

UNIVERSIDAD  
**NACIONAL**  
DE COLOMBIA

# **Desarrollo de un scaffold para regeneración ósea mediante impresión 3D de una pasta cerámica compuesta de una mezcla de fosfatos de calcio y biovidrio**

**Natalia I. Jaramillo Gómez**

Universidad Nacional de Colombia  
Facultad de Minas, Departamento de Materiales y Minerales  
Medellín, Colombia  
2021

# **Desarrollo de un scaffold para regeneración ósea mediante impresión 3D de una pasta cerámica compuesta de una mezcla de fosfatos de calcio y biovidrio**

**Natalia I. Jaramillo Gómez**

Tesis presentada como requisito parcial para optar al título de:  
**Doctora en Ingeniería- Ciencia y Tecnología de Materiales**

Director (a):

Prof. Carlos Guillermo Paucar Álvarez, MSc. PhD.

Línea de Investigación:

**Biomateriales**

Grupo de Investigación:

**Cerámicos y Vítreos**

Universidad Nacional de Colombia  
Facultad de Minas, Departamento de Materiales y Minerales  
Medellín, Colombia  
2021

***“No le digas a la gente como hacer las cosas,  
Diles qué hacer y déjalos que  
Te sorprendan con sus resultados “***

***George S. Patton Jr.***

## Agradecimientos

Es inevitable mirar hacia atrás y recordar tantas situaciones vividas, puedo decir que no fue un camino fácil de recorrer, que estuvo lleno de dificultades, pero también de grandes bendiciones. A Dios infinitas gracias por haberme sostenido y por haber puesto en mi camino personas que nunca permitieron que me rindiera, que fueron voces de aliento y que cada vez que me sentí derrotada fueron los encargados de recordarme cada una de mis capacidades y talentos.

Al finalizar este trabajo y evaluar el aprendizaje, aunque fue importante el adquirido en el campo académico; el aporte de cada una de las personas que me acompañaron fue fundamental para crecer como estudiante, como profesional y como persona.

A mi familia, no hay palabras que puedan expresar tanta gratitud. A mi madre gracias por enseñarme a ser resiliente, por ser uno de mis pilares y por valorarme como soy. A mi padre que en cuerpo no saboreara este triunfo, sé que se sintió orgulloso hasta su último suspiro de la persona que formó. A los demás miembros de mi familia, mi esposo, abuela, mis hermanos, mi cuñada y sobrinas gracias por siempre tener una voz de aliento, por su compañía y solidaridad en todo momento. GRACIAS familia por enseñarme que nadie “TIENE LA POSIBILIDAD DE PONER GRILLETES AL PENSAMIENTO”

Al profesor Carlos Paucar le agradezco infinitamente el haber creído en mí a pesar de las circunstancias y aceptar ser mi director de tesis, más que un profesor se convirtió en mi MAESTRO ese que día a día batalló y sufrió conmigo las vicisitudes que se presentaban. Encargado de darme las más gratas palabras de aliento, siempre me dejó ser libre de pensamiento y jamás trato de imponer sus ideas a pesar de su gran experiencia. Admiro que siempre fue una persona que vio lo bueno de mi proceso, notó cada uno de los sacrificios y fue benevolente con sus consejos y puntos de vista. Gracias por la confianza depositada en mi trabajo, por esa capacidad que posee para guiar a sus alumnos y dar aportes invaluable en la vida de cada uno, no solo a nivel académico sino también en la formación personal. Su orientación fue clave en el trabajo que hemos realizado juntos, el cual hoy no se hubiera concebido sin su participación.

**V** Desarrollo de un scaffold para regeneración ósea mediante impresión 3D de una pasta cerámica compuesta de una mezcla de fosfatos de calcio y biovidrio

---

A mis compañeros del grupo cerámicos y vítreos: Alex Lopera, Sebastián Restrepo, Jennifer Caballero, Sebastián Ocampo, del grupo GIOM a Isabel Moreno, Niza Otero, Miriam a Isabel Gómez del laboratorio de biología molecular, a los laboratorista de química de la Universidad Nacional sede Medellín Jaime y Aníbal, a Valentina Ospina de biotecnología, solo quedan gratos y grandes recuerdos. Como estudiantes vemos día a día las luchas internas de cada uno, esa necesidad de superar obstáculos impuestos no sólo por el sistema sino también por la egolatría de quienes imparten el conocimiento. Cabe resaltar que como grupos de investigación somos insuperables, es invaluable la sed de conocimiento que tenemos y la capacidad de compañerismo que poseemos. Gracias por tan valiosos aportes que favorecen esta investigación.

A la universidad Cooperativa de Colombia por brindarme sus instalaciones para generar aportes en el campo biológico y porque allí encontré personas valiosas con gran calidad humana.

Y no menos importante, a mi hija que con sus travesuras llegó para demostrarme lo simple de la vida, a valorar lo realmente importante y a luchar por lo que deseo alcanzar.



## Resumen

Las enfermedades, lesiones y traumatismos pueden provocar degeneración y daños irreversibles en los tejidos del cuerpo humano, lo que hace necesario recurrir a tratamientos y/o procedimientos que faciliten su reparación, reemplazo o regeneración, en especial los trastornos óseos que van aumentando con la edad de la población. Los procedimientos realizados a nivel mundial se fundamentan principalmente en recuperar la pérdida de tejido óseo o reparar su funcionalidad mediante inclusión de materiales que suplan la función original. Los más utilizados han sido los injertos óseos para tratar las fracturas, reemplazar o regenerar el tejido óseo dañado, así como el uso de biomateriales, los cuales poseen propiedades biomecánicas, bioactividad y capacidad de reabsorción atractivas. Los sustitutos óseos requieren del conocimiento del ambiente donde ocurrirá el reemplazo. Sin embargo, la evolución de éstos ha dado lugar a cambios en los requisitos y propiedades de los materiales a utilizar. Aun cuando los scaffolds para regeneración ósea han sido ampliamente estudiados, aún quedan inconvenientes por superar tales como la correcta combinación de sus propiedades mecánicas, velocidad de degradación, porosidad, biocompatibilidad, biodegradabilidad, osteoconductividad e integración funcional al hueso.

Con el ánimo de proveer una alternativa diferente a los implantes óseos ya existentes, en el presente trabajo se muestra la síntesis del fosfato de calcio ( $\beta$ -TCP) y posterior con inclusión de iones de Mg (con el fin de observar su efecto bacteriostático) y un biovidrio de boro (BGB) dentro del sistema  $X \text{ B}_2\text{O}_3 [100-X] (61\text{SiO}_2 \cdot 9 \text{ P}_2\text{O}_5 \cdot 30\text{CaO})$  controlando las variables físico-químicas que influyen en la estructura obtenida. Para la síntesis de estos materiales se exploraron diferentes técnicas como: auto combustión o combustión en solución, fusión, hidrotermal y sol gel, de estos métodos fue escogido el que presentó un mejor resultado en cuanto a degradabilidad, obtención del material cerámico y vítreo apto para la producción del scaffold. La pasta cerámica para la conformación del scaffold por manufactura aditiva (Impresión 3D) fue formulada basados en el diseño de experimentos (DOE). La caracterización de los polvos cerámicos, la

pasta cerámica y los scaffolds fue realizada estructuralmente por difracción de rayos X (DRX), morfología, porosidad e interconectividad de los poros por microscopía electrónica de barrido (SEM), tamaño de partícula por distribución de tamaño de partícula, espectroscopia infrarroja (FTIR), degradabilidad (norma ISO 10993-14), en especial para los scaffolds la bioactividad in vitro mediante pruebas de inmersión en SBF dispuestas por Kokubo en diferentes intervalos de tiempo. Los scaffolds fueron caracterizados de manera biológica con el fin de evaluar la capacidad del material para interactuar con células madre mesenquimales provenientes de tejido adiposo y pulpa dental con posterior diferenciación osteogénica. También fueron evaluados el comportamiento de este frente a bacterias comunes presentes en el cuerpo humano principalmente en la cavidad bucal.

Los resultados evidenciaron la obtención de Biovidrio de boro (BGBS) por la técnica sol-gel y fosfato de calcio asociado a la fase  $\beta$  por auto combustión, demostrando el carácter amorfo del biovidrio y las fases cristalinas asociadas al  $\beta$ -TCP, el BGBS con 30% w boro y ( $\beta$ -TCP)B y ( $\beta$ -TCP)Mg presentaron mejor degradabilidad. Para la formulación de la pasta cerámica se utilizó un DOE cuya mejor respuesta fue una mezcla en peso del 66,5% de fosfato de calcio  $\beta$ -TCP y 28,5% de BGBS, 3% de Atapulgita y 2% de agua. La impresión 3D para la conformación del scaffold fue llevada a cabo en una impresora Wasp modelo Delta 20 × 40, utilizando una jeringa con carga de 2ml con aguja 23G (0,8 mm de Diámetro), el scaffold presenta una geometría tipo Schwartz D (diamante) ideal para la simulación de hueso nativo. Los scaffolds presentaron buenas propiedades de degradabilidad, bioactividad, porosidad e interconectividad de poros. En cuanto a la actividad antibacteriana, BGBS y  $\beta$ -TCP/Mg presentaron efectos inhibitorios frente a *S. mutans*. Las células madre mesenquimales provenientes de tejido adiposo y pulpa dental evidenciaron buena adhesión y proliferación celular en contacto con los scaffolds, siendo los scaffolds dopados con Mg un mejor promotor de la proliferación celular, además de esto; no generan ningún efecto citotóxico en las células, la diferenciación a un ambiente osteogénico fue comprobada por medio de la actividad de fosfatasa alcalina.

Palabras Claves: Pasta cerámica, impresión 3D, Scaffold, Regeneración ósea.

# Development of a scaffold for bone regeneration through 3D printing of a ceramic paste composed of a mixture of calcium phosphates and bioglass

## Abstract

Diseases, injuries and traumas can cause degeneration and irreversible damage to the tissues of the human body, which makes it necessary to resort to treatments and / or procedures that facilitate their repair, replacement or regeneration, especially bone disorders that increase with age of the population. The procedures performed worldwide are mainly based on recovering the loss of bone tissue or repair its functionality by including materials that meet the original function. The most used have been bone grafts to treat fractures, replace or regenerate damaged bone tissue, as well as the use of biomaterials, which have attractive biomechanical properties, bioactivity and reabsorption capacity. Bone substitutes require knowledge of the environment where the replacement will occur. However, the evolution of these has led to changes in the requirements and properties of the materials to be used. Even though scaffolds for bone regeneration have been widely studied, there are still disadvantages to overcome such as the correct combination of their mechanical properties, rate of degradation, porosity, biocompatibility, biodegradability, osteoconductivity and functional integration to bone.

With the aim of providing a different alternative to existing bone implants, the present work shows the synthesis of bactericidal calcium phosphate ( $\beta$ -TCP) with the inclusion of Mg ions ((in order to observe its bacteriostatic effect) and a boron bioglass (BGB) within the system  $X B_2O_3 [100-X] (61SiO_2 \cdot 9 P_2O_5 \cdot 30CaO)$  controlling the physicochemical variables that influence the obtained structure. For the synthesis of these materials, 3

methods were explored, such as combustion solution, Fusion, hydrothermal and sol gel. Of these methods, the one that presented the best results in terms of biodegradability and obtaining ceramic and vitreous materials suitable for the production of the scaffolds was chosen. The ceramic paste for the conformation of the scaffolds by additive manufacturing (3D printing) was formulated based on the design of experiments (DOE)

The characterization of the ceramic powders, the ceramic paste, and the scaffolds were carried out structurally by X-ray diffraction (XRD), morphology, porosity, and interconnectivity of the pores by scanning electron microscopy (SEM), particle size by the size distribution of particle, infrared spectroscopy (FTIR), degradability (ISO 10993-14), especially for in vitro bioactivity scaffolds using immersion tests in SBF arranged by Kokubo at different time intervals. The scaffolds were biologically characterized to evaluate the material's ability to interact with mesenchymal stem cells from adipose tissue and dental pulp with subsequent osteogenic differentiation. The behavior of this against common bacteria present in the human body, mainly in the oral cavity, was also evaluated. The results evidenced the obtaining of Boron Bioglass (BGBS) by the sol-gel technique and calcium phosphate associated with the  $\beta$  phase by self-combustion, demonstrating the amorphous nature of the bioglass and the crystalline phases associated with  $\beta$ -TCP, BGBS with 30 %w boron and ( $\beta$  -TCP) and 5%w Mg ( $\beta$  -TCP) exhibit better degradability. For the ceramic paste formulation, select a DOE whose best response is a mixture by weight of 66.5% of calcium phosphate  $\beta$ -TCP and 28.5% of BGBS, 3% of Attapulgate and 2% of water. 3D printing for the scaffolding is carried out in a Wasp Delta 20  $\times$  40 printers, using a 2 ml syringe with a 23G needle (0.8 mm diameter), the scaffold has a geometry type Schwartz D (diamond) ideal for simulating native bone. The scaffolds selected have good properties degradability, bioactivity, porosity, and interconnectivity pores. Regarding antibacterial activity, BGBS and  $\beta$  -TCP / Mg, inhibitory effects against *S. mutans*. Mesenchymal stem cells from adipose tissue and dental pulp showed good adhesion and cell proliferation in contact with the scaffolds, with Mg-doped scaffolds being a better promoter of cell proliferation, in addition to this; there are no cytotoxic effects in the cells, the differentiation in an osteogenic environment was verified by means of alkaline phosphatase activity.

**Key words:** Ceramic paste, 3D printing, Scaffold, Bone regeneration.

## Contenido

Resumen.....	VII
Abstract.....	IX
Lista de figuras .....	XV
Lista de tablas.....	XIX
Lista de abreviaturas.....	XXI
Introducción.....	19
<b>Objetivos .....</b>	<b>21</b>
<b>Objetivo General.....</b>	<b>21</b>
<b>Objetivos Específicos .....</b>	<b>21</b>
<b>Alcances del proyecto .....</b>	<b>22</b>
<b>Referencias Bibliográficas .....</b>	<b>23</b>
<b>CAPÍTULO 1:.....</b>	<b>19</b>
<b>MARCO TEÓRICO Y ESTADO DEL ARTE.....</b>	<b>19</b>
<b>1. Marco Teórico .....</b>	<b>19</b>
<b>1.1. Generalidades del Tejido Óseo y Dental.....</b>	<b>19</b>
1.1.1. Composición Química y Estructura Jerárquica del Hueso.....	21
1.1.2. Formación Ósea .....	29
1.1.3. Remodelación Ósea.....	31
<b>1.2. Biomateriales en Regeneración ósea .....</b>	<b>34</b>
1.2.1. Polímeros Naturales .....	35
1.2.2. Polímeros Sintéticos .....	37
1.2.3. Metales .....	38
1.2.4. Cerámicos .....	38
1.2.4.1 Biovidrios .....	39

---

1.2.4.1.1	Bioactividad .....	44
1.2.4.1.2	Métodos de Obtención Biovidrios .....	47
1.2.4.2	Fosfatos de Calcio .....	48
1.2.4.2.1	Fosfatos Monocálcico Monohidratado (MCPM) y Fosfato Monocálcico Anhidrido (MCPA) .....	52
1.2.4.2.2	Fosfatos Dicálcico Dihidratado (DCPD) y Fosfato Dicálcico Anhidro (DCPA) .....	52
1.2.4.2.3	Fosfato Octacálcico (OCP) .....	52
1.2.4.2.4	Fosfato de Calcio Amorfo (ACP) .....	52
1.2.4.2.5	Hidroxiapatita (HA).....	53
1.2.4.2.6	Fosfato Tetracálcico (TTCP).....	53
1.2.4.2.7	Fosfato Tricálcico ( $\alpha$ y $\beta$ ) .....	53
1.2.4.2.8	Solubilidad de los Fosfatos de Calcio .....	54
1.2.4.2.9	Obtención de Fosfatos de Calcio.....	57
1.3.	Scaffolds en Regeneración Ósea.....	59
1.3.1	Características de los Scaffold.....	59
1.3.1.1	Parámetros de Diseño.....	64
1.3.1.2	Obtención de Scaffolds .....	67
1.3.1.2.1	Manufactura Aditiva (AM) –Impresión 3D .....	68
1.3.1.2.1.1	Tinta de impresión “Inkjet Printing “ .....	73
1.3.1.2.1.2	Superficies Minimales Triplemente Periódicas (TPMS).....	74
1.4.	Evaluación Antibacteriana.....	76
1.5.	Células Madre y su Diferenciación a Osteoblastos .....	77
1.6.	ESTADO DEL ARTE .....	81
1.6.1	Exploración diferentes técnicas de Manufactura Aditiva.....	85
	Referencias Bibliográficas .....	90
	CAPÍTULO 2:.....	117
	SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DEL MATERIAL CERÁMICO .....	117
2.	Introducción .....	118
2.1	Metodología Experimental .....	118
2.1.1	Síntesis De Fosfato de Calcio.....	118
2.1.1.1	Sol- Gel.....	120
2.1.1.2	Hidrotermal .....	120
2.1.1.3	Autocombustión ó combustión en solución.....	121

2.1.2	Síntesis De Biovidrio de Boro (BGB).....	122
2.1.2.1	Sol – gel .....	123
2.1.2.2	Fusión.....	124
2.1.2.3	Auto Combustión .....	125
2.2	Caracterización Material Cerámico .....	125
2.2.1	Difracción de Rayos X (DRX) .....	125
2.2.2	Tamaño de partícula.....	126
2.2.3	Espectroscopia Infrarroja con Transformada de Fourier (FTIR) .....	126
2.2.4	Degradabilidad.....	126
2.3	Resultados y Discusión de Resultados .....	127
2.3.1	Biovidrio (BG).....	127
2.3.2	Fosfatos de Calcio ( $\beta$ -TCP).....	141
2.4	Conclusiones .....	153
	Referencias Bibliográficas .....	155
	CAPÍTULO 3:.....	159
	FORMULACIÓN PASTA CERÁMICA E IMPRESIÓN 3D DEL SCAFFOLD .....	159
3.1	Formulación de la Pasta Cerámica.....	160
3.2	Diseño de experimentos (DOE) .....	161
3.3	Caracterización de la Pasta Cerámica.....	168
3.3.1	Reología.....	168
3.3.2	Difracción de Rayos X.....	168
3.3.3	Espectroscopia Infrarroja con Transformada de Fourier (FTIR) .....	168
3.3.4	Tamaño de Partícula.....	169
3.3.5	Microscopía Electrónica de Barrido (SEM) .....	169
3.4	Caracterización scaffold.....	169
3.4.1	Estereomicroscopía.....	169
3.4.2	Microscopía Electrónica de Barrido (SEM) .....	169
3.4.3	Porosidad e Interconectividad de poros.....	169
3.4.4	Degradabilidad.....	171
3.4.5	Bioactividad .....	171
3.5	Resultados y Discusión.....	172
3.5.1	Formulación Pasta Cerámica .....	172
3.6	Conclusiones .....	196

---

<b>Referencias Bibliográficas</b> .....	198
<b>CAPÍTULO 4:</b> .....	202
<b>EVALUACIÓN ACTIVIDAD BACTERIANA</b> .....	202
<b>4. Evaluación Actividad Bacteriana</b> .....	203
<b>4.1 Viabilidad Celular</b> .....	204
<b>4.2 Cuantificación de Adhesión Celular</b> .....	204
<b>4.3 Medida de Zona de Inhibición (IZ)</b> .....	206
<b>4.4 Resultados y Discusión de Resultados</b> .....	206
<b>4.4.1 Viabilidad Celular</b> .....	206
<b>4.4.2 Medida de Zona Inhibición (IZ)</b> .....	211
<b>4.5 Conclusiones</b> .....	219
<b>Referencias Bibliográficas</b> .....	220
<b>CAPÍTULO 5:</b> .....	223
<b>REGENERACIÓN ÓSEA</b> .....	223
<b>5.1 Regeneración Ósea in vitro</b> .....	224
<b>5.1.1 Obtención y Procesamiento del Tejido Adiposo</b> .....	224
<b>5.1.2 Obtención y Procesamiento Pulpa dental</b> .....	225
<b>5.2 Viabilidad por medio de MTT</b> .....	226
<b>5.3 Adhesión y Proliferación Celular</b> .....	228
<b>5.4 Diferenciación Osteogénica</b> .....	229
<b>5.4.1 Identificación Osteoblastos (Mineralización)</b> .....	229
<b>5.4.1.1 Actividad de la Fosfatasa Alcalina (ALP)</b> .....	229
<b>5.5 Resultados y Discusión</b> .....	230
<b>5.6 Conclusiones</b> .....	239
<b>Referencias Bibliográficas</b> .....	240
<b>Conclusiones Generales y Recomendaciones</b> .....	243

## Lista de figuras

Figura 1. Clasificación de los Huesos .....	20
Figura 2. a) Organización estructural jerárquica del hueso. b) Estructura típica del hueso largo .....	23
Figura 3. Células óseas.....	26
Figura 4. Estructura del diente .....	29
Figura 5. Diagrama esquemático de la osificación endocondral.....	30
Figura 6. Diagrama de la osificación intramembranosa .....	31
Figura 7. Compartimiento de remodelación Ósea (CRB).....	32
Figura 8. Fases de la remodelación ósea .....	34
Figura 9. Tipos de injertos en regeneración de tejido. ....	36
Figura 10. Clasificación de algunos compuestos de acuerdo a su papel en la formación del vidrio .....	41
Figura 11. Biovidrio y promoción del crecimiento óseo a partir de implantes e interacciones tisulares.....	45
Figura 12. Esquema del proceso de formación de la capa de hidroxiapatita después de la interacción del vidrio bioactivo con el fluido corporal simulado. ....	46
Figura 13. Diagrama de fases correspondiente al sistema CaO-P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> representando la cantidad de los diferentes compuestos en función del porcentaje molar de CaO (C=CaO; P=P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> ) .....	49
Figura 14. Diagrama de solubilidad para el sistema Ca(OH) <sub>2</sub> -H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> -H <sub>2</sub> O en la relación Log [Ca] vs pH .....	55
Figura 15. Diagrama de solubilidad para el sistema Ca(OH) <sub>2</sub> -H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> -H <sub>2</sub> O en la relación Log [P] vs pH.....	56
Figura 16. Esquema de algunas técnicas convencionales para la fabricación de Scaffold.....	67
Figura 17. Diferenciación de las células Madre.....	79
Figura 18. Propuesta Metodológica para el Desarrollo de los Objetivos de Investigación. ....	119
Figura 19. Rampa calentamiento obtención Fosfato de calcio vía Hidrotermal.....	121
Figura 20. Metodología Síntesis Fosfato de Calcio vía autocombustión. ....	122
Figura 21. Metodología Síntesis Biovidrio vía Sol-gel (BGS). ....	123
Figura 22. Metodología Síntesis Biovidrio vía Fusión (BGF).....	124
Figura 23. Difractograma Biovidrio obtenido por Sol-Gel: a) sin Boro (BGS), b) con Boro (BGBS). ....	128
Figura 24. Difractograma Biovidrio obtenido por Autocombustión: a) Sin Boro (BGA), b) con Boro (BGBA). ....	129
Figura 25. Difractograma Biovidrio obtenido por Fusión; a) Sin boro (BGF), b) Con boro (BGBF).....	130
Figura 26. Espectro Infrarrojo Biovidrio: a) Sin Boro, b) con Boro.....	132
Figura 27. Degradabilidad polvos Biovidrio evaluados en solución extrema: a) Fusión; b) Autocombustión; c) Sol-gel.....	135

---

Figura 28. Espectro Infrarrojo de: a) apatitas de inmersión, b) BGBS con 30%w boro c) inmersión en TRIS-HCL a 120 horas. ....	137
Figura 29. Evolución pH del Biovidrio de boro inmerso en el buffer Tris-HCl. ....	139
Figura 30. Diagrama de distribución del tamaño de partícula de partículas de Biovidrio de boro.....	140
Figura 31. Fotomicrografías de Microscopía Electrónica de Barrido (SEM) de biovidrio: a) BGBS, b) BGBS inmerso en TRIS-HCL a 120 horas. ....	141
Figura 32. Difractograma Fosfato de Calcio obtenido por Sol-Gel: a) CPS, b) CPSB. ....	142
Figura 33. Difractograma Fosfato de Calcio por Autocombustión: a) Sin Boro, b) con Boro c) con Mg.....	143
Figura 34. Difractograma Fosfato de Calcio por Hidrotermal: a) Sin Boro, b) con Boro.....	144
Figura 35. Espectro Infrarrojo fosfato de Calcio: a) $\beta$ -TCP, b) $\beta$ -TCP/Mg con 5%w Mg c) $\beta$ -TCP/B con 30%w Boro.....	145
Figura 36. Degradabilidad polvos Fosfatos de calcio evaluados en solución extrema: a) Sol-gel; b) Autocombustión; c) Hidrotermal.....	148
Figura 37. Degradabilidad polvos de los fosfatos de calcio ( $\beta$ -TCP) B, ( $\beta$ -TCP) Mg y ( $\beta$ -TCP) B+Mg evaluados en solución extrema .....	149
Figura 38. Espectro Infrarrojo de: a) apatitas de inmersión, b) Fosfato de Calcio con 5%w Magnesio, d) Fosfato de Calcio con 5%w Magnesio inmerso en TRIS-HCL. ....	150
Figura 39. Evolución pH del Fosfato de calcio inmerso en el buffer Tris-HCl.....	151
Figura 40. Diagrama de distribución del tamaño de partícula de partículas de Fosfato de Calcio. ....	152
Figura 41. Fotomicrografías de Microscopía Electrónica de Barrido (SEM) de polvos cerámicos de fosfatos de Calcio obtenido por autocombustión: a) $\beta$ -TCP, b) $\beta$ -TCP inmerso en TRIS-HCL a 120 horas.....	153
Figura 42. Extrusor de cerámica avanzada para impresora 3D Wasp Modelo 20X40. ....	164
Figura 43. Solido Basado en superficies mínimas periódicas triples, Diamond...	167
Figura 44. Gráficos de Residuos para Plasticidad .....	175
Figura 45. Contorno de mezcla vs tiempo. ....	176
Figura 46. Gráfico Optimización de respuesta.....	177
Figura 47. Gráfico de Trazas de variable respuesta plasticidad para la mezcla de componentes. ....	179
Figura 48. Clasificación de los Fluidos.....	180
Figura 49. Módulo elástico y viscoso en función de la deformación.....	181
Figura 50. Módulo elástico y viscoso en función del esfuerzo. ....	182
Figura 51. Módulo elástico y viscoso en función de la frecuencia. ....	183
Figura 52. Modulo complejo y ángulo de fase en función del tiempo. ....	183
Figura 53. Viscosidad en función de la frecuencia. ....	184
Figura 54. Viscosidad en función de la deformación.....	185

Figura 55. Difractograma de: a) BGBS, b) $\beta$ -TCP, c) Atapulgita o palygorskita, d) Pasta cerámica .....	186
Figura 56. Espectro Infrarrojo de: a) $\beta$ -TCP, b) BGBS, c) Atapulgita y d) Pasta cerámica.....	188
Figura 57. Diagrama de distribución del tamaño de partícula de partículas de la pasta cerámica. ....	189
Figura 58. Fotomicrografías de Microscopía Electrónica de Barrido (SEM) de: a) BGBS, b) $\beta$ -TCP, c) Pasta cerámica .....	189
Figura 59. Fotografía del Scaffold obtenido mediante impresión 3D. a y b) Imágenes Estereomicroscópicas. ....	190
Figura 60. Fotomicrografías de Microscopía Electrónica de Barrido (SEM) del Scaffold obtenido mediante impresión 3D .....	191
Figura 61. Fotomicrografías de Microscopía Electrónica de Barrido (SEM) y EDX de: a) Scaffold sin dopar, b) scaffold dopado con 5%w Mg. ....	192
Figura 62. Fotomicrografías de Microscopía Electrónica de Barrido (SEM) y estereomicrofotografía del scaffold dopado con 5%w Mg inmerso en SBF en un tiempo de: a) 0 días, b) 28 días y c) 120 días.....	195
Figura 63. Porcentaje de Masa ganado en scaffold dopado con 5%w Mg inmerso en SBF en un tiempo de: a) 0 días, b) 28 días y c) 120 días. ....	196
Figura 64. Efecto de BGBS, BGBA, $\beta$ -TCP y $\beta$ -TCP/Mg en el crecimiento de <i>S. mutans</i> (ATCC25175). ....	207
Figura 65. Efecto de BGBS, BGBA, $\beta$ -TCP y $\beta$ -TCP/Mg en el crecimiento de <i>C. albicans</i> (ATCC90028).....	208
Figura 66. Efecto de BGBS, BGBA, $\beta$ -TCP y $\beta$ -TCP/Mg en el crecimiento del co-cultivo formado entre <i>S. mutans</i> (ATCC25175) y <i>C. albicans</i> (ATCC90028).....	209
Figura 67. Diagrama pH vs tiempo .....	210
Figura 68. Zona de inhibición polvos cerámico frente <i>S. mutans</i> de: a) BGBS, b) BGBA, c) $\beta$ -TCP/Mg, d) $\beta$ -TCP .....	211
Figura 69. Zona de inhibición polvo cerámico frente a <i>C. albicans</i> de: a) BGBS, b) BGBA, c) $\beta$ -TCP/Mg, d) $\beta$ -TCP, e) Polvos cerámicos. ....	212
Figura 70. Zona de inhibición scaffold frente <i>S. mutans</i> de: a) $\beta$ -TCP/Mg, b) $\beta$ -TCP .....	213
Figura 71. Zona de inhibición scaffold frente <i>C. albicans</i> de: a) $\beta$ -TCP/Mg, b) $\beta$ -TCP.....	214
Figura 72. Adhesión <i>S. mutans</i> , <i>C. albicans</i> , Co-Cultivo en: a) Control sin Mg, b) control con Mg, c) Scaffold sin Mg y d) Scaffold con Mg.....	216
Figura 73. Fotomicrografías Microscopia Electrónica de Barrido (SEM) a) Scaffold sin <i>S. Mutans</i> (Control), b) Scaffold con 5%w Mg sin <i>S. Mutans</i> (control), c) Scaffold con <i>S. Mutans</i> , d) Scaffold con 5%w Mg con <i>S. Mutans</i> .....	217
Figura 74. Fotomicrografías Microscopia Electrónica de Barrido (SEM) a) Scaffold sin <i>C. albicans</i> (Control), b) Scaffold con 5%w Mg sin <i>C. albicans</i> (control), c) Scaffold con <i>C. albicans</i> , d) Scaffold con 5%w Mg con <i>C. albicans</i> .....	218
Figura 75. Obtención y procesamiento tejido adiposo .....	224

---

<b>Figura 76. Obtención y procesamiento pulpa dental (DPSCs).....</b>	<b>226</b>
<b>Figura 77. Diseño del plato de MTT.....</b>	<b>227</b>
<b>Figura 78. Identificación de la cantidad de células madre derivadas de tejido adiposo por Citometría de flujo.....</b>	<b>230</b>
<b>Figura 79. Células madre mesenquimales en cultivo in vitro derivadas de: a) Tejido adiposo y b) Pulpa dental.....</b>	<b>231</b>
<b>Figura 80. Viabilidad Celular.....</b>	<b>232</b>
<b>Figura 81. Diagrama de cajas y bigotes para Viabilidad Celular.....</b>	<b>233</b>
<b>Figura 82. Adhesión de las células Madres provenientes de pulpa dental y tejido adiposo sobre los diferentes tipos de scaffold (n=6, p&lt;0,05) .....</b>	<b>234</b>
<b>Figura 83. Proliferación de las células Madres provenientes tejido adiposo sobre los diferentes tipos de scaffolds a 24 y 48 horas (n=6, p&lt;0,05) .....</b>	<b>235</b>
<b>Figura 84. Adhesión celular de ADSCs obtenidas por microscopía de fluorescencia y microscopía electrónica de barrido respectivamente para: a) y c) Scaffold sin dopaje, b) y d) Scaffold con 5%w Mg .....</b>	<b>236</b>
<b>Figura 85. Cultivo celular células madre provenientes de tejido Adiposo (a, c y e) y Pulpa dental (b,d y f) en etapa de diferenciación.....</b>	<b>237</b>
<b>Figura 86. Actividad de fosfatasa alcalina (ALP).....</b>	<b>238</b>
<b>Figura 87. Depósitos de calcio en Scaffold con dopaje.....</b>	<b>238</b>

## Lista de tablas

Tabla 1. Composición Química de hueso (%w) .....	22
Tabla 2. Propiedades mecánicas del hueso cortical y trabecular.....	24
Tabla 3. Clasificación de los vidrios. ....	40
Tabla 4. Composiciones de diferentes biovidrios.....	42
Tabla 5. Biovidrios con incorporaciones de diferentes elementos. ....	43
Tabla 6. Métodos de síntesis y características de scaffold para obtención de biovidrios .....	48
Tabla 7. Fosfatos de calcio: composición química, relación molar Ca/P .....	51
Tabla 8. Técnicas utilizadas en la obtención de fosfatos de calcio.....	62
Tabla 9. Relación entre el tamaño de poro y la función en scaffolds porosos estructurados jerárquicamente para la ingeniería de tejidos.....	65
Tabla 10. Parámetros de diseño de Scaffold para aplicaciones de ingeniería de tejido .....	66
Tabla 11. Técnicas convencionales obtención de scaffolds.....	69
Tabla 12. Categorías ASTM de AM para diferentes materiales .....	72
Tabla 13. Superficies y ecuaciones matemáticas de TPMS P (Primitivo), D (Diamante) y G (Giroide). ....	75
Tabla 14. Impresión 3D scaffold regeneración ósea].....	88
Tabla 15. Asignación de Bandas Infrarrojas en el espectro de los biovidrios.....	132
Tabla 16. Degradabilidad polvos cerámicos Biovidrios en solución extrema bajo la norma ISO 10993. ....	134
Tabla 17. Asignación de Bandas Infrarrojas en el espectro de biovidrio con 30%w boro. ....	138
Tabla 18. Asignación de Bandas Infrarrojas en el espectro de Fosfatos de Calcio. ....	146
Tabla 19. Degradabilidad polvos cerámicos Fosfatos de Calcio en solución extrema bajo la norma ISO 10993. ....	147
Tabla 20. Procedimiento experimental preparación pasta cerámica .....	163
Tabla 21. Resumen del diseño y Matriz experimental para evaluar Plasticidad .....	164
Tabla 22. Concentración de iones del SBF y plasma sanguíneo humano .....	171
Tabla 23. Reactivos para preparar SBF .....	172
Tabla 24. Análisis de varianza para la plasticidad (pseudocomponentes).....	173

---

<b>Tabla 25. Coeficientes de regresión estimados para tiempo (pseudocomponentes)</b>	<b>174</b>
.....	
<b>Tabla 26. Resumen del modelo.</b>	<b>174</b>
<b>Tabla 27. Optimización.....</b>	<b>176</b>
<b>Tabla 28. Porosidad e Interconectividad de poros de los scaffolds.....</b>	<b>193</b>
<b>Tabla 29. Degradabilidad Scaffolds en solución extrema bajo la norma ISO 10993.</b>	
.....	
<b>Tabla 30. Porcentajes de viabilidad celular .....</b>	<b>231</b>

## Lista de abreviaturas

Esta lista se encuentra en el orden en que van haciendo aparición en el documento.

Abreviatura	Término
EMC	Matriz extracelular
HA	Hidroxiapatita
% w	Porcentaje en peso
ALP	Fosfatasa Alcalina
MSC	Célula progenitora mesenquimal
CRB	Compartimiento de remodelación ósea
BMPs	Proteínas morfogenéticas óseas
FGFs	Factores de crecimiento de fibroblastos
TGF- $\beta$	Factor de crecimiento transformante
PCL	Policaprolactona
PLA	Ácido poli láctico
PLLA	Ácido poli (L-láctico)
PDLA	Ácido poli (D-L,láctico)
PGA	Ácido poliglicólico
PLGA	Ácido poli (láctico-coglicólico)
Tg	Temperatura de transición vítrea
SBF	Fluido corporal simulado
CaP	Fosfatos de calcio
R	Relación Molar
$\beta$ - TCP	Fosfato de calcio fase $\beta$

**Abreviatura Término**

---

<b><math>\alpha</math>- TCP</b>	<b>Fosfato de calcio fase <math>\alpha</math></b>
<b>Mg</b>	<b>Magnesio</b>
<b>MCPM</b>	<b>Fosfato monocálcico monohidrato</b>
<b>DCPD</b>	<b>Fosfato dicálcico dihidratado</b>
<b>DCPA</b>	<b>Fosfato dicálcico anhidro</b>
<b>OCP</b>	<b>Fosfato octacálcico</b>
<b>PHA</b>	<b>Hidroxiapatita precipitada</b>
<b>CDHA</b>	<b>Hidroxiapatita deficiente en calcio</b>
<b>ACP</b>	<b>Fosfato de calcio amorfo</b>
<b>MCPA o MCP</b>	<b>Fosfato monocálcico anhidro</b>
<b>OXA</b>	<b>Oxiapatita</b>
<b>TTCP</b>	<b>Fosfato tetracálcico</b>
<b>A(OH)<sub>n</sub></b>	<b>Base</b>
<b>H<sub>n</sub>X</b>	<b>Ácido</b>
<b>T<sub>m</sub></b>	<b>Temperatura de Combustión</b>
<b>SBA-15</b>	<b>Sílice mesoporosa -15</b>
<b>MCM-41</b>	<b>Sílice mesoporosa</b>
<b>MBG</b>	<b>Nanobalones mesoporoso de grafeno</b>
<b>RP</b>	<b>Prototipado rápido</b>
<b>AM</b>	<b>Manufactura aditiva</b>
<b>FDM</b>	<b>Deposición fundida</b>
<b>SLS</b>	<b>Sinterización por láser selectivo</b>
<b>SLA</b>	<b>Estereolitografía</b>
<b>ASTM</b>	<b>American Society of Testing Materials</b>
<b>BJ</b>	<b>Inyección de aglomerante</b>
<b>DED</b>	<b>Deposición de energía dirigida</b>
<b>ME</b>	<b>Extrusión de material</b>
<b>MJ</b>	<b>Chorro de material</b>
<b>PBF</b>	<b>Fusión de lecho en polvo</b>

<b>SL</b>	<b>Laminación</b>
<b>VP</b>	<b>Fotopolimerización</b>
<b>CAD</b>	<b>Diseño asistido por computador</b>
<b>STL</b>	<b>Lenguaje de triangulación estándar</b>
<b>TPMS</b>	<b>Superficie minimal triplemente periódicas</b>
<b>ADSC</b>	<b>Células madre provenientes de tejido adiposo</b>
<b>BMSC</b>	<b>Células madre provenientes de médula ósea</b>
<b>DPSC</b>	<b>Células madre provenientes de pulpa dental</b>
<b>BG</b>	<b>Biovidrio</b>
<b>BGS</b>	<b>Biovidrio vía sol-gel</b>
<b>BGA</b>	<b>Biovidrio vía autocombustión</b>
<b>BGF</b>	<b>Biovidrio vía fusión</b>
<b>BGB</b>	<b>Biovidrio de boro</b>
<b>BGBF</b>	<b>Biovidrio de boro vía sol-gel</b>
<b>BGBA</b>	<b>Biovidrio de boro vía autocombustión</b>
<b>BGBF</b>	<b>Biovidrio de boro vía fusión</b>
<b>CPS</b>	<b>Fosfato de calcio vía sol-gel</b>
<b>CPH</b>	<b>Fosfato de calcio vía hidrotermal</b>
<b>DOE</b>	<b>Diseño de experimentos</b>
<b>TEP</b>	<b>Trietil fosfato</b>
<b>CTAB</b>	<b>Cetiltrimetilamonio</b>
<b>PEG</b>	<b>Polietilenglicol</b>
<b>DRX</b>	<b>Difracción de rayos X</b>
<b>SEM</b>	<b>Microscopía electrónica de barrido</b>
<b>FTIR</b>	<b>Espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier</b>
<b>%D</b>	<b>Porcentaje de degradabilidad</b>
<b>Wi</b>	<b>Peso inicial</b>
<b>Wf</b>	<b>Peso final</b>
<b>pb</b>	<b>Densidad aparente</b>



# Introducción

Existen algunas condiciones donde el tejido óseo no es capaz de repararse a sí mismo, sino que se hace necesario un soporte para que ocurra la reparación. Las diferentes afecciones óseas pueden representar pérdida de hueso, algunas de ellas en grandes proporciones. Estas afecciones se dan por diferentes traumatismos, enfermedades, estados patológicos que producen fracturas espontáneas, los accidentes deportivos, domésticos y del trabajo como caídas entre otros [1]–[4]. Se han venido desarrollando estrategias con el fin de superar estos inconvenientes. Una de ellas es la fabricación de scaffolds o scaffolds (por convención internacional será el término que se usará en este texto), fundamentales en la regeneración de tejidos perdidos o dañados. Desde el punto de vista mecánico, éstos deben soportar cargas que dan forma al tejido que se regenera. Biológicamente las células contenidas en el tejido óseo como osteoblastos, osteoclastos y osteocitos se encargan de generar o reabsorber la matriz extracelular (ECM) continuamente. Por esto, el hueso es capaz de remodelarse y regenerarse [5]. Sin embargo, la regeneración de este solo tiene lugar en defectos pequeños. Algunos defectos óseos no presentan remodelación espontánea, necesitando factores que estimulen su reparación. La velocidad de reparación del hueso es inferior a la de otros tejidos, motivo por el cual también en algunos casos es necesaria la utilización de materiales de regeneración ósea, que actúen como injertos y auxilien el proceso de reparación. Una característica deseable de los scaffolds es su capacidad de degradación, la cual depende del material y de su porosidad. Por otro lado, la velocidad de degradación del scaffold debe ser lo más cercana posible a la velocidad de crecimiento del nuevo hueso [2], [6]. Los métodos de obtención se han centrado principalmente en controlar la arquitectura de los scaffolds, el diseño interno y externo del este debe brindar cualidades aptas para la regeneración del tejido óseo [7]. El diseño externo del scaffold juega un papel importante ya que está orientado al sitio del implante y la porosidad que debe tener, recordando que a medida que aumenta la porosidad existe mayor

proliferación y migración celular [2], [7]. El scaffold ideal, es aquel que se espera que funcione como una matriz extracelular temporal, cumpliendo con requisitos biomecánicos, mientras que es degradado y reemplazado por nuevo tejido [4], [8].

En la actualidad se encuentran scaffolds de polímeros naturales como colágeno, quitosano, seda, alginato, ácido hialurónico, péptidos entre otros [2], [8]–[12]. Poseen propiedades atractivas para la regeneración ósea, se comportan muy bien en cuanto a su biocompatibilidad, biodegradabilidad, estimulación de la proliferación y diferenciación celular de las células de la ECM, algunos de ellos presentan baja estabilidad mecánica [2], [8], [13], [14] lo que limita su uso como scaffolds y hace necesario que sean reforzados con otro tipo de materiales para mejorarlos. También se encuentran scaffolds de polímeros sintéticos como el ácido poliglicólico (PGA), el ácido poliláctico (PLA) y la policaprolactona (PCL) [8], cuyo principal inconveniente es que su degradación puede crear ambientes que conllevan a respuestas tisulares desfavorables causando reacciones inmunológicas y de cuerpos extraños, activando macrófagos y causando osteólisis sin necesidad de reacciones químicas adicionales. Además carecen de interacción celular [2], [15]. Mezclas de polímero / Fosfatos de calcio (CaP) confieren al scaffold propiedades mecánicas y bioquímicas favorables, ya que poseen cinética más favorable de degradación.

Como se puede observar, a pesar de que el tema de los scaffolds en regeneración ósea ha sido ampliamente estudiado aún quedan inconvenientes por superar tales como la correcta combinación de sus propiedades mecánicas, velocidad de degradación, porosidad (forma, tamaño, interconectividad), biocompatibilidad, biodegradabilidad, osteoconductividad, la vascularización y la integración funcional del hueso [2], [12], [16]. La regeneración de tejido óseo parece tener un futuro prometedor como una alternativa viable y más eficiente que las terapias existentes actualmente. Esto no significa que estemos cerca de alcanzar productos que se puedan utilizar de forma masiva y rutinaria; existe una serie de obstáculos que deben ser vencidos si se quiere lograr esta meta. Con respecto al crecimiento óseo y a la vascularización, la mayoría de los estudios están basados en la utilización de un tipo de cultivo celular específico (monocultivo de células madre y/o células osteoblásticas). En recientes estudios se han empleado sistemas de co-cultivo que son atractivos para las pruebas de materiales in vitro, debido a que se encuentran un paso más cerca de las condiciones naturales permitiendo aclarar aspectos complejos acerca de las interacciones celulares en la regeneración ósea.

En el presente trabajo se formuló una pasta cerámica cuyos componentes principales son un biovidrio de boro y un fosfato de calcio para el desarrollo de un scaffold conformado por impresión 3D con propiedades de biocompatibilidad, bioactividad y degradabilidad, capaz de potenciar la oseointegración a través de poros interconectados y química superficial adecuadas para el crecimiento, proliferación, migración celular y antibacteriana comprobados a través de pruebas in vitro. Diseñar este scaffold implica equilibrar la necesidad de porosidad interconectada con el transporte de nutrientes y angiogénesis mientras se produce su degradación, todo este conjunto de pruebas biológicas, estructurales y morfológicas apuntan principalmente al desarrollo de una alternativa para la regeneración ósea.

## **Objetivos**

### **Objetivo General**

Desarrollar un scaffold para regeneración ósea conformado mediante impresión 3D de una pasta cerámica compuesta de una mezcla de fosfatos de calcio y biovidrio.

### **Objetivos Específicos**

- Formular una pasta cerámica compuesta de fosfato de calcio y biovidrio apropiada para fabricar un scaffold biocompatible y biodegradable, haciendo uso del diseño de experimentos.
- Explorar los procesos de manufactura aditiva para el desarrollo de scaffolds de formas y tamaños ajustables a partir de mezclas de materiales cerámicos de características compatibles con el medio biológico.
- Evaluar la porosidad e interconectividad de los poros, tamaño, rugosidad de la superficie y geometría de la matriz tridimensional sintetizada.
- Evaluar la adherencia bacteriana in vitro sobre los scaffolds desarrollados a partir de cultivos bacterianos mono y multiespecies.
- Evaluar la biocompatibilidad in vitro de los scaffolds desarrollados a partir de cultivos de osteoblastos.

## Alcances del proyecto

Esta investigación inicia con una compilación teórica y metodológica de la obtención a partir de diferentes rutas químicas de síntesis de fosfato de calcio ( $\beta$ -TCP) y Biovidrio de boro (BGB). Luego es detallada la obtención de los scaffold por impresión 3D a través de la formación de una pasta cerámica, así como las técnicas de caracterización estructural y biológica en cada una de las etapas del proyecto. Cada capítulo contiene la metodología, resultados y la discusión de estos, así como; sus respectivas referencias bibliográficas. Se encontrará al finalizar una sesión exclusiva de conclusiones generales de la investigación.

Este trabajo de investigación se encuentra organizado de la siguiente manera:

Capítulo 1. Marco teórico y Estado del arte: Enfocado en las generalidades del tejido óseo, los fundamentos teóricos de la remodelación ósea, las técnicas de obtención de los materiales cerámicos utilizados, la utilización de manufactura aditiva para la obtención de scaffold a través de la formulación de una pasta cerámica, su aplicación en regeneración ósea a través de la evaluación en cultivos celulares in vitro y su capacidad bactericida y/o bacteriostática en cultivos bacterianos mono y multiespecies.

Capítulo 2. Síntesis y Caracterización Material cerámico: Son expuestos los métodos utilizados para la obtención de biovidrio y fosfato de calcio. Se Incluye la caracterización estructural, morfológica y la degradabilidad basada en la norma.

Capítulo 3. Formulación de una Pasta Cerámica e impresión 3D del Scaffold: Se centra en el diseño de experimentos aplicado a la formulación de la pasta cerámica, agrupa las condiciones óptimas para la impresión de la pasta cerámica y posterior obtención de los scaffolds. También se incluye la caracterización estructural, morfológica, reológica, porosidad e interconectividad de poros bioactividad y degradabilidad basada en la norma.

Capítulo 4. Actividad Bacteriana: Reúne todas las etapas en las que el scaffold actúa como agente bactericida y/o bacteriostático.

Capítulo 5. Regeneración Ósea in vitro: Reúne todas las etapas en las que el scaffold actúa como regenerador óseo evaluado en cultivos celulares osteogénicos provenientes de células madre a partir de tejido adiposo (ADSCs) y explantes de pulpa dental (DPSCs).

Conclusiones Generales: agrupación y síntesis de los resultados obtenidos en el trabajo de investigación.

## Referencias Bibliográficas

- [1] N. Peel, "Bone remodelling and disorders of bone metabolism," *Surgery*, vol. 27, no. 2, pp. 70–74, Feb. 2009.
- [2] M. A. Velasco, C. A. Narváez-Tovar, and D. A. Garzón-Alvarado, "Design, materials, and mechanobiology of biodegradable scaffolds for bone tissue engineering," *Biomed Res. Int.*, vol. 2015, 2015.
- [3] K. Lin, R. Sheikh, S. Romanazzo, and I. Roohani, "3D Printing of Bioceramic Scaffolds—Barriers to the Clinical Translation: From Promise to Reality, and Future Perspectives," *Materials*, vol. 12, no. 17, 2019.
- [4] H. Ma, C. Feng, J. Chang, and C. Wu, "3D-printed bioceramic scaffolds: From bone tissue engineering to tumor therapy," *Acta Biomater.*, vol. 79, pp. 37–59, 2018.
- [5] B. Clarke, "Normal bone anatomy and physiology.," *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.*, vol. 3 Suppl 3, pp. S131-9, Nov. 2008.
- [6] P. Lichte, H. C. Pape, T. Pufe, P. Kobbe, and H. Fischer, "Scaffolds for bone healing: concepts, materials and evidence," *Injury*, vol. 42, no. 6, pp. 569–573, 2011.
- [7] M. A. Velasco Peña and D. A. Garzón Alvarado, "Implantes Scaffolds para regeneración ósea.: Materiales, técnicas y modelado mediante sistemas de reacción-difusión ," *Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas*, vol. 29, p. 0, 2010.
- [8] L. Polo-Corrales, M. Latorre-Esteves, and J. E. Ramirez-Vick, "Scaffold Design for Bone Regeneration," *J. Nanosci. Nanotechnol.*, vol. 14, no. 1, pp. 15–56, Jan. 2014.
- [9] C. E. Semino, "Self-assembling peptides: from bio-inspired materials to bone regeneration," *J. Dent. Res.*, vol. 87, no. 7, pp. 606–616, 2008.
- [10] S. Mallick, S. Tripathi, and P. Srivastava, "Advancement in Scaffolds for Bone Tissue Engineering: A Review," *IOSR J. Pharm. Biol. Sci.*, vol. 10, pp. 37–54, 2015.

- 
- [11] B. Dhandayuthapani, Y. Yoshida, T. Maekawa, and D. S. Kumar, "Polymeric scaffolds in tissue engineering application: a review," *Int. J. Polym. Sci.*, vol. 2011.
- [12] Y. Liu, J. Lim, and S.-H. Teoh, "Review: development of clinically relevant scaffolds for vascularised bone tissue engineering," *Biotechnol. Adv.*, vol. 31, no. 5, pp. 688–705, 2013.
- [13] B. A. Harley, J. H. Leung, E. C. C. M. Silva, and L. J. Gibson, "Mechanical characterization of collagen–glycosaminoglycan scaffolds," *Acta Biomater.*, vol. 3, no. 4, pp. 463–474, 2007.
- [14] F. Matassi, L. Nistri, D. C. Paez, and M. Innocenti, "New biomaterials for bone regeneration," *Clin. cases Miner. bone Metab.*, vol. 8, no. 1, pp. 21–24, 2011.
- [15] S. Bose, M. Roy, and A. Bandyopadhyay, "Recent advances in bone tissue engineering scaffolds," *Trends Biotechnol.*, vol. 30, no. 10, pp. 546–554, 2012.
- [16] S. Deb, R. Mandegaran, and L. Di Silvio, "A porous scaffold for bone tissue engineering/45S5 Bioglass® derived porous scaffolds for co-culturing osteoblasts and endothelial cells," *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, vol. 21, no. 3, pp. 893–905, 2010.

# **CAPÍTULO 1:**

**MARCO TEÓRICO Y ESTADO DEL ARTE**



# 1.Marco Teórico

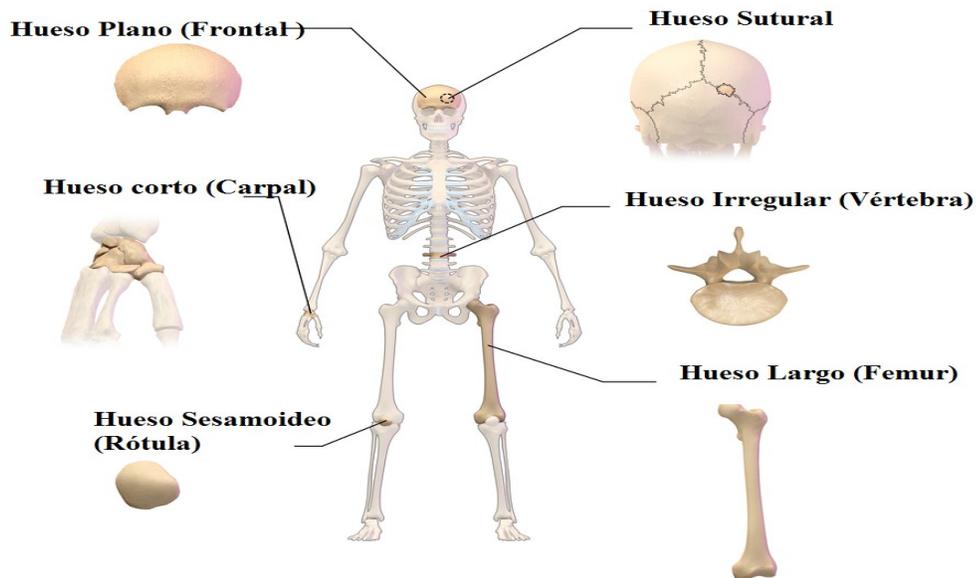
## 1.1. Generalidades del Tejido Óseo y Dental

El tejido óseo, comúnmente llamado hueso constituye el esqueleto y junto con los dientes son los tejidos más duros del cuerpo humano. El tejido óseo está conformado por aproximadamente 213 huesos (aunque algunos autores referencian 206 [1], [2]), omitiendo los huesos sesamoideos [3], [4], los cuales tienden a desarrollarse en el contorno de los tendones o de la cápsula fibrosa que rodea las articulaciones [5]. Los huesos son órganos que se caracterizan por su rigidez, dureza y especialmente por contar con un poder regenerativo y reparador innato [3], [6]–[8], esto gracias a que cuenta con un tejido activo que se encuentra en constante remodelación para eliminar los daños [3], [7], [9], [10], es capaz de auto repararse y de adaptar su estructura a las fuerzas biomecánicas como respuesta a cambios en la características mecánicas y biológicas [10], [11]

Los huesos son los encargados de proteger los órganos vitales, proporcionando un ambiente apropiado para la formación de sangre, el almacenamiento de grasas, además de esto; pueden actuar como depósito de calcio, fosfatos y factores de crecimiento [3], [7], [12]–[15]. Su principal función es proporcionar un soporte estructural para el cuerpo humano [3], [10], pero también se desempeña como [11], [15], [16] :

- Sostén: brinda soporte a tejidos blandos en los puntos de inserción de la mayoría de los músculos esqueléticos.
- Protección: con el fin de evitar lesiones en los órganos vitales.
- Asistencia en el movimiento: cuando se contraen o realizan tracción, los músculos esqueléticos se fijan a los huesos con el fin de generar movimientos.

- Homeostasis mineral: el tejido óseo almacena algunos minerales como calcio y fósforo, los cuales aportan solidez al hueso. Estos minerales son liberados hacia la sangre de acuerdo con las necesidades fisiológicas que se tengan.
- Producción de sangre: dentro de algunos huesos, la médula ósea roja es la encargada de producir células sanguíneas (glóbulos rojos, blancos y plaquetas) en un proceso llamado hemopoyesis.
- Almacenamiento de triglicéridos: la médula ósea amarilla está constituida principalmente por adipocitos, los cuales almacenan triglicéridos (reserva potencial de energía química)



**Figura 1.** Clasificación de los Huesos [17].

Los huesos se encuentran clasificados en 4 grupos: huesos largos, cortos, planos e irregulares, y huesos sesamoideos [18], [19] (Figura 1). Esta clasificación depende principalmente del tamaño, forma, cantidad y proporción del tipo de tejido óseo que lo componen (hueso compacto o cortical y hueso esponjoso o trabecular) [3], [12], [14], [18]

- Huesos largos: se caracterizan por ser cilíndricos con una forma más alargada que ancha, sus extremos son más grandes para articular con otros huesos.

Actúan sobre los músculos esqueléticos como palancas rígidas con el fin de producir movimientos en el cuerpo. Algunos ejemplos de huesos largos son el húmero, radio, tibia y peroné entre otros [14], [18].

- Huesos cortos: son a simple vista iguales en longitud y grosor, se describen como estructuras en forma de cubo o caja, tienen movimientos limitados, estrictamente se deslizan entre sí para permitir que sean doblados en diferentes direcciones. Ejemplo de ellos son el carpo (muñeca) y tarsal (tobillo) [14], [18].
- Huesos planos: son generalmente anchos, de superficie aplanada y a menudo curva, se encargan de proteger los órganos blandos proporcionando extensas superficies para la fijación de los músculos. Se incluyen la mayoría de los huesos craneales, las costillas, el esternón (Esternón), escápula (omóplato) y algunos huesos de la cadera [14], [18].
- Huesos irregulares: presentan formas y características diferentes, se encuentran agrupados como las vértebras, algunos huesos del cráneo y del oído [14], [18].
- Huesos Sesamoideos: pueden ser agrupados con los huesos irregulares, aunque a menudo aparecen solos. “El nombre sesamoideo proviene de “semilla de sésamo” [18], pues se asemejan a este tipo de semillas tanto en forma como en tamaño”. El número de huesos sesamoideos en el cuerpo humano varía de una persona a otra, por lo general se desarrollan en los tendones cerca de las articulaciones. Ejemplo de ello es el hueso sesamoideo cercano a las articulaciones de la rótula el cual es el más grande de este tipo [18].

#### 1.1.1. Composición Química y Estructura Jerárquica del Hueso

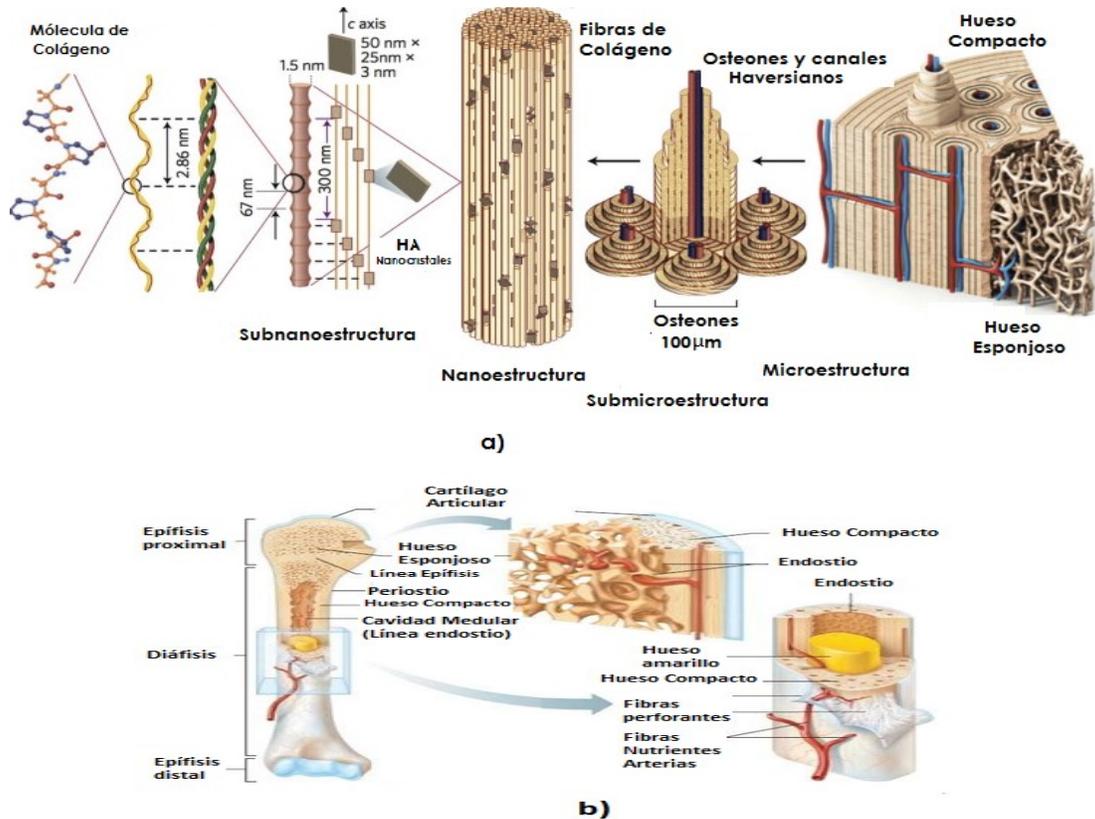
El hueso está compuesto por células envueltas en una matriz extracelular (ECM) que es metabólicamente activa compuesta por una fase orgánica y una fase inorgánica. La fase orgánica está compuesta por colágeno tipo I, proteínas no estructurales, glicosaminoglicanos y lípidos. La fase mineral o inorgánica contiene fosfatos de calcio en forma de hidroxiapatita (HA;  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ ) [20], [21]. Las apatitas biológicas

presentan diferencias respecto a la composición estequiométrica de HA, ya que contiene algunas impurezas de sustitución iónica [21]. La ECM es la garante de las propiedades biomecánicas del hueso y las fibras de colágeno suministran la flexibilidad y la resistencia a las tensiones a las cuales es sometido el tejido óseo. La composición química de hueso se muestra en la tabla 1.

Tabla 1. Composición Química de hueso (%w) [21].

Fase Inorgánica	Fase Orgánica
HA≈60 H <sub>2</sub> O≈9 Carbonato≈4 Citrato≈0.9 Na <sup>+</sup> ≈0.7 Mg <sup>2+</sup> ≈0.5 Cl <sup>-</sup> ≈0.13 Otros: K <sup>+</sup> , F <sup>-</sup> , Zn <sup>2+</sup> , Fe <sup>2+</sup> , Cu <sup>2+</sup> , Sr <sup>2+</sup> , y Pb <sup>2+</sup>	Colágeno≈20 Proteínas no colagenadas ((NCPs) ≈3 Trazas: polisacáridos, lípidos y citoquinas Células primarias del hueso: Osteoblastos, Osteoclastos y Osteocitos

Una característica importante de los huesos es su organización jerárquica (Figura 2 (a)), que incluye una macroestructura (hueso esponjoso y cortical), microestructura (sistemas de Harvers, osteones, trabéculas simples), submicroestructura (laminillas), nanoestructura (colágeno y minerales) sub-nanoestructura (estructura molecular de minerales óseos, colágeno y proteínas) [15], [19], [22]–[24]. Histológicamente, el hueso consiste en una corteza de forma cilíndrica densa y dura denominada hueso compacto o hueso cortical y un núcleo interior poroso que forma una red de trabéculas que conforman el hueso trabecular o esponjoso [3], [7], [10], [11], [22], [25]–[27]. El hueso cortical es un hueso bastante denso debido a un alto contenido de mineralización y poca presencia de materia orgánica lo que lo hace más rígido. Cuenta con una porosidad aproximada 5% a 30% [27]–[29], con una resistencia a la compresión de en un rango de 130–225 MPa [28], [30]. Su papel fundamental radica en ser el soporte estructural del cuerpo [27].



**Figura 2.** a) Organización estructural jerárquica del hueso [21]. b) Estructura típica del hueso largo [21], [31].

El hueso trabecular se caracteriza por que es altamente poroso (30%-90%) [27], [29], presenta una resistencia a la compresión en un rango de 4-12 MPa [27], [29], [30]. Su porosidad se ve influenciada por la actividad celular, la cual puede alterar las estructuras trabeculares garantando el tamaño de los poros [27]. A pesar de que el esqueleto humano está diseñado para soportar cargas debidas a las diferentes actividades que realiza cada individuo, estas cargas inducen tensiones de tracción, compresión o corte sobre el tejido óseo. Las propiedades mecánicas óseas como el módulo de elasticidad, la compresión y la resistencia a la tracción son importantes, ya que dependen en gran medida de la posición del hueso y de la condición de cada individuo. Además, las propiedades mecánicas del hueso varían según la orientación de la carga con respecto a la orientación del tejido (anisotropía) y la velocidad a la que se aplica la carga

(viscoelasticidad) [32], [33]. Algunas propiedades mecánicas importantes se encuentran en la Tabla 2.

Tabla 2. Propiedades mecánicas del hueso cortical y trabecular.  
(Tomado con modificaciones de referencia [28]).

Propiedades Mecánicas	Hueso Cortical	Hueso Trabecular
Resistencia a la compresión (MPa)	100-230	2-12
Resistencia a la tracción (MPa)	50-150	10-20
Resistencia a la flexión (MPa)	100 - 240	–
Deformación de pre-fallo (%)	1-3	5-7
Módulo de Young (GPa)	7-30	0.5-0.05
Resistencia al agrietamiento (KIC) (MPa.m <sup>1/2</sup> )	2-12	–
Porosidad (%)	5 - 30	30 – 90

Macro estructuralmente, los huesos como tal presentan una estructura ósea similar, por ejemplo los huesos largos contienen 6 regiones importantes como: la diáfisis, epífisis, cartílago articular, periostio, cavidad medular (médula), endostio [3], [14], [18], [25], [34] (Figura 2 (b)), mientras que los huesos cortos, irregulares y planos cuentan con una capa de hueso compacto recubierta exteriormente por periostio y una zona central de hueso esponjoso. Como éstos no son cilíndricos no tiene epífisis ni diáfisis, pero sí contienen médula ósea entre las trabéculas del hueso esponjoso, pero no cavidad medular.

La diáfisis se conoce como la porción central de los huesos largos, localizada entre los dos extremos del hueso (epífisis), presenta forma cilíndrica, hueca, cubierta por un tejido exterior llamado periostio encargado de proteger el hueso y en su parte interna presenta una cavidad llamada canal medular, el hueso que lo forma está compuesto por tejido óseo compacto, mientras que la diáfisis contiene en su interior la médula ósea amarilla, la epífisis por su parte, contiene un tejido conectivo llamado médula ósea roja, la cual se encarga de llenar los espacios al interior del hueso esponjoso, éste tejido óseo no es compacto en su totalidad sino tejido óseo esponjoso revestido de hueso cortical o compacto [18]. La epífisis, se encuentra cubierta por una capa de cartílago hialino (cartílago articular) el cual es encargado de amortiguar la sobrecarga de las superficies en contacto (por su elasticidad) y permitir el desplazamiento de las superficies óseas

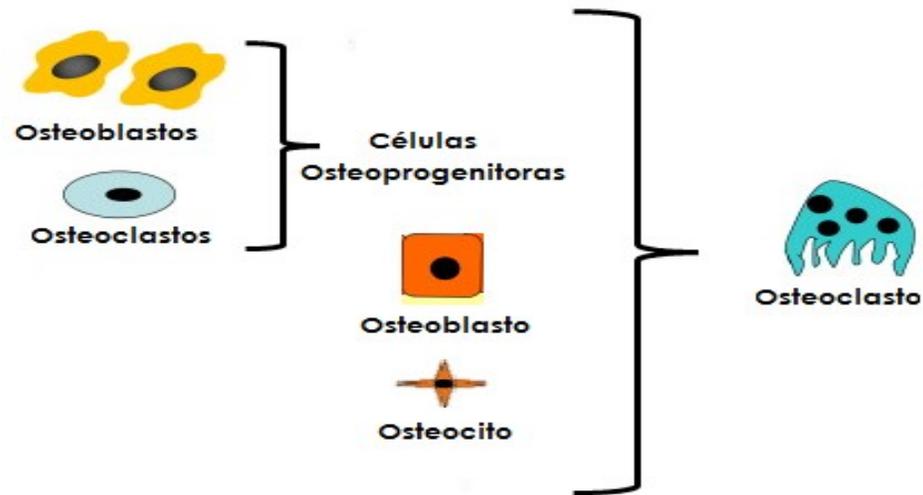
durante el movimiento. Para llevar a cabo estas dos funciones, el cartílago articular es a vascular y se nutre por difusión pasiva desde el líquido sinovial y el hueso subcondral. Este cartílago está compuesto principalmente por una red de fibras de colágeno tipo II y proteoglicanos producidos por sus células principales (condrocitos) [3], [7], [14], [18], [25], [34].

Microestructuralmente el hueso compacto puede diferenciarse del hueso esponjoso en varios aspectos [3], [12], [15], [18], [35], [36]: El hueso compacto contiene gran cantidad de unidades estructurales en forma de cilindro llamadas osteones o sistemas haversianos, cada osteón rodea un canal central a lo largo del hueso. Las células óseas vivas de estas unidades se unen para formar estructuralmente el hueso compacto. La estructura que tiene el osteón permite la entrega de nutrientes y la eliminación de los productos de desecho de las células óseas metabólicamente activas [14], [18].

Por último, los conductos centrales también llamado canal osteonal o canal haversiano, se extiende de manera longitudinal a través del centro de cada osteón, éste canal está revestido con endostio y contiene vasos sanguíneos, vasos linfáticos y nervios [11], [14], [18]. Una de sus funciones principales va más allá del soporte de carga requiriendo resistencia y rigidez [15]. Por su parte, el hueso esponjoso llamado a menudo hueso trabecular no contiene osteones, consiste principalmente en una red interconectada de trabéculas que permiten la difusión de nutrientes y la exposición a factores de crecimiento circulantes, permitiendo que el tejido del hueso esponjoso sea metabólicamente activo y pueda ser remodelado con más frecuencia que la del hueso cortical [11], [14], [18], [23]. La colocación de las trabéculas en el hueso esponjoso luce como un tejido desorganizado, pero realmente hay una organización que ayuda al hueso a tener una mayor resistencia a las cargas [15], [18].

A nivel nanoestructural el hueso contiene fibrillas de colágeno mineralizadas con un diámetro aproximado de 100 nm, estas fibrillas son un conjunto de moléculas de colágeno (largas: 300 nm, gruesas: 1,5 nm) que dispuestas en patrones geométricos que se forman a partir de aminoácidos y nanocristales de hidroxapatita [15], [21]. El colágeno y la HA se combinan para formar un material compuesto, la HA aporta la rigidez y el colágeno proporciona resistencia y ductilidad [15]. Subnanoestructural, el hueso contiene sustancias orgánicas e inorgánicas que juegan un papel muy importante en el

funcionamiento del hueso, ya que de ellas dependen las propiedades físicas y fisico-químicas del hueso.



**Figura 3.** Células óseas

(Tomada con modificaciones de referencia [37])

El tejido óseo está compuesto por un 70% de cristales de HA y el 30% restante es una mezcla de proteínas de colágeno, agua y proteoglicanos los cuales conforman la fase orgánica de la masa ósea [27]. Su estructura contiene material orgánico como medula ósea, vasos sanguíneos, los cuales permiten el transporte de nutrientes y desechos metabólicos [27]. Ambos se catalogan en función de su porosidad, estructura y actividad metabólica, las cuales modulan su función y fisiología [23]. Las células residentes en el hueso constituyen solo aproximadamente el 2% de esta matriz orgánica. El hueso está constituido por tres tipos de células principales: osteoblastos (células de formación ósea), osteoclastos (células de reabsorción ósea) y osteocitos (células óseas maduras) [3], [8], [22], [38], [39] (Figura 3).

- **Los osteoblastos:** son células osteoprogenitoras, formadoras de hueso originadas a partir de células progenitoras mesenquimales (MSC) tienen la posibilidad de diferenciarse a mioblastos, fibroblastos, adipocitos, condrocitos u osteoblastos en función de los factores de crecimiento o diferenciación que intervengan, encargadas de sintetizar la matriz orgánica (osteóide) [40], [41], además de esto, responden a muchos estímulos mecánicos, locales y sistémicos

que facilitan la mineralización del hueso a través de filamentos de colágeno que sirven como scaffold para la formación de cristales de hidroxiapatita [3], [8], [13], [14], [18], [42]. Las células madre osteogénicas, que se encuentran en el endostio y revestimiento de los canales centrales, se someten a división celular para formar osteoblastos [3], [14], [43]. La producción de la matriz ósea y posterior mineralización comprende la proliferación, desarrollo y maduración de la ECM, la mineralización y posterior apoptosis [42]

Su principal función es la secreción de proteínas de la matriz ósea y la mineralización ósea [42], también están encargados de regular la hematopoyesis e inducen a la expansión y maduración de los osteoclastos [13]. Los osteoblastos expresan altos niveles de fosfatasa alcalina (ALP) y osteocalcina, estas proteínas manifiestan el número de osteoblastos y la velocidad de formación ósea [42]. Dentro del linaje osteoblástico, las subpoblaciones de células responden de manera diferente a varias señales hormonales, mecánicas o citoquinas. Se ha demostrado que los osteoblastos del hueso axial y apendicular responden de forma diferente a estas señales [3].

- **Los osteoclastos:** son células gigantes multinucleadas producidas como resultado de la fusión de células precursoras mononucleadas [42]. Son los responsables de la erosión activa de los minerales óseos, es decir; que están directamente implicadas en la resorción ósea [42]. Se forman por la fusión de varias células precursoras que se agrupan en el endostio, la membrana plasmática de estas células se pliegan y forman un borde indentado donde se libera un gran número de mitocondrias y enzimas lisosómicas y ácidos que digieren los componentes minerales y proteicos de la matriz subyacente (resorción) [43]. Los osteoclastos son las únicas células que son capaz de hacer resorción ósea, son células que se disuelven en la superficie del hueso, y se desarrollan a partir del mismo hueso [13], [44].
- **Los osteocitos:** son células maduras derivadas de los osteoblastos que componen la mayor parte del tejido óseo y permanecen al interior de la matriz ósea mineralizada formando una red detectora de estímulos ambientales, mecánicos y hormonales. Su principal función es la regulación de las funciones de

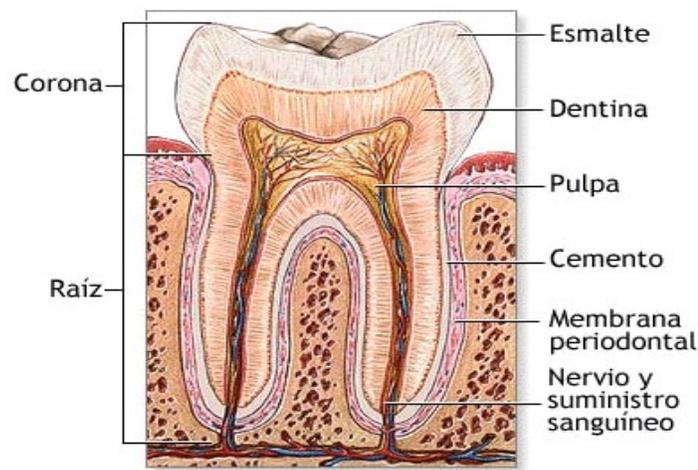
los osteoblastos y osteoclastos de forma tal que se garanticen las actividades celulares del tejido óseo como el intercambio de nutrientes y productos de desecho [14], [18], [42]. Los osteocitos detectan el más mínimo daño provocado por la fatiga e muestran a los osteoclastos dichas detecciones con el fin de inducir el reemplazo del hueso dañado a través de la remodelación.

Al igual que los huesos, los dientes también son jerárquicos y se encuentran compuestos por diferentes estructuras clasificadas en tres grupos:

1. Estructura propiodónticas (esmalte y dentina)
2. Estructura endodoncia (la pulpa, formadora de la dentina)
3. Estructuras periodontales (cemento, hueso alveolar, encía y membrana periodontal)

Los dientes están formados principalmente por 3 sustancias duras: el esmalte, la dentina, el cemento y un tejido blando: la pulpa dentaria (Figura 4). La parte más externa y visible es la corona dentaria recubierta por un tejido calcificado denominado esmalte [45]. El esmalte es el material más duro producido por procesos biológicos. Está formado por compuestos inorgánicos cuyos componentes principales son calcio, fósforo, carbonatos, magnesio, sodio, también cuenta con agua y un 4% de compuestos orgánicos. Al interior del esmalte se encuentra la dentina, la segunda sustancia más dura del cuerpo humano, formada por un 70% de componentes inorgánicos, un 26% de componente orgánico y agua principalmente. Este tejido es altamente mineralizado, acelular y avascular [45], [46]. Las células formadoras de esmalte (ameloblastos) desaparecen a medida que se completa el desarrollo, como consecuencia, el esmalte no puede ser reparado o remodelado. Por lo tanto, las enfermedades que tienen un impacto en la formación del esmalte pueden dejar "cicatrices" permanentes en la estructura del esmalte [45]. La dentina va desde la superficie más interna del esmalte hasta penetrar el maxilar para formar la raíz del diente, en esta zona se encuentra cubierta por un tejido duro llamado cemento, compuesto de un 60% aproximadamente de compuestos inorgánicos principalmente calcio y fosfato y el 40% restante es colágeno. Las células productoras de la dentina son los odontoblastos las cuales permanecen inactivas en los extremos, se encuentra ubicados en los bordes más internos de la dentina. La dentina puede remodelarse hasta cierto punto, ya que los odontoblastos pueden producir tejido nuevo (dentina secundaria) si es necesario (por ejemplo, un desgaste dental excesivo que

expone la dentina) [45]. Por otra parte, la dentina proporciona un respaldo estructural para el esmalte duro pero frágil y encierra el componente del tejido blando del diente, la cámara pulpar, que llena la cavidad interna del diente. La pulpa consiste en vasos sanguíneos y nervios conectados al resto de las redes vasculares y nerviosas del cuerpo a través del foramen apical en el vértice de la raíz [45]. Las raíces de los dientes son fijadas en su posición gracias a fibras elásticas que forman una ligamento periodontal, la cual se extiende desde el cemento hasta una capa ósea llamada lámina dura al interior del maxilar [45], [46]. El cemento es el medio mineralizado entre el diente y el ligamento periodontal. Es un tejido conjuntivo avascular con un contenido mineral equivalente al hueso. Al igual que los osteoblastos, los cementoblastos pueden quedar atrapados en su propia matriz y diferenciarse en cementocitos. El origen embrionario del cemento es el mismo que el hueso.

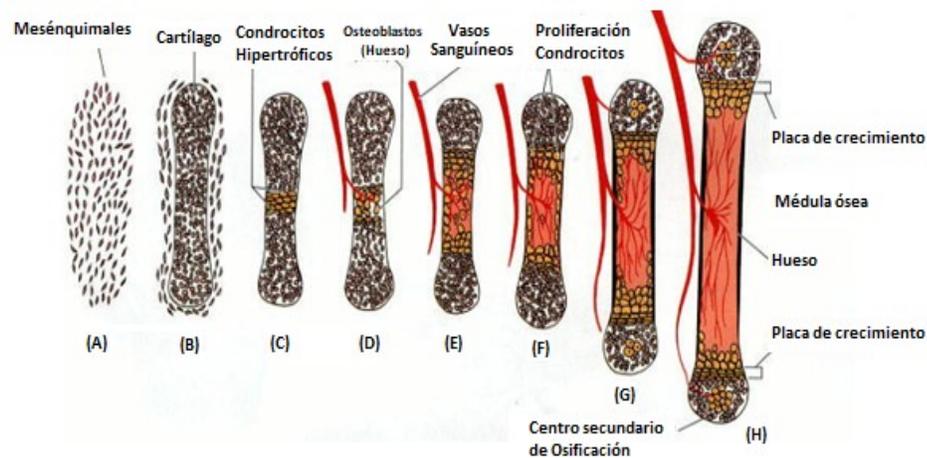


**Figura 4.** Estructura del diente [47].

### 1.1.2. Formación Ósea

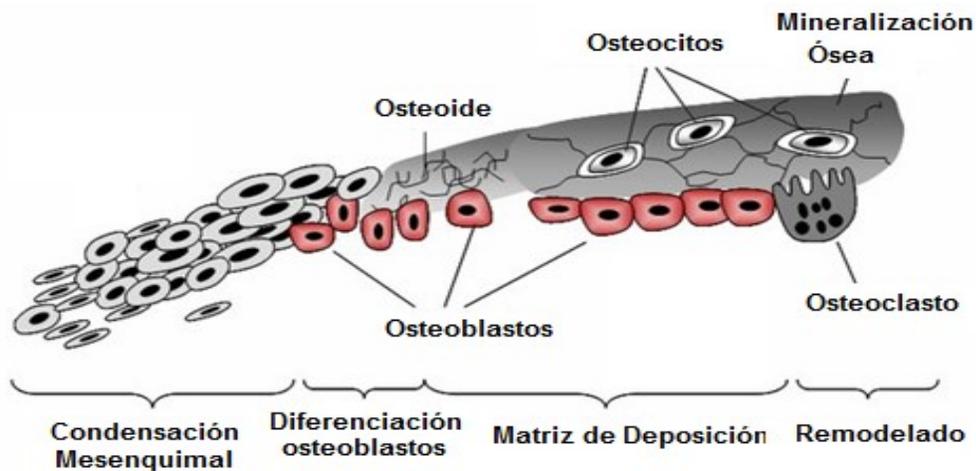
La formación del hueso también conocido como “**osteogénesis**” es un proceso natural que inicia con el desarrollo del feto y se da de manera continua a lo largo de la vida. Existen dos formas en la que se forma hueso: osificación endocondral y la osificación intramembranosa [48], [49]. En las dos intervienen células madres mesenquimales (MSC), las cuales son las encargadas de secretar proteínas que regulan la inflamación y la regeneración del tejido [27], [48]. La osificación endocondral involucra el reclutamiento, la proliferación y diferenciación de MSC en condrocitos creando un tejido cartilaginoso

que posteriormente es reemplazado por hueso mineralizado [49], [50]. La osificación endocondral puede dividirse en 5 etapas [40]: 1) Las MSC se convierten en células de cartílago, incluye la formación de un collar óseo alrededor del modelo de cartílago y posterior degeneración del cartílago subyacente, 2) las MSC se condensan y se diferencian en condrocitos. 3) los condrocitos proliferan secretando la ECM cartilaginosa. 4) los condrocitos dejan de dividirse y permiten que la ECM se mineralice. 5) los condrocitos mueren, a medida que esto sucede algunas células se diferencian en osteoblastos los cuales comienzan a formar la matriz ósea [51]. El reemplazo de condrocitos por células óseas depende de la mineralización de la matriz extracelular. (Figura 5).



**Figura 5.** Diagrama esquemático de la osificación endocondral [40], [51].

La osificación intramembranosa por su parte inicia y se da en un tejido conjuntivo compuesto principalmente de células mesenquimales, conocido como blastema óseo [49], las células MSC se diferencian en osteoblastos creando tejido óseo a través de procesos anabólicos [49], [50]. Las MSC se condensan con el fin de producir osteoblastos, encargados de depositar la matriz ósea, algunos osteoblastos se agrupan estableciendo una región de osificación primaria, siendo allí; el sitio donde se producen los procesos de crecimiento óseo. La formación de ECM es producida por los osteoblastos que se encuentran al interior de ésta los cuales posteriormente se convierten en osteocitos [49], [51]. La matriz ósea producida es una estructura de colágeno no organizada, una vez hay suficiente ECM depositada son reclutados más osteoblastos con el fin de continuar la producción de tejido óseo [49], [52]. (Figura 6).

