

SÍNTESIS DE BIOMATERIALES, PRUEBAS DE BIOCOMPATIBILIDAD IN VITRO, PRIMEROS PASOS EN INGENIERÍA TISULAR EN BOLIVIA

SYNTHESIS OF BIOMATERIALS, IN VITRO BIOCOMPATIBILITY TESTS, FIRST STEPS IN TISSULAR ENGINEERING IN BOLIVIA

FLORES - Irma¹, GUTIERREZ - Blanca¹, ESCALERA - Mavis¹, CALIZAYA - Edsson¹, SALAZAR - Ivana¹, VILLARROEL - Erik¹, SOLIS - Javier¹, MIRANDA - Andres², ANTEZANA - Alex³, ARZABE - José Omar¹

1 CITEMA, Dpto. de Química, FCyT, UMSS, Cochabamba, Bolivia

2 Carrera Biología, FCyT, UMSS, Cochabamba, Bolivia

3 Centro de Traumatología Deportiva, Cochabamba, Bolivia

o.arzabe@umss.edu.bo

Sucre, Bolivia

Recibido en 13 de septiembre de 2018

Aceptado en 21 de octubre de 2018

Resumen

El desarrollo de biomateriales bioactivos como andamios para la osteointegración o regeneración de tejidos ha dado grandes pasos, el presente trabajo, muestra los procesos de síntesis de biomateriales como la hidroxiapatita, biomateriales del sistema SiO₂-CaO-P₂O₅-Al₂O₃ y biovidrios del sistema SiO₂.Li₂O, se ha logrado caracterizar los biomateriales obtenidos, con resultados similares a los de otros investigadores por técnicas con la Difracción de Rayos X y la Microscopía Electrónica de Barrido, se ha evaluado su comportamiento en pruebas de biocompatibilidad y bioactividad en soluciones de Plasma Rico en Factores de Crecimiento y Fluido corporal simulado, seguidamente y con el fin de evaluar la incorporación de sustancias antibacteriales se ha dopado uno de ellos con plata, logrando determinar que el material tiene esta capacidad, estos resultados son los primeros pasos para encarar posteriores trabajos en el campo de la Ingeniería Tisular en Bolivia, y de esta forma encarar procesos de osteointegración y regeneración de tejidos en general.

Palabras clave: Ingeniería tisular, Síntesis, Biomateriales, biocompatibilidad *in vitro*

Abstract

The development of bioactive biomaterials as scaffolds for osseointegration or tissue regeneration has taken great steps, the present work shows the synthesis processes of biomaterials such as hydroxyapatite, biomaterials of the SiO₂-CaO-P₂O₅-Al₂O₃ system and bio-libraries of the SiO₂ system. Li₂O, it has been possible to characterize the biomaterials obtained, with results similar to those of other researchers by techniques with X-ray Diffraction and Scanning Electron Microscopy, their behavior in biocompatibility and bioactivity tests in Plasma Rico solutions has been evaluated in Growth factors and simulated body fluid, then and in order to evaluate the incorporation of antibacterial substances, one of them has been doped with silver, managing to determine that the material has this capacity, these results are the first steps to face further work in the field of Tissue Engineering in Bolivia, and thus face Osteointegration processes and tissue regeneration in general.

Key words: Tissue engineering, Synthesis, Biomaterials, in vitro biocompatibility

Introducción

Hoy en día hablamos de un nuevo concepto, conocido como "Ingeniería Tisular", entre los objetivos de este novedoso campo están la regeneración, reparación o reemplazo bioartificial de tejidos y órganos propios del cuerpo humano, que han sido dañados por diversos factores, tales como trauma, quemaduras, por enfermedades adquiridas como el cáncer o ciertas anomalías congénitas, se basa en tres componentes fundamentales: Células, Andamios y Biomoléculas, inductores o factores de crecimiento (1).

Entre los andamios utilizados se puede hablar de los biomateriales, nos referimos a los materiales que interactúan con sistemas biológicos y que se aplican en diversas ramas de la medicina. Estos pueden dividirse en biocompatibles y bioactivos, los primeros no sufren modificaciones durante su servicio, los segundos tendrán una interacción dentro del sistema (2).

El campo de aplicación de los biomateriales es amplio y abarca elementos y dispositivos de uso diario en centros de salud, como jeringas, vendajes, catéteres, etc. hasta piezas sofisticadas que se utilizan en la regeneración de tejidos o remplazo de órganos, es el caso de prótesis de distintos usos, implantes y otros (3).

