



UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE COLOMBIA

Producción por manufactura aditiva de andamios con propiedades antimicrobianas a partir de Propóleos de Tame (Arauca) para regeneración ósea

Ana Isabel Moreno Flórez

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ciencias, Área curricular Biotecnología.
Medellín, Colombia
2023

Producción por manufactura aditiva de andamios con propiedades antimicrobianas a partir de Propóleos de Tame (Arauca) para regeneración ósea

Ana Isabel Moreno Flórez

Tesis o trabajo de investigación presentada(o) como requisito parcial para optar al título de:

Doctora en Biotecnología

Director (a):

PhD. Claudia García García

Codirector (a):

PhD. Alejandro Peláez Vargas

Línea de Investigación:

Biomateriales

Grupo de Investigación:

Grupo de Materiales Cerámicos y Vítreos Universidad Nacional de Colombia – Sede
Medellín

Grupo de Investigación en Odontología Multidisciplinar - GIOM

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ciencias, Área curricular Biotecnología

Medellín, Colombia

2023

Dedicatoria

Dedico este trabajo a mi familia, por su amor incondicional, apoyo constante y paciencia interminable. A mi madre, cuyo esfuerzo me ha permitido llegar hasta aquí. A mis hermanos, por su constante ánimo sin el cual habría sido difícil continuar. A mi hijo, que con su energía me recuerda siempre por qué debo continuar. A mis amigos y seres queridos, que han sido un apoyo fundamental a lo largo de este viaje. A mis directores de tesis, por su guía, sabiduría y paciencia. A todos los que creyeron en mí, esto es para ustedes.

Agradecimientos

Quiero agradecer a todos aquellos que directa o indirectamente me han apoyado científica, técnica y socialmente durante este viaje, todos ustedes ocupan un lugar muy especial en mi corazón. Gracias a esta experiencia tan sustancial tuve la oportunidad de conocer, aprender y compartir de diferentes culturas y regiones tanto de nuestro país como del resto del mundo, dándome una oportunidad única de crecimiento personal y profesional, que se ha convertido en uno de mis tesoros más preciados.

También quiero agradecer a los fondos proporcionados por la beca de Minciencias Plan Bienal de Convocatorias 2019 y al Proyecto: *Desarrollo de andamios producidos por fabricación aditiva mejorados con la incorporación de propóleos de Tame (Arauca) para la regeneración ósea con la incorporación de propóleos de Tame (Arauca) para la regeneración ósea*. Código 71203- Convocatoria de proyectos que conectan el conocimiento. 2019 852-2019. Número de contrato 80740-476-2020.

Por último, pero no menos importante agradezco a la Universidad Nacional de Colombia Sede Medellín, a la Universidad Cooperativa de Colombia Sede Medellín y Envigado, a la Universidad Eafit, en especial al profesor Alex Ossa, quien fue un apoyo incondicional y necesario durante todo este proceso y al Centro de Biotecnología Biomédica, Investigación y Desarrollo de Implantes (NIFE) de la Universidad Leibniz de Hannover (Alemania), las cuales tuvieron un papel crucial en mi proceso de formación personal y profesional y sin las cuales este sueño no habría sido posible. También quiero dar un especial agradecimiento a la Asociación de Apicultores de Tame, Arauca por abrirme las puertas al corazón de su labor y permitirme trabajar de su mano en pro del desarrollo de nuestra amada región.

Resumen

Producción por manufactura aditiva de andamios con propiedades antimicrobianas a partir de Propóleos de Tame (Arauca) para regeneración ósea

Una alternativa para solucionar la problemática de los defectos es la manufactura aditiva, específicamente en el diseño y fabricación de dispositivos de reemplazamiento óseo. Sin embargo, la posibilidad de fallo debido a infecciones requiere mejoras en el potencial antimicrobiano de estos dispositivos. En esta tesis se propuso desarrollar por manufactura aditiva andamios antimicrobianos potencializados con extractos de propóleos para regeneración ósea. Se utilizó un diseño de experimentos factorial fraccional en la formulación de una pasta cerámica empleada como tinta de impresión 3D para fabricar andamios con geometría TPMS Gyroid, los cuales se impregnaron con extractos etanólicos de propóleos (EEP). Se evaluó la actividad antimicrobiana de los EEP y de los andamios impregnados con EEP (AI) frente a *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* y su co-cultivo midiendo zonas de inhibición y la viabilidad de biopelículas. En pruebas *in vitro* se evaluó la interacción de los andamios con cultivos celulares de osteosarcoma humano (SaOS) y células madre mesenquimales humanas (bmMSC) en términos de proliferación celular (Ensayo alamar blue) y actividad metabólica (Tinciones de Alizarin red, Von kossa y Actividad de la ALP). Los resultados mostraron que la manufactura aditiva permitió la fabricación de andamios cerámicos con geometrías complejas que se impregnaron exitosamente con extractos de propóleos provenientes de la Orinoquía Colombiana, los cuales mostraron inhibición considerable de las cepas estudiadas y reducción significativa en la viabilidad del co-cultivo por parte de los AI. La evaluación *in vitro* mostró una proliferación en los andamios superior al 90 % de las SaOS y cercano al 50 % de las bmMSC, además se encontraron zonas con señales de mineralización. En conclusión, los andamios fabricados son aptos para la reparación y regeneración ósea y presentan un potencial antibacteriano contra cepas relacionadas con el desarrollo de osteomielitis.

Palabras clave: Impresión 3D, regeneración ósea, wollastonita, actividad antimicrobiana, propóleos.

Abstract

Production by additive manufacturing of scaffolds with antimicrobial properties from Propolis from Tame (Arauca) for bone regeneration.

The problem of bone defects has been addressed through additive manufacturing, specifically with bone replacement devices. However, the potential for failure due to infection makes it necessary to improve the antimicrobial potential of these devices. The aim of this thesis is to develop antimicrobial scaffolds by additive manufacturing, enhanced with propolis extract for bone regeneration. A fractional factorial design of experiments was used to formulate a ceramic paste used as a 3D printing ink to fabricate scaffolds with TPMS gyroid geometry. These were impregnated with ethanolic extracts of propolis (EEP). The antimicrobial activity of EEP and EEP-impregnated scaffolds (AI) was evaluated against *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* and their co-cultures by measuring inhibition zones and biofilm viability. In vitro assays evaluated the interaction of the scaffolds with cultures of human osteosarcoma cells (SaOS) and human mesenchymal stem cells (bmMSC) in terms of cell proliferation (Alamar blue assay) and metabolic activity (Alizarin red, Von Kossa staining and ALP activity). The results showed that additive manufacturing made possible the fabrication of ceramic scaffolds with complex geometries that were successfully impregnated with propolis extracts from the Colombian Orinoco region, which showed considerable inhibition of the studied strains and significant reduction in the viability of the co-culture by the IAs. The in vitro evaluation showed a proliferation in the scaffolds higher than 90 % of the SaOS and close to 50 % of the bmMSC, in addition, areas with signs of mineralization were found. In conclusion, the fabricated scaffolds are suitable for bone repair and regeneration and present antibacterial potential against strains related to the development of osteomyelitis.

Keywords: 3D printing, bone regeneration, wollastonite, antimicrobial activity, propolis.

Contenido

	Pág.
Resumen.....	VIII
Lista de figuras	XV
Lista de tablas	XVIII
Lista de Símbolos y abreviaturas	1
Introducción	5
Objetivos	9
Objetivo General	9
Objetivos Específicos.....	9
Estructura de la Tesis.....	10
1. Diseño y Obtención de andamios porosos mediante impresión 3D con potencial antimicrobiano para regeneración ósea	13
1.1 Ingeniería de Tejidos	13
1.1.1 Tejido óseo y Traumatismos	15
1.1.2 Manufactura Aditiva	18
1.1.3 Impresión 3D en reparación de tejido óseo	21
1.1.4 Wollastonita como material para implantación ósea.....	23
1.2 Osteomielitis.....	26
1.3 Resistencia antibiótica y productos naturales como emergentes antibacterianos ..	29
• 1.3.1 Propóleos	31
2. Extractos etanólicos de propóleos de Tame (Arauca). Producción y caracterización de su actividad antioxidante y antimicrobiana.....	33
Abstract	33
Resumen.....	34
2.1 Introducción	36
2.2 Metodología.....	37
2.2.1 Recolección de propóleos	37
2.2.3 Caracterización Fisicoquímica.....	38
• Porcentaje de humedad	38
• Cuantificación de material extractable en Hexano y porcentaje de ceras	39
• Determinación de Cenizas	39