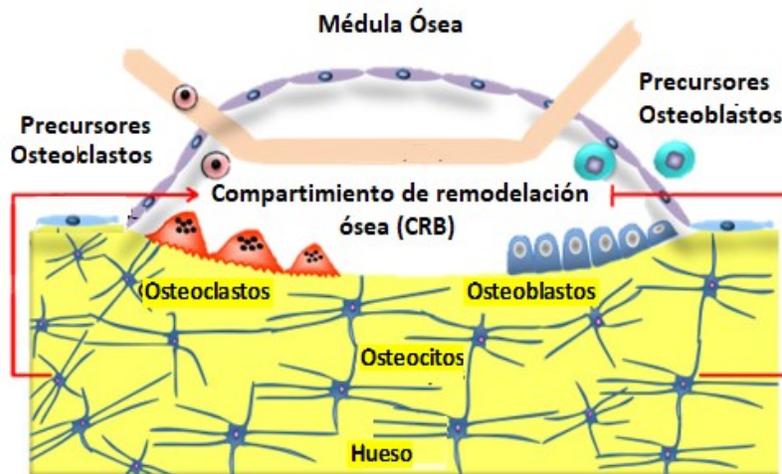


**Figura 6.** Diagrama de la osificación intramembranosa (Tomada con modificaciones de referencia [51], [52])

### 1.1.3. Remodelación Ósea

Aunque es bien conocido que el hueso posee la capacidad de regenerarse como parte del proceso de reparación en respuesta a una lesión, así como de remodelarse a lo largo de la vida. La remodelación ósea consta de una serie de eventos biológicos que involucran células, vías de señalización molecular, etc. [38], [39], [53], [54]. A diferencia de los demás tejidos del cuerpo humano, en los que se forma tejido cicatricial fibroso, la cicatrización de una lesión ósea se da sin tejido cicatricial [38], [39], [53], [54]. El crecimiento óseo, el modelado o la remodelación tienen relación espacial entre la reabsorción y la formación ósea [42]. Los osteoclastos son los encargados de realizar la resorción del hueso, mientras que los osteoblastos son encargados de su formación y los osteocitos coordinan las actividades en la que se encuentran involucrados los osteoblastos y osteoclastos [42]. Aunque en los procesos de modelación y remodelación ósea los osteoclastos y osteoblastos actúan de manera independiente, en la remodelación ósea los osteoblastos y osteoclastos funcionan de manera simultánea en la misma superficie y deben ser coordinadas para dar forma al hueso [42], [49]. La remodelación ósea es dependiente del correcto funcionamiento de los osteoclastos y los osteoblastos, los cuales tienen funciones osteogénicas. Los osteocitos por su parte, en este proceso de remodelación tienen una función mecano-sensorial [54]. La remodelación

puede ocurrir dentro de cualquiera de las cuatro superficies: perióstica, endocortical, trabecular e intracortical [49]. Para que el proceso de remodelación se lleve a cabo, los precursores de osteoclastos deben estar en la superficie ósea donde proliferan seguido de una diferenciación y fusión en células maduras multinucleadas. Posteriormente se adhieren a la superficie ósea, acidificando y degradando la matriz mineralizada [42]. Al final de este proceso todos los osteoclastos presentan apoptosis (muerte celular programada). Los osteocitos son los encargados de detectar las señales existentes ante una necesidad de reabsorción ósea, cuando esto sucede; envían señales a las células de revestimiento, las cuales se retiran de la superficie ósea permitiendo la formación de una estructura llamada compartimiento de remodelación ósea (CRB) (figura 7).



**Figura 7.** Compartimiento de remodelación Ósea (CRB).  
(Tomada con modificaciones de referencia [40], [42])

La remodelación ósea es llevada a cabo de acuerdo con las siguientes etapas (figura 8) [7], [8], [38], [39], [49], [53], [54].

- 1) **Fase quiescente:** el hueso se encuentra en condiciones de reposo.
- 2) **Fase de activación:** es la primera fase del proceso de remodelación, las señales bioquímicas y/o mecánicas inducen a las células de revestimiento óseo a liberarse. Esta fase comienza gracias a la retracción de los osteoblastos maduros existentes en la superficie y la digestión de la membrana en dicha superficie por la acción de las colagenasas abriéndole paso a las células de revestimiento. La fase inicial incluye

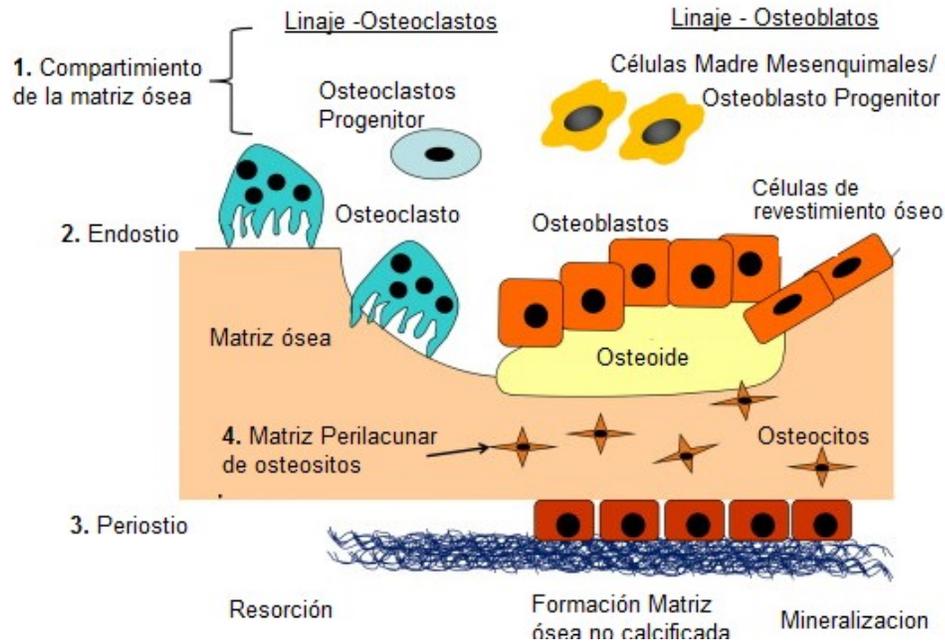
también la unión de los osteoclastos maduros a las superficies óseas donde se llevará a cabo la resorción. Al quedar así expuesta la superficie mineralizada se produce la atracción de células osteoclásticas y sus precursores desde los vasos próximos.

3) **Fase de resorción:** en esta segunda fase, los osteoclastos se adhieren a la superficie ósea y comienzan a disolver el hueso mediante la secreción de iones de hidrogeno y fosfatasas ácidas que reducen el pH y son capaz de degradar los componentes de la matriz ósea. Esta función requiere dos etapas: i) acidificación de la matriz ósea para disolver el componente inorgánico, y ii) liberación de enzimas lisosomales, encargadas de la degradación del componente orgánico del hueso, lo que produce cavidades irregulares en el hueso. Una vez cumplido su función, los osteoclastos sufren apoptosis. Esta etapa culmina con la intervención de los macrófagos.

4) **Fase formación:** una vez los osteoclastos terminan de resorber el hueso, las cavidades quedan libres y son colonizadas por macrófagos que acaban de degradar el colágeno, y activan la liberación de varios factores de crecimiento aquí almacenados, incluyendo proteínas morfogenéticas óseas (BMPs), factores de crecimiento de fibroblastos (FGFs) y factor de crecimiento transformante (TGF- $\beta$ ), encargados del reclutamiento de los pre-osteoblastos, los cuales producen la nueva matriz ósea, inicialmente no calcificada (osteoide) y luego promueven su mineralización, completando así el proceso de remodelación ósea.

5) **Fase de mineralización:** es llevada a cabo por los osteoblastos que se encargan de sintetizar el componente orgánico de la matriz ósea y de controlar el depósito de minerales. Concertada por la intervención de dos tipos de células óseas osteoclastos y osteoblastos. El osteoide comienza a mineralizarse en esta fase, seguida de nuevo por una fase quiescente o de descanso. Cuando este proceso se desequilibra por diversos factores (déficit de estrógenos, envejecimiento, etc.) aparece la patología ósea, como ocurre en la osteoporosis.

El proceso completo de remodelación normalmente toma entre 4 y 6 meses en los seres humanos, aunque esto puede ser altamente alterado por varias enfermedades [49]. El proceso de remodelación ósea es un punto crítico en lo que respecta al diseño y desarrollo de materiales encargado de la reconstrucción de un tejido dañado.



**Figura 8.** Fases de la remodelación ósea: a) fase quiescente. b) fase de activación. c) fase de resorción. d) fase formación. e) fase mineralización. f) Estructura ósea remodelada

(Tomada con modificaciones de referencia [37])

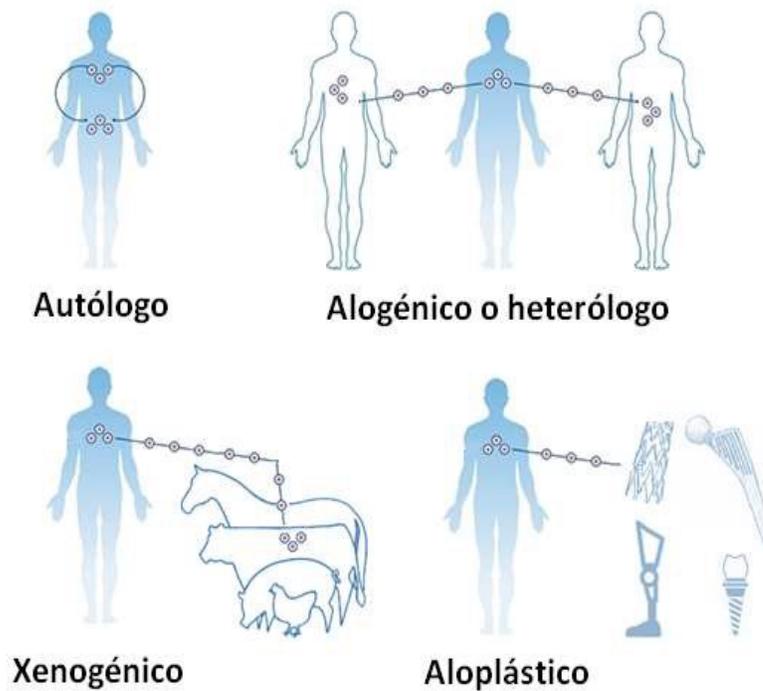
## 1.2. Biomateriales en Regeneración ósea

En los últimos años se ha evidenciado un incremento en la forma de reparar y/o regenerar un tejido óseo en cirugía ortopédica y dental [55]. Los defectos óseos han sido tratados con terapias convencionales generalmente implantes y/o injertos y algunos biomateriales [56]. Pueden ser derivados de productos naturales, poliméricos, cerámicos, composites entre otros. Desafortunadamente, muchos de estos han presentado problemas *in vitro* lo que evidenciaría problemas *in vivo*, algunos de estos sustitutos no son adecuados para casos clínicos, cada patología contiene una serie de condiciones que conllevan a la elección de un sustituto que éste acorde con dichas condiciones [55]. Ejemplo de ellos han sido los injertos óseos un procedimiento de carácter quirúrgico donde su objetivo es reemplazar el hueso perdido con materiales propios del cuerpo del paciente, sustitutos de otros pacientes, o provenientes de otras fuentes [57]. Los injertos óseos pueden clasificarse en autoinjerto, aloinjerto y xenoinjerto (Figura 9). El Autoinjerto también conocido como injerto autólogo o autógeno, es aquel injerto donde se utiliza hueso obtenido del mismo paciente. Puede ser extraído de huesos no esenciales [57].

Este tipo de injertos es el más utilizado ya que existe un menor riesgo de rechazo [55], [57]. Su principal desventaja radica en que se requiere otro sitio quirúrgico adicional al lugar que albergara el implante, potencial a complicaciones posoperatorias [55], [57]. Mientras que el aloinjerto, es derivado de los seres humanos, su principal diferencia con el autoinjerto es que este es extraído de un donante, puede ser recolectado de pacientes vivos pero generalmente son obtenidos a través de bancos de huesos [56], [57]. Requieren de una esterilización que conlleva a efectos contraproducentes sobre las propiedades mecánicas del hueso, además que pueden desactivarse los mecanismos de acción de las proteínas al interior del hueso [56]. También se han evidenciado posibles riesgos infecciosos [56], [57]. Por su parte, los xenoinjertos tiene su origen de donantes diferentes a la especie humana [56], ejemplo de ello es el hueso bovino o porcino previamente liofilizado y desmineralizado. Los xenoinjertos son utilizados como una matriz calcificada [56], [57]. Debido a los principales inconvenientes que los injertos presentaron, las investigaciones actuales se centran en el comportamiento que tiene el entorno celular y los procesos de reparación y/o regeneración con los sustitutos implantados. A continuación, son detallados algunos materiales utilizados en la reparación y/o regeneración del tejido óseo.

### **1.2.1. Polímeros Naturales**

Los polímeros naturales tienen propiedades atractivas tales como biocompatibilidad y biodegradabilidad [11], [58], [59] son sustratos naturales que facilitan la unión celular favoreciendo la proliferación y diferenciación celular [60]. Cabe resaltar que, el control de la porosidad, la carga, y la resistencia mecánica pueden ser controladas modificando las condiciones de polimerización o mediante la introducción de diversos grupos funcionales [11], [59], [61].



**Figura 9.** Tipos de injertos en regeneración de tejido [62].

Sin embargo, a pesar de esto, el uso de estos materiales es limitado, los polímeros naturales presentan baja resistencia mecánica y una tasa de degradación relativamente rápida [59], mientras que los polímeros sintéticos tienen propiedades fisicoquímicas y biológicas más controlables, pero carecen de suficientes señales de reconocimiento biológico [59]. Los polímeros naturales más comúnmente estudiados para el propósito de la ingeniería ósea han sido colágeno, quitosano, seda, alginato, ácido hialurónico, péptidos entre otros [11], [59], [63]–[66]. El colágeno como componente principal del hueso, es un candidato ideal para el diseño de scaffolds ya que es biocompatible, biodegradable y además de esto, estimula la proliferación y diferenciación de las células en la matriz extracelular, se utiliza como una base para scaffolds y es modificado con la adición de polímeros y otras biomoléculas con el fin de mejorar la osteoinductividad [11], [67], [68]. Sin embargo, presenta pobres propiedades mecánicas [11], [68]–[70]. El quitosano por su parte, puede ser considerado como una buena opción para la construcción de scaffolds ya que presenta buena biodegradabilidad, biocompatibilidad, tiene propiedades antibacterianas y bioadhesivas [11], [58], [68], [71], lastimosamente sus propiedades mecánicas son deficientes y no se asemejan a las del hueso normal [71]. La fibroína de seda ha sido utilizada para aplicaciones en ingeniería de tejidos

gracias a las buenas propiedades mecánicas que presenta, biocompatibilidad, biodegradabilidad y flexibilidad morfológica [11], [56], [68]. A pesar de que cuenta con excelentes propiedades mecánicas, la mayoría de los materiales desarrollados a partir de fibroína de seda son débiles, frágiles y presentan una osteoinducción pobre lo que limita su uso [72]. También necesita de otros factores para la osteogénesis [72]. El alginato es biocompatibles, hidrófilo y biodegradable bajo condiciones fisiológicas normales [11], [68]. Debido a que presenta unas propiedades mecánicas débiles, falta de interacciones celulares, los scaffold basados solo en alginato son débiles lo que limita su uso y hace necesario que sea reforzado con otro tipo de materiales para mejorarlo [73]. El ácido hialurónico es natural, hidrófilo, no inmunogénico y también se ha encontrado en las células osteoprogenitoras. Ha sido utilizado en combinación con otros materiales para mejorar su potencial osteogénico [74].

### **1.2.2. Polímeros Sintéticos**

Los polímeros sintéticos han generado gran expectativa en regeneración ósea gracias a que se pueden lograr una gran cantidad de propiedades tanto físicas como químicas simplemente basados en las unidades monoméricas, las reacciones de polimerización y la formación de co-polímeros [75], [76]. Los polímeros sintéticos como la policaprolactona (PCL), ácido poli láctico (PLA) y sus isómeros ácido poli (L-láctico) (PLLA), ácido poli (D-láctico) (PDLA) y ácido poli (D,L-Láctico) (PDLLA), ácido poliglicólico (PGA) y ácido poli (láctico-coglicólico) (PLGA) son los más utilizados [38], [75]. Sus productos de degradación son monómeros que se eliminan por vía fisiológica [11]. Se pueden fabricar scaffold a partir de estos materiales mediante diversas técnicas como electro spinning, evaporación, entre otros [11], [68]. El ajuste de las relaciones molares de estos polímeros pueden influir en las propiedades mecánicas y sus tasas de degradación [68]. Sin embargo, la degradación de ciertos polímeros como el ácido poliglicólico (PGA) y el ácido poliláctico (PLA) pueden crear ambientes ácidos que conllevan a respuestas tisulares desfavorables [11], [69]. La policaprolactona (PCL) presenta una velocidad de degradación lenta y pobres propiedades de adhesión celular [22].

Pese a que los polímeros presentan un gran potencial en regeneración ósea, gracias a sus propiedades de biodegradabilidad y biocompatibilidad que superan a la mayoría de los materiales cerámicos, no cuentan con un buen rendimiento osteogénico, haciendo necesario el uso de materiales que puedan optimizar esta propiedad. Es ahí; donde

algunos materiales cerámicos juegan un papel importante en regeneración ósea ya que presentan mayor similitud con el hueso natural, gracias a esto, se tendría una mayor capacidad para simularlo.

### **1.2.3. Metales**

Numerosas aplicaciones en el área de la medicina se basaron en implantes con uno o varios componentes metálicos [30], [63], [77]. Algunos usos específicos fueron el reemplazo de tejidos dañados o disfuncionales con el fin de restaurar su función, principalmente en aplicaciones ortopédicas, rellenos dentales y actualmente como tornillos para implantes dentales y alambres de ortodoncia [77]. Generalmente, los metales cuentan con numerosas ventajas, ya que cuentan con excelentes propiedades mecánicas lo que implica una estabilidad a largo plazo en el entorno del implante. Lastimosamente, este entorno es muy reactivo y puede incitar la liberación de iones metálicos que provocan reacciones inflamatorias y degradan los metales generando corrosión [78], [79]. Las propiedades mecánicas de un metal deben coincidir con los requisitos para aplicaciones específicas en el cuerpo humano, debe ser lo suficientemente fuerte y resistente a la fatiga y al desgaste en un entorno altamente corrosivo.

### **1.2.4. Cerámicos**

En los últimos 40 años, la cerámica se ha utilizado en aplicaciones médicas con el fin de construir y reemplazar partes del cuerpo que se encuentren dañadas. A este tipo de cerámicas se le conocen como biocerámicas [11], [80] y generalmente presentan una clasificación como materiales reabsorbibles o no reabsorbibles, de acuerdo con su degradabilidad en fluidos que simulan los fluidos corporales [80]. Los cerámicos son utilizados debido a sus propiedades químicas y cristalinidad similar a los componentes minerales presentes en el hueso. Estos materiales presentan alta biocompatibilidad y bioactividad [11]. La parte inorgánica del hueso se compone de fosfatos de calcio tipo Hidroxiapatita (HA), que permiten la formación de tejido óseo en su superficie [11], [19], [44], [69]. Este tipo de material ha exhibido buenas propiedades como un implante, pero presenta problemas particulares con sus propiedades mecánicas especialmente cuando se habla de fractura y fatiga [11], pese a esto son una mejor alternativa que los scaffold poliméricos ya que proporcionan una mejor resistencia mecánica [79]. Los materiales

cerámicos que comúnmente son utilizados para la reparación o regeneración ósea son los biovidrios y diferentes fosfatos de calcio.

#### 1.2.4.1 Biovidrios

Según ASTM, la definición de vidrio "***it is an inorganic product of fusion cooled to a rigid condition without crystallising,***" [81]. Luego de muchas discusiones y modificaciones, la definición de vidrio ha sido "***an amorphous solid, completely lacking in long range periodic atomic structure and exhibiting a region of glass transition behavior,***" [81], [82]. Los vidrios se caracterizan por ser aparentemente duros, frágiles, por experimentar una transición denominada transición del vidrio, la cual ocurre en una región particular, depende de la velocidad de enfriamiento o temperatura de transición vítrea ( $T_g$ ). La estructura de los vidrios ha sido ampliamente estudiada, pero la teoría que más destaca es propuesta por Zachariasen en 1932, la cual hace referencia que, a una misma composición, la rigidez de un sólido en estado vítreo y su correspondiente cristalino son semejantes dentro de un amplio rango de temperaturas. Lo cual implica que la energía interna de ambas fases es similar, es decir, que se encuentran constituidas por unidades estructurales idénticas y con fuerzas de enlaces muy similares [83]. La diferencia es que los vidrios presentan un rango de valores para las longitudes y los ángulos de enlace, mientras que los cristales presentan valores fijos. Es por esta razón, que los materiales vítreos presentan una falta de orden en la orientación de las unidades estructurales que lo constituyen [84], [85].

De acuerdo a la composición química del vidrio, puede hacerse una clasificación (Tabla 3), existiendo vidrios de carácter orgánico, los cuales están basados en compuestos orgánicos simples y polímeros orgánicos principalmente, mientras que los vidrios inorgánicos están consistidos por un elemento no metálico o una aleación de metales, de un óxido o más, entre otros [83]. Además de esto, los vidrios de carácter inorgánico a su vez, se encuentran de 2 tipos: naturales y sintéticos. Los naturales son generalmente encontrados en rocas volcánicas mientras que los vidrios sintéticos son obtenidos al fundir materias primas o por exploración de otras rutas de síntesis [83].

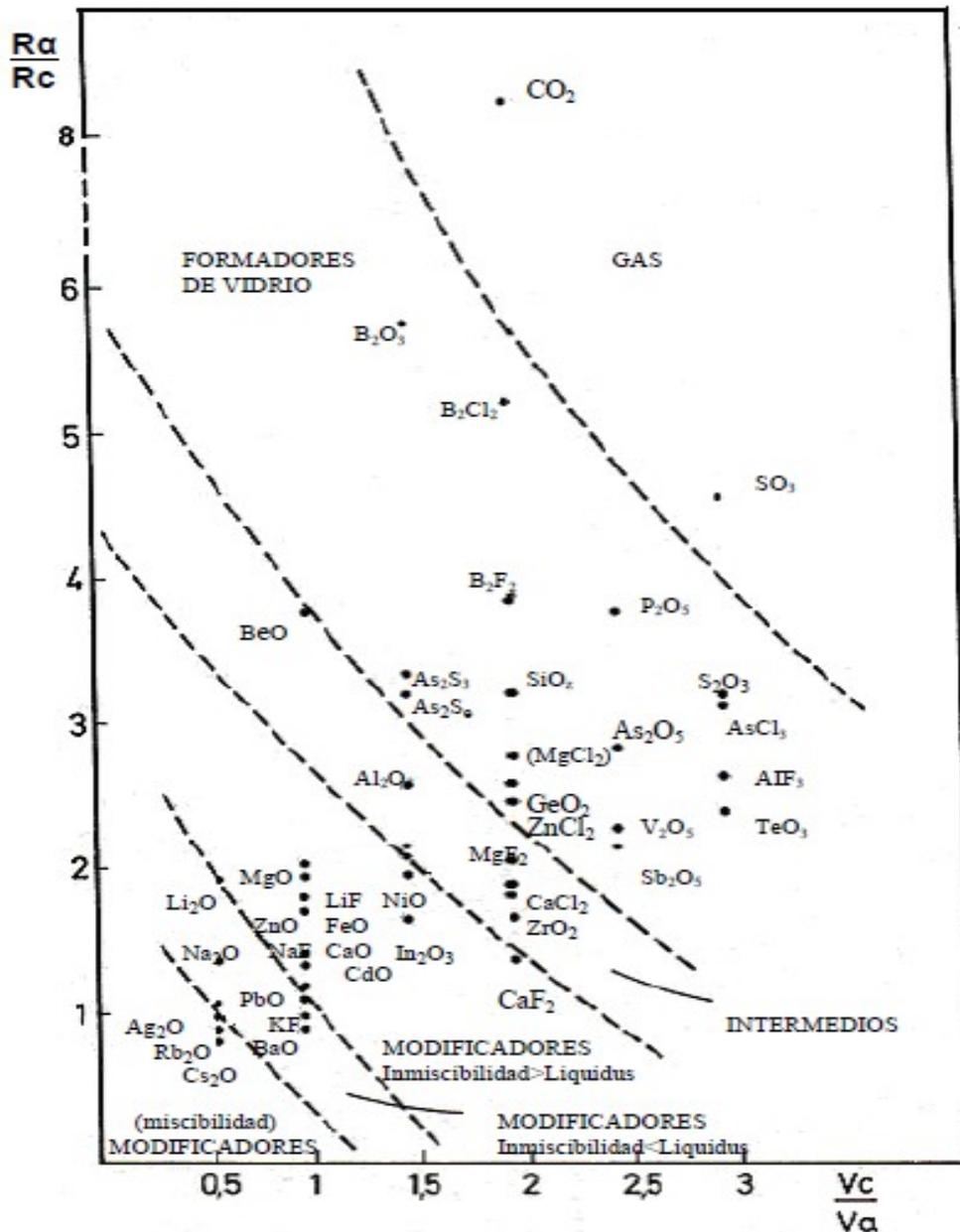
Las materias primas empleadas para la fabricación de un vidrio son clasificadas según el papel que desempeñan durante el proceso de formación. Se pueden encontrar cuatro grupos: vitrificante, fundentes, estabilizantes y componentes secundarios [81], [86]. Los

vitrificante son todas las sustancias formadoras de vidrio, principalmente son óxidos como  $\text{SiO}_2$ ,  $\text{B}_2\text{O}_3$ ,  $\text{P}_2\text{O}_5$ ,  $\text{GeO}_2$ ,  $\text{TeO}_2$ ,  $\text{V}_2\text{O}_5$ ,  $\text{SeO}_2$ ,  $\text{MoO}_3$ ,  $\text{TiO}_2$  y  $\text{Bi}_2\text{O}_3$  constituyen sistemas binarios, ternarios, cuaternarios y multicomponentes. Particularmente,  $\text{SiO}_2$ ,  $\text{B}_2\text{O}_3$ ,  $\text{P}_2\text{O}_5$  y  $\text{GeO}_2$ , tienen la habilidad de formar vidrios y cuando son mezclados con otros óxidos forman vidrios que pertenecen a un sistema multicomponente; refiriéndose a vidrios convencionales ya referidos ampliamente en la literatura.

**Tabla 3.** Clasificación de los vidrios [87].

Tipo de Vidrio		Ejemplos
Inorgánicos	Elementos	No metálicos S, Se, P
		Aleaciones metálicas Au-Si, Pt-Pd, Cu-Au
	Óxidos	$\text{SiO}_2$ , $\text{B}_2\text{O}_3$ , $\text{P}_2\text{O}_5$ , $\text{SiO}_2\text{-Na}_2\text{O}$ , $\text{TeO}_2\text{-V}_2\text{O}_5$ , $\text{B}_2\text{O}_3\text{-Al}_2\text{O}_3\text{-CaO}$ , $\text{TeO}_2\text{-GeO}_2\text{-ZnO}$ , $\text{PbO-P}_2\text{O}_5\text{-TeO}_2$ ,
	Calcogenuros	$\text{As}_2\text{S}_3$ , $\text{As}_2\text{Se}_3$ , $\text{GeS}_3$ , $\text{GeSe}_2$ , $\text{P}_2\text{S}_3$ , etc.
	Halogenuros	$\text{BeF}_2$ , $\text{PbCl}_2$ , Oxisales, $\text{HKSO}_4$ , $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ , $5\text{H}_2\text{O}$ , $\text{Ca}(\text{NH}_3)_2$
	Oxinitruros	$\text{Si}_3\text{N}_4\text{-Al}_2\text{O}_3\text{-SiO}_2$ , $\text{AlN-Y}_2\text{O}_3\text{-SiO}_2$
Orgánicos		Glicoles, azúcares, polímeros (polietileno, poliestireno, poliamidas, etc.)

Los fundentes son óxidos modificadores de red vítrea, favorecen la formación de vidrio bajando su temperatura de fusión y facilitando su elaboración. Los estabilizadores son óxidos que no son provechosos para ninguno de los dos grupos anteriores, mientras que los componentes secundarios; incluyen materias primas que incorporan proporciones minoritarias con fines específicos como colorantes, opacificantes, entre otros. Los fundentes y estabilizantes actúan como intermediarios entre los formadores de red y los modificadores. Plumat en 1967, realizó una clasificación de las materias primas basada principalmente en la relación entre el radio del anión y del catión, y la relación entre la valencia del anión y del catión [88]. Esta clasificación, permite clasificar los óxidos, halogenuros y sulfuros, quedando diferenciados en varios grupos: formadores de vidrio, modificadores acordes a si son o no miscibles (figura 10).



**Figura 10.** Clasificación de algunos compuestos de acuerdo a su papel en la formación del vidrio [88].

El primer vidrio bioactivo fue desarrollado en 1969 por Hench. Estos materiales han sido utilizados en la reparación de tejidos y la regeneración ósea [55], [80], [89]–[91]. Los biovidrios presentan propiedades osteointegradoras y osteoconductoras, tiene buena capacidad para unirse a los tejidos blandos y duros al formar una capa de hidroxiapatita muy similar al hueso [92], [93], buena velocidad de degradación, bioactividad, y

capacidad para estimular las células osteoblásticas [11], [69], [93], [94] pero presentan limitaciones en ciertas propiedades mecánicas tales como una baja resistencia a la tenacidad [11], [69], [79]. El biovidrio 45S5 conocido comercialmente como Bioglass® [91], [95]–[97] fue el primer material bioactivo, consiste en una red de silicatos que incorpora minerales que se encuentran de forma natural en el cuerpo humano. Está compuesto por 45% SiO<sub>2</sub>, 24,5% CaO, 24,5% Na<sub>2</sub>O y 6% P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> [19], [73], [89], [95], [98], [99]. El Bioglass® estimula el crecimiento óseo y se une con el hueso de manera rápida, debido principalmente a la formación de una capa de hidroxiapatita sobre la superficie del vidrio [79], [91], [93], [94]. Se ha demostrado que la degradación de este vidrio es dependiente del tiempo y puede permanecer durante algún tiempo en el cuerpo humano. Además del Bioglass® existen otros vidrios bioactivos basados en diagramas ternarios como el biovidrio 58S (60% SiO<sub>2</sub>, 36% CaO, 4% P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>) y 77S (80% SiO<sub>2</sub>, 16% CaO, 4% P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>) [95] y aquellos que incorporan B<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, MgO, K<sub>2</sub>O entre otros [55], [98]–[100] (Tabla 4).

**Tabla 4.** Composiciones de diferentes biovidrios [79].

<b>Composición (%w)</b>	<b>45S5</b>	<b>13-93</b>	<b>6P53B</b>	<b>58S</b>	<b>70S30C</b>	<b>13-93B1</b>	<b>13-93B3</b>	<b>P<sub>50</sub>C<sub>35</sub>N<sub>15</sub></b>
<b>Na<sub>2</sub>O</b>	24.5	6	10.3	0	0	5.8	5.5	9.3
<b>K<sub>2</sub>O</b>	0	12	2.8	0	0	11.7	11.1	0
<b>MgO</b>	0	5	10.2	0	0	4.9	4.6	0
<b>CaO</b>	24.5	20	18	32.6	28.6	19.5	18.5	19.7
<b>SiO<sub>2</sub></b>	45	53	52.7	58.2	71.4	34.4	0	0
<b>P<sub>2</sub>O<sub>5</sub></b>	6	4	6	9.2	0	3.8	3.7	71
<b>B<sub>2</sub>O<sub>3</sub></b>	0	0	0	0	0	19.9	56.6	0

A parte de los biovidrios de silicio, los biovidrios que contienen Na<sub>2</sub>O, CaO, P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> y B<sub>2</sub>O<sub>3</sub> pueden ser usados para reparar, reemplazar o aumentar partes del sistema esquelético que promueven la respuesta beneficiosa del tejido, fomentando la formación de nuevos tejidos e involucrando interacciones de las células con los materiales [79], [89]. Los biovidrios de fosfato son atractivos gracias a sus propiedades ópticas, baja temperatura de fusión y biocompatibilidad [79], [101]. El biovidrio de boro ha presentado características especiales, ya que han exhibido una degradación más rápida que los

obtenidos a base de sílice, se ha evidenciado que esta velocidad de degradación puede coincidir con la velocidad de regeneración ósea [55], [79], [100], [102]–[105]. También puede variarse la composición del vidrio apuntando a diferentes objetivos [97] (Tabla 5), incorporando fuentes de elementos que favorecen el crecimiento óseo como Zn, Cu, F, Mn, Sr y B [79].

**Tabla 5.** Biovidrios con incorporaciones de diferentes elementos [97].

<b>CÓDIGO</b>	<b>RED PRINCIPAL</b>	<b>OBJETIVO</b>
<b>NCL1</b>	<b>SiO<sub>2</sub></b>	Desarrollar un material con propiedades osteogénicas, determinado principalmente por la presencia de una alta cantidad de sílice.
<b>NCL2</b>	<b>SiO<sub>2</sub></b>	Desarrollar un material de carga con propiedades osteogénicas y una tasa de degradación adaptada.
<b>NCL3</b>	<b>B<sub>2</sub>O<sub>3</sub></b>	Desarrollar un material con una tasa de degradación mejorada y un nivel apropiado de bioactividad, así como propiedades mecánicas
<b>NCL4</b>	<b>B<sub>2</sub>O<sub>3</sub></b>	Desarrollar un material con tasa de degradación adaptada y efectos osteogénicos.
<b>NCL5</b>	<b>P<sub>2</sub>O<sub>5</sub></b>	Desarrollar un vidrio reabsorbible con tasa de degradación controlada.
<b>NCL6</b>	<b>P<sub>2</sub>O<sub>5</sub></b>	Desarrollar un vidrio reabsorbible con tasa de degradación controlada y resistencia mecánica mejorada
<b>NCL7</b>	<b>SiO<sub>2</sub></b>	Desarrollar un material con propiedades antibacterianas, principalmente determinado por la presencia de óxido de plata y un buen nivel de bioactividad.
<b>NCL8</b>	<b>SiO<sub>2</sub></b>	Desarrollar un material con propiedades osteogénicas y una tasa de degradación adaptada para aplicaciones sin carga.

El biovidrio de boro también ha demostrado que favorecen la proliferación y diferenciación celular, actúan como buenos sustratos para la liberación de fármacos y para tratamientos de infección ósea [92]. Los biovidrios de boro se derivan del biovidrio 45S5 sustituyendo de manera parcial o total SiO<sub>2</sub> con B<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (conocido como 13-93) [105]–[107]. Todas estas cualidades al incluir boro en los biovidrios puede deberse principalmente a que el boro es indispensable en los procesos biológicos como el crecimiento y mantenimiento óseo [105], [108]. Se ha informado de que la deficiencia de B dio lugar a la alteración o pérdida de importantes funciones fisiológicas asociadas con

el metabolismo del calcio y la formación y remodelación del tejido óseo [109]. También, presenta diversos efectos biológicos como 1) Participa en la angiogénesis, 2) ayuda a mejorar el proceso de cicatrización de heridas y la respuesta a lesiones y/o infecciones, 3) modificaciones del calcio y metabolismos óseos, 4) efectos sobre la función de la vitamina D y las hormonas, incluida la hormona tiroidea, la insulina, el estrógeno y progesterona [108], [110].

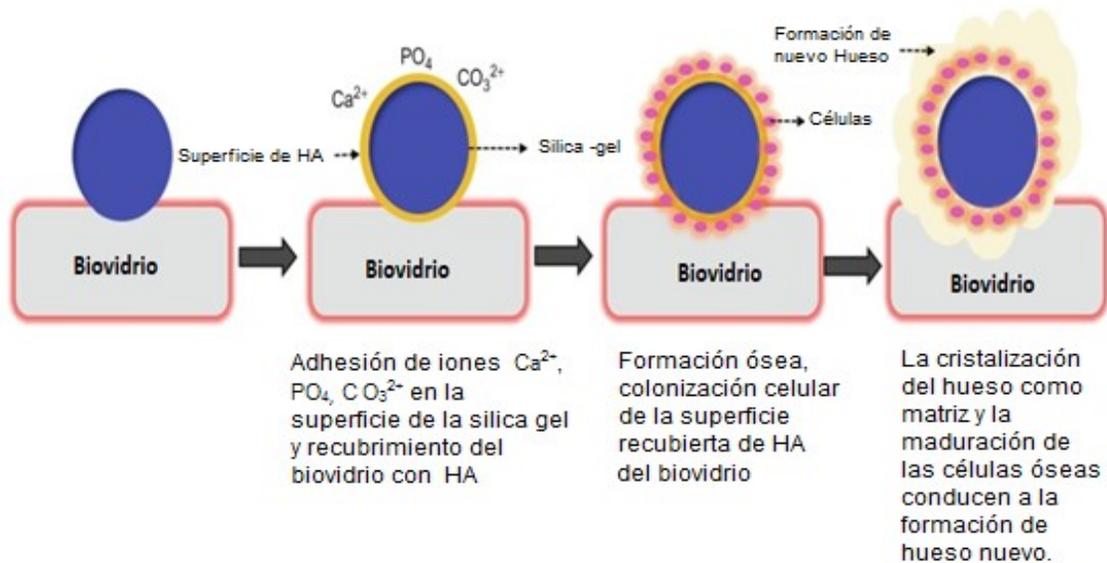
La cantidad de boro en tejido óseo humano (0,90 ppm) es significativamente mayor a la que se encuentran en la sangre o en los tejidos blandos, estas concentraciones dependen de la principalmente de la ingesta de este [105], [108].

#### **1.2.4.1.1 Bioactividad**

El término bioactivo hace referencia a la respuesta biológica en la interfaz del material que proporciona como resultado la formación de un enlace entre los tejidos y el material [111], [112]. Si un biomaterial es capaz de formar enlaces directos con los huesos en el cuerpo humano es clasificado como bioactivo [81]. El vidrio bioactivo se ha diseñado con el objetivo principal de provocar una reacción biológica en la interfaz del material con el fin de estimular la proliferación celular, la respuesta génica y la formación de un enlace entre tejido vivo y el material [113]–[115]. En 1991, Hench propuso que el requisito esencial para que un material se adhiriera al hueso vivo es la formación de apatita en su superficie cuando es implantado en un cuerpo vivo y que esa formación de apatita podría reproducirse en un fluido corporal simulado (SBF) con concentraciones de iones que debían igualar el plasma humano [115]. Es así como el vidrio bioactivo desarrolla en su superficie una capa de hidroxiapatita (HA) que inicia con la unión al hueso, la fase de apatita formada imita química y estructuralmente la fase mineral de hueso [115], [116], (figura 11).

Cuando el biovidrio es sumergido en SBF, se producen tres procesos generales: lixiviación, disolución y precipitación. La lixiviación sería la liberación de iones por intercambio iónico de metales alcalinos o alcalinotérreos con iones  $H^+$  o  $H_3O^+$  de la solución [111]. Los iones modificadores de vidrio se filtran fácilmente de la superficie cuando este es sumergido una solución acuosa, ya que no forman parte de la red de vidrio. El proceso de intercambio iónico lleva a un aumento en la concentración de ión hidróxido aumentando la basicidad de la solución ( $pH > 7$ ). Al romper la red que forma los

enlaces de sílice (-Si-O-Si-O-Si-) por el ataque de los iones hidroxilo (OH<sup>-</sup>) se produce la disolución de esta. Liberándose sílice en la solución en forma de ácido silícico (Si(OH)<sub>4</sub>).

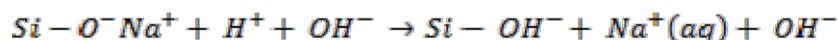


**Figura 11.** Biovidrio y promoción del crecimiento óseo a partir de implantes e interacciones tisulares.

( Tomado con modificaciones de referencia [116]).

En este paso, la composición del vidrio juega un papel importante, ya que la velocidad de disolución de la sílice depende en gran medida de la composición del vidrio. La tasa de disolución de sílice disminuye rápidamente si el porcentaje en peso de SiO<sub>2</sub> supera el 60% debido al aumento de oxígeno puente, que puede mantener la red muy fuertemente. La sílice hidratada luego se somete a policondensación con silanoles vecinos para formar una capa rica en sílice. En la precipitación, los iones de calcio y fosfato son liberados del vidrio junto con los iones de la solución para formar una capa rica en fosfato de calcio sobre la superficie del vidrio. Lentamente, se forman una capa rica en fosfato de calcio al incorporar iones Ca<sup>2+</sup> y PO<sub>4</sub><sup>-3</sup>, esta capa aumenta al incluir calcio y fosfatos solubles del SBF, formando finalmente una capa rica en Ca y P que cristaliza para formar HA. En general, hay cinco etapas de reacción en el lado del implante de la interfaz con un vidrio bioactivo (figura 12) [79], [89], [111], [113], [115], [117].

**Etapa 1:** intercambio de cationes de Na<sup>+</sup> y/o Ca<sup>2+</sup> con H<sup>+</sup> de la solución acuosa, creando enlaces de silanol (Si – OH) en la superficie del vidrio:



El pH de la solución aumenta y se forma una región rica en sílice (deficiente en cationes) cerca de la superficie del vidrio. El fosfato también desaparece del vidrio si está presente en la composición.

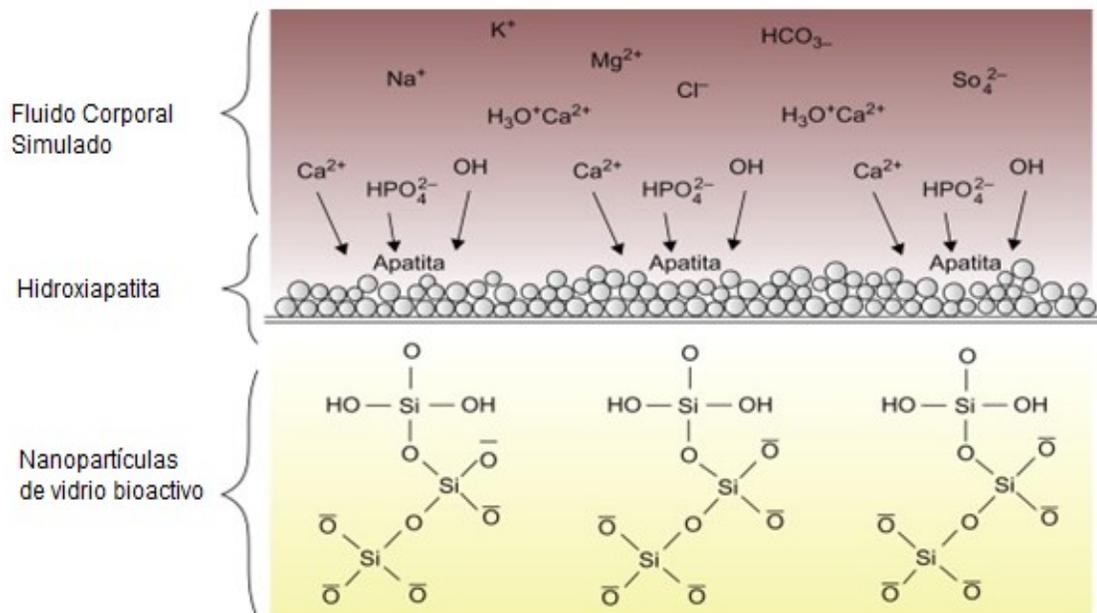
**Etapa 2:** Un pH local alto conduce al ataque de la red de vidrio de sílice por OH<sup>-</sup>, rompiendo los enlaces Si – O – Si. La sílice soluble se desaparece en forma de Si (OH)<sub>4</sub> en la solución, dejando más Si-OH (silanoles) en la interfaz de vidrio-solución:



**Etapa 3:** Condensación de grupos Si-OH cerca de la superficie del vidrio: repolimerización de la capa rica en sílice.

**Etapa 4:** La migración de Ca<sup>2+</sup> y grupos a la superficie a través de la capa rica en sílice y de la solución, formando una película rica en CaO-P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> amorfo sobre la capa rica en sílice.

**Etapa 5:** Incorporación de grupos hidroxilos y carbonato de la solución y cristalización de la capa de CaO-P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> a HA.



**Figura 12.** Esquema del proceso de formación de la capa de hidroxiapatita después de la interacción del vidrio bioactivo con el fluido corporal simulado.

(Tomado con modificaciones de referencia [117]).

### 1.2.4.1.2 Métodos de Obtención Biovidrios

Existe gran variedad de métodos para la obtención de biovidrios (tabla 6), teniendo en cuenta que la porosidad, tamaño de poro e interconectividad son parámetros críticos. La sinterización láser involucra la fusión de un precursor a altas temperaturas usando como su nombre lo indica un láser, al mismo tiempo un gas es inyectado con el fin de enfriar el material fundido. El sol-gel ha sido ampliamente estudiado para la fabricación de biovidrios, su principal ventaja es que se da a bajas temperaturas, lo que proporciona mezclas homogéneas en la composición final del vidrio.

Las características y propiedades del biovidrio obtenido dependen principalmente de una variedad de factores que intervienen en la velocidad de las reacciones de hidrólisis y condensación como el pH, temperatura, tiempo de reacción, tipo de catalizador (ácido o básico) relación molar R entre otras [118], [119]. Controlando estos factores es posible variar tanto la estructura como las propiedades de la red inorgánica obtenida. Para la obtención de biovidrios por la técnica sol-gel, el gel obtenido es calcinado a temperaturas entre 600°C y 700°C aproximadamente con el fin de estabilizar su estructura amorfa y evitar su cristalización [119].

La elaboración del vidrio por fusión es un proceso que inicia con una mezcla, seguido del tratamiento térmico que induce a reacciones químicas de las materias primas y termina con la salida del producto frío a la desembocadura del túnel de recocido. El proceso puede considerarse en seis etapas más o menos diferenciadas: 1) Reacción de los componentes y formación de vidrio. 2) Disolución del excedente de sílice sin reaccionar. 3) Afinado y homogeneización. 4) Reposo y acondicionamiento térmico. 5) Conformación. 6) Enfriamiento y recocido [120]. “Las cuatro primeras etapas suceden sin solución de continuidad dentro del horno con arreglo a un programa térmico cuidadosamente establecido que, de modo general, comprende un aumento progresivo de la temperatura hasta un máximo de unos 1558°C, seguido de un enfriamiento y de un período de estabilización en el que la masa vítrea debe alcanzar la rigurosa homogeneidad térmica requerida para su inmediata conformación” [120]. Estas cuatro primeras etapas son reconocidas como la fusión del vidrio, algunos autores indican que dicha denominación es incorrecta, debido principalmente a que no se trata de una fusión, sino de una serie de reacciones que, tras la formación de distintas fases cristalinas, conducen finalmente a

una fase líquida. De esta manera, resultaría más propio hablar de fundición o, más correctamente, de vitrificación o de formación de vidrio. Sin embargo, el extendido uso de ese término en el lenguaje vidriero común hace muy difícil que pueda desarraigarse y ser sustituido por otro.

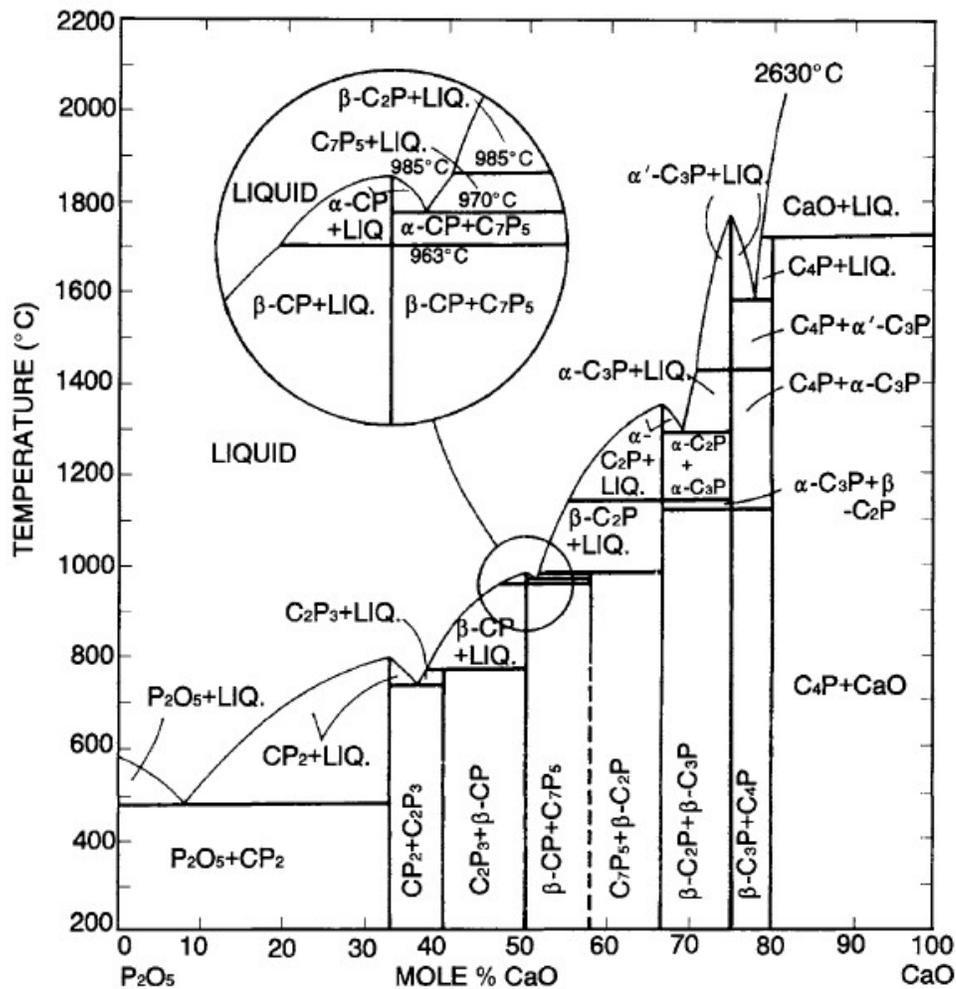
**Tabla 6.** Métodos de síntesis y características de scaffold para obtención de biovidrios  
(Tomada con modificaciones de referencia [79])

Método	Biovidrio	Porosidad (%)	Tamaño de poro ( $\mu\text{m}$ )	(MPa)
<b>Uniones térmicas de</b>				
<b>Partículas</b>	13-93	40-45	100-300	22 $\pm$ 1
<b>Fibras cortas</b>	13-93	45-50	>100	5
<b>Réplica espuma de polímero</b>	45S5	89-92	510-720	0.4 $\pm$ 0.1
	13-93	75-85	100-500	11 $\pm$ 1
	13-93B3	80-85	100-500	5 $\pm$ 0.5
<b>Espuma sol-gel</b>	70S30C	82	100-500	2.4
<b>Congelación de suspensiones</b>	13-93	53-57	90-110	25 $\pm$ 3
	13-93	50-55	60-120	27 $\pm$ 8
	13-93	50	50-150	47 $\pm$ 5
<b>Fabricación sólida</b>				
<b>Sinterización láser</b>	13-93	58-60	700-1000	15 $\pm$ 1
<b>Extrusión</b>	13-93	50	300	140 $\pm$ 70
<b>Robocasting</b>	6P <sub>53</sub> B	60	500	136 $\pm$ 22

### 1.2.4.2 Fosfatos de Calcio

Los fosfatos de calcio son materiales de gran importancia en el campo de la biología, geología, la industria y la medicina. Su formación, funciones y aplicaciones dependerán de su estructura, composición, estabilidad y solubilidad [121]. Han recibido gran atención ya que en su mayoría se utilizan como biomateriales, en ingeniería de tejidos óseos

[122], rellenos óseos [123]–[126], scaffolds [127], [128] o recubrimientos bioactivos [126], administración de fármacos 99,106,107, y rellenos de piel 108,109. La mayoría de los fosfatos de calcio (CaP) a excepción del pirofosfato de calcio ( $\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7$ ) son orto fosfatos de calcio solo por el hecho de contener el grupo  $(\text{PO}_4)^{3-}$  [122], [129]. Los fosfatos de calcio representan una de las familias de minerales más complejas debido a la existencia de varios compuestos de ellos. La estabilidad de cada uno de los fosfatos de calcio se ve afectada por cambios en la composición, las variaciones del pH, condiciones de reacción, temperatura, entre otros factores. Al sintetizar cualquier fosfato de calcio debe tenerse muy en cuenta el diagrama de fases [127], [130], a partir del cual es posible predecir y analizar las transformaciones de fase que sufren los fosfatos de calcio (Figura 13).



**Figura 13.** Diagrama de fases correspondiente al sistema  $\text{CaO}-\text{P}_2\text{O}_5$  representando la

cantidad de los diferentes compuestos en función del porcentaje molar de CaO ( $C=CaO$ ;  
 $P=P_2O_5$ ).[130].

Existen once fosfatos de calcio conocidos, con relaciones molares Ca/P que varían de 0,5 a 2, diferente composición química, estructura cristalográfica y solubilidad en agua (tabla 7) [122], [124], [125], [131]–[133]. Es posible distinguir dos categorías de CaP:

1) fosfatos de calcio obtenidos por precipitación a partir de una solución acuosa a temperatura ambiente y/o bajas temperaturas [122], [125].

2) fosfatos de calcio obtenidos por una reacción térmica [122], [125].

Los fosfatos de calcio, principalmente HA y  $\beta$ - TCP son propensos a inclusión en sus redes cristalinas de algunos elementos [134], [135]. Estos elementos juegan generalmente un papel esencial en la formación, crecimiento y reparación y/o regeneración ósea como el estroncio (Sr), Zinc (Zn), Manganeso (Mn), magnesio (Mg); entre otros [134], [136], [137]. El magnesio es el cuarto catión más importante en el cuerpo humano y el segundo a nivel intracelular, aproximadamente el 50-65% de la cantidad del Mg del cuerpo humano se encuentra en el tejido óseo y tan solo el 1% en la matriz extracelular [135], [138], [139].

El Mg estimula la proliferación de osteoblastos [137], la pérdida de Mg causa inhibición del crecimiento celular debido a la reducción resultante en la síntesis de ADN, ARN y proteínas [135], [140]. El  $\beta$ - TCP es altamente biocompatible y reabsorbible en el tejido óseo y puede utilizarse como portador de Mg [135]. El dopaje tiene un efecto en el proceso de reabsorción del material debido a la liberación de iones, con los cuales se busca desencadenar un tipo específico de respuestas celulares, en especial los iones de Mg permiten ajustar el comportamiento de la absorción del  $\beta$ - TCP desde el instante en que es incluido en la red cristalina disminuyen su solubilidad y estimulando la proliferación de osteoblastos, mejorando de esta manera la formación de nuevo hueso [137], [141].

**Tabla 7.** Fosfatos de calcio: composición química, relación molar Ca/P [123]–[127], [130], [134] [123].

Categoría	Nombre	Abreviación	Fórmula	Ca/P
Bajas temperaturas	Fosfato monocálcico monohidrato	MCPM	$\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0.50
	Fosfato dicálcico dihidratado	DCPD	$\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1.00
	Fosfato dicálcico anhidro	DCPA	$\text{CaHPO}_4$	1.00
	Fosfato octacálcico	OCP	$\text{Ca}_8\text{H}_2(\text{PO}_4)_6 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	1.33
	Hidroxiapatita precipitada	PHA	$\text{Ca}_{10-x}(\text{HPO}_4)_x(\text{PO}_4)_{6-x}(\text{OH})_{2-x}$	1.50 -1.67
	Hidroxiapatita deficiente en calcio	CDHA [132]	$\text{Ca}_{10-x}(\text{HPO}_4)_x(\text{PO}_4)_{6-x}(\text{OH})_{2-x}$ (0 < x < 1)	1.50
	fosfato de calcio amorfo	ACP	$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2 \cdot n\text{H}_2\text{O}$ n = 3–4.5; 15–20% $\text{H}_2\text{O}$	1.50
Altas temperaturas	fosfato monocálcico anhidro	MCPA o MCP [132]	$\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$	0.50
	$\alpha$ -fosfato tricálcico	$\alpha$ -TCP	$\alpha\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	1.50
	$\beta$ -fosfato tricálcico	$\beta$ -TCP	$\beta\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	1.50
	Hidroxiapatita	HA	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$	1.67
	Oxyapatita	OXA	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{O}$	1.67
	fosfato tetracálcico	TTCP	$\text{Ca}_4(\text{PO}_4)_2\text{O}$	2.00

### **1.2.4.2.1 Fosfatos Monocálcico Monohidratado (MCPM) y Fosfato Monocálcico Anhídrido (MCPA)**

El fosfato monocálcico monohidratado  $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$  (MCPM) cristaliza en el sistema monoclinico, es el fosfato más soluble y más ácido; se convierte en la forma anhídrida  $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$  (MCPA) cuando se somete a más de  $100^\circ\text{C}$  [121], [129], [130].

### **1.2.4.2.2 Fosfatos Dicálcico Dihidratado (DCPD) y Fosfato Dicálcico Anhídrido (DCPA)**

El fosfato dicálcico dihidratado  $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (DCPD) es conocido por su nombre mineral brushita [127], [129]. El Fosfato Dicálcico Dihidratado monoclinico [121], [127], [129], es una fase estable en entornos débilmente ácidos de pH 4-6 [127]. Una característica importante del Fosfato Dicálcico Dihidratado es su uso como precursor para la síntesis de HA, ya que se asemeja a los componentes minerales del hueso humano y las piedras de los riñones [127], [142].

El Fosfato Dicálcico Dihidratado se transforma gradualmente a cristales de Hidroxiapatita (HA) bajo condiciones fisiológicas [143], su conversión a fosfato dicálcico anhídrido  $\text{CaHPO}_4$  (DCPA) se produce a temperaturas relativamente bajas [127], [129]. El fosfato dicálcico anhídrido es conocido como monetita, cristaliza en la forma triclinica [121], [129].

### **1.2.4.2.3 Fosfato Octacálcico (OCP)**

A pH fisiológico el fosfato octacálcico es más soluble que la apatita, pero menos soluble que los demás fosfatos de calcio. Es de estructura triclinica [121], [129]. Debido a sus características estructurales, el carbono se encuentra como una fase intermedia durante la precipitación de HA termodinámicamente más estable [130].

### **1.2.4.2.4 Fosfato de Calcio Amorfo (ACP)**

Los fosfatos de calcio amorfos (ACP), se encuentran frecuentemente como una fase de transición durante la precipitación de otros fosfatos de calcio en soluciones acuosas. La formación de fosfatos de calcio amorfos se favorece mezclando rápidamente soluciones

muy concentradas de calcio y fosfato a elevado pH y baja temperatura. Es común encontrarlos al inicio de la precipitación debido a que tienen menor energía superficial que el fosfato octacálcico y que la HA [144].

#### 1.2.4.2.5 Hidroxiapatita (HA)

El término apatita se refiere a una familia de cristales representados por la fórmula  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{X}_2$  donde X puede ser un hidróxido (hidroxiapatita (HA):  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ , flúor (fluoroapatito:  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{F}_2$ ) o cloro (cloroapatita:  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{Cl}_2$ ) [145]. Estos tres minerales pertenecen a la familia de los ortofosfatos de calcio, los cuales en su forma química pura son cristales blancos. Desde el punto de vista químico y estructural, la hidroxiapatita es el fosfato de calcio más similar al componente mineral de huesos y dientes [121], [129]. La hidroxiapatita presenta una estructura monoclinica, que cuando se calienta por encima de  $250^\circ\text{C}$  sufre una transformación a hexagonal bipiramidal [145].

#### 1.2.4.2.6 Fosfato Tetracálcico (TTCP)

Tiene la relación Ca/P más alta (Ca/P=2) y fórmula química  $\text{Ca}_4(\text{PO}_4)_2\text{O}$ . Cristaliza en estructura monoclinica. Por su fuerte basicidad el fosfato tetracálcico reacciona con agua para producir Hidroxiapatita e hidróxido de calcio [121], [129], [130].

#### 1.2.4.2.7 Fosfato Tricálcico ( $\alpha$ y $\beta$ )

El fosfato tricálcico (TCP) se presenta principalmente en dos formas alotrópicas:  $\alpha$ -monoclinica y  $\beta$ -romboédrica [146], [147], y ambas gozan de la misma capacidad de osteoconducción y el mismo comportamiento biodegradable. Sin embargo; a partir de las temperaturas de fase específicas, acorde al diagrama de fase de Kreidler y Hummel [148], [149], el  $\beta$ -TCP (romboédrico) se transforma a  $1125^\circ\text{C}$  hacia  $\alpha$ -TCP (monoclinico) y a  $1430^\circ\text{C}$ , el  $\alpha$ -TCP se convierte a  $\alpha'$ -TCP (hexagonal). El  $\alpha'$ -TCP solo es estable por encima de una temperatura tan alta y la reversión hacia  $\alpha$ -TCP ocurre inmediatamente cuando se enfría. En cambio, el  $\alpha$ -TCP es metaestable a temperatura ambiente y la discusión sobre la velocidad de enfriamiento requerida para evitar la reconversión a  $\beta$ -TCP es amplia, varios investigadores indican la necesidad de un enfriamiento rápido para lograrlo [148], [150], mientras que otros indican que usar velocidades de enfriamiento

bajas como 5 °C / min es suficiente para evitar dicha transformación de fase [151]. La discusión también se basa en el contenido de impurezas que pueden estabilizar el polimorfo  $\alpha$ , por ejemplo, silicio (Si) u otros, el polimorfo  $\beta$ , por ejemplo, magnesio (Mg) y estroncio (Sr) [148], [151].

#### 1.2.4.2.8 Solubilidad de los Fosfatos de Calcio

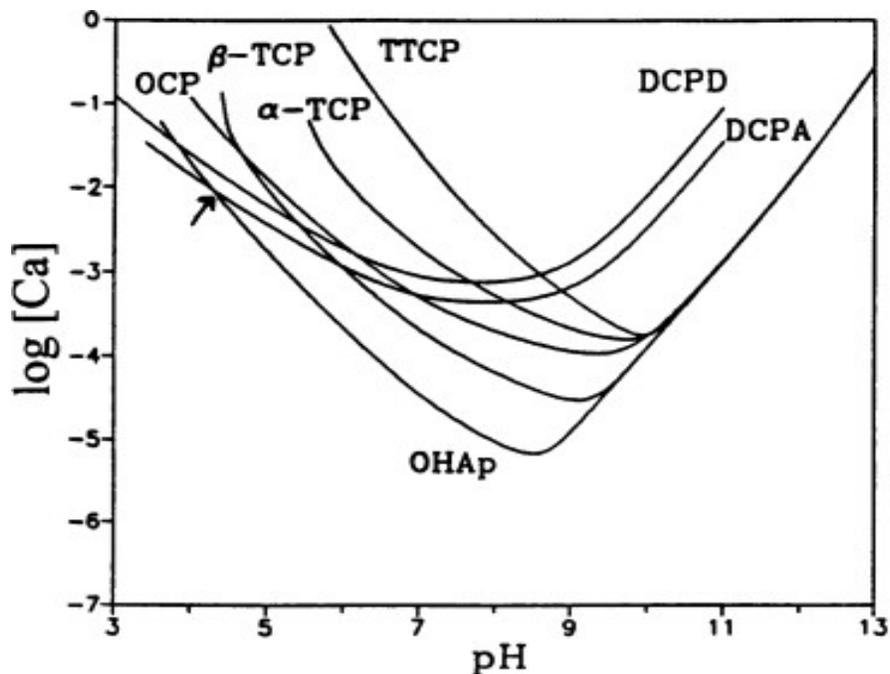
La solubilidad de un mineral en una solución acuosa del sistema  $A(OH)_n - H_nX - H_2O$ , es descrita en función de las concentraciones analíticas de los iones  $A^{+n}$  y  $X^{-n}$ . Sin embargo, cuando se presenta una base  $A(OH)_n$  y un ácido  $H_nX$  débil se hace necesario utilizar el pH con el fin de realizar una descripción más completa de la solubilidad y del comportamiento del mineral, a estas representaciones gráficas se les conoce como diagramas o isotermas de solubilidad [152]. En pocas palabras, la solubilidad es una medida de la capacidad de una cierta sustancia para disolverse en otra, es decir; indica que tan equilibrada se encuentra una fase sólida con los componentes disueltos en una solución [121].

Los fosfatos de calcio son estudiados a partir del diagrama de solubilidad en el sistema  $Ca(OH)_2 - H_3PO_4 - H_2O$  [122], [124], [125], [131], [132], [152], el cual permiten la obtención de posibles mezclas de fases de fosfatos de calcio que pueden hidrolizar.

En las figuras 14 y 15, se muestran las isotermas de solubilidad calculadas a 37°C para soluciones saturadas en equilibrio con diferentes sales de fosfatos de calcio en la relación  $\text{Log} [Ca]$  vs pH y  $\text{Log} [P]$  vs pH respectivamente. Las isotermas toman en cuenta siete fosfatos de calcio: fosfato tetracálcico (TTCP), fosfato dicálcico dihidratado (DCPD), fosfato dicálcico anhidro (DCPA), fosfato octacálcico (OCP), fosfato tricálcico alfa ( $\alpha$ -TCP), fosfato tricálcico beta ( $\beta$ -TCP) e hidroxiapatita (HA). Un rasgo usual de las isotermas de las figuras 14 y 15 es que tienen pendientes negativas en las regiones neutras y ácidas (pH < 7) de los diagramas de solubilidad. Esto indica que estos compuestos son más solubles a medida que el pH decrece. Las sales de fosfato dicálcico dihidratado (DCPD) y

fosfato dicálcico anhidro (DCPA) son sales ácidas en comparación con las sales fosfato octacálcico (OCP), fosfato tricálcico alfa ( $\alpha$ -TCP), fosfato tricálcico beta ( $\beta$ -TCP), Hidroxiapatita (HA) y fosfato tetracálcico (TTCP) ya que cuentan con pendientes negativas más pequeñas. En las regiones alcalinas (figura 14) la concentración de Calcio aumenta a medida que se incrementa el valor del pH, a excepción del fosfato dicálcico dihidratado (DCPD) y fosfato dicálcico anhidro (DCPA), mientras que la concentración de P disminuye al aumentar el pH (figura 14).

El comportamiento de la isoterma  $\log [P]$  vs pH también ha sido relacionada con la basicidad del compuesto. Las figuras 14 y 15, proporcionan información acerca de las estabildades relativas de las diferentes sales para distintos valores de pH. En general, para una sal cuya isoterma se encuentra por debajo de la isoterma de otra sal, será más estable y por ende menos soluble que la otra sal.

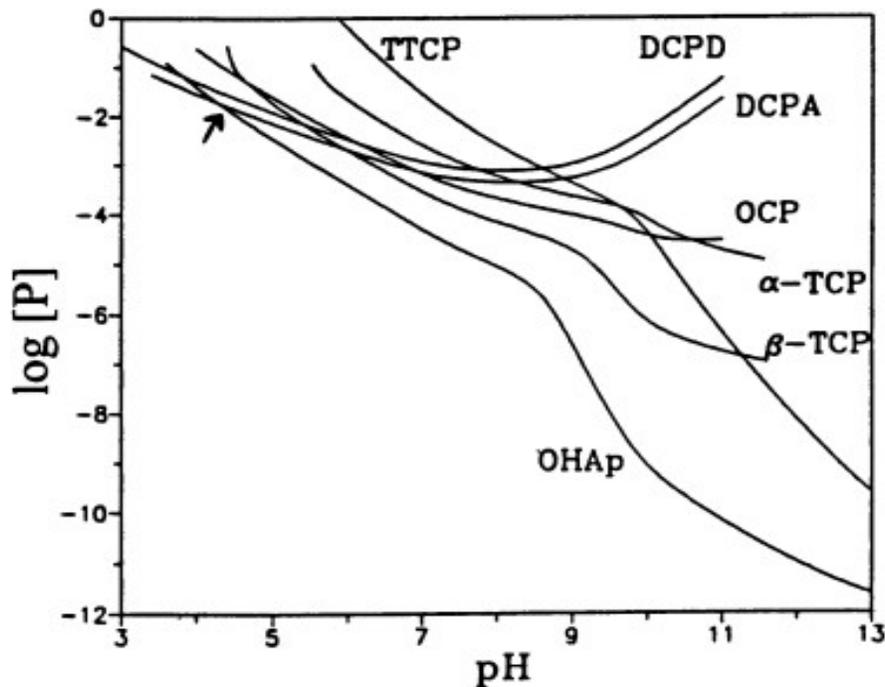


**Figura 14.** Diagrama de solubilidad para el sistema  $Ca(OH)_2-H_3PO_4-H_2O$  en la relación  $\text{Log [Ca]} vs \text{pH}$  [121]

En la figura 15, puede observarse que la Hidroxiapatita es la sal menos soluble de todas hasta que el pH cae por debajo de 4.2 ( $\text{pH} \approx 4.2$ ), es en este punto donde la sal menos soluble es el fosfato dicálcico anhidro (DCPA); de igual manera puede observarse que cuando el pH es menor de 8.5 ( $\text{pH} < 8.5$ ) la sal más soluble es el fosfato tetracálcico (TTCP) mientras que para pH mayores de 8.5 ( $\text{pH} > 8.5$ ) la sal más soluble es el fosfato dicálcico dihidratado (DCPD), a pH bajos ( $\text{pH} < 7$ ) indica que los fosfatos de calcio son más solubles en medios ácidos [121]. A  $\text{pH} = 7.0$  la solubilidad decrece en el orden:



Termodinámicamente, se infiere que las estabilidades relativas entre las distintas sales serán la fuerza motriz de las posibles reacciones químicas que ocurran en materiales basados en fosfatos de calcio [152].



**Figura 15.** Diagrama de solubilidad para el sistema  $\text{Ca}(\text{OH})_2\text{-H}_3\text{PO}_4\text{-H}_2\text{O}$  en la relación  $\text{Log [P]}$  vs  $\text{pH}$  [121].

Los diagramas de solubilidad de la figura 14 y 15 solo son válidos para el sistema  $\text{Ca}(\text{OH})_2\text{-H}_3\text{PO}_4\text{-H}_2\text{O}$  a  $37^\circ\text{C}$ . es decir; que las composiciones que se describen en estos

diagramas se han obtenido equilibrando una determinada sal en una solución acuosa sólo de ácido fosfórico ( $\text{H}_3\text{PO}_4$ ) o de hidróxido de calcio ( $\text{Ca}(\text{OH})_2$ ) y no en una solución que contenga otro tipo de compuestos diferentes a los del sistema ternario que está considerando [152]. La estabilidad relativa de las diferentes sales y su reactividad, tienen algunos factores que pueden influenciar su comportamiento tales como: la relación  $[\text{Ca}]/[\text{P}]$ , la temperatura (T) o el efecto de la formación de iones carbonato.

#### 1.2.4.2.9 Obtención de Fosfatos de Calcio

Se han utilizado muchas rutas de síntesis para la obtención, control del tamaño y forma de los fosfatos de calcio, incluyendo rutas como: precipitación química, procesos sol-gel, hidrotermal, sono-química, combustión, síntesis asistida por microondas entre otros (Tabla 8) [123]. El tamaño de los fosfatos de calcio se ve directamente relacionado por parámetros de síntesis como la relación  $[\text{Ca}]/[\text{P}]$ , la temperatura, y el valor del pH [123], [153].

La precipitación química es la ruta más sencilla para la síntesis de cristales fosfatos de calcio. El tamaño del material obtenido tiende a aumentar conforme aumenta el tiempo y la temperatura de reacción [123], [153], [154]. Los productos obtenidos por precipitación química suelen ser aglomerados y su distribución de tamaño no puede ser bien controlada mediante los parámetros de reacción. A diferencia del método de precipitación química, el método hidrotermal caracterizado por presentar una presión y temperatura alta puede formar cristales de fosfatos de calcio bien definidos con morfologías regulares, de tamaño definido, y posiblemente menor aglomeración [123], [153]. Por lo general, por el método de precipitación química e hidrotermal, es difícil controlar el tamaño y la distribución de tamaño de partícula debido a una nucleación rápida y un posterior crecimiento del cristal [123]. La microemulsión, es un proceso eficaz a la hora de controlar la distribución de tamaño y forma de los cristales de fosfatos de calcio, ya que la etapa de nucleación y crecimiento pueden ser controlados por los tensoactivos que sirven como plantilla [123].

Las técnicas de combustión se caracterizan por reacciones químicas exotérmicas producto de fenómenos de óxido-reducción entre los precursores de los óxidos deseados (por lo general sales) quienes dentro de la reacción se conocen como oxidantes y un

reductor que es el combustible empleado. Usualmente los combustibles usados son ácido cítrico, glicina, urea etc. En las reacciones de combustión el calor liberado producto de los fenómenos de óxido-reducción entre el combustible y el oxidante permite alcanzar una temperatura (temperatura de flama). Esta afecta a su vez de forma directa o indirecta las propiedades morfológicas finales de los polvos. En esta técnica es muy difícil controlar la forma de las partículas, pero por lo general son agregados nanométricos.

La condensación puede también ocurrir entre el alcoxisilano y el grupo silanol, liberando un alcohol. Al igual que la reacción de hidrólisis, la reacción de condensación también se puede catalizar de forma ácida o básica. Las reacciones de hidrólisis y condensación ocurren simultáneamente. La velocidad de ambos procesos determina la estructura de los productos [118], [155]. Las técnicas de combustión se caracterizan por reacciones químicas exotérmicas producto de fenómenos de óxido-reducción entre los precursores de los óxidos deseados (por lo general sales) quienes dentro de la reacción se conocen como oxidantes y un reductor que es el combustible empleado. Usualmente los combustibles usados son ácido cítrico, glicina, urea etc.

Los parámetros a tener en cuenta son la relación combustible/ oxidante, temperatura, gases generados, composición de los precursores. En las reacciones de combustión el calor liberado producto de los fenómenos de óxido-reducción entre el combustible y el oxidante permite alcanzar una temperatura de ignición (temperatura de flama) la cual se sostiene determinado tiempo. La máxima temperatura de combustión ( $T_m$ ) se alcanza cuando la relación oxidante / combustible ( $\varphi$ ) es igual a 1, esta relación es expresada en teniendo en cuenta los coeficientes estequiométricos que participan en la reacción [156]:

$$\varphi = \frac{\sum \text{Coefficient Oxidant elements} \times \text{Valence}}{(-1) \sum \text{Coefficient Reducing elements} \times \text{Valence}} \quad \text{ecn (1)}$$

El elemento oxidante es el oxígeno, elementos como el carbono, hidrógeno y los cationes metálicos son considerados elementos reductores, mientras que el nitrógeno es neutro. Los elementos oxidantes poseen valencias positivas y los elementos reductores poseen valencias negativas. Una reacción es considerada deficiente en combustible cuando  $\varphi > 1$ , y con elevada cantidad de combustible cuando  $\varphi < 1$ . Del adecuado manejo del parámetro  $\varphi$  depende principalmente las propiedades morfológicas, la porosidad y las aglomeraciones finales de los polvos [156].

## 1.3. Scaffolds en Regeneración Ósea

A diferencia de los años noventa, cuando el diseño y la fabricación de scaffolds se basaban directamente en implantes bioreabsorbibles, los enfoques actuales utilizan ampliamente materiales destinados a proporcionar una matriz adecuada para el crecimiento y proliferación celular. El espectro básico de materiales se ha ido ampliando, incluyendo tanto materiales orgánicos como inorgánicos, de origen natural y sintético. Gracias a esta evolución han sido utilizados para el diseño y construcción de scaffold para la ingeniería de tejidos óseos, polímeros de origen natural y sintético, cerámicos como fosfatos de calcio, biovidrios entre otros [69], [94], [157]–[161].

### 1.3.1 Características de los Scaffold

Los scaffolds ideales para la regeneración de tejido óseo debe ser diseñado para imitar la estructura y la función biológica del tejido óseo tanto química, jerárquica y estructuralmente [27]. Son estructuras tridimensionales que guían y soportan la migración celular, la proliferación, adhesión y diferenciación [157], [162]–[165]. Los scaffolds deben cumplir criterios altamente específicos que no se limiten únicamente a su interacción celular. Idealmente, un scaffold debe ser [63], [64], [67], [79], [157], [162], [164], [166]–[171].

- Tridimensional y altamente poroso con una red interconectada de poros para el crecimiento celular, transporte de flujo de nutrientes y desechos metabólicos. La porosidad es un elemento crítico de las propiedades osteoconductoras del material del scaffold, la estructura de los poros de los scaffold (es decir, el tamaño de los poros, el volumen y la interconexión) es una consideración esencial para el crecimiento, migración celular, el flujo de nutrientes, la vascularización y producción de matriz extracelular (ECM) [58], [64], [79], [157], [159], [162], [166], [172]–[175]. La porosidad óptima y el tamaño de poro para un scaffold de hueso tridimensional aún están en discusión. Sin embargo; éstos deben presentar una estructura jerárquica de poros que comprenda un poros interconectado con diámetros superiores a 100  $\mu\text{m}$  y poros interconectados entre 2 y 50  $\mu\text{m}$  esto con el fin de favorecer el crecimiento de hueso vascularizado y la adherencia de células osteoprogenitoras respectivamente [92]. Los estudios sugieren que los

scaffolds actualmente diseñados con tamaños de poro pequeño (<200  $\mu\text{m}$ ) tiene formación de hueso muy limitada debido a la disminución de oxígeno y la difusión de nutrientes a través de los scaffolds. Por otra parte, los scaffolds con un tamaño de poro medio de 300 micras, aumentan la proliferación de osteoblastos y la diferenciación a través de todo el scaffold, debido a una mayor neovascularización y el transporte de masa de oxígeno y nutrientes [8], [38], [157], [162], [163], [166], [172].

- Deben tener propiedades de superficie [22], [92] (rugosidad, cristalinidad, pH, presión osmótica, reacciones inflamatoria, etc) que se optimizan para la unión, migración, proliferación y diferenciación de tipos de células de interés [92], [163], [176].
- Sus propiedades mecánicas deben ser lo más similares posible a las del tejido en el lugar de implantación [12], [58], [166], [172]. Es decir, debe resistir cargas mecánicas diversas que se pueden evaluar mediante sus propiedades mecánicas tales como la resistencia a la tracción (hueso cortical 50-150 MPa; hueso esponjoso 10-100 MPa), resistencia a la compresión (hueso cortical 130-230 MPa; hueso esponjoso 2-12 MPa ), Modulo de Young (hueso cortical 7-30 GPa; hueso esponjoso 0.02-0.5 GPa), entre otras [12].
- Degradabilidad: Para el diseño de un scaffold deben considerarse las propiedades fisicoquímicas, morfológicas y biomecánicas, así como la cinética de degradación [12], [22], [43], [67]. Paralelo a la formación de tejido óseo, el scaffold también debe someterse a degradación con el fin de permitir la sustitución del material de andamiaje por hueso nuevo en el proceso de regeneración. Además, el scaffold es responsable del soporte mecánico (temporal) y la estabilidad en el sitio de implantación hasta que el nuevo hueso está completamente madurado y sea capaz de soportar la carga mecánica [12], [22], [67], [166], [175].
- La estructura de un scaffold debe ser fácil y eficientemente reproducible en diferentes formas y tamaños [12].

- Osteoconductivos: capacidad para permitir que las células óseas se adhieran, proliferen y formen una matriz extracelular en su superficie y poros [22]. Esta propiedad está relacionada con la biodegradabilidad porque el material del scaffold debe reabsorberse para hacer espacio al tejido maduro que inicialmente ayudó a soportar. Además, los scaffold s actúan como un molde de la forma anatómica deseada.
- Osteoinductivos: capacidad para inducir la formación de hueso nuevo a través de estímulos biomoleculares o mecánicos, reclutando células progenitoras y permitiendo la diferenciación en un fenotipo controlado o linajes particulares [177].
- Osteogénicos: capacidad de actuar como osteoblastos o células mesenquimales (capaces de derivar en un linaje osteoblástico) porque estas células pueden formar y mineralizar la matriz extracelular de tejido óseo nuevo.
- Osteointegradores: Capacidad para formar enlaces fuertes con el tejido óseo circundante que permite la continuidad del material y la carga de transferencia adecuada.

**Tabla 8.** Técnicas utilizadas en la obtención de fosfatos de calcio [123].

	Métodos	Característica del producto			Ventajas	Desventajas	Ref.
		Tamaño	Fase	Forma			
Métodos en seco	Estado sólido	Micrométrico	HAP/ $\beta$ -TCP	Diversas y porosas	Bajo costo, escalable	Aglomeración	[178]
	Mecano- químico	nanométrico	HAp	Nano granos Nano varillas	Bajo costo, buena cristalinidad, alta reproducibilidad	Aglomeración, contaminación durante la molienda	[179]
Métodos Químicos	Coprecipitación	Nanométrico	HAp, $\beta$ -TCP, CDA	Nano varillas	Bajo costo, método simple	Agregados	[180]
	Sol-gel	Nanométrico o pocas micras	HAp, $\beta$ -TCP	0D-1D, esféricas	Alto Control estequiométrico	Algunos reactivos son costosos y especiales, pequeña escala, aglomeraciones	[181]–[184]
Métodos	Auto ensamble o método directo de cristalización	nanométrico micrométrico	DCPD, DCPA, HAp, Mezcla de fases	Flores, platos, Diversas estructuras	Formas controlables	Alto costo	[185]–[187]
	Sono- químico	Nanométrico	HAP	esferas, nanorods	Bajo costo, alta cristalinidad, buena dispersión	Pequeña escala	[188]

	Método	Característica del producto			Ventajas	Desventajas	Ref.
		Tamaño	Fase	Forma			
	Hidrotermal/ Hidrotermal con plantilla Hidrotermal asistido por MW	nanométrico micrométrico	Múltiples fases. HAP, $\beta$ - TCP, DCPD, DCPA	Múltiples formas: varillas, esferas, agujas, Flores.	Control en forma, control en cristalinidad	Escala pequeña, cuando se usa surfactantes son generalmente costosos	[189]
	método de combustión	Nanométrico o submicrométrico	HAp, DCPD, CDA, Mezclade fosfatos de calcio	Diversa	No se tiene un control en la forma de las partículas	bajo costo, simplicidad de montaje, agregación	[190]–[194]
Métodos de alta temperaturas	Spray pirolisis	Nano, sub- micrométricos	Mezclade fosfatos, HAp	esferas, nano rods	Escalable	Agregados, alto consumo de energía	[195]
	Sales fundidas	nano, sub- micrométrico	Hap	platos, fibras	Alta cristalinidad	alto costo	[196]
	método de electrospinning, deposición electroforética	Micrométrico	HA, $\beta$ -TCP, mezcla	Fibras, platos	Escalable	sistemas policristalinos, uso de aditivos costosos	[197]–[199]

### 1.3.1.1 Parámetros de Diseño

El diseño y la fabricación de scaffolds para regeneración ósea pretenden obtener y controlar la arquitectura en diferentes niveles debido a la forma externa y la estructura interna para cumplir con los requisitos específicos. La arquitectura tiene diferentes propiedades y características según las dimensiones del scaffold. Hay tres escalas que hacen referencia a diferentes características y procesos (Tabla 9):

- Macro y meso escala da cuenta de la geometría. Entre sus características destacan:
  - Forma externa del scaffold
  - Propiedades mecánicas
  - Densidad
  - Porosidad
  
- Microescala describe características en el orden micrométrico como:
  - Tamaño del poro
  - Interconectividad de poros
  - Degradabilidad
  
- Nano escala describe características en nanómetros como:
  - Superficie de los poros
  - Físico- química de la superficie

Es bien conocido que la estructura del tejido óseo varía según la ubicación en el cuerpo humano. Por lo tanto, la selección de configuraciones, así como los biomateriales apropiados, dependerán del sitio anatómico para la regeneración, las cargas mecánicas presentes en el sitio y la velocidad de incorporación deseada. Inicialmente, la ECM debe tener una alta porosidad y un tamaño de poro adecuado para preservar la migración celular, la deposición de tejido y la administración de nutrientes.

**Tabla 9.** Relación entre el tamaño de poro y la función en scaffolds porosos estructurados jerárquicamente para la ingeniería de tejidos [200].