El desarrollo de nuevos andamios con características de biomateriales con propiedades físicas, químicas y mecánicas debe seguirse explorando; actualmente, la combinación de colágeno, hidroxiapatita, péptidos osteogénicos y células madre, es el biocomplejo idóneo (1).

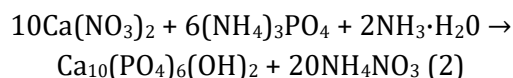
En la búsqueda de distintos andamios con características biomateriales la presente investigación estudió los procesos de biocompatibilidad *in vitro* de diferentes materiales sintetizados en nuestros laboratorios, es el caso de hidroxiapatita sintética (4), biovidrios del sistema SiO₂-CaO-P₂O₅-Al₂O₃ (5) y biovidrios del sistema SiO₂-Li₂O (6), logrando su caracterización química, mineral y estructural, su actividad bioactiva fue evaluada en pruebas sobre fluido corporal simulado y en algunos casos en plasma rico en plaquetas, se estudió también la actividad antimicrobiana de algunos dopantes utilizados en la preparación de los biomateriales, logrando obtener materiales que en un futuro puedan ser utilizados en ensayos *in vivo*, siguiendo los protocolos correspondientes a este tipo de investigaciones, es decir presentación al comité de ética y obtener el consentimiento informado ya sea para trabajos en animales o humanos.

Métodos

Síntesis de biomateriales

- Hidroxiapatita

La hidroxiapatita se sintetizó por vía húmeda a partir de la siguiente reacción:



La síntesis incluye los siguientes pasos:

- Preparación de las soluciones de Ca(NO₃)₂ y (NH₄)₃PO₄ en concentraciones adecuadas,
- Adición de amoníaco NH₄·OH.
- Adición de solución de Ca(NO₃)₂ gota a gota sobre la solución de (NH₄)₃PO₄ bajo agitación constante por 24 horas.
- Reposo, filtración y lavado del precipitado formado

- Secado y calcinación a 1100°C.

- **Biomateriales del sistema SiO₂-CaO-P₂O₅-Al₂O₃**

El procedimiento de síntesis por proceso de sol.gel es el propuesto por Balamurugan A. y col. (7):

- Utiliza como base Zeolita Clinoptilolita, en una solución 0,1 M de Ácido nítrico y se deja reaccionar bajo agitación durante 60 [min] en un frasco de vidrio con tapa a temperatura ambiente.
- Síntesis de Biovidrio base (BG), se agregan los siguientes compuestos en secuencia, con un intervalo de 45 [min] entre un reactante y otro: Trietilfosfato (TEP) y Nitrato de Calcio Tetrahidratado.
- Se agrega de carbonato de calcio y de carbonato de sodio, después de agregar el último reactivo se continúa agitando por 1 hora.
- Para el caso de Biovidrios dopados con plata (BGAg), el recipiente de vidrio se cubre con papel aluminio, dado que la plata es fotosensible, se esperan 45 min luego de agregar Nitrato de Calcio y se agrega Nitrato de Plata y se continúa agitando por 1 hora.

- **Biomateriales Li₂O-SiO₂**

El proceso de síntesis se realizó por fusión a partir de ceniza de cascara de arroz como fuente de SiO₂ y Li₂CO₃ obtenido a partir de los recursos evaporíticos del Salar de Uyuni.

- Preparación de una mezcla de polvos con una composición de 72 % de SiO₂ y 28 % de Li₂O.
- Fusión en Horno de microondas con iglu de alta alúmina y crisol de carburo de silicio a una temperatura aproximada de 1200 °C.

Caracterización de los biomateriales

- **Análisis Químicos**

El análisis químico se realizó por métodos tradicionales de volumetría y colorimetría para los elementos mayoritarios, y Espectroscopía de Absorción atómica para los elementos minoritarios.

- **Difracción de Rayos X**

El análisis mineralógico de fases sólidas cristalinas se realizó en un equipo de Difracción de Rayos X (DRX) marca PanAnalytical Expert Plus con tubo generador de Rayos X de Cu (cobre) y filtro de Ni, radiación K alfa del Cu con longitud de onda de 1.54178 Å, bajo las condiciones de operación: Radiación a 40 Kv. y 40mA., rango de registro de 3° a 60°, velocidad de barrido del goniómetro de 2°/min, escala de detección automática, del Instituto de Investigaciones Geológicas de la Facultad de Ciencias Puras y Naturales de la Universidad Mayor de San Andres.