• Obtención de Extractos Etanólicos de Propóleos.....	40
2.2.4 Actividad Antioxidante	41
• Cuantificación del contenido total de Flavonoides.....	41
• Cuantificación del contenido total de Fenoles	42
• Actividad antioxidante mediante captación del radical libre 2,2-Difenil-1-Picrilhidrazilo DPPH'	43
• Actividad antioxidante mediante captación del radical libre 2, 2'-Azinobis-3-etilbenzo-tiazolina-6-acido sulfónico ABTS' +	44
2.2.5 Actividad antimicrobiana.....	45
• Medidas de Zona de Inhibición	45
• Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI).....	45
• Determinación de la Concentración Mínima Bactericida (CMB)	46
2.2.6 Análisis Estadístico.....	47
2.3 Resultados y Discusión	47
• 2.3.1 Caracterización Organoléptica.....	47
2.3.2 Caracterización Físicoquímica.....	49
2.3.3 Actividad Antioxidante	50
• Cuantificación de Fenoles y Flavonoides Totales	50
• Captación de radicales libres de DPPH y ABTS	52
2.3.4 Actividad Antimicrobiana	54
• Medidas de Zonas de Inhibición	54
• Determinación de la concentración Mínima Inhibitoria CMI y Concentración Mínima bactericida CMB	56
2.4 Conclusión	57
3. Obtención de un andamio poroso para regeneración ósea mediante impresión 3D	58
Abstract	58
Resumen	59
3.1 Introducción.....	60
3.2 Metodología	62
3.2.1 Diseño de Experimentos y formulación de la pasta cerámica	62
3.2.2 Comportamiento Reológico	63
3.2.3 Impresión de Andamios.....	64
3.2.5 Porosidad e interconectividad de los andamios	66
3.2.5 Impregnación de los andamios.....	67
3.2.6 Espectro FTIR	67
3.2.7 Curva de pH	68
2.4 Resultados y Discusión	68
• 3.3.1 Diseño de Experimentos	68
3.3.2 Comportamiento Reológico	71
3.3.3 Impresión de Andamios.....	74
1.3.4 Difracción de Rayos X e impregnación de andamios	76
• 3.3.4 Porosidad e interconectividad de los andamios.....	78
• 3.3.5 Espectro FTIR.....	79
• 3.3.6 Curva de pH.....	81
3.4 Conclusiones.....	82
4. Actividad antimicrobiana de andamios porosos impregnados con Extractos Etanólicos de Propóleos.....	84

Abstract	84
Resumen	85
4.1 Introducción	86
2.5 Metodología	88
4.2.1 Zonas de Inhibición	88
4.2.2 Viabilidad de Biopelículas monoespecie	89
4.1.4 Análisis Estadístico	91
4.3 Resultados y Discusión	92
4.3.1 Zonas de Inhibición	92
4.3.2 Viabilidad de Biopelículas monoespecie	93
4.3.3 Viabilidad de Biopelículas multiespecie	97
4.4 Conclusión	99
5. Actividad biológica <i>in vitro</i> de andamios porosos impregnados con Extractos Etanólicos de Propóleos	100
Abstract	100
Resumen	101
5.1 Introducción	102
5.2 Metodología	104
5.2.1 Ensayo de proliferación celular	106
5.2.2 Tinción de Alizarin Red	107
5.2.4 Tinción de actividad de la Fosfatasa alcalina (ALP)	107
5.2.5 Propiedades Mecánicas	108
5.2.6 Análisis Estadístico	108
5.3.1 Ensayo de proliferación celular	109
5.3.2 Tinción de Alizarin Red	113
5.3.3 Tinción de Von Kossa	115
5.3.4 Tinción de actividad de la Alcalino Fosfatasa (ALP)	118
5.4 Conclusión	123
6. Conclusiones y recomendaciones	124
6.1 Conclusiones	124
6.2 Recomendaciones	125
A. Anexo: Artículo 1.....	127
B. Anexo: Artículo 2.....	128
C. Anexo: Artículo 3.....	129
D. Anexo: Artículo 4.....	130
E. Anexo: Artículo 5.....	131
F. Anexo: Artículo 6.....	132
Bibliografía	133

Lista de figuras

	Pág.
Figura 1-1: Arquitectura del hueso-----	16
Figura 1-2: Variantes de la manufactura aditiva -----	18
Figura 1-3: Diagrama de los tipos de scaffolds obtenidos mediante la variación del tamaño del poro y su distribución-----	24
Figura 1-4: Presentación histopatológica de las características de la puntuación de la evaluación histopatológica de la osteomielitis (HOES) por graduación (I-IV): a). Signos de una osteítis/osteomielitis aguda, b). Signos de una osteítis/osteomielitis crónica activa, c). Signos de una osteítis/osteomielitis crónica, d). Signos de una osteítis/osteomielitis remitida/calmada. -----	28
Figura 2-1: Recolección de propóleos con asociación de apicultores Colmiel-----	37
Figura 2-2: Obtención de extractos etanólicos de propóleos. Propóleos pulverizados, filtración por gravedad y rotoevaporación.-----	40
Figura 2-3: Estructura del complejo Tricloruro de Aluminio- Flavonoide -----	41
Figura 2-4: Mecanismo de acción del reactivo de Folin-Ciocalteu -----	42
Figura 2-5: Medidas de la Zona de Inhibición de los Extractos de Propóleos (EEP) frente a <i>S. aureus</i> y <i>S.epidermidis</i> -----	55
Figura 3-1: Obtención de la pasta cerámica. a) Mezcla manual con espátula. b)Agitación con el homogeneizador axial. c) Pasta cerámica homogénea d) Proceso de llenado de la jeringa para posterior impresión-----	63
Figura 3-2: obtención del G code a partir de la superficie obtenida mediante MathMod	64
Figura 3-3: Montaje experimental del DOE. a) Montaje para evaluar la “printabilidad” de las formulaciones obtenidas según el DOE. b y c) Material siendo extruido mediante el montaje empleado para evaluar cada formulación del DOE. -----	69
Figura 3-4: Resultados final de la extrusión de las formulaciones 1-4 del DOE. -----	69
Figura 3-5: Curvas de Fuerza vs Desplazamiento obtenidas como resultado de la extrusión de las formulaciones 1-4 del DOE. -----	70
Figura 3-6: Comportamiento reológico de las suspensiones de wollastonita y ajuste lineal mediante el modelo de Herschel-Bulkley. -----	72
Figura 3-7: a) Diseño CAD para los andamios cilíndricos, b) Montaje en jeringa para la extrusión e impresión de los andamios, c) Microfotografía de la medida de los poros en los andamios, d) Microfotografía de las capas sinusoidales en el andamio, e) Diseño CAD de los andamios cúbicos, f) Vista frontal de un andamio impreso y g) Vista de la capa posterior de un andamio impreso-----	74
Figura 3-8: a) Imágenes de Microscopía Electrónica de Barrido (SEM) de los andamios obtenidos mediante impresión 3D. a-b) Muestra la curvatura en las capas impresas, así como la c) estructura tridimensional de las paredes de los macroporos, y finalmente, d-e) la estructura prismática de los cristales característicos de wollastonita. f-h) Caracterización por Espectroscopía Energética Dispersiva de Rayos X (EDS) elemental del andamio obtenido mediante impresión 3D, mostrando la presencia de Si, Ca, y O--	75

Figura 3-9: Difractograma Wollastonita y muestras de wollastonita sin tratamiento térmico y wollastonita con tratamiento térmico a 1180 °C -----	76
Figura 3-11: Análisis FTIR. A) Espectro FTIR de los propóleos y de la Wollastonita impregnada con propóleo. B) Ampliación de los espectros entre 400 cm ⁻¹ y 1200 cm ⁻¹ .	79
Figura 3-12: Curva de pH de los andamios impregnados (AI) y sin impregnar (AC) durante 70 horas. -----	81
Figura 4-1: Procedimiento para medir las zonas de inhibición de los andamios. a) Obtención del inóculo. b) Siembra en placa del inóculo. C) Andamio sembrado en la placa. d) Incubación de las placas. -----	89
Figura 4-2: Procedimiento para medir la viabilidad de las biopelículas formadas en los andamios. a) Cepas bacterianas. b) Obtención del inóculo. c) Andamio sembrado en placa. d) Período de incubación. e) Lectura de las coloraciones formadas al agregar reactivo de MTT. -----	90
Figura 4-3: Actividad antibacteriana de los andamios impregnados (AI) y los andamios sin impregnar (AC). a) Mediciones de las zonas de inhibición de AI y la Clorhexidina digluconato (C+). b) Imagen de la zona de inhibición de AC, AI, C+ y C- frente a <i>S. aureus</i> . c) Imagen de la zona de inhibición de AC, AI, C+ y C- frente a <i>S. epidermidis</i> .	92
Figura 4-4: a) Viabilidad de las biopelículas formadas por <i>S. epidermidis</i> y <i>S. aureus</i> sobre los andamios control (AC) y los andamios impregnados con EEP (AI) tras 24 h de cultivo. b) Fotografía de los andamios AC (filas 1 y 3) y IS (Filas 2 y 4) tras agregar MTT y 2 horas de incubación. -----	94
Figura 4-5: a) Viabilidad de las biopelículas formadas por <i>S. epidermidis</i> y <i>S. aureus</i> sobre los andamios control (AC) y los andamios impregnados con EEP (AI) tras 48 h de cultivo. b) Fotografía de la placa con las soluciones de DMSO obtenidos de los andamios tras 24 y 48 h de cultivo. -----	95
Figura 4-6: Fotomicrografías de barrido electrónico (SEM) a) Andamios sin impregnar (AC) frente a <i>S. aureus</i> . b) Andamios impregnados (AI) frente a <i>S. aureus</i> . c) Andamios sin impregnar (AC) frente a <i>S. epidermidis</i> . d) Andamios impregnados (AI) frente a <i>S. epidermidis</i> . -----	96
Figura 4-7: Viabilidad de las biopelículas del co-cultivo sobre los andamios impregnados con EEP (AI) y de los andamios sin impregnar (AC) tras 24 y 48 h de co-cultivo. -----	97
Figura 4-8: Fotomicrografías de barrido electrónico (SEM) a) Andamios sin impregnar (AC) frente al co-cultivo de <i>S. aureus</i> y <i>S. epidermidis</i> . b) Andamios impregnados (AI) frente al co-cultivo de <i>S. aureus</i> y <i>S. epidermidis</i> . -----	98
Figura 5-1: Proliferación celular de células madre mesenquimales de médula ósea humana (bmMSC). a) Porcentaje de viabilidad de bmMSC en andamios impregnados de propóleos (AI) y en andamios sin impregnación de propóleos (AC). b-c) SEM de bmMSC adheridas en andamios sin impregnación de propóleos (AC) durante 21 y 28 días de cultivo. d-e) SEM de bmMSC adheridas en andamios impregnados con propóleos (AI) durante 21 y 28 días de cultivo. -----	109
Figura 5-2: Proliferación celular de células de osteosarcoma humano (SaOS). a) Porcentaje de viabilidad de SaOS en andamios impregnados de propóleos (AI) y en andamios sin impregnación de propóleos (AC). b-c) SEM de SaOS adheridas en	

