleo, la temperatura e incluso es sensible a la proximidad de otras NPs [135]. Por ejemplo, la agregación de las NPs se identifica a través de un desplazamiento de frecuencia SPR hacia el infrarrojo, mientras que la ampliación de la banda de plasmón superficial y el cambio de color en la solución de rojo a azul se atribuye al acoplamiento del plasmón interpartícula [136].

2.2.3 Métodos para la síntesis de NMNPs

Debido a los altos requerimientos energéticos y poco control sobre la morfología de las NPs obtenidas, los procesos top-down para la síntesis de NMNPs son menos utilizados [137]. Los procesos bottom-up presentan ventajas sobre el producto final con

tamaño, forma y composición química más homogéneos, siendo incluso más económicos. El enfoque bottom-up considera comúnmente un procedimiento de síntesis de química húmeda, tales como la reacción química [138], [139], electroquímica [140], [141], sonoquímica [142], [143] y síntesis verde [144], [145]. El principal reto por superar para su aplicación biomédica es la purificación de las partículas sintetizadas a partir de su mezcla reactiva (químicos tóxicos, solventes orgánicos) [137].

2.2.3.1 Reducción de iones metálicos en solución

A partir de sales iónicas (precursores) se lleva a cabo la reducción de iones metálicos usando varios agentes químicos, en presencia de un agente estabilizante y bajo parámetros de reacción favorables (pH, temperatura, etc.). Es el método más popular y confiable, debido a su simplicidad [113], [146]. Una extensa lista de agentes reductores está disponible para este proceso, incluyendo citrato de sodio [147], [148], ácido tánico [146], boro hidruro de sodio [149], hidracina, hidrógeno, hidruro de litio y aluminio, así como los alcoholes [113], [150]. Similarmente, existen muchas opciones para elegir el agente estabilizante y pueden dividirse en 2 categorías: 1) de bajo peso molecular (por ejemplo, citrato, SDS, quitosano, etc.) y; 2) alto peso molecular (por ejemplo, almidón, tween, PVP, PEG, etc.). Los estabilizadores de bajo peso molecular (generalmente detergentes cargados) tienen la tendencia a alterar la carga superficial de las partículas sintetizadas y mantener la fuerza repulsiva entre ellas, previniendo la agregación; este tipo de estabilizadores generalmente no protegen a las NPs contra factores ambientales (especialmente cambios en la temperatura de almacenamiento y exposición a la luz). Los estabilizadores de alto peso molecular generalmente envuelven a las partículas y las protege del ambiente. Han mostrado ser más eficientes que los de bajo peso molecular. A pesar de sus ventajas, sus aplicaciones biológicas y propiedades catalíticas, son cuestionables debido al espesor de la capa de agente estabilizante sobre las partículas que previene su disolución [151], [152]. La reducción química puede ser fácilmente regulada modificando los parámetros de la reacción (pH y la relación entre el agente reductor y el estabilizante) [137].

2.2.3.2 Síntesis química de las AuNPs

Turkevich et al. desarrollaron un método sintético para producir AuNPs en 1951 tratando ácido cloro-aúrico (HAuCl_4) con ácido cítrico en agua hirviendo, donde el citrato actúa como reductor y estabilizante [153]. Aún más, Frens refinó el método variando la relación Oro/citrato para controlar el tamaño de partícula [154]. Este protocolo ha sido ampliamente empleado para preparar soluciones diluidas de AuNPs esféricas, moderadamente estables, con diámetros entre 10 y 20 nm, aunque se pueden preparar de mayor tamaño (por ejemplo, 100 nm). Estas AuNPs estabilizadas con citrato, pueden experimentar agregación irreversible durante su funcionalización con ligandos tiolato. Muchas estrategias han sido desarrolladas con la intención de resolver el problema, incluyendo el uso de surfactantes antes de la modificación para prevenir la agregación [155]. Sin embargo, el requerimiento de alta dilución es un reto para su producción a gran escala [135].

2.2.4 Quitosano (CS)

Es un polisacárido natural, derivado de la quitina, conformado por dos monosacáridos, N-acetil-D-glucosamina y D-glucosamina, conectados por enlaces β -1, 4-glucosido. La quitina contiene principalmente N-acetil-D-glucosamina y puede transformarse en quitosano mediante la parcial deacetilación del monómero N-acetil-D-glucosamina a D-glucosamina [156], ver Figura 11. Por lo que el quitosano es más soluble en agua y más fácil de procesar. Los oligómeros de quitosano se han proyectado para ser utilizados en campos como la agricultura, tratamiento de aguas y aguas residuales, alimentos y bebidas, químicos, cosméticos y cuidado personal [156], [157]. Debido a sus propiedades bioactivas, es un candidato potencial para la producción de apósitos para el tratamiento de heridas y cosméticos [158].

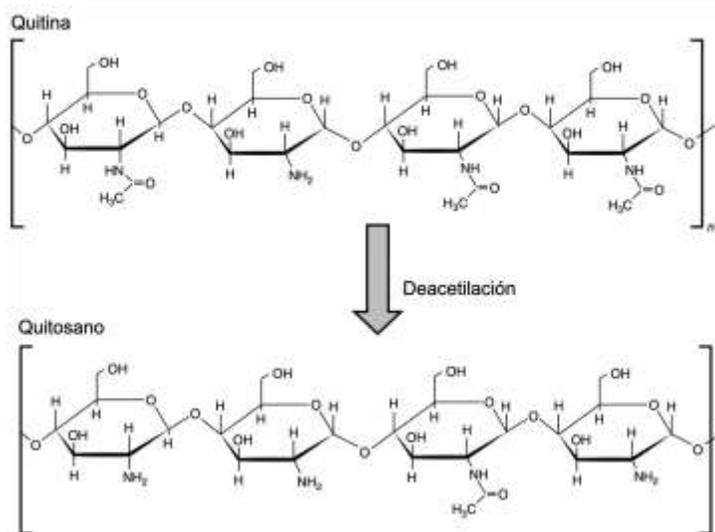


Figura 11. Estructura química de la quitina y quitosano [159].

Los hidrogeles son redes poliméricas entrecruzadas química y/o físicamente con grupos hidrofílicos, pueden absorber y retener gran cantidad de líquidos en un ambiente acuoso [160]. Debido a su alto contenido de agua y suavidad, similar al tejido humano (por ejemplo, piel, cartílago, musculo, etc.), los hidrogeles de quitosano son excelentes candidatos para producir tejidos artificiales [161]. El CS es un polisacárido de autoensamblado que responde de acuerdo con el pH del medio en el que se encuentra. En medio ácido, el grupo amino es protonado produciendo repulsión electrostática entre las cadenas poliméricas, obteniendo un polielectrolito catiónico soluble en agua. En condiciones neutras y básicas de pH, la deprotonación del grupo amino promueve la formación de enlaces de hidrógeno inter e intramolecular, así como el autoensamblado de las cadenas poliméricas formando el hidrogel y reduciendo su solubilidad [162], [163] ver Figura 12.

Debido a su origen natural, biocompatibilidad y biodegradabilidad, el CS aparece como una opción viable para la sustitución de algunos polímeros sintéticos y su aplicación en dispositivos electrónicos, baterías de estado sólido y sensores [164], [165]. Su estructura molecular conformada por grupos hidroxilo y amino es versátil para modificaciones químicas y permite buena interacción con iones como los ionoforos. La mayoría de los materiales producidos con CS exhiben conductividad

eléctrica debido a sus sitios de enlace protónico que permiten la movilidad. Entre las muchas propiedades exhibidas por este polisacárido, la actividad quelante y la conductividad eléctrica son de particular relevancia en el desarrollo de sensores y dispositivos electroquímicos. La habilidad donadora de hidrógeno del CS es un factor clave para muchas de sus propiedades, como la conductividad eléctrica, asistida por la red de enlaces de hidrógeno a lo largo de su estructura [159].

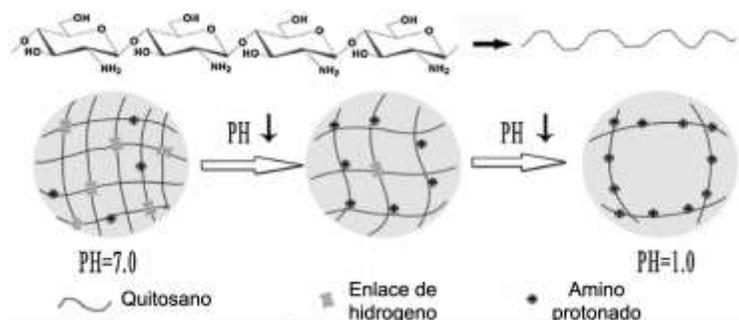


Figura 12. Mecanismo de hinchamiento dependiente del pH en hidrogeles de CS [163].

En estado seco, las películas de CS exhiben muy baja conductividad eléctrica, menor a 10^{-8} S/cm [166]. Sin embargo, si estas películas son hidratadas o solvatadas con soluciones salinas, se mejora fuertemente su conductividad [166]–[168]. Las películas de acetato de CS mostraron conductividades mayores a los 10^{-4} S/cm después de 1 hora de hidratación [166]. Esto muestra que la conductividad mejorada en las películas húmedas es una consecuencia de la absorción de agua, sugiriendo una relación con los cambios conformacionales en las cadenas de CS. Cuando las películas secas son hidratadas, los grupos amino son parcialmente protonados y forman solo algunos iones hidróxido [168]:



Sin embargo, se considera que el incremento en la conductividad de las películas húmedas no se atribuye a la iones OH^- [168], [169], se debe al “mecanismo Grotthus” (mecanismo de salto de protones) [168]. Cuando las moléculas de agua son adsorbidas

por las cadenas de CS, se forman los enlaces hidrógeno entre el agua y los grupos amino protonados y otros grupos polares [169]. El incremento en los enlaces intra e interhidrógeno en la estructura del CS, crea una red a través de la cual los protones (H^+) pueden saltar a lo largo de la red de hidrógenos enlazados, siguiendo un proceso de reorientación con enlaces de clivaje en un rearrreglo molecular local [168], [169]. Esta movilidad protónica explica la diferencia en la conductividad y temperatura, descrita por el modelo Vogel-Fulcher-Tammann (VFT) en experimentos de calentamiento de películas húmedas en el rango de 25-70°C [168]. A través de mediciones de relajación dieléctrica, se dedujo que el comportamiento VFT está relacionado al proceso de relajación α , incluyendo la rotación de los grupos hidroxilo y amino, así como al rompimiento de los enlaces hidrógeno debido a la desorción de agua en películas húmedas, obtenidas por debajo de su T_g [168], [170].

2.2.4.1 Sistema CS-AuNPs para la fabricación de biosensores

A pesar de las excelentes propiedades otorgadas por la estructura del CS, son necesarias algunas modificaciones para obtener un material con mejor desempeño en una aplicación específica [159]. La literatura ha mostrado que el uso de polímeros como agentes protectores, permite fabricar y dispersar AuNPs previniendo su agregación. Algunos polímeros, además, pueden controlar la cinética en la reducción de iones Au^{3+} , brindando una opción viable para la producción de AuNPs de diferentes tamaños [171]. En estudios anteriores se ha reportado la capacidad del CS para estabilizar las AuNPs [172], [173]. Debido a la carga positiva del CS en estado protonado, éste puede adsorberse sobre la superficie de las AuNPs [171], [174], ver Figura 13. Estudios previos han demostrado que el CS estabiliza a las AuNPs, no solo en soluciones, también en hidrogeles [175]. Por ejemplo, un estudio reciente presentó un método atractivo para la determinación de histamina, considerando un biosensor enzimático electroquímico. La oxidación de la histamina catalizada por oxidasa diamina (DAO) inmovilizada podría generar peroxidasa de hidrógeno (H_2O_2), causando un cambio medible en la corriente de oxidación [176]. Las enzimas se encapsularon en un criogel (Cry), un material soporte poroso caracterizado por una gran área superficial, de fácil preparación mediante condiciones C/D. La combinación del Cry y un polímero natural

como el CS generó una matriz eficiente para la inmovilización de enzimas, logrando obtener un soporte con abundantes grupos amino ($-\text{NH}_2$), en una estructura de Cry, no tóxico y biocompatible [177]. Sin embargo, la inherente baja conductividad del CS limitaba su aplicación, por lo que se sugirió la preparación de un material compuesto, combinando el CS con nanomateriales altamente conductivos, facilitando la transferencia electrónica. Así surge el sistema CS-AuNPs con la intención de mejorar la conductividad y fabricar excelentes soportes en la inmovilización de enzimas [178], [179]. En estudios relevantes, este tipo de sistemas mostraron alta sensibilidad, sin requerir complicados procedimientos antes del tratamiento de la muestra, realizando el análisis en cortos periodos de tiempo y bajo costo [180].

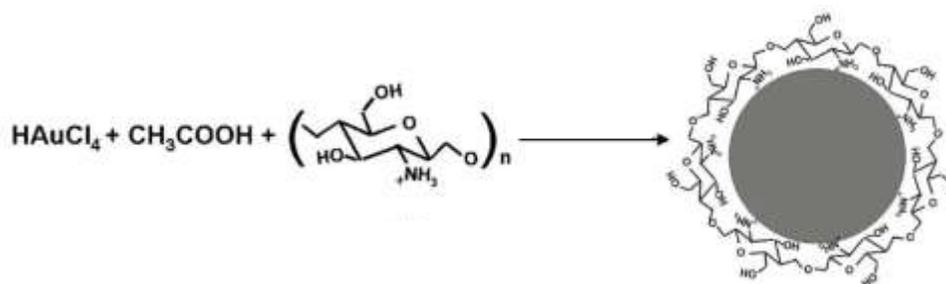


Figura 13. Esquema de la interacción entre las cadenas de CS y la superficie de las AuNPs [181].

Los hidrogeles, en forma de película, son una de las formas más usadas del CS en el desarrollo de dispositivos químicos y sensores. En algunas aplicaciones, las películas o hidrogeles de CS pueden usarse como vehículos o como sustrato para otros compuestos o NPs produciendo materiales compuestos con propiedades mejoradas. Considerables avances han ocurrido en años recientes, originados principalmente por el desarrollo de la nanotecnología. Algunas de las propiedades mejoradas, debido a la alta área superficial de las nanopartículas, son la resistencia a la tensión, la conductividad y la fotoluminiscencia [182]. Entre los métodos reportados en la literatura para la preparación de películas de CS se pueden mencionar: 1) el colado (casting), 2) el centrifugado (sping-coating) y 3) el depósito electroquímico [159], ver Figura 14. El colado consiste en agregar el CS dentro de una solución ácida y mantenerla en agitación hasta completar su solubilización. Entonces, la disolución es vaciada sobre un molde para proseguir con el proceso de secado a temperatura y humedad relativa controladas [164], [168], [183] para, finalmente, obtener las

películas. A través del método de centrifugación se requieren soluciones que cumplan con la adecuada viscosidad y homogeneidad para el procesado. Éste se lleva a cabo dispersando la disolución sobre una superficie plana, sometida a alta velocidad de rotación [184]. Mientras la solución cubre la superficie, el solvente se evapora, controlando el espesor de la película a través de la concentración del polímero, volatilidad del solvente y la velocidad angular del rotor. En el depósito electroquímico del CS, dos electrodos (cátodo y ánodo) son sumergidos en la solución precursora y sometidos a voltaje [185]. El depósito del CS sobre el cátodo (electrodo polarizado negativamente) es causado por la evolución del hidrogeno (H_2) a partir de la electrolisis del agua, consumiendo protones (H^+) y generando un exceso de iones hidroxilo (OH^-) en las inmediaciones de este electrodo. Los grupos amino protonados son atraídos electrostáticamente al cátodo, provocando la insolubilización del polímero sobre el electrodo. El flujo continuo de electrones y la remoción de protones mediante el cátodo, generan la formación de una delgada película sobre la superficie del cátodo. De acuerdo con Suginta [186], el electrodeposito de CS es de importante interés en el desarrollo de dispositivos biosensores electroquímicos, y en la selectiva colocación de los depósitos poliméricos sobre los sitios activos de arreglos microelectrodo y nanoelectrodo que no serían fácilmente producidos con otros procedimientos convencionales [159].

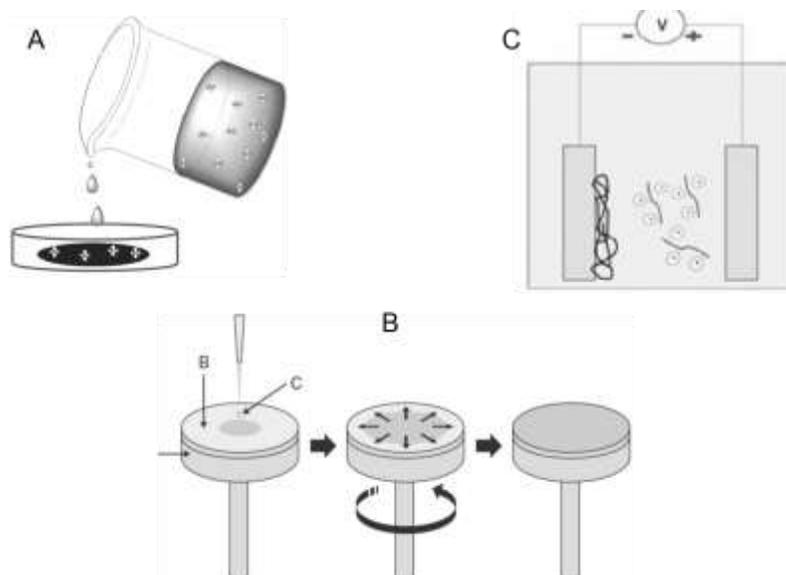


Figura 14. Métodos de preparación para películas de CS. A) Colado, B) Centrifugación, y C) Electrodeposición [159].

CAPITULO III. PLANTEAMIENTO DEL PROYECTO

3.1 Justificación

En años recientes, la demanda de terapias clínicas más efectivas y menos invasivas para la reparación de tejido y anomalías congénitas, así como para la detección temprana de enfermedades, han motivado el desarrollo de nuevas tecnologías. Los biomateriales han demostrado ser una opción viable para cubrir los requerimientos en diversas áreas clínicas. De acuerdo a sus propiedades y composición química, se han utilizado en la producción de material quirúrgico, implantes, en formulaciones de fármacos, biosensores, etc. Por ejemplo, los vidrios de una composición especial ($\text{SiO}_2\text{-CaO-P}_2\text{O}_5$) han mostrado ser bioactivos, reabsorbibles en el organismo y exhiben adecuadas propiedades mecánicas, convirtiéndolos en excelentes candidatos para la ingeniería de tejido. La estimulación del tejido para su pronta regeneración mediante estos materiales resultan en un beneficio para el paciente, acelerando la cicatrización de heridas y reduciendo los tiempos del tratamiento. También se han utilizado materiales metálicos como el oro en la producción de sensores, aprovechando sus propiedades conductivas y eléctricas para la detección de algunas biomoléculas específicas en análisis clínicos. Aún más, las ventajas que la nanotecnología ha otorgado a estos biomateriales ha permitido que se produzcan materiales con mejoradas propiedades. El reducido tamaño de las NPs y su gran área superficial proveen estrategias viables para la liberación y/o absorción, o incluso reacción química, de elevadas concentraciones de iones o moléculas selectivamente. Además de sus reducidas dimensiones y sus bajas concentraciones requeridas para un excelente desempeño, las NPs han permitido la producción de materiales con reducidas dimensiones, en distintas formas (por ejemplo, polvos, partículas, suspensiones, películas, fibras, pastillas, etc.), resultando en dispositivos médicos y clínicos manejables y ergonómicos. La mayoría de las tecnologías modernas requiere materiales con una combinación inusual de propiedades imposibles de conseguir con los metales, cerámicos y polímeros convencionales. Por lo que el desarrollo de materiales compuestos brinda la oportunidad de obtener propiedades excepcionales combinando dos o más materiales. Por lo tanto, los hidrogeles poliméricos resultan ser un vehículo factible para la suspensión de NPs, permitiendo un intercambio de fluidos

mediante una red estructurada de poros, manteniendolas dispersas y protegidas para un mejor desempeño.

Por lo que este proyecto propone la producción de dos nanomateriales compuestos, polimero-cerámico y polimero-metal, evaluando su propiedades y proyectando su posible aplicación como soportes celulares y biosensores, respectivamente.

3.2 Hipótesis 1

Los hidrogeles nanocompuestos PVA-SA-NPs VB, al contacto con los fluidos fisiológicos, permiten un flujo adecuado de líquido hacia su interior, disolviendo las NPs, liberando iones y promoviendo la nucleación de apatita sobre su superficie.

3.3 Hipótesis 2

El tamaño y el grado de dispersión de las AuNPs influyen sobre la conductividad de los nanocompuestos CS-AuNPs y puede ajustarse a través de la concentración del agente reductor adicionado en la formulación (SC).

3.4 Objetivo general

Producir y caracterizar nanocompuestos de matriz polimérica, evaluando propiedades como la bioactividad y conductividad para su desempeño como soporte celular y biosensor, en función del tamaño de las NPs obtenidas y la eficiencia de su dispersión durante los procesos de síntesis.

3.4.1 Objetivos particulares

- Establecer el método experimental mediante la técnica Sol-Gel-co-precipitación para la preparación de NPs VB del sistema $\text{SiO}_2\text{-CaO-P}_2\text{O}_5$.
- Analizar el efecto de la temperatura de sinterizado sobre la microestructura de las NPs de vidrio bioactivo.
- Estudiar los parámetros y condiciones requeridas para mantener la estabilidad química y eléctrica de las NPs.

- Caracterizar la morfología, la composición química y la microestructura de las NPs de vidrio bioactivo.
- Establecer las concentraciones convenientes de PVA y SA para la preparación del hidrogel
- Estudiar los procesos de entrecruzado de PVA y SA
- Realizar los ensayos de pérdida de peso, hinchabilidad, deshidratación y degradación hidrolítica de la matriz PVA-SA
- Realizar pruebas mecánicas de la matriz PVA-SA evaluando la microestructura del compuesto
- Ensayar la bioactividad de los hidrogeles PVA-SA-NPs VB
- Replicar la preparación de las películas de CS
- Identificar las variables del proceso que impactan el tamaño y dispersión de las AuNPs durante la preparación del compuesto
- Realizar las mediciones termogravimétricas, espectroscópicas, morfológicas y de conductividad

CAPITULO IV. DESARROLLO EXPERIMENTAL

4.1 Materiales y métodos para la preparación de NPs VB

4.1.1 Precursores y reactivos

Tetraetilortosilicato (TEOS) (pureza 99.9%), fosfato dibásico de amonio $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ (98%) (DAP), nitrato de calcio tetrahidratado $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (99%) (CaNT), ácido cítrico monohidratado $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (99-100%), polietilenglicol (PEG, peso molecular 20 000) e hidróxido de amonio (máximo 33% NH_3), adquiridos de Sigma Aldrich®. Además de etanol anhidro marca J. T. Baker®.

4.1.2 Métodos

4.1.2.1 Síntesis química de las NPs VB

Las nanopartículas de vidrio bioactivo correspondientes al sistema $\text{SiO}_2\text{-CaO-P}_2\text{O}_5$ fueron preparadas utilizando el protocolo presentado por Hong et. al [187], realizando algunas modificaciones principalmente en la concentración de precursores salinos, así como en los procesos de estabilización y secado. La síntesis química se inició agregando 785 μL de TEOS en 5 mL de EtOH anhidro, mencionada como Solución 1 en el diagrama de la Figura 15. Mientras la cantidad de TEOS se mantuvo constante, las concentraciones de los precursores de calcio y fósforo fueron variantes, de acuerdo con las composiciones teóricas deseadas (calculadas), especificadas en la Tabla 3. En otro contenedor se preparó la Solución 2, mezclando la cantidad requerida “X” de CaNT y 10 mL de agua desionizada. Ambas soluciones fueron agitadas magnéticamente logrando la disolución de los precursores químicos. Posteriormente, las soluciones 1 y 2 fueron mezcladas durante 15 minutos y sometidas a agitación magnética para obtener una solución homogénea. El ácido cítrico fue agregado para ajustar el pH entre 1 y 2, manteniendo una agitación severa durante 1 hora promoviendo la hidrólisis del alcóxido y reservándose para su posterior uso.

Tabla 3. Composiciones químicas y cantidades utilizadas de precursores experimentadas.

Formulación (% mol)	Etiqueta	Peso de los precursores	
		X = W (g) Ca(NO ₃) ₂ •4H ₂ O	Y = W (g) (NH ₄) ₂ HPO ₄
75 SiO ₂ : 20 CaO: 5 P ₂ O ₅	NPS20	0.05543	0.01566
65 SiO ₂ : 30 CaO: 5 P ₂ O ₅	NPS30	0.096	0.01806
55 SiO ₂ : 40 CaO: 5 P ₂ O ₅	NPS40	0.1512	0.02135

Posteriormente, el DAP “Y”, fue disuelto en 30 mL de agua y mezclado con 30 mL más de EtOH, ajustando el pH de la solución a 11.5 con hidróxido de amonio, Solución 3. Preparadas las soluciones precursoras, se procedió con la co-precipitación, adicionando lentamente (a goteo) la solución del alcóxido hidrolizado a la Solución 3, manteniendo una agitación magnética intensa y ajustando el valor de pH a 11.5. Tan pronto como se finalizó el mezclado de las soluciones, el contenedor se cerró herméticamente y se mantuvo por 72 horas en agitación magnética. Las etiquetas asignadas a las NPs como NPS20, NPS30 y NPS40 corresponden a las versiones preparadas bajo el mismo procedimiento con 20, 30 y 40 % mol de CaO teórico, respectivamente.

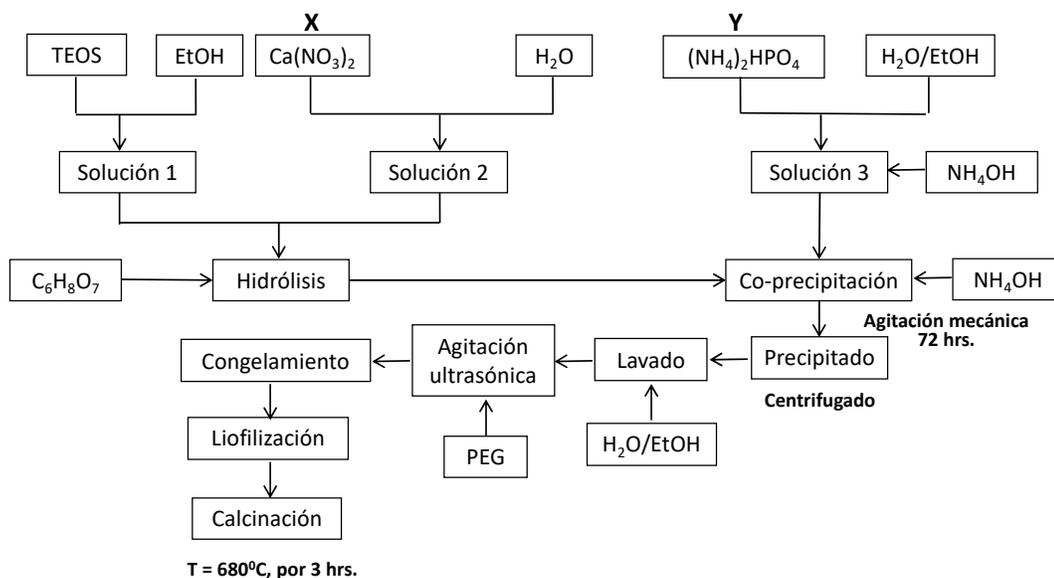


Figura 15. Ruta de síntesis química para la producción de NPs VB.

4.1.2.2 Lavado, secado y calcinado de las NPs VB

Las NPs fueron recolectadas por centrifugación a 7000 rpm y resuspendidas en una mezcla de agua desionizada/EtOH 50:50 %v, repitiendo el procedimiento 3 veces más para lavar y eliminar los compuestos o iones que no se integraron a la matriz vítrea. Posteriormente, con la intención de reducir el efecto aglomerante, fueron resuspendidas en una solución de PEG al 2% (w/v) y sometidas a agitación mediante el uso de la punta ultrasónica por 10 segundos (Potencia 500 Watts, frecuencia 20 kHz). Su estabilización se logró al mantener la suspensión por 24 horas más en agitación magnética para su posterior congelamiento y liofilización. El polvo seco obtenido fue ingresado a un horno mufla con calentamiento de 3°C/min, realizando un primer tratamiento a 300°C durante 120 minutos, con la intención de retirar la mayor parte del agua fisisorbida en la superficie de las NPs. Posteriormente, se procedió a calcinar las NPs alcanzando los 680°C durante 180 min y un enfriamiento natural como se menciona en la literatura [188]. El tratamiento térmico completo se muestra en la Figura 16.

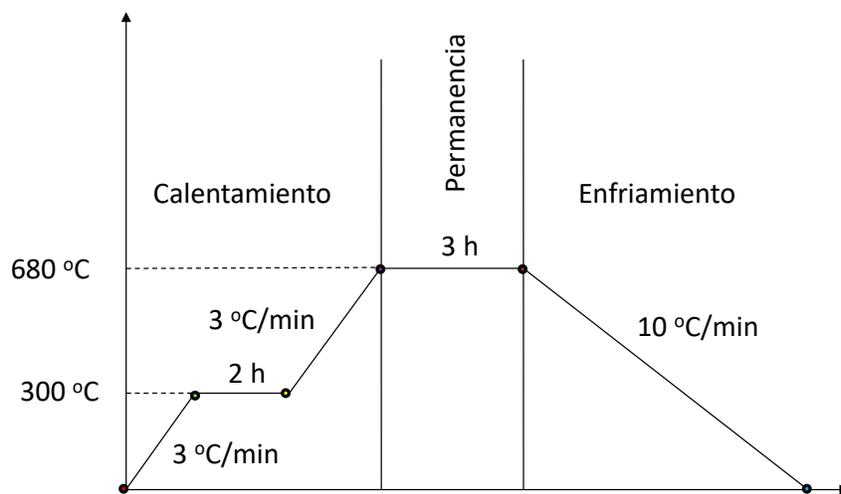


Figura 16. Tratamiento térmico para las NPs de vidrio bioactivo producidas.

4.1.3 Caracterización de las NPs VB

4.1.3.1 Determinación del tamaño de partícula

El análisis de dispersión dinámica de Luz (DLS) se utilizó para medir el diámetro hidrodinámico de las NPs en un Zetasizer Nano-S, equipado con un láser verde

correspondiente a 532 nm de longitud de onda. Las NPs calcinadas se re-suspendieron en agua desionizada filtrada a una concentración de 10 $\mu\text{g/mL}$. Antes de la medición, las NPs fueron irradiadas en un baño ultrasónico durante 10 min para asegurar su dispersión. La medición se realizó en un ángulo 90° y detección de 175° , considerando una temperatura de $20 \pm 1^\circ \text{C}$. Es preciso señalar que se realizaron tres mediciones continuas para cada una de las versiones de las NPs preparadas, con una diferencia de 60 segundos entre cada medición, para evaluar su estabilidad con respecto al tiempo. Los datos fueron analizados de acuerdo con el método acumulativo para determinar el diámetro promedio aparente y el índice de polidispersidad (PDI).

4.1.3.2 Identificación de grupos funcionales

La identificación de los grupos funcionales en las NPs de vidrio bioactivo se llevó a cabo mediante espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FT-IR). Los espectros FT-IR se obtuvieron a través de un espectrómetro Perkin-Elmer spectrum GX, operado en modo de reflectancia difusa (DRIFTS). Las NPs VB calcinadas se trituraron y diluyeron con KBr a una razón de 1:100 para ser colocadas sobre el portamuestras y analizadas con una punta de diamante, a 24 barridos y una resolución de 4 cm^{-1} . El rango de medición se consideró entre los $4000 - 370 \text{ cm}^{-1}$.

4.1.3.3 Análisis microestructural

4.1.3.3.1 Análisis mediante Difracción de Rayos X

La formación de fases y la identificación de la microestructura en las NPs fue el principal objetivo del análisis desarrollado mediante Difracción de Rayos X (DRX). Se usó un difractómetro Empyrean PANalytical, modelo X'pert Pro, operado con radiación Cu-K α ($\lambda=1.5406 \text{ \AA}$) a 45 kV y 40 mA. El sistema está equipado con un detector ultra rápido X'Celerator basado en tecnología Real Time Multiple Strip y una geometría Bragg-Brentano. Los datos se recolectaron a temperatura ambiente en el rango contemplado entre 10 y $90^\circ 2\theta$, con un tamaño de paso de $0.033^\circ 2\theta$ y tiempo de barrido de 1 minuto en modo continuo.

4.1.3.3.2 Refinamiento Rietveld

Los datos DRX fueron analizados mediante refinamiento de estructuras cristalinas a través de modelos teóricos, usando el método de mínimos cuadrados para ajustar el patrón de difracción teórico al experimental. Fue posible determinar los parámetros de celda de la HAp presente en las NPs, dependiente de la concentración de precursores, mediante el procesamiento de los datos obtenidos con el software FullProf. Los datos de Sudarsanan et. al [189] se utilizaron como modelo inicial para el refinamiento de la Hidroxiapatita hexagonal con grupo espacial P63/m.

Para describir la línea base se usó un modelo de interpolación lineal. Los perfiles de difracción fueron descritos por el modelo Thompson-Cox-Hastings Pseudo-Voigt. Se refinaron simultáneamente parámetros como el desplazamiento a cero, factor de escala, ancho medio (U, V, W) y forma de pico (X, Y). También se refinaron parámetros estructurales como las coordenadas atómicas para 2 átomos de Ca, un átomo de P, dos átomos de oxígeno O1 y O2 (plano especular) y un átomo de oxígeno O3 (fuera del plano). Se identificó la calidad de ajuste gráfico, entre el modelo teórico y experimental, mediante el valor de χ^2 (bondad de ajuste), cuyo valor tenderá a 1 cuando el patrón de difracción (de un polvo) ha sido optimizado [190].

4.1.3.4 Análisis químico elemental

El análisis XPS se realizó en un instrumento ensamblado por Intercovamex (Morelos, México,) usando una fuente de rayos X (XR4), $K\alpha_1$ del aluminio ($h\nu = 1486.7$ eV) y un espectrómetro hemisférico Alpha110, ambos marca ThermoFisher (East Grinstead, UK). Las mediciones XPS se llevaron a cabo a una presión de 9×10^{-11} Torr. La energía de paso del espectrómetro se ajustó a 15 eV. La linealidad de la escala BE (bending energy) fue verificada de acuerdo a la ISO 15472:2001, utilizando oro, plata y cobre sublimados como materiales de referencia. La resolución de energía fue de 1 eV y se determinó a partir del ancho medio del pico (FWHM) para la línea de excitación de la Ag 3d_{5/2}. El paso de energía en el espectro survey (global) fue de 1 eV y el paso en el espectro detallado fue de 0.1 eV. Las muestras (en polvo) se colocaron sobre una tapa de indio, desgasificadas y colocadas en una cámara de análisis, un

sistema de ultra vacío (8×10^{-11} Torr). Las escalas para la energía de enlace (BE) fueron referenciadas colocando la energía de enlace (C 1s) del carbono adventicio (284.6 eV). Se obtuvieron los espectros de alta resolución para C(1s), Ca(2p), P(2p), Si(2p) and O(1s) con una energía de paso de 15 eV. Los datos XPS se recolectaron por el fotodetector con ángulos de despegue de 85° , definidos como los ángulos entre la superficie normal y el eje de los lentes analizadores. Los espectros fueron analizados usando el software AAnalyzer®, desarrollado por CINVESTAV-IPN. La substracción de la línea base se realizó mediante el método iterativo Shirley-Sherwood. Se usó el producto Gaussiana y Lorenziana para el ajuste de las curvas.

4.1.3.5 Análisis morfológico y composición química

La morfología y composición química de las NPs de vidrio bioactivo fueron analizadas mediante microscopia electrónica de barrido de emisión de campo (FE-SEM) y espectroscopía de energía dispersiva de rayos X (EDS), en un equipo FEI Nova NanoSEM 200. Antes del análisis, una gota de solución (NPs de vidrio bioactivo y etanol) se colocó sobre un portamuestras, permitiendo que el solvente se evaporara a temperatura ambiente. Los espectros EDS se obtuvieron sobre partículas específicas y también a diferentes micro áreas, utilizando el mismo voltaje de aceleración (15 KV).

4.2 Materiales y métodos para la preparación del compuesto PVA-SA-NPs VB

4.2.1 Precursores y reactivos para preparar los hidrogeles nanocompuestos

Alcohol polivinílico (PVA, peso molecular 89,000-98,000, 99+% hidrolizado), alginato de sodio (SA, CAS 9005-38-3) grado químico, cloruro de calcio (CaCl_2 , $\geq 93\%$), NaCl ($\geq 99.0\%$), NaHCO_3 ($\geq 95.0\%$), KCl ($\geq 99.0\%$), $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ($\geq 99.0\%$), NaSO_4 ($\geq 99.0\%$), $\text{KH}_2\text{PO}_4 \cdot 3\text{HO}$ ($\geq 99.0\%$), Tris-hidroximetilaminometano (Tris, $\geq 99.8\%$) todos adquiridos con Sigma Aldrich®.

4.2.2 Métodos

4.2.2.1 Preparación de los hidrogeles de PVA-SA

Se prepararon cuatro soluciones poliméricas precursoras: 1) solución 5% w/v de PVA, 2) solución 10% w/v de PVA, 3) solución 3% w/v de SA y 4) solución 5% w/v de SA. Para obtener las soluciones precursoras de PVA, se pesaron las cantidades correspondientes del polímero seco y se disolvieron en H₂O desionizada. La temperatura de disolución fue de 90°C (en baño de aceite), durante 1 hora y agitación moderada, resultando una solución clara. Similarmente, se llevó a cabo la disolución del SA en H₂O a 55°C (en baño de aceite), durante 1 hora y agitación moderada. Los hidrogeles se produjeron a partir de las soluciones precursoras integradas en dos sistemas: DS1) las soluciones 5% w/v de PVA y SA se mezclan a una razón 50:50 %v y DS2) las soluciones 10% w/v de PVA y 3% w/v de SA se mezclaron a una razón 35:65 %v, respectivamente. Una vez se agregaron las proporciones indicadas de ambas soluciones poliméricas en el contenedor, se agitaron durante 1 hora más, asegurando la homogeneidad de la mezcla. Posteriormente, 3 mL de las mezclas poliméricas fueron vertidos en cajas circulares de poliestireno, de 3 cm de diámetro, para moldear y consolidar el hidrogel mediante el entrecruzado de las cadenas poliméricas. Antes del entrecruzado la mezcla de polímeros se mantuvo en reposo a temperatura ambiente durante 1 hora para la liberación de burbujas y el desgasificado. El ciclo de congelamiento y descongelamiento (C/D) consistió en mantener la mezcla a una temperatura de -42° C durante 16 horas, posteriormente se extraenjeron para su descongelamiento a temperatura ambiente durante las siguientes 8 horas. Los hidrogeles de PVA-SA obtenidos (S1 y S2) fueron sometidos a varios ciclos (1 a 5) C/D para determinar sus propiedades mecánicas y texturales de acuerdo al grado de entrecruzamiento. Algunos hidrogeles, además, se sometieron a un segundo proceso de entrecruzado, adicionando 2 mL de una solución 2% w/v de CaCl₂. Una vez transcurrida 1 hora, a partir de la adición del agente entrecruzante, los hidrogeles se enjuagaron con agua destilada, retirando el exceso de iones, obteniendo dos sistemas doblemente entrecruzados (S1-CaCl₂ y S2-CaCl₂). La ruta para la preparación de los hidrogeles se puede describir mediante el diagrama de la Figura 17.

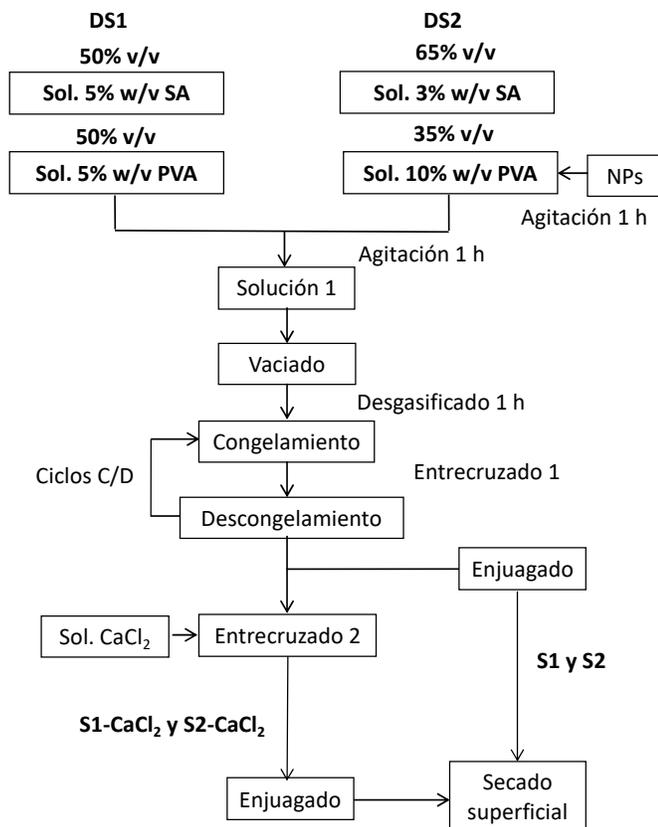


Figura 17. Ruta de preparación para los compuestos PVA-SA y PVA-SA-NPs VB.

4.2.2.2 Preparación de los Nanocompuestos de PVA-SA-NPs VB

La matriz polimérica PVA-SA fue preparada de acuerdo al procedimiento descrito anteriormente, en el apartado 3.2.2.1, eligiendo el sistema S2, 10% w/v de PVA y 3% w/v de SA (relación de mezcla 35:65 %v) y realizando la modificación pertinente para la resuspensión de las NPs. Una vez que se mantuvo la solución de PVA a temperatura ambiente, se adicionaron las NPs VB, manteniendo la agitación intensa durante 1 hora. Posteriormente, fueron colocados en el punta ultrasonica por 10 s para garantizar la dispersión de las NPs. Manteniendo la agitación mecánica intensa, la solución de SA fue agregada lentamente a la mezcla PVA-NPs VB, obtenido así una suspensión estable y sin sedimentos. Se obtuvieron los hidrogeles en forma de pastilla para NPS20, NPS30, NPS40 y BG comercial, vaciando los 3 mL de suspensión correspondiente en los contenedores, manteniendo el reposo para el desgasificado y sometiendo a 2

ciclos de C/D. El doble entrecruzado de los hidrogeles se logró adicionando 2 mL de la solución 2% w/v de CaCl₂ y enjuagandolos despues de 1 hora.

4.2.3 Ensayos

4.2.3.1 Análisis de peso para los hidrogeles PVA-SA

Una vez preparados los hidrogeles y cumplidos los correspondientes ciclos de entrecruzado por C/D (S1 y S2), se procedió a enjuagarlos con agua desionizada para retirar los residuos polímericos no integrados a su red, reservandose para su posterior análisis de peso. Mientras que los hidrogeles que requirieron un segundo entrecruzado adicionando CaCl₂ (S1-CaCl₂ y S1-CaCl₂), fueron enjuagados posteriormente para retirar, además, los iones excedentes del hidrogel. En ambos casos, los hidrogeles fueron secados suavemente con toallas de celulosa (libres de pelusa, kimwippes) para retirar el exceso de humedad exterior. Posteriormente, fueron pesados en una balanza analítica. Es preciso mencionar que todos los hidrogeles se prepararon por triplicado.

4.2.3.2 Deshidratación y secado de los hidrogeles PVA-SA

Se llevó a cabo sometiendo los hidrogeles a un tratamiento térmico, con la intención de evaporar el agua contenida en su interior y determinar el peso perdido en lapsos de tiempo definidos. El ensayo consistió en pesar los hidrogeles antes del proceso térmico, bajo el protocolo descrito en el apartado anterior. Posteriormente, fueron ingresados a una estufa de calentamiento, manteniendose a una temperatura de 50°C por 24 y 48 horas, en atmósfera de oxígeno. Una vez concluidos los tratamientos térmicos, se enfriaban los hidrogeles hasta temperatura ambiente y se procedía a pesarlos. Los vasos de precipitados que contenian las muestras fueron tratados térmicamente antes del análisis y enfriados en desecador para retirar la humedad en su superficie. Las mediciones fueron realizadas considerando las buenas practicas de laboratorio para no contaminar los hidrogeles, otorgando calidad en las mediciones. La determinación del %W perdido se realizó a través de la ecuación 6:

$$\%W \text{ perdido} = (W_i - W_t)/W_i \times 100 \quad \text{ec. 6}$$

Donde W_i es la masa del hidrogel inicialmente y W_t es la masa del hidrogel deshidratado a un tiempo t .

4.2.3.3 Determinación del comportamiento de hinchabilidad

Los hidrogeles se secaron durante 96 h a 50°C en una estufa de calentamiento para retirar la humedad. Posteriormente, se colocaron en tubos falcon, agregando agua destilada para mantenerlas sumergidas. Una vez cerrado el tubo, estos fueron ingresados a un baño con termostato, ajustando la temperatura a 37°C. En intervalos específicos de tiempo, los hidrogeles se extrajeron del baño, se escurrieron y secaron con toalla para, posteriormente, pesarlos. La relación de inchamiento (SR, g/g) se determinó gravimetricamente de acuerdo a la ecuación 7:

$$\text{Relación de inchamiento (SR)} = (W_t - W_i)/(W_i). \quad \text{ec. 7}$$

Donde W_i es la masa del hidrogel seco y W_t es la masa del hidrogel hinchado a un tiempo t .

