UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE INGENIERÍA MECÁNICA Y ELÉCTRICA

FABRICACIÓN DE UN ANDAMIO COMO RECUBRIMIENTO DE METALES CON APLICACIÓN EN IMPLANTES DE HUESO

Por

M.C GÉNESIS IRAIS SALAZAR FUENTES

COMO REQUISITO PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTORADO EN INGENIERÍA DE MATERIALES.

SAN NICOLÁS DE LOS GARZA, NUEVO LEÓN. **OCTUBRE 2026**

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE INGENIERÍA MECÁNICA Y ELÉCTRICA



FABRICACIÓN DE UN ANDAMIO COMO RECUBRIMIENTO DE METALES CON APLICACIÓN EN IMPLANTES DE HUESO

Por:

M.C GÉNESIS IRAIS SALAZAR FUENTES

COMO REQUISITO PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTORADO EN INGENIERÍA DE MATERIALES.

SAN NICOLÁS DE LOS GARZA, NUEVO LEÓN **OCTUBRE 2026**

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
Facultad de Ingeniería Mecánica y Eléctrica
Posgrado

Los miembros del Comité de Evaluación de Tesis recomendamos que la tesis "Fabricación de un andamio como recubrimiento de metales con aplicación en implantes de hueso", realizada por la estudiante Génesis Irais Salazar Fuentes, con número de matrícula 2172455, sea aceptada para su defensa como requisito parcial para obtener el grado de Doctorado en Ingeniería de Materiales.

El Comité de Evaluación de Tesis

Dra. Sofía Vázquez Rodríguez
Directora

Dra. Gethzemani Mayeli Estrada Villegas
Codirectora

Dra. Selene Sepúlveda Guzmán
Revisora

Dr. Marco Antonio Garza Navarro
Revisor

Dra. Diana Ginette Zarate Triviño
Revisora

Dr. Rodolfo Cruz Silva
Revisor

Dra. Abril Fonseca García
Revisora

V.º B.º

Dr. Azael Martínez de la Cruz
Secretario de Estudios de Posgrado

SECRETARÍA DE ESTUDIOS DE POSGRADO

Institución 190001

Programa 122608

Acta núm. 389

Ciudad Universitaria, 20 de octubre de 2026

Índice

Dedicatorias I
Agradecimientos II
Lista de abreviaciones III
Lista de Figuras IV
Lista de tablas VIII
Resumen 1
Capítulo 1. Introducción 3
1.1 Antecedentes 5
1.2 Justificación 16
1.3 Hipótesis 16
1.4 Objetivos 16
1.4.1 Objetivo general 16
1.4.2 Objetivos específicos 16
Capítulo 2. Parte Experimental 18
2.1 Materiales 18
2.2 Métodos 18
2.2.1 Síntesis de vidrio bioactivo micrométrico 19
2.2.2 Evaluación de bioactividad de vidrio bioactivo en fluido corporal simulado (SBF, por sus siglas en inglés) 20
2.2.3 Funcionalización y anclaje de vidrio bioactivo en gelatina y quitosano 22
2.2.4 Evaluación experimental de las condiciones de electrohilado para la obtención de fibras de gelatina y quitosano 25
2.2.5 Obtención de fibras y recubrimiento de metales 26
2.2.6 Evaluación del desempeño biológico y mecánico de los recubrimientos 28
2.3 Caracterización y técnicas de análisis 31
2.3.1 Caracterización del vidrio bioactivo sintetizado y molido 31
2.3.2 Caracterización de la funcionalización de los polímeros y anclaje de las partículas de vidrio bioactivo 31
2.3.3 Caracterización de las fibras electrohiladas y recubrimientos 32
2.3.4 Evaluación biológica de los recubrimientos 32
2.3.5 Evaluación de la adhesión de los recubrimientos 33
Capítulo 3. Resultados y Discusión 34
3.1 Síntesis de vidrio bioactivo micrométrico 34
3.1.1 Cambios morfológicos y estructurales del vidrio bioactivo por la molienda 34

3.1.2 Prueba de bioactividad del vidrio bioactivo molido 39
3.3 Funcionalización de gelatina y quitosano 42
3.4 Anclaje de partículas de vidrio bioactivo a los polímeros funcionalizados 48
3.5 Obtención de fibras poliméricas 57
3.5.1 Membranas de gelatina 59
3.5.2 Membranas de quitosano 61
3.5.3 Membranas de PCL/gelatina 63
3.5.4 Membranas de PCL/quitosano 65
3.5.5 Membranas de PCL/quitosano-VB 67
3.5.6 Membranas de PCL/gelatina-VB 68
3.6 Recubrimiento de aleación Ti-6Al-4V con fibras compuestas con VB 70
3.6.1 PCL/quitosano-VB 70
3.6.2 PCL/gelatina-VB 71
3.7 Prueba *in vitro* en fibras de PCL/gelatina-VB 74
3.9 Pruebas biológicas *in vitro* 80
3.9.1 Condrocitos 81
3.9.2 Fibroblastos 82
3.9.3 Células de fenotipo osteoblástico MG-63 86
Capítulo 4. Conclusiones 93
Perspectivas futuras 95
Bibliografía 96
Anexos 114
A1. Condiciones experimentales para la funcionalización de los polímeros 114
A2. Determinación de la concentración de vidrio bioactivo en los polímeros funcionalizados 116
A3. Evaluación complementaria con células madre mesenquimales (MSCs) 118
B.1 Publicaciones científicas 122
B.2 Participación en congresos y eventos científicos 122
B3. Reconocimientos académicos 123
B4. Participación académica y liderazgo estudiantil 123

Dedicatorias

Dedico este trabajo, en primer lugar, a Dios, por darme la fortaleza para seguir adelante, por acompañarme en cada paso de este camino y por permitirme alcanzar una meta más en mi vida.

A mis padres, por su amor incondicional, su esfuerzo y todos los sacrificios realizados para brindarme las herramientas necesarias para creer personal y profesionalmente. Gracias por creer siempre en mí, por impulsarme a perseguir mis sueños y por enseñarme que el trabajo, la dedicación y la perseverancia siempre tienen su recompensa. Este logro también es suyo.

A Arnold Ismael, por su amor, comprensión y compañía a lo largo de este camino. Gracias por estar prense en cada etapa, por apoyarme incondicionalmente y por recordarme, incluso en los momentos más difíciles, que nunca estaba sola. Gracias por celebrar mis logros como si fueran tuyos y por ser una parte tan importante de mi vida.

A Luna, por su compañía incondicional y por llenar de alegría mis días. Gracias por estar a mi lado en las largas jornadas de trabajo, por hacer más ligeros los momentos difíciles y por recordarme, con tu cariño, que siempre había una razón para sonreír.

Y, de manera muy especial, dedico este trabajo a mi Abuelito Mayo. Aunque hoy ya no estés conmigo físicamente, sé que desde el cielo has acompañado cada paso de este camino y que compartirías conmigo la alegría de este momento. Me gusta pensar que te sentirías orgulloso de la persona en la que me he convertido y de todo el esfuerzo, la dedicación y la constancia que puse para alcanzar este sueño. Esta meta también lleva un pedacito de ti, porque tu recuerdo ha sido una de las fuerzas que me impulsó a seguir adelante. Te abrazo con el corazón y espero que, dondequiera que estés, puedas sonreír conmigo. Siempre vivirás en mi memoria y en mi corazón.

Agradecimientos

A la Universidad Autónoma de Nuevo León, en especial a la Facultad de Ingeniería Mecánica y Eléctrica (FIME), por brindarme la oportunidad de formarme académica y profesionalmente.

A la Secretaría de Ciencia, Humanidades, Tecnología e Innovación (SEHCITI) por el apoyo brindado durante el desarrollo de mis estudios

Al Programa de Apoyo a la Ciencia, Tecnología e Innovación 2025 de la Universidad Autónoma de Nuevo León por el financiamiento al proyecto 140-ByQ-2025.

Al Instituto Nacional de Rehabilitación Luis Guillermo Ibarra Ibarra, por las facilidades brindadas para la realización de mi estancia, y al Dr. Roberto Sánchez Sánchez, por su disposición y apoyo durante este periodo, que contribuyó a complementar mi formación y al desarrollo de este trabajo.

A mis compañeros de laboratorio del CIQA y del CIIDIT, les agradezco sinceramente el apoyo, la compañía y todos los momentos compartidos a lo largo de esta etapa. Gracias por hacer más llevaderos los días de trabajo, por las conversaciones, las enseñanzas y por estar presentes tato en los momentos de esfuerzo como en aquellos que se convirtieron en buenos recuerdos. Me llevo no solo aprendizajes profesionales, sino también el cariño y la amistad de personas que hicieron de esta experiencia algo muy especial.

A mi asesora, la Dra. Sofía Vázquez Rodríguez, por brindarme la oportunidad de formar parte de su grupo de investigación durante el desarrollo de este trabajo, así como por su orientación y apoyo a lo largo de este proceso. Valoro la oportunidad de haber adquirido nuevos conocimientos y experiencias que contribuyeron tanto a mi formación académica como profesional.

A la Dra. Mayeli Estrada, por creer en mí, por compartir generosamente sus conocimientos y experiencia, y por acompañarme con paciencia, dedicación y compromiso a lo largo de este camino. Su pasión por la investigación, su calidad humana y su forma de enseñar han sido una fuente constante de inspiración para mí. Gracias por impulsarme a superar mis propios límites, por motivarme a dar siempre lo mejor de mí y por enseñarme que la investigación se construye con disciplina, perseverancia y amor por la ciencia. Más que una asesora, ha sido un ejemplo de investigadora y profesionista a la que aspiro.

Lista de abreviaciones

APTES	3-Aminopropiltrietoxisilano
ATR	Reflectancia Total Atenuada
Ca	Calcio
DMEM/F12	Medio de cultivo Dulbecco's Modified Eagle Medium/Nutrient Mixture F-12
DMF	Dimetilformamida
DRX	Difracción de Rayos X
EDC	1-Etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida
EDX	Espectroscopía de Dispersión de Energía de Rayos X
FT-IR	Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier
FT-IR/ATR	Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier con Reflectancia Total Atenuada
Gel	Gelatina
HAp	Hidroxiapatita
MG-63	Línea celular de osteosarcoma humano
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio bromuro
NHS	N-Hidroxisuccinimida
P	Fósforo
PBS	Solución amortiguadora de fosfatos
PCL	Policaprolactona
PCL-Gel	Policaprolactona/gelatina
PCL-Gel-VB	Policaprolactona/gelatina con vidrio bioactivo anclado
PCL-Qs	Policaprolactona/Quitosano
PCL-Qs-VB	Policaprolactona/Quitosano con vidrio bioactivo anclado
Qs	Quitosano
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
SBF	Fluido Corporal Simulado (*Simulated Body Fluid*)
SEM	Microscopía Electrónica de Barrido
Si	Silicio
Ti-6Al-4V	Aleación titanio–6% aluminio–4% vanadio
VB	Vidrio Bioactivo

Lista de Figuras

Figura 1. . Esquema del proceso de funcionalización del vidrio bioactivo mediante APTES en DMF (imagen creada en ChemSketch) 23

Figura 2. . Esquema del sistema activador EDC/NHS utilizado [55] 24

Figura 3. Patrones de difracción de rayos X del vidrio bioactivo sintetizado y después del proceso de molienda 36

Figura 4. Imágenes de microscopia electrónica de barrido (SEM) del vidrio bioactivo sintetizado (a, b) y después de la molienda (c, d), a diferentes aumentos, mostrando su morfología y distribución de partículas 38

Figura 5. Distribución del tamaño de partícula del vidrio bioactivo sintetizado y molido..... 38

Figura 6. Imágenes SEM de la evolución morfológica de la capa de apatita formada sobre el vidrio bioactivo después de inmersión en SBF a distintos tiempos (0, 1, 3, 7, 14 y 21 días). Los recuadros amarillos señalan las zonas donde se observa la formación de la capa superficial asociada a la apatita. 40

Figura 7. Espectros infrarrojos por transformada de Fourier del vidrio bioactivo después de inmersión en SBF (0-21 días) 41

Figura 8. Esquema del proceso de funcionalización de gelatina con ácido succínico utilizando el sistema EDC/NHS (imagen creada en ChemSketch) 43

Figura 9. Esquema del proceso de funcionalización de quitosano con ácido succínico utilizando el sistema EDC/NHS (imagen creada en ChemSketch) 43

Figura 10. Espectros FT-IR/ATR de la gelatina, acido succínico y gelatina funcionalizada, mostrando los cambios estructurales tras el proceso de funcionalización..... 45

Figura 11. Espectros FT-IR/ATR del quitosano, acido succínico y quitosano funcionalizado, mostrando los cambios estructurales tras el proceso de funcionalización..... 47

Figura 12. Esquema del anclaje de partículas de vidrio bioactivo en la gelatina funcionalizada (imagen creada en ChemSketch) 48

Figura 13. Esquema del anclaje de partículas de vidrio bioactivo en el quitosano funcionalizado

(imagen creada en ChemSketch) 49

Figura 14. Espectro FT-IR/ATR del sistema gelatina-VB 5% tras el proceso de anclaje de partículas de vidrio bioactivo. Se muestran las bandas características, incluyendo las regiones asociadas a amida I, amida II y enlaces Si-O-Si 52

Figura 15. Espectro FT-IR/ATR del sistema quitosano-VB 10% tras el proceso de anclaje de partículas de vidrio bioactivo. Se muestran las bandas características, incluyendo las regiones asociadas a amida I, amida II y enlaces Si-O-Si 54

Figura 16. Micrografías SEM y espectro EDS del sistema gelatina-VB 5% tras el proceso de anclaje de las partículas de vidrio bioactivo (a, b). El espectro EDS corresponde a la región analizada en la micrografía para determinar la composición elemental de las estructuras observadas 56

Figura 17. Micrografías SEM y espectro EDS del sistema quitosano-VB 10% tras el proceso de anclaje de las partículas de vidrio bioactivo (a, b). El espectro EDS corresponde a la región analizada en a micrografía para determinar la composición elemental de las estructuras observadas 56

Figura 18. Micrografías SEM de las membranas electrohiladas de gelatina a diferentes magnificaciones (a, b) y su correspondiente histograma de distribución de diámetros de fibra 61

Figura 19. Micrografías SEM de las membranas electrohiladas de quitosano a diferentes magnificaciones (a, b) y su correspondiente histograma de distribución de diámetros de fibra 62

Figura 20. Micrografías SEM de las membranas de PCL/gelatina obtenidas a 3000x y 10000x (a, b) y su correspondiente histograma de distribución de diámetros de fibra. La membrana presenta una morfología fibrosa continua, con un diámetro promedio de 0.12 ± 0.046 µm 65

Figura 21. Micrografías SEM de las membranas de PCL/quitosano obtenidas a 3000x y 10000x (a, b). La membrana presenta una morfología fibrosa continua y libre de defectos evidentes. El histograma muestra la distribución de diámetros de fibra, con un valor promedio de 0.67+0.159µm 67

Figura 22. Micrografías SEM de las membranas PCL/quitosano-VB obtenidas mediante electrohilado (a, b). Se observa la formación limitada de estructuras fibrosas. Asimismo, se distinguen partículas atribuidas al vidrio bioactivo anclado al sistema 68

Figura 23. Micrografías SEM y espectro EDS de las membranas PCL/gelatina-VB obtenidas mediante electrohilado (a, b). Se observa una red fibrosa definida con partículas presentes en la estructura de las fibras..... 70

Figura 24. Fotografías macroscópicas de la aleación Ti-6Al-4V antes y después de la deposición de los recubrimientos fibrosos: (a) aleación sin recubrimiento, (b) aleación recubierta con el sistema PCL/quitosano-VB y (c) aleación recubierta con el sistema PCL/gelatina-VB 72

Figura 25. Imágenes obtenidas mediante un microscopio estereoscópico de muestras de Ti-6Al-4V antes y después del recubrimiento de PCL/gelatina-VB: a) vista frontal de la aleación sin recubrimiento, b) vista lateral de la aleación sin recubrimiento, c) vista Frontal de la aleación recubierta y d) vista lateral de la aleación recubierta..... 73

Figura 26. Micrografías SEM de la aleación Ti-6Al-4V sin recubrimiento y recubierta con el sistema PCL/gelatina-VB: (a) superficie de la aleación sin recubrir y (b) distribución de las fibras y partículas de vidrio bioactivo sobre la superficie recubierta..... 74

Figura 27. Micrografías SEM de los depósitos minerales formados sobre las membranas electrohiladas de PCL/gelatina-VB durante el ensayo de bioactividad en fluido corporal simulado (SBF) a diferentes tiempos de inmersión (1, 3, 5, 7, 14 y 21 días)..... 76

Figura 28. Curva de desplazamiento vs. energía adhesiva obtenida en la prueba de adhesión del recubrimiento de fibras PCL/gelatina-VB sobre la aleación Ti-6Al-4V (promedio de 3 réplicas realizadas)..... 79

Figura 29. Ensayo de calceína-AM y MTT en células condrocitos cultivados en el control, sobre la aleación Ti-6Al-4V y sobre la aleación recubierta con fibras PCL/gelatina-VB. Las barras de error representan la desviación estándar de cuatro replicas por muestra (n=4)..... 82

Figura 30. Ensayo de calceína-AM y MTT en células fibroblastos cultivados en el control, sobre la aleación Ti-6Al-4V y sobre la aleación recubierta con fibras PCL/gelatina-VB. Las barras de error representan la desviación estándar de cuatro réplicas por muestra (n=4)..... 84

Figura 31. Ensayo de calceína-AM y MTT en células fibroblastos cultivados en el control, sobre la aleación Ti-6Al-4V y sobre la aleación recubierta con fibras PCL/gelatina. Las barras de error representan la desviación estándar de cuatro réplicas por muestra (n=4). 85

Figura 32. Ensayo de calceína-AM y MTT en células MG-63 cultivados en el control, sobre la aleación Ti-6Al-4V y sobre la aleación recubierta con fibras PCL/gelatina-VB. Las barras de

error representan la desviación estándar de cuatro replicas por muestra (n=4). 87

Figura 33. Ensayo de calceína-AM y MTT en células MG-63 cultivados en el control, sobre la aleación Ti-6Al-4V y sobre la aleación recubierta con fibras PCL/gelatina-VB. Las barras de error representan la desviación estándar de cuatro réplicas por muestra (n=4). 89

Figura 34. Porcentaje de viabilidad celular mediante el ensayo MTT de condrocitos, fibroblastos y células MG-63 cultivadas sobre los diferentes materiales. Los datos representan la media normalizada respecto al control (100%) ± la desviación estándar (n=8). 91

Figura 35. Espectros FT-IR/ATR de gelatina funcionalizada con 0.25% y 0.5% de ácido succínico..... 115

Figura 36. Espectros FT-IR/ATR de quitosano funcionalizado con 0.25% y 0.5% de ácido succínico..... 115

Figura 37. Espectros FT-IR/ATR de los sistemas de gelatina funcionalizada con 5 y 10% de vidrio bioactivo (VB), mostrando las diferencias en la intensidad de las bandas características asociadas a la interacción entre el VB y el polímero 117

Figura 38. Espectros FT-IR/ATR de los sistemas de quitosano funcionalizado con 5 y 10% de vidrio bioactivo (VB), mostrando las diferencias en la intensidad de las bandas características asociadas a la interacción entre el VB y el polímero 118

Figura 39. Micrografías SEM de las condiciones descartadas de los sistemas con vidrio bioactivo (VB): (a) PCL/gelatina-VB 10% y (b) PCL/quitosano-VB 5%, donde se observa una baja presencia de partículas de VB sobre la red fibrosa en ambas condiciones 118

Figura 40. Evaluación mediante calceína-AM y MTT de MSCs cultivadas sobre CTL, Ti y PCL/quitosano-VB. Las barras de error representan la desviación estándar de cuatro replicas por muestra (n=4). 120

Figura 41. Evaluación mediante calceína-AM y MTT de MSCs cultivadas sobre CTL, Ti y PCL/gelatina-VB 121

Lista de tablas

Tabla 1. Listado de reactivos empleados en la preparación de la solución de fluido corporal simulado (SBF), indicando las cantidades utilizadas en gramos 21

Tabla 2. Evaluación experimental para la gelatina, considerando los factores de concentración, flujo y voltaje 26

Tabla 3. Evaluación experimental para el quitosano, considerando los factores de concentración, flujo y voltaje 26

Tabla 4. Evaluación experimental para la obtención de fibras de gelatina, incluyendo la respuesta cualitativa de formación de fibras en función de la concentración, el flujo y voltaje 58

Tabla 5. Evaluación experimental para la obtención de fibras de quitosano, incluyendo la respuesta cualitativa de formación de fibras en función de la concentración, el flujo y voltaje 59

Resumen

El desempeño de los implantes metálicos depende de la interacción entre su superficie y el entorno biológico, así como de la estabilidad mecánica del sistema implante-recubrimiento. En este contexto, el desarrollo de recubrimientos compuestos con estabilidad estructural y bioactividad controlada representa una estrategia para mejorar la funcionalidad, biocompatibilidad y vida útil de los dispositivos implantables.

En este trabajo se diseñaron y fabricaron recubrimientos fibrosos basados en matrices de policaprolactona/gelatina (PCL/Gel) y policaprolactona/quitosano (PCL/Qs), funcionalizadas mediante el anclaje covalente de partículas de vidrio bioactivo (VB). El vidrio bioactivo se sintetizó por el método sol-gel, se redujo y se ancló a los polímeros naturales para favorecer una integración estable y modular su respuesta frente al entorno fisiológico.

Los polímeros funcionalizados se combinaron con PCL y se procesaron mediante electrohilado para obtener recubrimientos fibrosos sobre placas de aleación de titanio (TI-6Al-4V). La caracterización estructural, química y morfológica se realizó mediante microscopia electrónica de barrido (SEM), difracción de rayos X (DRX), espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier con reflectancia total atenuada (FT-IR/ATR), entre otras técnicas complementarias. Además, se realizaron ensayos mecánicos para evaluar la resistencia y adherencia del recubrimiento al sustrato metálico. La evaluación biológica *in vitro* incluyó pruebas de viabilidad celular mediante el ensayo MTT, así como el análisis de células viables mediante tinción con calceína, para determinar la citotoxicidad y la respuesta celular asociada a los recubrimientos desarrollados.

Los resultados demostraron que los recubrimientos fibrosos, particularmente aquellos funcionalizados con vidrio bioactivo, presentan adecuada biocompatibilidad e integración estructural sobre la aleación Ti-6Al-4V. La evaluación mediante MTT mostró viabilidades celulares de aproximadamente 99.5% en condrocitos, 98% en fibroblastos y 82.52% en células MG-63, mientras

que la evaluación morfológica mediante tinción con calceína evidenció la presencia de células viables sobre los recubrimientos. Asimismo, los ensayos mecánicos permitieron confirmar la adherencia del recubrimiento al sustrato metálico. Estas características los posicionan como una alternativa prometedora para aplicaciones en implantes de tejido óseo.

Capítulo 1.
Introducción

La ingeniería de tejidos y la medicina regenerativa han emergido como áreas estratégicas dentro de la investigación biomédica contemporánea, orientadas al desarrollo de soluciones que permitan restaurar la estructura y funcionalidad de tejidos dañados o degenerados, con el propósito de favorecer una integración estructural robusta y modular su respuesta frente al entorno.

La creciente incidencia de lesiones traumáticas, defectos estructurales complejos y condiciones degenerativas, aunado al incremento en la expectativa de vida global, han intensificado la necesidad de dispositivos implantables más seguros, eficientes y duraderos [1,2].

El mercado mundial de implantes metálicos refleja esta demanda creciente con aplicaciones ortopédicas, dentales y reconstructivas mostrando un aumento sostenido en diversos países; esto se ve impulsado por factores demográficos y el avance tecnológico en materiales y técnicas quirúrgicas [1]. Sin embargo, el incremento en procedimientos también ha puesto de manifiesto limitaciones asociadas al desempeño a largo plazo de dispositivos convencionales, incluyendo fallas biológicas y mecánicas [1–3].

Las aleaciones metálicas, especialmente aquellas basadas en titanio, son ampliamente empleadas debido a su elevada resistencia mecánica, estabilidad química y biocompatibilidad aceptable; sin embargo, la bioinercia de estas superficies limita su capacidad de establecer una interacción biológica activa con los tejidos circundantes [4,5]. Entre las fallas más reportadas se encuentran la respuesta inflamatoria, la corrosión superficial y la inadecuada integración interfacial, lo cual puede comprometer la estabilidad y desempeño del implante [4].

La respuesta biológica frente a un implante está condicionada por sus características fisicoquímicas y topográficas. Parámetros como rugosidad, energía superficial y composición química influyen directamente en eventos celulares críticos como adhesión y proliferación [6]. En este sentido, la modificación superficial mediante recubrimientos funcionales ha emergido como una estrategia eficaz para

optimizar la interacción implante-tejido sin comprometer las propiedades físicas del sustrato metálico [1].

Entre los enfoques desarrollados, los sistemas compuestos que combinan matrices poliméricas con fases inorgánicas bioactivas han mostrado alto potencial para generar superficies funcionales avanzadas. Los polímeros biodegradables proporcionan versatilidad del procesamiento y posibilidades de funcionalización, mientras que las fases bioactivas aportan capacidad de interacción dinámica con el entorno fisiológico [1,2]. Técnicas como el electrohilado han cobrado relevancia para la fabricación de recubrimientos fibrosos, ya que permiten obtener estructuras con alta área superficial y morfología controlada, favorables para interacciones célula-material [1].

Por su parte, los vidrios bioactivos han sido objeto de intensa investigación por su capacidad de interactuar con fluidos fisiológicos y promover la formación de una capa de hidroxiapatita en la interfaz material-tejido, contribuyendo así a una mejor integración biológica [5,7]. En particular, los vidrios bioactivos obtenidos mediante el método sol-gel han demostrado una mayor área superficial y bioactividad, lo que favorece su aplicación en regeneración ósea [8]. Además, el desarrollo de vidrios bioactivos funcionalizados con diferentes elementos ha demostrado mejoras tanto en propiedades antibacterianas como en la osteointegración en estudios recientes [9,10]. La incorporación de estas fases bioactivas dentro de matrices poliméricas permite modular su reactividad, mejorar sus propiedades mecánicas y controlar su cinética de degradación [5,11]

En este contexto, el diseño de recubrimientos de materiales compuestos para dispositivos metálicos implantables representa una estrategia prometedora para superar las limitaciones de los implantes convencionales, al optimizar la interacción biológica y mejorar la estabilidad mecánica y funcional del sistema a largo plazo.

1.1 Antecedentes

1.1.1 Implantes metálicos para regeneración ósea

Los implantes metálicos representan una de las soluciones terapéuticas más empleadas en ortopedia, traumatología y odontología debido a su capacidad para restaurar la función estructural de tejidos duros sometidos a cargas mecánicas elevadas. Según Swalsky y colaboradores [12], los biomateriales metálicos continúan siendo fundamentales en aplicaciones clínicas donde se requiere alta resistencia mecánica, estabilidad dimensional y durabilidad frente a condiciones fisiológicas exigentes. Materiales como el acero inoxidable, las aleaciones Co-Cr y, especialmente, las aleaciones basadas en titanio, destacan por su desempeño mecánico y resistencia a la corrosión en ambientes biológicos.

En particular, el titanio y sus aleaciones se han consolido como el estándar en implantología debido a su combinación de bajo peso, elevada resistencia específica, excelente resistencia a la corrosión y adecuada biocompatibilidad. Zhang y colaboradores [13] reportan que las nuevas generaciones de aleaciones de titanio mantienen una alta viabilidad celular y propiedades mecánicas compatibles con el tejido óseo, lo que confirma su relevancia en aplicaciones ortopédicas avanzadas. Estas características permiten que el titanio soporte cargas fisiológicas sin deformación permanente, favoreciendo la estabilidad estructural del implante.

No obstante, diversos estudios recientes subrayan que la biocompatibilidad del titanio no implica necesariamente una bioactividad suficiente para promover una integración ósea acelerada o reforzada. De acuerdo con Zhang y colaboradores [13], la superficie naturalmente pasivada del titanio presenta un comportamiento predominante bioinerte, lo que puede limitar la interacción celular directa y la formación temprana de tejido mineralizado en la interfase hueso-implante. Esta condición puede traducirse en tiempos prolongados de osteointegración y en una respuesta biológica dependiente en gran medida de las superficies del material.

Además, Mesa-Restrepo y colaboradores [14] señalan que, aunque el titanio presenta alta resistencia a la corrosión gracias a su capa pasiva de óxido, las condiciones fisiológicas incluyendo variaciones de pH, presencia de proteínas y

cargas cíclicas pueden favorecer fenómenos de corrosión localizada o liberación de partículas metálicas. Estos procesos pueden desencadenar respuestas inflamatorias o reacciones adversas en tejidos circundantes, particularmente en implantes de larga permanencia.

Estos hallazgos indican que, si bien los implantes metálicos basados en titanio ofrecen ventajas mecánicas incuestionables, persisten desafíos asociadas a su bioinercia superficial, interacción interfacial y estabilidad biológica a largo plazo. En consecuencia, se han orientado esfuerzos hacia el desarrollo de estrategias de modificación superficial capaces de optimizar la respuesta biológica sin comprometer la integridad estructural del implante.

1.1.2 Estrategias de modificación superficial en implantes metálicos

La modificación superficial de implantes metálicos ha sido ampliamente investigada con el objetivo de mejorar la interacción material-tejido y superar las limitaciones asociadas a la bioinercia del titanio y sus aleaciones [4].

Entre las estrategias tradicionales están las técnicas de plasma spray y sol-gel, las cuales han sido utilizadas para depositar recubrimientos cerámicos bioactivos, tales como hidroxiapatita y fosfatos de calcio, sobre superficies metálicas. García y colaboradores [15], demostraron que recubrimientos obtenidos por sol-gel en aleaciones Ti-6Al-4V pueden mejorar la resistencia a la corrosión y exhibir un comportamiento bioactivo en soluciones fisiológicas simuladas, aunque estas técnicas pueden presentar limitaciones en cuanto a la uniformidad y la adhesión bajo condiciones de carga prolongada.

La electrodeposición también ha mostrado eficacia para generar capas bioactivas homogéneas sobre titanio, mediante el depósito de materiales como hidroxiapatita, quitosano y otros componentes bioactivos. De manera paralela, se han explorado estrategias basadas en recubrimientos poliméricos obtenidos mediante electrohilado, los cuales permiten incorporar agentes funcionales y modificar las propiedades superficiales de los materiales. Por ejemplo, se ha demostrado que la incorporación de compuestos con actividad antibacteriana en

fibras ultrafinas de policaprolactona puede conferir propiedades antimicrobianas y de barrera a los recubrimientos obtenidos [16]. En el caso de las técnicas electroquímicas, estudios recientes han señalado que la deposición electroforética y la síntesis electroquímica permiten desarrollar recubrimientos sobre superficies de titanio con propiedades bioactivas y antibacterianas, además de posibilitar el control de la composición y características superficiales de las capas depositadas [17,18]. Asimismo, la incorporación de quitosano, hidroxiapatita y agentes antimicrobianos en recubrimientos para titanio ha demostrado potencial para mejorar la actividad antibacteriana y favorecer la bioactividad de la superficie, contribuyendo a reducir riesgos asociados con la infección y a mejorar las condiciones para la osteointegración de los implantes [19].

Recientemente, se han explorado estrategias que combinan recubrimientos poliméricos con fases inorgánicas bioactivas mediante métodos avanzados como el electrohilado. Este enfoque permite obtener matrices fibrosas de alta área superficial que imitan características de la matriz extracelular, lo que puede favorecer la adhesión, proliferación y diferenciación celular en torno a la superficie del implante. Ciarleglio y colaboradores [20] desarrollaron recubrimientos electrohilados de ácido poliláctico (PLA) con nano hidroxiapatita (nHAp) sobre titanio, demostrando que estas fibras nanométricas pueden mejorar la adhesión celular y potencialmente favorecer la corrosión protegida del sustrato metálico.

Además, Al-Khateeb y colaboradores [21] han evidenciado que recubrimientos electrohilados de PCL/quitosano con nanocompuestos cerámicos como $CaTiO_3$ y $BaTiO_3$ pueden mejorar significativamente la viabilidad y diferenciación celular en comparación con superficies no recubiertas, resaltando el potencial del electrohilado para generar recubrimientos funcionales y multifuncionales para implantes metálicos.

A pesar de estos avances, muchos recubrimientos combinados aun dependen de la deposición física de fases bioactivas sin controlar completamente la interacción interfacial entre las distintas fases. Esto puede resultar en heterogeneidad estructural o desprendimiento bajo condiciones fisiológicas, lo que

subraya la necesidad de estrategias que optimicen la estabilidad mecánica y biológica de recubrimientos electrohilados para implantes metálicos.

1.1.3 Andamios bioactivos para regeneración ósea: principios y características funcionales

En 1993, Langer y colaboradores introdujeron una estrategia innovadora para la reparación y regeneración de tejidos, sentando las bases del concepto moderno de la ingeniería de tejidos [22]. A partir de este planteamiento, se han desarrollado múltiples enfoques orientados a la creación de sustitutos biológicos funcionales capaces de restaurar la estructura y función de tejidos dañados.

La ingeniería de tejidos se fundamenta en la interacción de tres componentes esenciales: células, proteínas bioactivas, como factores de crecimiento que regulan la proliferación y diferenciación celular y proteínas de la matriz extracelular (MEC) y andamios. Estos últimos desempeñan un papel estructural y funcional clave, ya que actúan como matrices tridimensionales que imitan las características de la MEC nativa, proporcionando soporte físico y señales bioquímicas que regulan la adhesión, proliferación y diferenciación celular [23].

En el contexto de la regeneración ósea, el diseño de andamios busca no solo garantizar biocompatibilidad y biodegradabilidad, sino también promover respuestas biológicas específicas, como la diferenciación osteogénica, es decir, poseer propiedades osteoinductivas [24]. Para cumplir esta función, los andamios deben presentar una arquitectura porosa interconectada, propiedades superficiales adecuadas, estabilidad mecánica acorde al tejido objetivo y una tasa de degradación controlada que permita la sustitución progresiva por tejido neoformado. Estas características, son determinantes para lograr una integración eficiente con el tejido huésped.

Las diversidades de andamios desarrollados para aplicaciones en regeneración ósea incluyen estructuras monolíticas, sistemas microporosos, matrices basadas en nanopartículas, andamios fibrosos, hidrogeles y arquitecturas obtenidas mediante impresión 3D. Estos andamios pueden estar constituidos por biomateriales

poliméricos, cerámicos, metálicos o compuestos, derivados de fuentes sintéticas, naturales o híbridas, dependiendo de los requerimientos mecánicos y biológicos del tejido objetivo.

Más allá de su función estructural, los biomateriales empleados deben ser capaces de interactuar dinámicamente con el entorno biológico. Esto implica responder a señales bioquímicas, modular la respuesta inmunitaria e influir en la actividad de las células endógenas involucradas en la regeneración [25]. Debido a su carácter bioactivo y sensible al microambiente, estos materiales pueden modificar las condiciones tisulares locales a través de sus propiedades biofísicas y bioquímicas, regulando procesos como la inflamación, la angiogénesis, la cicatrización y la formación de tejido óseo nuevo.

Con el objetivo de emular de manera más precisa la complejidad estructural y funcional de la matriz extracelular, en los últimos años se ha observado un incremento significativo en el desarrollo de andamios compuestos. Esta estrategia permite combinar las ventajas individuales de distintos materiales, por ejemplo, la resistencia mecánica de las fases cerámicas o metálicas con la flexibilidad y procesabilidad de los polímeros en una sola arquitectura funcional [26]. Asimismo, las propiedades finales del andamio, tales como porosidad, morfología superficial, distribución de fases y comportamiento mecánico, puede ajustarse estratégicamente mediante la selección de la técnica de fabricación empleada.

1.1.4 Vidrios bioactivos en aplicaciones óseas

Los vidrios bioactivos son materiales inorgánicos no cristalinos diseñados para inducir una respuesta biológica especifica al entrar en contacto con los tejidos. Su composición puede ajustarse para favorecer interacciones con el entorno fisiológico y modificar su comportamiento superficial, características que han permitido su incorporación en diversas aplicaciones de regeneración y reparación tisular [27].

Los vidrios bioactivos constituyen una de las familias de biomateriales más relevantes en el campo de la regeneración ósea, debido a su capacidad de establecer una unión química directa con el tejido óseo mediante la formación de

una capa superficial de hidroxiapatita. Esta característica distintiva les permite no solo actuar como materiales de relleno, sino también como agentes estimuladores de procesos osteogénicos a través de la liberación controlada de iones terapéuticos [28].

Los vidrios bioactivos de base silicatada con composiciones como 58% de SiO_2, 36% de CaO y 6 % de P_2O_5, presentan una estructura amorfa cuya composición influye en la estructura de la red vítrea, así como en su reactividad, disolución y liberación de especies iónicas en medios fisiológicos. Al entrar en contacto con estos medios, ocurren procesos de intercambio iónico y disolución superficial que favorecen la liberación de especies como Ca^{2+} y PO_4^{3-}, seguida de la formación de una capa rica en calcio y fosforo que puede evolucionar hacia una fase de apatita sobre la superficie del vidrio [29,30]. Estas características resultan de interés para su incorporación en materiales nanofibrosos destinados a aplicaciones óseas, ya que la presencia del vidrio bioactivo puede conferir al recubrimiento una superficie con mayor capacidad de interacción con el medio fisiológico y favorecer la formación de una fase mineral semejante a la del tejido óseo.

En este sentido, Li y colaboradores [31] destacan que los vidrios bioactivos sintéticos ofrecen ventajas considerables sobre los sustitutos óseos tradicionales por su biocompatibilidad, bioactividad y biodegradabilidad controlada, lo que facilita la regeneración de defectos óseos críticos al promover la adhesión y proliferación celular en la interfaz material-tejido.

Dentro de las composiciones más estudiadas se encuentra el vidrio bioactivo 45S5, desarrollado originalmente por Hench, cuya estructura amorfa favorece la liberación iones como Ca^{2+} y PO_4^{3-} que estimulan la precipitación de una fase tipo apatita en presencia de fluidos fisiológicos. En un trabajo reciente, Hammami y colaboradores [5] modificaron el vidrio 45S5 mediante la incorporación de óxido de zirconio (ZrO_2) para su aplicación en recubrimientos de implantes dentales. Los autores observaron que esta modificación promovió la formación de una capa rica en fosfato de calcio en menos de 24 h, sin evidenciar citotoxicidad, lo que sugiere un potencial de osteointegración eficaz.

Asimismo, Drevet y colaboradores [32] señalaron que la incorporación de vidrios bioactivos en recubrimientos de implantes metálicos puede incrementar la bioactividad superficial y favorecer la nucleación de hidroxiapatita en condiciones fisiológicas simuladas, contribuyendo a una unión más estable entre el implante y el hueso circundante.

Por otra parte, se evaluó la incorporación de vidrio bioactivo 58S en implantes de Ti-6Al-4V fabricados mediante manufactura aditiva [33]. En el estudio *in vivo*, reportaron un mayor contacto hueso-implante en etapas tempranas de cicatrización en comparación con implantes sin vidrio bioactivo, lo que indica una aceleración del proceso integración ósea inicial.

La evidencia reciente demuestra que los vidrios bioactivos no solo favorecen la formación de apatita en medios fisiológicos, sino que también pueden modular las respuestas celulares mediante la liberación iónica controlada, lo que los posiciona como componentes estratégicos en el diseño de recubrimientos avanzados para aplicaciones ortopédicas y dentales.

1.1.5 Modelos celulares utilizados para la evaluación de biomateriales destinados a la regeneración ósea

El desarrollo de biomateriales para aplicaciones en regeneración ósea requiere una evaluación biológica que permita conocer la interacción entre el material y las células involucradas en los procesos de relación tisular. En este contexto, los estudios *in vitro* representan una etapa fundamental, ya que permiten determinar parámetros como la citocompatibilidad, la adhesión, la proliferación y la actividad metabólica celular antes de avanzar hacia modelos *in vivo*. Estos ensayos constituyen una herramienta indispensable para la selección y optimización de biomateriales con potencial aplicación clínica [34].

Debido a que la regeneración ósea involucra la participación coordinada de múltiples poblaciones celulares, la evaluación biológica de un biomaterial requiere el empleo de diferentes modelos in vitro que permitan estudiar las distintas etapas de la respuesta celular. Dvorakova y colaboradores [35] destacan que ninguna línea celular es capaz de reproducir por si sola la complejidad del proceso de

regeneración ósea, por lo que es frecuente combinar células primarias y líneas celulares para evaluar parámetros antes mencionados. Entre los modelos más utilizados se encuentran osteoblastos, osteoclastos, fibroblastos, condrocitos, células endoteliales y diversas líneas celulares osteoblásticas, cuya selección depende del tejido de interés y de los objetivos específicos de cada estudio.

1.1.6 Condrocitos

Los condrocitos son células especializadas y maduras que constituyen el único componente celular del tejido cartilaginoso. Su función principal radica en la síntesis, mantenimiento y recambio de la matriz extracelular, la cual es rica en colágeno tipo II y proteoglicanos, componentes esenciales que otorgan resistencia mecánica y elasticidad al tejido [36]. Tradicionalmente, en la ingeniería de tejidos, los condrocitos se han utilizado de forma directa para el tratamiento de defectos osteocondrales y patologías degenerativas como la osteoartritis. No obstante, su aplicación en el área de la regeneración ósea ha cobrado un enorme interés debido a su papel central en el proceso de osificación endocondral, el mecanismo biológico mediante el cual se forman y reparan la mayoría de los huesos largos del esqueleto [37].