andamios sin impregnación de propóleos (AC) durante 21 y 28 días de cultivo. d-e) SEM de SaOS adheridas en andamios impregnados con propóleos (AI) durante 21 y 28 días de cultivo. -----	111
Figura 5-3: Tinción de Alizarin Red de los andamios en cultivo con células madre mesenquimales de médula ósea humana (bmMSC). a-c) Andamios sin impregnar con propóleos (AC) sin células (CTRL), tras 21 y 28 días de cultivo. d-f) Andamios impregnados con propóleos (AI) sin células (CTRL), tras 21 y 28 días de cultivo. g-i) Pozos sin andamios usados como control, cultivo sin tinción al inicio del experimento y con tinción tras 21 y 28 días de cultivo. -----	113
Figura 5-4: Tinción de Alizarin Red de los andamios en cultivo con células de osteosarcoma humano (SaOS). a-c) Andamios sin impregnar con propóleos (AC) sin células (CTRL), tras 21 y 28 días de cultivo. d-f) Andamios impregnados con propóleos (AI) sin células (CTRL), tras 21 y 28 días de cultivo. g-i) Pozos sin andamios usados como control, cultivo sin tinción al inicio del experimento y con tinción tras 21 y 28 días de cultivo. -----	115
Figura 5-5: Tinción de Von kossa de los andamios en cultivo con células madre mesenquimales de médula ósea humana (bmMSC). a-c) Andamios sin impregnar con propóleos (AC) sin células (CTRL), tras 21 y 28 días de cultivo. d-f) Andamios impregnados con propóleos (AI) sin células (CTRL), tras 21 y 28 días de cultivo. g-i) Pozos sin andamios usados como control, cultivo sin tinción al inicio del experimento y con tinción tras 21 y 28 días de cultivo. -----	116
Figura 5-6: Tinción de Von Kossa de los andamios en cultivo con de osteosarcoma humano (SaOS). a-c) Andamios sin impregnar con propóleos (AC) sin células (CTRL), tras 21 y 28 días de cultivo. d-f) Andamios impregnados con propóleos (AI) sin células (CTRL), tras 21 y 28 días de cultivo. g-i) Pozos sin andamios usados como control, cultivo sin tinción al inicio del experimento y con tinción tras 21 y 28 días de cultivo. ---	117
Figura 5-7: Tinción de la actividad de la alcalina fosfatasa (ALP) de los andamios en cultivo con células madre mesenquimales de médula ósea humana (bmMSC). a-c) Andamios sin impregnar con propóleos (AC) sin células (CTRL), tras 21 y 28 días de cultivo. d-f) Andamios impregnados con propóleos (AI) sin células (CTRL), tras 21 y 28 días de cultivo. g-i) Pozos sin andamios usados como control, cultivo sin tinción al inicio del experimento y con tinción tras 21 y 28 días de cultivo. -----	118
Figura 5-8: Tinción de la actividad de la alcalina fosfatasa (ALP) de los andamios en cultivo con células de osteosarcoma humano (SaOS). a-c) Andamios sin impregnar con propóleos (AC) sin células (CTRL), tras 21 y 28 días de cultivo. d-f) Andamios impregnados con propóleos (AI) sin células (CTRL), tras 21 y 28 días de cultivo. g-i) Pozos sin andamios usados como control, cultivo sin tinción al inicio del experimento y con tinción tras 21 y 28 días de cultivo. -----	119
Figura 5-9: Respuesta mecánica de los andamios impregnados (AI) y sin impregnar (AC) en cultivos con células madre mesenquimales de médula ósea humana (bmMSC). No se encontraron diferencias significativas entre los dos grupos ($p < 0.001$). -----	121
Figura 5-10: Respuesta mecánica de los andamios impregnados (AI) y sin impregnar (AC) en cultivos con células de osteosarcoma humano (SaOS). No se encontraron diferencias significativas entre los dos grupos ($p < 0.001$). -----	122

Lista de tablas

	Pág.
Tabla 2-1: Caracterización organoléptica de los Propóleos crudos.....	48
Tabla 2-2: Caracterización Fisicoquímica de los Propóleos crudos	49
Tabla 2-3: Cuantificación de Fenoles y flavonoides totales.....	51
Tabla 2-4: Capacidad antioxidante mediante la captación de los radicales libres DPPH y ABTS de los Extractos de Propóleos de Tame.....	52
Tabla 2-5: Zonas de inhibición de los Extractos de Propóleo frente a <i>S. aureus</i> y <i>S. epidermidis</i>	55
Tabla 2-6: Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y Concentración Mínima Bactericida (CMB) frente a <i>S. aureus</i> y <i>S. epidermidis</i>	57
Tabla 3-1: Niveles y factores del DOE utilizado para la formulación de la pasta	62
Tabla 3-2: Parámetros de impresión.....	65
Tabla 3-3: Diseño de experimentos realizado para obtener la formulación óptima de la pasta de wollastonita.....	68
Tabla 3-4: Parámetros de ajuste de Herschel-Bulkley para las suspensiones de wollastonita	72
Tabla 3-5: Principales picos identificados en el espectro FTIR obtenidos en los andamios.	80

Lista de Símbolos y abreviaturas

Símbolos con letras latinas

Símbolo	Término	Unidad SI	Definición
W_i	Peso propóleo inicial	g	Ec. 2.1
W_f	Peso propóleo final	g	Ec. 2.1
P_i	Peso propóleo crudo	g	Ec. 2.2
P_f	Peso propóleo seco constante	g	Ec. 2.2
A_{DPPH}	Absorbancia del DPPH	u.a	Ec. 2.3
A_S	Absorbancia de la muestra	u.a	Ec. 2.3
A_{ABTS}	Absorbancia del ABTS	u.a	Ec. 2.4
M_s	Peso de los andamios secos	g	Ec. 3.1
M_{sat}	Peso de los andamios saturados	g	Ec. 3.1
M_i	Peso de los andamios sumergidos	g	Ec. 3.1
V	Volumen de líquido desplazado	mL	Ec. 3.3
K	Índice de consistencia	Pa*s ⁿ	Ec. 3.5
e	Constante de Euler	2.7182	Ec. 3.5
Q	Caudal en la punta de la aguja	m ³ /s	Ec. 3.6
R	Radio interno de la aguja	m	Ec. 3.6

Símbolos con letras griegas

Símbolo	Término	Unidad SI	Definición
ρ_a	Densidad aparente del andamio	n.a	Ec. 3.1
ϕ_t	Porosidad total del andamio	%	Ec. 3.1
ϕ_a	Porosidad abierta	n.a	Ec. 3.4
τ	Tensión de cizallamiento	Pa	Ec. 3.5
τ_0	Tensión de fluencia	Pa	Ec. 3.5
γ	Velocidad de cizallamiento	s ⁻¹	Ec. 3.5