- **Microscopía Electrónica de Barrido (MEB)**

El equipo utilizado fue el Microscopio Electrónico de Barrido (JSM - T100 SCANNING MICROSCOPE) del Instituto de Investigaciones Geológicas de la Universidad Mayor de San Andres, nos permitió obtener micrografías de los materiales obtenidos y las modificaciones microestructurales luego de ser sumergidos en Fluido Corporal Simulado y Plasma Rico en Plaquetas.

Ensayos de Biocompatibilidad

- **Preparación de Fluido Corporal Simulado (SBF)**

Se preparó 1000 ml de SBF, con 700 ml de agua destilada en un recipiente plástico de 1000 ml. en baño de agua termoregulado a 36± 1,5°C bajo agitación, adicionar los reactivos uno por uno, en el orden que aparece en la Tabla 1

siguiendo la metodología de Tadashi Kakubo (8).

Tabla 1. Reactivos para la preparación de SBF

| Nº | Reactivo | Cantidad | Pureza (%) |
|----|--|----------|------------|
| 1 | NaCl | 8,035 g | 99,5 |
| 2 | NaHCO ₃ | 0,355 g | 99,5 |
| 3 | KCl | 0,225 g | 99,5 |
| 4 | K ₂ HPO ₄ *3H ₂ O | 0,231 g | 99,0 |
| 5 | MgCl ₂ *6H ₂ O | 0,311 g | 98,0 |
| 6 | HCl | 39 ml | - |
| 7 | CaCl ₂ | 0,292 g | 99,5 |
| 8 | Na ₂ SO ₄ | 0,072 g | 99,0 |
| 9 | Tris(hidroximetil)aminometano | 6,118 g | 99,0 |
| 10 | HCl | 0-5 ml | - |

Ensayo de biocompatibilidad. Sumergir el biomaterial en SBF en una caja Petri y se lleva a una incubadora por 5 días a temperatura de 36°C, y se procede a separar los biomateriales para su estudio por MEB.

- **Extracción de Plasma rico en factores de crecimiento (PRGF)**

Para la obtención de Plasma Rico en Factores de Crecimiento se procede a la extracción de sangre del paciente y se dispone en tubos con anticoagulante (Citrato sódico al 3,8 %) para posteriormente introducir en una centrifugadora; la sangre debe centrifugarse inmediatamente tras la extracción y sin haber sido refrigerada ni manipulada; equilibrar la centrífuga y hacer girar la sangre (16 minutos) a 3200 RPM. Se procede a la extracción del fragmento de plasma situado por encima de los elementos conforman la sangre. Toda la manipulación de los dispositivos hay que realizarla asépticamente, para minimizar las posibilidades de contaminar las fracciones de plasma obtenidas. Todo el procedimiento no debe pasar de los 45 minutos.

Cabe mencionar que en este trabajo de investigación no se produjo la activación

plaquetaria con cloruro de calcio, ni gluconato de calcio. Es necesaria la utilización de una cabina de flujo laminar adecuada en los procesos de fraccionamiento y activación, que disminuye el riesgo de contaminación microbológica siguiendo la metodología de Raquel Moreno (9).

Ensayo de biocompatibilidad. Sumergir los biomateriales en PRPGF en una caja Petri y se lleva a una incubadora por 5 días a temperatura de 36°C, y se procede a separar los cristales para su estudio por MEB.

Ensayos de capacidad antibacterial.

- **Preparación del medio de cultivo.**

Se preparó 220 ml de un medio de cultivo en una autoclave, con Agar Muller Hinton, con una concentración del medio de cultivo de 8,36 g/L.

- **Antibiogramas Técnica de Kirby Bauer**

En nuestro caso se utilizó cepas de *S. aureus* y *E. Coli*. y se observó la formación de halos de inhibición, los resultados se determinan midiendo las zonas de inhibición del crecimiento de la bacteria por la efectividad del antibiótico en el estudio para el caso de los biovidrios dopados con plata.

Resultados

Preparación de los biomateriales

Los procesos de síntesis utilizados en la preparación de los biomateriales fueron satisfactorios, tal como lo muestran los resultados mostrados por las diferentes técnicas en la caracterización de los biomateriales.