Clasificación IUPAC	Tamaño de poro	Función
Microescala	<2 nm	Mejora de la bioactividad debido al aumento de la superficie disponible para los fenómenos de intercambio iónico en contacto con fluidos biológicos. Los microporos pequeños suelen estar presentes, en una cantidad limitada, en materiales mesoporosos como SBA-15, MCM-41 o MBG, aunque no se introducen deliberadamente.
Mesoescala	2–50 nm	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Captación y liberación de fármacos, factores de crecimiento y restos orgánicos.</li> <li>• Mejora de la bioactividad.</li> <li>• Acoplamiento celular mejorado.</li> </ul>
Macroescala	50 nm-100 $\mu$ m	Acoplamiento celular mejorado
	100–500 $\mu$ m	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Útil para el crecimiento óseo y de tejidos blandos</li> <li>• Vascularización</li> <li>• Colonización celular</li> <li>• Útil para disminuir el módulo de Young del implante, reduciendo así el desajuste de rigidez con el hueso</li> </ul>
	>500 $\mu$ m	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Útil para el crecimiento de huesos y tejidos blandos</li> <li>• Útil para permitir la fijación del implante in situ mediante alambres quirúrgicos.</li> </ul>

Posteriormente, la ECM matriz con debe diseñarse para guiar la formación de hueso, con la cual la tasa de degradación debe coincidir con la tasa de deposición del nuevo tejido, no debe ser ni demasiado rápida ni demasiado lenta [170]. Los parámetros más importantes del diseño de scaffolds óseos se enumeran en la Tabla 10.

Para la ingeniería de tejidos, el tamaño de poro óptimo para la regeneración de tejido óseo depende principalmente del tipo de tejido que se pretenda regenerar. Es recomendable, scaffolds con tamaños de poro superiores a 300  $\mu$ m para regenerar grandes defectos óseos, ya que estos dan lugar a formaciones óseas mejoradas con capacidades mayores de osteoinducción [201], [202], también se ha demostrado, que los

scaffold con poros inferiores a 500  $\mu\text{m}$  son óptimas para el proceso de osteogénesis y vascularización[201], [202].

**Tabla 10.** Parámetros de diseño de Scaffold para aplicaciones de ingeniería de tejido [170].

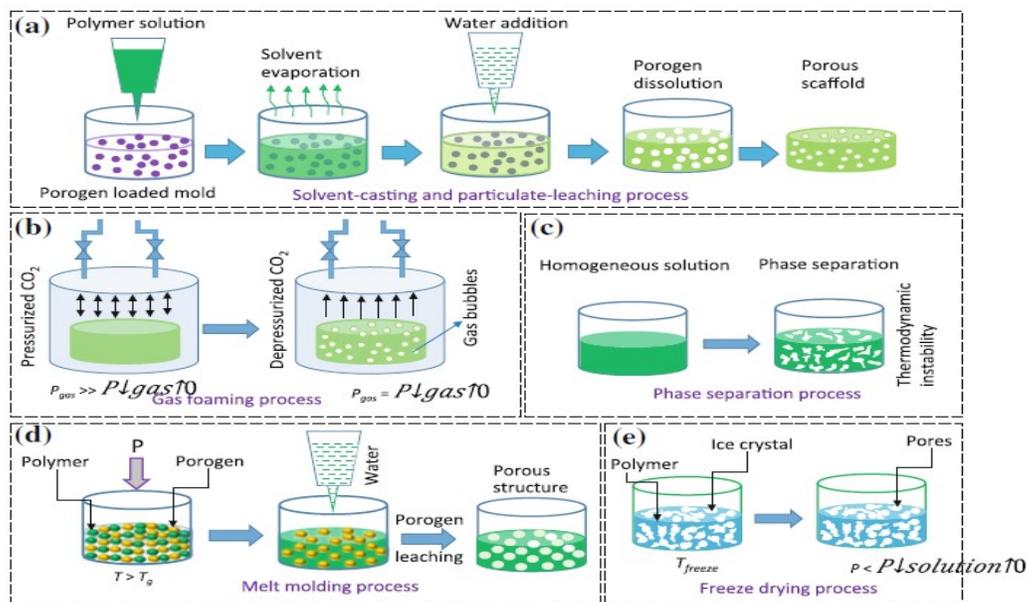
<b>Parámetros</b>	<b>Requerimientos</b>
<b>Porosidad</b>	Máxima de porosidad sin comprometer significativamente las propiedades mecánicas
<b>Tamaño de poro</b>	300–500 $\mu\text{m}$
<b>Estructura de poro</b>	Altamente interconectada
<b>Propiedades mecánicas</b>	
<b>Hueso esponjoso</b>	<b>Tensión y compresión</b> Fuerza: 5–10 MPa Módulo: 50–100 MPa
<b>Hueso cortical</b>	<b>Tensión</b> Fuerza: 80–150 MPa Módulo: 17–20 GPa <b>Compresión</b> Fuerza: 130–220 MPa Módulo: 17–20 GPa Resistencia a la fractura: 6–8 MPa $\sqrt{\text{m}}$
<b>Propiedades derivadas</b>	
<b>Tiempo de degradación</b>	Adaptable en aplicaciones con pacientes
<b>Mecanismo de degradación</b>	Erosión a granel o superficial
<b>Biocompatibilidad</b>	Sin inflamación crónica
<b>Esterilidad</b>	Esterilizable sin alterar las propiedades del material

Si bien el proceso de regeneración ósea debe contemplar scaffolds diseñados con una porosidad que simule tanto el hueso esponjoso como el hueso cortical, un aumento en la porosidad provoca una disminución de las propiedades mecánicas, como la resistencia a la compresión, y aumenta la complejidad de la fabricación de scaffolds. Aunque se ha desarrollado una intensa investigación tanto en modelos experimentales como computacionales, no hay conclusiones finales sobre la porosidad y el tamaño de poros óptimos de un scaffold para la regeneración ósea [12]. Por ejemplo, el rango de porosidad está entre el 50 y el 90% para los scaffolds que no están sujetos a cargas mecánicas [12]; mientras tanto, el tamaño recomendado de los poros varía entre 150 y 600  $\mu\text{m}$  [12]; de

400 a 1200  $\mu\text{m}$  [12] y 350  $\mu\text{m}$  o más [12], cabe aclarar que el comportamiento bajo carga de los huesos varía dependiendo de su función y la variedad de soluciones puede deberse a la complejidad del proceso de regeneración ósea, que es multivariable y multiobjetivo [12].

### 1.3.1.2 Obtención de Scaffolds

Se han utilizado diversos métodos de fabricación para lograr ciertas propiedades de los scaffolds a diferentes escalas. Estos métodos van desde métodos convencionales hasta prototipado rápido (RP). Los métodos convencionales son fundición, inversión de fase, mallado/ unión de fibras, moldeo por fusión, espumado de gas, laminación de membranas, plantillas de hidrocarburos, liofilización, liofilización en emulsión, fundición en solución y sinterización cerámica (Figura 16) [170].



**Figura 16.** Esquema de algunas técnicas convencionales para la fabricación de Scaffold.

- a) proceso de fundición con disolventes y lixiviación; b) proceso de espuma de gas; c) proceso de separación de fases; d) proceso de moldeo por fusión; e) proceso de liofilización. [169]

Lastimosamente, los métodos convencionales no logran obtener una geometría, tamaños de poro e interconectividad con gran precisión, (Tabla 11) [171], [203]. Otra limitación que presentan estas técnicas es que no pueden adaptarse específicamente para promover el crecimiento celular y la regeneración de tejidos [203]–[205]. Una alternativa a estas dificultades han surgido las técnicas de Manufactura aditiva (AM) también llamados prototipado rápido (RP), es un enfoque innovador de procesamiento de materiales para avanzar en la fabricación de scaffolds para ingeniería ósea y, por lo tanto, en la reparación de defectos de tamaño crítico en entornos clínicos [170], [171], [204], [206]. Una de las ventajas del uso de estas técnicas, es que cada una proporciona un medio para controlar la estructura tridimensional de los scaffold y su obtención puede influir fuertemente en algunas características de este. Cada ruta de síntesis, le otorga al scaffold fabricado características propias con un intervalo específico de tamaño de poro, interconectividad y porosidad. Por lo tanto, el método más apropiado debe ser seleccionado con precisión para satisfacer características particulares, pueden ser fabricados scaffolds versátiles con formas complejas capaces de una distribución celular homogénea, y la capacidad de imitar la matriz extracelular (ECM) [203].

### **1.3.1.2.1 Manufactura Aditiva (AM) –Impresión 3D**

La fabricación de piezas capa por capa se propuso a finales del siglo XIX, con origen en Estados Unidos y utilizada por primera vez en esculturas fotográficas y mapas topográficos. Scott Crump trabajó y patentó la primera máquina de modelado por deposición fundida (FDM) [207]–[209]. Carl D. Deckard y sus colegas de la Universidad de Texas desarrollaron la tecnología de sinterización por láser selectivo (SLS) basado en un rayo láser móvil para trazar y sinterizar selectivamente plástico, metal o polvo cerámico [210]. A finales de 1980, Chuck Hull desarrolló un proceso de AM que podía traducir datos numéricos a objetos 3D haciendo uso de estereolitografía (SLA) fundando la compañía 3D systems [207], [210]. Los últimos 15 años han sido testigos de la transformación de las tecnologías AM basadas en láser o en haz de electrones, estos han provocado una revolución en la fabricación de materiales especialmente en el campo de la aplicación biomédica. Hoy en día, las gamas de productos y materiales están creciendo rápidamente y la complejidad y la precisión de las piezas de AM se están mejorando notablemente.

**Tabla 11.** Técnicas convencionales obtención de scaffolds [170].

<b>Técnica</b>	<b>Tamaño de poro (<math>\mu\text{m}</math>)</b>	<b>(%) Porosidad</b>	<b>Arquitectura</b>	<b>Ventajas</b>	<b>Desventajas</b>
Fundición por solvente / lixiviación de partículas	30–300	20–50	Poros esféricos	Método simple; Porosidad y tamaño de poros controlados	Posibilidad de residuos, estructuras generalmente isotrópicas; Integridad mecánica insuficiente para uso en aplicaciones de carga
Secado por congelación	15–35	> 90	Gran volumen de microporos interconectados	Estructura de poro con alta interconectividad; buena porosidad	Insuficiente integridad mecánica; tamaños de poros pequeños
Separación de fase inducida térmicamente	5–600	<90	Gran volumen de microporos interconectados	Método simple; altas porosidades; estructura porosa con alta interconectividad; estructura y tamaño de los poros controlable en condiciones de preparación variables	Mucho tiempo para evaporar el solvente; posibilidad de residuos del disolvente; problemas de contracción; producción a pequeña escala
Procesamiento de fluidos supercríticos con espuma / gas	30–700	> 85	Gran volumen de microporos no interconectados	Sin solventes tóxicos; control de la porosidad	Integridad mecánica insuficiente para uso en aplicaciones de carga; interconexión de poros inadecuada; posibilidad de estructura de poro cerrado
Tecnología textil (electrospinning)	<1–10	90		Método simple; alta porosidad interconectada; alta relación de área superficial a volumen	Insuficiente integridad mecánica para uso en aplicaciones de carga; posibilidad de residuos del disolvente; limitación del espesor

Procesos de formación de polvo (bioglass producido mediante técnica de replicación)	300–700	> 80	Alto volumen de microporos interconectados	Método simple; estructura porosa similar al hueso esponja; Muy poroso y con poros abiertos; libre de sustancias químicas tóxicas	Insuficiente integridad mecánica para uso en aplicaciones de carga
Técnicas sol-gel (vidrios bioactivos)	> 600	> 70		Área de superficie alta; microestructura similar a la del hueso trabecular humano	Integridad mecánica insuficiente para uso en aplicaciones de carga; posibilidad de residuos del disolvente

La manufactura aditiva conocida coloquialmente como impresión 3D [211], es definida por la Sociedad Americana para Materiales de Prueba (ASTM) como: "***a process of joining materials to make objects from 3D model data, usually layer upon layer, as opposed to subtractive manufacturing methodologies***" [212], a su vez, clasifica los procesos de AM en siete categorías: (1) inyección de aglomerante (BJ); (2) deposición de energía dirigida (DED); (3) extrusión de material (ME); (4) chorro de material (MJ); (5) fusión de lecho en polvo (PBF); (6) laminación de láminas (SL) y (7) fotopolimerización (VP) (Tabla 12) [213]. La AM es un proceso automatizado basado en un diseño digital en tres dimensiones, utilizando diseños creados en CAD, generalmente "capa por capa" manejando herramientas controladas digitalmente diferenciándose de las técnicas convencionales [167], [203], [212]–[214].

La creación rápida de prototipos, la capacidad de imprimir grandes estructuras, reducir los defectos de impresión y mejorar las propiedades mecánicas son algunos de los factores clave que han impulsado el desarrollo de la AM [214]. Para producir dichos prototipos se requiere generar un sólido 3D (modelado), en la fase de modelado son aprovechados una serie de software que permiten crear, modificar y optimizar los prototipos diseñados. Una vez diseñados, estos pueden obtenerse directamente desde un CAD, el cual luego se traduce a un modelo de lenguaje de triangulación estándar (STL) con fines de impresión posterior. Esta operación consiste en la aproximación de las superficies del modelo a través de una malla de elementos triangulares. Finalmente, el modelo STL se divide matemáticamente en capas de Grosor homogéneo (archivo SLI) y posteriormente es enviado a impresión [210], [215], [216].

En regeneración ósea la AM producen scaffolds con geometría controlada e interconectividad a través de la aplicación progresiva de capas de materiales inorgánicos, polímeros, compuestos, etc. Los scaffolds nanoestructurados mejoran la capacidad de imitar las propiedades complejas del entorno óseo natural y proporcionan un entorno más favorable para la unión celular, el crecimiento interno y la formación ósea [215], [217], [218].

**Tabla 12.** Categorías ASTM de AM para diferentes materiales [213]

ASTM category	Basic principle	Example technology	Advantages	Disadvantages	Materials	Build volume (mm × mm × mm)	Tool manufacturer/country
<b>BJ</b>	Liquid binder/s jet printed onto thin layers of powder. The part is built up layer by layer By glueing the particles together	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 3D inkjet technology</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Free of support/substrate</li> <li>• Design freedom</li> <li>• Large build volume</li> <li>High print speed</li> <li>• Relatively low cost</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Fragile parts with limited mechanical properties</li> <li>• May require post processing</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Polymers</li> <li>• Ceramics</li> <li>• Composites</li> <li>• Metals</li> <li>• Hybrid</li> </ul>	Versatile (small to large) X = <4000 Y = <2000 Z = <1000	ExOne, USA PolyPico, Ireland
<b>DED</b>	Focused thermal energy melts materials <i>during</i> deposition	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Laser deposition (LD)</li> <li>• Laser Engineered NetShaping (LENS)</li> <li>• Electron beam</li> <li>• Plasma arc melting</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• High degree control of grain structure</li> <li>• High quality parts</li> <li>• Excellent for repair applications</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Surface quality and speed requires a balance</li> <li>• Limited to metals/metal based hybrids</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Metals</li> <li>• Hybrid</li> </ul>	Versatile X = 600–3000 Y = 500–3500 Z = 350–5000	Optomec, USA InssTek, USA Sciaky, USA Irepa Laser, France Trumpf, Germany
<b>ME</b>	Material is selectively pushed out through a nozzle or orifice	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Fused Deposition Modelling (FDM)/Fused Filament Fabrication (FFF), Fused Layer Modelling (FLM)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Widespread use</li> <li>• Inexpensive</li> <li>• Scalable</li> <li>• Can build fully functional parts</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Vertical anisotropy</li> <li>• Step-structured surface</li> <li>• Not amenable to fine details</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Polymers</li> <li>• Composites</li> </ul>	Small to medium X = <900 Y = <600 Z = <900	Stratasys, USA
<b>MJ</b>	Droplets of build materials are deposited	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 3D inkjet technology</li> <li>• Direct Ink writing</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• High accuracy of droplet deposition</li> <li>• Low waste</li> <li>• Multiple material parts</li> <li>• Multicolour</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Support material is often required</li> <li>• Mainly photopolymers and thermoset resins can be used</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Polymers</li> <li>• Ceramics</li> <li>• Composites</li> <li>• Hybrid</li> <li>• Biologicals</li> </ul>	Small X = <300 Y = <200 Z = <200	Stratasys, USA 3D Systems, USA PolyPico, Ireland 3Dinks, USA WASP, Italy
<b>PBF</b>	Thermal energy fuses a small region of the powder bed of the build material	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Electron beam melting (EBM)</li> <li>• Direct Metal Laser Sintering (DMLS)</li> <li>• Selective Laser Sintering/Melting (SLS/SLM)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Relatively inexpensive</li> <li>• Small footprint</li> <li>• Powder bed acts as an integrated support structure</li> <li>• Large range of material options</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Relatively slow</li> <li>• Lack of structural integrity</li> <li>• Size limitations</li> <li>• High power required</li> <li>• Finish depends on precursor powder size</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Metals</li> <li>• Ceramics</li> <li>• Polymers</li> <li>• Composites</li> <li>• Hybrid</li> </ul>	Small X = 200–300 Y = 200–300 Z = 200–350	ARCAM, Sweden; EOS, Germany; Concept Laser Cusing, Germany; MTT, Germany; Phoenix System Group, France; Renishaw, UK;Realizer, Germany; Matsuura, Japan, Voxeljet, 3Dsystems, USA
<b>SL</b>	Sheets/foils of materials are bonded	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Laminated Object Manufacturing (LOM)</li> <li>• Ultrasound consolidation/Ultrasound Additive Manufacturing (UC/UAM)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• High speed,</li> <li>• Low cost,</li> <li>• Ease of material handling</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Strength and integrity of parts depend on adhesive used</li> <li>• Finishes may require post processing</li> <li>• Limited material use</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Polymers</li> <li>• Metals</li> <li>• Ceramics</li> <li>• Hybrids</li> </ul>	Small X = 150–250 Y = 200 Z = 100–150	3D systems, USA MCor, Ireland
<b>VP</b>	Liquid polymer in a vat is light-cured	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Stereo Lithography (SLA)</li> <li>• Digital Light Processing (DLP)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Large parts</li> <li>• Excellent accuracy</li> <li>• Excellent surface finish and details</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Limited to photopolymers only</li> <li>• Low shelf life, poor mechanical properties of photopolymers</li> <li>• Expensive precursors/Slow build process</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Polymers</li> <li>• Ceramics</li> </ul>	Medium X < 2100 Y < 700 Z < 800	Lithoz, Austria 3D Ceram, France

La AM permite controlar el diseño y la estructura de los scaffold, así como la incorporación de factores bioactivos para que estos puedan tener un diseño más biomimético, reproducible con una geometría altamente organizada y específica a través del control preciso sobre la porosidad, el tamaño de los poros y la interconectividad de los mismos en el scaffold [215]. Aunque las características internas del scaffold son fundamentales por su porosidad e interconectividad, la geometría externa de un scaffold debe ser apropiada para su implantación como estructura ósea [167], [219]. La fabricación de scaffold en 3D se ha realizado mediante técnicas de AM, tales como estereolitografía (SL), modelado por deposición fundida (FDM), impresión 3D y sinterización selectiva por láser (SLS) [170], [171], [203], [204], [220], [221].

### 1.3.1.2.1.1 Tinta de impresión “Inkjet Printing “

Comúnmente la palabra “**Tinta**” es asociada con cartuchos de impresión, sin embargo; la tecnología que abarca el término es la inyección de tinta, utilizada desde la década de 1950. Esta tecnología se basa principalmente en la expulsión de gotas de tinta sobre un sustrato por medio de un cabezal de impresión. La implementación de esta tecnología es compleja y requiere habilidades multidisciplinarias. En la impresión 3D son utilizados como polímeros, resinas, cerámicos, metales entre otros, como tinta de impresión “**inkjet printing**”. La versatilidad en la fabricación de la tinta de impresión reside principalmente en la naturaleza de la misma. Pueden hacerse tintas con numerosos precursores de materiales cerámicos, gracias a que presentan alta dureza, bajas densidades, son químicamente estables, resistentes a la corrosión y presentan otras propiedades que potencializan su uso en diferentes campos de aplicación. Estas tintas pueden formularse bien sea en forma de suspensiones, barbotinas o pastas cerámicas [222].

Las tintas están conformadas principalmente por un material funcional encargado de darle consistencia, un solvente que determina la polaridad y el punto de ebullición de la tinta y por último un aditivo que permite el control de la viscosidad y/o la tensión superficial [223]. En la formulación deben tenerse en cuenta las propiedades de los materiales a utilizar como: distribución y tamaño de partícula, tipo de aglomerante, composición, viscosidad y presión de extrusión. En cuanto a la tinta: la viscosidad, tensión superficial, densidad, ángulo de contacto, velocidad de evaporación del disolvente, el volumen y velocidad de la

gota deben cumplirse, ya que estas determinan procesos esenciales en la impresión de una tinta basada en materiales cerámicos [223]. Generalmente, las tintas pasan por una transición a sólido después de la impresión, el sólido impreso puede requerir tratamiento térmico adicional con el fin de lograr la composición y estructura final del objeto impreso. Seguramente una de las limitaciones más evidentes es que debe ser una tinta imprimible; es decir, que debe tener propiedades físicas y reológicas que permitan la formación de “líneas” confiables y repetibles en la boquilla de impresión, debe ser una suspensión cerámica estable durante largos periodos de tiempo y no debe presentar separación o aglomeraciones significativas [222]. Para fabricar un objeto a partir de líneas, estas deben interactuar para formar características de dimensión superior de forma tal que puedan organizarse para que se superpongan en la dirección de desplazamiento. La impresión de líneas es importante, ya que si se imprimen muchas líneas superpuestas puede construirse un objeto 3D [222].

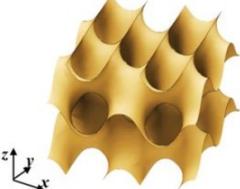
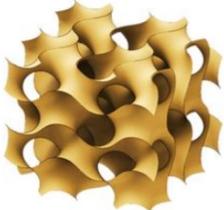
### **1.3.1.2.1.2 Superficies Minimales Triplemente Periódicas (TPMS)**

A menudo es difícil cumplir con los requisitos de fabricación del tejido óseo debido a que las características de los poros no se pueden controlar de manera efectiva [224]. Sin embargo; se han aplicado modelos de estructuras con arquitecturas variables, generando especial interés ya que son similares a la configuración aleatoria del hueso con respecto a arquitecturas hechas de celdas unitarias replicada en tres direcciones, que usualmente son consideradas para este tipo de aplicaciones [225]. Una superficie minimal triplemente periódica (TPMS) se muestran como unos diseños versátiles para scaffold en regeneración ósea. La morfología de sus estructuras produce propiedades que no están disponibles a escalas de producción masivas y continuas. Estas superficies, están inspiradas en la naturaleza, poseen características jerarquizadas, periódicas optimizadas y alta interconectividad [224]–[228]. Las TPMS tienen una historia de más de 200 años. La investigación comenzó a mediados del siglo XVIII, gracias a la investigación del matemático Lagrange basada en problemas variacionales donde se analiza la minimización y maximización de propiedades específicas de una superficie, llamadas superficies mínimas. Las primeras conjeturas matemáticas sobre las superficies mínimas se derivaron de las cuidadosas observaciones de las películas de jabón por parte del físico Plateau [227]. Las TPMS son modelos de superficie mínimas que presentan

periodicidad en tres direcciones independientes en el espacio tridimensional, la superficie tiene una curvatura media y puede extenderse indefinidamente en tres direcciones periódicas. La repetición periódica en el espacio (celdas unitarias) forma una estructura porosa cuyos poros se encuentran interconectados y puede proporcionar una descripción concisa de muchas estructuras físicas [216], [224]. Hermann Schwarz describió por primera vez una TPMS en 1865, propuso algunas configuraciones como P (primitivo), D (diamante) y G (giroide), cada una de ellas puede expresarse mediante ecuaciones matemáticas. [216] (tabla 13).

**Tabla 13.** Superficies y ecuaciones matemáticas de TPMS P (Primitivo), D (Diamante) y G (Giroide).

(Tomado con modificaciones de referencia [228])

Primitivo	Diamante	Giroide
$\text{Cos}(x) + \text{cos}(y) + \text{cos}(z) = 0$	$\text{Sen}(x)\text{sen}(y)\text{sen}(z) + \text{sen}(x)\text{cos}(y)\text{cos}(z) + \text{cos}(x)\text{sen}(y)\text{cos}(z) + \text{cos}(x)\text{cos}(y)\text{sen}(z) = 0$	$\text{Cos}(x)\text{sen}(y) + \text{cos}(y)\text{sen}(z) + \text{cos}(z)\text{sen}(x) = 0$
<p>(a)</p> 	<p>(b)</p> 	<p>(c)</p> 

Si bien, el objetivo de la ingeniería de tejidos es reemplazar los tejidos óseos ausentes o dañados con injertos sintéticos u otro tipo de estrategias que permitan alcanzar dicho objetivo, el uso de scaffolds con poros interconectados, que permiten la adhesión, el crecimiento y la proliferación de las células humanas se ha convertido en una opción prometedora. El diseño óptimo de tales scaffolds, en el campo de la ingeniería de tejidos óseos, debe cumplir con varios requisitos geométricos. Primero, tienen que personalizarse para replicar la anatomía esquelética del paciente, y luego tienen que

proporcionar la estructura trabecular adecuada para que las células migren y construyan la ECM con éxito. Por lo tanto, para modelar tales scaffolds, se necesitan métodos de diseño específicos, que conciban estructuras complejas, controlando tanto la macro como la micro estructura del hueso. Aun cuando se han explorado diversas técnicas y materiales para la regeneración ósea, El desarrollo de andamios basados en las superficies mínimas triplemente periódicas (TPMS) se ha demostrado recientemente como uno de los más eficaces enfoques para combinar un entorno correcto para la siembra celular con un comportamiento estructural adecuado, junto con un significativo potencial de fabricación a través de 3D impresión y otras tecnologías de AM [224], [229]. Cabe resaltar, los estudios previos realizados en el grupo de investigación demuestran las bondades que posee la TPMS con geometría diamante para ser utilizado como scaffold de regeneración ósea haciendo énfasis en su comportamiento biológico [229], [230].

## 1.4. Evaluación Antibacteriana

Los defectos óseos a menudo tienen un alto riesgo de infección debido a la falta de cobertura de tejidos blandos, la destrucción del suministro de sangre, la formación de hematomas locales y la aparición de necrosis tisular [232], [233]. Con respecto a los materiales de sustitución ósea, las superficies de estos materiales no solo son portadores de células, sino que también admiten la colonización microbiana [234]. La mayoría de las bacterias colonizarán la superficie del material en el sitio de los defectos óseos, produciendo una masa de complejos de polisacáridos y proteínas para encapsular las bacterias, formando así biopelículas [235]. Las biopelículas son altamente resistentes al sistema inmunitario del huésped y a los antibióticos [236]. Una vez que se produce la infección, el suministro de sangre al hueso se daña gravemente y se produce osteonecrosis, lo que dificulta el reclutamiento de células inmunes y osteoblastos en el sitio infectado [237]. Además, es difícil que los antibióticos alcancen concentraciones efectivas en el sitio infectado, lo que eventualmente conduce a una curación tardía o a la no curación del defecto óseo. La colonización bacteriana se encuentra asociada a diferentes tratamientos en regeneración ósea, a nivel de ortopedia o dental. Las estrategias actuales utilizadas para prevenir tales colonizaciones incluyen terapias con antibióticos, controles ambientales tales como aislamiento, esterilización, recubrimientos y

modificaciones superficiales [238] A pesar de estas estrategias, algunos patógenos tienen la capacidad de infectar cualquier dispositivo implantado, de los más comunes en ortopedia se encuentran *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *propionibacterium acnés*, *Eschericia coli* [238]. y en el área dental *Streptococcus mutans* y *Candida albicans* [239].

Las nuevas tecnologías tienden a sintetizar materiales que no solo promuevan la formación de nuevos tejidos en el sitio de la lesión, sino que también protejan las lesiones contra infecciones microbianas y formación de biopelículas. Para ello, se buscan materiales con propiedades antimicrobianas, tanto en bacterias Gram positivas como Gram negativas [240].

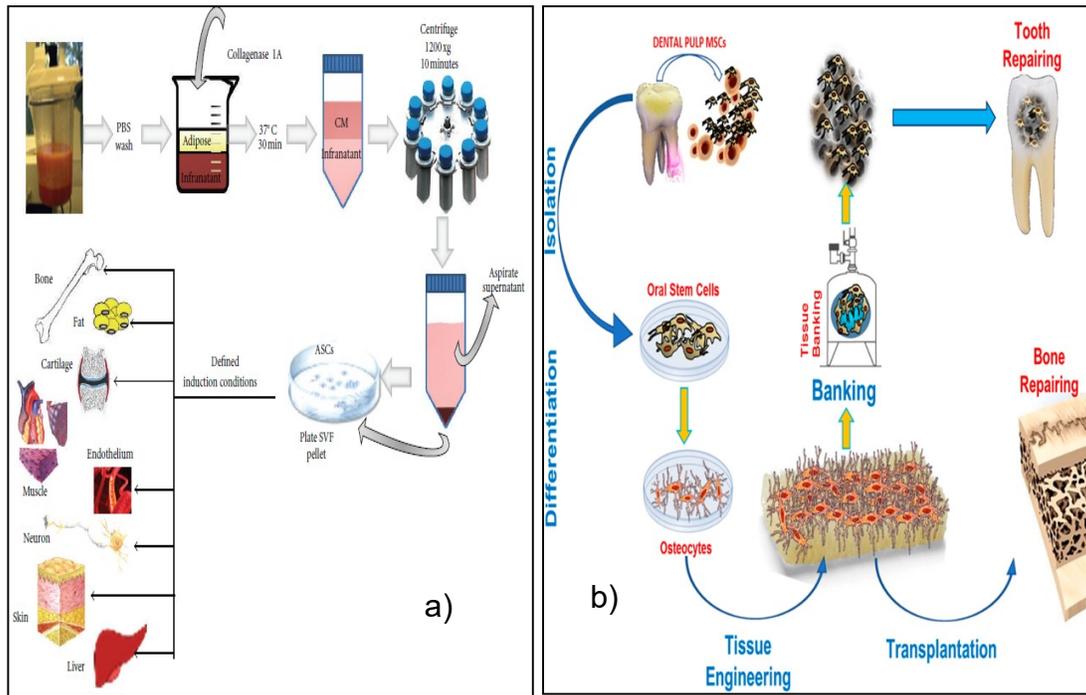
La caries dental es una de las enfermedades con mayor prevalencia dentro de las enfermedades de infección oral a nivel mundial, resulta de la interacción entre bacterias y elementos de la dieta conduciendo a la formación de placa en la superficie de los dientes [241], [242]. La caries junto con la enfermedad periodontal son causadas por un desbalance en las especies que conforman una biopelícula natural [243], consecuencias graves de este tipo de patologías pueden resultar en el defecto de huesos del periodonto, que requieren tratamientos con el fin de rehabilitar funciones mediante implantes o bien de regeneración ósea [244], [245]. Uno de los principales microorganismos asociados con estas enfermedades es el *Streptococcus mutans*, que se encarga de colonizar la superficie dura del diente y da paso a la formación de biopelículas infecciosas [246], *Streptococcus mutans* es un coco Gram positivo, posicionado en cadena, catalasa negativa, productor de ácido láctico, puede cambiar el entorno de pH 7 a pH 4,2 en un lapso de 24 horas [247]. Por estas razones resulta importante estudiar el efecto de su adhesión en scaffolds utilizados como soporte para el tratamiento y /o regeneración ósea.

## 1.5. Células Madre y su Diferenciación a Osteoblastos

Comprender la estructura y la funcionalidad del hueso en condiciones normales, permite crear estrategias para reparar o reemplazar el tejido dañado con la organización y función original después de la recuperación [224], [248]. En la actualidad, existen diferentes enfoques que difieren en el tipo de células madre que se utilizan o la composición del entorno de diferenciación. De acuerdo a esto, uno de los mayores retos es diseñar

matrices tridimensionales con capacidad de imitación del hueso, que proporcionen un soporte temporal para la regeneración del tejido y que a su vez ostenten la capacidad de balancear la degradación y la formación ósea. El uso de células madre constituye una opción prometedora en procesos de diferenciación celular, partiendo de las células más primitivas hasta llegar a células completamente diferenciadas [249]. En condiciones óptimas, estas células tienen la capacidad de regenerarse después de presentar traumas, enfermedades o envejecimiento. Las células madres son células especializadas, que poseen una alta capacidad de proliferación y tienen la habilidad de diferenciarse a tipos celulares específicos: osteogénico, condrogénico, adipogénico, tenogénico, miogénico, o linajes estromales [250], [251] (Figura 17). De acuerdo a su potencial de diferenciación las células madre podrían clasificarse en [251]: a) totipotentes: provenientes del embrión, con la capacidad de dar lugar a tipos celulares derivados de las tres capas germinales embrionarias y formar membranas extraembrionarias. Puede generar 2 tipos de células, unas con la capacidad de diferenciarse en una línea específica (pluripotentes) y otra con potencial de diferenciación en una línea particular (totipotente), estas últimas son capaz de autorenovarse, b) pluripotentes: Proceden de la masa celular interna del blastocito, tienen la destreza de diferenciarse a tejidos procedentes de las tres capas embrionarias ectodermo, mesodermo y endodermo. c) multipotente: son células en la capacidad de diferenciar en diferentes tejidos de la misma capa embrionaria, ejemplo de ellas son las células mesenquimales o d) unipotente: se encuentran comprometidas con un linaje celular específico y solo se diferencian a un tipo celular determinado, además; poseen baja capacidad de auto renovación.

Las células madre han sido aisladas en casi todos los tejidos del cuerpo humano [252], [253] como: tejido adiposo [254], [255], sangre del cordón umbilical, sangre periférica, pulpa dental [256], [257], dermis y líquido amniótico. Las células madres provenientes de tejido adiposo (ADSC, Adipose Stem cell), comparten diversas características con sus homólogas provenientes de la médula ósea (BMSC, Bone Marrow Stem Cells). A pesar de esto, la cantidad de células madre es mayor en el tejido adiposo que las provenientes de la medula ósea. Un gramo de tejido adiposo aspirado produce aproximadamente  $3,5 \times 10^5$  a  $1 \times 10^6$  ADSC, esto comparado con un rango de 5 a  $5 \times 10^4$  BMSC [255], [258], [259]. Las ASC fueron aisladas por primera vez en 2001 [255] y desde allí se ha evidenciado que presentan un alto potencial de diferenciación hacia otros linajes celulares [259], [260].



**Figura 17.** Diferenciación de las células Madre provenientes de: a) tejido adiposo [255] y b) explantes dentales [257].

Se han descrito dos tipos de tejido adiposo: tejido adiposo blanco y tejido adiposo marrón. Presentan diferencias significativas a nivel de color, morfología, funciones metabólicas, características bioquímicas y patrones de expresión génica [255]. El tejido adiposo blanco se encuentra en todo el cuerpo humano, representativamente en el tejido adiposo subcutáneo y visceral, su principal función es el almacenamiento y movilización de reservas energéticas en forma de lípidos. El tejido adiposo marrón, está localizado en las regiones supraclavicular, interescapular, axilar, paravertebral y suprarrenal; es el encargado de oxidar los depósitos y disipar la energía en forma de calor, regulando la temperatura corporal [255]. El aislamiento de las células madre provenientes de tejido adiposo es realizados a través de un lipoaspirado (generalmente de la zona peri umbilical), especialmente conveniente ya que el procedimiento proporciona fragmentos homogéneos que pueden ser fácilmente digeridos enzimáticamente en poco tiempo [259]. Por su parte, las células madre provenientes de explantes de pulpa dental conocidas como DPSCs, son células capaz de diferenciarse en adipocitos, osteoblastos,

---

odontoblastos y células neuronales, se han aislado del tejido de la pulpa dental de los dientes humanos permanentes [41], [257]. La diferenciación de ADSCs y DPSCs a un linaje celular específico está determinada principalmente por los componentes del ambiente en que se encuentran [41]. Existen medios de diferenciación que utilizan sustancias químicas extraídas u obtenidas a nivel de laboratorio las cuales son agregadas a un medio de cultivo con el fin de inducir la diferenciación osteogénica. Generalmente los medios de diferenciación osteogénica están suplementados con ácido ascórbico,  $\beta$ -glicerofosfato y dexametasona. Estos suplementos hacen que las células formen agregados, adquiriendo un cambio de morfología los cuales poseen la capacidad de formar depósitos de calcio y expresar fosfatasa alcalina [261]–[264].

## 1.6. ESTADO DEL ARTE

Los huesos son órganos que desempeñan roles importantes en la fisiología humana, intervienen en la protección, movimiento y soporte de órganos vitales, además, poseen funciones específicas muy importantes en la producción de sangre, el almacenamiento mineral, la homeostasis, la regulación del pH sanguíneo, almacenamiento de células progenitoras, entre otras actividades. Los huesos se ven directamente implicados y afectados en enfermedades como la osteoartritis, osteomielitis, y osteoporosis entre otras, en las que los huesos no funcionan adecuadamente. Sumado a esto, las fracturas, cirugías selectivas y resección tumoral, y hasta el envejecimiento de la población, en muchas Ocasiones, inducen y/o generan desafíos insuperables que resultan en carencias óseas significativas [34], [265]. Pese a la capacidad del hueso de regenerarse, remodelarse y repararse estos desafíos permanecen, haciendo necesario para su tratamiento el uso de injertos, implantes y scaffolds biodegradables que inciten y promuevan el proceso de regeneración ósea natural [266].

Lastimosamente, aunque el hueso tiene la capacidad de regenerarse, muchas afecciones óseas pueden comprometer la calidad de vida de un paciente. Estudios realizados en 5 países latinoamericanos (Argentina, Brasil, Colombia, México y Puerto Rico), muestran que la prevalencia de fracturas vertebrales en mujeres entre los 50 y 60 años de edad fue aproximadamente del 15% aumentando un 28% para mayores de 80 años. Proyecciones hechas desde 1990 hasta 2050 dan cuenta que el número de fracturas de cadera para mujeres y hombres en Latinoamérica aumentarían en un 400% [267], siendo estas solo algunas de las afecciones óseas que están representando un problema socioeconómico en la población mundial [268]–[270]. La demanda de tratamientos para regeneración ósea ha ido en aumento. Sin embargo, pese a los avances en ingeniería y los innumerables implantes que se usan hoy en día, aún no se logran llenar los vacíos asociados a los requisitos necesarios para la reparación y regeneración ósea [11], [271]–[273]. Es así como surgen los injertos como alternativas terapéuticas capaces de superar limitaciones impuestas por el uso de prótesis. No obstante, limitaciones como pérdida de sangre y morbilidad en el sitio del donante [11], [265], [274]–[276] asociadas a los autoinjertos (tejido que proviene del paciente) y transmisión de patógenos, respuesta inmunológica y

mayor riesgo de infección debido principalmente a la carencia de la capacidad osteoactiva [265], [268], [276], asociados a aloinjertos (procedente de la misma especie pero diferente donante) y xenoinjertos (procedente de otra especie), han llevado a la búsqueda de otro tipo de alternativas que ayuden a solventar estos inconvenientes en la regeneración ósea [11], [269]. Los materiales para este propósito han evolucionado a través de tres generaciones: materiales bioinertes (primera generación), materiales bioactivos y biodegradables (segunda generación), materiales que interactúen de forma específica con el tejido vivo, a través de estímulos a nivel celular y molecular (tercera generación). Estas generaciones han sido fundamentadas principalmente en los avances tecnológicos y propiedades de los materiales usados [11], [273], [277].

Los scaffolds surgieron casi al mismo tiempo que los materiales de tercera generación para aplicaciones en ingeniería de tejidos [273]. Estas estructuras porosas tridimensionales son una buena estrategia para lograr la reparación ósea, gracias a la capacidad que tienen para degradarse y ser reabsorbidos mientras soportan las cargas fisiológicas y regeneran el hueso. El scaffold posee propiedades osteoinductivas logradas a través de la presencia de una red porosa interconectada, facilitando la migración celular, así como el transporte de nutrientes y oxígeno al interior del scaffold [11], [157], [159], [164], [270], [278], [279]. Las propiedades mecánicas representan quizás uno de los requisitos más difíciles de cumplir en un scaffold. El scaffold debe soportar las demandas mecánicas del sitio lesionado durante todo el proceso de regeneración, lo que implica que las propiedades y mecanismos de degradación deben trabajar en equilibrio con la formación de tejido nuevo. Esta es un área que constituye un gran reto para la comunidad científica, pues todavía no es claro si este equilibrio implica que la tasa de formación de tejido y de degradación del material deben ser iguales, o si alguna debería ir más avanzada que la otra. Scaffolds para la regeneración ósea han sido fabricados utilizando materiales sintéticos y naturales. Los de origen natural, son polímeros que presentan su ventaja gracias a que se encuentran presentes en el cuerpo humano, y tienen la capacidad de interactuar con el componente celular. Entre ellos se encuentran el colágeno, ácido hialurónico, heparina y quitosano [157], [280]–[282]. El colágeno es un componente muy importante en el hueso, que cuenta con buena biocompatibilidad y biodegradabilidad. Sin embargo, las falencias en las propiedades mecánicas hace necesario que los scaffolds basados en este material se combinen con otros materiales para mejorarlas [11]. Se han desarrollado scaffolds de policaprolactona (PCL) – colágeno asociados con células madre mesenquimales (MSC) en un medio osteogénico. Se

demonstró que el colágeno no solo brinda un medio de carga celular, sino que además proporciona un ambiente adecuado para el crecimiento, la proliferación celular y diferenciación osteogénica, obteniendo un aumento significativo ( 50-60%) de estos parámetros comparado con el PCL solo [11] Se han realizado estudios para evaluar la interacción del colágeno con varios tipos de células madre mesenquimales, encontrando que el colágeno tiene buena compatibilidad logrando mantener una alta proliferación y viabilidad celular y un aumento considerable de los depósitos de matriz extracelular [283]. También se ha investigado la incorporación de otros materiales al colágeno, encontrando scaffold fabricados de combinaciones de biovidrio  $\text{CaO-P}_2\text{O}_5\text{-SiO}_2$  (BG), colágeno tipo I (COL) y PS (fosfatidilserina), BG-COL-PS con una porosidad de 75,40% y una resistencia a la compresión de 1,5469 MPa, exhibiendo una estructura de poros interconectados que favorecieron la actividad celular. Así como la mezcla del colágeno con algún polímero natural mejora el rendimiento de los scaffold de colágeno, de esta misma manera al mezclar colágeno con algún polímero sintético se alcanzan propiedades en el scaffold tanto biológicas como mecánicas, donde el polímero sintético será quien brinde apoyo mecánico al scaffold y el colágeno proporcionará el reconocimiento celular. Algunos polímeros sintéticos que se han mezclado con colágeno para la fabricación de scaffolds son: policaprolactona, ácido poli láctico y ácido poliglicólico [282]. Además, los scaffold de colágeno también han sido utilizados con el fin de suministrar factores de crecimiento. La proteína morfogenética ósea 4-(BMP4) fue inmovilizada en un scaffold de colágeno- poli (láctico-coglicólico) PLGA [284], demostrando que 4-(BMP4) es un factor que induce la ontogénesis, diferenciación de osteoblastos y osteo-progenitores, que promueve la formación ósea y favorece la adhesión y proliferación celular [284], [285]. La experimentación in vivo de este scaffold demostró que el factor 4- (BMP4) mantuvo su actividad osteoinductiva y aumento la biomineralización. Costa y colaboradores sintetizaron scaffolds de quitosano - poli-succinato de butileno (CH - PBS), y estos scaffolds se sembraron y cultivaron in vitro con células madre mesenquimales de medula ósea humana (hBMSCs) con el objetivo de verificar la capacidad de estos para inducir la osteogénesis. Los implantes recuperados mostraron una buena integración con el tejido circundante y una formación ósea significativa, más evidente para los scaffold cultivados e implantados con células humanas. Los resultados de este trabajo demostraron que los scaffolds basados en quitosano, además de apoyar la proliferación in vitro y la diferenciación osteogénica de hBMSCs, inducen la formación ósea [286]. A pesar de las

investigaciones llevadas a cabo con los polímeros naturales, uno de los inconvenientes aún sin resolver sigue siendo la resistencia mecánica baja, lo que los hace inadecuados como scaffold de carga [69], [287]. A diferencia de los polímeros naturales, los polímeros sintéticos carecen en su gran mayoría de interacción celular. Un scaffold ideal para regeneración ósea, debe ser osteoinductiva, osteoconductor, promover la osteointegración, y se deben degradar al mismo ritmo en que se forma tejido óseo nuevo [164]. Entre los más utilizados se encuentran la policaprolactona (PCL), ácido poliláctico (PLA) y sus isómeros ácido poli (L-láctico) (PLLA), ácido poli (D-láctico) (PDLA) y ácido poli (D, L-láctico) (PDLLA), ácido poliglicólico (PGA) y ácido poli (láctico-glicólico) (PLGA) [69], [157], [159], [164], [170]. El ácido poli (láctico-glicólico) (PLGA) es atractivo como scaffold, debido a que exhibe facilidad de procesamiento y biodegradabilidad, sin embargo; carecen de osteoinducción y osteoconducción. Un estudio reciente, utilizó scaffold de nanohidroxiapatita (nHA) revestido de PLGA. Se realizaron experimentos in vitro con el fin de analizar el rendimiento biológico de este scaffold. Los resultados revelaron que este scaffold tiene una biocompatibilidad mejorada y capacidades más eficaces para la cicatrización de defectos óseos [288]. Un estudio sobre células cultivadas en un scaffold de PCL /  $\beta$ -TCP por impresión 3D mostraron una diferenciación osteogénica reducida en comparación con las células que se cultivaron en el scaffold con un medio de diferenciación ósea y mostraron una diferenciación osteogénica mayor en comparación con la del grupo de control. Se demostró que la diferenciación osteogénica se produce como resultado de las interacciones entre el scaffold PCL /  $\beta$ -TCP y las células, este scaffold solo promueve la diferenciación osteogénica y es un biomaterial efectivo para promover la regeneración ósea [289].

Los fosfatos de calcio han sido de especial interés en investigaciones de regeneración y reparación ósea, debido a que imitan el componente inorgánico del hueso nativo. Han sido ampliamente estudiados e incluyen el fosfato monocálcico monohidrato, fosfato monocálcico anhídrido, fosfato dicálcico dihidratado, fosfato dicálcico anhídrido, fosfato octacálcico, fosfato tricálcico  $\alpha$ - y  $\beta$ -TCP, hidroxiapatita deficientes en calcio e hidroxiapatita (HA) [124], [126], [265], [290], [291]. Se ha demostrado que las cerámicas de fosfato de calcio mejoran la formación ósea dependiendo de la fase cristalina utilizada y la relación Ca/P, que dan como resultado el calcio y el ion fosfato necesarios para la mineralización ósea [124], [164], [292], [293]. Los fosfatos de calcio han demostrado ser osteoinductivos y osteoconductivos. Se dice que su capacidad radica principalmente en la

combinación de diferente porosidad capaz de atrapar y concentrar factores de crecimiento involucrados en la diferenciación celular [164]. La solubilidad de los diferentes fosfatos de calcio puede verse afectada por sustituciones iónicas. La estructura cristalina de la HA incluye varios sitios altamente intercambiables, siendo posibles sustituciones aniónicas y catiónicas, siendo las más comunes  $Mg^{2+}$ ,  $Si^{4+}$  y  $Sr^{2+}$  [164], [294]. Algunos estudios han evidenciado los beneficios de algunas sustituciones aniónicas y catiónicas donde el  $Mg^{2+}$  y  $Si^{4+}$  promueven la angiogénesis [158], [295] y el  $Sr^{2+}$  promueve la osteogénesis [164], [294]. Con respecto a la Osteoinducción el scaffold debe tener macroporos de 150 - 500  $\mu m$  de diámetro y exhibir 60-80% de porosidad interconectada. Estudios realizados han demostrado que integrar partículas magnéticas a los scaffolds cerámicos estimula el crecimiento óseo [11]. Un aspecto importante en el diseño de los scaffolds de fosfato de calcio es la geometría de su estructura porosa, que estimula la formación ósea y facilita el transporte por los poros Interconectados. Los estudios han demostrado que la relación HA /  $\beta$ - TCP es clave para controlar el rendimiento del scaffold para aplicaciones de reparación ósea. Una combinación de diferentes composiciones HA /  $\beta$ - TCP para el scaffold cerámico indican que el aumento de la superficie de los scaffolds permite que las células obtengan una mayor reactividad superficial, lo que a su vez influye en su proliferación y diferenciación osteogénica [11]. El vidrio bioactivo tiene una alta densidad de carga de superficie negativa por los silanoles, que promueven la adsorción de proteínas séricas. Por lo tanto, un compuesto vidrio bioactivo - fosfato de calcio podría ser un biomaterial de scaffold de cerámica candidato a adsorber proteínas. De la misma forma, se han diseñado compuestos inyectables de vidrio bioactivo – fosfato de calcio (CPC-BG) con buenos resultados para regeneración ósea y diferenciación celular. Estos materiales mostraron además biocompatibilidad y biodegradabilidad tanto *in vitro* como *in vivo*.

## 1.6.1 Exploración diferentes técnicas de Manufactura Aditiva

Como se ha indicado previamente, los defectos óseos se caracterizan por una geometría irregular, que requiere una solución personalizada tanto de diseño como de fabricación del implante [296], [297]. Para tal fin, las técnicas de AM son ventajosas sobre las técnicas de fabricación tradicionales en la fabricación de implantes personalizados;

durante la fabricación de implantes personalizados, Los datos anatómicos específicos del paciente se utilizan para modelado computacional [298], [299], y luego ser materializado por técnicas AM [296], [300]. Basado en el diseño geométrico de cada defecto específico, se podrían fabricar implantes / Scaffolds con mejores precisiones en cuanto a porosidad, tamaño, geometría y comportamiento de carácter estructural y biológico.

Biomateriales, incluidos metales, polímeros, cerámicas, hidrogeles entre otros, han sido ampliamente estudiados en AM para la conformación de scaffold en Ingeniería de tejidos óseos. Las características de los biomateriales y los requisitos de los scaffold determinan las tecnologías AM disponibles. Con el desarrollo de nuevos materiales, nuevas tecnologías y la aplicación de AM en la construcción de scaffold para la regeneración de tejidos óseos, los resultados apuntan principalmente a la alta precisión de procesamiento y acabado superficial liso que tiene la tecnología SLA, similar a la tecnología MJ, donde su materia prima son resinas fotosensibles líquidas, que pueden curarse con luz ultravioleta, lastimosamente no existe una gran variedad de resinas disponibles lo que limita su uso. Las materias primas líquidas en la tecnología BJ, con excepción de que el material es un aglutinante que es utilizado para unir el polvo (cerámicas, polímeros, compuestos...etc). BJ es una tecnología en la que los scaffolds presentan alta velocidad de impresión y pueden fabricarse grandes estructuras, debido a que el material particulado solo se encuentra unido por el aglutinante, la desventaja de la tecnología BJ es que los scaffolds obtenidos tienen pocas propiedades mecánicas y requieren de procesamientos posteriores. Para tecnologías que utilizar boquillas, como las tecnologías BJ y MJ, una desventaja común es el bloqueo frecuente de la boquilla comparado con la BJ, la tecnología ME tiene una mayor velocidad de procesamiento. La principal diferencia entre las tecnologías FDM, LDM y DIW es su procesamiento, la alta temperatura de la tecnología FDM o la baja temperatura de la tecnología DIW evita la adición de aditivos activos a los scaffold para ingeniería de tejidos. En respuesta a estos problemas, surgieron las tecnologías FDM o LDM. Comparado con otras, como la tecnología ME, los scaffolds obtenidos por la tecnología PBF tienen las mejores propiedades mecánicas. En la tecnología PBF, los andamios preparados con tecnología SLS tienen las peores propiedades mecánicas [301].

Todas estas técnicas han evidenciado avances prometedores en la ingeniería de tejidos óseo. Guillaume y colaboradores, fabricaron scaffolds compuestos biodegradables de poli (carbonato de trimetileno) (PTMC) / hidroxiapatita (HA) por SLA y se observó que los

scaffold que contienen 20% en peso de HA promovió significativamente la diferenciación osteogénica del hueso humano en células madre de médula ósea (hBMSC) in vitro y la cinética de curación ósea in vivo [302]. Lastimosamente, esta técnica requiere que los compuestos sean líquidos y de baja viscosidad, solo puede utilizarse una resina por cada compuesto, lo que limita la aplicación de algunos biomateriales, además de esto; U.S. Food and Drug Administration (FDA) aún no prueba el uso de materiales foto-curables en aplicaciones médicas [301], [303]. Andamios de poliamida (PA) / HA con diferentes estructuras y porosidad fueron fabricados utilizando SLS, demostrando la viabilidad de fabricar estructuras con arquitecturas complejas, con resistencia mecánica superior a otros métodos y buena precisión del scaffold acuerdo a los requisitos [304]. La tecnología SLM es considerada similar a la SLS, con la diferencia que requiere una temperatura de procesamiento más alta que SLS para fundir completamente los polvos metálicos y formar partes homogéneas. Los materiales en polvo consisten principalmente en titanio y aleaciones de titanio, así como polímeros y cerámica. Scaffold de Ti6Al4V fueron fabricados con tecnología SLM, experimentos realizados en cultivos in vitro confirmaron la viabilidad y proliferación de osteoblastos en los scaffolds [305]. La tecnología EBM es muy similar a la tecnología SLM, la diferencia radica en que los polvos metálicos se funden completamente mediante haces de electrones en un entorno de vacío en lugar de rayos láser en la tecnología EBM. Li y colaboradores fabricaron scaffolds de Ti6Al4V con revestimiento de HA asistido por polidopamina (HA / pDA); los resultados mostraron que el recubrimiento promovió la osteointegración y la osteogénesis del scaffold [301], [306]. Sin embargo, el scaffold basado en metales es no biodegradable, que es su mayor desventaja como andamio ideal. FDM, derrite un material (filamento) parcialmente, debido a la fusión involucrada, la tecnología FDM es la más adecuada para procesar polímeros. Recientemente, scaffold de PVA /  $\beta$ -TCP fueron fabricados por esta técnica exhibiendo una excelente bioactividad y favorabilidad para la adhesión y la proliferación celular in vitro [307]. Sin embargo, esta técnica no permite procesar cerámicas como HA y la alta temperatura usada en el proceso puede tener efectos adversos sobre aditivos. La impresión 3D de materiales cerámicos ha sido ampliamente estudiado, resaltando que aún hay un vacío en cuanto a las bondades y potencialidades que pueden aportar los scaffolds formados solo de materiales cerámicos. En la tabla 14, se muestran los avances en impresión 3D para regeneración ósea.

**Tabla 14.** Impresión 3D scaffold regeneración ósea [308].

Reference	3D printing technology	Printed material(s)	Post-processing	Cells/animal model	Primary findings
<i>In vitro studies</i>					
Almeida, 2014	Material extrusion	Two bioinks: 1. PEG-PLA + BG (G5) 2. Chitosan	PEG-PLA/G5: cross-linked with NaOH (8% w/v) in ethanol (70%) drop wise during printing Chitosan: Overnight gelation	Human monocytes	PEG-PLA/G5 scaffolds upregulated IL-6,12/23,10. Chitosan scaffolds upregulated TNF- $\alpha$ . Geometry (larger pores and wider angles) increased TNF- $\alpha$ and IL-12/23 <sup>2</sup>
Gao, 2014	Binder jetting	PEGDMA $\pm$ BG $\pm$ HA	UV photo polymerization during the printing process	hMSCs	PEGDMA-HA increased cell viability and osteogenic differentiation (ALP activity and Col10A1 gene expression) and increased compressive modulus compared to PEGDMA-BG or PEGDMA-BG-HA <sup>32</sup>
Lode, 2014	Material extrusion	$\alpha$ -TCP paste in biocompatible oil (short-chain triglyceride)	Reaction setting in water followed by incubation at 37 °C	hMSCs	Osteogenically-induced hMSCs-seeded scaffolds demonstrated favorable cytocompatibility and osteogenic differentiation compared to naïve cells <sup>51</sup>
Castilho, 2015	Binder jetting	CaP Powder: $\alpha/\beta$ -TCP Binder: 20% H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	Binder dip followed by PBS washes and vacuum infiltration with alginate at 37 °C	MG63 OB cells	Significant increase in mechanics of alginate-modified scaffolds, coupled with improvement of OB cells proliferation and cell viability <sup>15</sup>
Mehrban, 2013	Binder jetting	CaP Powder: TCP Binder: 20% H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	Triplicate 30 s immersions in binder	Rat tenocytes	Sera proteins strongly increased the rate of degradation and increased pore diameters in the scaffold. Presence of tenocytes inhibited increase in scaffold porosity <sup>65</sup>
<i>In vivo studies</i>					
Castilho, 2014	Binder jetting	CaP Powder: $\alpha/\beta$ -TCP Binder: 20% H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	30 s immersion in binder	Canine tibia tuberosity advancement (TTA)	Use of 3D printed bioceramic cage to treat CrCL crucial ligament deficient stifle by TTA enabled complete limb function restoration without adverse complications or patient lameness compared to standard titanium cage technique <sup>13</sup>
Habibovic, 2008	Binder jetting	CaP Powder: $\alpha/\beta$ -TCP Binder: 20% H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	Triplicate 30 s immersions in binder followed by autoclaving	Goat decorticated lumbar or intramuscular implants	Orthotopic implants facilitated bone formation into pores and ectopic implants had thin layers of bone on the implant surfaces <sup>39</sup>

La revisión bibliográfica, permitió obtener información acerca de los fundamentos teóricos utilizados en la regeneración ósea, los materiales con potencial uso en procesos de regeneración, así como; las técnicas de síntesis utilizadas para la obtención de dichos materiales y el uso de la manufactura aditiva en la obtención de scaffolds que logren imitar las características del hueso nativo. También se pudo adquirir información acerca de los mecanismos de interacción de estos materiales con las células del tejido óseo y con posibles bacterias que puedan encontrarse en el sitio de acción. Todo ello apuntando a la síntesis de un material cerámico que permitiera corroborar sus propiedades a nivel biológico.

Si bien la ingeniería de tejidos está encaminada a la búsqueda de soluciones a través de la creación de sustitutos que puedan restaurar, mantener o mejorar las funciones normales de los tejidos, se hace necesaria la búsqueda de diferentes alternativas que propendan a mantener los tejidos en sus condiciones normales de funcionamiento. Aún cuando existen metodologías y materiales que han sido ampliamente explorados, a través de este trabajo de investigación, se orientó hacia la búsqueda de la formulación de una pasta cerámica cuyos componentes principales fueran netamente cerámicos, proponiendo una formulación donde se omitiera el uso de componentes poliméricos y orgánicos. De esta manera, por medio del diseño de experimentos se formuló una pasta cerámica cuyos componentes principales son un biovidrio de boro y un fosfato de calcio, con propiedades de biocompatibilidad y biodegradabilidad capaz de potenciar la regeneración ósea cuando es usada en manufactura aditiva para la conformación de scaffolds por impresión 3D. Diseñar este scaffold implica equilibrar la necesidad de porosidad interconectada con el transporte de nutrientes y angiogénesis mientras se produce su degradación, todo este conjunto de pruebas biológicas, estructurales y morfológicas apuntan principalmente al desarrollo de una alternativa para la regeneración ósea a partir de pastas cerámicas.

## Referencias Bibliográficas

- [1] J. B. Woelfel, *Woelfel's Dental Anatomy*, 8th ed. Wolters Kluwer, 2012.
- [2] A. Teti, "Bone development: overview of bone cells and signaling," *Curr. Osteoporos. Rep.*, vol. 9, no. 4, p. 264, 2011.
- [3] B. Clarke, "Normal bone anatomy and physiology.," *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.*, vol. 3 Suppl 3, pp. S131-9, Nov. 2008, doi: 10.2215/CJN.04151206.
- [4] N. Mustansar, "Utility of Bone Scan Quantitative Parameters for the Evaluation of Prostate Cancer Patients," *J Nucl Med Radiat Ther*, vol. 9, no. 391, p. 2, 2018.
- [5] E. Olave, O. Binvinat, A. Soto, and J. J. Cabezas, "Huesos Sesamoideos en la Mano Humana ," *International Journal of Morphology* , vol. 32. scielocl , pp. 49–53, 2014.
- [6] N. Peel, "Bone remodelling and disorders of bone metabolism," *Surgery*, vol. 27, no. 2, pp. 70–74, Feb. 2009, doi: 10.1016/j.mpsur.2008.12.007.
- [7] U. Kini and B. N. Nandeesh, "Physiology of bone formation, remodeling, and metabolism," in *Radionuclide and hybrid bone imaging*, Springer, 2012, pp. 29–57.
- [8] R. Florencio-Silva, E. S.-C. Gisela Rodrigues da Silva Sasso, and P. S. C. Manuel Jesus Simões, "Biology of Bone Tissue: Structure, Function, and Factors That Influence Bone Cells," *Biomed Res. Int.*, p. 17, 2015, [Online]. Available: <http://dx.doi.org/10.1155/2015/421746>.
- [9] G. D. Roodman, "Advances in Bone Biology: The Osteoclast," *Endocr. Rev.*, vol. 17, no. 4, pp. 308–332, Aug. 1996, doi: 10.1210/edrv-17-4-308.
- [10] J. P. Bilezikian, L. G. Raisz, and T. J. Martin, *Principles of Bone Biology: Two-Volume Set*. Academic Press, 2008.
- [11] L. Polo-Corrales, M. Latorre-Esteves, and J. E. Ramirez-Vick, "Scaffold Design for Bone Regeneration," *J. Nanosci. Nanotechnol.*, vol. 14, no. 1, pp. 15–56, Jan. 2014, [Online]. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3997175/>.
- [12] M. A. Velasco, C. A. Narváez-Tovar, and D. A. Garzón-Alvarado, "Design, materials, and mechanobiology of biodegradable scaffolds for bone tissue engineering," *Biomed Res. Int.*, vol. 2015, 2015.
- [13] R. S. Taichman, "Blood and bone: two tissues whose fates are intertwined to create the hematopoietic stem-cell niche.," *Blood*, vol. 105, no. 7, pp. 2631–2639, Apr. 2005, doi: 10.1182/blood-2004-06-2480.

- [14] K. S. Saladin, S. J. Sullivan, and C. A. Gan, *Anatomy & physiology: the unity of form and function*. 2015.
- [15] D. B. Burr, "Chapter 1 - Bone Morphology and Organization," D. B. Burr and M. R. B. T.-B. and A. B. B. (Second E. Allen, Eds. Academic Press, 2019, pp. 3–26.
- [16] B. A. Harley, J. H. Leung, E. C. C. M. Silva, and L. J. Gibson, "Mechanical characterization of collagen–glycosaminoglycan scaffolds," *Acta Biomater.*, vol. 3, no. 4, pp. 463–474, 2007.
- [17] "clasificacion de los huesos." <http://aprendeenlinea.udea.edu.co/lms/moodle/mod/page/view.php?id=164158>.
- [18] K. T. Patton, *Anatomy and physiology*. Elsevier Health Sciences, 2015.
- [19] S. Bose, M. Roy, and A. Bandyopadhyay, "Recent advances in bone tissue engineering scaffolds," *Trends Biotechnol.*, vol. 30, no. 10, pp. 546–554, 2012.
- [20] Z. Zhang, Y.-W. Zhang, and H. Gao, "On optimal hierarchy of load-bearing biological materials," *Proceedings. Biol. Sci.*, vol. 278, no. 1705, pp. 519–525, Feb. 2011, doi: 10.1098/rspb.2010.1093.
- [21] N. Eliaz and N. Metoki, "Calcium Phosphate Bioceramics: A Review of Their History, Structure, Properties, Coating Technologies and Biomedical Applications," *Materials*, vol. 10, no. 4. 2017, doi: 10.3390/ma10040334.
- [22] J. Henkel *et al.*, "Bone Regeneration Based on Tissue Engineering Conceptions — A 21st Century Perspective," *Bone Res.*, vol. 1, no. 3, pp. 216–248, Sep. 2013, doi: 10.4248/BR201303002.
- [23] J. Y. Rho, L. Kuhn-Spearing, and P. Zioupos, "Mechanical properties and the hierarchical structure of bone.," *Med. Eng. Phys.*, vol. 20, no. 2, pp. 92–102, Mar. 1998.
- [24] J. R. Caeiro, P. González, and D. Guede, "Biomecánica y hueso (y II): ensayos en los distintos niveles jerárquicos del hueso y técnicas alternativas para la determinación de la resistencia ósea ," *Revista de Osteoporosis y Metabolismo Mineral*, vol. 5. scieloes, pp. 99–108, 2013.
- [25] J. A. Buckwalter, M. J. Glimcher, R. R. Cooper, and R. Recker, "Bone biology," *J Bone Jt. Surg Am*, vol. 77, no. 8, pp. 1256–1275, 1995.
- [26] M. Doblaré, J. M. Garcia, and M. J. Gómez, "Modelling bone tissue fracture and healing: a review," *Eng. Fract. Mech.*, vol. 71, no. 13, pp. 1809–1840, 2004.
- [27] A. Wubneh, E. K. Tsekoura, C. Ayranci, and H. Uludağ, "Current state of fabrication

- technologies and materials for bone tissue engineering,” *Acta Biomater.*, vol. 80, pp. 1–30, 2018, doi: <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2018.09.031>.
- [28] N. Nawawi, A. S. F. Alqap, and I. Sopyan, *Recent Progress on Hydroxyapatite-Based Dense Biomaterials for Load Bearing Bone Substitutes*, vol. 4. 2011.
- [29] S. Pal, *Design of artificial human joints & organs*. Des. Artif. Hum. Joints Organs, 2014.
- [30] M. Vlasea, A. Basalah, A. Azhari, R. Kandel, and E. Toyserkani, “Chapter 11 - Additive Manufacturing for Bone Load Bearing Applications,” L. G. Zhang, J. P. Fisher, and K. W. B. T.-3D B. and N. in T. E. and R. M. Leong, Eds. Academic Press, 2015, pp. 231–263.
- [31] “Anatomía hueso largo.” .
- [32] C. R. Jacobs, “Bone mechanics handbook (second edition),” *J. Biomech.*, vol. 35, no. 5, pp. 723–724, 2002, doi: [10.1016/s0021-9290\(01\)00251-2](https://doi.org/10.1016/s0021-9290(01)00251-2).
- [33] Z. Wu, T. C. Ovaert, and G. L. Niebur, “Viscoelastic properties of human cortical bone tissue depend on gender and elastic modulus,” *J. Orthop. Res.*, vol. 30, no. 5, pp. 693–699, May 2012, doi: [10.1002/jor.22001](https://doi.org/10.1002/jor.22001).
- [34] J. R. Porter, T. T. Ruckh, and K. C. Popat, “Bone tissue engineering: a review in bone biomimetics and drug delivery strategies,” *Biotechnol. Prog.*, vol. 25, no. 6, pp. 1539–1560, 2009.
- [35] J. Vélez, “Matriz tridimensional con potencial para regeneración ósea,” CES-EIA, 2012.
- [36] P. Lichte, H. C. Pape, T. Pufe, P. Kobbe, and H. Fischer, “Scaffolds for bone healing: concepts, materials and evidence,” *Injury*, vol. 42, no. 6, pp. 569–573, 2011.
- [37] A. I. Alford, K. M. Kozloff, and K. D. Hankenson, “Extracellular matrix networks in bone remodeling,” *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, vol. 65, pp. 20–31, 2015, doi: <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2015.05.008>.
- [38] A. R. Amini, C. T. Laurencin, and S. P. Nukavarapu, “Bone tissue engineering: recent advances and challenges,” *Crit. Rev. Biomed. Eng.*, vol. 40, no. 5, 2012.
- [39] R. Dimitriou, E. Jones, D. McGonagle, and P. V Giannoudis, “Bone regeneration: current concepts and future directions,” *BMC Med.*, vol. 9, p. 66, May 2011, doi: [10.1186/1741-7015-9-66](https://doi.org/10.1186/1741-7015-9-66).
- [40] J. Gasser and M. Kneissel, “Bone Physiology and Biology,” 2017, pp. 27–94.
- [41] S.-M. Lee, Q. Zhang, and A. D. Le, “Dental Stem Cells: Sources and Potential

- Applications,” *Curr. Oral Heal. Reports*, vol. 1, no. 1, pp. 34–42, 2014, doi: 10.1007/s40496-014-0012-0.
- [42] T. Bellido, L. I. Plotkin, and A. Bruzzaniti, “Chapter 3 - Bone Cells,” D. B. Burr and M. R. B. T.-B. and A. B. B. (Second E. Allen, Eds. Academic Press, 2019, pp. 37–55.
- [43] S. Mallick, S. Tripathi, and P. Srivastava, “Advancement in Scaffolds for Bone Tissue Engineering: A Review,” *IOSR J. Pharm. Biol. Sci*, vol. 10, pp. 37–54, 2015.
- [44] Y. Liu, J. Lim, and S.-H. Teoh, “Review: development of clinically relevant scaffolds for vascularised bone tissue engineering,” *Biotechnol. Adv.*, vol. 31, no. 5, pp. 688–705, 2013.
- [45] N. Lynnerup and H. D. Klaus, “Chapter 4 - Fundamentals of Human Bone and Dental Biology: Structure, Function, and Development,” J. E. B. T.-O. I. of P. C. in H. S. R. (Third E. Buikstra, Ed. San Diego: Academic Press, 2019, pp. 35–58.
- [46] A. Nanci, *Ten Cate’s oral histology: development, structure, and function*. Elsevier Health Sciences, 2017.
- [47] “El cuerpo humano. Los dientes. Introducción a las Ciencias de la Salud.” [https://agrega.juntadeandalucia.es/repositorio/27012016/42/es-an\\_2016012714\\_9125937/cuerpo\\_humano/dientes.htm#estru](https://agrega.juntadeandalucia.es/repositorio/27012016/42/es-an_2016012714_9125937/cuerpo_humano/dientes.htm#estru).
- [48] M. S. Ghiasi, J. Chen, A. Vaziri, E. K. Rodriguez, and A. Nazarian, “Bone fracture healing in mechanobiological modeling: A review of principles and methods,” *Bone Reports*, vol. 6, pp. 87–100, 2017, doi: <https://doi.org/10.1016/j.bonr.2017.03.002>.
- [49] M. R. Allen and D. B. Burr, “Chapter 5 - Bone Growth, Modeling, and Remodeling,” D. B. Burr and M. R. B. T.-B. and A. B. B. (Second E. Allen, Eds. Academic Press, 2019, pp. 85–100.
- [50] R. Dimitriou, E. Tsiridis, and P. V Giannoudis, “Current concepts of molecular aspects of bone healing,” *Injury*, vol. 36, no. 12, pp. 1392–1404, 2005, doi: <https://doi.org/10.1016/j.injury.2005.07.019>.
- [51] T. Albrektsson and C. Johansson, “Osteoinduction, osteoconduction and osseointegration.,” *Eur. spine J. Off. Publ. Eur. Spine Soc. Eur. Spinal Deform. Soc. Eur. Sect. Cerv. Spine Res. Soc.*, vol. 10 Suppl 2, pp. S96-101, Oct. 2001, doi: 10.1007/s005860100282.
- [52] J. Eyckmans, *Periosteum derived progenitor cells in bone tissue engineering*. 2019.
- [53] F. Deschaseaux, L. Sensébé, and D. Heymann, “Mechanisms of bone repair and

- regeneration," *Trends Mol. Med.*, vol. 15, no. 9, pp. 417–429, 2009.
- [54] N. Rucci, "Molecular biology of bone remodelling," *Clin. Cases Miner. Bone Metab.*, vol. 5, no. 1, pp. 49–56, 2008.
- [55] G. Fernandez de Grado *et al.*, "Bone substitutes: a review of their characteristics, clinical use, and perspectives for large bone defects management," *J. Tissue Eng.*, vol. 9, pp. 2041731418776819–2041731418776819, Jun. 2018, doi: 10.1177/2041731418776819.
- [56] V. Campana *et al.*, "Bone substitutes in orthopaedic surgery: from basic science to clinical practice," *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, vol. 25, no. 10, 2014, doi: 10.1007/s10856-014-5240-2.
- [57] P. Kumar, B. Vinitha, and G. Fathima, "Bone grafts in dentistry," *J. Pharm. Bioallied Sci.*, vol. 5, no. Suppl 1, pp. S125–S127, Jun. 2013, doi: 10.4103/0975-7406.113312.
- [58] A. Abdal-hay, K. A. Khalil, A. S. Hamdy, and F. F. Al-Jassir, "Fabrication of highly porous biodegradable biomimetic nanocomposite as advanced bone tissue scaffold," *Arab. J. Chem.*, vol. 10, no. 2, pp. 240–252, 2017, doi: <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2016.09.021>.
- [59] C. Shi, Z. Yuan, F. Han, C. Zhu, and B. Li, "Polymeric biomaterials for bone regeneration," *Ann. Joint; Vol 1, No 9 (November 2016) Ann. Jt.*, 2016, [Online]. Available: <http://aoj.amegroups.com/article/view/3596>.
- [60] Q. Chen, J. A. Roether, and A. R. Boccaccini, "Tissue engineering scaffolds from bioactive glass and composite materials," *Top. tissue Eng.*, vol. 4, no. 6, pp. 1–27, 2008.
- [61] C. E. Semino, "Self-assembling peptides: from bio-inspired materials to bone regeneration," *J. Dent. Res.*, vol. 87, no. 7, pp. 606–616, 2008.
- [62] Mesa Ospina Deisy Natali, "Evaluación de las propiedades físico-químicas, mecánicas y biológicas de scaffolds de hidroxiapatita e hidroxiapatita con recubrimiento de quitosano obtenidas por diversos métodos," Universidad de Antioquia, 2017.
- [63] G. Chen, T. Ushida, and T. Tateishi, "Scaffold design for tissue engineering," *Macromol. Biosci.*, vol. 2, no. 2, pp. 67–77, 2002.
- [64] D. Logeart-Avramoglou, F. Anagnostou, R. Bizios, and H. Petite, "Engineering bone: challenges and obstacles," *j cel mol med*, vol. 9, no. 1, pp. 72–84, 2005.
- [65] M.-E. Zarif, "A review of chitosan-, alginate-, and gelatin-based biocomposites for

- bone tissue engineering,” *Biomater. Tissue Eng. Bull.*, vol. 5, pp. 97–109, 2018, doi: <https://doi.org/10.33263/BTEB534.097109>.
- [66] A. Bharadwaz and A. C. Jayasuriya, “Recent trends in the application of widely used natural and synthetic polymer nanocomposites in bone tissue regeneration,” *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 110, p. 110698, 2020, doi: <https://doi.org/10.1016/j.msec.2020.110698>.
- [67] Q. L. Loh and C. Choong, “Three-dimensional scaffolds for tissue engineering applications: role of porosity and pore size,” *Tissue Eng. Part B Rev.*, vol. 19, no. 6, pp. 485–502, 2013.
- [68] B. Dhandayuthapani, Y. Yoshida, T. Maekawa, and D. S. Kumar, “Polymeric scaffolds in tissue engineering application: a review,” *Int. J. Polym. Sci.*, vol. 2011, 2011.
- [69] K. Rezwani, Q. Z. Chen, J. J. Blaker, and A. R. Boccaccini, “Biodegradable and bioactive porous polymer/inorganic composite scaffolds for bone tissue engineering,” *Biomaterials*, vol. 27, no. 18, pp. 3413–3431, 2006.
- [70] D. Zhang, X. Wu, J. Chen, and K. Lin, “The development of collagen based composite scaffolds for bone regeneration,” *Bioact. Mater.*, vol. 3, no. 1, pp. 129–138, 2018, doi: <https://doi.org/10.1016/j.bioactmat.2017.08.004>.
- [71] A. Aguilar *et al.*, “Application of Chitosan in Bone and Dental Engineering,” *Molecules*, vol. 24, no. 16, p. 3009, Aug. 2019, doi: [10.3390/molecules24163009](https://doi.org/10.3390/molecules24163009).
- [72] J. Wu *et al.*, “Enhanced bone regeneration of the silk fibroin electrospun scaffolds through the modification of the graphene oxide functionalized by BMP-2 peptide,” *Int. J. Nanomedicine*, vol. 14, pp. 733–751, Jan. 2019, doi: [10.2147/IJN.S187664](https://doi.org/10.2147/IJN.S187664).
- [73] J. F. Mano, R. A. Sousa, L. F. Boesel, N. M. Neves, and R. L. Reis, “Bioinert, biodegradable and injectable polymeric matrix composites for hard tissue replacement: state of the art and recent developments,” *Compos. Sci. Technol.*, vol. 64, no. 6, pp. 789–817, 2004.
- [74] P. Pavasant, T. M. Shizari, and C. B. Underhill, *Distribution of hyaluronan in the epiphyseal growth plate: Turnover by CD44-expressing osteoprogenitor cells*, vol. 107 ( Pt 1. 1994).
- [75] M. F. Maitz, “Applications of synthetic polymers in clinical medicine,” *Biosurface and Biotribology*, vol. 1, no. 3, pp. 161–176, 2015, doi: <https://doi.org/10.1016/j.bsbt.2015.08.002>.

- [76] H. Tian, Z. Tang, X. Zhuang, X. Chen, and X. Jing, "Biodegradable synthetic polymers: Preparation, functionalization and biomedical application," *Prog. Polym. Sci.*, vol. 37, no. 2, pp. 237–280, 2012, doi: <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2011.06.004>.
- [77] M. C. Tanzi, S. Farè, and G. Candiani, "Chapter 4 - Biomaterials and Applications," M. C. Tanzi, S. Farè, and G. B. T.-F. of B. E. Candiani, Eds. Academic Press, 2019, pp. 199–287.
- [78] D. Zindani, K. Kumar, and J. Paulo Davim, "4 - Metallic biomaterials—A review," in *Woodhead Publishing Series in Biomaterials*, J. P. B. T.-M. B. of B. Davim, Ed. Woodhead Publishing, 2019, pp. 83–99.
- [79] M. N. Rahaman *et al.*, "Bioactive glass in tissue engineering," *Acta Biomater.*, vol. 7, no. 6, pp. 2355–2373, Jun. 2011, doi: 10.1016/j.actbio.2011.03.016.
- [80] S. M. Best, A. E. Porter, E. S. Thian, and J. Huang, "Bioceramics: past, present and for the future," *J. Eur. Ceram. Soc.*, vol. 28, no. 7, pp. 1319–1327, 2008.
- [81] S. Mukhopadhyay, "Chapter 6 - Bioactive glass-ceramics," in *Woodhead Publishing Series in Biomaterials*, S. Thomas, P. Balakrishnan, and M. S. B. T.-F. B. C. Sreekala, Eds. Woodhead Publishing, 2018, pp. 129–152.
- [82] J. Shelby, *Introduction to Glass Science and Technology*, 2 edition., vol. 35. Royal Society of Chemistry, 2005.
- [83] B. Karmakar, "Chapter 1 - Fundamentals of Glass and Glass Nanocomposites," B. Karmakar, K. Rademann, and A. L. B. T.-G. N. Stepanov, Eds. Boston: William Andrew Publishing, 2016, pp. 3–53.
- [84] L. M. et al Alonso, "Vidrios biomédicos y vitrocerámicas como sustitutos de los tejidos óseos," 2015.
- [85] H. Aguiar, J. Serra, and P. González, "Los vidrios bioactivos en el mundo de los biomateriales," vol. 107, pp. 237–242, 2011.
- [86] K. Zheng and A. R. Boccaccini, "Sol-gel processing of bioactive glass nanoparticles: A review," *Advances in Colloid and Interface Science*, vol. 249. 2017, doi: 10.1016/j.cis.2017.03.008.
- [87] M. E. Zayas Saucedo, "Nuevos vidrios con aplicaciones ópticas formulados en el sistema ZnO-CdO-Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-TeO<sub>2</sub>-SiO<sub>2</sub>," UAM. Departamento de Física de la Materia, 1993.
- [88] E. Plumet, *La formation de systèmes pseudo-vitreux et pseudo-cristallines*, vol. 1. 1967.