Subíndices

Subíndice	Término
i	Inicial
f	Final

Superíndices

Superíndice	Término
n	Índice de flujo

Abreviaturas

Abreviatura	Término
ABS	Acrlonitrilo butadieno estireno
ABTS	2, 2'-Azinobis-3-etil- 2enzo-tiazolina-6-acido sulfónico
AC	Andamios control (sin impregnación de propóleos)
AI	Andamios impregnados con propóleos
ALP	Alcalina fosfatasa
AMPs	Péptidos con actividad antimicrobiana
ANOVA	Análisis de varianza
BHI	Brain Heart Infusion
bmMSC	Células madre mesenquimales aisladas de médula ósea humana
CAD	Diseño asistido por computador
CFE	Ensayo de eficiencia de formación de colonias
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
CMB	Concentración mínima bactericida
CMC	Carboximetilcelulosa
CMI	Concentración mínima inhibitoria
DE	Desviación estándar

DOE	Diseño de experimentos
DMEM	Medio de Eagle modificado de Dulbecco
DMSO	Dimetilsulfoxido
DPPH	2,2-Difenil-1-Picrilhidrazilo
E. coli	<i>Escherichia coli</i>
EDS	Detector de Rayos X
EEP	Extractos Etanólicos de Propóleos
FDM	Modelado por Deposición fundida
FTIR	Infrarrojos por transformada de Fourier
GAE	Equivalentes de ácido Gálico
HA	Hidroxiapatita
HOES	Evaluación histopatológica de la osteomielitis
IZ	Zona de Inhibición
MTT	Bromuro de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazolio
NTU	Unidades <i>nefelométricas</i> de turbidez
Pa	Pascal
PBS	Buffer de fosfato
PC	Policarbonato
PC-ISO	Policarbonato de grado médico
PCL	Policaprolactona
PPSF	Polifenilsulfona
PSMs	Péptidos anfipáticos α -helicoidales
PVA	Poli vinil alcohol
QE	Equivalentes de Quercetina

RPM	Revoluciones por minuto
SaOS	Línea celular de Osteosarcoma humano
S. aureus	<i>Staphylococcus aureus</i>
SEM	Microscopía de barrido electrónico
S. epidermidis	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
STL	Estereolitografía
TAC	Tomografía axial computarizada
TEOS	Orto silicato de Tetraetilo
TPMS	Superficie triple periódica mínima
Trolox	6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid
UFC	Unidades formadoras de colonias
VIH	Virus de Inmunodeficiencia Humana

Introducción

En el mundo hay cientos de personas que sufren de traumatismos y enfermedades óseas que requieren tratamientos con reparaciones parciales o sustituciones completas las cuales además de complejas, son altamente costosas. Adicionalmente existen otros factores que aumentan la probabilidad de sufrir una lesión ósea entre ellos el género, la edad y la alimentación (1). En el año 2000, en Estados Unidos se presentó una frecuencia de fracturas de cadera de 300.000 al año, con costos asociados que iban entre los \$5.4 y \$7.4 billones al año (2). En 2007 se encontró que, en pacientes con VIH de Estados Unidos, Europa y Australia, la incidencia de fracturas óseas correspondía a 13.5 por cada 1000 personas al año (3), para el año 2008 en el Reino Unido ocurrieron 3.6 fracturas por cada 100 personas al año con costos considerables, que incluyen desde el diagnóstico hasta el personal necesario para los cuidados posquirúrgicos (4). En 2015, el costo estimado para los tratamientos de fracturas óseas en Estados Unidos ascendió a \$17.8 billones con un incremento esperado para 2025 hacia los \$25 billones por año (5), mostrando así el impacto que tiene esta problemática en los costos de la salud.

El proceso de reparación de tejido óseo suele tener tres etapas que ocurren simultáneamente como el proceso inflamatorio, la producción de nuevo tejido óseo y la remodelación del hueso (6), que muestran la capacidad que tiene este tipo de tejido para remodelarse. Sin embargo, cuando las lesiones son complejas, es necesario recurrir a estrategias que permitan garantizar una formación óptima del nuevo tejido, disminuir los tiempos de los procesos de reparación, minimizar los efectos adversos e incluso disminuir los costos (7). Una de las estrategias que se utilizan son los materiales para inserción ósea que permiten la obtención de dispositivos implantables con características similares al hueso en cuanto a propiedades mecánicas, biocompatibilidad, entre otros (8).

Los dispositivos implantables para regeneración ósea denominados Andamios, requieren una estructura porosa, así como un tamaño adecuado y una interconexión entre los poros, lo cual permitirá la migración celular, la vascularización, el flujo de nutrientes, oxígeno y la eliminación de materiales de desecho, pero además requieren mantener la capacidad de soportar carga externa, que es una de las principales funciones del tejido óseo (9). La geometría del andamio y la distribución de los poros son aspectos claves que definirán la capacidad celular para infiltrar los andamios y poder llevar a cabo los procesos metabólicos que permitirán al tejido óseo repararse tras realizar el proceso de implantación. Este tipo

de características resultan ser un reto importante y difícil de superar a partir de procesos de fabricación tradicionales, dando una gran ventaja a la manufactura aditiva, que permite obtener modelos con diseños complejos y personalizados (9). En la utilización de andamios, también es deseable que haya una tasa de degradación de estos en sintonía con los procesos de maduración y regeneración del nuevo tejido, aunque en ocasiones algunos andamios pueden ser permanentes, dado el tamaño de los defectos que se pretende reparar (10). Esto deja clara la importancia de las propiedades tanto físicas como químicas de los andamios que se pretenden emplear en reparación y regeneración ósea donde es imprescindible lograr la adhesión, infiltración, crecimiento, migración y proliferación celular. Entre los materiales utilizados con el objetivo de fabricar dispositivos para regeneración y reparación ósea, se incluye una amplia gama de materiales cerámicos, poliméricos y compuestos(11).

La wollastonita es un material cerámico, específicamente un metasilicato de calcio con propiedades que pueden ser aprovechadas para el diseño de dispositivos implantables a nivel óseo. Gracias a su composición es biocompatible, tiene capacidad para acelerar los procesos de mineralización y mediante uso de manufactura aditiva permite generar geometrías con propiedades mecánicas similares a las del hueso natural (12). La Wollastonita ha sido empleada para obtener andamios altamente porosos y reparar defectos óseos simples y complejos (13), además posibilita obtener materiales compuestos al ser dopada con otros cerámicos como los fosfatos de calcio, confiriendo así propiedades biodegradables y resistentes a los dispositivos implantables (14).

La manufactura aditiva es una herramienta útil para el diseño de dispositivos implantables, porque permite el diseño capa a capa, facilitando el control de características fundamentales como el tamaño de poro, interconectividad y la obtención de geometrías complejas, imposibles de obtener mediante la manufactura tradicional (15). Sin embargo, aunque el panorama resulta ser bastante alentador en el campo de la regeneración ósea, aún existen retos que requieren especial atención. Tal es el caso de los fallos en implantes óseos debido a la infección bacteriana, específicamente por osteomielitis, que tiene una incidencia entre el 2 y el 5% en pacientes sometidos a procedimientos de implantación ósea (16).

La osteomielitis es una inflamación que se da por un organismo piogénico y puede clasificarse como aguda, subaguda y crónica. El tipo agudo, suele desarrollarse en las dos

semanas siguientes al inicio de la enfermedad, la subaguda entre uno y varios meses después, mientras que la crónica sucede varios meses después (17). Generalmente, cuando ocurren traumatismos óseos, la osteomielitis aguda suele ser la más común generando inflamaciones en el tejido circundante al traumatismo (18). Con el fin de disminuir la probabilidad de fallo de implantes se recurre a la administración de antibióticos de amplio espectro, pero la mala utilización de estos medicamentos ha ocasionado la aparición de cepas super resistentes, es decir, cepas bacterianas que pueden sobrevivir en presencia de los antibióticos empleados hoy en día para tratar infecciones severas (19). Como alternativa al uso de antibióticos se ha empezado a incentivar el aprovechamiento del potencial antimicrobiano de ciertos productos naturales, entre ellos los propóleos (20).

Los propóleos son un producto elaborado por las abejas a partir de polen, saliva y exudados de la flora circundante a las colmenas. Las abejas lo emplean para mantener sus colmenas seguras, aisladas del frío y de las plagas (21). Los propóleos presentan diferentes características y aplicaciones dependiendo de la vegetación cercana a las colmenas (22). Estudios de diferentes regiones han demostrado que los propóleos pueden tener actividad antioxidante (23), modulación del proceso de inflamación (24), tener propiedades anticancerígenas (25) y además tiene efecto antimicrobiano frente a diferentes especies, entre ellos el *Staphylococcus aureus* uno de los principales causantes de la osteomielitis, y que también está asociado a la principal causa de falla de implantes óseos (16,26).

Los traumatismos óseos son eventos muy comunes con causas que incluyen desde enfermedades como la osteoporosis hasta los accidentes de tránsito. Generalmente, los procedimientos de recuperación suelen tener asociados costos muy elevados. Sin embargo, la ingeniería de tejidos se ha enfocado en desarrollar nuevas estrategias que permitan reducir los tiempos de sanación y se ajusten a las necesidades específicas del paciente, con la idea de lograr una reducción en los costos. Para ello se recurre con frecuencia a la implantación de dispositivos que permiten solventar los tejidos dañados, donde se requieren procesos quirúrgicos que a su vez traen un riesgo de infección que ocasionan entre un 2 y 5 % de fallo en los implantes.