Durante el proceso de curación ósea guiada, los condrocitos no actúan únicamente como un soporte celular pasivo, sino que experimentan una transición fenotípica clave hacia un estado hipertrófico. Durante esta etapa, las células modifican su actividad metabólica y secretan componentes de la matriz extracelular, así como factores que favorecen la vascularización y la posterior mineralización de la matriz cartilaginosa [38]. La evidencia disponible indica que una proporción de estos condrocitos puede contribuir a la formación de tejido óseo mediante su transición hacia células con característica osteoblásticas, participando en la deposición y consolidación de nuevo tejido mineralizado [39]. Por esta capacidad de participar en procesos relacionados con la formación y mineralización del tejido óseo, los condrocitos constituyen un modelo celular de interés para evaluar la respuesta de biomateriales destinados a la regeneración ósea.

En el ámbito de la ingeniería de tejidos, diversos autores han aprovechado con éxito esta respuesta celular para el diseño de nuevos implantes. Trabajos

fundamentales dirigidos por Hallet y colaboradores [40] han explorado como las poblaciones celulares del cartílago poseen la capacidad intrínseca de dar origen a osteoblastos y células de estroma de la media ósea durante el desarrollo del esqueleto. Asimismo, estudios como los presentados por Giovannone y colaboradores [41] han profundizado en la reprogramación y conversación de condrocitos en osteoblastos funcionales dentro de estructuras óseas avanzadas, validando a los condrocitos como una estirpe celular de alto valor biotecnológico para evaluar la biocompatibilidad y el potencial de integración de andamios y recubrimientos bioactivos destinados a la reparación de defectos óseos.

1.1.7 Fibroblastos

Los fibroblastos son células residentes y estructurales fundamentales del tejido conectivo, caracterizadas morfológicamente por una apariencia alargada y fusiforme. Son derivados del mesénquima y su función biológica primordial en el organismo es la síntesis, organización y mantenimiento de la matriz extracelular (MEC), siendo los principales productores de colágeno, fibronectina y proteoglicanos esenciales para la integridad tisular [42,43]. El uso de los fibroblastos se ha consolidado como un pilar fundamental para la validación inicial de biomateriales destinados a la regeneración de tejido duro. Aunque estas células pertenecen propiamente al tejido conectivo blando, su alta sensibilidad metabólica, su velocidad de proliferación y su papel crucial en la deposición de la matriz extracelular provisional las convierten en un modelo biológico estándar para comprobar la biocompatibilidad y citotoxicidad general de nuevas matrices [44]. Asimismo, la literatura respalda que la señalización celular y el remodelado tisular iniciado por los fibroblastos son capaces de modular el microambiente local, sirviendo como un paso predictivo indispensable antes de evaluar modelos celulares óseos más especializados [45].

Trabajos recientes han empleado fibroblastos para validar matrices de policaprolactona orientadas al soporte óseo. Nguyen Vu y colaboradores [46]demostraron mediante ensayos MTT que la modificación de estas matrices con hidroxiapatita (HAp) reduce la apoptosis e induce una excelente extensión y anclaje

celular en contacto con fibroblastos. Por otro lado, Zehong Xiang y colaboradores [47]profundizaron al utilizar andamios nanofibrosos de PCL con agentes bioactivos; sus resultados confirmaron que la colonización eficaz de los fibroblastos funciona como una plantilla biológica activa que, al secretar factores de señalización y remodelar la matriz provisional, precede y estimula la posterior migración y diferenciación de los fibroblastos en el defecto óseo.

1.1.8 Células de fenotipo osteoblástico MG-63

Las células MG-63 constituyen una línea celular humana osteoblasto derivada de un osteosarcoma y representan uno de los modelos *in vitro* más utilizados para la evaluación biológica de biomateriales destinados a la regeneración ósea. Conservan características propias de los osteoblastos, como la síntesis de colágeno tipo I, la expresión de marcadores osteogénicos y la capacidad de mineralizar la matriz extracelular bajo condiciones de inducción. Debido a ello, son ampliamente empleadas para analizar la citocompatibilidad, la adhesión, la proliferación y la respuesta osteogénica de nuevos biomateriales, constituyendo un modelo de referencia en estudios preclínicos de ingeniería de tejido óseo [48,49].

En estudios recientes, Nitu y colaboradores [50], desarrollaron vidrios bioactivos 45S5 sustituidos con óxido de hierro y evaluaron su respuesta biológica utilizando células MG-63, observando una adecuada viabilidad celular y confirmando el potencial del material para aplicaciones en ingeniería de tejido óseo. Asimismo, Padúa y colaboradores [51] desarrollaron andamios compuestos de quitosano con HAp mesoporosa y vidrio bioactivo, evaluando su citocompatibilidad mediante células MG-63. Los autores observaron una adecuada adhesión y proliferación celular, concluyendo que la incorporación de ambas fases cerámicas mejoró el desempeño biológico del andamio y su potencial para aplicaciones en ingeniería de tejido óseo. Por otra parte, Fazeli y colaboradores [52] desarrollaron andamios impresos en 3D recubiertos por HAp para la reparación de defectos óseos. Antes de su evaluación *in vivo*, emplearon células MG-63 para confirmar la citocompatibilidad del biomaterial y observaron una adecuada interacción célula-material. Posteriormente, los estudios en un modelo de defecto de calota en rata

demostraron una formación ósea significativamente mayor en comparación con los controles, lo que evidenció el potencial regenerativo del biomaterial.

Estos trabajos evidencian que las células MG-63 constituyen un modelo experimental ampliamente aceptado para la evaluación inicial del potencial osteogénico de biomateriales. Aunque los resultados obtenidos con esta línea celular deben complementarse posteriormente con células primarias, células madre mesenquimales y estudios *in vivo*, una respuesta favorable de las MG-63 constituye un indicador confiable de la capacidad del biomaterial para promover la interacción célula-material y favorecer procesos relacionados con la regeneración del tejido óseo.

1.2 Justificación

La relevancia de este proyecto radica en la necesidad de desarrollar recubrimientos bioactivos que favorezcan la osteointegración de implantes metálicos, mejorando la interacción entre la superficie del material y el tejido óseo, sin comprometer sus propiedades mecánicas. En este contexto, el empleo del electrohilado para la fabricación de recubrimientos fibrosos funcionalizados con vidrio bioactivo representa una estrategia prometedora para obtener superficies con características estructurales y biológicas adecuada.

Asimismo, la evaluación integral de sus propiedades fisicoquímicas, mecánicas y biológicas contribuye a generar conocimiento sobre la relación entre la composición, la estructura y la respuesta celular. Los resultados obtenidos proporcionan bases para el desarrollo de recubrimientos con potencial aplicación en implantes óseos y fortalecen la investigación en el diseño de biomateriales para el sector salud.

1.3 Hipótesis

La aplicación de recubrimientos compuestos basados en vidrio bioactivo y fibras poliméricas sobre aleaciones metálicas incrementará la bioactividad superficial, favorecerá la interacción célula-material y promoverá una osteointegración más eficiente del sustrato.

1.4 Objetivos

1.4.1 Objetivo general

Desarrollar un andamio compuesto por mezclas de PCL-gelatina y PCL-quitosano, mediante la incorporación de partículas de vidrio bioactivo, con el propósito de mejorar la adherencia celular y favorecer la osteointegración sobre superficies de aleaciones de Ti usadas como implantes metálicos.

1.4.2 Objetivos específicos

- Sintetizar vidrio bioactivo mediante el método sol-gel, reducir su tamaño

mediante molienda y caracterizar los cambios químicos mediante técnicas espectroscópicas y microscopía.

- Modificar con vidrio bioactivo polímeros como la gelatina y el quitosano obteniendo los compositos gelatina-vidrio bioactivo (gelatina-VB) y quitosano-vidrio bioactivo (quitosano-VB).
- Elaborar fibras compuestas de PCL/gelatina-VB y PCL/quitosano-VB mediante electrohilado y aplicarlas como recubrimientos sobre la aleación metálica Ti-6Al-4V grado médico.
- Evaluar la fuerza de adhesión de los recubrimientos poliméricos aplicados sobre Ti-6Al-4V y realizar ensayos biológicos, incluidos estudios de citotoxicidad, biocompatibilidad, bioactividad y proliferación celular, para determinar su viabilidad en aplicaciones biomédicas.

Capítulo 2.
Parte Experimental

2.1 Materiales

En la síntesis del vidrio bioactivo se utilizó: ácido nítrico (HNO_3, 63.01 g/mol, Sigma Aldrich), tetraortosilicato (TEOS, 208.33 g/mol, Sigma Aldrich), trietilfosfato (TEP, 182.16 g/mol, Sigma Aldrich), nitrato de calcio tetrahidratado (Ca (NO_3) 2*4 (H_2O), 236.15 g/mol, Meyer), nitrato de sodio ($NaNO_3$, 84.99 g/mol, Meyer).

Para la preparación del fluido corporal simulado (SBF) se utilizó: cloruro de sodio (NaCl, 58.44 g/mol, Meyer), bicarbonato de sodio ($NaHCO_3$, 84.01 g/mol, Meyer), cloruro de potasio (KCl, 74.55 g/mol, Meyer), fosfato de potasio dibásico trihidratado (K_2HPO_4*3H_2O, 228.22 g/mol, Meyer), cloruro de magnesio hexahidratado ($MgCl_2$*6H_2O, 203.30 g/mol, Meyer), ácido clorhídrico (HCl, 36.46 g/mol, J.T Baker), cloruro de calcio ($CaCl_2$, 110.98 g/mol, Meyer), sulfato de sodio (Na_2SO_4, Meyer), Tris ([($HOCH_2$)3(NH_2), 121.14 g/mol, Sigma Aldrich).

Los polímeros utilizados fueron: gelatina (gelatina de piel porcina, Sigma Aldrich), quitosano (quitosano, Sigma Aldrich), policaprolactona (PCL, Mw= 90,000 g/mol, Sigma Aldrich).

Los solventes utilizados fueron: ácido acético (CH_3COOH, 60.05 g/mol, Sigma Aldrich), ácido fórmico (CH_2O_2, 46.03 g/mol, J. T Baker), diclorometano (DCM, 84.93 g/mol, J. T Baker), ácido trifluoroacético (TFA, 114.02 g/mol, Sigma Aldrich).

Para la funcionalización de los polímeros se utilizó: acido succínico ($C_4H_6O_4$, 118.09 g/mol, Sigma Aldrich), carbodiimida (EDC, 155.24 g/mol, Sigma Aldrich), N-hidroxisuccinimida (NHS, 115.09 g/mol, Sigma Aldrich).

2.2 Métodos

En el presente trabajo, se implementaron diferentes procedimientos experimentales orientados al desarrollo de fibras compuestas de PCL-gelatina y PCL-quitosano incorporando vidrio bioactivo, destinadas a su aplicación como recubrimientos bioactivos en sustratos de Ti-6Al-4V.

El trabajo se dividió en cuatro etapas principales: la síntesis del vidrio bioactivo,

modificación de los polímeros de gelatina y quitosano con vidrio bioactivo, obtención de las condiciones para la elaboración de las fibras por la técnica de electrohilado, así como la obtención de recubrimiento en placas de aleaciones de titanio. En cada etapa el material fue caracterizado química y morfológicamente. Asimismo, se determinó su capacidad como biomaterial osteoinductor.

2.2.1 Síntesis de vidrio bioactivo micrométrico

El vidrio bioactivo fue sintetizado mediante el método sol-gel, a través de reacciones controladas de hidrólisis y policondensación empleando tetraetilortosilicato (TEOS) como precursor de sílice, trietilfosfato (TEP) como fuente de fósforo y nitrato de calcio tetrahidratado como precursor de calcio. La formulación se diseñó para obtener una composición nominal de 58% en peso de SiO_2, 36% en peso de CaO y 6% en peso de P_2O_5.

Inicialmente, se preparó una solución acuosa de ácido nítrico 2M, utilizada como catalizador ácido para promover la hidrólisis del TEOS. Posteriormente, se añadieron 33.5 mL de TEOS bajo agitación magnética constante durante 45 min, favoreciendo la formación de grupos silanol (Si-OH). A continuación, se incorporó 1.9 mL de TEP, manteniendo la agitación por 45 min adicionales para permitir su adecuada integración en la red en formación. Finalmente, se adicionaron 10.52 g de nitrato de calcio, continuando la agitación durante 60 min con el fin de asegurar la homogeneidad del sistema precursor.

La solución obtenida se transfirió a un recipiente de teflón herméticamente cerrado y se dejó en reposo a temperatura ambiente durante 5 días para permitir el proceso de gelificación. El gel formado fue sometido a un proceso de secado a 60 °C durante 72 h para favorecer la eliminación gradual del solvente y minimizar la formación de grietas. Posteriormente, se realizó un tratamiento térmico intermedio a 130 °C durante 48 h, con el objetivo de completar las reacciones de policondensación y eliminar el exceso de humedad residual. Finalmente, el material seco fue calcinado a 700 °C durante 10-12 h en una mufla, con el propósito de estabilizar la red vítrea, promover la descomposición del nitrato de calcio y obtener el vidrio bioactivo en forma de polvo fino.

El polvo de vidrio bioactivo fue sometido a un proceso de molienda de alta energía con el fin de optimizar su incorporación en las matrices poliméricas y favorecer una dispersión homogénea con alta área superficial.

La molienda se llevó a cabo en un mezclador/molino de alta energía Spex Sample Prep 8000D Mixer/mill, operando bajo un mecanismo de impacto mecánico. En cada vial se colocó 0.5 g de vidrio bioactivo, previamente pesados en una balanza analítica, junto con dos bolas de molienda. Se emplearon viales y bolas de plástico con el propósito de evitar la contaminación o posibles reacciones indeseadas del material durante el proceso. El tratamiento de molienda se realizó durante un periodo de 45 min. Las muestras fueron caracterizadas estructural y morfológicamente mediante microscopia electrónica de barrido (SEM) y difracción de rayos X (DRX).

2.2.2 Evaluación de bioactividad de vidrio bioactivo en fluido corporal simulado (SBF, por sus siglas en inglés)

La evaluación de la bioactividad del vidrio bioactivo se realizó mediante la inmersión de muestras moldeadas en forma de pastillas en fluido corporal simulado (Simulated Body Fluid, SBF) cuya composición iónica reproduce de manera cercana la del plasma sanguíneo humano. La preparación del SBF se llevó a cabo siguiendo el protocolo descrito por Kokubo y Takadama [53], bajo condiciones estrictamente controladas de temperatura y pH.

Para la preparación de 1000 mL de SBF, se colocaron inicialmente 700 mL de agua destilada en un recipiente plástico de 1L, equipado con una barra de agitación magnética. El recipiente se mantuvo cubierto, asegurando una temperatura constante de 36.5 $\pm$ 1.5 °C durante todo el proceso. Una vez alcanzada la temperatura establecida, se procedió a la disolución secuencial de los reactivos en el siguiente orden mostrado en la Tabla 1:

Tabla 1. Listado de reactivos empleados en la preparación de la solución de fluido corporal simulado (SBF), indicando las cantidades utilizadas en gramos

Reactivo	Cantidad (g)
1. Cloruro de sodio	8.035
2. Bicarbonato de sodio	0.355
3. Cloruro de potasio	0.225
4. Fosfato de potasio dibásico trihidratado	0.231
5. Cloruro de magnesio hexahidratado	0.311
6. Ácido clorhídrico	1 M
7. Cloruro de calcio	0.292
8. Sulfato de sodio	0.072

La temperatura se mantuvo constante a 36.5 $\pm$ 1.5 °C durante toda la etapa de incorporación de sales. Se insertó el electrodo de pH en la solución (justo antes de disolver el Tris, el pH debe ser de 2.0 $\pm$ 1.0). Posteriormente, el Tris se agregó de forma gradual bajo agitación continua, lo que permitió su completa disolución y la estabilización del pH antes de cada nueva adición. Este procedimiento permitió un incremento controlado del pH.

Al alcanzar un valor de 7.30 $\pm$ 0.05, se verificó que la temperatura se mantuviera en 36.5 $\pm$ 0.5 °C. Se continuó la adición progresiva de Tris hasta aproximarse a un pH ligeramente inferior a 7.45. Una vez alcanzando un valor de 7.45 $\pm$ 0.01, se suspendió la incorporación de Tris y se añadió cuidadosamente HCl 1M gota a gota mediante una jeringa, con el fin de ajustar el pH a 7.42 $\pm$ 0.01, evitando que descendiera por debajo de 7.40. Este procedimiento de ajuste fino se repitió hasta lograr la disolución completa del Tris, manteniendo el pH en un intervalo de 7.42-7.45.

Como etapa final, la temperatura se estabilizó en 36.5 $\pm$0.2 °C y el pH se ajustó cuidadosamente a 7.40. Una vez alcanzado el pH requerido, el electrodo fue retirado y enjuagado con agua destilada. El agua utilizada durante este enjuague fue reincorporada a la solución SBF, con el propósito de compensar la pequeña cantidad de solución que pudiera haber quedado adherida al electrodo durante el ajuste del oh y evitar alteraciones en la composición final del medio. El SBF preparado se almacenó en una botella herméticamente cerrada a una temperatura de 5-10 °C hasta su uso, recomendándose su empleo dentro de un periodo máximo

de 30 días para garantizar la estabilidad de la solución.

Una vez teniendo la solución SBF, se realizó la prueba de bioactividad, la cual consiste en sumergir por completo las pastillas de vidrio bioactivo en el fluido. Las pastillas se obtuvieron a partir de aproximadamente 0.05 g de vidrio bioactivo, cantidad que se colocó indivisamente en un molde para pastillas y se compactó mediante una prensa mecánica, aplicando una carga de 2 toneladas durante 5 min, sin calentamiento. Posteriormente, las pastillas compactadas se retiraron del molde y presentaron un diámetro de 7 mm, correspondiente a un área superficial total de 38.48 mm^2 por pastilla. A partir de estos valores, el volumen de solución SBF requerido por muestra se determinó mediante la siguiente expresión: $V_s = S_a/10$, en donde V_s es el volumen de SBF por muestra en mL, y S_a al área de la muestra en (mm^2).

Una vez preparado y estabilizado el fluido corporal simulado, este fue calentado nuevamente a 36.5 °C previo al ensayo de inmersión. Posteriormente, se distribuyó el volumen correspondiente en frascos plásticos individuales asegurando que cada muestra estuviera completamente sumergida. De acuerdo con la relación previamente calculada, se emplearon 12 mL de SBF por muestra.

Los tiempos de inmersión evaluados fueron de 0, 1, 3, 7, 14 y 21 días. Para cada condición experimental, se colocaron tres pastillas de vidrio bioactivo en cada frasco, asegurando su completa inmersión en el volumen correspondiente de SBF.

Transcurrido el tiempo de inmersión establecido para cada punto de estudio, las muestras fueron retiradas de la solución y enjuagadas cuidadosamente con agua destilada para eliminar residuos superficiales. Posteriormente, se dejaron secar bajo condiciones controladas antes de proceder a su caracterización.

2.2.3 Funcionalización y anclaje de vidrio bioactivo en gelatina y quitosano

Las partículas de vidrio bioactivo, cuya superficie presenta grupos hidroxilo (-OH) característicos de los vidrios bioactivos de base silicatada [54], fueron sometidas a un proceso de funcionalización mediante su reacción con 3-aminopropiltrietoxisilano (APTES) en dimetilformamida (DMF), empleando cantidades estequiométricas. Estos grupos superficiales proporcionan sitios reactivos para la interacción con el APTES y favorecen su unión a la superficie del vidrio. La reacción de silanización

permite la formación de enlaces Si-O-Si entre los grupos silanol superficiales del vidrio y las especies silanizadas del APTES, incorporando grupos amino (NH_2) en la superficie del vidrio bioactivo. El material funcionalizado se utilizó posteriormente para el anclaje químico a los polímeros de estudio (Figura 1).



Figura 1. . Esquema del proceso de funcionalización del vidrio bioactivo mediante APTES en DMF (imagen creada en ChemSketch)

Una vez realizada la funcionalización de las partículas de vidrio bioactivo, se llevó a cabo la funcionalización de la gelatina y del quitosano con ácido succínico. En el caso de la gelatina, se preparó una solución al 25% (p/v) en agua destilada, que se mantuvo a 35 °C bajo agitación magnética constante hasta su completa disolución y homogeneización. Por otra parte, para la funcionalización del quitosano se preparó una solución al 3% (p/v) utilizando una mezcla de agua destilada y ácido acético en proporción 8:2 (v/v), con el fin de favorecer su adecuada solubilización. La solución se mantuvo a 30 °C bajo agitación constante hasta obtener un sistema homogéneo.

La selección de las condiciones de funcionalización se realizó mediante la evaluación experimental de diferentes concentraciones de ácido succínico y temperaturas. Se evaluaron concentraciones de 0.25% y 0.5% (p/v) de ácido succínico en solución acuosa, mientras que las condiciones de temperatura se establecieron considerando principalmente la estabilidad y homogeneidad de los sistemas durante el proceso de funcionalización. Las condiciones evaluadas y los criterios empleados para establecer las condiciones seleccionadas se presentan en el Anexo A.1. Con base en esta evaluación, se seleccionó una concentración de 0.5% (p/v) de ácido succínico, empleando una relación molar de EDC: NHS de 1:1 y una temperatura de 30 °C.

Una vez establecidas las condiciones de funcionalización, se preparó una solución acuosa del sistema activador EDC/NHS (Figura 2) en proporción molar 1:1.

El esquema de la Figura 2 representa la activación de los grupos carboxilo mediante EDC, seguida de la formación de un intermediario más estable en presencia de NHS, lo que facilita su posterior reacción con grupos amino y la formación de enlaces amida. Posteriormente se incorporó ácido succínico al 0.5% (p/v) mediante la adición gota a gota bajo agitación constante, con el fin de favorecer la disponibilidad de grupos carboxilo para el proceso de acoplamiento. Una vez obtenida la solución activada, cada sistema polimérico fue combinado con la mezcla ácido succínico-EDC/NHS y sometido a síntesis asistida por microondas empleando un reactor Monowave 50 de Anton Paar, operando a 30 °C durante 20 min. Este tratamiento permitió favorecer la reacción de acoplamiento y promover la modificación covalente de los polímeros.

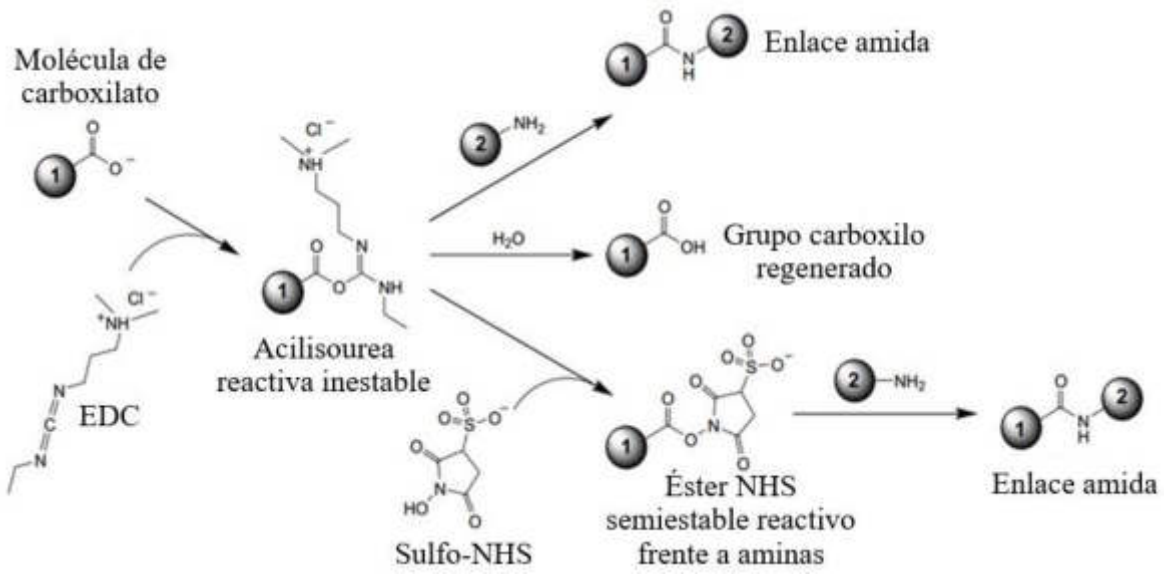


Figura 2. . Esquema del sistema activador EDC/NHS utilizado [55]

Después de la funcionalización de los polímeros, las partículas de vidrio bioactivo previamente funcionalizadas con APTES fueron ancladas covalentemente a las estructuras de gelatina y quitosano funcionalizado. Previo a la preparación de las soluciones, ambos polímeros funcionalizados fueron secados durante 24 h en una estufa de vacío para eliminar la humedad residual y obtener un material seco. Posteriormente, se preparó una solución de gelatina funcionalizada al 25% (p/v) en agua destilada, manteniéndola a 35 °C bajo agitación constante hasta su completa homogeneización. En el caso del quitosano funcionalizado, se preparó una solución

al 10% (p/v) utilizando una mezcla de agua y ácido acético en proporción 8:2 (v/v), bajo agitación constante hasta asegurar su completa solubilizacion.

Posteriormente, las partículas de vidrio bioactivo funcionalizadas se mantuvieron en la solución de APTES y DMF obtenida durante el proceso de funcionalización. Esta suspensión fue incorporada directamente a las soluciones de gelatina y quitosano previamente funcionalizadas, bajo agitación constante, para favorecer la dispersión de las partículas dentro de los sistemas poliméricos. Las partículas se incorporaron en concentraciones de 5 y 10% para cada polímero modificado, con la finalidad de evaluar su incorporación y dispersión en las formulaciones obtenidas.

Las mezclas obtenidas fueron sometidas a una reacción asistida por microondas con el fin de promover el anclaje covalente del vidrio bioactivo. El tratamiento se realizó a 100 °C durante 3 h utilizando un reactor Monowave 50 de Anton Parr. Al término de la síntesis, las muestras se dejaron enfriar a temperatura ambiente y posteriormente se almacenaron a 5 °C durante 24 h. Los materiales sometidos fueron sometidos a ciclos sucesivos de lavado con etanol en el caso de la gelatina funcionalizada con vidrio bioactivo (Gel-VB) y con acetona para el quitosano funcionalizado (Qs-VB), con el propósito de eliminar residuos de solventes y reactivos no incorporados durante el proceso de funcionalización e incorporación del vidrio bioactivo.

Finalmente, los sistemas se secaron en un horno de vacío a 40 °C durante 24 h hasta obtener materiales secos y estables.

2.2.4 Evaluación experimental de las condiciones de electrohilado para la obtención de fibras de gelatina y quitosano

Se realizó una evaluación experimental de diferentes condiciones de procesamiento para la obtención de fibras de gelatina y quitosano mediante electrohilado. El objetivo fue identificar los parámetros de operación que permitieran obtener fibras continuas, uniformes y con la menos presencia posible de defectos morfológicos.

Para cada sistema polimérico, se evaluaron como variables de procesamiento el flujo de alimentación, la concentración de la solución y el voltaje aplicado. Como parámetros constantes se establecieron la distancia entre la aguja y el colector (10

cm), el calibre de la aguja (18 G) y la temperatura ambiente (30 °C), con el propósito de mantener un entorno de procesamiento uniforme.

Los niveles evaluados para cada variable de procesamiento se presentan en la Tabla 2 y Tabla 3:

Tabla 2. Evaluación experimental para la gelatina, considerando los factores de concentración, flujo y voltaje

Experimento	Factor 1 Concentración (% p/v)	Factor 2 Flujo (mL/h)	Factor 3 Voltaje (kV)
1	15	0.3	10
2	20	0.5	15
3	**25**	**0.8**	**18**
4	15	0.8	18
5	20	0.3	10
6	25	0.5	15

Tabla 3. Evaluación experimental para el quitosano, considerando los factores de concentración, flujo y voltaje

Experimento	Factor 1 Concentración (% p/v)	Factor 2 Flujo (mL/h)	Factor 3 Voltaje (kV)
1	5	0.6	10
2	7	0.7	11
3	10	0.8	12
4	5	0.8	12
5	**10**	**0.6**	**10**
6	7	0.7	11

A partir de la evaluación de las diferentes condiciones, se seleccionaron los parámetros que permitieron obtener fibras con morfología uniforme y menos presencia de defectos estructurales para cada sistema polimérico. Las condiciones seleccionadas fueron empleadas posteriormente en el proceso de recubrimiento de la aleación Ti-6Al-4V

2.2.5 Obtención de fibras y recubrimiento de metales

Con el propósito de mejorar la estabilidad estructural y las propiedades mecánicas del recubrimiento final, se incorporó policaprolactona (PCL) a la solución de gelatina-vidrio bioactivo y quitosano-vidrio bioactivo. La adición de PCL busca optimizar la formación y continuidad de las fibras obtenidas por electrohilado, así

como la integridad del recubrimiento final. Esta estrategia permite complementar la bioactividad del sistema con un mejor desempeño mecánico, alargar los tiempos de degradación, favoreciendo la integridad del material.

Para la preparación de las soluciones destinadas al proceso de electrohilado, cada polímero se disolvió de manera individual empleando el sistema de solventes que permitió obtener una solución homogénea y adecuada para su posterior procesamiento. Para el sistema gelatina-vidrio bioactivo, se elaboró una solución al 25% (p/v) empleando como sistema de solventes una mezcla de ácido fórmico y ácido acético en proporción 2:8 (v/v). La solución se mantuvo a 35 °C bajo agitación constante hasta ser homogénea. De manera independiente, el sistema quitosano-vidrio bioactivo se preparó a una concentración del 10% (p/v) utilizando ácido trifluoroacético (TFA) como solvente, manteniéndose a 30°C bajo agitación constante hasta su total homogeneización. Finalmente, se preparó una solución de policaprolactona (PCL) al 3.5% (p/v) en diclorometano (DCM), manteniéndola a temperatura ambiente bajo agitación continua hasta lograr su completa solubilizacion.

Una vez obtenidas las soluciones individuales, se procedió a la incorporación de la solución de PCL en los sistemas gelatina-VB y quitosano-VB. Para ello, la solución de PCL se colocó en un embudo de decantación y se añadió lentamente, gota a gota, sobre la solución polimérica correspondiente, la cual se mantuvo a 35 °C bajo agitación constante hasta obtener una emulsión estable. Esta adición controlada permitió favorecer la incorporación progresiva del PCL y reducir la formación de fases separadas. Una vez completada la incorporación, la mezcla se mantuvo bajo agitación continua durante 20 min adicionales, asegurando la homogeneización del sistema. El mismo procedimiento se aplicó para la solución de quitosano-VB, donde la solución de PCL fue adicionada de manera gradual hasta obtener una mezcla homogénea y estable.

De esta manera, se obtuvieron las formulaciones PCL/gelatina-VB y PCL/quitosano-VB, las cuales fueron posteriormente sometidas al proceso de electrohilado. la selección de los sistemas de solventes se realizó de acuerdo con la capacidad de cada medio para solubilizar los respectivos polímeros y permitir la

preparación de soluciones homogéneas para su posterior combinación y procesamiento.

Previamente al proceso de recubrimiento, la aleación metálica Ti-6Al-4V fue cortada en dimensiones aproximadas de 9 x 3 cm. Posteriormente, las muestras fueron sometidas a un proceso de limpieza mediante ultrasonido, realizando lavados sucesivos con etanol y acetona durante 10 min en cada solvente. Una vez completada la limpieza, las aleaciones se secaron en una estufa a temperatura controlada durante 24 h. Después del secado, las muestras fueron manipuladas exclusivamente con guantes para evitar cualquier tipo de contaminación superficial antes del proceso de recubrimiento. Las aleaciones limpias se fijaron en el colector del equipo de electrohilado para proceder con la deposición de las fibras. El recubrimiento se realizó utilizando el equipo Innovenso NS24.

Para el sistema PCL/gelatina-VB, la solución se preparó empleando una relación 70:30, se cargó en una jeringa de 10 mL y se procesó bajo las condiciones optimizadas previamente determinadas mediante la evaluación experimental: flujo de 0.8 ml/h y un voltaje aplicado de 18 kV. Se mantuvieron constantes la distancia aguja-colector (10 cm), el calibre de la aguja (18 G) y la temperatura ambiente (30°C). El tiempo de deposición fue de 2 h, hasta observar la formación de un recubrimiento homogéneo sobre la superficie de la aleación.

En el caso del sistema PCL/quitosano-VB, se empleó una relación de 70:30 y los parámetros optimizados: flujo de 0.6 mL/h y un voltaje de 10 kV, manteniendo las mismas condiciones constantes del proceso. Para este sistema, el tiempo de recubrimiento fue de 4 h, hasta obtener una capa fibrosa uniforma y adecuada para los análisis posteriores.

2.2.6 Evaluación del desempeño biológico y mecánico de los recubrimientos

Previo a la evaluación biológica, las placas de titanio Ti-6Al-4V fueron cortadas 1 x 1 cm utilizando un sistema de corte láser LT-20W-A de Laser Tree, y posteriormente recubiertas con las fibras compuestas de PCL/gelatina-VB y PCL/quitosano-VB mediante el proceso de electrohilado previamente descrito. Antes de realizar los ensayos biológicos, los recubrimientos fueron sometidos a un

proceso de acondicionamiento superficial con el fin de estabilizar el pH y eliminar posibles residuos de solventes o especies remanentes que pudieran afectar la viabilidad celular. Para ello, los sustratos se lavaron inicialmente con solución amortiguadora de fosfatos (PBS) para favorecer la neutralización de especies remanentes y posteriormente con agua destilada. Durante los lavados, se midió el pH del medio de enjuague y se realizaron lavados sucesivos hasta alcanzar valores cercanos al pH fisiológico (7.4).

Una vez completado el proceso de lavado, las muestras se secaron en una estufa de vacío a 40 °C durante 2 h. Los sustratos recubiertos y acondicionados fueron posteriormente empleados en los ensayos biológicos descritos a continuación.

Se realizaron ensayos de calceína AM y MTT con el objetivo de analizar el comportamiento celular y cuantificar la actividad metabólica. En ambos ensayos se evaluaron las mismas condiciones experimentales para cada uno de nuestros recubrimientos: CTL (control), Ti (aleación Ti-6Al-4V sin recubrimiento) y Ti-Fibra (sustratos recubiertos con fibras compuestas). Se emplearon tres líneas celulares como modelos biológicos: condrocitos, fibroblastos y células osteoblásticas MG-63, con el propósito de evaluar la respuesta celular desde diferentes perspectivas relacionas con regeneración tisular y biocompatibilidad.

Las células, previamente cultivadas en medio DMEM-F12 suplementado, fueron sembradas sobre cada muestra a una densidad de 350 µL por pozo. Para ello, se depositó una gota de la suspensión celular directamente sobre la superficie del recubrimiento, utilizando un volumen suficiente para cubrir completamente el área de la muestra y favorecer el contacto homogéneo de las células con la superficie evaluada.

El ensayo de calceína-AM/ETHD-1 se llevó a cabo empleando dos réplicas por grupo experimental, dispuestas en una placa de cultivo de 24 pozos. Las muestras fueron incubadas durante 24 h bajo condiciones estándar de cultivo celular (37 °C, 5%CO_2 y atmosfera húmeda controlada) para permitir la adhesión y proliferación celular inicial. Transcurrido este periodo, se preparó la solución de tinción compuesta por calceína-AM y etidio homodímero-1 (ETHD-1), la cual se añadió en un volumen de 1 mL por pozo, asegurando la cobertura total de las superficies de

las muestras. Posteriormente, se incubaron durante 1 h en condiciones protegidas de la luz para favorecer la reacción de fluorescencia.

Finalmente, las muestras fueron analizadas mediante microscopía de fluorescencia, con el fin de evaluar la viabilidad celular, distinguiendo células vivas (fluorescencia verde) y células muertas (fluorescencia roja).

Para el ensayo de MTT, se emplearon las mismas condiciones experimentales y líneas celulares, siguiendo el mismo procedimiento de siembra. En este caso, se prepararon cuatro replicas por condición experimental (CTL, Ti y Ti-Fibra), obteniendo un total de 12 pozos distribuidos en una placa de cultivo de 24 pozos. Las muestras se incubaron durante 24 h bajo condiciones estándar de cultivo celular. Transcurrido este periodo, se preparó la solución de trabajo de MTT en medio de DMEM-F12 en una proporción 1:9 (v/v), la cual se añadió en un volumen de 1 mL por pozo, asegurando la cobertura completa de las superficies. Las muestras se incubaron durante 3 h, permitiendo la reducción del MTT por la actividad mitocondrial de las células viables y la consecuente formación de cristales de formazán.

Posteriormente, el medio fue retirado cuidadosamente y se añadió una solución de isopropanol/dimetilsulfóxido (DMSO) para solubilizar los cristales formados. Se recolectaron alícuotas de 100 µL de cada muestra por duplicado y se transfirieron a una placa de 96 pozos para su análisis espectrofotométrico. Los valores obtenidos se emplearon para determinar la viabilidad celular relativa de cada condición experimental.

Para la caracterización mecánica se emplearon placas de aleación Ti-6Al-4V con dimensiones de 9 x 3 cm, previamente recubiertas con las fibras compuestas correspondientes. Las propiedades mecánicas de los recubrimientos fueron evaluadas mediante ensayos instrumentados de tensión y pelado. Cada condición experimental se evaluó por triplicado, y el procedimiento completo se repitió en tres tandas independientes. Los valores obtenidos fueron promediados para calcular la fuerza media de desprendimientos, obteniendo así un valor representativo y estadísticamente más confiable en la adhesión mecánica del sistema.

2.3 Caracterización y técnicas de análisis

2.3.1 Caracterización del vidrio bioactivo sintetizado y molido

Caracterización estructural

En las muestras de vidrio bioactivo sintetizado y molido se evaluó la estructura del material mediante difracción de rayos X (DRX), para determinar los posibles cambios estructurales asociados con el proceso de molienda. Para ello se utilizó un difractómetro de rayos X para polvos automatizado y multipropósito XRDynamic 500, empleando radiación CuKα, en un intervalo de 10-80° (2θ) y con un tamaño de paso de 0.02°.

Caracterización morfológica

En las muestras de vidrio bioactivo sintetizado y molido se observó la morfología superficial y la distribución de tamaño de partículas, para evaluar los cambios producidos por el proceso de molienda. Asimismo, se realizó la caracterización morfológica de las muestras de vidrio bioactivo molido después de la prueba de bioactividad para identificar cambios en su superficie asociados con la formación de una capa de productos de bioactividad. Para ello, se utilizó un microscopio electrónico de barrido Hitachi SU8020, operado a 5 kV y utilizando un detector de electrones secundarios (SE). Las micrografías se obtuvieron a diferentes escalas, comprendidas entre 1 y 50 µm.

Caracterización química

En las muestras de vidrio bioactivo molido después de la prueba de bioactividad se realizó espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR), para evaluar la formación de nuevos productos superficiales durante el proceso de bioactividad. Para ello, se utilizó un espectrómetro de infrarrojo por transformada de fourier Nicolet iS10 (Thermo Scientific), mediante la técnica de reflectancia total atenuada (ATR), en un intervalo de análisis de 4000 a 400 cm^{-1}.

2.3.2 Caracterización de la funcionalización de los polímeros y anclaje de las partículas de vidrio bioactivo

Caracterización química

En los polímeros funcionalizados mediante acido succínico y el sistema de

activación EDC/NHS se realizó espectroscopía infrarroja por transformada de fourier (FTIR). Asimismo, se analizaron mediante FTIR los polímeros funcionalizados después del anclaje de las partículas. Para ello, se utilizó un espectrómetro de infrarrojo por transformada de Fourier Nicolet iS10 (Thermo Scientific), mediante la técnica de reflectancia total atenuada (ATR), en un intervalo de análisis de 4000 a 400 cm^{-1}.

2.3.3 Caracterización de las fibras electrohiladas y recubrimientos

Caracterización morfológica

Las fibras obtenidas mediante electrohilado se observaron de manera individual y en sistemas compuestos. asimismo, se analizaron las fibras depositadas como recubrimientos sobre la aleación Ti-6Al-4V para observar la confirmación de la capa fibrosa. Para ello se utilizó un microscopio electrónico de barrido Hitachi SU8020, operado a 5 kV y utilizando un detector de electrones secundarios (SE).

Caracterización elemental

La composición elemental de las fibras obtenidas se determinó mediante espectroscopía de dispersión de energía de rayos x (EDS), considerando los sistemas compuestos por vidrio bioactivo. El análisis se realizó mediante un detector de dispersión de energía de rayos x acoplado al microscopio electrónico de barrido Hitachi SU8020 a una distancia de observación de 11mm.

Evaluación superficial

La superficie de los recubrimientos recubiertos con las fibras electrohiladas se examinó mediante un microscopio estereoscópico. Para ello, se utilizó el microscopio Jewso, modelo EMR-02, bajo las condiciones de observación establecidas para cada muestra.

2.3.4 Evaluación biológica de los recubrimientos

Análisis de viabilidad celular

La viabilidad celular de los recubrimientos se evaluó mediante el ensayo de calceína-AM, basado en la fluorescencia emitida por las células metabólicamente activas. Para ello, las muestras fueron incubadas con calceína-AM y posteriormente

observadas mediante un microscopio modelo AMF4300 de Thermo Scientific, bajo las condiciones de excitación y emisión correspondientes al fluoróforo.