- [89] J. R. Jones, "Review of bioactive glass: From Hench to hybrids," *Acta Biomater.*, vol. 9, no. 1, pp. 4457–4486, Jan. 2013, doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.actbio.2012.08.023>.
- [90] L. L. Hench, "The story of Bioglass," in *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 2006, vol. 17, no. 11, pp. 967–978, doi: 10.1007/s10856-006-0432-z.
- [91] L. L. Hench, "Bioceramics: from concept to clinic," *J. Am. Ceram. Soc.*, vol. 74, no. 7, pp. 1487–1510, 1991.
- [92] F. Orgaz, L. Santos Ruiz, M. F. Barba Martín-Sonseca, J. Becerra, and D. Amat, "Bioactive glasses and scaffolds, preparation methods and uses thereof," Jul. 2015, Accessed: Jul. 23, 2018. [Online]. Available: <http://hdl.handle.net/10261/136139>.
- [93] L. L. Hench, R. J. Splinter, W. C. Allen, and T. K. Greenlee, "Bonding mechanisms at the interface of ceramic prosthetic materials," *J. Biomed. Mater. Res.*, vol. 5, no. 6, pp. 117–141, 1971.
- [94] Q. Fu, E. Saiz, M. N. Rahaman, and A. P. Tomsia, "Bioactive glass scaffolds for bone tissue engineering: state of the art and future perspectives," *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 31, no. 7, pp. 1245–1256, 2011.
- [95] E. Rezabeigi, P. M. Wood-Adams, and R. A. L. Drew, "Synthesis of 45S5 Bioglass® via a straightforward organic, nitrate-free sol–gel process," *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 40, pp. 248–252, 2014, doi: <https://doi.org/10.1016/j.msec.2014.03.042>.
- [96] I. Cacciotti, M. Lombardi, A. Bianco, A. Ravaglioli, and L. Montanaro, "Sol–gel derived 45S5 bioglass: synthesis, microstructural evolution and thermal behaviour," *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, vol. 23, no. 8, pp. 1849–1866, 2012.
- [97] E. Mancuso, O. A. Bretcanu, M. Marshall, M. A. Birch, A. W. McCaskie, and K. W. Dalgarno, "Novel bioglasses for bone tissue repair and regeneration: Effect of glass design on sintering ability, ion release and biocompatibility," *Mater. Des.*, vol. 129, pp. 239–248, 2017, doi: <https://doi.org/10.1016/j.matdes.2017.05.037>.
- [98] L. L. Hench, "Chronology of Bioactive Glass Development and Clinical Applications," *New J. Glas. Ceram.*, vol. 3, no. 2, pp. 67–73, 2013, doi: 10.4236/njgc.2013.32011.
- [99] J. Faure *et al.*, "A new sol-gel synthesis of 45S5 bioactive glass using an organic acid as catalyst," *Mater. Sci. Eng. C. Mater. Biol. Appl.*, vol. 47, pp. 407–412, Feb. 2015, doi: 10.1016/j.msec.2014.11.045.
- [100] V. Miguez Pacheco, D. Greenspan, L. L. Hench, and A. Boccaccini, *Bioactive*

- glasses in soft tissue repair*, vol. 94. 2015.
- [101] M. Uo, M. Mizuno, Y. Kuboki, A. Makishima, and F. Watari, "Properties and cytotoxicity of water soluble Na<sub>2</sub>O–CaO–P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> glasses," *Biomaterials*, vol. 19, no. 24, pp. 2277–2284, 1998, [Online]. Available: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0142961298001367>.
- [102] A. Saranti, I. Koutselas, and M. A. Karakassides, "Bioactive glasses in the system CaO–B<sub>2</sub>O<sub>3</sub>–P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>: preparation, structural study and in vitro evaluation," *J. Non. Cryst. Solids*, vol. 352, no. 5, pp. 390–398, 2006.
- [103] Y. Gu *et al.*, "Biodegradable borosilicate bioactive glass scaffolds with a trabecular microstructure for bone repair," *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 36, pp. 294–300, 2014, doi: <https://doi.org/10.1016/j.msec.2013.12.023>.
- [104] K. M. Tohamy, I. E. Soliman, A. E. Motawea, and M. A. Aboelnasr, "Synthesis, Characterization and Bioactive Study of Borosilicate Sol-Gel Glass."
- [105] P. Balasubramanian, T. Büttner, V. M. Pacheco, and A. R. Boccaccini, "Boron-containing bioactive glasses in bone and soft tissue engineering," *J. Eur. Ceram. Soc.*, vol. 38, no. 3, pp. 855–869, 2018, doi: <https://doi.org/10.1016/j.jeurceramsoc.2017.11.001>.
- [106] H. Fu *et al.*, "In vitro evaluation of borate-based bioactive glass scaffolds prepared by a polymer foam replication method," *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 29, no. 7, pp. 2275–2281, 2009, doi: <https://doi.org/10.1016/j.msec.2009.05.013>.
- [107] A. M. Deliormanlı, "Size-dependent degradation and bioactivity of borate bioactive glass," *Ceram. Int.*, vol. 39, no. 7, pp. 8087–8095, 2013, doi: <https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2013.03.081>.
- [108] B. Yılmaz and Z. Evis, "Boron-substituted bioceramics: A review," *J. boron*, vol. 1, no. 1, pp. 6–14, Jan. 2016.
- [109] L. Xia *et al.*, "Stimulatory Effects of Boron Containing Bioactive Glass on Osteogenesis and Angiogenesis of Polycaprolactone: In Vitro Study," *Biomed Res. Int.*, vol. 2019, 2019.
- [110] F. H. Nielsen, "Is boron nutritionally relevant?," *Nutr. Rev.*, vol. 66, no. 4, pp. 183–191, Apr. 2008, doi: 10.1111/j.1753-4887.2008.00023.x.
- [111] S. Nandi, A. Mahato, B. Kundu, and P. Mukherjee, "Doped Bioactive Glass Materials in Bone Regeneration," 2016.
- [112] A. A. El-Rashidy, J. A. Roether, L. Harhaus, U. Kneser, and A. R. Boccaccini, "Regenerating bone with bioactive glass scaffolds: A review of in vivo studies in

- bone defect models,” *Acta Biomater.*, vol. 62, pp. 1–28, 2017, doi: <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2017.08.030>.
- [113] L. L. Hench, *An introduction to bioceramics, second edition*. 2013.
- [114] H. Takadama and T. Kokubo, “In vitro evaluation of bone bioactivity,” in *Bioceramics and their Clinical Applications*, 2008, pp. 165–182.
- [115] T. Kokubo and H. Takadama, “How useful is SBF in predicting in vivo bone bioactivity?,” *Biomaterials*, vol. 27, no. 15, pp. 2907–2915, 2006.
- [116] K. Shanmugam and R. Sahadevan, “1 - Bioceramics—An introductory overview,” in *Woodhead Publishing Series in Biomaterials*, S. Thomas, P. Balakrishnan, and M. S. B. T.-F. B. C. Sreekala, Eds. Woodhead Publishing, 2018, pp. 1–46.
- [117] S. M. Carvalho, A. A. R. Oliveira, E. M. F. Lemos, and M. M. Pereira, “Chapter 15 - Bioactive Glass Nanoparticles for Periodontal Regeneration and Applications in Dentistry,” in *Nanobiomaterials in Clinical Dentistry*, K. Subramani, W. Ahmed, and J. K. Hartsfield, Eds. William Andrew Publishing, 2013, pp. 299–322.
- [118] N. Jaramillo, C. Paucar, and C. García, “Influence of the reaction time and the Triton x-100/Cyclohexane/Methanol/H<sub>2</sub>O ratio on the morphology and size of silica nanoparticles synthesized via sol–gel assisted by reverse micelle microemulsion,” *J. Mater. Sci.*, vol. 49, no. 9, pp. 3400–3406, May 2014, doi: 10.1007/s10853-014-8049-y.
- [119] J. A. P. Gonzalez, “Síntesis de Biovidrios por La Técnica Sol-Gel Con Incorporación de Metales y Estudio de Sus Propiedades Antibacteriales,” Universidad de Chile, 2012.
- [120] J. M. F. Navarro, *El vidrio*, Editorial., vol. 6. Editorial CSIC-CSIC Press, 2003.
- [121] M. Tung, “Calcium Phosphates: Structure, Composition, Solubility, and Stability,” in *Calcium Phosphates in Biological and Industrial Systems SE - 1*, Z. Amjad, Ed. Springer US, 1998, pp. 1–19.
- [122] M. Bohner, “Calcium orthophosphates in medicine: from ceramics to calcium phosphate cements,” *Injury*, vol. 31, Supple, pp. D37–D47, Dec. 2000, doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S0020-1383\(00\)80022-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0020-1383(00)80022-4).
- [123] K. Lin, C. Wu, and J. Chang, “Advances in synthesis of calcium phosphate crystals with controlled size and shape.,” *Acta Biomater.*, vol. 10, no. 10, pp. 4071–4102, Oct. 2014, doi: 10.1016/j.actbio.2014.06.017.
- [124] S. V. Dorozhkin, “Calcium Orthophosphate Cements and Concretes,” *Materials*

- (*Basel*), vol. 2, no. 1, pp. 221–291, Mar. 2009, doi: 10.3390/ma2010221.
- [125] M. Bohner, S. Tadier, N. van Garderen, A. de Gasparo, N. Döbelin, and G. Baroud, “Synthesis of spherical calcium phosphate particles for dental and orthopedic applications,” *Biomatter*, vol. 3, no. 2, p. e25103, Apr. 2013, doi: 10.4161/biom.25103.
- [126] M. Vallet-Regí and J. M. González-Calbet, “Calcium phosphates as substitution of bone tissues,” *Prog. Solid State Chem.*, vol. 32, no. 1–2, pp. 1–31, 2004, doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.progsolidstchem.2004.07.001>.
- [127] P. N. Kumta, C. Sfeir, D.-H. Lee, D. Olton, and D. Choi, “Nanostructured calcium phosphates for biomedical applications: novel synthesis and characterization.,” *Acta Biomater.*, vol. 1, no. 1, pp. 65–83, Jan. 2005, doi: 10.1016/j.actbio.2004.09.008.
- [128] Dorozhkin and S. V., “Nanodimensional and Nanocrystalline Apatites and Other Calcium Orthophosphates in Biomedical Engineering,” *Biol. Med. Mater.*, vol. 2, pp. 1975-2045., 2009.
- [129] E. Boanini, M. Gazzano, and A. Bigi, “Ionic substitutions in calcium phosphates synthesized at low temperature,” *Acta Biomater.*, vol. 6, no. 6, pp. 1882–1894, Jun. 2010, doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.actbio.2009.12.041>.
- [130] J. M. Hughes, “Structure and Chemistry of the Apatites and Other Calcium Orthophosphates By J. C. Elliot (The London Hospital Medical College). Elsevier: Amsterdam. 1994. xii + 389 pp. ISBN 0-444-81582-1.,” *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 118, no. 12, p. 3072, Jan. 1996, doi: 10.1021/ja945007t.
- [131] S. V Dorozhkin, “Bioceramics of calcium orthophosphates,” *Biomaterials*, vol. 31, no. 7, pp. 1465–1485, Mar. 2010, doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biomaterials.2009.11.050>.
- [132] S. V Dorozhkin, “Biphasic, triphasic and multiphasic calcium orthophosphates,” *Acta Biomater.*, vol. 8, no. 3, pp. 963–977, Mar. 2012, doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.actbio.2011.09.003>.
- [133] S. V. Dorozhkin, “Calcium orthophosphate deposits: Preparation, properties and biomedical applications,” *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 55, pp. 272–326, 2015, doi: 10.1016/j.msec.2015.05.033.
- [134] M. Ferreira *et al.*, *Doping  $\beta$ -TCP as a Strategy for Enhancing the Regenerative Potential of Composite  $\beta$ -TCP—Alkali-Free Bioactive Glass Bone Grafts. Experimental Study in Rats*, vol. 12. 2018.
- [135] X. Li, A. Ito, Y. Sogo, X. Wang, and R. Z. LeGeros, “Solubility of Mg-containing

- beta-tricalcium phosphate at 25 degrees C,” *Acta Biomater.*, vol. 5, no. 1, pp. 508–517, Jan. 2009, doi: 10.1016/j.actbio.2008.06.010.
- [136] I. Zofkova, P. Nemcikova, and P. Matucha, “Trace elements and bone health,” *Clin. Chem. Lab. Med.*, vol. 51, no. 8, pp. 1555–1561, Aug. 2013, doi: 10.1515/cclm-2012-0868.
- [137] K. Glenske *et al.*, “Applications of Metals for Bone Regeneration,” *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 19, no. 3, p. 826, Mar. 2018, doi: 10.3390/ijms19030826.
- [138] R. K. Rude and H. E. Gruber, “Magnesium deficiency and osteoporosis: animal and human observations,” *J. Nutr. Biochem.*, vol. 15, no. 12, pp. 710–716, Dec. 2004, doi: 10.1016/j.jnutbio.2004.08.001.
- [139] S. Castiglioni, A. Cazzaniga, W. Albisetti, and J. A. M. Maier, “Magnesium and osteoporosis: current state of knowledge and future research directions,” *Nutrients*, vol. 5, no. 8, pp. 3022–3033, Jul. 2013, doi: 10.3390/nu5083022.
- [140] L. Y. He, X. M. Zhang, B. Liu, Y. Tian, and W. H. Ma, “Effect of magnesium ion on human osteoblast activity,” *Brazilian J. Med. Biol. Res. = Rev. Bras. Pesqui. medicas e Biol.*, vol. 49, no. 7, p. e5257, Jul. 2016, doi: 10.1590/1414-431X20165257.
- [141] M. Gallo *et al.*, *Effect of grain orientation and magnesium doping on  $\beta$ -tricalcium phosphate resorption behavior*. 2019.
- [142] Vanderschoot P. Spinal, “Development, fractures: treatment options and of a vertebral replacement implant,” 2002.
- [143] R. Roop Kumar and M. Wang, “Biomimetic deposition of hydroxyapatite on brushite single crystals grown by the gel technique,” *Mater. Lett.*, vol. 49, no. 1, pp. 15–19, May 2001, doi: 10.1016/S0167-577X(00)00333-5.
- [144] SHIRLEY JOHANNA MAGALI DUARTE CHÁVEZ, “Síntesis y caracterización de fosfatos de calcio por el método sol-gel,” Universidad Nacional de Asunción, 2012.
- [145] M. Miranda, “Materiales Compuestos Nanoestructurados Biocompatibles con Matriz de Hidroxiapatita,” UNIVERSIDAD DE OVIEDO, 2010.
- [146] N. K. Porsani *et al.*, “Beta-phosphate tricalcium colloidal processing,” *Ceram. Int.*, 2019, doi: <https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2019.09.249>.
- [147] A. O. McIntosh and W. L. Jablonski, “X-Ray Diffraction Powder Patterns of Calcium Phosphates,” *Anal. Chem.*, vol. 28, no. 9, pp. 1424–1427, Sep. 1956, doi: 10.1021/ac60117a019.

- [148] D. Moreno, F. Vargas, J. Ruiz, and M. E. López, "Solid-state synthesis of alpha tricalcium phosphate for cements used in biomedical applications," *Boletín la Soc. Española Cerámica y Vidr.*, 2019, doi: <https://doi.org/10.1016/j.bsecv.2019.11.004>.
- [149] E. R. Kreidler and F. A. Hummel, "Phase relations in the system SrO-P2O5 and the influence of water vapor on the formation of Sr4P2O9," *Inorg. Chem.*, vol. 6, no. 5, pp. 884–891, May 1967, doi: 10.1021/ic50051a007.
- [150] D. Loca, M. Sokolova, J. Locs, A. Smirnova, and Z. Irbe, "Calcium phosphate bone cements for local vancomycin delivery," *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 49, pp. 106–113, Apr. 2015, doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.msec.2014.12.075>.
- [151] I. H. García-Páez, P. Pena, C. Baudin, M. A. Rodríguez, E. Cordoba, and H. Antonio, "Processing and in vitro bioactivity of a  $\beta$ -Ca<sub>3</sub> (PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>-CaMg (SiO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> ceramic with the eutectic composition," *boletín la Soc. española cerámica y Vidr.*, vol. 55, no. 1, pp. 1–12, 2016.
- [152] E. Fernández Aguado, "Obtención y caracterización de nuevos cementos óseos de fosfatos de calcio en el sistema CaHPO<sub>4</sub>--- -Ca<sub>3</sub> (PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>," *TDX (Tesis Dr. en Xarxa)*, vol. 2, 2008.
- [153] S. C. J. Loo, Y. E. Siew, S. Ho, F. Y. C. Boey, and J. Ma, "Synthesis and hydrothermal treatment of nanostructured hydroxyapatite of controllable sizes.," *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, vol. 19, no. 3, pp. 1389–1397, Mar. 2008, doi: 10.1007/s10856-007-3261-9.
- [154] K. Kandori, S. Mizumoto, S. Toshima, M. Fukusumi, and Y. Morisada, "Effects of heat treatment of calcium hydroxyapatite particles on the protein adsorption behavior.," *J. Phys. Chem. B*, vol. 113, no. 31, pp. 11016–11022, Aug. 2009, doi: 10.1021/jp904481z.
- [155] Y. Liu, J. Goebel, and Y. Yin, "Templated synthesis of nanostructured materials," *Chem. Soc. Rev.*, vol. 42, no. 7, pp. 2610–2653, 2013, doi: 10.1039/C2CS35369E.
- [156] S. R. R. Jain, K. C. C. Adiga, and V. R. R. Pai Verneker, "A new approach to thermochemical calculations of condensed fuel-oxidizer mixtures," *Combust. Flame*, vol. 40, pp. 71–79, Jan. 1981, doi: [https://doi.org/10.1016/0010-2180\(81\)90111-5](https://doi.org/10.1016/0010-2180(81)90111-5).
- [157] J. F. A. Barreto, "Regeneración ósea a través de la ingeniería de tejidos: una introducción," *RET. Rev. Estud. Transdiscipl.*, vol. 1, no. 2, pp. 98–109, 2009.
- [158] E. Landi, G. Logroscino, L. Proietti, A. Tampieri, M. Sandri, and S. Sprio, "Biomimetic Mg-substituted hydroxyapatite: from synthesis to in vivo behaviour," *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, vol. 19, no. 1, pp. 239–247, 2008.

- [159] D. W. Hutmacher, J. T. Schantz, C. X. F. Lam, K. C. Tan, and T. C. Lim, "State of the art and future directions of scaffold-based bone engineering from a biomaterials perspective," *J. Tissue Eng. Regen. Med.*, vol. 1, no. 4, pp. 245–260, 2007.
- [160] M. Wang, "Developing bioactive composite materials for tissue replacement," *Biomaterials*, vol. 24, no. 13, pp. 2133–2151, 2003.
- [161] D. W. Hutmacher, "Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage," *Biomaterials*, vol. 21, no. 24, pp. 2529–2543, 2000.
- [162] I. Sabree, J. E. Gough, and B. Derby, "Mechanical properties of porous ceramic scaffolds: Influence of internal dimensions," *Ceram. Int.*, vol. 41, no. 7, pp. 8425–8432, Aug. 2015, doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ceramint.2015.03.044>.
- [163] C. Liu, Z. Xia, and J. T. Czernuszka, "Design and Development of Three-Dimensional Scaffolds for Tissue Engineering," *Chem. Eng. Res. Des.*, vol. 85, no. 7, pp. 1051–1064, 2007, doi: <http://dx.doi.org/10.1205/cherd06196>.
- [164] I. Denry and L. T. Kuhn, "Design and characterization of calcium phosphate ceramic scaffolds for bone tissue engineering," *Dent. Mater.*, vol. 32, no. 1, pp. 43–53, 2016.
- [165] E. Fallahiarezoudar, M. Ahmadipourroudposht, A. Idris, and N. Mohd Yusof, "A review of: Application of synthetic scaffold in tissue engineering heart valves," *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 48, pp. 556–565, 2015, doi: <https://doi.org/10.1016/j.msec.2014.12.016>.
- [166] M. A. Velasco Peña and D. A. Garzón Alvarado, "Implantes Scaffolds para regeneración ósea: Materiales, técnicas y modelado mediante sistemas de reacción-difusión," *Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas*, vol. 29, p. 0, 2010.
- [167] X. Chen and S. Naghieh, "Extrusion Bio-Printing of Scaffolds for Tissue Engineering Applications, Chapter 1: Scaffold Fabrication," 2019.
- [168] S. C. Cox, J. A. Thornby, G. J. Gibbons, M. A. Williams, and K. K. Mallick, "3D printing of porous hydroxyapatite scaffolds intended for use in bone tissue engineering applications," *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 47, 2015, doi: [10.1016/j.msec.2014.11.024](https://doi.org/10.1016/j.msec.2014.11.024).
- [169] J. R. Jones *et al.*, "Bioactive glass scaffolds for bone regeneration and their hierarchical characterisation.," *Proc. Inst. Mech. Eng. H.*, vol. 224, no. 12, pp. 1373–1387, 2010, doi: [10.1243/09544119JEIM836](https://doi.org/10.1243/09544119JEIM836).
- [170] B. Thavornyutikarn, N. Chantarapanich, K. Sitthiseripratip, G. A. Thouas, and Q.

- Chen, "Bone tissue engineering scaffolding: computer-aided scaffolding techniques," *Prog. Biomater.*, vol. 3, no. 2–4, pp. 61–102, 2014.
- [171] L. Zhang, G. Yang, B. N. Johnson, and X. Jia, "Three-dimensional (3D) printed scaffold and material selection for bone repair," *Acta Biomater.*, vol. 84, pp. 16–33, 2019, doi: <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2018.11.039>.
- [172] V. Karageorgiou and D. Kaplan, "Porosity of 3D biomaterial scaffolds and osteogenesis," *Biomaterials*, vol. 26, no. 27, pp. 5474–5491, Sep. 2005, doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biomaterials.2005.02.002>.
- [173] A. Khademhosseini and R. Langer, "Nanobiotechnology for Tissue Engineering and Drug Delivery," *Chem. Eng. Prog.*, vol. 102, no. 1, pp. 38–42, 2006.
- [174] B. Nasiri-Tabrizi, A. Fahami, and R. Ebrahimi-Kahrizsangi, "A comparative study of hydroxyapatite nanostructures produced under different milling conditions and thermal treatment of bovine bone," *J. Ind. Eng. Chem.*, vol. 20, no. 1, pp. 245–258, 2014, doi: <https://doi.org/10.1016/j.jiec.2013.03.041>.
- [175] J. Zeltinger, J. K. Sherwood, D. A. Graham, R. Müller, and L. G. Griffith, "Effect of pore size and void fraction on cellular adhesion, proliferation, and matrix deposition," *Tissue Eng.*, vol. 7, no. 5, pp. 557–572, 2001.
- [176] B. Dhandayuthapani, Y. Yoshida, T. Maekawa, and D. S. Kumar, "Polymeric scaffolds in tissue engineering application: a review," *Int. J. Polym. Sci.*, vol. 2011, 2011.
- [177] F. Edalat, H. Bae, S. Manoucheri, J. Min Cha, and A. Khademhosseini, *Engineering Approaches Toward Deconstructing and Controlling the Stem Cell Environment*, vol. 40. 2011.
- [178] G. D. Webler *et al.*, "Characterization and evaluation of cytotoxicity of biphasic calcium phosphate synthesized by a solid state reaction route," *Curr. Appl. Phys.*, vol. 14, no. 6, pp. 876–880, Jun. 2014, doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cap.2014.03.026>.
- [179] B. Nasiri-Tabrizi, P. Honarmandi, R. Ebrahimi-Kahrizsangi, and P. Honarmandi, "Synthesis of nanosize single-crystal hydroxyapatite via mechanochemical method," *Mater. Lett.*, vol. 63, no. 5, pp. 543–546, Feb. 2009, doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.matlet.2008.11.030>.
- [180] Y.-S. Wu, Y.-H. Lee, and H.-C. Chang, "Preparation and characteristics of nanosized carbonated apatite by urea addition with coprecipitation method," *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 29, no. 1, pp. 237–241, Jan. 2009, doi:

<http://dx.doi.org/10.1016/j.msec.2008.06.018>.

- [181] A. H. Rajabi-Zamani, A. Behnamghader, and A. Kazemzadeh, "Synthesis of nanocrystalline carbonated hydroxyapatite powder via nonalkoxide sol-gel method," *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 28, no. 8, pp. 1326–1329, 2008.
- [182] K. Cheng, S. Zhang, and W. Weng, "Sol-gel prepared  $\beta$ -TCP/FHA biphasic coatings," *Thin Solid Films*, vol. 515, no. 1, pp. 135–140, 2006.
- [183] B. H. Fellah and P. Layrolle, "Sol-gel synthesis and characterization of macroporous calcium phosphate bioceramics containing microporosity," *Acta Biomater.*, vol. 5, no. 2, pp. 735–742, 2009.
- [184] A. Gozalian, A. Behnamghader, M. Daliri, and A. Moshkforoush, "Synthesis and thermal behavior of Mg-doped calcium phosphate nanopowders via the sol gel method," *Sci. Iran.*, vol. 18, no. 6, pp. 1614–1622, 2011, doi: 10.1016/j.scient.2011.11.014.
- [185] J. Hui *et al.*, "Control synthesis and self-assembly of calcium apatite at low temperatures," *Ceram. Int.*, vol. 41, no. 5, pp. 6194–6202, 2015.
- [186] C. Kailasanathan, N. Selvakumar, and V. Naidu, "Structure and properties of titania reinforced nano-hydroxyapatite/gelatin bio-composites for bone graft materials," *Ceram. Int.*, vol. 38, no. 1, pp. 571–579, 2012.
- [187] J. S. Son *et al.*, "Porous hydroxyapatite scaffold with three-dimensional localized drug delivery system using biodegradable microspheres," *J. Control. Release*, vol. 153, no. 2, pp. 133–140, 2011.
- [188] W. Kim and F. Saito, "Sonochemical synthesis of hydroxyapatite from H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> solution with Ca(OH)<sub>2</sub>," *Ultrason. Sonochem.*, vol. 8, no. 2, pp. 85–88, 2001.
- [189] W. Zhang, Y. Chai, X. Xu, Y. Wang, and N. Cao, "Rod-shaped hydroxyapatite with mesoporous structure as drug carriers for proteins," *Appl. Surf. Sci.*, vol. 322, pp. 71–77, 2014.
- [190] Y.-P. Guo, Y.-B. Yao, Y.-J. Guo, and C.-Q. Ning, "Hydrothermal fabrication of mesoporous carbonated hydroxyapatite microspheres for a drug delivery system," *Microporous Mesoporous Mater.*, vol. 155, pp. 245–251, Jun. 2012, doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.micromeso.2012.01.037>.
- [191] J. Zhao *et al.*, "Solution combustion method for synthesis of nanostructured hydroxyapatite, fluorapatite and chlorapatite," *Appl. Surf. Sci.*, vol. 314, pp. 1026–1033, 2014.

- [192] S. K. Ghosh, S. K. Roy, B. Kundu, S. Datta, and D. Basu, "Synthesis of nano-sized hydroxyapatite powders through solution combustion route under different reaction conditions," *Mater. Sci. Eng. B*, vol. 176, no. 1, pp. 14–21, 2011.
- [193] J. Zhao, J. Zhao, J. Chen, X. Wang, Z. Han, and Y. Li, "Rietveld refinement of hydroxyapatite, tricalcium phosphate and biphasic materials prepared by solution combustion method," *Ceram. Int.*, vol. 40, no. 2, pp. 3379–3388, 2014.
- [194] R. Ramakrishnan, P. Wilson, T. Sivakumar, and I. Jemina, "A comparative study of hydroxyapatites synthesized using various fuels through aqueous and alcohol mediated combustion routes," *Ceram. Int.*, vol. 39, no. 4, pp. 3519–3532, 2013.
- [195] K. Itatani, T. Tsugawa, T. Umeda, Y. Musha, and I. J. Davies, "Preparation of submicrometer-sized porous spherical hydroxyapatite agglomerates by ultrasonic spray pyrolysis technique," *J. Ceram. Soc. Japan*, vol. 118, no. 1378, pp. 462–466, 2010.
- [196] D. Gopi, J. Indira, L. Kavitha, S. Kannan, and J. M. F. Ferreira, "Spectroscopic characterization of nanohydroxyapatite synthesized by molten salt method," *Spectrochim. Acta Part A Mol. Biomol. Spectrosc.*, vol. 77, no. 2, pp. 545–547, 2010.
- [197] S. Radin, J. T. Campbell, P. Ducheyne, and J. M. Cuckler, "Calcium phosphate ceramic coatings as carriers of vancomycin," *Biomaterials*, vol. 18, no. 11, pp. 777–782, 1997.
- [198] D. M. Santos *et al.*, "PLGA nanoparticles loaded with KMP-11 stimulate innate immunity and induce the killing of *Leishmania*," *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.*, vol. 9, no. 7, pp. 985–995, 2013.
- [199] T. Lan, Z. Shao, J. Wang, and M. Gu, "Fabrication of hydroxyapatite nanoparticles decorated cellulose triacetate nanofibers for protein adsorption by coaxial electrospinning," *Chem. Eng. J.*, vol. 260, pp. 818–825, 2015.
- [200] F. Baino, S. Fiorilli, and C. Vitale-Brovarone, "Bioactive glass-based materials with hierarchical porosity for medical applications: Review of recent advances," *Acta Biomater.*, vol. 42, pp. 18–32, 2016, doi: <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2016.06.033>.
- [201] J. Zeltinger, J. K. Sherwood, D. A. Graham, R. Müller, and L. G. Griffith, "Effect of pore size and void fraction on cellular adhesion, proliferation, and matrix deposition," *Tissue Eng.*, vol. 7, no. 5, pp. 557–572, 2001.
- [202] A. Kramschuster and L.-S. Turng, "17 - Fabrication of Tissue Engineering

- Scaffolds,” in *Plastics Design Library*, S. B. T.-H. of B. and B. P. Ebnesajjad, Ed. Boston: William Andrew Publishing, 2013, pp. 427–446.
- [203] A.-V. Do, B. Khorsand, S. M. Geary, and A. K. Salem, “3D Printing of Scaffolds for Tissue Regeneration Applications,” *Adv. Healthc. Mater.*, vol. 4, no. 12, pp. 1742–1762, Aug. 2015, doi: 10.1002/adhm.201500168.
- [204] H. Ma, C. Feng, J. Chang, and C. Wu, “3D-printed bioceramic scaffolds: From bone tissue engineering to tumor therapy,” *Acta Biomater.*, vol. 79, pp. 37–59, 2018, doi: <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2018.08.026>.
- [205] S. M. Peltola, F. P. W. Melchels, D. W. Grijpma, and M. Kellomäki, “A review of rapid prototyping techniques for tissue engineering purposes,” *Ann. Med.*, vol. 40, no. 4, pp. 268–280, 2008.
- [206] Z. Chen *et al.*, “3D printing of ceramics: A review,” *J. Eur. Ceram. Soc.*, vol. 39, no. 4, pp. 661–687, 2019, doi: <https://doi.org/10.1016/j.jeurceramsoc.2018.11.013>.
- [207] K. Takagishi and S. Umezu, “Development of the Improving Process for the 3D Printed Structure,” *Sci. Rep.*, vol. 7, p. 39852, Jan. 2017, [Online]. Available: <https://doi.org/10.1038/srep39852>.
- [208] assignee. Crump, S. S. Stratasys Inc. Minneapolis, Minnesota, “Apparatus and method for creating three-dimensional objects,” 5.
- [209] H. Chen, X. Yang, L. Chen, Y. Wang, and Y. Sun, “Application of FDM three-dimensional printing technology in the digital manufacture of custom edentulous mandible trays,” *Sci. Rep.*, vol. 6, p. 19207, Jan. 2016, [Online]. Available: <https://doi.org/10.1038/srep19207>.
- [210] X.-Y. Zhang, G. Fang, and J. Zhou, “Additively Manufactured Scaffolds for Bone Tissue Engineering and the Prediction of their Mechanical Behavior: A Review,” *Mater. (Basel, Switzerland)*, vol. 10, no. 1, p. 50, Jan. 2017, doi: 10.3390/ma10010050.
- [211] R. Jiang, R. Kleer, and F. T. Piller, “Predicting the future of additive manufacturing: A Delphi study on economic and societal implications of 3D printing for 2030,” *Technol. Forecast. Soc. Change*, vol. 117, pp. 84–97, 2017, doi: <https://doi.org/10.1016/j.techfore.2017.01.006>.
- [212] P. Chandra and B. Pachipulusu, *Three-Dimensional Printing-A Revolutionary Technology*, vol. 12. 2018.
- [213] S. A. M. Tofail, E. P. Koumoulos, A. Bandyopadhyay, S. Bose, L. O’Donoghue, and

- C. Charitidis, "Additive manufacturing: scientific and technological challenges, market uptake and opportunities," *Mater. Today*, vol. 21, no. 1, pp. 22–37, 2018, doi: <https://doi.org/10.1016/j.mattod.2017.07.001>.
- [214] A. Gebhardt and J.-S. Hötter, "1 - Basics, Definitions, and Application Levels," A. Gebhardt and J.-S. B. T.-A. M. Hötter, Eds. Hanser, 2016, pp. 1–19.
- [215] L. Piaia, G. V Salmoria, and D. Hotza, "Chapter 10 - Additive manufacturing of nanostructured bone scaffolds," in *Advanced Nanomaterials*, J. C. M. Souza, D. Hotza, B. Henriques, and A. R. B. T.-N. B. for C.-M. and O. A. Boccaccini, Eds. Elsevier, 2018, pp. 181–210.
- [216] L. Yuan, S. Ding, and C. Wen, "Additive manufacturing technology for porous metal implant applications and triple minimal surface structures: A review," *Bioact. Mater.*, vol. 4, no. 1, pp. 56–70, 2019, doi: <https://doi.org/10.1016/j.bioactmat.2018.12.003>.
- [217] T. Serra, J. A. Planell, and M. Navarro, "High-resolution PLA-based composite scaffolds via 3-D printing technology," *Acta Biomater.*, vol. 9, no. 3, pp. 5521–5530, 2013, doi: <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2012.10.041>.
- [218] N. J. Castro, R. Patel, and L. G. Zhang, "Design of a Novel 3D Printed Bioactive Nanocomposite Scaffold for Improved Osteochondral Regeneration.," *Cell. Mol. Bioeng.*, vol. 8, no. 3, pp. 416–432, Sep. 2015, doi: [10.1007/s12195-015-0389-4](https://doi.org/10.1007/s12195-015-0389-4).
- [219] Y. Yang *et al.*, *Additive manufacturing of bone scaffolds*, vol. 5. 2018.
- [220] C. M. O'Brien, B. Holmes, S. Faucett, and L. G. Zhang, "Three-dimensional printing of nanomaterial scaffolds for complex tissue regeneration," *Tissue Eng. Part B. Rev.*, vol. 21, no. 1, pp. 103–114, Feb. 2015, doi: [10.1089/ten.TEB.2014.0168](https://doi.org/10.1089/ten.TEB.2014.0168).
- [221] S. H. Jariwala, G. S. Lewis, Z. J. Bushman, J. H. Adair, and H. J. Donahue, "3D Printing of Personalized Artificial Bone Scaffolds," *3D Print. Addit. Manuf.*, vol. 2, no. 2, pp. 56–64, Jun. 2015, doi: [10.1089/3dp.2015.0001](https://doi.org/10.1089/3dp.2015.0001).
- [222] B. Derby, "Additive Manufacture of Ceramics Components by Inkjet Printing," *Engineering*, vol. 1, no. 1, pp. 113–123, 2015, doi: <https://doi.org/10.15302/J-ENG-2015014>.
- [223] M. Vilardell Navarro and R. Yáñez López, "Inkjet printing: a exible manufacturing of functional ceramic coatings by Chemical Solution Deposition," 2014.
- [224] J. Shi, L. Zhu, L. Li, Z. Li, J. Yang, and X. Wang, "A TPMS-based method for modeling porous scaffolds for bionic bone tissue engineering," *Sci. Rep.*, vol. 8, no. 1, p. 7395, May 2018, doi: [10.1038/s41598-018-25750-9](https://doi.org/10.1038/s41598-018-25750-9).
- [225] R. Ambu and E. A. Morabito, "Porous Scaffold Design Based on Minimal Surfaces:

- Development and Assessment of Variable Architectures,” *Symmetry* , vol. 10, no. 9. 2018, doi: 10.3390/sym10090361.
- [226] D. W. Abueidda, M. Bakir, R. K. Abu Al-Rub, J. S. Bergström, N. A. Sobh, and I. Jasiuk, “Mechanical properties of 3D printed polymeric cellular materials with triply periodic minimal surface architectures,” *Mater. Des.*, vol. 122, pp. 255–267, 2017, doi: <https://doi.org/10.1016/j.matdes.2017.03.018>.
- [227] H. Karcher and K. Polthier, “Construction of Triply Periodic Minimal Surfaces,” *Philos. Trans. Math. Phys. Eng. Sci.*, vol. 354, no. 1715, pp. 2077–2104, 1996, [Online]. Available: <http://www.jstor.org/stable/54581>.
- [228] S. C. Han, J. M. Choi, G. Liu, and K. Kang, “A Microscopic Shell Structure with Schwarz’s D-Surface,” *Sci. Rep.*, vol. 7, no. 1, p. 13405, 2017, doi: 10.1038/s41598-017-13618-3.
- [229] A. Castro, J. Santos, T. Pires, and P. Fernandes, “Micromechanical Behavior of TPMS Scaffolds for Bone Tissue Engineering,” *Macromol. Mater. Eng.*, vol. 305, Oct. 2020, doi: 10.1002/mame.202000487.
- [230] J. A. Ramírez *et al.*, “Influence of geometry on cell proliferation of PLA and alumina scaffolds constructed by additive manufacturing,” *J. Mater. Res.*, vol. 34, no. 22, pp. 3757–3765, 2019, doi: DOI: 10.1557/jmr.2019.323.
- [231] S. Restrepo, S. Ocampo-Gutiérrez, J. Ramírez, C. Paucar, and C. García, *Mechanical properties of ceramic structures based on Triply Periodic Minimal Surface (TPMS) processed by 3D printing*, vol. 935. 2017.
- [232] R. Ma, W. Wang, P. Yang, C. Wang, D. Guo, and K. Wang, “In vitro antibacterial activity and cytocompatibility of magnesium-incorporated poly(lactide-co-glycolic acid) scaffolds,” *Biomed. Eng. Online*, vol. 19, no. 1, p. 12, Feb. 2020, doi: 10.1186/s12938-020-0755-x.
- [233] M. B. Nair, J. D. Kretlow, A. G. Mikos, and F. K. Kasper, “Infection and tissue engineering in segmental bone defects--a mini review,” *Curr. Opin. Biotechnol.*, vol. 22, no. 5, pp. 721–725, Oct. 2011, doi: 10.1016/j.copbio.2011.02.005.
- [234] A. G. Gristina, P. Naylor, and Q. Myrvik, “Infections from biomaterials and implants: a race for the surface.,” *Med. Prog. Technol.*, vol. 14, no. 3–4, pp. 205–224.
- [235] E. Hetrick and M. Schoenfisch, “Reducing Implant-Related Infections: Active Release Strategies,” *Chem. Soc. Rev.*, vol. 35, pp. 780–789, Oct. 2006, doi: 10.1039/b515219b.

- [236] J. W. Costerton, P. S. Stewart, and E. P. Greenberg, "Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections.," *Science*, vol. 284, no. 5418, pp. 1318–1322, May 1999, doi: 10.1126/science.284.5418.1318.
- [237] C. Lu, E. Hansen, A. Sapozhnikova, D. Hu, T. Miclau, and R. S. Marcucio, "Effect of age on vascularization during fracture repair.," *J. Orthop. Res.*, vol. 26, no. 10, pp. 1384–1389, Oct. 2008, doi: 10.1002/jor.20667.
- [238] C. T. Johnson and A. J. García, "Scaffold-based anti-infection strategies in bone repair," *Ann. Biomed. Eng.*, vol. 43, no. 3, pp. 515–528, Mar. 2015, doi: 10.1007/s10439-014-1205-3.
- [239] M. M. Pithon, R. L. dos Santos, W. S. Alviano, A. C. de O. Ruellas, and M. T. de S. Araújo, "Quantitative assessment of *S. mutans* and *C. albicans* in patients with Haas and Hyrax expanders," *Dental Press J. Orthod.*, vol. 17, no. 3, pp. e1–e6, 2012.
- [240] A. Przekora, "Current Trends in Fabrication of Biomaterials for Bone and Cartilage Regeneration: Materials Modifications and Biophysical Stimulations," *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 20, no. 2, p. 435, Jan. 2019, doi: 10.3390/ijms20020435.
- [241] Y.-T. Xu, Q. Wu, Y.-M. Chen, R. J. Smales, S.-Y. Shi, and M.-T. Wang, *Antimicrobial effects of a Bioactive Glass combined with Fluoride or Triclosan on Streptococcus mutans Biofilm*, vol. 60. 2015.
- [242] A. Sharma, N. Agarwal, A. Anand, and Z. Jabin, "To compare the effectiveness of different mouthrinses on *Streptococcus mutans* count in caries active children," *J. Oral Biol. Craniofacial Res.*, vol. 8, no. 2, pp. 113–117, 2018, doi: <https://doi.org/10.1016/j.jobcr.2018.05.002>.
- [243] S. D. Forssten, M. Björklund, and A. C. Ouwehand, "Streptococcus mutans, Caries and Simulation Models," *Nutrients*, vol. 2, no. 3, pp. 290–298, Mar. 2010, doi: 10.3390/nu2030290.
- [244] I. Allan, H. Newman, and M. Wilson, "Antibacterial activity of particulate Bioglass® against supra- and subgingival bacteria," *Biomaterials*, vol. 22, no. 12, pp. 1683–1687, 2001, doi: [https://doi.org/10.1016/S0142-9612\(00\)00330-6](https://doi.org/10.1016/S0142-9612(00)00330-6).
- [245] E. Fernández, H. González, Á. Castro, and D. Lisboa, "Osteología: relevancia de conceptos médicos en el ámbito odontológico," *Rev. Clínica Periodoncia, Implantol. y Rehabil. Oral*, vol. 8, no. 1, pp. 83–92, 2015, doi: <https://doi.org/10.1016/j.piro.2015.02.010>.
- [246] R. J. Lamont and P. G. Egland, "Chapter 52 - Dental Caries," Y.-W. Tang, M.

- Sussman, D. Liu, I. Poxton, and J. B. T.-M. M. M. (Second E. Schwartzman, Eds. Boston: Academic Press, 2015, pp. 945–955.
- [247] J. C. Ojeda-Garcés, E. Oviedo-García, and L. A. Salas, “Streptococcus mutans y caries dental ,” *CES Odontología* , vol. 26. scieloco , pp. 44–56, 2013.
- [248] C. Zhou *et al.*, *Biomimetic fabrication of a three-level hierarchical calcium phosphate/collagen/hydroxyapatite scaffold for bone tissue engineering*, vol. 6. 2014.
- [249] G. T.-J. Huang, “Induced Pluripotent Stem Cells-A New Foundation in Medicine.,” *J. Exp. Clin. Med.*, vol. 2, no. 5, pp. 202–217, Oct. 2010, doi: 10.1016/S1878-3317(10)60033-2.
- [250] Z. Gazit, G. Pelled, D. Sheyn, N. Kimelman, and D. Gazit, “Mesenchymal Stem Cells,” in *Handbook of Stem Cells*, vol. 2, 2013, pp. 513–527.
- [251] K. Kalra and P. Tomar, “Stem cell: basics, classification and applications,” *Am. J. Phytomedicine Clin. Ther.*, vol. 2, no. 7, pp. 919–930, 2014.
- [252] P. A. Zuk *et al.*, “Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells,” *Mol. Biol. Cell*, vol. 13, no. 12, pp. 4279–4295, Dec. 2002, doi: 10.1091/mbc.e02-02-0105.
- [253] L. da Silva Meirelles, P. C. Chagastelles, and N. B. Nardi, “Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues.,” *J. Cell Sci.*, vol. 119, no. Pt 11, pp. 2204–2213, Jun. 2006, doi: 10.1242/jcs.02932.
- [254] P. A. Zuk *et al.*, “Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies.,” *Tissue Eng.*, vol. 7, no. 2, pp. 211–228, Apr. 2001, doi: 10.1089/107632701300062859.
- [255] W. Tsuji, J. P. Rubin, and K. G. Marra, “Adipose-derived stem cells: Implications in tissue regeneration,” *World J. Stem Cells*, vol. 6, no. 3, pp. 312–321, Jul. 2014, doi: 10.4252/wjsc.v6.i3.312.
- [256] M. A. Haniffa *et al.*, “Adult human fibroblasts are potent immunoregulatory cells and functionally equivalent to mesenchymal stem cells.,” *J. Immunol.*, vol. 179, no. 3, pp. 1595–1604, Aug. 2007, doi: 10.4049/jimmunol.179.3.1595.
- [257] M. Tatullo, B. Codispoti, F. Paduano, M. Nuzzolese, and I. Makeeva, “Strategic Tools in Regenerative and Translational Dentistry,” *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 20, no. 8, p. 1879, 2019.
- [258] D. A. De Ugarte *et al.*, “Comparison of multi-lineage cells from human adipose

- tissue and bone marrow.," *Cells. Tissues. Organs*, vol. 174, no. 3, pp. 101–109, 2003, doi: 10.1159/000071150.
- [259] A. Ho-Shui-Ling, J. Bolander, L. E. Rustom, A. W. Johnson, F. P. Luyten, and C. Picart, "Bone regeneration strategies: Engineered scaffolds, bioactive molecules and stem cells current stage and future perspectives," *Biomaterials*, 2018.
- [260] L. de Girolamo, M. F. Sartori, W. Albisetti, and A. T. Brini, "Osteogenic differentiation of human adipose-derived stem cells: comparison of two different inductive media," *J. Tissue Eng. Regen. Med.*, vol. 1, no. 2, pp. 154–157, 2007.
- [261] S. Ehnert *et al.*, "TGF- $\beta$ 1 as possible link between loss of bone mineral density and chronic inflammation," *PLoS One*, vol. 5, no. 11, pp. e14073–e14073, Nov. 2010, doi: 10.1371/journal.pone.0014073.
- [262] S. Ehnert *et al.*, "Primary human osteoblasts with reduced alkaline phosphatase and matrix mineralization baseline capacity are responsive to extremely low frequency pulsed electromagnetic field exposure - Clinical implication possible," *Bone reports*, vol. 3, pp. 48–56, Aug. 2015, doi: 10.1016/j.bonr.2015.08.002.
- [263] M. J. Coelho, A. T. Cabral, and M. H. Fernandes, "Human bone cell cultures in biocompatibility testing. Part I: osteoblastic differentiation of serially passaged human bone marrow cells cultured in alpha-MEM and in DMEM.," *Biomaterials*, vol. 21, no. 11, pp. 1087–1094, Jun. 2000.
- [264] M. J. Coelho and M. H. Fernandes, "Human bone cell cultures in biocompatibility testing. Part II: effect of ascorbic acid, beta-glycerophosphate and dexamethasone on osteoblastic differentiation.," *Biomaterials*, vol. 21, no. 11, pp. 1095–1102, Jun. 2000.
- [265] P. Wang, L. Zhao, J. Liu, M. D. Weir, X. Zhou, and H. H. K. Xu, "Bone tissue engineering via nanostructured calcium phosphate biomaterials and stem cells," *Bone Res.*, vol. 2, p. 14017, 2014.
- [266] F. J. O'Brien, "Biomaterials & scaffolds for tissue engineering," *Mater. today*, vol. 14, no. 3, pp. 88–95, 2011.
- [267] E. L. Ambrish Mithal, Vibha Dhingra, "International Osteoporosis Foundation," 2015. <https://www.iofbonehealth.org/facts-statistics>.
- [268] S.-H. Lee and H. Shin, "Matrices and scaffolds for delivery of bioactive molecules in bone and cartilage tissue engineering.," *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 59, no. 4–5, pp. 339–359, May 2007, doi: 10.1016/j.addr.2007.03.016.
- [269] P. Wang, L. Zhao, W. Chen, X. Liu, M. D. Weir, and H. H. K. Xu, "Stem cells and

- calcium phosphate cement scaffolds for bone regeneration,” *J. Dent. Res.*, p. 0022034514534689, 2014.
- [270] J. J. Li *et al.*, “Multiple silk coatings on biphasic calcium phosphate scaffolds: effect on physical and mechanical properties and in vitro osteogenic response of human mesenchymal stem cells,” *Biomacromolecules*, vol. 14, no. 7, pp. 2179–2188, 2013.
- [271] C. Ning, L. Zhou, and G. Tan, “Fourth-generation biomedical materials,” *Mater. Today*, vol. 19, no. 1, pp. 2–3, Jan. 2016, doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.mattod.2015.11.005>.
- [272] L. L. Hench and J. M. Polak, “Third-generation biomedical materials,” *Science*, vol. 295, no. 5557, pp. 1014–1017, Feb. 2002, doi: 10.1126/science.1067404.
- [273] M. Navarro, A. Michiardi, O. Castaño, and J. A. Planell, “Biomaterials in orthopaedics,” *J. R. Soc. Interface*, vol. 5, no. 27, pp. 1137–1158, Oct. 2008, doi: 10.1098/rsif.2008.0151.
- [274] C. Myeroff and M. Archdeacon, “Autogenous Bone Graft: Donor Sites and Techniques,” *J. Bone & Jt. Surg.*, vol. 93, no. 23, pp. 2227 LP – 2236, Dec. 2011, [Online]. Available: <http://jbjs.org/content/93/23/2227.abstract>.
- [275] J. S. Silber *et al.*, “Donor site morbidity after anterior iliac crest bone harvest for single-level anterior cervical discectomy and fusion,” *Spine (Phila. Pa. 1976)*, vol. 28, no. 2, pp. 134–139, Jan. 2003, doi: 10.1097/01.BRS.0000041587.55176.67.
- [276] S.-I. Roohani-Esfahani, P. Newman, and H. Zreiqat, “Design and Fabrication of 3D printed Scaffolds with a Mechanical Strength Comparable to Cortical Bone to Repair Large Bone Defects,” *Sci. Rep.*, vol. 6, 2016.
- [277] L. L. Hench and I. Thompson, “Twenty-first century challenges for biomaterials,” *J. R. Soc. Interface*, vol. 7, no. Suppl 4, pp. S379–S391, Aug. 2010, doi: 10.1098/rsif.2010.0151.focus.
- [278] S. Gómez, M. D. Vlad, J. López, and E. Fernández, “Design and properties of 3D scaffolds for bone tissue engineering,” *Acta Biomater.*, vol. 42, pp. 341–350, 2016.
- [279] M. Mastrogiacomo *et al.*, “Role of scaffold internal structure on in vivo bone formation in macroporous calcium phosphate bioceramics,” *Biomaterials*, vol. 27, no. 17, pp. 3230–3237, 2006.
- [280] G. Pasquinelli *et al.*, “Mesenchymal stem cell interaction with a non-woven hyaluronan-based scaffold suitable for tissue repair,” *J. Anat.*, vol. 213, no. 5, pp. 520–530, Nov. 2008, doi: 10.1111/j.1469-7580.2008.00974.x.

- [281] J. Glowacki and S. Mizuno, "Collagen scaffolds for tissue engineering.," *Biopolymers*, vol. 89, no. 5, pp. 338–344, May 2008, doi: 10.1002/bip.20871.
- [282] C. Dong and Y. Lv, "Application of Collagen Scaffold in Tissue Engineering: Recent Advances and New Perspectives," *Polymers (Basel)*, vol. 8, no. 2, p. 42, 2016.
- [283] R. K. Schneider *et al.*, "The osteogenic differentiation of adult bone marrow and perinatal umbilical mesenchymal stem cells and matrix remodelling in three-dimensional collagen scaffolds.," *Biomaterials*, vol. 31, no. 3, pp. 467–480, Jan. 2010, doi: 10.1016/j.biomaterials.2009.09.059.
- [284] H. Lu *et al.*, "Spatial immobilization of bone morphogenetic protein-4 in a collagen-PLGA hybrid scaffold for enhanced osteoinductivity," *Biomaterials*, vol. 33, no. 26, pp. 6140–6146, 2012.
- [285] E.-K. Pang *et al.*, "Effect of recombinant human bone morphogenetic protein-4 dose on bone formation in a rat calvarial defect model," *J. Periodontol.*, vol. 75, no. 10, pp. 1364–1370, 2004.
- [286] A. R. Costa-Pinto *et al.*, "Chitosan-poly(butylene succinate) scaffolds and human bone marrow stromal cells induce bone repair in a mouse calvaria model.," *J. Tissue Eng. Regen. Med.*, vol. 6, no. 1, pp. 21–28, Jan. 2012, doi: 10.1002/term.391.
- [287] S. Wu, X. Liu, K. W. K. Yeung, C. Liu, and X. Yang, "Biomimetic porous scaffolds for bone tissue engineering," *Mater. Sci. Eng. R Reports*, vol. 80, pp. 1–36, 2014.
- [288] D.-X. Wang *et al.*, "Enhancing the bioactivity of Poly(lactic-co-glycolic acid) scaffold with a nano-hydroxyapatite coating for the treatment of segmental bone defect in a rabbit model," *Int. J. Nanomedicine*, vol. 8, pp. 1855–1865, May 2013, doi: 10.2147/IJN.S43706.
- [289] H. Park *et al.*, "Effects of three-dimensionally printed polycaprolactone/ $\beta$ -tricalcium phosphate scaffold on osteogenic differentiation of adipose tissue- and bone marrow-derived stem cells," *Arch. craniofacial Surg.*, vol. 19, no. 3, pp. 181–189, Sep. 2018, doi: 10.7181/acfs.2018.01879.
- [290] C. Combes and C. Rey, "Amorphous calcium phosphates: Synthesis, properties and uses in biomaterials," *Acta Biomater.*, vol. 6, no. 9, pp. 3362–3378, Sep. 2010, doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.actbio.2010.02.017>.
- [291] M. Vallet-Regí and F. Balas, "Silica materials for medical applications.," *Open Biomed. Eng. J.*, vol. 2, pp. 1–9, 2008, doi: 10.2174/1874120700802010001.
- [292] A. F. Khan, M. Saleem, A. Afzal, A. Ali, A. Khan, and A. R. Khan, "Bioactive

- behavior of silicon substituted calcium phosphate based bioceramics for bone regeneration,” *Materials Science and Engineering C*, vol. 35, no. 1. Elsevier, pp. 245–252, 2014, doi: 10.1016/j.msec.2013.11.013.
- [293] S. V Dorozhkin, “Calcium orthophosphate-based bioceramics,” *Materials (Basel)*, vol. 6, no. 9, pp. 3840–3942, 2013.
- [294] S. Bose, G. Fielding, S. Tarafder, and A. Bandyopadhyay, “Understanding of dopant-induced osteogenesis and angiogenesis in calcium phosphate ceramics,” *Trends Biotechnol.*, vol. 31, no. 10, pp. 594–605, 2013.
- [295] J. R. Jones and L. L. Hench, “Regeneration of trabecular bone using porous ceramics,” *Curr. Opin. Solid State Mater. Sci.*, vol. 7, no. 4, pp. 301–307, 2003.
- [296] C. You, W. Li, C. Zhang, Z. Wu, and J. Liu, “Recent Developments of Biomaterials for Additive Manufacturing of Bone Scaffolds,” *Adv. Healthc. Mater.*, vol. 9, p. 2000724, Aug. 2020, doi: 10.1002/adhm.202000724.
- [297] K. Fu, Y. Liu, N. Gao, J. Cai, W. He, and W. Qiu, “Reconstruction of Maxillary and Orbital Floor Defect With Free Fibula Flap and Whole Individualized Titanium Mesh Assisted by Computer Techniques.,” *J. oral Maxillofac. Surg. Off. J. Am. Assoc. Oral Maxillofac. Surg.*, vol. 75, no. 8, pp. 1791.e1-1791.e9, Aug. 2017, doi: 10.1016/j.joms.2017.03.054.
- [298] G. Gerbino, E. Zavattoni, F. Zenga, F. A. Bianchi, P. Garzino-Demo, and S. Berrone, “Primary and secondary reconstruction of complex craniofacial defects using polyetheretherketone custom-made implants.,” *J. cranio-maxillo-facial Surg. Off. Publ. Eur. Assoc. Cranio-Maxillo-Facial Surg.*, vol. 43, no. 8, pp. 1356–1363, Oct. 2015, doi: 10.1016/j.jcms.2015.06.043.
- [299] J. W. Park, H. G. Kang, J. H. Kim, and H.-S. Kim, “New 3-dimensional implant application as an alternative to allograft in limb salvage surgery: a technical note on 10 cases,” *Acta Orthop.*, vol. 91, no. 4, pp. 489–496, Jul. 2020, doi: 10.1080/17453674.2020.1755543.
- [300] X. Wang *et al.*, “Topological design and additive manufacturing of porous metals for bone scaffolds and orthopaedic implants: A review,” *Biomaterials*, vol. 83. 2016, doi: 10.1016/j.biomaterials.2016.01.012.
- [301] H. Qu, “Additive manufacturing for bone tissue engineering scaffolds,” *Mater. Today Commun.*, vol. 24, p. 101024, 2020, doi: <https://doi.org/10.1016/j.mtcomm.2020.101024>.

- 
- [302] O. Guillaume *et al.*, “Surface-enrichment with hydroxyapatite nanoparticles in stereolithography-fabricated composite polymer scaffolds promotes bone repair,” *Acta Biomater.*, vol. 54, pp. 386–398, May 2017, doi: 10.1016/j.actbio.2017.03.006.
- [303] G. Brunello *et al.*, “Powder-based 3D printing for bone tissue engineering,” *Biotechnology Advances*, vol. 34, no. 5, 2016, doi: 10.1016/j.biotechadv.2016.03.009.
- [304] T. Kumaresan, R. Gandhinathan, M. Ramu, M. Ananthasubramanian, and K. B. Pradheepa, “Design, analysis and fabrication of polyamide/ hydroxyapatite porous structured scaffold using selective laser sintering method for bio-medical applications,” *J. Mech. Sci. Technol.*, vol. 30, no. 11, pp. 5305–5312, 2016, doi: 10.1007/s12206-016-1049-x.
- [305] P. Warnke *et al.*, “Rapid Prototyping: Porous Titanium Alloy Scaffolds Produced by Selective Laser Melting for Bone Tissue Engineering,” *Tissue Eng. Part C. Methods*, vol. 15, pp. 115–124, Jun. 2009, doi: 10.1089/ten.tec.2008.0288.
- [306] Y. Li *et al.*, “Improving Osteointegration and Osteogenesis of Three-Dimensional Porous Ti6Al4V Scaffolds by Polydopamine-Assisted Biomimetic Hydroxyapatite Coating,” *ACS Appl. Mater. Interfaces*, vol. 7, no. 10, pp. 5715–5724, Mar. 2015, doi: 10.1021/acsami.5b00331.
- [307] G. Chen, N. Chen, and Q. Wang, “Fabrication and properties of poly(vinyl alcohol)/ $\beta$ -tricalcium phosphate composite scaffolds via fused deposition modeling for bone tissue engineering,” *Compos. Sci. Technol.*, vol. 172, pp. 17–28, 2019, doi: <https://doi.org/10.1016/j.compscitech.2019.01.004>.
- [308] R. Trombetta, J. A. Inzana, E. M. Schwarz, S. L. Kates, and H. A. Awad, “3D Printing of Calcium Phosphate Ceramics for Bone Tissue Engineering and Drug Delivery,” *Ann. Biomed. Eng.*, vol. 45, no. 1, pp. 23–44, Jan. 2017, doi: 10.1007/s10439-016-1678-3.

# **CAPÍTULO 2:**

**SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DEL  
MATERIAL CERÁMICO**

## 2. Introducción

En este capítulo, son expuestos los métodos utilizados para la obtención de biovidrio y fosfato de calcio mediante diferentes métodos de síntesis. Se muestran los resultados referentes a la formación y caracterización de material cerámico obtenido, así como; el comportamiento que estos presentan frente a la degradabilidad. Siendo la degradabilidad de los polvos cerámicos precursores una de las variables que deben tenerse en cuenta previo a la formulación de la pasta cerámica y conformación del scaffold. Con fines comparativos en la actividad antibacteriana fueron sintetizados fosfatos de calcio dopados con Magnesio.

### 2.1 Metodología Experimental

Para lograr los objetivos propuestos se exploraron los métodos de síntesis en los cuales se tiene experticia en el grupo de investigación para la obtención de fosfato de calcio y un biovidrio de boro (BGB) dentro del sistema  $X \text{ B}_2\text{O}_3 [100-X] (61\text{SiO}_2 \cdot 9\text{P}_2\text{O}_5 \cdot 30\text{CaO})$  donde  $X$  es el %w del boro utilizado. Una vez establecidas las rutas de síntesis para obtención del biovidrio de boro (BGB) y el fosfato de calcio, se evaluó la degradabilidad de los polvos cerámicos y posterior a esto, se utilizó el diseño de experimentos con el fin de obtener los mejores resultados en cuanto formulación de la pasta cerámica y posterior impresión del scaffold (Figura 18).

#### 2.1.1 Síntesis De Fosfato de Calcio

Para la síntesis de los fosfatos de calcio se exploraron 3 rutas químicas, esto con el fin de identificar aquella ruta con la cual se obtuviera un material con las mejores características asociadas a un fosfato de calcio para regeneración ósea. De estas rutas, se escogió la que arrojó mejores resultados en cuanto a la obtención del material cerámico y biodegradabilidad. Las rutas de síntesis exploradas fueron: sol- gel (CPS), hidrotermal (CPH) y autocombustión ó combustión en solución ( $\beta$ -TCP).

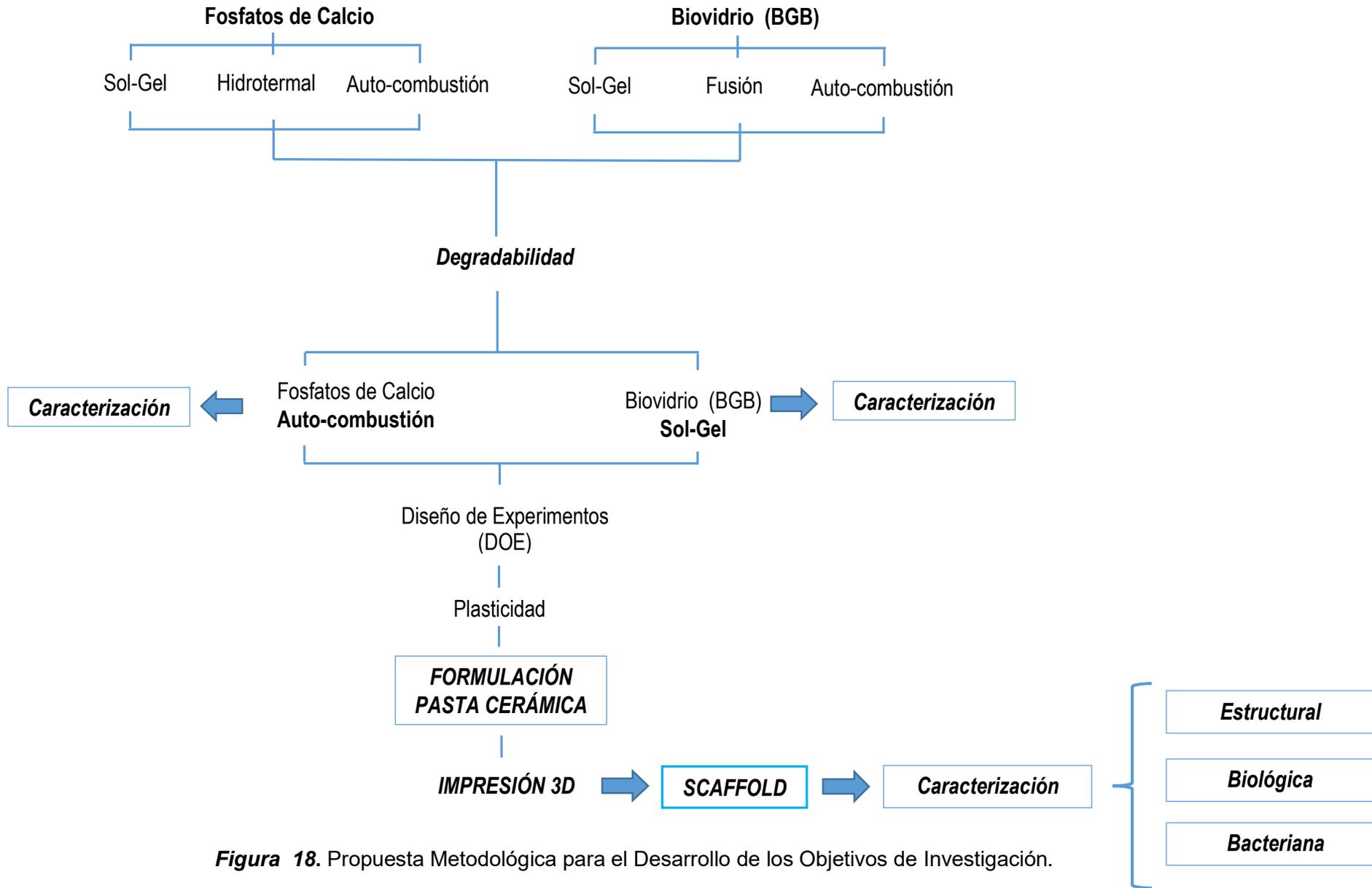


Figura 18. Propuesta Metodológica para el Desarrollo de los Objetivos de Investigación.

### 2.1.1.1 Sol- Gel

Los fosfatos de calcio fueron sintetizados mediante la ruta a sol-gel (CPS) a partir de nitrato de calcio tetrahidratado  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  (Merck), trietil fosfato (TEP)  $\text{C}_6\text{H}_{15}\text{O}_4\text{P}$  (Merck), ácido bórico  $\text{H}_3\text{BO}_3$  (Scharlau), etanol al 99.8% (Merck) e hidróxido de amonio acuoso (Merck). Inicialmente se forman 2 soluciones, la primera consta de una solución de TEP y  $\text{H}_3\text{BO}_3$  en etanol y la segunda solución acuosa de  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  y  $\text{NH}_4\text{OH}$  hasta alcanzar  $\text{pH}=10$ , las dos soluciones bajo agitación continua durante 20 minutos, pasado este tiempo las 2 soluciones son mezcladas y continúan bajo agitación por un espacio de 5 horas a  $40^\circ\text{C}$  hasta observar la formación del gel y finalmente secar la muestra durante 12 horas para luego ser calcinada a una temperatura de  $800^\circ\text{C}/2\text{h}$ .

### 2.1.1.2 Hidrotermal

Los fosfatos de calcio fueron sintetizados vía Hidrotermal (CPH), en un reactor PN 16 (Eurotechnica) con control de temperatura. Los fosfatos se obtuvieron a partir de nitrato de calcio tetrahidratado  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  (Merck), di-amonio de fosfato  $(\text{NH}_4)_2 \cdot \text{HPO}_4$  (Scharlau), bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB)  $\text{C}_{19}\text{H}_{42}\text{BrN}$ , polietilenglicol (PEG)  $\text{C}_{2n}\text{H}_{4n+2}\text{O}_{n+1}$ , ciclohexano  $\text{C}_6\text{H}_{12}$  y ácido bórico  $\text{H}_3\text{BO}_3$  (Scharlau) como fuentes primarias, con una relación  $\text{Ca}/\text{P}=1,5$ . La síntesis consistió de dos etapas, en la etapa 1 son preparadas 3 soluciones como se indica a continuación:

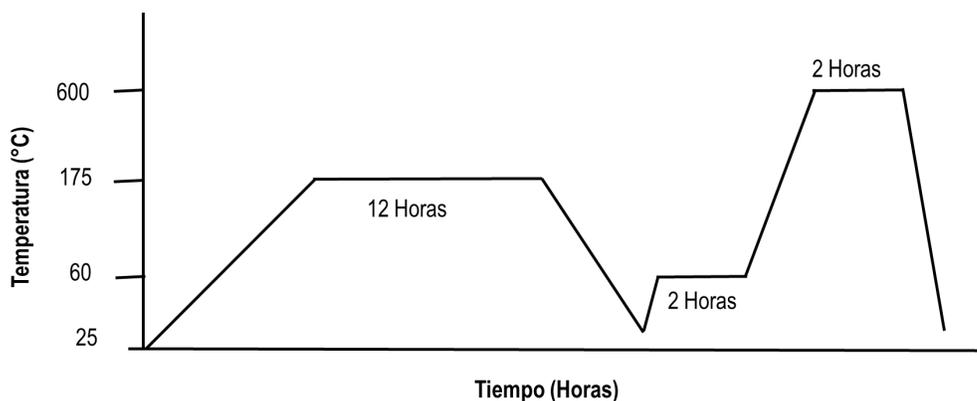
**1. Solución 1 ( $\text{S}_1$ ):** Se mezclan el  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  y agua destilada bajo agitación magnética constante (600 rpm).

**2. Solución 2 ( $\text{S}_2$ ):** Se mezclan el  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ ,  $\text{H}_3\text{BO}_3$  y agua destilada bajo agitación magnética constante (600 rpm)

**3. Solución ( $\text{S}_3$ ):** Se mezclan el CTAB, el PEG y el Ciclohexano. Posteriormente, se agregó lentamente cada disolución, en su orden  $\text{S}_1+\text{S}_2$  y luego la mezcla  $\text{S}_3$ , posteriormente se somete el sistema a agitación durante 30 minutos a 600 rpm.

Una vez se tiene la emulsión  $S_1 + S_2 + S_3$  se registra el pH antes y después del tratamiento térmico. La emulsión obtenida es depositada en el vaso de teflón del autoclave y posteriormente ubicado en el reactor de acero inoxidable.

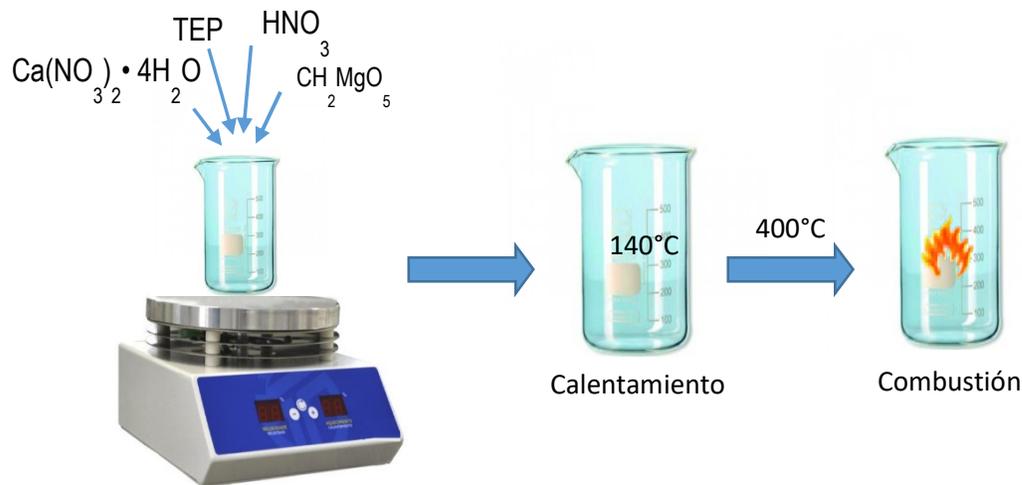
En la segunda etapa, se lleva la emulsión a tratamiento térmico a  $170^\circ\text{C}$  por un periodo de 12 horas, que generará unos 15 bares de presión (Figura 19). Transcurrido el tratamiento térmico, el reactor se dejó enfriar hasta temperatura ambiente. Luego se separa el sobrenadante en un beaker y se filtra el precipitado en bomba de vacío. Finalmente, el precipitado obtenido se seca a una temperatura de  $60^\circ\text{C}$  durante dos horas y se realiza un tratamiento térmico de  $600^\circ\text{C}/2\text{h}$ , con el fin de eliminar los residuos de componentes orgánicos e inducir a la estabilización de la fase.



**Figura 19.** Rampa calentamiento obtención Fosfato de calcio vía Hidrotermal.

### 2.1.1.3 Autocombustión ó combustión en solución

Los fosfatos de calcio fueron sintetizados vía combustión ( $\beta$ -TCP) en solución utilizando como fuentes primarias nitrato de calcio tetrahidratado  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  (Merck), trietil fosfato (TEP)  $\text{C}_6\text{H}_{15}\text{O}_4\text{P}$  (Merck) como fuentes de calcio y fósforo respectivamente, glicina  $\text{C}_2\text{H}_5\text{NO}_2$  (Merck) como combustible, y ácido nítrico  $\text{HNO}_3$  al 65% (Biochemical), ácido bórico  $\text{H}_3\text{BO}_3$  (Scharlau) como precursor de boro (B) y  $\text{CH}_2\text{MgO}_5$  como precursor de magnesio (Mg). Experimentalmente el  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  fue disuelto en 10 ml de agua destilada bajo agitación constante durante 20 minutos, pasado este tiempo fue agregado el  $\text{C}_6\text{H}_{15}\text{O}_4\text{P}$  manteniendo una relación  $\text{Ca}/\text{P}=1,5$  ( $\beta$ -fosfato tricálcico) la cual forma un precipitado que posteriormente es disuelto con 10 ml de  $\text{HNO}_3$ . (Figura 20).



**Figura 20.** Metodología Síntesis Fosfato de Calcio vía autocombustión.

Para obtener la temperatura de combustión, se utilizó el parámetro  $\phi$  ajustado a la relación estequiometría oxidante -combustible para  $\phi = 1$ . El parámetro  $\phi$  (Ecn 1.) está definido como [1]:

$$\phi = \frac{\sum \text{Coefficient.Oxidant elements} \times \text{Valence}}{(-1)\sum \text{Coefficient Reducing elements} \times \text{Valence}} \quad \text{Ecn (1)}$$

Una vez agregada la glicina, es agregada el  $\text{H}_3\text{BO}_3$  y  $\text{CH}_2\text{MgO}_5$  (para los fosfatos de calcio sin Mg y sin B este paso es omitido), durante el proceso de síntesis la solución permaneció en agitación y calentamiento a una temperatura de  $70^\circ\text{C}$  durante  $\frac{1}{2}$  hora hasta la completa evaporación del solvente y la formación de la resina, una vez formada la resina es aumentada la temperatura a  $140^\circ\text{C}$  hasta la combustión.

Las cenizas formadas fueron llevadas a tratamiento térmico a  $800^\circ\text{C}/2\text{h}$ . Los polvos obtenidos fueron molidos en un molino de bolas Retsch PM100 durante 30 minutos en intervalos de 6 minutos a 310 rpm a continuación los polvos fueron tamizados en tamiz malla 635 obteniendo de esta manera los polvos finos y los polvos gruesos del fosfato de calcio.

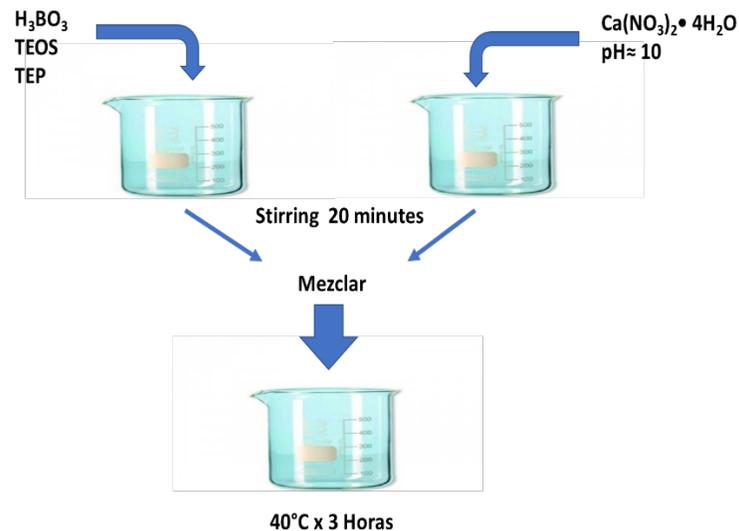
### 2.1.2 Síntesis De Biovidrio de Boro (BGB)

Para la síntesis del biovidrio (BGB) se exploraron 3 rutas de síntesis: sol- gel (BGBS), Fusión (BGBF) y autocombustión (BGBA). De estos métodos se escogió el método que

arrojó los mejores resultados en cuanto a la obtención del material cerámico y la biodegradabilidad.

### 2.1.2.1 Sol – gel

El biovidrio fue sintetizado vía Sol-gel (BGS) a partir de nitrato de calcio tetrahidratado  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  (Merck), Trietil fosfato (TEP)  $\text{C}_6\text{H}_{15}\text{O}_4\text{P}$  (Merck), ácido Bórico  $\text{H}_3\text{BO}_3$  (Scharlau), Tetraetil ortosilicato  $\text{SiC}_8\text{H}_{20}\text{O}_4$  (TEOS), Etanol al 99.8% (Merck) e Hidróxido de Amonio acuoso (Merck). Inicialmente se forman 2 soluciones, la primera consta de una solución de TEP,  $\text{H}_3\text{BO}_3$  y TEOS en etanol y la segunda solución es el  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  disuelto en agua y  $\text{NH}_4\text{OH}$  hasta  $\text{pH}=10$ , las dos soluciones bajo agitación continua durante 20 minutos, pasado este tiempo las 2 soluciones son mezcladas y continúan bajo agitación por un espacio de 3 horas a  $40^\circ\text{C}$  hasta observar la formación del gel y finalmente secar la muestra durante 3 días para luego ser sinterizada a una temperatura de  $600^\circ\text{C}/2\text{h}$  (figura 21). Los polvos obtenidos fueron molidos en un molino de bolas Retsch PM100 durante 30 minutos en intervalos de 6 minutos a 310 rpm a continuación los polvos fueron tamizados en tamiz malla 635 obteniendo de esta manera los polvos finos y los polvos gruesos del biovidrio.



**Figura 21.** Metodología Síntesis Biovidrio vía Sol-gel (BGS).

### 2.1.2.2 Fusión

Para conformar el biovidrio vía fusión (BGF) fueron utilizados como materias primas nitrato de calcio tetrahidratado  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  (Merck), cuarzo ( $\text{SiO}_2$ ), di-amonio de fosfato  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  (Scharlau), ácido bórico  $\text{H}_3\text{BO}_3$  (Scharlau). Inicialmente son mezclados en un mortero el nitrato de calcio tetrahidratado, el cuarzo en polvo, el ácido bórico y el di-amonio de fosfato los cuales posteriormente se transfieren a un crisol de platino. La mezcla es sometida a calcinación a unos  $900^\circ\text{C}$  durante 2 horas y la reacción química final se realiza durante 4 horas a  $1350^\circ\text{C}$  (figura 22).

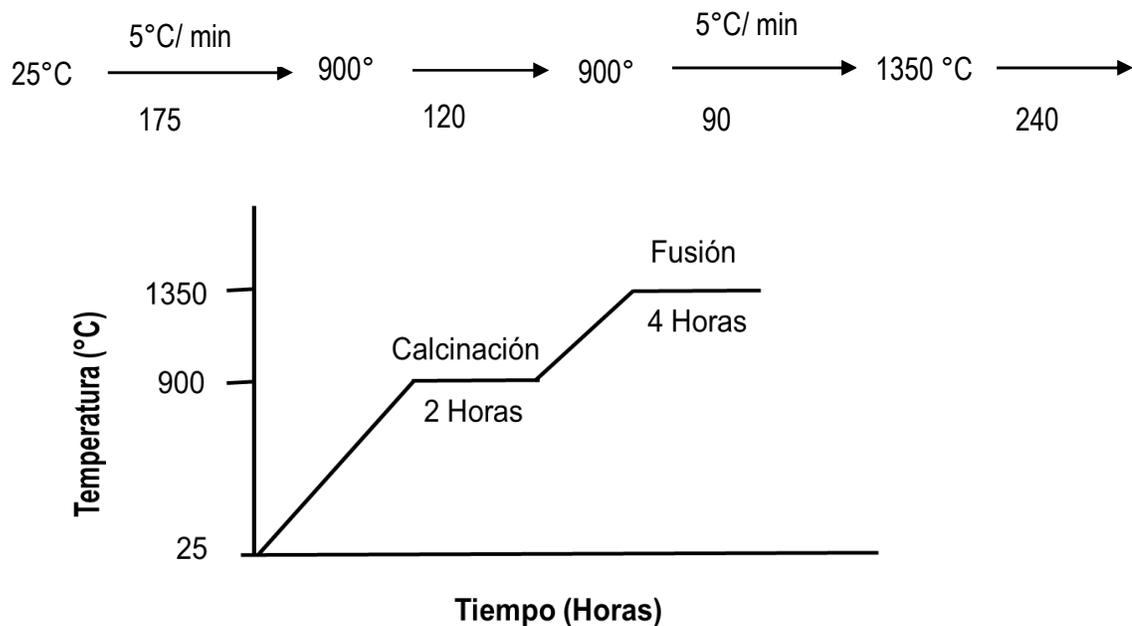


Figura 22. Metodología Síntesis Biovidrio vía Fusión (BGF).

Para conformar el material amorfo, se vierte el material fundido en agua destilada a temperatura ambiente para conformar una frita. Luego la frita se conformará en polvo mediante un proceso de molienda.

### 2.1.2.3 Auto Combustión

Los biovidrios fueron sintetizados vía autocombustión en solución (BGA) utilizando como fuentes primarias nitrato de calcio tetrahidratado  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  (Merck), trietil fosfato (TEP)  $\text{C}_6\text{H}_{15}\text{O}_4\text{P}$  (Merck), tetraetil ortosilicato  $\text{SiC}_8\text{H}_{20}\text{O}_4$  (TEOS) como fuentes de calcio, fósforo y silicio respectivamente, glicina  $\text{C}_2\text{H}_5\text{NO}_2$  (Merck) como combustible, y ácido nítrico  $\text{HNO}_3$  al 65% (Biochemical),  $\text{H}_3\text{BO}_3$  ácido bórico como precursor de Boro (B). Experimentalmente el  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  fue mezclado con 20 ml de agua destilada bajo agitación constante a 400 rpm hasta su disolución, luego fue agregado el  $\text{C}_6\text{H}_{15}\text{O}_4\text{P}$ , teniendo en cuenta la relación estequiométrica oxidante-combustible ( $\varphi=1$ ), son agregados 10 ml de  $\text{HNO}_3$ , posteriormente es agregada la glicina, el  $\text{SiC}_8\text{H}_{20}\text{O}_4$  y  $\text{H}_3\text{BO}_3$ , durante el proceso de síntesis la solución permaneció en agitación y calentamiento a una temperatura de 70 °C durante 1 hora hasta la completa evaporación del solvente y la formación de la resina, una vez formada la resina es aumentada la temperatura a 140°C hasta la combustión. Las cenizas formadas fueron llevadas a tratamiento térmico a 800°C/2h. Los polvos obtenidos fueron molidos en un molino de bolas Retsch PM100 durante 30 minutos en intervalos de 6 minutos a 310 rpm a continuación los polvos fueron tamizados en tamiz malla 635 obteniendo de esta manera los polvos finos y los polvos gruesos del Biovidrio.

## 2.2 Caracterización Material Cerámico

### 2.2.1 Difracción de Rayos X (DRX)

La formación de las partículas de biovidrio y fosfatos de calcio fueron caracterizadas mediante difracción de rayos X en un difractómetro RIGAKU miniflex que opera con radiación  $\text{K}\alpha$  Cu  $\lambda = 1,54056 \text{ \AA}$ , geometría  $2\theta$  y configuración Bragg-Brentano. El análisis de los difractogramas permitió la identificación de los picos más representativos de los materiales utilizados y su carácter amorfo y/o cristalino.

### 2.2.2 Tamaño de partícula

La distribución del tamaño de las partículas fue observada en un zetasizer Nano ZS de Malvern, a través de dispersión de luz dinámica, la cual detecta la velocidad de difusión de las partículas mediante la irradiación de la muestra con un láser.

### 2.2.3 Espectroscopia Infrarroja con Transformada de Fourier (FTIR)

La identificación de los grupos funcionales presentes en el biovidrio de boro, fosfato de calcio fueron determinados mediante Espectroscopia infrarroja con Transformada de Fourier Infrarroja de Reflectancia Difusa (DRIFT, equipo Shimadzu IRTracer-100), con un número de barridos de 16, una resolución  $4\text{ cm}^{-1}$  y un rango de números de onda de  $4000\text{-}400\text{ cm}^{-1}$ . Para esta caracterización, las muestras se prepararon utilizando 2 mg de muestra molida junto con 150 mg de KBr, hasta conseguir un polvo pasante malla 400, con el cual se conformó una pastilla mediante prensado a 10 toneladas-fuerza.

### 2.2.4 Degradabilidad

Con el fin de identificar la técnica que brindar mayor degradabilidad para la formulación de la pasta cerámica, se evaluó la degradabilidad del Biovidrio de boro, el fosfato de calcio para cada una de las técnicas de síntesis utilizadas siguiendo la norma ISO 10993: **“Biological evaluation of biomedical devices – Part 14: Identification and quantification of degradation products from ceramics”** [2].

La prueba consistió principalmente en 2 ensayos a  $(37\pm 1)\text{ }^{\circ}\text{C}$  en un shaker (Thermo Fisher Scientific) con movimiento circular continuo a una velocidad de 2Hz. El primero fue evaluado a condiciones extremas de pH ( $\text{pH}\approx 3\pm 0,2$ ) basado en una solución buffer de ácido cítrico. Un valor de  $\text{pH}\approx 3$  es definido como el peor de los ambientes para cualquier dispositivo médico. El segundo ensayo constó de una solución de simulación basada en un buffer TRIS-HCL a  $\text{pH}\approx 7,4 \pm 0,1$  el cual simula el pH normal del cuerpo humano [2]. Los polvos cerámicos del biovidrio de boro y del fosfato de calcio fueron evaluados a 0, 7, 14, 21, 30 y 120 horas para el ensayo 1. En el ensayo 2, solo aquella técnica que evidenciara mayor degradabilidad a 120 horas fue evaluada en TRIS – HCL. Posteriormente, las muestras fueron lavadas con agua desionizada y filtradas en bomba

de vacío, previamente fueron secadas a 95°C por espacio de 48 horas. La morfología de la superficie de los polvos y las fases apatíticas fueron analizadas por microscopía electrónica de barrido (SEM), los picos característicos de las fases apatíticas pudieron evidenciarse por espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier (FTIR).

Los cambios de peso fueron medidos en una balanza analítica marca ADAM modelo aaa160L, dichas medidas fueron tomadas al inicio y al final de la prueba. Ambos ensayos se realizaron por triplicado. La degradabilidad fue expresada como:

$$\%D = \left( \frac{w_i - w_f}{w_i} \right) \times 100 \quad \text{Ecn (2)}$$

Donde D es el porcentaje de degradabilidad o pérdida de peso (%D),  $W_i$  es el peso inicial de la muestra seca (g) y  $W_f$  es el peso final de la muestra para cada tiempo de inmersión.

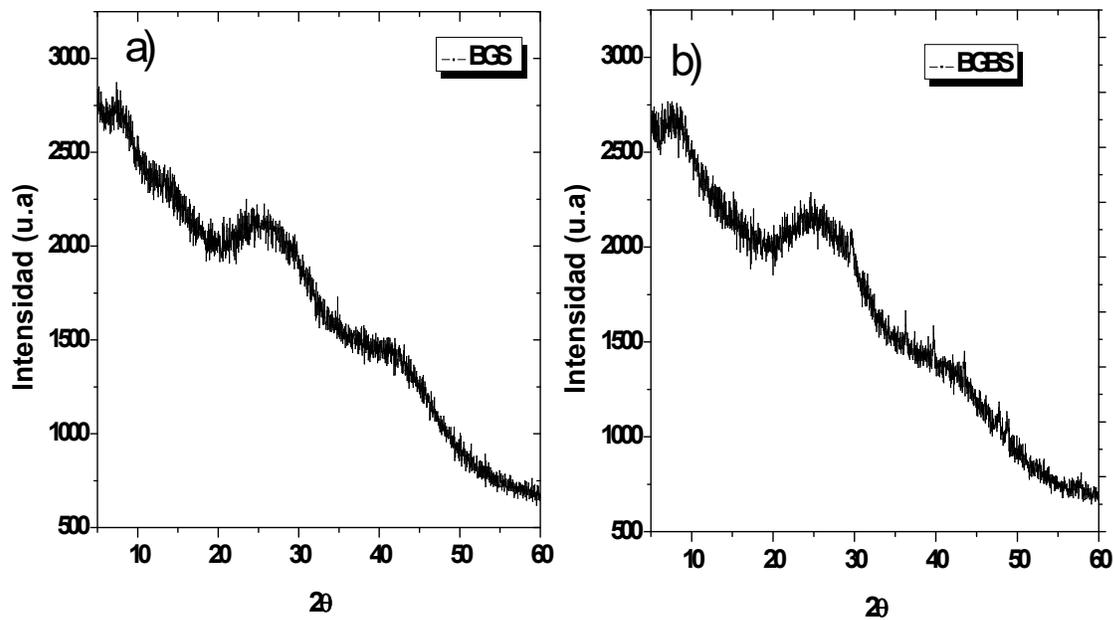
Teniendo en cuenta que uno de los objetivos de esta investigación fue el desarrollo de un material cerámico el cual contará con una variable que determinan los mejores resultados para aplicaciones en regeneración ósea, uno de los parámetros a tener en cuenta es la degradabilidad de dicho material cuando entra en contacto con un ambiente biológico. A partir de allí, se obtuvo la relación molar de los compuestos y el método de síntesis que exhibieran mayor biodegradabilidad.