En el presente trabajo se desarrollaron por manufactura aditiva andamios cerámicos antimicrobianos potencializados con extractos de propóleos para regeneración ósea. Se utilizó la impresión 3D como herramienta de fabricación de los andamios con geometría

TPMS Gyroid, los cuales se impregnaron con extractos etanólicos de propóleos (EEP) procedentes del departamento de Arauca (Colombia). Los andamios se evaluaron fisicoquímicamente y se utilizaron ensayos biológicos para evaluar su capacidad antimicrobiana frente a *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* y su co-cultivo y la interacción de los andamios con cultivos celulares de osteosarcoma humano (SaOS) y células madre mesenquimales humanas (bmMSC) en términos de proliferación celular y actividad metabólica.

Objetivos

Objetivo General

Desarrollar por manufactura aditiva andamios antimicrobianos potencializados con extractos de propóleos para regeneración ósea.

Objetivos Específicos

- OE1. Evaluar características fisicoquímicas y la capacidad antimicrobiana de extractos etanólicos de propóleos frente a patógenos óseos.
- OE2. Obtener por manufactura aditiva andamios cerámicos que contengan extractos de propóleos para regeneración ósea.
- OE3. Evaluar el comportamiento mecánico de los andamios cerámicos modificados con propóleos.
- OE4. Valorar el comportamiento biológico *in vitro* de andamios modificados con propóleos en términos de adhesión, proliferación, diferenciación y mineralización a partir de células madre mesenquimales derivadas de médula ósea y en células de osteosarcoma SaOS.
- OE5. Valorar la actividad antimicrobiana de los andamios modificados con extractos de propóleos sobre un modelo multiespecies de biopelícula *in vitro*.

Estructura de la Tesis

Esta tesis está dividida en cinco capítulos relacionados con el desarrollo de los objetivos específicos planteados anteriormente. A continuación, se describe con algo de detalle lo que se podrá encontrar en cada uno de ellos.

El primer capítulo titulado “***Diseño y Obtención de andamios porosos mediante impresión 3D con potencial antimicrobiano para regeneración ósea***” presenta el marco teórico y el estado del arte de aquellos aspectos necesarios para el desarrollo de la tesis. Se incluye información sobre ingeniería de tejidos, manufactura aditiva y en especial la impresión 3D que es la técnica empleada en el desarrollo de esta tesis, además la problemática asociada al desarrollo de osteomielitis en personas con implantes y los propóleos como potencial agente antimicrobiano para el control de la osteomielitis.

Los capítulos dos a cinco se presentan en el formato de artículo científico. En ellos se encuentra un resumen del trabajo realizado en el capítulo, seguido por la introducción en la que se revisa el estado del arte de la temática particular del capítulo, después se describe la metodología empleada y los resultados y discusión y por último las conclusiones del capítulo. Cabe resaltar que la información incluida en los capítulos dos al cinco no corresponde a los artículos publicados como productividad de la tesis. Buena parte de la información consignada y organizada en estos capítulos se utilizó como insumo en los artículos publicados, los cuales se pueden consultar en los anexos (página 128)

En el capítulo dos, titulado “***Extractos etanólicos de propóleos de Tame (Arauca). Producción y caracterización de su actividad antioxidante y antimicrobiana***” se presenta la caracterización organoléptica y fisicoquímica de los extractos de los propóleos obtenidos a partir de las muestras colectadas en Tame, Arauca. Además, se expone la actividad antioxidante evaluada por dos métodos diferentes y la actividad antimicrobiana frente a *S. aureus* y *S. epidermidis*, especies relacionadas con el desarrollo de osteomielitis.

El capítulo tres, titulado “***Obtención de un andamio poroso para regeneración ósea mediante impresión 3D***”, comprende el diseño de

experimentos empleado para obtener la formulación de la pasta para impresión 3D, así como el proceso de modelado CAD para generar la geometría de TPMS empleada en los andamios, el proceso de impresión, tratamiento térmico de los andamios y su impregnación con propóleo, además de la caracterización que incluye el cálculo de la porosidad e interconectividad de los poros en el andamio, y el análisis FTIR que confirma la impregnación de los propóleos en los andamios.

En el capítulo cuatro, titulado “**Actividad antimicrobiana de un andamio poroso impregnado con extractos etanólicos de propóleos**”, se aborda la caracterización antimicrobiana *in vitro* de los andamios impregnados con propóleos frente a cepas de *S. aureus*, *S. epidermidis* y sus co-cultivos.

El capítulo cinco, “**Actividad metabólica in vitro de un andamio poroso impregnado con extractos etanólicos de propóleos**”, expone la actividad metabólica de los andamios cultivados con células madre mesenquimales de médula ósea humana y células de osteosarcoma humano SaOS. Se usan técnicas de histopatológicas para visualizar el proceso de mineralización y técnicas de microscopía electrónica para verificar la adhesión y morfología celular en la superficie de los andamios.

Luego se encuentran las conclusiones y las recomendaciones a las que se llegó después de desarrollar esta tesis. Por último, en los anexos se presentan los artículos publicados y los sometidos que fueron desarrollados durante la beca Minciencias Plan Bienal de Convocatorias 2019 y el proyecto financiado por Minciencias “*Desarrollo de andamios producidos por fabricación aditiva mejorados con la incorporación de propóleos de Tame (Arauca) para la regeneración ósea*”. Código 71203- Convocatoria de proyectos que conectan el conocimiento. 2019 852-2019, los cuales se listan a continuación:

Artículo 1. *Influence of composition of β -TCP and borate bioglass scaffolds on cell proliferation of adipose tissue-derived mesenchymal stem cells: osteogenic differentiation.*

<https://doi.org/10.1557/s43580-021-00036-x>

Artículo 2. *Fabrication of polycaprolactone/calcium phosphates hybrid scaffolds impregnated with plant extracts using 3D printing for potential bone regeneration. DOI: 10.1016/j.heliyon. 2023.e13176*

Artículo 3. *Effects of Propolis Impregnation on Poly(lactic Acid (PLA) Scaffolds Loaded with Wollastonite Particles against Staphylococcus aureus, Staphylococcus epidermidis, and Their Coculture for Potential Medical Devices. DOI:10.3390/polym15122629.*

Artículo 4. *Effect of synthesis on the antimicrobial response of β -TCP/Mg with potential applications in the regeneration of dental tissue: 3D printing of ceramic paste in a β -TCP/Mg/bioglass system. DOI: 10.1016/j.matlet.2023.134907.*

Artículo 5. *Antibacterial and Osteoinductive properties of Wollastonite Scaffolds Impregnated with Propolis Produced by Additive Manufacturing. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2023.e23955>*

Artículo 6. *In vitro evaluation of the osteogenic and antimicrobial potential of porous Wollastonite scaffolds impregnated with ethanolic extracts of propolis. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2024.1321466>*

1. Diseño y Obtención de andamios porosos mediante impresión 3D con potencial antimicrobiano para regeneración ósea

Este capítulo abordará los conceptos básicos sobre la ingeniería de tejidos, así como los necesarios para entender la manufactura aditiva y los avances de sus técnicas que han superado limitantes de la manufactura convencional, pudiendo desarrollar geometrías complejas para modelar dispositivos de implantación. La impresión 3D es una de las técnicas más exploradas dentro de la manufactura aditiva, ya que es una técnica relativamente económica, con un grado de complejidad bajo en los procesos operativos y con resoluciones aceptables en los productos finales.

1.1 Ingeniería de Tejidos

La ingeniería de tejidos ha sido concebida como un campo interdisciplinario en constante evolución como respuesta a la dificultad para cubrir la alta demanda de trasplantes de órganos y tejidos (27). La ingeniería de tejidos se estructura mediante tendencias generales y se enfoca en tejidos específicos, como es la regeneración de tejido óseo, que

a su vez se sustenta en el uso de biomateriales de origen natural o sintético para llenar defectos (p. ej.: hueso liofilizado, hidroxiapatita, entre otros), el uso de células madre para terapia celular, el uso de biomoléculas concentradas a partir de derivados de la sangre (p. ej.: plasma rico en plaquetas o rico en fibrina, entre otros) y el uso de andamios tridimensionales para el reemplazo de tejidos (28–31).