Caracterización de los biomateriales

- **Análisis Químicos**

Los resultados de los análisis químicos determinados por las distintas técnicas

analíticas son los mostrados a continuación en la Tabla 2.

Tabla 2. Composición Química de los biomateriales obtenidos

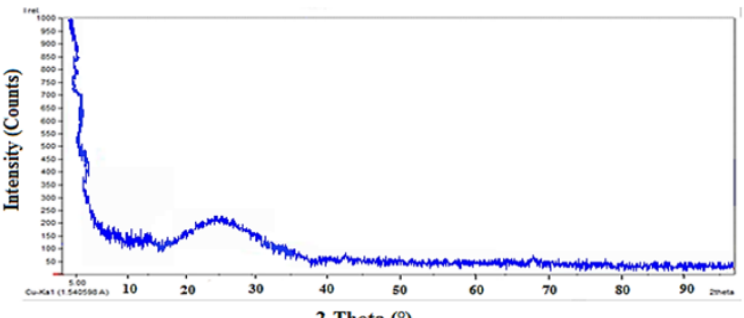
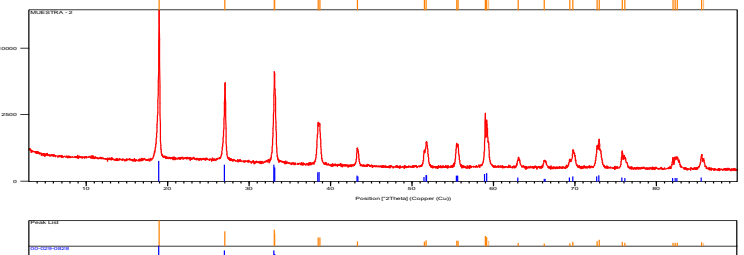
| Componentes mayoritarios (%) | Biomaterial | | | |
|------------------------------|---------------|------|------|-----------|
| | Hidroxiapatia | BG | BGAg | SiO2-Li2O |
| SiO2 | - | 55,2 | 51,4 | 71,5 |
| CaO | 52,1 | 20,5 | 19,1 | - |
| P2O5 | 34,9 | 1,3 | 1,2 | - |
| Ag2O | - | | 3,8 | - |
| Li2O | - | | - | 27,4 |
| Otros | 13 | 23 | 24,5 | 1,1 |

- Difracción de Rayos X

Los difractogramas obtenidos para los distintos biomateriales obtenidos por las diferentes vías de síntesis, se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3. Resultados de DRX de los Biomateriales obtenidos.

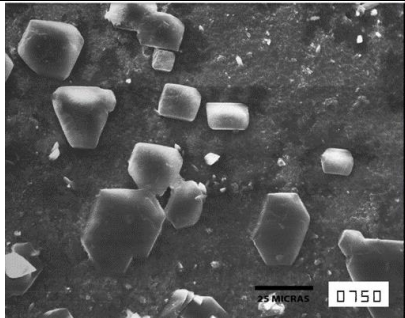
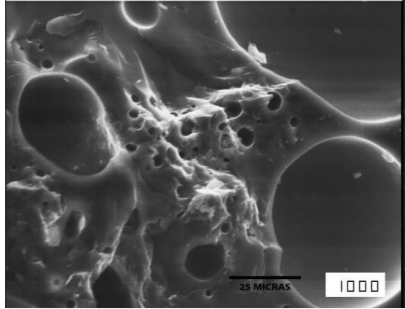
| Biomaterial | DRX | Observación |
|-----------------------|-----|--|
| Hidroxiapatita | | Formación de hidroxiapatita, con fases amorfas de fosfatos en un porcentaje muy bajo. |
| Biomaterial BG | | Formación de vitrocerámico, presencia de fase vítrea y devitrificaciones de Silicato sódico cálcico. |


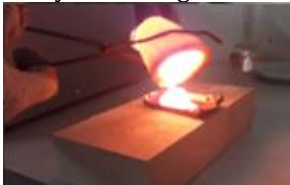
| | | |
|-------------------------------------|--|---|
| <p>Biomaterial BGAg</p> |  | <p>Se observa la formación de fase vítrea y la ausencia total de cristales, átomos de plata son parte de la red vítrea.</p> |
| <p>Biomaterial SiO2-Li2O</p> |  | <p>Se observa la formación de un vitrocerámico, fase vítrea y cristales de Silicato de Litio Li_2SiO_3</p> |

- Microscopía Electrónica de Barrido

Las micrografías de los biomateriales obtenidos se muestran en la Tabla 4. Junto a ellas fotografías de los vidrios o vitrocerámicos obtenidos.