## 2.3 Resultados y Discusión de Resultados

### 2.3.1 Biovidrio (BG)

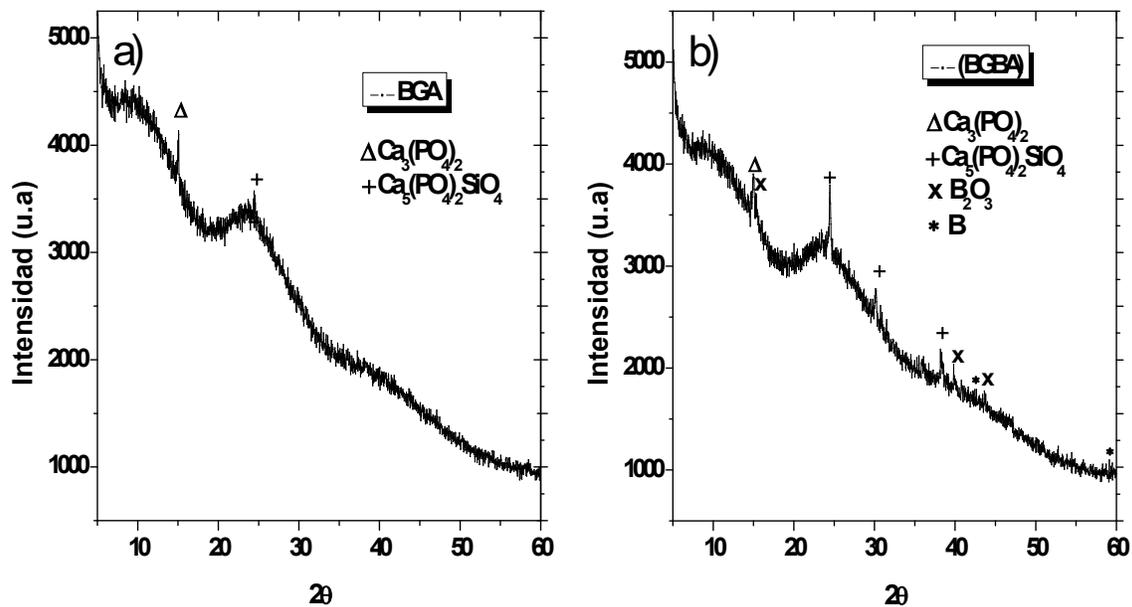
Los Difractogramas de Rayos X de los biovidrios sintetizados vía sol-gel (BGS y BGBS), autocombustión (BGA y BGBA) y fusión (BGF y BGBF) dopados con boro y sin dopar, se muestran en las figuras 23, 24 y 25 respectivamente. Los vidrios se caracterizan principalmente por ser compuestos no cristalinos o amorfos, en los cuales no existe un ordenamiento estructural a largo alcance, esto se encuentra asociado con la ausencia de picos de difracción. Por lo tanto, se esperaba que los difractogramas de los vidrios bioactivos obtenidos reflejaran su naturaleza amorfa. Sin embargo; estas características de los vidrios solo fueron evidencia en los materiales sintetizados vía sol-gel. En la figura 23, claramente se evidencia la naturaleza amorfa del biovidrio obtenido por sol-gel en ausencia de boro (BGS) y presencia de boro (BGBS), los cuales tienen una banda ancha

alrededor de  $22.9^{\circ}$ - $25.0^{\circ}$  típica de materiales de carácter amorfo a base de sílice [3]. Sin embargo, en los difractogramas del biovidrio obtenido por autocombustión y fusión se evidencian algunas fases cristalinas, asociadas al boro del dopaje que permiten afirmar que estas dos técnicas permitieron obtener un material semicristalino (vitrocerámico) donde coexisten fases amorfas y cristalinas.



**Figura 23.** Difractograma Biovidrio obtenido por Sol-Gel: a) sin Boro (BGS), b) con Boro (BGBS).

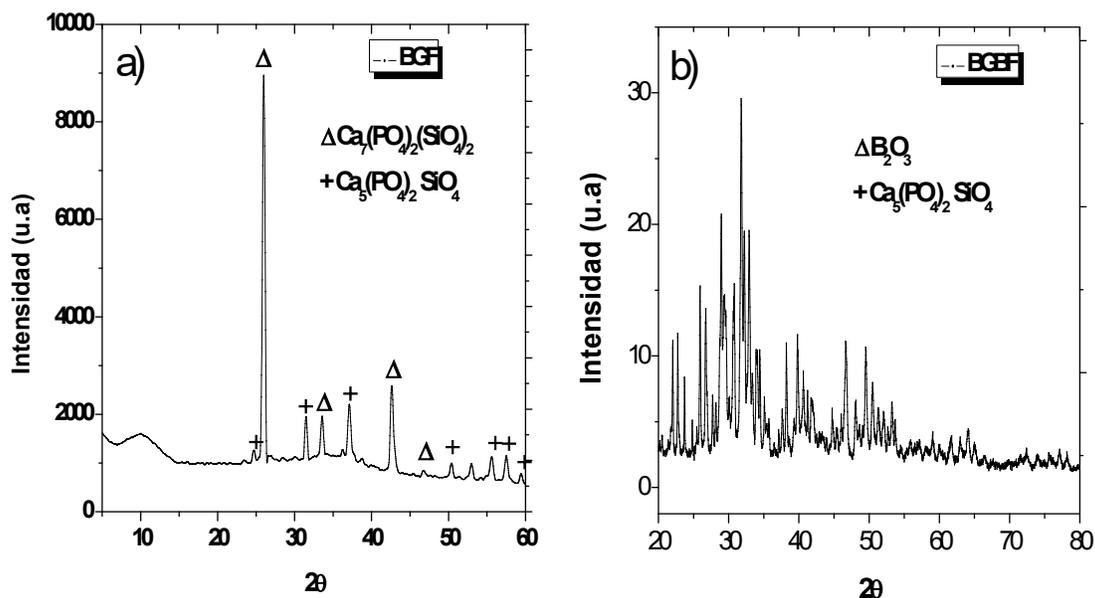
Las fases cristalinas del biovidrio obtenido por autocombustión (BGA) (figura 24, (a)) corresponden principalmente a fosfatos de calcio (JCPDS 01-070-0364  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ) y silicatos de fosfatos de calcio (JCPDS 01-073-1181; JCPDS 01-021-0157  $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_2\text{SiO}_4$ ), para el biovidrio dopado con boro (BGBA) (figura 24, (b)) son evidentes los picos asociados a dicho elemento (óxido de boro ( $\text{B}_2\text{O}_3$ ) (JCPDS 00-006-0297) y boro (B)(JCPDS (00-012-0377)).



**Figura 24.** Difractograma Biovidrio obtenido por Autocombustión: a) Sin Boro (BGA), b) con Boro (BGBA).

En la figura 25, se observa el difractograma del biovidrio obtenido por fusión sin boro (BGF) y con dopaje de boro (BGBF) respectivamente. El difractograma del biovidrio BGF (figura 25 (a)) mostró un material cristalino con picos asociados a silicatos de fosfatos de calcio (JCPDS 00-005-0646 y 00-011-0676  $\text{Ca}_7(\text{PO}_4)_2(\text{SiO}_4)_2$ ; 00-040-0393  $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_2\text{SiO}_4$ ), mientras que el biovidrio dopado con boro (BGBF) (figura 25 (b)) hacen presencia picos asociados al boro presente (óxido de boro ( $\text{B}_2\text{O}_3$ ) (JCPDS 00-006-0297)).

Como se había explicado previamente, se hizo evidente la obtención de un material con mayor cristalinidad por la técnica de fusión que por las técnicas de sol-gel y autocombustión con las cuales se obtuvieron materiales vitrocerámicos. Generalmente los vidrios obtenidos por sol-gel utilizan precursores que se encuentran en capacidad de formar materiales amorfos actuando a bajas temperaturas comparadas con otras técnicas. En particular, la cristalización de un vidrio a temperaturas inferiores a  $600^\circ\text{C}$  no es viable, a temperaturas superiores a  $600^\circ\text{C}$  son obtenidos materiales cristalinos y/o vitrocerámicos, en especial estos últimos; son formados a partir de vidrios a los que se les aplica un tratamiento térmico que permite la nucleación y posterior cristalización [4], [5], tal como ocurrió en el caso del vidrio obtenido por fusión donde se alcanzaron temperaturas de  $1350^\circ\text{C}$ .

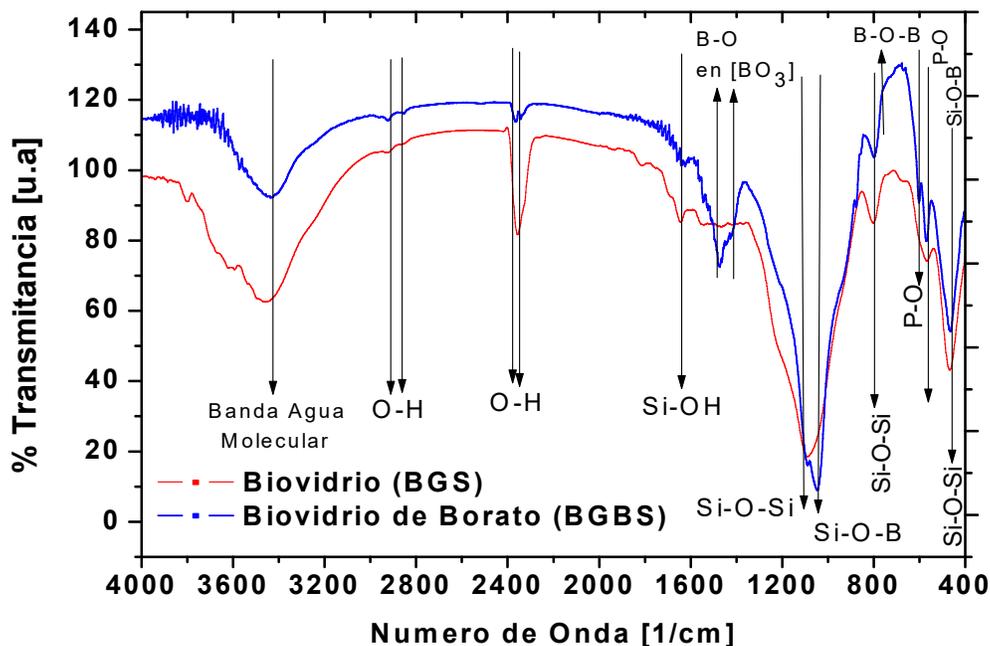


**Figura 25.** Difractograma Biovidrio obtenido por Fusión; a) Sin boro (BGF), b) Con boro (BGBF).

A pesar de que la formulación química del material juega un papel muy importante, no debe descartarse la influencia que tienen los tratamientos térmicos en la cristalinidad del biovidrio [3], [4]. Sin duda alguna, la técnica sol-gel permitió obtener un biovidrio totalmente amorfo sin ninguna impureza comparada con las otras técnicas de síntesis y esto es gracias a que sol-gel es una ruta que permite trabajar inicialmente a bajas temperaturas y luego estabilizar el vidrio a temperaturas entre  $600^\circ\text{C}$  y  $700^\circ\text{C}$ , además de esto proporciona mezclas homogéneas en la composición final del vidrio, el tamaño y la morfología pueden ser manipulados a través de la variación de las condiciones de reacción.

La Figura 26, muestra los espectros infrarrojos de los biovidrios obtenidos por sol-gel BGS y BGBS en número de onda entre  $4000\text{ cm}^{-1}$  y  $400\text{ cm}^{-1}$ . Para BGS se aprecian bandas de absorción ubicadas entre  $3000\text{ cm}^{-1}$  y  $3800\text{ cm}^{-1}$  asociadas a las vibraciones de diferentes grupos hidroxilo [6]: la banda en  $3807,48\text{ cm}^{-1}$ , se encuentra asociada a una superposición de modos de estiramiento de un silanol no enlazado con hidrógeno (silanoles aislados) [6], a  $3608,81\text{ cm}^{-1}$ , asociada a un silanol enlazado con hidrógeno (silanoles adyacentes y/o germinales), la banda ancha en  $3448,72\text{ cm}^{-1}$  corresponde al enlace O-H en moléculas de agua absorbida. Bandas ubicadas en  $2912,48\text{ cm}^{-1}$  y

2872,50  $\text{cm}^{-1}$  correspondientes a enlaces de Hidrogeno, 2365,52  $\text{cm}^{-1}$  y 2341,53  $\text{cm}^{-1}$  a enlaces del grupo OH [7], [8]. También se aprecian bandas asociadas a los modos de vibración de Si-O-Si [6], [7], [9]–[11]: en 1089,23  $\text{cm}^{-1}$  estiramiento asimétrico Si-O-Si, la banda pequeña en 1625,56  $\text{cm}^{-1}$  se debe a estiramientos del grupo OH del silanol (Si-OH), en 801,40  $\text{cm}^{-1}$  estiramientos de O-Si-O, en 467,19  $\text{cm}^{-1}$  flexión simétrica de Si-O-Si. Generalmente, las bandas de absorción en regiones de 900  $\text{cm}^{-1}$  a 1200  $\text{cm}^{-1}$  pueden ser asignados a estiramientos Si-O-Si y/o P-O, lo que implica que algunas bandas del IR sean superpuestas [11]. Las bandas características de los grupos fosfatos ( $\text{PO}_4$ )<sup>3-</sup> ubicadas a 467,19  $\text{cm}^{-1}$  [12], 568,6  $\text{cm}^{-1}$  y 1089,23  $\text{cm}^{-1}$ . Como el boro es un elemento formador de vidrio bastante liviano, es de esperarse que las unidades formadoras de boro ( $\text{BO}_3$  y  $\text{BO}_4$ ) presenten bandas características dentro del rango 1550 a 500  $\text{cm}^{-1}$  [13]. El espectro de BGBS (b) pueden identificarse tres regiones de absorción asociadas al  $\text{B}_2\text{O}_3$ : la primera región se encuentra comprendida entre 1800  $\text{cm}^{-1}$  y 1200  $\text{cm}^{-1}$ , en 1549,88  $\text{cm}^{-1}$  se encuentra un pico asociado al estiramiento B-O de las unidades trigonales [ $\text{BO}_3$ ], 1474,72  $\text{cm}^{-1}$  estiramiento asimétrico de unidades [ $\text{BO}_3$ ]. La segunda región está comprendida entre 1200  $\text{cm}^{-1}$  y 700  $\text{cm}^{-1}$ , en 879,78  $\text{cm}^{-1}$  se encuentra un pico asociado al estiramiento B-O de las unidades tetraédricas [ $\text{BO}_4$ ]. Bandas en 879,78  $\text{cm}^{-1}$  y 1049,31  $\text{cm}^{-1}$  estiramiento de las vibraciones del enlace B – O – Si. Estos cambios estructurales y físicos que se producen en la red de vidrio pueden ser influyentes en la disolución y degradación del vidrio [14]. En 798,92  $\text{cm}^{-1}$  estiramiento O-Si-O y una región de aproximadamente 705,46  $\text{cm}^{-1}$  para la flexión de los enlaces B-O-B de la red de boro [8], [14]–[17]. La última región se encuentra comprendida entre 700 y 400  $\text{cm}^{-1}$  donde, la presencia de picos a 468,76  $\text{cm}^{-1}$  y 569,52  $\text{cm}^{-1}$  representa enlaces Si-O-B que confirman la presencia de unidades de silicio en la red de boro [8], [16], [18]. Se atribuye la banda ancha a 3448,72  $\text{cm}^{-1}$  y fina a 1625,05  $\text{cm}^{-1}$  a los modos vibratorios de estiramiento y flexión de enlaces O–H de las moléculas de agua y estiramiento Si-OH de silanoles superficiales respectivamente [7], [10], [17].



**Figura 26.** Espectro Infrarrojo Biovidrio: a) Sin Boro, b) con Boro.

La asignación de bandas infrarrojas en el espectro de biovidrio se encuentra recopilada en la tabla 15.

**Tabla 15.** Asignación de Bandas Infrarrojas en el espectro de los biovidrios.

BGS	BGBS	Asignaciones IR
<b>Posición (cm<sup>-1</sup>)</b>		
3807,48	N.A	Silanoles aislados
3608,81	N.A	Silanoles adyacentes y/o germinales
3448,72	3448,72	Enlace O-H en moléculas de agua absorbida
2912,48 y 2872,50	2912,48 y 2872,50	Enlaces de Hidrogeno de grupos Hidroxilo
2365,52 y 2341,53	2365,52 y 2341,53	Enlaces del grupo OH
1625,56	1625,05	Estiramientos de O-H del grupo silanol (Si-OH)
N. A	1549,88	Estiramiento B-O de las unidades trigonales [BO <sub>3</sub> ]
N.A	1474,72	Estiramiento asimétrico de unidades [BO <sub>3</sub> ]
N.A	1421,94	Vibraciones de estiramiento del enlace B-O

1089,23	1100,48	Estiramiento asimétrico Si-O-Si Estiramientos asimétricos grupos fosfato (PO <sub>4</sub> ) <sup>-3</sup>
N.A	1049,31	Estiramiento de las vibraciones del enlace B – O – Si.
N.A	879,78	Estiramiento de las vibraciones del enlace B – O – Si Estiramiento enlace B-O de [BO <sub>4</sub> ]
801,40	798,92	Estiramientos de O- Si -O
N.A	705,46	Flexión de los enlaces B-O-B de la red de boro
568,6	604,70	Flexión asimétrica de grupos fosfato (PO <sub>4</sub> ) <sup>3-</sup>
N.A	569,52	Enlaces Si-O-B
467,19 N.A para enlace Si-O-B	468,76	Enlaces Si-O-B Flexión simétrica de Si-O-Si P-O del grupo fosfato (PO <sub>4</sub> ) <sup>3-</sup>

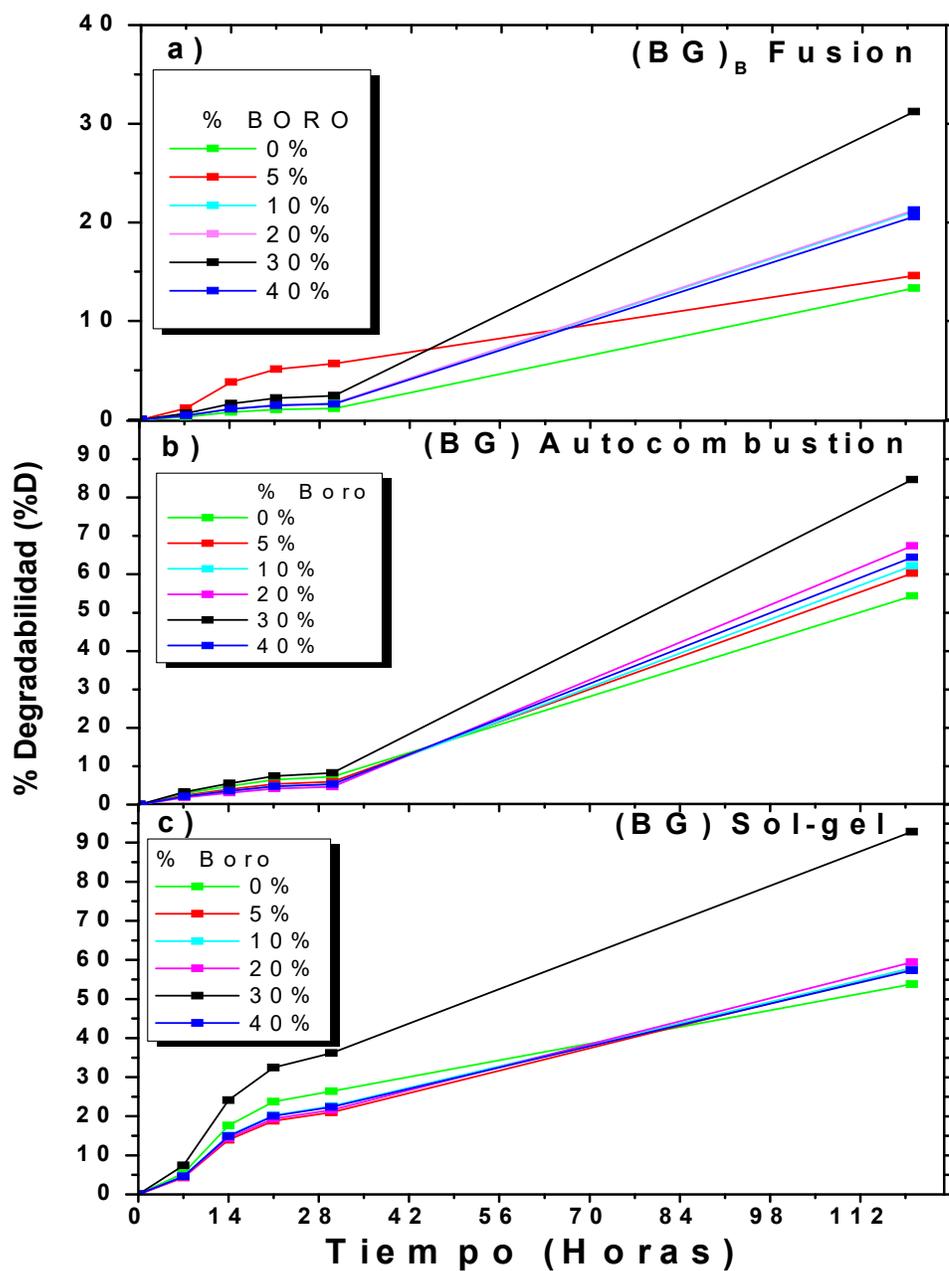
La degradabilidad de los polvos fue determinada para cada método de síntesis, teniendo un dopaje con Boro (%w) que varía de 0% a 40 %w. Los análisis de los datos permitieron corroborar la influencia que tenía el boro sobre la degradabilidad del material, así como la técnica de síntesis que evidenciaba una mejor degradabilidad. Al someter los polvos cerámicos de biovidrio a soluciones extremas de pH, es evidente la rapidez de degradación, lo cual puede estar relacionado con las transferencias de cargas químicas que conllevan a una desintegración de polvos cerámicos.

En la tabla 16, se muestra la degradabilidad del biovidrio obtenido por diferentes métodos de síntesis inmersos en una solución extrema. Para el biovidrio, el método de síntesis de fusión evidenció la menor degradabilidad con un %D de 13,329 en ausencia de boro, mientras que el método de sol-gel evidenció mayor degradabilidad en solución extrema con un %D de 92,877 cuando se dopa con un 30%w de boro. Generalmente, los biovidrios de boro presentan una menor durabilidad química y una mayor velocidad de degradación comparada con biovidrios de sílice [14], [19], la pérdida de peso aumenta a medida que el contenido de boro es aumentado, éste comportamiento se evidenció hasta que se dopaba con un 30%w en boro independiente del método que se está utilizando para la síntesis y del material sintetizado, valores superiores generan una disminución en la degradabilidad.

**Tabla 16.** Degradabilidad polvos cerámicos Biovidrios en solución extrema bajo la norma ISO 10993.

Boro (%w) Método de Síntesis	0	5	10	20	30	40
	Degradabilidad (%D)					
<b>Sol-Gel</b>	47,813	53,860	57,956	59,462	92,877	57,419
<b>Autocombustión</b>	54,335	60,231	62,201	67,373	84,673	64,408
<b>Fusión</b>	13,329	14,587	21,100	21,237	31,220	20,570

La figura 27, muestra la pérdida de peso de los polvos cerámicos cuando se encuentran inmersos en una solución extrema a medida que transcurre el tiempo. En la figura 27 (a y b), la tendencia de degradación de los biovidrios obtenidos por fusión y autocombustión son ascendentes y muy similares, los biovidrios en un tiempo de 0 a 30 horas presentan una degradación entre 1,13% y 5,68% por el método de fusión, de 4,61% y 8,25% alcanzando un máximo de degradación (120 horas) por el método de fusión de 31,22% y autocombustión de 84,67%. Aunque la tendencia que presenta el método sol-gel con respecto a la degradabilidad sigue siendo de manera ascendente, (figura 27 (c)) se hace evidente que el material cerámico obtenido por este método es más degradable que el de fusión y autocombustión, en un tiempo de 0 a 30 horas presentan una degradación entre 4,30% y 36,22% y un máximo de degradación 92,87% en un tiempo de 120 horas. En general, independiente del método de síntesis se evidenció una tendencia a aumentar la degradación del material cerámico siempre y cuando no se supere el 30%w de boro. Durante la inmersión en solución extrema de los polvos de biovidrio, se evidenció una tendencia a la disolución de manera ascendente, esta disolución fue independiente del método de síntesis, pero dependiente de la cantidad de boro incluida en el biovidrio. Teniendo en cuenta que el biovidrio obtenido por Sol-gel dopado con boro al 30%w (BGBS) fue el polvo cerámico que evidenció la mayor degradabilidad, se procedió a realizar el segundo ensayo de la prueba y fue sumergido en buffer TRIS-HCL con el fin de simular el pH del cuerpo humano.



**Figura 27.** Degradabilidad polvos Biovidrio evaluados en solución extrema: a) Fusión; b) Autocombustión; c) Sol-gel.

La figura 28, muestra los espectros infrarrojos del biovidrio con 30%w de boro y las fases apatíticas presentes cuando es inmerso en un buffer TRIS-HCL en un tiempo de 120 horas. En la figura 28 (a), pueden observarse las bandas principales correspondientes a las vibraciones de los grupos principales de la Hidroxiapatita [20]–[22]. Esta figura es asociada a los grupos apatíticos formados durante la inmersión del biovidrio. En 3572,98

$\text{cm}^{-1}$ , se aprecia una banda fina correspondiente a la vibración del grupo hidroxilo ( $\text{OH}^-$  estructural) y su respectivo doblaje fuera del plano ( $\rho$ ) alrededor de  $631,18 \text{ cm}^{-1}$  [21], algunos autores hacen referencia a que estas 2 bandas son generadas por HA cristalina [23]. En  $3432,25 \text{ cm}^{-1}$ , se observa la vibración del grupo hidroxilo ( $\text{OH}^-$ ) correspondiente al agua remante. Las bandas asignadas enlaces de hidrógeno asociadas a modos vibracionales de grupos hidroxilos son  $2850,11 \text{ cm}^{-1}$ ,  $2931,67 \text{ cm}^{-1}$  y  $3572,98 \text{ cm}^{-1}$  [20]. Las bandas a  $878,18 \text{ cm}^{-1}$ ,  $1423,54 \text{ cm}^{-1}$  y  $1461,62 \text{ cm}^{-1}$  son atribuidas a los grupos carbonato ( $\text{CO}_3$ )<sup>2-</sup> indicativo de una precipitación de HA, la presencia de los grupos carbonato muestra la naturaleza cristalina de HA y estas bandas son atribuidas a la formación de una capa de HA [24], [25]. La banda en  $1637,84 \text{ cm}^{-1}$  es atribuida al cambio en el ángulo de enlace del hidrógeno en aguas cristalizadas [26]. Grupos fosfato presentan bandas a  $569,52 \text{ cm}^{-1}$ ,  $603,10 \text{ cm}^{-1}$ ,  $964,74 \text{ cm}^{-1}$ ,  $1044,51 \text{ cm}^{-1}$  y  $1092,49 \text{ cm}^{-1}$  correspondientes al modo vibracional del enlace O-P-O, flexión asimétrica y estiramiento del enlace O-P-O respectivamente [23]. En  $3432,25 \text{ cm}^{-1}$ , se observa la vibración del grupo hidroxilo ( $\text{OH}^-$ ) correspondiente al agua remante. Las bandas asignadas de enlaces de hidrógeno están asociadas a modos vibracionales de grupos hidroxilos son  $2850,11 \text{ cm}^{-1}$ ,  $2931,67 \text{ cm}^{-1}$  y  $3572,98 \text{ cm}^{-1}$  [20]. Las bandas a  $878,18 \text{ cm}^{-1}$ ,  $1423,54 \text{ cm}^{-1}$  y  $1461,62 \text{ cm}^{-1}$  son atribuidas a los grupos carbonato ( $\text{CO}_3$ )<sup>2-</sup> indicativo de una precipitación de HA, la presencia de los grupos carbonato muestra la naturaleza cristalina de HA y estas bandas son atribuidas a la formación de una capa de HA [24], [25]. La banda en  $1637,84 \text{ cm}^{-1}$  es atribuida al cambio en el ángulo de enlace del hidrógeno en aguas cristalizadas [26]. Grupos fosfato presentan bandas a  $569,52 \text{ cm}^{-1}$ ,  $603,10 \text{ cm}^{-1}$ ,  $964,74 \text{ cm}^{-1}$ ,  $1044,51 \text{ cm}^{-1}$  y  $1092,49 \text{ cm}^{-1}$  correspondientes al modo vibracional del enlace O-P-O, flexión asimétrica y estiramiento del enlace O-P-O respectivamente [23]. La figura 28 b) y c) muestra el espectro infrarrojo del biovidrio de boro antes y después de la inmersión en TRIS-HCL respectivamente. Para el biovidrio de boro sin inmersión sus bandas características ya fueron explicadas previamente. Cuando es sumergido en el buffer (figura 28 (c)) presenta picos en  $567,92 \text{ cm}^{-1}$  y  $577,52 \text{ cm}^{-1}$  atribuidos principalmente a la precipitación de fosfatos de calcio o hidroxiapatita [27]. La aparición de esta banda es un indicativo de la bioactividad de los biovidrios estudiados. Como explicación de esta señal, responde a la formación de nuevas fases correspondientes a HA tras la inmersión buffer TRIS-HCL, la cual es un indicativo del nivel de bioactividad del material, característica

distintiva de compuestos o vidrios bioactivos. Además de esto; las fase de HA formada es responsables de formar enlaces con el hueso [27].

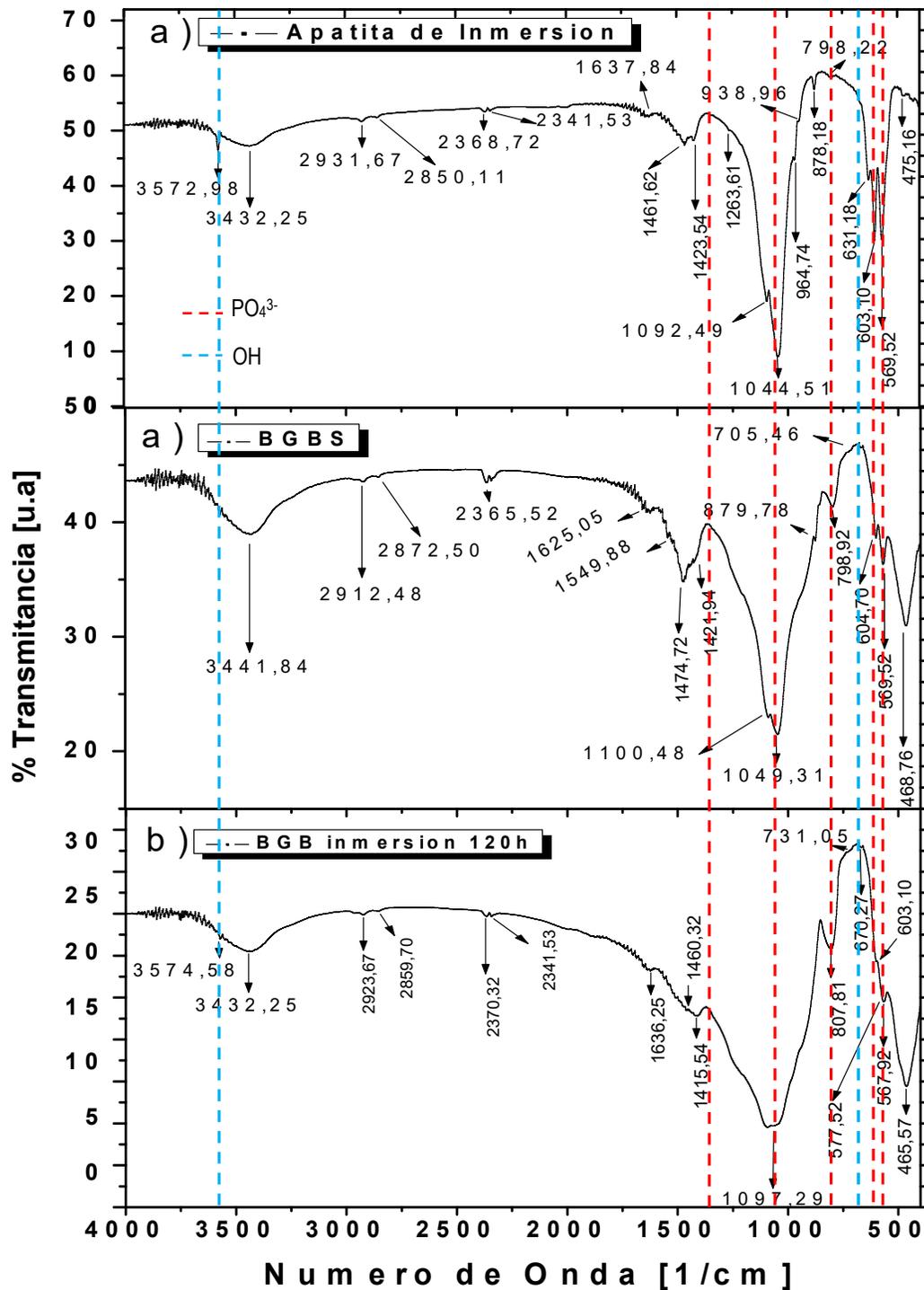


Figura 28. Espectro Infrarrojo de: a) apatitas de inmersión, b) BGBS con 30%w boro c) inmersión en TRIS-HCL a 120 horas.

Durante la inmersión en Tris-HCl, se evidenció un aumento en la intensidad de la banda ubicada a  $465,67\text{ cm}^{-1}$  junto con la presencia de un pico a  $1460,32\text{ cm}^{-1}$  que confirma la formación de fases apatíticas. También se evidenció una disminución de los picos ubicados a  $569,52\text{ cm}^{-1}$ ;  $604, 70\text{ cm}^{-1}$  asociados principalmente a flexiones de grupos fosfato. El fosfato suele ser el factor limitante para la formación de apatita ya que este se agota antes que el calcio, lo que resulta en la formación de otras fases cristalinas [28].

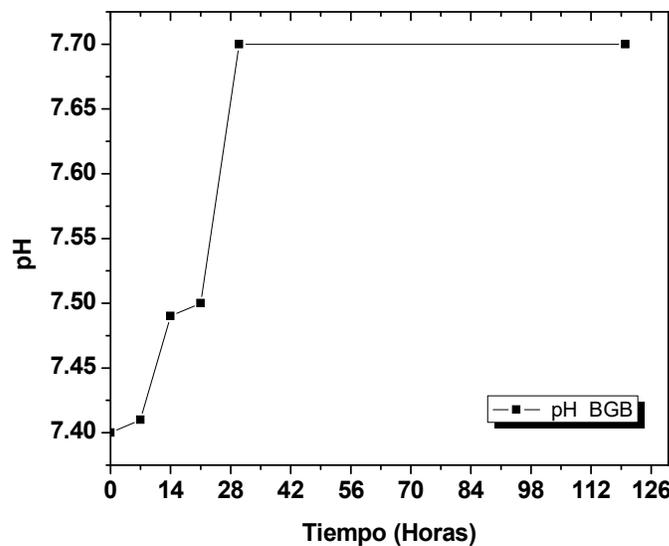
Cada una de las asignaciones de las bandas de vibración se encuentra en la tabla 17.

**Tabla 17.** Asignación de Bandas Infrarrojas en el espectro de biovidrio con 30%w boro.

Biovidrio inmersión 120 horas		Apatitas Formadas	
Posición ( $\text{cm}^{-1}$ )	Asignación IR	Posición ( $\text{cm}^{-1}$ )	Asignación IR
465,67	Enlaces Si-O-B Vibración enlace P-O	475,16	Vibración enlace P-O
567,92	Enlaces Si-O-B Flexión asimétrica de grupos fosfato ( $\text{PO}_4$ ) <sup>3-</sup>	569,52	Flexión asimétrica de grupos O – P – O
577,52	Flexión enlaces O – P – O	603,10	Flexión enlaces O – P – O
603,10	Flexión enlaces O – P – O	631,18	Flexión de grupos OH
670,27	Flexión de los enlaces B-O-B de la red de boro	798,22	Estiramiento C – O
731,05	Estiramientos de O-Si-O y del enlace B-O de $[\text{BO}_4]$	878,18	Estiramiento C – O
807,81	Estiramiento C-O and	964,74	Estiramiento P – O
1097,29	Estiramiento P-O		
1415,54	Estiramiento asimétrico C-O		
1460,32	Estiramiento C-O		
1636,25	Enlace del hidrógeno en $\text{H}_2\text{O}$ cristalizadas		
2341,53	Enlaces del grupo OH	1423,54	Estiramiento asimétrico C – O
2370,32	Enlaces del grupo OH	1461,62	Estiramiento C – O
2859,70	Vibraciones del enlace de Hidrogeno en grupos OH	1637,84	Enlace del hidrógeno en $\text{H}_2\text{O}$ cristalizadas
2923,67	Vibraciones de Hidrógeno en grupos OH	2341,53	Enlaces del grupo OH
3432,25	Enlace O-H en moléculas de	2368,72	Enlaces del grupo OH

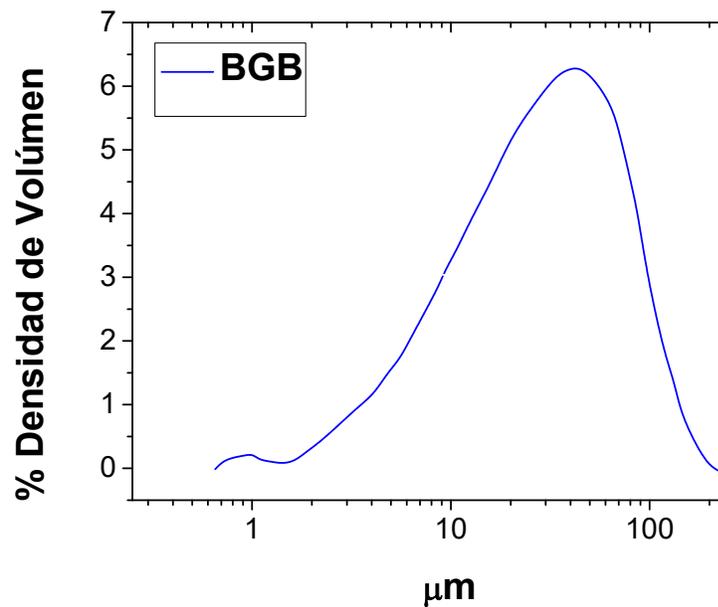
	agua absorbida		
3574,58	Estiramiento de grupos OH	2850,11	Vibraciones H de grupos OH
		2931,67	Vibraciones H de grupos OH
		3432,25	Estiramiento OH agua remanente
		3572,98	Estiramiento de grupos OH

La figura 29, muestra la evolución del pH del biovidrio inmerso en el buffer Tris-HCl. Se evidenció una tendencia ascendente del pH hasta llegar a su estabilización en aproximadamente 7,70, el mayor aumento fue observado a 30 horas de inmersión con un valor pH ≈7,7 que se mantuvo constante hasta las 120 horas. Se obtuvieron medidas de pH de 7,41; 7,49; 7,5 para un tiempo de 7, 14, 21 horas respectivamente.



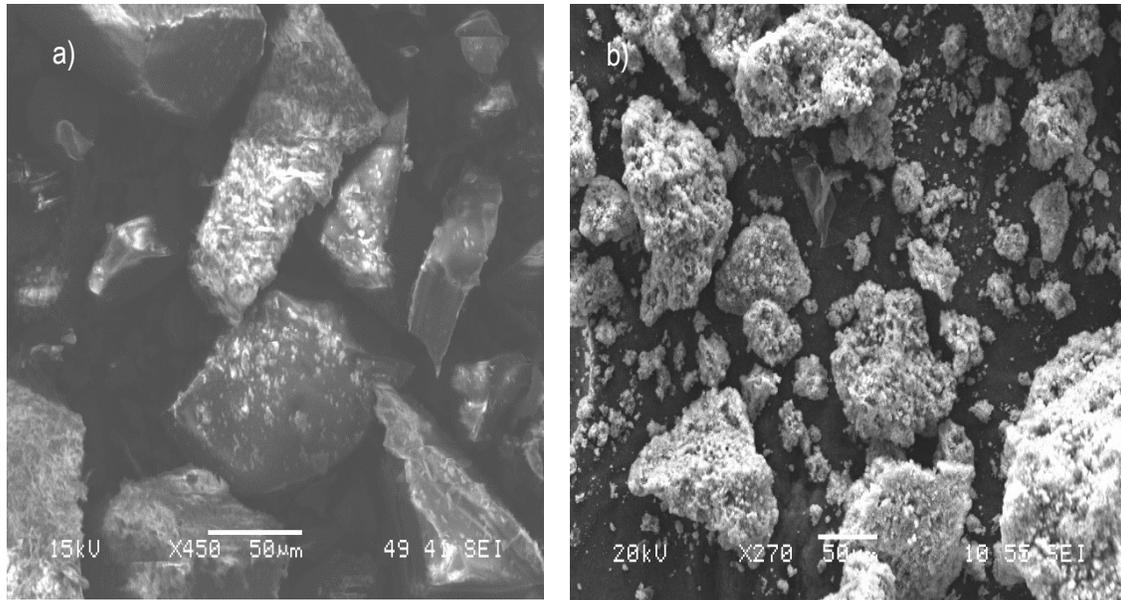
**Figura 29.** Evolución pH del Biovidrio de boro *inmerso en el buffer Tris-HCl.*

La figura 30, muestra el diagrama de distribución del tamaño de partícula de partículas de biovidrio de boro. En el diagrama, se muestran que las partículas del BG<sub>B</sub> presentan tamaños que oscilan entre 2,90 μm y 133 μm, más del 60% de las partículas tenían un tamaño entre 27,9 μm y 106 μm.



**Figura 30.** Diagrama de distribución del tamaño de partícula de partículas de Biovidrio de boro.

Las fotomicrografías fueron obtenidas por Microscopía Electrónica de Barrido (SEM) para el biovidrio sin inmersión y con inmersión en el buffer TRIS-HCL (Figura 31). Puede observarse que el tamaño de las partículas de biovidrio no es tan homogéneo, evidenciando grandes diferencias de tamaños. También se evidencian morfologías irregulares. Aunque se evidencian tamaños de partícula superiores a las 50  $\mu\text{m}$  observados a 450 aumentos, algunos granos están formados por aglomeraciones y presentan agregados debidos principalmente a partículas que parecen encontrarse en rangos submicrométricos.

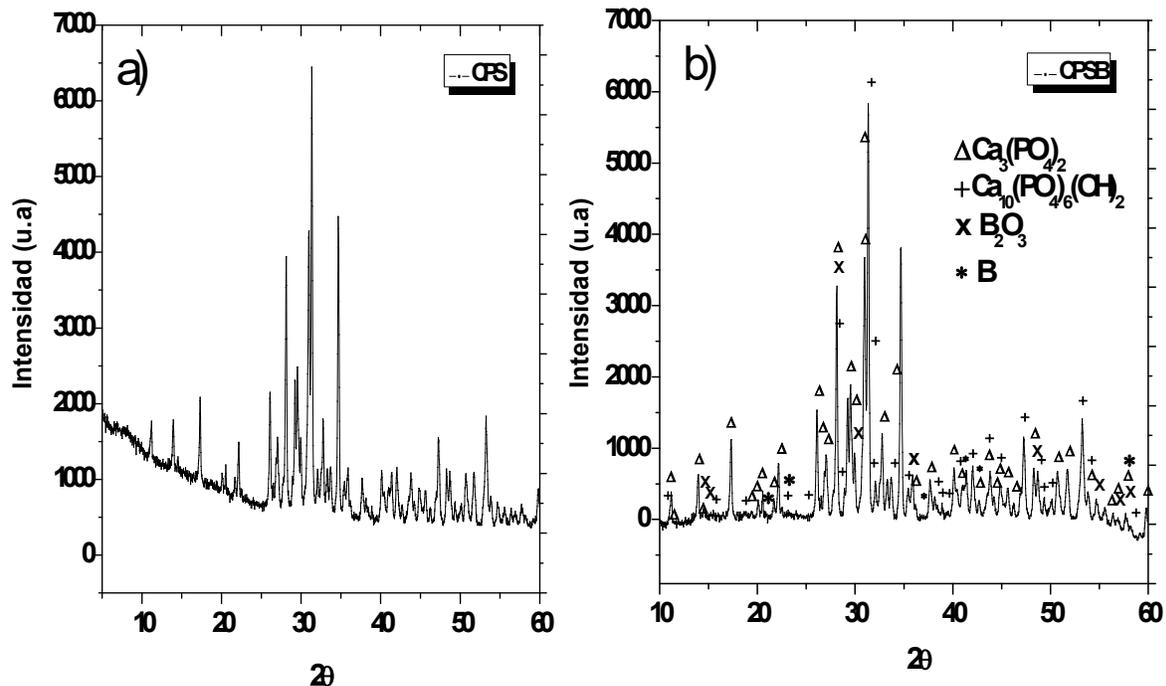


**Figura 31.** Fotomicrografías de Microscopía Electrónica de Barrido (SEM) de biovidrio: a) BGBS, b) BGBS inmerso en TRIS-HCL a 120 horas.

Cuando el biovidrio es inmerso en TRIS-HCL (Figura 31 (b)), es evidente que la superficie del biovidrio es cubierta de partículas que precipitan y forman aglomeraciones. Estas aglomeraciones corresponden a una capa apatítica (tal como se confirmó por FTIR) que presentan tamaños de partícula que pueden estar en rangos submicrométricos.

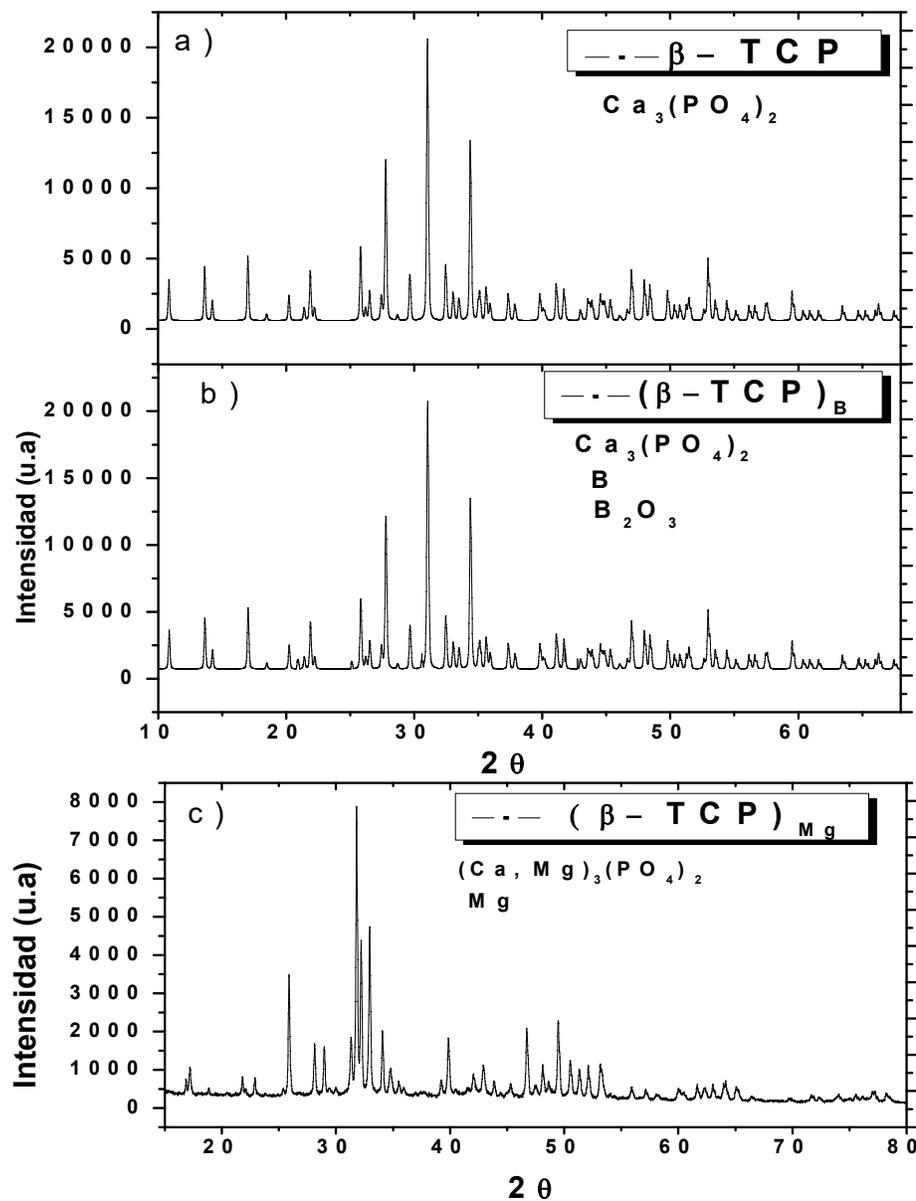
### 2.3.2 Fosfatos de Calcio ( $\beta$ -TCP)

Los Difractogramas de Rayos X de los fosfatos de calcio sintetizados vía sol-gel (CPS), autocombustión ( $\beta$ -TCP) e hidrotermal (CPH) se muestran en la figura 32, 33 y 34 respectivamente. En la Figura 32 (a) se presenta el Difractograma del fosfato de calcio obtenido por sol-gel, en el cual se evidencia la formación de dos fases mayoritarias: el fosfato de calcio fase  $\beta$  ( $\beta$ -TCP o Whitlockita) que indexa en el patrón JCPDS 00-009-0169 y la hidroxiapatita (HA) (JCPDS 00-09-0432 y 01-074-0566). Por su parte, el fosfato de calcio dopado con boro (CPSB) (Figura 32 (b)) evidenció picos adicionales a los mencionados anteriormente, asociados a óxido de boro ( $B_2O_3$ ) (JCPDS 00-006-0297) picos a  $2\theta$ : 14,4826; 14,5662; 27,6933; 35,9321; 48,2620; 54,6599; 57,1081; 57,6750 y con boro (B) (JCPDS (00-012-0377) picos a  $2\theta$ : 20,9802; 25,0530; 25,2465; 35,3117; 36,2963; 41,3754; 42,6446; 42,7316 y 56,4041.



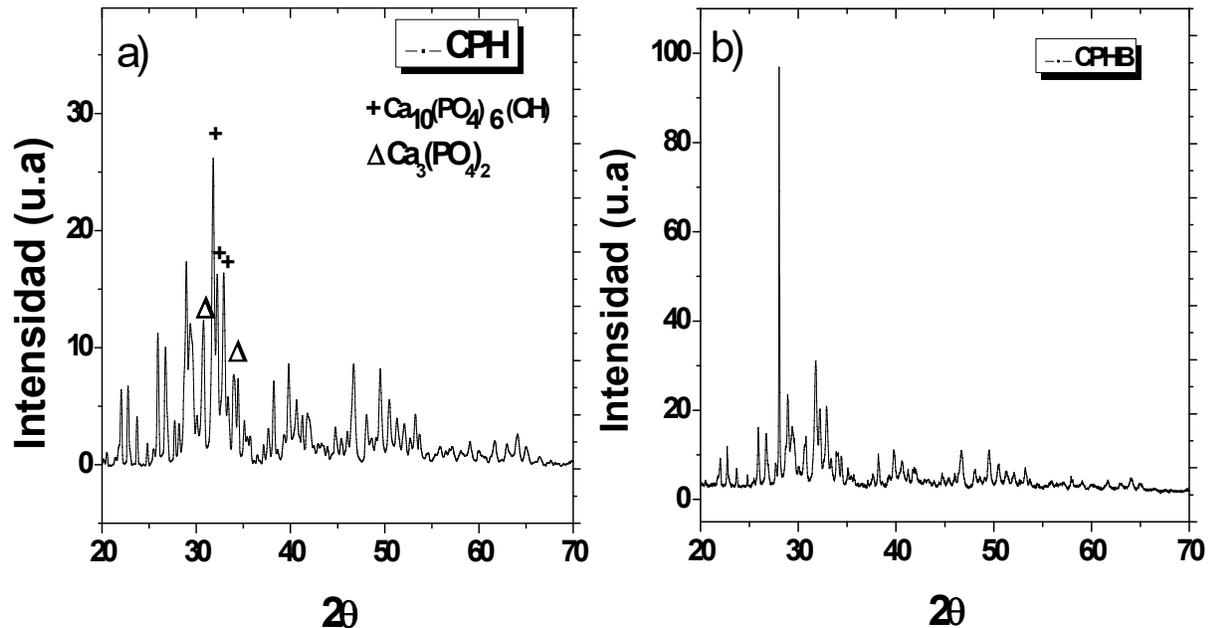
**Figura 32.** Difractograma Fosfato de Calcio obtenido por Sol-Gel: a) CPS, b) CPSB.

El Difractograma del fosfato de calcio obtenido por autocombustión ( $\beta$ -TCP) (Figura 33 (a)) mostró un material que indexa con el patrón de  $\beta$ -TCP (JCPDS 00-009-0169), por su parte: en el difractograma del fosfato de calcio con boro (figura 33 (b)) pudieron identificarse los picos correspondientes al óxido de boro ( $B_2O_3$ ) (JCPDS 00-006-0297) y boro (B) (JCPDS 00-012-0377). Con el fin de evaluar la actividad bacteriana se procedió a la síntesis por autocombustión del  $\beta$ -TCP dopado con magnesio (Mg), este Difractograma (figura 33 (c)) da cuentas de los picos asociados a fosfato de calcio magnésico o Whitlockita magnésica ( $(Ca, Mg)_3(PO_4)_2$ ) (JCPDS 00-013-0404) [29] y Magnesio (Mg) (JCPDS 00-035-0821). La incorporación de Mg en el  $\beta$ -TCP se ve reflejada por el desplazamiento de los picos de difracción del  $\beta$ -TCP hacia ángulos más altos (Figura 33 (c)) [30], debido a la sustitución parcial del  $Mg^{2+}$  por  $Ca^{2+}$  lo cual induce a una contracción en la dimensión de la celda unitaria. Este efecto es atribuido a que el radio iónico del Mg (0,65 Å) es mucho más pequeño que el radio iónico del Ca (0,99 Å), de esta manera; las sustituciones con iones pequeños dan lugar a tensiones de red, lo cual beneficia la contracción y al mismo tiempo estabiliza la estructura.



**Figura 33.** Difractograma Fosfato de Calcio por Autocombustión: a) Sin Boro, b) con Boro c) con Mg

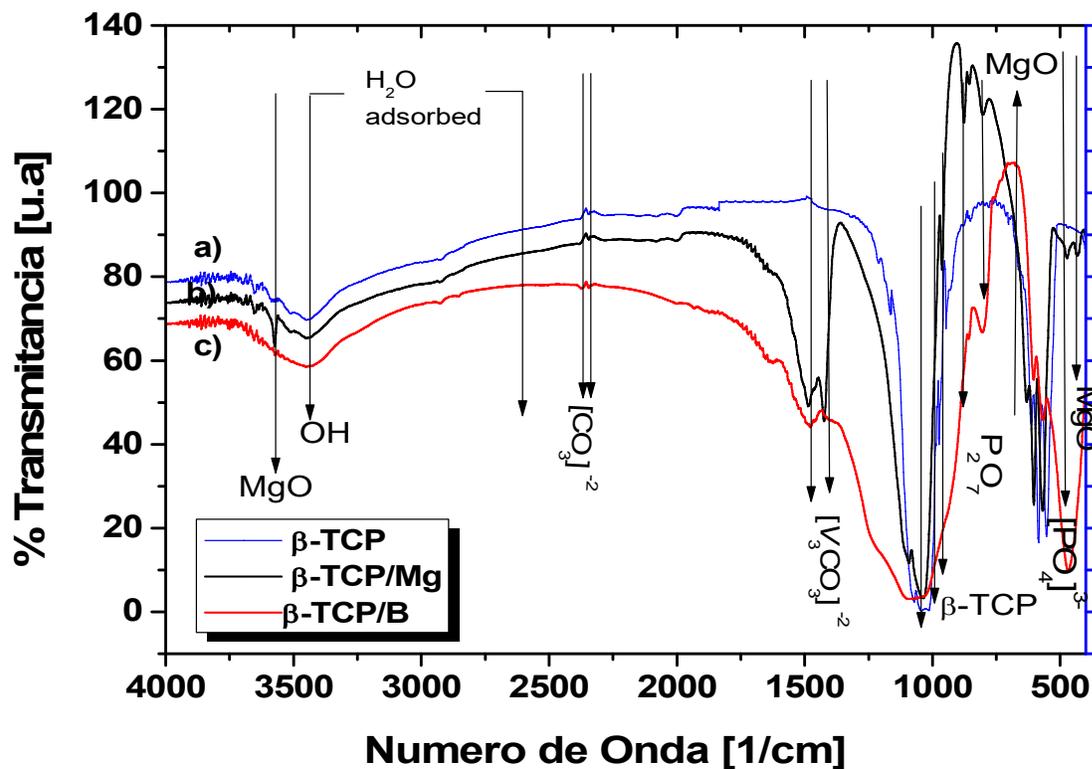
Los Difractogramas de fosfatos de calcio obtenidos vía hidrotermal (CPH y CPHB) (figura 34) evidencian la formación de HA con trazas de otros fosfatos de calcio ( $\beta$ -TCP). Para el CPHB hacen presencia picos asociados al boro (óxido de boro ( $\text{B}_2\text{O}_3$ ) (JCPDS 00-006-0297)).



**Figura 34.** Difractograma Fosfato de Calcio por Hidrotermal: a) Sin Boro, b) con Boro.

La Figura 35, muestra los espectros infrarrojos en número de onda entre  $4000\text{ cm}^{-1}$  y  $400\text{ cm}^{-1}$  para el fosfato de calcio obtenido por autocombustión. Las bandas comprendidas entre  $3400\text{ cm}^{-1}$  y  $2600\text{ cm}^{-1}$  se atribuyen principalmente a enlaces O-H correspondientes al agua molecular y adsorbida. Las bandas de vibración a  $947,05\text{ cm}^{-1}$ ;  $974,05\text{ cm}^{-1}$ ;  $1014,60\text{ cm}^{-1}$  que demuestran la presencia de  $\beta$ -TCP o Whitlockita [31], [32]. las bandas a  $553,94\text{ cm}^{-1}$ ;  $584,43\text{ cm}^{-1}$ ;  $615,19\text{ cm}^{-1}$ ;  $1014,60\text{ cm}^{-1}$ ;  $1074,40\text{ cm}^{-1}$  asociados a modos vibracionales de los grupos  $[\text{PO}_4]^{3-}$  característicos de la fase  $\beta$  [33]–[36]. Bandas en  $850,61\text{ cm}^{-1}$  y  $1212,47\text{ cm}^{-1}$  atribuidos a la presencia de grupos  $(\text{P}_2\text{O}_7)^{4-}$  [31]. En el espectro del fosfato de calcio dopado con Magnesio se evidenciaron bandas en  $468,76\text{ cm}^{-1}$ ;  $571,12\text{ cm}^{-1}$ ;  $612,70\text{ cm}^{-1}$ ;  $633,49\text{ cm}^{-1}$ ;  $1033,31\text{ cm}^{-1}$  y  $1094,09\text{ cm}^{-1}$  asociadas a los modos vibracionales de los grupos fosfato. La banda en  $468,76\text{ cm}^{-1}$  constituye la vibración de tensión asimétrica ( $\nu_2$ ). Los dobletes a  $571,12\text{ cm}^{-1}$  y  $612,70\text{ cm}^{-1}$  atribuidos a la flexión del enlace P-O-P [35]. En  $961,35\text{ cm}^{-1}$  efecto de la tensión simétrica del enlace P-O ( $\nu_1$ ). Las bandas  $1033,31\text{ cm}^{-1}$  y  $1094,09\text{ cm}^{-1}$  están asociadas al estiramiento asimétrico del enlace P-O ( $\nu_3$ ). Una banda ancha en  $3446,64\text{ cm}^{-1}$  y otra banda a  $1649,04$  son debidas a la presencia de estiramientos y flexión de enlaces O-H respectivamente [37]. Se indica la presencia de una nueva banda a  $3569,79\text{ cm}^{-1}$  atribuido principalmente

a la presencia de MgO [38]. Las bandas ubicadas en  $633,49\text{ cm}^{-1}$  y  $438,38\text{ cm}^{-1}$  también pueden ser asignadas a modos vibracionales del enlace Mg-O [39]. Dos Bandas en  $1423,54\text{ cm}^{-1}$  y  $1484,31\text{ cm}^{-1}$  asociadas a grupos carbonatos ( $\nu_3$ ) [40]. El espectro de fosfato de calcio dopado con boro se evidenciaron una serie de bandas en la región comprendida entre  $650\text{ cm}^{-1}$  y  $1200\text{ cm}^{-1}$ , bandas relacionadas con los modos vibracionales de estiramiento ( $\nu_1, \nu_2, \nu_3$  y  $\nu_4$ ) y flexiones de unidades  $[\text{BO}_4]^{5-}$  y  $[\text{PO}_4]^{3-}$  [41]. Las bandas en  $1257,44\text{ cm}^{-1}$ ;  $1495,51\text{ cm}^{-1}$ ;  $1639,44\text{ cm}^{-1}$  hacen referencia a estiramientos de los enlaces B-O de las unidades trigonales  $[\text{BO}_3]$  [17], En  $1257,44\text{ cm}^{-1}$  son vibraciones de estiramiento asimétrica del enlace de  $[\text{PO}_4]^{3-}$  y también pueden asociarse a vibraciones de enlaces B-O. Las bandas a  $474,57\text{ cm}^{-1}$ ;  $561,52\text{ cm}^{-1}$  que corresponden a los modos vibracionales de flexión ( $\nu_2$ ) de unidades  $[\text{BO}_4]$  y  $[\text{PO}_4]^{3-}$ , en  $601,51\text{ cm}^{-1}$  y  $940\text{ cm}^{-1}$  las bandas corresponden a enlaces O-B-O y vibraciones de estiramiento de los enlaces B-O de las unidades  $[\text{BO}_4]$ . La banda en  $1063,70\text{ cm}^{-1}$  son estiramientos antisimétricos ( $\nu_3$ ) de unidades  $[\text{PO}_4]^{3-}$ . Bandas en  $807,81\text{ cm}^{-1}$  asignadas a vibraciones de estiramiento de enlaces O-B-O y B-O-P [42].



**Figura 35.** Espectro Infrarrojo fosfato de Calcio: a)  $\beta$ -TCP, b)  $\beta$ -TCP/Mg con 5%w Mg c)  $\beta$ -TCP/B con 30%w Boro.

Para cada método de síntesis fue determinada la degradabilidad de los polvos dopados con Boro (%w), el dopaje varió de 0% a 40 %w. Los análisis de los datos permitieron corroborar la influencia que tenía el boro sobre la degradabilidad del material, y la técnica de síntesis que evidenciaba una mejor degradabilidad. Cuando los fosfatos de calcio son sometidos a soluciones extremas de pH, se evidenció la rapidez con la cual son degradados, lo cual puede estar relacionado con la disociación del compuesto.

La asignación de bandas infrarrojas en el espectro de fosfatos de calcio se encuentra compilada en la tabla 18.

**Tabla 18.** Asignación de Bandas Infrarrojas en el espectro de Fosfatos de Calcio.

$\beta$ -TCP		$\beta$ -TCP/B		$\beta$ -TCP/Mg	
Posición (cm <sup>-1</sup> )	Asignaciones IR	Posición (cm <sup>-1</sup> )	Asignaciones IR	Posición (cm <sup>-1</sup> )	Asignaciones IR
3424,06	Agua molecular	3446,64	Agua molecular	3569,79	Confirmación presencia de enlaces Mg-O
3400-2600	Agua adsorbida	2922,07	Agua adsorbida	3446,64	Flexión del enlace O-H
2362,72 - 2336,73	[CO <sub>3</sub> ] <sup>2-</sup> adsorbido	2347,93	[CO <sub>3</sub> ] <sup>2-</sup> adsorbido	2367,12	[CO <sub>3</sub> ] <sup>2-</sup> adsorbido
1212,47	Agua molecular	1257,44	Estiramiento de enlaces B-O de unidades [BO <sub>3</sub> ]	1649,04	Estiramiento del enlace O-H
1014,60 974,05 947,05	Modos vibracionales del grupo [PO <sub>4</sub> ] <sup>3-</sup> de la fase $\beta$			1484,31 1423,54	Carbonatos $\nu_3$ (CO <sub>3</sub> ) <sup>2-</sup>
850,61	Grupos (P <sub>2</sub> O <sub>7</sub> ) <sup>4-</sup>			1033,31 1094,09	Estiramiento asimétrico del enlace P-O
615,19 584,43	Vibración grupos [PO <sub>4</sub> ] <sup>3-</sup>			961,35	Estiramiento simétrico del enlace P-O

553,94	de la fase $\beta$			879,78	Flexión del enlace C-O en grupos $[\text{CO}_3]^{2-}$
	Flexiones ( $\nu_4$ ) de enlaces P-O del grupo $[\text{PO}_4]^{3-}$			633,49	Modos vibracionales enlace Mg-O
				612,70	
				571,12	Flexión del enlace P-O-P
				468,76	Vibraciones de los enlaces de grupos $[\text{PO}_4]^{3-}$
			438,38	Modos vibracionales enlace Mg-O	

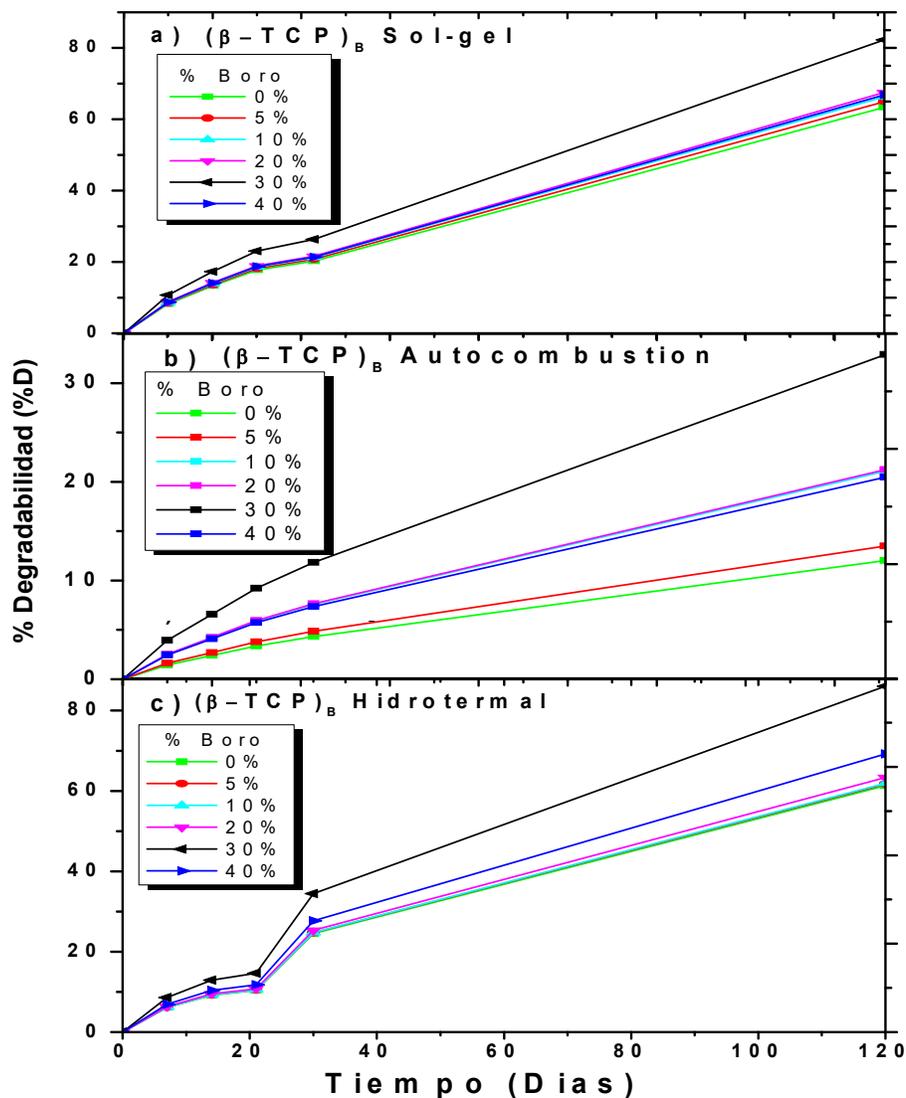
En la tabla 19, se muestra la degradabilidad del fosfato de calcio obtenido por diferentes métodos de síntesis inmersos en una solución extrema. Para el fosfato de calcio se evidenció una menor degradabilidad por el método sol-gel con un %D de 28,194 con presencia de un 30%w de boro, mientras que el método de autocombustión evidenció mayor degradabilidad en solución extrema con un %D de 82,277 cuando se dopa con un 30%w de boro.

**Tabla 19.** Degradabilidad polvos cerámicos Fosfatos de Calcio en solución extrema bajo la norma ISO 10993.

Boro (%w)	0	5	10	20	30	40
	Degradabilidad (%D)					
<b>Sol-Gel</b>	10,303	11,561	18,074	18,211	28,194	17,544
<b>Autocombustión</b>	63,354	64,950	66,317	67,532	82,277	66,851
<b>Hidrotermal</b>	55,744	56,112	56,257	57,601	78,274	62,919

La figura 36, evidencia la pérdida de peso de los polvos cerámicos de fosfato de calcio cuando se encuentran inmersos en una solución extrema a medida que transcurre el tiempo. La tendencia de degradación de los fosfatos de calcio obtenidos presentó comportamientos ascendentes. En la figura 36 (a), se tiene un fosfato de calcio obtenido

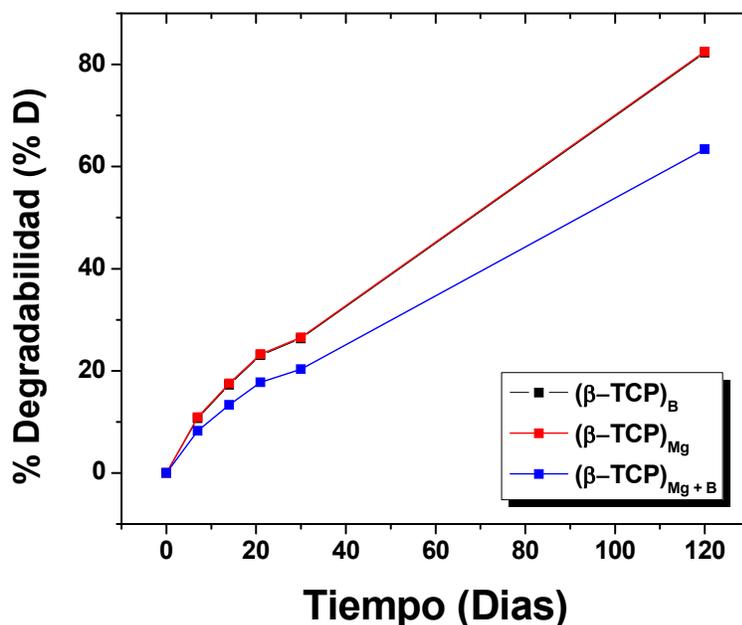
por sol-gel el cual presenta una degradación entre 1,23% y 10,14% en un tiempo de 0 a 30 horas, alcanzando un máximo de degradación 10,30% y 28,19%. Por el método autocombustión (figura 36 (b)), la degradación evidenció una tendencia ascendente y continua, evidenciando una degradación entre 8,23% y 26,32% en un tiempo de 0 a 30 horas y un máximo entre 63,35% y 82,27% transcurridas 120 horas. Aunque la tendencia general fue ascendente, es evidente que el fosfato de calcio obtenido por autocombustión es más degradable que los demás métodos de síntesis.



**Figura 36.** Degradabilidad polvos Fosfatos de calcio evaluados en solución extrema: a) Sol-gel; b) Autocombustión; c) Hidrotermal.

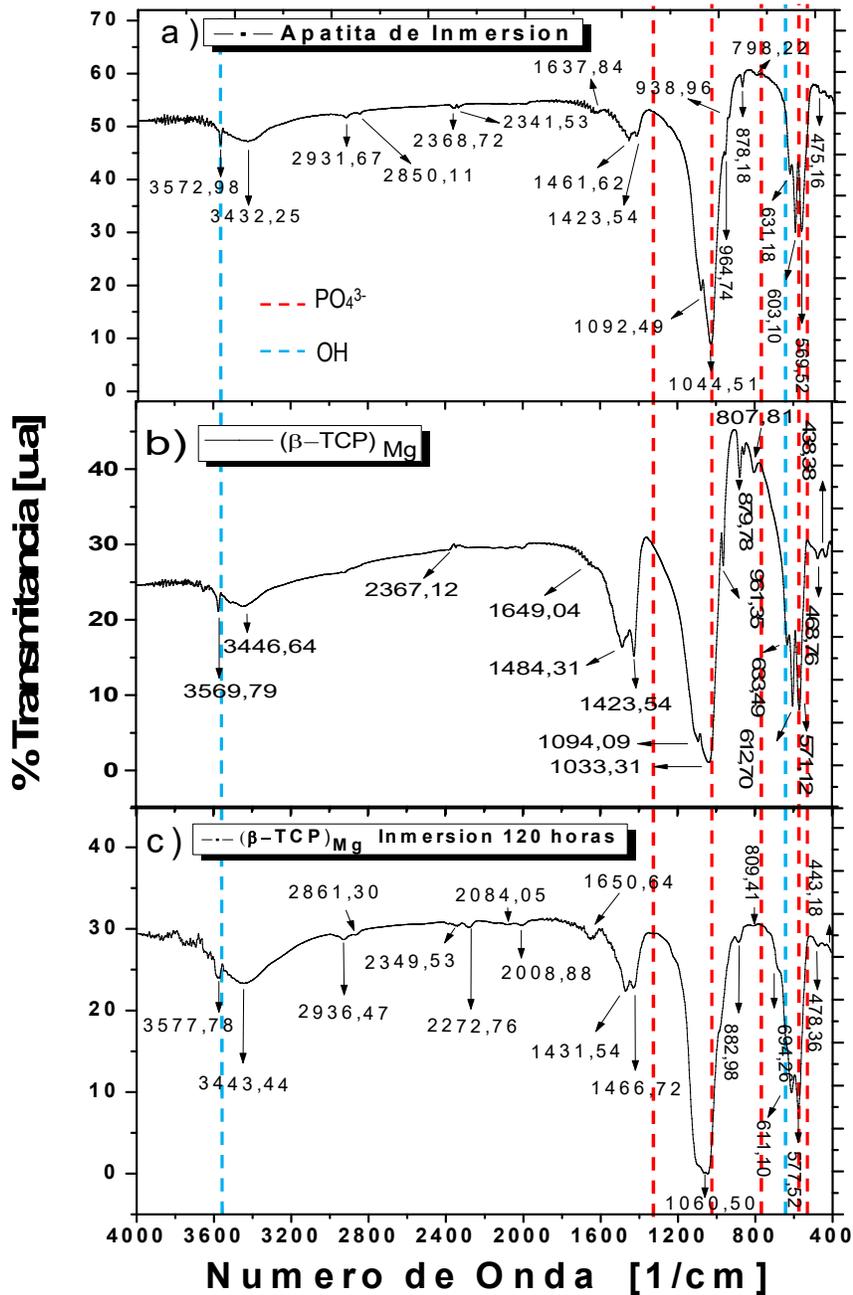
La figura 36 (c), presenta una degradabilidad que varía entre 5,57% y 31,30% en un periodo de 0 a 30 horas, este fosfato de calcio obtenido por el método hidrotermal tiene una tendencia ascendente de degradabilidad la cual se ve alterada en la velocidad de degradación transcurridas 21 horas de inmersión. En general, independiente del método de síntesis se evidenció una tendencia a aumentar la degradación del material cerámico con un aumento no superior al 30%w de boro.

A pesar de que el fosfato de calcio obtenido por autocombustión dopado con boro al 30%w de boro fue el polvo cerámico que evidenció la mayor degradabilidad, se hizo necesario realizar una prueba de degradabilidad donde se observara el comportamiento del fosfato de calcio sin boro y dopado con 5% de Mg [ $(\beta -TCP)_{Mg}$ ] y fosfato de dopado con 30%w de boro y 5%w de Mg [ $(\beta -TCP)_{Mg+B}$ ] ambos obtenidos por el método de autocombustión (Figura 37). La degradabilidad de  $(\beta -TCP)_B$  y  $(\beta -TCP)_{Mg}$  no mostraron diferencias significativas, mientras que el  $(\beta -TCP)_{Mg+B}$  evidenció una menor degradabilidad. Una vez identificado cual sería el fosfato de calcio a utilizar apuntando a la regeneración ósea, se procedió a realizar el segundo ensayo de la prueba y fue sumergirlo en TRIS-HCL.



**Figura 37.** Degradabilidad polvos de los fosfatos de calcio  $(\beta -TCP)_B$ ,  $(\beta -TCP)_{Mg}$  y  $(\beta -TCP)_{Mg+B}$  evaluados en solución extrema

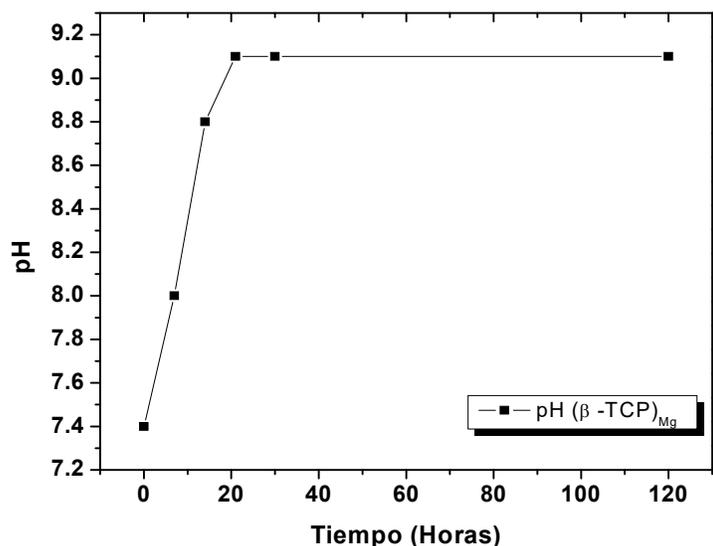
La figura 38, presenta los espectros infrarrojos del fosfato de calcio dopado con 30% de boro y las fases apatíticas formadas cuando es inmerso en un buffer TRIS-HCL en un tiempo de 120 horas.



**Figura 38.** Espectro Infrarrojo de: a) apatitas de inmersión, b) Fosfato de Calcio con 5%w Magnesio, d) Fosfato de Calcio con 5%w Magnesio inmerso en TRIS-HCL.

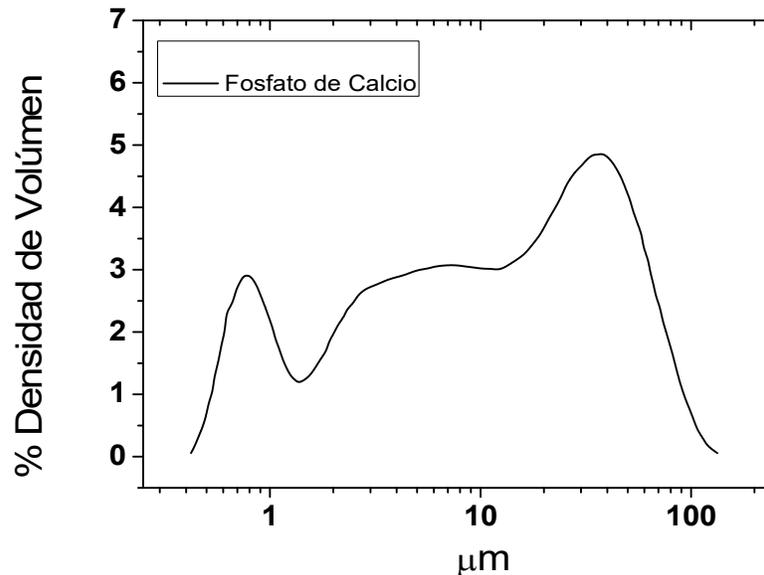
La figura 38 (a) se observa las bandas correspondientes a las vibraciones de los grupos apatíticos descritos anteriormente en la figura 27 [19]–[21]. El espectro Infrarrojo del fosfato de calcio con 30% boro sin inmersión (figura 38 (b)) fue explicado previamente en la figura 36 (c). El fosfato de calcio dopado con Mg sumergido en el buffer (Figura 38 (c)) presenta bandas a  $443,18\text{ cm}^{-1}$ ;  $577,52\text{ cm}^{-1}$ ;  $611,10\text{ cm}^{-1}$ ;  $624,24\text{ cm}^{-1}$ ;  $1060,50\text{ cm}^{-1}$ ; asociada a los modos vibracionales de los grupos fosfatos. La banda a  $1060,50\text{ cm}^{-1}$  asociada al estiramiento asimétrico del enlace P-O, en  $577,52\text{ cm}^{-1}$  y  $611,10\text{ cm}^{-1}$  corresponden a la flexión del enlace P-O [35]. Las bandas a  $1431,54\text{ cm}^{-1}$  y  $3443,44\text{ cm}^{-1}$  son debidas a la presencia de estiramientos y flexión de enlaces O-H respectivamente [37]. Se indica la presencia de un pico a  $3577,78\text{ cm}^{-1}$  el cual se atribuye principalmente a la presencia de MgO [38], las bandas ubicadas en  $624,26\text{ cm}^{-1}$  y  $443,18\text{ cm}^{-1}$  también pueden ser asignadas a modos vibracionales del enlace Mg-O [39]. Durante el tiempo de inmersión se evidenció una banda ubicada a  $478,36\text{ cm}^{-1}$  junto con la presencia de un pico a  $1466,72\text{ cm}^{-1}$  que confirma la formación de fases apatíticas.

El pH del fosfato de calcio dopado con  $(\beta\text{-TCP})_{\text{Mg}}$  (Figura 39) inmerso en el buffer Tris-HCl mostró una tendencia ascendente hasta llegar a su estabilización aproximadamente en 9.1, el mayor aumento fue observado a las 21 horas de inmersión, el cual se mantuvo constante hasta alcanzar las 120 horas.