En el mundo se realizan más de 2.2 millones de procedimientos anualmente que implican algún tipo de injerto para el manejo de la pérdida de hueso en ortopedia, neurocirugía y odontología(32). La pérdida de estructura ósea trae secuelas que afectan la calidad de vida de los pacientes(33). Estas pérdidas pueden ser consecuencia de defectos congénitos, trauma, o patologías como tumores. Los aloinjertos y autoinjertos son el estándar de referencia para tratar este tipo de anomalías, pero tienen limitaciones tales como el rechazo del individuo receptor, la transmisión de enfermedades, así como el aumento de morbilidad del sitio donante, e incluso fallo por baja vascularización o por infecciones(31,34). La falla de implantes y sustitutos óseos en la etapa posquirúrgica producida por osteomielitis bacteriana tiene una incidencia de 15-20 % (35). Una medida frecuente para disminuir la morbilidad de estas intervenciones se basa en la prescripción de antibióticos que, dado el incremento de la resistencia bacteriana intrahospitalaria, presenta una limitación adicional. En este contexto, el desarrollo de fármacos localizados de liberación controlada basados en productos naturales presenta una oportunidad terapéutica de innovación en lo clínico y en lo social. Constituye un desarrollo económico-social para los productores (36–39) y a su vez se convierte en un reto importante dentro de la ingeniería de tejidos. Se encamina no sólo a lograr el reemplazo de un tejido sino a desarrollar nuevos implantes o dispositivos que sean biocompatibles, que cuenten con características mecánicas específicas y que a su vez puedan reducir las probabilidades del desarrollo de infecciones.

En la reparación de tejido óseo, muchos esfuerzos se han centrado en lograr fortalecer los procesos de regeneración ósea, pensando también en que el paciente pueda recuperar su hueso natural y no deba mantener un implante de forma permanente. Sin embargo, dependiendo del tamaño del defecto óseo, en ocasiones resulta más fácil implantar biomateriales más resistentes, pero con menos actividad biodegradable. Para la reparación de este tipo de tejido, dentro de la ingeniería de tejidos se ha recurrido al uso de matrices tridimensionales. Este es un proceso complejo que requiere de tres

herramientas básicas: células, andamios 3D y compuestos biológicos. Además de estas, la vascularización y angiogénesis juegan un papel esencial para el desarrollo de nuevo tejido debido a que permiten la llegada de nutrientes y la salida de productos del metabolismo (41,42).

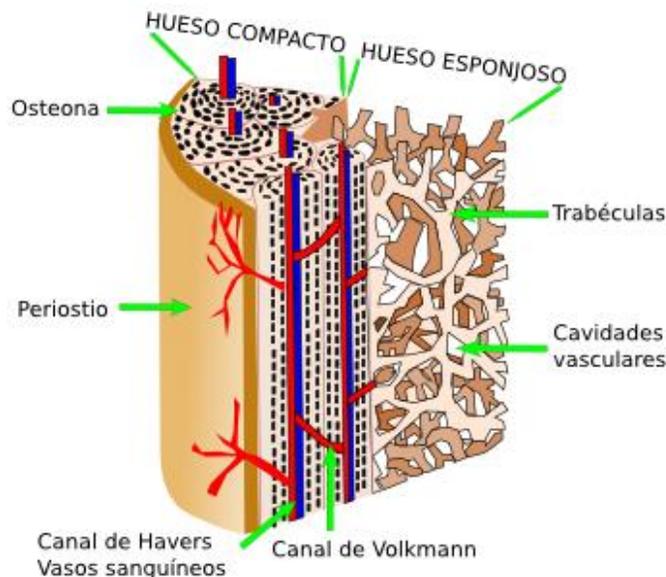
1.1.1 Tejido óseo y Traumatismos

El hueso es un tejido dinámico, vascularizado, con capacidad de regenerarse y remodelarse sin dejar cicatriz, además tiene la capacidad de emplear rápidamente sus reservas metabólicas y minerales de acuerdo con las situaciones a las que se enfrenta. Su principal función es proporcionar estructura al cuerpo y servir como reservorio mineral, además es el encargado de soportar la contracción muscular que permite el movimiento y protege los órganos internos (43). La estructura, el tamaño y la resistencia del hueso están directamente relacionadas con las necesidades fisiológicas y las rutinas a las que se exponen, esto causa que los estímulos mecánicos puedan iniciar o inhibir los procesos de modelado y remodelación como respuesta a variaciones externas de la fuerza o la inmovilización (43,44). El hueso se está remodelando constantemente en presencia o ausencia de carga mecánica y esto conduce luego a la acumulación (formación), mantenimiento (homeostasis) o degradación (resorción) de la matriz ósea (44,45).

El hueso está formado por tejido compacto (Capa externa dura) y tejido esponjoso (Capa interna esponjosa que contiene médula roja), además de la matriz ósea. También se pueden encontrar vasos sanguíneos, nervios, proteínas que hacen parte de este tejido. El hueso esponjoso suele ser mucho más poroso que el hueso cortical y, por tanto, menos denso, su actividad metabólica suele ser ocho veces mayor que la del hueso cortical, implicando que sus funciones están asociadas al metabolismo, mientras que las del hueso cortical se asocian con la mecánica (41,46). El hueso esponjoso suele tener trabéculas óseas donde se sitúan osteoclastos y osteoblastos, así como láminas óseas irregulares y curvadas y su porosidad es entre el 50 – 90 %, por lo que se ven favorecidos los procesos metabólicos(47). En la figura 1.1 se muestra la arquitectura del tejido óseo, haciendo una clara diferenciación entre el hueso compacto y el hueso esponjoso, mostrando además la

complejidad estructural del tejido esponjoso en cuanto a su porosidad y la interconectividad de estos poros.

Figura 1-1: Arquitectura del hueso



Nombre de la fuente: Atlas de histología vegetal y animal. Megías, M. Molist, P. Pombal, MA.

El tejido óseo es propenso a sufrir traumatismos como cualquiera de los tejidos del cuerpo humano. El trauma ortopédico es una causa frecuente e importante de morbilidad y discapacidad (43). Estos eventos afectan personas de todas las edades y grupos demográficos por lo que resulta de gran importancia entender la respuesta natural del tejido óseo a las fracturas (44,45) con el fin de poder reaccionar de forma eficiente en el desarrollo de estrategias para su reparación. En el momento en que ocurre una fractura, se presenta una perturbación mecánica. Es por esto por lo que resulta imprescindible brindar estabilidad relativa o absoluta dependiendo de la localización y el patrón de fractura, con el fin de evitar lesiones en otras regiones del cuerpo (46). Además, es importante recalcar que, aunque las lesiones óseas sean tratadas con los protocolos pertinentes es inherente que ocurran retrasos en los procesos de unión, así como infecciones que pueden terminar generando complicaciones graves en los pacientes (47). También puede ocurrir que el hueso no sea capaz de repararse por sí mismo. Esto puede

obedecer a diferentes razones, entre ellas algunos factores inherentes al paciente como las afecciones comórbidas, su dieta, el consumo de alcohol y tabaco, o factores propios de la fractura como la conminución de la fractura, lesión de tejido blando o el hecho de que el defecto sea de tamaño crítico (52).

Como se mencionó, el hueso tiene una capacidad regenerativa bastante alta, con mayores probabilidades en personas jóvenes, permitiendo la reparación de muchas lesiones sin necesidad de intervenciones quirúrgicas complejas. Los retos vienen cuando se presentan defectos óseos grandes, como los que produce en la resección de los tumores óseos y las fracturas graves sin unión, ya que estos no cuentan con un patrón guía para que ocurra el proceso de regeneración. En estos casos, la única opción es la intervención quirúrgica (28,49,50). La pérdida de tejido relacionada con enfermedades o traumatismos ha sido tratada con la inserción de injertos óseos, los cuales pueden ser de dos tipos: los autoinjertos y los aloinjertos. Los autoinjertos consisten en tomar tejido de una zona del mismo paciente que no requiera tanta carga y de fácil acceso, como por ejemplo de la cresta ilíaca, para ser trasplantada a la zona lesionada (54). Los autoinjertos o injertos autólogos frescos, especialmente de hueso esponjoso, cuentan con propiedades osteogénicas, osteoinductoras y de estructura organizada que permite guiar la proliferación celular para generar nuevo tejido óseo (55). Sin embargo, este tipo de injertos tienen asociada una morbilidad que puede ser estructural o funcional lo cual limita su uso(56). Generalmente, la práctica de usar autoinjertos es más frecuente que usar aloinjertos, que son obtenidos de un paciente donante, ya que los aloinjertos pueden presentar efectos de resistencia en el paciente tratado, transmisión de enfermedades como el VIH y la hepatitis, entre otros (53). Sin embargo, algunos autores han propuesto los aloinjertos como una alternativa para superar la morbilidad producida en la zona donante, así como una forma de reducir los tiempos quirúrgicos y las incisiones, ya que en términos de estabilidad y funcionalidad ambos tipos de injertos suelen presentar resultados similares (52,54).