4.2.3.4 Ensayo mecánico de compresión en hidrogeles PVA-SA

Se utilizó un analizador de textura marca Texture Analyser, modelo TA-TX2 plus para determinar la dureza de los hidrogeles. Las pastillas poliméricas recién preparadas se enjuagaron y secaron, retirando la humedad de su superficie bajo el protocolo establecido y especificado anteriormente (ver sección 4.2.3.1). Cada hidrogel en forma de pastilla (diámetro de 3 cm) era colocado en el portamuestra del equipo y alineado al eje del pistón. Al operar el equipo, un disco de 4 cm (diámetro), al final del pistón, comprimía al hidrogel en dirección descendente y regresaba a su posición inicial. Los parámetros requeridos por el equipo fueron velocidad de avance (del pistón) y distancia (profundidad de inserción), seleccionando 0.5 mm/s y 4 mm, respectivamente. Los ensayos se realizaron en condiciones atmosféricas de presión y temperatura. Las mediciones se llevaron a cabo por triplicado para cada hidrogel. De esta manera se obtuvieron los resultados de dureza, mediante el gráfico fuerza - tiempo.

4.2.3.5 Degradación hidrolítica de hidrogeles PVA-SA

Los hidrogeles obtenidos se secaron para retirar la humedad, bajo el protocolo mencionado anteriormente (ver sección 4.2.3.1). Se determinó el peso inicial de los hidrogeles a través de una balanza analítica. Entonces, fueron colocados al interior de un tubo falcon e inmersos en 8 mL de solución salina buffer de fosfato (PBS, 0.1 M, pH 7.4). El procedimiento establecido por Kokubo et al. se utilizó para la preparación del PBS [191]. Una vez cerrados los tubos, se dispusieron en un baño con termostato, ajustando la temperatura a 37°C. Los hidrogeles permanecieron en estado estático por periodos de tiempo definidos (15, 30 y 45 días) y entonces extraídos, secados suavemente para remover el líquido remanente en su superficie y pesados. Cada versión de los hidrogeles se preparó por triplicado, con la intención de extraerse en los 3 periodos de tiempo estipulados, sin detener la continuidad de la degradación. La determinación del %W perdido se realizó a través de la ecuación 8:

$$\%W \text{ perdido} = (W_i - W_t)/W_i \times 100 \quad \text{ec. 8}$$

Donde W_i es la masa del hidrogel inicialmente y W_t es la masa del hidrogel degradado a un tiempo t .

4.2.3.6 Ensayo de bioactividad para Hidrogeles PVA-SA-NPs vidrio bioactivo

Siguiendo los protocolos, se procedió a lavar el material que sería utilizado para el ensayo con detergente neutro y agua destilada. Posteriormente, el material se ingresó a una solución 1M de HCl durante 24 horas, eliminando cualquier residuo sobre el material que pudiera influir sobre la nucleación y crecimiento de la apatita. Pasado el tiempo, el material se extrajo, se escurrió y se dejó secar. Los hidrogeles se enjuagaron con agua desionizada, secando suavemente su superficie con toalla, como se ha descrito anteriormente (ver sección 4.2.3.1). El proceso de esterilización del material y los hidrogeles nanocompuestos se realizó con radiación UV, irradiando 15 minutos el material y 5 minutos por cada lado del hidrogel. Los hidrogeles se colocaron al interior de los tubos falcon para, posteriormente, agregar 15 mL de solución de Hank's (pH = 6.96, T = 32.6° C). El valor de pH de la solución fue determinada antes de agregarla a

los hidrogeles y fue usada como referencia bajo las mismas condiciones de tratamiento. Una vez dispuestos los hidrogeles, se procedió a cerrar los contenedores y colocarlos en un baño con termostato, ajustando la temperatura a 37°C. El cambio de la solución se realizó cada 84 horas, monitoreando su pH. Los hidrogeles se extrajeron a los 14 días para identificar el crecimiento de la apatita sobre su superficie.

4.3 Materiales y métodos para la preparación de compuestos CS-AuNPs

4.3.1 Precursores y reactivos

Quitosano de medio peso molecular (300,000 g/mol) y 85% grado de deacetilación (CAT. 448877), ácido cloro-aúrico (CAT. 50790) y citrato de sodio (CAT. S1804) se obtuvieron de Sigma Aldrich® y se usaron sin purificación adicional.

4.3.2 Métodos

4.3.2.1 Preparación de las películas de CS-AuNPs

Se sintetizaron siete nanocompuestos con la misma concentración molar de HAuCl_4 y diferente cantidad de citrato de sodio (SC). Los nanocompuestos se sintetizaron disolviendo 2% de quitosano en una solución de ácido acético al 1%. Posteriormente, a una solución de 0.3 mM de HAuCl_4 se agregaron diferentes cantidades de SC, variando la relación milimolar entre HAuCl_4 y SC en el rango de 0.1 y 5. La mezcla se calentó a 75°C y se agitó magnéticamente hasta que la solución cambió color a rojo.

Un estudio reciente de nuestro grupo desarrolló la modificación al método de reducción química de Turkevich que se aplicó [192]. En este sentido, el CS es un polisacárido soluble en medio acuoso ácido por debajo de pH 6. La cantidad de citrato adicionado a la reacción no debe incrementar el pH de la solución por arriba de 6 para sobrellevar la precipitación del CS. Las soluciones fueron calentadas a 75°C manteniendo la agitación magnética hasta su cambio a color rojo. Se prepararon películas con espesor de 20 μm a través del método de colado, vaciando la solución final en una caja petri y permitiendo que el solvente se evapore por 24 horas a 60°C.

Las películas de 20 μm se prepararon para realizar mediciones de espectroscopia por impedancia y las de 10 μm para mediciones FT-IR en modo transmisión.

4.3.3 Caracterización de las películas CS-AuNPs

4.3.3.1 Mediciones FT-IR y análisis de morfología

Los nanocompuestos se caracterizaron mediante FT-IR. Los espectros se obtuvieron entre 4000 y 400 cm^{-1} en un equipo Perkin Elmer Spectrum1, modelo PerkinElmer, Inc. (Waltham, MA, USA). Los espectros fueron recolectados con 16 barridos, en intervalos de 4 cm^{-1} y modo de transmisión. La morfología de las películas CS/AuNPs fue tomada mediante un microscopio electrónico de barrido de emisión de campo (FE-SEM) JEOM JSM-7401F (JEOL Inc. Peabody, MA, USA). La espectroscopia UV-Vis, utilizada para determinar el tamaño de las AuNPs mediante la banda de absorción máxima, se realizó en un espectrometro Agilent 8453, Agilent Technologies (Santa Clara, CA, USA).

4.3.3.2 Mediciones térmicas

La cantidad de agua libre, se determinó mediante análisis termogravimétrico (TGA) (modelo Mettler Toledo 851e, Mettlet Toledo, Columbus, OH, USA). Las mediciones se realizaron con flujo de aire seco desde 25 hasta 300°C y una razón de calentamiento de 10°C/min.

4.3.3.3 Mediciones dieléctricas

Se realizaron en un rango de frecuencia contemplado entre 40 Hz y 110 MHz en un analizador Agilent Presicion Impedance 4249A. La amplitud de la señal medida fue de 100 mV. Las mediciones de temperatura se realizaron en la celda, con un rango de 20 a 200°C, usando un controlador programado para calentar a una razón de 3°C/min entre ciertas medidas de temperatura. Para remover la humedad de las películas, se llevaron a cabo mediciones adicionales en una celda a vacío interna [193].

CAPITULO V. ESTUDIO DEL COMPUESTO PVA – SA – NPs VB

5.1 Resultados y discusión de las NPs VB

5.1.1 Inspección visual

Después del proceso de calcinado, se obtuvieron las NPs VB en forma de polvos finos y volátiles, como se muestra en la Figura 18. Es preciso mencionar que durante la preparación de las NPS20, NPS30 y NPS40 se identificaron algunas características particulares. Por ejemplo, la formación de burbujas durante el lavado, así como la acelerada precipitación de las NPs durante su recolección, se incrementaron adicionando mayores concentraciones de CaNT. Aún más, se identificó un cambio en la coloración de las NPs. Un polvo blanco se obtuvo para las NPS20, mientras que las NPS30 y NPS40 presentaron una coloración más oscura, siendo más intensa conforme se incrementó la concentración de CaNT.

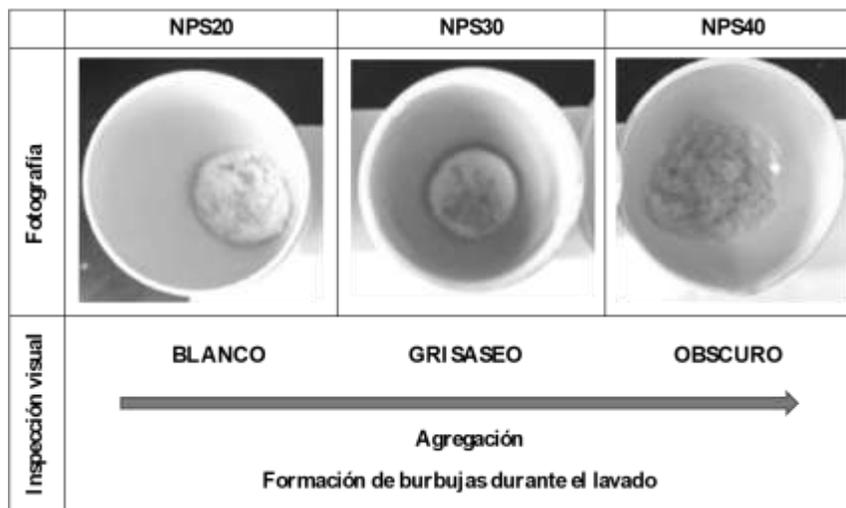


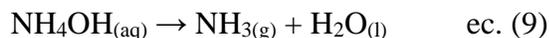
Figura 18. NPs VB obtenidas, apariencia física y algunas características observadas durante la síntesis química y el lavado.

Las observaciones realizadas durante la síntesis química (sol-gel- co-precipitación) sugieren que la adición de distintas concentraciones de CaNT podría formar variedad de compuestos en la superficie de las NPs (principalmente fosfatos y carbonatos de calcio), influyendo en sus propiedades físico-químicas. Estudios anteriores han demostrado que una cantidad limitada del calcio adicionado en la formulación, se

adsorbe en la superficie del silicato. El calcio restante, queda en el medio y es eliminado durante el proceso de lavado. Durante el calcinado, parte del calcio adsorbido se difunde e integra en la red vítrea [59], [194]. Aún más, la elevada área superficial de las NPs permitirá la adsorción de altas concentraciones de calcio, fosfatos y carbonatos, que reaccionarán entre sí para formar nuevos compuestos, incluyendo la HAp. Durante el proceso de lavado (centrifugación), fue posible identificar efectos de agregación de las NPs, determinando el tiempo y la velocidad de centrifugación aplicada para lograr su sedimentación. Para NPS20 se observó inicialmente (antes de la recolección) una solución turbia, sin sedimentación al permanecer estática.

Además, a pesar de centrifugar a 7000 rpm y lograr la recolección de la mayor parte de las NPs, el líquido residual aún mostró turbidez debido al efecto Tindal generado por la NPs aún suspendidas (dispersión de la luz transmitida en una suspensión, al chocar con las NPs). Sin embargo, para el caso de NPS30 y NPS40, fue evidente la formación de sedimentos al permanecer en reposo. Los tiempos y velocidades de centrifugación disminuyeron conforme se adicionaron mayores concentración de calcio y, la apariencia del líquido residual, fue transparente. La teoría de estabilidad coloidal DLVO (Deryaguin–Landau–Verwey–Overbeek) indica que el incremento en la concentración de electrolitos en una suspensión, genera un cambio en la carga superficial de las partículas, reduciendo las fuerzas de repulsión entre ellas y promoviendo su agregación [195].

Considerando que el NH_4OH se utilizó durante el proceso de co-precipitación, la formación de burbujas observada en el proceso de lavado podría originarse a la liberación de amoníaco (NH_3), como resultado del proceso de neutralización de pH.



Específicamente, podría estar relacionado con el NH_3 al interior de los poros de las NPs, que ha sido atrapado por algunos residuales o compuestos formados en la superficie y que escapa cuando las NPs son sometidas al movimiento y a la fuerza

centrifuga. Sin embargo, existen evidencias que durante la preparación sol-gel de algunos silicatos de calcio se integran carbonatos, mediante la descomposición de residuales orgánicos [196], [197]. Otras investigaciones revelan que los silicatos de calcio además son comúnmente utilizados como soporte de fase activa (Calcio), para la adsorción de CO₂ y la producción de hidrogeno a partir de biomasa [198], [199]. Incluso, se menciona que el CaCO₃ es un mineral que suele encontrarse junto con Apatitas naturales (extraídas del subsuelo) [200]. Estas observaciones resaltan la alta afinidad química existente entre los iones Ca²⁺ y los grupos CO₃²⁻, así como la viabilidad de formar CaCO₃ durante la síntesis química y el procesado de éstos materiales. Es posible que las reacciones químicas llevadas a cabo en la producción de las NPs favorezcan la producción de ácido carbónico y/o carbonatos en medio acuoso, como se muestra a continuación [201]:



Además, otros estudios han comprobado la formación de CaCO₃ en el rango contemplado entre 350 y 550 °C [202] mediante la descomposición de algunos complejos metálicos de calcio (como el oxalato de calcio), mencionando al CO y CO₂ como subproductos. Algunos trabajos además reportan la obtención de polvos grisáceos alrededor de 600 °C debido a la formación de carbón libre mediante la siguiente reacción:



Por lo que la formación de burbujas y la apariencia oscura de las NPs, bien podría estar relacionada con la formación de carbonatos y su proceso de descomposición. Algunas investigaciones señalan que el rango de descomposición térmica del CaCO₃ se encuentra entre los 650 y 750 °C [196], [203], coincidiendo con el tratamiento térmico otorgado a las NPs (680 °C). A través de estas observaciones, se encontró una relación directa entre la formación de burbujas y la coloración oscura de las NPs, con

la concentración de CaNT adicionado en la formulación. Conforme se adicionó mayor concentración de CaNT los efectos anteriormente señalados también se incrementaron.

5.1.2 Análisis de tamaño de partícula

La Figura 19 presenta tres gráficos apilados obtenidos a partir de las mediciones de diámetro hidrodinámico en función de la intensidad de luz dispersada. La determinación del diámetro hidrodinámico para cada muestra (NPS20, NPS30 y NPS40) se llevó a cabo por triplicado, con un retraso de 60 s entre cada medición para analizar la estabilidad de las NPs resuspendidas en un medio acuoso sobre el tiempo (agregación). Por lo tanto, en cada gráfico se presentan tres curvas correspondientes a las mediciones. La curva tipo campana (Gausiana) representa la distribución de diámetro hidrodinámico en la suspensión de las NPs. Las más intensas y estrechas, indican una población de NPs con un diámetro más homogéneo (similar) en tamaño (con un tamaño predominante) y tienden a ensancharse conforme los diámetro difieren. Es posible obtener comportamiento bimodal, trimodal e incluso multimodal para el caso de una suspensión conformada de partículas con diámetros en distintos rangos de longitud [204].

De acuerdo a los resultados observados en la Figura 19, la suspensión NPS20 presenta una distribución monomodal. Las curvas correspondientes a la primera (línea con guiones) y segunda (línea punteada) medición, se traslapan y presentan una distribución entre los 100 y 180 nm. A pesar de éste comportamiento, la tercera medición (línea solida) exhibió un desplazamiento a mayores valores de diámetro, entre los 150 y 300 nm. Para la suspensión NPS30, la curva de la primera medición fue monomodal con una distribución contemplada entre 100 y 180 nm. Sin embargo, la segunda medición fue bimodal con rangos de diámetro entre a) 30 – 90 nm, y b) 180 – 400 nm. Un comportamiento multimodal se identificó en la tercera medición, presentando tres distribuciones, con rangos entre a) 40 – 100 nm, b) 120 – 600 nm, y c) 5000 – 6000 nm. Una distribución monomodal y dos multimodales se observaron para la suspensión NPS40, mostrando un rango de diámetros entre 120 y 400 nm, en la primera medición. Las multimodales correspondieron a 3 distribuciones, con rangos de

diámetro entre a) 40 – 100 nm, b) 180 - 700 nm, y c) 5000 – 6000 nm para la segunda medición, así como a) 60 – 240 nm, b) 300 – 1800 nm, y c) 4000 – 6000 nm para la tercera medición. La distribución de diámetro hidrodinámico para las NPs VB se resumen en la Tabla 4.

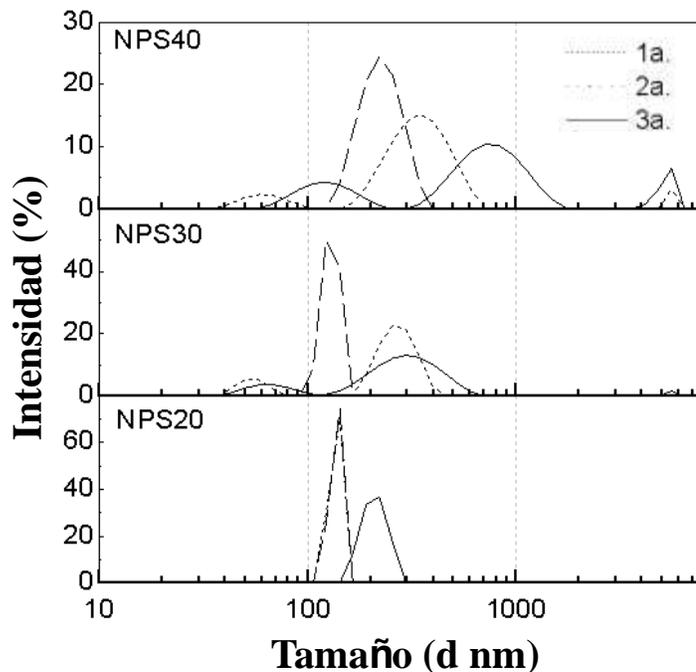


Figura 19. Distribución de tamaño de diámetro hidrodinámico para NPs VB preparadas con 20, 30 and 40% mol CaO (3 mediciones para cada muestra, 60 segundos de retraso).

La amplia distribución de diámetro hidrodinámico fue evidente a través del análisis DLS, presentando valores de índice de polidispersidad (PDI) en el rango contemplado entre 0.4 y 1 (polidispersas) [205]. Las primeras mediciones indican que NPS20 y NPS30 se conforman mayoritariamente de NPs con diámetros hidrodinámicos entre los 100 y 200 nm, mientras que NPS40 presenta su población predominante entre los 150 a 300 nm. El comportamiento monomodal de las curvas en la primera medición, así como el rango de población predominante contemplado entre 100 y 300 nm, sugieren que al inicio del análisis, las NPs se encuentran dispersas en el medio.

Tabla 4. Tipos de distribución y rangos de diámetro hidrodinámico en mediciones DLS para las NPs VB preparadas con 20, 30 and 40% mol CaO.

	Medición	Tipo de distribución	Rango de la distribución (nm)
NPS20	1ª.	Monomodal	100-180
	2ª.	Monomodal	100-180
	3ª.	Monomodal	150 - 300
NPS30	1ª.	Monomodal	100-180
	2ª.	Binomodal	40 – 90, 180-400
	3ª.	Multimodal	40 – 100, 120-600, 5000 - 6000
NPS40	1ª.	Monomodal	120-400
	2ª.	Multimodal	40 – 100, 180-700, 5000 - 6000
	3ª.	Multimodal	60 – 240, 300-1800, 4000 - 6000

Sin embargo, conforme avanza el análisis (segunda y tercera medición), se observan desplazamientos o ensanchamientos de las distribuciones, así como el surgimiento de nuevas, indicando un cambio en el diámetro y la velocidad de difusión de las NPs. Además, el surgimiento de nuevas distribuciones (en el rango de los 30 a 100 nm y los micrómetros) para NPS30 y NPS40, expone la ampliación en la distribución de tamaños conforme se adicionan mayores concentraciones de CaNT en la formulación. La teoría sol-gel menciona que el surgimiento de las partículas primarias de SiO₂ (< 5 nanómetros) se lleva a cabo por adición monomérica del ácido silícico Si(OH)₄. Posteriormente, estas partículas se agrupan para formar partículas mayores. Durante este proceso, se presentan fenómenos de disolución y reprecipitación. Las más pequeñas, con mayor área y energía superficial, se disolverán más rápido y se reprecipitarán en las más grandes, incrementando su tamaño. Este mecanismo de crecimiento es conocido como maduración de Ostwald y concluirá una vez que las NPs tengan una estabilidad coloidal [54], [206]. Además, las investigaciones realizadas muestran que las NPs de silicatos preparadas por sol-gel, usualmente forman una capa de gel sobre su superficie cuando están en una solución, actuando como una barrera estérica y mejorando su estabilidad a valores de pH mayores a 8 [207]–[210]. Sin embargo, cuando un electrolito es agregado en la suspensión, los iones comprimen la capa de gel, debido al apantallamiento de cargas. La concentración de electrolito tendrá

un efecto sobre el espesor del gel, a mayor concentración agregada, el espesor del gel y la distancia entre las NPs se reducirá, promoviendo su aglomeración [211]. Otro argumento mencionado en la literatura señala que las NPs VB en medio acuoso se solubilizan, generando además la precipitación de calcio y la formación de apatitas en su superficie, modificando sus propiedades fisicoquímicas y superficiales [212].

Los trabajos de investigación revelan que es más fácil estabilizar un sistema coloidal cuando el tamaño de diámetro, la forma y las propiedades fisicoquímicas de las partículas individuales en la suspensión son similares (monodispersas), o mejor dicho cuando el PDI es menor a 0.1 [205]. Sin embargo, cuando la suspensión es polidispersa, las propiedades superficiales dependerán del tamaño (área superficial) y la concentración de las distintas poblaciones de NPs, haciendo impredecibles e incontrolables los fenómenos físico-químicos superficiales. Por ejemplo, un efecto en la reducción del tamaño de las NPs (como se observa en NPS30 y NPS40, <100 nm), incrementará el área y la energía superficial de esa porción de la población, generando mayor fuerza de atracción entre ellas y mayor aglomeración [212]. La presencia de NPs pequeñas en NPS30 y NPS40 puede surgir debido a la adición de elevadas concentraciones de electrolito (Ca^{2+}), modificando su carga superficial y afectando los procesos de disolución, reprecipitación (maduración de Ostwald) y estabilidad coloidal. Pero también, podrían ser un efecto de la radiación ultrasónica aplicada a las NPs en su redispersión, durante el proceso de lavado y modificación superficial. Se podría esperar una mayor disolución o el seccionamiento de aglomerados (degradación) en NPS30 y NPS40, al aplicar la radiación ultrasónica, debido a su red vítrea más abierta o menos polimerizada (con mayor concentración de modificadores de red, por ejemplo el Ca^{2+}).

5.1.3 Análisis de grupos funcionales

Los espectros FTIR correspondientes a las NPs producidas se presentan en la Figura 20. Las NPs exhiben bandas características de los grupos funcionales hidroxilo OH^- ($3750 - 3000 \text{ cm}^{-1}$), carbonato CO_3^{2-} ($1575 - 1400 \text{ cm}^{-1}$), siloxano Si-O-Si ($1200 - 800 \text{ cm}^{-1}$) y fosfato PO_4^{3-} ($1200-900$ y $600 -475 \text{ cm}^{-1}$). A pesar de observar bandas similares

para NPS20, NPS30 y NPS40, se identificaron diferencias en sus intensidades, así como ligeros desplazamiento en el espectro, relacionándose con la formación de distintas especies. Por ejemplo, realizando una comparación entre los espectros completos ($4000 - 400 \text{ cm}^{-1}$), se puede determinar que NPS20 presenta bandas más intensas en la región de los hidroxilos, siloxanos y fosfatos, mientras que NPS40 presenta bandas más intensas para la región de los carbonatos. Un análisis más detallado es necesario para una correcta identificación de grupos funcionales, considerando incluso bandas de baja intensidad. La Figura 21 presenta acercamiento de las regiones más destacadas de los espectros a) $4000 - 2800$, b) $2000 - 1000$ y c) $1000 - 400 \text{ cm}^{-1}$.

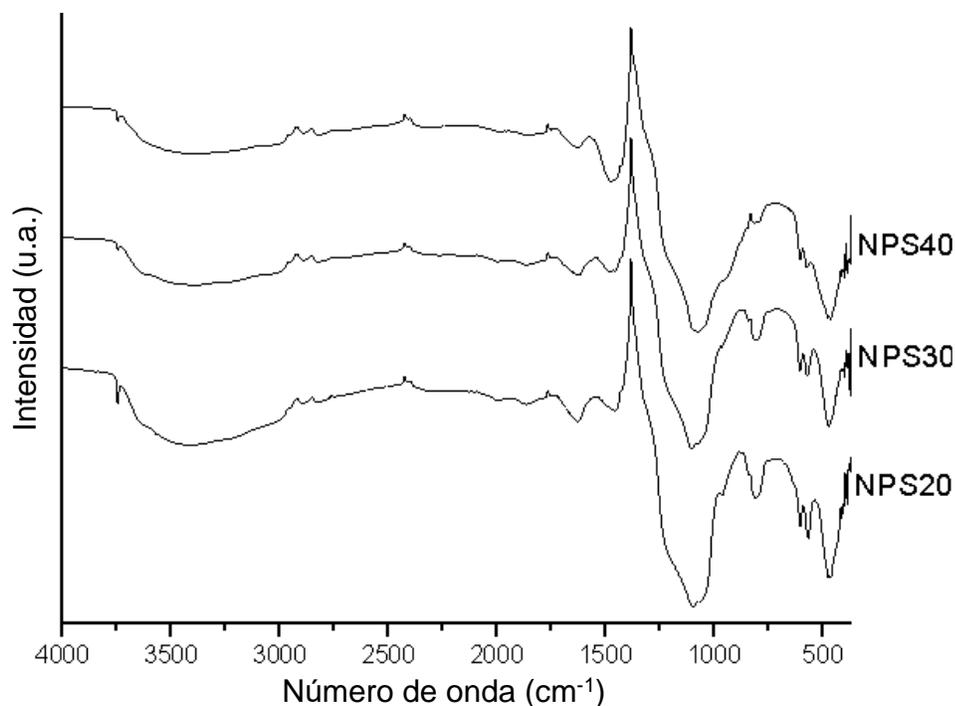


Figura 20. Espectros FT-IR obtenidos para NPS20, NPS30 y NPS40 en la región 4000 a 400 cm^{-1} .

En la primera región (Figura 21a) se puede observar una banda muy marcada para los tres espectros, pero destacable para NPS20, alrededor de 3750 cm^{-1} , atribuida al modo vibracional O-H de los silanoles (Si-OH) aislados sobre SiO_2 [213]. La banda ancha observada entre 3700 y 3000 cm^{-1} es la contribución de vibraciones O-H originadas por algunos compuestos formados, entre ellas destacan las correspondientes al hidróxido de calcio Ca(OH)_2 cerca de 3645 cm^{-1} [214], a HAp en 3570 cm^{-1} [200],

a moléculas de H₂O adsorbidas sobre fosfato de calcio 3448 cm⁻¹, a moléculas de H₂O adsorbidas sobre HAp entre 3420 y 3400 cm⁻¹, a moléculas de H₂O adsorbidas sobre carbonato de calcio CaCO₃ en 3350 cm⁻¹, a moléculas de H₂O coordinadas a cationes (observado generalmente en minerales) alrededor de 3220 cm⁻¹, así como la banda centrada alrededor de 3000 cm⁻¹ generada por moléculas de agua solvatada, enlazadas mediante puentes de hidrogeno con sales de ácido carboxílico [215]. También se observan las bandas correspondientes a los modos vibracionales del enlace C-H en 2970, 2820 y 2720 cm⁻¹, correspondientes a radicales alquilo y grupos –COH, originados en la descomposición de precursores, fosfatos y carbonatos de calcio.

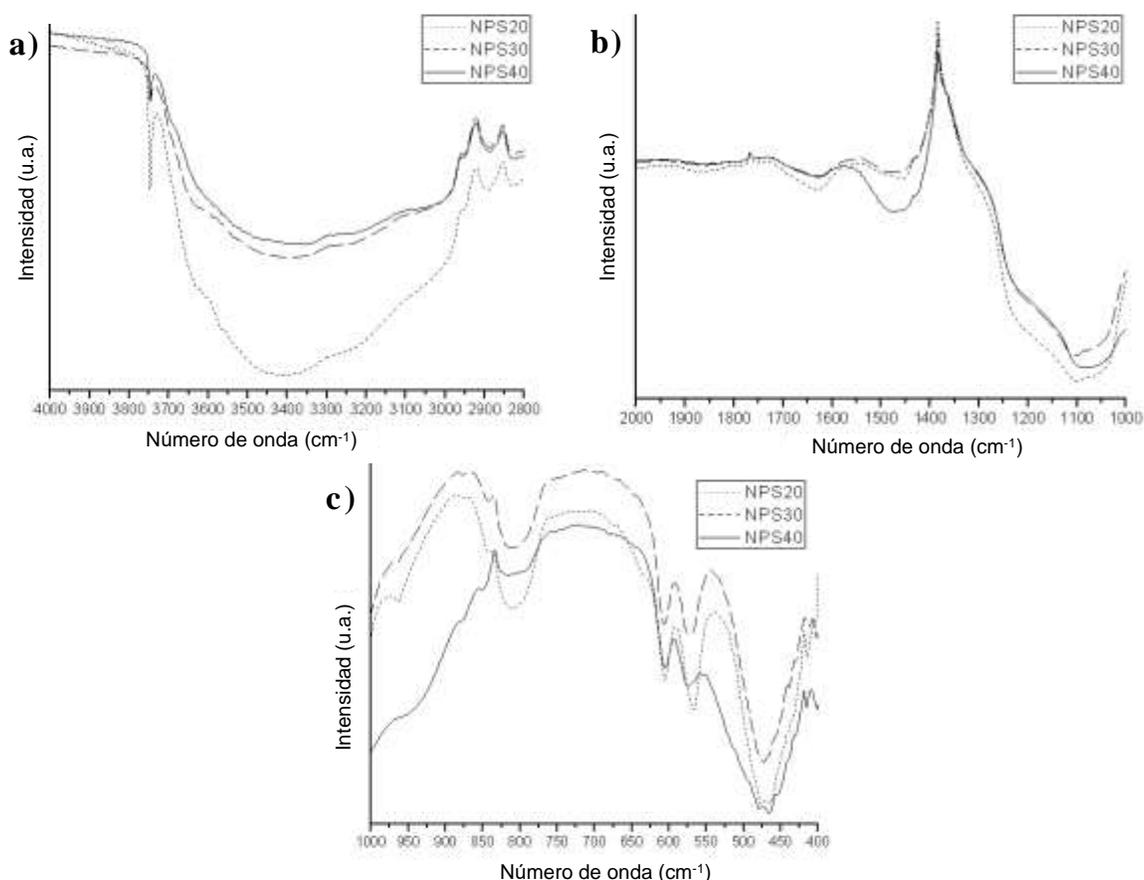


Figura 21. Regiones del espectro FT-IR a) 4000 - 2800 cm⁻¹, b) 2000 - 1000 cm⁻¹ and c) 1000 - 400 cm⁻¹.

En la segunda (Figura 21b) región se observan sobretonos de los modos vibracionales Si-O alrededor de 2000 y 1860 cm⁻¹, así como una banda alrededor de 1630 cm⁻¹ atribuida a las moléculas de H₂O adsorbida en superficie de las NPs. La

banda ancha contemplada entre los 1580 y 1400 cm^{-1} resulta de las vibraciones de grupos carbonato apatítico (carbonato sustituido en la red de apatita) y no apatítico (por ejemplo, CaCO_3). Se ha establecido que los iones carbonato pueden ubicarse en los canales estructurales del eje c, sustituyendo a los OH^- (tipo A) o sustituyendo al grupo fosfato (tipo B) en la red cristalina de la HCA [216]. Por lo que la apatita carbonatada (CAp) generalmente tiende a desplazar sus bandas de acuerdo a la sustitución de los grupos CO_3^{2-} en su red cristalina. Por ejemplo, las bandas localizadas en 1545 y 1455 cm^{-1} corresponden a la sustitución tipo A, así como la banda en 1474 cm^{-1} al tipo B. Además, algunas bandas reportadas para los carbonatos no apatíticos también son visibles en esta región del espectro, entre ellas se encuentran las localizadas en 1520, 1490, 1430 y el hombro en 1418 cm^{-1} . La banda invertida alrededor de 1380 cm^{-1} se atribuye a la vibración C-O del CO_2 fisisorbido en la superficie, observándose para todas las NPs preparadas. La presencia de SiO_2 se reconoce a través del hombro localizado en 1220 cm^{-1} , correspondiendo a la vibración óptico transversal (TO) del estiramiento anti-simétrico, reportado como característica específica de especies cíclicas formadas con 4 a 8 átomos de silicio en la red [212]. En la región contemplada entre 1100 y 1000 cm^{-1} se traslapan las bandas características ν_3 (tensión antisimétrica) de los grupos PO_4^{3-} y los correspondientes al enlace Si-O-Si. Los PO_4^{3-} tienden a presentar una banda muy marcada y centrada alrededor de 1100 cm^{-1} , observable en todos los espectros de las NPs [217]. La banda ancha observada entre 1070 y 1050 cm^{-1} , corresponde a las vibraciones del enlace Si-O-Si, comúnmente reportado para silicatos preparados por el método sol-gel. Esta banda se encuentra traslapada con algunas bandas adicionales en la misma zona del espectro, las localizadas en 1076 y 1030 cm^{-1} . De acuerdo a investigaciones realizadas, la banda en 1076 cm^{-1} podría relacionarse a una vibración de estiramiento C-O en grupos CO_3^{2-} [218]; y la segunda, a las vibraciones de los grupos PO_4^{3-} observada comúnmente en la formación de apatita.

En la tercera región (Figura 21c), se identifican los ortofosfatos a través de la banda estrecha localizada alrededor de 960 cm^{-1} , siendo evidente para NPS20 y NPS30. Los metafosfatos tipo cadena se reconocen a través de una banda ancha localizada entre 950 y 930 cm^{-1} observada específicamente en NPS40. Otras dos bandas son atribuidas

a la formación de CO_3^{2-} en ésta región del espectro, localizadas en 875 y 845 cm^{-1} , siendo más intensas para NPS40. La primera puede desplazarse en el espectro dependiendo del tipo de carbonato predominante (tipo A, B o una combinación) [218]; y la segunda banda es característica de CaCO_3 amorfo [219]. El estiramiento simétrico del enlace Si-O-Si exhibe una amplia banda observada entre 830 y 770 cm^{-1} , indicando la polimerización de la red vítrea, mientras que la apenas perceptible en 680 cm^{-1} , originada por el enlace de silicio no enlazante (Si-O-NBO), permite evaluar la integración del Ca^{2+} en el vidrio y la disrupción de la red de SiO_2 . La banda observable en 630 cm^{-1} , exclusivamente para NPS20, se atribuye a la formación de HAp y se relaciona con la banda en 3570 cm^{-1} . En la región contemplada entre 610 y 550 cm^{-1} se encuentran las bandas relacionadas con las vibraciones de estiramiento simétrico ν_4 , del enlace P-O en el ion PO_4^{3-} . Estas se localizan en 606, 575 y 560 cm^{-1} , y son comúnmente observadas en HAp. Una contribución más de los grupos PO_4^{3-} se observa alrededor de 540 cm^{-1} en apatitas sintéticas y biológicas, referida a los fosfatos ácidos (HPO_4^{2-}). Las bandas observadas en aproximadamente 480 y 470 cm^{-1} son atribuidas a los modos ν_2 del PO_4^{3-} . Para el caso de NPS40, se observa la primera banda, y además, un ensanchamiento hacia mayores números de onda, lo que podría relacionarse con la presencia de mayor concentración de ACP. La segunda se reporta para HAp cristalina [220], [221]. La literatura además menciona una banda entre 450 y 490 cm^{-1} atribuida a Si-O-Si, comúnmente observada en silicatos. Sin embargo, en los espectros no se define claramente ésta banda debido a su apantallamiento por las bandas de PO_4^{3-} . Al final del espectro se puede observa una banda alrededor de 415 cm^{-1} atribuida a la vibración de doblamiento del enlace O-Ca-O. Los modos vibracionales de los grupos funcionales identificados en éste análisis se especifican en la Tabla 5.

Tabla 5. Modos vibracionales y grupos funcionales identificados en las NP VB.

Numero de onda (cm^{-1})	Enlace	Vibración asignada	Compuesto atribuido	Referencia
3750	O-H	Estiramiento	SiOH	[213]
3645	O-H		Ca(OH)_2	[214], [222]
3570	O-H	Estiramiento	HAp	[218]
3448	O-H	Estiramiento	H_2O , ACP	[223]

3433	O-H	Estiramiento	H ₂ O, Vidrio bioactivo	[224]
3400	O-H	Estiramiento	H ₂ O, NanoHAp	[225]
3350	O-H	Estiramiento antisimétrico	H ₂ O, ACC	[226], [227]
3220	O-H	Estiramiento	H ₂ O, cationes minerales	[228]
3000	O-H	Estiramiento	Ac. Carboxílico	[229]
2976	C-H	Estiramiento antisimétrico	CH ₃	[230]
2820	C-H	Estiramiento antisimétrico	CH ₃	[230]
2820	C-H	Estiramiento	Aldehido – OCH ₃	[231]
2000	Si-O	Sobretono	SiO ₂ mesoporoso	[232]
1860	Si-O	Sobretono	SiO ₂ mesoporoso	[232]
1630	O-H-O	Deformación	H ₂ O	[74], [233]–[235]
1569	C-O	v3 Estiramiento antisimétrico	CO ₃ ²⁻ tipo A2, CAp AB	[218], [236]
1545	C-O	v3 Estiramiento antisimétrico	CO ₃ ²⁻ , tipo A CAp	[216], [218], [236], [237]
1520	C-O	V3 asimetric streching	CO ₃ ²⁻ , ACP	[223]
1507	C-O	v3 Estiramiento antisimétrico	CO ₃ ²⁻ tipo A2. CAp AB	[216], [218], [236]
1493	C-O	v3 Estiramiento antisimétrico	CO ₃ ²⁻ , no apatíticos. ACC	[238]
1475	C-O	v3 Estiramiento antisimétrico	CO ₃ ²⁻ tipo B. CAp AB	[200], [216], [218]
1460	C-O	v3 Estiramiento antisimétrico	CO ₃ ²⁻ tipo B. CAp	[200], [216], [218]
1450	C-O	v3 Estiramiento antisimétrico	CO ₃ ²⁻ tipo A. CAp. NanoHCA.	[200], [216], [218]
1435	C-O	v3 Estiramiento antisimétrico	CO ₃ ²⁻ , no apatítico CaCO ₃	[218], [239]
1410	C-O	v3 Estiramiento antisimétrico	CO ₃ ²⁻ tipo B. CAp	[218], [237]
1380	C-O		CO ₂ fisisorbido	[240]
1330	O-H	Doblamiento	SiO ₂	[241]

1220	Si-O-Si	Hombro LO3, Estiramiento antisimétrico	SiO ₂ amorfo sol gel	[218], [230], [242]
1100	P-O	v3 Estiramiento antisimétrico	PO ₄ ³⁻	[217]
1099	C-O	v1 Estiramiento simétrico	CaCO ₃	[218]
1090	Si-O-Si	Estiramiento antisimétrico	SiO ₂ especies cíclicas	[212]
1076	P-O		PO ₄ ³⁻ /CO ₃ ²⁻	[243], [244]
1070-1050	Si-O-Si	Estiramiento antisimétrico	SiO ⁻ /Ca ²⁺	[212], [224]
1030	P-O	Estiramiento antisimétrico	PO ₄ ³⁻	[217]
960	P-O	v1 Estiramiento simétrico	PO ₄ ³⁻ Ortofosfatos	[200], [244], [245]
956	P-O	v1 resonancia	PO ₄ ³ , ACP	[223], [237]
880	C-O	v2 doblamiento fuera del plano	CO ₃ ²⁻ tipo A. CAp	[200], [216], [218]
875, 870	C-O	v2 doblamiento fuera del plano	CO ₃ ²⁻ , ACC o r calcita	[218], [239]
870	C-O	v2 doblamiento fuera del plano	CO ₃ ²⁻ tipo B. CAp	[200], [216], [218], [246]
862	C-O	v2 doblamiento fuera del plano	CO ₃ ²⁻ tipo A2. CAp AB	[218], [236]
845	C-O	v2 doblamiento	CO ₃ ²⁻ , ACC o r calcita	[219], [239]
793-814	Si-O-Si	Estiramiento simétrico	SiO ₂ , vidrio biactivo sol-gel	[224]
680	Si-O NBO (Ca ²⁺)	Doblamiento	Silicatos	[247]
630	O-H	Libracional	HAp	[200], [225], [237]
604	P-O	v4 doblamiento antisimétrico	PO ₄ ³⁻ HAp	[200], [246]
575	P-O hombro	v4 doblamiento antisimétrico	PO ₄ ³⁻ HAp, ACP	[223], [246]
560	P-O	v4 doblamiento antisimétrico	HPO ₄ ²⁻	[237], [246]
474	P-O	v2	PO ₄ ³⁻	[200], [217], [225], [237]
450-490	O-Si-O	Doblamiento	SiO ₂ amorfo	[196]

415	O-Ca-O	bending	CaO	[248]
-----	--------	---------	-----	-------

La intensidad incrementada de las bandas OH⁻, Si-O y Si-O-Si en NPS20, indica una mayor hidratación superficial, pero también una superficie más pura del vidrio bioactivo, donde la reducida concentración de CaNT en la formulación, minimiza su concentración en el medio, reduciendo también su precipitación en la superficie de las NPs y la formación de fosfatos de calcio. Además, al estar expuesta la superficie del silicato, se incrementan los modos vibracionales de los silanoles (Si-OH), así como del Ca(OH)₂ y la HAp formados. De acuerdo a la literatura, la formación de la capa de gel de silicio (ácido polisilícico) en la superficie del vidrio bioactivo, conformada por abundantes grupos Si-OH, provee sitios favorables para la nucleación de fosfatos de calcio [249], [250]. Estos grupos funcionales inducen la nucleación heterogénea de la apatita, mientras que la liberación de Ca²⁺ acelera su nucleación [251]. Esta observación coincide también con un trabajo de investigación anteriormente realizado para la síntesis de silicato de calcio, mediante el método sol-gel, mencionando que bajas concentraciones de calcio se dispersan en la superficie del SiO₂. Sin embargo, altas concentraciones, suelen acumularse cubriendo la superficie y promoviendo la formación de cristalitas de CaCO₃ (calcita) [196]. El máximo de banda para NPS20 en esta región se encuentra alrededor de 3400 cm⁻¹, correspondiendo a las moléculas de H₂O adsorbidas sobre vidrio bioactivo e HAp. Algunos trabajos de investigación también señalan que el incremento en las bandas 3400 y 1630 cm⁻¹ se relaciona con la formación de apatita nanocristalina en la superficie de las NPs [224], [225]. Otros más señalan que las bandas en 3570 y 630 cm⁻¹ suelen ser apenas perceptibles para apatitas pobremente cristalinas (nanocristales), donde el dominio cristalino apenas empieza a desarrollarse. Además, señalan que la intensidad de las bandas de HAp se reducen integrando iones CO₃²⁻, o incluso desaparecen cuando existe una sustitución completa de los OH⁻ [218], [252], [253]. La reducción de las bandas OH⁻ (3750 – 3000 cm⁻¹), así como el desplazamiento del máximo a 3350 cm⁻¹ para NPS40, indican mayor concentración de CaCO₃ y una reducción en el H₂O adsorbida. El efecto de deshidratación bien puede atribuirse a la reducción de grupos Si-OH y la formación de otros compuestos en la superficie de las NPs, pero también podría ser una consecuencia de la aglomeración de NPs y la reducción del área superficial.