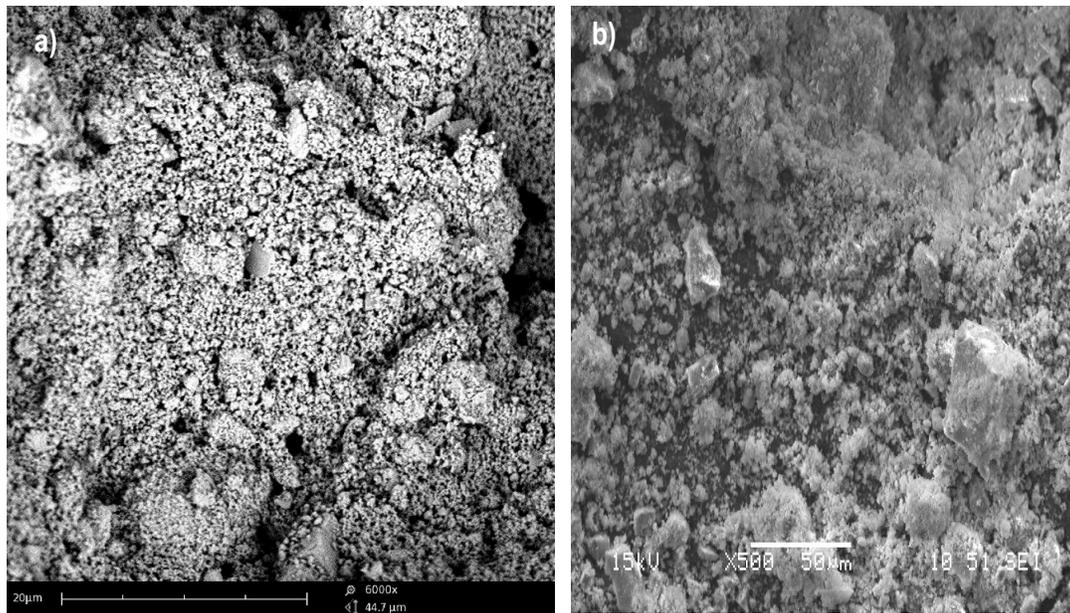
**Figura 39.** Evolución pH del Fosfato de calcio *inmerso en el buffer Tris-HCl*.

La distribución del tamaño de partícula de las partículas de fosfato de calcio se encuentra en la figura 40. En el diagrama, se muestran que las partículas del fosfato de calcio presentan tamaños de micras que oscilan entre 0,958  $\mu\text{m}$  y 126  $\mu\text{m}$ . Cabe recordar que estos tamaños dependen directamente del proceso de molienda.



**Figura 40.** Diagrama de distribución del tamaño de partícula de partículas de Fosfato de Calcio.

Las fotomicrografías fueron obtenidas por Microscopía Electrónica de Barrido (SEM) para el fosfato de calcio sin inmersión y con inmersión en el buffer TRIS-HCL (Figura 41). Puede observarse que se tiene una morfología que evidencia diferentes tamaños de partícula, en general se aprecia la formación de agregados.



**Figura 41.** Fotomicrografías de Microscopía Electrónica de Barrido (SEM) de polvos cerámicos de fosfatos de Calcio obtenido por autocombustión: a)  $\beta$ -TCP, b)  $\beta$ -TCP inmerso en TRIS-HCL a 120 horas

## 2.4 Conclusiones

Se logró la obtención de polvos de biovidrio y fosfato de calcio asociado a la fase  $\beta$  con tamaños de partícula en el rango micrométrico a submicrométrico.

La difracción de rayos X evidenció que la ruta de síntesis más óptima para la obtención del biovidrio es la ruta sol-gel, gracias a que permite la obtención de un material amorfo y no vitrocerámicos como las obtenidas por las otras rutas de síntesis. Para el fosfato de calcio, las 3 rutas de síntesis utilizadas son buenas opciones para la obtención de este. Sin embargo; la aplicación del material obtenido juega un papel importante a la hora de escoger la ruta de síntesis, por esta razón y basados en que se necesitaba un material que tuviera unas características biológicas, la mejor ruta de síntesis para la obtención de fosfatos de calcio fue autocombustión, ya que de una u otra manera garantizó un material más puro asociado a la fase  $\beta$  que no presentó trazas de otros fosfatos de calcio.

CPS y  $\beta$ -TCP presentan composiciones muy diferentes antes de ser dopados con magnesio, debido principalmente a que la autocombustión genera ordenamientos estructurales más definidos que el método sol-gel, de ahí que por autocombustión se

obtenga un fosfato de calcio correspondiente a  $\beta$ -TCP sin impurezas y por sol-gel se obtenga una mezcla de fosfatos de calcio con alto contenido de hidroxiapatita principalmente.

Teniendo en cuenta, que el biovidrio contó con una variación de las relaciones molares de boro (0% a 40% molar). Esta variación mostró un mejor rendimiento en cuanto a biodegradabilidad del biovidrio cuando este era dopado con un 30%w de boro. Por su parte, el fosfato de calcio evidenció una mejor degradabilidad cuando era dopado con un 30 %w de boro. Cuando se dopa con el 5% de Mg el fosfato de calcio se encuentra con 0%w de boro [ $(\beta -\text{TCP})_{\text{Mg}}$ ], esto debido a que el estudio de degradabilidad [ $(\beta -\text{TCP})_{\text{B}}$ ,  $(\beta -\text{TCP})_{\text{Mg}}$  y  $(\beta -\text{TCP})_{\text{B+Mg}}$ ] mostró que la degradabilidad entre  $(\beta -\text{TCP})_{\text{B}}$  y  $(\beta -\text{TCP})_{\text{Mg}}$  eran similares y no presentaban una diferencia significativa. Mientras que el fosfato de calcio con 30%w de boro y 5%w de Mg presentó una menor degradabilidad frente a los dos fosfatos anteriores.

Los reportes de degradabilidad para el vidrio por fusión y el fosfato por sol-gel no fueron significativos y por tal motivo estas dos técnicas fueron descartadas en el análisis de los datos.

En esta primera etapa se buscó la ruta de síntesis más adecuada en cuanto a degradabilidad. Debido a que esta es una característica fundamental de un material cerámico en óptimas condiciones para la regeneración ósea, donde principalmente intervienen procesos celulares complejos, en los cuales actúan mecanismos de tipo biológico y físico- químicos coordinados por proteínas, células, factores de crecimiento entre otros. A pesar de esto; la velocidad a la que ocurra la degradación de un material afecta significativamente su comportamiento a nivel *in vivo* e *in vitro*.

Los materiales cerámicos con condiciones óptimos (en cuanto a degradabilidad y caracterización) para la formulación de la pasta cerámica fueron el biovidrio de boro obtenido por la ruta sol-gel y el fosfato de calcio obtenido por la ruta autocombustión.

## Referencias Bibliográficas

- [1] S. R. R. Jain, K. C. C. Adiga, and V. R. R. Pai Verneker, "A new approach to thermochemical calculations of condensed fuel-oxidizer mixtures," *Combust. Flame*, vol. 40, pp. 71–79, Jan. 1981.
- [2] "norma ISO 10993-14: Biological evaluation of medical devices - Part 1: Evaluation and testing within a risk management process."
- [3] A. Hadji, A. Merah, O. Guellati, and M. Guerioune, "Synthesis and characterization of the bioactive ternary SiO<sub>2</sub>-CaO-P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> Bioglass," *Int. J. Eng. Appl. Sci.*, vol. 5, no. 2.
- [4] M. Catauro, F. Bollino, R. A. Renella, and F. Papale, "Sol-gel synthesis of SiO<sub>2</sub>-CaO-P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> glasses: Influence of the heat treatment on their bioactivity and biocompatibility," *Ceram. Int.*, vol. 41, no. 10, Part A, pp. 12578–12588, 2015.
- [5] J. Rincón and R. Casasola, "TEM replica of a fluoride-miserite glass-ceramic glaze microstructure," *Mater. Tehnol.*, vol. 49, pp. 229–233, Apr. 2015.
- [6] H. Aguiar, J. Serra, P. González, and B. León, "Structural study of sol-gel silicate glasses by IR and Raman spectroscopies," *J. Non. Cryst. Solids*, vol. 355, no. 8, pp. 475–480, 2009.
- [7] C. Gao, Q. Gao, X. Bao, Y. Li, A. Teramoto, and K. Abe, *Preparation and In Vitro Bioactivity of Novel Mesoporous Borosilicate Bioactive Glass Nanofibers*, vol. 94. 2011.
- [8] C. Gautam, A. K. Yadav, V. K. Mishra, and K. Vikram, "Synthesis, IR and Raman spectroscopic studies of (Ba, Sr) TiO<sub>3</sub> borosilicate glasses with addition of La<sub>2</sub>O<sub>3</sub>," *Open J. Inorg. Non-metallic Mater.*, vol. 2, no. 4, pp. 47–54, 2012.
- [9] P. Kiran, V. Ramakrishna, M. Trebbin, N. K. Udayashankar, and H. D. Shashikala, "Effective role of CaO/P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> ratio on SiO<sub>2</sub>-CaO-P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> glass system," *J. Adv. Res.*, vol. 8, no. 3, pp. 279–288, 2017.
- [10] J. Wan, J. Cheng, and P. Lu, *Coordination state of B and Al of Borosilicate glass by IR spectra*, vol. 23. 2008.
- [11] S. M. Ahmadi, A. Behnamghader, and A. Asefnejaad, *Sol-gel synthesis, characterization and in vitro evaluation of SiO<sub>2</sub>-CaO-P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> bioactive glass nanoparticles with various CaO/P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> ratios*, vol. 12. 2017.
- [12] M. Mehdipour, A. Afshar, and M. Mohebbali, *Electrophoretic Deposition of Bioactive Glass Coating on 316L Stainless Steel and Electrochemical Behavior Study*, vol.

258. 2012.
- [13] G. El-Bassyouni, *In Vitro Bioactivity Behavior of some Borate Glasses and their Glass-Ceramic Derivatives Containing Zn<sup>2+</sup>, Ag<sup>+</sup> or Cu<sup>2+</sup> by Immersion in Phosphate Solution and their Anti-Microbial Activity*. 2017.
- [14] P. Balasubramanian, T. Büttner, V. M. Pacheco, and A. R. Boccaccini, "Boron-containing bioactive glasses in bone and soft tissue engineering," *J. Eur. Ceram. Soc.*, vol. 38, no. 3, pp. 855–869, 2018.
- [15] S. Agathopoulos, D. U. Tulyaganov, J. M. G. Ventura, S. Kannan, A. Saranti, M. A. Karakassides, and J. M. F. Ferreira, "Structural analysis and devitrification of glasses based on the CaO–MgO–SiO<sub>2</sub> system with B<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, Na<sub>2</sub>O, CaF<sub>2</sub> and P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> additives," *J. Non. Cryst. Solids*, vol. 352, no. 4, pp. 322–328, 2006.
- [16] P. Balasubramanian, A. Grünwald, R. Detsch, L. Hupa, B. Jokic, F. Tallia, A. K. Solanki, J. R. Jones, and A. R. Boccaccini, "Ion Release, Hydroxyapatite Conversion, and Cytotoxicity of Boron-Containing Bioactive Glass Scaffolds," *Int. J. Appl. Glas. Sci.*, vol. 7, no. 2, pp. 206–215, 2016.
- [17] C. Gautam, A. K. Yadav, and A. Kumar Singh, *A Review on Infrared Spectroscopy of Borate Glasses with Effects of Different Additives*, vol. 2012. 2012.
- [18] H. B. Pan, X. L. Zhao, X. Zhang, K. B. Zhang, L. C. Li, Z. Y. Li, W. M. Lam, W. W. Lu, D. P. Wang, W. H. Huang, K. L. Lin, and J. Chang, "Strontium borate glass: potential biomaterial for bone regeneration," *J. R. Soc. Interface*, vol. 7, no. 48, pp. 1025–1031, Jul. 2010.
- [19] N. W. Marion, W. Liang, W. Liang, G. C. Reilly, D. E. Day, M. N. Rahaman, and J. J. Mao, "Borate Glass Supports the In Vitro Osteogenic Differentiation of Human Mesenchymal Stem Cells," *Mech. Adv. Mater. Struct.*, vol. 12, no. 3, pp. 239–246, May 2005.
- [20] H. Ghomi, M. Fathi, and H. Edris, *Preparation of nanostructure hydroxyapatite scaffold for tissue engineering applications*, vol. 58. 2014.
- [21] A. Stoch, W. Jastrzębski, A. Brożek, B. Trybalska, M. Cichocińska, and E. Szarawara, "FTIR monitoring of the growth of the carbonate containing apatite layers from simulated and natural body fluids," *J. Mol. Struct.*, vol. 511–512, pp. 287–294, 1999.
- [22] N. Marin Pareja, D. Escobar, C. Orozco, and A. Echavarría, *Synthesis and characterization of microporous hydroxyapatite, comparison with a commercial*

- product*. 2008.
- [23] F. Margha and A. Abdelghany, *Bone bonding ability of some borate bio-glasses and their corresponding glass-ceramic derivatives*, vol. 6. 2012.
- [24] H. Tripathi, S. Arepalli, P. M, and A. J, *Studies on Preparation and Characterization of 45S5 Bioactive Glass Doped with (TiO<sub>2</sub> + ZrO<sub>2</sub>) as Bioactive Ceramic Material*, vol. 6. 2016.
- [25] A. L. B. Maçon, T. B. Kim, E. M. Valliant, K. Goetschius, R. K. Brow, D. E. Day, A. Hoppe, A. R. Boccaccini, I. Y. Kim, C. Ohtsuki, T. Kokubo, A. Osaka, M. Vallet-Regí, D. Arcos, L. Fraile, A. J. Salinas, A. V. Teixeira, Y. Vueva, R. M. Almeida, M. Miola, C. Vitale-Brovarone, E. Verné, W. Höland, and J. R. Jones, "A unified in vitro evaluation for apatite-forming ability of bioactive glasses and their variants," *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, vol. 26, no. 2, 2015.
- [26] M. E. Londoño, A. Echavarría, and F. De La Calle, "CARACTERÍSTICAS CRISTALOQUÍMICAS DE LA HIDROXIAPATITA SINTÉTICA TRATADA A DIFERENTES TEMPERATURAS ," *Revista EIA . scieloco* , pp. 109–118, 2006.
- [27] H. Kamal and A. Hezma, *Structure and Physical Properties of Borosilicate as Potential Bioactive Glasses*. 2017.
- [28] R. Wetzel and D. S. Brauer, "Apatite formation of substituted Bioglass 45S5: SBF vs. Tris," *Mater. Lett.*, vol. 257, p. 126760, 2019.
- [29] D. dos S. Tavares, L. de O. Castro, G. D. de A. Soares, G. G. Alves, and J. M. Granjeiro, "Synthesis and cytotoxicity evaluation of granular magnesium substituted  $\beta$ -tricalcium phosphate," *J. Appl. Oral Sci.*, vol. 21, no. 1, pp. 37–42, 2013.
- [30] M. S. Sader, R. Z. LeGeros, and G. A. Soares, "Human osteoblasts adhesion and proliferation on magnesium-substituted tricalcium phosphate dense tablets," *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, vol. 20, no. 2, pp. 521–527, 2009.
- [31] L. Berzina-Cimdina, "Research of Calcium Phosphates Using Fourier Transform Infrared Spectroscopy," N. B. E.-T. Theophanides, Ed. Rijeka: IntechOpen, 2012, p. Ch. 6.
- [32] X. Li, A. Ito, Y. Sogo, X. Wang, and R. Z. LeGeros, "Solubility of Mg-containing beta-tricalcium phosphate at 25 degrees C," *Acta Biomater.*, vol. 5, no. 1, pp. 508–517, Jan. 2009.
- [33] D. Xidaki, P. Agrafioti, D. Diomatari, A. Kaminari, E. Tsalavoutas-Psarras, P. Alexiou, V. Psycharis, E. C. Tsilibary, S. Silvestros, and M. Sagnou, "Synthesis of Hydroxyapatite,  $\beta$ -Tricalcium Phosphate and Biphasic Calcium Phosphate Particles

- to Act as Local Delivery Carriers of Curcumin: Loading, Release and In Vitro Studies,” *Mater. (Basel, Switzerland)*, vol. 11, no. 4, p. 595, Apr. 2018.
- [34] K. Ananth, S. Shanmugam, S. Jose, A. Nathanael, T. Oh, D. Mangalaraj, and A. M. Ballamurugan, *Structural and chemical analysis of silica-doped  $\beta$ -TCP ceramic coatings on surgical grade 316L SS for possible biomedical application*. 2015.
- [35] W. Abdel-Fattah, F. M Reicha, and T. Elkhoody, *Nano-beta-tricalcium phosphates synthesis and biodegradation: 1. Effect of microwave and  $SO_4^{2-}$  ions on  $\beta$ -TCP synthesis and its characterization*, vol. 3. 2008.
- [36] S. Paul, *Characterization of Beta-Tricalcium Phosphate ( $\beta$ -TCP) Produced at Different Process Conditions*. 2017.
- [37] R. Mahadevaiah, H. Lalithamba, S. B S, and R. Hanumanaika, “Synthesis of Na-protected formamides from amino acids using MgO nano catalyst: Study of molecular docking and antibacterial activity,” *Sci. Iran.*, vol. 24, Sep. 2017.
- [38] P. N. Kumar, S. K. Mishra, and S. Kannan, “Probing the limit of magnesium uptake by  $\beta$ -tricalcium phosphate in biphasic mixtures formed from calcium deficient apatites,” *J. Solid State Chem.*, vol. 231, pp. 13–19, 2015.
- [39] A. Ansari, A. Ali, M. Asif, and S. Uzzaman, “Microwave-assisted MgO NP catalyzed one-pot multicomponent synthesis of polysubstituted steroidal pyridines,” *New J. Chem.*, vol. 42, Nov. 2017.
- [40] N. M. F. Costa, D. H. Yassuda, M. S. Sader, G. V. O. Fernandes, G. D. A. Soares, and J. M. Granjeiro, “Osteogenic effect of tricalcium phosphate substituted by magnesium associated with Genderm® membrane in rat calvarial defect model,” *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 61, pp. 63–71, 2016.
- [41] I. Korybska-Sadło, M. Sitarz, M. Król, and P. Gunia, “Vibrational spectroscopic characterization of the magnesium borate-phosphate mineral lüneburgite,” *Spectrosc. Lett.*, vol. 49, no. 9, pp. 606–612, Oct. 2016.
- [42] A. Baykal, G. Gozel, M. Kizilyalli, M. Toprak, and R. Kniep, “X-RAY powder diffraction and IR study of calcium borophosphate, CaBPO<sub>5</sub>,” *Turkish J. Chem.*, vol. 24, pp. 381–388, Jan. 2000.

# **CAPÍTULO 3:**

**FORMULACIÓN PASTA CERÁMICA E  
IMPRESIÓN 3D DEL SCAFFOLD**

## 3.1 Formulación de la Pasta Cerámica

Este capítulo se centra en el diseño de experimentos aplicado a la formulación de la pasta cerámica a partir de la mezcla del biovidrio de boro obtenido por la ruta sol-gel y el fosfato de calcio obtenido por autocombustión. Se agrupan las condiciones óptimas para la impresión de la pasta cerámica y posterior obtención de los scaffolds. También se incluye la caracterización estructural, morfológica, reológica, porosidad e interconectividad de poros de los scaffold, así como su bioactividad y degradabilidad.

Para lograr el objetivo de imprimir un scaffold, se hace necesario definir los valores de composición de los polvos cerámicos que conformaran la pasta cerámica y lograr las mejores condiciones de fluidez, para lo cual se implementará un modelo de diseño de experimentos de Mezclas lo cual permitirá optimizar las mejores condiciones de conformación del scaffold en términos de tiempo y estabilidad.

Basados en un diseño de mezclas, se determinó cuáles son los componentes que más influencia presentaron en la formulación de la pasta cerámica. De manera general, un diseño de experimentos con mezclas busca cuantificar cómo influyen los diferentes componentes sobre la respuesta con el propósito de encontrar la composición de la mezcla que brinde el mejor resultado, es decir el más óptimo. También se enfoca de manera indirecta en ajustar la respuesta en función de los porcentajes de los componentes de la mezcla. Este diseño permite hallar las mezclas posibles que cumplen con las propiedades o variables respuesta requeridas, conduciendo a una superficie de respuesta, la cual indica aquella zona donde se cumplen las condiciones definidas. A través de esta superficie respuesta, se evidencia que existen múltiples zonas donde la mezcla puede cumplir con las condiciones, sin embargo; la evaluación de ellas apoyado en las técnicas de caracterización (reológica, tamaño partícula, degradabilidad, bioactividad, etc) pueden establecer los porcentajes adecuados de cada material en la mezcla.

Con el fin de evaluar las condiciones óptimas para la formulación de la pasta cerámica utilizada en la impresión del scaffold, también fue utilizado el DOE para dicho fin. Valerse de un DOE, es una forma de direccionar metodológicamente la parte experimental, con la única finalidad de obtener información sobre la influencia de cada componente sobre la plasticidad de la pasta cerámica, y de las posibles interacciones que tiene los

componentes entre sí. Realizar un análisis al DOE permite la obtención de una mejor formulación y un tratamiento más óptimo de los datos que permiten entender el comportamiento y los mecanismos de operación de los materiales cerámicos obtenidos.

### 3.2 Diseño de experimentos (DOE)

La experimentación se orientó inicialmente, en la evaluación de los diferentes tipos de materiales y su posible interacción, con la finalidad de comprender su efecto, depurar las mezclas y componentes acorde a las características planteadas. Es así como se establecieron los materiales que serían adecuados para la formulación de la pasta cerámica.

Para la formulación de la pasta cerámica se realizó un experimento con mezclas, el cual cuenta con 4 componentes y los tratamientos del experimento consisten en la combinación particular o mezcla de estos componentes. De manera global, las proporciones en las que participan los componentes de la mezcla deben tender a satisfacer dos restricciones [1]:

**Para cada componente  $i$ ,  $0 \leq X_i \leq 1$**

$$X_1 + X_2 + X_3 + \dots + X_q = 1$$

Acorde a estas orientaciones bibliográficas, el diseño de experimento de mezclas para la formulación de la pasta cerámica presenta algunas restricciones, ya que una mezcla que contenga 100% de cualquiera de los cuatro componentes resultará poco satisfactoria y se desea que cada componente éste presente en cualquier formulación (% peso). El diseño de la mezcla viene dado por:

**Atapulgita (At)**  $3 \leq X_1 \leq 5$

**Agua (Ag)**  $1 \leq X_2 \leq 3$

**Biovidrio (bio)**  $10 \leq X_3 \leq 90$

**Fosfato de calcio (f)**  $10 \leq X_4 \leq 90$

---

Atapulgita + agua+ biovidrio de boro + Fosfato de calcio= 100

Al igual que en otros tipos de materiales cerámicos el tiempo de fluidez y moldeabilidad, es un criterio reológico para conformar el scaffold. La norma UNE-EN 13395-2: Determinación de la trabajabilidad. Parte 2: Ensayo de escurrimiento de pastas o de morteros, sirvió como referenciación para realizar la medición. Dicha norma fue tomada con modificaciones al ensayo de este trabajo de investigación.

Como variable respuesta del DOE, se eligió la plasticidad (moldeabilidad). La plasticidad es una propiedad fundamental en las pastas cerámicas y permite determinar la moldeabilidad de la pasta sin que esta cambie de forma. Para evaluar la posibilidad de moldear adecuadamente la pasta cerámica se tuvieron en cuenta varios aspectos:

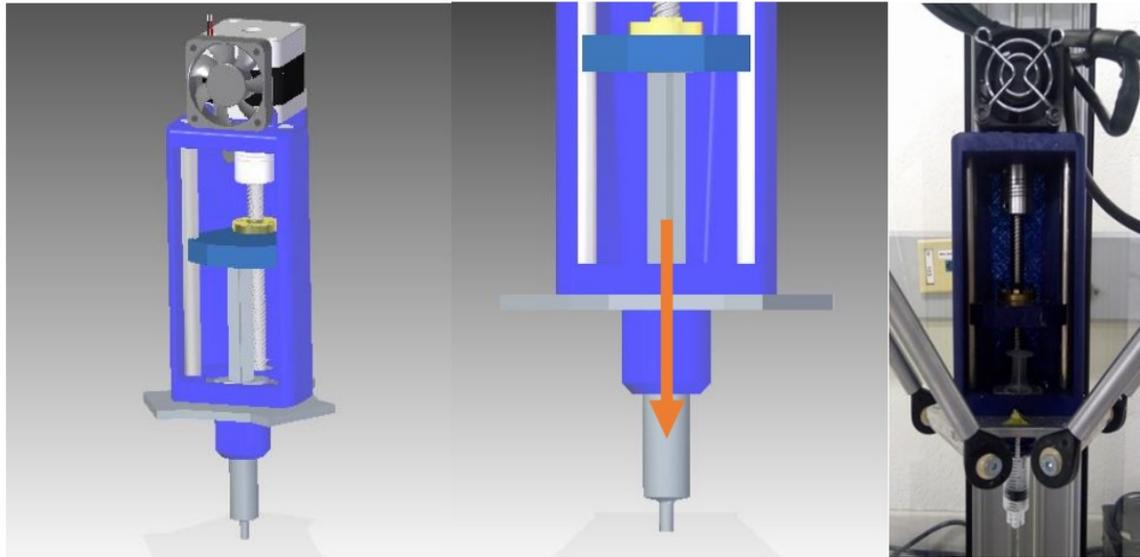
1) **Cuantitativo:** Con el fin de encontrar la mejor proporción de plastificante y agua presente en la pasta cerámica, se tomaron porcentajes en peso de Atapulgita (entre 3% y 5%) y de Agua (entre 1% y 3%). Una vez evaluados y tomados los datos, fueron seleccionados aquellas muestras que cumplieran con los requisitos cualitativos. Durante toda la experimentación e impresión del scaffold se mantuvo una presión, humedad y temperatura constante. Cabe resaltar que estas condiciones y determinaciones fueron tomadas en cuenta gracias a estudios previos realizados en el grupo de investigación y que permitieron establecer condiciones de trabajo para la Atapulgita y el agua [2], [3].

2) **Cualitativo:** en ocasiones cuando se formula una pasta cerámica puede ocurrir que no tiene la cantidad de agua y/o plastificante suficiente y la cantidad adecuada de componentes, con lo cual puede ocurrir que la pasta cerámica se forme, pero no posea la capacidad de fluir, presente separación de fases o formación de agregados. Durante la obtención de los datos solamente fueron tomadas en cuenta mezclas que no presentaban anomalías de carácter visual. Entendiendo como anomalías: no presentaran fluidez, perder su plasticidad al finalizar la prueba, presentaran aglomeraciones. La Tabla 20, muestra el procedimiento experimental para la preparación de la pasta cerámica.

**Tabla 20.** Procedimiento experimental preparación pasta cerámica

Pasos a seguir		Tiempo total	Parámetro medido	Resultado
1	Preparación de las materias primas	20 min	Dosificación	% peso de las materias primas
2	Mezcla de las materias primas	3 min/ mezcla		
3	Aspecto Cualitativo –Visual	Durante la conformación de la pasta y extrusión.		Aspecto de la pasta
4	Medidas con el extrusor	t: Tiempo final extrusión de la pasta	Fluidez – Plasticidad	Tiempo
5	Aspecto Cualitativo –Visual	Después de extrusión		Aspecto de la pasta

3) Para evaluar la plasticidad de la pasta cerámica, se tomaron las medidas de los tiempos que demoraba en salir la carga de las pastas por extrusión (solo fueron tomadas en cuenta aquellas pastas que cumplieran con el aspecto cualitativo indicado previamente). La extrusión se realizó en la una impresora Wasp modelo Delta 20 × 40, la cual cuenta con un extrusor de cerámica avanzada (diseñado y ajustado por integrantes del grupo de investigación), este consiste en un sistema de dosificación de material por medio de jeringas, utilizando volúmenes de 2ml de pasta cerámica con aguja 23G (0,8 mm de Diámetro externo y 0,3 de diámetro interno). Dichas jeringas son accionadas por una plataforma contralada por el código G determinado por el modelo (Figura 42). Para la configuración del código G necesario para el proceso, se utiliza el Software de impresión 3D Slicing Cura 3D versión 15.04.2.



**Figura 42.** Extrusor de cerámica avanzada para impresora 3D Wasp Modelo 20X40.

*Fuente: Informes Grupo investigación cerámicos y vítreos. UNAL Medellín*

Las mezclas cerámicas fueron hechas teniendo en cuenta el tamaño de partícula de los biovidrios de boro (BGB) y el fosfato de calcio previamente tamizados en tamiz malla 635 y clasificados en tamaños finos (pasante) y gruesos (retenido) así como la relación de cada uno de ellos en la mezcla que fue variada entre 10% - 90% en peso para cada uno de los componentes cerámicos. Los ensayos fueron ejecutados de manera aleatoria y con 3 réplicas con el fin de garantizar la reproducibilidad y repetitividad del ensayo.

Una vez se conocen los componentes del experimento y los niveles, se procedió a realizar el diseño experimental con ayuda del software minitab18®. La matriz experimental (tabla 21) fue creada con ayuda del software probando un diseño de mezclas con 4 componentes, 60 Tratamientos o corridas y una variable respuesta: Plasticidad

**Tabla 21.** Resumen del diseño y Matriz experimental para evaluar Plasticidad

**Resumen del diseño**

Componentes: 4 Puntos del diseño: 60

**Niveles componentes de la mezcla**

Componente	Cantidad	
	Inferior	Superior

Atapulgita	3,0000	5,0000
Agua	1,0000	3,0000
Biovidrio	10,0000	90,0000
Fosfato	10,0000	90,0000

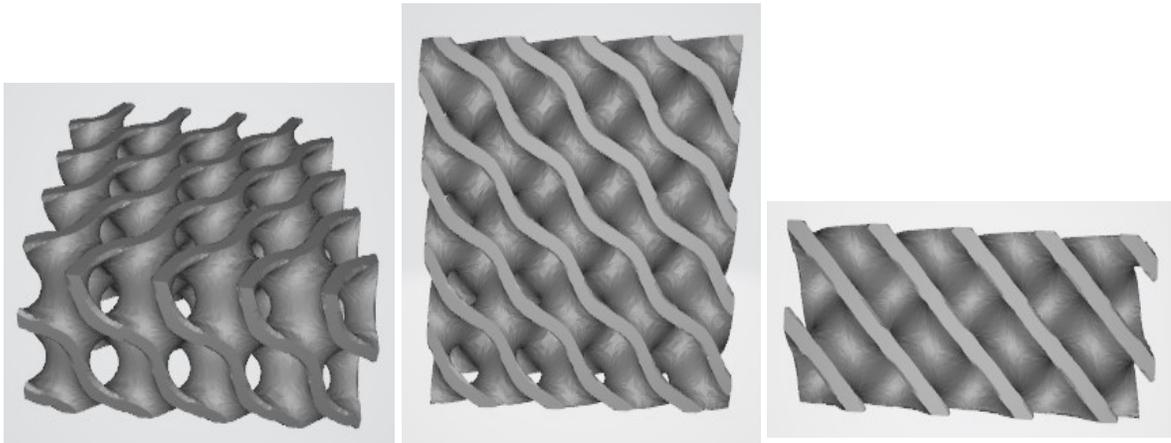
**Tabla de diseño (aleatorizada)**

<b>Corrida - Tratamiento</b>	<b>Atapulgita</b>	<b>Agua</b>	<b>Biovidrio</b>	<b>Fosfato</b>
1	3,0000	2,0000	28,5000	66,5000
2	3,0000	1,0000	10,0000	86,0000
3	4,5000	2,5000	64,5000	28,5000
4	4,0000	2,0000	47,0000	47,0000
5	5,0000	3,0000	82,0000	10,0000
6	3,0000	2,0000	28,5000	66,5000
7	3,0000	3,0000	84,0000	10,0000
8	3,0000	3,0000	10,0000	84,0000
9	4,5000	2,5000	64,5000	28,5000
10	4,5000	2,5000	28,5000	64,5000
11	5,0000	1,0000	10,0000	84,0000
12	3,5000	2,5000	28,5000	65,5000
13	4,5000	1,5000	28,5000	65,5000
14	4,5000	1,5000	65,5000	28,5000
15	4,5000	2,5000	64,5000	28,5000
16	5,0000	1,0000	10,0000	84,0000
17	5,0000	1,0000	84,0000	10,0000
18	4,0000	2,0000	47,0000	47,0000
19	3,5000	1,5000	66,5000	28,5000
20	3,0000	1,0000	86,0000	10,0000
21	3,5000	1,5000	28,5000	66,5000
22	3,0000	1,0000	86,0000	10,0000
23	5,0000	3,0000	82,0000	10,0000
24	3,5000	1,5000	28,5000	66,5000
25	5,0000	1,0000	84,0000	10,0000
26	3,0000	1,0000	86,0000	10,0000
27	4,5000	2,5000	28,5000	64,5000
28	4,5000	1,5000	65,5000	28,5000
29	3,0000	3,0000	84,0000	10,0000
30	5,0000	3,0000	10,0000	82,0000
31	3,0000	3,0000	10,0000	84,0000
32	3,0000	1,0000	10,0000	86,0000
33	3,0000	3,0000	84,0000	10,0000
34	5,0000	3,0000	10,0000	82,0000

---

35	5,0000	3,0000	82,0000	10,0000
36	3,0000	2,0000	66,5000	28,5000
37	3,5000	1,5000	28,5000	66,5000
38	3,0000	3,0000	10,0000	84,0000
39	5,0000	3,0000	10,0000	82,0000
40	3,0000	2,0000	66,5000	28,5000
41	4,5000	1,5000	65,5000	28,5000
42	5,0000	1,0000	84,0000	10,0000
43	4,5000	1,5000	28,5000	65,5000
44	4,5000	2,5000	28,5000	64,5000
45	3,5000	1,5000	66,5000	28,5000
46	3,0000	1,0000	10,0000	86,0000
47	3,5000	1,5000	66,5000	28,5000
48	4,5000	1,5000	28,5000	65,5000
49	4,0000	2,0000	47,0000	47,0000
50	5,0000	1,0000	10,0000	84,0000
51	3,0000	2,0000	66,5000	28,5000
52	3,0000	2,0000	28,5000	66,5000
53	3,5000	2,5000	28,5000	65,5000
54	3,5000	2,5000	28,5000	65,5000
55	3,0000	2,0000	28,5000	66,5000
56	3,5000	1,5000	66,5000	28,5000
57	3,5000	2,5000	65,5000	28,5000
58	3,5000	2,5000	65,5000	28,5000
59	3,5000	2,5000	65,5000	28,5000
60	3,0000	1,0000	10,0000	86,0000

Para la conformación de los scaffolds, se imprimen sólidos basados en superficies mínimas periódicas triples (TPMS) con forma de diamante dicho modelo cuenta con una distribución de celdas unitarias  $9 \times 9 \times 3.6\text{mm}$  (Figura 43). Para la impresión 3D se utilizaron jeringas de 5 ml, evitando burbujas. Las jeringas se colocaron en el cabezal de extrusión, donde los pistones son desplazados por un mecanismo de tornillo de avance, con el objetivo de extruir la pasta a través de una aguja plana G23 con un diámetro interno de aproximadamente 0,3 mm. Se utilizó el software Slicing Cura 3D Printing versión 15.04.2 para configurar los parámetros de impresión. Con una altura de capa de 0,4 mm y una velocidad de 15mm/s.



**Figura 43.** *Solido Basado en superficies mínimas periódicas triples, Diamond.*  
*Vista Isométrica, Superior y Lateral.*

Una particularidad en la impresión del scaffolds para regeneración ósea es el tipo de material a utilizar, como se pudo evidenciar en el capítulo 2, donde se estudiaron varias técnicas de síntesis que proporcionaron los materiales cerámicos más adecuados para aplicaciones biológicas. La novedad de este tipo de materiales para la impresión 3D, apunta principalmente a que es un material netamente inorgánico, donde se evalúan las potencialidades individuales que tiene estos materiales cuando interactúan en ambientes biológicos, cabe resaltar; que existela posibilidad de que el scaffold de materiales netamente cerámicos exhiba características que ralenticen los procesos biológicos cuando interactúan con las células, esto basado principalmente; en estudios realizados por otros autores que indican deben realizarse ajustes en las condiciones post-procesamiento para evitar dichos inconvenientes (estado del arte). Los materiales cerámicos como el biovidrio y el fosfato de calcio tienen propiedades que garantizan una buena estabilidad en la regeneración ósea, así como la interacción de carácter biológico que independientemente para cada material también ha sido ampliamente estudiado. Aprovechando los conocimientos adquiridos y las referencias en cuanto este tipo de comportamiento, el diseño de la pasta del scaffold se realizó con materiales netamente inorgánicos con la única finalidad de demostrar que las interacciones del scaffold con las células no necesitan materiales aditivos o ligandos- generalmente orgánicos - para realizar un buen proceso de regeneración ósea.

Posterior a la formación del scaffold por impresión 3D es evaluada su biodegradabilidad, bioactividad, actividad antimicrobiana (previa inclusión de iones de  $Mg^{+2}$  en el fosfato de calcio) a partir de cultivos bacterianos mono y multiespecies; así como su potencial uso en regeneración ósea.

## **3.3 Caracterización de la Pasta Cerámica**

### **3.3.1 Reología**

La evaluación reológica se realizó en un reómetro rotacional Bohlin Instruments C-VOR 200, con la geometría plato-plato de 40 mm de diámetro, fabricado en titanio, con un gap de 1000  $\mu\text{m}$ , en la celda Peltier a temperatura controlada de  $25^{\circ}\text{C}$  ( $\pm 0,1$ ) y a una tasa de cizalladura desde 0,1 a 1000 1/s en 300 s

### **3.3.2 Difracción de Rayos X**

La formación de la pasta cerámica fue caracterizada mediante difracción de rayos X en un difractómetro RIGAKU miniflex que opera con radiación  $K\alpha$  Cu  $\lambda = 1,54056 \text{ \AA}$ , geometría  $2\theta$  y configuración Bragg-Brentano, este ensayo se realizó con el fin de identificar las fases cristalinas de los cerámicos obtenidos.

### **3.3.3 Espectroscopia Infrarroja con Transformada de Fourier (FTIR)**

La identificación de los grupos funcionales presentes en el biovidrio de boro, fosfato de calcio fueron determinados mediante Espectroscopia infrarroja con Transformada de Fourier Infrarroja de Reflectancia Difusa (DRIFT, equipo Shimadzu IRTracer-100), con un número de barridos de 16, una resolución  $4 \text{ cm}^{-1}$  y un rango de números de onda de  $4000-400 \text{ cm}^{-1}$ . Para esta caracterización, las muestras se prepararon utilizando 2 mg de muestra molida junto con 150 mg de KBr, hasta conseguir un polvo pasante malla 400, con el cual se conformó una pastilla mediante prensado a 10 toneladas-fuerza.

### 3.3.4 Tamaño de Partícula

La distribución del tamaño de las partículas fue observada en un zetasizer Nano ZS de Malvern, a través de dispersión de luz dinámica, la cual detecta la velocidad de difusión de las partículas mediante la irradiación de la muestra con un láser.

### 3.3.5 Microscopía Electrónica de Barrido (SEM)

La morfología y estructura de los scaffolds se evaluaron mediante microscopía electrónica de barrido (SEM) de alta resolución (1- 3 nm) dotado de un analizador EDX Bruker X Flash Detector 4010 con una resolución de 133 eV, para identificar los elementos constituyentes de cada material.

## 3.4 Caracterización scaffold

### 3.4.1 Estereomicroscopía

Los Scaffold se observaron en estereomicroscopio con el fin de obtener información estructural, depósitos de grupos apatíticos en la superficie, homogeneidad, morfología y porosidad entre otras características. Se utilizó un estereomicroscopio ya que permite observar la estructura tridimensional de éstos.

### 3.4.2 Microscopía Electrónica de Barrido (SEM)

La morfología y estructura de los scaffolds se evaluaron mediante microscopía electrónica de barrido (SEM) de alta resolución (1- 3 nm) dotado de un analizador EDX Bruker X Flash Detector 4010 con una resolución de 133 eV, para identificar los elementos constituyentes de cada material.

### 3.4.3 Porosidad e Interconectividad de poros

Para determinar la densidad aparente ( $\rho_b$ ) (ecn 3) de los scaffold se utilizó el método descrito en la norma ASTM C373- 88: “**Standard Test Method for Water Absorption, Bulk Density, Apparent Porosity, and Apparent Specific Gravity of Fired Whiteware Products**”. Inicialmente se obtuvo el peso de los scaffold secos ( $M_{neto}$ ), luego fueron sumergidos en agua destilada y sometidos a calentamiento por 5 horas, posteriormente

se dejaron reposando en el agua por un periodo de 24 horas. Finalmente son sacados e inmediatamente pesados correspondiente a la masa del scaffold sumergido ( $M_h$ ), una vez se elimina el exceso de agua con un paño húmedo y se procede a pesarlos, este valor será la masa del scaffold saturado ( $M_{sat}$ ).

$$\rho_b = \left( \frac{M_{neto}}{M_{sat} - M_h} \right) \quad \text{Ecn (3)}$$

La porosidad e interconectividad de los poros se realizó siguiendo la metodología descrita por Liu et al [4]. Una vez obtenidos los valores se procedió a determinar la capacidad de absorción de agua del scaffold conocida como porosidad másica ( $\phi_m$ ) (ecn 4):

$$\phi_m = \left( \frac{M_{sat} - M_{neto}}{M_{neto}} \right) \times 100 \quad \text{Ecn (4)}$$

Para determinar el porcentaje de poros comunicados en el exterior (ecn 5), se realizó mediante el cálculo de la porosidad abierta ( $\phi_a$ ):

$$\phi_a = \left( \frac{M_{sat} - M_{neto}}{\rho_a \times V} \right) \times 100 \quad \text{Ecn (5)}$$

Posterior a esto, son obtenidos los valores de porosidad total ( $\phi_t$ ) correspondiente a la suma de los poros abiertos y cerrados existentes en la muestra con respecto al volumen total (ecn 6)

$$\phi_t = 1 - \left( \frac{\rho_b}{\rho_r} \right) \quad \text{Ecn (6)}$$

El porcentaje de poros comunicados entre sí hace referencia a la interconectividad de los poros ( $P_i$ ) (ecn 7):

$$P_i = \frac{\phi_a}{\phi_t} \quad \text{Ecn (7)}$$

Por otra parte, los scaffold son molidos y pesados hasta que las partículas pasen por tamiz malla 250. Se agrega agua desionizada hasta la mitad del picnómetro y se añaden los scaffolds molidos ( $M_g$ ). La densidad real del scaffold fue obtenida por el método del picnómetro [5]. Inicialmente, se obtiene el peso del picnómetro seco y luego se llena de agua hasta el enrase ( $M_1$ ). Posteriormente, es llenado con agua desionizada y se pesa ( $M_2$ ).

Donde  $V$  es el volumen del cuerpo scaffold,  $(\rho_r)$  es la densidad real del scaffold,  $(\rho_b)$  es la densidad aparente del scaffold y  $(\rho_a)$  es la densidad teórica del agua. Fueron efectuadas tres mediciones para cada uno de los métodos con el fin de minimizar el error asociado a la medición y la porosidad de los scaffold.

### 3.4.4 Degradabilidad

En cuanto a degradabilidad de los scaffolds se consideró el mismo protocolo empleado en el capítulo 2, ítem 2.2.4.

### 3.4.5 Bioactividad

En su mayoría, como se presentó en el ítem 1.2.4.1.1, los materiales bioactivos tienen la capacidad de inducir la formación de apatita en sus superficies. La bioactividad de los scaffold fue realizada en una solución fisiológica cuya concentración iónica es aproximadamente equivalente al plasma del cuerpo humano (tabla 22). Para evaluarla se procedió a preparar un fluido corporal simulado (SBF) basado en el método propuesto por Kokubo y colaboradores [6], [7].

**Tabla 22.** Concentración de iones del SBF y plasma sanguíneo humano [6], [7]

Fluido	Concentración iones (mM)							
	Na <sup>+</sup>	K <sup>+</sup>	Mg <sup>2+</sup>	Ca <sup>2+</sup>	Cl <sup>-</sup>	HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	HPO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>
Plasma sanguíneo	142	5,0	1,5	2,5	103	27,0	1,0	0,5
SBF (original)	142	5,0	1,5	2,5	148,8	4,2	1,0	0
SBF (nuevo y mejorado)	142	5,0	1,5	2,5	103	4,2	1,0	0,5
Ajustar pH ≈ 7,25 a 36,5°C con TRIS- HCl								

En la tabla 23, se muestra el orden de los reactivos usados para preparar 1000 ml de solución. Estas sales fueron disueltas en el mismo orden en el cual se mencionan, la adición de cada reactivo se realizó una vez disuelto completamente el reactivo previo.

**Tabla 23.** Reactivos para preparar SBF [6], [7]

Orden Reactivo	Reactivo	Cantidad (g)
1	NaCl	8,035
2	NaHCO <sub>3</sub>	0,355
3	KCl	0,225
4	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> • 3H <sub>2</sub> O	0,231
5	MgCl <sub>2</sub> • 6H <sub>2</sub> O	0,311
6	1.0M HCl	39 ml
7	CaCl <sub>2</sub>	0,292
8	Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0,072
9	Tris	6,118
10	1.0M HCl	0 - 5ml

Los scaffold fueron sumergidos en 50 ml de SBF, en recipientes de polietileno a 36,5°C, usando un shaker (Thermo Fisher Scientific) con movimiento circular continuo a una velocidad de 2Hz. Después de incubar por un periodo de tiempo designado (0, 7, 14, 28 y 120 días), los scaffold fueron sacados del SBF, lavados con agua destilada y secados a 40°C por 24 horas. La formación de los depósitos apatíticos en la superficie de los scaffold se analizó mediante Microscopía electrónica de barrido (SEM).

## 3.5 Resultados y Discusión

### 3.5.1 Formulación Pasta Cerámica

Una vez corridos los 60 Tratamientos emitidos por minitab18®, fue medida la variable respuesta, sobre cada una de las mezclas y se procedió a realizar el análisis. Los resultados obtenidos con el análisis estadístico para la variable respuesta presentaron buen ajuste acorde al modelo escogido, evidenciando que los cambios en los porcentajes de cada material cerámico afectan de manera significativa la formulación de la pasta cerámica y por ende la variable respuesta. El análisis de los resultados del DOE indica que los factores y el modelo escogido son acertados.

Por medio de gráficos de rastreo de respuestas, fueron evaluadas las respuestas de los componentes sobre la variable respuesta. En estos gráficos, se muestra el comportamiento de la plasticidad relacionado con cada componente que se varía en la pasta cerámica. Este análisis se realizó bajo el conocimiento de que la variable respuesta

no puede mirarse aislada, dado que la pasta cerámica está muy ligada a cierto tipo de características (degradabilidad, reología, etc) que debe poseer principalmente de carácter reológico. Esta gráfica permite obtener la región óptima al considerar varias respuestas para ser evaluadas. Esto hizo que se presentaran pastas con formulaciones en las regiones óptimas arrojadas por el DOE que no cumplían algunas características para su potencial uso en regeneración ósea. Para determinar la formulación óptima de la pasta cerámica, se hizo necesario evaluar la zona de respuesta (cada una de las formulaciones) y escoger aquella que cumpliera no sólo con la variable respuesta, si no que presentará óptimas características acordes al comportamiento de la pasta cerámica en el momento de la impresión y posterior comportamiento del scaffold obtenido a nivel biológico.

Partiendo del modelo que mejor se ajusta a la plasticidad (como medida de tiempo). Se encontró un modelo que es significativo a nivel cuadrático. A nivel de falta de ajuste el modelo resultó significativo al presentar un p-valor de 0.00, siendo menor a un alpha de 0.05 (tabla 24).

**Tabla 24.** Análisis de varianza para la plasticidad (pseudocomponentes)

Fuente	GL	SC Sec.	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Regresión	5	72,116	72,116	14,4232	31,58	0
Lineal	3	65,099	52,997	17,6656	38,68	0
Cuadrático	2	7,017	7,017	3,5086	7,68	0,001
Atapulgita*agua	1	4,362	4,181	4,1813	9,15	0,004
biovidrio*fosfato	1	2,655	2,655	2,6553	5,81	0,019
Error residual	54	24,663	24,663	0,4567		
Falta de ajuste	14	21,997	21,997	1,5712	23,57	0
Error puro	40	2,667	2,667	0,0667		
Total	59	96,779				

Los coeficientes de los términos del modelo cuadrático se presentan en el siguiente cuadro, donde se puede observar que todos los coeficientes del modelo son significativos ya que el valor p (p-value) es inferior al nivel de significancia (tabla 25).

**Tabla 25. Coeficientes de regresión estimados para tiempo (pseudocomponentes)**

Término	Coef	EE del		Valor T	Valor p	FIV
		coef.				
Atapulgita	63,6	12,8		*	*	5,01
agua	-73,3	13,2		*	*	5,81
biovidrio	3,329	0,273		*	*	3,54
fosfato	3,286	0,26		*	*	3,36
Atapulgita*agua	2297	759	3,03	0,004		5,17
biovidrio*fosfato	-2,318	0,961	-2,41	0,019		2,41

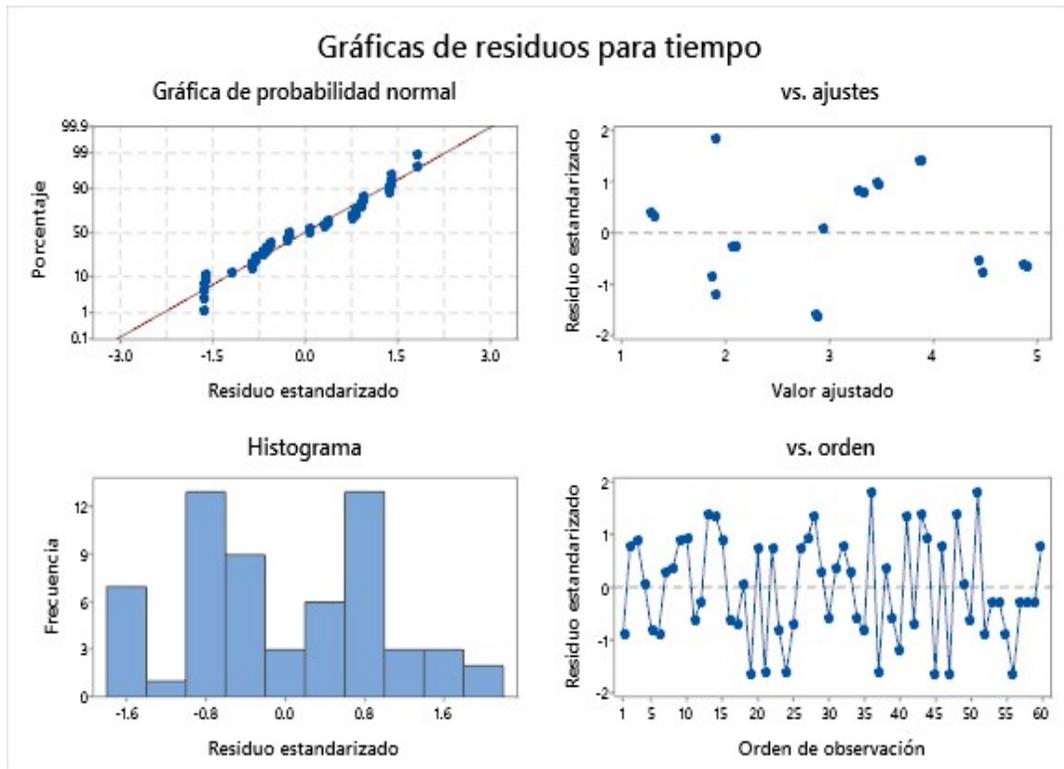
El nivel de ajuste de este modelo, arroja un R-cuadrado ajustado de 96,21%, lo que indica que con los factores Atapulgita, agua, biovidrio de boro y fosfato de calcio, solo pueden ser explicados el 96,21% de la variabilidad del tiempo a través del modelo de regresión cuadrático ajustado (tabla 26).

**Tabla 26. Resumen del modelo.**

S	R-cuad.	R-cuad. (ajustado)	PRESS	R-cuad. (pred)
0,249428	97,24%	96,21%	6,01412	93,79%

En la figura 44, puede observarse que la figura de residuos para la variable respuesta (plasticidad):

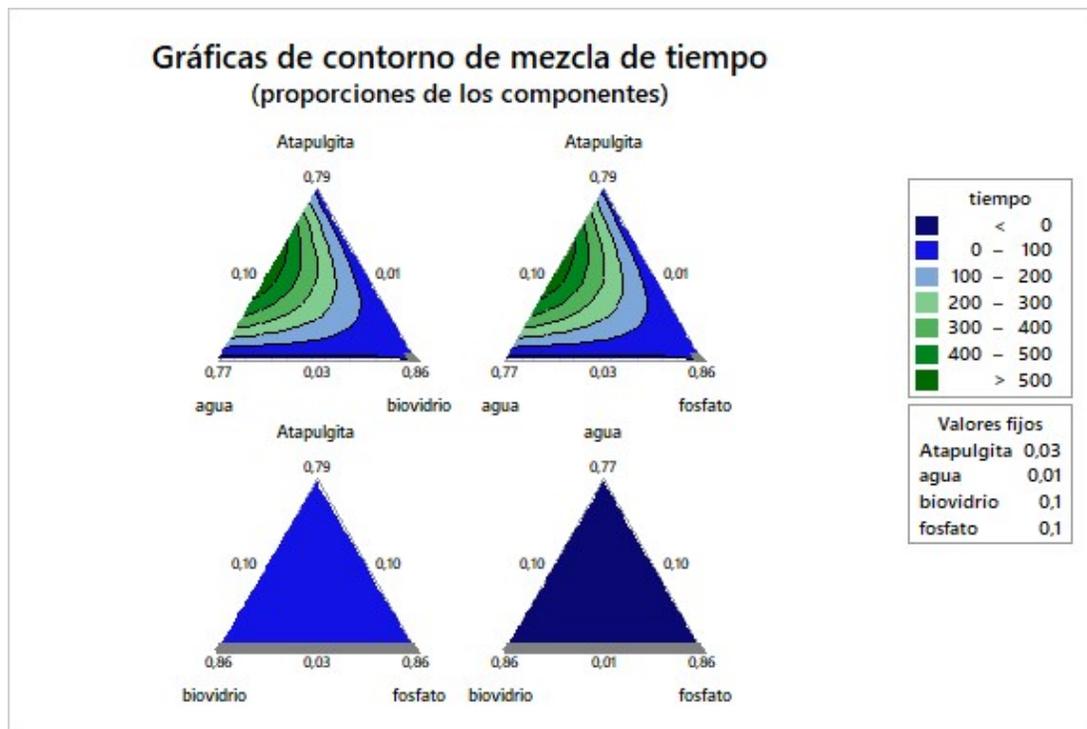
- En el Q-Q plot se aprecia buen comportamiento, indicando que el supuesto de normalidad de los residuos del modelo se podría estar cumpliendo. Aunque en el histograma, no se puede apreciar de forma clara, por lo que se necesitaría una prueba formal para la normalidad.
- Los residuos estandarizados vs los ajustes del modelo, tienden a tener un mejor comportamiento, indicando la presencia de una varianza constante o de homocedasticidad.
- Respecto a la independencia de los residuos, se puede observar un mejor comportamiento a lo largo del orden de observación, y al no presentar patrones deterministas se puede tener indicios de que los errores son independientes.



**Figura 44.** Gráficos de Residuos para Plasticidad

La Figura 45, muestra los contornos de la mezcla con el tiempo, donde se puede observar el efecto de los componentes, y el nivel de sensibilidad de cada uno de ellos en función de la variable respuesta (plasticidad), también puede inferirse la influencia de cambiar cada componente de la mezcla mientras se mantienen todos los componentes en una relación constante (atapulgita + agua+ biovidrio de boro + Fosfato de calcio= 100)

Las regiones más oscuras (azul) indican los valores de tiempo más bajos, en el rango de 0 -100 segundos; donde se tiene una región que cubre la parte superior derecha de la figura prolongándose hacia la parte inferior derecha y posterior alcance de la parte inferior izquierda. Esta zona representa los valores bajos de tiempo que dan como resultado mezclas acordes a los parámetros y restricciones solicitadas, el contorno gris sólido representa la región donde debe trabajarse el diseño de la mezcla. Los contornos son curvos debido a que el modelo contiene términos cuadráticos que son estadísticamente significativos.



**Figura 45.** Contorno de mezcla vs tiempo.

Con la finalidad de encontrar una optimización de la mezcla que se ajustara a la región de trabajo, se calculó la solución óptima para determinar cómo las diferentes configuraciones podrían afectar la variable respuesta. La tabla 27, muestra un resumen de los valores óptimos alcanzados con una deseabilidad de 0,98179 de los componentes y respuesta del modelo propuesto.

**Tabla 27.** Optimización

**Parámetros**

Meta	Inferior	Objetivo	Superior	Ponderación	Importar
tiempo	Mínimo	1,1	1,0798	4,8	1

**Solución global**

Componentes

Atapulgita = 3,00

agua = 2,00

biovidrio = 28,50

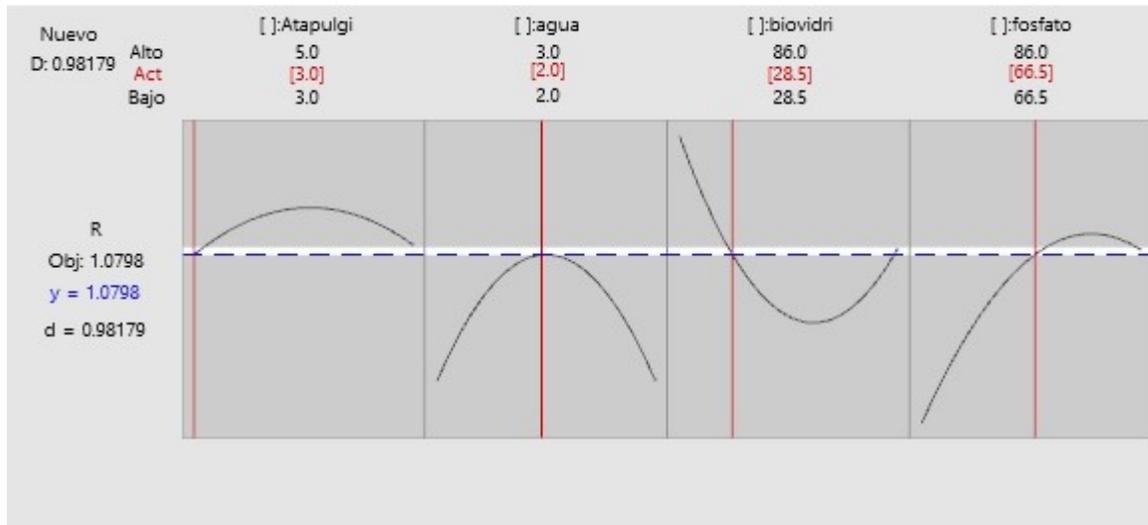
fosfato = 66,50

### Respuestas pronosticadas

R = 1.07980 , deseabilidad = 0.98179

Vale la pena resaltar que el objetivo de optimizar en DOE, es hallar un conjunto de condiciones adecuadas que satisfagan los objetivos propuestos, no precisamente se busca una deseabilidad de 1.0, ya que la deseabilidad es simplemente un método matemático que ayuda a encontrar ese valor óptimo [8].

La figura 46, muestra las proporciones de los componentes de la mezcla óptima, con una deseabilidad de 0,98179. La configuración óptima de la mezcla está dada por: 3% Atapulgita; 2% Agua; 28,5% Biovidrio de boro; 66,5% Fosfato de calcio, cada uno de ellos en porcentaje en peso, la meta fue minimizar el tiempo, siendo su valor pronosticado de 1,0798.

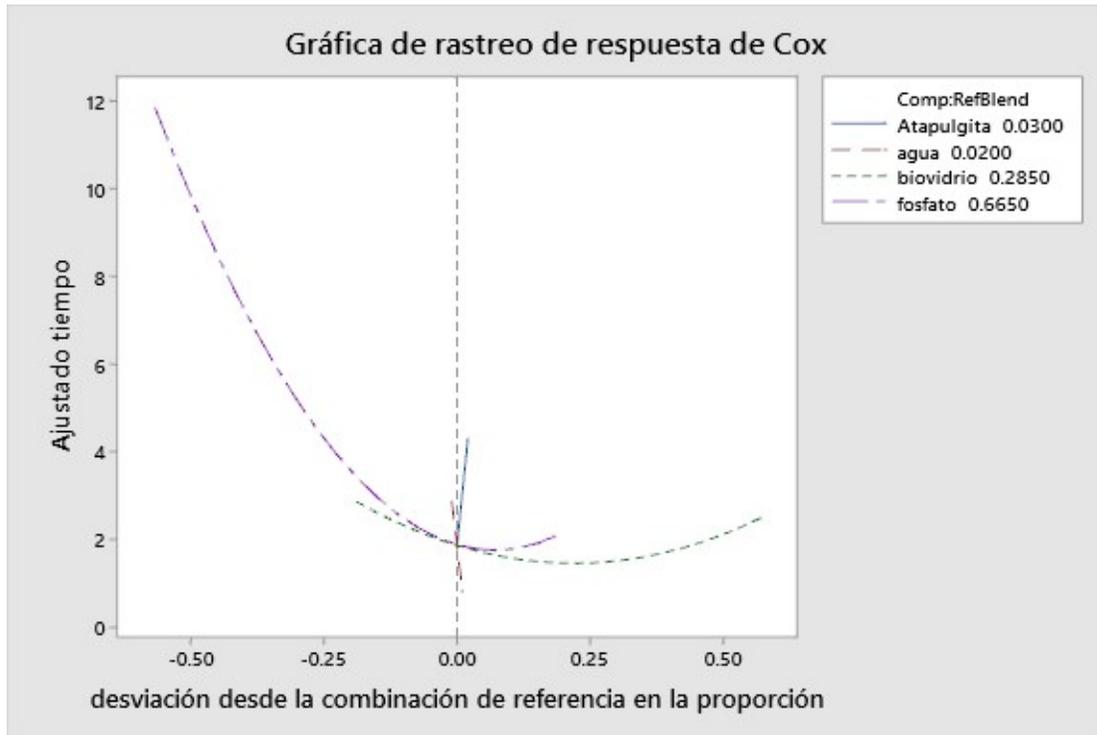


**Figura 46.** Gráfico Optimización de respuesta

La gráfica de trazas de la variable respuesta (figura 47) proporciona información sobre los efectos de los componentes cuando se comienza en la zona que corresponde a la mezcla de referencia:

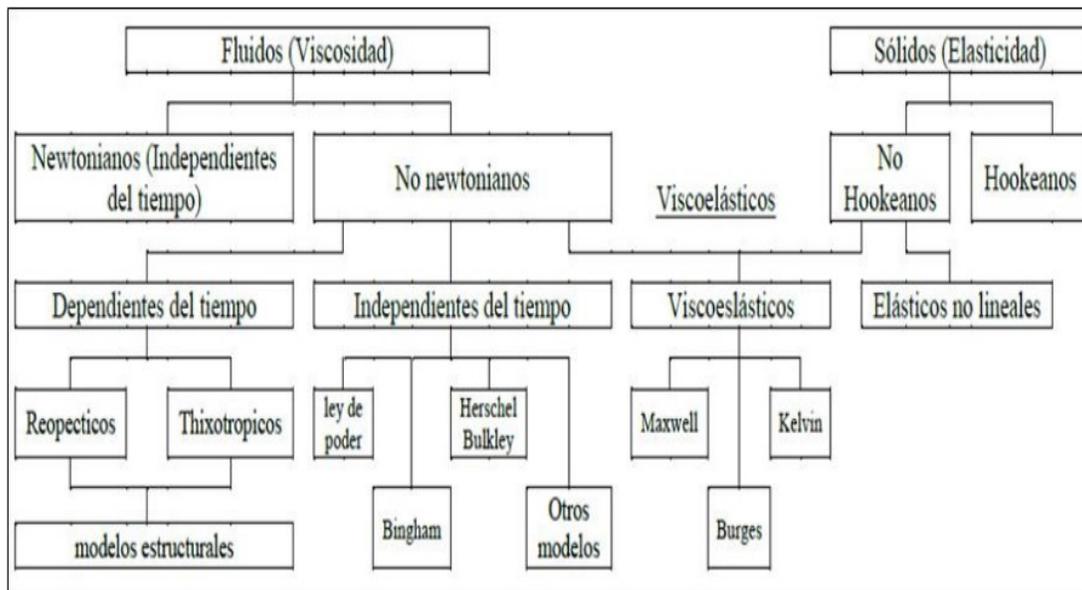
- A medida que aumenta la proporción de fosfato de calcio en la mezcla, el tiempo presenta una disminución.
- A medida que aumenta la proporción de Atapulgita en la mezcla, se presenta aumento del tiempo.
- A medida que aumenta la proporción de agua en la mezcla, se presenta una disminución en el tiempo presentando una relación inversamente proporcional.
- Mientras que el biovidrio de borato parece no tener un efecto muy relevante en el cambio de la variable respuesta.

En general, la minimización de la variable respuesta está directamente asociada con el papel que juega el fosfato de calcio y el agua en la mezcla, sin desconocerse que la relación [agua/ atapulgita] también influye de manera significativa. Experimentalmente, a mayores cantidades de agua, se evidenciaba una disminución en el tiempo, pero la mezcla se asociaba más a una barbotina que a una pasta cerámica, por su falta de consistencia lo que impedía una óptima impresión. Mientras que, cuando se tenía una mayor cantidad de atapulgita con respecto a esa relación, la mezcla se compactaba y no presentaba fluidez, evidenciándose un aumento en el tiempo de extrusión. Acorde a los resultados del DOE, para obtener una minimización en la variable respuesta se debe aumentar la proporción de fosfato de calcio, disminuir la cantidad de atapulgita asociada a la relación [agua/atapulgita], y tener una proporción adecuada de biovidrio de boro.



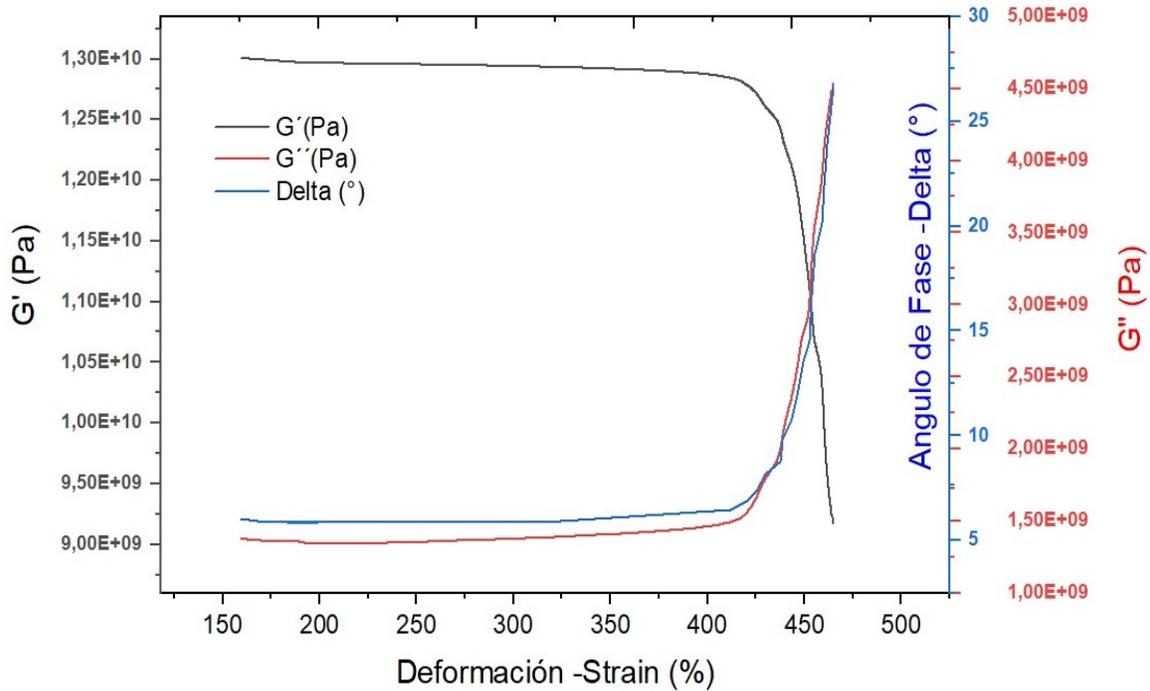
**Figura 47.** Gráfico de Trazas de variable respuesta plasticidad para la mezcla de componentes.

El componente reológico en una pasta cerámica es importante, debido a que es una manera de evaluar la viscosidad de la misma. Un aumento en la cantidad de agua proporciona una mejor manejabilidad de las pastas cerámicas, pero disminuye su viscosidad, lo que implica un aumento en su fluidez [9]. Dentro de las características de esta pasta cerámica se pueden concluir que es un fluido no newtoniano dependiente del tiempo y con características reopécticas donde aumentan la viscosidad aparente bajo esfuerzo de cizalla. Permitiendo clasificarla como un sistema fluido que permite hacer proceso de extrusión bajo presión controlada (Figura 48).



**Figura 48.** Clasificación de los Fluidos [10].

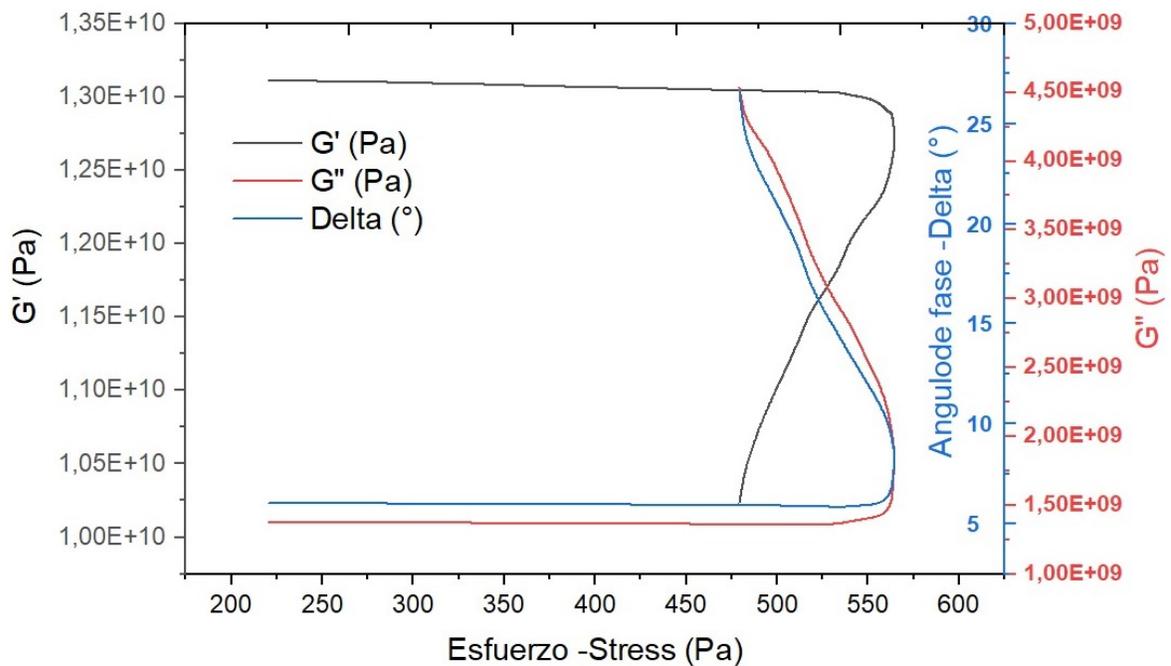
En las figuras 49 a la 54, se muestran los espectros mecánico- dinámicos, donde se observa la evolución de los módulos dinámicos ( $G'$ ,  $G''$  y  $\eta^*$ ) respecto a frecuencia, tiempo y esfuerzo. El módulo elástico ( $G'$ ) o de almacenamiento, es llamado así aludiendo al almacenamiento temporal de la energía proporcionada por el esfuerzo aplicado, el cual; posteriormente es liberada en forma de recuperación elástica. El módulo viscoso o de pérdidas, haciendo referencia a la energía usada al iniciar el flujo que se pierde irreversiblemente en forma de deformación permanente. Idealmente, un sólido; tendría  $G' = G^*$  y  $G'' = 0$ , mientras que un líquido  $G' = 0$  y  $G'' = G^*$ . En términos de estabilidad, una suspensión o pasta cerámica debería comportarse acorde a  $G'' > G'$  lo que sería un indicativo de un comportamiento viscoso puro.



**Figura 49.** Módulo elástico y viscoso en función de la deformación.

Las propiedades como sólido de un fluido en una frecuencia determinada son representadas por el módulo elástico ( $G'$ ), mientras que como líquido son explicadas por el módulo viscoso ( $G''$ ). Cuando  $G'$  y  $G''$  aumentan conforme aumenta la frecuencia ( $\omega$ ), predomina el carácter viscoso sobre el carácter elástico del material ( $G'' > G'$ ) en todo el intervalo de frecuencias estudiado. La frecuencia en la cual  $G'$  y  $G''$  se intersectan da lugar al tiempo característico o tiempo de respuesta del material. Con respecto a la pasta cerámica, se presenta un módulo elástico  $G'$  y un módulo viscoso  $G''$  con deformación a valores mayores ( $10^{-2}$ ) esto tomando como referencia una pasta blanca cerámica tradicional ( $10^{-3}$ ), verificando que es necesario un menor esfuerzo (en Pascales) para obtener una deformación en la cerámica. Lo que confirmaría un comportamiento más viscoso de la pasta cerámica el cual se aleja de una tendencia "sólida". Por medio de la figura 49 y 50 se determinó la región viscoelástica de la pasta cerámica.

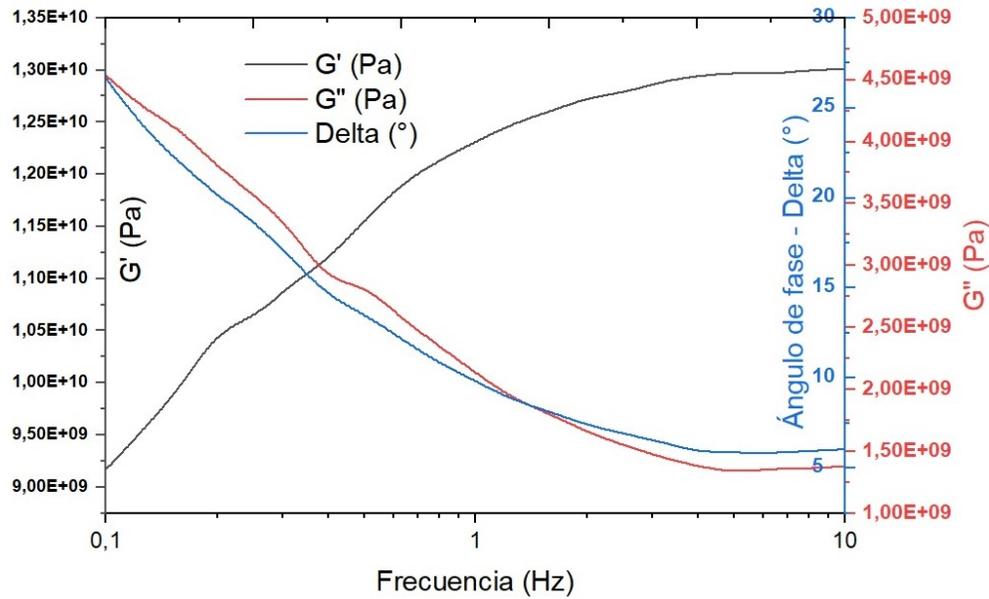
En este sistema no newtoniano, al aumentar la deformación se mantiene ángulos bajos indicando que esta pasta cerámica presenta fluencia. También es propio de este sistema que al aumentar el esfuerzo aumenta el módulo elástico propios de sistema de alta fluencia.



**Figura 50.** Módulo elástico y viscoso en función del esfuerzo.

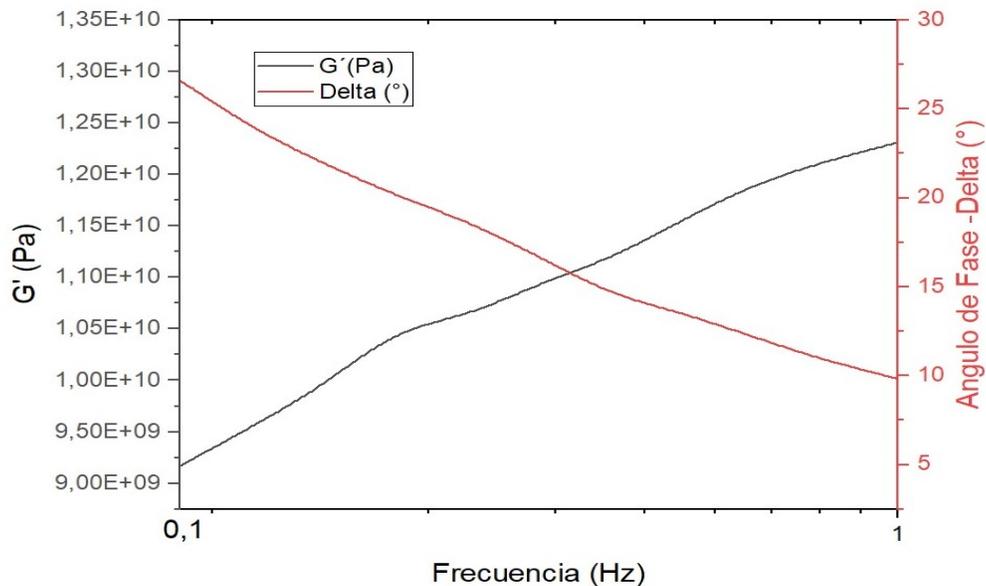
En la figura 51, el barrido de frecuencia muestra, por el cambio de ángulo de fase, un comportamiento menos elástico, este comportamiento va desde los 26° a menos de los 10° a lo largo de la aplicación de la misma amplitud en un barrido de frecuencia. La muestra presenta una disminución del ángulo de fase y del módulo viscoso a lo largo del barrido de frecuencia. Durante el barrido de frecuencia se confirma la reducción módulo  $G^*$  (Pa) a lo largo de todos los rangos de frecuencia, mientras que el ángulo de fase aumenta. Fluidos no-newtonianos dependientes del tiempo. El comportamiento de estos fluidos, además de depender de la velocidad de deformación, está sujeto a la historia de deformación del fluido y del tiempo que ha estado sometido a un esfuerzo de cizalla.

Durante el aumento de frecuencia se reduce la viscosidad compleja y al aumentar el esfuerzo aumenta la viscosidad compleja.



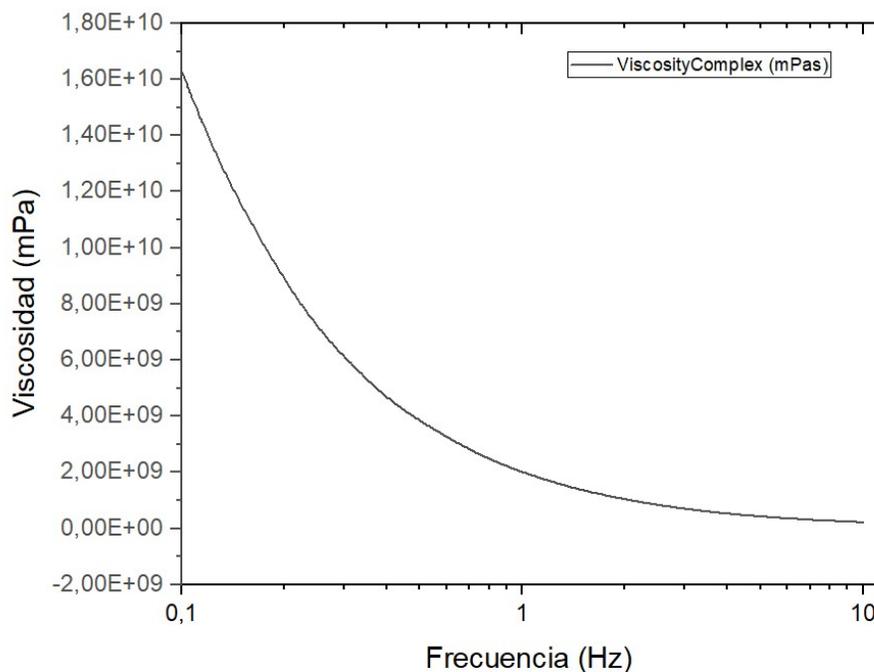
**Figura 51.** Módulo elástico y viscoso en función de la frecuencia.

La figura 52, muestra el comportamiento del módulo complejo ( $G^*$ ) respecto al tiempo y el ángulo de fases. Al representar el módulo complejo o el ángulo de fase, se evidencian cambios de pendientes para ambos, asociado principalmente a la transición de comportamiento elástico a viscoso, el cual hace referencia directa al punto de fluidez de la pasta cerámica.



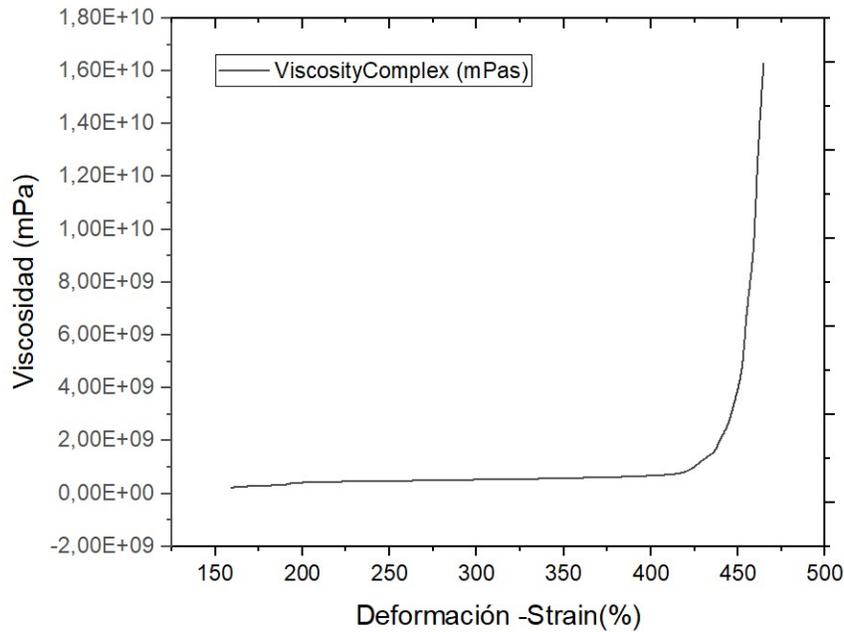
**Figura 52.** Módulo complejo y ángulo de fase en función del tiempo.

Cabe recordar que los fluidos no newtonianos tienen 2 características principales asociadas a su relación con el tiempo y con la deformación, acorde a ello pueden presentar clasificaciones. Acorde con esta clasificación, en la figura 53, indica como la pasta cerámica puede caracterizarse como fluido reopéctico (dependiente del tiempo), que son aquellos que aumentan la viscosidad aparente bajo esfuerzo de cizalla constante, seguido de la disminución de la viscosidad al aumentar el tiempo de reposo.



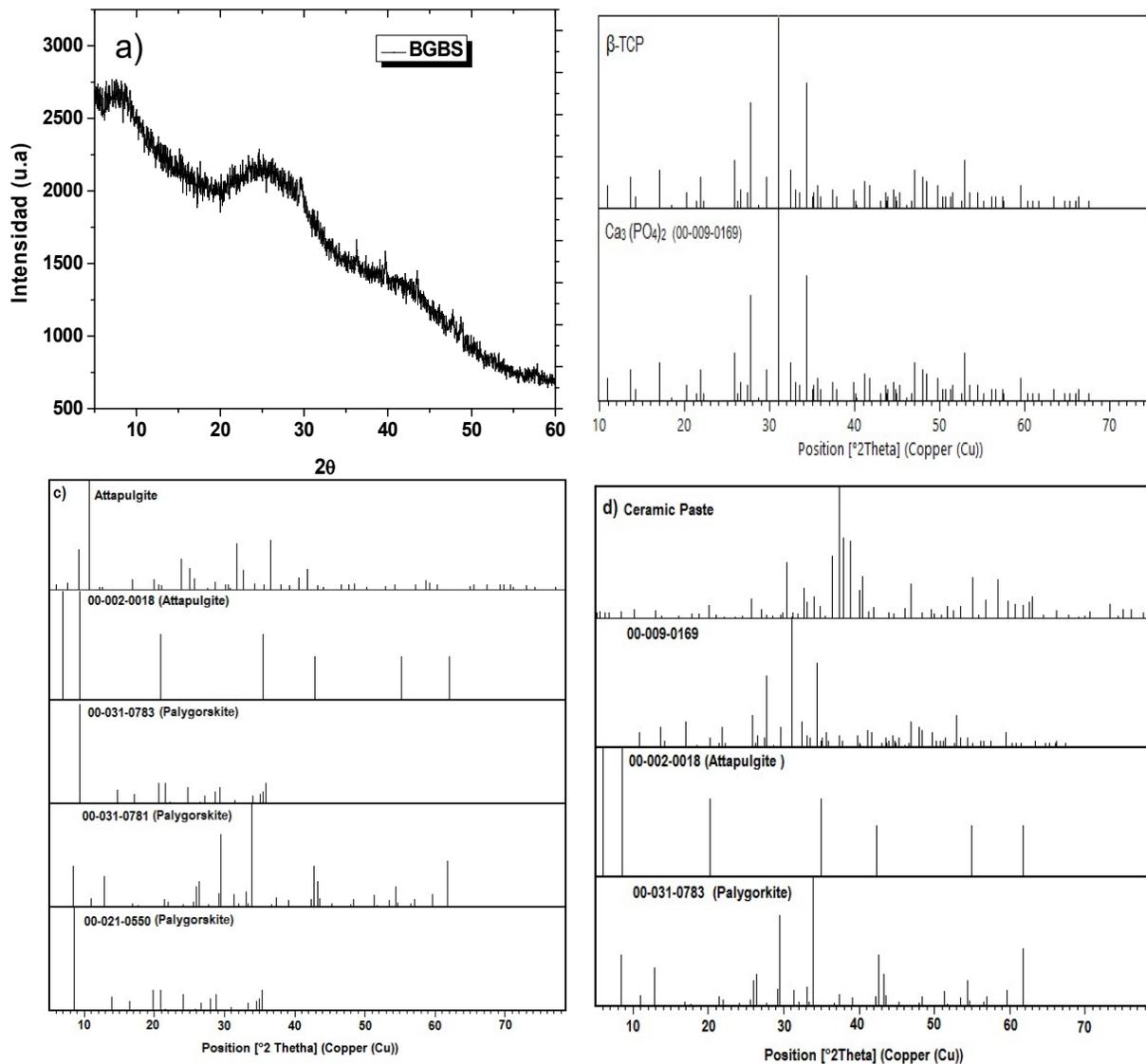
**Figura 53.** Viscosidad en función de la frecuencia.