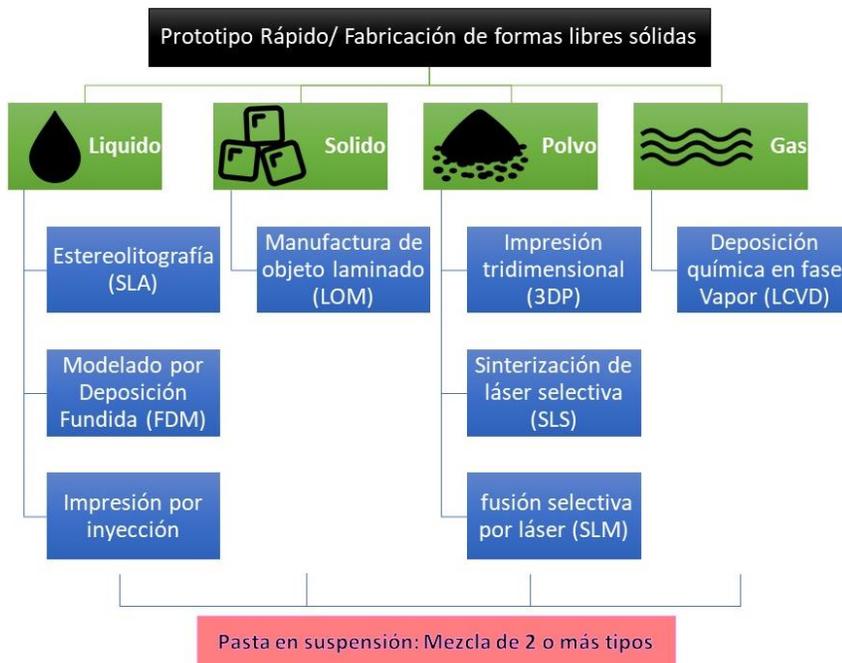
Al año se producen alrededor de un millón de casos de defectos esqueléticos que requieren procedimientos de injertos óseos para lograr su unión. El tratamiento de estos pacientes se ha convertido en una creciente preocupación socioeconómica, especialmente en Estados Unidos y la Unión Europea, donde se prevé un aumento del costo dado el proceso de envejecimiento de sus poblaciones y el aumento de factores de riesgo en

poblaciones mayores a sufrir lesiones óseas (55,56). Actualmente, se han explorado otras alternativas a los injertos autólogos que consisten en la utilización de materiales cerámicos, poliméricos y metálicos para el desarrollo de matrices implantables que contengan las características fundamentales del tejido óseo para garantizar la reparación satisfactoria de estos defectos y es aquí donde la manufactura aditiva juega un papel de vital importancia.

1.1.2 Manufactura Aditiva

Tal como se ha mencionado anteriormente, la manufactura aditiva ha sido una herramienta fundamental para superar ciertas limitaciones que venían dadas por el procesamiento de materiales convencional, muchas de ellas ligadas a la capacidad del diseño a detalle, tamaño y forma. La manufactura aditiva tiene cuatro variantes principales y a partir de ellas se desprenden toda una gama de posibilidades en cuanto a técnicas de modelado capa a capa. Ellas son: manufactura basada en líquidos, basada en polvos, basada en sólidos y basada en gases. Las variantes se clasifican teniendo como referencia el estado de la materia en que se encuentran los materiales con que se lleva a cabo el proceso de fabricación, estas variantes se pueden observar en figura 1.2 (61).

Figura 1-2: Variantes de la manufactura aditiva



Nombre de la fuente: Bose, Susmita and Koski, Caitlin and Vu, Ashley A. *Additive Manufacturing of Natural Biopolymers and Composites for Bone Tissue Engineering*. Mater. Horiz . 7 (8). 2020. **DOI:10.1039/D0MH00277A**

Dentro de la manufactura aditiva, el prototipado rápido fue la primera herramienta que permitió crear un objeto tridimensional capa a capa mediante el diseño asistido por computador (CAD). Fue una de las primeras metodologías que permitió no solo modelar sino diseñar piezas tridimensionales y logró reducir el tiempo y el costo del desarrollo de productos, aunque en la actualidad se utiliza solo en el campo investigativo y no en el sector industrial (58,59).

La manufactura aditiva se ha convertido en una opción óptima para el desarrollo de diferentes tipos de andamios. Comprende varios métodos con adición de material capa a capa que permiten diseñar estructuras porosas, interconectadas y complejas.

La estereolitografía fue el primer proceso de prototipado rápido conocido y ha sido de los más utilizados. Consiste en una base líquida fotosensible que se somete a procesos de fotopolimerización cuando un láser de luz ultravioleta ilumina discriminadamente la base líquida, que suele ser una resina (64). Para trabajar con esta técnica se utiliza un CAD que luego se traduce a un archivo STL en el que las piezas se cortan en “slices” o “Rebanadas” cada una de las cuales contiene la información de la impresión capa a capa. Es necesario anclar la pieza y soportar las estructuras que sobresalen, por ello es necesario contar con una plataforma. Al finalizar el proceso se hace un sellado y se drenan los excesos de resina, la cual puede ser reutilizada. La resolución y detalle de la impresión dependerá del modelo de la impresora, así como del grosor de las capas (65,66). Tiene ciertas limitaciones en cuanto a la posibilidad del sobrecurado de las piezas y al tipo de material que se usa pues deberá ser fotosensible (64).

La impresión 3DP es otra técnica de manufactura aditiva en la que se suministra un aglutinante líquido a base de agua sobre un polvo a base de almidón para imprimir la información contenida en un CAD. Cuando las partículas del polvo se encuentran con el aglutinante, forman un aglomerado. Esta técnica se emplea con polímeros y es muy similar a la impresión por chorro de tinta con la que se imprime de forma bidimensional sobre papel (61,65). Sin embargo, la impresión 3D ha evolucionado y se ha expandido a la

utilización de varios tipos de materiales para lograr la fabricación capa a capa de diseños complejos sin la necesidad de utilizar herramientas específicas para cada sección diseñada (68). Las tintas empleadas para la impresión en la actualidad incluyen desde materiales biocerámicos, poliméricos, composites e incluso materiales biocompatibles mezclados con células vivas (69).

En las técnicas de Modelado por Deposición Fundida (FDM) se emplean filamentos poliméricos que alimentan un cabezal de impresión, que lo funde y luego lo extruye, generalmente con una boquilla de espesor generalmente de 0.25 mm. Se emplean materiales como Policarbonato (PC), Acrilonitrilo butadieno estireno (ABS), Polifenilsulfona (PPSF), Mezclas de PC-ABS y PC-ISO el cual es un PC de grado médico (62,66). El hecho de no incluir procesos de curado, lo convierte en una opción más económica, que no requiere procesos químicos y con la ventaja adicional que las máquinas y materiales suelen tener costos más bajos (64). Sin embargo, sus desventajas se pueden apreciar en las resoluciones que se obtienen en el eje Z, ya que es imposible obtener superficies lisas con esta técnica o realizar procesos de pulido al final de la impresión. Adicionalmente debido a los materiales que se emplean, las propiedades mecánicas pueden no ser óptimas para ciertas aplicaciones (66).

Otra de las técnicas importantes de impresión tridimensional es la sinterización selectiva por láser, en la que un polvo se sinteriza o fusiona mediante la aplicación de un rayo láser de dióxido de carbono. El material se funde dentro de la cámara que se calienta hasta el punto de fusión del material. La fusión se hace de forma localizada gracias al láser, mientras las partículas se mantienen sueltas dentro de un lecho que es controlado por un pistón, que se baja la misma cantidad del grosor de una capa en cuanto cada una de ellas se termina (68). Este tipo de impresión puede emplearse en polímeros, metales, y compuestos (metales y cerámicos) (72,73). Cuando se trabaja con metales es necesario usar un aglutinante, casi siempre polimérico, el cual se elimina en el proceso de calentamiento. Su principal ventaja radica en la gran variedad de materiales que se pueden emplear y además se puede reciclar el polvo de material sobrante, pero su principal desventaja es que la precisión está limitada por el tamaño de las partículas del material. Además, se debe evitar que los materiales se oxiden por lo que requiere garantizar una

atmósfera de gas inerte y mantener la temperatura constante y muy cercana al punto de fusión (68,69).

Como se puede apreciar, las técnicas de manufactura aditiva son variadas, así como los materiales que se pueden procesar mediante ella y las aplicaciones. A la fecha se han reportado diferentes aplicaciones, incluyendo el arte (75), el mejoramiento de pilas de combustible, el modelamiento arquitectónico (76), el modelamiento de máquinas ligeras en la industria automotriz y aeroespacial (72), así como aplicaciones médicas, en donde ha tomado gran relevancia dada la posibilidad de fabricar prototipos rápidos y de muy alta calidad para trasplantes óseos y para la reparación de huesos dañados, así como para realizar modelados que permitan analizar a detalle los defectos de los pacientes, proponiendo diagnósticos precisos y tratamientos más predecibles, reduciendo de esta forma los costos y tiempos de recuperación (78–80). Las técnicas de impresión 3D permiten obtener implantes óseos idénticos al hueso original y con detalles de porosidad e interconectividad que faciliten los procesos de proliferación celular mediante la osteoconductividad o incluso han logrado obtener implantes metálicos precisos e idénticos a los huesos que se deben sustituir y que requieren mayor resistencia (81–84). También se ha visto que empleando técnicas de procesado digital de luz es posible obtener andamios biocerámicos con geometrías específicas e interconectividad de poros que permiten la reparación *in situ* de los defectos orbitales, con capacidad de biodegradación a temperaturas relativamente bajas y con actividad osteogénica (85). Como se ha visto, la manufactura aditiva es una herramienta versátil y útil sobre todo en el campo de la reparación de tejido óseo.