Si bien no es posible diferenciar entre bandas de CO_3^{2-} apatítics tipo A y B, debido a su escaso carácter cristalino y, posiblemente, baja concentración (no están bien definidas), es posible diferenciar entre bandas apatíticas y no apatíticas mediante la localización de sus máximos. La banda intensa y ancha observada en la región de los carbonatos para NPS40 ($1580 - 1400 \text{ cm}^{-1}$), centrada alrededor de 1480 cm^{-1} , sugiere que predominan los carbonatos no apatíticos, resaltando la formación del CaCO_3 . Por otro lado, NPS20 y NPS30 presentan bandas muy reducidas de carbonato con máximos alrededor de 1450 cm^{-1} y 1480 cm^{-1} , respectivamente, marcando una diferencia en la composición química superficial. Si bien, el máximo de NPS20 coincide con el modo de vibración de CO_3^{2-} tipo A, en NPS30 predominan los carbonatos no apatíticos. La presencia de bandas débiles de carbonatos (específicamente tipo A) es otra característica que se reportó en otra investigación analizando apatitas nanocristalinas [200] y puede originarse debido a la presencia de CO_3^{2-} lábiles (fisisorbidos). Aún cuando se forman otros compuestos de calcio en la superficie de las NPs con adiciones excesivas de CaNT, es preciso resaltar que existe también una concentración de calcio que se integra a la matriz vítrea, formando el silicato. De acuerdo a la literatura, la banda observada comúnmente alrededor de 1090 cm^{-1} para SiO_2 amorfo sintetizado por sol-gel, tiende a desplazarse hacia menores números de onda (entre 1070 y 1050 cm^{-1}) para el caso de los silicatos, debido a la integración de modificadores de red (como el Ca^{2+}) o el incremento de oxígenos no enlazados (NBO) [212], [242], [254]. Otro trabajo menciona que [230] el hombro observado en 1220 cm^{-1} , puede relacionarse con la incrementada porosidad residual característica de los materiales sol-gel con alta concentración de silicio. Esta banda, al igual que la observada entre 830 y 770 cm^{-1} , tienden a reducir su intensidad conforme se incrementa el contenido de modificadores de red (calcio) en silicatos [255]. La formación de enlaces Si-O-NBO también puede identificarse mediante la banda localizada alrededor de 680 cm^{-1} , incrementando su intensidad a mayor concentración de modificadores de red [247]. Otra banda que también sugiere la integración de Ca^{2+} a la matriz del silicato, es la observada alrededor de 415 cm^{-1} , debido a la formación de CaO, incrementando su intensidad para NPS20 y reduciéndola para NPS30, debido al apantallamiento de otros compuestos en su

superficie. Se esperaría entonces que NPS40 no mostrara ésta banda debido a la excesiva acumulación de compuestos en la superficie que cubren al silicato, sin embargo, presentó mayor intensidad que NPS30, lo que podría estar relacionado con el proceso de descomposición de algunos compuestos impurificantes. La literatura indica que la descomposición del CaCO_3 inicia desde los 550°C para su estado amorfo y, en un rango contemplado entre 600 y 800°C , para sus fases cristalinas [203], [256]. Por otra parte, las bandas de los grupos fosfatos son más intensas y marcadas (estrechas) para NPS20, señalando una predominancia de ortofosfatos que originan la HAp. Sin embargo, conforme se adicionan mayores concentraciones de calcio, bandas como la observada alrededor de 960 cm^{-1} para NPS30 y NPS40, tienden a reducir su intensidad o incluso a desaparecer [237]. Para NPS40 la ausencia de ésta banda y el surgimiento de otra banda ancha en la región contemplada entre 960 y 930 cm^{-1} indica un cambio en las especies de PO_4^{3-} formadas, resaltando la presencia de metafosfatos, comúnmente identificados en fosfato de calcio amorfo (ACP). Otra zona que permite identificar el tipo de especies predominantes en las NPs es la contemplada entre $880 - 770\text{ cm}^{-1}$. En este rango es posible identificar la presencia de CO_3^{2-} con la banda localizada en 845 cm^{-1} o la correspondiente a los Si-O-Si alrededor de 800 cm^{-1} . El cambio de intensidades (la relación de intensidades) entre estas bandas, claramente revela las especies predominantes en la superficie de las NPs; mientras que en NPS20 predominan los Si-O-Si, para NPS40 destaca aún más los CO_3^{2-} . Las bandas en 606 , 575 y 560 cm^{-1} asignadas a los PO_4^{3-} , revelan la formación de apatitas en la superficie de las NPs. Sin embargo, como se ha establecido anteriormente, las diversas concentraciones de CaNT forman distintas especies de fosfatos y CaCO_3 , requiriendo un análisis más detallado en la región contemplada entre 630 y 500 cm^{-1} . Usando el software Origin 8 fue posible la generación y substracción de la línea base en los espectros, así como la localización de los máximos, y la determinación del valor FWHM de las dos principales contribuciones del modo ν_4 de doblamiento antisimétrico, observadas aproximadamente en 604 y 565 cm^{-1} . De acuerdo a la literatura, el valor FWHM para la banda localizada alrededor de 604 cm^{-1} es de suma importancia, relacionándose directamente con el índice de cristalinidad de la apatita. Mientras más estrecha, mayor es el índice de cristalinidad [257]. El procesamiento de

datos en esta región resulta en el gráfico de la Figura 22 y, los valores de altura, localización del máximo y FWHM para la primera contribución de PO_4^{3-} en NPS20, NPS30 y NPS40 se presentan en la Tabla 6.

Las NPS20, además de presentar bandas de PO_4^{3-} , también presentan las correspondientes a los OH^- en 3570 , 1630 y 630 cm^{-1} , como reporta la literatura para la HAp [200]. Más aún, entre las bandas de PO_4^{3-} atribuidas a la HAp, la más intensa de las vibraciones ν_4 en NPS20 se localizó en 565 cm^{-1} (segunda contribución). Ésta banda puede integrar una contribución adicional, correspondiente a los HPO_4^{2-} , observada alrededor de 550 cm^{-1} [246], marcando un desplazamiento hacia menores números de onda, como se observa para NPS20. Éste desplazamiento se reconoce comunmente en la caracterización de HAp en etapas tempranas (nucleación y crecimiento) [200], [237]. Sin embargo, el carácter cristalino de NPS20 se determina a partir de los valores de altura y FWHM correspondientes a la primera contribución del modo ν_4 de doblamiento antisimétrico (máximo en 606 cm^{-1}) para NPS20, siendo de 0.070 y 14.04 , respectivamente. Se infiere que los cristalitas de apatita en NPS20 aún son pequeños y se encuentran en crecimiento (nanocristales), mostrando bandas anchas y algunas bandas débiles de CO_3^{2-} (lábilis) [200], [218].

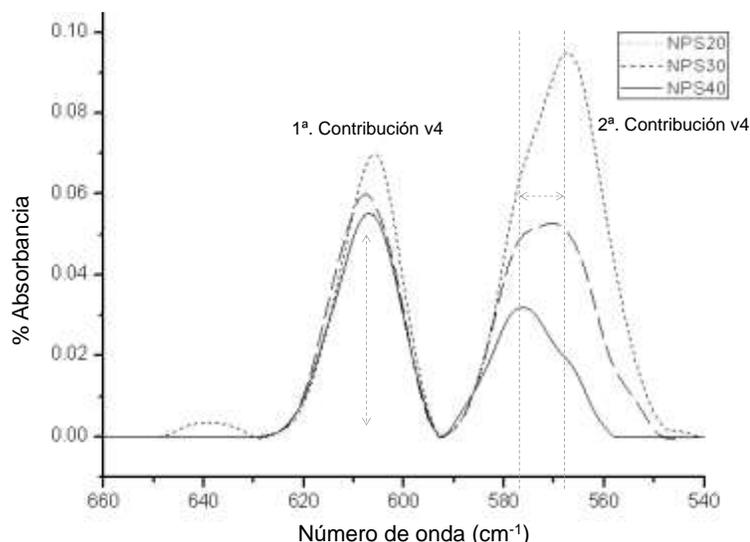


Figura 22. Substracción de línea base, determinación del máximo y el FWHM a partir de la primera contribución de ν_4 del PO_4^{3-} . Desplazamiento de la segunda contribución de ν_4 del PO_4^{3-} .

Tabla 6. Altura, posición del máximo y FWHM calculados a partir de la primera contribución v4 del PO_4^{3-} .

	Primera contribución del modo v4 PO_4^{3-}		
	Posición máximo	Altura	FWHM
NPS20	606	0.070	14.045
NPS30	608	0.060	15.814
NPS40	607	0.055	15.493

Para el caso de NPS40, se observa que su segunda contribución del modo vibracional v4, se desplaza hacia 575 cm^{-1} , fenómeno observado comúnmente en la formación de fosfato de calcio amorfo (ACP) [246]. Ésta banda también se relaciona con la banda ancha alrededor de 950 cm^{-1} correspondiente a los metafosfatos, confirmando una mayor coordinación de los iones PO_4^{3-} y el aumento de enlaces P-O-P [223]. La reducción en su altura y el incremento del valor FWHM, determinados a partir de la primera contribución del modo vibracional v4 (máximo en 607 cm^{-1}) para NPS40, 0.055 y 15.49, respectivamente, confirman la reducción en la cristalinidad de HAp formada en su superficie y el predominio de la porción amorfa. La segunda contribución del modo vibracional v4 de doblamiento antisimétrico para NPS30 se encuentra en 570 cm^{-1} , presentando un redondeo en su máximo, sugiriendo la formación de ACP [258]. Sin embargo, el ensanchamiento de ésta contribución en NPS30 y el desplazamiento de su máximo a un valor intermedio al mostrado por NPS20 y NPS40, se atribuye principalmente a la coexistencia de una porción amorfa y otra cristalina de la apatita. Los valores de altura y FWHM para la primera contribución del modo vibracional v4 en NPS30 (con máximo en 608 cm^{-1}), son respectivamente 0.060 y 15.81. De los resultados obtenidos, se deduce que la reducción gradual en la altura de la primera contribución del modo vibracional v4, y el desplazamiento de la segunda hacia mayores números de onda, confirman la reducción en la cristalinidad de la apatita formada en la superficie de las NPs incrementando la adición de CaNT en la preparación, como se observa en el gráfico de la Figura 22. Además, siendo el valor FWHM inversamente proporcional al tamaño del cristalito, se determinó que NPS20 presentó el cristalito más grande, mientras que los valores para NPS30 y NPS40

estuvieron muy próximos (15.81 y 15.49, respectivamente). El ligero incremento de FWHM para NPS40, respecto a NPS30, podría relacionarse con un carácter ligeramente más cristalino y su mayor concentración de ACP en su superficie, favoreciendo la nucleación de apatitas cristalinas. La identificación de ACP en las NPs coincide con las investigaciones realizadas anteriormente, mencionando que la fase amorfa es propicia para la nucleación y crecimiento de apatitas cristalinas [259]–[261].

5.1.4 Estudio microestructural DRX

Los patrones de difracción de las NPs de vidrio bioactivo se presentan en la Figura 23. En el difractograma correspondiente a NPS20, se observó una banda ancha entre 15 y 37° 2 θ , centrada alrededor de los 22° 2 θ , característica particular de un silicato amorfo [74], [75], [234], [262]. Pero también presentó reflexiones anchas y de baja intensidad en 25.73, 31.94, 32.83, 34.00, 39.85, 46.80, 49.43, 53.28 y 64.01 siendo indexados con la carta JCPDS 09-0432 de la HAp hexagonal.

A pesar de observar la banda ancha de la porción amorfa en las tres muestras, se identificó una reducción de su intensidad conforme se adicionan mayores concentraciones de CaNT, sugiriendo un incremento en la cristalinidad de las NPs. Además, reflexiones adicionales y apenas perceptibles se observaron para NPS30 en 21.84, 29.25 y 55.93° 2 θ . La primera y tercera coinciden con las referidas en la carta JCPDS 33-0268 para CaCO₃ en fase vaterita. La segunda coincide con lo reportado en la carta JCPDS 85-1108 para la reflexión de mayor intensidad en el CaCO₃ tipo calcita. El surgimiento de bandas adicionales correspondientes a los polimorfos del CaCO₃ también se observaron para NPS40. La banda principal de la calcita en 29.25° 2 θ se intensifica, mientras que aparecen otras dos reflexiones en 35.92 y 39.58° 2 θ , confirmando la presencia de ésta fase cristalina. Además, surgen otras reflexiones en 24.90, 27.10, 32.90, 43.96 y 50.05 ° 2 θ originadas por la vaterita.

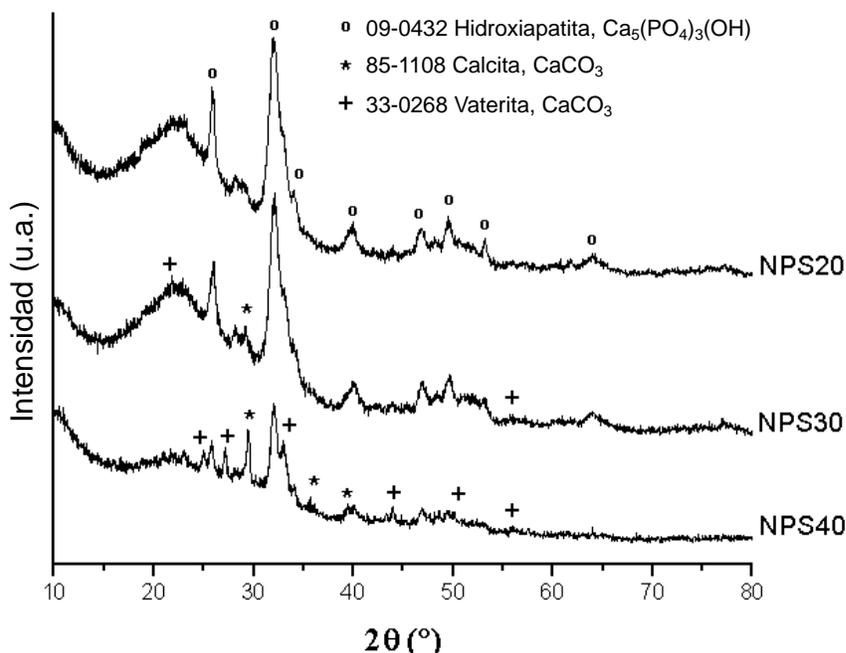


Figura 23. Perfiles DRX obtenidos para NPS20, NPS30 y NPS40.

A través del refinamiento Rietveld se evalúa la estructura cristalina de la apatita obtenida en cada caso, usando como referencia los datos reportados en la ficha CIF 9911091 de la HAp hexagonal. La estructura pertenece al grupo P 63m y presenta los siguientes parámetros de red: $a = 9.421 \text{ \AA}$ y $c = 6.88 \text{ \AA}$. Los resultados del refinamiento Rietveld se presentan en la Tabla 7. Los valores de χ^2 fueron menores a 3, considerando un ajuste adecuado de los difractogramas. Sin embargo, se identificó una diferencia en los valores de parámetros de red obtenidos por refinamiento con los reportados en la ficha CIF. El valor del parámetro c se mantiene casi constante en las tres muestras. Mientras que el parámetro a de NPS20 presenta una contracción de 0.04%, NPS30 y NPS40 presentan contracción del 0.47 y 0.71%, respectivamente. Adicionalmente, los difractogramas fueron procesados con el software OriginPro 8 para normalizar los datos, crear y abstraer la línea base, así como para determinar la intensidad de los picos y posición exacta del máximo correspondiente a la reflexión 002 de la apatita. Las intensidades de la reflexión 002 correspondiente a la HAp para NPS20, NPS30 y NPS40 fueron 0.189, 0.180 y 0.087 respectivamente; los máximos para NPS20 y NPS40 se localizaron en $25.83^\circ 2\theta$, mientras que el máximo para NPS30 se ubicó en $26^\circ 2\theta$.

Tabla 7. Parámetros de red y medio ancho del pico (FWHM) obtenidos por refinamiento Rietveld a partir de la hidroxiapatita 09-0432.

	Ajuste máximo	Parámetros de red		FWHM
	χ^2	a = b (Å)	c (Å)	W
NPS20	1.95	9.417	6.887	0.444
NPS30	1.50	9.376	6.885	0.521
NPS40	2.55	9.354	6.887	0.219

Los resultados obtenidos del análisis DRX revelan un incremento en la cristalinidad de las NPS, así como la formación de diferentes fases conforme se adicionan mayores concentraciones de CaNT. A pesar de realizarse un proceso de lavado (eliminación de iones residuales) y el tratamiento térmico (difusión de iones), la excesiva concentraciones de iones Ca^{2+} en la superficie genera las condiciones óptimas para la nucleación y crecimiento de fases cristalinas. Una investigación señala que el incremento en el tamaño de partícula y la reducción del área superficial limitan los procesos de difusión de calcio en la matriz vítrea, acumulándose principalmente en la superficie y formando compuestos de calcio. Por lo que, es posible obtener partículas más pequeñas con mayor contenido en calcio, difundido a su interior [263]. Si bien, la formación de CaCO_3 se ha identificado en la producción de silicatos con elevadas concentraciones de Ca^{2+} [196], [197], su formación no es exclusiva solo del ambiente químico del silicato, también tiene una relación estrecha con los fosfatos de la formulación. Considerando el proceso de bioactividad de las NPs, una vez que inician su disolución, se forma la capa de ácido silícico (gel), donde precipitan los iones Ca^{2+} y PO_4^{3-} , generando una capa de ACP [264]. Éste es termodinámicamente inestable y tiende a transformarse rápidamente en cristal [265]. La nucleación y crecimiento de cristalitos HAp es consecuencia del reordenamiento atómico de la porción amorfa y se identifica a través de picos anchos y de baja intensidad (débiles) en los difractogramas [266], tal como se observa para NPS20. También se ha mencionado que la nucleación de HAp en la superficie de las NPs puede originarse debido a la movilidad de iones durante el tratamiento térmico y se incrementa debido al área superficial específica de las NPs [212]. La incorporación de CO_3^{2-} se ha reportado en la producción de NPs de apatita sintetizadas con citrato, identificado además una asociación de los iones con la

capa superficial desordenada de los nanocristalitos de HAp [267]. Se puede inferir que al incrementarse la concentración de Ca^{2+} , se genera una competencia entre los grupos CO_3^{2-} y PO_4^{3-} para enlazarse a estos cationes [268], formando no solo ACP, también CaCO_3 amorfo (ACC). Algunas investigaciones también señalan que la integración de CO_3^{2-} en ACP es una estrategia comúnmente usada para estabilizar la fase amorfa y evitar su transformación a HCA, formando una capa de CaCO_3 amorfo (ACC) alrededor de los cristalitos e inhibiendo su crecimiento [237], [265]. Por lo tanto, el crecimiento de algunos polimorfos del CaCO_3 (calcita y vaterita) en NPS30 y NPS40 puede ser consecuencia del incremento en la formación de ACC en la superficie de las NPs. Si bien la finalidad de los VB es promover la formación de HAp de manera controlada, la generación de otras fases cristalinas impurificantes traerá un detrimento en el desempeño de éstos materiales. Algunos trabajos señalan que el incremento en la cristalinidad de los vidrios y la apatita reducirá su solubilidad y eficiencia bioactiva [212], [237], [269], [270].

Aún más, es preciso identificar la madurez de la apatita obtenida para predecir su comportamiento bioactivo. Éste parámetro denota el grado de transformación desde el dominio no-apatítico hasta el apatítico, es decir, desde su estado amorfo hasta un cristal estable [257]. La composición química y la estructura molecular proveerán información para determinar la madurez de la apatita obtenida para NPS20, NPS30 y NPS40. Por ejemplo, el espectro FTIR para NPS20 señala la presencia de HPO_4^{2-} para apatita en etapa temprana (nucleación y crecimiento), lo que no se observa en NPS30 y NPS40. Por otro lado, la información complementaria de DRX revela que la integración de CO_3^{2-} y la microestructura de las apatitas formadas en NPS30 y NPS40, corresponden a etapas avanzadas de maduración. La adición de mayores concentraciones de Ca^{2+} en estas muestras incrementa la inserción y difusión de CO_3^{2-} , formando otras fases (como el CaCO_3) y permitiendo la sustitución tipo A y B en apatita. Los resultados obtenidos del Refinamiento Rietveld muestran una reducción del parámetro **a**, sugiriendo una sustitución de PO_4^{3-} por CO_3^{2-} como se ha mostrado en otras investigaciones [200]. El cambio de valor en el parámetro “**a**” se ha propuesto como una estrategia en la determinación del porcentaje de CO_3^{2-} integrado a la red de

apatita [265]. Otros trabajos más mencionan que la síntesis química de apatita carbonatada tipo B (B-CAp) suele realizarse mediante precipitación en medio acuoso [200], [216], [218] indicando la viabilidad de su formación bajo las condiciones de síntesis química del vidrio bioactivo.

Los valores de intensidad y la posición del máximo en la reflexión 002 de la apatita se relacionan directamente con su índice de cristalinidad. Se observó que la intensidad del pico disminuye con mayores adiciones de CaNT en la formulación. Esta observación sugiere que la apatita presenta un mayor índice de cristalinidad en la concentración más baja de CaNT adicionada (NPS20). Para las muestras NPS30 y NPS40 la intensidad del pico y la cristalinidad de la apatita se reducen, sin embargo, la presencia de otras fases cristalinas también contribuyen en el carácter cristalino global (considerando todas las fases cristalinas presentes, HAp+CaCO₃) de las NPs. Es decir, que a pesar de observar una reducción en la cristalinidad de la apatita conforme se adiciona CaNT en las NPs, el carácter cristalino global realmente se incrementa, considerando la formación de otras fases (como CaCO₃). Además, la posición del máximo para NPS20 y NPS40 se encuentra en 25.83° 2θ coincidiendo con lo reportado para HAp, mientras que para NPS30 el máximo se observó en 26° 2θ. Algunos trabajos de investigación realizados en cementos de CaPO₄ señalan que el desplazamiento de la reflexión 002 de la HAp se debe a la presencia de algunas fases impurificantes como tricalcio fosfato (TCP) o la formación de ACP [271]. Se podría inferir que la concentración de iones Ca²⁺ en NPS20 permitirá la nucleación y crecimiento de la HAp, mientras que la concentración de cationes en NPS30 además de formar el HAp, también formará suficiente ACP, generando un ambiente propicio para la nucleación de CaCO₃ (calcita y vaterita). En NPS40 el incremento en cationes y la formación de mayor concentración de ACP promueven el crecimiento de los cristales de CaCO₃. Por lo tanto, la reducción de intensidad y el desplazamiento del pico 002 evidencian una vez más el efecto inhibitorio para el crecimiento y desarrollo de HAp reportado, causado por la formación de CaCO₃ [265] y coincidiendo con lo observado en el análisis de grupos funcionales FTIR.

5.1.5 Composición química

5.1.5.1 Espectroscopia fotoelectrónica de rayos X (XPS)

Se obtuvieron los espectro XPS para las NPs VB (NPS20, NPS30 y NPS40). Las principales señales en el espectro pertenecen a los constituyentes del vidrio (Si, Ca, P, O) y residuos carbonaceos. Se identificaron mediante espectros de alta resolución los picos de los niveles C 1s, Ca 2p, P 2p, O 1s y Si 2p para NPS20, NPS30 y NPS40, como se muestran en la Figura 24. Los espectros mostrados en el gráfico a) corresponden a C 1s para NPS20 (inferior), NPS30 (centro) y NPS40 (superior). Los espectros en b), c), d) y e) corresponden a Si 2p, P 2p, Ca 2p y O 1s, respectivamente. La deconvolución de espectros se presenta a través de una curva de ajuste (línea sólida) y las contribuciones de las diferentes especies químicas (lineas punteadas).

Los gráficos de a) correspondientes al C 1s presentan 4 principales picos, localizados en 282, 284.5, 286 y 288 eV atribuidos a los enlaces Metal-Carbono (carburos), C-C, C-O-C y O-C=O, respectivamente [272]–[274]. Adicionalmente, NPS30 y NPS40 presentan un pico apenas perceptible alrededor de 284.55 eV, indicando la formación de residuales carbonaceos [275], [276]. Los picos correspondientes a Si 2p en b), se localizan entre 101 y 105 eV, asignados a los distintos estados de oxidación intermedios del SiO₂. Se han reportado las posiciones de los picos en 101.2 eV para Si₂-Si-O₂ (estado de oxidación Si²⁺, Q²), en 102.5 eV para Si-Si-O₃ (estado de oxidación Si³⁺, Q³) y en 103.5 eV para Si-O₄ (estado de oxidación Si⁴⁺, Q⁴) [255], [277]–[279]. Adicionalmente, la literatura menciona que es posible observar algunos picos en el intervalo contemplado entre 104.5 y 105.2 eV en silicatos producidos mediante la técnica sol-gel, indicando un cambio estructural de los tetraedros silicio-oxígeno y un mayor grado de oxidación [280]. Otros estudios señalan que éstos picos se deben a la formación de silanoles Si-OH [254], [281]. En c) se observan los espectros del nivel P 2p, presentando 3 picos atribuidos al enlace P-O de fosfatos. Alrededor de 132.5 eV se observa el correspondiente a los grupos PO₄³⁻ no enlazados (NBO, Q⁰). Sin embargo, especies de fosfato como son PO₃²⁻ (Q¹) y PO₂²⁻ (Q²) también se muestran a través de picos alrededor de 133.5 y 134.5 eV, respectivamente [282]. El pico alrededor de 130 eV se atribuye a la presencia de P no

oxidado [279]. Los espectros del Ca 2p visibles en d) presentan tres picos correspondientes al calcio en su estado elemental y a sus dos componentes spin-orbital $2 p_{1/2}$ y $2 p_{3/2}$ (doblete), localizados alrededor de 345, 347 y 351 eV [283].

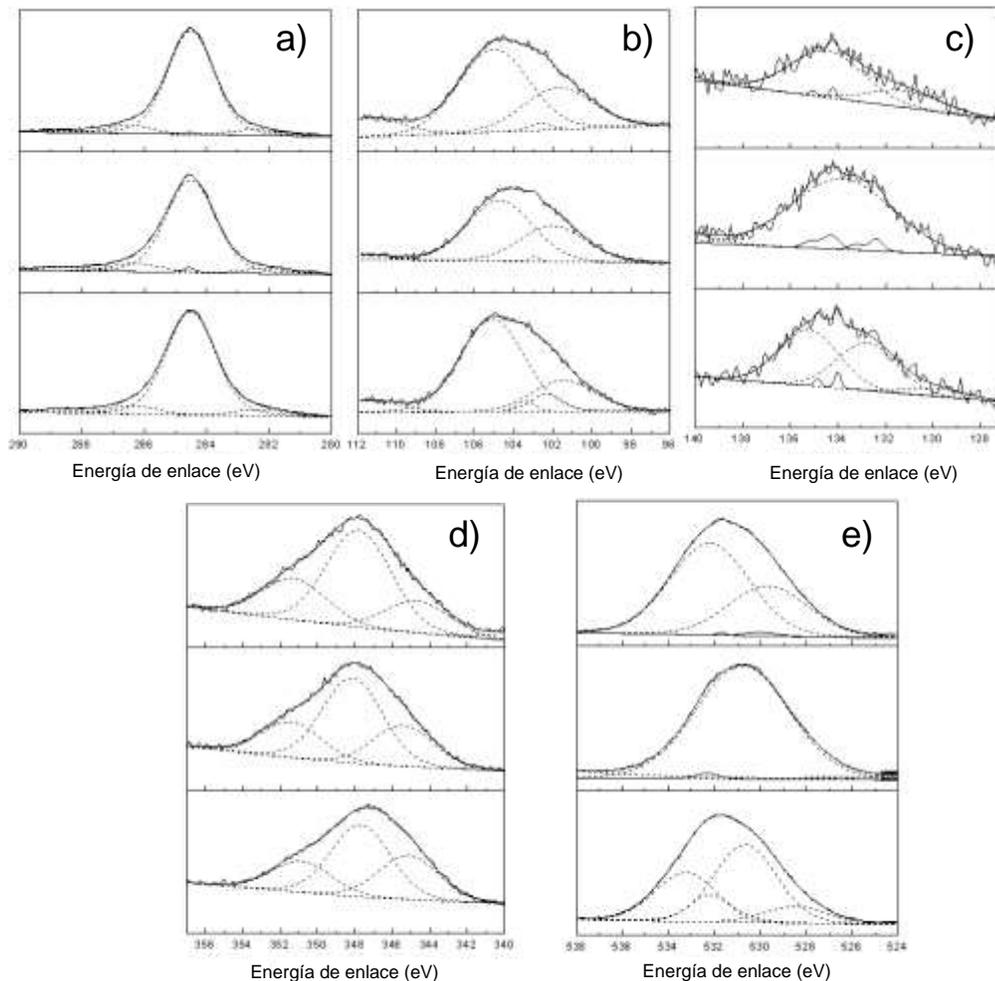


Figura 24. Deconvolución de pico para los niveles a) C 1s, b) Si 2p, c) P 2p, d) Ca 2p y e) O 1s correspondientes a NPS20 inferior, NPS30 central y NPS40 superior. La línea sólida es la tendencia y las líneas punteadas la deconvolución.

La presencia del oxígeno en la red vítrea del silicato y en los fosfatos, se analizó a través del nivel O 1s, presentado 3 picos en los espectros del inciso e). El primero se localiza alrededor de 530 eV atribuido principalmente a la formación de oxígenos no enlazados del silicato (Si-O-NBO) [255], [278], [283], [284] y fosfato (P-O-NBO) [255], [282]. Algunos estudios asignan también éste valor a la energía de enlace del Ca-O [285], [286], relacionándolo con la formación de CaO o algún fosfato en el

silicato, y su efecto de ruptura en la red de SiO₂. El pico localizado alrededor de 532 eV se asigna a la formación de oxígenos enlazado (Si-O-Si, BO) en la red vítrea [254], [255], [283], [284] y tiende a desplazarse hacia menores energías de enlace con mayor adición de modificadores de red [242]. Además, los enlaces P=O y C-O-H en 531.7 y 532.5 eV, respectivamente, se encuentran en las inmediaciones de éste pico y también pueden aportar a su intensidad [278], [279]. El pico de mayor energía de enlace es el localizado en 533.2 eV, observado en NPS20, podría relacionarse con los enlaces Si-OH, Ca-OH y P-O-P mencionados en la literatura. Los silanoles Si-OH suelen presentar un pico entre 532 y 533 eV [254], [284], mientras que el pico correspondiente al enlace Ca-OH de la HAp se observa en el rango contemplado entre 532.5 y 533.5 eV [285], [287]. Otros estudios reportan también un pico alrededor de 533 eV, asignado al enlace P-O-P [255], [282]. La localización de los picos obtenidos en el proceso de deconvolución y su área bajo la curva se presentan en la Tabla 8.

Los residuos carbonaceos presentes en las NPs de vidrio bioactivo resultan de la descomposición térmica de algunos precursores orgánicos como el TEOS, el ácido cítrico, PEG, etc. utilizados en la síntesis química; pero también de la adsorción de compuestos atmosféricos como el CO₂. Los hidrocarburos, carboxilatos y carbonatos son mencionados comúnmente como impurificantes en silicatos y fosfatos de calcio, tanto sintéticos como naturales [29-31, 114-115][198], [199], [288], [289]. Es de notar que las diferentes especies de carbono observados a través del nivel O 1s como carburos, C-C, C-O-C y O-C=O presentan su mayor concentración para NPS20 y la menor para NPS40. Lo que puede relacionarse con su grado de dispersión, el área superficial y los compuestos adicionales (fosfatos y carbonatos de calcio) formados en la superficie de las NPs, tal como lo sugieren los análisis DLS y FTIR. La baja concentración de calcio adicionada en NPS20, evita la excesiva formación de ACP y la saturación superficial con otros compuestos, así como la generación de NPs de tamaños más homogéneos (estrecha distribución de diámetro hidrodinámico), evitando cambios drásticos en su carga eléctrica superficial y reduciendo los efectos de aglomeración.

Tabla 8. Parámetros obtenidos de la deconvolución en cada nivel de NPS20, NPS30 y NP40. Pico (energía de enlace, eV) y área bajo la curva. N.A. (No aplica, igual a cero).

C 1s										
Especie	Metal-C, carburo		C-C, C-H		Carbono Residual		C-O-C, C-O-H		O-C=O	
Parámetro	Pico	Área	Pico	Área	Pico	Área	Pico	Área	Pico	Área
NPS20	282.25	723.79	284.5	10871.3	N.A.	N.A.	286.35	900.6	288.56	374.88
NPS30	282.08	510.58	284.5	9742.5	284.56	148.57	286.28	876.57	288.56	369.54
NPS40	282.44	479.77	284.5	8885.5	284.52	56.86	286.47	693.57	288.46	196.26
Si 2p										
Especie	Q ³ Si-O ₂ -		Q ³ Si-O-		Q ⁴ SiO ₂		Si-OH			
Parámetro	Pico	Área	Pico	Área	Pico	Área	Pico	Área		
NPS20	101.45	1159.88	102.29	353.07	103.38	134.6	105.08	3434.83		
NPS30	101.99	1643.02	102.92	39.87	N.A.	N.A.	104.71	2790.98		
NPS40	101.71	2402.56	102.61	138.87	N.A.	N.A.	105.01	4773.28		
P 2p										
Especie	Si-P, P-C		PO ₄ ³⁻ , Q ⁰ , NBO		PO ₃ ²⁻ , Q ¹ , P 2p 3/2		PO ₂ , Q ² , P 2p 1/2			
Parámetro	Pico	Área	Pico	Área	Pico	Área	Pico	Área		
NPS20	129.64	92.9	132.48	541.72	133.98	30.85	134.92	637.14		
NPS30	N.A.	N.A.	132.36	47.85	133.53	1352.5	134.26	63.46		
NPS40	130.89	183.64	N.A.	N.A.	134.15	514.21	134.18	18.51		
Ca 2p										
Especie	Ca ²⁺		Ca 2p 3/2		Ca 2p 1/2					
Parámetro	Pico	Área	Pico	Área	Pico	Área				
NPS20	344.66	2463.69	347.79	7565.26	351.25	3213.65				
NPS30	345.13	4427.29	347.68	7209.45	350.87	3140.03				
NPS40	345.4	3568.21	348.13	7411.53	351.4	3089.16				
O 1s										
Especie	Si-O-NBO, Ca-O-, C=O, P-O		BO, Si-O-Si, (C, P)-OH		Si-OH, Ca-OH, P-O-P					
Parámetro	Pico	Área	Pico	Área	Pico	Área				
NPS20	530.62	23767.8	532.19	5480.46	533.23	14881.1				
NPS30	530.75	50863.4	532.28	645.2	N.A.	N.A.				
NPS40	529.65	19327.2	531.68	163.04	N.A.	N.A.				
	529.95	599.53	532.19	35338.8	N.A.	N.A.				

Estudios previos revelan que la adición de bajas concentraciones de calcio en la síntesis de silicatos, permite su distribución homogénea en la superficie, así como la descomposición de otros compuestos de calcio (CaCO₃) a menores temperaturas. Por otro lado, el incremento en su concentración, provoca su acumulación en la superficie, formando compuestos de calcio, recubriendo la matriz de SiO₂ e incrementando la temperatura para su descomposición [196]. Esto claramente explica la relación entre la alta área superficial de NPS20 y la ausencia de carbono libre en su estructura. Por otro lado, a través de FTIR y DRX, se confirma la formación y el incremento en la concentración de fosfatos y carbonatos de calcio superficiales en NPS30 y NPS40, generando el efecto aglomerante de las NPs. Además, se confirma la presencia de

carbono grafítico para NPS30 y NPS40 a través del pico apenas perceptible localizado alrededor de 284.6 eV. Se esperaría una mayor concentración de carbono grafítico en NPS40 debido a la mayor concentración de calcio adicionada en la formulación y la coloración oscura en NPS40, pero no fue el caso. NPS30 resultó con mayor concentración de carbono grafítico en la zona analizada (superficie), sugiriendo que la reducción en la concentración de carbono grafítico para NPS40 resulta principalmente por los efectos de aglomeración y reducción del área superficial. Los fosfatos y carbonatos de calcio precipitados en la superficie de NPS40 promueven la aglomeración de partículas primarias y secundarias, generando mayores porosidades (poros secundarios), manteniendo cautivo al carbono en el interior de los poros primarios, evitando su descomposición y liberación completa durante el tratamiento térmico. Un trabajo de investigación menciona que las partículas de silicato de calcio, producidas con bajas concentraciones de calcio, a través del método sol-gel, mantuvieron altas áreas superficiales (aprox. 500 m²/g), observando su reducción cuando se adicionaron mayores concentraciones de calcio [196]. Mientras que bajas concentraciones de calcio mantuvieron una estrecha distribución en el tamaño de poro del silicato (poros primarios), el incremento de calcio la amplió (formación de poros secundarios) [196]. Aún más, el incremento de calcio en la formulación sol-gel puede generar la segregación de fases y la modificación de las propiedades superficiales del silicato, incrementando su aglomeración. De acuerdo a los análisis FTIR y DRX se considera que la concentración de fosfatos y carbonatos superficiales en NPS30 es mayor a NPS20, y menor a NPS40, por lo que su aglomeración y formación de poros será limitada (poros secundarios). La combinancia de poros primarios y secundarios más abiertos en NPS30 mantienen a los residuos orgánicos más expuestos en la superficie, permitiendo su descomposición y su posterior liberación. Sin embargo, debido al efecto aglomerante de las NPS30, una proporción de los poros primarios se cierran, evitando la expulsión de los gases de descomposición y formando el grafito en su interior. Este fenómeno explica la coloración grisacea de las NPS30. Cabe señalar que la técnica XPS es una técnica de análisis superficial, por lo que la concentración de carbono grafítico detectado a través de esta técnica se limita a detectar la porción superficial principalmente y no la porción atrapada al interior de los poros, esto podría explicar la

reducción en la concentración de carbono gráfico en NPS40 a pesar de mostrar la coloración más oscura. Sin embargo, a través de los resultados FT-IR se confirma la elevada concentración de carbono en NPS40.

La unidad estructural fundamental del dióxido de silicio consiste de un átomo de silicio, rodeado por cuatro átomos de oxígeno, dispuestos en forma tetraédrica. Las fuerzas que mantienen unidos a estos átomos comprenden enlaces iónicos y covalentes. En un vidrio, los tetraedros se unen a través de sus vértices, formando enlaces Si-O-Si (BO, enlazados a través de oxígeno), sin orientación determinada; la distancia de separación entre los átomos de Si y O no es homogénea, las unidades tetraédricas no se repiten con regularidad y el compuesto está desordenado [290]. El grado de conectividad de la red vítrea (polimerización) se determina mediante el promedio de oxígenos enlazados (BO) a dos tetraedros de SiO_4 . Los oxígenos que no se enlazan a los poliedros se denominan oxígenos no enlazados (NBO). Por lo tanto, cinco variantes del óxido de silicio conforman la estructura de corto alcance en la estructura vítrea de los silicatos, identificados como Q^n ($n = 0$ a 4), donde Q representa la unidad tetraédrica de Si y “n” es el número de BO por tetraedro [255], [279]. Por ejemplo, la configuración Q^3 se encuentra rodeada por tres oxígenos enlazados (BO) a tetraedros y uno no enlazado [254]. En estado vítreo pueden coexistir las diferentes formas del óxido de silicio, uniéndose a través de los BO y formando la red. Las especies de óxido predominantes determinaran el grado de polimerización o conectividad, así como sus propiedades fisicoquímicas y texturales [255], [277]. Por ejemplo, los vidrios producidos por la técnica de fusión-enfriamiento generalmente producen especies predominantes Q^1 , Q^2 y Q^3 , formando estructuras tipo cadena, mientras que los producidos por sol-gel podrían originar especies Q^2 , Q^3 y Q^4 resultando en estructuras cíclicas. Éstas características, además de resaltar el mayor grado de conectividad para los vidrios producidos por sol-gel, también describen las razones por las que se atribuyen propiedades como una mayor porosidad y área superficial específica, mejorando la solubilidad [291]. De acuerdo a estudios previos, la energía de enlace del SiO_2 en Si 2p es afectado por el número de átomos de oxígeno enlazados (BO) o no enlazados (NBO) al átomo central de silicio. A mayor número de átomos de oxígeno no enlazados, mayor es la densidad electrónica sobre éste y menor energía de enlace

en el pico espectral [255], [277], [278]. Los resultados muestran que las especies Q^2 y Q^3 se presentan en las tres formulaciones de NPs, mientras que la Q^4 solo se observa para NPS20. Además, NPS40 tiene la mayor concentración de Q^2 y NPS20 tiene la mayor concentración de Q^3 , sugiriendo que la baja concentración de calcio adicionada en la formulación genera una red vítrea más conectada. Éste resultado coincide con algunos trabajos de investigación, reportando un desplazamiento del pico Si 2p hacia mayores energías de enlace cuando se incrementa el grado de oxidación [242], [280], [284]. Además, coincide con lo mencionado en los análisis de resonancia magnética nuclear en estado sólido (^{29}Si) (NRM), realizados a partículas de silicato de calcio, producidas por sol-gel. En éste, también se reporta una reducción de las especies Q^4 , conforme se adicionan mayores concentraciones de calcio [263]. El pico localizado en 105.08 eV para NPS20 se atribuye a los grupos silanoles (Si-OH) presentes en el silicato, tal como lo reportan en la investigación de geles de óxido de silicio envejecido [254], [292], mientras que el pico en 105.01 eV de NPS40 podría estar más relacionado con la interacción del SiO_2 y los átomos de carbono, por ejemplo, se han reportado un pico alrededor de 104.9 eV correspondiente al grafeno sobre SiO_2 [293]. El pico de NPS30 en 104.7 eV también podría atribuirse al ambiente químico generado por algunos impurificantes, mencionados anteriormente como el fosfato de calcio amorfo que contiene silicio, presentando un pico alrededor de 104.4 eV [294].

Se han sintetizado vidrios de fosfato, aprovechando no solo su forma molecular tetraédrica, también la capacidad de unirse entre sí bajo ciertas condiciones, formando estructuras vítreas muy parecidas a las de los silicatos amorfos. En el caso del pentóxido de fósforo (P_2O_5), existen tres tetraédros enlazados (tres átomos de oxígeno covalentemente enlazados al tetraedro de fosfato, P_2O_5), dejando, un oxígeno terminal (P=O) presente en la red. De manera análoga a la clasificación de los oxígenos enlazados (BO) en los silicatos, el tetraedro fundamental del P_2O_5 se especifica como Q^3 . Cuando existe una depolimerización de la red de fosfatos (P-O-P), se reducen los BO y forman especies Q^2 (tetraedros de fosfato compartiendo dos átomos de oxígeno) formando largas cadenas, conocidos como metafosfatos. Reduciendo aún más los BO, se generan cadenas de menor longitud, por ejemplo en Q^1 dímeros (pirofosfatos) y Q^0

monómeros (ortofosfatos) [295], [296]. Sin embargo, también existen evidencias acerca del rol de los grupos fosfato como modificadores de red vítrea en silicatos [255]. Se considera que en baja concentración de fosfatos, el fósforo se encuentra en ambientes tipo ortofosfato (Q^0) y, junto con algunos pirofosfatos (Q^1), forman fases separadas en la red de óxido de silicio. La susceptibilidad a la separación de fases durante la síntesis química, también se observa generalmente en los vidrios bioactivos de silicato [255]. Además, la cristalización se presenta como consecuencia de la separación de fases en la estructura de los vidrios bioactivos producidos mediante la técnica sol-gel, siendo favorecida en un ambiente acuoso durante su síntesis [297], [298]. Algunos estudios previos que han sintetizado vidrios bioactivos mediante esta técnica, han encontrado fases cristalinas de fosfatos como $Ca_5(PO_4)_2SiO_4$ [299], $Ca_5(PO_4)_3OH$ (HAp) [297] o $NaCaPO_4$ [300]. Su presencia se debe principalmente al uso de diferentes parámetros de proceso térmico (por ejemplo, velocidad de calentamiento, duración del tratamiento térmico y rango de temperatura) o a los parámetros de síntesis sol-gel (por ejemplo, tipo y concentración de precursores, catalizador) [255]. Los espectros de alta resolución para el P 2p, presentan picos del fósforo en diversos ambientes químicos. En el caso de NPS20, el primer pico se encuentra en 129.6 eV, señalando la presencia de fósforo no oxidado, reportado en la caracterización de SiO_2 amorfo impurificado con estos iones (formando enlaces Si-P, incorporados a la matriz vítrea de manera sustitucional o intersticial) [279], [301]. El pico en NPS40 se desplaza hacia 130.8 eV y puede estar relacionado con la formación de enlaces P-C, identificados durante el crecimiento de $CaCO_3$ en fosfatos [268], [302]. Esta observación coincide con los resultados DRX, identificando la presencia de fases cristalinas de $CaCO_3$ para NPS40. Además, son reportados otros picos característicos del estado oxidado del fósforo (PO_4^{3-}), entre ellos los localizados alrededor de 132.5, 133.5 y 134.5 eV que corresponden a las especies Q^0 , Q^1 y Q^2 , respectivamente [282]. Los espectros obtenidos para NPS20, NPS30 y NPS40 presentan picos aproximados a los reportados, mostrando unos ligeros desplazamientos debido a los diferentes ambientes químicos. Por ejemplo, NPS20 y NPS30 presentan los tres picos característicos de las especies de óxidos: un pico de los fosfatos no enlazados (NBO, Q^0) y un doblete debido a los enlazados (BO, Q^1 y Q^2). La mayor concentración de

ortofosfatos (Q^0) en NPS20 evidencia su rol como modificador de red en el vidrio, mientras que la presencia de especies enlazadas (Q^1 y Q^2) se relaciona con la formación de otros compuestos como la HAp y ACP en el silicato (segregación de fases). La alta concentración de ortofosfatos en NPS20 coincide con los resultados FTIR, identificando fosfatos reactivos (fosfatos ácidos) capaces de enlazarse a la matriz vítrea o a los iones Ca^{2+} . Los trabajos de investigación anteriormente realizados reportan la localización del doblete P $2p_{3/2}$ y P $2p_{1/2}$, correspondiente a los grupos PO_4^{3-} de la HAp pura, en 134.13 y 133.18 eV, respectivamente, manteniendo una separación de 0.9 eV [272], [303], [304]. NPS20 presenta ambos picos localizados ligeramente a mayores BE (134.92 y 133.98 eV), atribuido a la presencia del silicato y otras fases; sin embargo, la separación de ambos picos cumple con lo establecido (0.9 eV). Se ha reportado el pico correspondiente al enlace Ca-O-P en 133.8 eV [305]. Otra razón para el desplazamiento a mayores energías de enlace de estas componentes puede ser la formación de P_2O_5 , interactuando con los PO_4^{3-} de la HAp. Las investigaciones reportan que la banda característica del P_2O_5 se localiza entre 134.3 y 135.3 eV [279], [287], [306]. Es preciso mencionar que NPS20 no solo presenta la mayor concentración de ortofosfatos, también de fosfatos con mayor polimerización, señalando una eficiencia para su integración en la matriz del silicato, creando además las condiciones óptimas para la nucleación de HAp y reduciendo la excesiva formación de especies intermedias (piro y metafosfatos). El incremento de calcio en la preparación de NPS30 reduce la concentración de ortofosfatos e incrementa los pirofosfatos y metafosfatos, generando un exceso de ACP en el silicato. Estos resultados coinciden plenamente con los de FTIR mencionando a los metafosfatos como evidencia de la acumulación de ACP. La diferencia del doblete P $2p_{3/2}$ y P $2p_{1/2}$ en NPS30 es de 0.73 eV y el desplazamiento de su primer componente a menores energías de enlace (133.53 eV) podrían estar relacionados con un incremento en la porción amorfa del fosfato (ACP) (reducción de su cristalinidad) [272], [307]. El desplazamiento del pico P $2p_{3/2}$ hacia mayores energías de enlace (134.1 eV) en NPS40 se discute en algunos trabajos de investigación y la atribuyen a la presencia de apatita carbonatada [294]. Otras investigaciones además aportan que la energía de enlace P-O-C generalmente presenta un pico alrededor de 134.3 eV [308]. Este resultado confirma la incorporación de CO_3^{2-}

en NPS40, así como la formación de ACP carbonatado y CaCO_3 , coincidiendo con lo analizado en DRX y FTIR.