Tabla 4. Micrografías y fotografías de los biomateriales obtenidos

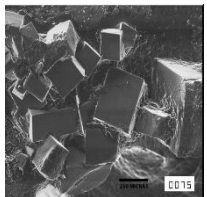
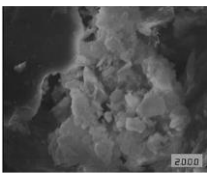
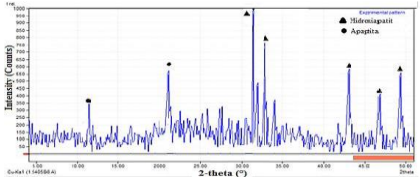
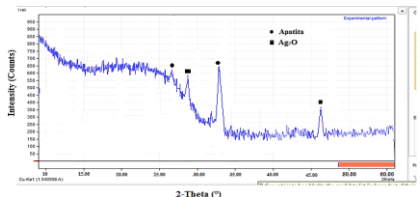
| Biomaterial | Micrografía MEB | Observación |
|--------------------------------|---|--|
| <p>Hidroxiapatita</p> |  | <p>Micrografía MEB de polvos, se observa la formación de cristales de hidroxiapatita.</p> |
| <p>Biomaterial BG</p> |  | <p>Micrografía MEB en fractura fresca, se observa la formación de fase vítrea y cristales</p> |
| <p>Biomaterial BGAg</p> | <p>Micrografía MEB en fractura fresca, similar a Biomaterial BG</p> | <p>Formación de fase vítrea y la ausencia total de cristales. Fotografía de los biomateriales obtenidos.</p> |

| | | |
|------------------------------|----------------|--|
| | |  |
| Biomaterial SiO2-Li2O | No se realizó. | Se observa la formación de un vitrocerámico. Fusión en horno de microondas y crisol de grafito.  |

- **Ensayos de Biocompatibilidad**

El seguimiento a la biocompatibilidad, después de la inmersión en los fluidos de SBF y PRP se han realizado mediante la MEB y la DRX, los resultados encontrados se muestran en la Tabla 5.

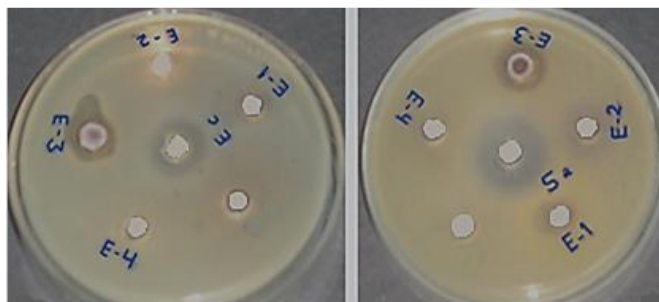
Tabla 5. Cambios observados en la inmersión en SBF y PRP

| Biomaterial | Micrografía MEB | DRX | Observación |
|------------------------------|---|--|---|
| Hidroxiapatita |  | No se realizó, el espectro sería el mismo porque solo hay incremento de fases de hidroxiapatita. | Formación de una interfase entre cristales y SBF, resultados similares en PRGF. |
| Biomaterial BG |  |  | Formación de cristales de hidroxiapatita y apatita, confirmado por DRX |
| Biomaterial BGAg | Micrografía MEB en polvo, similar a BG después de inmersión en fluidos. |  | Formación de apatita y formación de Ag2O, evidenciado por DRX. |
| Biomaterial SiO2-Li2O | | No se realizó. | |

- **Ensayos de capacidad antibacterial.**

El ensayo se realizó con el biomaterial BGAg, debido a que es conocida la acción antibacterial de la plata, obteniéndose los resultados mostrados en la Figura 1.

Figura 1. Acción antibacterial de iones plata presentes en biomaterial BGAg.



Las pruebas antibacterianas muestran una zona de inhibición claramente visible donde las bacterias no están presentes alrededor de los gránulos de vidrio, el diámetro del halo alrededor de las muestras, en el caso de *S.aureus*, alcanzó 10 mm; en el caso de *E. coli*, 5 mm., según la norma (SNV 195920-1992), una zona de inhibición superior a 1 mm se considera adecuada para la actividad antibacteriana.