Análisis de actividad metabólica

La actividad metabólica de las células en contacto con los recubrimientos se evaluó mediante el ensayo colorimétrico de MTT. La absorbancia de las muestras se determinó a una longitud de onda de 570 nm con un espectrofotómetro BioTek Epoch 2.

2.3.5 Evaluación de la adhesión de los recubrimientos

Caracterización mecánica

La adhesión de los recubrimientos al sustrato se evaluó mediante un ensayo de pelado. El ensayo se realizó utilizando un analizador de textura T.A XTExpress Connect, bajo condiciones secas y a temperatura ambiente, con una velocidad de desplazamiento del cabezal de 1 mm/min y una fuerza de disparo inicial de 0.049 N.

Capítulo 3.
Resultados y Discusión

3.1 Síntesis de vidrio bioactivo micrométrico

En esta sección se presentan los resultados de la síntesis y molienda del vidrio bioactivo. Se analizan las características estructurales y morfológicas del material obtenido mediante difracción de rayos X y microscopía electrónica de barrido, así como los cambios observados en el tamaño de partícula después del proceso de molienda, con el propósito de evaluar su comportamiento frente a condiciones de síntesis y procesamiento empleadas.

3.1.1 Cambios morfológicos y estructurales del vidrio bioactivo por la molienda

Como se observa en el difractograma del vidrio bioactivo sintetizado (Figura 3), el material presenta un comportamiento predominantemente amorfo. Esto se evidencia por la presencia de una banda ancha y difusa en el intervalo de 20° a 40° (2θ), asociada al halo amorfo característico de los vidrios bioactivos basados en silicatos. Este comportamiento indica la ausencia de un ordenamiento cristalino de largo alcance en la estructura del material, lo que confirma la naturaleza vítrea del vidrio bioactivo obtenido [56].

Al analizar con mayor detalle la región correspondiente al halo amorfo, es posible identificar ligeras variaciones en la intensidad de la señal, manifestadas como pequeñas reflexiones que no llegan a conformar picos cristalinos bien definidos. La presencia de estas señales sugiere la existencia de regiones con cierto grado de organización estructural dentro de la matriz vítrea. Sin embargo, estas contribuciones son insuficientes para atribuir un comportamiento cristalino al material, debido a que no presentan la intensidad, definición y posición característica de reflexiones asociadas con fases cristalinas identificables. En su lugar, estas señales pueden relacionarse con arreglos atómicos localmente ordenados y, de manera alternativa, con la presencia de dominios cristalinos de tamaño reducido, los cuales generan reflexiones débiles y poco definidas en los patrones de difracción. No obstante, la ausencia de picos cristalinos claramente definidos indica que el material conserva un carácter predominantemente amorfo del vidrio bioactivo [57].

Tras el proceso de molienda, el difractograma del VB molido muestra una modificación estructural significativa en comparación con el material sintetizado. Aunque el halo amorfo inicial aún permanece parcialmente visible, se observa la clara aparición de reflexiones de difracción superpuestas de mayor definición e intensidad relativa [58]. Este comportamiento no responde únicamente a un efecto físico de refinamiento de partícula o distribución del material, sino a un proceso de cristalización parcial de la matriz amorfa inducido por la alta energía mecánica de la molienda [59–61].

Por lo tanto, el patrón de difracción del vidrio bioactivo sometido a molienda confirma que el material no conserva una naturaleza puramente vítrea. Aunque los picos de difracción presentan un ensanchamiento característico asociado a refinamiento del tamaño de cristalito a la escala nano estructural o a la acumulación de esfuerzos mecánicos residuales, corresponden a la nucleación de fases cristalinas a partir del precursor amorfo [62]. Este fenómeno es característico de las transformaciones mecano químicas, en las cuales los impactos locales repetidos y la acumulación de deformación durante la molienda suministran la energía de activación necesaria para promover el ordenamiento estructural y el crecimiento de dominios cristalinos.

Adicionalmente, en el difractograma del VB sintetizado y VB molido se identifican señales en las posiciones aproximadas de 28°, 32°, 34-35° y 38° (2θ). En este sentido, dichas señales han sido asociadas en la literatura con la presencia de entornos locales ricos en calcio, especies fosfato o unidades estructurales relacionadas con el sistema $CaO\text{-}SiO_2\text{-}P_2O_5$, así como con dominios tipo wollastonita ($CaSiO_3$) y sílice residual, respectivamente [63,64]. En particular, la contribución asociada a estructuras tipo wollastonita ha sido ampliamente relacionada con un incremento en la bioactividad del material, al favorecer procesos de nucleación y crecimiento de apatita en ambientes fisiológicos, lo cual ha sido reportado en sistemas de vidrios bioactivos parcialmente cristalizados [65,66].

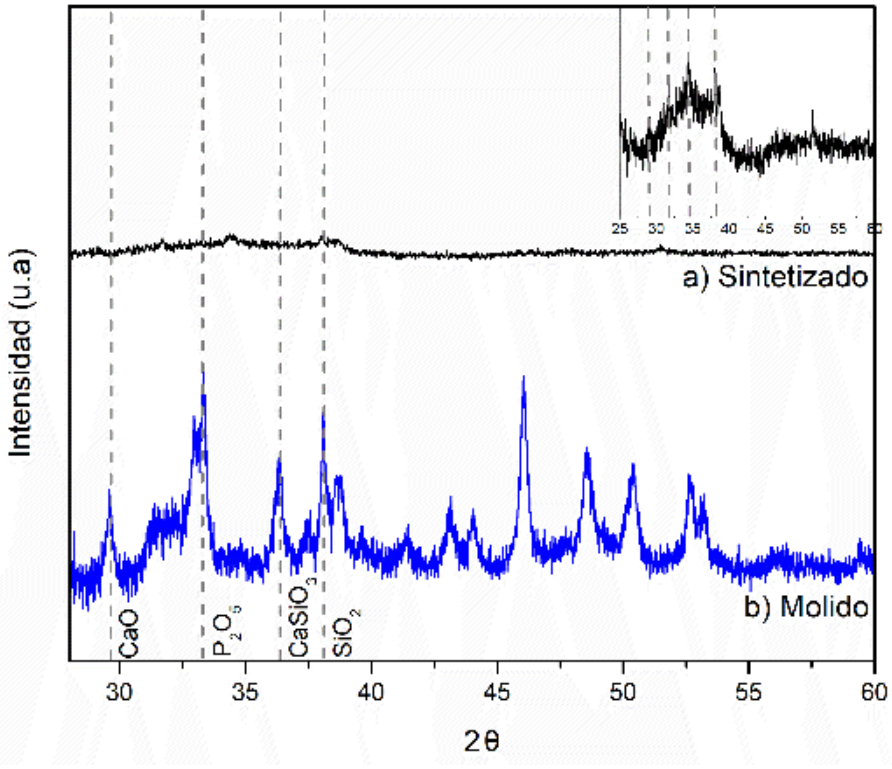


Figura 3. Patrones de difracción de rayos X del vidrio bioactivo sintetizado y después del proceso de molienda

La Figura 4 presenta las micrografías SEM correspondientes al vidrio bioactivo antes y después del proceso de molienda. En el caso del VB sintetizado se observa una dispersión de partículas con diferentes tamaños, cierto grado de aglomeración y morfologías irregulares con bordes poco definidos, características comunes en materiales vítreos obtenidos mediante procesos de síntesis. El análisis de distribución de tamaño de partícula, obtenido a partir de las micrografías SEM y representado en el histograma correspondiente (Figura 5), muestra un intervalo de tamaños entre 1 y 10 µm, evidenciando una distribución heterogénea. La mayor frecuencia de partículas se concentra alrededor de 3.9 µm, aunque también se identifican algunas partículas de mayor tamaño que alcanzan aproximadamente 8 µm. En contraste, después del proceso de molienda se observa una reducción significativa en el tamaño de partícula. El histograma correspondiente al VB molido revela una distribución de tamaños de partícula en el intervalo aproximado de 0.8 a 3.5 µm, siendo el valor de la mediana de 1.8 µm. No obstante, aún se identifican algunas partículas con una distribución de tamaños variable asociada al proceso mecánico de molienda.

En conjunto, estos resultados indican que el proceso de molienda fue efectivo para reducir el tamaño de partícula del vidrio bioactivo, generando partículas más pequeñas e comparación con el material sintetizado originalmente.

Diversos estudios han señalado que la morfología y el tamaño de partícula del vidrio bioactivo influyen directamente en sus propiedades y desempeño en aplicaciones biomédicas. Se ha reportado que la forma de las partículas favorece propiedades de flujo adecuadas y su interacción con fluidos corporales, mientras que la morfología y porosidad dependen del método de síntesis empleado. En particular, el método sol-gel permite obtener microestructuras porosas similares al hueso, donde parámetros como la porosidad y la interconectividad son fundamentales para favorecer el crecimiento óseo [67–72].

Asimismo, el control del tamaño de partícula resulta clave para optimizar la bioactividad de estos materiales. Partículas más pequeñas presentan una mayor relación superficie-volumen, lo que favorece la formación de apatita en fluidos fisiológicos y mejora su compatibilidad con matrices poliméricas, además de incrementar su área superficial especifica sin afectar significativamente sus propiedades mecánicas [71,73,74].

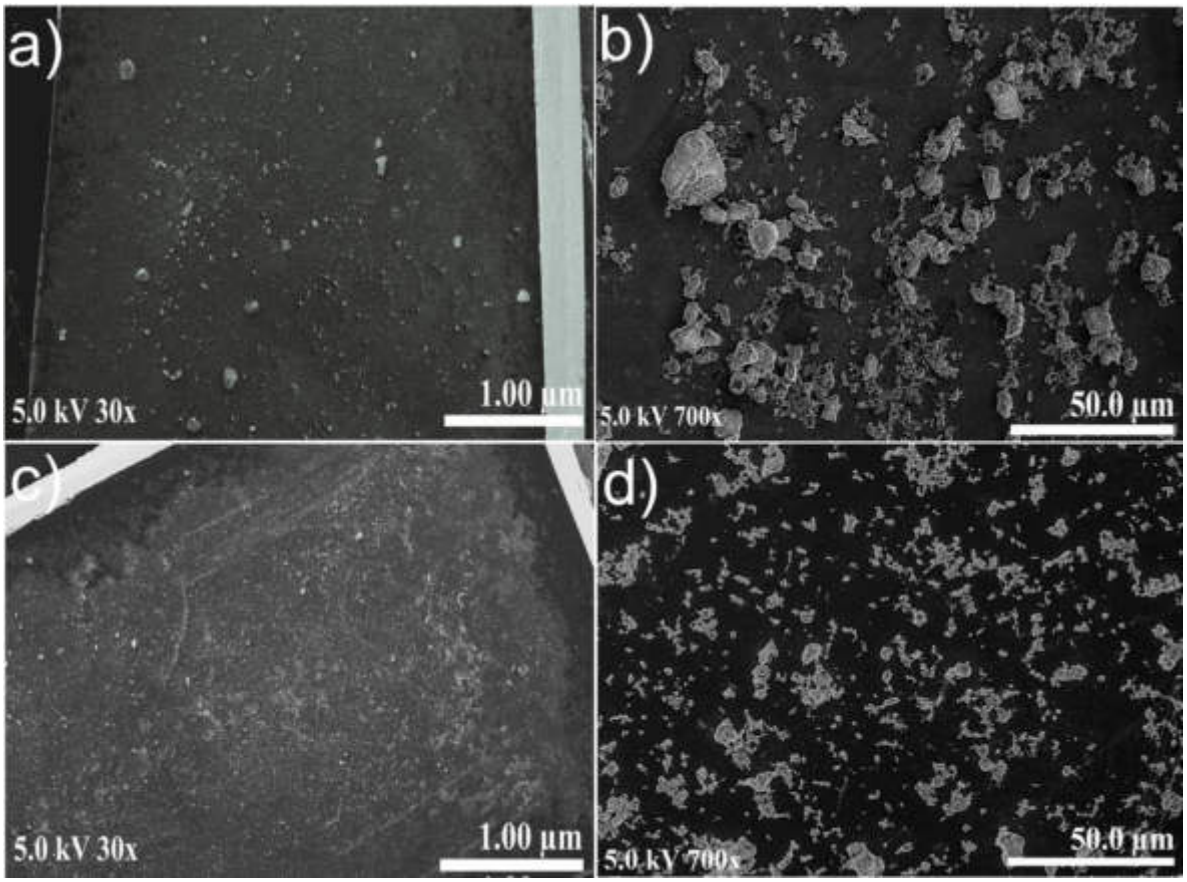


Figura 4. Imágenes de microscopia electrónica de barrido (SEM) del vidrio bioactivo sintetizado (a, b) y después de la molienda (c, d), a diferentes aumentos, mostrando su morfología y distribución de partículas

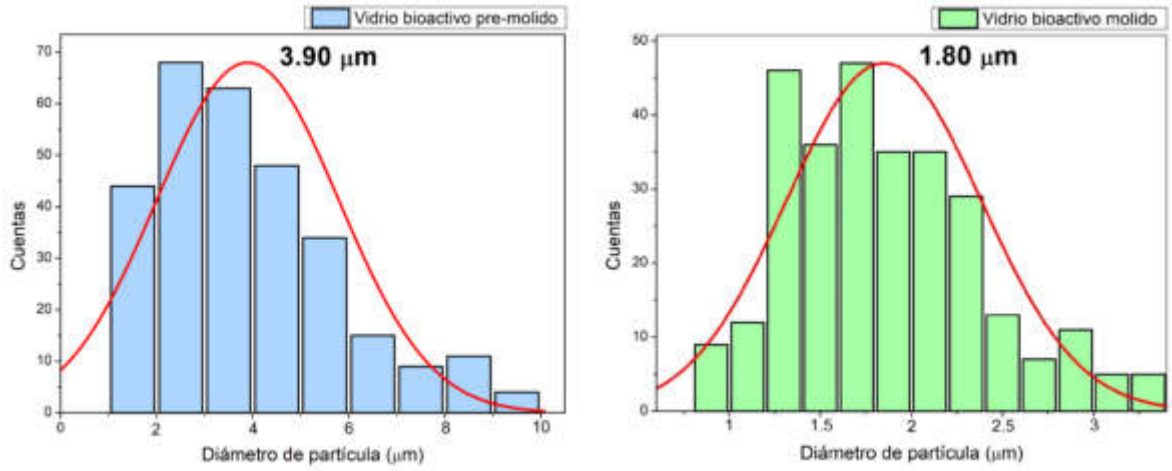


Figura 5. Distribución del tamaño de partícula del vidrio bioactivo sintetizado y molido

3.1.2 Prueba de bioactividad del vidrio bioactivo molido

Los resultados correspondientes a la evaluación de la bioactividad del vidrio bioactivo tras su inmersión en fluido corporal simulado (SBF) se presentan a continuación.

La bioactividad del VB molido se evaluó mediante la inmersión de especímenes preparados en forma comprimidos (pastilla) en SBF durante 21 días, siguiendo el protocolo comúnmente empleado para la evaluación *in vitro* de biomateriales bioactivos [53]. Esta prueba permite reproducir las reacciones iniciales que ocurren en la superficie de materiales bioactivos tras su implantación, particularmente la formación de una capa apatita, la cual es similar a la fase mineral del tejido óseo y se considera un indicador importante de la capacidad del material para unirse al hueso [75,76].

Los cambios morfológicos en la superficie de las pastillas del VB molido se analizaron mediante microscopía electrónica de barrido (SEM) (Figura 6). Antes de la inmersión, la micrografía muestra la superficie característica del material sin observar cambios superficiales evidentes respecto al material inicial. Después de un día de inmersión se observa el inicio de la nucleación de partículas de apatita. Después de tres días, la cantidad y cobertura de estas partículas aumentan, mientras que después de 21 días la superficie del material se encuentra prácticamente continua de depósitos superficiales (apatita).

Los depósitos formados presentan una morfología alargada y filamentosa, compuesta por cristales delgados dispuestos de manera paralela o ligeramente entrelazados. Este tipo de estructura ha sido reportado en diferentes estudios de vidrios bioactivos y puede variar dependiendo de la composición del material y de las condiciones del ensayo en SBF [71,77,78]. La formación progresiva de esta capa confirma la bioactividad del material, ya que se ha establecido que los biomateriales bioactivos se adhieren al tejido óseo mediante la generación de una capa interfacial de apatita, favoreciendo su integración con el hueso.

En este sentido, Drevet, Fauré y Benhayoune [32] describieron que la formación de una capa biológica de apatita sobre la superficie de biomateriales basados en fosfatos de calcio y vidrios bioactivos favorece la interacción del material con el

medio fisiológico y contribuye a establecer una unión química con el tejido óseo circundante. De manera similar, Kaou y colaboradores [79] señalaron que los vidrios bioactivos generan una capa intermedia rica en apatita que actúa como un puente entre el material y el tejido óseo, favoreciendo los procesos de biomineralización y la integración estructural del implante con el hueso huésped.

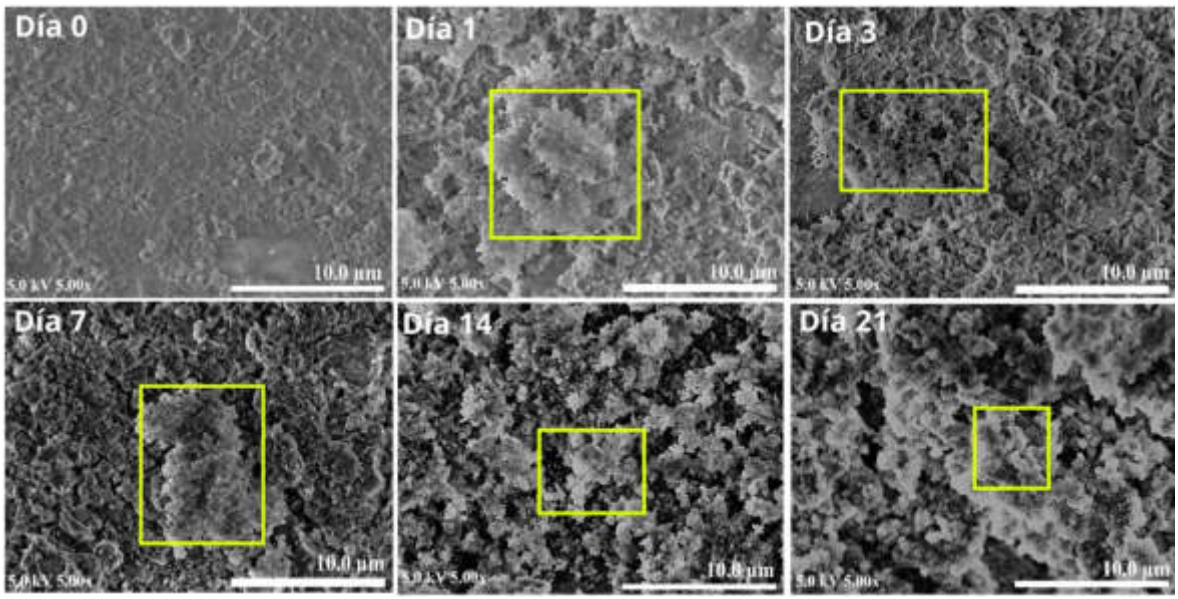


Figura 6. Imágenes SEM de la evolución morfológica de la capa de apatita formada sobre el vidrio bioactivo después de inmersión en SBF a distintos tiempos (0, 1, 3, 7, 14 y 21 días). Los recuadros amarillos señalan las zonas donde se observa la formación de la capa superficial asociada a la apatita.

Para verificar la naturaleza química de la fase apatita formada en la superficie del VB molido, se realizaron mediciones mediante FT-IR/ATR durante el proceso de crecimiento de la apatita a lo largo de 21 días de inmersión en SBF (Figura 7). Tras la inmersión de las pastillas en la solución, se observaron bandas adicionales a las originales al día cero en los espectros.

Se ha reportado que la nucleación de fosfato de calcio en vidrio bioactivos inicia con la formación de una capa rica en sílice en la superficie del material, seguida de un intercambio catiónico que conduce a la generación de grupos Si-OH, los cuales actúan como sitios de nucleación para la posterior precipitación de fosfato de calcio amorfo [80–82]. En los espectros obtenidos, este proceso se evidencia a partir del día 1 por la presencia de una banda ancha e intensa centrada en aproximadamente 1030-1050 cm^{-1}, la cual se atribuye a los modos vibraciones de estiramiento asimétrico (v_3) del grupo fosfato (PO_4^{3-}) asociado a la fase de fosfato de calcio

[80,83,84]. Con el incremento en el tiempo de inmersión (hasta el día 21), esta señal muestra un aumento progresivo en su intensidad, confirmando la acumulación y desarrollo continuo de la capa de apatita sobre la superficie del vidrio bioactivo.

Asimismo, a partir del día 7 de inmersión se distinguen bandas adicionales de menor intensidad en la región de 1410-1480 cm^{-1}, asignadas a las vibraciones de estiramiento asimétrico (v_3) del grupo carbonato (CO_3^{2-}). La incorporación de estos grupos sugiere la sustitución parcial de los grupos fosfato o hidroxilo en la red cristalina por carbonatos presentes en el medio fisiológico simulado, conduciendo a la formación y cristalización de una capa de hidroxiapatita carbonatada (CHA) biológicamente equivalente a la fase mineral ósea. Con base en la evolución de los espectros, se concluye que el vidrio bioactivo presenta un comportamiento bioactivo favorable y una alta capacidad para inducir la nucleación y maduración de apatita carbonatada, característica clave para su integración en aplicaciones de regeneración e ingeniería del tejido óseo [85–87].

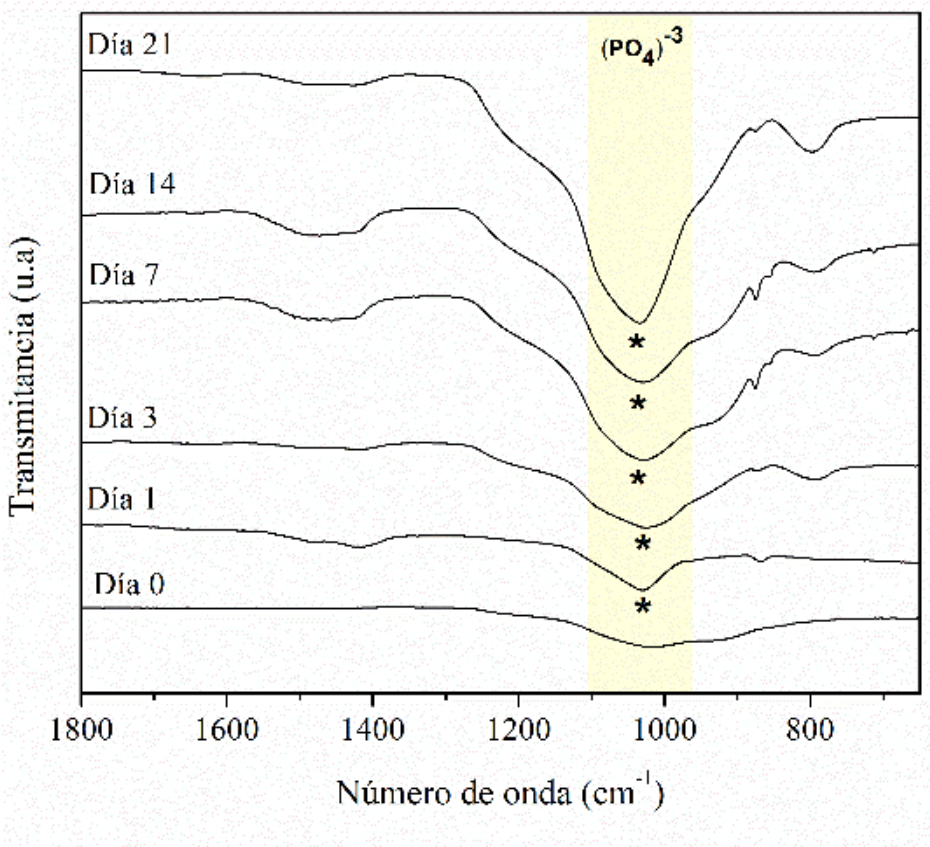


Figura 7. Espectros infrarrojos por transformada de Fourier del vidrio bioactivo después de inmersión en SBF (0-21 días)

3.3 Funcionalización de gelatina y quitosano

El mecanismo propuesto para la funcionalización de los polímeros se presenta en la Figura 8 y Figura 9. La gelatina y el quitosano son polímeros que presentan en su estructura diversos grupos funcionales reactivos. En el caso de la gelatina, destacan los grupos amina primarios (-NH_2), así como grupos hidroxilo (-OH) y carboxilo (-COOH); mientras que el quitosano contiene principalmente grupos amina primarios y grupos hidroxilo distribuidos a lo largo de su cadena polisacarídica. Durante la modificación química, el ácido succínico reacciona con los grupos amina primarios presentes en ambas estructuras poliméricas mediante la interacción de su grupo carbonilo, lo que conduce a la formación de enlaces amida estables. De esta manera, se establece una unión covalente entre el agente modificador y las cadenas de la gelatina y quitosano, incorporando nuevos grupos funcionales en su estructura.

La presencia de estos grupos funcionales favorece posteriormente la interacción y el anclaje covalente de las partículas, proceso que se describe en el siguiente apartado.

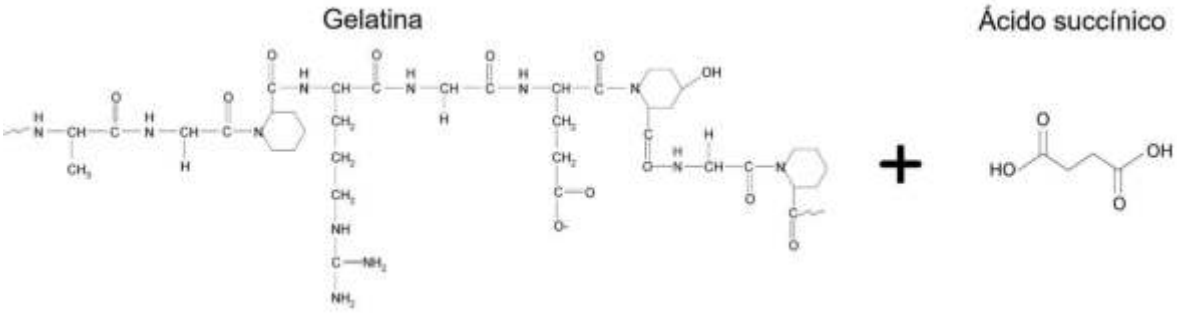




Figura 8. Esquema del proceso de funcionalización de gelatina con ácido succínico utilizando el sistema EDC/NHS (imagen creada en ChemSketch)

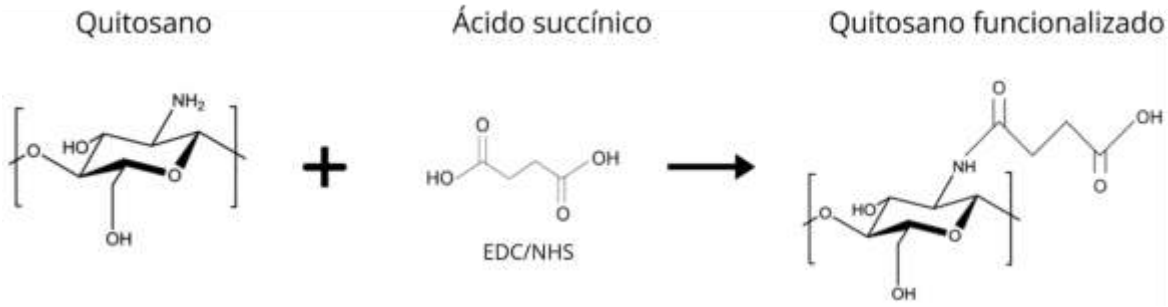


Figura 9. Esquema del proceso de funcionalización de quitosano con ácido succínico utilizando el sistema EDC/NHS (imagen creada en ChemSketch)

Los resultados asociados a la funcionalización de la gelatina y el quitosano con ácido succínico, mediante EDC/NHS, se presentan a continuación. Se evalúan las evidencias que confirman la incorporación de nuevos grupos funcionales en los polímeros funcionalizados mediante un análisis FT-IR/ATR.

En la Figura 10, se muestran el espectro de la gelatina antes y después de la modificación con el ácido succínico. Se observa la banda alrededor de 3281 cm^{-1} que se atribuye al estiramiento del grupo N-H, mientras que las señales en 1625 cm^{-1} y 1528 cm^{-1} corresponden a las bandas amida I (estiramiento C=O) y amida II (principalmente deformación δ N-H combinada con estiramiento C-N), respectivamente. Estas señales son típicas de proteínas y confirman el carácter proteico de la gelatina.

Tras el proceso de modificación con ácido succínico, se observaron variaciones en la posición y en la intensidad relativa de algunas bandas características del

espectro FT-IR/ATR. En particular, la banda alrededor de 3294 cm^{-1}, asociada al estiramiento del grupo N-H, presentó un corrimiento batocrómico con respecto a la gelatina pura, cuya banda se localizó alrededor de 3281 cm^{-1}. Este desplazamiento hacia números de onda mayores sugiere una modificación en el entorno químico de los grupos N-H, posiblemente asociada con cambios en las interacciones por puentes de hidrogeno y con el proceso de acoplamiento entre los grupos amino de la gelatina y los grupos carboxilo introducidos mediante el ácido succínico [88]. La variación observada en la posición de esta banda, junto con los cambios en la intensidad relativa de las señales características, es consistente con una modificación de las interacciones químicas presentes en la gelatina tras la funcionalización.

Desplazamientos similares en las bandas características de amida tras la modificación de la gelatina con derivados del ácido succínico han sido reportados en diversos estudios. En este sentido, Liu y colaboradores [88] reportaron que la modificación de gelatina mediante anhídrido octenil succínico induce alteraciones en la estructura molecular del material, evidenciadas mediante desplazamientos en las señales características obtenidas por espectroscopía FT-IR/ATR. De manera similar, Zhang y colaboradores [89] demostraron que la reacción de la gelatina con anhídrido succínico produce la formación de gelatina succinilada, reflejando desplazamientos en las bandas por la formación de los enlaces amida y en modificaciones en el entorno químico de la cadena polipeptídica. Lo anterior confirma la incorporación exitosa de grupos funcionales derivados del ácido succínico.

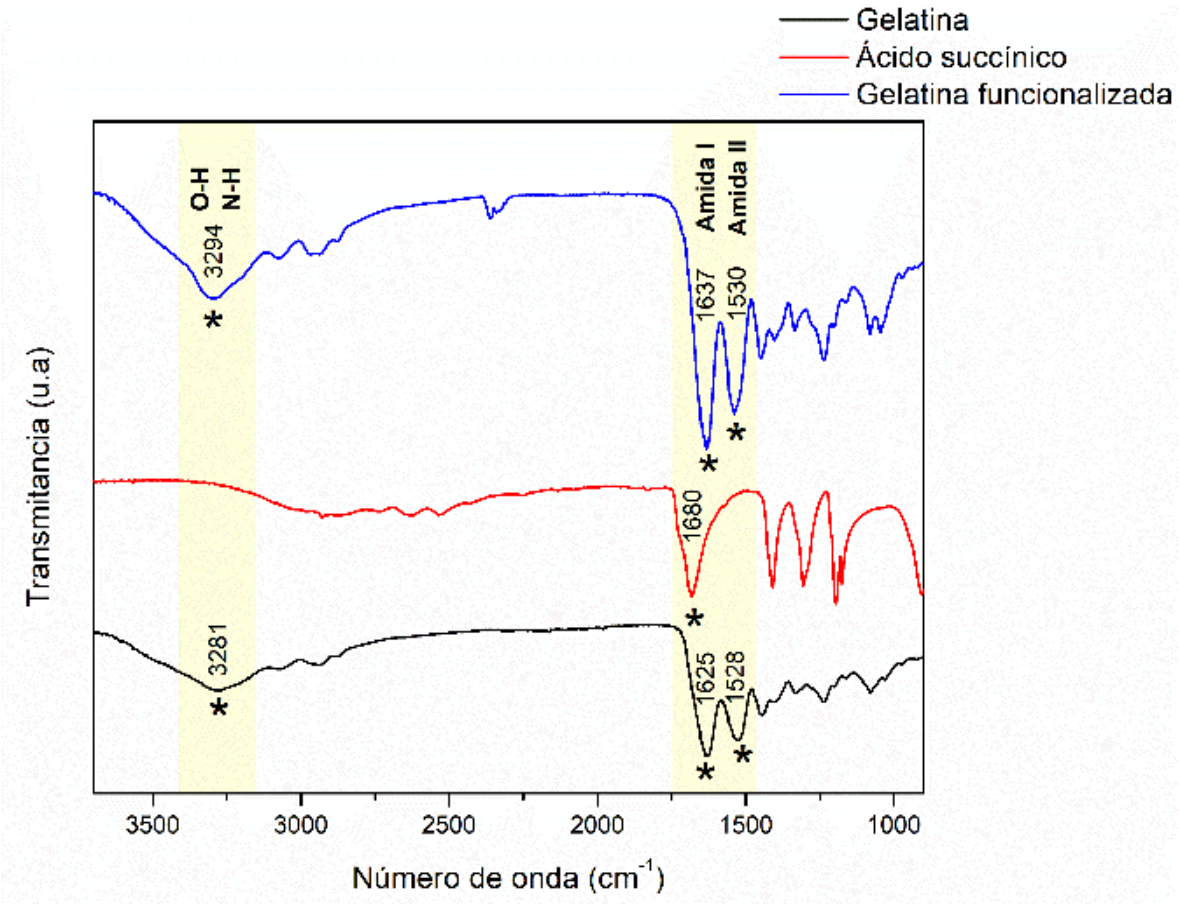


Figura 10. Espectros FT-IR/ATR de la gelatina, acido succínico y gelatina funcionalizada, mostrando los cambios estructurales tras el proceso de funcionalización

Por otra parte, el espectro FT-IR/ATR del quitosano puro presenta bandas características asociadas a su química. La banda alrededor de 3309 cm^{-1} corresponde a vibraciones de estiramiento de los grupos –OH y $–NH_2$ presentes en la cadena del polímero. Asimismo, la señal en 1638 cm^{-1} se atribuye a la banda amida I, asociada al estiramiento del enlace C=O, mientras que la banda en 1550 cm^{-1} corresponde a la amida II, relacionada con vibraciones de deformación N-H y estiramiento C-N, características del quitosano (Figura 11). Estas bandas han sido ampliamente reportadas como señales representativas de la estructura química del quitosano y sus grupos funcionales principales [90,91].

Después de la modificación con ácido succínico, se observaron desplazamientos en las posiciones de las bandas características del espectro FT-IR/ATR. La banda asociada al estiramiento de los grupos O-H y N-H se desplazó de 3309 cm^{-1} en el

quitosano sin modificar a 3291 cm^{-1} después de la funcionalización, correspondiente a un corrimiento hipsocrómico. De igual manera, la señal correspondiente a la amida I (1638 cm^{-1}) indica cambios en el entorno químico del enlace C=O, mientras que la banda alrededor de 1528 cm^{-1} (amida II) sugiere la formación de nuevas interacciones químicas asociadas al proceso de succinilacion. Estos cambios en las bandas características indican que el ácido succínico reaccionó con los grupos amino presentes en la cadena del quitosano, lo que confirma la modificación química del polímero.

Desplazamientos y modificaciones en las bandas asociadas a los grupos amino, amida y carbonilo del quitosano tras procesos de modificación química han sido ampliamente reportados en la literatura. Zhou y colaboradores describieron la succinilacion de derivados de quitosano mediante compuestos succínicos, observando la incorporación de grupos carbonilo provenientes del ácido succínico, reflejada en la aparición o incremento de bandas correspondientes a los enlaces C=O, así como modificaciones en las señales asociadas a los grupos amino y amida, lo que evidencia la sustitución parcial de estos grupos durante la reacción química. De manera complementaria, Guo y colaboradores señalaron que las modificaciones químicas del quitosano generan cambios detectables en las bandas características del FT-IR/ATR, particularmente en las regiones asociadas a los grupos amino ($-NH_2$) y carbonilo (C=O), que constituyen indicadores espectroscópicos de la modificación estructural y permiten verificar la formación de derivados funcionalizados destinados a aplicaciones biomédicas [92,93].

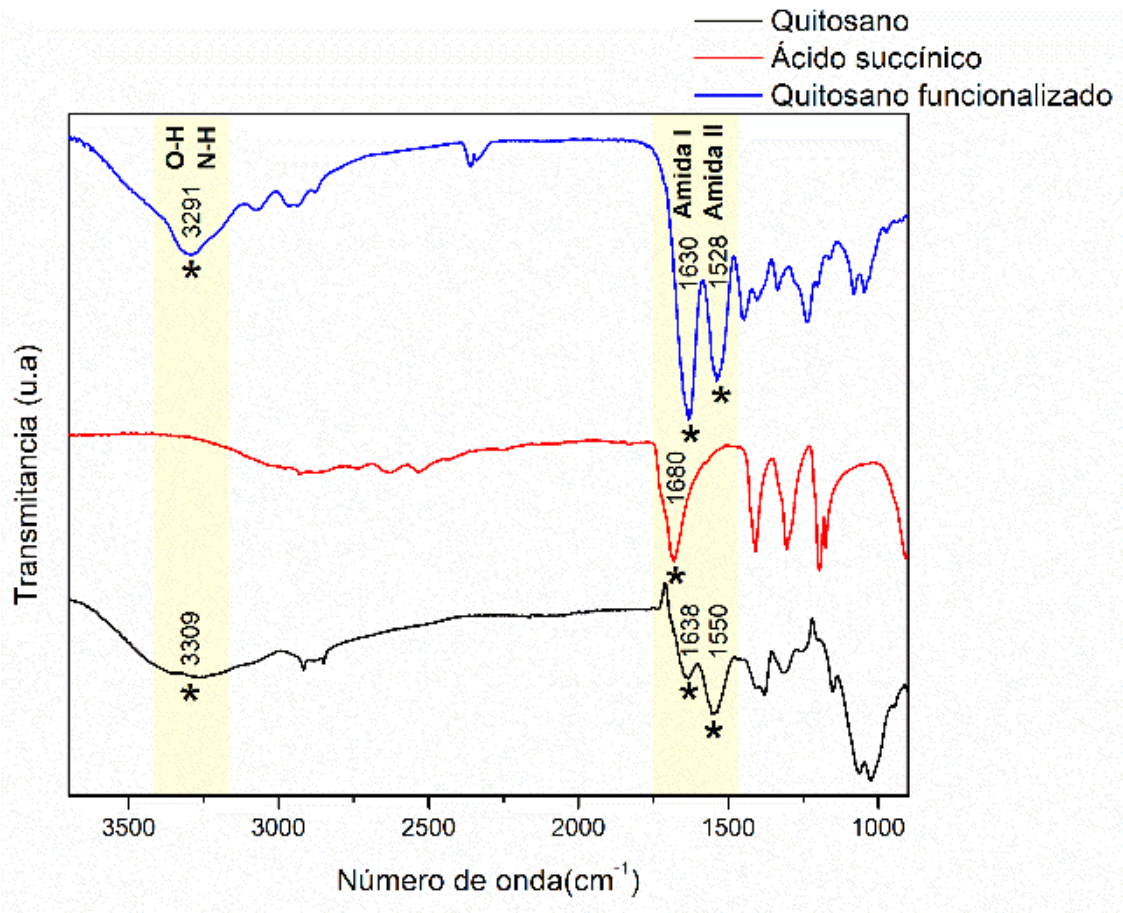


Figura 11. Espectros FT-IR/ATR del quitosano, acido succínico y quitosano funcionalizado, mostrando los cambios estructurales tras el proceso de funcionalización

Los resultados obtenidos mediante FT-IR/ATR confirman que tanto la gelatina como el quitosano fueron funcionalizados exitosamente mediante su reacción con ácido succínico en presencia del sistema EDC/NHS. Las variaciones observadas en las bandas características de ambos polímeros evidencian cambios en su entorno químico, los cuales se asocian con el proceso de succinilación. Esta modificación permite la incorporación de nuevos grupos funcionales dentro de las cadenas poliméricas, generando sitios reactivos adicionales que favorecen su capacidad de interacción con fases inorgánicas. En particular, la introducción de estos grupos en la estructura de los polímeros resulta favorable para el posterior anclaje de partículas de vidrio bioactivo, contribuyendo al desarrollo de materiales compuestos con potencial aplicación en recubrimientos y andamios dirigidos a la ingeniería de tejidos.

3.4 Anclaje de partículas de vidrio bioactivo a los polímeros funcionalizados

El mecanismo del anclaje de las partículas se detalla a continuación (Figura 12 y Figura 13): la gelatina funcionalizada y el quitosano funcionalizado presentan en su estructura grupos ácido carboxílicos derivados de la reacción con el ácido succínico. Estos grupos ácido reaccionan con los grupos amina primarios presentes en la superficie del vidrio bioactivo previamente funcionalizado, dando lugar a la formación de un nuevo enlace amida. Como resultado, se establece una unión covalente entre las partículas y los polímeros funcionalizados, favoreciendo un anclaje estable del vidrio bioactivo en las estructuras de la gelatina y el quitosano.