Los silicatos bioactivos presentan una estructura abierta viable para la inserción de cationes alcalinos y alcalinotérreos. Estos modificadores de red (como el Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , etc.) provocan la disrupción de la red vítrea de SiO_2 , evitando la continuidad de los enlaces Si-O-Si (BO) y generando oxígenos no enlazados (Si-O-NBO) [309]. El papel de los modificadores de red es de suma importancia en los vidrios bioactivos. Regulando la concentración de grupos Si-O-NBO y silanoles en en la superficie de los VB, se puede ofrecer una estrategia viable para controlar la velocidad de su disolución [310]–[312]. Algunos trabajos de investigación afirman que la solubilidad incrementa cuando se reduce la interconectividad de la red vítrea “en bulto”, resaltando la relación entre la estructura del silicato y su bioactividad [255]. Los espectros del Ca 2p presentan tres picos, uno correspondiente al estado elemental y dos al splitting spin-orbital (Ca $2p_{3/2}$ y Ca $2p_{1/2}$). El primer pico del estado elemental para NPS20 se localiza en 344.6 eV y puede originarse al ambiente químico del catión cuando se integra a la matriz del silicato. Sin embargo, para NPS30 y NPS40 se observa que el pico del estado elemental se desplaza hacia 345 eV, tal como se menciona en investigaciones anteriores, a través del análisis de fosfatos de calcio como la HAp [313]. La localización del doblete Ca 2p reportada en vidrios bioactivos del sistema $\text{SiO}_2\text{-Na}_2\text{O-CaO-P}_2\text{O}_5$ y desarrollados por la técnica fusión-enfriamiento se encuentra en 346 y 350 eV [278], coincidiendo con lo mencionado para silicatos de calcio [283]. Sin embargo, NPS20 presenta el doblete en 347.7 y 351.2 eV, valores cercanos a los reportados para la HAp creciendo en la superficie del VB después de permanecer sumergido en SBF [278], [287], [304], [314]. Se ha reportado el pico correspondiente al enlace Ca-O-P en 347.2 eV [305]. Además, la separación del doblete en NPS20 es de 3.46 eV, muy cercano al valor de 3.5 eV, reportado para la HAp [278], [289]. NPS20 también presentó los máximos valores del área bajo la curva para el doblete, sugiriendo que la concentración máxima de HAp se debe a su incrementada área superficial. Se considera que al ser XPS una técnica de análisis superficial, identificará prioritariamente a los compuestos de calcio que se han formado y precipitado en la superficie de las NPs y

en menor proporción al silicato recubierto. El desplazamiento de los picos Ca 2p_{1/2} (350.8 eV) en NPS30 y Ca 2p_{3/2} (348.1 eV) en NPS40, así como la reducción en la separación del doblete (3.19 y 3.27, respectivamente) sugieren un cambio en las especies formadas en la superficie de las NPs. En algunos trabajos mencionan que el desplazamiento del doble Ca 2p_{1/2} y Ca 2p_{3/2} hacia menores energías de enlace sugiere una reducción en la cristalinidad del fosfato de calcio formado [315], [316]. Un estudio más señala que el desplazamiento del pico Ca 2p_{1/2} (NPS30) hacia 350 eV se atribuye a la presencia en mezcla de fosfatos de calcio/HAp y a una reducción en su cristalinidad, mientras que el desplazamiento de Ca 2p_{3/2} (NPS40) hacia 348 eV sugiere la formación de apatita carbonatada y CaCO₃ [272], [278], [317].

El oxígeno cumple un rol importante en el desarrollo de los silicatos debido a su función enlazante entre los átomos de silicio y los modificadores de red. NPS20 presenta 3 picos localizados en 530.6, 532.1 y 533.2 eV, los dos primeros corresponden al oxígeno enlazado y no enlazado en la red de SiO₂, comúnmente reportados en la identificación de los silicatos de calcio [283]. El tercer pico, siendo el de mayor energía de enlace en éste nivel, sugiere la presencia de hidróxidos como son el Si-OH y Ca-OH. Algunos estudios mencionan que los 3 picos observados en NPS20 señalan la presencia de CaO expuesto a H₂O [318] y a grupos silanoles superficiales sobre SiO₂ [254], confirmando la presencia de especies reactivas de calcio y su integración en la red vítrea (formación del silicato). Otro estudio también menciona que el pico alrededor de 533.2 eV, se atribuye a los enlaces formados por el calcio y fósforo, mencionando por ejemplo Ca-O-P [305]. Otro más menciona que la formación del enlace P-O-P (fosfatos enlazados) se identifica con un pico entre 533 y 534 eV, que junto con el pico de 532 eV (NBO), indican la formación del P₂O₅ en el silicato [279], [282], [306]. El estudio del nivel O 1s para la mezcla vidrio bioactivo/fosfatos de calcio es compleja debido a que los enlaces formados por carbonatos, hidróxidos y fosfatos presentan picos próximos en el rango contemplado entre 530 y 532 eV. Sin embargo, es posible deducir los grupos funcionales y elementos predominantes en cada muestra complementando la información con las otras técnicas de caracterización (FTIR y DRX). Se infiere que NPS20 se conforma principalmente de silicatos no enlazados,

característica principal de los vidrios, pero también presenta señales de especies enlazadas características de siloxanos (Si-O-Si) y fosfatos de calcio como la hidroxiapatita. Los resultados sugieren que NPS20 mantiene la superficie del silicato expuesta, permitiendo la identificación de sus componentes, mostrando señales de las especies hidroxiladas (Si-OH y Ca-OH) en su superficie. Sin embargo, también es reconocible la formación de HAp sobre el silicato, seguramente en etapa temprana de nucleación y crecimiento. Por otro lado, NPS30 presenta dos picos, correspondientes a las especies enlazadas y no enlazadas del silicato alrededor de 530 y 532 eV. El incremento sustancial en la concentración de las especies no enlazadas en NPS30 se atribuye no solo a la apertura de la red vítrea, por el incremento en la concentración del modificador, también puede originarse como consecuencia de la excesiva generación de fosfatos de calcio amorfo. A pesar de reconocer el rango de energía de enlace (530 – 532 eV) que pueden cubrir los grupos PO_4^{3-} en el espectro XPS de acuerdo a la literatura, se infiere que los fosfatos amorfos presentan las energías de enlace más bajas (aprox. 530 eV) y, conforme se genera el reordenamiento atómico, incrementan su energía de enlace, como en la HAp (532 eV). El incremento de la energía de enlace, conforme se ordena la estructura, también se observó para el nivel Si 2p en la generación de las diversas especies (Q^1 , Q^2 , Q^3 y Q^4) y el desarrollo de la red vítrea [255], [277], [278], así como en el nivel Ca 2p para diferenciar entre los diversos tipos de fosfatos de calcio [272], [278], [317]. Además, el pico de los hidroxilos no se observa en NPS30, sugiriendo la saturación de la superficie del silicato con el fosfato de calcio amorfo precipitado. Mientras que NPS40 revela 4 picos, 2 en la región de especies enlazadas y dos más en la región de no enlazadas. Éste hallazgo se relaciona con la formación de compuestos impurificantes debido a la excesiva concentración de calcio y la segregación de fases. Se considera que los picos en 529.65 y 531.68 eV corresponden al silicato, mientras que 529.65 y 532.19 a los fosfatos de calcio. La asignación de picos al silicato y fosfato de calcio en NPS40 coincide con lo mencionado en la literatura. Un estudio señala que es posible la formación de fases impurificantes como la portlandita $\text{Ca}(\text{OH})_2$, durante la síntesis química de silicatos con altas concentraciones de calcio, identificándola mediante dos picos del espectro XPS; uno alrededor de 530 eV y otro en 531.6 eV [283]. Sin embargo, debido a la presencia de

fósforo en las NPs VB no es posible tener portlandita, en su lugar se formarían fosfatos de calcio cristalino como la HAp. Los picos correspondientes a fosfatos de calcio se reportan a mayores BE, alrededor de 530.5 y 532.5 eV [319]. Además, se observa que el pico de las especies no enlazadas en el silicato (529.65 eV) tiene mayor área bajo la curva, resaltando la presencia de los modificadores de red y su efecto depolimerizante sobre la red vítrea. Mientras que el pico en 532.19 eV asignada a los fosfatos enlazados destaca su predominancia y afinidad química por el calcio, formando otros compuestos en la superficie de las NPs. Aún cuando los resultado DRX identifican fases cristalinas del CaCO_3 (calcita y vaterita) para NPS40, se infiere que la abundancia de fosfatos de calcio precipitado en las NPs crea un ambiente favorable para la nucleación de éstos polimorfos. De acuerdo a la literatura, el pico correspondiente al grupo CO_3^{2-} se reporta entre 531.2-531.6 eV [320], [321], sin embargo, la ubicación de los picos principales en ésta muestra son más influenciados por los compuestos predominantes como la apatita, mostrando una menor contribución del CaCO_3 recién nucleado.

5.1.5.2 Espectroscopia de energía dispersiva de rayos X (EDS)

Mediante espectroscopia de energía dispersiva de rayos X se obtuvieron los % atómicos (%at.) de carbono (C), oxígeno (O), silicio (Si), fósforo (P) y calcio (Ca). Se tomaron 5 mediciones en diferentes regiones de las NPs y los valores promedio del análisis a NPS20, NPS30 y NPS40 se muestra en la Tabla 9.

Tabla 9. Composición química obtenida mediante EDS de NPS20, NPS30 y NPS40 (%at.), promedio \pm desviación estandar (DE). Relación Ca/P obtenida a partir de la composición elemental, promedio \pm desviación estandar (DE).

	C	O	Si	P	Ca	Ca/P
NPS20	26.02 \pm 2.65	54.95 \pm 2.65	11.85 \pm 1.98	2.66 \pm 0.38	4.50 \pm 0.90	1.68 \pm 0.17
NPS30	14.69 \pm 2.71	63.64 \pm 2.91	13.66 \pm 0.86	2.89 \pm 0.21	5.11 \pm 0.31	1.77 \pm 0.04
NPS40	36.63 \pm 3.50	52.00 \pm 2.62	6.19 \pm 0.70	1.09 \pm 0.07	4.08 \pm 0.45	3.76 \pm 0.43

Además, a través de los resultados, se calculó la relación Ca/P, siendo un parámetro importante para la identificación de algunas fases de CaPO_4 [322]. Las bajas concentraciones de Si y P en NPS40 resultan de la impurificación superficial. Los

excesivos %at. de Ca y C confirman la formación de fases como CaCO_3 coincidiendo con los resultados FT-IR, DRX y XPS. La formación de compuesto impurificantes mostraron un efecto sobre la agregación de las NPs, reduciendo además su área superficial como se observado en el análisis DLS.

Caso contrario ocurrió con las NPS20, manteniendo una superficie más limpia y mayor área superficial, absorbiendo CO_2 atmosférico y mostrando un %at. de C mayor que NPS30. Por otro lado, NPS30 presenta los mayores %at. de Ca y P indicando una mayor concentración y acumulación de fosfato de calcio en su superficie. De la literatura se conoce que la relación estequiométrica Ca/P de la HAp es de 1.67 [322], como el calculado para las NPS20. Menores valores de Ca/P corresponderán a hidroxiapatita deficiente en calcio y valores mayores resultarán cuando existe un excedente de iones Ca^{2+} . Este exceso de iones promueve la formación de fases impurificantes en la superficie de las NPs, modificando sus propiedades fisicoquímicas. De los resultados obtenidos, también se puede inferir que la concentración de calcio adicionado en NPS20 es optimizado, debido a la liberación controlada de iones promoviendo la formación de HAp de mayor pureza en su superficie.

5.1.6 Morfología

La micrografía mostrada en la Figura 25 corresponde a las NPS40. Es posible identificar una morfología esférica de las NPs. Sin embargo, la literatura señala que la esferoidicidad de las NPS es afectada conforme se adicionan mayores concentraciones de modificadores de red, como el calcio [188], [263], [323]. Además, se observa una amplia distribución de tamaños de partícula, indicando una deficiencia en las reacciones sol-gel debido al exceso de iones [324]. Este efecto es consecuencia de una falta en el equilibrio de las reacciones, manteniendo los procesos de redisolución precipitación en silicatos [54]. Aún más, la modificación de la carga eléctrica superficial, debido a los compuestos de calcio formados en la superficie de las NPs genera su aglomeración [233], [325], [326].

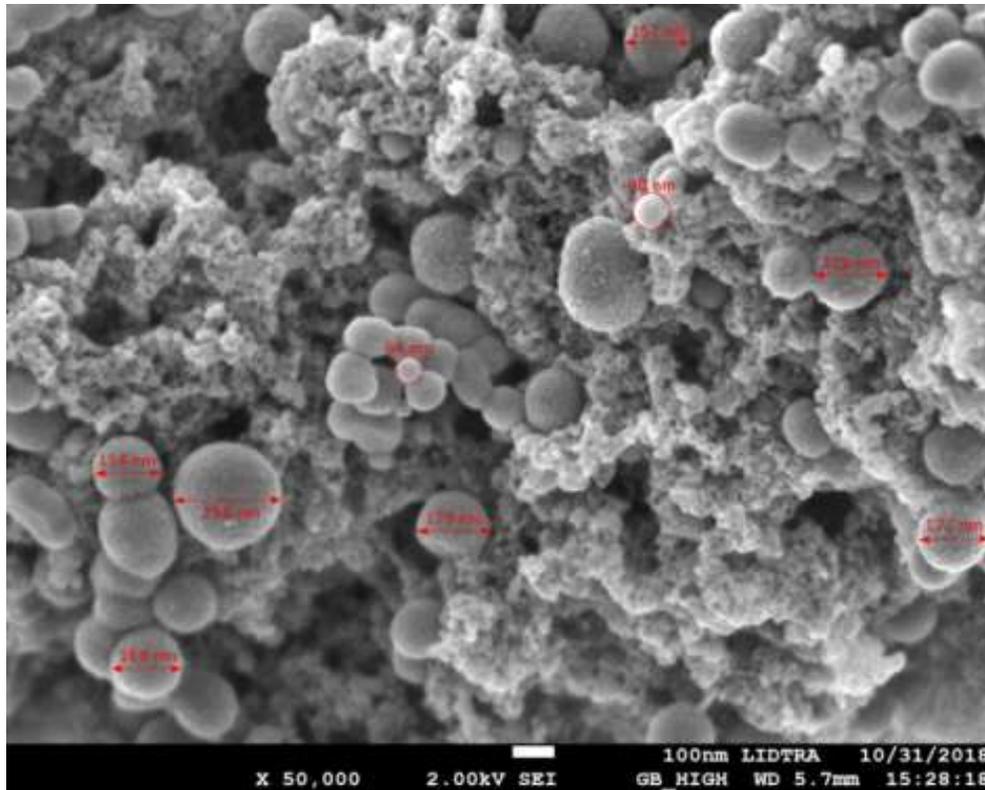


Figura 25. Morfología cuasi-esférica de las NPS40. Ampliación en la distribución de tamaños de partícula y morfología irregular causadas por la incrementada adición de CaNT.

5.2 Resultados y discusión Matriz polimérica PVA – SA

5.2.1 Inspección visual de los hidrogeles PVA - SA

Considerando 2 sistemas poliméricos, 2 mecanismos de entrecruzado y 5 ciclos C/D, se obtuvieron 20 diferentes hidrogeles de 3 centímetros de diámetro, con características muy particulares, ver Figura 26. Las fotografías presentan a los hidrogeles S1 (superior) y S2 (inferior), entrecruzados por C/D (inferior) y entrecruzado adicional con solución de CaCl_2 (superior), considerando además de 1 a 5 ciclos C/D. Las características fisicoquímicas, mecánicas, reológicas y texturales fueron diferentes para cada uno de ellos. En las fotografías se puede observar que la opacidad de los hidrogeles se incremento con los ciclos C/D y estaría relacionado con un mayor grado de entrecruzamiento de las cadenas poliméricas. Incluso, la textura y dureza de los hidrogeles fueron diferentes entre ellos.

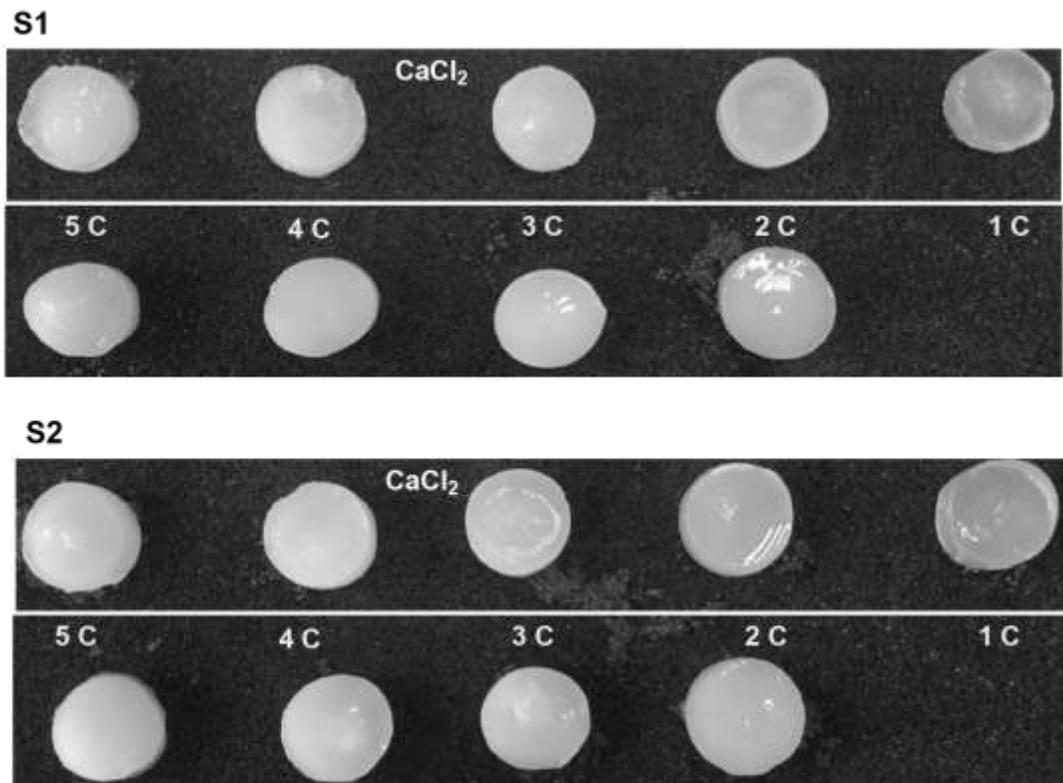


Figura 26. Hidrogeles PVA – SA obtenidos a través las de mezclas 50:50 (S1) y 65:35 (S2) %v/v. Cada sistema se entrecruzo físicamente (C/D, línea inferior) y doblemente con iones Ca^{2+} (C/D y adición de CaCl_2 , línea superior).

La eliminación del primer hidrogel en ambos sistemas, correspondientes a 1 ciclo C/D, sin adición de CaCl_2 , se debió a su textura líquida. Se observó que conforme se incrementaban los ciclos C/D, se reducía su flexibilidad y se incrementaba la dureza. Más aún, cuando se realizaba un segundo entrecruzado con CaCl_2 , se incrementaban la dureza y rigidez, diferenciándose con las propiedades del hidrogel entrecruzado solo con el proceso C/D. De ésta manera, se identificó visualmente el efecto de la concentración de los polímeros sobre las propiedades mencionadas. Por ejemplo, los hidrogeles S1, con mayor concentración de alginato de sodio en su preparación, exhibieron mayor rigidez. Incluso, se identificaron algunas irregularidades de formación en sus costados y bordes, como el correspondiente a 5 ciclos C/D y doble entrecruzado (S1- CaCl_2). Mientras que los producidos con mayor concentración de PVA (S2), presentan una

regularidad de forma y son más flexibles al tacto. Además, una superficie más lisa y brillante se observa en los correspondientes a S2, con 1 ciclo C/D y entrecruzado doble, mientras que su homólogo de S2 se observa mate y con mayor opacidad. Se pensaría que los hidrogeles con mayor concentración de PVA mantiene mayor humedad en su superficie, siendo más hidrofílica. A través del tacto, se identificó que los correspondientes a S2, y sometidos solo al entrecruzado C/D, presentaron mayor adhesividad que sus similares de S1 y sus pares doblemente entrecruzados. Estas características podrían estar relacionadas con la concentración de grupos hidroxilo (OH) en las cadenas poliméricas, siendo mayor para el PVA.

La literatura confirma la compatibilidad y viabilidad en la mezcla PVA y SA en la formación de geles. Estudios señalan que SA y PVA son miscibles en cualquier composición. Además, que existen interacciones puente de hidrógeno entre las cadenas de PVA y SA [327], [328]. Estas observaciones coinciden plenamente con lo descrito en otros trabajos de investigación. Wei et al. mencionan que la integración de PVA en el sistema polimérico PVA-SA reduce la rigidez y dureza, e incrementa la ductilidad y la tenacidad del hidrogel. Además, menciona que las cadenas de PVA tienen mayor número de grupos polares que las cadenas de SA del mismo peso molecular [327].

5.2.2 Peso de los hidrogeles

Es preciso mencionar que algunos de los hidrogeles preparados, sometidos solo al proceso C/D (sin adición de CaCl_2), mostraron separación de fases. Se observó que los sometidos a 3, 4 y 5 ciclos C/D, de ambos sistemas S1 y S2, una vez que se descongelaban, exhibían un núcleo blanquesino y opaco, inmerso en una solución clara, transparente (exhudado). Conforme se incrementaban los ciclos de entrecruzado, el núcleo reducía su tamaño y se incrementaba el exhudado, como se observa en las fotografías de la Figura 27.

Los hidrogeles que no presentaron exhudado fueron los correspondiente a 2 ciclos C/D, mientras que los de 5 ciclos expulsaron mayor cantidad de solución. Se puede inferir que el núcleo correspondía a la región del hidrogel con mayor concentración de

PVA, reduciendo su volumen debido a un mayor grado de entrecruzado. Mientras que el líquido trasparente corresponde al SA exhudado del hidrogel debido a la contracción en la red de PVA.

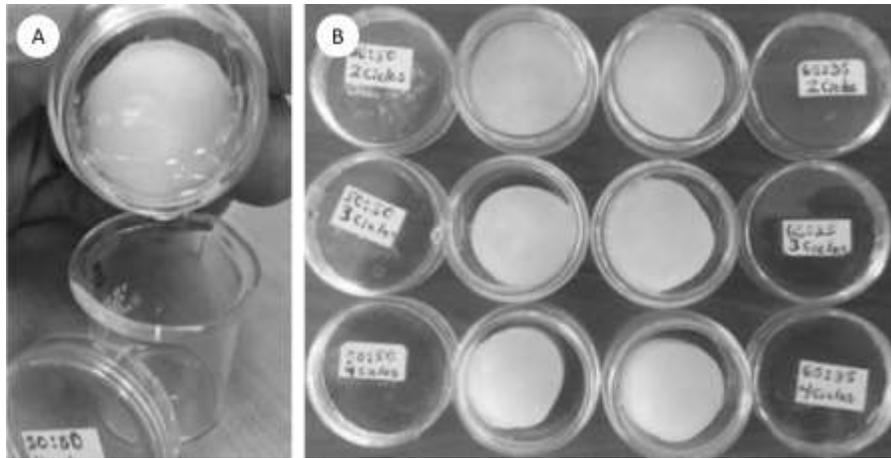


Figura 27. A) Expulsión del exudado desde el hidrogel, posterior al entrecruzado (C/D). B) Reducción del núcleo PVA conforme se incrementan los ciclos C/D, desde 2 hasta 4.

Éste fenómeno motivo un análisis de peso para los hidrogeles obtenidos, con la intención de identificar el porcentaje de polímero y humedad perdidos durante su enjuague. Los hidrogeles fueron preparados por triplicado y los valores de peso mostrados en la Tabla 10 son el promedio de 3 mediciones realizadas. Considerando que el doble entrecruzado (físico y químico) logra entrecruzar la totalidad de las cadenas poliméricas, se asume que no existen pérdidas de los polímeros. Por lo tanto, los sistemas con ambos entrecruzados son referente para determinar la pérdida de polímero en los sistemas entrecruzados físicamente (solo por C/D).

Tabla 10. Pesos promedio de los hidrogeles húmedos (W promedio), obtenidos a partir de 3 mediciones, W promedio \pm desviación estándar (DE).

Ciclos	W promedio (g)				W Perdido (g)		%W Perdido	
	Sistema 1	Sistema 1 CaCl ₂	Sistema 2	Sistema 2 CaCl ₂	Sistema 1	Sistema 2	Sistema 1	Sistema 2
1	-	2.89 \pm 0.015	-	2.87 \pm 0.013	-	-	-	-
2	2.39 \pm 0.042	2.91 \pm 0.026	2.21 \pm 0.062	2.85 \pm 0.044	0.5227	0.6373	17.9388	22.3109
3	2.06 \pm 0.040	2.83 \pm 0.055	2.09 \pm 0.036	2.79 \pm 0.055	0.7711	0.7044	27.2075	25.1790
4	1.84 \pm 0.056	2.75 \pm 0.084	1.92 \pm 0.091	2.60 \pm 0.054	0.9155	0.6777	33.2244	26.0456
5	1.75 \pm 0.040	2.51 \pm 0.025	1.79 \pm 0.177	2.63 \pm 0.009	0.7564	0.8412	30.1060	31.8738

Los valores de mayor peso fueron 2.87 y 2.91 g correspondientes a S2-CaCl₂ y S1-CaCl₂, con uno y dos ciclos C/D, respectivamente. Mientras que los valores de peso más bajos correspondieron a los sistemas entrecruzados solo físicamente (S1 y S2) con cinco ciclos C/D. Se observó que, conforme se incrementaban los ciclos de entrecruzado físico en S1 y S2, se reducía el peso del hidrogel humedo. Se consideró entonces que los hidrogeles sometidos a éste proceso se conforman de una red polimérica entrecruzada de PVA con cadenas móviles de SA, interactuando mediante enlaces puente de hidrógeno. Fue factible pensar que las cadenas de SA al ser sometidas a esfuerzos, pueden moverse libremente por el hidrogel, sino han sido enlazadas o entrecruzadas. Por lo que la pérdida de peso de los hidrogeles se atribuyó principalmente al exudado de SA, eliminado durante el enjuague. A pesar de la expulsión del SA de los hidrogeles, como consecuencia de su contracción, es posible que existan cadenas de SA remanentes en su interior, que serán determinantes en la absorción de agua y el peso del hidrogel. La literatura señala que la adición de SA en geles de PVA incrementa su hinchabilidad y capacidad para absorber agua [329], tal como se observa en los hidrogeles S1 preparados con 2 ciclos C/D, presentando el peso máximo. Mientras que el incremento de PVA genera geles más densos, disminuyendo el tamaño de poro [327]. Se infiere entonces que la microestructura del hidrogel S1 con 2 ciclos de entrecruzado físico resulta a partir de una afectación en el entrecruzado de las cadenas poliméricas de PVA, debido a la incrementada cantidad de SA móvil en su interior. Una mayor concentración de SA actuará como una barrera más difícil de esquivar en el entrecruzamiento de PVA, generando poros más grandes a los de su homólogo en S2, absorbiendo mayor cantidad de agua y, por ende, mostrando un peso incrementado. Sin embargo, conforme se incrementa el entrecruzado físico del gel, éste se contrae, reduciendo el tamaño de poro y expulsando mayor cantidad de exudado. Dicho fenómeno se puede identificar también a través de una mayor varianza en el %W perdido del hidrogel S1, en cada ciclo C/D, ver Tabla 10. También puede monitorearse a través del gráfico de pesos de los hidrogeles, ver Figura 28. Mientras que la pérdida de peso para los hidrogeles del sistema S2 mostró un comportamiento casi lineal, con una tendencia ajustada a $y = -0.1433x + 2.5102$ y $R^2 = 0.9965$, la correspondiente a S1 tiende a comportarse polinomialmente, ajustándose a una ecuación de segundo

orden, $y = 0.061x^2 - 0.64x + 3.4289$ y $R^2 = 0.9998$. Esto también explicaría la razón del peso tan reducido del hidrogel S1 con 5 ciclos C/D.

Los hidrogeles producidos en el sistema S1-CaCl₂ presentaron mayores valores de peso a los obtenidos para S2-CaCl₂, exceptuando los producidos a cinco ciclos de entrecruzado físico, destacando nuevamente la mayor capacidad absorbente del SA. A pesar de no perder una porción polimérica, los hidrogeles doblemente entrecruzados (S1-CaCl₂ y S2-CaCl₂) también presentaron una pérdida de peso. La reducción de peso, conforme se sometían a más ciclos C/D, se atribuyó principalmente a la capacidad de absorber agua (hinchabilidad) de los hidrogeles debido a su composición y porosidad. Al igual que en S1 y S2, los sistemas con doble entrecruzado presentan sus máximos pesos para los producidos con 2 ciclos C/D.

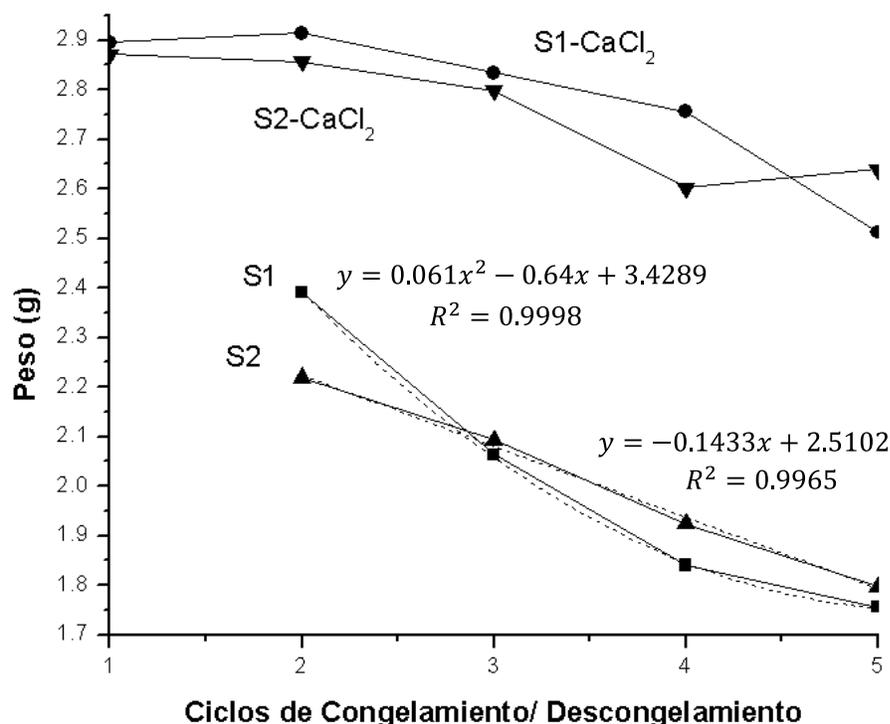


Figura 28. Pérdida de peso de los hidrogeles PVA – SA en función de los ciclos C/D otorgados para los sistemas con entrecruzado físico (S1 y S1) y doble entrecruzado (S1-CaCl₂ y S2-CaCl₂).

Se considera además que la microestructura de la red de PVA formada en S1 y S2 (porosidad, fracción de gel) corresponde a la del núcleo de PVA en sus homólogos

doblemente entrecruzados. Por ejemplo, el tamaño de poros formados por la red de PVA en los hidrogeles con dos ciclos C/D en S1 y S2, corresponden a la de sus versiones doblemente entrecruzados (S1-CaCl₂ y S2-CaCl₂). Antes del doble entrecruzado, la red de PVA funge como una estructura soporte para las cadenas de SA. Sin embargo, el tamaño de poro de los hidrogeles S1-CaCl₂ y S2-CaCl₂ se reduce con respecto a sus similares S1 y S2 hasta que se presenta el entrecruzado de las cadenas de SA con CaCl₂. Se podría inferir que la red de SA entrecruzada con calcio, se ensambla y estructura en función de la red de PVA entrecruzada, incrementando la fracción gel. Además, cabe señalar que estos hidrogeles no fueron exentos a los efectos de la separación de fases. Si bien los hidrogeles con 2 ciclos C/D no presentaron exudado en S1 y S2, se consideró que el SA se localizó al interior del gel de PVA, haciendo viable la interconectividad de ambas redes (PVA y SA) mediante el segundo entrecruzado. Sin embargo, en los hidrogeles con 3, 4 y 5 ciclos C/D, en lugar de obtener un exudado como en los sistemas S1 y S2, el segundo entrecruzado generó la gelificación del SA en el exterior de los hidrogeles de PVA, configurando un sistema núcleo-coraza. Un núcleo conformado principalmente por gel de PVA y una coraza de SA entrecruzado con calcio. Se observó que el núcleo reducía su volumen conforme se incrementaban los ciclos C/D, mientras que la coraza incrementaba su espesor. La separación de los polímeros genera anisotropía de las propiedades fisicoquímicas de los hidrogeles, por lo no se profundizó más sobre el tema.



Figura 29. Configuración núcleo PVA – coraza SA obtenido en los hidrogeles producidos con 3, 4 y 5 ciclos C/D. Separación de fases.

5.2.3 Deshidratación y secado de los hidrogeles

Los hidrogeles presentaron diferentes comportamientos de deshidratación y secado de acuerdo a su composición y microestructura. La rapidez en la evaporación de agua desde su interior dependerá fuertemente de la relación polimérica PVA/SA y el tamaño de poro. Se determinó el porcentaje de peso perdido (%W perdido) para cada uno de los hidrogeles a 24 y 48 horas. Los resultados se presentan en la Tabla 11 y en gráfico de barras para analizar su comportamiento, ver Figura 30.

Tabla 11. Porcentaje en peso perdido (%W perdido) a 24 y 48 horas de deshidratación para los hidrogeles S1, S2, S1-CaCl₂ y S2-CaCl₂.

	Ciclos	C/D		C/D + CaCl ₂	
		24 h	48 h	24 h	48 h
S1	1	N.A.	N.A.	71.48	94.84
	2	81.43	95.25	63.6	94.45
	3	82.14	95.18	78.72	94.35
	4	76.72	95.17	66.73	94.44
	5	87.37	95.19	81.41	94.35
S2	1	N.A.	N.A.	76.82	94.44
	2	90.79	94.81	75.93	94.21
	3	78.64	95.64	65.5	94.73
	4	82.22	94.75	77.23	93.92
	5	85.63	94.93	78.3	93.78

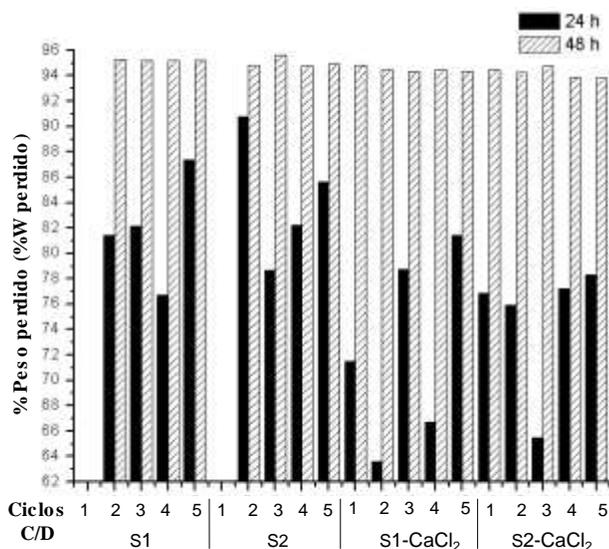


Figura 30. %W perdido en la deshidratación de los hidrogeles a 24 y 48 h.

Al observar el conjunto de datos, se infiere que los hidrogeles con mayor concentración de SA, como S1-CaCl₂ y S2-CaCl₂ presentaron menores pérdidas de peso a las 24 horas de tratamiento térmico. Más aún, el hidrogel con 2 ciclos C/D, perteneciente al sistema S1-CaCl₂, mantuvo la mayor hidratación y menor %W perdido a las 24 horas (63.6%). La incrementada concentración de SA retenida al interior de estos hidrogeles es la responsable del incremento de peso. Otros hidrogeles también presentaron retención hídrica considerable a las 24 horas, entre ellos se encuentran los correspondientes a 3 y 4 ciclos C/D, de los sistemas S2-CaCl₂ y S1-CaCl₂, respectivamente. Mientras que el hidrogel con mayor %W perdido a las 24 horas fue el producido con dos ciclos C/D en S2, mostrando características muy particulares. Este gel no presentó exudado, asumiendo que las cadenas de SA se mantuvieron cautivas en su interior. Sin embargo, a pesar de contener una porción considerable de SA, mostró un acelerado proceso de deshidratación a las 24 horas. Por lo que su comportamiento tan especial no se explicaría a partir de un incremento en la concentración de SA, en su lugar se considera una microestructura conformada por una red de poros mayores, permitiendo una rápida evaporación de agua. Otros hidrogeles que muestran una elevada pérdida de peso a las 24 horas son los preparados a 5 ciclos C/D y entrecruzado físico (S1 y S2). Su rápida deshidratación se deduce considerando que la concentración de SA es muy baja en su interior y muy baja hidratación, predominando el PVA y generando una red de poros pequeños para almacenar agua. Sin embargo, considerando que los hidrogeles con 3, 4 y 5 ciclos C/D y doble entrecruzado presentaron separación de fases (configuración núcleo PVA-coraza SA), se esperaría que sus propiedades fueran anisotrópicas, apartándose de los intereses propios de éste estudio. La interpretación de sus resultados y la descripción de su comportamiento puede resultar un tanto complicados, requiriendo un estudio más profundo.

Al reorganizar los datos obtenidos y graficar solo los correspondientes a 2 ciclos C/D, se obtiene el gráfico de la Figura 31. En éste se observa una relación clara entre el %W perdido y la composición del hidrogel. La mayor retención de agua y el menor

%W perdido mostrado por los hidrogeles con doble entrecruzado, S2-CaCl₂ y S1-CaCl₂, se deben principalmente a la predominancia del SA en su interior.

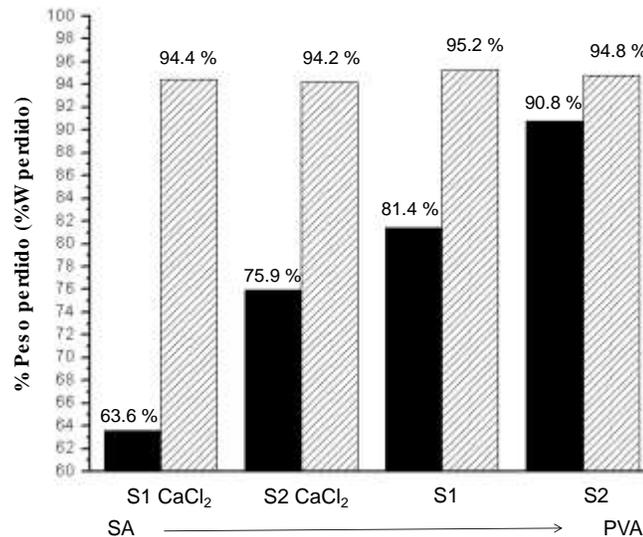


Figura 31. Porcentaje de peso perdido en hidrogeles preparados con 2 ciclos C/D en los sistemas S1 y S2, entrecruzados físicamente y con adición de CaCl₂. El ordenamiento de los datos evidencia una relación con el contenido de los polímeros.

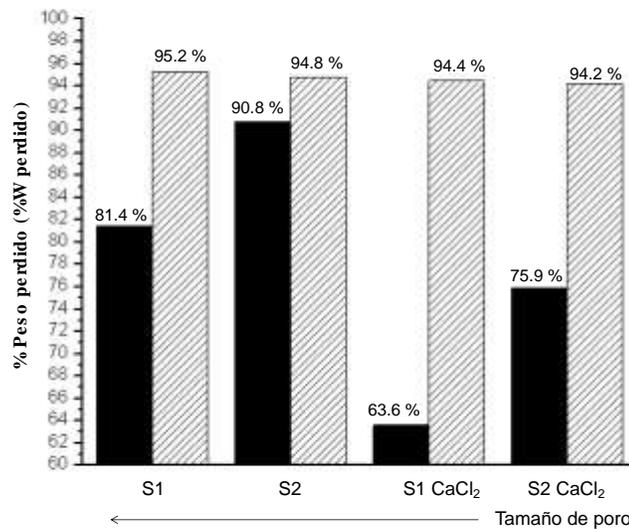


Figura 32. Porcentaje de peso perdido en hidrogeles preparados con 2 ciclos C/D en los sistemas S1 y S2, entrecruzados físicamente y con adición de CaCl₂. El ordenamiento de los datos evidencia una relación con la porosidad de los hidrogeles.

Mientras que los correspondientes a S1 y S2, con entrecruzado físico y menor proporción de SA, exhiben altos %W perdido debido a una mayor deshidratación a las

24 horas. Como se mencionó anteriormente, a pesar de no estar fuertemente enlazadas las cadenas de SA a la red de PVA, en S1 y S2, es posible reconocer su presencia en los hidrogeles y el efecto de absorción de agua. Aún más, existe una clara diferencia entre los hidrogeles de S1 y S2. Los preparados con la relación en volumen 50:50 (S1), genera hidrogeles con poros más grandes que 65:35 (S2), permitiendo una mayor absorción de agua y presentando un peso incrementado, como se discutió anteriormente en el análisis de peso. Además, esta diferencia microestructural también tienen un fuerte impacto en el proceso de deshidratación como se deduce en los resultados. El gráfico de la Figura 32 corresponde a los mismos datos analizados en la Figura 31, solo se han ordenado de manera distinta. A través de esta modificación, es más perceptible el incremento en la porosidad de los hidrogeles de 2 ciclos C/D, con y sin segundo entrecruzado. A través del % W perdido a las 48 horas, fueron ordenados los hidrogeles de acuerdo al grado de porosidad (tamaño de poro) de la siguiente manera: $S1 > S2 > S1-CaCl_2 > S2CaCl_2$, correspondiendo a los valores 95.2, 94.8, 94.4 y 94.2 %.

5.2.4 Comportamiento de hinchabilidad

Un compuesto conformado homogéneamente por PVA y SA brindará ventajas sobre los hidrogeles producidos con un solo polímero, por lo tanto se eligieron los hidrogeles con 1 y 2 ciclos C/D, pertenecientes a S1-CaCl₂ y S2CaCl₂, para realizar el análisis de hinchabilidad. El gráfico de la Figura 33 presenta la relación de hinchamiento de los hidrogeles, definiéndose como la capacidad del hidrogel para absorber agua y siendo uno de los requerimientos más importantes en aplicaciones biomédicas (liberadores de fármacos, apósitos y soportes celulares) [330]. Se observa que, de manera general, los hidrogeles obtenidos tienen una tendencia de hinchamiento similar durante las primeras horas del tratamiento, creciendo rápidamente la relación de hinchabilidad en las primeras 10 horas de acondicionamiento, después las curvas cambian.

El hidrogel S1-CaCl₂ con dos ciclos C/D presentó la mayor relación de hinchabilidad, mientras que el homólogo de S2-CaCl₂ mostró la menor. Los producidos con 1 ciclo, de ambos sistemas, mantuvieron valores intermedios. Las relaciones de hinchabilidad en el equilibrio fueron de 2.43 y 1.92 para los producidos con 2 y 1 ciclo

C/D en S1-CaCl₂, respectivamente, y se alcanzaron alrededor de las 90 horas. Sin embargo, los hidrogeles de S2-CaCl₂ no presentan un equilibrio definido. El producido con 1 ciclo C/D presenta incrementos y decrementos en los valores de su relación de hinchabilidad, mientras que el producido con 2 ciclos C/D aún en el último punto medido (127 horas) continua incrementandose.

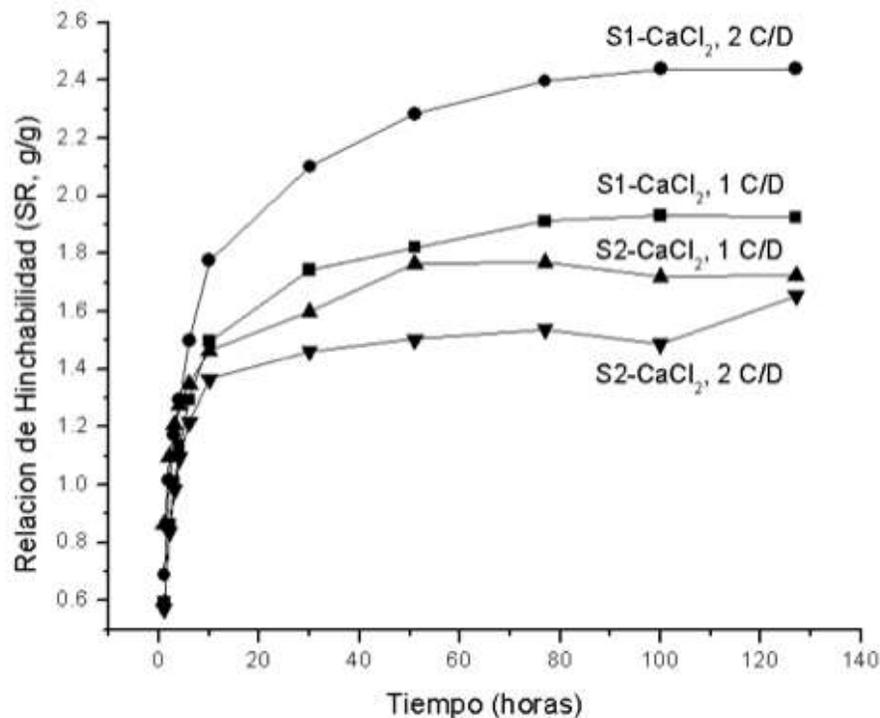


Figura 33. Curvas de comportamiento relación de hinchabilidad en función del tiempo para hidrogeles con 1 y 2 ciclos C/D, doblemente entrecruzados.