Discusión

Los biomateriales obtenidos tienen las características adecuadas para ser utilizados como materiales bioactivos.

La caracterización de los materiales nos muestra que los biomateriales tienen las características adecuadas para su utilización en ingeniería tisular, en el caso de la hidroxiapatita será necesario conformarla y no tenerla en polvo de forma de forma similar a trabajos realizados por Gallegos Nieto (10), en el caso de los biomateriales BG y BGAg o SiO₂-Li₂O se tiene estructuras porosas similares a la estructura osea, lo que permitiría una mejor interacción con las células y biocomplejos que favorecen la bioactividad de los mismos como indica en su artículo Macías-Andrés, V. I. (11), estos resultados permitirían la osteointegración.

Los estudios de Difracción de Rayos X confirman los valores de la composición química de los biomateriales, y corresponden adecuadamente a los patrones de las fichas de difracción de rayos X de cada uno de los biomateriales obtenidos, resultados son similares a los encontrados por Londoño (12) en el caso de la hidroxiapatita y similares a muchos autores como Quiroga (13) y Mondragón (14) para el caso de los biomateriales BG, BGAg y SiO₂-Li₂O respectivamente. Los biomateriales han demostrado en diferentes estudios la capacidad de regular la liberación de iones de calcio y contribuir con la formación de tejido óseo nuevo. Sin embargo, hasta ahora continúan algunos cuestionamientos, como el efecto sobre las propiedades mecánicas, el efecto de diferentes composiciones de biovidrios y la tasa de liberación de iones, etc.

Un aspecto importante a considerar es la presencia de Ag₂O en el caso de BGAg, por lo que será necesario ver la acción de los iones plata en el medio y su disponibilidad en el organismo.

Las pruebas de biocompatibilidad alcanzan resultados similares a los obtenidos por autores como Sierra (15) y Fernandez (16), y la actividad antimicrobiana similares a Febre (17)

Conclusiones

La presente investigación muestra que es posible desarrollar andamios a partir de distintas materias primas y compuestos químicos por distintos procesos de síntesis, es el caso de la hidroxiapatita por reacción química a partir de compuestos químicos, vitrocerámicos bioactivos a partir de zeolitas del tipo clinoptilolita y compuestos químicos o vitrocerámicos bioactivos a partir de ceniza de cascara de arroz y carbonato de litio del Salar de Uyuni.

Los biomateriales sintetizados son de características similares a otros obtenidos en laboratorios de otros países, situación verificada por las técnicas de DRX, MEB, las pruebas de biocompatibilidad, en PRFG y SBF,

también evidenciadas por las técnicas indicadas y la acción antibacterial permitirían desarrollar biomateriales que pueden ser estudiados *in situ* en animales, para posteriormente pasar a ensayos en seres humanos.

El presente trabajo se constituye en uno de los primeros trabajos realizados en Bolivia sobre Ingeniería de Tejidos, con la obtención de andamios bioactivos, por lo que será necesario integrar al equipo de investigación a profesionales de otras disciplinas, lo que nos permitirá alcanzar resultados de alta calidad y permitirán su aplicación en la solución de problemas traumatológicos que requieren la osteointegración o la regeneración de tejidos en distintas partes del cuerpo humano.