Por su parte la figura 54, da cuenta de una pasta cerámica que aumenta su viscosidad al aumentar la velocidad de deformación (dilatante).



**Figura 54.** Viscosidad en función de la deformación.

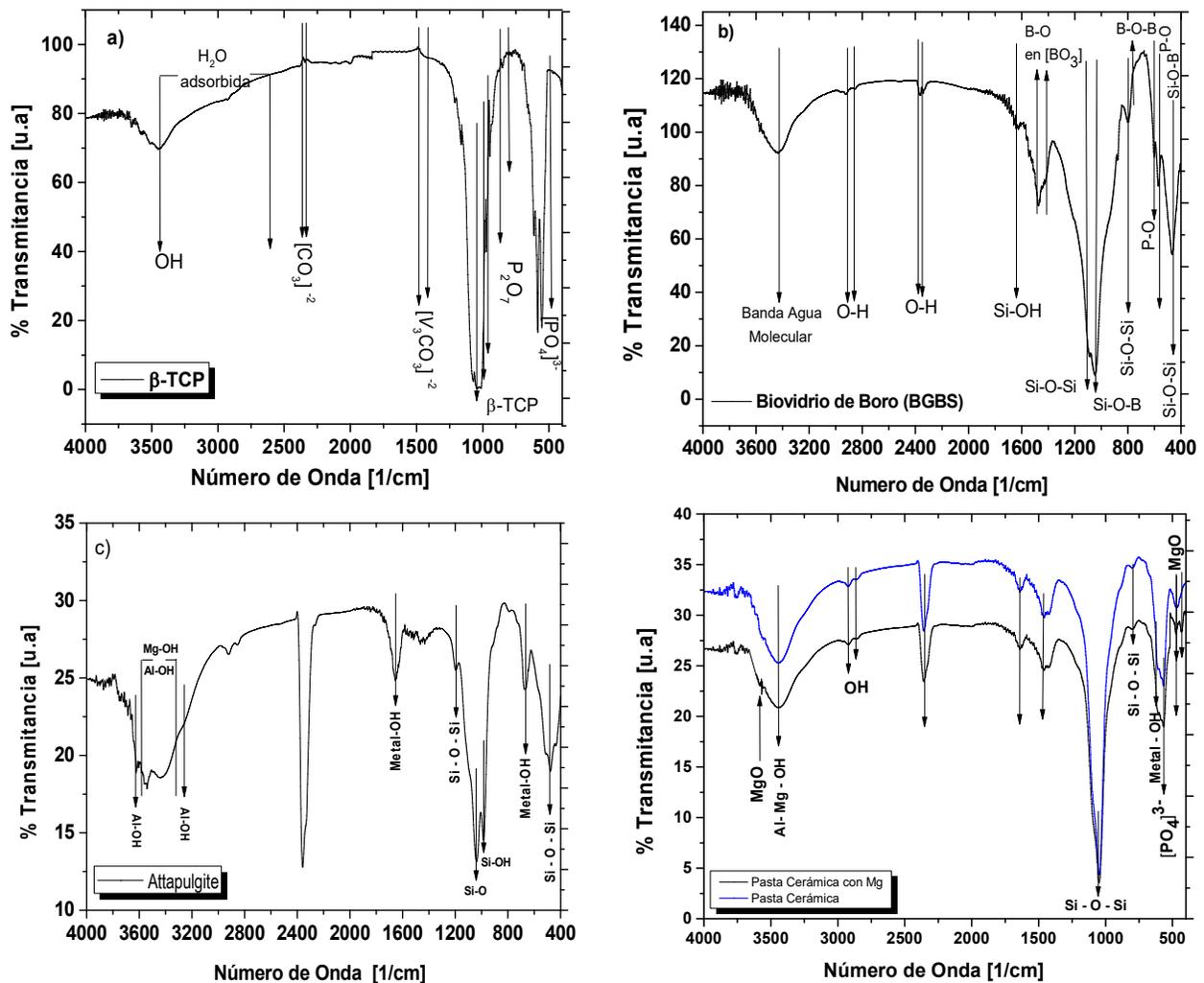
Los Difractogramas de Rayos X del biovidrio de boro y el fosfato de calcio fueron explicados en el capítulo 2. Para los biovidrios de boro (figura 55 (a)) se evidenciaron características de un material de naturaleza no cristalina o amorfa, en los cuales no existe un ordenamiento estructural, esto se encuentra asociado con la ausencia de picos de difracción. Dando como resultado un difractograma que reflejó su naturaleza amorfa [11]. La figura 55 (b), muestra el difractograma de rayos X de las muestras obtenidas por combustión para fosfato de calcio, demostrando la formación de la fase beta de fosfato tricálcico ( $\beta$ -TCP) cuyos patrones se indexan con el estándar (JCDPDS 00-009-0169) [12]–[15]. La Figura 55 (c) muestra el difractograma de rayos X de la atapulgita, que es una arcilla y controla la plasticidad, indexando con el patrón asociado con Silicato de Aluminio Magnésico o palygorskita [16]–[18] (JCPDS 00-031-0781, JCPDS 00-031 -0783 y JCPDS 00-021-0550) y atapulgita (JCPDS 00-002-0018). La Figura 55 (d) muestra el difractograma de rayos X de la pasta cerámica calcinada que evidencia un aumento en la intensidad de los picos de fosfato de calcio que confirman la presencia de  $\beta$ -TCP y una disminución en los picos de intensidad del biovidrio de boro y atapulgita.



**Figura 55.** Difractograma de: a) BGBS, b)  $\beta$ -TCP, c) Atapulgita o palygorskita, d) Pasta cerámica

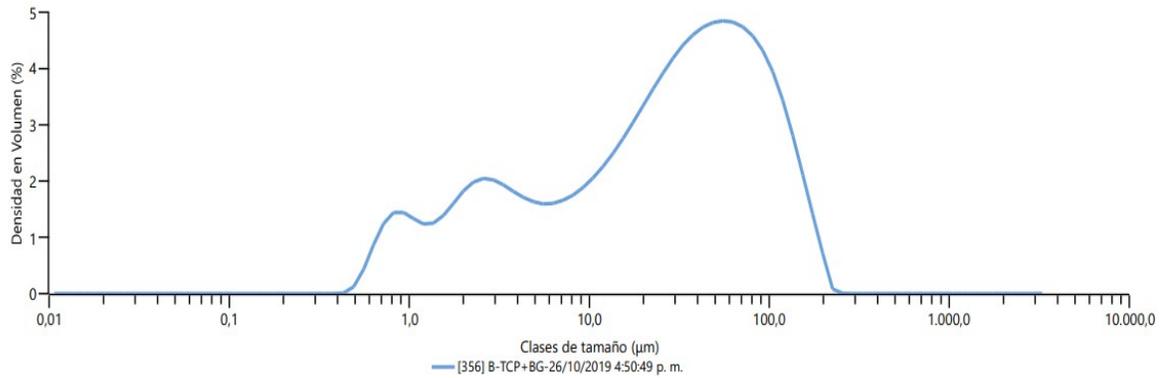
La Figura 56, muestra los espectros infrarrojos en longitudes de onda entre  $4000\text{ cm}^{-1}$  y  $400\text{ cm}^{-1}$  para a)  $\beta$ -TCP, b) biovidrio de boro, c) Atapulgita y d) Pasta cerámica. El espectro infrarrojo asociado al  $\beta$ -TCP (Figura 56 (a)) presenta picos en  $947,05\text{ cm}^{-1}$ ;  $974,05\text{ cm}^{-1}$ ;  $1014,60\text{ cm}^{-1}$  que demuestran la presencia de  $\beta$ -TCP o Whitlockita [13], [14]. Las bandas a  $553,94\text{ cm}^{-1}$ ;  $584,43\text{ cm}^{-1}$ ;  $615,19\text{ cm}^{-1}$ ;  $1014,60\text{ cm}^{-1}$ ;  $1074,40\text{ cm}^{-1}$  asociados a modos vibracionales de los grupos  $[\text{PO}_4]^{-3}$  característicos de la fase  $\beta$  [15] - [18]. Bandas en  $850,61\text{ cm}^{-1}$  y  $1212,47\text{ cm}^{-1}$  atribuidos a la presencia de grupos  $(\text{P}_2\text{O}_7)^{-4}$  [13]. El espectro infrarrojo de BGBS (Figura 54(b)) pueden identificarse los principales

modos vibracionales asociadas al  $B_2O_3$ , se encuentran tres regiones de absorción asociadas al  $B_2O_3$ : la primera región se encuentra comprendida entre  $1800\text{ cm}^{-1}$  y  $1200\text{ cm}^{-1}$ , en  $1549,88\text{ cm}^{-1}$  se encuentra un pico asociado al estiramiento B-O de las unidades trigonales  $[BO_3]$ ,  $1474,72\text{ cm}^{-1}$  estiramiento asimétrico de unidades  $[BO_3]$ . La segunda región está comprendida entre  $1200\text{ cm}^{-1}$  y  $700\text{ cm}^{-1}$ , en  $879,78\text{ cm}^{-1}$  se encuentra un pico asociado al estiramiento B-O de las unidades tetraédricas  $[BO_4]$ . Bandas en  $879,78\text{ cm}^{-1}$  y  $1049,31\text{ cm}^{-1}$  estiramiento de las vibraciones del enlace B – O – Si. Estos cambios estructurales y físicos que se producen en la red de vidrio pueden ser influyentes en la disolución y degradación del vidrio [19]. En  $798,92\text{ cm}^{-1}$  estiramiento O-Si-O y una región de aproximadamente  $705,46\text{ cm}^{-1}$  para la flexión de los enlaces B-O-B de la red de boro [19]–[23]. La última región se encuentra comprendida entre  $700$  y  $400\text{ cm}^{-1}$  donde, la presencia de picos a  $468,76\text{ cm}^{-1}$  y  $569,52\text{ cm}^{-1}$  representa enlaces Si-O-B que confirman la presencia de unidades de silicio en la red de boro [21], [23], [24]. Se atribuye la banda ancha a  $3448,72\text{ cm}^{-1}$  y fina a  $1625,05\text{ cm}^{-1}$  a los modos vibratorios de estiramiento y flexión de enlaces O–H de las moléculas de agua y estiramiento Si-OH de grupos silanoles superficiales respectivamente [22], [25], [26]. Las bandas características de los grupos fosfatos  $(PO_4)^{3-}$  ubicadas a  $467,19\text{ cm}^{-1}$  [27],  $568,6\text{ cm}^{-1}$  y  $1089,23\text{ cm}^{-1}$ . El espectro infrarrojo de la atapulgita (figura 54 (c)), muestra las principales bandas de vibración características de los grupos hidroxilo unidos a los metales presentes, en las regiones  $3624,25\text{ cm}^{-1}$  y  $3266,81\text{ cm}^{-1}$  se refieren a las vibraciones Al-OH. Otras bandas también presentes en el espectro en  $3580,79\text{ cm}^{-1}$ ,  $3540,37\text{ cm}^{-1}$ ,  $3400,93\text{ cm}^{-1}$  y  $3266,81\text{ cm}^{-1}$  se atribuyen a un estiramiento vibratorio característico de Al-OH, Mg-OH [28]–[30]. Bandas en una región de menor número de onda se identifica en los espectros a  $1195,29\text{ cm}^{-1}$  asociada a los estiramiento Si - O - Si, estiramiento Si - O ubicada a  $1041,26\text{ cm}^{-1}$  [28], en  $986,25\text{ cm}^{-1}$  asociada a la flexión Si – OH y  $670,15\text{ cm}^{-1}$  correspondiente a las vibraciones de estiramiento simétrico de Si – O – Mg y Si – O – Al [31]. En la figura 54 (d), muestra las principales bandas de vibración características de la pasta cerámica, una banda a  $3449,15\text{ cm}^{-1}$  atribuidos a un estiramiento vibratorio característico de Al-Mg-OH [30], y en  $1050,55\text{ cm}^{-1}$  asociadas a las bandas características en infrarrojo de los grupos  $[PO_4]^{3-}$  y  $SiO_2$ , así como bandas superpuestas en  $791,01\text{ cm}^{-1}$



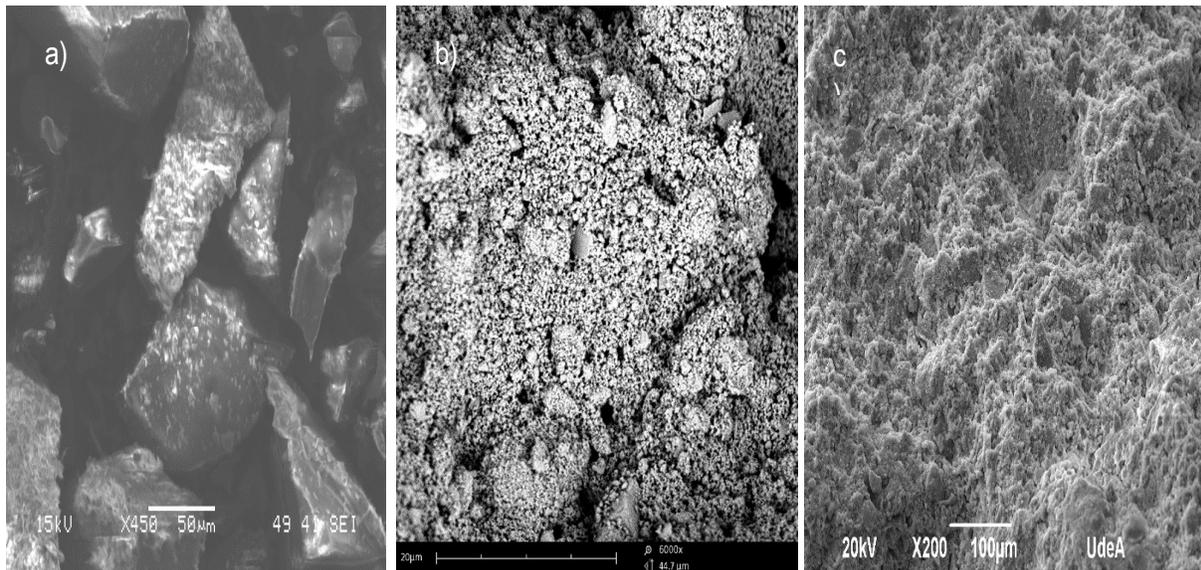
**Figura 56.** Espectro Infrarrojo de: a)  $\beta$ -TCP, b) BGBS, c) Atapulgite y d) Pasta cerámica

La figura 57, muestra el diagrama de distribución del tamaño de partícula de la pasta cerámica. En el diagrama, se muestran que las partículas de la pasta cerámica presentan tamaños que oscilan entre 1,82  $\mu m$  y 233  $\mu m$ , más del 60% de las partículas tenían un tamaño entre 28,7  $\mu m$  y 81, 8  $\mu m$ .



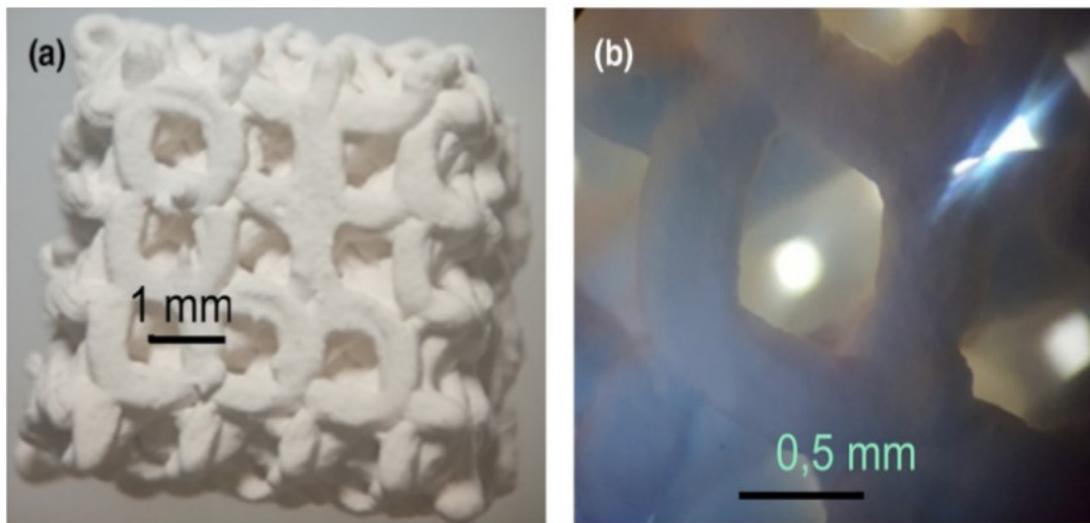
**Figura 57.** Diagrama de distribución del tamaño de partícula de partículas de la pasta cerámica.

Las fotomicrografías fueron obtenidas por Microscopía Electrónica de Barrido (SEM) para el BGBS,  $\beta$ -TCP y la pasta cerámica (Figura 58). Para el BGBS (Figura 58 (a)) se evidencia morfologías irregulares, con tamaños superiores a los 50  $\mu\text{m}$  con una formación de agregados debidos principalmente a partículas que parecen encontrarse en rangos submicrométricos. En la figura 58(b) y 58(c), puede observarse que se tiene una morfología que evidencia diferentes tamaños de partícula, en general se aprecia la formación de agregados.



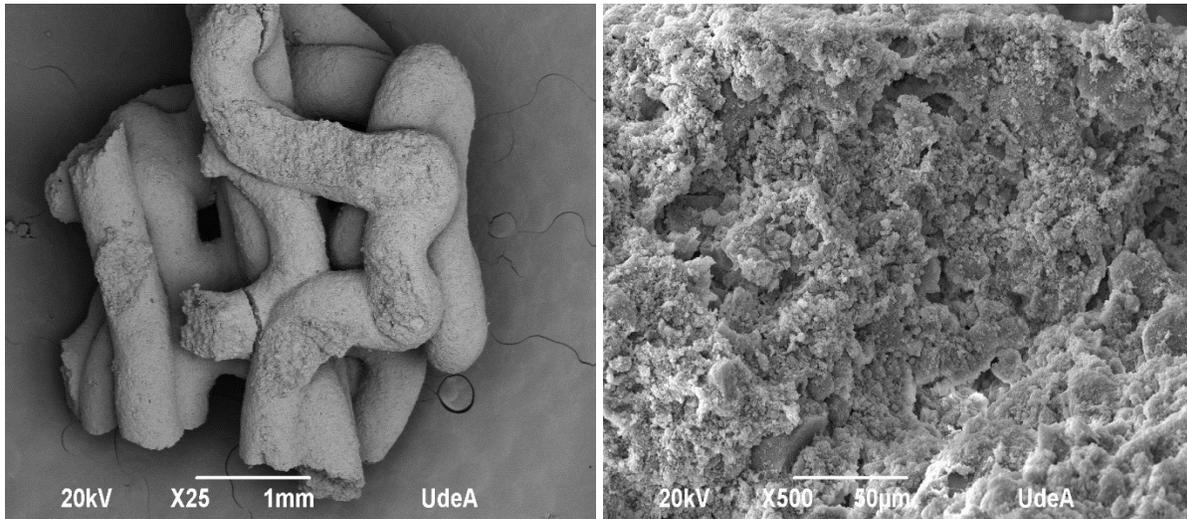
**Figura 58.** Fotomicrografías de Microscopía Electrónica de Barrido (SEM) de: a) BGBS, b)  $\beta$ -TCP, c) Pasta cerámica

El diseño del scaffold se basó en superficies mínimas periódicas triples (TPMS) con forma de diamante tal como se explicó en el capítulo 1, ítem 1.3.1.2.1.2 (Figura 59). Para la impresión 3D, se utilizó el software Slicing Cura 3D Printing versión 15.04.2 para configurar los parámetros de impresión. Para la impresión, se utilizó una impresora Wasp modelo Delta 20 × 40. La pasta fue conformada por BGBS,  $\beta$ -TCP, atapulgita y agua, con y sin dopado de magnesio fue cargada. La pasta cerámica en jeringa de 5 ml con una aguja 23G (0,3 mm de diámetro interno) con una presión de 101 PSI aproximadamente, esto con el fin de obtener las piezas en 3D (scaffold). La impresión de la pasta cerámica fue realizada a temperatura ambiente. Después de la impresión, las piezas se secaron a 100 °C durante 5 h hasta alcanzar un peso constante. Finalmente, los scaffold fueron sinterizados a 950 °C / 3 h.



**Figura 59.** Fotografía del Scaffold obtenido mediante impresión 3D. a y b) Imágenes Estereomicroscópicas.

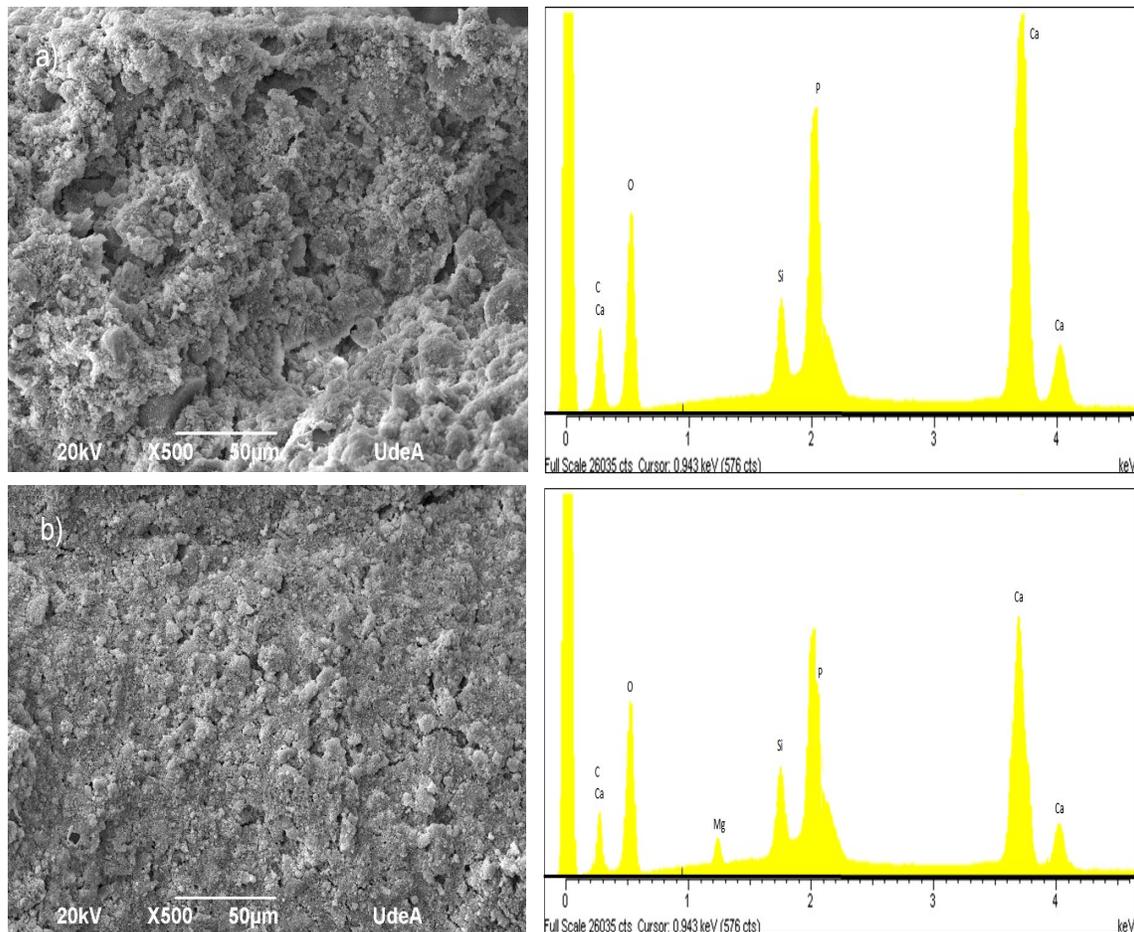
Las características superficiales de los scaffold fueron evidenciadas mediante microscopía electrónica de barrido (SEM). En la figura 60, se evidencia la formación de aglomerados en la superficie de los scaffolds, la interconectividad de los macroporos, también se evidencian algunos pequeños poros que van al interior del scaffold. La porosidad está entre 0.5 a 1 mm en geometría rombohedral o en forma diamante propia de la TPMS seleccionada.



**Figura 60.** Fotomicrografías de Microscopía Electrónica de Barrido (SEM) del Scaffold obtenido mediante impresión 3D

En la figura 61, se muestran las microfotografías obtenidas por SEM con su respectivo EDS para el scaffold sin dopar (figura 61 (a)) y dopado 5% w con magnesio (figura 61 (b)). Se observa una estructura porosa con aglomeraciones, con el EDS puede comprobarse la composición química, la Si es aportada por el BGBS y el Mg es aportado por el dopaje que se le realizó al  $\beta$ -TCP. También se evidencia una disminución en la intensidad de los picos de  $\text{Ca}^{+2}$ , lo que puede estar relacionado con el dopaje del  $\beta$ -TCP con Mg.

En la tabla 28, se muestran los resultados obtenidos con respecto a la porosidad e interconectividad de poros obtenidas para los scaffolds con y sin dopaje 5%w Mg. Para los scaffold dopados con Mg, se evidenció una porosidad total de 69,020% e interconectividad de poros de 93,345%, mientras que para los scaffolds sin dopaje con Mg la porosidad total fue de 68,788% e interconectividad de poros de 86,541% aproximadamente. Los scaffolds dopados con 5%w Mg, presentan valores mayores en cuanto a interconectividad de poros, porosidad másica y porosidad abierta comparados con los scaffolds sin dopaje.



**Figura 61.** Fotomicrografías de Microscopía Electrónica de Barrido (SEM) y EDX de: a) Scaffold sin dopar, b) scaffold dopado con 5%w Mg.

Cabe recordar, que la estructura del tejido óseo varía de acuerdo a su ubicación en el cuerpo humano. Por lo tanto, la selección de configuraciones, así como los biomateriales apropiados, dependerán del sitio anatómico para la regeneración y otros factores adicionales, la ECM debe tener una alta porosidad y un tamaño de poro adecuado para preservar la migración celular, la deposición de tejido y la administración de nutrientes. Posteriormente, la ECM matriz con debe diseñarse para guiar la formación de hueso, con la cual la tasa de degradación debe coincidir con la tasa de deposición del nuevo tejido, no debe ser ni demasiado rápida ni demasiado lenta [32]. Si el tamaño de poro es muy pequeño, no habría migración celular y, por ende, el intercambio de nutrientes y demás actividades celulares se verá interrumpidas. Caso contrario ocurriría, si el tamaño de poro es grande, la unión de las células para realizar funciones que así lo requieran sería una

limitante. El porcentaje de porosidad, también es importante, valores superiores a 10% de porosidad indican que existe una interconectividad [2], [33] resultado de una mayor porosidad [2]. Por ende, entre más alta sea la porosidad más alta es la probabilidad de interconexión de los poros. Los valores de porosidad del hueso trabecular se encuentran reportados entre el 30% y 90% [2], [34] y del hueso cortical entre el 5% y 30% [34]. A partir de los resultados obtenidos para el tamaño de poro y la porosidad, dentro del contexto de ingeniería de tejidos; el scaffold que se está simulando en este trabajo de investigación es propio de una estructura de hueso esponjoso o trabecular, debido a que los porcentajes de porosidad de los scaffolds evaluados se encuentra en el rango de porosidad reportada en la literatura para este tipo de hueso.

**Tabla 28.** Porosidad e Interconectividad de poros de los scaffolds.

		Scaffold	
		Con 5 %w Mg	Sin 5 %w Mg
<b>Porosidad másica</b>	$\phi_m$	68,585 $\pm$ 0,8	63,723 $\pm$ 0,3
<b>Porosidad abierta</b>	$\phi_a$	64,427 $\pm$ 0,1	59,530 $\pm$ 0,01
<b>%Poros interconectados</b>	$P_i$	93,345 $\pm$ 1,2	86,541 $\pm$ 0,8
<b>Porosidad total</b>	$\phi_t$	69,020 $\pm$ 0,9	68,788 $\pm$ 1,0
<b>Densidad real</b>	$\rho_r$	0,938 $\pm$ 0,1	0,933 $\pm$ 0,01
<b>Densidad aparente</b>	$\rho_b$	0,290 $\pm$ 0,5	0,291 $\pm$ 0,2

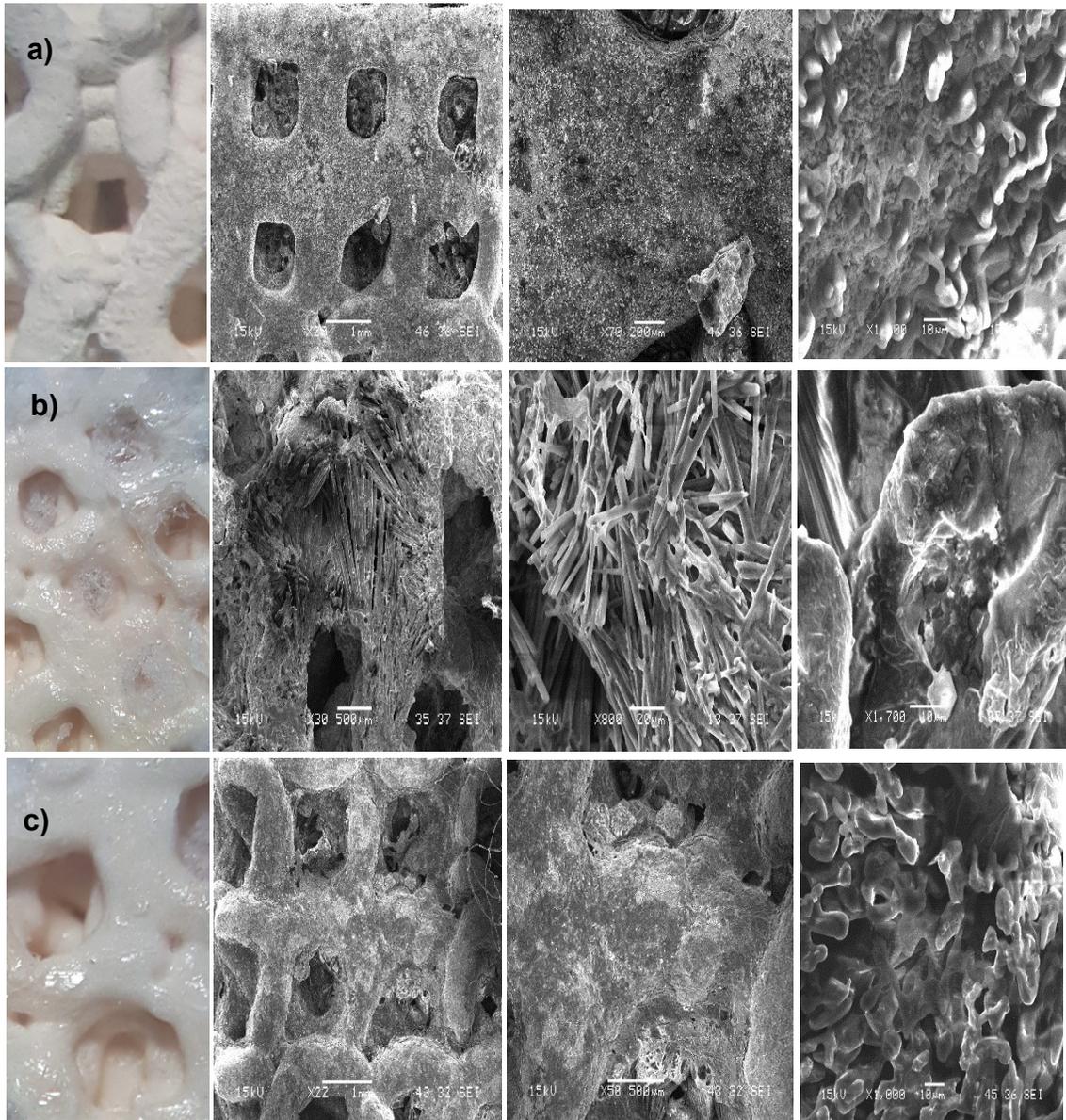
En la tabla 29, se muestra la degradabilidad de los scaffolds dopados y sin dopar con Mg, cuando se encuentran inmersos en una solución extrema. El scaffold dopado con Mg, presentó un %D de 89,195 mientras que el scaffold sin dopaje de Mg presentó un %D de 86,924. Siendo el scaffold dopado con magnesio quien presentará una mayor degradabilidad.

**Tabla 29.** Degradabilidad Scaffolds en solución extrema bajo la norma ISO 10993.

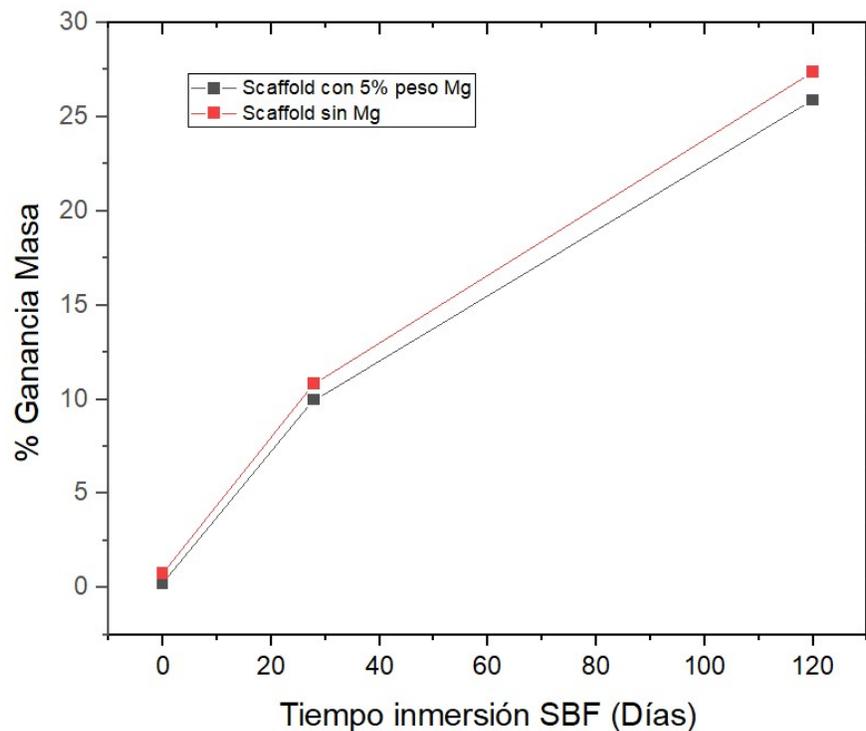
<b>Scaffold</b>	<b>Degradabilidad (%D)</b>
<b>Con 5 %w Mg</b>	89,195
<b>Sin 5 %w Mg</b>	86,924

Como el scaffold dopado con magnesio presentó mayor degradabilidad, se procedió a realizar el segundo ensayo de la prueba y fue sumergido en TRIS – HCL con el fin de simular el pH del cuerpo humano.

La figura 62, muestra las fotografías y fotomicrografías de microscopía electrónica de barrido para los scaffold con 5%w Mg inmersos en SBF a 0, 28 y 120 días respectivamente. A medida que el tiempo de inmersión aumenta, la cantidad de partículas de apatita es depositada de forma gradual. En el día cero (Figura 62 (a)), puede evidenciarse la formación de pequeños aglomerados de apatita. El análisis EDS realizado en la superficie de la muestra reveló la presencia de calcio y fósforo con una relación  $Ca/P= 1.67$ . Las imágenes SEM del scaffold inmerso 28 días en SBF (Figura 62 (b)) muestran la formación de una capa en la superficie de cristales en forma de aguja que comienzan a cubrir por completo la superficie. Esta morfología puede estar asociada a la precipitación de compuestos iniciales de Ca-P produciendo una sobresaturación en la solución, que induce a una reprecipitación de los cristales [35]. La bioactividad del fosfato de calcio y otros materiales se ha relacionado con su preferencia a nuclear cristales de apatita [35], [36]. La figura 62 (c), muestra los scaffold inmersos en SBF pasados 120 días, donde puede evidenciarse que a pesar de la reprecipitación que se evidenció a los 28 días, hay una capa continua de HA que cubre toda la superficie lo que evidencia el carácter bioactivo que presenta el scaffold.



**Figura 62.** Fotomicrografías de Microscopía Electrónica de Barrido (SEM) y estereomicrofotografía del scaffold dopado con 5%w Mg inmerso en SBF en un tiempo de: a) 0 días, b) 28 días y c) 120 días.



**Figura 63.** Porcentaje de Masa ganado en scaffold dopado con 5%w Mg inmerso en SBF en un tiempo de: a) 0 días, b) 28 días y c) 120 días.

La figura 63, muestra el porcentaje de ganancia de peso que tiene los scaffolds cuando son inmersos en SBF en 0, 28 y 120 días, evidenciando como a medida que pasa el tiempo de inmersión el scaffold presenta una ganancia en su peso inicial debido principalmente a los depósitos de HA que se comienzan a formar en la superficie de estos.

## 3.6 Conclusiones

El diseño de experimentos es una herramienta eficaz y segura utilizada para optimizar la formulación de una pasta cerámica. El DOE, proporcionó un modelo predictivo estadísticamente validado, el cual mediante ajustes se adecuó de manera asertiva a un proceso de optimización. Por medio de este, se encontró la región de trabajo y las proporciones óptimas donde se pueden reducir los tiempos de formulación y el consumo de materia prima de manera indiscriminada ya que éste suministra de manera efectiva las

proporciones a utilizar de cada componente con el objetivo de obtener la mejor variable respuesta.

Por medio del diseño de experimentos fue posible formular de manera efectiva la pasta cerámica, garantizando las propiedades intrínsecas del material, así como las del diseño estructural del scaffold. Las proporciones (% peso) óptimas para la formulación de la pasta cerámica encontradas acorde al DOE corresponden a: 3% atapulgita; 2% agua; 28.5% biovidrio de boro y 66.5% fosfato de calcio con una deseabilidad de 0.98%.

Las pruebas dinámicas realizadas a la pasta cerámica permitieron caracterizar su comportamiento como fluido no newtoniano, gracias a la correlación de los parámetros reológicos, puede considerarse formulación de la pasta cerámica obtenida en el DOE como la formulación más adecuada en cuanto a características de consistencia y estabilidad.

La manufactura aditiva permite la obtención de scaffolds por diferentes técnicas con los cuales se pretende avanzar en la ingeniería de tejido, si bien; estas técnicas permiten simular el hueso nativo, la impresión 3D permitió la conformación de scaffold a partir de una pasta cerámica netamente inorgánica. Tanto la obtención del material, el diseño del scaffold y la impresión 3D del mismo, son metodologías que presentan varias ventajas, (1) permite obtener materiales cerámicos con el fin de formular una pasta que apunte principalmente a las características físico-químicas del hueso, (2) puede construirse un scaffold por impresión 3D a las necesidades óseas específicas de cada paciente, (3) Comparado con metodologías existentes, la impresión 3D exhibe potencial a la hora de interconectar los poros, de imitar las características del tejido óseo que posteriormente permitirán una buena interacción celular.

Los scaffolds presentaron una porosidad acorde a los rangos establecidos en el tejido óseo y obteniendo rangos exploratorios para los reportados en el hueso esponjoso o trabecular. En general, los scaffold presentaron alta porosidad e interconectividad de poro con desviaciones estándar relativamente bajas.

A diferentes tiempos de inmersión, los scaffold evidenciaron buena bioactividad gracias al crecimiento de forma gradual de una capa apatítica que evidenció un recubrimiento en la

superficie del scaffold. Propiedades como esta permiten que estos scaffold sean potencialmente utilizados en regeneración ósea.

## Referencias Bibliográficas

- [1] H. Gutiérrez Pulido and R. de la Vara Salazar, *Análisis y Diseño de Experimentos*. 2012.
- [2] J. G. Ocampo, D. M. E. Sierra, and C. P. O. Orozco, "Métodos de fabricación de cuerpos porosos de hidroxiapatita, revisión del estado del arte," *Rev. ION*, vol. 27, no. 2, 2014.
- [3] S. Restrepo, S. Ocampo-Gutiérrez, J. Ramírez, C. Paucar, and C. García, *Mechanical properties of ceramic structures based on Triply Periodic Minimal Surface (TPMS) processed by 3D printing*, vol. 935. 2017.
- [4] J. Liu and X. Miao, "Porous alumina ceramics prepared by slurry infiltration of expanded polystyrene beads," *J. Mater. Sci.*, vol. 40, no. 23, pp. 6145–6150, 2005.
- [5] J. Hernández-Gutiérrez, L.E., Santamarta, J.C., Tomás, R., Cano, M., García-Barba and A. Piñero-García, "Prácticas de Ingeniería del Terreno," 2013. .
- [6] T. Kokubo and H. Takadama, "How useful is SBF in predicting in vivo bone bioactivity?," *Biomaterials*, vol. 27, no. 15, pp. 2907–2915, 2006.
- [7] H. Takadama and T. Kokubo, "In vitro evaluation of bone bioactivity," in *Bioceramics and their Clinical Applications*, 2008, pp. 165–182.
- [8] O. Yaguas, "METODOLOGÍA DE SUPERFICIE DE RESPUESTA PARA LA OPTIMIZACIÓN DE UNA PRODUCCIÓN AGRÍCOLA RESPONSE SURFACE METHODOLOGY FOR THE OPTIMIZATION OF AN AGRICULTURAL PRODUCTION," *Rev. Ingeniería Ind.*, vol. Vol. 16 Nú, pp. 205–222, Aug. 2016, doi: 10.22320/S07179103/2017.13.
- [9] J. Laffarga Osteret, "Reología de las pastas crudas," *Mater. Construcción; Vol 7, No 083*, 2016, doi: 10.3989/mc.1957.v07.i083.2077.
- [10] J. L. Martínez Medina, "Reología En Geles Y Pastas Alimentarias: Aplicación De

- Las Curvas De Flujo Y Límite De La Elasticidad En Emulsiones.,” Universidad Nacional Agraria La Molina., 2017.
- [11] A. Hadji, A. Merah, O. Guellati, and M. Guerioune, “Synthesis and characterization of the bioactive ternary SiO<sub>2</sub>-CaO-P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> Bioglass,” *Int. J. Eng. Appl. Sci.*, vol. 5, no. 2.
- [12] M. Goldberg *et al.*, “Influence of aluminum substitutions on phase composition and morphology of  $\beta$  - tricalcium phosphate nanopowders,” *Ceram. Int.*, Jul. 2017, doi: 10.1016/j.ceramint.2017.07.112.
- [13] D. Zhou *et al.*, “Comparative study of porous hydroxyapatite/chitosan and whitlockite/chitosan scaffolds for bone regeneration in calvarial defects,” *Int. J. Nanomedicine*, vol. 12, pp. 2673–2687, Apr. 2017, doi: 10.2147/IJN.S131251.
- [14] M. Seidenstuecker, Y. Mrestani, R. Neubert, A. Bernstein, and H. Mayr, *Release Kinetics and Antibacterial Efficacy of Microporous -TCP Coatings*, vol. 2013. 2013.
- [15] M. Huang *et al.*, “Controlling the strontium-doping in calcium phosphate microcapsules through yeast-regulated biomimetic mineralization,” *Regen. Biomater.*, vol. 3, no. 5, pp. 269–276, 2016.
- [16] K. Cruz Magalhães Xavier *et al.*, *Effects of Acid Treatment on the Clay Palygorskite: XRD, Surface Area, Morphological and Chemical Composition*, vol. 17. 2014.
- [17] L. G. Domingos, A. C. da Silva, E. N. Ito, and W. Acchar, “Characterization of natural attapulgitic clay and treated attapulgitic,” 2012, [Online]. Available: [http://inis.iaea.org/search/search.aspx?orig\\_q=RN:46081571](http://inis.iaea.org/search/search.aspx?orig_q=RN:46081571).
- [18] R. N. Oliveira, W. Acchar, G. Soares, and L. Barreto, *The Increase of Surface Area of a Brazilian Palygorskite Clay Activated with Sulfuric Acid Solutions Using a Factorial Design*, vol. 16. 2013.
- [19] P. Balasubramanian, T. Büttner, V. M. Pacheco, and A. R. Boccaccini, “Boron-containing bioactive glasses in bone and soft tissue engineering,” *J. Eur. Ceram. Soc.*, vol. 38, no. 3, pp. 855–869, 2018, doi: <https://doi.org/10.1016/j.jeurceramsoc.2017.11.001>.
- [20] S. Agathopoulos *et al.*, “Structural analysis and devitrification of glasses based on

- the CaO–MgO–SiO<sub>2</sub> system with B<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, Na<sub>2</sub>O, CaF<sub>2</sub> and P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> additives,” *J. Non. Cryst. Solids*, vol. 352, no. 4, pp. 322–328, 2006, doi: <https://doi.org/10.1016/j.jnoncrsol.2005.12.003>.
- [21] P. Balasubramanian *et al.*, “Ion Release, Hydroxyapatite Conversion, and Cytotoxicity of Boron-Containing Bioactive Glass Scaffolds,” *Int. J. Appl. Glas. Sci.*, vol. 7, no. 2, pp. 206–215, 2016.
- [22] C. Gautam, A. K. Yadav, and A. Kumar Singh, *A Review on Infrared Spectroscopy of Borate Glasses with Effects of Different Additives*, vol. 2012. 2012.
- [23] C. Gautam, A. K. Yadav, V. K. Mishra, and K. Vikram, “Synthesis, IR and Raman spectroscopic studies of (Ba, Sr) TiO<sub>3</sub> borosilicate glasses with addition of La<sub>2</sub>O<sub>3</sub>,” *Open J. Inorg. Non-metallic Mater.*, vol. 2, no. 4, pp. 47–54, 2012.
- [24] H. B. Pan *et al.*, “Strontium borate glass: potential biomaterial for bone regeneration,” *J. R. Soc. Interface*, vol. 7, no. 48, pp. 1025–1031, Jul. 2010, doi: [10.1098/rsif.2009.0504](https://doi.org/10.1098/rsif.2009.0504).
- [25] C. Gao, Q. Gao, X. Bao, Y. Li, A. Teramoto, and K. Abe, *Preparation and In Vitro Bioactivity of Novel Mesoporous Borosilicate Bioactive Glass Nanofibers*, vol. 94. 2011.
- [26] J. Wan, J. Cheng, and P. Lu, *Coordination state of B and Al of Borosilicate glass by IR spectra*, vol. 23. 2008.
- [27] M. Mehdipour, A. Afshar, and M. Mohebbali, *Electrophoretic Deposition of Bioactive Glass Coating on 316L Stainless Steel and Electrochemical Behavior Study*, vol. 258. 2012.
- [28] H. Cheng, J. Yang, R. L. Frost, and Z. Wu, “Infrared transmission and emission spectroscopic study of selected Chinese palygorskites,” *Spectrochim. Acta Part A Mol. Biomol. Spectrosc.*, vol. 83, no. 1, pp. 518–524, 2011, doi: <https://doi.org/10.1016/j.saa.2011.08.077>.
- [29] L. Boudriche, R. Calvet, B. Hamdi, and H. Balard, “Surface properties evolution of attapulgite by IGC analysis as a function of thermal treatment,” *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.*, vol. 399, pp. 1–10, 2012, doi: <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2012.02.015>.

- 
- [30] K. C. M. Xavier, M. S. F. Santos, J. A. Osajima, A. B. Luz, M. G. Fonseca, and E. C. Silva Filho, "Thermally activated palygorskites as agents to clarify soybean oil," *Appl. Clay Sci.*, vol. 119, pp. 338–347, 2016, doi: <https://doi.org/10.1016/j.clay.2015.10.037>.
- [31] W. Yan, D. Liu, D. Tan, P. Yuan, and M. Chen, "FTIR spectroscopy study of the structure changes of palygorskite under heating.," *Spectrochim. Acta. A. Mol. Biomol. Spectrosc.*, vol. 97, pp. 1052–1057, Nov. 2012, doi: [10.1016/j.saa.2012.07.085](https://doi.org/10.1016/j.saa.2012.07.085).
- [32] B. Thavornyutikarn, N. Chantarapanich, K. Sitthiseripratip, G. A. Thouas, and Q. Chen, "Bone tissue engineering scaffolding: computer-aided scaffolding techniques," *Prog. Biomater.*, vol. 3, no. 2–4, pp. 61–102, 2014.
- [33] S. Teixeira *et al.*, "Physical characterization of hydroxyapatite porous scaffolds for tissue engineering," *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 29, no. 5, pp. 1510–1514, 2009.
- [34] Mesa Ospina Deisy Natali, "Evaluación de las propiedades físico-químicas, mecánicas y biológicas de scaffolds de hidroxiapatita e hidroxiapatita con recubrimiento de quitosano obtenidas por diversos métodos," Universidad de Antioquia, 2017.
- [35] A. Elghazel, R. Taktak, J. Bouaziz, S. Charfi, and H. Keskes, "TCP-Fluorapatite Composite Scaffolds: Mechanical Characterization and In Vitro/In Vivo Testing," 2017.
- [36] A. Priya, S. Nath, K. Biswas, and B. Basu, "In vitro dissolution of calcium phosphate-mullite composite in simulated body fluid," *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, vol. 21, pp. 1817–1828, Jun. 2010, doi: [10.1007/s10856-010-4053-1](https://doi.org/10.1007/s10856-010-4053-1).

# **CAPÍTULO 4:**

## **EVALUACIÓN ACTIVIDAD BACTERIANA**

## 4. Evaluación Actividad Bacteriana

Valorar la capacidad antimicrobiana de un material cerámico requiere el uso de técnicas experimentales que miden la capacidad de los microorganismos para crecer en presencia de éste. Existen diferentes métodos *in vitro* específicos para determinar la susceptibilidad de las bacterias frente a agentes antimicrobianos, sin embargo, el tipo de técnica aplicada puede generar variaciones en cuanto a la susceptibilidad evaluada. Cada microorganismo presenta características estructurales y morfológicas propias, generando variaciones en los mecanismos de defensa y resistencia entre especies, por tanto la valoración de la capacidad antimicrobiana de un material cerámico se verá afectada por la técnica empleada para hacer su medición y por el microorganismo que se esté valorando [1], [2].

Existen algunas patologías que se pretenden solucionar con la implementación de estos materiales y principalmente corresponden a tratamientos de desmineralización dental, reabsorción dental y endodoncia. Sin embargo; cuando se trata de lesiones de la cavidad bucal es necesario considerar el efecto de los materiales diseñados sobre patógenos específicos de esta área. *Streptococcus mutans* y *Candida albicans* se han relacionado etiológicamente con la formación de placa dental que puede conducir al desarrollo de caries, lo que a su vez conduce a la destrucción de tejidos duros y al desequilibrio entre los procesos de mineralización y desmineralización del esmalte dental. La ingesta de carbohidratos fermentables genera una disminución del pH de la boca generando una reducción de especies no cariogénicas y prevalencia de especies ácidas resistentes [3]. Se sabe que *S. mutans* coloniza las superficies duras del diente ya que tiene mecanismos especializados para unir y retener la estructura del diente, esto es producido por sus factores de virulencia que confieren una fuerte adhesión a través de la acción de proteínas de superficie como los antígenos Ag IyII, B , PAc, p1 y SpaP, así como la producción de polisacárido extracelular sintetizado a partir de las enzimas glucosiltransferasa y fructosil transferasa de su pared celular, proteínas de unión a glucanos y su producción de ácido fortalecen y facilitan la adhesión y formación de biopelículas en el esmalte dental. Entre el 60 y el 80% de esta especie se ha encontrado en la microbiota de personas con caries [4]. *C. albicans* es una de las especies más comúnmente aisladas en humanos, con una prevalencia del 20% -40% en personas con buena salud bucal, mientras que en personas con lesiones de caries sus niveles se

elevan al 60% [5]. Se considera un hospedador habitual de la mucosa, sin embargo, en condiciones de bajo flujo salival, inmunosupresión, medicación, entre otras, puede convertirse en patógeno desencadenando condiciones de desmineralización dental, inflamación de las encías y / o candidiasis oral [6]. La formación de biopelículas multiespecíficas aumenta la probabilidad de supervivencia de varios microorganismos orales. Sin embargo, también puede suceder que los factores de virulencia de algunas especies se vean afectados por el crecimiento simultáneo de otras especies [50]. Se utilizan nuevas tecnologías para la síntesis de materiales cerámicos para asegurar que no se presenten fenómenos de toxicidad o rechazo en el tejido vivo, es fundamental estudiar la interacción entre el tejido vivo y el material implantado, para prevenir infecciones. Los protocolos utilizados en este trabajo comprenden pruebas de medida de la Zona de Inhibición, cuantificación de adhesión y viabilidad celular.

## 4.1 Viabilidad Celular

Para la valoración de la viabilidad celular se obtuvieron curvas de crecimiento de las cepas de *Streptococcus mutans* (ATCC25175) y *Candida Albicans* (ATCC25175) a partir de un inóculo que fue mezclado con los diferentes materiales a evaluar, en placas de 96 pozos hasta obtener un volumen total de 200  $\mu\text{L}$ , se utilizaron concentraciones de 2%w/vol y 70%w/vol para los fosfatos de calcio y concentraciones de 2%w/vol y 30%w/vol para los biovidrios sintetizados. Se sembraron pozos con inóculos sin adición de materiales cerámicos, para obtener una curva control del crecimiento de cada especie valorada. Además, se usaron pozos con medio de cultivo sin inocular junto con material cerámico en las proporciones de interés, con el fin de obtener medidas de referencia para luego restarlas en las curvas obtenidas y calcular con precisión el crecimiento celular de los microorganismos. Estas placas se incubaron a 37°C y agitación constante en un espectrofotómetro de microplacas (Multiskan GO, Thermo Scientific, EE.UU), se tomaron medidas de absorbancia a 600 nm cada 30 min durante 12 horas.

## 4.2 Cuantificación de Adhesión Celular

Para los ensayos experimentales fueron empleados Scaffold con Mg y Scaffold sin Mg, así como especímenes de control, los cuales fueron diseñados de forma compacta, sin poros para evaluar la incidencia de la geometría tridimensional en la adhesión, se

---

realizaron ensayos por triplicado. Los scaffolds fueron previamente esterilizados mediante autoclave a 121°C y 15 libras de presión durante 15 minutos con posterior secado en horno a 120°C durante 1 hora. Se prepararon inóculos de *S. mutans*, *C. albicans* y un co-cultivo entre las dos especies mencionadas, previamente reactivados e incubados durante 24 horas a 37°C en medio de cultivo líquido enriquecido, se ajustaron a 750 NTU (unidades Nefelométricas de Turbidez) correspondientes a una concentración de  $1 \times 10^9 \text{ UFC/mL}$  en medio Brain Heart Infusión (BHI). La preparación del co-cultivo se basó en la metodología reportada por *Falsetta et al* [7] con algunas modificaciones, para ello se cultivó por separado cada una de las bacterias y se ajustó turbidez a 750 NTU, luego se realizaron diluciones hasta obtener un inóculo con concentración de  $1 \times 10^6 \text{ UFC/mL}$ , se tomó igual volumen de cada uno de ellos y se juntaron en un tubo de vidrio estéril. En platos de 24 pozos estéril se colocaron las muestras de cada grupo evaluado y se sembraron 1000  $\mu\text{l}$  de los inóculos preparados. Se formaron dos grupos, en el primero los platos se incubaron durante 8 horas a 37°C, 5%  $\text{CO}_2$  y 120 rpm. En el segundo grupo los platos se incubaron durante 72 horas realizando cambio de medio de cultivo BHI cada 12 horas. Se descartó el medio y se realizaron dos lavados durante 5 minutos con solución salina al 0,9%, luego se agregaron 100  $\mu\text{l}$  de MTT (3-[4,5-dimetiltiazol-2-ilo]-2,5-difeniltetrazolium bromuro) diluido (1:10 en Solución salina) y 900  $\mu\text{l}$  de BHI. Se incubó durante 2 horas a 37°C, 120 rpm y 5%  $\text{CO}_2$  en ausencia de luz. Se descartó el medio y se agregaron 500  $\mu\text{l}$  de DMSO (Dimetilsulfóxido) se llevó a incubación durante 30 minutos a 37°C y 120 rpm en ausencia de luz. Se midió absorbancia a 550nm en un espectrofotómetro de microplacas (Multiskan GO, Thermo Scientific, EE. UU). Se realizó una curva de calibración con medidas de absorbancia de MTT vs concentración de UFC/ml, para ello se emplearon concentraciones de  $1 \times 10^3 \text{ UFC/ml}$  hasta  $1 \times 10^9 \text{ UFC/ml}$ . ( $r^2$ : 0.9933). Los resultados finales se expresan en UFC/ mL. Se realizaron cuatro réplicas del ensayo. La adhesión bacteriana también fue observada mediante Microscopía Electrónica de Barrido (SEM). Para ello se emplearon muestras de scaffolds dopados con Mg y sin Mg y de los especímenes de control, los cuales fueron inoculados con las especies evaluadas durante 24 y 72 horas, bajo condiciones de crecimiento óptimas para *S. mutans* y *C. albicans*. Las muestras se fijaron con glutaraldehído 3% y se deshidrataron con soluciones acuosas de etanol al 50, 60 70, 80 y 90%v/v. Para el recubrimiento se empleó una capa de Au-Pd.

### 4.3 Medida de Zona de Inhibición (IZ)

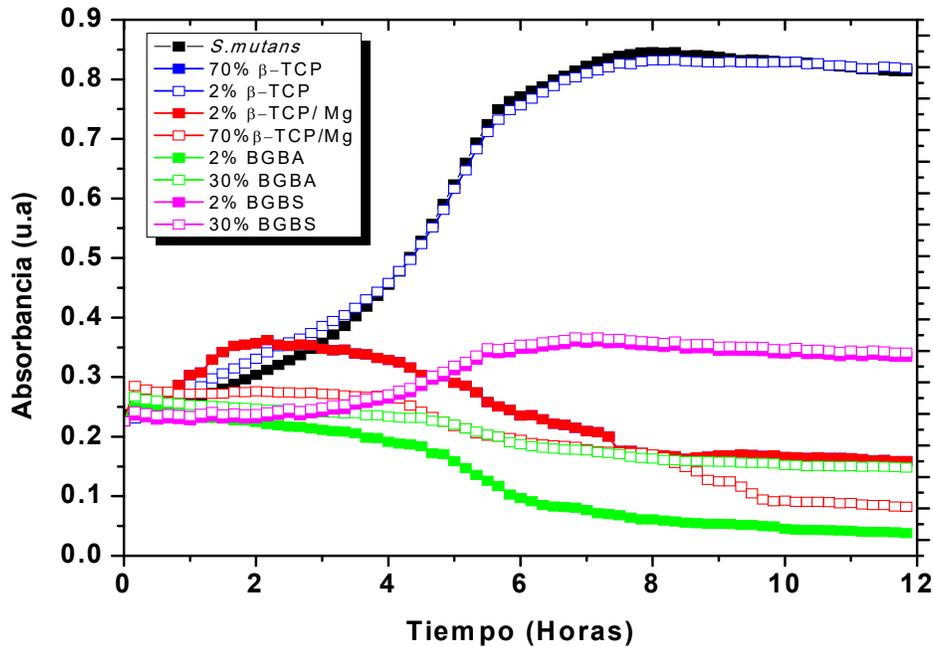
Los ensayos para medir la zona de inhibición (IZ) del crecimiento microbiano se basan en el método de difusión por disco de Kirby-Bauer [2]. La actividad antimicrobiana de scaffold con y sin Mg se evaluó frente a la cepa *Streptococcus mutans* (ATCC25175) y *Candida Albicans* (ATCC25175), para esto se reactivó cada uno de los microorganismos en medio de cultivo enriquecido Broth Brain Heart Infusion (BHI), se incubaron durante 24 horas a 37°C. Se preparó el inóculo en solución salina al 0,9%, midiendo la concentración celular de microorganismos en un turbidímetro hasta obtener 90NTU correspondiente a  $1 \times 10^8$  UFC/ml, luego el medio agar Mueller Hinton fue inoculado con extendido mediante hisopo. Se impregnaron discos de papel Advantec de 6.0 mm de diámetro con solución salina y clorhexidina (0,2%), los cuales se emplearon como controles negativo y positivo respectivamente, se sembraron discos de cada uno de los materiales puros (BGBS, BGBA,  $\beta$ -TCP y  $\beta$ -TCP/Mg) y scaffolds dopados con Mg y sin dopar, éstos se sembraron en el medio sólido inoculado. Se incubaron las placas a 37°C por 24, 48 y 72 horas en condiciones de 5% de  $CO_2$  para *Streptococcus mutans* y totalmente aeróbicas para *Candida albicans*. Este ensayo se hizo por triplicado y la actividad antimicrobiana se evaluó midiendo el diámetro de la zona de inhibición del crecimiento (IZ) en milímetros (sin incluir el diámetro del disco de 6.0 mm) usando el programa ImageJ para los organismos de prueba en comparación con los controles. Este método no necesariamente indica que la bacteria muera por la presencia del material antibacteriano, a través de ella también puede evidenciarse como un material podría prevenir el crecimiento de la cepa bacteriana (actividad bacteriostática) [8], [9]

## 4.4 Resultados y Discusión de Resultados

### 4.4.1 Viabilidad Celular

En la figura 64, se observa el crecimiento de *S. mutans* en presencia de cada uno de los polvos cerámicos evaluados. El BGBA (2%w/v y 30%w/v) mostró mejor efecto inhibitorio, ya que logró reducir de manera eficaz la proliferación de *S. mutans* después de las 4 horas de incubación, el  $\beta$ -TCP 2%w/v no mostró efecto inhibitorio frente a esta cepa. Sin embargo, cuando la concentración de  $\beta$ -TCP aumenta, es posible observar un decrecimiento de la cepa. Caso contrario ocurre con  $\beta$ -TCP /Mg que muestra un efecto

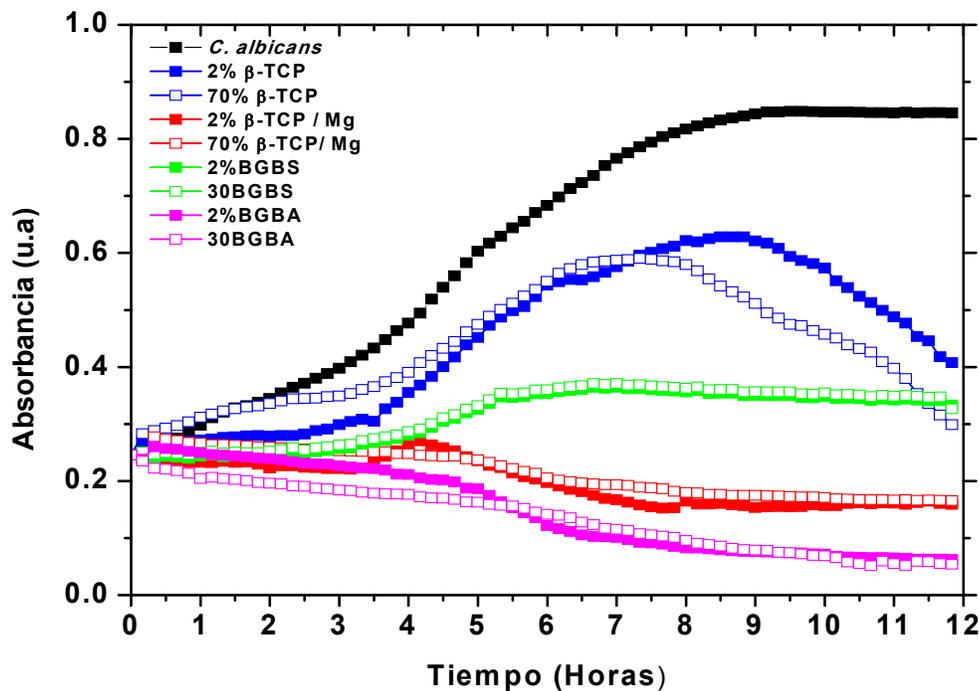
inhibitorio comparable con el de los biovidrios de boro. Las curvas de pH mostraron que se requiere un tiempo estimado de 2 horas para que los materiales cerámicos comiencen su disociación iónica que afectará el pH del medio, los cambios que resultan determinantes en la inhibición de las cepas evaluadas toman entre 5 y 8 horas, tiempo necesario para generar microambientes alcalinos que ralentizan el crecimiento de *S. mutans* y *C. albicans*.



**Figura 64.** Efecto de BGBS, BGBA,  $\beta$ -TCP y  $\beta$ -TCP/Mg en el crecimiento de *S. mutans* (ATCC25175).

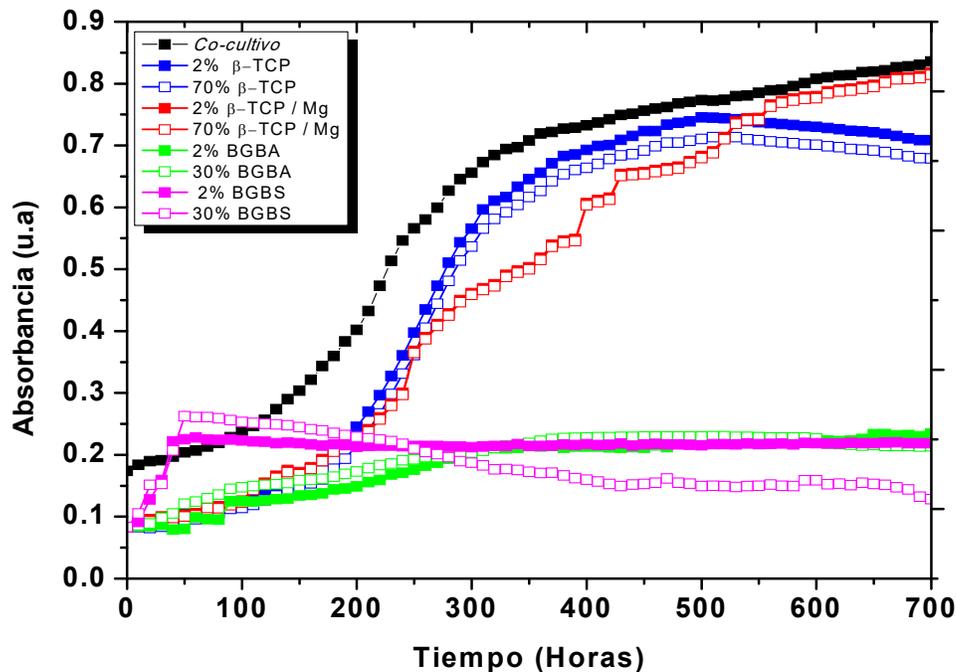
La figura 65, presenta el efecto de los biomateriales en el crecimiento de *C. albicans*, se observa un efecto radical en el control de crecimiento de la cepa en presencia de BGBA tal como se observa con los halos de inhibición, cuando se emplea una concentración de 70 %w/vol. El efecto obtenido por el  $\beta$ -TCP/Mg, resulta comparable con el del BGBA, efecto correlacionado con los niveles de pH alcalinos que se generan entre estos dos biomateriales y el medio de cultivo BHI. El tamaño de partícula encontrado para los biovidrios de borato resultó ser menor que para los fosfatos de calcio, lo que podría facilitar el ingreso de estos compuestos en las cepas evaluadas, potenciando el efecto inhibitorio de los biovidrios. Este tipo de efecto ha sido estudiado con otros biomateriales con capacidad antimicrobiana en especies como *S. aureus* y *E. coli*, mostrando un

aumento del potencial antimicrobiano a medida que se aumenta la concentración de material y se disminuye el tamaño de la partícula [10].



**Figura 65.** Efecto de BGBS, BGBA,  $\beta$ -TCP y  $\beta$ -TCP/Mg en el crecimiento de *C. albicans* (ATCC90028).

En la figura 66, se observa el efecto de los polvos de los biomateriales frente al co-cultivo establecido entre las dos cepas, las curvas muestran un descenso en la capacidad antimicrobiana por parte del  $\beta$ -TCP, ya que, aunque sean dopados con Mg, no se logró el efecto inhibitorio deseado, lo cual puede evidenciarse en una curva con comportamiento similar al crecimiento control. Los biovidrios siguen mostrando un efecto inhibitorio deseable, aunque las medidas de absorbancia que reflejan crecimiento son mayores que las obtenidas frente a los cultivos mono especie, el crecimiento del co-cultivo se ve fuertemente disminuido en presencia de BGBS y BGBA. Los co-cultivos pueden generar factores de resistencia que les permiten adaptarse con mayor facilidad a condiciones adversas, es decir, pueden crear relaciones sinérgicas que les permiten coexistir en microambientes mucho más drásticos, tal es el caso entre *S. mutans* y *C. albicans* que logran coexistir y generan factores de virulencia más difíciles de controlar [7], [11]



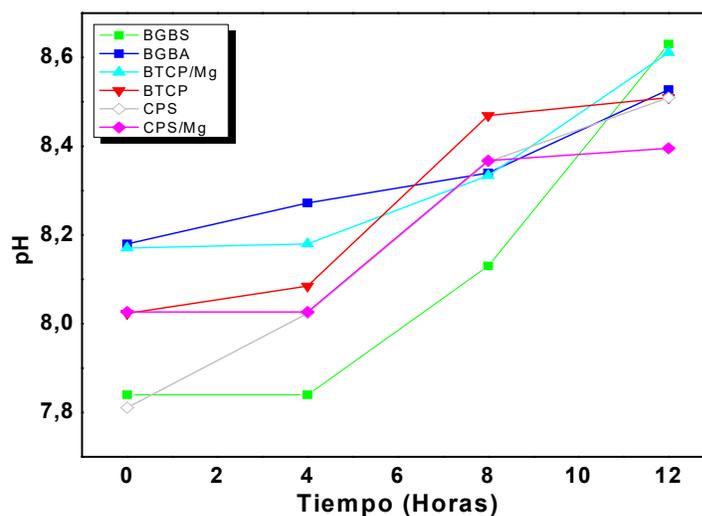
**Figura 66.** Efecto de BGBS, BGBA,  $\beta$ -TCP y  $\beta$ -TCP/Mg en el crecimiento del co-cultivo formado entre *S. mutans* (ATCC25175) y *C. albicans* (ATCC90028).

La capacidad antimicrobiana frente a las especies evaluadas está relacionada con el tamaño de partícula que favorece el acceso al citoplasma microbiano y genera aumento en los daños intracelulares, así como los cambios de pH que induce al entrar en contacto con fluidos fisiológicos, porque al reaccionar se genera una capa de apatita en la superficie induciendo la osteogénesis y esto a su vez aumenta la presión osmótica y el pH por la lixiviación de iones alcalinos, alcalinotérreos y de silicio en la superficie, desencadenando factores ambientales que pueden producir lesión celular, inactivación de enzimas fundamentales para el crecimiento bacteriano, eliminación de la fuerza protón-motriz que evita el transporte iónico y la disminución de la síntesis de Adenosin tri-fosfato (ATP) [12]–[15]. Sin embargo, para que ocurra un cambio fuerte en el aumento de pH es necesario que el biovidrio entre en contacto con un medio acuoso, ya que de esta forma se facilita la liberación de iones, determinante en el potencial antimicrobiano de los materiales valorados.

Los materiales dopados con Mg, mostraron mayor potencial antimicrobiano frente a las cepas, pero desmejoró su capacidad cuando se evaluó frente al co-cultivo; esto se debe a que sus iones, generan un aumento en el pH ya que, al tener un tamaño de partícula tan

pequeño, puede ingresar con mayor facilidad al interior de los microorganismos, generando un desbalance en la concentración de iones a dentro del citoplasma que puede inducir daños difíciles de reparar a nivel celular, así mismo su tamaño de partícula aumenta el área de contacto con las especies que se desean controlar, haciendo más efectiva su acción; hasta el momento no se han reportado efectos citotóxicos y es biocompatible, por tal motivo resulta prometedor su uso en el diseño de materiales encaminados a osteointegración.[16]

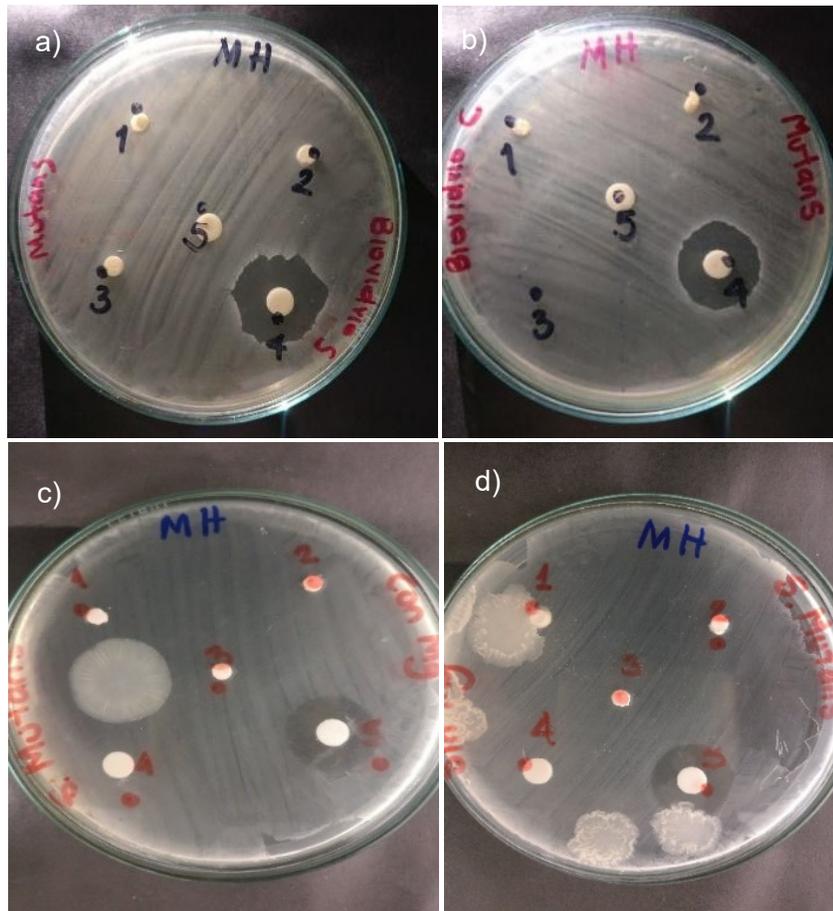
La figura 67, muestra medidas de pH de cada de uno de los biomateriales al entrar en contacto con el medio en que fueron cultivados los microorganismos. Se obtuvo un aumento del pH en cuanto transcurre el tiempo, generando un ambiente alcalino, que permite intuir un efecto antimicrobiano frente a patógenos acidogénicos como *S. mutans* y *C. albicans*, cuyo rango de actividad se encuentran entre 2,5 y 7,5 para *C. albicans* [17], mientras que la actividad del *S. mutans* está presente hasta pH cercanos a 9 [18], debido a su habilidad para mantener un gradiente de pH transmembrana (DpH), logrando sintetizar ATP a partir del transporte de  $H^+$ , generando un pH extracelular ácido que le permite mantener un pH intracelular alcalino, por tanto, a medida que el pH extracelular se eleva, se inactiva la fuerza protón-motriz [18]. Aunque *S.mutans* puede sobrevivir en ocasiones a pH tan elevados, no todas las cepas presentan los mismos factores de virulencia, por lo tanto; su proliferación ocurre a pH 7, si es sometido a condiciones alcalinas constantes se pueden inducir daños estructurales que actuarían como ambientes bacteriostáticos [19].



**Figura 67.** Diagrama pH vs tiempo

#### 4.4.2 Medida de Zona Inhibición (IZ)

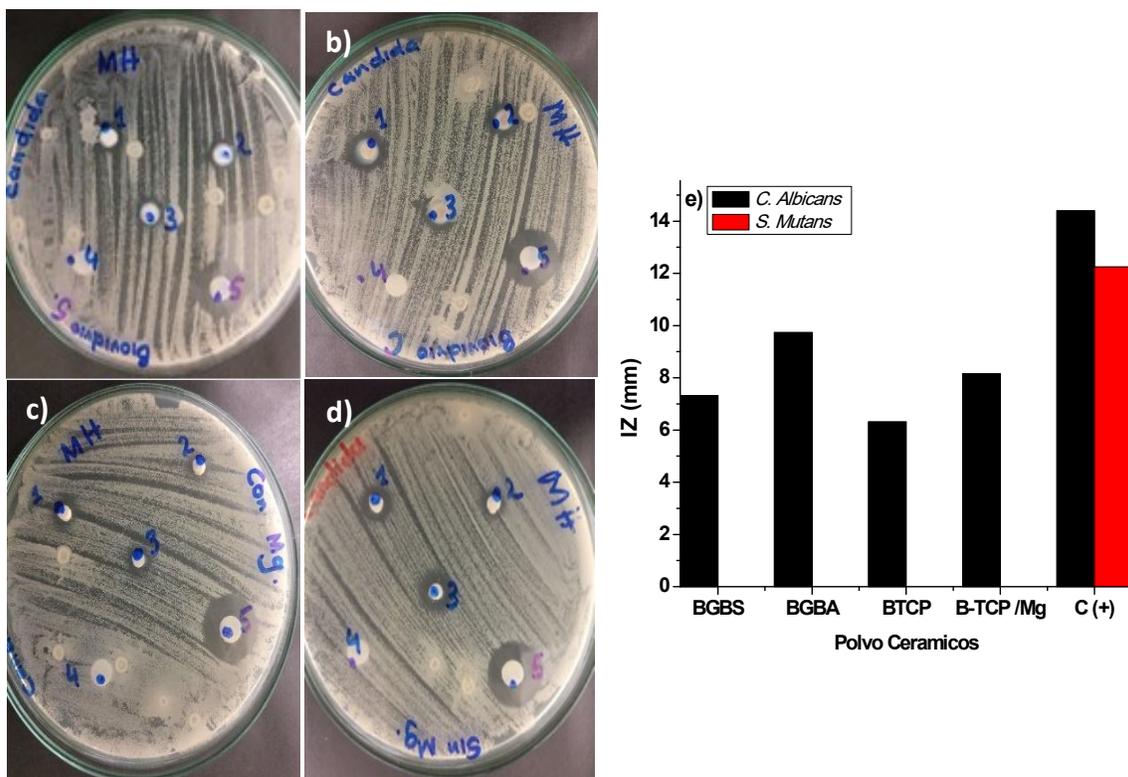
La figura 68 y 69, muestra la zona de inhibición bacteriana de los polvos cerámicos: BGBS, BGBA,  $\beta$ -TCP y  $\beta$ -TCP/Mg frente a *S. mutans* y *C. albicans* respectivamente. En la figura 68, En la figura 1(a) puede observarse que no se presentó halo de inhibición para a) BGBS, b) BGBA, c)  $\beta$ -TCP/Mg, d)  $\beta$ -TCP frente a *S. mutans*. Los resultados acá presentados corresponden a los polvos del material cerámico.



**Figura 68.** Zona de inhibición polvos cerámico frente *S. mutans* de: a) BGBS, b) BGBA, c)  $\beta$ -TCP/Mg, d)  $\beta$ -TCP

En la figura 69, se presentan los halos de inhibición de los polvos cerámicos cuando interactúan con *C. albicans*, allí se observa la formación de halos de inhibición. El efecto obtenido no es comparable con el de la clorhexidina empleada como control positivo ( $p < 0.0001$ ), sin embargo; el BGBA presentó una medida IZ de  $9.73 \pm 0.3 \text{ mm}$ , mientras que el BGBS mostró una IZ de  $7.32 \pm 0.3 \text{ mm}$ , haciendo significativamente mejor el efecto del

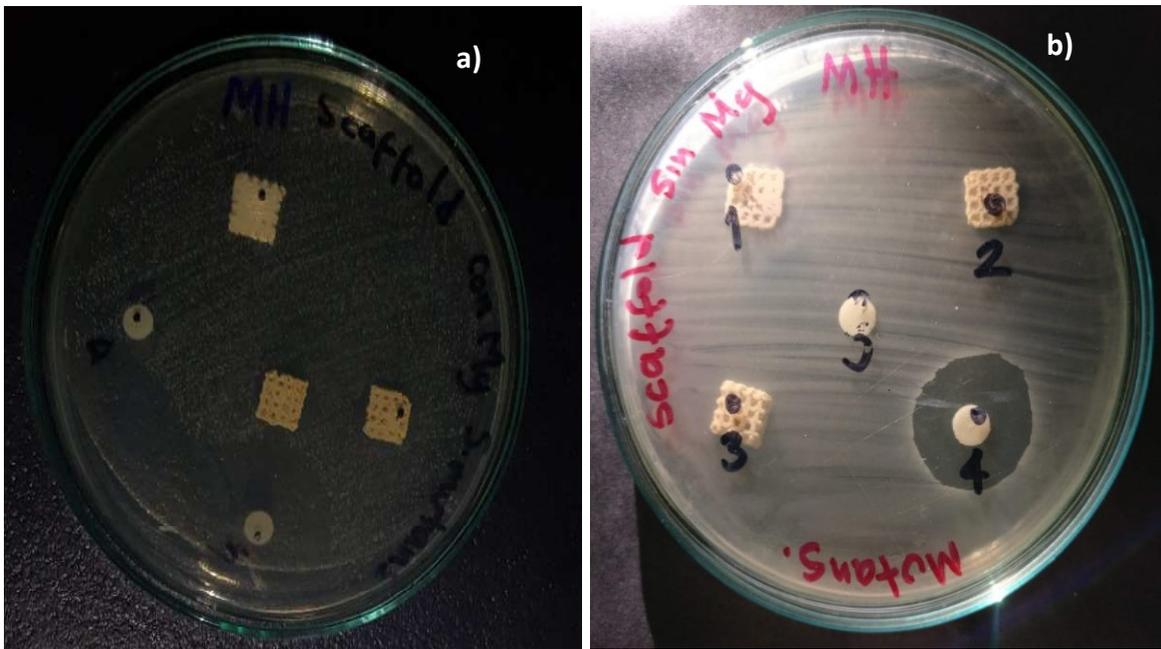
BGBA. En el del  $\beta$ -TCP mostró una medida de IZ de  $6.31 \pm 0.1$  mm, mientras que el  $\beta$ -TCP/Mg de  $8.15 \pm 0.7$  mm, el efecto del BGBA resultó significativamente mejor que los demás materiales cerámicos evaluados, datos que pueden corroborarse con el diagrama de barras de la figura 69. Las medidas de IZ mostraron un efecto inhibitorio significativo frente a *C. albicans*, pero no se observó inhibición frente a *S. mutans* mediante esta técnica. El BGBA mostró un mejor efecto inhibitorio frente a *S. mutans* debido a que logró reducir de manera drástica su proliferación, esto comparado con BGBS. Por otro lado;  $\beta$ -TCP/Mg generó una zona de inhibición mucho mayor que la del  $\beta$ -TCP. No se encontró efecto inhibitorio frente a *Streptococcus mutans* mediante esta técnica



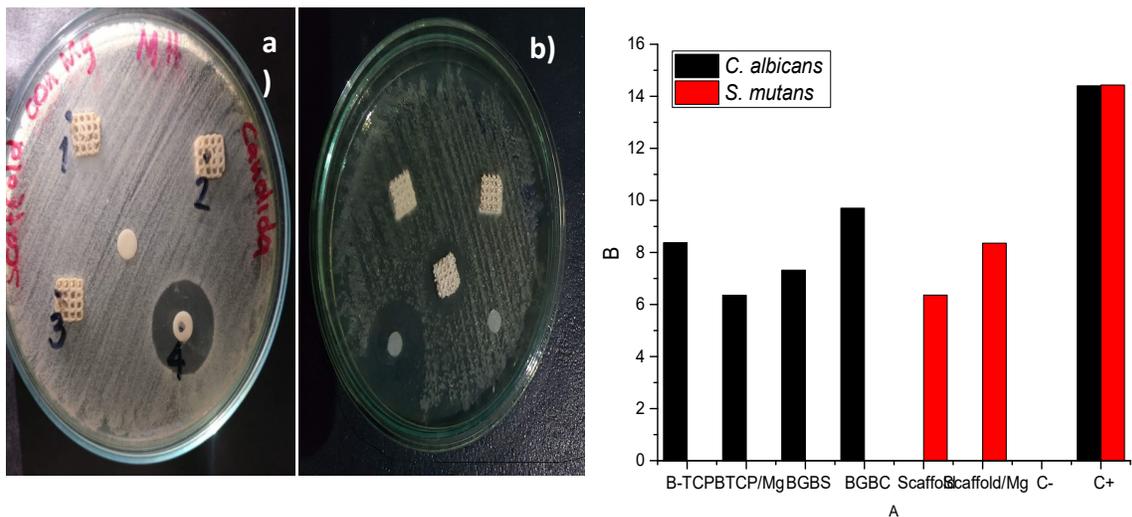
**Figura 69.** Zona de inhibición polvo cerámico frente a *C. albicans* de: a) BGBS, b) BGBA, c)  $\beta$ -TCP/Mg, d)  $\beta$ -TCP, e) Polvos cerámicos.