Estos resultados coinciden con los análisis anteriores y otros estudios [329], confirmando que el aumento en la concentración de SA también incrementa el peso del hidrogel y su capacidad para absorber agua. Así como una mayor proporción de PVA tenderá a generar hidrogeles más densos, con tamaño de poro más pequeño y menor capacidad de absorción. Algunos trabajos reportan que la hinchabilidad de los hidrogeles se relaciona con la difusión del agua y la ionización de los grupos funcionales. Si la cinética de ionización es mucho más lenta que la difusión, el proceso de ionización limita la cinética de hinchamiento. El pKa del alginato se encuentra alrededor de 3.2 y 4 para el ácido gularónico y manurónico, respectivamente [331].

En medios con bajo valor de pH, la mayoría de los grupos carboxílicos del alginato se encuentran en forma de -COOH. Conforme el pH del medio se incrementa, los grupos carboxílicos llegan a estar ionizados (-COO⁻) provocando la repulsión electrostática de la red, así como la hinchabilidad del hidrogel [329]. Con el incremento de SA en los hidrogeles, se ionizan más grupos -COOH y -COONa (incrementándose la velocidad de ionización) y, por ende, favoreciendo el hinchamiento. En algunos casos, es posible que durante el secado, los hidrogeles con alto contenido de SA y considerable entrecruzado generen una estructura compacta, bloqueando los grupos -COOH o -COONa, restringiendo la velocidad de ionización [332], [333]. Es posible que un fenómeno similar ocurra en el hidrogel con 2 ciclos C/D de S2-CaCl₂, presentando la relación de hinchabilidad más baja, atribuida a una menor velocidad de ionización en los grupos -COOH y -COONa. A pesar de mantenerse sumergido en agua más de 100 horas, su relación de hinchabilidad máxima fue de 1.64 y continúa absorbiendo agua e hinchándose. La baja densidad de entrecruzamiento de la red de PVA y la degradación del hidrogel S1-CaCl₂, con 1 ciclo C/D, pueden ser la causa de una menor relación de hinchabilidad a la de su par S1-CaCl₂ con dos ciclos C/D. La generación de una red entrecruzada de PVA más laxa y relajada, con poros grandes, permitió mayor movilidad de las cadenas SA y su eliminación del hidrogel, reduciendo el efecto de hinchabilidad.

5.2.5 Dureza de los hidrogeles

Cabe mencionar que la dureza medida a través de TPA (texture profile analyzer) se diferencia de la obtenida a través de pruebas de penetración (Rockwell, Brinell o Vickers). Mientras que las pruebas de penetración determinan la dureza a partir de una huella de deformación en materiales con cierta rigidez, el gran módulo elástico de los hidrogeles no permite usar esta estrategia. Por lo tanto, la dureza en esta técnica se define como la fuerza máxima (gramos fuerza, g_f) requerida para lograr una deformación en los hidrogeles [334] y se obtiene a partir del punto máximo en el ciclo de compresión. Las curvas de compresión para los hidrogeles obtenidos en este estudio se presentan en las Figuras 34 y 35. En el primero (Figura 34), se presentan tres curvas en negro resaltadas, correspondientes a los ciclos de compresión para S1 con 2 ciclos

C/D, y tres con línea tenues para S2 con 2 ciclos C/D. Los valores de dureza obtenidos se muestran en la Tabla 12.

Tabla 12. Valores de dureza (g_f) obtenidos para los hidrogeles PVA-SA preparados con 1 y 2 ciclos (C/D), así como para sus homólogos doblemente entrecruzados.

Entrecruzado	Valores de Dureza (g_f)					
	Físico (C/D)		Doble (C/D + CaCl ₂)			
	S1, 2 C/D	S2, 2 C/D	S1-CaCl ₂ , 1 C/D	S2-CaCl ₂ , 1 C/D	S1-CaCl ₂ , 2 C/D	S2-CaCl ₂ , 2 C/D
1o.	149.5	61.5	286.3	185.8	752.3	1117.8
2o.	67.4	35.4	272.6	184.9	747.7	907.6
3ero.	29.1	26.3	258.9	117.2	706.6	861.9
Desviación Est.	61.5	18.2	13.7	39.3	25.1	136.4

A partir de estos datos, se reconoce el valor máximo de dureza para los hidrogeles con entrecruzado C/D, siendo 149.5 g_f para S1 con 2 ciclos C/D (1a. medición) y el menor es 26.3 g_f para S2 con 2 ciclos C/D (3a. medición). Se deduce que los hidrogeles con mayor proporción de SA (S1) presentaron un ligero incremento en la dureza, tal como se esperaba. Pero también mostraron mayor desviación estandar lo que podría señalar una microestructura interna irregular, por ejemplo, la formación de poros de diferentes tamaños o poros muy grandes. Los del sistema S2 mostraron menores valores de dureza y desviación estandar, sugiriendo la formación de un hidrogel con predominancia en PVA (mayor elasticidad) y una microestructura más ordenada, por ejemplo, una distribución de tamaños de poro más estrecha o una densidad de entrecruzado más homogénea.

En la segunda gráfica (Figura 35) se observan los ciclos de compresión para los hidrogeles doblemente entrecruzados correspondientes a 1 y 2 ciclos de C/D. Los valores de dureza más altos se observan para S2-CaCl₂ con 2 ciclos C/D, contemplados entre 1117.8 y 861.9 g_f . Se podría decir que en esa proporción de polímeros PVA/SA, las condiciones se optimizan para la formación de una red entrecruzada de PVA, brindando mayor soporte y resistencia a la red interpenetrada de SA, creando una red de poros interconectados y permitiendo la difusión de iones y agua.

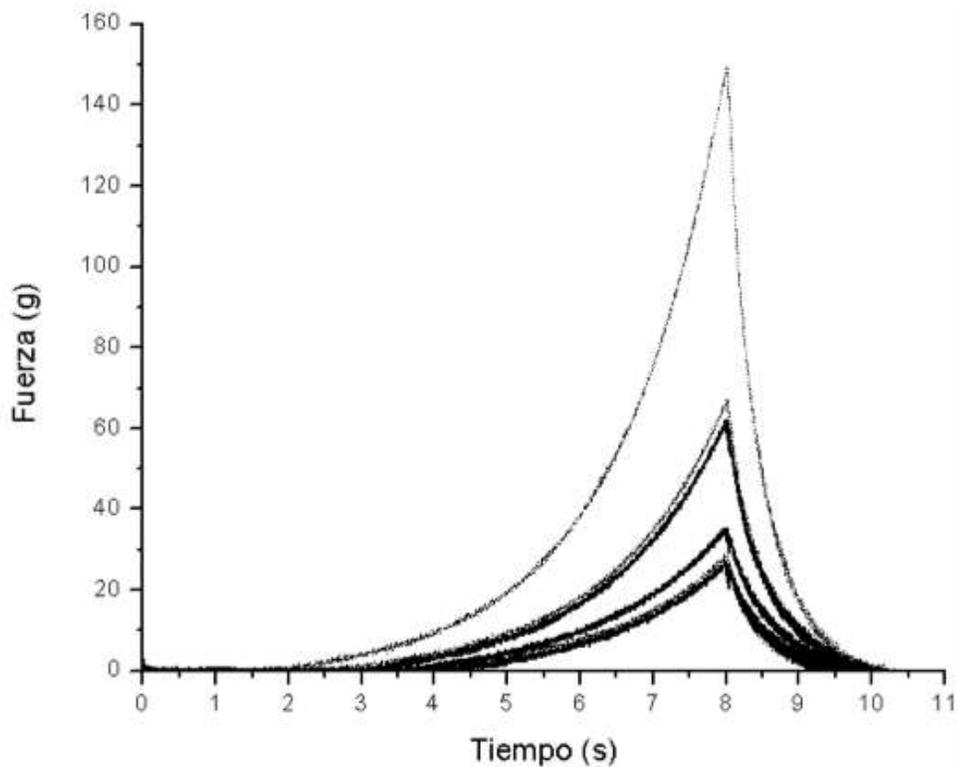


Figura 34. Ciclos de compresión mecánica aplicada en los hidrogeles de S1 y S2 preparados con 2 ciclos C/D. Los tenues corresponden a S2 y los marcados a S1.

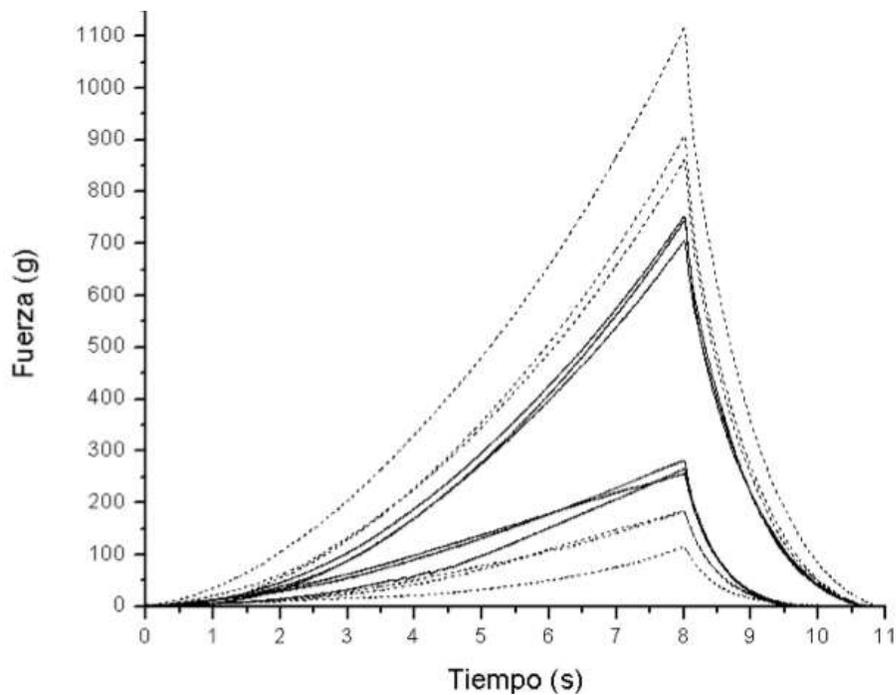


Figura 35. Ciclos de compresión mecánica aplicada en los hidrogeles de S1-CaCl₂ (línea continua) y S2-CaCl₂ (línea punteada) preparados con 1 y 2 ciclos C/D.

La concentración de SA es suficiente para permitir que las cadenas de PVA se entrecrucen, consolidando la estructura primaria y la formación de poros. Por otro lado, la concentración de PVA es optimizada para generar una red entrecruzada, flexible y abierta conteniendo al SA, sin generar esfuerzos internos para su expulsión. Es posible que en éste hidrogel, la distribución de tamaño de poro se reduzca, influyendo sobre sus propiedades mecánicas. Tal como lo reporta la literatura, la introducción de SA por encima del 20% en el hidrogel de PVA mejora las propiedades mecánicas (como resistencia a la tensión y modulo elástico), atribuido a la fuerte adhesión interfacial entre PVA y SA (miscibilidad), convirtiendo a los hidrogeles frágiles en materiales tenaces [329], [335]. La reducción en los valores de dureza para S1-CaCl₂ con 2 ciclos C/D se debe principalmente a la estructura del hidrogel, presentando mayor distribución de tamaño de poro formando microzonas con regiones de alta densidad de entrecruzamiento y otras de menor, reduciendo el área superficial y debilitando la red del hidrogel. También se observa un detrimento en las propiedades mecánicas del hidrogel con relación a los ciclos de C/D. Los hidrogeles con 2 ciclos C/D presentaron valores de dureza mayores a sus pares con solo 1 ciclo C/D debido a una mayor densidad de entrecruzado y una distribución de tamaño de poro más estrecha, brindando mayor resistencia a la red.

5.2.6 Degradación hidrolítica de los hidrogeles

El análisis de degradación se llevó a cabo para los hidrogeles preparados con 2 ciclos C/D, en sus versiones de entrecruzado físico y doble entrecruzado. Los %W perdido por efecto de la degradación hidrolítica con SBF se presentan en la Tabla 13 y el gráfico de barras de la Figura 36. Es preciso mencionar que los valores graficados corresponden a los %W perdido en los hidrogeles por cada intervalo de tiempo, no al %W perdido total.

Nuevamente, se identifica que los hidrogeles entrecruzados solo físicamente pierden mayor peso en los 3 intervalos de tratamiento (15, 30 y 45 días). Mientras que el hidrogel con mayor concentración de PVA (S2) presenta una tendencia en su pérdida

de peso, el correspondiente a S1 con mayor concentración de SA presenta una pérdida de peso aleatoria.

Tabla 13. Porcentaje de peso perdido (% W perdido) en los hidrogeles con 2 ciclos C/D, por efecto de la degradación hidrolítica en SBF a 15, 30 y 45 días.

Días	Hidrogeles			
	S1	S2	S1-CaCl ₂	S2-CaCl ₂
15	54.79	48.8	25.92	24.83
30	53.54	48.25	22.13	34.67
45	59.84	44.81	40.78	27.66

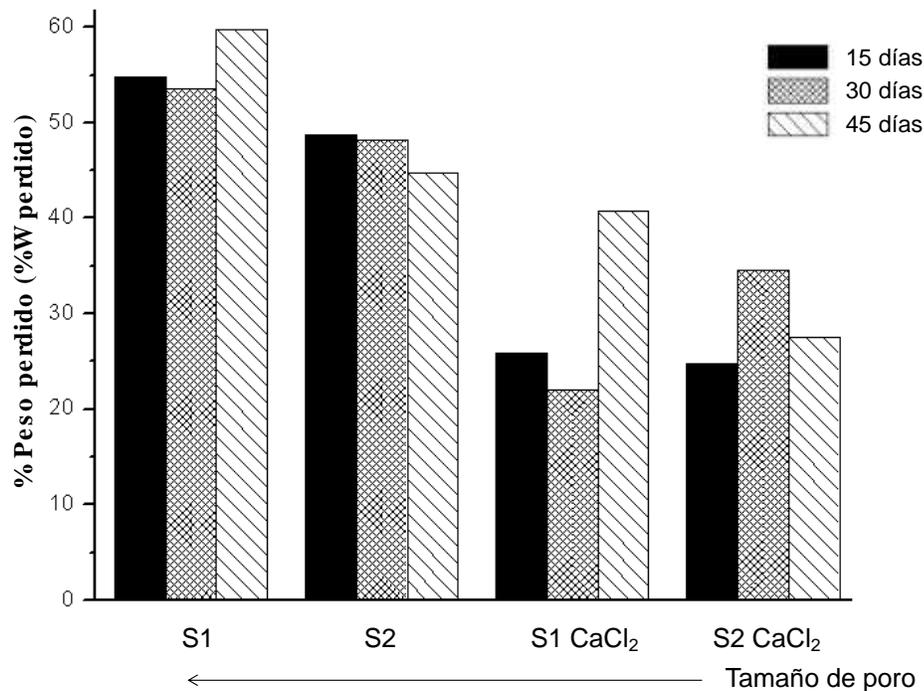


Figura 36. Comportamiento de la degradación en los hidrogeles preparados con 2 ciclos C/D, inmersos en SBF 15, 30 y 45 días. Relación entre su degradación con la composición y tamaño de poro.

El comportamiento de S2 podría estar relacionado con una regularidad en su microestructura, por ejemplo, una red de poros con tamaños más homogéneos, regulando la adsorción de iones y agua, así como la desorción de los productos de la degradación. Por otro lado, las muestras con doble entrecruzado presentaron una menor pérdida de peso, infiriendo que se conforman de una red de poros más pequeños que

sus similares entrecruzados físicamente. Los valores de %W perdido correspondientes a 45 y 15 días muestran una tendencia en la degradación de los hidrogeles relacionada con su porosidad. Cabe mencionar que estos resultados coinciden con el orden establecido en el análisis de deshidratación para la misma serie de hidrogeles. Se pensaría que un mayor tamaño de poro, permite mayor degradación, siendo posible establecer un orden de tamaño de poro de la siguiente manera: S1 > S2 > S1-CaCl₂ > S2-CaCl₂. Considerando que la red de PVA formada en S2 es la correspondiente a la de S2-CaCl₂, se infiere que su red de poros también es más ordenada que en S1-CaCl₂. Además, esa red de poros más pequeños reduce la difusión de agua al interior del hidrogel retardando la cinética de ionización de los grupos -COOH y -COONa y, por ende, la disolución del SA. La literatura señala que la concentración de iones en el interior del hidrogel es mayor que la del PBS, causando una diferencia en la presión osmótica y generando un flujo hacia el interior de la matriz polimérica [333]. Una vez al interior del hidrogel, los fosfatos del PBS reaccionan con el calcio y lo separan del SA, resultando en un rompimiento de la estructura del hidrogel [336]. Además, los iones Na⁺ y K⁺ sustituyen a los iones Ca²⁺ en los bloques de polimannuronato y poliguluronato, reduciendo el entrecruzamiento de SA [337] y haciéndolo susceptible a la degradación [332].

5.3 Compuesto PVA – SA – NPs VB

5.3.1 Obtención de hidrogeles nanocompuestos

Considerando los resultados obtenidos en el análisis de los hidrogeles puros PVA-SA, se eligió la matriz S2-CaCl₂ con 2 ciclos C/D para preparar el nanocompuesto. Los hidrogeles se prepararon con 0.3% w de NPs VB (NPS20, NPS30 y NPS40) y partículas de Bioglass comercial (COMER) procesadas por molienda de alta energía. Bajo el procedimiento descrito en el desarrollo experimental, las NPs fueron dispersas y resuspendidas en las soluciones poliméricas precursoras. Cabe mencionar que la viscosidad de las soluciones precursoras evitaron la sedimentación de las NPs. La fotografía de la Figura 37 presenta las suspensiones precursoras producidas para la obtención de los hidrogeles nanocompuestos. Durante el colado de los hidrogeles, se observó que la adición de las NPs incrementó la viscosidad de las soluciones

precursoras, con respecto a la viscosidad de la solución de referencia (PVA-SA), y la tendencia a la gelificación se aceleró, incluso a temperatura ambiente. Se podría pensar que la disolución de las NPs por efecto de la agitación, durante la redispersión, liberó iones Ca^{2+} , acelerando el proceso de entrecruzado de SA, antes del proceso C/D. Sin embargo, ese fenómeno no fue analizado en éste estudio



Figura 37. Suspensión de las NPS20, NPS30, NPS40 y BG comercial en la solución de PVA – SA.

Una vez colados los hidrogeles, se sometieron a 2 ciclos C/D, llevando a cabo el entrecruzado físico de las cadenas de PVA. Descongelados y a temperatura ambiente, se adicionó la solución de CaCl_2 a los hidrogeles, generando el segundo entrecruzado. De esta manera, se obtuvieron tres hidrogeles nanocompuestos (PVA-SA-NPS20, PVA-SA-NPS30 y PVA-SA-NPS40) y dos referencias (PVA-SA-COMER y PVA-SA) como se observa en la imagen de la Figura 38.

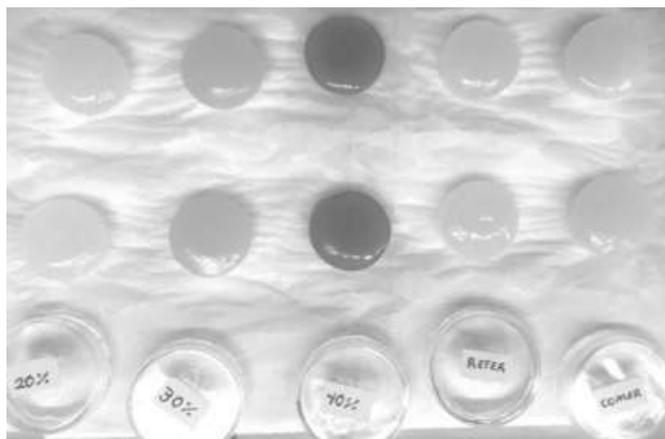


Figura 38. Pastillas nanocompuestas PVA – SA – NPs VB obtenidas.

5.3.2 Nucleación de apatita (HAp) sobre los hidrogeles PVA-SA-NPs vidrio bioactivo

Los hidrogeles nanocompuestos inmersos 14 días en la solución de Hank's, junto con sus referencias (sin ensayo de bioactividad), se liofilizaron para extraer el líquido en su interior, evitando su contracción y conservando su microestructura porosa para estudios posteriores. Los hidrogeles fueron analizados mediante DRX identificando las fases presentes. Todos los perfiles DRX obtenidos fueron normalizados para realizar las comparaciones pertinentes entre los hidrogeles nanocompuestos ensayados y sus referencias. En la Figura 39 se presentan los difractogramas de los hidrogeles no ensayados. Los frontales corresponden a los producidos con NPS20 y NPS40, mientras que los posteriores, a la matriz PVA-SA y BG comercial. En todos estos se observa una banda ancha extendida entre 15 y 30° 2 θ , presentando un máximo alrededor de los 20° 2 θ , típico de los hidrogeles de PVA y un pequeño pico alrededor de 13.5° 2 θ característico del SA. Además, los mayoría de hidrogeles de referencia muestran reflexiones estrechas en 27.3, 31.7, 45.5, 56.4 y 66.3° 2 θ , resaltando el entrecruzado del SA con CaCl₂ [338], [339]. Algunos trabajos de investigación señalan que estas reflexiones se relacionan con la reducción de la distancia molecular entre las cadenas de SA, así como la generación de dominios cristalinos en el hidrogel [338], [340]. El hidrogel producido con NPS20 presenta reflexiones de baja intensidad comparado con el resto de los hidrogeles, incluso, los picos en 56.4 y 66.3° 2 θ no son evidentes en su perfil. Las intensidades de estas reflexiones fueron reduciendo gradualmente para BG comercial, matriz PVA-SA, NPS40 y NPS20. Los valores de intensidad para el pico localizado en 31.7° 2 θ , correspondientes a los hidrogeles antes del ensayo de bioactividad (I_o), se encuentran reportados en la Tabla 14. La literatura señala que la reducción del pico es una clara señal de amorfización del hidrogel y, es comunmente observada en nanocompuestos de SA entrecruzados con CaCl₂. Por ejemplo, la adición incrementada de NPs de HAp homogéneamente dispersas en hidrogeles de SA, provocó el decremento de su cristalinidad [341]. Considerando que las NPs de HAp se conforman de fosfato de calcio, se explica que los iones Ca²⁺ generados de su disolución, interactúan con los aniones carboxilato (-COO⁻) del SA, incrementando los enlaces dentro del hidrogel [339].

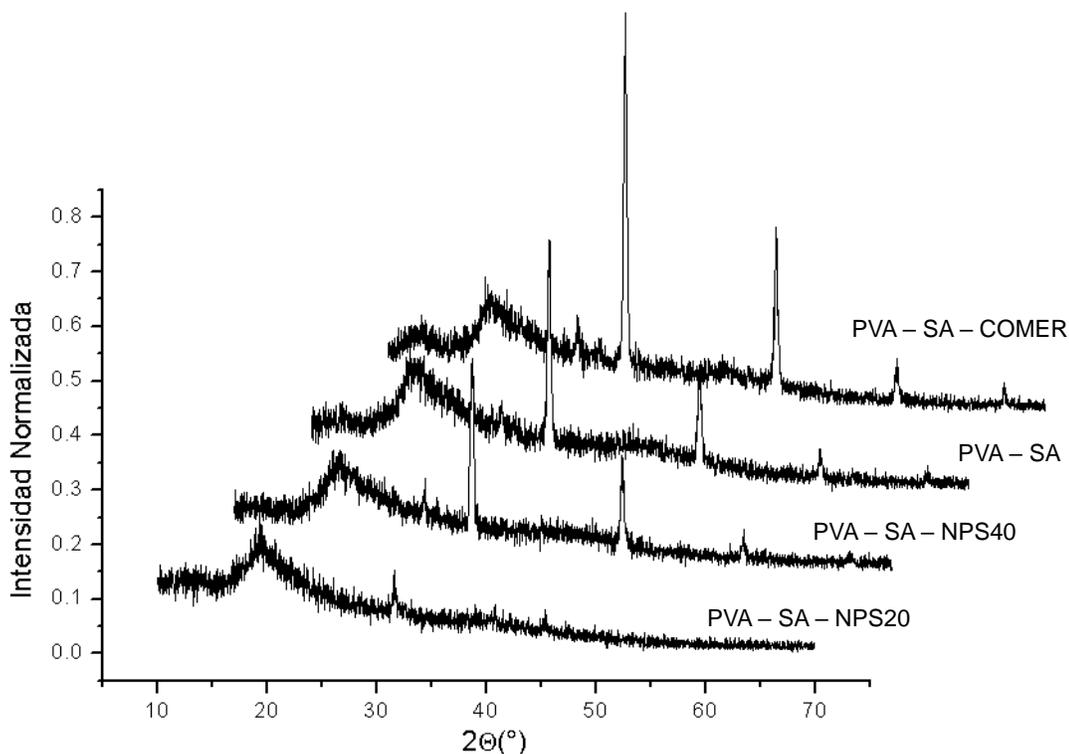


Figura 39. Perfiles DRX de los hidrogeles nanocompuestos y sus referencias no ensayados.

Sin embargo, el efecto entrecruzante de los iones Ca^{2+} liberados está limitado por la velocidad de disolución de las NPs. Es entonces cuando el área superficial de las NPs juega un papel más relevante en los hidrogeles de SA, generando interacciones entre su superficie y las cadenas poliméricas, pero también reduciendo el contacto entre ellas. Las NPs de HAp no solo proveen los iones para el entrecruzado de las cadenas de SA, también funcionan como “puntos enlazantes”, reduciendo los dominios cristalinos dentro del hidrogel. Esta idea coincide plenamente con los principios de actuación de los vidrios bioactivos, destacando la importancia de mantener su amorficidad, al menos en sus primeras etapas de aplicación, brindando una adecuada cinética de disolución y un mejor desempeño [269]. Al igual que las NPs de HAp, las NPs VB se conforman de calcio y aportan iones Ca^{2+} . Sin embargo, como se analizó anteriormente, el reducido tamaño de NPS20, su mayor área superficial y su composición química (cristalitos de hidroxiapatita) influyen sobre la microestructura del hidrogel. Mientras que NPS40, estando más aglomeradas e impurificadas con otras fases (CaCO_3),

reducirán el efecto de “punto enlazante” con las cadenas de SA. Incluso, se observa que la adición de las NPS40 a la matriz polimérica no mostró efecto de amorfización, con respecto al hidrogel PVA-SA. La adición de partículas de BG comercial con mayor tamaño, incrementó el carácter cristalino del hidrogel, incluso más que la matriz polimérica pura PVA-SA.

Los difractogramas correspondientes a los hidrogeles sometidos al ensayo de bioactividad se muestran en la Figura 40. Después de 14 días de permanecer en la solución de Hank’s, los hidrogeles mostraron su capacidad formadora de apatita (HAp). De acuerdo a la literatura, la nucleación y crecimiento de apatita (biomineralización) se monitorea a través de la intensidad de los picos localizados en 21.8, 31.7, 45.5 y 56.4° 2 θ , correspondientes a los planos (2 0 0), (2 1 1), (2 0 3) y (3 2 2), respectivamente [340]. Estos picos se han identificado también en hidrogeles PVA - Fibroina de seda – vidrio bioactivo, después de 7 días de sumergidos en SBF [342]. Cabe resaltar que en las etapas tempranas de la apatita no se observan los picos característicos de la HAp estequiométrica, puesto que su carácter cristalino aún es débil. Sin embargo, conforme crecen los cristallitos, su ordenamiento se incrementa. Las intensidades del pico (2 1 1) correspondientes a los hidrogeles ensayados se muestran como I_f en la Tabla 14.

Tabla 14. Intensidades del pico (2 1 1) antes (I_o) y después del ensayo de bioactividad (I_f) por 14 días.

	NPS20	NPS40	PVA-SA	BG comer
Final (I_f)	73	51	100	85
Inicial (I_o)	10	39	47	75
Diferencia ($I_f - I_o$)	63	12	53	10

A través de los difractogramas se identifica un crecimiento en la intensidad de las reflexiones, en específico para el hidrogel preparado con NPS20. Se puede argumentar que la diferencia en la intensidad de la reflexión (2 1 1) entre el hidrogel no ensayado y el ensayado nos proporciona una medición del grado de biomineralización obtenido en los hidrogeles. Bajo éste argumento, la mayor capacidad bioactiva se observó para

NPS20 y su hidrogel, debido principalmente a su mayor area superficial. El mejorado efecto bioactivo de éste hidrogel hubiese sido más evidente si se hubiera prolongado el ensayo. Sin embargo, son evidentes sus ventajas ante la matriz polimérica. Por ejemplo, pasado el tiempo, la matriz polimérica PVA-SA tenderá a la degradación y su efecto bioactivo se reducirá. Por otro lado, la unión de las cadenas de SA mediante las NPs de vidrio bioactivo, así como la liberación de iones controlada y prologanda, permitirá extender el desempeño y eficacia del biomaterial. Aún más, se considera que las NPs dispersas en el hidrogel mejoran las propiedades mecánicas.

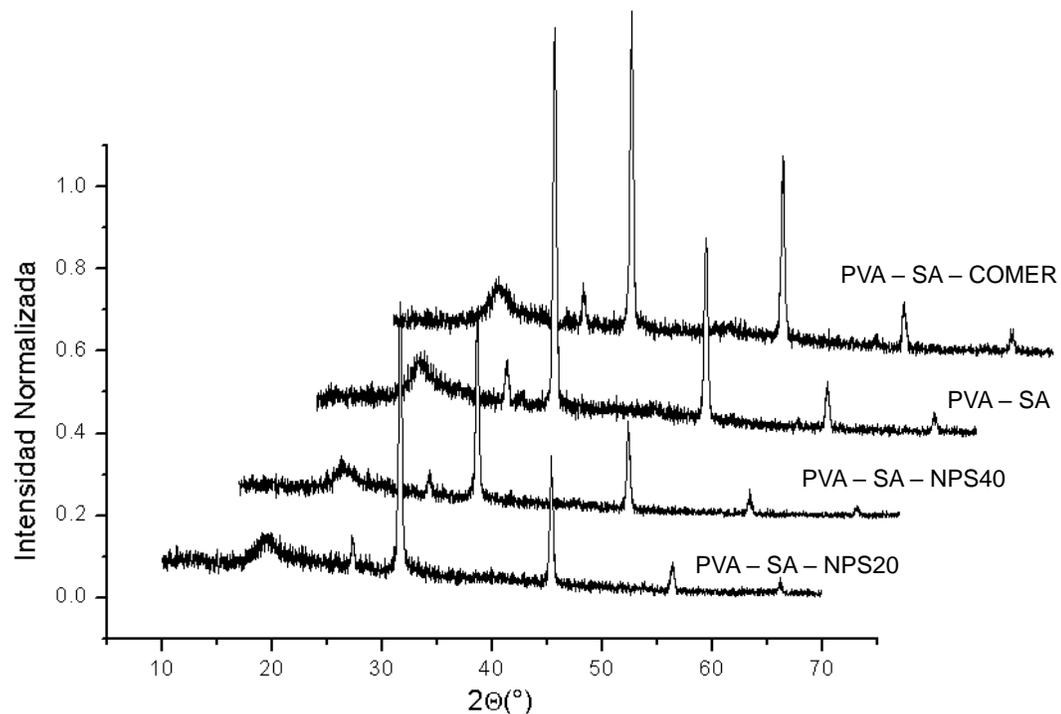


Figura 40. Perfiles DRX de los hidrogeles nanocompuestos y sus referencias ensayados 14 días en solución de Hank´s. La nucleación de apatita se puede monitorear a través del pico (2 1 1), localizado en $31.7^\circ 2\theta$.

CAPITULO VI. ESTUDIO DEL COMPUESTO CS – AuNPs

6.1 Resultados y discusión

6.1.1 Análisis de grupos funcionales

La Figura 41 muestra los espectros IR del compuesto CS/AuNPs, con concentración constante de HAuCl_4 y diferentes cantidades de SC; CS puro y relaciones molares de HAuCl_4 /citrato de sodio 0.1, 0.21, 1.2 y 5. La banda a 3300 cm^{-1} se produce por estiramiento simétrico de los grupos $-\text{OH}$. La banda en 2880 cm^{-1} se asocia con un estiramiento simétrico del grupo metilo, la banda presente en 1640 cm^{-1} pertenece a $\text{C}=\text{O}$ antisimétrica, del citrato, además, la banda en 1550 cm^{-1} se asigna a la deformación antisimétrica de NH_3^+ . La banda a 1410 cm^{-1} se produce por estiramiento $\text{C}-\text{N}$. La banda de estiramiento a 1025 cm^{-1} está relacionada con $\text{C}-\text{O}$ [181], [343]–[345].

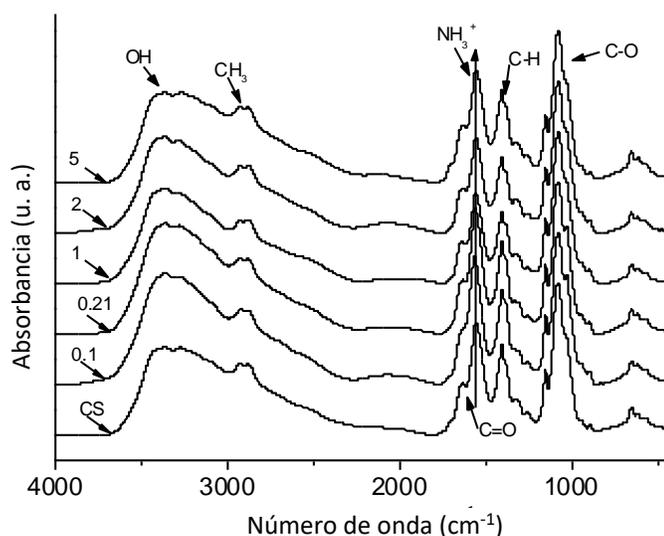


Figura 41. Espectro FT-IR de CS puro y compuestos CS/AuNPs con relación HAuCl_4 /SC (M/M, relación molar) de 0.1, 0.21, 1.2 y 5. Nótese que la región 3200 a 3500 cm^{-1} revela una sutil ampliación de las bandas vibracionales correspondientes al hidrogeno enlazado.

Las características sobresalientes de los espectros FT-IR se encuentran en la vecindad de la banda de 1640 cm^{-1} , donde la intensidad del espectro disminuye con la

concentración de SC. Este efecto podría atribuirse a la baja eficacia del citrato de sodio para reducir el oro.

6.1.2 Morfología

Las Figuras 42a y 42b muestran las micrografías SEM de una matriz de CS con una distribución homogénea de AuNPs embebidas. Usando el software AutoCAD 2007, las dimensiones de las NPs pueden ser obtenidas. La Figura 42c muestra el histograma de distribución de tamaño de partícula para la relación HAuCl_4/SC igual a 1: este histograma se obtuvo de 3 micrografías. La mayoría de las NPs se dimensionan entre 8 y 11 nm (76%). Incrementando la relación HAuCl_4/SC de 0 a 1 el tamaño de partícula disminuye; al aumentar aún más, el tamaño de las partículas aumenta ligeramente.

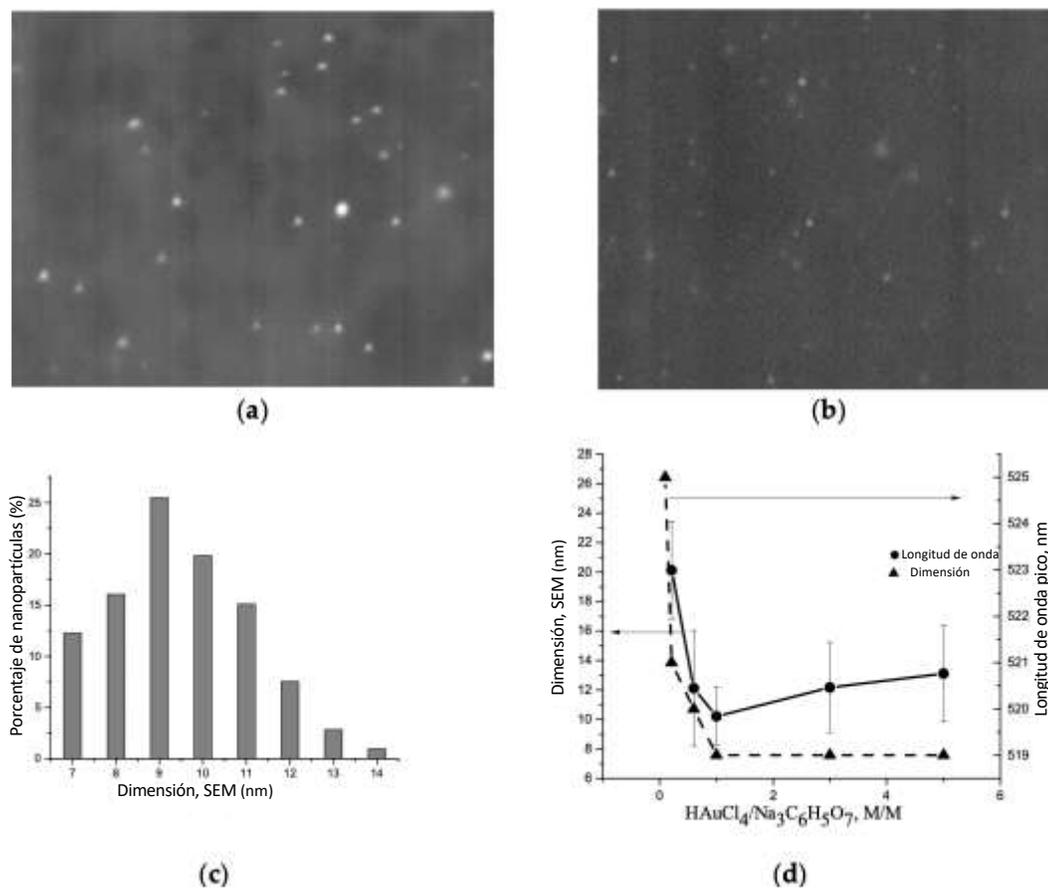


Figura 42. Micrografías SEM de las películas CS/AuNPs con relación molar HAuCl_4/SC de a) 0.21 y b) 1.0; c) Histograma de la distribución de tamaño de partícula para la relación igual a 1.0; d) Dependencia de la absorción máxima en el espectro UV-Vis sobre la relación molar HAuCl_4/SC .

De manera similar, la máxima absorción en el espectro UV-Vis disminuye y luego permanece casi constante (Fig. 42d). El desplazamiento de la banda de absorción máxima a una longitud de onda más baja confirma la reducción del tamaño de AuNPs. En la síntesis convencional de Turkevich para las AuNPs, donde se usa citrato de sodio como agente reductor (sin quitosano), el aumento en la concentración de SC genera una reducción del tamaño de partícula [153]. Debe resaltarse que, a través del uso del CS como agente reductor, disminuye la cantidad de citrato de sodio, reduciendo el tamaño de las NPs. Este comportamiento puede explicarse mediante la capacidad reductora del CS y la presencia de grupos amino e hidroxilo libres en su estructura, sus propiedades policationicas y quelantes. Las cualidades de este polisacárido permiten su uso como estabilizador y agente reductor en la síntesis de AuNPs [345]. Además, un excesivo volumen de HAuCl_4 promueve una nucleación de tamaño de partícula más pequeño y polidispersidad [345].

6.1.3 Análisis termogravimétrico

El análisis termogravimétrico (TGA) se realizó para determinar el contenido de agua libre durante el calentamiento, a través de la pérdida en peso. La evaporación de agua se identificó mediante la pérdida de peso a 120°C . La Figura 43 muestra la dependencia del contenido de humedad en función de la relación molar HAuCl_4/SC . Conforme incrementa la relación molar HAuCl_4/SC a 1, se observa la reducción del contenido de humedad. Un aumento adicional de esta relación HAuCl_4/SC , genera una ligera reducción en el contenido de agua libre, como se observa en la Fig. 43. En este sentido, el mayor cambio en el contenido de agua libre se produce para relaciones molares HAuCl_4/SC de 0 a 1 (17 %) mientras que un cambio mínimo de 3% se observó para una relación molar HAuCl_4/SC de hasta 5. En una segunda exploración, se realizaron mediciones TGA adicionales sobre películas recocidas, durante 30 minutos a 120°C y, posteriormente, enfriadas a temperatura ambiente. En estas películas el contenido de agua fue de 0.2 %w.

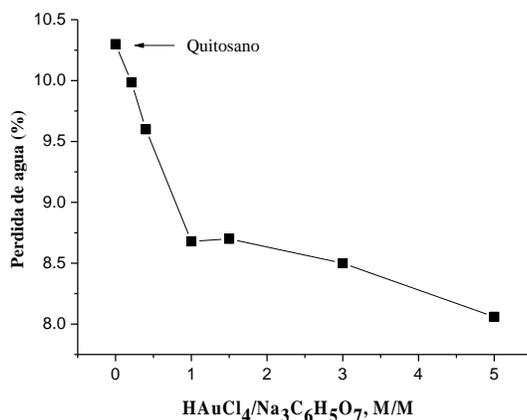


Figura 43. Dependencia del contenido de agua sobre la relación molar HAuCl₄/SC.

6.1.4. Conductividad

Los espectros de impedancia compleja (Z'' contra Z') para todas las películas exhiben características semicirculares en altas frecuencias y respuesta cuasi-lineal a bajas frecuencias (Figura 44 b). La respuesta lineal a bajas frecuencias puede asociarse con polarización interfacial o efectos de contacto metálico [192]. Los valores de resistencia DC R_{dc} se han obtenido ajustando el semicírculo de frecuencia alta del espectro de impedancia, antes de la intersección con las partes reales, como se muestra en el inserto de la Fig. 44. La correspondiente conductividad DC (σ_{dc}) se ha obtenido a partir de la ecuación $\sigma_{dc} = d/(R_{dc} \times S)$ donde d es el espesor de la película y S es el área de la película.

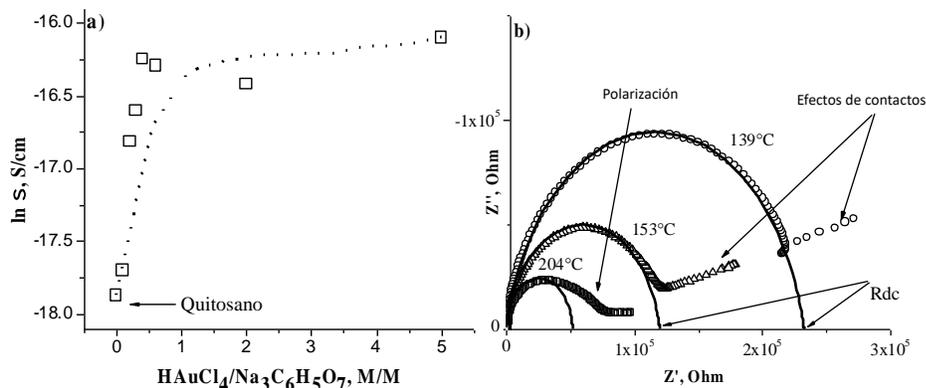


Figura 44. Dependencia de la conductividad DC sobre la relación molar HAuCl₄/SC.

El inserto muestra el espectro de impedancia obtenido a la temperatura indicada en el gráfico.

En la Fig. 44 se puede observar que la conductividad del nanocompuesto aumenta desde 0 hasta una relación molar HAuCl₄/SC de 1.0; para una relación molar HAuCl₄/SC más alta, la conductividad permanece casi constante (saturación). Esta observación concuerda cualitativamente con los resultados mostrados en la Fig. 42; presentando saturación tanto en el tamaño de NPs como en la conductividad.

6.1.5 Propiedades dieléctricas

Las mediciones dieléctricas se realizaron en un rango de frecuencia contemplado entre 40 Hz y 110 MHz. Cada muestra se mantuvo por 3 minutos a cada temperatura, asegurando el equilibrio térmico. Para reducir la humedad de las películas, se realizaron mediciones adicionales en una celda a vacío. Las muestras recién preparadas, se recoció a 120° C por 1 hora en una celda a vacío antes de las mediciones, continuando a vacío con el enfriamiento a temperatura ambiente. Además, se utilizó un elemento de calentamiento Peltier para realizar las mediciones desde 0 hasta 100° C.

Las mediciones dieléctricas proveen información acerca de los procesos de relajación de temperatura en el nanocomposito. En los compositos polímero – MNPs, tanto la corriente iónica y la polarización interfacial podrían comúnmente enmascarar los procesos reales de relajación dieléctrica en el rango de baja frecuencia. Por tanto, para analizar el proceso dieléctrico, se ha convertido la permitividad ϵ^* al módulo eléctrico complejo M^* mediante la ecuación 14:

$$M^* = \frac{1}{\epsilon^*} = M' + iM'' = \frac{\epsilon'}{\epsilon'^2 + \epsilon''^2} + i \frac{\epsilon''}{\epsilon'^2 + \epsilon''^2} \quad \text{ec. (14)}$$

donde M' es la parte real y M'' la parte imaginaria del módulo eléctrico, ϵ' es la parte real y ϵ'' la parte imaginaria de la permitividad. En esta representación, la polarización interfacial y las contribuciones del electrodo se suprimen esencialmente [346]. El tiempo de relajación correspondiente se puede calcular mediante la siguiente relación: $\tau = 1/(2\pi f_p)$, donde f_p es la frecuencia pico en la dependencia de M'' sobre la frecuencia [193].

Un estudio reciente reportó tres relajaciones moleculares en nanocompuestos CS-Au basados en mediciones dieléctricas [193]:

1) en el rango de temperatura de 25-70°C se revela un comportamiento no lineal,
 2) un comportamiento lineal en el rango de temperatura de 70-150°C, y
 3) a temperaturas superiores a los 160°C, se desencadena la degradación del polímero.
 De acuerdo con este análisis, la Figura 45 muestra las dependencias del tiempo de relajación con la temperatura recíproca según la metodología descrita en [346] para una relación molar H_{AuCl₄}/SC de 0.21.