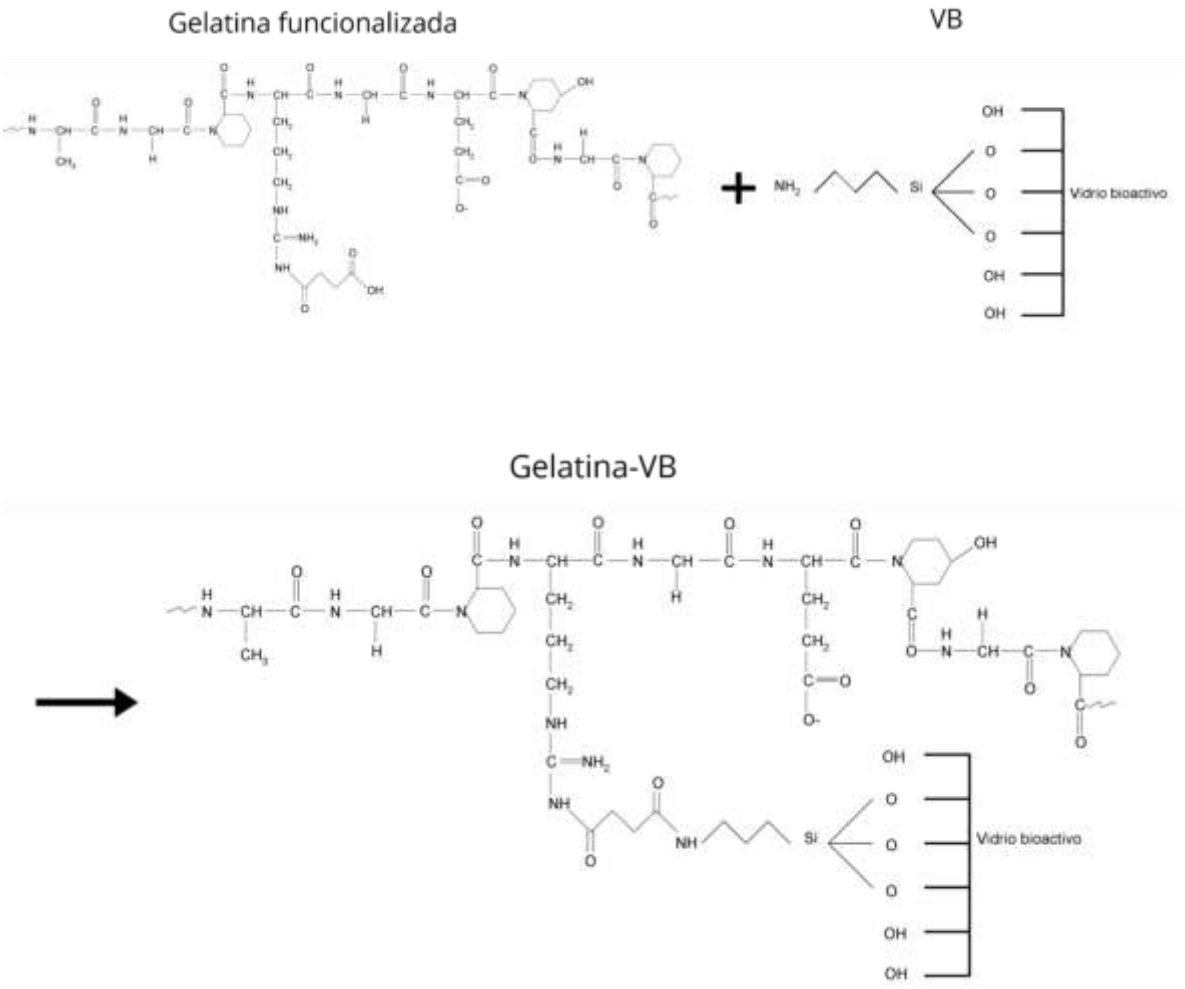


Figura 12. Esquema del anclaje de partículas de vidrio bioactivo en la gelatina funcionalizada (imagen creada en ChemSketch)

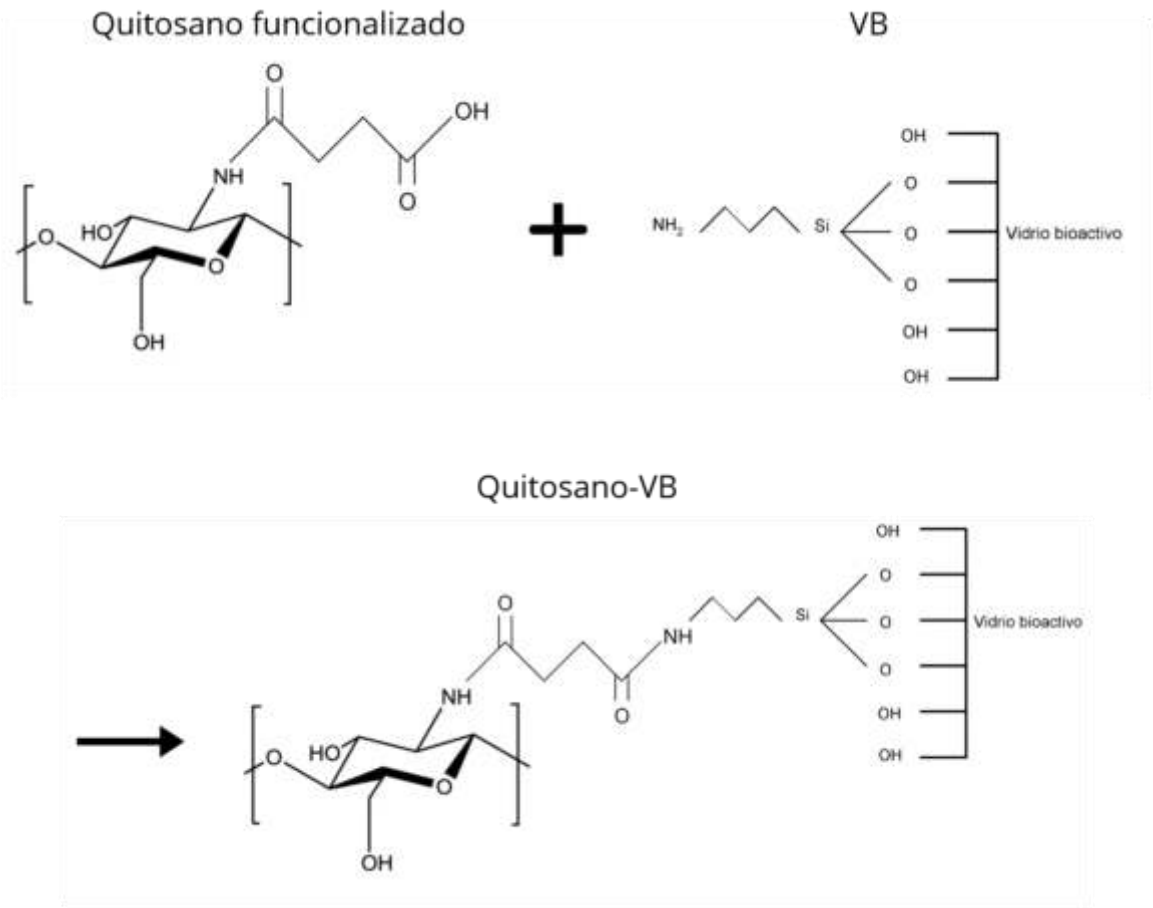


Figura 13. Esquema del anclaje de partículas de vidrio bioactivo en el quitosano funcionalizado (imagen creada en ChemSketch)

Una vez realizada la funcionalización de la gelatina y el quitosano, se llevó a cabo el anclaje de partículas de vidrio bioactivo (VB) a los polímeros funcionalizados con ácido succínico. En esta sección se presentan los resultados correspondientes a los sistemas polímero-VB, así como la selección de la concentración de partículas empleada para cada polímero y la evaluación del anclaje de las partículas a cada polímero.

Previo al anclaje, se evaluaron experimentalmente dos concentraciones de vidrio bioactivo, 5 y 10% en peso respecto al polímero. El objetivo principal fue maximizar la incorporación de vidrio bioactivo en el sistema, debido a su papel en la bioactividad del material y en la formación de apatita en condiciones fisiológicas. Una mayor proporción podría favorecer la liberación de especies iónicas y la interacción del biomaterial con el tejido circundante, lo que resulta de interés para

la regeneración ósea.

La selección de la concentración de vidrio bioactivo se realizó mediante la evaluación experimental de diferentes proporciones incorporadas a cada polímero funcionalizado. La descripción de las condiciones evaluadas y los criterios considerados para establecer la concentración seleccionada para cada sistema se presentan en el Anexo A2. Con base en esta evaluación, se seleccionó una concentración de 5% de VB para la gelatina funcionalizada y 10% para el quitosano funcionalizado. A partir de estas condiciones, se realizaron análisis correspondientes para evaluar la presencia y el anclaje de las partículas de vidrio bioactivo en cada sistema. El análisis mediante FT-IR/ATR se muestra en la Figura 14 y Figura 15.

En el espectro correspondiente a la gelatina-VB al 5%, se observó una banda ancha localizada alrededor de 3282 cm-1, atribuida a estiramientos de los grupos O-H y N-H. En comparación con la gelatina funcionalizada (Figura 10), esta banda presentó un desplazamiento de 3294 a 3282 cm^{-1}, correspondiente a un corrimiento hipsocrómico, lo que puede asociarse con modificaciones en el entorno químico de estos grupos funcionales tras la incorporación de las partículas de vidrio bioactivo.

Asimismo, la banda correspondiente a la amida I presentó un desplazamiento de 1637 a 1633 cm^{-1}, correspondiente a un corrimiento hipsocrómico, mientras que la banda de amida II se desplazó de 1530 a 1538 cm^{-1}, correspondiente a un corrimiento batocrómico. Estas variaciones en la posición de las bandas son consistentes con modificaciones en las interacciones químicas entre la gelatina funcionalizada y las partículas de vidrio bioactivo.

Los desplazamientos observados en las bandas características del espectro FT-IR/ATR son consistentes con modificaciones en el entorno químico de los grupos funcionales presentes en la gelatina funcionalizada tras la incorporación de vidrio bioactivo. En particular, los cambios en la posición de las bandas asociadas con los grupos O-H/N-H, amida I y amida II sugieren modificaciones en las interacciones químicas entre la gelatina funcionalizada y las partículas de vidrio bioactivo funcionalizadas con APTES. Estas variaciones son compatibles con el establecimiento de interacciones entre los grupos funcionales presentes en ambas

superficies durante el proceso de anclaje.

Resultados similares han sido reportados en sistemas de gelatina modificados mediante reacciones de acoplamiento mediadas por EDC/NHS, donde el incremento de las bandas amida I y amida II se relaciona con la formación de nuevos enlaces amida y con la unión efectiva entre los componentes involucrados [94,95].

Finalmente, se observó una banda localizada en 1076 cm^{-1}, atribuida al estiramiento característico de enlaces Si-O-Si. Esta señal es característica de materiales ricos en silicatos y se asocia a la presencia del vidrio bioactivo incorporado al sistema. Trabajos previos realizados con vidrios bioactivos y materiales basados en sílice han reportado bandas similares en la región comprendida entre 900 y 1110 cm^{-1}, las cuales se atribuyen a las vibraciones de los enlaces Si-O-Si presentes en la red vítrea [96,97].

Debido a los resultados obtenidos, la presencia de la banda Si-O-Si en el sistema gelatina-VB 5% evidencia la incorporación del vidrio bioactivo, además que las modificaciones observadas previamente en las bandas amida I y amida II constituye una evidencia de la interacción entre la gelatina funcionalizada y las partículas de vidrio bioactivo. Estos resultados confirman la obtención exitosa del sistema gelatina-VB 5% y son consistentes con el mecanismo de anclaje propuesto.

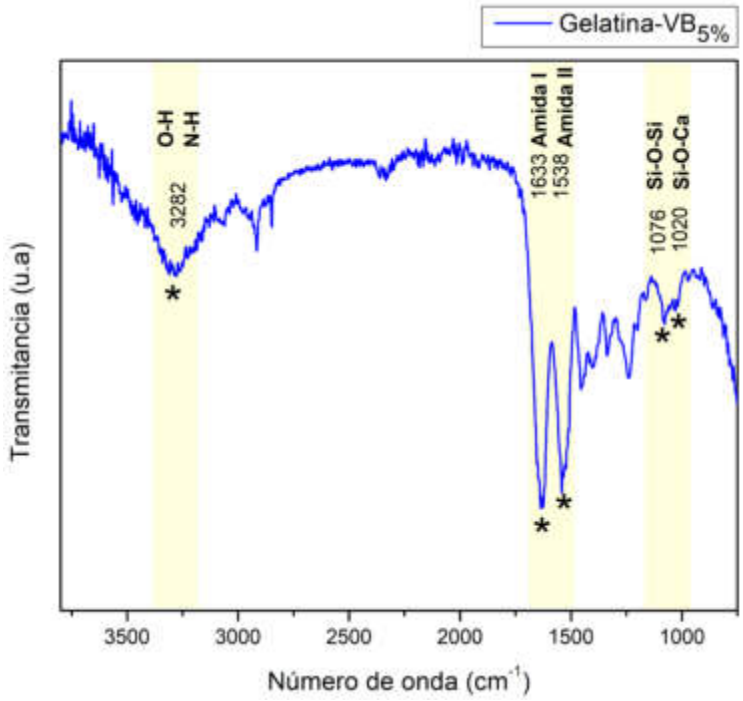


Figura 14. Espectro FT-IR/ATR del sistema gelatina-VB 5% tras el proceso de anclaje de partículas de vidrio bioactivo. Se muestran las bandas características, incluyendo las regiones asociadas a amida I, amida II y enlaces Si-O-Si

El espectro FT-IR/ATR correspondiente al sistema quitosano-VB 10% se muestra en la Figura 15. En este espectro se observa una banda ancha localizada alrededor de 3270 cm^{-1}, atribuida a vibraciones de estiramiento de los grupos O-H y N-H, características del quitosano. Tras el proceso de anclaje del vidrio bioactivo, esta señal presentó un desplazamiento de 3291 a 3270 cm^{-1} con respecto al quitosano funcionalizado, correspondiente a un corrimiento hipsocrómico. Este desplazamiento puede asociarse con modificaciones en el entorno químico de los grupos O-H y N-H tras la incorporación de las partículas de vidrio bioactivo.

De igual manera, se observaron las bandas correspondientes a amida I y amida II, localizadas alrededor de 1650 y 1530 cm^{-1}, respectivamente. La banda amida I presentó un desplazamiento de 1630 a 1650 cm^{-1}, correspondiente a un corrimiento batocrómico, mientras que la banda de amida II se desplazó de 1528 a 1530 cm^{-1}, correspondiente a un corrimiento batocrómico. Estas variaciones en la posición de las bandas son consistentes con modificaciones en las interacciones químicas entre el quitosano funcionalizado y las partículas de vidrio bioactivo durante el proceso de

anclaje.

Este comportamiento difiere del observado para el sistema gelatina-VB 5%; sin embargo, diversos estudios han reportado que modificaciones químicas del quitosano pueden provocar cambios en la posición e intensidad de las bandas amida debido a alteraciones en las interacciones por puentes de hidrogeno y en el entorno químico de los grupos funcionales presentes en el polímero.

De manera particular, Chuc-Gamboa y colaboradores [98] reportaron una disminución en la intensidad de la banda amida I asociada a cambios en las interacciones intermoleculares y en el contenido de moléculas adsorbida dentro del sistema, mientras que Otrowska-Czubenko y colaboradores [99,100] señalan que los desplazamientos observados en las bandas amida pueden relacionarse con procesos de reorganización molecular y modificaciones en la red de puentes de hidrogeno del quitosano. De acuerdo con estos autores, dichos cambios pueden modificar las señales espectroscópicas de los grupos amida, por lo que una disminución en la intensidad de estas bandas no necesariamente indica la ausencia de interacción entre el quitosano funcionalizado y las partículas de vidrio bioactivo.

Por otra parte, se identificó una banda alrededor de 1067 $cm^{-1,}$ atribuida a las vibraciones características de los enlaces Si-O-Si. La presencia de esta señal es consistente con la incorporación de partículas de vidrio bioactivo en el sistema quitosano-VB al 10% y confirma la presencia del componente inorgánico en la muestra [96,97].

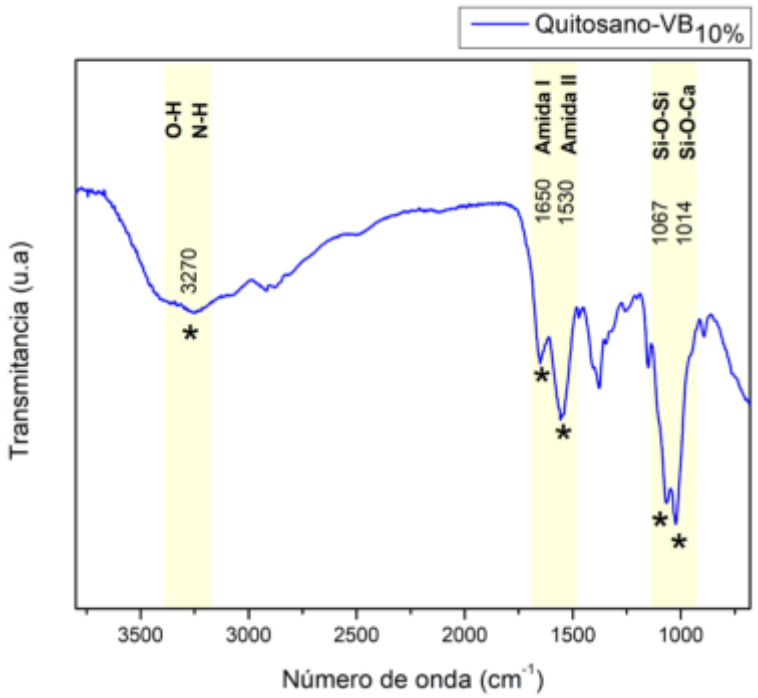


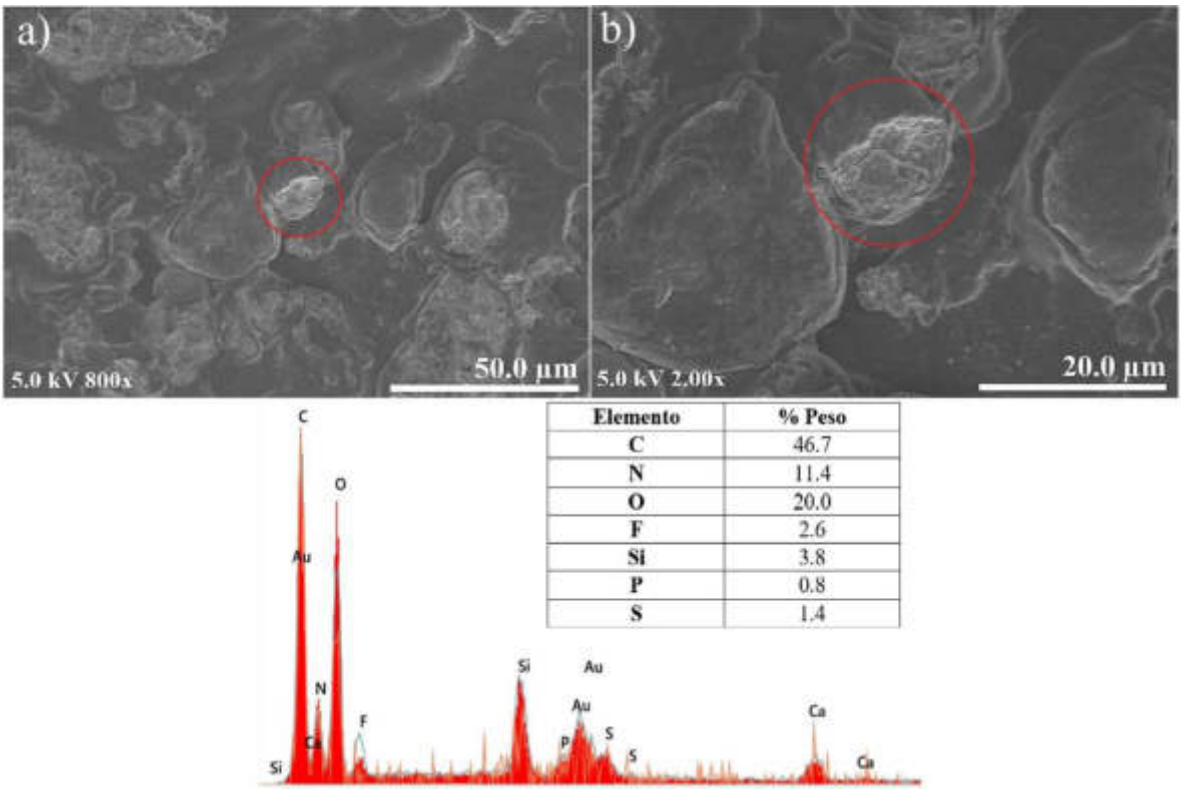
Figura 15. Espectro FT-IR/ATR del sistema quitosano-VB 10% tras el proceso de anclaje de partículas de vidrio bioactivo. Se muestran las bandas características, incluyendo las regiones asociadas a amida I, amida II y enlaces Si-O-Si

Los resultados obtenidos para los sistemas gelatina-VB 5% y quitosano-VB 10% muestran que el comportamiento de las partículas de vidrio bioactivo depende de las características químicas y estructurales de cada polímero. Mientras que la gelatina funcionalizada presentó un incremento en la intensidad de las bandas amida I y amida II tras el proceso de anclaje, el quitosano funcionalizado mostro un desplazamiento en estas señales acompañados de una disminución en la intensidad de la banda amida I. Estas diferencias pueden atribuirse a la naturaleza particular de cada polímero, así como a las distintas interacciones que establecen con el vidrio bioactivo. No obstante, las evidencias obtenidas mediante FTIR, junto con la estabilidad observada en los sistemas seleccionados y la presencia de las señales características del componente inorgánico, sugieren que fue posible incorporar y anclar las partículas de vidrio bioactivo tanto a la gelatina funcionalizada como al quitosano funcionalizado.

A continuación, se presentan los resultados obtenidos mediante microscopia electrónica de barrido de los sistemas gelatina-VB 5% y quitosano-VB 10% tras el proceso de anclaje de partículas de vidrio bioactivo.

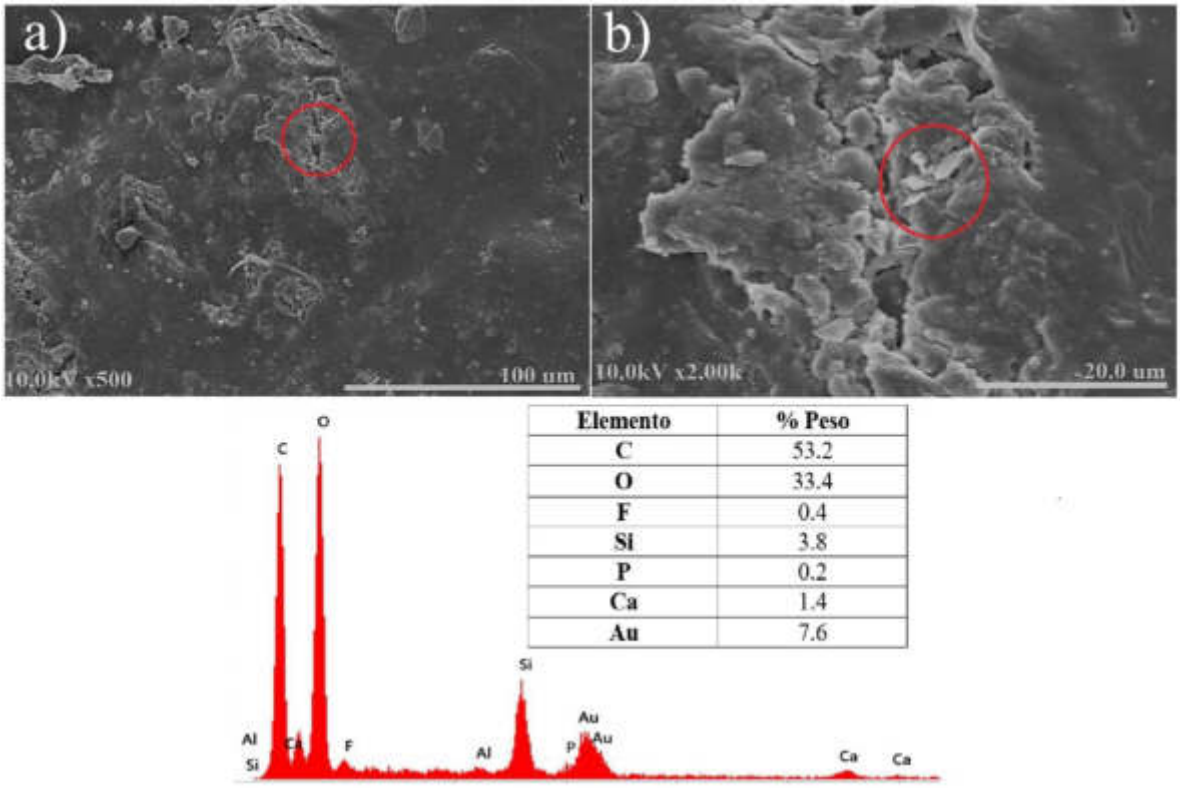
En la Figura 16 se presenta la micrografía SEM correspondiente al sistema gelatina-VB 5%. En esta imagen se observan partículas con morfología irregular y tendencia a la aglomeración, en las cuales se aprecian estructuras que parecen corresponder a agregados de partículas distribuidas sobre el material. Esta aglomeración es común en sistemas que contienen partículas inorgánicas de escala micro o nanométrica, debido a su alta energía superficial y a las interacciones intermoleculares predominantes, tales como fuerzas de van der Waals, que favorecen su agrupamiento [97,101]. De manera similar, en el sistema quitosano-VB 10% se identifican regiones con presencia de aglomerados distribuidos sobre la superficie del material. Las micrografías correspondientes (Figura 17) muestran agregados con características morfológicas similares a las observadas en el sistema basado en gelatina-VB 5%, los cuales pueden relacionarse con la presencia de las partículas de vidrio bioactivo dentro del sistema.

Como se mostró previamente en las micrografías SEM del vidrio bioactivo sintetizado y molido (Figura 4), las partículas presentaron una marcada tendencia a la aglomeración y un tamaño aproximado a 1.8 µm. Estas características se utilizaron como referencia para comparar las estructuras identificadas en los sistemas gelatina-VB 5% y quitosano-VB 10 %. En ambos casos, se observaron regiones con morfología y tendencia a la aglomeración similares a las del vidrio bioactivo molido. Esta similitud, junto con la distribución de dichas estructuras en los materiales, sugiere que estas regiones podrían estar asociadas con las partículas de vidrio bioactivo incorporadas en cada sistema.



Elemento	% Peso
C	46.7
N	11.4
O	20.0
F	2.6
Si	3.8
P	0.8
S	1.4

Figura 16. Micrografías SEM y espectro EDS del sistema gelatina-VB 5% tras el proceso de anclaje de las partículas de vidrio bioactivo (a, b). El espectro EDS corresponde a la región analizada en la micrografía para determinar la composición elemental de las estructuras observadas



Elemento	% Peso
C	53.2
O	33.4
F	0.4
Si	3.8
P	0.2
Ca	1.4
Au	7.6

Figura 17. Micrografías SEM y espectro EDS del sistema quitosano-VB 10% tras el proceso de anclaje de las

partículas de vidrio bioactivo (a, b). El espectro EDS corresponde a la región analizada en a micrografía para determinar la composición elemental de las estructuras observadas

Con el propósito de corroborar la naturaleza química de las partículas observadas en las micrografías SEM de los sistemas, se llevó a cabo un análisis elemental mediante espectroscopía de dispersión de energía de rayos X (EDS) (Figura 16 y Figura 17). El análisis se realizó de manera localizada sobre las regiones donde se identificaron los agregados descritos previamente.

Los espectros obtenidos para ambos sistemas muestran la presencia de silicio (Si), calcio (Ca) y fósforo (P), elementos característicos del vidrio bioactivo. La identificación de estos elementos en las zonas analizadas confirma que las partículas observadas en las micrografías corresponden al vidrio bioactivo presente dentro de los sistemas poliméricos. Resultados similares han sido reportados en materiales compuestos que incorporan vidrio bioactivo, donde la detección simultanea de Si, Ca, y P mediante EDS se emplea como evidencia de la presencia del componente inorgánico dentro del sistema [102,103].

Por lo tanto, los resultados obtenidos mediante SEM y EDS indican que las estructuras observadas presentan características morfológicas y composicionales con las partículas de vidrio bioactivo. Mientras que las micrografías permitieron identificar regiones asociadas a dichas partículas y comparar su morfología, el análisis EDS confirmó la presencia de los elementos característicos que constituyen su composición. Estas evidencias complementan los resultados obtenidos mediante FTIR, donde los cambios observados en las bandas características de los polímeros funcionalizados fueron consistentes con el anclaje de las partículas de vidrio bioactivo.

3.5 Obtención de fibras poliméricas

Con la finalidad de establecer las condiciones adecuadas para la obtención de fibras poliméricas mediante electrohilado, se evaluaron diferentes parámetros de la solución y del proceso, considerando su efecto sobre la formación y morfología de las fibras. A partir de esta evaluación, se identificaron las condiciones de procesamiento que permitieron obtener fibras continuas y con menor presencia de

defectos para cada sistema polimérico.

En la Tabla 4 se enlistan las características de las fibras electrohiladas utilizando gelatina como polímero. Se obtuvo que las características óptimas de electrohilado de gelatina son: una concentración de 25% en ácido acético/ácido fórmico (8:2), un flujo de 0.8 mL/h y un voltaje de 18 kV. En la Tabla 5 se presentan las características de las fibras de quitosano, obteniendo como condiciones óptimas para electrohilar una concentración del 10% en ácido trifluoroacético (TFA), 0.6 mL/h y 10kV.

Tabla 4. Evaluación experimental para la obtención de fibras de gelatina, incluyendo la respuesta cualitativa de formación de fibras en función de la concentración, el flujo y voltaje

Gelatina				
Experimento	Factor 1 Concentración (%)	Factor 2 Flujo (mL/h)	Factor 3 Voltaje (kV)	Respuesta
1	15	0.3	10	Ausencia de fibras
2	20	0.5	15	Formación de fibras con defectos
3	**25**	**0.8**	**18**	**Formación de fibras**
4	15	0.8	18	Formación de fibras con defectos
5	20	0.3	10	Ausencia de fibras
6	25	0.5	15	Ausencia de fibras

Tabla 5. Evaluación experimental para la obtención de fibras de quitosano, incluyendo la respuesta cualitativa de formación de fibras en función de la concentración, el flujo y voltaje

Quitosano				
Experimento	Factor 1 Concentración (%)	Factor 2 Flujo (mL/h)	Factor 3 Voltaje (kV)	Respuesta
1	5	0.6	10	Formación de fibras con defectos
2	7	0.7	11	Ausencia de fibras
3	10	0.8	12	Ausencia de fibras
4	5	0.8	12	Formación de fibras con defectos
5	**10**	**0.6**	**10**	**Formación de fibras**
6	7	0.7	11	Ausencia de fibras

3.5.1 Membranas de gelatina

En la Figura 18 se presenta la micrografía SEM donde se observa una morfología continua y una red fibrosa distribuida de manera uniforme, sin presencia evidente de defectos estructurales. A un aumento de 10000x se observa una superficie homogénea, así como la formación de una red tridimensional en la que las fibras se encuentran interconectadas y superpuestas. En cuanto al diámetro de fibra, se obtuvo un valor promedio de 1.12 $\pm$0.26 µm (n=200), el cual se distribuye alrededor de un valor central con una variación moderada. El histograma correspondiente muestra una tendencia de distribución concentrada en torno al valor promedio, lo que indica la formación de fibras con tamaños relativamente uniformes dentro del sistema.

La morfología de las fibras de gelatina obtenidas, es consistente con lo reportado para sistemas electrohilados, donde se ha descrito la formación de estructuras fibrosas uniformes con adecuada integridad morfológica bajo condiciones óptimas de procesamiento [104,105]. Este tipo de arquitecturas ha sido ampliamente relacionado con sistemas biomimeticos que reproducen características de la matriz extracelular, la cual desempeña un papel fundamental en la adhesión, proliferación y migración celular. En este sentido, se ha reportado que andamios electrohilados basados en gelatina pueden favorecer la interacción célula-material debido a su similitud estructural con componentes proteicos presentes en el entorno extracelular. Asimismo, se ha señalado que fibras con morfología uniforme, superficies continuas y una distribución homogénea dentro de la red fibrosa proporcionan condiciones favorables, en comparación con estructuras que presentan defectos o irregularidades morfológicas [106,107].

Adicionalmente, el diámetro obtenido para las fibras de gelatina fue de 1.12 µm. Este valor se encuentra dentro del intervalo de diámetros reportado para fibras electrohiladas de gelatina empleadas en aplicaciones de ingeniería de tejido óseo y otras aplicaciones de regeneración tisular, donde se han descrito diámetros desde la escala nanométrica hasta aproximadamente 1 µm o mayores. En particular se han estudiado fibras de gelatina con diámetros cercanos a 0.6-1.0 µm. Sisson y colaboradores demostraron que el diámetro de las fibras de gelatina influye directamente en el comportamiento de células osteoblásticas, afectando procesos como la migración y diferenciación celular. De manera similar, diversos estudias han señalado que fibras en rangos submicrométricos y micrométricos pueden proporcionar características estructurales favorables para el establecimiento y proliferación celular sobre el material [108–110].

Por lo tanto, las características morfológicas y el diámetro promedio de las fibras obtenidas se encuentran dentro de las dimensiones reportadas para sistemas fibrosos de gelatina estudiados en aplicaciones de ingeniería de tejido óseo.

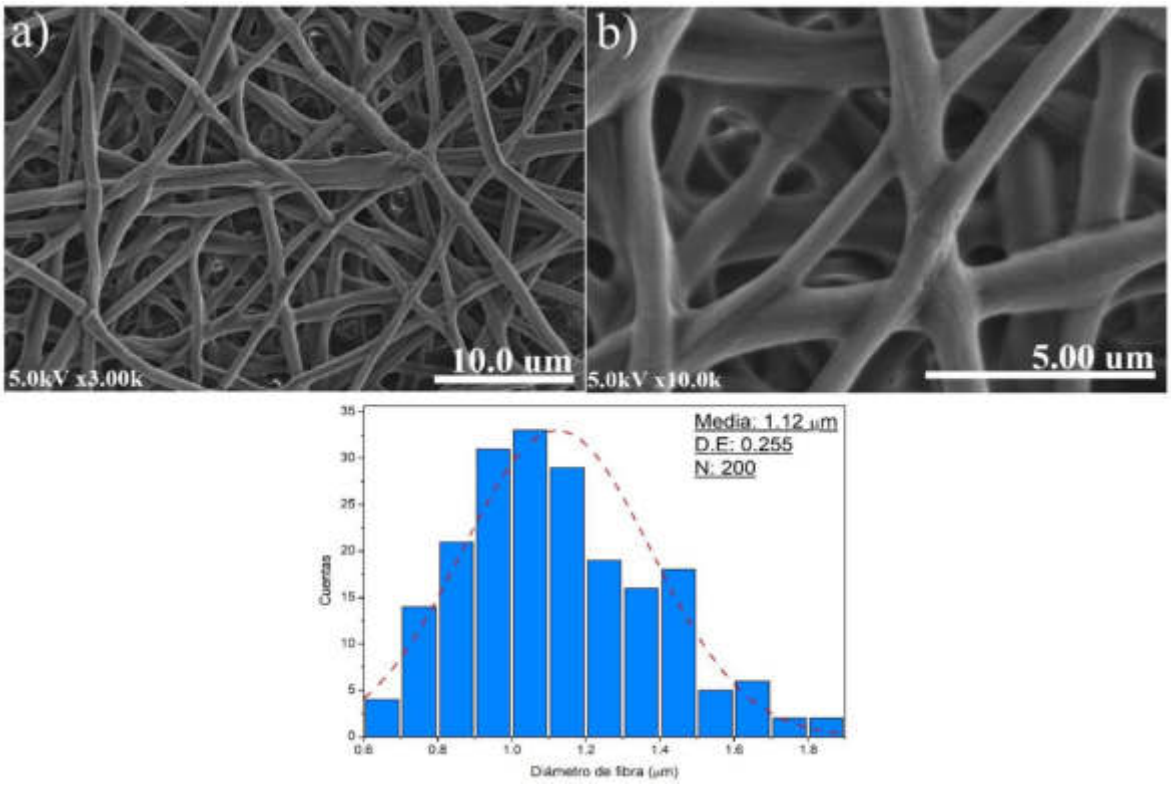


Figura 18. Micrografías SEM de las membranas electrohiladas de gelatina a diferentes magnificaciones (a, b) y su correspondiente histograma de distribución de diámetros de fibra

3.5.2 Membranas de quitosano

En la Figura 19 se presentan las micrografías SEM de las membranas obtenidas por electrohilado. A diferencia de las fibras de gelatina, estas presentan una morfología distinta, caracterizada por una red fibrosa con espacios abiertos distribuidos a lo largo de toda la membrana. A bajas magnificaciones se observa una arquitectura tridimensional formada por fibras entrelazadas, mientras que a mayores aumentos es posible distinguir fibras de mayor y menor diámetro distribuidas de manera conjunta. De igual manera, se observan zonas done las fibras se interconectan, generando espacios de distintos tamaños. Esto sugiere que la red fibrosa del quitosano presenta una organización menos compacta que la observada en las membranas de gelatina.

El análisis de la distribución de diámetro de fibra mostró un valor promedio de 0.45 $\pm$0.10 µm (n=200). El histograma presenta una distribución unimodal centrada alrededor de este valor, con una mayor frecuencia de fibras en el intervalo comprendido entre 0.35 y 0.55 µm. La dispersión observada indica variaciones en

el diámetro de las fibras; sin embargo, la mayoría de las mediciones se concentra dentro de un intervalo relativamente estrecho alrededor de la media.

La morfología observada en las membranas de quitosano coincide con lo reportado en la literatura, donde se describe la formación de redes fibrosas con alta porosidad y distribución aleatoria de las fibras. Este tipo de organización es característico de sistemas basados en quitosano, donde el electrohilado genera fibras interconectadas con una estructura porosa distribuida en toda la membrana [111–113].

Diversos estudios han reportado que las fibras de quitosano electrohilado presentan dimensiones en el rango submicrométrico (100-800 nm), en función de las propiedades del polímero y de los parámetros del proceso de electrohilado [112,113]. En este estudio, el diámetro promedio obtenido (0.45 $\pm$0.10 µm) se encuentra dentro de este intervalo, lo que confirma una adecuada formación del sistema fibroso bajo las condiciones empleadas.

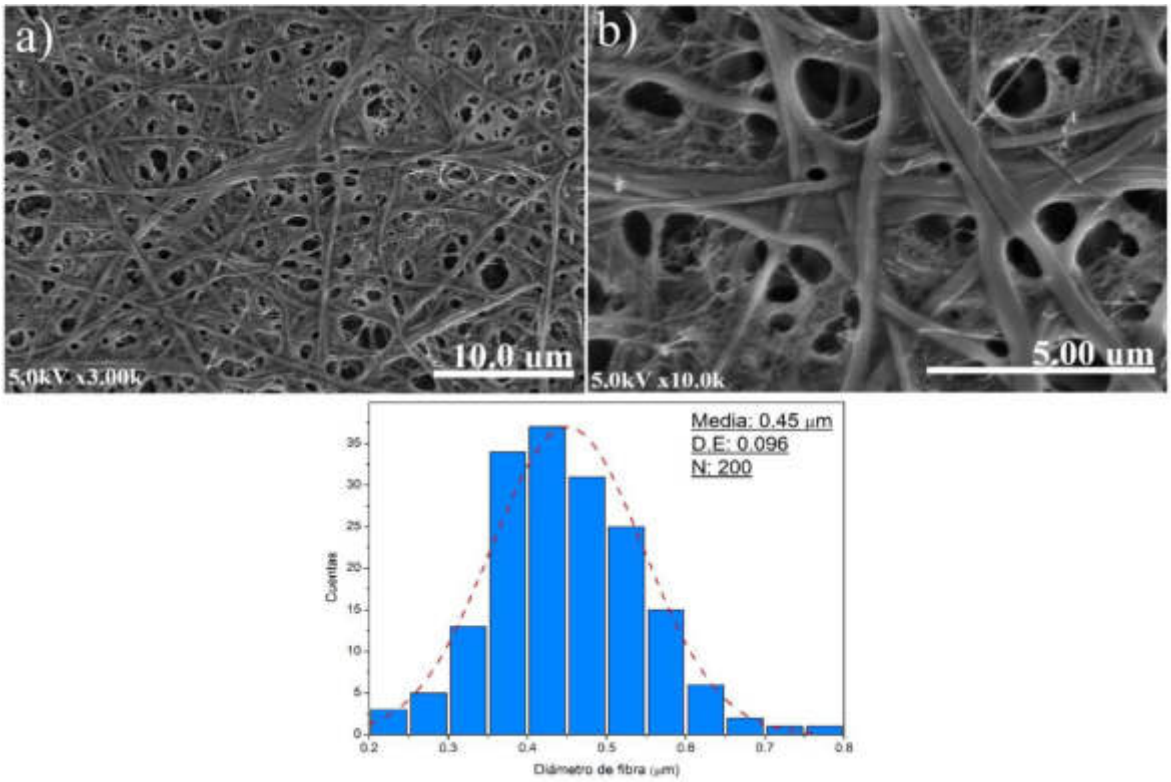


Figura 19. Micrografías SEM de las membranas electrohiladas de quitosano a diferentes magnificaciones (a, b) y su correspondiente histograma de distribución de diámetros de fibra

La combinación de una morfología porosa y diámetros en escala micro y submicrométrica favorece la interacción celular, incluyendo procesos de adhesión, migración y proliferación [114]. De acuerdo con los resultados obtenidos, ambos polímeros demostraron la capacidad de formar fibras mediante electrohilado, presentando diferencias en su morfología y distribución de diámetros, lo cual es consistente con la naturaleza de cada material. No obstante, ambas membranas exhiben características estructurales compatibles con el entorno biológico, especialmente en términos de porosidad y escala fibrosa. Estos resultados sugieren que ambos sistemas presentan un desempeño adecuado para su aplicación en ingeniería de tejido óseo.