REFERENCIAS

1. Rosales Ibáñez R., Ojeda Gutiérrez F., Alvarado Estrada K.N., Ingeniería Tisular en Odontología, Revista ADM (2012) Julio-Agosto, VOL. LXIX, N°. 4., 164-167.
2. Soria J. M., Barcia-González J., Andrades J. A., Romero J., Monleón Pradas M., García-Verdugo J. M., Uso de biomateriales en medicina regenerativa, aspectos básicos y aplicaciones en el Sistema Nervioso, Trauma Fund MAPFRE (2008) Vol 20 n° 1:15-22.
3. Abraham G.A., Gonzáles M.F., Cuadrado T.R., Hacia nuevos biomateriales: Aportes desde el campo de la Química Macromolecular, Anales de la Real Sociedad Española de Química, Segunda Epoca, (2001) Abril-Junio, 21-32.
4. Flores Paraguayo Irma, Gutierrez Loza Blanca N., Obtención de Hidroxiapatita por vía Húmeda, (2019) Tesis Ingeniería Química, Carreras de Química y Alimentos, Facultad de Ciencias y Tecnología, Universidad Mayor de San Simón.
5. Escalera Almanza Mavis Rocío, Calizaya Garnica Edsson, Síntesis de Biovidrio por la técnica Sol-Gel a partir de Zeolita, con incorporación de metales Cobre-Plata y estudio de sus propiedades antibacteriales. (2019), Tesis Ingeniería Química, Carreras de Química y Alimentos, Facultad de Ciencias y Tecnología, Universidad Mayor de San Simón.
6. Villarroel Maida Erik Brayan, Ivana Guadalupe Salazar Padilla, Obtención de vitrocerámicos del sistema nLi₂O.mSiO₂ a partir de recursos naturales bolivianos y residuos agroindustriales. (2019) Tesis Ingeniería Química, Carreras de Química y Alimentos, Facultad de Ciencias y Tecnología, Universidad Mayor de San Simón.
7. Balamurugan A., Balossier G., Laurent-Maquin D., Pina S., Rebelo A.H.S., Faure J., Ferreira J.M.F. An *in vitro* biological and anti-bacterial study on a sol-gel derived silver-incorporated bioglass system, Dental Materials, 24, 10. 2008. 1343-1351.

8. Tadashi Kokubo, Hiroaki Takadama. How useful is SBF in predicting in vivo bone bioactivity? (2006), *Biomaterials*, Volume 27, Issue 15, May 2006, Pages 2907-2915.
9. Raquel Moreno, Marisa Gaspar Carreño, José Jiménez Torres, José María Alonso Herreros, Ana Villimar, Piedad López Sánchez, (2015) *Farm Hosp.*;39(3):130-136.
10. Gallegos Nieto, Enrique, Medellín Castillo, Hugo I., & de Lange, Dirk F. (2013). Análisis del desempeño estructural de andamios de hidroxiapatita utilizados en ingeniería tisular. *Ingeniería mecánica, tecnología y desarrollo*, 4(5), 185-194.
11. Macías-Andrés, V. I., Orozco-Sixtos, J. M., Maldonado-Paleo, J., & Aguilar-Reyes, E. A. (2017). Evaluación de la Permeabilidad en Andamios Macroporosos de Bioglass 45S5 para Ingeniería de Tejidos. *Revista mexicana de ingeniería biomédica*, 38(1), 273-279.
12. Londoño, Marta Elena, Echavarría, Alejandro, De La Calle, Francenith, (2006), Características cristaloquímicas de la Hidroxiapatita sintética tratada a diferentes temperaturas, *Revista EIA [en línea]*, (Junio-Sin mes) Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=149216902009>. ISSN 1794-1237.
13. Quiroga, Gisela Alejandra Ramona, Redondo, Franco Leonardo, Ninago, Mario Daniel, Ciolino, Andrés Eduardo, Villar, Marcelo Armando, & Santillán, María José. (2018). Fabricación de recubrimientos compuestos de Bioglass®/poli(ε-capro-lactona) obtenidos por co-deposición electroforética sobre acero inoxidable. (2018) *Matéria (Rio de Janeiro)*, 23(2), e12097. Epub July 19, 2018. <https://dx.doi.org/10.1590/s1517-707620180002.0431>.
14. Mondragón Gutiérrez Georgina, (2007), Síntesis de Li₂SiO₃ a baja temperatura, Instituto de Investigaciones en Materiales. Universidad Nacional Autónoma de México, Tesis Maestría.
15. Sierra Uribe, Jhon H, Bravo Molina, Oscar M, Acevedo Peña, Próspero, & Córdoba Tuta, Elcy M. (2015). Evaluación electroquímica de recubrimientos de biovidrio/Al₂O₃ soportados sobre acero inoxidable AISI 316L y su relación con el carácter bioactivo de las películas. *Revista Latinoamericana de Metalurgia y Materiales*, 35(2), 151-164.
16. Fernández, Haney Castro, & Lozano, Oscar E. Ledea, (2010). Determinación de la bioactividad y la resistencia a la compresión de bloques de Poliapatita. *Química Nova*, 33(4), 891-894.
17. Febré Naldy, Silva Viviana, Báez Andrea, Palza Humberto, Delgado Katherine, Aburto Isabel, (2016), Comportamiento antibacteriano de partículas de cobre frente a microorganismos obtenidos de úlceras crónicas infectadas y su relación con la resistencia a antimicrobianos de uso común. *Rev. méd. Chile*; 144(12): 1523-1530.