En el rango de temperatura de 25 a 70° C, el proceso de relajación no lineal puede ajustarse mediante la relación Vogel-Fulcher-Tamman (VFT) $\tau = \tau_0 \exp\left(\frac{DT_0}{T - T_0}\right)$, donde T_0 es la temperatura de Vogel, τ_0 y D son los parámetros dependientes empíricos del material.

En el proceso de relajación (80-150° C), se observó una dependencia lineal tipo Arrhenius ($\tau = \tau_0 \exp\left(\frac{E_{a\tau}}{RT}\right)$) para películas recién preparadas y en un rango de 22-150° C para películas secas (recocidas a vacío a temperatura de 120° C).

La relajación σ aparece cuando predomina la conductividad iónica en los nanocompuestos CS-Au, en el CS puro y la mayoría de los polisacáridos [345]. Esta relajación aparece debido a la migración de iones, responsable de la polarización dieléctrica adicional en sistemas amorfos y eléctricamente no homogéneos.

La relajación no lineal α está relacionada con la transición vítrea apareciendo en nanocompuestos CS-Au húmedos. La Figura 46 muestra la temperatura de Vogel T_0 en función de la relación molar H_{AuCl₄}/SC; se espera un comportamiento análogo para la temperatura de transición vítrea de dichos nanocompuestos a 50-70 K por encima de T_0 [193].

La Figura 46 muestra que la existencia de un exceso de H_{AuCl₄} es responsable de la "anomalía" de temperatura de Vogel. La temperatura de Vogel T_0 es la temperatura de activación aparente de la relajación α en muchos polímeros; T_0 suele ser 50–70 K más baja que la temperatura de transición vítrea [192].

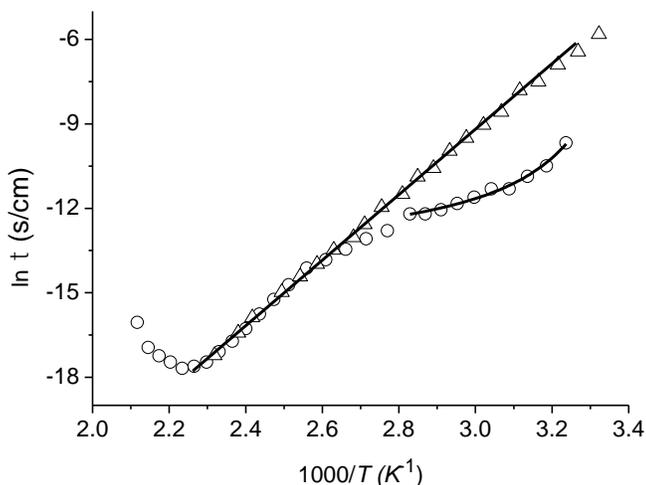


Figura 45. Dependencia del tiempo de relajación sobre la temperatura recíproca en películas recién preparadas (círculos) y recocidas (triángulos) para una relación molar HAuCl_4/SC de 0.21. Nótese un ajuste lineal tipo Arrhenius asociado a la relajación σ (energía de activación 103.2 kJ/mol) y el ajuste no lineal VFT asociado a una relajación α (transición vítrea).

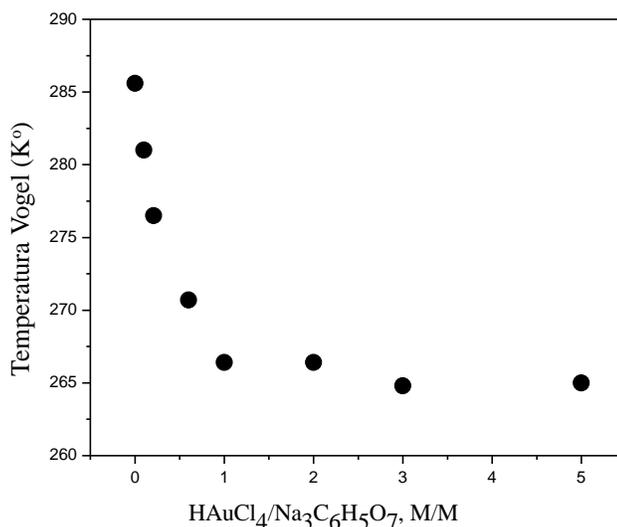


Figura 46. Dependencia de la temperatura Vogel sobre la relación molar HAuCl_4/SC . Nótese que la transición vítrea de la mayoría de los polímeros amorfos es de 50-70 K más alta que T_o .

Se han preparado nanocompuestos CS/Au con diferentes relaciones molares HAuCl_4/SC y es viable pensar que una porción del HAuCl_4 se acomplejará en las películas y podrá participar en la conductividad DC iónica observada. Al disminuir la concentración de SC (aumento del HAuCl_4), se produce incremento de la

conductividad de la película. Cuando la relación molar HAuCl_4/SC es superior a 1.0, la capacidad reductora competitiva del CS ayuda a compensar la baja concentración de SC. La capacidad del CS para asistir la reducción del HAuCl_4 se debe a la presencia de los grupos amino e hidroxilo libres. Este efecto es responsable de la saturación en el tamaño de partícula (Fig. 42c), la conductividad (Fig. 44), la absorción de agua (Fig. 43) y la temperatura de Vogel (Fig. 46).

La absorción de agua en películas puras de CS promueve un efecto plastificante; por esta razón, en las muestras con menor contenido de humedad, baja la temperatura de Vogel [193]. Sin embargo, en el caso de los nanocompuestos CS/AuNPs, la temperatura de Vogel disminuye con el incremento de la relación molar HAuCl_4/SC , aun cuando el contenido de humedad disminuya (ver Fig. 43 y Fig. 46). De acuerdo a un trabajo anterior de investigación [345], las AuNPs con una relación molar HAuCl_4/SC baja, se unen al CS a través de enlaces de hidrógeno entre el sodio acomplejado y los grupos amino del CS. Al aumentar la relación molar HAuCl_4/SC , el sodio acomplejado disminuye y la interacción entre AuNPs y CS podría deberse a fuerzas electrostáticas (debido a la polarización de la superficie de las NPs).

Este efecto es responsable de la reducción de las temperaturas de Vogel y transición vítrea. Se puede obtener una conclusión similar de las dependencias del tamaño de partícula (Fig. 42c) y la conductividad en relaciones molares HAuCl_4/SC superiores a 1.0.

Cabe señalar que, al variar la relación molar HAuCl_4/SC , se pueden ajustar con precisión la absorción de agua, la conductividad y la temperatura de transición vítrea del nanocompuesto. Las muestras preparadas con bajas relaciones molares HAuCl_4/SC tienen moléculas de sodio más acomplejadas. Estas moléculas forman enlaces de hidrógeno con la matriz polimérica y el agua puede unirse al grupo -OH del CS. Por otro lado, las películas con altas relaciones molares HAuCl_4/SC , tienen moléculas de sodio menos acomplejadas, por lo que la cantidad de enlaces de hidrógeno también es menor.

Además, cualquier exceso de HAuCl_4 puede reducirse potencialmente por las capacidades reductoras del CS. Aunque el proceso de reducción por CS no se conoce bien, es posible que los grupos OH puedan actuar como grupo reductor en la formación de NPs [347]. Las AuNPs cargadas superficialmente pueden adherirse a los grupos NH^{3+} mediante fuerzas electrostáticas. La absorción de agua de los nanocompuestos es menor para los preparados con relaciones molares HAuCl_4/SC más altas debido a la reducción en la concentración de enlaces de hidrógeno.

CAPITULO VII. CONCLUSIONES Y PUBLICACIONES

7.1 Conclusiones NPs VB

- 1) El efecto de la concentración de calcio en la formulación de las NPs VB se observó desde su síntesis química y se reconoció como un factor clave en el control de su dispersión y la formación de subproductos.
- 2) Se obtuvieron NPs esféricas compuestas de VB e HAp, mediante la técnica sol-gel-co-precipitación y radiación ultrasónica, presentando tamaños de diámetro en el orden de los nanómetros. Su aglomeración se debe principalmente a la excesiva concentración de iones Ca^{2+} en el medio de preparación y a la precipitación de éstos sobre su superficie, modificando la carga eléctrica superficial y reduciendo las fuerzas de repulsión entre ellas.

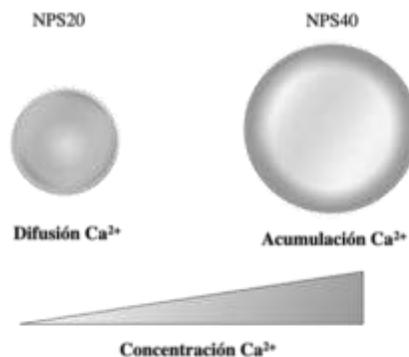


Figura 47. Relación entre tamaño, área superficial y difusión de Ca^{2+} en las NPs VB, durante el tratamiento térmico. El Ca^{2+} se difunde en NPS20, mientras que en NPS40 se acumula en su superficie.

- 3) La identificación de fosfatos y siloxanos en NPS20 revela que se compone de silicato e HAp. Los ortofosfatos y fosfatos ácidos indican que la HAp se encuentra en etapa temprana de crecimiento sobre el gel de silicio (cristalitos, en escala nanométrica). La adición de bajas concentraciones de CaNT ($\leq 20\%$ mol CaO) en la formulación, incrementa el carácter cristalino de HAp formada. Mientras que mayores concentraciones de CaNT tenderán a la formación y acumulación de ACP en la superficie de las NPs. Una acumulación excesiva de

ACP proveera las condiciones óptimas para el surgimiento de ACC y los polimorfismos de CaCO_3 , como se observa para NPS30 y NPS40

- 4) Una red de SiO_2 más polimerizada (especies de silicio Q^2 , Q^3 y Q^4) en el silicato será favorecida a menores adiciones de CaNT ($\leq 20\%$ mol CaO) en la formulación. Además, una superficie más limpia en las NPS20 exhibirá mayor concentración de Si-OH (formación del gel) fundamentales para la nucleación y crecimiento de la HAp. La presencia de especies que interactúan con las moléculas de agua como Si-OH y Ca-OH en la superficie de NPS20 señalan la habilidad que presenta para la nucleación y crecimiento de la HAp.
- 5) La mayor concentración de ortofosfatos (Q^0) en NPS20 revela su integración a la red del silicato fungiendo como modificadores de red, pero junto con las especies de fosfato Q^2 caracterizan a un cristal de HAp en etapa de crecimiento. Las elevadas concentraciones de Q^0 y Q^2 revelan la cinética de transformación entre los ortofosfatos liberados de la matriz de silicio, así como su inmediata y eficiente reacción química con los iones Ca^{2+} formando HAp. La elevada concentración de metafosfatos Q^1 (especies intermedias) en NPS30 y NPS40 confirman la acumulación de ACP en su superficie y el detrimento de la cinética de transformación a HAp.
- 6) La cristalinidad de la HAp se reduce con mayores adiciones de CaNT ($\geq 30\%$ mol CaO), mientras que la cristalinidad global ($\text{HAp} + \text{CaCO}_3$) de las NPs VB se incrementa con mayores adiciones de CaNT. Es posible que exista una cinética para la nucleación de CaCO_3 en las NPs VB dependiente de la formación y acumulación de ACP.

La integración gradual de CO_3^{2-} en la red de la apatita, así como la nucleación de CaCO_3 en las NPs VB restringen el crecimiento de HAp (Principio de biomineralización).

7.2 Conclusiones Compuesto PVA-SA-NPs VB

- 1) La relación de polímeros PVA/SA será determinante en la microestructura del hidrogel obtenido e influirá en los procesos de difusión e intercambio de fluidos. A pesar de comprobar que SA gobierna la absorción de agua en los hidrogeles, no será el único parámetro a considerar, también parámetros como porosidad, densidad de entrecruzamiento y fracción gel influirán en los procesos de hidratación y evaporación.
- 2) A través de la microestructura y composición de los hidrogeles, es posible modular su capacidad de absorción/desorción de agua, siendo un requerimiento importante para aplicaciones biomédicas como la liberación de fármacos de forma controlada o el suministro de nutrientes en soportes celulares. Si los poros son demasiado grandes, disminuye el área superficial disponible para la adhesión celular, afectando también las propiedades mecánicas y acelerando su degradación.
- 3) La mezcla homogénea y en proporciones adecuadas de los polímeros PVA y SA, brindará las condiciones óptimas para generar una red de cadenas interpenetradas, mostrando un aumento de hasta 1 orden de magnitud en los valores de dureza para los sistemas doblemente entrecruzados (S1- CaCl_2 y S2- CaCl_2). El doble entrecruzado C/D + CaCl_2 brinda una estrategia más para regular las propiedades mecánicas de los hidrogeles y su cinética de degradación, sin la adición de entrecruzantes tóxicos.
- 4) El hidrogel preparado con la relación 65:35 %v/v, dos ciclos de entrecruzado C/D y adición de CaCl_2 (S2- CaCl_2) presentó elevada dureza, capacidad de absorción y desorción controlada de agua, así como baja cinética de degradación, siendo el mejor candidato para la dispersión de las NPs.

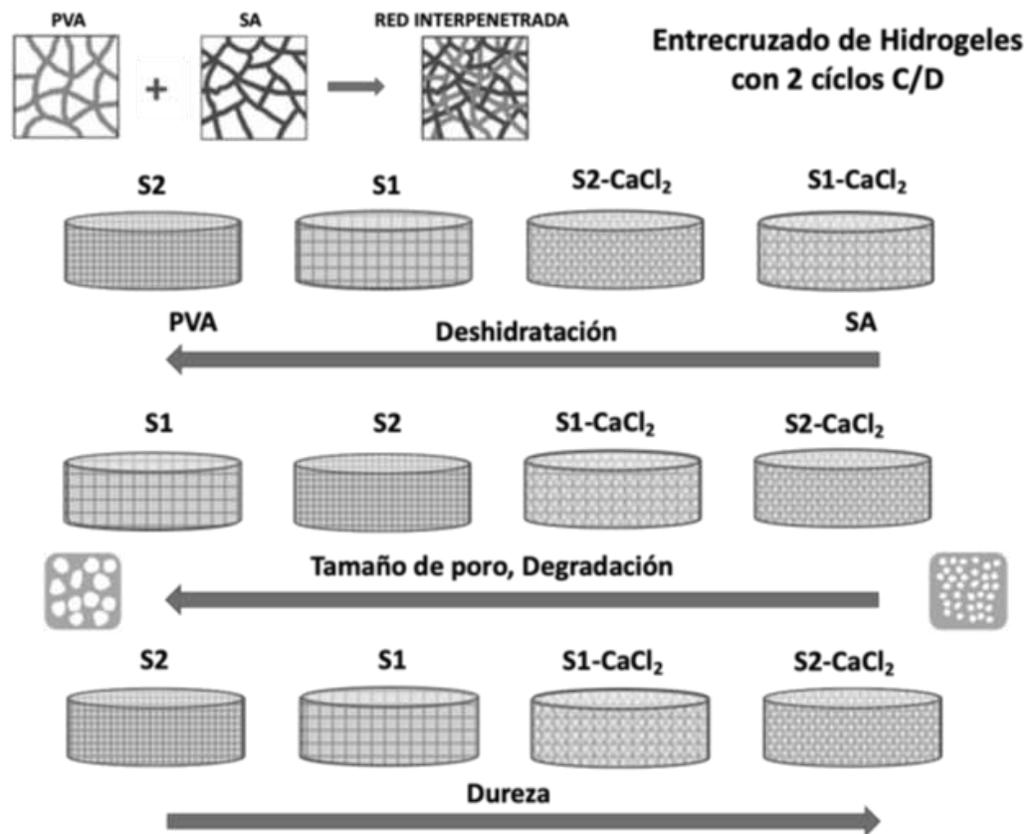


Figura 49. Resumen de las características evaluadas en los hidrogel PVA-SA y su ordenamiento de acuerdo a las propiedades fisicoquímicas y microestructurales.

- 5) El uso de NPs VB con reducida aglomeración e incrementada área superficial (NPS20), así como la generación de dominios cristalinos en el hidrogel, brindarán una superficie más homogénea para la nucleación y el crecimiento de la apatita (HAp). La elevada área superficial de las NPs VB garantiza su disolución y la liberación de iones Ca^{2+} y PO_4^{3-} , mientras que el hidrogel funge como su vehículo protegiéndolas, manteniéndolas dispersas y húmedas, optimizando su desempeño.
- 6) Se espera que la adición de las NPS20 mejoren aún más las propiedades mecánicas del hidrogel, al incrementarse las interacciones superficiales con las cadenas poliméricas (efecto reforzante) y la generación de dominios cristalinos. Además de mostrar un retraso en su degradación debido a la continua liberación de iones Ca^{2+} desde las NPs, manteniendo el entrecruzado de las cadenas SA.

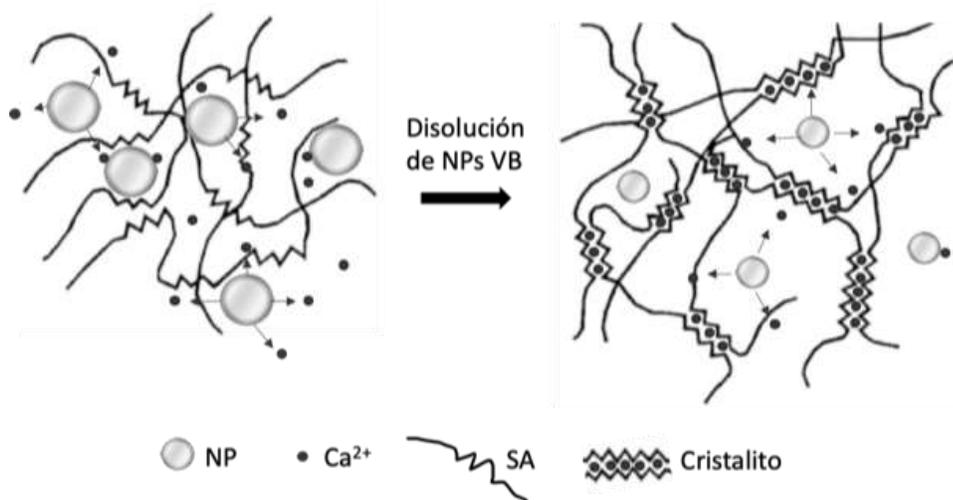


Figura 50. Desarrollo de dominios cristalinos de calcio en el hidrogel PVA-SA-NPs VB. La liberación de iones Ca^{2+} desde NPs VB, permite el entrecruzado de las cadenas SA.

7.3 Conclusiones Compuesto CS – AuNPs

- 1) Se han sintetizado películas delgadas de CS/AuNPs por reducción química de HAuCl_4 en presencia de soluciones de citrato de sodio (SC) y quitosano (CS). La estructura, la conductividad y las propiedades de relajación de las películas de CS/AuNPs se han investigado en función de la relación molar HAuCl_4/SC .
- 2) La relación molar HAuCl_4/SC afecta los tamaños de AuNPs debido a las capacidades adicionales del CS como agente reductor. Se ha propuesto un modelo descriptivo para entender la reacción entre HAuCl_4 , SC, CS y ácido acético, demostrando que un exceso de HAuCl_4 es responsable de las dependencias de conductividad, temperatura de Vogel y absorción de agua en los nanocompuestos CS/AuNPs.
- 3) El valor de la relación molar HAuCl_4/SC de 1.0 es un umbral de la relación molar. A mayores relaciones molares HAuCl_4/SC , la capacidad reductora del CS conduce a la saturación de la cantidad libre de HAuCl_4 y, posteriormente, a la saturación de todas las propiedades de los nanocompuestos CS/AuNPs.

7.4 Publicaciones

- 1) L. R. Torres-Ferrer, J. M. López-Romero, J. Mendez-Nonell, M. J. Rivas-Arreola, M. Moreno-Ríos, E. O. Ávila-Dávila, E. Prokhorov, Y. Kovalenko, D. Zarate-Triviño, J. R. Revilla-Vazquez, M. A. Meraz-Ríos, G. Luna-Barcenas. “Tuning $\text{H}_2\text{O}/\text{Sodium citrate}$ stoichiometry to fabricate Chitosan-Au Nanocomposites”. *Polymers* (2022), 14, 768. DOI: 10.3390/polym14040788

- 2) E. Estrada- Cabrera, L. R. Torres-Ferrer, G. Luna Barcenas, R. Ramirez-Bon. “Cellulose dialysis membrane containing raw clinoptilolite enhances the removal of Rhodamine 6G from aqueous solution”. *Microporous Mesoporous Mater.* 321 (2021) 111113. DOI: 10.1016/j.micromeso.2021.111113

- 3) E. Estrada-Cabrera, L. R. Torres-Ferrer, O. G. Aztatzi-Aguilar, A. De Vizcaya-Ruíz, M. A. Meraz-Ríos, D. G. Zarate-Triviño, A. Arizmendi-Morquecho, A. de Luna-Bugallo, E. Prokhorov, G. Luna-Barcenas. “Chitosan-bioglass coatings on partially nanostructured anodized Ti-6Al-4V alloy for biomedical applications”. *Surf. Coatings Technol.* 375 (2019), 468-476. DOI: 10.1016/j.surfcoat.2019.07.002

CAPITULO VIII. PERSPECTIVAS

Para continuar esta investigación se proponen algunas actividades que complementarían los fundamentos teóricos aplicados, así como los conocimientos desarrollados durante éste proyecto.

- 1) Analizar el efecto de menores adiciones de CaNT (< 20% mol CaO) sobre el tamaño en las NPs VB, su dispersión, disolución y bioactividad.
- 2) Estudiar la cinética de liberación de iones en las NPs VB obtenidas y relacionarla con la concentración de CaNT adicionada en la formulación, acoplando y optimizando su solubilidad y la cinética de transformación a HAp.
- 3) Investigar y aplicar estrategias para realizar el ensayo de bioactividad a las NPs VB, evitando su redispersión en la matriz polimérica y eliminando la contribución de ésta.
- 4) Realizar análisis de citotoxicidad y viabilidad celular a las NPs VB en función de su composición y las fases presentes.
- 5) Completar la caracterización química, térmica y microestructural de los hidrogeles PVA-SA y los nanocompuestos, a través de técnicas como FTIR, TGA y SEM.
- 6) Realizar pruebas de compresión mecánica a los hidrogeles nanocompuestos (NPs VB), identificando el efecto reforzante de la fase inorgánica.
- 7) Realizar ensayos biológicos in vitro. Cultivos celulares sobre los nanocompuestos (PVA-SA-NPs VB).
- 8) Caracterizar la porosidad (área superficial, distribución de tamaño de poro, volumen de poro, etc.) de los hidrogeles obtenidos PVA-SA y nanocompuestos, mediante microscopía SEM y BET (absorción de Nitrogeno).
- 9) Realizar análisis de actividad osteogénica de fosfatasa alcalina (ALP), identificando la habilidad formadora de apatita de los hidrogeles nanocompuestos PVA-SA-NPsVB.

- 10) Desarrollar nanocompuestos CS - Au NPs con relaciones próximas al umbral $\text{HAuCl}_4/\text{SC} = 1$, verificando las propiedades identificadas con valores de relación más lejanas.
- 11) Analizar el efecto de variar el espesor de las membranas CS – AuNPs sobre la conductividad, propiedades térmicas y la absorción de agua.
- 12) Realizar análisis de propiedades mecánicas en las membranas CS – AuNPs.

REFERENCIAS

- [1] J. Huang and S. Best, "Ceramic biomaterials for tissue engineering," in *Tissue Engineering Using Ceramics and Polymers: Second Edition*, 2014, pp. 3–34. doi: 10.1533/9780857097163.1.3.
- [2] R. B. Heimann, *Classic and Advanced Ceramics: From Fundamentals to Applications*. 2010. doi: 10.1002/9783527630172.
- [3] C. B. Carter and M. G. Norton, *Ceramic materials: Science and engineering*. Springer New York, 2013. doi: 10.1007/978-1-4614-3523-5.
- [4] D. W. Richerson, *The Magic of Ceramics*. Wiley, 2012. doi: 10.1002/9781118392317.
- [5] M. Ohring, *Engineering Materials Science*. Elsevier, 1995. doi: 10.1016/b978-0-12-524995-9.x5023-5.
- [6] E. C. Vázquez-Malagón, *Materiales cerámicos. Propiedades, aplicaciones y elaboración*. Universidad Nacional Autónoma de México, 2005.
- [7] A. K. Varshneya and J. C. Mauro, *Fundamentals of inorganic glasses*. Elsevier, 2019. doi: 10.1016/C2017-0-04281-7.
- [8] W. H. Zachariasen, "The atomic arrangement in glass," *J Am Chem Soc*, vol. 54, no. 10, pp. 3841–3851, Oct. 1932, doi: 10.1021/ja01349a006.
- [9] J. M. Fernández-Navarro, *El vidrio*. 2003.
- [10] D. R. Uhlmann and N. J. Kreidl, *Glass – Science and Technology*, vol. 25, no. 9. Wiley, 1984. doi: 10.1002/crat.2170250905.
- [11] M. Vallet-Regí, "Ceramics for medical applications," *Journal of the Chemical Society, Dalton Transactions*, no. 2, pp. 97–108, 2001, doi: 10.1039/b007852m.
- [12] J. M. Rincon Lopez and F. Martinez Ruiz, "Los vidrios y materiales vitrocerámicos como implantes quirúrgicos," *Revista Espanola de Cirugia Osteoarticular*, vol. 19, no. 110. pp. 77–95, 1984.
- [13] C. P. Poole and F. J. Owens, *Introducción a la Nanotecnología*. 2007.
- [14] E. L. Pastor, "Contribución al estudio del comportamiento de silicio poroso nanoestructurado en fluidos corporales simulados para el desarrollo de nuevos materiales biocompatibles y biodegradables," Universitat Politècnica de València, Valencia (Spain), 2008. doi: 10.4995/Thesis/10251/1985.
- [15] S. C. Thomas, P. K. Mishra, and S. Talegaonkar, "Ceramic nanoparticles: fabrication methods and applications in drug delivery ceramic nanoparticles: fabrication methods and applications in drug delivery," no. October, 2015, doi: 10.2174/1381612821666151027153246.
- [16] S. Andreescu, M. Ornatska, J. S. Erlichman, A. Estevez, and J. C. Leiter, "Biomedical applications of metal oxide nanoparticles," in *Fine Particles in Medicine and Pharmacy*, vol. 9781461403, Springer US, 2012, pp. 57–100. doi: 10.1007/978-1-4614-0379-1_3.
- [17] A. Carvalho, A. R. Fernandes, and P. v Baptista, *Chapter 10 - Nanoparticles as delivery systems in cancer therapy: focus on gold nanoparticles and drugs*, no. 2. Elsevier Inc., 2019. doi: 10.1016/B978-0-12-814029-1.00010-7.

-
- [18] H. Hahn, "Gas phase synthesis of nanocrystalline materials," *Nanostructured Materials*, vol. 9, no. 1–8, pp. 3–12, Jan. 1997, doi: 10.1016/S0965-9773(97)00013-5.
- [19] C. De Mello Donegá, *Nanoparticles: Workhorses of nanoscience*, vol. 9783662448. 2014. doi: 10.1007/978-3-662-44823-6.
- [20] V. Pareek, A. Bhargava, R. Gupta, N. Jain, and J. Panwar, "Synthesis and applications of noble metal nanoparticles: A Review," no. July, 2017, doi: 10.1166/ asem.2017.2027.
- [21] M. H. Wakamatsu and R. Salomão, "(Unintentional) synthesis of ceramic nanoparticles," *InterCeram: International Ceramic Review*, vol. 60, no. 6, pp. 364–369, 2011.
- [22] V. Miguez-Pacheco, L. L. Hench, and A. R. Boccaccini, "Bioactive glasses beyond bone and teeth: Emerging applications in contact with soft tissues," *Acta Biomaterialia*, vol. 13. Elsevier Ltd, pp. 1–15, Feb. 01, 2015. doi: 10.1016/j.actbio.2014.11.004.
- [23] A. M. Deliormanli, "Preparation and in vitro characterization of electrospun 45S5 bioactive glass nanofibers," *Ceramics International*, vol. 41, no. 1, pp. 417–425, Jan. 2015, doi: 10.1016/j.ceramint.2014.08.086.
- [24] W. Zakrzewski, M. Dobrzyński, A. Zawadzka-Knefel, A. Lubojański, W. Dobrzyński, M. Janecki, K. Kurek, M. Szymonowicz, R. J. Wiglusz, and Z. Rybak, "Nanomaterials application in endodontics," *Materials*, vol. 14, no. 18. MDPI, Sep. 01, 2021. doi: 10.3390/ma14185296.
- [25] K. D. Lobel and L. L. Hench, "In vitro adsorption and activity of enzymes on reaction layers of bioactive glass substrates," *Journal of Biomedical Materials Research*, vol. 39, no. 4, pp. 575–579, Mar. 1998, doi: 10.1002/(SICI)1097-4636(19980315)39:4<575::AID-JBM11>3.0.CO;2-6.
- [26] R. M. Day, A. R. Boccaccini, S. Shurey, J. A. Roether, A. Forbes, L. L. Hench, and S. M. Gabe, "Assessment of polyglycolic acid mesh and bioactive glass for soft-tissue engineering scaffolds," *Biomaterials*, vol. 25, no. 27, pp. 5857–5866, Dec. 2004, doi: 10.1016/j.biomaterials.2004.01.043.
- [27] H. Keshaw, A. Forbes, and R. M. Day, "Release of angiogenic growth factors from cells encapsulated in alginate beads with bioactive glass," *Biomaterials*, vol. 26, no. 19, pp. 4171–4179, Jul. 2005, doi: 10.1016/j.biomaterials.2004.10.021.
- [28] A. M. Gatti, G. Valdrè, and Ö. H. Andersson, "Analysis of the in vivo reactions of a bioactive glass in soft and hard tissue," *Biomaterials*, vol. 15, no. 3, pp. 208–212, 1994, doi: 10.1016/0142-9612(94)90069-8.
- [29] J. A. Roether, J. E. Gough, A. R. Boccaccini, L. L. Hench, V. Maquet, and R. Jérôme, "Novel bioresorbable and bioactive composites based on bioactive glass and polylactide foams for bone tissue engineering," in *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, Dec. 2002, vol. 13, no. 12, pp. 1207–1214. doi: 10.1023/A:1021166726914.
- [30] J. F. Mano, "Bioactive glass-ceramic nanoparticles for the development of new smart and biomimetic composite biomaterials," 2006.
- [31] A. R. Boccaccini, M. Erol, W. J. Stark, D. Mohn, Z. Hong, and J. F. Mano, "Polymer/bioactive glass nanocomposites for biomedical applications: A
-

- review,” *Composites Science and Technology*, vol. 70, no. 13, pp. 1764–1776, Nov. 2010, doi: 10.1016/j.compscitech.2010.06.002.
- [32] S. Kay, A. Thapa, K. M. Haberstroh, and T. J. Webster, “Nanostructured polymer/nanophase ceramic composites enhance osteoblast and chondrocyte adhesion,” *Tissue Engineering*, vol. 8, no. 5, pp. 753–761, Oct. 2002, doi: 10.1089/10763270260424114.
- [33] E. Palin, H. Liu, and T. J. Webster, “Mimicking the nanofeatures of bone increases bone-forming cell adhesion and proliferation,” *Nanotechnology*, vol. 16, no. 9. IOP Publishing, pp. 1828–1835, Sep. 01, 2005. doi: 10.1088/0957-4484/16/9/069.
- [34] X. Yan, C. Yu, X. Zhou, J. Tang, and D. Zhao, “Highly ordered mesoporous bioactive glasses with superior in vitro bone-forming bioactivities,” *Angewandte Chemie - International Edition*, vol. 43, no. 44, pp. 5980–5984, Nov. 2004, doi: 10.1002/anie.200460598.
- [35] N. M. Alves, I. B. Leonor, H. S. Azevedo, R. L. Reis, and J. F. Mano, “Designing biomaterials based on biomineralization of bone,” *Journal of Materials Chemistry*, vol. 20, no. 15, pp. 2911–2921, Mar. 2010, doi: 10.1039/b910960a.
- [36] D. S. Couto, N. M. Alves, and J. F. Mano, “Nanostructured multilayer coatings combining chitosan with bioactive glass nanoparticles,” in *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, Mar. 2009, vol. 9, no. 3, pp. 1741–1748. doi: 10.1166/jnn.2009.389.
- [37] Z. Wang, T. Jiang, S. Sauro, D. H. Pashley, M. Toledano, R. Osorio, S. Liang, W. Xing, Y. Sa, and Y. Wang, “The dentine remineralization activity of a desensitizing bioactive glass-containing toothpaste: An in vitro study,” *Australian Dental Journal*, vol. 56, no. 4, pp. 372–381, Dec. 2011, doi: 10.1111/j.1834-7819.2011.01361.x.
- [38] E. Gjorgievska and J. W. Nicholson, “Prevention of enamel demineralization after tooth bleaching by bioactive glass incorporated into toothpaste,” *Australian Dental Journal*, vol. 56, no. 2, pp. 193–200, Jun. 2011, doi: 10.1111/j.1834-7819.2011.01323.x.
- [39] C. Lin, C. Mao, J. Zhang, Y. Li, and X. Chen, “Healing effect of bioactive glass ointment on full-thickness skin wounds,” *Biomedical Materials (Bristol)*, vol. 7, no. 4, 2012, doi: 10.1088/1748-6041/7/4/045017.
- [40] W. J. Stark, L. Mädler, M. Maciejewski, S. E. Pratsinis, and A. Baiker, “Flame synthesis of nanocrystalline ceria-zirconia: Effect of carrier liquid,” *Chemical Communications*, vol. 3, no. 5, pp. 588–589, Feb. 2003, doi: 10.1039/b211831a.
- [41] Stark WJ, Mädler L, and Pratsinis SE., “Metal oxides prepared by flame spray pyrolysis - Patents - WO2004005184A1,” 2004. <https://patents.google.com/patent/WO2004005184A1/fi> (accessed May 12, 2022).
- [42] Stark WJ and Pratsinis SE, “Metal delivery system for nanoparticle manufacture - Patents - US20060229197A1,” 2004. <https://patents.google.com/patent/US20060229197> (accessed May 12, 2022).
- [43] T. J. Brunner, R. N. Grass, and W. J. Stark, “Glass and bioglass nanopowders by flame synthesis,” *Chemical Communications*, no. 13, pp. 1384–1386, 2006, doi: 10.1039/b517501a.

- [44] S. Loher, W. J. Stark, M. Maciejewski, A. Baiker, S. E. Pratsinis, D. Reichardt, F. Maspero, F. Krumeich, and D. Günther, "Fluoro-apatite and calcium phosphate nanoparticles by flame synthesis," *Chemistry of Materials*, vol. 17, no. 1, pp. 36–42, Jan. 2005, doi: 10.1021/cm048776c.
- [45] M. P. Pileni, "The role of soft colloidal templates in controlling the size and shape of inorganic nanocrystals," *Nature Materials*, vol. 2, no. 3, pp. 145–150, 2003, doi: 10.1038/nmat817.
- [46] Y. Sun, G. Guo, D. Tao, and Z. Wang, "Reverse microemulsion-directed synthesis of hydroxyapatite nanoparticles under hydrothermal conditions," *Journal of Physics and Chemistry of Solids*, vol. 68, no. 3, pp. 373–377, Mar. 2007, doi: 10.1016/j.jpics.2006.11.026.
- [47] S. Singh, P. Bhardwaj, V. Singh, S. Aggarwal, and U. K. Mandal, "Synthesis of nanocrystalline calcium phosphate in microemulsion-effect of nature of surfactants," *Journal of Colloid and Interface Science*, vol. 319, no. 1, pp. 322–329, Mar. 2008, doi: 10.1016/j.jcis.2007.09.059.
- [48] G. K. Lim, J. Wang, S. C. Ng, and L. M. Gan, "Processing of fine hydroxyapatite powders via an inverse microemulsion route," *Materials Letters*, vol. 28, no. 4–6, pp. 431–436, Oct. 1996, doi: 10.1016/0167-577X(96)00095-X.
- [49] C. Karagiozov and D. Momchilova, "Synthesis of nano-sized particles from metal carbonates by the method of reversed mycelles," *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification*, vol. 44, no. 1, pp. 115–119, Jan. 2005, doi: 10.1016/j.cep.2004.05.004.
- [50] F. J. Arriagada and K. Osseo-Asare, "Synthesis of nanosize silica in a nonionic water-in-oil microemulsion: Effects of the water/surfactant molar ratio and ammonia concentration," *Journal of Colloid and Interface Science*, vol. 211, no. 2, pp. 210–220, Mar. 1999, doi: 10.1006/jcis.1998.5985.
- [51] Lopez-Goerne T., "El proceso 'sol-gel,'" 2007. <http://tessymarialopezgoerne.blogspot.com/2007/12/el-proceso-sol-gel.html> (accessed May 13, 2022).
- [52] M. García-Hernández, "Elaboración y caracterización de polvos de BaTiO₃:Er³⁺, Yb³⁺ por el método Sol-Gel," 2008.
- [53] B. D. Stojanovic, C. R. Foschini, V. B. Pavlovic, V. M. Pavlovic, V. Pejovic, and J. A. Varela, "Barium titanate screen-printed thick films," *Ceramics International*, vol. 28, no. 3, pp. 293–298, 2002, doi: 10.1016/S0272-8842(01)00093-1.
- [54] C. J. Brinker and G. W. Scherer, *Sol-Gel Science: The Physics and Chemistry of Sol-Gel Processing*. Elsevier Inc., 2013. doi: 10.1016/C2009-0-22386-5.
- [55] Reyes-Gomez J., "Aplicación de la técnica sol-gel," Universidad de Colima, 2001. Accessed: May 12, 2022. [Online]. Available: <https://www.iberlibro.com/APLICACION%20DE%20LA%20TECNICA%20SOL-GEL-Paperback-JUAN-REYES/19183998034/bd>
- [56] De la Rosa Fox N., Piñero M., and Esquivias L., "Organic-Inorganic Hybrid Materials from Sonogels," 2002. https://www.researchgate.net/publication/237383746_Organic-Inorganic_Hybrid_Materials_from_Sonogels (accessed May 13, 2022).
- [57] D. Levy and M. Zayat, *The Sol-Gel Handbook*, vol. 1–3. Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2015. doi: 10.1002/9783527670819.

- [58] S. Lin, C. Ionescu, K. J. Pike, M. E. Smith, and J. R. Jones, "Nanostructure evolution and calcium distribution in sol-gel derived bioactive glass," *Journal of Materials Chemistry*, vol. 19, no. 9, pp. 1276–1282, Feb. 2009, doi: 10.1039/b814292k.
- [59] J. R. Jones, "Review of bioactive glass: From Hench to hybrids," *Acta Biomaterialia*, vol. 9, no. 1. Elsevier Ltd, pp. 4457–4486, Jan. 01, 2013. doi: 10.1016/j.actbio.2012.08.023.
- [60] Z. Hong, R. L. Reis, and J. F. Mano, "Preparation and in vitro characterization of novel bioactive glass ceramic nanoparticles," *Journal of Biomedical Materials Research - Part A*, vol. 88, no. 2, pp. 304–313, Feb. 2009, doi: 10.1002/jbm.a.31848.
- [61] X. Chen, B. Lei, Y. Wang, and N. Zhao, "Morphological control and in vitro bioactivity of nanoscale bioactive glasses," *Journal of Non-Crystalline Solids*, vol. 355, no. 13, pp. 791–796, May 2009, doi: 10.1016/j.jnoncrysol.2009.02.005.
- [62] G. M. Luz and J. F. Mano, "Nanoengineering of bioactive glasses: Hollow and dense nanospheres," *Journal of Nanoparticle Research*, vol. 15, no. 2, p. 1457, Feb. 2013, doi: 10.1007/s11051-013-1457-0.
- [63] D. Callister W, "Introducción a la ciencia e ingeniería de los materiales," *Ed. Reverté*, 2007. <https://books.google.com/cu/books?id=gnfPV1txXiUC&printsec=copyright#v=onepage&q&f=false> (accessed May 14, 2022).
- [64] M. Guglielmi, G. Kickelbick, and A. Martucci, *Sol-Gel Nanocomposites*. Springer New York, 2014. doi: 10.1007/978-1-4939-1209-4.
- [65] P. Fabbri, V. Cannillo, A. Sola, A. Dorigato, and F. Chiellini, "Highly porous polycaprolactone-45S5 Bioglass® scaffolds for bone tissue engineering," *Composites Science and Technology*, vol. 70, no. 13, pp. 1869–1878, Nov. 2010, doi: 10.1016/j.compscitech.2010.05.029.
- [66] Y. Minaberry and M. Jobbágy, "Macroporous bioglass scaffolds prepared by coupling sol-gel with freeze drying," *Chemistry of Materials*, vol. 23, no. 9, pp. 2327–2332, May 2011, doi: 10.1021/cm103362c.
- [67] A. García, I. Izquierdo-Barba, M. Colilla, C. L. De Laorden, and M. Vallet-Regí, "Preparation of 3-D scaffolds in the SiO₂-P₂O₅ system with tailored hierarchical meso-macroporosity," *Acta Biomaterialia*, vol. 7, no. 3, pp. 1265–1273, 2011, doi: 10.1016/j.actbio.2010.10.006.
- [68] L. Ji, Y. Si, A. Li, W. Wang, D. Qiu, and A. Zhu, "Progress of three-dimensional macroporous bioactive glass for bone regeneration," *Frontiers of Chemical Science and Engineering*, vol. 6, no. 4. Higher Education Press, pp. 470–483, Dec. 05, 2012. doi: 10.1007/s11705-012-1217-1.
- [69] M. Yazdimamaghani, D. Vashae, S. Assefa, K. J. Walker, S. v. Madihally, G. A. Köhler, and L. Tayebi, "Hybrid macroporous gelatin/bioactive-glass/nanosilver scaffolds with controlled degradation behavior and antimicrobial activity for bone tissue engineering," *Journal of Biomedical Nanotechnology*, vol. 10, no. 6, pp. 911–931, 2014, doi: 10.1166/jbn.2014.1783.
- [70] E. M. Valliant and J. R. Jones, "Softening bioactive glass for bone regeneration: Sol-gel hybrid materials," *Soft Matter*, vol. 7, no. 11. The Royal Society of Chemistry, pp. 5083–5095, Jun. 07, 2011. doi: 10.1039/c0sm01348j.

- [71] A. Larrañaga and J. R. Sarasua, "Effect of bioactive glass particles on the thermal degradation behaviour of medical polyesters," *Polymer Degradation and Stability*, vol. 98, no. 3, pp. 751–758, Mar. 2013, doi: 10.1016/j.polymdegradstab.2012.12.015.
- [72] A. Liu, Z. Hong, X. Zhuang, X. Chen, Y. Cui, Y. Liu, and X. Jing, "Surface modification of bioactive glass nanoparticles and the mechanical and biological properties of poly(l-lactide) composites," *Acta Biomaterialia*, vol. 4, no. 4, pp. 1005–1015, 2008, doi: 10.1016/j.actbio.2008.02.013.
- [73] D. D. Deligianni, N. Katsala, S. Ladas, D. Sotiropoulou, J. Amedee, and Y. F. Missirlis, "Effect of surface roughness of the titanium alloy Ti-6Al-4V on human bone marrow cell response and on protein adsorption," *Biomaterials*, vol. 22, no. 11, pp. 1241–1251, Jun. 2001, doi: 10.1016/S0142-9612(00)00274-X.
- [74] L. Ji, W. Wang, D. Jin, S. Zhou, and X. Song, "In vitro bioactivity and mechanical properties of bioactive glass nanoparticles/polycaprolactone composites," *Materials Science and Engineering C*, vol. 46, pp. 1–9, Jan. 2015, doi: 10.1016/j.msec.2014.09.041.
- [75] M. Peter, N. S. Binulal, S. v. Nair, N. Selvamurugan, H. Tamura, and R. Jayakumar, "Novel biodegradable chitosan-gelatin/nano-bioactive glass ceramic composite scaffolds for alveolar bone tissue engineering," *Chemical Engineering Journal*, vol. 158, no. 2, pp. 353–361, Apr. 2010, doi: 10.1016/j.cej.2010.02.003.
- [76] J. M. Smith, R. A. Martin, G. J. Cuello, and R. J. Newport, "Structural characterisation of hypoxia-mimicking bioactive glasses," *Journal of Materials Chemistry B*, vol. 1, no. 9, pp. 1296–1303, Mar. 2013, doi: 10.1039/c3tb00408b.
- [77] J. S. Boateng, K. H. Matthews, H. N. E. Stevens, and G. M. Eccleston, "Wound healing dressings and drug delivery systems: A review," *Journal of Pharmaceutical Sciences*, vol. 97, no. 8. John Wiley and Sons Inc., pp. 2892–2923, 2008. doi: 10.1002/jps.21210.
- [78] R. Langer, "Polymeric delivery systems for controlled drug release," *Chemical Engineering Communications*, vol. 6, no. 1–3, pp. 1–48, Jan. 1980, doi: 10.1080/00986448008912519.
- [79] B. v. Slaughter, S. S. Khurshid, O. Z. Fisher, A. Khademhosseini, and N. A. Peppas, "Hydrogels in regenerative medicine," *Adv Mater*, vol. 21, no. 0, p. 3307, Sep. 2009, doi: 10.1002/ADMA.200802106.
- [80] N. A. Peppas, "A model of dissolution-controlled solute release from porous drug delivery polymeric systems," *Journal of Biomedical Materials Research*, vol. 17, no. 6. J Biomed Mater Res, pp. 1079–1087, 1983. doi: 10.1002/jbm.820170615.
- [81] J. Boateng and O. Catanzano, "Advanced therapeutic dressings for effective wound healing - A review," *Journal of Pharmaceutical Sciences*, vol. 104, no. 11. John Wiley and Sons Inc., pp. 3653–3680, Nov. 01, 2015. doi: 10.1002/jps.24610.
- [82] J. M. Rajwade, K. M. Paknikar, and J. V. Kumbhar, "Applications of bacterial cellulose and its composites in biomedicine," *Applied Microbiology and Biotechnology*, vol. 99, no. 6. Springer Verlag, pp. 2491–2511, Feb. 28, 2015. doi: 10.1007/s00253-015-6426-3.