3.5.3 Membranas de PCL/gelatina

En la Figura 20 se muestran las micrografías SEM de las membranas de PCL/gelatina. A un aumento de 3000x se observa una estructura fibrosa tridimensional compuesta por fibras orientadas aleatoriamente y distribuidas de forma uniforme. Asimismo, se identifica la presencia de estructuras tipo perla dispersas a lo largo de la red fibrosa. Al incrementar a 10 000x, se aprecia con mayor detalle la organización de la red fibrosa, donde las fibras se entrecruzan y se superponen entre sí, dando lugar a una estructura altamente interconectada, característica de los sistemas electrohilados.

La aparición de estructuras tipo perla puede atribuirse principalmente a modificaciones en la viscosidad, la tensión superficial y la concentración polimérica de la solución, parámetros que determinan la capacidad de estiramiento del material durante el proceso de electrohilado [115,116]. Cuando estos factores no se encuentran en equilibrio, el chorro pierde estabilidad y se generan acumulaciones locales de material que dan origen a defectos morfológicos tipo perla. En este sentido, se sugiere que las fibras de PCL/gelatina observadas presentan una modificación en su morfología asociada a la incorporación de PCL, lo que altera las propiedades reológicas de la solución y favorece la aparición de estas estructuras.

De acuerdo con Rodríguez-Martín y colaboradores [117], en sistemas PCL/gelatina la composición de la solución influye directamente en la morfología final de las

fibras, debido a su efecto sobre las propiedades reológicas de la solución durante el electrohilado. Por su parte, Montoya y colaboradores [118] reportaron que la incorporación de PCL modifica la organización y uniformidad de la red fibrosa, generando variaciones en la arquitectura del material obtenido.

A partir de estos resultados, el análisis de distribución de diámetros, mostró un valor promedio de 0.12 ± 0.046 µm, lo que confirma la obtención predominante de fibras en la escala nanométrica. Este resultado contrasta con la gelatina, la cual presenta diámetros promedio reportados de aproximadamente 1.12 µm, lo que evidencia que la incorporación de PCL reduce de manera significativa el tamaño de las fibras formadas. Este comportamiento ha sido atribuido a modificaciones en las propiedades reológicas del sistema.

En particular, Lim y sus colaboradores describieron la obtención de fibras de PCL/gelatina con diámetros comprendidos principalmente entre 100 y 200 nm [119]. Las fibras en escala nanométrica y la red interconectada obtenida pueden favorecer la mimetización de la matriz extracelular natural, contribuyendo a un entorno más adecuado para la adhesión y organización celular.

Estos resultados evidencian que la incorporación de PCL en gelatina permite obtener membranas con morfología homogénea y diámetros reducidos, con potencial aplicación como andamios para ingeniería de tejido óseo.

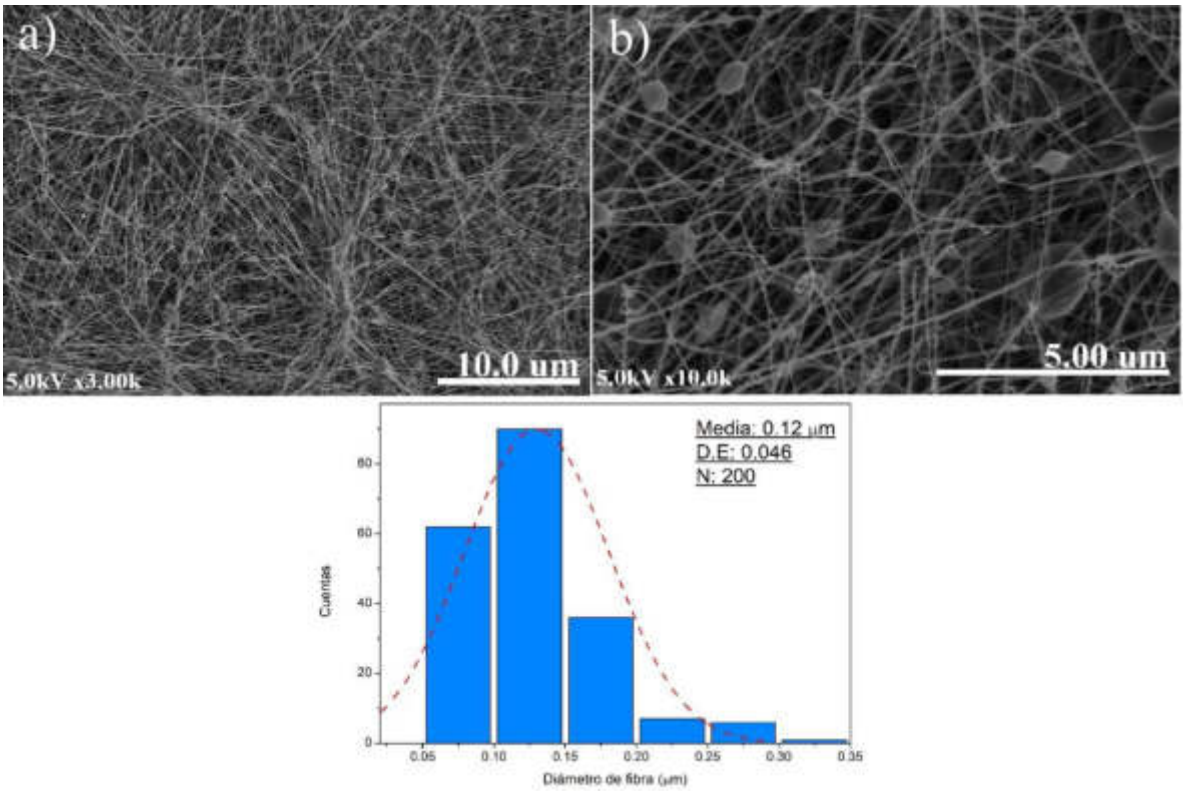


Figura 20. Micrografías SEM de las membranas de PCL/gelatina obtenidas a 3000x y 10000x (a, b) y su correspondiente histograma de distribución de diámetros de fibra. La membrana presenta una morfología fibrosa continua, con un diámetro promedio de 0.12 ± 0.046 µm

3.5.4 Membranas de PCL/quitosano

En la Figura 21 se presentan las micrografías SEM, donde a un aumento de 3000x se observa una estructura fibrosa tridimensional compuesta por fibras orientas aleatoriamente e interconectadas, formando una red continua distribuida homogéneamente a lo largo de la membrana. Asimismo, se aprecia una morfología libre de estructuras tipo perla y defectos morfológicos evidentes, lo que sugiere una adecuada estabilidad del chorro durante el proceso de electrohilado. Las fibras presentan superficies lisas y continuas, sin evidencia de fracturas o irregularidades significativas. Además, se observan variaciones en el diámetro de las fibras, identificándose algunas fibras de mayor espesor distribuidas entre una red predominante de fibras más delgadas, las cuales pueden apreciarse con mayor detalle en las micrografías obtenidas a 10 000x. Esta disposición genera una estructura fibrosa con espacios interconectados de distintas dimensiones.

La presencia de fibras con diferentes diámetros podría estar relacionada con las propiedades particulares de la mezcla PCL/quitosano durante el proceso de

electrohilado. Aunque ambas soluciones se integraron previamente a la fabricación de las membranas y no se observaron indicios de separación de fases, cada polímero contribuye de manera distinta al comportamiento del chorro polimérico. El PCL favorece la formación de fibras continuas y estables, mientras que la incorporación de quitosano modifica las propiedades de la solución, particularmente al incrementar su viscosidad y conductividad, lo cual puede influir en la estabilidad del chorro durante el proceso de electrohilado, como ha sido reportado por Gizaw y sus colaboradores [120].

En este sentido, Sheik Saudi y colaboradores [121] han demostrado que dichas modificaciones en las propiedades de la solución se reflejan en la morfología final de las fibras, observándose variaciones en el diámetro de las mismas sin evidencia de separación de fases poliméricas, lo que indica una mezcla efectiva entre ambos componentes. Estas características estructurales resultan de interés en aplicaciones en regeneración ósea, ya que pueden proporcionar una elevada área superficial para la interacción célula-material y reproducir algunas características estructurales de la matriz extracelular, propiedades ampliamente asociadas con los andamios electrohilados destinados a ingeniería de tejido óseo [122].

El análisis de distribución de diámetros mostró un valor promedio de 0.67 ± 0.159 µm. El histograma presentó una distribución unimodal, con la mayor proporción de fibras entre 0.5 y 0.8 µm, lo que indica una distribución relativamente homogénea alrededor del valor promedio. En comparación con las fibras de quitosano (0.45 ± 0.10 µm), las membranas de PCL/quitosano exhibieron un incremento en el diámetro de fibra, este comportamiento ha sido previamente reportado, donde se ha observado que la incorporación de PCL puede modificar la morfología final de las fibras. En este sentido, dichas variaciones en el diámetro pueden atribuirse al balance entre las propiedades el quitosano y la presencia de PCL en el sistema [120,121].

Por lo tanto, las diferencias observadas entre las formulaciones evaluadas sugieren que la naturaleza del polímero empleado influye en el tamaño y la uniformidad de las fibras, así como en las características morfológicas de las membranas. Estas variaciones evidencian que la composición de la solución

desempeña un papel importante en la obtención de estructuras fibrosas con características potencialmente útiles para aplicaciones en ingeniería de tejidos.

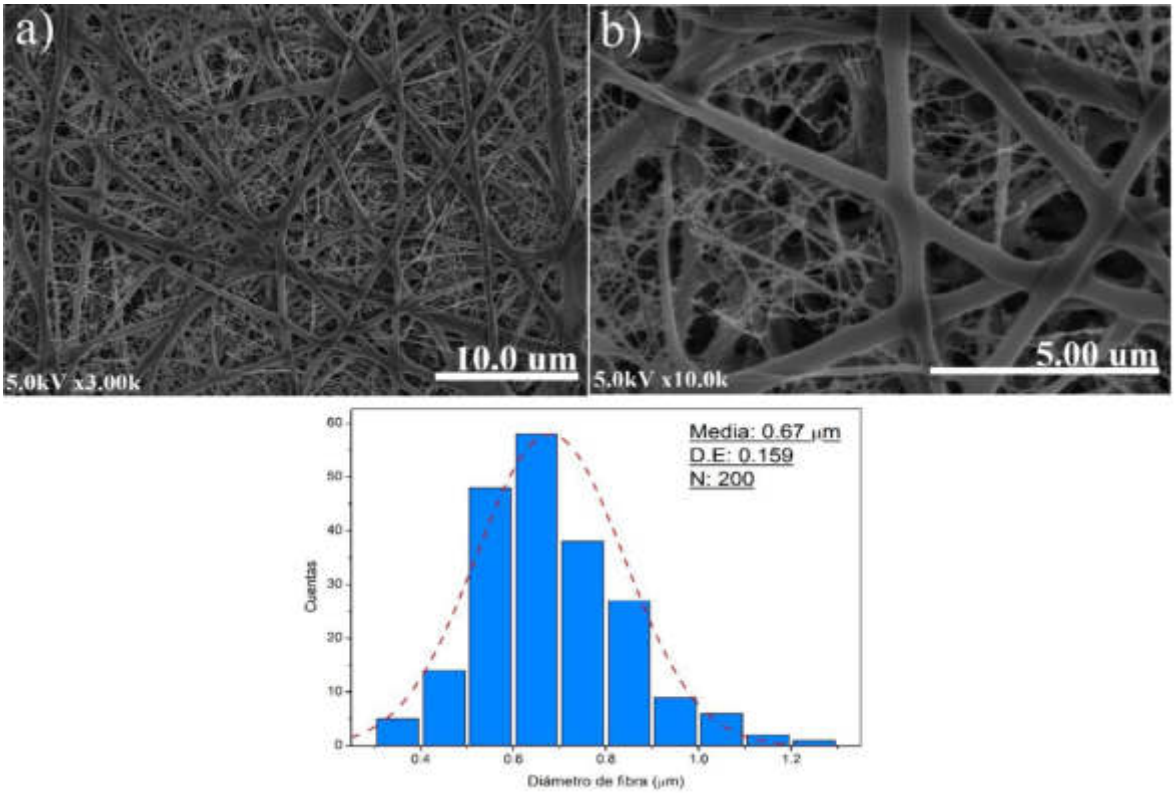


Figura 21. Micrografías SEM de las membranas de PCL/quitosano obtenidas a 3000x y 10000x (a, b). La membrana presenta una morfología fibrosa continua y libre de defectos evidentes. El histograma muestra la distribución de diámetros de fibra, con un valor promedio de 0.67+0.159µm

3.5.5 Membranas de PCL/quitosano-VB

En la Figura 22 se presentan las micrografías SEM correspondientes al sistema PCL/quitosano-VB. A diferencia de las membranas de PCL/quitosano obtenidas previamente, en este sistema no se observó la formación de una red fibrosa continua.

En su lugar, se observan principalmente estructuras irregulares y defectos morfológicos, junto con una cantidad limitada de fibras dispersas a lo largo de la superficie. Asimismo, se aprecia una acumulación de material polimérico depositado sobre el colector, lo que sugiere que las condiciones de la solución no fueron las más adecuadas para mantener un proceso de electrohilado estable y favorecer la formación de fibras continuas uniformes debido a la presencia del VB en el polímero

funcionalizado. A su vez, en las micrografías SEM se observan partículas presentes dentro de las escasas fibras obtenidas, las cuales se asocian con la presencia del vidrio bioactivo anclado al sistema.

La ausencia de una estructura fibrosa continua podría estar relacionada no solo con las modificaciones características de la solución ocasionadas por la importación del VB, sino también con una posible alteración de la estabilidad del quitosano durante el procesamiento, lo que pudo afectar su capacidad para formar fibras bajo las condiciones empleadas. Por lo tanto, aunque la morfología observada es consistente con la presencia del VB, el sistema PCL/quitosano-VB no presentó la estabilidad suficiente durante el electrohilado para generar una estructura fibrosa continua y homogénea.

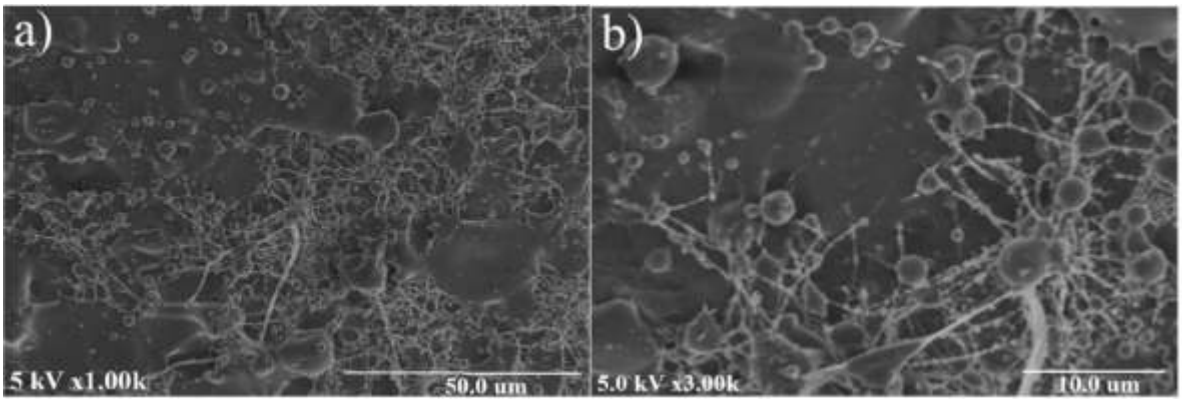


Figura 22. Micrografías SEM de las membranas PCL/quitosano-VB obtenidas mediante electrohilado (a, b). Se observa la formación limitada de estructuras fibrosas. Asimismo, se distinguen partículas atribuidas al vidrio bioactivo anclado al sistema

3.5.6 Membranas de PCL/gelatina-VB

Por otra parte, el sistema PCL-gelatina-VB presentó un comportamiento favorable durante el proceso de electrohilado a las mismas condiciones de la obtención de PCL/gelatina, permitiendo la obtención de membranas con una morfología fibrosa definida, como se muestra en la Figura 23.

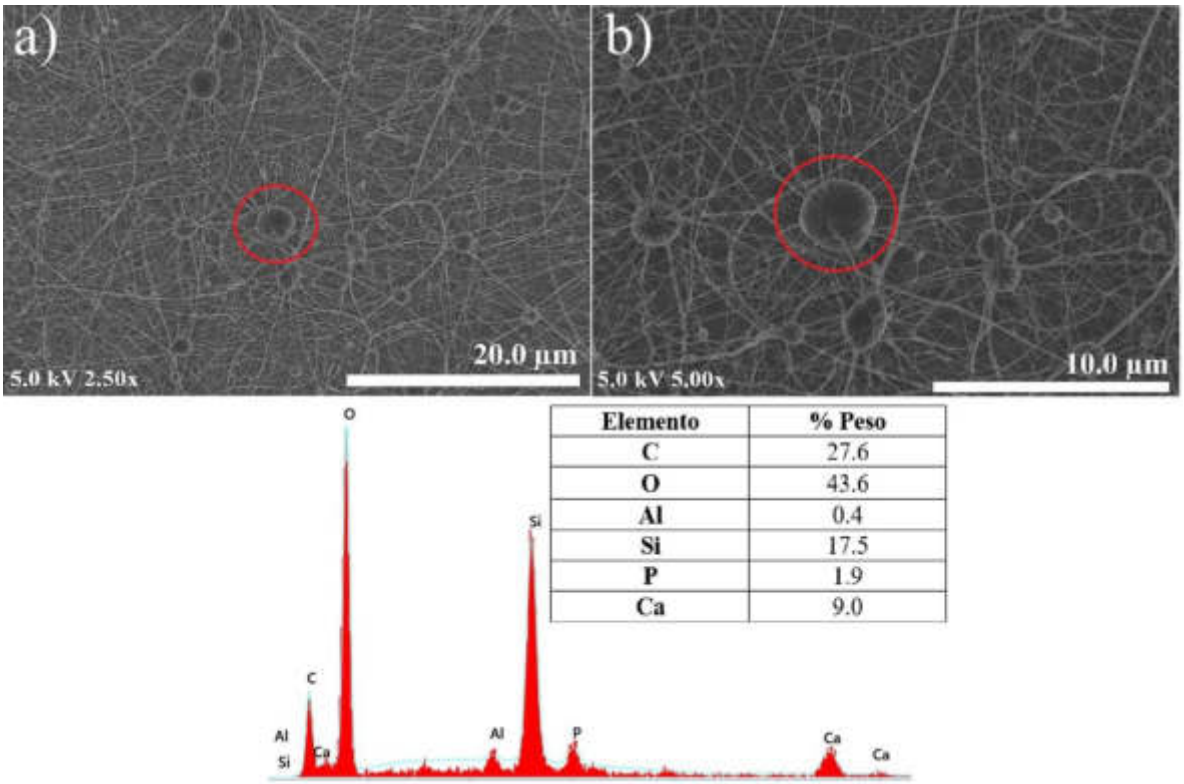
Las micrografías SEM revelan una red fibrosa tridimensional compuesta por fibras continuas, homogéneas y distribuidas aleatoriamente, conservando la morfología característica de los sistemas electrohilados. Asimismo, se observa una mayor densidad de fibras y una estructura más desarrollada en comparación con los sistemas previamente descritos. Este tipo de arquitectura fibrosa ha sido

ampliamente reportada como favorable para aplicaciones biomédicas, ya que puede proporcionar un entorno adecuado para la adhesión y proliferación celular, además de facilitar el transporte de nutrientes y el intercambio de metabolitos [106].

Adicionalmente, en las micrografías SEM se observan partículas distribuidas a lo largo de la red fibrosa, las cuales se asocian con la presencia del vidrio bioactivo anclado al sistema. A diferencia del sistema PCL/quitosano-VB, en el cual las características de la solución limitaron la formación de fibras, este sistema presentó condiciones adecuadas para el electrohilado, permitiendo la obtención de una estructura fibrosa definida.

Para determinar la composición elemental de las partículas observadas en las micrografías SEM, se realizó un análisis EDS en una zona localizada de la membrana PCL/gelatina-VB donde se identificó una de las partículas presentes dentro de la red fibrosa.

El espectro obtenido (Figura 23) muestra la presencia de silicio, fósforo y calcio, componentes característicos del vidrio bioactivo sintetizado y molido previamente para este estudio. La detección de estos elementos confirma que las partículas observadas en las micrografías corresponden al vidrio bioactivo empleado en el proceso de anclaje a la gelatina funcionalizada.



Elemento	% Peso
C	27.6
O	43.6
Al	0.4
Si	17.5
P	1.9
Ca	9.0

Figura 23. Micrografías SEM y espectro EDS de las membranas PCL/gelatina-VB obtenidas mediante electrohilado (a, b). Se observa una red fibrosa definida con partículas presentes en la estructura de las fibras

3.6 Recubrimiento de aleación Ti-6Al-4V con fibras compuestas con VB

Las fibras compuestas con partículas de vidrio bioactivo ancladas fueron depositadas sobre la superficie de la aleación Ti-6Al-4V con el propósito de obtener recubrimientos bioactivos sobre el sustrato metálico. En esta sección se presentan las imágenes obtenidas mediante un microscopio estereoscópico de los recubrimientos elaborados a partir de los sistemas PCL/quitosano-VB y PCL/gelatina-VB. Asimismo, se muestra la sección transversal de la aleación de titanio tanto sin recubrimiento como recubierta con las membranas fibrosas, con el fin de evaluar visualmente la presencia y distribución de la capa depositada.

3.6.1 PCL/quitosano-VB

En la Figura 24 se presentan las imágenes de los recubrimientos obtenidos sobre la aleación Ti-6Al-4V mediante los sistemas previamente desarrollados. En la Figura 24(a) se muestra la superficie de la aleación sin recubrimiento, utilizada como referencia para fines comparativos.

En el caso del sistema PCL/quitosano-VB (Figura 24(b)), aunque fue posible

depositar material sobre la superficie metálica, no se obtuvo un recubrimiento fibroso uniforme y continuo. En su lugar, se observaron diversos defectos morfológicos caracterizados por acumulaciones localizadas de material polimérico, las cuales presentan una apariencia similar a gotas distribuidas sobre la aleación.

Asimismo, se identificaron algunas estructuras de material polimérico aislado; sin embargo, estas fueron escasas y se encontraron distribuidas de manera heterogénea sobre la superficie. Como consecuencia, no se aprecia la formación de una membrana continua capaz de cubrir homogéneamente el sustrato metálico. Este comportamiento es consistente con los resultados observados previamente para las membranas de PCL/quitosano-VB, donde las características de la solución limitaron la estabilidad del proceso de electrohilado y, por consiguiente, la obtención de fibras continuas y definidas.

3.6.2 PCL/gelatina-VB

Como se observa en la Figura 24(c), las fibras de PCL/gelatina-VB recubren de manera uniforme la superficie de la aleación Ti-6Al-4V. La imagen evidencia la formación de una capa continua y homogénea compuesta por material polimérico distribuida a lo largo del sustrato metálico. Asimismo, se observa una distribución uniforme de la membrana, lo que indica una adecuada deposición del material y la formación exitosa del recubrimiento sobre la superficie de la aleación.

En comparación con el sistema PCL/quitosano-VB, el recubrimiento basado en PCL/gelatina-VB presentó un comportamiento significativamente más favorable, tanto en la formación de fibras como en su deposición sobre el sustrato metálico. Como se describió en la sección de metodología, aunque en ambos casos se utilizó la misma cantidad de solución polimérica, los tiempos de deposición fueron diferentes. Esta variación puede atribuirse a parámetros inherentes al sistema de electrohilado, como la concentración del polímero, el flujo de alimentación, la viscosidad de la solución y la estabilidad del chorro durante el proceso, los cuales influyen directamente en la velocidad de depósito y en la forma en que el material se distribuye sobre el sustrato.

La obtención de una membrana continua, homogénea y distribuida permitió seleccionar el sistema PCL/gelatina-VB para las etapas posteriores del estudio, al

representar una alternativa con las características morfológicas más adecuadas para su aplicación como recubrimiento bioactivo sobre aleaciones de titanio.

Con el propósito de evaluar con mayor detalle la presencia y distribución del recubrimiento, se obtuvieron imágenes mediante un microscopio estereoscópico de las muestras sin recubrimiento y recubiertas con PCL/gelatina-VB. Como se muestra en la Figura 25 (a, b), la aleación Ti-6Al-4V sin recubrir presenta una superficie uniforme y una sección transversal característica del sustrato metálico. Por otro lado, en la muestra recubierta (Figura 25 (c, d)) se observa una capa adicional sobre la superficie de la aleación, correspondiente al recubrimiento depositado. Esta capa se mantiene continua a lo largo del sustrato, evidenciando la permanencia del material sobre la superficie metálica. En la vista transversal es posible distinguir la disposición del recubrimiento sobre la aleación, así como su interacción con el sustrato metálico. La presencia de esta capa adicional confirma la deposición efectiva de la membrana y permite apreciar su continuidad sobre la superficie recubierta.

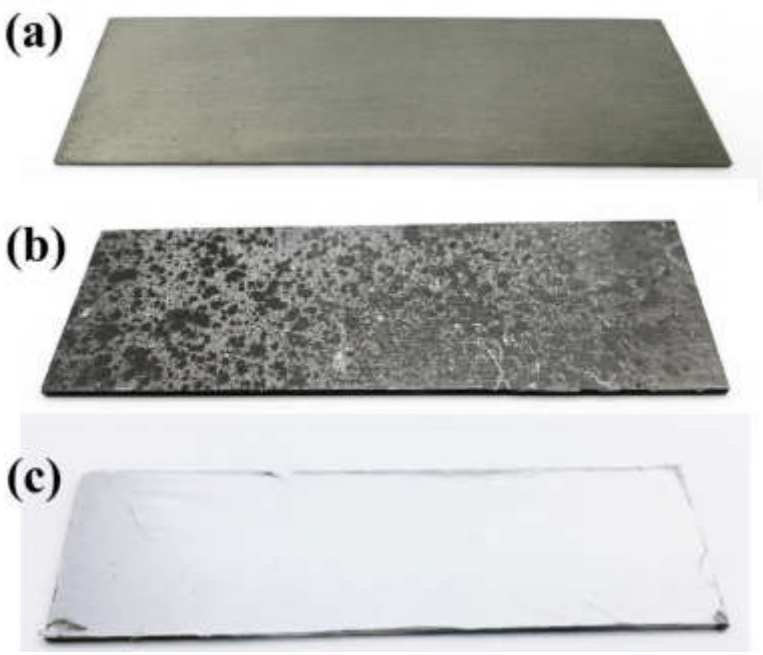


Figura 24. Fotografías macroscópicas de la aleación Ti-6Al-4V antes y después de la deposición de los recubrimientos fibrosos: (a) aleación sin recubrimiento, (b) aleación recubierta con el sistema PCL/quitosano-VB y (c) aleación recubierta con el sistema PCL/gelatina-VB

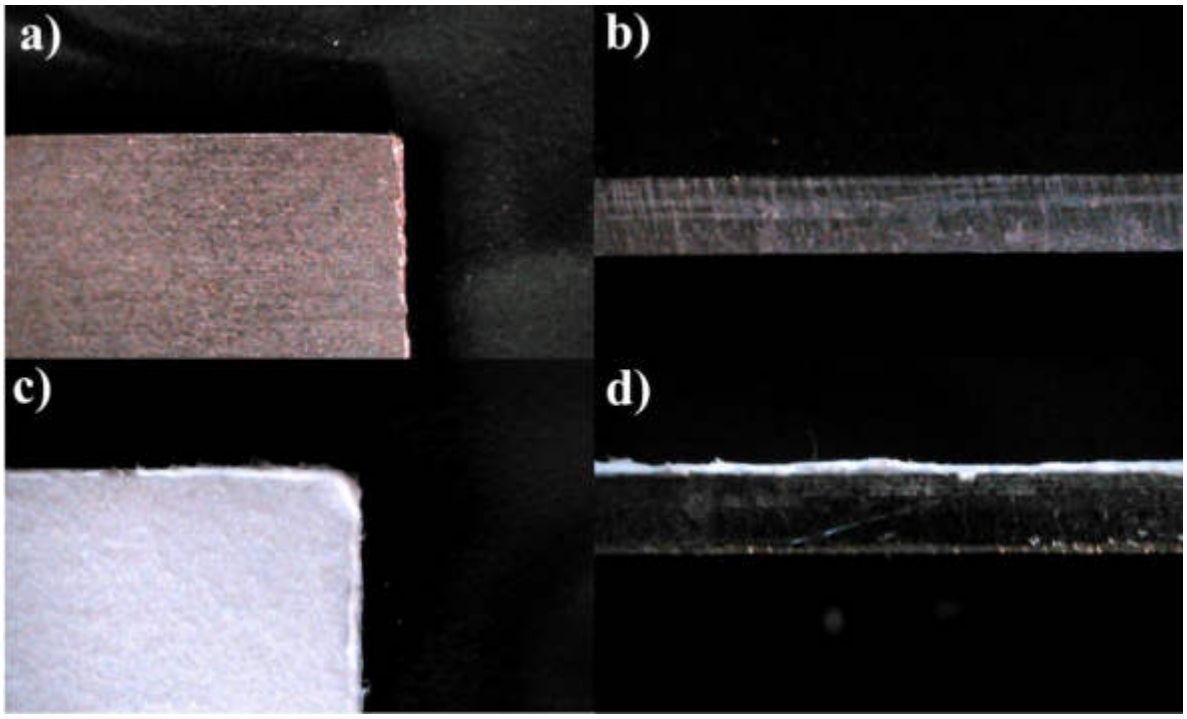


Figura 25. Imágenes obtenidas mediante un microscopio estereoscópico de muestras de Ti-6Al-4V antes y después del recubrimiento de PCL/gelatina-VB: a) vista frontal de la aleación sin recubrimiento, b) vista lateral de la aleación sin recubrimiento, c) vista Frontal de la aleación recubierta y d) vista lateral de la aleación recubierta

Con el fin de evaluar la superficie de la aleación Ti-6Al-4V recubierta con PCL/gelatina-VB, se realizó un análisis mediante microscopia electrónica de barrido. Como se observó en la Figura 25 (a), la superficie de la aleación de titanio es lisa y continua a escala macroscópica. Sin embargo, el análisis SEM permitió identificar características topográficas propias del sustrato metálico, asociadas a los procesos de preparación superficial y manufactura de la aleación, tales como pulido y tratamientos mecánicos previos (Figura 26 (a)).

Posteriormente, tras la deposición del sistema PCL/gelatina-VB, es posible apreciar una red fibrosa distribuida sobre la superficie metálica (Figura 26 (b)). Las fibras conservan la morfología continua y homogénea observada previamente en las membranas electrohiladas, manteniendo una distribución aleatoria característica de este tipo de sistemas. Asimismo, se distinguen partículas correspondientes al vidrio bioactivo dispersas a lo largo de la red fibrosa, evidenciando su presencia en diferentes regiones del recubrimiento. Estos resultados indican que la deposición sobre la aleación de Ti-6Al-4V no produjo modificaciones apreciables en la

morfología de las fibras ni en la distribución de las partículas de vidrio bioactivo, preservándose las características estructurales observadas previamente en las membranas fibrosas.

La deposición de fibras electrohiladas como recubrimientos sobre aleaciones metálicas ha sido ampliamente estudiada debido a su capacidad para modificar la interacción entre el material y el entorno biológico, generando superficies con características morfológicas similares a las de la matriz extracelular [123–125].

Se ha reportado que este tipo de arquitecturas fibrosas pueden favorecer la interacción entre el implante u el tejido circundante, proporcionando un entorno adecuado para la adhesión, proliferación y actividad celular. Asimismo, este tipo de recubrimientos ha sido relacionado con una mejora en la respuesta biológica del material y con procesos relacionados con la regeneración ósea y la osteointegración [106,126,127].

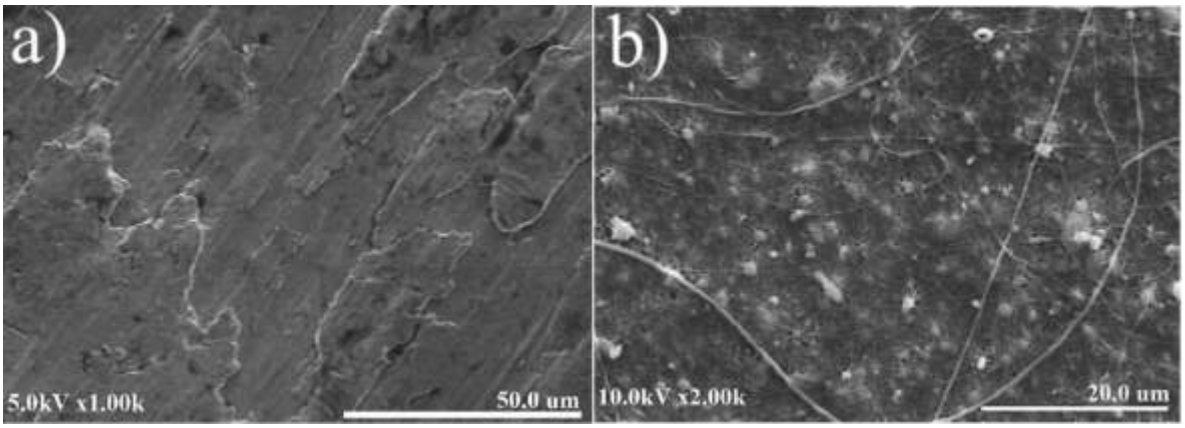


Figura 26. Micrografías SEM de la aleación Ti-6Al-4V sin recubrimiento y recubierta con el sistema PCL/gelatina-VB: (a) superficie de la aleación sin recubrir y (b) distribución de las fibras y partículas de vidrio bioactivo sobre la superficie recubierta

3.7 Prueba *in vitro* en fibras de PCL/gelatina-VB

Con el fin de evaluar la bioactividad de las membranas electrohilada, se realizó un ensayo de inmersión en fluido corporal simulado (SBF) durante 1, 3, 5, 7, 14 y 21 días (Figura 27). Este análisis permitió determinar si las partículas de vidrio bioactivo previamente ancladas a la gelatina conservaban su capacidad de inducir la formación de una capa apatítica tras su exposición a un medio fisiológico simulado.

Desde el primer día de inmersión fue posible observar la formación de depósitos sobre la superficie de las membranas de PCL/gelatina-VB. Se identifica la morfología característica de las fibras electrohiladas, así como la presencia de partículas de vidrio bioactivo distribuidas a lo largo del material. Asimismo, se aprecia el desarrollo inicial de una capa de depósitos alrededor de las fibras y de las partículas de vidrio bioactivo expuestas. Estos depósitos presentan una morfológica porosa e irregular y se distribuyen de manera localizada sobre la superficie del material. Para el día 3 (Figura 27), la cantidad de depósitos superficiales aumenta considerablemente, observándose una mayor cobertura sobre las fibras. la capa mineral se distribuye de manera más homogénea y comienza a cubrir gran parte del material. Además, se identifican estructuras alargadas e irregulares junto con los depósitos observados desde el día 1, evidenciando modificaciones en la morfología de los depósitos conforme avanza el tiempo de inmersión.

Durante los días 5 y 7 (Figura 27) se observa un incremento adicional en la cantidad de depósitos presentes sobre la superficie. Estos se distribuyen de forma más uniforme a lo largo de las fibras, formando agregados de mayor tamaño que cubren progresivamente el material. Como consecuencia, la morfología original de las fibras comienza a distinguirse con menor claridad debido al crecimiento continuo de la capa mineral. Después de 14 días de inmersión (Figura 27), la superficie de las membranas se encuentra ampliamente cubierta por depósitos minerales, observándose una capa más continua en comparación con los tiempos iniciales. Además de los agregados irregulares presentes desde los primeros días de estudio, comienzan a identificarse estructuras con morfologías más definidas distribuidas sobre el material. Estas estructuras se observan tanto alrededor de las partículas de vidrio bioactivo como sobre las fibras electrohiladas, indicando que el proceso de mineralización continúa avanzando conforme aumenta el tiempo de inmersión.

Para el día 21 (Figura 27), la cobertura superficial es aún más extensa y los depósitos presentan una apariencia más compacta y densa. Asimismo, se mantiene la presencia de estructuras con morfologías definidas, acompañadas por agregados

de mayor tamaño distribuidos a lo largo del material. Esta evolución morfológica sugiere que los depósitos formados durante las etapas iniciales continúan creciendo y reorganizándose a medida que transcurre el ensayo.

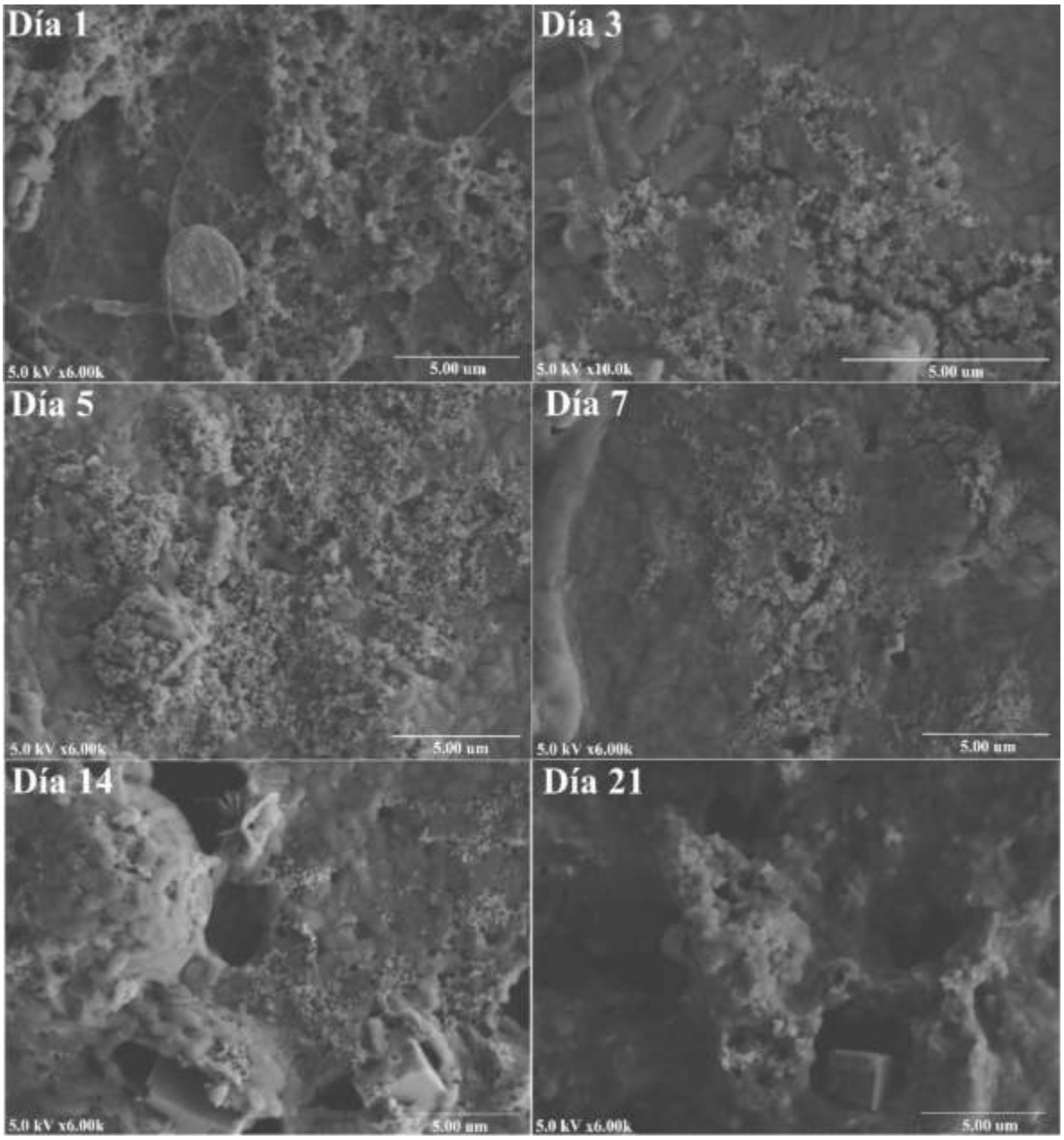


Figura 27. Micrografías SEM de los depósitos minerales formados sobre las membranas electrohiladas de PCL/gelatina-VB durante el ensayo de bioactividad en fluido corporal simulado (SBF) a diferentes tiempos de inmersión (1, 3, 5, 7, 14 y 21 días)

La formación progresiva de depósitos minerales observada sobre las membranas de PCL/gelatina-VB coincide con el comportamiento bioactivo ampliamente

reportado para materiales que contienen vidrio bioactivo tras su inmersión en SBF. De acuerdo con Ghneim y sus colaboradores, la formación de una capa apatítica ocurre mediante un proceso gradual de nucleación y crecimiento de depósitos de fosfato de calcio sobre la superficie del material, constituyendo una de las principales evidencias de bioactividad *in vitro* [128].