En la figura 70 y 71, puede observarse la medida de la zona de Inhibición de los Scaffold dopados con 5%w de  $Mg^{+2}$  y sin dopar respectivamente. Los datos obtenidos en la medida de Zona de Inhibición, no presentaron una distribución normal al aplicar el test de normalidad de Shapiro-Wilk, por tanto para obtener información sobre la relación entre los datos, se aplicó el test de Kruskal-Wallis, se encontró que las diferencias entre las

medianas de las muestras son estadísticamente significativas ( $p= 6.18e-10$ ), esto indica que los materiales evaluados presentan efecto antimicrobiano frente a *Candida albicans*, sin embargo es significativamente menor al del control positivo. En el periodo de incubación el agente se difunde desde el papel filtro hacia el agar formando un gradiente. La concentración del agente antibacteriano disminuye a medida que aumenta la distancia al papel filtro, pero en la periferia del disco no se produce dicho crecimiento. Es ahí donde se crea una zona de inhibición con un diámetro proporcional al efecto que produce el material evaluado. La respuesta obtenida por este método no necesariamente indica que la bacteria muere, ya que la inhibición del crecimiento de la bacteria podría reanudarse al cabo de cierto tiempo (actividad bacteriostática) [8], [9].



**Figura 70.** Zona de inhibición scaffold frente *S. mutans* de: a)  $\beta$ -TCP/Mg, b)  $\beta$ -TCP



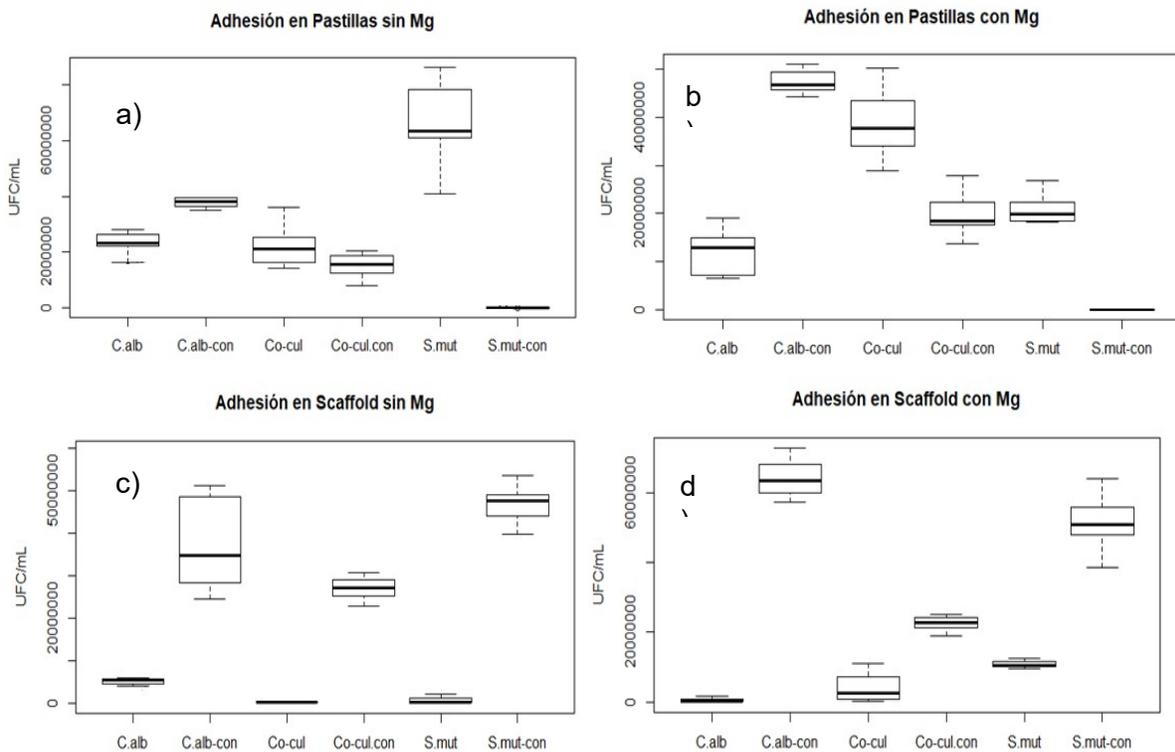
**Figura 71.** Zona de inhibición scaffold frente *C. albicans* de: a)  $\beta$ -TCP/Mg, b)  $\beta$ -TCP

En la figura 72, se evidenció la adhesión bacteriana de *S. mutans* en los scaffolds producidos es significativamente menor respecto al grupo control ( $p < 0.001$ ). La adherencia bacteriana a una superficie depende de factores específicos que comprenden las estructuras moleculares propias del microorganismo para llevar a cabo la adhesión y de otros factores inespecíficos como las interacciones físico químicas que se generan entre la superficie de la bacteria y la del material en un medio ambiente determinado [20]. El biovidrio al entrar en contacto con un medio acuoso incrementa su pH superficial, así como la presión osmótica, esto se debe a la lixiviación de iones de calcio y sodio, factores determinantes en la inhibición del crecimiento de bacterias acidogénicas como *S. mutans* [21].

Al evaluar la adhesión de *Streptococcus mutans* en los materiales cerámicos durante dos tiempos de incubación diferentes, 8 horas y 72 horas, se encontró que los datos no tienen un comportamiento normal, las medianas de las muestras presentan diferencias significativas entre ellas ( $p = 1.447e-09$ ,  $1.774e-08$ ). Además de esto, se encontraron diferencias significativas en la cantidad de células adheridas con el paso del tiempo en los scaffolds, ya que a medida que el tiempo aumenta, también aumenta la adhesión celular. En el caso de los especímenes de control, se observó una reducción significativa cuando este no contiene magnesio, mientras que en los controles que contienen magnesio, hubo un aumento de adhesión celular.

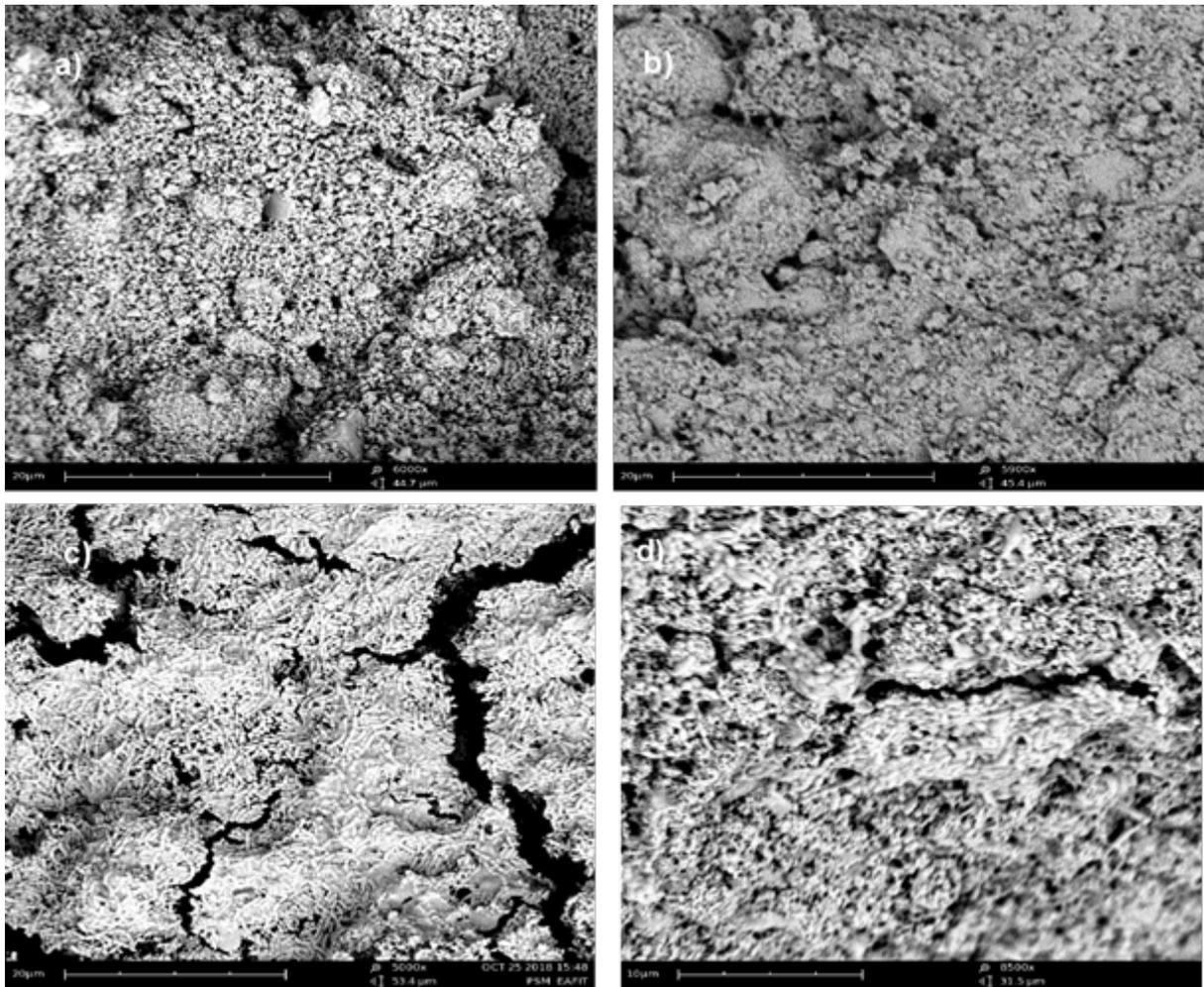
Los datos obtenidos en la valoración de adhesión de *Candida albicans* sobre los materiales cerámicos de interés en dos tiempos de incubación diferentes (8 horas y 72 horas), no tienen un comportamiento normal y sus medianas presentan diferencias significativas entre ellas ( $p= 1.45e-09, 2.230e-07$ ). También, se encontraron diferencias en la cantidad de células adheridas en los dos tiempos valorados, ya que en todas las muestras se obtuvo un aumento significativo cuando se incrementa el tiempo de incubación, siendo los scaffold con adición de Mg, las muestras con mayor adhesión. Los especímenes de control con magnesio también mostraron mayor adhesión transcurridas 72 horas de incubación.

De acuerdo a los datos obtenidos en la valoración de adhesión del co-cultivo entre *S. mutans* y *C. albicans* sobre los materiales cerámicos de interés en dos tiempos de incubación diferentes (08 horas y 72 horas), no tienen un comportamiento normal y sus medianas presentan diferencias significativas entre ellas ( $p= 2.585e-09, 1.888e-06$ ). Se encontraron diferencias significativas en la cantidad de células adheridas en los dos tiempos evaluados, en las muestras de control se observa una reducción significativa en la cantidad de células adheridas a medida que el tiempo aumenta, mientras que en los scaffolds se obtuvo el efecto contrario, transcurridas 72 horas se encontró mayor adhesión que en las 8 horas de incubación. El control con Magnesio mostró menor adhesión, en el caso de los scaffolds, en el mayor tiempo de incubación. Los scaffolds evaluados presentan mayor área superficial en contacto con medio acuoso, por tanto, es más fácil generar un microambiente más alcalino circundante en ellos que en la de los especímenes de control, dificultando el proceso de adhesión de *S. mutans*.

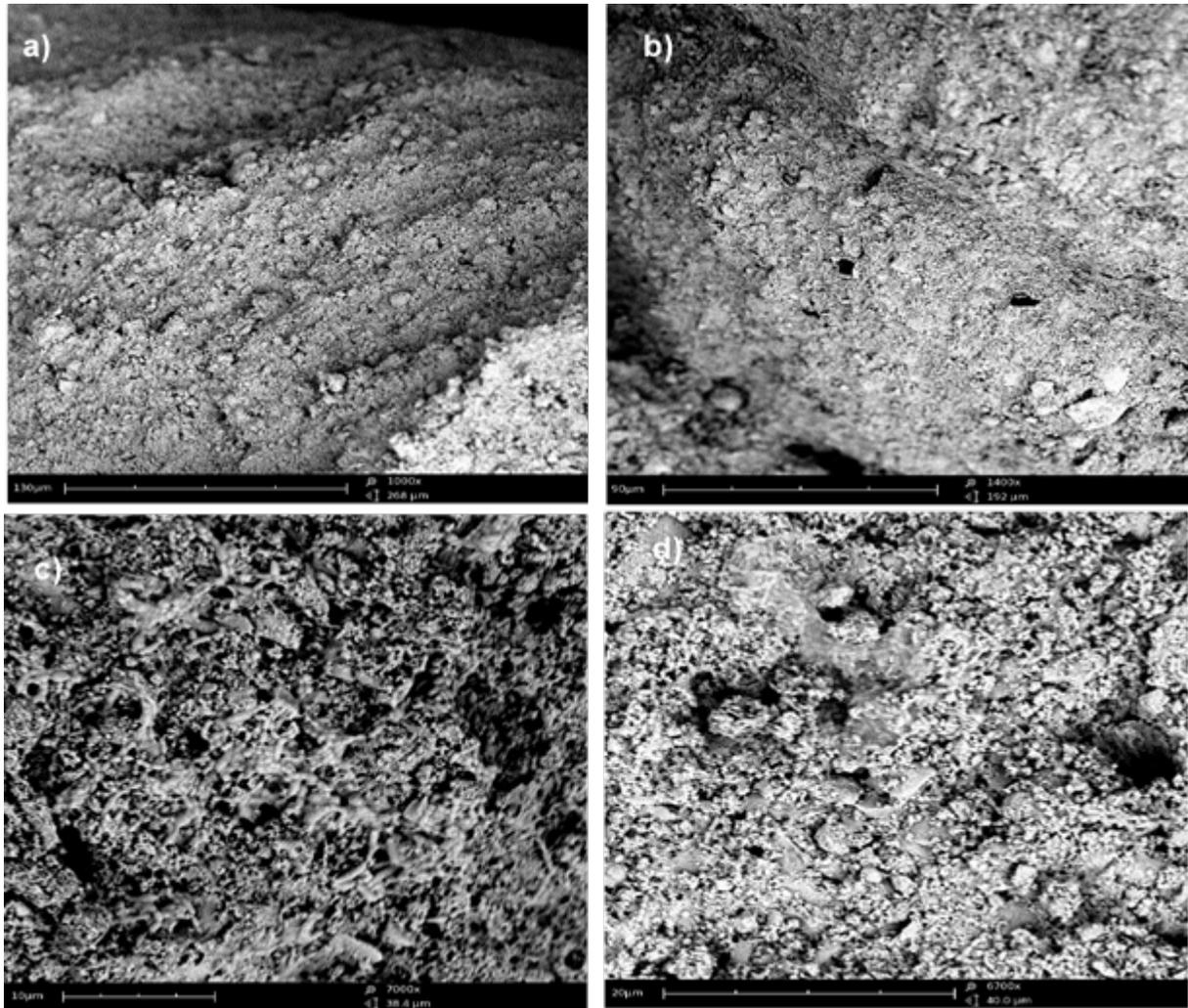


**Figura 72.** Adhesión *S. mutans*, *C. albicans*, Co-Cultivo en: a) Control sin Mg, b) control con Mg, c) Scaffold sin Mg y d) Scaffold con Mg.

La figura 73 y 74, muestra las fotomicrografías obtenidas por microscopía Electrónica de Barrido (SEM) para Scaffold sin Mg y scaffold con 5%w de Mg frente a *S. mutans* y *C. albicans* respectivamente. En general, puede evidenciarse una superficie porosa conformada por agregados de partículas, atribuida principalmente a la coalescencia de los cristales de  $\beta$ -TCP asociados principalmente con la relación molar Ca/P y a la cinética interfacial entre las partículas tanto de BGBS como de  $\beta$ -TCP, puede evidenciarse que aún conserva su carácter poroso (figura 73 (a y b), figura 74 (a y b)). Cuando se encuentra en contacto con *S. mutans* (figura 73 (c y d)). Las fotomicrografías evidencian la adhesión de las bacterias en cada una de las muestras trabajadas a las mismas condiciones, se muestra una menor cantidad de bacteria adherida en toda la superficie del scaffold con 5%w Mg comparada con la superficie del scaffold sin Mg.



**Figura 73.** Fotomicrografías Microscopía Electrónica de Barrido (SEM) a) Scaffold *sin S.Mutans (Control)*, b) Scaffold con 5%w Mg *sin S.Mutans (control)*, c) Scaffold con *S.Mutans*, d) Scaffold con 5%w Mg con *S.Mutans*



**Figura 74.** Fotomicrografías Microscopía Electrónica de Barrido (SEM) a) Scaffold sin *C. albicans* (Control), b) Scaffold con 5%w Mg sin *C. albicans* (control), c) Scaffold con *C. albicans*, d) Scaffold con 5%w Mg con *C. albicans*

En la figura 74 (c y d), las fotomicrografías comprueban la adhesión de *C. albicans* en cada una de las muestras, tanto en la muestra con magnesio y sin magnesio se evidenció una disminución de esta adhesión comparada con las muestras sometidas a *S. mutans*. Existen propiedades físico químicas que influyen en la adhesión bacteriana como el tipo de superficie, su carga, su topografía y los grupos químicos que se encuentran en la superficie [22].

## 4.5 Conclusiones

Acorde a las curvas de pH se requiere un tiempo estimado de 2 horas para que los materiales cerámicos estudiados empiecen su disociación iónica afectando el pH del medio, los cambios que resultan determinantes en la inhibición de las cepas evaluadas toman entre 5 y 8 horas, tiempo necesario para generar microambientes alcalinos que ralentizan el crecimiento de *S. mutans* y *C. albicans*.

A pesar que el BGBA y BGBS presentaron efectos inhibitorios frente a *S. mutans*, el BGBA mostró un mejor efecto inhibitorio frente comparado con BGBS ya que logró reducir de manera significativa su proliferación.

Así mismo el  $\beta$ -TCP/Mg generó una zona de inhibición mucho mayor que la del  $\beta$ -TCP. Sin embargo, cuando las concentraciones del  $\beta$ -TCP son variadas, puso evidenciarse que  $\beta$ -TCP a bajas concentraciones no muestra efecto inhibitorio frente *S. mutans*, pero cuando la concentración de  $\beta$ -TCP aumenta, es posible observar un decrecimiento en la proliferación de la cepa. Caso contrario ocurre con  $\beta$ -TCP/Mg que muestra un efecto inhibitorio comparable con el de los biovidrios de borato.

El  $\beta$ -TCP fue dopado con 5%w de Mg debido a que el magnesio presenta propiedades antibacterianas y ayuda en los procesos de regeneración ósea.

A pesar de que el BGBS no fue quien presentó el mejor efecto inhibitorio de los biovidrios ante las cepas evaluadas, su inhibición aun fue significativa teniendo en cuenta que es quien cumplió con las características estructurales requeridas. Los scaffolds para la regeneración ósea fueron conformados mediante impresión 3D de polvos de BGBS y  $\beta$ -TCP/Mg debido principalmente a que estos dos polvos confieren propiedades de estructura, biodegradabilidad, biocompatibilidad y control bacteriano adecuado de manera independiente.

Una de los más grandes inconvenientes a nivel dental, es la desmineralización ósea que puede presentarse debido a la presencia de ciertos patógenos a nivel bucal que aceleran dicho proceso, afectando de manera directa el hueso esponjoso o trabecular que se encuentra en esta cavidad. Este estudio permitió inhibir de manera significativa los patógenos que causan la desmineralización ósea cuando entran en contacto con scaffolds fabricados por impresión 3D.

## Referencias Bibliográficas

- [1] M. Balouiri, M. Sadiki, and S. K. Ibsouda, "Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review," *J. Pharm. Anal.*, vol. 6, no. 2, pp. 71–79, 2016, doi: <https://doi.org/10.1016/j.jpha.2015.11.005>.
- [2] J. Jorgensen, J. T.-M. of C. Microbiology, and undefined 2015, "Susceptibility test methods: dilution and disk diffusion methods," *asmscience.org*, Accessed: Jul. 27, 2018. [Online]. Available: <http://www.asmscience.org/content/book/10.1128/9781555817381.mcm11.ch71>.
- [3] A. Fumes, P. Telles, S. Corona, and M. C. Borsatto, "Effect of aPDT on *Streptococcus mutans* and *Candida albicans* present in the dental biofilm: Systematic review," *Photodiagnosis Photodyn. Ther.*, vol. 21, Feb. 2018, doi: [10.1016/j.pdpdt.2018.01.013](https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2018.01.013).
- [4] B. Turyna, J. Milc, A. Łączka, K. Cholewa, and M. Łączka, "Biocompatibility of glass-crystalline materials obtained by the sol-gel method: effect on macrophage function," *Biomaterials*, vol. 17, no. 14, pp. 1379–1386, 1996, doi: [https://doi.org/10.1016/0142-9612\(96\)87278-4](https://doi.org/10.1016/0142-9612(96)87278-4).
- [5] D. Sharma, "Oral *Candida albicans* and its correlation with caries in children in vivo," *J. Pierre Fauchard Acad.*, vol. 30, pp. 1–4, Jan. 2015, doi: [10.1016/j.jpfa.2015.06.002](https://doi.org/10.1016/j.jpfa.2015.06.002).
- [6] T. C. de Abreu Brandi, M. B. Portela, P. M. Lima, G. F. B. de Araújo Castro, L. C. Maia, and A. Fonseca-Gonçalves, "Demineralizing potential of dental biofilm added with *Candida albicans* and *Candida parapsilosis* isolated from preschool children with and without caries," *Microb. Pathog.*, vol. 100, pp. 51–55, 2016.
- [7] M. L. Falsetta, M. I. Klein, P. M. Colonne, K. Scott-anne, S. Gregoire, and C. Pai, "Symbiotic Relationship between *Streptococcus mutans* and *Candida albicans* Synergizes Virulence of Plaque Biofilms In Vivo," *J. Am. Soc. Microbiol.*, vol. 82, no. 5, pp. 1968–1981, 2014, doi: [10.1128/IAI.00087-14](https://doi.org/10.1128/IAI.00087-14).
- [8] D. P. Clark, J. M. Martinko, M. T. Madigan, and P. V Dunlap, *Brock, Biología de los microorganismos, duodécima edición*. Pearson, 2009.
- [9] N. Cioffi and M. Rai, *Nano-antimicrobials: progress and prospects*. Springer Science & Business Media, 2012.
- [10] O. Yamamoto, "Influence of particle size on the antibacterial activity of zinc oxide," *Int. J. Inorg. Mater.*, vol. 3, no. 7, pp. 643–646, 2001, doi: [10.1016/S1466-](https://doi.org/10.1016/S1466-)

6049(01)00197-0.

- [11] T. Pereira-Cenci *et al.*, "The effect of *Streptococcus mutans* and *Candida glabrata* on *Candida albicans* biofilms formed on different surfaces," *Arch. Oral Biol.*, vol. 53, no. 8, pp. 755–764, 2008, doi: <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2008.02.015>.
- [12] I. Allan, H. Newman, and M. Wilson, "Antibacterial activity of particulate Bioglass® against supra- and subgingival bacteria," *Biomaterials*, vol. 22, no. 12, pp. 1683–1687, 2001, doi: [10.1016/S0142-9612\(00\)00330-6](https://doi.org/10.1016/S0142-9612(00)00330-6).
- [13] S. Ghosh *et al.*, "In vivo response of porous hydroxyapatite and ??-tricalcium phosphate prepared by aqueous solution combustion method and comparison with bioglass scaffolds," *J. Biomed. Mater. Res. B. Appl. Biomater.*, vol. 86, pp. 217–227, Jul. 2008, doi: [10.1002/jbm.b.31009](https://doi.org/10.1002/jbm.b.31009).
- [14] R. Alhashimi, F. Mannocci, and S. Sauro, "Bioactivity, cytocompatibility and thermal properties of experimental Bioglass-reinforced composites as potential root-canal filling materials," *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.*, vol. 69, Jan. 2017, doi: [10.1016/j.jmbbm.2017.01.022](https://doi.org/10.1016/j.jmbbm.2017.01.022).
- [15] Y. T. Xu, Q. Wu, Y. M. Chen, R. J. Smales, S. Y. Shi, and M. T. Wang, "Antimicrobial effects of a bioactive glass combined with fluoride or triclosan on *Streptococcus mutans* biofilm," *Arch. Oral Biol.*, vol. 60, no. 7, pp. 1059–1065, 2015, doi: [10.1016/j.archoralbio.2015.03.007](https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2015.03.007).
- [16] L. Zhu, P. Wan, J. Duan, L. Tan, and K. Yang, "An alternative magnesium-based root canal disinfectant: Preliminary study of its efficacy against *Enterococcus faecalis* and *Candida albicans* in vitro," *Prog. Nat. Sci. Mater. Int.*, vol. 24, no. 5, pp. 441–445, 2014, doi: [10.1016/j.pnsc.2014.09.003](https://doi.org/10.1016/j.pnsc.2014.09.003).
- [17] S. Vylkova, A. J. Carman, H. A. Danhof, J. R. Collette, H. Zhou, and M. C. Lorenz, "The fungal pathogen *Candida albicans* autoinduces hyphal morphogenesis by raising extracellular pH.," *MBio*, vol. 2, no. 3, pp. e00055-11, 2011, doi: [10.1128/mBio.00055-11](https://doi.org/10.1128/mBio.00055-11).
- [18] S. G. Dashper and E. C. Reynolds, "pH Regulation by *Streptococcus mutans*," *J. Dent. Res.*, vol. 71, no. 5, pp. 1159–1165, 1992, doi: [10.1177/00220345920710050601](https://doi.org/10.1177/00220345920710050601).
- [19] J. A. Lemos *et al.*, "The Biology of *Streptococcus mutans*," *Microbiol. Spectr.*, vol. 7, no. 1, pp. 1–26, 2019, doi: [10.1128/microbiolspec.gpp3-0051-2018](https://doi.org/10.1128/microbiolspec.gpp3-0051-2018).
- [20] J. Vila, A. Soriano, and J. Mensa, "Bases moleculares de la adherencia microbiana

---

sobre los materiales protésicos. Papel de las biocapas en las infecciones asociadas a los materiales protésicos,” *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.*, vol. 26, no. 1, pp. 48–55, 2008, doi: 10.1157/13114395.

- [21] C. H. G. Martins *et al.*, “Assessment of antimicrobial effect of Biosilicate(R) against anaerobic, microaerophilic and facultative anaerobic microorganisms,” *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, vol. 22, no. 6, pp. 1439–1446, Jun. 2011, doi: 10.1007/s10856-011-4330-7.
- [22] H. H. Tuson and D. B. Weibel, “Bacteria-surface interactions,” *Soft Matter*, vol. 9, no. 18, pp. 4368–4380, May 2013, doi: 10.1039/C3SM27705D.

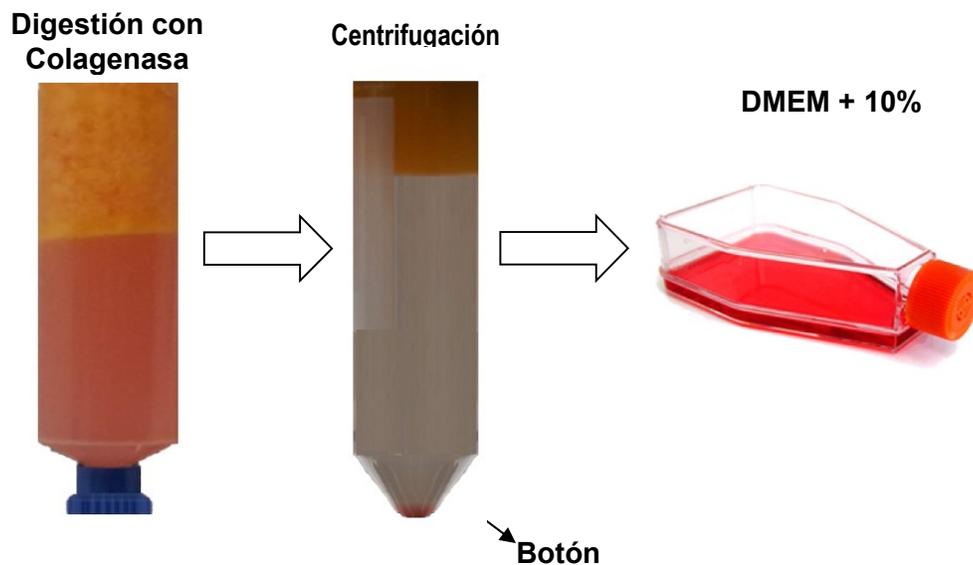
# **CAPÍTULO 5:**

## **REGENERACIÓN ÓSEA**

## 5.1 Regeneración Ósea in vitro

### 5.1.1 Obtención y Procesamiento del Tejido Adiposo

Las muestras de tejido adiposo fueron obtenidas mediante liposucción de pacientes jóvenes y sanos bajo anestesia general (obtenidas bajo consentimiento informado por el paciente). Este procedimiento combina fragmentos de tejido variables y dependen principalmente del tamaño de la cánula. El tejido adiposo es transportado en jeringas estériles de 50 cc a 4°C hasta su procesamiento. Las células de Fracción Vascular Estromal (SVF) se aislaron utilizando un método modificado descrito por Sun y otros [1]–[3]. El tejido adiposo se diluyó 2 veces con solución salina tamponada con fosfato (PBS) para eliminar los glóbulos rojos y luego se digirió con colagenasa tipo IIS al 0,1% durante 20 minutos a 37° C con agitación vigorosa durante 15 segundos cada cinco minutos. Los tejidos digeridos se centrifugaron a 500 g durante 10 minutos para generar el sedimento celular (SVF, Fracción Vascular del Estroma), el SVF obtenido se centrifugó a 500 g durante 5 minutos y luego se filtró a través de una malla de nylon de 100 µm para eliminar los residuos celulares. El sedimento se resuspendió finalmente en 5 ml de PBS (Figura 75).

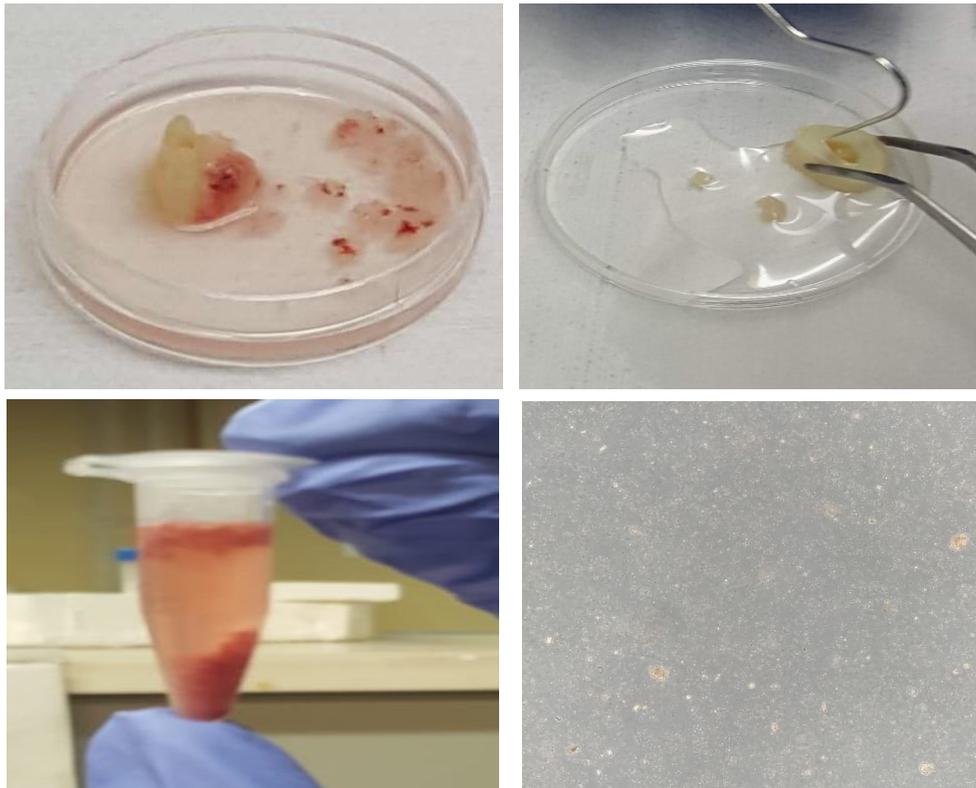


**Figura 75.** Obtención y procesamiento tejido adiposo

Cada ml de SVF se cultivó en matraces de 25 cm<sup>2</sup> que contenían medio de Eagle modificado con alto contenido de glucosa (H-DMEM) que contenía L-glutamina, 10% de SFB (suero fetal bovino) o PRGF y 1% de antibiótico a 37 ° C, 98% HR y 5% de CO<sub>2</sub>. Después de la detección de células adherentes por microscopio invertido, las células no adherentes se eliminaron lavando con PBS. Las células se mantuvieron hasta que alcanzaron el 80-90% de confluencia (Pase 0) y fueron analizadas en el pase dos por citometría de flujo para los marcadores de membrana CD73, 90 y 105.

### **5.1.2 Obtención y Procesamiento Pulpa dental**

Antes de realizar el procedimiento quirúrgico fue firmado el consentimiento informado posteriormente, se realizaron maniobras de asepsia y antisepsia; una vez realizados los procedimientos anestésicos con lidocaína más vasoconstrictor al 2% se procedió a la incisión, levantamiento de colgajo, osteotomía, luxación y extracción del diente cuidando que el elevador no sobrepasara el tercio medio radicular del mismo. Una vez extraído, éste fue embebido en un frasco estéril con medio de transporte (DMEM + 5% SFB + 3% de antibiótico) y llevado refrigerado al laboratorio en un tiempo máximo de 30 minutos. Una vez en la cámara de flujo laminar los dientes fueron seccionados con pieza de alta con abundante irrigación y fresa zecria estériles, una vez seccionados, la pulpa fue extraída mediante una cucharilla # 5, esta muestra fue disgregada mecánicamente y sometida a la acción de colagenasa tipo I (3 mg/ml) durante 1 hora. Los explantes disgregados de pulpa, fueron colocados en cajas de petri e incubados en condiciones estándar de CO<sub>2</sub> (5%) y temperatura (37°C) hasta permitir su fijación en la caja, posteriormente se agregaron 5ml de medio RPMI1640 (con L-glutamina) enriquecido con suero fetal bovino 10% y antibiótico 1%. Las cajas de Petri con las muestras fueron incubadas hasta obtener migración celular. Una vez la migración celular tuvo lugar las células fueron desprendidas mediante la acción de tripsina y cultivadas en cajas independientes hasta 5 pases (Figura 76).



**Figura 76.** Obtención y procesamiento pulpa dental (DPSCs)

## 5.2 Viabilidad por medio de MTT

Esta técnica ha sido ampliamente usada para ensayos como activación celular, proliferación, citotoxicidad, entre otras. Se basa en la reducción del colorante 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il) 2,5bromuro difeniltetrazolio (MTT) por parte de las mitocondrias de la célula, las cuales cuando son viables transforman el MTT a formazan que da una coloración purpura [4], [5].

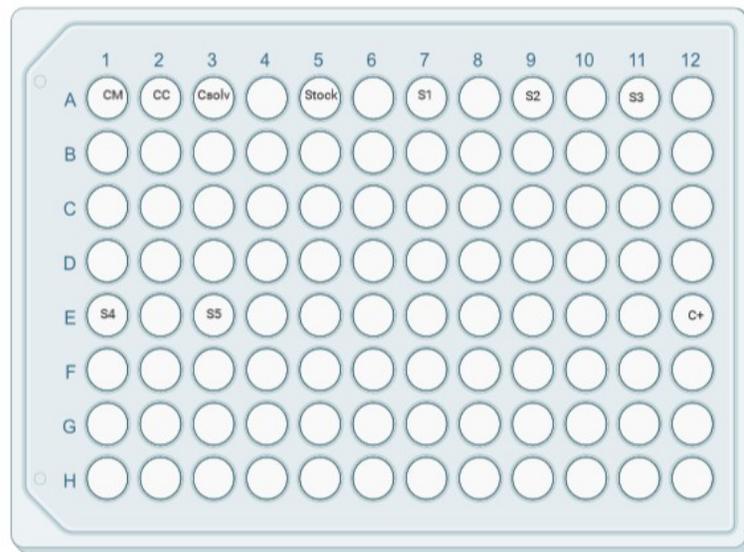
- **Preparación de soluciones a evaluar**

A partir del material utilizado en la preparación de la pasta cerámica para la impresión de los scaffolds, se generaron las concentraciones a evaluar diluidas en solución buffer fosfatada (PBS, por sus siglas en inglés):

- **Stock:** 3.5mg/ml
- **S1:** 1.75 mg/ml
- **S2:** 0.875 mg/ml
- **S3:** 0.43 mg/ml
- **S4:** 0.21 mg/ml
- **S5:** 0.10 mg/ml

- **Viabilidad por medio de la prueba MTT**

Para la realización de la prueba de viabilidad, se usaron las células madre derivadas de tejido adiposo, sembrando 4000 células por pozo bajo el siguiente diseño de plato (Figura 77):



**Figura 77.** Diseño del plato de MTT

Siendo:

CM: control de medio

CC: Control de células

Csolv: Control solvente (PBS)

C<sup>+</sup>: Control positivo de muerte celular.

Posterior a la siembra de las células madre conteniendo 10% de SFB y 1% de antibiótico, se dejaron en incubación durante 48 horas hasta alcanzar una confluencia de

aproximadamente el 70%. Pasadas las 48 horas, se agregaron 10µl del tratamiento a cada pozo correspondiente y se dejó en incubación durante 24 horas. Luego, se adicionaron 10 µl de MTT (5 mg/mL) en condiciones de oscuridad y se incubaron en shaker (58 rpm) durante tres horas y media. Para solubilizar los cristales de formazán, se adicionó 100 µL de isopropanol ácido frío (2,5 mL de Tritón X-100, 200µL de HCl 37%, 22,3 mL de Isopropanol), se resuspendió continuamente a temperatura ambiente y oscuridad hasta observar la dilución de los cristales y se midió la absorbancia en un espectrofotómetro (*Thermo Scientific Multiskan® Spectrum*) a una longitud de onda de 570 nm. Cada concentración del material se evaluó por triplicado. Para definir los porcentajes de viabilidad se usaron las siguientes fórmulas:

$$\text{D.O tratamiento corregido} = \text{Promedio D.O tratamiento} - \text{Promedio CM} \quad \text{ecn (8)}$$

$$\% \text{Viabilidad} = \left( \frac{\text{D.O tratamiento corregido}}{\text{Promedio CC}} \right) * 100 \quad \text{ecn (9)}$$

Siendo D.O la densidad óptica de cada pozo evaluado.

Los datos fueron analizados por medio de prueba de normalidad *Shapiro-Wilk*, prueba de *Levene* para análisis de varianzas y finalmente se realizó prueba de *Mann Whitney U* para determinar la diferencia significativa entre los tratamientos, todo lo anterior bajo  $p < 0,05$  por medio del programa *Statgraphics centurión*.

### 5.3 Adhesión y Proliferación Celular

Para los ensayos de adhesión y proliferación, se utilizó una concentración de 4000 células/pozo sobre la superficie de los scaffolds. Se realizó el cultivo de las células con el mismo protocolo para MTT. Para medir la adhesión de las células a 5 horas, estas fueron lavadas y posteriormente fijadas durante 20 minutos con un fijador solución compuesto de formaldehído al 16%, glutaraldehído 50% y PBS, las células fueron teñidas con cristal violeta. El cristal violeta es un colorante utilizado como tinción de células adherentes [6]. Una vez teñidas las células, se añadió metanol para retirar el exceso de colorante y se realizó medición de la densidad óptica de cada pozo a 570 nm en un lector de placas. Cada experimento se realizó por triplicado.

## 5.4 Diferenciación Osteogénica

Para realizar los ensayos de diferenciación se utilizaron células provenientes de los pases 2 a 5 de los cultivos celulares. Se realizaron experimentos donde se evaluó la diferenciación a 7, 14 y 23 días de cultivo con tres replicas cada uno. Una vez las ADSCs y DPSCs alcanzaron una confluencia del 70%, fueron subcultivadas en platos de 24 pozos, con un medio de diferenciación osteogénica. Para lograr que las ADSCs se diferencien a osteoblastos se hace necesario que sean estimuladas con glucocorticoides y otros suplementos como: dexametasona,  $\beta$ -glicerol fosfato, ácido ascórbico, los cuales se encuentran en capacidad de formar depósitos de calcio y expresión de fosfatasa alcalina [7], [8]. El ácido ascórbico (50 $\mu$ g/ml) promueve la diferenciación de osteoblastos en pruebas in vitro [9], el  $\beta$ -glicerol fosfato (2mM) es un inhibidor de la fosfatasa, el cual opera como donante de grupos fosfato en la mineralización ósea [10], [11] y la dexametasona (10<sup>-7</sup>M) tiene el efecto de diferenciar osteoblastos [12].

### 5.4.1 Identificación Osteoblastos (Mineralización)

#### 5.4.1.1 Actividad de la Fosfatasa Alcalina (ALP)

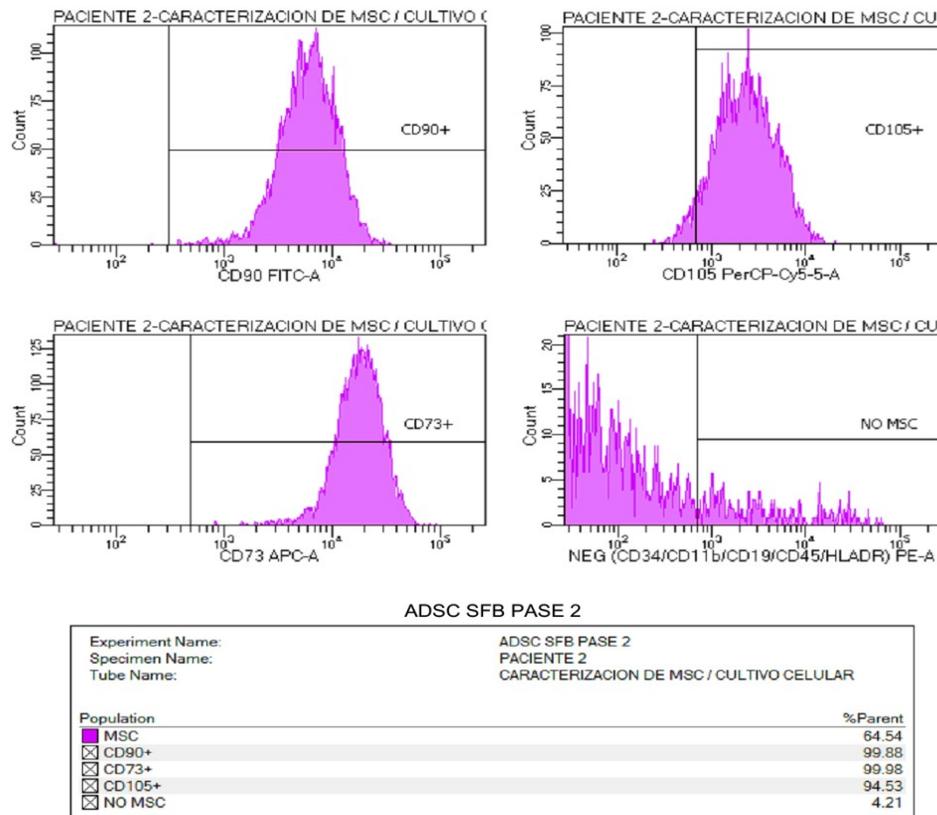
Las células madre mesenquimales indiferenciadas muestran una débil actividad de fosfatasa alcalina (ALP), mientras que los osteoblastos diferenciados presentan una actividad de fosfatasa alcalina muy alta. La actividad de ALP es, por lo tanto, una indicación de la diferenciación exitosa de MSC en osteoblastos.

Para la identificación de la actividad de la fosfatasa alcalina, las células ADSC sembradas; una vez alcanzan una confluencia del 70% fueron subcultivadas en platos de 24 pozos, con un medio de diferenciación osteogénica, tras 7 días de tratamiento, fueron lavadas con PBS, lavadas con un surfactante (Triton X-100 al 0,1%) y posteriormente sonicadas a 4°C después de haber sido centrifugadas a 4°C a 20.000g por espacio de 5 min. El sobrenadante es recogido y evaluado mediante ALP reagent (Thermo scientific, Massachusetts, EEUU) [13]. Se midió la absorbancia en un espectrofotómetro (Thermo Scientific Multiskan® Spectrum) a una longitud de onda de 405 nm (absorbancia de referencia). Cada concentración del material se evaluó por triplicado.

Apoiados en el método colorimétrico de Bradford, se determinó la concentración de proteína. Donde la ALP es expresada en  $\mu\text{g}$  de producto formado por minuto de reacción sobre la cantidad de proteína presente en el sobrenadante (U/mg) [14], [15].

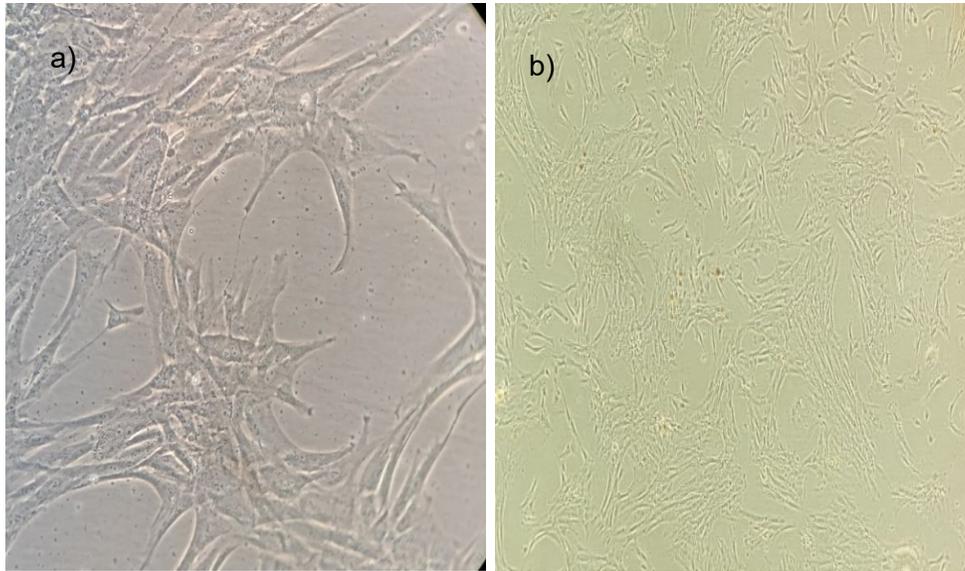
### 5.5 Resultados y Discusión

El fenotipo de las células aisladas fue determinado en una fase temprana del cultivo celular, evaluando los antígenos de superficie CD105 y CD90 característicos de las células madre mesenquimales, fueron tomados para muestras en pase dos. Las células provenientes de tejido adiposo fueron identificadas como células madre por medio de citometría de flujo con expresión de los marcadores de membrana superiores al 90% tal como se ve en la figura 78.



**Figura 78.** Identificación de la cantidad de células madre derivadas de tejido adiposo por Citometría de flujo.

A partir de la pulpa dental, se logró la obtención de células para los explantes dentales procesadas por digestión enzimática. Se estableció el cultivo primario de las células madre mesenquimales derivadas de pulpa dental (Figura 79). A pesar de no contar con una citometría de flujo que comprobara los antígenos de superficie CD105 y CD90 característicos de las células madre mesenquimales, se prosiguió con la experimentación.



**Figura 79.** Células madre mesenquimales en cultivo in vitro derivadas de: a) Tejido adiposo y b) Pulpa dental

En cuanto a la viabilidad celular por medio de la prueba de MTT, se realizaron cuatro réplicas, cada una por triplicado dentro de cada experimento realizado. Estas réplicas fueron realizadas con una semana de diferencia donde se obtuvieron los porcentajes de viabilidad (Tabla 30)

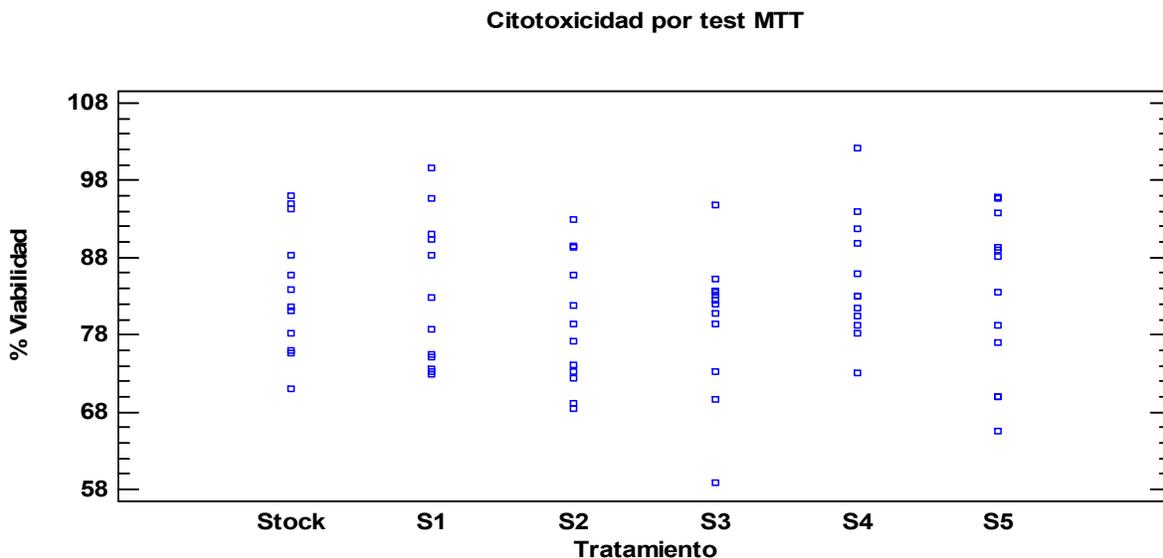
**Tabla 30.** Porcentajes de viabilidad celular

Stock	S1	S2	S3	S4	S5	C+
78,25937	75,484	72,44844	58,94743	81,46839	69,96217	12,46001
81,64185	75,1949	73,2001	73,2001	78,28828	69,99108	11,44815
75,62855	73,51812	69,1816	69,58634	73,02664	65,59675	10,08938
94,29383	91,09884	92,89042	81,93193	102,1469	95,63751	14,98657

94,9806	99,60884	89,51628	83,15617	93,96537	93,78621	16,41983
96,02569	95,57779	89,36698	83,63393	91,78561	88,05316	17,91282
71,10557	78,71979	74,15126	82,42238	79,28712	83,43761	17,35818
81,13842	73,22561	68,53764	79,43642	82,93	77,04764	17,29847
75,94284	72,92701	77,2268	83,46747	80,4815	89,40954	18,31369
85,79864	82,75821	79,41708	80,75353	83,0255	79,1832	17,40572
83,79396	88,23766	81,78928	85,16382	85,96569	95,88885	17,37231
88,27107	90,30916	85,66499	94,75286	89,87481	88,9393	17,87348

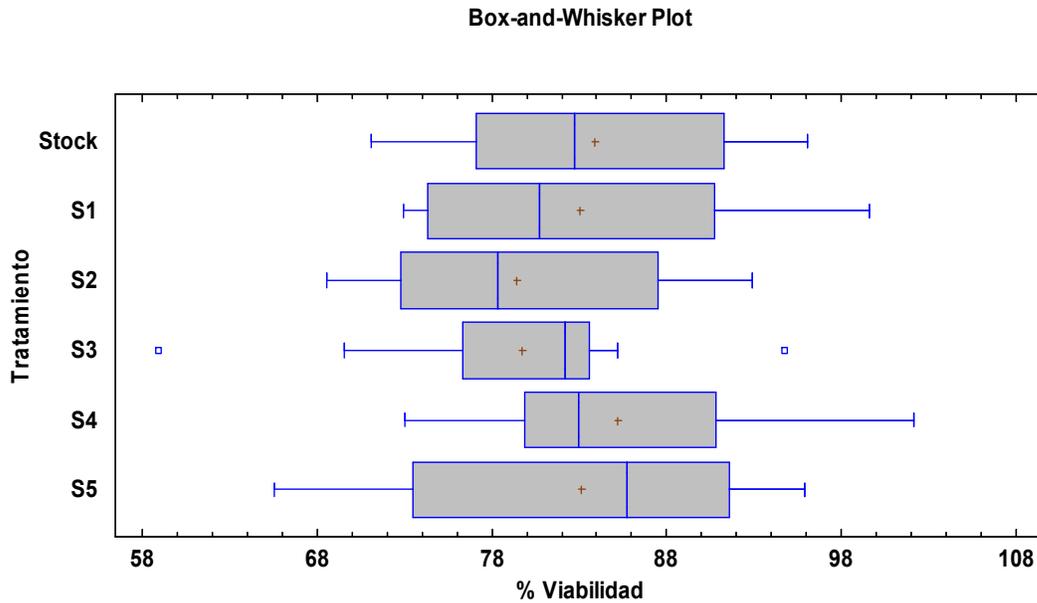
En la figura 80, se puede ver que la viabilidad en todos los tratamientos supera el 50%, por lo que se puede decir que la composición de los Scaffolds a las concentraciones analizadas no es tóxica para las células, sin embargo, se hará un análisis estadístico más detallado.

Dentro de los resultados de la ANOVA, se puede ver que el valor  $p = 0,65$ , por ende, se considera como no significativo, es decir, no hay diferencia significativa estadísticamente entre las medianas a un nivel de confianza del 95%.



**Figura 80.** Viabilidad Celular

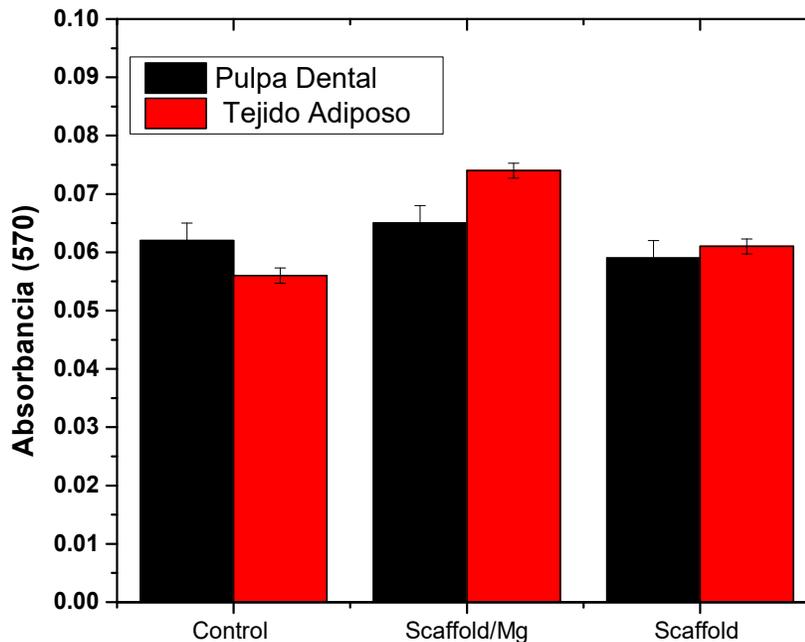
La figura 81, evidencia que los datos obtenidos los bigotes no se tocan, por ende, se puede decir que no hay diferencia significativa entre las medianas. Al ver que las viabilidades superan el 50%, decimos que la composición de los scaffolds a las concentraciones analizadas no presenta toxicidad para las células madre.



**Figura 81.** Diagrama de cajas y bigotes para Viabilidad Celular

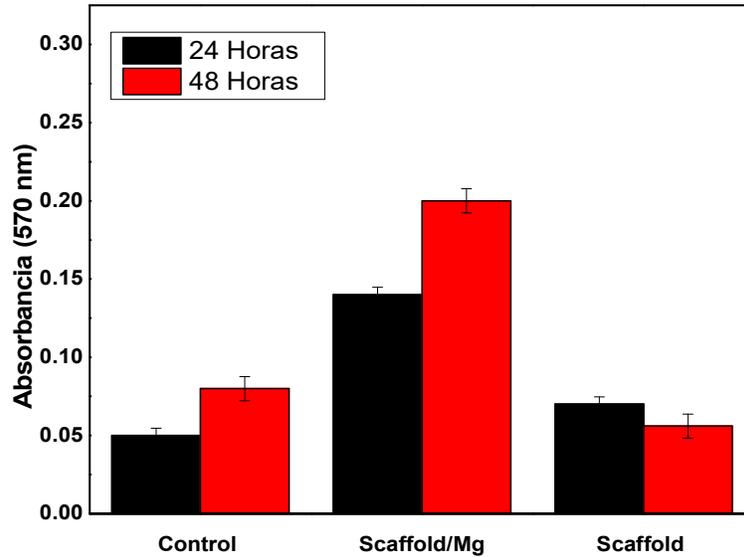
La Figura 82, muestra los resultados obtenidos de los ensayos de adhesión con células madre provenientes de tejido adiposo y pulpa dental. La adhesión de las células madre provenientes de tejido adiposo después de 4 horas en contacto con los scaffolds (Figura 79) y con mediciones de absorbancia (570 nm), presentaron una mayor adhesión sobre scaffolds dopados con 5%w Mg comparado con los scaffold sin dopaje, Independiente de la composición del scaffold, los dos evidenciaron una mayor adhesión que la muestra control. Por su parte, los resultados obtenidos de la adhesión con células madre provenientes de pulpa dental, evidenció que los scaffolds dopados con 5%w Mg presentaron una mayor adhesión comparados con los scaffolds sin dopaje y con el control. Sin embargo, el scaffold sin dopaje presenta relativamente un valor de absorbancia por debajo comparado con el control, esto puede ser debido a que las células

no se están adhiriendo de manera adecuada. Estos resultados de buena adhesión asociada al magnesio evidencia su capacidad de incentivación en los procesos de adhesión y proliferación celular [16].



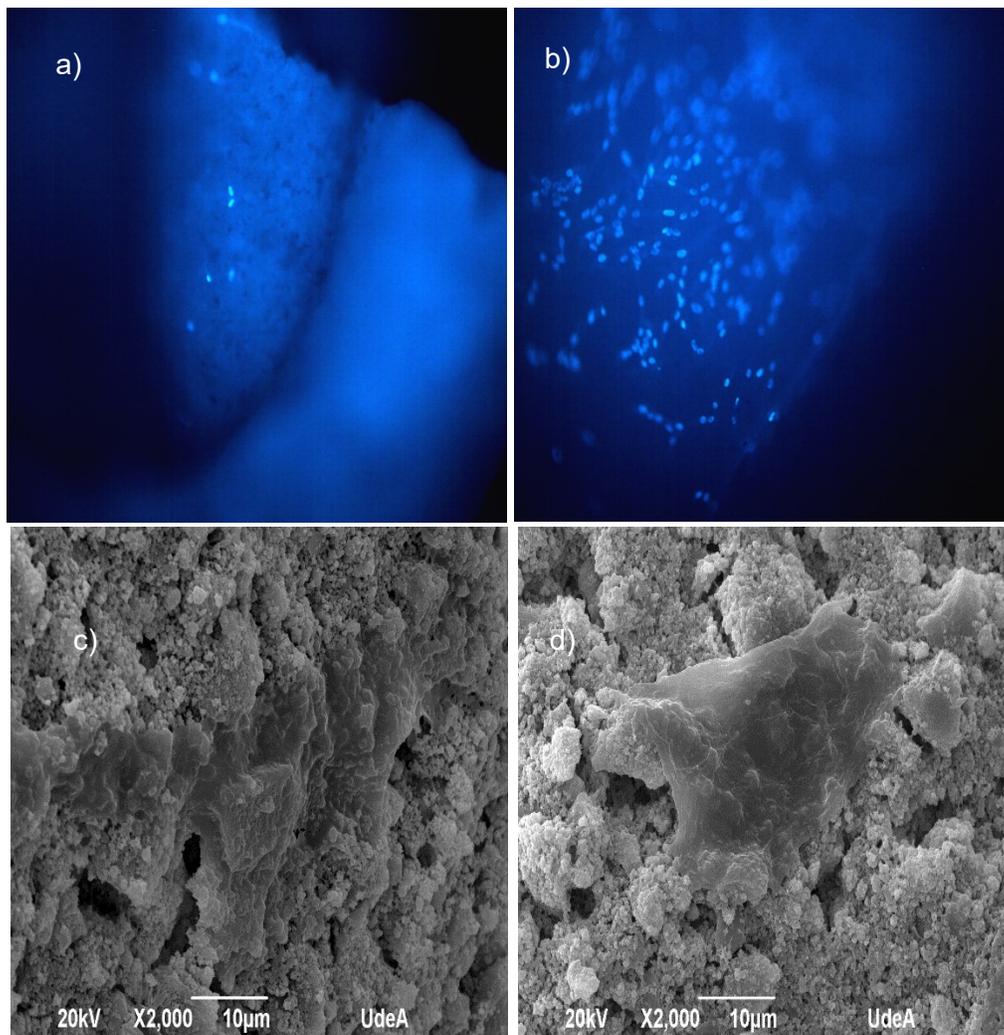
**Figura 82.** Adhesión de las células Madres provenientes de pulpa dental y tejido adiposo sobre los diferentes tipos de scaffold (n=6, p<0,05)

La figura 83, muestra los resultados obtenidos de los ensayos de proliferación celular de las células madre provenientes de tejido adiposo y pulpa dental. Acorde a los valores de absorbancia reportados, los scaffolds dopados con 5% w de Mg mostraron un incremento en la proliferación de las células comparadas con el control y con los scaffolds sin dopaje. También se evidenció que los scaffold sin dopar, presentan a las 48 horas una disminución en la respuesta celular comparados con el control. Este comportamiento puede estar asociado con la degradación del scaffold, donde algún residuo de degradación puede estar cambiando el comportamiento normal de la célula. En general, podría decirse que los scaffolds con y sin dopaje mejoran la proliferación celular.



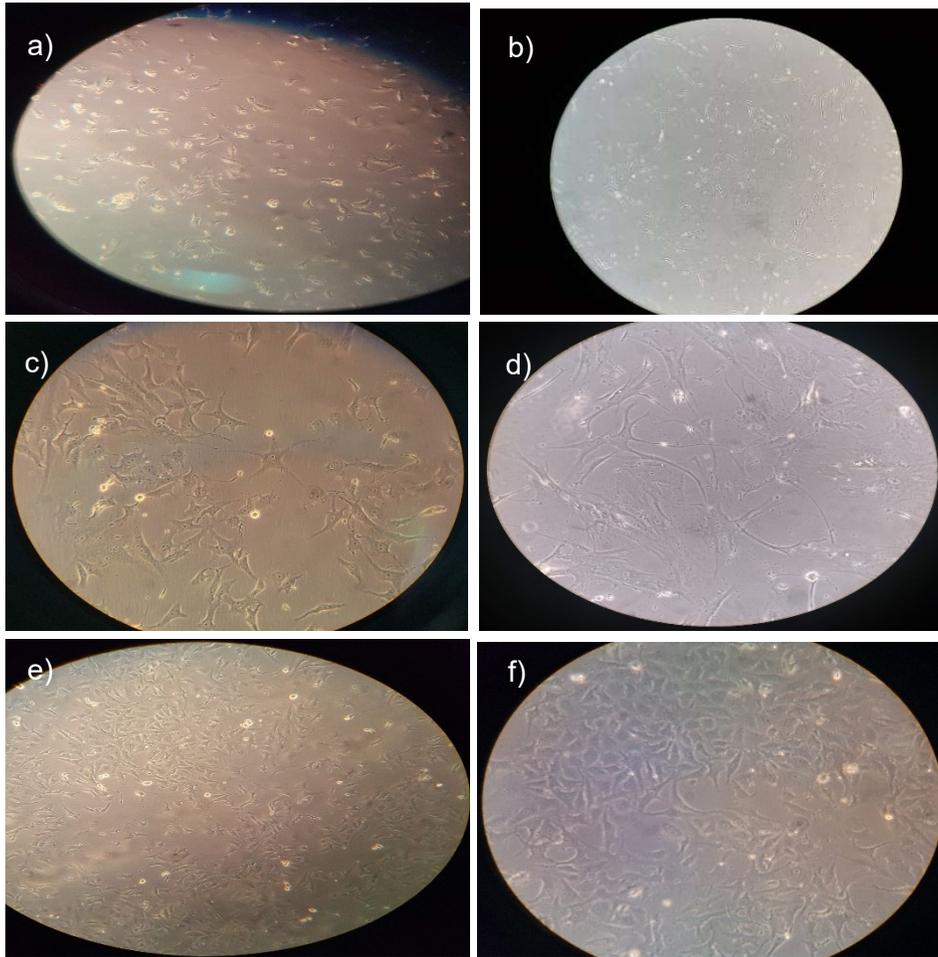
**Figura 83.** Proliferación de las células Madres provenientes tejido adiposo sobre los diferentes tipos de scaffolds a 24 y 48 horas ( $n=6$ ,  $p<0,05$ )

En la figura 84, se muestran las imágenes obtenidas por microscopio de fluorescencia para la adhesión celular y las fotomicrografías de microscopía electrónica de barrido (SEM), correspondiente al cultivo de las ADSCs en presencia de los scaffolds con y sin dopaje, esta es una forma de evaluar la adhesión de manera cualitativa, claramente puede evidenciarse como el scaffold dopado favorece la adhesión celular comparado con el scaffold sin dopar.



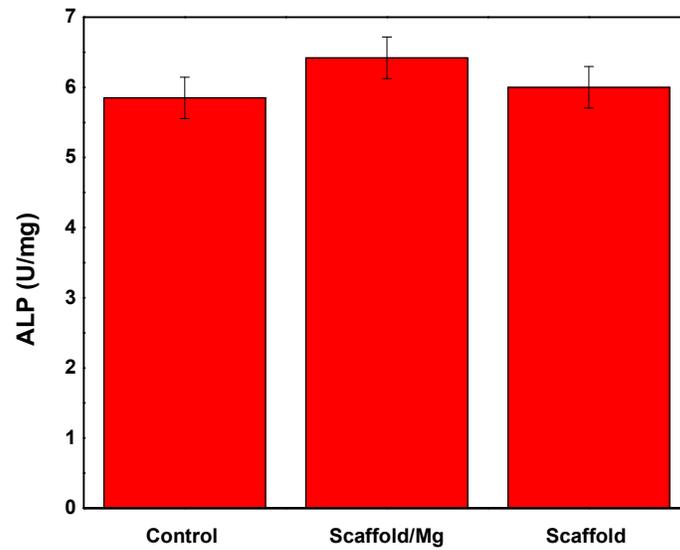
**Figura 84.** Adhesión celular de ADSCs obtenidas por microscopía de fluorescencia y microscopía electrónica de barrido respectivamente para: a) y c) Scaffold sin dopaje, b) y d) Scaffold con 5%w Mg

Una vez obtenidas las células madre mesenquimales a partir de tejido adiposo y explantes de pulpa dental, se continuó con la investigación orientada a la capacidad de diferenciación osteogénica que podrían tener las células. Para realizar la diferenciación, se utilizaron las células provenientes del pase 2 y 5 de los cultivos celulares. La diferenciación se realizó suplementando el medio inicial con un medio de diferenciación y fue evaluado a 7, 14 y 23 días de cultivo con tres replicas para cada uno (figura 85).



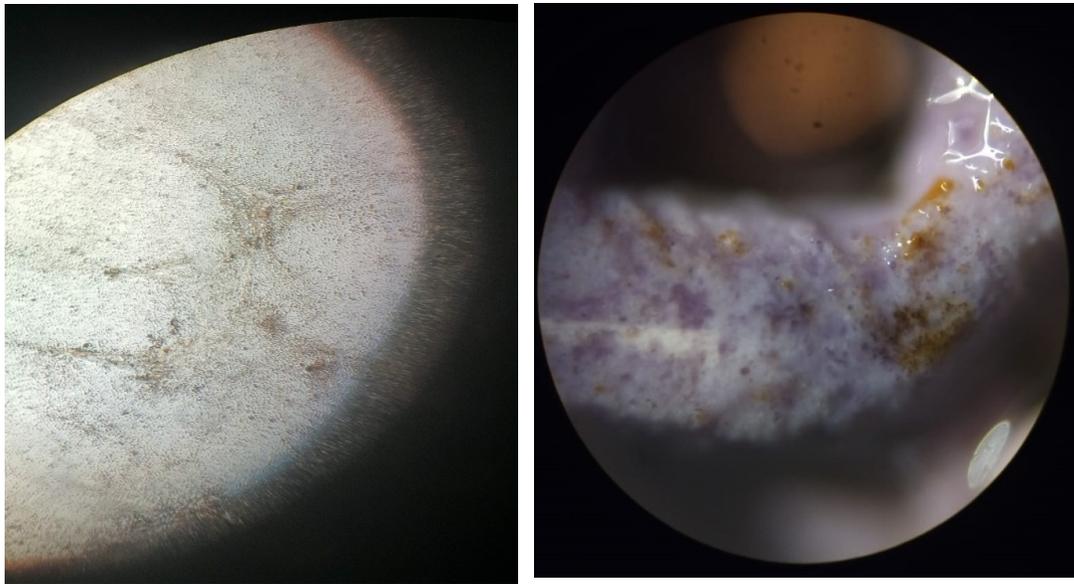
**Figura 85.** Cultivo celular células madre provenientes de tejido Adiposo (a, c y e) y Pulpa dental (b,d y f) en etapa de diferenciación.

La capacidad de diferenciación ósea se comprobó por medio de la detección de la actividad de la fosfatasa alcalina, un marcador temprano del fenotipo de los osteoblastos [17]. En vista, que para las células ADSCs pudo comprobarse su origen de una línea de células madre, la diferenciación osteogénica fue referenciada sólo para ellas. La figura 86, muestra la actividad de la fosfatasa alcalina en los dos tipos de scaffold a los 14 días a partir de células ADSCs en medio de diferenciación osteogénico. En este tiempo se evidenció que el scaffold con dopaje presentó mayor ALP comparado con el scaffold sin dopaje y el control. A pesar de que se hicieron mediciones en el 7 día, estas no evidenciaron un incremento en la ALP, lo que indica que a este tiempo aún no se encontraban diferenciadas.



**Figura 86.** Actividad de fosfatasa alcalina (ALP).

La figura 87, evidencia los depósitos de calcio en los scaffold dopado con Mg observados con microscopio óptico.



**Figura 87.** Depósitos de calcio en Scaffold con dopaje.

## 5.6 Conclusiones

Las técnicas y protocolos utilizados, permitieron el aislamiento y expansión de células madre mesenquimales provenientes de tejido adiposo y pulpa dental humana. Además, fue posible su mantenimiento hasta el pase 5 sin que dicho tratamiento afectara su comportamiento.

Los resultados obtenidos en la viabilidad medida por MTT corroboraron que los scaffold no presentan efectos citotóxicos que puedan generar muerte celular.

A pesar de que las células provenientes de que, en los explantes de pulpa dental, no se realizó una citometría de flujo que evidenciará los antígenos de superficie CD105 y CD90 característicos de las células madre mesenquimales, se pudo corroborar un comportamiento adecuado en cuanto a la adhesión y proliferación celular, pero mucho menor comparado con las células proveniente de tejido adiposo.

En cuanto a la adhesión y proliferación celular, se evidenció un buen comportamiento de las células madre, siendo los scaffold dopados con magnesio quienes evidenciaron mejor adhesión y esto puede estar asociado con el dopaje, ya que el magnesio es conocido por favorecer la adhesión y proliferación celular. A pesar, de los resultados de citotoxicidad y adhesión favorable, los scaffold sin dopaje presentaron una menor adhesión comparada con el control y los scaffolds dopados, esto puede estar asociado principalmente al material con el que se encuentra formada la pasta cerámica que al degradarse puede dejar trazas que impidan la óptima adhesión celular.

Las células mesenquimales provenientes de tejido adiposo humano, presentaron una buena capacidad de diferenciación a una estirpe osteogénica lo que posibilita su utilización en terapias de regeneración ósea.

Los scaffolds mostraron estructuras con porosidad interconectada y una superficie porosa característica del tipo de material utilizado en regeneración ósea, las propiedades de superficie son fundamentales para la adhesión y proliferación celular.

La capacidad de diferenciación a una estirpe osteogénica fue comprobada por medio de la actividad de la fosfatasa alcalina. Las células madre mesenquimales provenientes de

## Referencias Bibliográficas

- [1] L. Satish, J. M. Krill-Burger, P. H. Gallo, S. Des Etages, F. Liu, B. J. Philips, S. Ravuri, K. G. Marra, W. A. LaFramboise, S. Kathju, and J. P. Rubin, "Expression analysis of human adipose-derived stem cells during in vitro differentiation to an adipocyte lineage," *BMC Med. Genomics*, vol. 8, p. 41, Jul. 2015.
- [2] J. C. Ra, I. S. Shin, S. H. Kim, S. K. Kang, B. C. Kang, H. Y. Lee, Y. J. Kim, J. Y. Jo, E. J. Yoon, H. J. Choi, and E. Kwon, "Safety of intravenous infusion of human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells in animals and humans.," *Stem Cells Dev.*, vol. 20, no. 8, pp. 1297–1308, Aug. 2011.
- [3] L.-Y. Sun, C.-Y. Pang, D.-K. Li, C.-H. Liao, W.-C. Huang, C.-C. Wu, Y.-Y. Chou, W. W. Li, S.-Y. Chen, H.-W. Liu, Y.-J. Chang, and C.-F. Cheng, "Antioxidants cause rapid expansion of human adipose-derived mesenchymal stem cells via CDK and CDK inhibitor regulation," *J. Biomed. Sci.*, vol. 20, no. 1, p. 53, Aug. 2013.
- [4] D. Arencibia, L. Fernández, and D. Sánchez, "Principal assays that to determine the cytotoxicity of a substance, some considerations and their utility," *RETEL Rev. Toxicol. en Línea*, Jan. 2009.
- [5] E. García, C. Bautista-Garfias, and I. García, "Evaluación del bioensayo de MTT para determinar la proliferación in vitro de linfocitos de bovino, frescos y congelados," *Vet. Mex.*, Jan. 2000.
- [6] Alberto Checa Rojas, "Tinción de Cristal Violeta (0.5%) en cultivo de células adherentes," 2018. .
- [7] C. Wang, X. Cao, and Y. Zhang, "A novel bioactive osteogenesis scaffold delivers ascorbic acid, beta-glycerophosphate, and dexamethasone in vivo to promote bone regeneration.," *Oncotarget*, vol. 8, no. 19, pp. 31612–31625, May 2017.
- [8] J.-B. Park, "The effects of dexamethasone, ascorbic acid, and beta-glycerophosphate on osteoblastic differentiation by regulating estrogen receptor and

- osteopontin expression.," *J. Surg. Res.*, vol. 173, no. 1, pp. 99–104, Mar. 2012.
- [9] R. T. Franceschi, B. S. Iyer, and Y. Cui, "Effects of ascorbic acid on collagen matrix formation and osteoblast differentiation in murine MC3T3-E1 cells.," *J. Bone Miner. Res.*, vol. 9, no. 6, pp. 843–854, Jun. 1994.
- [10] A. Shioi, Y. Nishizawa, S. Jono, H. Koyama, M. Hosoi, and H. Morii, "Beta-glycerophosphate accelerates calcification in cultured bovine vascular smooth muscle cells.," *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, vol. 15, no. 11, pp. 2003–2009, Nov. 1995.
- [11] C. H. Chung, E. E. Golub, E. Forbes, T. Tokuoka, and I. M. Shapiro, "Mechanism of action of beta-glycerophosphate on bone cell mineralization.," *Calcif. Tissue Int.*, vol. 51, no. 4, pp. 305–311, Oct. 1992.
- [12] X. Ma, X. Zhang, Y. Jia, S. Zu, S. Han, D. Xiao, H. Sun, and Y. Wang, "Dexamethasone induces osteogenesis via regulation of hedgehog signalling molecules in rat mesenchymal stem cells.," *Int. Orthop.*, vol. 37, no. 7, pp. 1399–1404, Jul. 2013.
- [13] T. Scientific, "Protocol Alkaline Phosphatase (ALP) Reagent (2 Part Liquid)." [Online]. Available: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/TR11320#/TR11320>.
- [14] K. Sridhar, N. Manickam, and K. Goswami, "Measurement of Total Alkaline Phosphatase Activity in Human Serum using Charcoal Activated para-Nitro Phenyl Phosphate," *Int. J. Sci. Res.*, vol. 5, pp. 1315–1317, Apr. 2016.
- [15] H. Bergmeyer, M. Horder, and R. Rej, "Approved recommendation (1985) on IFCC methods for the measurement of catalytic concentration of enzymes. Part 2. IFCC method for aspartate aminotransferase (L-aspartate: 2-oxoglutarate aminotransferase, EC 2.6.1.1)," *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.*, vol. 24, pp. 497–508, Jan. 1986.
- [16] J. Ma, N. Zhao, and D. Zhu, "Biphasic responses of human vascular smooth muscle cells to magnesium ion," *J. Biomed. Mater. Res. A*, vol. 104, no. 2, pp. 347–356,

Feb. 2016.

- [17] I. M. Linero, A. Doncel, and O. Chaparro, “Proliferación y diferenciación osteogénica de células madre mesenquimales en hidrogeles de plasma sanguíneo humano,” *Biomédica*, vol. 34, no. 1 SE-Artículos originales, pp. 67–78, Mar. 2014.

## Conclusiones Generales y Recomendaciones

La experticia que se tiene en el grupo de investigación cerámico y vítreo de la Universidad Nacional de Colombia, en cuanto a la síntesis de nuevos materiales cerámicos, permitió la obtención de polvos de biovidrio de borato y fosfatos de calcio en fase  $\beta$ , vía sol-gel y autocombustión respectivamente. Vale la pena destacar que algunas de las rutas de síntesis exploradas, evidenciaron la obtención del material cerámico como biovidrio por rutas diferentes a las comúnmente exploradas.

Los scaffolds fabricados por impresión 3D con una pasta cerámica completamente inorgánica, evidenciaron su potencial uso en regeneración de tejidos óseos aun cuando no se tiene un componente orgánico encargado de potencializar las interacciones celulares. Las pruebas biológicas realizadas lograron comprobar las propiedades con las que cuentan los materiales cerámicos y su uso en investigaciones biológicas debido principalmente a que no generan ningún tipo de reacción que conlleve a la muerte celular.

Las técnicas de caracterización de los materiales cerámicos aportaron grandes hallazgos en la investigación, gracias a ellas, se evidenciaron las rutas más óptimas para la obtención de polvos asociados a biovidrios y fosfatos de calcio. Siendo la ruta sol-gel para el biovidrio de boro y la auto combustión para el fosfato de calcio las rutas más óptimas para la formulación de la pasta cerámica.

La degradabilidad del material jugó un papel importante en el desempeño tanto del polvo cerámico como del scaffold. A través de la degradabilidad se evidenció el comportamiento de los materiales cerámicos en medios biológicos in vitro, los cuales interactuaron de manera satisfactoria.

El diseño de experimentos permitió optimizar la formulación de la pasta cerámica, proporcionando un modelo que se validó en los ensayos experimentales. A partir de este se determinó la zona donde se encontraban las formulaciones más adecuadas para la conformación de la pasta cerámica, siendo 3% atapulgita; 2% agua; 28.5% biovidrio de

## Conclusiones Generales y Recomendaciones

---

boro y 66.5% fosfato de calcio la formulación más óptima en cuanto a los requerimientos a nivel estructural, composicional y biológicos requeridos.

La correlación de los parámetros reológicos de la pasta cerámica formulada evidenció su buen comportamiento y permitió su caracterización como fluido no newtoniano, cumpliendo las características exigidas en cuanto a consistencia y estabilidad.

La formulación de la pasta cerámica permitió la impresión del scaffold con una geometría TPMS-Diamante, que cumple con las especificaciones y características requeridas para cubrir necesidades de tipo óseo. Dichas necesidades siempre apuntaron a la interconectividad de poros, porosidad adecuada establecida en los rangos del tejido óseo, comportamiento a nivel biológico que permitiera su interacción con las células y posterior regeneración ósea.

Con la finalidad de monitorear el comportamiento de los polvos cerámicos y de los scaffold en cuanto a actividad antimicrobiana y teniendo en cuenta que uno de los principales efectos negativos que presentan estos materiales es la contaminación bacteriana que surge alrededor de ellos una vez entran en contacto con cultivos celulares, se dopó el fosfato de calcio con Mg, encontrándose que el fosfato de calcio sin dopaje presentó efectos inhibitorios frente a *S. mutans*, siempre y cuando su concentración fuera alta. Caso contrario ocurrió cuando el fosfato de calcio fue dopado con Mg, el cual generó un decrecimiento en la proliferación de la cepa, pudiéndose comparar su comportamiento muy similar al poder inhibitorio que presentan los biovidrios.

A pesar de que los ensayos a nivel biológico, con respecto a la regeneración ósea no fueron planteados en células de linaje osteoblástico, las técnicas utilizadas en el aislamiento y expansión de las células madre mesenquimales provenientes de tejido adiposo fueron exitosas toda vez que pudo comprobarse sus antígenos característicos por citometría de flujo.

El dopaje con Mg, no sólo jugó un papel importante en el comportamiento inhibitorio de las cepas bacteriana, sino que también permitió una mejor proliferación de las células madre mesenquimales provenientes del tejido adiposo y de explantes de pulpa dental.

En general, el organigrama seguido en este trabajo de investigación permitió la obtención de materiales cerámicos con características aptas para ser utilizados a nivel biológico en regeneración ósea, ya que no se evidenció una citotoxicidad y la adhesión celular tuvo un

comportamiento favorable. Cabe resaltar, orientación de las células madre mesenquimales a una estirpe osteogénica. Todo este trabajo en conjunto evidencia el potencial uso de los scaffolds obtenidos en cuanto a regeneración ósea.

Para futuros avances en el área de esta investigación, se recomienda realizar estudios más amplios que aborden las propiedades mecánicas del scaffold y permitan corroborar su aplicación en regeneración ósea.