-
- [83] G. M. de Olyveira, L. X. Filho, P. Basmaji, and L. M. M. Costa, "Bacterial nanocellulose for medicine regenerative," *Journal of Nanotechnology in Engineering and Medicine*, vol. 2, no. 3, pp. 1–8, Aug. 2011, doi: 10.1115/1.4004181.
- [84] G. D. Mogoşanu and A. M. Grumezescu, "Natural and synthetic polymers for wounds and burns dressing," *International Journal of Pharmaceutics*, vol. 463, no. 2, pp. 127–136, Mar. 2014, doi: 10.1016/j.ijpharm.2013.12.015.
- [85] A. R. Unnithan, N. A. M. Barakat, P. B. Tirupathi Pichiah, G. Gnanasekaran, R. Nirmala, Y. S. Cha, C. H. Jung, M. El-Newehy, and H. Y. Kim, "Wound-dressing materials with antibacterial activity from electrospun polyurethane-dextran nanofiber mats containing ciprofloxacin HCl," *Carbohydrate Polymers*, vol. 90, no. 4, pp. 1786–1793, Nov. 2012, doi: 10.1016/j.carbpol.2012.07.071.
- [86] M. Sinha, R. M. Banik, C. Haldar, and P. Maiti, "Development of ciprofloxacin hydrochloride loaded poly(ethylene glycol)/chitosan scaffold as wound dressing," *Journal of Porous Materials*, vol. 20, no. 4, pp. 799–807, Aug. 2013, doi: 10.1007/s10934-012-9655-1.
- [87] A. Martínez-Felipe, C. Moliner-Estopiñán, C. T. Imrie, and A. Ribes-Greus, "Characterization of crosslinked poly(vinyl alcohol)-based membranes with different hydrolysis degrees for their use as electrolytes in direct methanol fuel cells," *Journal of Applied Polymer Science*, vol. 124, no. 2, pp. 1000–1011, Apr. 2012, doi: 10.1002/APP.35138.
- [88] J. W. Rhim, H. B. Park, C. S. Lee, J. H. Jun, D. S. Kim, and Y. M. Lee, "Crosslinked poly(vinyl alcohol) membranes containing sulfonic acid group: proton and methanol transport through membranes," *Journal of Membrane Science*, vol. 238, no. 1–2, pp. 143–151, Jul. 2004, doi: 10.1016/J.MEMSCI.2004.03.030.
- [89] L. W. Chan, J. S. Hao, and P. W. S. Heng, "Evaluation of permeability and mechanical properties of composite polyvinyl alcohol films," *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, vol. 47, no. 10, pp. 1412–1416, Oct. 1999, doi: 10.1248/CPB.47.1412.
- [90] S. Mohammad Mahdi Dadfar, G. Kavooosi, and S. Mohammad Ali Dadfar, "Investigation of mechanical properties, antibacterial features, and water vapor permeability of polyvinyl alcohol thin films reinforced by glutaraldehyde and multiwalled carbon nanotube," *Polymer Composites*, vol. 35, no. 9, pp. 1736–1743, Sep. 2014, doi: 10.1002/PC.22827.
- [91] O. W. Guirguis, M. T. H. Moselhey, O. W. Guirguis, and M. T. H. Moselhey, "Thermal and structural studies of poly (vinyl alcohol) and hydroxypropyl cellulose blends," *Natural Science*, vol. 4, no. 1, pp. 57–67, Dec. 2011, doi: 10.4236/NS.2012.41009.
- [92] C. López-De-Dicastillo, M. Jordá, R. Catalá, R. Gavara, and P. Hernández-Muñoz, "Development of active polyvinyl alcohol/ β -cyclodextrin composites to scavenge undesirable food components," *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 59, no. 20, pp. 11026–11033, Oct. 2011, doi: 10.1021/JF200749F/ASSET/IMAGES/MEDIUM/JF-2011-00749F_0003.GIF.
- [93] S. A. Riyajan, S. Chaiponban, and K. Tanbumrung, "Investigation of the preparation and physical properties of a novel semi-interpenetrating polymer network based on epoxised NR and PVA using maleic acid as the crosslinking
-

- agent,” *Chemical Engineering Journal*, vol. 153, no. 1–3, pp. 199–205, Nov. 2009, doi: 10.1016/J.CEJ.2009.05.043.
- [94] Y. Wang and Y. lo Hsieh, “Crosslinking of polyvinyl alcohol (PVA) fibrous membranes with glutaraldehyde and PEG diacylchloride,” *Journal of Applied Polymer Science*, vol. 116, no. 6, pp. 3249–3255, Jun. 2010, doi: 10.1002/APP.31750.
- [95] S. Bano, A. Mahmood, and K. H. Lee, “Vapor permeation separation of methanol–water mixtures: effect of experimental conditions,” *Industrial and Engineering Chemistry Research*, vol. 52, no. 31, pp. 10450–10459, Aug. 2013, doi: 10.1021/IE302986Y.
- [96] W. Wan, A. Dawn Bannerman, L. Yang, and H. Mak, “Poly(vinyl alcohol) cryogels for biomedical applications,” *Advances in Polymer Science*, vol. 263, pp. 283–321, 2014, doi: 10.1007/978-3-319-05846-7_8.
- [97] A. Kumar, R. Mishra, Y. Reinwald, and S. Bhat, “Cryogels: Freezing unveiled by thawing,” *Materials Today*, vol. 13, no. 11, pp. 42–44, Nov. 2010, doi: 10.1016/S1369-7021(10)70202-9.
- [98] C. M. Hassan and N. A. Peppas, “Structure and morphology of freeze/thawed PVA hydrogels,” *Macromolecules*, vol. 33, no. 7, pp. 2472–2479, Apr. 2000, doi: 10.1021/MA9907587.
- [99] A. E. Ivanov and L. Ljunggren, “Thin poly(vinyl alcohol) cryogels: reactive groups, macropores and translucency in microtiter plate assays,” *Heliyon*, vol. 5, no. 11, Nov. 2019, doi: 10.1016/J.HELIYON.2019.E02913.
- [100] A. H. A. Wahab, A. P. M. Saad, M. N. Harun, A. Syahrom, M. H. Ramlee, M. A. Sulong, and M. R. A. Kadir, “Developing functionally graded PVA hydrogel using simple freeze-thaw method for artificial glenoid labrum,” *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, vol. 91, pp. 406–415, Mar. 2019, doi: 10.1016/J.JMBBM.2018.12.033.
- [101] M. Wang, J. Bai, K. Shao, W. Tang, X. Zhao, D. Lin, S. Huang, C. Chen, Z. Ding, and J. Ye, “Poly(vinyl alcohol) hydrogels: the old and new functional materials,” *International Journal of Polymer Science*, vol. 2021, 2021, doi: 10.1155/2021/2225426.
- [102] E. Rynkowska, K. Fatyeyeva, S. Marais, J. Kujawa, and W. Kujawski, “Chemically and thermally crosslinked PVA-based membranes: effect on swelling and transport behavior,” *Polymers 2019, Vol. 11, Page 1799*, vol. 11, no. 11, p. 1799, Nov. 2019, doi: 10.3390/POLYM11111799.
- [103] S. Ceylan, D. Göktürk, and N. Bölgen, “Effect of crosslinking methods on the structure and biocompatibility of polyvinyl alcohol/gelatin cryogels,” *Biomed Mater Eng*, vol. 27, no. 4, pp. 327–340, 2016, doi: 10.3233/BME-161589.
- [104] A. Merakchi, S. Bettayeb, N. Drouiche, L. Adour, and H. Lounici, “Cross-linking and modification of sodium alginate biopolymer for dye removal in aqueous solution,” *Polymer Bulletin 2018 76:7*, vol. 76, no. 7, pp. 3535–3554, Oct. 2018, doi: 10.1007/S00289-018-2557-X.
- [105] X. Tao, Y. Wu, Y. Wu, Y. Fan, B. Zhang, H. Sha, L. Cha, and N. Liu, “Facile synthesis of metal ion-cross-linked alginate electrode for efficient organic dye removal,” *Ionics 2018 25:4*, vol. 25, no. 4, pp. 1929–1941, Aug. 2018, doi: 10.1007/S11581-018-2672-6.

- [106] G. T. Grant, E. R. Morris, D. A. Rees, P. J. C. Smith, and D. Thom, "Biological interactions between polysaccharides and divalent cations: The egg-box model," *FEBS Letters*, vol. 32, no. 1, pp. 195–198, May 1973, doi: 10.1016/0014-5793(73)80770-7.
- [107] C. H. Goh, P. W. S. Heng, and L. W. Chan, "Cross-linker and non-gelling Na⁺ effects on multi-functional alginate dressings," *Carbohydrate Polymers*, vol. 87, no. 2, pp. 1796–1802, Jan. 2012, doi: 10.1016/J.CARBPOL.2011.09.097.
- [108] K. Y. Lee and D. J. Mooney, "Alginate: Properties and biomedical applications," *Progress in Polymer Science*, vol. 37, no. 1, pp. 106–126, Jan. 2012, doi: 10.1016/J.PROGPOLYMSCI.2011.06.003.
- [109] G. Darabdhara, M. R. Das, S. P. Singh, A. K. Rengan, S. Szunerits, and R. Boukherroub, "Ag and Au nanoparticles/reduced graphene oxide composite materials: Synthesis and application in diagnostics and therapeutics," *Advances in Colloid and Interface Science*, vol. 271, p. 101991, Sep. 2019, doi: 10.1016/J.CIS.2019.101991.
- [110] G. Sharma, B. Thakur, M. Naushad, A. Kumar, F. J. Stadler, S. M. Alfadul, and G. T. Mola, "Applications of nanocomposite hydrogels for biomedical engineering and environmental protection," *Environmental Chemistry Letters* 2017 16:1, vol. 16, no. 1, pp. 113–146, Nov. 2017, doi: 10.1007/S10311-017-0671-X.
- [111] J. Lee, J. Kim, S. Kim, and D. H. Min, "Biosensors based on graphene oxide and its biomedical application," *Advanced Drug Delivery Reviews*, vol. 105, pp. 275–287, Oct. 2016, doi: 10.1016/J.ADDR.2016.06.001.
- [112] Y. Zare and I. Shabani, "Polymer/metal nanocomposites for biomedical applications," *Materials Science and Engineering: C*, vol. 60, pp. 195–203, Mar. 2016, doi: 10.1016/J.MSEC.2015.11.023.
- [113] M. Azharuddin, G. H. Zhu, D. Das, E. Ozgur, L. Uzun, A. P. F. Turner, and H. K. Patra, "A repertoire of biomedical applications of noble metal nanoparticles," *Chemical Communications*, vol. 55, no. 49, pp. 6964–6996, Jun. 2019, doi: 10.1039/C9CC01741K.
- [114] M. Rai, A. P. Ingle, S. Birla, A. Yadav, and C. A. dos Santos, "Strategic role of selected noble metal nanoparticles in medicine," *Crit Rev Microbiol*, vol. 42, no. 5, pp. 696–719, Sep. 2016, doi: 10.3109/1040841X.2015.1018131.
- [115] A. I. Ruiz-Carmuega, C. Garcia-Hernandez, J. Ortiz, C. Garcia-Cabezón, F. Martín-Pedrosa, Á. Sastre-Santos, M. A. Rodríguez-Perez, and M. L. Rodríguez-Mendez, "Electrochemical sensors modified with combinations of sulfur containing phthalocyanines and capped gold nanoparticles: a study of the influence of the nature of the interaction between sensing materials," *Nanomaterials* 2019, Vol. 9, Page 1506, vol. 9, no. 11, p. 1506, Oct. 2019, doi: 10.3390/NANO9111506.
- [116] W. Lian, S. Liu, J. Yu, X. Xing, J. Li, M. Cui, and J. Huang, "Electrochemical sensor based on gold nanoparticles fabricated molecularly imprinted polymer film at chitosan-platinum nanoparticles/graphene-gold nanoparticles double nanocomposites modified electrode for detection of erythromycin," *Biosens Bioelectron*, vol. 38, no. 1, pp. 163–169, Oct. 2012, doi: 10.1016/J.BIOS.2012.05.017.

- [117] X. Luo, A. Morrin, A. J. Killard, and M. R. Smyth, "Application of nanoparticles in electrochemical sensors and biosensors," *Electroanalysis*, vol. 18, no. 4, pp. 319–326, Feb. 2006, doi: 10.1002/ELAN.200503415.
- [118] W. Zhao, J. M. Karp, M. Ferrari, and R. Serda, "Bioengineering nanotechnology: towards the clinic," *Nanotechnology*, vol. 22, no. 49, p. 490201, Dec. 2011, doi: 10.1088/0957-4484/22/49/490201.
- [119] J. Conde, J. Rosa, J. C. Lima, and P. v. Baptista, "Nanophotonics for molecular diagnostics and therapy applications," *International Journal of Photoenergy*, vol. 2012, 2012, doi: 10.1155/2012/619530.
- [120] W. R. Heineman and W. B. Jensen, "Leland C. Clark Jr. (1918–2005)," *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 21, no. 8, pp. 1403–1404, Feb. 2006, doi: 10.1016/J.BIOS.2005.12.005.
- [121] R. S. Dey, "Development of biosensors from polymer graphene composites," *Graphene-Based Polymer Nanocomposites in Electronics*, pp. 277–305, Jan. 2015, doi: 10.1007/978-3-319-13875-6_11.
- [122] L. C. S. Figueiredo-Filho, B. C. Janegitz, O. Fatibelilo-Filho, L. H. Marcolino-Junior, and C. E. Banks, "Inexpensive and disposable copper mini-sensor modified with bismuth for lead and cadmium determination using square-wave anodic stripping voltammetry," *Analytical Methods*, vol. 5, no. 1, pp. 202–207, Dec. 2012, doi: 10.1039/C2AY26078F.
- [123] C. Dincer, R. Bruch, E. Costa-Rama, M. T. Fernández-Abedul, A. Merkoçi, A. Manz, G. A. Urban, and F. Güder, "Disposable sensors in diagnostics, food, and environmental monitoring," *Advanced Materials*, vol. 31, no. 30, p. 1806739, Jul. 2019, doi: 10.1002/ADMA.201806739.
- [124] W. R. Fahrner, U. Hilleringmann, J. T. Horstmann, R. Job, H. C. Neitzert, H. C. Scheer, A. Ulyashin, and A. D. Wieck, "Nanotechnology and nanoelectronics: Materials, devices, measurement techniques," *Nanotechnology and Nanoelectronics: Materials, Devices, Measurement Techniques*, pp. 1–269, 2005, doi: 10.1007/B137771.
- [125] E. Turkmen, S. Z. Bas, H. Gulce, and S. Yildiz, "Glucose biosensor based on immobilization of glucose oxidase in electropolymerized poly(o-phenylenediamine) film on platinum nanoparticles-polyvinylferrocenium modified electrode," *Electrochimica Acta*, vol. 123, pp. 93–102, Mar. 2014, doi: 10.1016/J.ELECTACTA.2013.12.189.
- [126] Lockwood D. J., "Nanostructure science and technology," *Book series-Springer*, 2002. <https://www.springer.com/series/6331> (accessed May 20, 2022).
- [127] G. Cao, "Nanostructures and nanomaterials," *Nanostructures and Nanomaterials*, Apr. 2004, doi: 10.1142/P305.
- [128] Y. Li, H. J. Schluesener, and S. Xu, "Gold nanoparticle-based biosensors," *Gold Bulletin 2010 43:1*, vol. 43, no. 1, pp. 29–41, 2010, doi: 10.1007/BF03214964.
- [129] D. Tian, C. Duan, W. Wang, N. Li, H. Zhang, H. Cui, and Y. Lu, "Sandwich-type electrochemiluminescence immunosensor based on N-(aminobutyl)-N-ethylisoluminol labeling and gold nanoparticle amplification," *Talanta*, vol. 78, no. 2, pp. 399–404, Apr. 2009, doi: 10.1016/J.TALANTA.2008.11.037.
- [130] Z. Yan, M. Yang, Z. Wang, F. Zhang, J. Xia, G. Shi, L. Xia, Y. Li, Y. Xia, and L. Xia, "A label-free immunosensor for detecting common acute lymphoblastic

- leukemia antigen (CD10) based on gold nanoparticles by quartz crystal microbalance,” *Sensors and Actuators B: Chemical*, vol. 210, pp. 248–253, Apr. 2015, doi: 10.1016/J.SNB.2014.12.104.
- [131] K. Sugawa, H. Tahara, A. Yamashita, J. Otsuki, T. Sagara, T. Harumoto, and S. Yanagida, “Refractive index susceptibility of the plasmonic palladium nanoparticle: Potential as the third plasmonic sensing material,” *ACS Nano*, vol. 9, no. 2, pp. 1895–1904, Feb. 2015, doi: 10.1021/NN506800A/SUPPL_FILE/NN506800A_SI_001.PDF.
- [132] N. Khlebtsov and L. Dykmana, “Biodistribution and toxicity of engineered gold nanoparticles: a review of in vitro and in vivo studies,” *Chemical Society Reviews*, vol. 40, no. 3, pp. 1647–1671, Feb. 2011, doi: 10.1039/C0CS00018C.
- [133] P. K. Jain, K. S. Lee, I. H. El-Sayed, and M. A. El-Sayed, “Calculated absorption and scattering properties of gold nanoparticles of different size, shape, and composition: applications in biological imaging and biomedicine,” *Journal of Physical Chemistry B*, vol. 110, no. 14, pp. 7238–7248, Apr. 2006, doi: 10.1021/JP057170O.
- [134] H. H. Jeong, A. G. Mark, M. Alarcón-Correa, I. Kim, P. Oswald, T. C. Lee, and P. Fischer, “Dispersion and shape engineered plasmonic nanosensors,” *Nature Communications 2016 7:1*, vol. 7, no. 1, pp. 1–7, Apr. 2016, doi: 10.1038/ncomms11331.
- [135] Y. C. Yeh, B. Creran, and V. M. Rotello, “Gold nanoparticles: preparation, properties, and applications in bionanotechnology,” *Nanoscale*, vol. 4, no. 6, p. 1871, Mar. 2012, doi: 10.1039/C1NR11188D.
- [136] K. H. Su, Q. H. Wei, X. Zhang, J. J. Mock, D. R. Smith, and S. Schultz, “Interparticle coupling effects on plasmon resonances of nanogold particles,” *Nano Letters*, vol. 3, no. 8, pp. 1087–1090, Aug. 2003, doi: 10.1021/NL034197F/ASSET/IMAGES/MEDIUM/NL034197FN00001.GIF.
- [137] G. Habibullah, J. Viktorova, and T. Ruml, “Current strategies for noble metal nanoparticle synthesis,” *Nanoscale Research Letters 2021 16:1*, vol. 16, no. 1, pp. 1–12, Mar. 2021, doi: 10.1186/S11671-021-03480-8.
- [138] S. Hasan, “A review on nanoparticles: their synthesis and types,” *Research Journal of Recent Sciences*, vol. 4, pp. 9–11, 2015, Accessed: May 21, 2022. [Online]. Available: www.isca.me
- [139] S. Sun, “Recent advances in chemical synthesis, self-assembly, and applications of FePt nanoparticles,” *Advanced Materials*, vol. 18, no. 4, pp. 393–403, Feb. 2006, doi: 10.1002/ADMA.200501464.
- [140] S. G. Booth, A. Uehara, S. Y. Chang, J. F. W. Mosselmans, S. L. M. Schroeder, and R. A. W. Dryfe, “Gold deposition at a free-standing liquid/liquid interface: evidence for the formation of Au(I) by microfocus X-ray spectroscopy (μ XRF and μ XAFS) and cyclic voltammetry,” *Journal of Physical Chemistry C*, vol. 119, no. 29, pp. 16785–16792, Jul. 2015, doi: 10.1021/ACS.JPCC.5B05127/SUPPL_FILE/JP5B05127_SI_001.PDF.
- [141] M. Starowicz and B. Stypuła, “Electrochemical synthesis of ZnO nanoparticles,” *European Journal of Inorganic Chemistry*, vol. 2008, no. 6, pp. 869–872, Feb. 2008, doi: 10.1002/EJIC.200700989.
- [142] M. T. Noman, M. Petru, J. Militký, M. Azeem, and M. A. Ashraf, “One-pot sonochemical synthesis of ZnO nanoparticles for photocatalytic applications,

- modelling and optimization,” *Materials 2020, Vol. 13, Page 14*, vol. 13, no. 1, p. 14, Dec. 2019, doi: 10.3390/MA13010014.
- [143] J. Balachandramohan, T. Sivasankar, and M. Sivakumar, “Facile sonochemical synthesis of Ag₂O-guar gum nanocomposite as a visible light photocatalyst for the organic transformation reactions,” *Journal of Hazardous Materials*, vol. 385, p. 121621, Mar. 2020, doi: 10.1016/J.JHAZMAT.2019.121621.
- [144] D. Sharma, S. Kanchi, and K. Bisetty, “Biogenic synthesis of nanoparticles: A review,” *Arabian Journal of Chemistry*, vol. 12, no. 8, pp. 3576–3600, Dec. 2019, doi: 10.1016/J.ARABJC.2015.11.002.
- [145] S. Ahmad, S. Munir, N. Zeb, A. Ullah, B. Khan, J. Ali, M. Bilal, M. Omer, M. Alamzeb, S. M. Salman, and S. Ali, “Green nanotechnology: a review on green synthesis of silver nanoparticles - an ecofriendly approach,” *Int J Nanomedicine*, vol. 14, pp. 5087–5107, 2019, doi: 10.2147/IJN.S200254.
- [146] K. Ranoszek-Soliwoda, E. Tomaszewska, E. Socha, P. Krzyczmonik, A. Ignaczak, P. Orłowski, M. Krzyzowska, G. Celichowski, and J. Grobelny, “The role of tannic acid and sodium citrate in the synthesis of silver nanoparticles,” *Journal of Nanoparticle Research*, vol. 19, no. 8, pp. 1–15, Aug. 2017, doi: 10.1007/S11051-017-3973-9/FIGURES/10.
- [147] P. Slepíčka, N. S. Kasálková, J. Siegel, Z. Kolská, and V. Švorčík, “Methods of gold and silver nanoparticles preparation,” *Materials (Basel)*, vol. 13, no. 1, p. 1, Jan. 2019, doi: 10.3390/MA13010001.
- [148] M. K. Alqadi, O. A. Abo Noqtah, F. Y. Alzoubi, J. Alzoubi, and K. Aljarrah, “pH effect on the aggregation of silver nanoparticles synthesized by chemical reduction,” *Materials Science-Poland 2014 32:1*, vol. 32, no. 1, pp. 107–111, Feb. 2014, doi: 10.2478/S13536-013-0166-9.
- [149] M. U. Rashid, M. K. H. Bhuiyan, and M. E. Quayum, “Synthesis of silver nanoparticles (Ag-NPs) and their uses for quantitative analysis of vitamin C tablets,” *Dhaka University Journal of Pharmaceutical Sciences*, vol. 12, no. 1, pp. 29–33, Sep. 2013, doi: 10.3329/DUJPS.V12I1.16297.
- [150] M. Jeyaraj, S. Gurunathan, M. Qasim, M. H. Kang, and J. H. Kim, “A comprehensive review on the synthesis, characterization, and biomedical application of platinum nanoparticles,” *Nanomaterials 2019, Vol. 9, Page 1719*, vol. 9, no. 12, p. 1719, Dec. 2019, doi: 10.3390/NANO9121719.
- [151] E. Izak-Nau, A. Huk, B. Reidy, H. Uggerud, M. Vadset, S. Eiden, M. Voetz, M. Himly, A. Duschl, M. Dusinska, and I. Lynch, “Impact of storage conditions and storage time on silver nanoparticles’ physicochemical properties and implications for their biological effects,” *RSC Advances*, vol. 5, no. 102, pp. 84172–84185, Oct. 2015, doi: 10.1039/C5RA10187E.
- [152] H. Kang, J. T. Buchman, R. S. Rodriguez, H. L. Ring, J. He, K. C. Bantz, and C. L. Haynes, “Stabilization of silver and gold nanoparticles: preservation and improvement of plasmonic functionalities,” *Chemical Reviews*, vol. 119, no. 1, pp. 664–699, Jan. 2019, doi: 10.1021/ACS.CHEMREV.8B00341/ASSET/IMAGES/MEDIUM/CR-2018-00341Z_0018.GIF.
- [153] J. Turkevich, P. C. Stevenson, and J. Hillier, “A study of the nucleation and growth processes in the synthesis of colloidal gold,” *Discuss Faraday Soc*, vol. 11, pp. 55–75, Jan. 1951, doi: 10.1039/DF9511100055.

- [154] G. Frens, "Controlled nucleation for the regulation of the particle size in monodisperse gold suspensions," *Nature Physical Science* 1973 241:105, vol. 241, no. 105, pp. 20–22, Jan. 1973, doi: 10.1038/physci241020a0.
- [155] K. Aslan and V. H. Pérez-Luna, "Surface modification of colloidal gold by chemisorption of alkanethiols in the presence of a nonionic surfactant," *Langmuir*, vol. 18, no. 16, pp. 6059–6065, Aug. 2002, doi: 10.1021/LA025795X.
- [156] M. Rinaudo, "Chitin and chitosan: Properties and applications," *Prog. Polym. Sci.*, vol. 31, pp. 603–632, 2006, doi: 10.1016/j.progpolymsci.2006.06.001.
- [157] M. Zuber, K. M. Zia, and M. Barikani, "Chitin and chitosan based blends, composites and nanocomposites," *Advanced Structured Materials*, vol. 18, pp. 55–119, 2013, doi: 10.1007/978-3-642-20940-6_3.
- [158] K. Kurita, "Chitin and chitosan: functional biopolymers from marine crustaceans," *Mar Biotechnol (NY)*, vol. 8, no. 3, pp. 203–226, Jun. 2006, doi: 10.1007/S10126-005-0097-5.
- [159] L. A. M. van den Broek and C. G. Boeriu, *Chitin and chitosan : properties and applications*. Wiley, 2020. Accessed: May 21, 2022. [Online]. Available: <https://www.wiley.com/en-us/Chitin+and+Chitosan:+Properties+and+Applications-p-9781119450436>
- [160] W. E. Hennink and C. F. van Nostrum, "Novel crosslinking methods to design hydrogels," *Advanced Drug Delivery Reviews*, vol. 64, no. SUPPL., pp. 223–236, Dec. 2012, doi: 10.1016/J.ADDR.2012.09.009.
- [161] L. Cao, B. Cao, C. Lu, G. Wang, L. Yu, and J. Ding, "An injectable hydrogel formed by in situ cross-linking of glycol chitosan and multi-benzaldehyde functionalized PEG analogues for cartilage tissue engineering," *Journal of Materials Chemistry B*, vol. 3, no. 7, pp. 1268–1280, Feb. 2015, doi: 10.1039/C4TB01705F.
- [162] H. Xu and S. Matysiak, "Effect of pH on chitosan hydrogel polymer network structure," *Chemical Communications*, vol. 53, no. 53, pp. 7373–7376, Jun. 2017, doi: 10.1039/C7CC01826F.
- [163] H. Hamed, S. Moradi, S. M. Hudson, and A. E. Tonelli, "Chitosan based hydrogels and their applications for drug delivery in wound dressings: A review," *Carbohydr Polym*, vol. 199, pp. 445–460, Nov. 2018, doi: 10.1016/J.CARBPOL.2018.06.114.
- [164] M. F. Shukur and M. F. Z. Kadir, "Hydrogen ion conducting starch-chitosan blend based electrolyte for application in electrochemical devices," *Electrochimica Acta*, vol. 158, pp. 152–165, Mar. 2015, doi: 10.1016/J.ELECTACTA.2015.01.167.
- [165] S. Monisha, T. Mathavan, S. Selvasekarapandian, A. Milton Franklin Benial, G. Aristatil, N. Mani, M. Premalatha, and D. Vinoth pandi, "Investigation of bio polymer electrolyte based on cellulose acetate-ammonium nitrate for potential use in electrochemical devices," *Carbohydr Polym*, vol. 157, pp. 38–47, Feb. 2017, doi: 10.1016/J.CARBPOL.2016.09.026.
- [166] Y. Wan, K. A. M. Creber, B. Peppley, and V. T. Bui, "Ionic conductivity of chitosan membranes," *Polymer (Guildf)*, vol. 44, no. 4, pp. 1057–1065, Feb. 2003, doi: 10.1016/S0032-3861(02)00881-9.

- [167] J. Ma and Y. Sahai, "Chitosan biopolymer for fuel cell applications," *Carbohydr Polym*, vol. 92, no. 2, pp. 955–975, Feb. 2013, doi: 10.1016/J.CARBPOL.2012.10.015.
- [168] E. Prokhorov, G. Luna-Bárceñas, J. B. González-Campos, Y. Kovalenko, Z. Y. García-Carvajal, and J. Mota-Morales, "Proton conductivity and relaxation properties of chitosan-acetate films," *Electrochimica Acta*, vol. 215, pp. 600–608, Oct. 2016, doi: 10.1016/J.ELECTACTA.2016.08.148.
- [169] G. Wu, J. Zhang, X. Wan, Y. Yang, and S. Jiang, "Chitosan-based biopolysaccharide proton conductors for synaptic transistors on paper substrates," *Journal of Materials Chemistry C*, vol. 2, no. 31, pp. 6249–6255, Jul. 2014, doi: 10.1039/C4TC00652F.
- [170] S. Kumar-Krishnan, E. Prokhorov, M. Ramírez, M. A. Hernandez-Landaverde, D. G. Zarate-Triviño, Y. Kovalenko, I. C. Sanchez, J. Méndez-Nonell, and G. Luna-Bárceñas, "Novel gigahertz frequency dielectric relaxations in chitosan films," *Soft Matter*, vol. 10, no. 43, pp. 8673–8684, Oct. 2014, doi: 10.1039/C4SM01804D.
- [171] H. Huang, Q. Yuan, and X. Yang, "Morphology study of gold–chitosan nanocomposites," *Journal of Colloid and Interface Science*, vol. 282, no. 1, pp. 26–31, Feb. 2005, doi: 10.1016/J.JCIS.2004.08.063.
- [172] Y. Du, X. L. Luo, J. J. Xu, and H. Y. Chen, "A simple method to fabricate a chitosan-gold nanoparticles film and its application in glucose biosensor," *Bioelectrochemistry*, vol. 70, no. 2, pp. 342–347, May 2007, doi: 10.1016/J.BIOELECTCHEM.2006.05.002.
- [173] D. S. dos Santos, P. J. G. Goulet, N. P. W. Pieczonka, O. N. Oliveira, and R. F. Aroca, "Gold nanoparticle embedded, self-sustained chitosan films as substrates for surface-enhanced Raman scattering," *Langmuir*, vol. 20, no. 23, pp. 10273–10277, Nov. 2004, doi: 10.1021/LA048328J/ASSET/IMAGES/MEDIUM/LA048328JN00001.GIF.
- [174] I. C. Sun, J. H. Na, S. Y. Jeong, D. E. Kim, I. C. Kwon, K. Choi, C. H. Ahn, and K. Kim, "Biocompatible glycol chitosan-coated gold nanoparticles for tumor-targeting CT imaging," *Pharmaceutical Research* 2013 31:6, vol. 31, no. 6, pp. 1418–1425, Aug. 2013, doi: 10.1007/S11095-013-1142-0.
- [175] A. H. Virgili, D. C. Laranja, P. S. Malheiros, M. B. Pereira, T. M. H. Costa, and E. W. de Menezes, "Nanocomposite film with antimicrobial activity based on gold nanoparticles, chitosan and aminopropylsilane," *Surface and Coatings Technology*, vol. 415, p. 127086, Jun. 2021, doi: 10.1016/J.SURFCOAT.2021.127086.
- [176] M. A. Alonso-Lomillo, O. Domínguez-Renedo, P. Matos, and M. J. Arcos-Martínez, "Disposable biosensors for determination of biogenic amines," *Analytica Chimica Acta*, vol. 665, no. 1, pp. 26–31, Apr. 2010, doi: 10.1016/J.ACA.2010.03.012.
- [177] A. Fatoni, A. Numnuam, P. Kanatharana, W. Limbut, C. Thammakhet, and P. Thavarungkul, "A highly stable oxygen-independent glucose biosensor based on a chitosan-albumin cryogel incorporated with carbon nanotubes and ferrocene," *Sensors and Actuators B: Chemical*, vol. 185, pp. 725–734, Aug. 2013, doi: 10.1016/J.SNB.2013.05.056.

- [178] P. Samadi Pakchin, H. Ghanbari, R. Saber, and Y. Omid, "Electrochemical immunosensor based on chitosan-gold nanoparticle/carbon nanotube as a platform and lactate oxidase as a label for detection of CA125 oncomarker," *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 122, pp. 68–74, Dec. 2018, doi: 10.1016/J.BIOS.2018.09.016.
- [179] N. Nontipichet, S. Khumngern, J. Choosang, P. Thavarungkul, P. Kanatharana, and A. Numnuam, "An enzymatic histamine biosensor based on a screen-printed carbon electrode modified with a chitosan–gold nanoparticles composite cryogel on Prussian blue-coated multi-walled carbon nanotubes," *Food Chemistry*, vol. 364, p. 130396, Dec. 2021, doi: 10.1016/J.FOODCHEM.2021.130396.
- [180] M. Asal, Ö. Özen, M. Şahinler, H. T. Baysal, and İ. Polatoğlu, "An overview of biomolecules, immobilization methods and support materials of biosensors," *Sensor Review*, vol. 39, no. 3, pp. 377–386, May 2019, doi: 10.1108/SR-04-2018-0084/FULL/XML.
- [181] D. R. Bhumkar, H. M. Joshi, M. Sastry, and V. B. Pokharkar, "Chitosan reduced gold nanoparticles as novel carriers for transmucosal delivery of insulin," *Pharm Res*, vol. 24, no. 8, pp. 1415–1426, Aug. 2007, doi: 10.1007/S11095-007-9257-9.
- [182] S. K. Shukla, A. K. Mishra, O. A. Arotiba, and B. B. Mamba, "Chitosan-based nanomaterials: A state-of-the-art review," *International Journal of Biological Macromolecules*, vol. 59, pp. 46–58, Aug. 2013, doi: 10.1016/J.IJBIOMAC.2013.04.043.
- [183] K. M. Kim, J. H. Son, S. K. Kim, C. L. Weller, and M. A. Hanna, "Properties of chitosan films as a function of pH and solvent type," *Journal of Food Science*, vol. 71, no. 3, pp. E119–E124, Apr. 2006, doi: 10.1111/J.1365-2621.2006.TB15624.X.
- [184] S. S. Voznesenskiy, A. A. Sergeev, A. Y. Mironenko, S. Y. Bratskaya, and Y. N. Kulchin, "Integrated-optical sensors based on chitosan waveguide films for relative humidity measurements," *Sensors and Actuators B: Chemical*, vol. 188, pp. 482–487, Nov. 2013, doi: 10.1016/J.SNB.2013.07.043.
- [185] D. B. Hall, P. Underhill, and J. M. Torkelson, "Spin coating of thin and ultrathin polymer films," *Polymer Engineering & Science*, vol. 38, no. 12, pp. 2039–2045, Dec. 1998, doi: 10.1002/PEN.10373.
- [186] W. Suginta, P. Khunkaewla, and A. Schulte, "Electrochemical biosensor applications of polysaccharides chitin and chitosan," *Chemical Reviews*, vol. 113, no. 7, pp. 5458–5479, Jul. 2013, doi: 10.1021/CR300325R/ASSET/IMAGES/CR300325R.SOCIAL.JPEG_V03.
- [187] Z. Hong, G. M. Luz, P. J. Hampel, M. Jin, A. Liu, X. Chen, and J. F. Mano, "Mono-dispersed bioactive glass nanospheres: Preparation and effects on biomechanics of mammalian cells," *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, vol. 95A, no. 3, pp. 747–754, Dec. 2010, doi: 10.1002/JBM.A.32898.
- [188] S. Labbaf, O. Tsigkou, K. H. Müller, M. M. Stevens, A. E. Porter, and J. R. Jones, "Spherical bioactive glass particles and their interaction with human mesenchymal stem cells in vitro," *Biomaterials*, vol. 32, no. 4, pp. 1010–1018, Feb. 2011, doi: 10.1016/J.BIOMATERIALS.2010.08.082.

- [189] K. Sudarsanan and R. A. Young, "Significant precision in crystal structural details. Holly Springs hydroxyapatite," *Acta Crystallographica Section B*, vol. 25, no. 8, pp. 1534–1543, Aug. 1969, doi: 10.1107/S0567740869004298.
- [190] V. K. Pecharsky and P. Y. Zavalij, "Fundamentals of powder diffraction and structural characterization of materials," *Fundamentals of Powder Diffraction and Structural Characterization of Materials*, pp. 1–741, 2005, doi: 10.1007/978-0-387-09579-0.
- [191] T. Kokubo and H. Takadama, "How useful is SBF in predicting in vivo bone bioactivity?," *Biomaterials*, vol. 27, no. 15, pp. 2907–2915, May 2006, doi: 10.1016/J.BIOMATERIALS.2006.01.017.
- [192] J. L. Li, L. Wang, X. Y. Liu, Z. P. Zhang, H. C. Guo, W. M. Liu, and S. H. Tang, "In vitro cancer cell imaging and therapy using transferrin-conjugated gold nanoparticles," *Cancer Lett*, vol. 274, no. 2, pp. 319–326, Feb. 2009, doi: 10.1016/J.CANLET.2008.09.024.
- [193] J. B. G. Jez-Campos, E. Prokhorov, G. Iuna-Bárceñas, A. Fonseca-García, and I. C. Sanchez, "Dielectric relaxations of chitosan: The effect of water on the α -relaxation and the glass transition temperature," *Journal of Polymer Science Part B: Polymer Physics*, vol. 47, no. 22, pp. 2259–2271, Nov. 2009, doi: 10.1002/POLB.21823.
- [194] C. Vichery and J. M. Nedelec, "Bioactive glass nanoparticles: from synthesis to materials design for biomedical applications," *Materials (Basel)*, vol. 9, no. 4, 2016, doi: 10.3390/MA9040288.
- [195] T. Mäurer and B. Kraushaar-Czarntzki, "Effect of electrolyte addition on the colloidal stability of aqueous zeolite sols," *Helvetica Chimica Acta*, 2001. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/1522-2675%2820010919%2984%3A9%3C2550%3A%3AAID-HLCA2550%3E3.0.CO%3B2-Z> (accessed Jun. 03, 2022).
- [196] P. Marciniak, B. Sztorch, A. Martyła, A. Czapik, M. Stodolny, and R. E. Przekop, "Metallic calcium as a precursor for sol-gel synthesis of CaCO₃-SiO₂ and CaO-SiO₂ systems," *Ceramics 2021, Vol. 4, Pages 278-290*, vol. 4, no. 2, pp. 278–290, Jun. 2021, doi: 10.3390/CERAMICS4020022.
- [197] C. Bossard, H. Granel, É. Jallot, V. Montouillout, F. Fayon, J. Soulié, C. Drouet, Y. Wittrant, and J. Lao, "Mechanism of Calcium Incorporation Inside Sol-Gel Silicate Bioactive Glass and the Advantage of Using Ca(OH)₂ over Other Calcium Sources," *ACS Biomaterials Science and Engineering*, vol. 5, no. 11, pp. 5906–5915, Nov. 2019, doi: 10.1021/ACSBMATERIALS.9B01245/ASSET/IMAGES/MEDIUM/AB9B01245_0008.GIF.
- [198] M. Zhao, X. Yang, T. L. Church, and A. T. Harris, "Novel CaO-SiO₂ sorbent and bifunctional Ni/Co-CaO/SiO₂ complex for selective H₂ synthesis from cellulose," *Environmental Science and Technology*, vol. 46, no. 5, pp. 2976–2983, Mar. 2012, doi: 10.1021/ES300135D/SUPPL_FILE/ES300135D_SI_001.PDF.
- [199] K. B. Kale, R. Y. Raskar, V. H. Rane, and A. G. Gaikwad, "Preparation and Characterization of Calcium Silicate for CO₂ Sorption:," <http://dx.doi.org/10.1260/0263-6174.30.10.817>, vol. 30, no. 10, pp. 817–830, Dec. 2012, doi: 10.1260/0263-6174.30.10.817.