De manera similar, los cambios morfológicos observados a lo largo de los diferentes tiempos de inmersión sugieren una evolución continua de los depósitos minerales formados sobre la superficie de las membranas. Omidian y colaboradores [129] reportaron que, durante la inmersión de materiales bioactivos en SBF, los depósitos de fosfato de calcio experimentan modificaciones progresivas en su morfología conforme avanza el proceso de mineralización. Dichas variaciones han sido asociadas al crecimiento y reorganización de la capa apatítica, dando lugar a estructuras cada vez más desarrollada y con una mayor cobertura superficial.

Diversos autores han señalado que la capacidad bioactiva del vidrio bioactivo no depende exclusivamente de que las partículas se encuentren completamente expuestas al medio. Elkhouly y Mamdouh [130] observaron la formación de una capa apatítica en andamios electrohilados de PCL-gelatina con vidrio bioactivo tras su inmersión en SBF, demostrando que la presencia de la fase polimérica no impide los procesos de mineralización. De manera similar, Liverani y colaboradores [131] indicaron que las partículas de vidrio bioactivo incorporadas dentro de fibras electrohiladas conservan su capacidad de liberar iones al medio circundante, favoreciendo la nucleación y el crecimiento de depósitos apatíticos. Este comportamiento sugiere que la difusión del fluido a través de la estructura fibrosa permite la interacción entre el SBF y las partículas bioactivas, promoviendo la formación de una capa mineral incluso cuando el vidrio bioactivo no se encuentra completamente expuesto sobre la superficie del material.

Los resultados obtenidos demuestran que las partículas de vidrio bioactivo ancladas a la gelatina mantuvieron su capacidad de inducir la formación de depósitos apatíticos, promoviendo el desarrollo progresivo de una capa mineral sobre la superficie de las membranas durante el periodo de inmersión evaluado.

3.8 Prueba mecánica (T-peeling 90°)

La adhesión del recubrimiento electrohilado de PCL/gelatina-VB depositado sobre sustratos de Ti-6Al-4V fue evaluada mediante un ensayo de peeling a 90° con el propósito de analizar la estabilidad mecánica de la interfaz polímero-metal y la resistencia del sistema al desprendimiento. La Figura 28 muestra la energía adhesiva en función de la distancia de despegue, donde se observó un comportamiento relativamente estable a lo largo del ensayo, acompañado de oscilaciones periódicas de baja amplitud y un incremento pronunciado hacia el final del recorrido.

El perfil de la curva presentó una morfología tipo serrucho (stick-slip behavior), caracterizada por fluctuaciones repetitivas durante el proceso de desprendimiento. Este comportamiento ha sido reportado en ensayos de pelado de recubrimiento poliméricos y membranas fibrosas, particularmente en sistemas electrohilados, donde el desprendimiento del material ocurre de manera progresiva, de forma análoga al mecanismo observado en una cinta adhesiva.

En el presente trabajo, la estabilidad de las oscilaciones observadas a lo largo del ensayo sugiere una distribución relativamente homogénea de la adhesión sobre la superficie del titanio. A partir de tres replicas independientes, se obtuvo una energía adhesiva promedio de 44.52 J/m^2, valor calculado considerando únicamente la región estable del ensayo. El incremento abrupto observado al final de la curva no fue incluido en el promedio, debido a que corresponde al evento de falla final del sistema, donde el recubrimiento alcanzó aproximadamente 5 cm de desprendimiento, seguido de la separación total y fractura de la membrana. De acuerdo con lo descrito por Díaz y sus colaboradores, este tipo de incremento final puede asociarse al máximo esfuerzo requerido para vencer los últimos puntos de anclaje del recubrimiento antes de su separación completa [132].

Durante el ensayo se observa una falla predominante cohesiva, evidenciada por el desgarro parcial de la membrana y la permanencia de residuos fibrosos adheridos sobre la superficie de titanio tras el desprendimiento. Este mecanismo de falla resulta relevante, ya que indica que la resistencia de adhesión entre el recubrimiento y el sustrato fue suficientemente elevada para superar localmente la resistencia

interna de la propia membrana bajo las condiciones del ensayo.

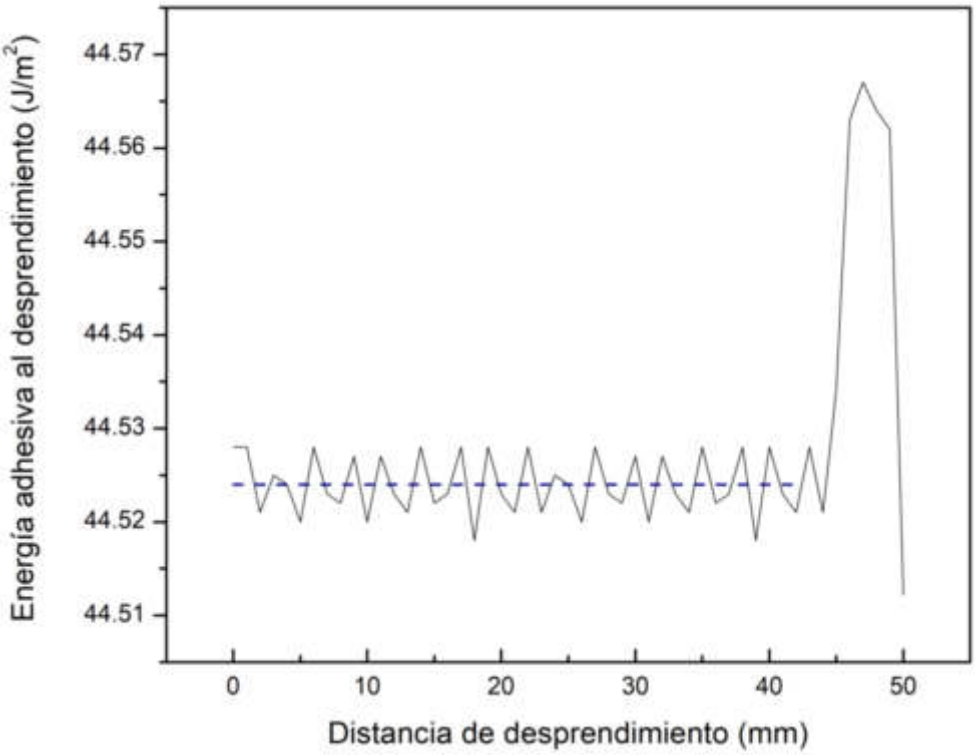


Figura 28. Curva de desplazamiento vs. energía adhesiva obtenida en la prueba de adhesión del recubrimiento de fibras PCL/gelatina-VB sobre la aleación Ti-6Al-4V (promedio de 3 réplicas realizadas)

En este sentido, Díaz y colaboradores [132] reportaron un comportamiento similar en recubrimientos de policaprolactona (PCL) depositados sobre aleaciones titanio modificadas superficialmente, evaluados mediante ensayos de peeling a 90°, donde las oscilaciones observadas durante el despegue fueron asociadas a eventos sucesivos de adhesión y liberación local de tensión en la interfaz. Este patrón puede explicarse mediante ciclos repetitivos, acumulación y relación de esfuerzos, favorecidos por el anclaje parcial del recubrimiento sobre el sustrato metálico.

De acuerdo con lo descrito por Ochoa-Putman y colaboradores [133], los sistemas polímero-metal con adecuada interacción interfacial suelen exhibir fallas cohesivas cuando el anclaje al sustrato es superior a la cohesión interna del material. En este sentido, la permanencia de fibras adheridas sobre el titanio puede interpretarse como un indicio indirecto de una interacción efectiva entre el recubrimiento electrohilado y el sustrato metálico.

Estudios sobre membranas electrohiladas para regeneración tisular, como los

reportados por Owston y colaboradores [134], han señalado que la estabilidad estructural y la capacidad de conservar su integridad durante la manipulación son relevantes para su manejo y permanencia en aplicaciones biomédicas. Asimismo, Bazbouz y colaboradores [135] indicaron que a combinación de gelatina y PCL puede mejorar la cohesión estructural y estabilidad mecánica debido a la interacción entre ambas fases poliméricas.

Los resultados obtenidos sugieren que el recubrimiento PCL/gelatina-VB presentó una adhesión estable sobre titanio, acompañada de un mecanismo de falla cohesiva, lo cual representa una característica favorable para aplicaciones dirigidas a regeneración ósea. En este tipo de sistemas, la permanencia parcial de recubrimiento o de material adherido al sustrato puede contribuir a mantener regiones superficialmente modificadas, favoreciendo la interacción célula-material [125,136].

3.9 Pruebas biológicas *in vitro*

Con el objetivo de analizar la interacción inicial de las células con los recubrimientos desarrollados y evaluar la viabilidad celular, la actividad metabólica y la adhesión de las células sobre su superficie, se realizaron ensayos in vitro. Estos análisis permitieron valorar el potencial de los recubrimientos para aplicaciones en la regeneración de tejido óseo. Para ello, se emplearon células condrocitos, fibroblastos y células MG-63, las cuales fueron cultivadas sobre los recubrimientos fibrosos de PCL/quitosano-VB y PCL/gelatina-VB. Asimismo, se evaluó un recubrimiento blanco constituido únicamente por fibras de PCL/gelatina, con el propósito de determinar el efecto de la incorporación de partículas de vidrio bioactivo sobre la respuesta celular.

La evaluación biológica se llevó a cabo mediante los ensayos de calceína-AM y MTT. El ensayo de calceína-AM permitió visualizar, mediante microscopía de fluorescencia, las células viables adheridas a la superficie de los recubrimientos, mientras que el ensayo MTT se empleó para cuantificar la actividad metabólica celular como un indicador indirecto de la viabilidad y proliferación celular. Estos ensayos permitieron evaluar la viabilidad, la adhesión y la actividad metabólica de las células cultivadas sobre los diferentes recubrimientos, proporcionando

información sobre su citocompatibilidad y su potencial para aplicaciones relacionadas con la regeneración de tejido óseo.

3.9.1 Condrocitos

Los condrocitos muestran una adecuada interacción con todas las superficies evaluadas (Figura 29). En el grupo control se observó una distribución homogénea de células viables, mientras que sobre la aleación de titanio presentaron una morfología extendida, predominantemente fusiforme, y una distribución homogénea, características asociadas con una adecuada adhesión celular.

En el recubrimiento de PCL/gelatina-VB, los condrocitos mostraron una distribución asociada a la arquitectura de las fibras, formando agrupaciones y estructuras alineadas con la red fibrosa. Este comportamiento sugiere una interacción entre las células y la topografía del material, donde la estructura electrohilada puede actuar como guía para su organización. La intensa fluorescencia observada mediante calceína-AM confirma una adecuada supervivencia celular sobre el recubrimiento. Comportamientos similares han sido reportados en fibras electrohiladas, cuya arquitectura puede influir significativamente en la orientación y distribución celular [137,138].

En el ensayo MTT, la aleación de titanio presentó una viabilidad celular de 143.8%, mientras que el recubrimiento de PCL/gelatina-VB alcanzó 99.5%, valor prácticamente equivalente al control. Estos resultados indican que ambas superficies proporcionan un entorno favorable para la actividad metabólica de los condrocitos, sin evidenciar efectos citotóxicos. La respuesta observada en el recubrimiento puede atribuirse a su red fibrosa continua y homogénea, cuya arquitectura favorece el anclaje celular, así como la presencia de gelatina, que incrementa la hidrofilicidad y favorece la interacción célula-material.

Es por ello que, los resultados de calceína-AM y MTT confirman la citocompatibilidad del recubrimiento fibroso de PCL/gelatina-VB y muestran que sus características morfológicas y fisicoquímicas favorecieron la adhesión, la organización y la viabilidad de los condrocitos sobre la superficie.

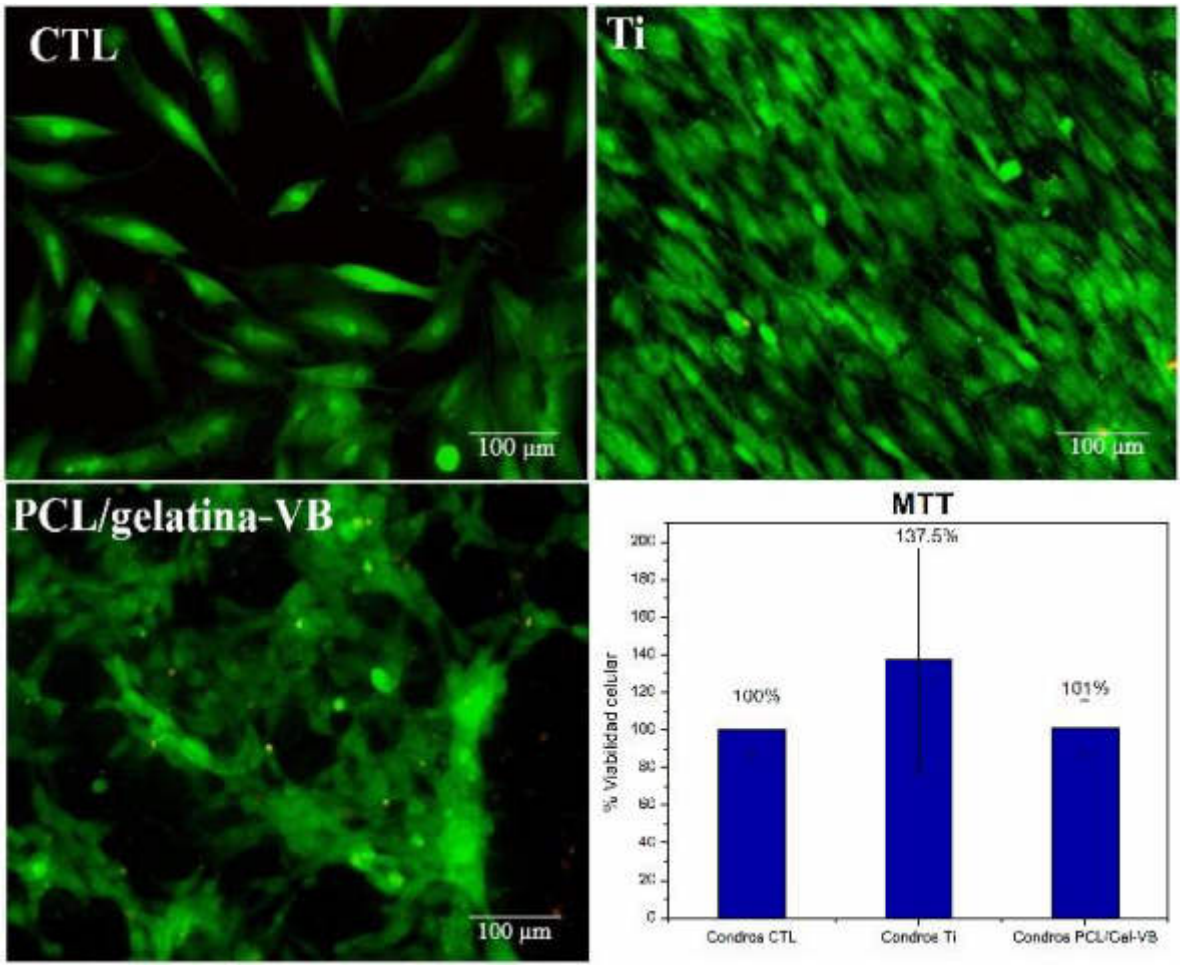


Figura 29. Ensayo de calceína-AM y MTT en células condrocitos cultivados en el control, sobre la aleación Ti-6Al-4V y sobre la aleación recubierta con fibras PCL/gelatina-VB. Las barras de error representan la desviación estándar de cuatro replicas por muestra (n=4).

3.9.2 Fibroblastos

Como se muestra en la Figura 30, se evaluó la respuesta celular sobre la superficie de los diferentes superficies. En el grupo control, los fibroblastos presentaron una distribución homogénea y una morfología característica de células cultivadas en condiciones estándar. Sobre la aleación de titanio se observó una adecuada adhesión celular, evidenciada por la presencia células con morfología fusiforme y distribución uniforme sobre la superficie.

El recubrimiento de PCL/gelatina-VB mostró una mayor cobertura celular, sugiriendo que su arquitectura fibrosa proporciona un microambiente favorable para la interacción célula-material. Las imágenes de calceína-AM evidenciaron una elevada densidad celular y una distribución asociada a la orientación de las fibras,

acompañada de una morfología extendida característica de células adheridas. Este comportamiento coincide con lo reportado para los fibroblastos cultivados sobre la estructura electrohiladas, donde la organización de las fibras puede actuar como estímulo físico e influir en su morfología y comportamiento [107,139].

El ensayo MTT mostró una elevada actividad metabólica en ambas superficies. La aleación de titanio presentó una viabilidad celular de 250%, mientras que el recubrimiento de PCL/gelatina-VB alcanzó 98%, valor comparable al control. Aunque la actividad metabólica fue mayor sobre el titanio, las imágenes de calceína-AM mostraron una interacción más estrecha de los fibroblastos con la arquitectura fibrosa del recubrimiento. Esta respuesta puede relacionarse con la estructura electrohilada, cuya organización y similitud con la matriz extracelular favorecen la adhesión e interacción celular, respaldando su potencial para aplicaciones en ingeniería de tejidos [140].

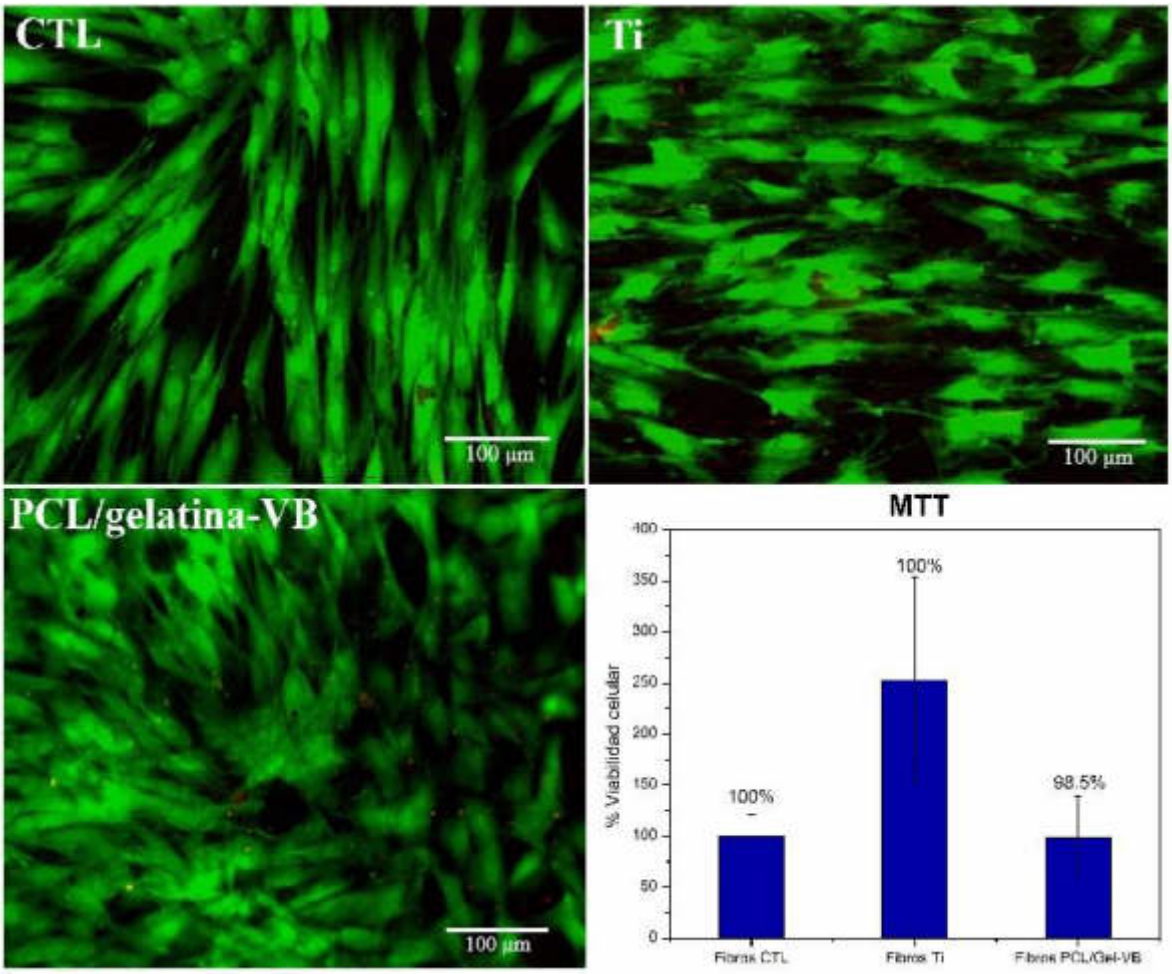


Figura 30. Ensayo de calceína-AM y MTT en células fibroblastos cultivados en el control, sobre la aleación Ti-6Al-4V y sobre la aleación recubierta con fibras PCL/gelatina-VB. Las barras de error representan la desviación estándar de cuatro réplicas por muestra (n=4).

Debido a la respuesta favorable observada en los fibroblastos sobre el recubrimiento de PCL/gelatina-VB, se evaluó adicionalmente un recubrimiento de referencia (blanco) constituido por fibras de PCL/gelatina sin partículas de vidrio bioactivo. Esta comparación permitió determinar la contribución del vidrio bioactivo a la viabilidad y respuesta celular del sistema desarrollado.

Las imágenes obtenidas mediante calceína-AM (Figura 31) mostraron una elevada proporción de células viables sobre el recubrimiento de PCL/gelatina, evidenciada por la predominancia de fluorescencia verde. Los fibroblastos presentaron una morfología alargada y extendida, con orientación parcial siguiendo la disposición de la red fibrosa, lo que indica una interacción favorable con la topografía del material. Este comportamiento coincide con lo reportado para

matrices electrohiladas de composición polimérica similar, cuya la arquitectura favorece la extensión celular y la interacción con el sustrato [140–142].

El ensayo MTT mostró una viabilidad celular de 84.66% para el recubrimiento de PCL/gelatina. Aunque este valor fue inferior al obtenido para la aleación de titanio, se mantuvo dentro de un rango favorable para materiales no citotóxicos [143]. La respuesta observada puede relacionarse con la presencia de gelatina, que aporta sitios bioactivos capaces de favorecer la interacción célula-material y mantener la actividad metabólica de los fibroblastos.

Al comparar estos resultados con los obtenidos para PCL/gelatina-VB, ambos recubrimientos mostraron adecuada adhesión y supervivencia celular; sin embargo, la incorporación de vidrio bioactivo favoreció una distribución más homogénea, mayor densidad celular y una organización más continua sobre la red fibrosa. Esto sugiere que, aunque PCL/gelatina presenta citocompatibilidad intrínseca, la incorporación de vidrio bioactivo contribuye a mejorar la interacción de los fibroblastos con la superficie del recubrimiento.

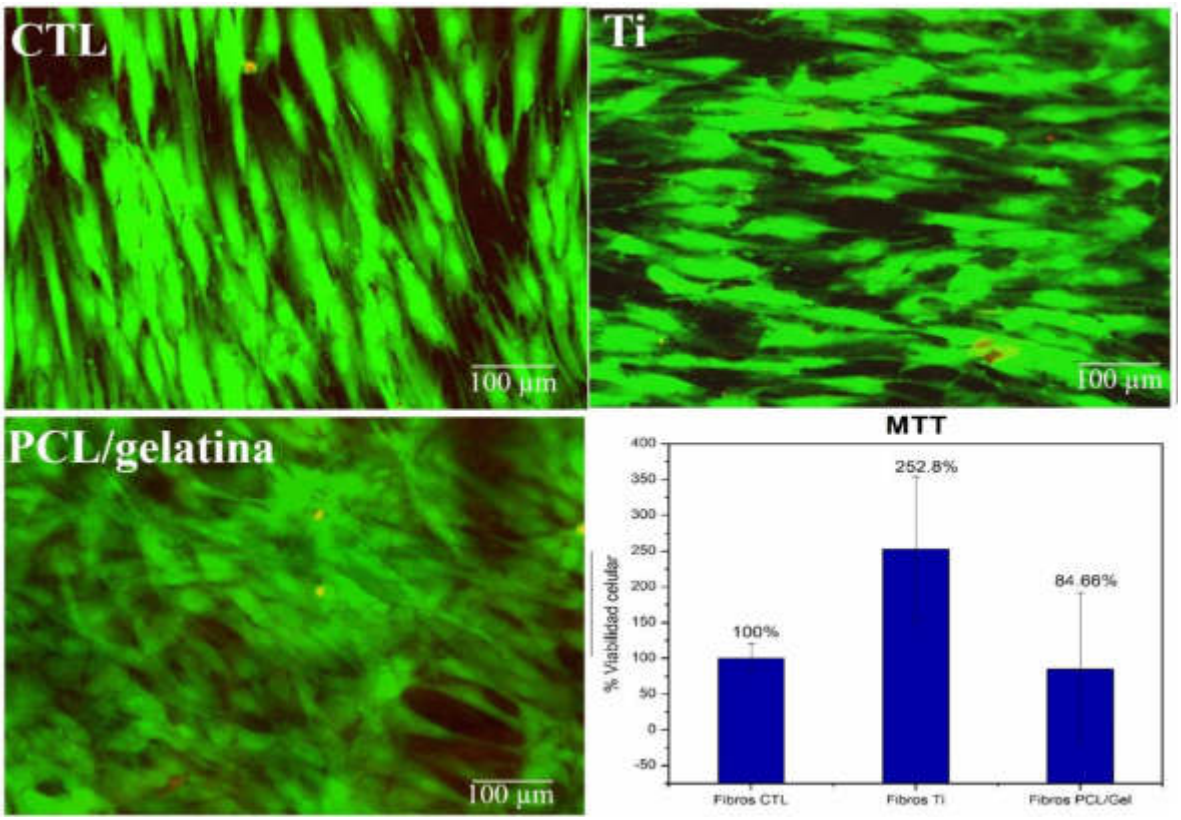


Figura 31. Ensayo de calceína-AM y MTT en células fibroblastos cultivados en el control, sobre la aleación Ti-

6Al-4V y sobre la aleación recubierta con fibras PCL/gelatina. Las barras de error representan la desviación estándar de cuatro réplicas por muestra (n=4).

3.9.3 Células de fenotipo osteoblástico MG-63

La citocompatibilidad del recubrimiento fibroso PCL/gelatina-VB se evaluó utilizando células MG-63 como modelo osteoblástico, con el propósito de analizar su viabilidad y actividad metabólica en un contexto relacionado con la regeneración ósea. Las imágenes obtenidas mediante calceína-AM (Figura 32) mostraron una elevada proporción de células viables en el grupo control y sobre la aleación de titanio, donde presentaron una morfología predominantemente alargada y extendida, característica de células adheridas a la superficie.

Por su parte, el recubrimiento PCL/gelatina-VB presentó una abundante población celular, evidenciada por la intensa fluorescencia verde. A diferencia del titanio, donde las células se observaron principalmente individualizadas, sobre el recubrimiento se identificó una tendencia a formar agrupaciones o micro-colonias. Este patrón puede relacionarse con la arquitectura tridimensional de las fibras electrohiladas y la presencia de partículas de vidrio bioactivo, que modifican las propiedades superficiales y pueden favorecen las interacciones célula-material y célula-célula. Se ha reportado que la composición y morfología de estructuras electrohiladas influyen en la adhesión y organización de células osteoblásticas [137].

El ensayo MTT mostró una viabilidad cercana al 100% para el grupo control, mientras que la aleación de titanio presentó un valor de 66.29% [143]. En contraste, el recubrimiento PCL/gelatina-VB alcanzó 82.52%, superando el valor obtenido para la aleación sin recubrimiento y manteniéndose dentro del intervalo considerado no citotóxico. Esta respuesta sugiere que las características estructurales y fisicoquímicas del recubrimiento condiciones más favorables para mantener la actividad metabólica de las células MG-63. La respuesta observada concuerda con lo encontrado previamente en condrocitos y fibroblastos, en los que el recubrimiento mostró una adecuada citocompatibilidad. Además se ha señalado que las células MG-63 son sensibles a propiedades superficiales como la composición química, rugosidad y topografía, las cuales pueden modular su adhesión y comportamiento celular [144].

El recubrimiento de PCL/gelatina-VB mostró, por tanto, una respuesta favorable frente a células tipo osteoblástico, manteniendo su viabilidad y favoreciendo su interacción con la superficie, lo que respalda su potencial para aplicaciones en regeneración de tejido óseo.

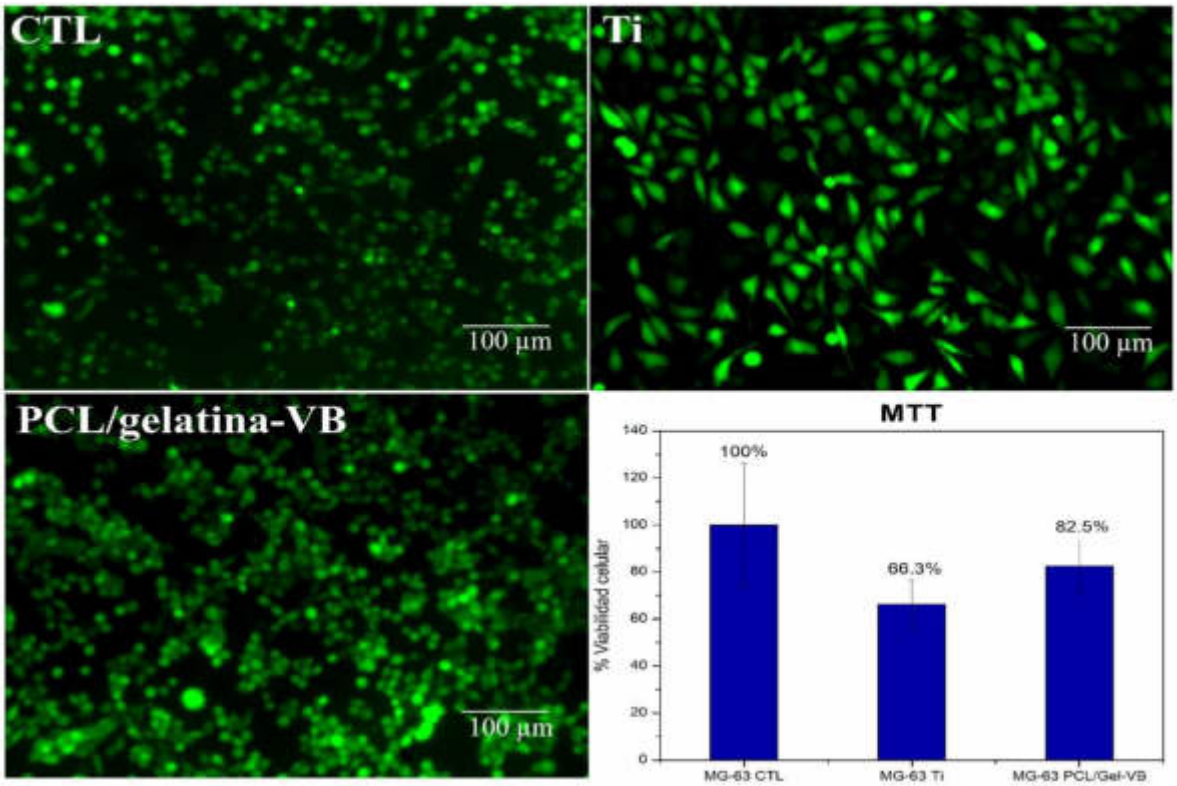


Figura 32. Ensayo de calceína-AM y MTT en células MG-63 cultivados en el control, sobre la aleación Ti-6Al-4V y sobre la aleación recubierta con fibras PCL/gelatina-VB. Las barras de error representan la desviación estándar de cuatro replicas por muestra (n=4).

Siguiendo la estrategia empleada para los fibroblastos, se evaluó un recubrimiento de referencia (blanco) constituido por fibras de PCL/gelatina sin partículas de vidrio bioactivo, con el propósito de comparar la respuesta de las células MG-63 con la obtenida para el sistema PCL/gelatina-VB y determinar la contribución de la fase bioactiva.

Las imágenes de calceína-AM (Figura 33) evidenciaron una adecuada viabilidad de las células MG-63 sobre el recubrimiento de PCL/gelatina, con predominancia de fluorescencia verde y una distribución relativamente homogénea. Las células mostraron además una tendencia a formar agrupaciones asociadas a la estructura

fibrosa. Este patrón difiere de la morfología predominantemente alargada observada sobre la aleación de titanio y puede relacionarse con la arquitectura tridimensional del recubrimiento electrohilado, que favorece distintos patrones de organización celular sin comprometer la interacción célula-material. Se ha reportado que este tipo de estructuras puede modular la adhesión y organización de células osteoblásticas debido a su similitud con la matriz extracelular [137,145,146].

El ensayo MTT mostró una viabilidad de 77.52% para el recubrimiento de PCL/gelatina, superior a la obtenida para la aleación de titanio sin recubrimiento (66.29%) y dentro del rango considerado favorable para materiales no citotóxicos [143]. Aunque este valor fue ligeramente inferior al obtenido para PCL/gelatina-VB (82.52%), ambos recubrimientos proporcionaron condiciones adecuadas para mantener la actividad metabólica de las células MG-63.

La incorporación de partículas de vidrio bioactivo incrementó la viabilidad celular de 77.52% a 82.52%, lo que sugiere un efecto favorable sobre la actividad metabólica de las células de fenotipo osteoblástico. Este comportamiento puede atribuirse a las propiedades bioactivas de las partículas, que complementan las características de la matriz PCL/gelatina y favorecen la interacción celular con el recubrimiento.

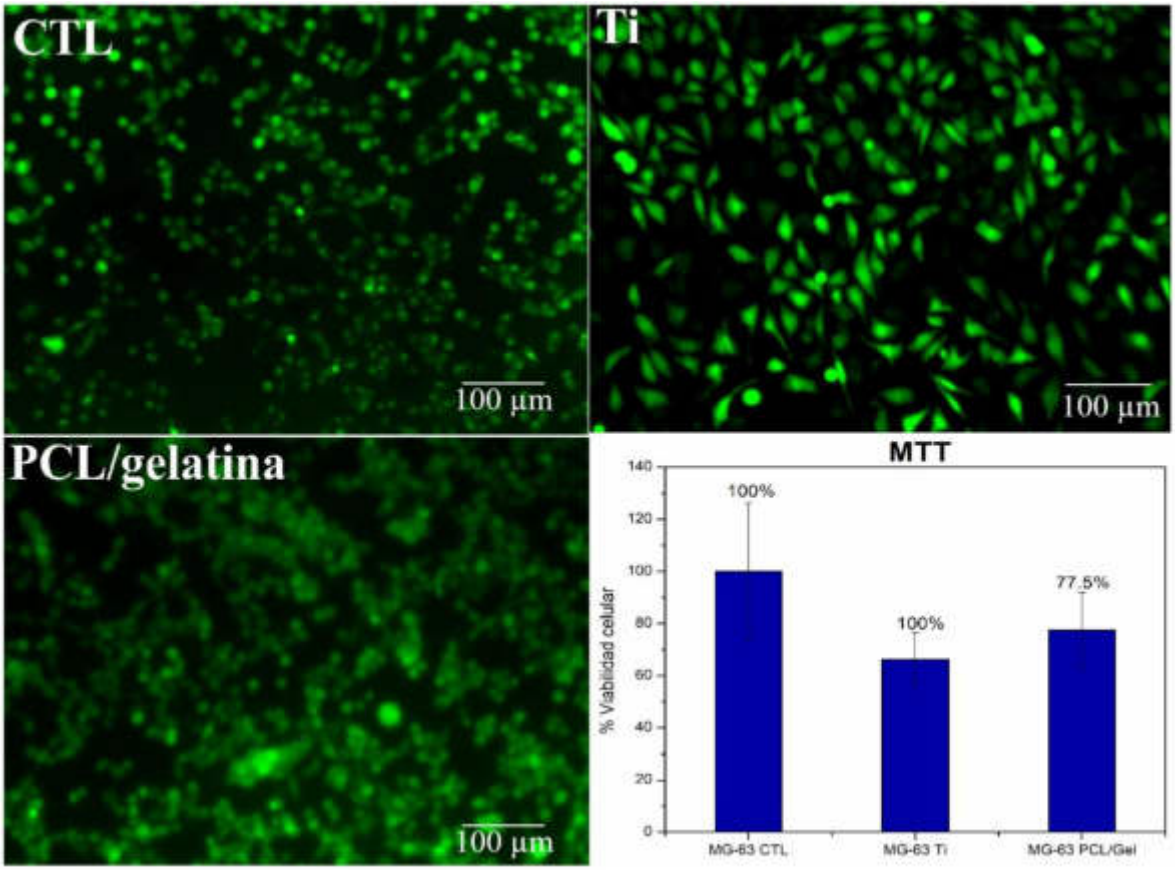


Figura 33. Ensayo de calceína-AM y MTT en células MG-63 cultivados en el control, sobre la aleación Ti-6Al-4V y sobre la aleación recubierta con fibras PCL/gelatina-VB. Las barras de error representan la desviación estándar de cuatro réplicas por muestra (n=4).

La Figura 34 presenta la comparación de los resultados del ensayo MTT para las tres líneas celulares evaluadas y los diferentes materiales analizados. La respuesta metabólica varió de acuerdo con la composición del recubrimiento y el tipo celular, permitiendo identificar diferencias entre las distintas superficies.

De manera general, la respuesta celular estuvo influenciada tanto por la composición del biomaterial como por el tipo de línea celular empleada. El sustrato de Ti-6Al-4V promovió los mayores porcentajes de viabilidad en los fibroblastos, confirmando su reconocida biocompatibilidad y su capacidad para favorecer la adhesión y el mantenimiento de la actividad metabólica celular. En este contexto, el recubrimiento de PCL/quitosano-VB presentó los menores porcentajes de viabilidad celular en la línea MSCs, situándose por debajo del umbral establecido para materiales citocompatibles (Anexo A3). En contraste, el recubrimiento de

PCL/gelatina conservó porcentajes de viabilidad superiores al 70% en todas las líneas celulares, evidenciando una adecuada citocompatibilidad y confirmando el potencial del sistema como soporte para aplicaciones biomédicas. Finalmente, la presencia de las partículas de vidrio bioactivo al recubrimiento de PCL/gelatina permitió incrementar la viabilidad celular con respecto al sistema sin partículas, lo que sugiere un efecto favorable de la fase bioactiva sobre el comportamiento celular. Aunque los valores de viabilidad obtenidos no superaron a los registrados para el titanio sin recubrimiento, el sistema PCL/gelatina-VB incorpora un componente bioactivo que aporta funcionalidades adicionales a la superficie del implante. En consecuencia, además de mantener una adecuada citocompatibilidad, este recubrimiento posee el potencial de establecer una interacción biológica más activa con el tejido circundante, aspecto que resulta especialmente relevante para aplicaciones de regeneración ósea.

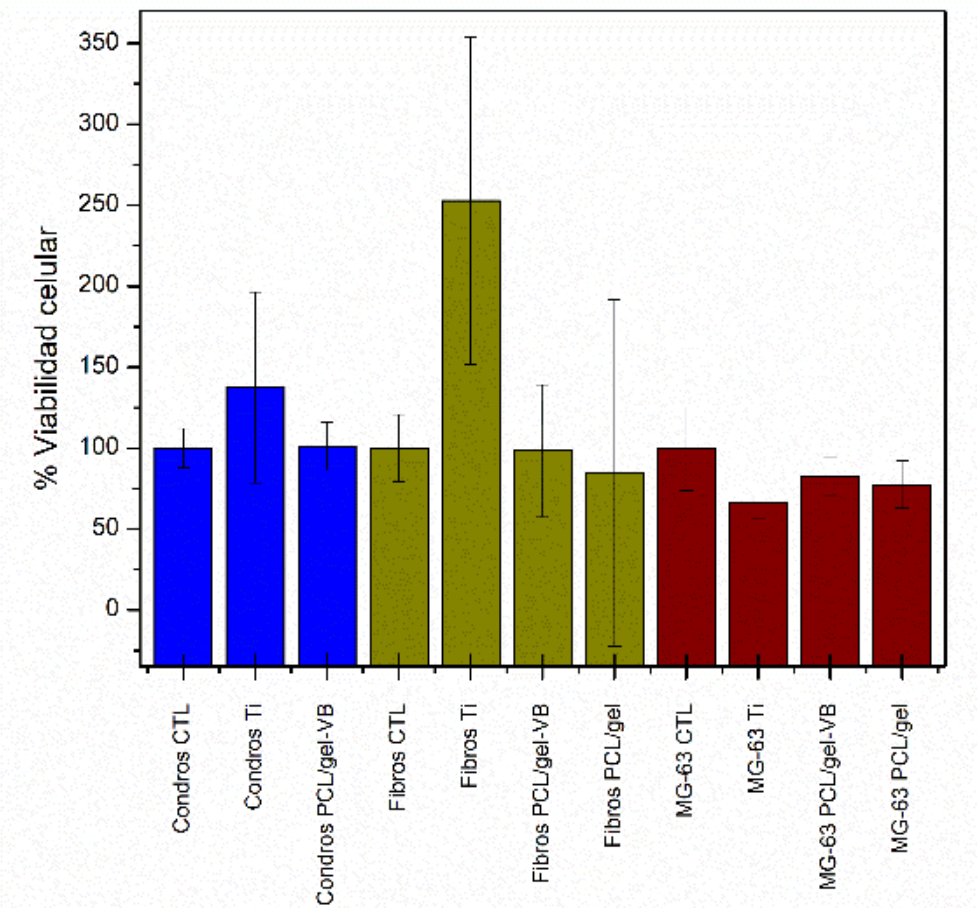


Figura 34. Porcentaje de viabilidad celular mediante el ensayo MTT de condrocitos, fibroblastos y células MG-63 cultivadas sobre los diferentes materiales. Los datos representan la media normalizada respecto al control (100%) ± la desviación estándar (n=8).