- [200] F. Ren, Y. Ding, and Y. Leng, "Infrared spectroscopic characterization of carbonated apatite: a combined experimental and computational study," *J Biomed Mater Res A*, vol. 102, no. 2, pp. 496–505, Feb. 2014, doi: 10.1002/JBM.A.34720.
- [201] O. A. Omosebi, R. M. Ahmed, and S. N. Shah, "Mechanisms of cement degradation in HPHT carbonic acid environment," *Proceedings - SPE International Symposium on Oilfield Chemistry*, vol. 2017-April, pp. 448–468, Apr. 2017, doi: 10.2118/184567-MS.
- [202] D. Hourlier, "Thermal decomposition of calcium oxalate: beyond appearances," *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry 2018 136:6*, vol. 136, no. 6, pp. 2221–2229, Nov. 2018, doi: 10.1007/S10973-018-7888-1.
- [203] M. A. Popescu, R. Isopescu, C. Matei, G. Fagarasan, and V. Plesu, "Thermal decomposition of calcium carbonate polymorphs precipitated in the presence of ammonia and alkylamines," *Advanced Powder Technology*, vol. 25, no. 2, pp. 500–507, Mar. 2014, doi: 10.1016/J.APT.2013.08.003.
- [204] A. R. Khare and N. Vasisht, "Nanoencapsulation in the Food Industry: Technology of the Future," *Microencapsulation in the Food Industry*, pp. 151–155, Jan. 2014, doi: 10.1016/B978-0-12-404568-2.00014-5.
- [205] J. Amaro-Gahete, A. Benítez, R. Otero, D. Esquivel, C. Jiménez-Sanchidrián, J. Morales, Á. Caballero, and F. J. Romero-Salguero, "A comparative study of particle size distribution of graphene nanosheets synthesized by an ultrasound-assisted method," *Nanomaterials (Basel)*, vol. 9, no. 2, Feb. 2019, doi: 10.3390/NANO9020152.
- [206] A. van Blaaderen, J. van Geest, and A. Vrij, "Monodisperse colloidal silica spheres from tetraalkoxysilanes: Particle formation and growth mechanism," *Journal of Colloid and Interface Science*, vol. 154, no. 2, pp. 481–501, Dec. 1992, doi: 10.1016/0021-9797(92)90163-G.
- [207] M. Kobayashi, F. Juillerat, P. Galletto, P. Bowen, and M. Borkovec, "Aggregation and charging of colloidal silica particles: Effect of particle size," *Langmuir*, vol. 21, no. 13, pp. 5761–5769, Jun. 2005, doi: 10.1021/LA046829Z/ASSET/IMAGES/MEDIUM/LA046829ZN00001.GIF.
- [208] L. H. Allen and E. Matijević, "Stability of colloidal silica: I. Effect of simple electrolytes," *Journal of Colloid and Interface Science*, vol. 31, no. 3, pp. 287–296, Nov. 1969, doi: 10.1016/0021-9797(69)90172-6.
- [209] L. H. Allen and E. Matijević, "Stability of colloidal silica. II. Ion exchange," *Journal of Colloid And Interface Science*, vol. 33, no. 3, pp. 420–429, 1970, doi: 10.1016/0021-9797(70)90234-1.
- [210] J. L. Trompette and M. Meireles, "Ion-specific effect on the gelation kinetics of concentrated colloidal silica suspensions," *Journal of Colloid and Interface Science*, vol. 263, no. 2, pp. 522–527, Jul. 2003, doi: 10.1016/S0021-9797(03)00397-7.
- [211] G. Vigil, Z. Xu, S. Steinberg, and J. Israelachvile, "Interactions of Silica Surfaces," *Journal of Colloid and Interface Science*, vol. 165, no. 2, pp. 367–385, Jul. 1994, doi: 10.1006/JCIS.1994.1242.
- [212] A. A. R. de Oliveira, D. A. de Souza, L. L. S. Dias, S. M. de Carvalho, H. S. Mansur, and M. de Magalhães Pereira, "Synthesis, characterization and cytocompatibility of spherical bioactive glass nanoparticles for potential hard

- tissue engineering applications,” *Biomed Mater*, vol. 8, no. 2, 2013, doi: 10.1088/1748-6041/8/2/025011.
- [213] P. J. Launer and B. Arkles, “Infrared analysis of organosilicon compounds: spectra-structure relationships,” Jan. 2013, doi: 10.5281/ZENODO.3696063.
- [214] D. Neumeyer, C. Venturini, N. Ratel-Ramond, M. Verelst, and A. Gourdon, “Simple and economic elaboration of high purity CaCO₃ particles for bone graft applications using a spray pyrolysis technique,” *Journal of Materials Chemistry B*, vol. 5, no. 33, pp. 6897–6907, Aug. 2017, doi: 10.1039/C7TB00586E.
- [215] J. J. Max and C. Chapados, “Infrared spectroscopy of aqueous carboxylic acids: comparison between different acids and their salts,” *Journal of Physical Chemistry A*, vol. 108, no. 16, pp. 3324–3337, Apr. 2004, doi: 10.1021/JP036401T/SUPPL_FILE/JP036401TSI20040119_125020.PDF.
- [216] M. E. Fleet, “Infrared spectra of carbonate apatites: v₂-Region bands,” *Biomaterials*, vol. 30, no. 8, pp. 1473–1481, Mar. 2009, doi: 10.1016/J.BIOMATERIALS.2008.12.007.
- [217] N. Kourkoumelis and M. Tzaphlidou, “Spectroscopic assessment of normal cortical bone: differences in relation to bone site and sex,” *ScientificWorldJournal*, vol. 10, pp. 402–412, Mar. 2010, doi: 10.1100/TSW.2010.43.
- [218] M. E. Fleet, “Carbonated hydroxyapatite: materials, synthesis, and applications,” *Carbonated Hydroxyapatite*, Dec. 2014, doi: 10.1201/B17954.
- [219] C. Ramón-De los Santos *et al.*, “Effect of the thermal annealing on the phase transitions of biogenic CaCO₃ nanostructures,” *J Mex Chem Soc*, vol. 63, no. 1, pp. 1–12, 2019, doi: 10.29356/JMCS.V63I1.422.
- [220] L. Berzina-Cimdina and N. Borodajenko, “6 Research of calcium phosphates using fourier transform infrared spectroscopy”, Accessed: Jun. 03, 2022. [Online]. Available: www.intechopen.com
- [221] M. Markovic, B. O. Fowler, and M. S. Tung, “Preparation and Comprehensive Characterization of a Calcium Hydroxyapatite Reference Material,” *Journal of Research of the National Institute of Standards and Technology*, vol. 109, no. 6, p. 553, 2004, doi: 10.6028/JRES.109.042.
- [222] A. Ślósarczyk, Z. Paszkiewicz, and C. Paluszkiwicz, “FTIR and XRD evaluation of carbonated hydroxyapatite powders synthesized by wet methods,” *Journal of Molecular Structure*, vol. 744–747, no. SPEC. ISS., pp. 657–661, Jun. 2005, doi: 10.1016/J.MOLSTRUC.2004.11.078.
- [223] T. Windarti, Taslimah, A. Haris, Y. Astuti, and A. Darmawan, “Synthesis of β-calcium pyrophosphate by sol-gel method,” *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering*, vol. 172, no. 1, p. 012058, Feb. 2017, doi: 10.1088/1757-899X/172/1/012058.
- [224] H. Hajiali, S. Karbasi, M. Hosseinalipour, and H. R. Rezaie, “Preparation of a novel biodegradable nanocomposite scaffold based on poly (3-hydroxybutyrate)/bioglass nanoparticles for bone tissue engineering,” *J Mater Sci Mater Med*, vol. 21, no. 7, pp. 2125–2132, Jul. 2010, doi: 10.1007/S10856-010-4075-8.
- [225] A. Michelot, S. Sarda, C. Audin, E. Deydier, E. Manoury, R. Poli, and C. Rey, “Spectroscopic characterisation of hydroxyapatite and nanocrystalline apatite with grafted aminopropyltriethoxysilane: nature of silane–surface interaction,”

- Journal of Materials Science* 2015 50:17, vol. 50, no. 17, pp. 5746–5757, Jun. 2015, doi: 10.1007/S10853-015-9122-X.
- [226] M. Karuppaiah, S. Sundar, R. Mariappan, R. Madhuvilakku, M. Paramasivam, and S. Piraman, “Improvement of bagasse based paper properties using definite size effect of CaCO₃ nanofillers,” *International Journal of Scientific Research(IJSR)*, *IJSR / World Wide Journals*, 2016. [https://www.worldwidejournals.com/international-journal-of-scientific-research-\(IJSR\)/article/improvement-of-bagasse-based-paper-properties-using-definite-size-effect-of-caco3-nanofillers/NzQ3Mg==/?is=1](https://www.worldwidejournals.com/international-journal-of-scientific-research-(IJSR)/article/improvement-of-bagasse-based-paper-properties-using-definite-size-effect-of-caco3-nanofillers/NzQ3Mg==/?is=1) (accessed Jun. 03, 2022).
- [227] F. A. Andersen and L. Brecevic, “Infrared spectra of amorphous and crystalline calcium carbonate,” *Acta Chamica Scandinavia*, 1991. <https://www.semanticscholar.org/paper/Infrared-Spectra-of-Amorphous-and-Crystalline-Andersen-Bre%20C%28Devi%2887/0caa5aff9bcb3ca2978bec329989ab3a0899c4e> (accessed Jun. 03, 2022).
- [228] V. Rives, “Layered double hydroxides : present and future,” *Nova Publishers*, p. 2, 2001, Accessed: Jun. 03, 2022. [Online]. Available: <http://search.ebscohost.com.ezproxy.liv.ac.uk/login.aspx?direct=true&db=cat00003a&AN=lvp.b3073884&site=eds-live&scope=site%5Cnhttp://liv.ac.uk.libanswers.com/a.php?qid=627773%5Cnhttp://site.ebrary.com/lib/liverpool/Doc?id=10662874>
- [229] R. M. Silverstein, F. X. Webster, and D. Kiemle, “Spectrometric identification of organic compounds,” p. 512, 2005, Accessed: Jun. 03, 2022. [Online]. Available: https://books.google.com/books/about/Spectrometric_Identification_of_Organic.html?hl=es&id=mQ8cAAAAQBAJ
- [230] P. Innocenzi, “Infrared spectroscopy of sol–gel derived silica-based films: a spectra-microstructure overview,” *Journal of Non-Crystalline Solids*, vol. 316, no. 2–3, pp. 309–319, Feb. 2003, doi: 10.1016/S0022-3093(02)01637-X.
- [231] A. K. Pahari and B. S. Chaulan, “Engineering chemistry,” p. 572, 2006, Accessed: Jun. 03, 2022. [Online]. Available: https://books.google.com/books/about/Engineering_Chemistry.html?hl=es&id=x6ct1xjyJpoC
- [232] Z. Bacsik, N. Ahlsten, A. Ziadi, G. Zhao, A. E. Garcia-Bennett, B. Martín-Matute, and N. Hedin, “Mechanisms and kinetics for sorption of CO₂ on bicontinuous mesoporous silica modified with n-propylamine,” *Langmuir*, vol. 27, no. 17, pp. 11118–11128, Sep. 2011, doi: 10.1021/LA202033P/SUPPL_FILE/LA202033P_SI_001.PDF.
- [233] G. M. Luz and J. F. Mano, “Preparation and characterization of bioactive glass nanoparticles prepared by sol-gel for biomedical applications,” *Nanotechnology*, vol. 22, no. 49, Dec. 2011, doi: 10.1088/0957-4484/22/49/494014.
- [234] J. P. Fan, P. Kalia, L. di Silvio, and J. Huang, “In vitro response of human osteoblasts to multi-step sol–gel derived bioactive glass nanoparticles for bone tissue engineering,” *Materials Science and Engineering: C*, vol. 36, no. 1, pp. 206–214, Mar. 2014, doi: 10.1016/J.MSEC.2013.12.009.

- [235] M. S. Kang, J. H. Kim, R. K. Singh, J. H. Jang, and H. W. Kim, "Therapeutic-designed electrospun bone scaffolds: mesoporous bioactive nanocarriers in hollow fiber composites to sequentially deliver dual growth factors," *Acta Biomater*, vol. 16, no. 1, pp. 103–116, Jun. 2015, doi: 10.1016/J.ACTBIO.2014.12.028.
- [236] M. E. Fleet, "Infrared spectra of carbonate apatites: Evidence for a connection between bone mineral and body fluids," *American Mineralogist*, vol. 102, no. 1, pp. 149–157, Jan. 2017, doi: 10.2138/AM-2017-5704.
- [237] C. J. S. Ibsen, D. Chernyshov, and H. Birkedal, "Apatite formation from amorphous calcium phosphate and mixed amorphous calcium phosphate/amorphous calcium carbonate," *Chemistry – A European Journal*, vol. 22, no. 35, pp. 12347–12357, Aug. 2016, doi: 10.1002/CHEM.201601280.
- [238] A. Pondelak, F. Rosi, C. Maurich, C. Miliani, S. D. Škapin, and A. Sever Škapin, "The role of relative humidity on crystallization of calcium carbonate from calcium acetoacetate precursor," *Applied Surface Science*, vol. 506, p. 144768, Mar. 2020, doi: 10.1016/J.APSUSC.2019.144768.
- [239] L. Fernández-Díaz, Á. Fernández-González, and M. Prieto, "The role of sulfate groups in controlling CaCO₃ polymorphism," *Geochimica et Cosmochimica Acta*, vol. 74, no. 21, pp. 6064–6076, Nov. 2010, doi: 10.1016/J.GCA.2010.08.010.
- [240] A. Villarreal, P. Castillo-Villalón, and J. Ramírez, "Analysis of the interaction of CO₂ with Na, K, and Ca-exchanged Mordenite. An infrared spectroscopic study," *J Mex Chem Soc*, vol. 61, no. 2, pp. 102–108, Oct. 2017, doi: 10.29356/JMCS.V61I2.257.
- [241] R. Cesana, J. H. A. Ferreira, J. M. Gonçalves, D. Gomes, M. Nakamura, R. M. Peres, H. E. Toma, and T. C. Canevari, "Fluorescent Cdots(N)-Silica composites: Direct synthesis and application as electrochemical sensor of fenitrothion pesticide," *Materials Science and Engineering: B*, vol. 267, p. 115084, May 2021, doi: 10.1016/J.MSEB.2021.115084.
- [242] J. Serra, P. González, S. Liste, C. Serra, S. Chiussi, B. León, M. Pérez-Amor, H. O. Ylänen, and M. Hupa, "FTIR and XPS studies of bioactive silica based glasses," *Journal of Non-Crystalline Solids*, vol. 332, no. 1–3, pp. 20–27, Dec. 2003, doi: 10.1016/J.JNONCRY SOL.2003.09.013.
- [243] R. Salzer and H. W. Siesler, "Infrared and Raman Spectroscopic Imaging.," p. 657, 2014.
- [244] A. Kiani, J. v. Hanna, S. P. King, G. J. Rees, M. E. Smith, N. Roohpour, V. Salih, and J. C. Knowles, "Structural characterization and physical properties of P₂O₅–CaO–Na₂O–TiO₂ glasses by Fourier transform infrared, Raman and solid-state magic angle spinning nuclear magnetic resonance spectroscopies," *Acta Biomaterialia*, vol. 8, no. 1, pp. 333–340, Jan. 2012, doi: 10.1016/J.ACTBIO.2011.08.025.
- [245] J. Soulié, P. Gras, O. Marsan, D. Laurencin, C. Rey, and C. Combes, "Development of a new family of monolithic calcium (pyro)phosphate glasses by soft chemistry," *Acta Biomaterialia*, vol. 41, pp. 320–327, Sep. 2016, doi: 10.1016/J.ACTBIO.2016.05.030.
- [246] L. M. Miller, V. Vairavamurthy, M. R. Chance, R. Mendelsohn, E. P. Paschalis, F. Betts, and A. L. Boskey, "In situ analysis of mineral content and crystallinity

- in bone using infrared micro-spectroscopy of the ν_4 PO₄³⁻ vibration,” *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, vol. 1527, no. 1–2, pp. 11–19, Jul. 2001, doi: 10.1016/S0304-4165(01)00093-9.
- [247] A. G. Kalampounias, “IR and Raman spectroscopic studies of sol-gel derived alkaline-earth silicate glasses,” *Bull. Mater. Sci.*, vol. 34, no. 2, pp. 299–303, 2011.
- [248] R. Choudhary, S. Koppala, and S. Swamiappan, “Bioactivity studies of calcium magnesium silicate prepared from eggshell waste by sol-gel combustion synthesis,” *Journal of Asian Ceramic Societies*, vol. 3, no. 2, pp. 173–177, Jun. 2015, doi: 10.1016/J.JASCER.2015.01.002.
- [249] P. Li, C. Ohtsuki, T. Kokubo, K. Nakanishi, N. Soga, T. Nakamura, and T. Yamamuro, “Effects of ions in aqueous media on hydroxyapatite induction by silica gel and its relevance to bioactivity of bioactive glasses and glass-ceramics,” *J Appl Biomater*, vol. 4, no. 3, pp. 221–229, 1993, doi: 10.1002/JAB.770040303.
- [250] H. B. Wen, J. Moradian-Oldak, and A. G. Fincham, “Modulation of apatite crystal growth on Bioglass(®) by recombinant amelogenin,” *Biomaterials*, vol. 20, no. 18, pp. 1717–1725, Sep. 1999, doi: 10.1016/S0142-9612(99)00085-X.
- [251] M. Tanahashi, T. Yao, T. Kokubo, M. Minoda, T. Miyamoto, T. Nakamura, and T. Yamamuro, “Apatite coated on organic polymers by biomimetic process: improvement in its adhesion to substrate by NaOH treatment,” *J Appl Biomater*, vol. 5, no. 4, pp. 339–347, 1994, doi: 10.1002/JAB.770050409.
- [252] S. Lala, M. Ghosh, P. K. Das, T. Kar, and S. K. Pradhan, “Mechanical preparation of nanocrystalline biocompatible single-phase Mn-doped A-type carbonated hydroxyapatite (A-cHAp): effect of Mn doping on microstructure,” *Dalton Transactions*, vol. 44, no. 46, pp. 20087–20097, Nov. 2015, doi: 10.1039/C5DT03398E.
- [253] F. Ren and Y. Leng, “Carbonated Apatite, Type-A or Type-B?,” *Key Engineering Materials*, vol. 493–494, pp. 293–297, 2012, doi: 10.4028/WWW.SCIENTIFIC.NET/KEM.493-494.293.
- [254] M. E. Simonsen, C. Sønderby, Z. Li, and E. G. Søgaard, “XPS and FT-IR investigation of silicate polymers,” *Journal of Materials Science 2009 44:8*, vol. 44, no. 8, pp. 2079–2088, Apr. 2009, doi: 10.1007/S10853-009-3270-9.
- [255] M. Dziadek, B. Zagrajczuk, P. Jelen, Z. Olejniczak, and K. Cholewa-Kowalska, “Structural variations of bioactive glasses obtained by different synthesis routes,” *Ceramics International*, vol. 13, no. 42, pp. 14700–14709, Oct. 2016, doi: 10.1016/J.CERAMINT.2016.06.095.
- [256] J. Ihli, W. C. Wong, E. H. Noel, Y. Y. Kim, A. N. Kulak, H. K. Christenson, M. J. Duer, and F. C. Meldrum, “Dehydration and crystallization of amorphous calcium carbonate in solution and in air,” *Nature Communications 2014 5:1*, vol. 5, no. 1, pp. 1–10, Jan. 2014, doi: 10.1038/ncomms4169.
- [257] D. Farlay, G. Panczer, C. Rey, P. D. Delmas, and G. Boivin, “Mineral maturity and crystallinity index are distinct characteristics of bone mineral,” *Journal of Bone and Mineral Metabolism*, vol. 28, no. 4, p. 433, 2010, doi: 10.1007/S00774-009-0146-7.

- [258] J. Vecstaudza, M. Gasik, and J. Locs, “Amorphous calcium phosphate materials: Formation, structure and thermal behaviour,” *J Eur Ceram Soc*, vol. 39, no. 4, pp. 1642–1649, Apr. 2019, doi: 10.1016/J.JEURCERAMSOC.2018.11.003.
- [259] W. Querido, N. Shanas, S. Bookbinder, M. C. Oliveira-Nunes, B. Krynska, and N. Pleshko, “Fourier transform infrared spectroscopy of developing bone mineral: from amorphous precursor to mature crystal,” *Analyst*, vol. 145, no. 3, pp. 764–776, Feb. 2020, doi: 10.1039/C9AN01588D.
- [260] T. Kokubo, H. M. Kim, and M. Kawashita, “Novel bioactive materials with different mechanical properties,” *Biomaterials*, vol. 24, no. 13, pp. 2161–2175, Jun. 2003, doi: 10.1016/S0142-9612(03)00044-9.
- [261] M. S. Tung, “Calcium phosphates in biological and industrial systems,” *Calcium Phosphates in Biological and Industrial Systems*, 1998, doi: 10.1007/978-1-4615-5517-9.
- [262] Z. Hong, A. Liu, L. Chen, X. Chen, and X. Jing, “Preparation of bioactive glass ceramic nanoparticles by combination of sol–gel and coprecipitation method,” *Journal of Non-Crystalline Solids*, vol. 355, no. 6, pp. 368–372, Mar. 2009, doi: 10.1016/J.JNONCRY SOL.2008.12.003.
- [263] S. L. Greasley, S. J. Page, S. Sirovica, S. Chen, R. A. Martin, A. Riveiro, J. v. Hanna, A. E. Porter, and J. R. Jones, “Controlling particle size in the Stöber process and incorporation of calcium,” *Journal of Colloid and Interface Science*, vol. 469, pp. 213–223, May 2016, doi: 10.1016/J.JCIS.2016.01.065.
- [264] E. Fiume, J. Barberi, E. Verné, and F. Baino, “Bioactive glasses: from parent 45S5 composition to scaffold-assisted tissue-healing therapies,” *J Funct Biomater*, vol. 9, no. 1, Mar. 2018, doi: 10.3390/JFB9010024.
- [265] G. Xu, I. A. Aksay, and J. T. Groves, “Continuous crystalline carbonate apatite thin films. A biomimetic approach,” *J Am Chem Soc*, vol. 123, no. 10, pp. 2196–2203, 2001, doi: 10.1021/JA002537I.
- [266] S. M. Londoño-Restrepo, R. Jeronimo-Cruz, B. M. Millán-Malo, E. M. Rivera-Muñoz, and M. E. Rodríguez-García, “Effect of the nano crystal size on the X-ray diffraction patterns of biogenic hydroxyapatite from human, bovine, and porcine bones,” *Scientific Reports 2019 9:1*, vol. 9, no. 1, pp. 1–12, Apr. 2019, doi: 10.1038/s41598-019-42269-9.
- [267] J. M. Delgado-López, M. Iafisco, I. Rodríguez, A. Tampieri, M. Prat, and J. Gómez-Morales, “Crystallization of bioinspired citrate-functionalized nanoapatite with tailored carbonate content,” *Acta Biomater*, vol. 8, no. 9, pp. 3491–3499, 2012, doi: 10.1016/J.ACTBIO.2012.04.046.
- [268] S. Tadier, S. Rokidi, C. Rey, C. Combes, and P. G. Koutsoukos, “Crystal growth of aragonite in the presence of phosphate,” *Journal of Crystal Growth*, vol. 458, pp. 44–52, Jan. 2017, doi: 10.1016/J.JCRYSGRO.2016.10.046.
- [269] L. L. Hench, “The story of Bioglass,” *J Mater Sci Mater Med*, vol. 17, no. 11, pp. 967–978, Nov. 2006, doi: 10.1007/S10856-006-0432-Z.
- [270] X. Chen, Y. Meng, Y. Li, and N. Zhao, “Investigation on bio-mineralization of melt and sol–gel derived bioactive glasses,” *Applied Surface Science*, vol. 255, no. 2, pp. 562–564, Nov. 2008, doi: 10.1016/J.APSUSC.2008.06.101.
- [271] B. Wahyudi, S. Muljani, M. A. Alfian, and A. R. Zukhrufiansyah, “Synthesis and characteristics of β -Tri-calcium phosphate from green mussel shell,” *Journal of Physics: Conference Series*, 2020.

- [272] C. C. Negrila, M. V. Predoi, S. L. Iconaru, and D. Predoi, "Development of Zinc-doped hydroxyapatite by sol-gel method for medical applications," *Molecules*, vol. 23, no. 11, Nov. 2018, doi: 10.3390/MOLECULES23112986.
- [273] F. Santerre, M. A. el Khakani, M. Chaker, and J. P. Dodelet, "Properties of TiC thin films grown by pulsed laser deposition," *Applied Surface Science*, vol. 148, no. 1–2, pp. 24–33, Jun. 1999, doi: 10.1016/S0169-4332(99)00139-7.
- [274] C. Oliveira, R. E. Galindo, C. Palacio, S. Calderon V, B. G. Almeida, M. Henriques, A. Espinosa, and S. Carvalho, "Surface characterization of Ti-Si-C-ON coatings for orthopedic devices: XPS and Raman spectroscopy," *Solid State Sciences*, vol. 13, no. 1, pp. 95–100, Jan. 2011, doi: 10.1016/J.SOLIDSTATESCIENCES.2010.10.015.
- [275] W. Cui, J. Li, L. Chen, X. Dong, H. Wang, J. Sheng, Y. Sun, Y. Zhou, and F. Dong, "Nature-inspired CaCO₃ loading TiO₂ composites for efficient and durable photocatalytic mineralization of gaseous toluene," *Science Bulletin*, vol. 65, no. 19, pp. 1626–1634, Oct. 2020, doi: 10.1016/J.SCIB.2020.05.024.
- [276] C. S. Ciobanu *et al.*, "Antimicrobial activity evaluation on silver doped hydroxyapatite/polydimethylsiloxane composite layer," *Biomed Res Int*, vol. 2015, 2015, doi: 10.1155/2015/926513.
- [277] Y. Zhong, X. Qiu, J. Gao, and Z. Guo, "Chemical structure of Si–O in silica fume from ferrosilicon production and Its reactivity in alkali dissolution," *ISIJ International*, vol. 59, no. 6, pp. 1098–1104, Jun. 2019, doi: 10.2355/ISIINTERNATIONAL.ISIJINT-2018-516.
- [278] F. V. Ferreira *et al.*, "Nanocellulose/bioactive glass cryogels as scaffolds for bone regeneration," *Nanoscale*, vol. 11, no. 42, pp. 19842–19849, Nov. 2019, doi: 10.1039/C9NR05383B.
- [279] A. Thøgersen, M. Syre, B. Retterstol Olaisen, and S. Diplas, "Studies of the oxidation states of phosphorus gettered silicon substrates using X-ray photoelectron spectroscopy and transmission electron microscopy," *Journal of Applied Physics*, vol. 113, no. 4, p. 044307, Jan. 2013, doi: 10.1063/1.4775818.
- [280] K. D. Sattler, *Silicon nanomaterials sourcebook. Volume two, Hybrid materials, arrays, networks, and devices*. Accessed: Jun. 04, 2022. [Online]. Available: <https://www.routledge.com/Silicon-Nanomaterials-Sourcebook-Hybrid-Materials-Arrays-Networks-and/Sattler/p/book/9780367782078>
- [281] S. Samal, S. Mohanty, and S. K. Nayak, "Superhydrophobic polymer coatings : fundamentals, design, fabrication, and applications".
- [282] O. Kostadinova, D. Kochnitcharova, E. Lefterova, M. Shipochka, P. Angelov, and T. Petkova, "Network modification of phosphate materials by transition metals doping," *Bulgarian Chemical Communications*, vol. 50, pp. 50–54, 2018.
- [283] V. Rheinheimer and I. Casanova, "Thin films as a tool for nanoscale studies of cement systems and building materials," *Thin Film Processes - Artifacts on Surface Phenomena and Technological Facets*, Apr. 2017, doi: 10.5772/66665.
- [284] G. S. Henderson, D. R. Neuville, and R. T. Downs, "Spectroscopic methods in mineralogy and materials Sciences," *Spectroscopic Methods in Mineralogy and Materials Sciences*, pp. 1–800, Nov. 2014, doi: 10.1515/9781614517863/PDF.
- [285] Y. Wang and Y. Zuo, "Adsorption and inhibition behavior of calcium lignosulfonate on steel in NaCl + Ca(OH)₂ solutions with different pH values,"

- Int. J. Electrochem. Sci*, vol. 11, pp. 6976–6992, 2016, doi: 10.20964/2016.08.49.
- [286] S. J. Kerber, J. J. Bruckner, K. Wozniak, S. Seal, S. Hardcastle, and T. L. Barr, “The nature of hydrogen in x-ray photoelectron spectroscopy: General patterns from hydroxides to hydrogen bonding,” *Journal of Vacuum Science & Technology A: Vacuum, Surfaces, and Films*, vol. 14, no. 3, p. 1314, Jun. 1998, doi: 10.1116/1.579947.
- [287] D. B. Dreghici, B. Butoi, D. Predoi, S. L. Iconaru, O. Stoican, and A. Groza, “Chitosan-hydroxyapatite composite layers generated in radio frequency magnetron sputtering discharge: from plasma to structural and morphological analysis of layers,” *Polymers (Basel)*, vol. 12, no. 12, pp. 1–14, Dec. 2020, doi: 10.3390/POLYM12123065.
- [288] H. B. Lu, C. T. Campbell, D. J. Graham, and B. D. Ratner, “Surface characterization of hydroxyapatite and related calcium phosphates by XPS and TOF-SIMS,” *Analytical Chemistry*, vol. 72, no. 13, pp. 2886–2894, Jul. 2000, doi: 10.1021/AC990812H.
- [289] V. Uskoković, “X-ray photoelectron and ion scattering spectroscopic surface analyses of amorphous and crystalline calcium phosphate nanoparticles with different chemical histories,” *Physical Chemistry Chemical Physics*, vol. 22, no. 10, pp. 5531–5547, Mar. 2020, doi: 10.1039/C9CP06529F.
- [290] T. López, “El mundo mágico del vidrio,” 2003, Accessed: Jun. 04, 2022. [Online]. Available: <https://books.google.com.mx/books?id=DRXsPQAACAAJ>
- [291] A. Lucas-Girot, F. Z. Mezahi, M. Mami, H. Oudadesse, A. Harabi, and M. le Floch, “Sol–gel synthesis of a new composition of bioactive glass in the quaternary system SiO₂–CaO–Na₂O–P₂O₅: Comparison with melting method,” *Journal of Non-Crystalline Solids*, vol. 357, no. 18, pp. 3322–3327, Sep. 2011, doi: 10.1016/J.JNONCRY SOL.2011.06.002.
- [292] E. Paparazzo, M. Fanfoni, E. Severini, and S. Priori, “Evidence of Si–OH species at the surface of aged silica,” *Journal of Vacuum Science & Technology A: Vacuum, Surfaces, and Films*, vol. 10, no. 4, p. 2892, Jun. 1998, doi: 10.1116/1.577726.
- [293] S. A. Paniagua, J. Baltazar, H. Sojoudi, S. K. Mohapatra, S. Zhang, C. L. Henderson, S. Graham, S. Barlow, and S. R. Marder, “Production of heavily n- and p-doped CVD graphene with solution-processed redox-active metal–organic species,” *Materials Horizons*, vol. 1, no. 1, pp. 111–115, Nov. 2013, doi: 10.1039/C3MH00035D.
- [294] L. Radev, I. Michailova, H. Georgiev, and D. Zaimova, “Carbonate apatite formation on novel multiphase CaO–SiO₂–P₂O₅–MgO glass-ceramics in TRIS–HCl buffer,” *Processing and Application of Ceramics*, vol. 10, no. 2, pp. 57–66, 2016, doi: 10.2298/PAC1602057R.
- [295] B. Tischendorf, J. U. Otaigbe, J. W. Wiench, M. Pruski, and B. C. Sales, “A study of short and intermediate range order in zinc phosphate glasses,” *Journal of Non-Crystalline Solids*, vol. 282, no. 2–3, pp. 147–158, Apr. 2001, doi: 10.1016/S0022-3093(01)00350-7.

- [296] B. C. Sales, J. U. Otaigbe, G. H. Beall, L. A. Boatner, and J. O. Ramey, "Structure of zinc polyphosphate glasses," *Journal of Non-Crystalline Solids*, vol. 226, no. 3, pp. 287–293, Jun. 1998, doi: 10.1016/S0022-3093(98)00415-3.
- [297] Q. Z. Chen, Y. Li, L. Y. Jin, J. M. W. Quinn, and P. A. Komesaroff, "A new sol-gel process for producing Na₂O-containing bioactive glass ceramics," *Acta Biomaterialia*, vol. 6, no. 10, pp. 4143–4153, Oct. 2010, doi: 10.1016/j.actbio.2010.04.022.
- [298] R. L. Siqueira, O. Peitl, and E. D. Zanotto, "Gel-derived SiO₂-CaO-Na₂O-P₂O₅ bioactive powders: Synthesis and in vitro bioactivity," *Materials Science and Engineering: C*, vol. 31, no. 5, pp. 983–991, Jul. 2011, doi: 10.1016/j.msec.2011.02.018.
- [299] I. Cacciotti, M. Lombardi, A. Bianco, A. Ravaglioli, and L. Montanaro, "Sol-gel derived 45S5 bioglass: synthesis, microstructural evolution and thermal behaviour," *J Mater Sci Mater Med*, vol. 23, no. 8, pp. 1849–1866, Aug. 2012, doi: 10.1007/s10856-012-4667-6.
- [300] J. Qian, Y. Kang, Z. Wei, and W. Zhang, "Fabrication and characterization of biomorphic 45S5 bioglass scaffold from sugarcane," *Materials Science and Engineering: C*, vol. 29, no. 4, pp. 1361–1364, May 2009, doi: 10.1016/j.msec.2008.11.004.
- [301] T. Bekkay, K. Piyakis, Y. Diawara, E. Sacher, A. Yelon, and J. F. Currie, "Band bending and Fermi level shifts in phosphorus-doped hydrogenated amorphous silicon studied by X-ray photoelectron spectroscopy," *Surface Science*, vol. 258, no. 1–3, pp. 190–196, Nov. 1991, doi: 10.1016/0039-6028(91)90913-D.
- [302] T. Zheng, L. Yang, P. Dai, C. Qin, and Q. Tang, "XPS analysis of char residue from an intumescent flame retardant rigid PU composite foam," *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering*, vol. 544, no. 1, p. 012003, Jul. 2019, doi: 10.1088/1757-899X/544/1/012003.
- [303] U. Thamma, T. Kowal, M. Falk, and H. Jain, "Influence of nanoporosity on the nature of hydroxyapatite formed on bioactive calcium silicate model glass," *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, vol. 107, no. 4, pp. 886–899, May 2019, doi: 10.1002/jbm.b.34184.
- [304] A. Anwar, Q. Kanwal, S. Akbar, A. Munawar, A. Durrani, and M. Hassan Farooq, "Synthesis and characterization of pure and nanosized hydroxyapatite bioceramics," *Nanotechnology Reviews*, vol. 6, no. 2, pp. 149–157, Apr. 2017, doi: 10.1515/NTREV-2016-0020/MACHINEREADABLECITATION/RIS.
- [305] L. V. Tapia-Lopez, H. E. Esparza-Ponce, A. Luna-Velasco, P. E. Garcia-Casillas, H. Castro-Carmona, and J. S. Castro, "Bioactivation of zirconia surface with laminin protein coating via plasma etching and chemical modification," *Surface and Coatings Technology*, vol. 402, p. 126307, Nov. 2020, doi: 10.1016/j.surfcoat.2020.126307.
- [306] M. A. Salim, G. D. Khattak, P. S. Fodor, and L. E. Wenger, "X-ray photoelectron spectroscopy (XPS) and magnetization studies of iron-vanadium phosphate glasses," *Journal of Non-Crystalline Solids*, vol. 289, no. 1–3, pp. 185–195, Aug. 2001, doi: 10.1016/S0022-3093(01)00727-X.
- [307] C. C. Chusuei, D. Wayne-Goodman, M. J. Van Stipdonk, D. R. Justes, and E. A. Schweikert, "Calcium phosphate phase identification using XPS and time-

- of-flight cluster SIMS,” *Analytical Chemistry*, vol. 71, no. 1, pp. 149–153, 1998, doi: 10.1021/AC9806963.
- [308] A. M. Puziy, O. I. Poddubnaya, B. Gawdzik, and J. M. D. Tascón, “Phosphorus-containing carbons: Preparation, properties and utilization,” *Carbon N Y*, vol. 157, pp. 796–846, Feb. 2020, doi: 10.1016/J.CARBON.2019.10.018.
- [309] H. Scholze, “Glass : nature, structure, and properties,” *Springer-Verlag*, p. 454, 1991, Accessed: Jun. 04, 2022. [Online]. Available: <https://books.google.com/books/about/Glass.html?hl=es&id=JtJTAAMAAAJ>
- [310] L. L. Hench, “An introduction to bioceramics, second edition,” *An Introduction to Bioceramics, Second Edition*, pp. 1–600, Jan. 2013, doi: 10.1142/P884/SUPPL_FILE/P884_CHAP03.PDF.
- [311] T. Yamamuro, L. L. Hench, and June. Wilson, “Handbook of bioactive ceramics,” *CRC Express*, 1990.
- [312] J. Serra, P. González, S. Liste, S. Chiussi, B. León, M. Pérez-Amor, H. O. Ylänen, and M. Hupa, “Influence of the non-bridging oxygen groups on the bioactivity of silicate glasses,” *Journal of Materials Science: Materials in Medicine 2002 13:12*, vol. 13, no. 12, pp. 1221–1225, Dec. 2002, doi: 10.1023/A:1021174912802.
- [313] E. O. López, P. L. Bernardo, N. R. Checca, A. L. Rossi, A. Mello, D. E. Ellis, A. M. Rossi, and J. Terra, “Hydroxyapatite and lead-substituted hydroxyapatite near-surface structures: Novel modelling of photoemission lines from X-ray photoelectron spectra,” *Applied Surface Science*, vol. 571, p. 151310, Jan. 2022, doi: 10.1016/J.APSUSC.2021.151310.
- [314] N. Ebadipour, S. Paul, B. Katryniok, and F. Dumeignil, “Calcium hydroxyapatite: a highly stable and selective solid catalyst for glycerol polymerization,” *Catalysts 2021, Vol. 11, Page 1247*, vol. 11, no. 10, p. 1247, Oct. 2021, doi: 10.3390/CATAL11101247.
- [315] S. C. Ciobanu, S. L. Iconaru, D. Predoi, A. M. Prodan, and M. V. Predoi, “Physico-chemical properties and in vitro antifungal evaluation of samarium doped hydroxyapatite coatings,” *Coatings 2020, Vol. 10, Page 827*, vol. 10, no. 9, p. 827, Aug. 2020, doi: 10.3390/COATINGS10090827.
- [316] H. Takadama, H. M. Kim, T. Kokubo, and T. Nakamura, “XPS study of the process of apatite formation on bioactive Ti–6Al–4V alloy in simulated body fluid,” *Science and Technology of Advanced Materials*, vol. 2, no. 2, pp. 389–396, Jun. 2001, doi: 10.1016/S1468-6996(01)00007-9.
- [317] E. Pecheva, L. Pramatarova, A. Toth, T. Hikov, D. Fingarova, S. Stavrev, E. Iacob, and L. Vanzetti, “Effect of nanodiamond particles incorporation in hydroxyapatite coatings,” *ECS Transactions*, vol. 25, no. 3, pp. 403–410, Sep. 2009, doi: 10.1149/1.3204431/XML.
- [318] Y. Inoue and I. Yasumori, “Catalysis by alkaline earth metal oxides. III. X-ray photoelectron spectroscopic study of catalytically active MgO, CaO, and BaO surfaces,” <http://dx.doi.org/10.1246/bcsj.54.1505>, vol. 54, no. 5, pp. 1505–1510, Jun. 2006, doi: 10.1246/BCSJ.54.1505.
- [319] H. Shin, J. Jae-Young, K. Sung-Wook, and L. Woo-Kul, “XPS analysis on chemical properties of calcium phosphate thin films and osteoblastic HOS cell responses,” *Semantic Scholar*, 2006.

- <https://www.semanticscholar.org/paper/XPS-Analysis-on-Chemical-Properties-of-Calcium-Thin-Shin-Jung/d466a5907947aa90e9a4fcd3acfe1447c04ed227> (accessed Jun. 04, 2022).
- [320] X. Liu, W. Quan, C. Kang, and J. Chen, "Preparation of TiO₂/CaCO₃ composites by adsorption phase nanoreactor technique," *Proceedings of the 2014 International Conference on Mechatronics, Control and Electronic Engineering*, vol. 113, pp. 533–536, Mar. 2014, doi: 10.2991/MCE-14.2014.119.
- [321] D. H. Chu, M. Vinoba, M. Bhagiyalakshmi, I. Hyun Baek, S. C. Nam, Y. Yoon, S. H. Kim, and S. K. Jeong, "CO₂ mineralization into different polymorphs of CaCO₃ using an aqueous-CO₂ system," *RSC Advances*, vol. 3, no. 44, pp. 21722–21729, Oct. 2013, doi: 10.1039/C3RA44007A.
- [322] H. Liu, H. Yazici, C. Ergun, T. J. Webster, and H. Bermek, "An in vitro evaluation of the Ca/P ratio for the cytocompatibility of nano-to-micron particulate calcium phosphates for bone regeneration," *Acta Biomaterialia*, vol. 4, no. 5, pp. 1472–1479, Sep. 2008, doi: 10.1016/J.ACTBIO.2008.02.025.
- [323] X. Kesse, C. Vichery, A. Jacobs, S. Descamps, and J. M. Nedelec, "Unravelling the impact of calcium content on the bioactivity of sol-gel-derived bioactive glass nanoparticles," *ACS Applied Bio Materials*, vol. 3, no. 2, pp. 1312–1320, Feb. 2020, doi: 10.1021/ACSABM.0C00036/ASSET/IMAGES/MEDIUM/MT0C00036_0009.GIF.
- [324] X. Kesse, C. Vichery, and J. M. Nedelec, "Deeper insights into a bioactive glass nanoparticle synthesis protocol to control its morphology, dispersibility, and composition," *ACS Omega*, vol. 4, no. 3, pp. 5768–5775, Mar. 2019, doi: 10.1021/ACSOMEGA.8B03598/ASSET/IMAGES/LARGE/AO-2018-03598Y_0007.JPEG.
- [325] W. Xia and J. Chang, "Preparation and characterization of nano-bioactive-glasses (NBG) by a quick alkali-mediated sol–gel method," *Materials Letters*, vol. 61, no. 14–15, pp. 3251–3253, Jun. 2007, doi: 10.1016/J.MATLET.2006.11.048.
- [326] A. Lukowiak, J. Lao, J. Lacroix, and J. Marie Nedelec, "Bioactive glass nanoparticles obtained through sol–gel chemistry," *Chemical Communications*, vol. 49, no. 59, pp. 6620–6622, Jun. 2013, doi: 10.1039/C3CC00003F.
- [327] Q. Wei, R. Yang, D. Sun, J. Zhou, M. Li, Y. Zhang, and Y. Wang, "Design and evaluation of sodium alginate/polyvinyl alcohol blend hydrogel for 3D bioprinting cartilage scaffold: molecular dynamics simulation and experimental method," *Journal of Materials Research and Technology*, vol. 17, pp. 66–78, Mar. 2022, doi: 10.1016/J.JMRT.2021.12.130.
- [328] W. Haixia, M. Bin, C. Xi, Q. Lian, and X. Zheng, "Preparation and characterization of ternary composite films of polyvinyl alcohol/sodium alginate/TiO₂," *Russian Journal of Applied Chemistry* 2016 89:2, vol. 89, no. 2, pp. 287–292, May 2016, doi: 10.1134/S10704272160020191.
- [329] H. M. N. El-Din, S. G. A. Alla, and A. W. M. El-Naggar, "Swelling, thermal and mechanical properties of poly(vinyl alcohol)/sodium alginate hydrogels synthesized by electron beam irradiation,"

- <https://doi.org/10.1080/10601320601077336>, vol. 44, no. 3, pp. 291–297, Mar. 2007, doi: 10.1080/10601320601077336.
- [330] T. Wikanta and E. Erizal, “Properties of sodium alginate–polyvinyl alcohol hydrogels irradiated by gamma ray for wound dressing materials,” *Squalen Bulletin of Marine and Fisheries Postharvest and Biotechnology*, vol. 8, no. 1, p. 1, May 2013, doi: 10.15578/SQUALEN.V8I1.97.
- [331] H. K. Ju, S. Y. Kim, S. J. Kim, and Y. M. Lee, “pH/temperature-responsive semi-IPN hydrogels composed of alginate and poly(N-isopropylacrylamide),” *Journal of Applied Polymer Science*, vol. 83, no. 5, pp. 1128–1139, Jan. 2002, doi: 10.1002/APP.10137.
- [332] L. Xie, M. Jiang, X. Dong, X. Bai, J. Tong, and J. Zhou, “Controlled mechanical and swelling properties of poly(vinyl alcohol)/sodium alginate blend hydrogels prepared by freeze–thaw followed by Ca²⁺ crosslinking,” *Journal of Applied Polymer Science*, vol. 124, no. 1, pp. 823–831, Apr. 2012, doi: 10.1002/APP.35083.
- [333] S. Hua, H. Ma, X. Li, H. Yang, and A. Wang, “pH-sensitive sodium alginate/poly(vinyl alcohol) hydrogel beads prepared by combined Ca²⁺ crosslinking and freeze-thawing cycles for controlled release of diclofenac sodium,” *International Journal of Biological Macromolecules*, vol. 46, no. 5, pp. 517–523, Jun. 2010, doi: 10.1016/J.IJBIOMAC.2010.03.004.
- [334] V. G. R. Patlolla, W. P. Holbrook, S. Gizurarson, and P. Kristmundsdottir, “Evaluation of in vitro mucoadhesiveness and texture profile analysis of doxycycline in situ hydrogels,” *Pharmazie*, vol. 75, no. 1, pp. 7–12, Jan. 2020, doi: 10.1691/PH.2020.9122.
- [335] X. B. Luo, M. F. Ma, and X. J. Zhou, “Hydroxyapatite-poly(vinyl alcohol)-sodium alginate porous hydrogels with poly(vinyl alcohol) surface layer used for articular cartilage repair,” *Materials Science Forum*, vol. 852, pp. 1155–1161, 2016, doi: 10.4028/WWW.SCIENTIFIC.NET/MSF.852.1155.
- [336] L. S. Liu, S. Q. Liu, S. Y. Ng, M. Froix, T. Ohno, and J. Heller, “Controlled release of interleukin-2 for tumour immunotherapy using alginate/chitosan porous microspheres,” *Journal of Controlled Release*, vol. 43, no. 1, pp. 65–74, Jan. 1997, doi: 10.1016/S0168-3659(96)01471-X.
- [337] S. K. Bajpai and R. Tankhiwale, “Investigation of water uptake behavior and stability of calcium alginate/chitosan bi-polymeric beads: Part-1,” *Reactive and Functional Polymers*, vol. 66, no. 6, pp. 645–658, Jun. 2006, doi: 10.1016/J.REACTFUNCTPOLYM.2005.10.017.
- [338] S. Tang, Y. Zhao, H. Wang, Y. Wang, H. Zhu, Y. Chen, S. Chen, S. Jin, Z. Yang, P. Li, and S. Li, “Preparation of the sodium alginate-g-(polyacrylic acid-co-allyltrimethylammonium chloride) polyampholytic superabsorbent polymer and Its dye adsorption property,” *Mar Drugs*, vol. 16, no. 12, Nov. 2018, doi: 10.3390/MD16120476.
- [339] B. S. Gholizadeh, F. Buazar, S. M. Hosseini, and S. M. Mousavi, “Enhanced antibacterial activity, mechanical and physical properties of alginate/hydroxyapatite bionanocomposite film,” *International Journal of Biological Macromolecules*, vol. 116, pp. 786–792, Sep. 2018, doi: 10.1016/J.IJBIOMAC.2018.05.104.

- [340] A. Abdal-hay, K. A. Khalil, A. S. Hamdy, and F. F. Al-Jassir, "Fabrication of highly porous biodegradable biomimetic nanocomposite as advanced bone tissue scaffold," *Arabian Journal of Chemistry*, vol. 10, no. 2, pp. 240–252, Feb. 2017, doi: 10.1016/J.ARABJC.2016.09.021/FABRICATION_OF_HIGHLY_POROUS_BIODEGRADABLE_BIOMIMETIC_NANOCOMPOSITE_AS_ADVANCED_BONE_TISSUE_SCAFFOLD.PDF.
- [341] H. H. Jin, C. H. Lee, W. K. Lee, J. K. Lee, H. C. Park, and S. Y. Yoon, "In-situ formation of the hydroxyapatite/chitosan-alginate composite scaffolds," *Materials Letters*, vol. 62, no. 10–11, pp. 1630–1633, Apr. 2008, doi: 10.1016/J.MATLET.2007.09.043.
- [342] B. N. Singh and K. Pramanik, "Development of novel silk fibroin/polyvinyl alcohol/sol-gel bioactive glass composite matrix by modified layer by layer electrospinning method for bone tissue construct generation," *Biofabrication*, vol. 9, no. 1, Mar. 2017, doi: 10.1088/1758-5090/AA644F.
- [343] J. Esther and V. Sridevi, "Synthesis and characterization of chitosan-stabilized gold nanoparticles through a facile and green approach," *Gold Bulletin 2016 50:1*, vol. 50, no. 1, pp. 1–5, Dec. 2016, doi: 10.1007/S13404-016-0189-1.
- [344] S. Jeyarani, N. M. Vinita, P. Puja, S. Senthamilselvi, U. Devan, A. J. Velangani, M. Biruntha, A. Pugazhendhi, and P. Kumar, "Biomimetic gold nanoparticles for its cytotoxicity and biocompatibility evidenced by fluorescence-based assays in cancer (MDA-MB-231) and non-cancerous (HEK-293) cells," *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, vol. 202, p. 111715, Jan. 2020, doi: 10.1016/J.JPHOTOBIO.2019.111715.
- [345] E. Strupiechonski, M. Moreno-Ríos, E. O. Ávila-Dávila, R. Román-Doval, E. Prokhorov, Y. Kovalenko, D. G. Zárate-Triviño, D. I. Medina, and G. Luna-Barcenas, "Relaxation phenomena in chitosan-Au nanoparticle thin films," *Polymers 2021, Vol. 13, Page 3214*, vol. 13, no. 19, p. 3214, Sep. 2021, doi: 10.3390/POLYM13193214.
- [346] M. Choi, M. Cho, B. S. Han, J. Hong, J. Jeong, S. Park, M. H. Cho, K. Kim, and W. S. Cho, "Chitosan nanoparticles show rapid extrapulmonary tissue distribution and excretion with mild pulmonary inflammation to mice," *Toxicology Letters*, vol. 199, no. 2, pp. 144–152, Nov. 2010, doi: 10.1016/J.TOXLET.2010.08.016.
- [347] E. Prokhorov, G. Luna-Barcenas, S. Kumar-Krishnan, R. A. Mauricio Sánchez, B. E. Castillo Reyes, and J. Hernández Vargas, "Probing molecular interactions of polysaccharides in the presence of water," *Journal of Molecular Structure*, vol. 1218, p. 128531, Oct. 2020, doi: 10.1016/J.MOLSTRUC.2020.128531.