El análisis integral de los resultados obtenidos para el recubrimiento de PCL/gelatina-VB mostró que las tres líneas celulares evaluadas presentaron diferencias morfológicas acordes con sus características biológicas; no obstante, en todos los casos se mantuvo una adecuada viabilidad celular, evidenciando la compatibilidad del recubrimiento con poblaciones celulares de distinto origen. Los condrocitos mostraron una distribución homogénea y una mayor extensión sobre la red fibrosa, con morfología ovalada ligeramente poligonal; los fibroblastos conservaron su morfología fusiforme y se extendieron ampliamente, formando una red celular uniforme; mientras que las células MG-63 presentaron una morfología inicialmente redondeada, con tendencia a formar agrupaciones y colonias, además

de células parcialmente extendidas asociadas con su adecuada adhesión al material.

Estas diferencias morfológicas concuerdan con lo reportado en la literatura, donde la interacción célula-material favorece la reorganización del citoesqueleto y cambios en la extensión celular, procesos relacionados con la adhesión, proliferación y actividad metabólica [147]. Por lo tanto, la morfología celular observada refleja tanto las características propias de cada línea celular como su capacidad de adaptación a la superficie del recubrimiento, sin evidenciar alteraciones morfológicas asociadas con un efecto adverso del material.

En términos comparativos, aunque la aleación de Ti-6Al-4V sin recubrimiento presento los mayores porcentajes de viabilidad en los fibroblastos, el recubrimiento de PCL/gelatina-VB mostro un mejor desempeño frente a las células MG-63. Este resultado adquiere especial relevancia debido a que esta línea celular constituye un modelo ampliamente utilizado para la evaluación de materiales destinados a la regeneración ósea. La mayor viabilidad observada con PCL/gelatina-VB sugiere que la incorporación de vidrio bioactivo, en combinación con la arquitectura fibrosa del recubrimiento, genera una superficie favorable para la interacción con células de fenotipo osteoblástico. Mientras que la red de PCL/gelatina proporciona una estructura semejante a la matriz extracelular que favorece la adhesión y distribución celular, el vidrio bioactivo puede aportar iones capaces de estimular procesos asociados con la actividad osteoblástica.

De esta manera, la principal aportación del recubrimiento PCL/gelatina-VB no se limita a mantener la viabilidad celular, sino que consiste en proporcionar una superficie bioactiva con potencial para favorecer la interacción de implante con el tejido óseo. Si bien el Ti-6Al-4V presento un mejor desempeño en algunas de las líneas evaluadas, la respuesta superior del recubrimiento frente a las células MG-63, consideradas de particular interés para la aplicación propuesta, respalda su potencial como estrategia para mejorar la osteointegración y contribuir a los procesos de regeneración ósea.

Capítulo 4.
Conclusiones

Los resultados obtenidos permiten confirmar parcialmente la hipótesis de investigación, al demostrar que la aplicación de un recubrimiento compuesto de PCL/gelatina incorporado con partículas de vidrio bioactivo sobre la aleación Ti-6Al-4V incrementó la bioactividad superficial y favoreció la interacción célula-material. La formación de apatita durante la inmersión en fluido fisiológico simulado y la respuesta celular favorable observada en los ensayos realizados respaldan el potencial del recubrimiento para favorecer procesos asociados a la osteointegración. No obstante, la osteointegración no fue evaluada directamente en el presente estudio.

La síntesis y molienda de las partículas de vidrio bioactivo permitieron obtener un material con capacidad bioactiva, evidenciada mediante la formación de apatita tras su inmersión en fluido fisiológico simulado. Estos resultados confirman la bioactividad del vidrio obtenido y su capacidad para general superficies favorables para la interacción con tejido óseo.

La funcionalización de la gelatina y quitosano proporcionó grupos reactivos que favorecen el anclaje de las partículas de vidrio bioactivo, promoviendo una unión estable entre los componentes orgánicos e inorgánicos. Esta estrategia permitió incorporar exitosamente el material bioactivo y conservas sus propiedades funcionales dentro de los sistemas desarrollados.

La incorporación de policaprolactona y la aplicación de la técnica de electrohilado permitieron obtener membranas con morfología homogénea y características estructurales adecuadas para su utilización como recubrimientos biomédicos.

El ensayo mecánico demostró una adecuada adhesión entre los recubrimientos desarrollados y la aleación de titanio, evidenciado la estabilidad de la interfaz recubrimiento-sustrato. Este comportamiento respalda la capacidad de los sistemas obtenidos para permanecer adheridos a la superficie metálica y respalda su potencial aplicación como recubrimientos para implantes biomédicos.

Los ensayos de viabilidad celular y actividad metabólica demostraron que el material desarrollado presentó un comportamiento citocompatible bajo las

condiciones evaluadas. La respuesta favorable observada en fibroblastos, condrocitos y células MG-63 confirmó la ausencia de efectos citotóxicos y evidencio una interacción favorable entre las células y el recubrimiento.

Particularmente, la interacción favorable observada con las células MG-63 sugiere que el recubrimiento desarrollado presenta características de interés para aplicaciones orientadas a la regeneración ósea. Los resultados obtenidos demuestran que el recubrimiento fibroso bioactivo de PCL/gelatina-VB combina bioactividad, estabilidad mecánica e interacción celular favorable, constituyendo una alternativa con potencial para su aplicación como recubrimiento de implantes orientados a la reparación y regeneración de tejido óseo.

Perspectivas futuras

Los resultados obtenidos en este trabajo demostraron que el recubrimiento de PCL/gelatina-VB presenta características de bioactividad, adecuada adhesión al sustrato metálico y respuesta celular favorable, lo que establece una base para continuar con investigaciones orientadas a validar su desempeño como recubrimiento bioactivo para implantes metálicos. En este sentido, una de las principales perspectivas futuras consiste en ampliar la evaluación biológica mediante estudios que permitan determinar su capacidad para favorecer procesos relacionados con la formación de tejido óseo. Para ello, será necesario analizar la expresión de marcadores osteogénicos específicos y proteínas relacionadas con la diferenciación osteoblástica, así como realizar ensayos de mineralización de la matriz extracelular, con el propósito de evaluar la capacidad del recubrimiento para inducir la formación de tejido mineralizado.

Asimismo, será fundamental llevar a cabo estudios preclínicos en modelos animales para evaluar el desempeño del recubrimiento en un entorno biológico más complejo. Estas evaluaciones permitirán analizar la formación de nuevo tejido óseo, la calidad de la integración entre el implante y el tejido circundante, la respuesta de los tejidos y el comportamiento del recubrimiento durante el proceso de regeneración.

Finalmente, la validación de estas etapas permitirá orientar futuros estudios de escalamiento y evaluación preclínica, necesarios para determinar la factibilidad de una eventual aplicación del recubrimiento como estrategia para favorecer la integración implante-hueso y contribuir al desarrollo de recubrimientos bioactivos para implantes metálicos.

Bibliografía

(1) Vishwakarma, V.; Kaliaraj, G. S.; Kirubaharan, K.; Mosas, A. Multifunctional Coatings on Implant Materials — A Systematic. *Coatings* 2023. https://doi.org/https://doi.org/10.3390/ coatings13010069.

(2) Akshaya, S.; Rowlo, P. K.; Dukle, A.; Nathanael, A. J. Antibacterial Coatings for Titanium Implants : Recent Trends and Future Perspectives. *Antibiotics* 2022. https://doi.org/https://doi.org/10.3390/ antibiotics11121719.

(3) Safavi, S.; Yu, Y.; Robinson, D. L.; Gray, H. A.; Ackland, D. C.; Lee, P. V. S. Additively Manufactured Controlled Porous Orthopedic Joint Replacement Designs to Reduce Bone Stress Shielding : A Systematic Review. *J. Orthop. Surg. Res.* 2023, *9*, 1–23. https://doi.org/10.1186/s13018-022-03492-9.

(4) Liang, J.; Lu, X.; Zheng, X.; Li, Y. R.; Geng, X. Modification of Titanium Orthopedic Implants with Bioactive Glass: A Systematic Review of in Vivo and in Vitro Studies. 2023, No. November. https://doi.org/10.3389/fbioe.2023.1269223.

(5) Hammami, I.; Gavinho, R.; Sofia, A.; Isabel, S.; Silva, J. C.; Valente, M. A.; Pedro, M.; Graça, F. Bioactive Glass Modified with Zirconium Incorporation for Dental Implant Applications : Fabrication , Structural , Electrical , and Biological Analysis. *Int. J. Mol. Sci.* 2023. https://doi.org/https://doi.org/10.3390/ijms241310571.

(6) Stoilov, M.; Stoilov, L.; Enkling, N.; Stark, H.; Winter, J.; Marder, M.; Kraus, D. Effects of Different Titanium Surface Treatments on Adhesion , Proliferation and Differentiation of Bone Cells : An In Vitro Study. *J. Funct. Biomater.* 2022. https://doi.org/https://doi.org/10.3390/jfb13030143.

(7) Shoushtari, M. S.; Hoey, D.; Biak, D. R. A.; Abdullah, N.; Kamarudin, S.; Zainuddin, H. S. Sol–Gel-templated Bioactive Glass Scaffold: A Review. *Res. Biomed. Eng.* 2024, *40* (1), 281–296. https://doi.org/10.1007/s42600-024-00342-x.

(8) Song, X. Sol–Gel Technologies to Obtain Advanced Bioceramics for Dental Therapeutics. *Molecules* 2023. https://doi.org/https://doi.org/10.3390/molecules28196967.

(9) Dudek, A. Bioactive Coatings and the Safety of Using Metal Implants. *Sciendo* 2024, *6* (1), 227–238. https://doi.org/10.2478/czoto-2024-0025.

(10) He, L.; Yin, J. Additive Manufacturing of Bioactive Glass and Its Polymer Composites as Bone Tissue Engineering Scaffolds : A Review. *Bioengineering* 2023, 1–39. https://doi.org/https://doi.org/10.3390/bioengineering10060672.

(11) Baino, F. Bioactive Glasses : Where Are We and Where Are We Going ? *J. Funct. Biomater.* 2018. https://doi.org/10.3390/jfb9010025.

(12) Swalsky, A.; Noumbissi, S. S.; Wiedemann, T. G. The Systemic and Local Interactions Related to Titanium Implant Corrosion and Hypersensitivity Reactions : A Narrative Review of the Literature. *Int. J. Implant Dent.* 2024. https://doi.org/10.1186/s40729-024-00578-3.

(13) Zhang, H.; Wu, Z.; Wang, Z.; Yan, X.; Duan, X.; Sun, H. Advanced Surface Modification Techniques for Titanium Implants : A Review of Osteogenic and Antibacterial Strategies. *Front. Bioeng. Biotechnol.* 2025, No. March, 1–16. https://doi.org/10.3389/fbioe.2025.1549439.

(14) Mesa-restrepo, A.; Byers, E.; Brown, J. L.; Ramirez, J.; Allain, J. P.; Posada, V. M. Osteointegration of Ti Bone Implants : A Study on How Surface Parameters Control the Foreign Body Response. *ACS Biomater. Sci. Eng.* 2024. https://doi.org/10.1021/acsbiomaterials.4c00114.

(15) García, C.; Ceré, S.; Durán, A. Recubrimientos Bioactivos Sobre Aleaciones de Titanio Depositados Por La Técnica Sol-Gel. *Rev. Fac. Ing. Univ. Antioquia* 2006.

(16) Figueroa-lopez, K. J.; Castro-mayorga, J. L.; Mar, M.; Id, L. C.; Lagaron, J. M. Antibacterial and Barrier Properties of Gelatin Coated by Electrospun Polycaprolactone Ultrathin Fibers Containing Black Pepper Oleoresin of Interest in Active Food Biopackaging Applications. *Nanomaterials* 2018. https://doi.org/10.3390/nano8040199.

(17) Djoši, M. Electrophoretic Deposition of Biocompatible and Bioactive Hydroxyapatite-Based Coatings on Titanium. 2021.

(18) Orekhov, E. V; Arbenin, A. Y.; Zemtsova, E. G.; Sokolova, D. N.; Ponomareva, A. N.; Shevtsov, M. A.; Yudintceva, N. M.; Smirnov, V. M. Template

Electrochemical Synthesis of Hydroxyapatite on a Titania – Silver Composite Surface for Potential Use in Implantology. 2022.

(19) Doymus, B.; Kerem, G.; Karatas, A. Y. A Functional Coating to Enhance Antibacterial and Bioactivity Properties of Titanium Implants and Its Performance in Vitro. 2020. https://doi.org/10.1177/0885328220977765.

(20) Ciarleglio, G.; Toto, E.; Engineering, C.; Environment, M.; Castro, V. Biocompatible PLA / NHAp Coatings for Titanium Implants Fabricated by Green Electrospinning. *MRS Commun.* 2025, *XX* (xx), 1–7. https://doi.org/10.1557/s43579-025-00891-x.

(21) Al-khateeb, A.; Al-hassani, E. S.; Jabur, A. R. Metallic Implant Surface Activation through Electrospinning Coating of Nanocomposite Fiber for Bone Regeneration. *Int. J. Biomater.* 2023, *2023*. https://doi.org/https://doi.org/10.1155/2023/1332814.

(22) Panggabean, J. A.; Adiguna, S. P.; Hardhiyuna, M.; Rahmawati, S. I.; Sadi, N. H.; Yoga, G. P.; Nafisyah, E.; Bayu, A.; Putra, M. Y. Cutting Edge Aquatic-Based Collagens in Tissue Engineering. *Mar. Drugs* 2023, *21* (2), 1–32. https://doi.org/10.3390/md21020087.

(23) Li, Y.; Zhu, J.; Cheng, H.; Li, G.; Cho, H.; Jiang, M.; Gao, Q.; Zhang, X. Developments of Advanced Electrospinning Techniques: A Critical Review. *Adv. Mater. Technol.* 2021, *6* (11), 1–29. https://doi.org/10.1002/admt.202100410.

(24) Polo-Corrales, L.; Latorre-Esteves, M.; Ramirez-Vick, J. E. Scaffold Design for Bone Regeneration. *J. Nanosci. Nanotechnol.* 2014, *14* (1), 15–56. https://doi.org/10.1166/jnn.2014.9127.

(25) Baino, F.; Verne, E. Glass-Based Coatings on Biomedical Implants: A State-of-the-Art Review. *Biomed. Glas.* 2017, *3* (1), 1–17. https://doi.org/10.1515/bglass-2017-0001.

(26) Velasco Peña, M. A.; Toro Toro, L. F.; Garzón-Alvarado, D. A. Andamios Porosos Para Ingeniería de Tejidos Óseos: Características Geométricas, Requerimientos de Uso, y Materiales y Métodos de Manufactura Aditiva. *Ing. y Compet.* 2023, *25* (3). https://doi.org/10.25100/iyc.v25i3.12572.

(27) Shearer, A.; Montazerian, M.; Mauro, J. C. Modern Definition of Bioactive Glasses and Glass-Ceramics. *J. Non. Cryst. Solids* 2023, *608* (December 2022), 122228. https://doi.org/10.1016/j.jnoncrysol.2023.122228.

(28) Zhao, F.; Yang, Z.; Xiong, H.; Yan, Y.; Chen, X.; Shao, L. Bioactive Materials A Bioactive Glass Functional Hydrogel Enhances Bone Augmentation via Synergistic Angiogenesis , Self-Swelling and Osteogenesis. *Bioact. Mater.* 2023, *22* (June 2022), 201–210. https://doi.org/10.1016/j.bioactmat.2022.09.007.

(29) Negut, I.; Ristoscu, C. Bioactive Glasses for Soft and Hard Tissue Healing Applications — A Short Review. *Sciences (New. York).* 2023. https://doi.org/https://doi.org/10.3390/app13106151.

(30) Henao, J.; Salazar-Martinez, J. D. SrO-Containing Bioactive Glasses in the SiO 2 − CaO − P 2 O 5 System : A Comprehensive Review. *ACS Biomater. Sci. Eng.* 2025, *11*, 6997–7030. https://doi.org/10.1021/acsbiomaterials.5c01097.

(31) Wang, X.; Guo, Q.; He, Y.; Geng, X.; Wang, C.; Li, Y.; Wang, C.; Dong, Q.; Tian, H. A PH-Neutral Bioactive Glass Coated 3D-Printed Porous Ti6Al4V Scaffold with Enhanced Osseointegration. *J. Mater. Chem. B* 2022. https://doi.org/10.1039/D2TB02129C.

(32) Drevet, R.; Fauré, J.; Benhayoune, H. Calcium Phosphates and Bioactive Glasses for Bone Implant Applications. *Coatings* 2023, 23–25. https://doi.org/https://doi.org/10.3390/ coatings13071217.

(33) Lee, C. Y. In Vivo Study of Bone Growth Around Additively Manufactured Implants With Ti - 6Al - 4V and Bioactive Glass Powder Composites. *J. Orthop. Res.* 2025, 1796–1804. https://doi.org/10.1002/jor.70037.

(34) Farag, M. M. Recent Trends on Biomaterials for Tissue Regeneration Applications : Review. *J. Mater. Sci.* 2023, *58* (2), 527–558. https://doi.org/10.1007/s10853-022-08102-x.

(35) Dvorakova, J.; Wiesnerova, L.; Chocholata, P.; Kulda, V.; Landsmann, L.; Cedikova, M.; Kripnerova, M.; Eberlova, L.; Babuska, V. Human Cells with Osteogenic Potential in Bone Tissue Research. *Biomed. Eng. Online* 2023, 1–

28. https://doi.org/10.1186/s12938-023-01096-w.

(36) Fox, A. J. S. The Basic Science of Articular Cartilage : *Orthopaedics* 2014, *1* (6), 461–468. https://doi.org/10.1177/1941738109350438.

(37) Zhang, T.; Wang, J.; Jia, S.; Ding, K.; Du, X.; Lyu, H.; Hou, Z.; Chai, R.; Chen, W. Chondrocytes in Fracture Healing : A Review of Chondrocyte Journey. *Chin. Med. J. (Engl).* 2026, *139* (12), 6–9. https://doi.org/10.1097/CM9.0000000000004089.

(38) Wang, L.; Jie, Q.; Yang, L. Chondrocytes-Osteoblast Transition in Endochondral Ossification. *Ann. Jt.* 2017, 1–9. https://doi.org/10.21037/aoj.2017.01.06.

(39) Yang, L.; Yeung, K.; Ching, H.; Chan, D.; Cheah, K. S. E. Hypertrophic Chondrocytes Can Become Osteoblasts and Osteocytes in Endochondral Bone Formation. *Proc Natl Acad Sci USA* 2014, *111* (33). https://doi.org/10.1073/pnas.1302703111.

(40) Hallett, S. A.; Ono, W.; Ono, N. Growth Plate Chondrocytes : Skeletal Development , Growth and Beyond. *Int. J. Mol. Sci.* 2019, 1–17. https://doi.org/10.3390/ijms20236009.

(41) Giovannone, D.; Paul, S.; Schindler, S.; Arata, C.; Farmer, D. J. T.; Patel, P.; Smeeton, J.; Crump, J. G. Programmed Conversion of Hypertrophic Chondrocytes into Osteoblasts and Marrow Adipocytes within Zebrafish Bones. *Elifesciences* 2019, 1–22. https://doi.org/https://doi.org/10.7554/eLife.42736.

(42) Wang, H.; Qi, L.; Shema, C.; Jiang, K.; Ren, P.; Wang, H.; Wang, L. Advances in the Role and Mechanism of Fi Broblasts in Fracture Healing. 2024, *2019* (February), 1–10. https://doi.org/10.3389/fendo.2024.1350958.

(43) Zupan, J. Mesenchymal Stem/Stromal Cells and Fibroblasts: Their Roles in Tissue Injury and Regeneration, and Age-Related Degeneration. *Fibroblast-Advances Cancer, Autoimmun. Inflamm.* 2021. https://doi.org/http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.100556.

(44) Hannan, R. T.; Peirce, S. M.; Barker, T. H. Fibroblasts : Diverse Cells Critical to Biomaterials Integration. *ACS Biomater. Sci. Eng.* 2018.

https://doi.org/10.1021/acsbiomaterials.7b00244.

(45) Arnke, K.; Pape, H.; Cinelli, P. Fibroblast-Derived ECM as a Donor-Specific Pro-Osteogenic Coating Surpassing ASC- and Osteoblast-Derived ECM. *J. Funct. Biomater.* 2026, 1–13. https://doi.org/https://doi.org/10.3390/jfb17020097.

(46) Vu, N.; Linh, V.; The, N.; Thi, N.; My, N.; Ngoc, N.; Dai, H. Electrospun Polycaprolactone / Hydroxyapatite (PCL / HAp) Microfibers as Potential Biomaterials for Tissue Engineering. *Mater. Today Proc.* 2022, No. xxxx, 10–14. https://doi.org/10.1016/j.matpr.2022.06.553.

(47) Xiang, Z.; Guan, X.; Ma, Z.; Shi, Q.; Panteleev, M.; Ataullakhanov, F. I. Bioactive Fibrous Scaffolds with Programmable Release of Polypeptides Regulate Inflammation and Extracellular Matrix Remodeling. *Regen. Biomater.* 2023, No. February. https://doi.org/https://doi.org/10.1093/rb/rbad010.

(48) Chatree, K.; Sriboonaied, P.; Phetkong, C. Heliyon Distinctions in Bone Matrix Nanostructure , Composition , and Formation between Osteoblast-like Cells , MG-63 , and Human Mesenchymal Stem Cells , UE7T-13. *Heliyon* 2023, *9* (5), e15556. https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2023.e15556.

(49) Mao, L.; Wang, L.; Xu, J. The Role of Integrin Family in Bone Metabolism and Tumor Bone Metastasis. *Off. J. CDDpress* 2023, No. March, 1–12. https://doi.org/10.1038/s41420-023-01417-x.

(50) Fopase, R. R.; Mohan, L.; Seal, P.; Prasad, J. Assessment of Sol-Gel Derived Iron Oxide Substituted 45S5 Bioglass- Ceramics for Biomedical Applications . *J. Mater. Chem. B* 2023. https://doi.org/https://doi.org/10.1039/d3tb00287j.

(51) Sofia, A.; Lígia, P.; Jorge, F.; Silva, C.; Paulo, J. Chitosan Scaffolds with Mesoporous Hydroxyapatite and Mesoporous Bioactive Glass. *Prog. Biomater.* 2023, *12* (2), 137–153. https://doi.org/10.1007/s40204-023-00217-x.

(52) Fazeli, N.; Arefian, E.; Irani, S.; Ardeshirylajimi, A.; Seyedjafari, E. Accelerated Reconstruction of Rat Calvaria Bone Defect Using 3D - Printed Scaffolds Coated with Hydroxyapatite / Bioglass. *Sci. Rep.* 2023, 1–15.

https://doi.org/10.1038/s41598-023-38146-1.

(53) Kokubo, T.; Takadama, H. How Useful Is SBF in Predicting in Vivo Bone Bioactivity? *Biomaterials* 2006, *27* (15), 2907–2915. https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2006.01.017.

(54) Chen, M.; Wang, Y.; Yuan, P.; Wang, L.; Li, X.; Lei, B. Multifunctional Bioactive Glass Nanoparticles : Surface – Interface Decoration and Biomedical Applications. *Regen. Biomater.* 2024, No. September. https://doi.org/https://doi.org/10.1093/rb/rbae110.

(55) Hughes, A. S.; Reeves, M. Biosensing on the End of an Optical Fiber Dissertation Directed By. 2015, No. May 2011.

(56) Piatti, E.; Miola, M.; Verné, E. Tailoring of Bioactive Glass and Glass-Ceramics Properties for in Vitro and in Vivo Response Optimization: A Review. *Biomater. Sci.* 2024, 4546–4589. https://doi.org/10.1039/d3bm01574b.

(57) Shearer, A.; Molinaro, M.; Montazerian, M.; Miola, M.; Mauro, J. C. The Unexplored Role of Alkali and Alkaline Earth Elements (ALAEs) on the Structure, Processing, and Biological Effects of Bioactive Glasses. *Biomater. Sci.* 2024, 2521–2560. https://doi.org/10.1039/d3bm01338c.

(58) Masaru, I.; Masayuki, O.; Mikio, K.; Shin, K. Structural Changes of SiO 2 Glass by Mechanical Milling. *J. Mineral. Petrol. Sci.* 2010. https://doi.org/10.2465/jmps.090810.

(59) Vicent, M.; Bannier, E.; Carpio, P.; Orts, M. J.; Sánchez, E.; Ca, E. Effect of Particle Size on Processing of Bioactive Glass Powder for Atmospheric Plasma Spraying. *J. Eur. Ceram. Soc.* 2016, *36*, 837–845. https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.jeurceramsoc.2015.09.039.

(60) Tsitlakidis, S.; Hohenbild, F.; Saur, M.; Moghaddam, A.; Kunisch, E.; Renkawitz, T.; Juan, I. G. De; Westhauser, F. Reduced Sodium Portions Favor Osteogenic Properties and Cytocompatibility of 45S5-Based Bioactive Glass Particles. *Biomimetic* 2023. https://doi.org/https://doi.org/10.3390/biomimetics8060472.

(61) Bahniuk, M. S.; Pirayesh, H.; Singh, H. D.; Nychka, J. A.; Unsworth, L. D. Bioactive Glass 45S5 Powders : Effect of Synthesis Route and Resultant

Surface Chemistry and Crystallinity on Protein Adsorption from Human Plasma. *Biointerphases* 2012. https://doi.org/10.1007/s13758-012-0041-y.

(62) Nascimento, D. L.; Ruiz, Y. L.; Mendes, C.; Marcos, F.; Batista, C.; Cabot, A.; Elias, M.; Ferreira, R. D.; Val, M.; Saraiva, L. B.; Quaresma, N. N.; Nobre, F. X. BaNb2O6 at Room Temperature by Ball Milling Method : Structural , Optical , Morphology , and Electrochemistry Properties. *I&EC Res.* 2024. https://doi.org/10.1021/acs.iecr.4c02578.

(63) Marghussian, V. K.; Mesgar, A. S. Effects of Composition on Crystallization Behaviour and Mechanical Properties of Bioactive Glass-Ceramics in the MgO-CaO-SiO2-P2O5 System. *Ceram. Int.* 2000, *26*, 415–420. https://doi.org/10.1016/S0272-8842(99)00072-3.

(64) Adams, L. A.; Essien, E. R.; Adesalu, A. T.; Julius, M. L. Bioactive Glass 45S5 from Diatom Biosilica. *J. Sci. Adv. Mater. Devices* 2017, *2* (4), 476–482. https://doi.org/10.1016/j.jsamd.2017.09.002.

(65) Kirste, G.; Jaimes, A. C.; Martín, A. D. P.; Martins, J.; Souza, D.; Massera, J.; Hill, R. G.; Brauer, D. S. Bioactive Glass – Ceramics Containing Fluorapatite , Xonotlite , Cuspidine and Wollastonite Form Apatite Faster than Their Corresponding Glasses. *Sci. Rep.* 2024, 1–14. https://doi.org/10.1038/s41598-024-54228-0.

(66) Xin, R.; Zhang, Q.; Gao, J. Identi Fi Cation of the Wollastonite Phase in Sintered 45S5 Bioglass and Its Effect on in Vitro Bioactivity. *NOC* 2010, *356* (23–24), 1180–1184. https://doi.org/10.1016/j.jnoncrysol.2010.03.010.

(67) Baino, F.; Novajra, G.; Miguez-Pacheco, V.; Boccaccini, A. R.; Vitale-Brovarone, C. Bioactive Glasses: Special Applications Outside the Skeletal System. *J. Non. Cryst. Solids* 2016, *432*, 15–30. https://doi.org/10.1016/j.jnoncrysol.2015.02.015.

(68) Kim, T. H.; Singh, R. K.; Kang, M. S.; Kim, J. H.; Kim, H. W. Inhibition of Osteoclastogenesis through SiRNA Delivery with Tunable Mesoporous Bioactive Nanocarriers. *Acta Biomater.* 2016, *29*, 352–364. https://doi.org/10.1016/j.actbio.2015.09.035.

(69) Hoppe, A.; Güldal, N. S.; Boccaccini, A. R. A Review of the Biological

Response to Ionic Dissolution Products from Bioactive Glasses and Glass-Ceramics. *Biomaterials* 2011, *32* (11), 2757–2774. https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2011.01.004.

(70) Hu, G.; Xiao, L.; Tong, P.; Bi, D.; Wang, H.; Ma, H.; Zhu, G.; Liu, H. Antibacterial Hemostatic Dressings with Nanoporous Bioglass Containing Silver. *Int. J. Nanomedicine* 2012, *7*, 2613–2620. https://doi.org/10.2147/IJN.S31081.

(71) Zheng, K.; Boccaccini, A. R. Sol-Gel Processing of Bioactive Glass Nanoparticles: A Review. *Adv. Colloid Interface Sci.* 2017, *249*, 363–373. https://doi.org/10.1016/j.cis.2017.03.008.

(72) Rahaman, M. N.; Day, D. E.; Sonny Bal, B.; Fu, Q.; Jung, S. B.; Bonewald, L. F.; Tomsia, A. P. Bioactive Glass in Tissue Engineering. *Acta Biomater.* 2011, *7* (6), 2355–2373. https://doi.org/10.1016/j.actbio.2011.03.016.

(73) Ducheyne, P.; Wheeler, D. L. Effect of Bioactive Glass Particle Size on Osseous Regeneration of Cancellous Defects. *J. Biomed. Mater. Res.* 1999, *46* (2), 301–303. https://doi.org/10.1002/(sici)1097-4636(199908)46:2<301::aid-jbm20>3.3.co;2-r.

(74) Boller, L. A.; McGough, M. A. P.; Shiels, S. M.; Duvall, C. L.; Wenke, J. C.; Guelcher, S. A. Settable Polymeric Autograft Extenders in a Rabbit Radius Model of Bone Formation. *Materials (Basel).* 2021, *14* (14), 1–15. https://doi.org/10.3390/ma14143960.

(75) Lutišanová, G.; Palou, M. T.; Kozánková, J. Comparison of Bioactivity in Vitro of Glass and Glass Ceramic Materials during Soaking in SBF and Dmem Medium. *Ceram. - Silikaty* 2011, *55* (3), 199–207.

(76) Kokubo, T.; Kushitani, H.; Ohtsuki, C.; Sakka, S.; Yamamuro, T. Chemical Reaction of Bioactive Glass and Glass-Ceramics with a Simulated Body Fluid. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 1992, *3* (2), 79–83. https://doi.org/10.1007/BF00705272.

(77) Rezaei, Y.; Moztarzadeh, F.; Shahabi, S.; Tahriri, M. Synthesis, Characterization, and in Vitro Bioactivity of Sol-Gel-Derived SiO2-CaO-P2O5-MgO-SrO Bioactive Glass. *Synth. React. Inorganic, Met. Nano-Metal Chem.*

2014, *44* (5), 692–701. https://doi.org/10.1080/15533174.2013.783869.

(78) Ma, J.; Chen, C. Z.; Wang, D. G.; Shao, X.; Wang, C. Z.; Zhang, H. M. Effect of MgO Addition on the Crystallization and in Vitro Bioactivity of Glass Ceramics in the CaO-MgO-SiO 2-P 2O 5 System. *Ceram. Int.* 2012, *38* (8), 6677–6684. https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2012.05.056.

(79) Kaou, M. H.; Balazsi, K. Advanced Bioactive Glasses : The Newest Achievements and Breakthroughs in the Area. *Nanomaterials* 2023, 1–33. https://doi.org/https://doi.org/10.3390/nano13162287.

(80) Li, P.; Ohtsuki, C.; Kokubo, T.; Nakanishi, K.; Soga, N.; de Groot, K. The Role of Hydrated Silica, Titania, and Alumina in Inducing Apatite on Implants. *J. Biomed. Mater. Res.* 1994, *28* (1), 7–15. https://doi.org/10.1002/jbm.820280103.

(81) Maçon, A. L. B.; Kim, T. B.; Valliant, E. M.; Goetschius, K.; Brow, R. K.; Day, D. E.; Hoppe, A.; Boccaccini, A. R.; Kim, I. Y.; Ohtsuki, C.; Kokubo, T.; Osaka, A.; Vallet-Regí, M.; Arcos, D.; Fraile, L.; Salinas, A. J.; Teixeira, A. V.; Vueva, Y.; Almeida, R. M.; Miola, M.; Vitale-Brovarone, C.; Verné, E.; Höland, W.; Jones, J. R. A Unified in Vitro Evaluation for Apatite-Forming Ability of Bioactive Glasses and Their Variants. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 2015, *26* (2), 1–10. https://doi.org/10.1007/s10856-015-5403-9.

(82) Oliveira, J. M.; Correia, R. N.; Fernandes, M. H. Effects of Si Speciation on the in Vitro Bioactivity of Glasses. *Biomaterials* 2002, *23* (2), 371–379. https://doi.org/10.1016/S0142-9612(01)00115-6.

(83) Oki, A.; Parveen, B.; Hossain, S.; Adeniji, S.; Donahue, H. Preparation and in Vitro Bioactivity of Zinc Containing Sol-Gel-Derived Bioglass Materials. *J. Biomed. Mater. Res. - Part A* 2004, *69* (2), 216–221. https://doi.org/10.1002/jbm.a.20070.

(84) Bakhtiari, A.; Cheshmi, A.; Naeimi, M.; Mohammadi Fathabad, S.; Aliasghari, M.; Modarresi Chahardehi, A.; Hassani, S.; Elhami, V. Synthesis and Characterization of the Novel 80S Bioactive Glass: Bioactivity, biocompatibility, Cytotoxicity. *J. Compos. Compd.* 2020, *2* (4), 110–114. https://doi.org/10.29252/jcc.2.3.1.

(85) Ubaldini, A. L. M.; Pascotto, R. C.; Sato, F.; Soares, V. O.; Zanotto, E. D.; Baesso, M. L. Effects of Bioactive Agents on Dentin Mineralization Kinetics after Dentin Bleaching. *Oper. Dent.* 2020, *45* (3), 286–296. https://doi.org/10.2341/18-272-L.

(86) Zhang, J.; Lynch, R. J. M.; Watson, T. F.; Banerjee, A. Remineralisation of Enamel White Spot Lesions Pre-Treated with Chitosan in the Presence of Salivary Pellicle. *J. Dent.* 2018, *72* (December 2017), 21–28. https://doi.org/10.1016/j.jdent.2018.02.004.

(87) Mocquot, C.; Attik, N.; Pradelle-Plasse, N.; Grosgogeat, B.; Colon, P. Bioactivity Assessment of Bioactive Glasses for Dental Applications: A Critical Review. *Dent. Mater.* 2020, *36* (9), 1116–1143. https://doi.org/10.1016/j.dental.2020.03.020.

(88) Liu, T.-T.; Zhuang, X.-Y.; Yang, T.-S. Functionalities of Gelatin Modified with 2-Octenyl Succinic Anhydride and Gallic Acid. *Foods* 2022, 1–12. https://doi.org/. https://doi.org/10.3390/foods11091241.

(89) Zhang, C.; Xie, C.; Fu, H.; Li, J.; Wang, Y.; Tian, M. Design and Evaluation of Modified Gelatin Films to Address the Aging Problem of Soft Capsule Shells. *Polym. Test.* 2025, *145* (December 2024), 108759. https://doi.org/10.1016/j.polymertesting.2025.108759.

(90) Thambiliyagodage, C.; Jayanetti, M.; Mendis, A.; Ekanayake, G. Recent Advances in Chitosan-Based Applications—A Review. *Materials (Basel).* 2023. https://doi.org/https://doi.org/10.3390/ma16052073.

(91) Sánchez-machado, D. I.; López-cervantes, J.; Escárcega-galaz, A. A.; Campas-baypoli, O. N.; Martínez-ibarra, D. M.; Rascón-león, S. MethodsX Measurement of the Degree of Deacetylation in Chitosan Films by FTIR , 1 H NMR and UV Spectrophotometry. 2024, *12* (January), 10–15. https://doi.org/10.1016/j.mex.2024.102583.

(92) Zhou, H.; Ikeuchi-takahashi, Y.; Hattori, Y. Nanogels of a Succinylated Glycol Chitosan-Succinyl Prednisolone Conjugate : Release Behavior , Gastrointestinal Distribution , and Systemic Absorption. *Int. J. Mol. Sci.* 2020. https://doi.org/10.3390/ijms21072376.

(93) Dressings, S.; Guo, W.; Ding, X.; Zhang, H.; Liu, Z.; Han, Y.; Wei, Q. Recent Advances of Chitosan-Based Hydrogels. 2024, 1–26.

(94) Chou, S.; Luo, L.; Lai, J.; Ma, D. H. Role of Solvent-Mediated Carbodiimide Cross-Linking in Fabrication of Electrospun Gelatin Nano Fi Brous Membranes as Ophthalmic Biomaterials. *Mater. Sci. Eng. C* 2017, *71*, 1145–1155. https://doi.org/10.1016/j.msec.2016.11.105.

(95) Venezia, V.; Verrillo, M.; Avallone, P. R.; Silvestri, B.; Cangemi, S.; Pasquino, R.; Grizzuti, N.; Spaccini, R.; Luciani, G. Waste to Wealth Approach: Improved Antimicrobial Properties in Bioactive Hydrogels through Humic Substance − Gelatin Chemical Conjugation. *Biomacromolecules* 2023. https://doi.org/10.1021/acs.biomac.3c00143.

(96) Serra, J.; Gonz, P. FTIR and XPS Studies of Bioactive Silica Based Glasses. *J. Non. Cryst. Solids* 2003, *332*, 20–27. https://doi.org/10.1016/j.jnoncrysol.2003.09.013.

(97) Jones, J. R. Acta Biomaterialia Review of Bioactive Glass : From Hench to Hybrids. *Acta Biomater.* 2013, *9* (1), 4457–4486. https://doi.org/10.1016/j.actbio.2012.08.023.

(98) Chuc-gamboa, M. G.; Vargas-coronado, R. F.; Cervantes-uc, J. M.; Valerio, J.; Mar, D. The Effect of PEGDE Concentration and Temperature on Physicochemical and Biological Properties of Chitosan. *Polymers (Basel).* 2019. https://doi.org/10.3390/polym11111830.

(99) Ostrowska-czubenko, J.; Gierszewska, M.; Pieróg, M. PH-Responsive Hydrogel Membranes Based on Modified Chitosan : Water Transport and Kinetics of Swelling. *J. Polym. Res.* 2015. https://doi.org/10.1007/s10965-015-0786-3.

(100) Kumirska, J.; Kaczy, Z.; Bychowska, A. Application of Spectroscopic Methods for Structural Analysis of Chitin and Chitosan. *Mar. Drugs* 2010, 1567–1636. https://doi.org/10.3390/md8051567.

(101) Liang, F.; Ding, J.; Li, R.; Lee, D.; Liu, S. Nanoparticle Agglomeration in Molten Salt Nanofluids : Free Energy Landscape and Its Impacts on Thermal Transport Property Degradation. *J. Mol. Liq.* 2024, *410* (April), 125632.

https://doi.org/10.1016/j.molliq.2024.125632.

(102) Glass, B.; Acid, P.; Torre, G. C.; Zurita-Méndez; Lourdes, D.; Ortiz-ortiz, J.; Est, M.; Espinosa-medina, M. A. Characterization and Evaluation of Composite Biomaterial Bioactive Glass–Polylactic Acid for Bone Tissue Engineering Applications. *Polymers (Basel).* 2022. https://doi.org/https://doi.org/10.3390/polym14153034.

(103) Scaffolds, C. C.; Biernat, M.; Antosik, A.; Ciołek, L.; Krok-borkowicz, M.; Arkadiusz, G. Bioactive Glasses Enriched with Strontium or Zinc with Different Degrees of Structural Order as Components of Tissue Engineering. *Polymers (Basel).* 2023. https://doi.org/https://doi.org/10.3390/polym15193994.

(104) Mao, S.; Liu, X.; Xia, W. Chitosan Oligosaccharide-g-Linalool Polymer as Inhibitor of Hyaluronidase and Collagenase Activity. *Int. J. Biol. Macromol.* 2021, *166*, 1570–1577. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.11.036.

(105) Brito, Y. A.; Husteden, C.; Alherz, J.; Fuhrmann, B. Extracellular Matrix-Inspired Surface Coatings Functionalized with Dexamethasone-Loaded Liposomes to Induce Osteo- and Chondrogenic Differentiation of Multipotent Stem Cells. *Mater. Sci. Eng. C* 2021, *131* (October). https://doi.org/10.1016/j.msec.2021.112516.

(106) Bhardwaj, N.; Kundu, S. C. Electrospinning: A Fascinating Fiber Fabrication Technique. *Biotechnol. Adv.* 2010, *28* (3), 325–347. https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2010.01.004.

(107) Sill, T. J.; Recum, H. A. Von. Electrospinning : Applications in Drug Delivery and Tissue Engineering. 2008, *29*. https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2008.01.011.

(108) Sisson, K.; Zhang, C.; Farach-carson, M. C.; Chase, D. B.; Rabolt, J. F. Fiber Diameters Control Osteoblastic Cell Migration and Differentiation in Electrospun Gelatin. *Wiley Period.* 2010, 1312–1320. https://doi.org/10.1002/jbm.a.32756.

(109) Bhattarai, D. P.; Aguilar, L. E.; Park, C. H.; Kim, C. S. A Review on Properties of Natural and Synthetic Based Electrospun Fibrous Materials for Bone Tissue Engineering. *Membranes (Basel).* 2018.

https://doi.org/10.3390/membranes8030062.

(110) Lyu, S. Electrospun Fibers as a Scaffolding Platform Fot Bone Tissue Repair. *Natl. Inst. Heal.* 2014, *31* (9), 1382–1389. https://doi.org/10.1002/jor.22367.Electrospun.

(111) Ganesh, S. S.; Anushikaa, R.; Sri, V.; Victoria, S.; Lavanya, K. Recent Advancements in Electrospun Chitin and Chitosan Nanofibers for Bone Tissue Engineering Applications. *J. Funct. Biomater.* 2023. https://doi.org/https://doi.org/10.3390/jfb14050288.

(112) Dong, X.; Shi, L.; Ma, S.; Chen, X.; Cao, S.; Li, W.; Zhao, Z.; Chen, C.; Deng, H. Chitin / Chitosan Nanofibers Toward a Sustainable Future : From Hierarchical Structural Regulation to Functionalization Applications. *Nano Lett.* 2024. https://doi.org/10.1021/acs.nanolett.4c02632.

(113) Dutt, S.; Bhaskar, R.; Singh, H.; Priyadarshi, R.; Kim, H.; Son, Y.; Gautam, S.; Soo, S. Chitosan-Based Electrospun Fibers for Bone-Tissue Engineering : Recent Research Advancements. *Int. J. Biol. Macromol.* 2024, *281* (P4), 136530. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2024.136530.

(114) Huang, T.; Zeng, Y.; Li, C.; Zhou, Z.; Xu, J.; Wang, L.; Yu, D.; Wang, K. Application and Development of Electrospun Nanofiber Scaffolds for Bone Tissue Engineering. *ACS Biomater. Sci. Eng.* 2024. https://doi.org/10.1021/acsbiomaterials.4c00028.

(115) Bagla, A.; Mitharwal, C.; Mitra, S.; Vidyapith, B. Influence of Solution Parameters on Phase Formation and Morphology of Electrospun Poly(Vinylidene Fluoride) Nanofiber.

(116) Nadaf, A.; Gupta, A.; Hasan, N.; Ahmad, S.; Kesharwani, P.; Ahmad, F. J. Recent Update on Electrospinning and Electrospun Nano Fi Bers : Current Trends and Their Applications. 2022, 23808–23828. https://doi.org/10.1039/d2ra02864f.

(117) Rodríguez, M.; Aguilar, M.; Castro-Criado, D.; Romero, A. Characterization of Gelatin-Polycaprolactone Membranes by Electrospinning. *Biomimetics* 2024. https://doi.org/https://doi.org/10.3390/biomimetics9020070.

(118) Montoya, Y.; Cardenas, J.; Bustamante, J.; Valencia, R. Effect of Sequential

Electrospinning and Co-Electrospinning on Morphological and Fluid Mechanical Wall Properties of Polycaprolactone and Bovine Gelatin Scaffolds , for Potential Use in Small Diameter Vascular Grafts. *Biomater. Res.* 2021, 1–17. https://doi.org/10.1186/s40824-021-00240-8.

(119) Lim, W. L.; Chowdhury, S. R.; Ng, M. H.; Law, J. X. Physicochemical Properties and Biocompatibility of Electrospun Polycaprolactone / Gelatin Nanofibers. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 2021. https://doi.org/https://doi.org/10.3390/ijerph18094764.

(120) Gizaw, M.; Mustafa, D. B.; Chou, S. Fabrication of Drug-Eluting Polycaprolactone and Chitosan Blend Micro Fi Bers for Topical Drug Delivery Applications. *Front. Mater.* 2023, No. April, 1–12. https://doi.org/10.3389/fmats.2023.1144752.

(121) Saudi, S.; Bhattarai, S. R.; Adhikari, U. Nanonet-Nano Fiber Electrospun Mesh of PCL-Chitosan for Controlled and Extended Release of Diclofenac Sodium. *Nanoscale* 2020. https://doi.org/10.1039/D0NR05968D.

(122) Yan, X.; Yao, H.; Luo, J.; Li, Z.; Wei, J. Functionalization of Electrospun Nanofiber for Bone Tissue Engineering. *Polymers (Basel).* 2022, 1–18. https://doi.org/https://doi.org/10.3390/polym14142940.

(123) Murugan, J.; Durairajan, R.; Sivakumar, S.; Kartik, R. A Critical Review on Multifunctional Surface Strategies for Titanium Alloys in Bioactive and Durable Implants. *Next Bioeng.* 2025, *1* (June), 100009. https://doi.org/10.1016/j.nxbio.2025.100009.

(124) Wang, R.; Ni, S.; Ma, L.; Li, M. Porous Construction and Surface Modification of Titanium-Based Materials for Osteogenesis : A Review. *Front. Bioeng. Biotechnol.* 2022, No. August, 1–19. https://doi.org/10.3389/fbioe.2022.973297.

(125) Nhlapo, N.; Dzogbewu, T. C.; de Smidt, O. Nanofiber Polymers for Coating Titanium-Based Biomedical Implants. *Fibers* 2022, *10* (4), 1–18. https://doi.org/10.3390/fib10040036.

(126) Lin, H. Nanofibers Grafted on Titanium Alloy : The Effects of Fiber Alignment and Density on Osteoblast Mineralization. *J. Mater. Sci.* 2017.

https://doi.org/10.1007/s10856-017-5951-2.

(127) Ibrahim, S. W.; Hamad, T. I. Electrospun Nano-Barium Titanate / Polycaprolactone Composite Coatings on Titanium and Ti13Nb13Zr Alloy. *Compos. Adv. Mater.* 2023, *32*, 1–17. https://doi.org/10.1177/26349833231203742.

(128) Ghneim, A.; Abou, L.; Schaniel, D.; Soule, S.; Bendeif, E. Multiscale Investigation on the Formation Path of the Apatite Phase in Bioactive Glasses. *J. Non. Cryst. Solids* 2024, *639* (March). https://doi.org/10.1016/j.jnoncrysol.2024.123095.

(129) Omidian, S.; Nazarpak, M. H.; Bagher, Z.; Moztarzadeh, F. The Effect of Vanadium Ferrite Doping on the Bioactivity of Mesoporous Bioactive Glass-Ceramics. *RSC Adv.* 2022, 25639–25653. https://doi.org/10.1039/d2ra04786a.

(130) Elkhouly, H.; Mamdouh, W. Electrospun Nano- Fibrous Bilayer Scaffold Prepared from Polycaprolactone / Gelatin and Bioactive Glass for Bone Tissue Engineering. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 2021. https://doi.org/10.1007/s10856-021-06588-6.

(131) Liverani, L.; Liguori, A.; Zezza, P.; Gualandi, C.; Toselli, M.; Boccaccini, A. R.; Letizia, M. Bioactive Materials with Shape Memory Properties. *Bioact. Mater.* 2022, *11* (September 2021), 230–239. https://doi.org/10.1016/j.bioactmat.2021.09.020.

(132) Bacchiega, R.; Soto, G.; Kimmins, S. D.; Flores, M.; Hamm, E.; Aguilar, C.; Tamayo, L.; Mu, L. Enhanced Adhesion and Dual Antibacterial/Anti-Adherent Function of Polycaprolactone Coatings on Polydopamine-Treated Ti-13Ta-12Sn Alloy. *Prog. Org. Coatings* 2025, *209* (July). https://doi.org/10.1016/j.porgcoat.2025.109553.

(133) Ochoa-putman, C.; Vaidya, U. K. Composites : Part A Mechanisms of Interfacial Adhesion in Metal – Polymer Composites – Effect of Chemical Treatment. *Compos. Part A* 2011, *42* (8), 906–915. https://doi.org/10.1016/j.compositesa.2011.03.019.

(134) Owston, H. E.; Moisley, K. M.; Tronci, G.; Stephen, J.; Giannoudis, P. V;

Jones, E. Induced Periosteum-Mimicking Membrane with Cell Barrier and Multipotential Stromal Cell (MSC) Homing Functionalities. *Int. J. Mol. Sci. Sci.* No. Im. https://doi.org/https://doi.org/10.3390/ijms21155233.

(135) Bazbouz, M. B.; Liang, H.; Tronci, G. A UV-Cured Nanofibrous Membrane of Vinylbenzylated Gelatin-Poly (ε -Caprolactone) Dimethacrylate Co-Network by Scalable Free Surface Electrospinning. *Mater. Sci. Eng. C*. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.msec.2018.05.076.

(136) Jiang, P.; Zhang, Y.; Hu, R.; Shi, B.; Zhang, L.; Huang, Q.; Yang, Y.; Tang, P.; Lin, C. Bioactive Materials Advanced Surface Engineering of Titanium Materials for Biomedical Applications : From Static Modification to Dynamic Responsive Regulation. *Bioact. Mater.* 2023, *27* (March), 15–57. https://doi.org/10.1016/j.bioactmat.2023.03.006.

(137) Zhang, X.; Li, L.; Ouyang, J.; Zhang, L.; Xue, J.; Zhang, H.; Tao, W. Electroactive Electrospun Nanofibers for Tissue Engineering. *Nano Today* 2021, *39*, 101196. https://doi.org/10.1016/j.nantod.2021.101196.

(138) Chen, S.; Li, R.; Li, X.; Xie, J. Electrospinning : An Enabling Nanotechnology Platform for Drug Delivery and Regenerative Medicine. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2018, *132*, 188–213. https://doi.org/10.1016/j.addr.2018.05.001.

(139) Rojas, G. G. F. Electrospun Scaffold for Tissue Engineering: A Review. *Macromol*. https://doi.org/https://doi.org/10.3390/macromol3030031.

(140) Woodley, J. P.; Lambert, D. W. Reduced Fibroblast Activation on Electrospun Polycaprolactone Scaffolds. *Bioengineering* 2023. https://doi.org/https://doi.org/10.3390/bioengineering10030348.

(141) Li, Y.; Ge, Z.; Liu, Z.; Li, L.; Song, J.; Wang, H.; Tian, F.; Lei, P. Integrating Electrospun Aligned Fiber Scaffolds with Bovine Serum Albumin - Basic Fibroblast Growth Factor Nanoparticles to Promote Tendon Regeneration. *J. Nanobiotechnology* 2024, 1–18. https://doi.org/10.1186/s12951-024-03022-1.

(142) Miranda-Buendia, E.; Gonz, G. H.; Maciel-cerda, A.; Gonz, M. In Vitro Culture of Human Dermal Fibroblasts on Novel Electrospun Polylactic Acid Fiber Scaffolds Loaded with Encapsulated Polyepicatechin Physical Gels. *Gels* 2024. https://doi.org/https://doi.org/10.3390/gels10090601.

(143) Standard, I. Biological Evaluation of Medical Devices-Tests for in Vitro Cytotoxicity. 2009.

(144) Ability, O.; Wong, P.; Song, S.; Tsai, P.; Nien, Y. Relationship between the Surface Roughness of Biodegradable Mg-Based Bulk Metallic Glass and the Osteogenetic Ability of MG63 Osteoblast-Like Cells. *Materials (Basel).* 2020. https://doi.org/10.3390/ma13051188.

(145) Marquez, A. L.; Jos, F.; Gerhard, C. How Fiber Surface Topography Affects Interactions between Cells and Electrospun Scaffolds : A Systematic Review. *Polymers (Basel)*. 2022. https://doi.org/https://doi.org/10.3390/polym14010209.

(146) Tudureanu, R.; Handrea-dragan, I. M.; Boca, S.; Botiz, I. Insight and Recent Advances into the Role of Topography on the Cell Differentiation and Proliferation on Biopolymeric Surfaces. *Int. J. Mol. Sci.* 2022. https://doi.org/https://doi.org/10.3390/ijms23147731.

(147) Rajendran, A. K.; Sankar, D.; Amirthalingam, S.; Kim, H. D. Trends in Mechanobiology Guided Tissue Engineering and Tools to Study Cell - Substrate Interactions : A Brief Review. *Biomater. Res.* 2023, 1–24. https://doi.org/10.1186/s40824-023-00393-8.

Anexos

Anexo A.

A1. Condiciones experimentales para la funcionalización de los polímeros

Con el propósito de establecer las condiciones adecuadas para la funcionalización de los polímeros, se evaluaron diferentes concentraciones de ácido succínico y temperaturas de reacción. La selección de las condiciones se realizó considerando de manera independiente, el comportamiento macroscópico de los sistemas durante la funcionalización y los cambios observados mediante FT-IR/ATR.

Previo a la selección de las condiciones finales, se evaluaron experimentalmente concentraciones de ácido succínico (0.25 y 0.5% p/v), manteniendo constante la relación molar del sistema activados EDC/NHS en 1:1. Así mismo, se evaluaron dos condiciones de temperatura durante el proceso de funcionalización: 30 °C y 80 °C. A 30 °C, ambos polímeros presentaron sistemas homogéneos y una adecuada dispersión de los componentes durante el proceso de funcionalización. En contraste, al emplear 80 °C se observó un comportamiento asociado con la reticulación de los polímeros, evidenciado por un incremento en la consistencia de los sistemas y la perdida de homogeneidad. Debido a que estas características podrían comprometer el procesamiento posterior de los materiales, la condición de 80 °C fue descartada y se seleccionó una temperatura de 30°C para la funcionalización.

Como evidencia complementaria para la selección de la concentración de ácido succínico, en la Figura 35 y Figura 36 se presentan los espectros FT-IR/ATR de la gelatina y el quitosano funcionalizados con 0.25% y 0.5% (p/v) de ácido succínico, respectivamente. En ambos sistemas se comparan las bandas características de los polímeros, incluyendo las correspondientes a los grupos O-H y N-H y a las amidas I y II. La condición con 0.5% de ácido succínico mostró cambios más evidentes en la intensidad y/o posición de estas bandas en comparación con la concentración de 0.25%, lo que fue considerado indicativo de una mayor modificación de los polímeros bajo esta condición.

Con base en estos resultados, se seleccionó una concentración de 0.5% (p/v) de

ácido succínico para los análisis posteriores.

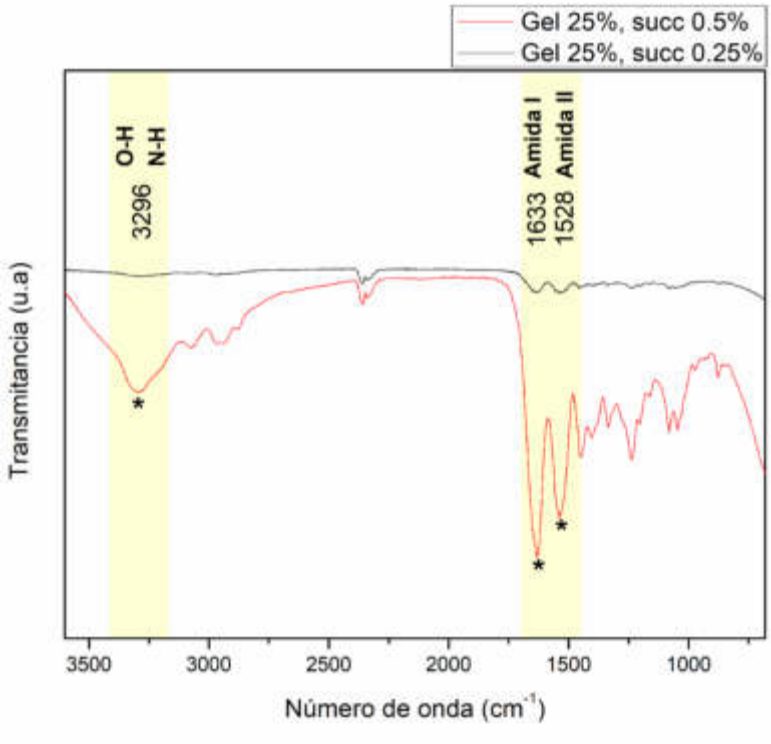


Figura 35. Espectros FT-IR/ATR de gelatina funcionalizada con 0.25% y 0.5% de ácido succínico

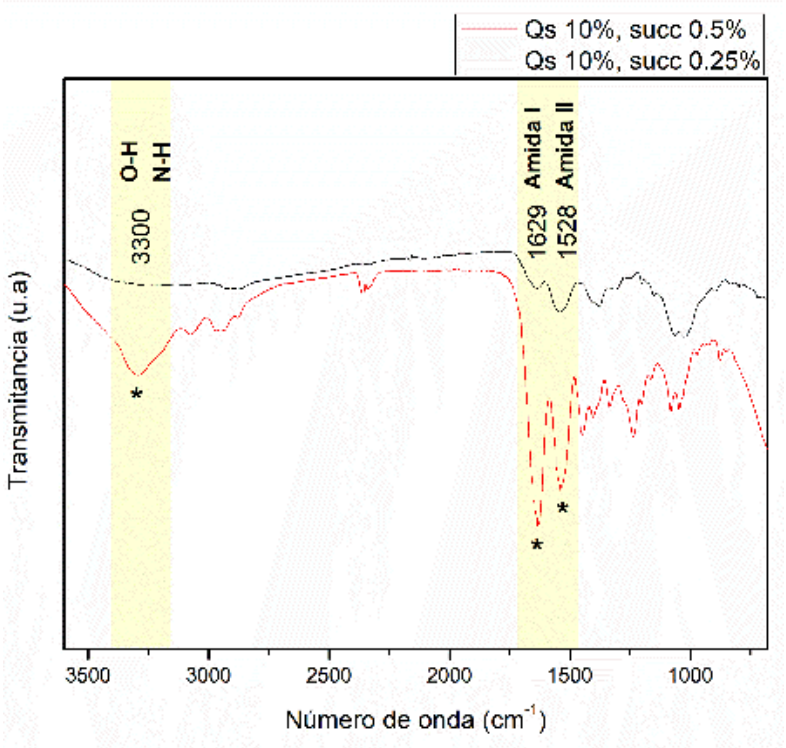


Figura 36. Espectros FT-IR/ATR de quitosano funcionalizado con 0.25% y 0.5% de ácido succínico

A2. Determinación de la concentración de vidrio bioactivo en los polímeros funcionalizados

La incorporación del vidrio bioactivo (VB) en los sistemas polímeros funcionalizados requirió evaluar diferentes concentraciones con el propósito de identificar aquellas que favorecieran su adecuada dispersión e incorporación en cada sistema polimérico. Para ello, se evaluaron concentraciones de 5 y 10% de VB tanto para la gelatina como para el quitosano funcionalizados con ácido succínico. Inicialmente, la selección se realizó mediante la observación macroscópica de los sistemas durante y después del periodo de reposo, considerando la estabilidad de la dispersión, la presencia de sedimentación y la separación de fases.

En el sistema de gelatina funcionalizada, la concentración de 5% de VB presentó una dispersión homogénea, con las partículas permaneciendo suspendidas durante el periodo de reposo. En contraste, al incrementar la concentración a 10% se observó sedimentación y separación de fases, lo que indicó una menos estabilidad de la dispersión y una posible fracción de partículas no asociadas al polímero. Por ello, la concentración de 5% de VB fue seleccionada para este sistema.

Para el quitosano funcionalizado se observó un comportamiento diferente. La incorporación de 5% de VB presentó sedimentación de partículas durante el periodo de reposo, mientras que con 10% de VB se obtuvo una dispersión más estable, sin evidencia visible de sedimentación. Este comportamiento sugirió una mayor interacción entre el VB y el quitosano funcionalizado a esta concentración, por lo que se seleccionó 10% de VB para este sistema.

Con el propósito de corroborar estas observaciones, se obtuvieron los espectros FT-IR/ATR de ambas concentraciones para cada polímero funcionalizado. En la gelatina (Figura 37), la formulación con 5% de VB presentó una mayor intensidad de la banda asociada al grupo amida respecto a la formulación con 10%, lo que sugiere una mayor interacción del VB con los grupos funcionales disponibles del polímero. Por su parte, en el quitosano (Figura 38), la formulación con 10% de VB presentó una mayor intensidad en las bandas asociadas a la interacción con el polímero en comparación con la concentración de 5%. Estos resultados respaldaron la selección de 5% de VB para la gelatina y 10% de VB para el quitosano como las

concentraciones con mayor evidencia de incorporación del VB en los polímeros funcionalizados.

Posteriormente, las formulaciones fueron procesadas mediante electrohilado para evaluar la incorporación del VB en la estructura fibrosa. En las condiciones descartadas, PCL/gelatina-VB 10% y PCL/quitosano-VB 5%, las micrografías SEM mostraron una baja presencia de partículas de VB sobre la red fibrosa (Figura 39). Si bien se observaron algunas partículas, su escasa presencia indicó que la mayor parte del VB no quedó incorporada en la estructura polimérica. En contraste, las condiciones seleccionadas, PCL/gelatina-VB 5% y PCL/quitosano-VB 10%, mostraron una mayor presencia de partículas asociadas a las fibras.

De esta manera, la selección de las concentraciones optimas se sustentó en la evaluación complementaria de la estabilidad macroscópica de las dispersiones, el comportamiento observado mediante FT-IR/ATR y la incorporación de las partículas en las fibras mediante SEM.

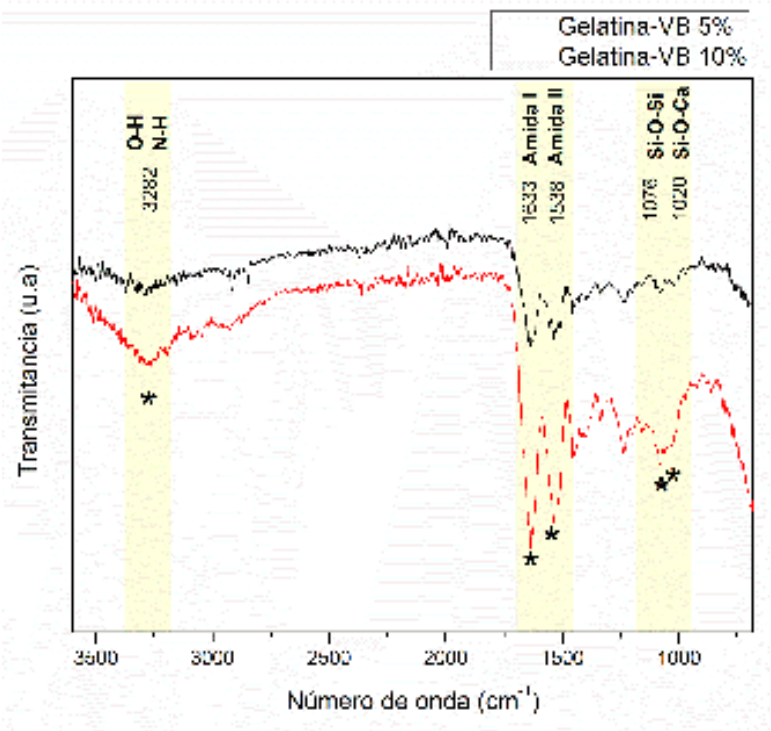


Figura 37. Espectros FT-IR/ATR de los sistemas de gelatina funcionalizada con 5 y 10% de vidrio bioactivo (VB), mostrando las diferencias en la intensidad de las bandas características asociadas a la interacción entre el VB y el polímero

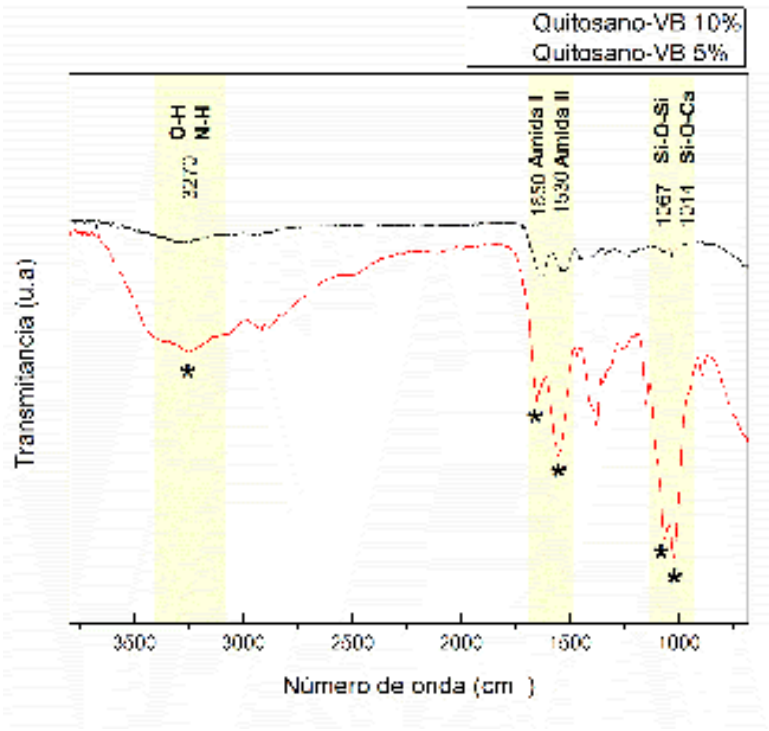


Figura 38. Espectros FT-IR/ATR de los sistemas de quitosano funcionalizado con 5 y 10% de vidrio bioactivo (VB), mostrando las diferencias en la intensidad de las bandas características asociadas a la interacción entre el VB y el polímero

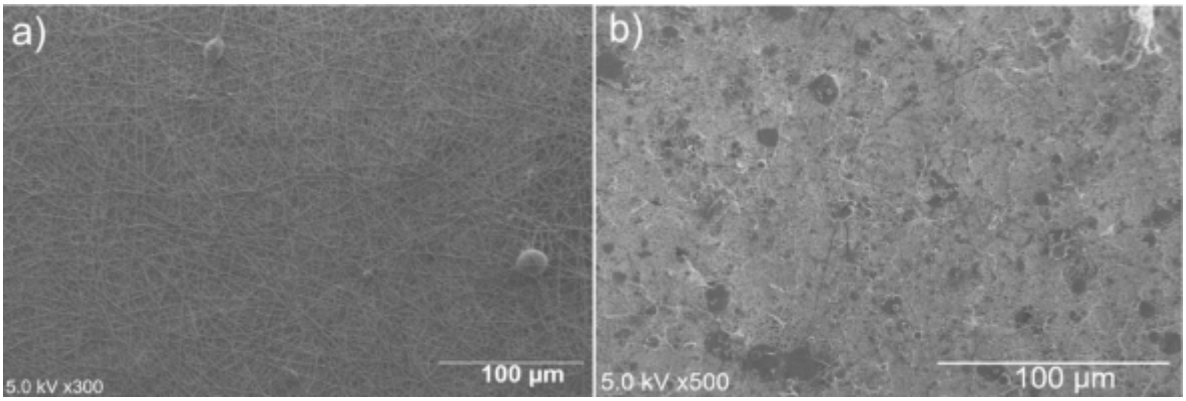


Figura 39. Micrografías SEM de las condiciones descartadas de los sistemas con vidrio bioactivo (VB): (a) PCL/gelatina-VB 10% y (b) PCL/quitosano-VB 5%, donde se observa una baja presencia de partículas de VB sobre la red fibrosa en ambas condiciones

A3. Evaluación complementaria con células madre mesenquimales (MSCs)

Como parte de las evaluaciones biológicas preliminares, se realizaron ensayos complementarios con células madre mesenquimales pata analizar su respuesta frente a los recubrimientos PCL/quitosano-VB y PCL/gelatina-VB. Esta evaluación

permitió comparar la viabilidad y actividad metabólica celular con las características morfologías observadas mediante calceína-AM, particularmente en términos de adhesión y distribución sobre la superficie de los recubrimientos. Los resultados obtenidos contribuyeron a la selección de los sistemas y líneas celulares considerados para la evaluación biológica principal de este trabajo.

PCL/quitosano-VB

Inicialmente, se evaluó la respuesta de las MSCs sobre el recubrimiento de PCL/quitosano-VB. La Figura 40 muestra los resultados obtenidos mediante calceína-AM y MTT para el grupo control (CTL), la aleación de titanio (Ti) y el recubrimiento. El grupo control presentó una distribución homogénea de células viables, mientras que sobre la aleación de titanio se observó una morfología extendida y una adecuada distribución celular. En contraste, las MSCs cultivadas sobre PCL/quitosano-VB mostraron una morfología predominantemente redondeada, menor dispersión sobre la superficie y pequeños agrupamientos celulares. Asimismo, se observó una mayor presencia de fluorescencia roja respecto a la verde, indicando una menor proporción de células viables.

Los resultados de MTT mostraron una viabilidad de 190.7% para la aleación de titanio y de 69.83% para PCL/quitosano-VB, respecto al control (100%). La menor viabilidad y la respuesta morfológica observada podrían estar relacionadas con la superficie heterogénea del recubrimiento, caracterizada por escasas fibras y zonas irregulares de material polimérico, las cuales pudieron limitar la adhesión y extensión inicial de las MSCs.

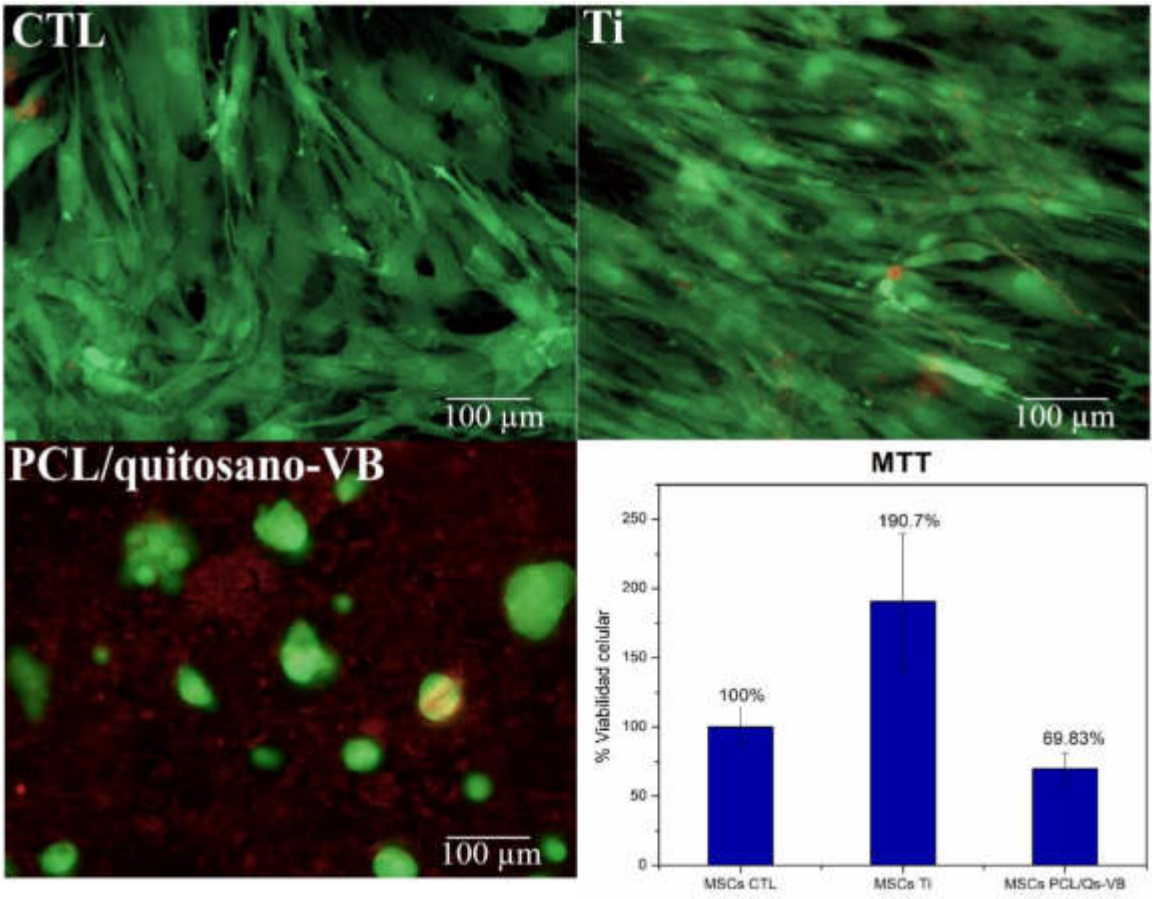


Figura 40. Evaluación mediante calceína-AM y MTT de MSCs cultivadas sobre CTL, Ti y PCL/quitosano-VB. Las barras de error representan la desviación estándar de cuatro replicas por muestra (n=4).

PCL/gelatina-VB

Como se muestra en la Figura 41, el grupo control y la aleación de titanio presentaron una distribución adecuada de células viables y una morfología extendida. En el caso de PCL/gelatina-VB, las células mostraron una distribución localizada principalmente en la zona de siembre, formando agrupamientos y con una dispersión limitada sobre la superficie del recubrimiento. Esta respuesta fue diferente de la observada en el sustrato de titanio, donde las células presentaron una mayor extensión y distribución superficial.

El ensayo MTT mostró una viabilidad de 190% para la aleación de titanio y de 78.9% para PCL/gelatina-VB, respecto al control (100%). Por lo tanto, aunque el resultado metabólico indico una respuesta celular favorable y ausencia de una reducción significativa de viabilidad, las imágenes de calceína-AM evidenciaron una distribución y extensión celular limitadas sobre el recubrimiento. Esta diferencia

entre la respuesta metabólica y la morfología celular sugiere que las características superficiales del recubrimiento pueden influir en la interacción inicial de las MSCs con el material.

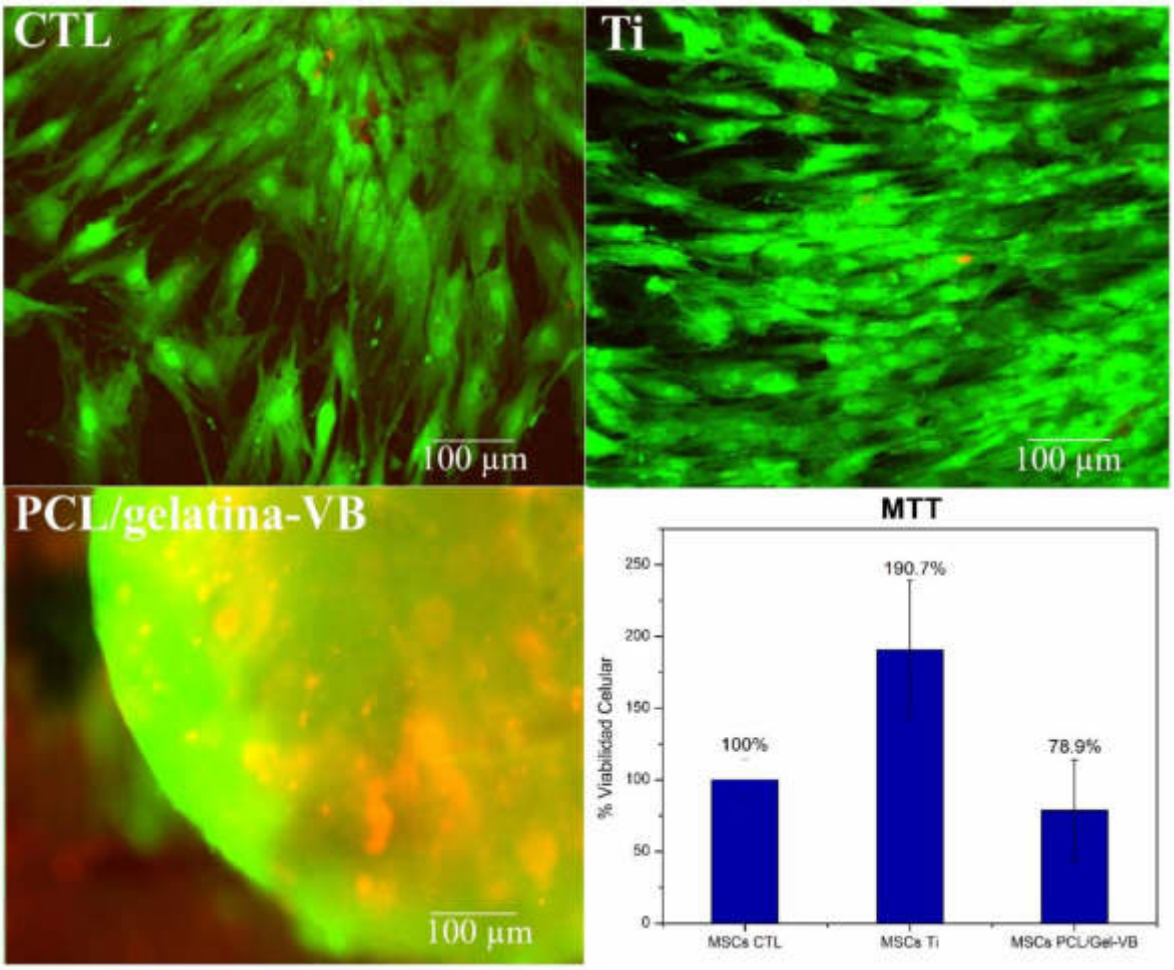


Figura 41. Evaluación mediante calceína-AM y MTT de MSCs cultivadas sobre CTL, Ti y PCL/gelatina-VB

La evaluación complementaria con MSCs mostró respuestas diferenciadas entre los sistemas estudiados. El recubrimiento PCL/quitosano-VB presentó una respuesta menos favorable tanto en términos de viabilidad como de morfología celular, mientras que PCL/gelatina-VB mostró una viabilidad superior al umbral establecido, aunque con una distribución celular limitada sobre la superficie. Estos resultados complementarios permitieron identificar diferencias en la interacción de las MSCs con los recubrimientos y contribuyeron a delimitar las condiciones consideradas en la evaluación biológica principal.

Anexo B. Participaciones académicas, producción científica y reconocimientos

B.1 Publicaciones científicas

Salazar-Fuentes, G.I., Vázquez-García, R.Á., Vázquez-Rodríguez, S., Fonseca García, A., Ramírez García, G., Pérez-Isidoro, R., García-Hernández, A.B., González-Pérez, G., Estrada-Villegas, G. M. (2025. Bioactive glass-polyethyleneimine fiber coating for medical-grade nickel alloy. Journal of Materials Science.

B.2 Participación en congresos y eventos científicos

1. Simposio de Química Aplicada a Materiales (SQAM), CIQA Unidad Monterrey, Monterrey, Nuevo León, 2026. Presentación de poster en modalidad presencial.
2. XI Seminario Regional de Materiales Avanzados, Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo (UAEH), 2025. Presentación de póster en modalidad virtual.
3. III Congreso Nacional de Nanotecnología, Monterrey, Nuevo León, 2024. Presentación de poster en modalidad presencial.
4. Segundo Encuentro Estudiantil PIIT, Monterrey, Nuevo León, 2024. Presentación de póster en modalidad presencial.
5. XXVII Congreso Nacional de la Sociedad Polimérica de México A.C, Saltillo, Coahuila, 2024. Presentación oral.
6. VII Seminario Regional de Materiales Avanzados, Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo (UAEH), 2024. Presentación de póster en modalidad virtual.
7. Simposio de Química Aplicada a Materiales (SQAM), Monterrey, Nuevo León, 2024. Presentación de póster en modalidad virtual.
8. 31st International Materials Research Congress (IMRC), Cancún, Quintana Roo, 2023. Presentación de póster en modalidad presencial.
9. VII Seminario Regional de Materiales Avanzados, Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo(UAEH), 2023. Presentación de póster en modalidad virtual.

10. LatinXChem 2023. Presentación de poster en modalidad virtual.
11. XXXV Congreso Nacional de la Sociedad Polimérica de México A.C, Monterrey, Nuevo León, 2022. Presentación oral.

B3. Reconocimientos académicos

1. Tercer lugar en la categoría de poster presencial durante el Simposio de Química Aplicada a Materiales (SQAM), CIQA Unidad Monterrey, 2026.
2. Tercer lugar en la categoría de poster virtual durante el VII Seminario Regional de Materiales Avanzados, Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo (UAEH), 2023.

B4. Participación académica y liderazgo estudiantil

1. Integrante del comité evaluador en ExpoCiencias/FEMECI Nuevo León, 2026.
2. Chair-Man del Simposio de Química Aplicada a Materiales (SQAM), CIQA, Unidad Monterrey, 2026.
3. Asesora de proyecto en el Verano de Investigación del PIIT, Monterrey, Nuevo León, 2025.
4. Integrante del comité evaluador en ExpoCiencias/FEMECI Nuevo León, 2025.
5. Chair-Man del Simposio de Química Aplicada a Materiales (SQAM), CIQA, Unidad Monterrey, 2024.
6. Impartición de la charla de divulgación científica “Divulgadoras Mexicanas”, CITNOVA, 2024.
7. Impartición del taller “Evaluación de propiedades mecánicas de biopolímeros como reemplazo de materiales plásticos”, Mujeres en la Ciencia, Monterrey, Nuevo León, 2023.