1.1.3 Impresión 3D en reparación de tejido óseo

La impresión 3D es una de las técnicas más populares de la manufactura aditiva y tal como se expuso anteriormente, ha sido ampliamente utilizada para desarrollar terapias que permitan reparar los defectos del tejido óseo, obedeciendo a la escasez de injertos adecuados y a las dificultades asociadas a la conformación y personalización de implantes. Mediante la impresión 3D es posible fabricar andamios específicos, en cuanto al tamaño, la forma y las características estructurales intrínsecas adecuadas.

El diseño de andamios implica características de vital importancia, como la porosidad y la interconectividad para garantizar el éxito funcional. Es por esto por lo que el diseño de andamios con un volumen y tamaño de poro específico se ha convertido en un reto (86), debido a que este parámetro es crucial para imitar la estructura del hueso natural. Para lograr la reparación de tejido óseo, se han adoptado diferentes estrategias que incluyen el espumado químico/gas (83,84), la lixiviación de partículas/sal (89), la liofilización (90), entre otras. Sin embargo, estas técnicas no logran controlar en su totalidad la distribución interna de la porosidad, que resulta aleatoria. La aparición de la tecnología de impresión 3D ha permitido superar este reto de forma eficaz, proporcionando exactitud y precisión para la fabricación de implantes y además utilizando diversos materiales que incluyen metales, polímeros naturales/sintéticos (91), polvos cerámicos y compuestos (86,92,93).

En la impresión 3D, la tinta de impresión es un factor crucial porque se requiere que tenga características específicas para garantizar el éxito del proceso. La tinta debe ser biocompatible, ya que los andamios se usarán como soporte temporal o permanente de las células y de los tejidos, cumplir requerimientos mecánicos específicos, los cuales varían de acuerdo con el tipo de hueso que se quiere reparar, así como también es necesario construir andamios con volumen y tamaño de poros controlados, dado que esto facilita el metabolismo de nutrientes, la difusión de oxígeno y el desecho de residuos entre los tejidos. Por tanto, la tinta debe permitir fabricar estructuras que reúnan todas estas condiciones, convirtiendo la obtención de la tinta en uno de los retos más importantes para la implementación de esta técnica (94). Seleccionar los materiales con los cuales se formulará la tinta, es el primer paso crucial de esta técnica. Se deben considerar aspectos como la viscosidad, la tensión superficial, el mecanismo de reticulación, la "printabilidad", entre otros. A la fecha se han empleado algunas tintas naturales que incluyen colágeno, ácido hialurónico, alginato de sodio (91,92), pero también se han desarrollado otras tintas que incluyen polímeros (97), metales y sus aleaciones (98,99), cerámicos y composites (100).

1.1.4 Wollastonita como material para implantación ósea

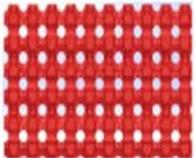
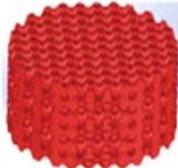
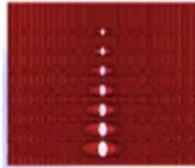
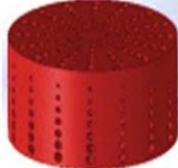
La wollastonita (CaSiO_3), es un silicato de calcio con características únicas entre los minerales no metálicos, de color blanco, forma cristalina acicular y pH alcalino, es bioactiva y biocompatible. Sus propiedades la han convertido en un material a la vanguardia en la obtención de dispositivos con aplicaciones en regeneración ósea (11). Desde hace mucho tiempo ha sido empleada para obtener andamios mediante diversas técnicas, tales como la técnica de robocasting, que permitió fabricar andamios dopados con magnesio, mostrando amplia porosidad y resistencia, que adicionalmente demostraron osteogenicidad en el modelo de defecto óseo de tamaño crítico (13).

También se ha usado wollastonita para fabricar andamios con fosfatos de calcio dopados y sin dopar con magnesio para evaluar su efecto en la reparación de defectos óseos calvariales de conejos. Se comprobó la obtención de andamios biocompatibles, así como una aceleración en la tasa de crecimiento de hueso nuevo en aquellos defectos en que se emplearon andamios dopados con un 10% de magnesio. La mezcla de cerámicos brinda características de soporte y resistencia necesarios para superar los defectos óseos calvariales (12), cumpliendo así con características de biocompatibilidad, estructuración organizada y resistencia mecánica adecuada para el soporte de carga, aspectos críticos en el desarrollo de dispositivos de implantación.

Las propiedades de la wollastonita permiten utilizarla para obtener materiales compuestos. Un ejemplo es el material que se puede obtener a partir de Policaprolactona (PCL), Wollastonita y Cobre (Cu), el cual no sólo permite la obtención de andamios mediante técnicas de electro spinning, sino que además estos andamios son satisfactoriamente aceptados por células madre de ratón y permiten la diferenciación en osteoblastos. Gracias a la acción del cobre, se presencia efecto inhibitorio frente a *S. aureus* y *E. coli* disminuyendo la probabilidad de fallos por infecciones (101). La wollastonita también ha sido empleada para obtener tintas de impresión en conjunto con otros materiales como la gelatina de pescado, con las que es posible lograr la reología necesaria para la impresión de estructuras consistentes y similares al hueso natural, biocompatibles y con potencial osteogénico (98). Como se ha mencionado, el diseño del tamaño de los poros y su modelo de interconectividad son parámetros que deben tratarse con especial atención en los

dispositivos óseos implantables. Es necesario generar un modelo CAD que permita su construcción mediante alguna técnica de manufactura aditiva. Es posible diseñar modelos porosos homogéneos o con un gradiente específico que a su vez podrían facilitar los procesos de liberación de fármacos cuando se requiere una administración localizada, como se puede observar en la figura 1-3 (103).

Figura 1-3: Diagrama de los tipos de scaffolds obtenidos mediante la variación del tamaño del poro y su distribución

Tipo de andamio	Tamaño de poro	Diseño de poros	Diseño CAD 3D
Homogéneo (H)	400 μm		
Gradiente (G)	50 μm ↓ 350 μm		

Nombre de la Fuente: Tamburaci, S. Perpelek, M. Aydemir, S. Baykara, B. Havitcioglu, H. and Tihminlioglu, F. Fabrication of Helix aspersa Extract Loaded Gradient Scaffold with an Integrated Architecture for Osteochondral Tissue Regeneration: Morphology, Structure, and In Vitro Bioactivity. 6 (4). 2023. DOI: /10.1021/acsabm.2c01050

En vista del potencial que tiene la wollastonita para ser empleada como biomaterial en la ingeniería de tejidos óseos, se ha recurrido a buscar alternativas que permitan la obtención de este material a un bajo costo. En 2019 se desarrolló una estrategia que permite obtener β - wollastonita a partir de cenizas de cáscara de arroz y polvo de cáscaras de huevo por el método sol-gel después de un tratamiento térmico. Esta wollastonita fue comparada con una que fue sintetizada a partir de Orto silicato de Tetraetilo (TEOS) y Nitrato de calcio tetra hidratado $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, obteniendo una mono fase de β - wollastonita a

temperaturas relativamente bajas. Al comparar las propiedades de las dos wollastonitas sintetizadas, ambas mostraron bioactividad y cito compatibilidad, además se encontró una constante dieléctrica y una conductividad eléctrica mejoradas (14.85 y $8.62 \times 10^{-6} \Omega\text{m}^{-1}$ medidas a 1MHz), abriendo un camino hacia la obtención de Wollastonita mediante técnicas sencillas y a partir de productos de desecho que a su vez se convertirían en una forma amigable con el planeta de sintetizar materiales con potencial aplicación en el desarrollo de implantes bioactivos. Adicionalmente se midió la resistencia a la compresión y se evaluó la micro dureza de esta wollastonita ($40.77 \pm 2.46 \text{ MPa}$ y $20.14 \pm 1.85 \text{ HV}$) valor que resultó aceptable para su aplicación en la fabricación de dispositivos implantables (104).

Cuando se fabrican andamios de materiales cerámicos, en la mayoría de las ocasiones suelen emplearse fosfatos de calcio e incluso se combinan fases de fosfatos de calcio con silicatos de calcio para obtener un rendimiento óptimo (12,105). Sin embargo, los silicatos como la wollastonita pueden tener ciertas ventajas sobre los fosfatos. Los silicatos de Calcio y Magnesio tienen una tasa de degradación muy baja comparada con los fosfatos de calcio, lo que se traduce en implantes más duraderos en el tiempo para permitir que ocurran procesos de regeneración (106). Los silicatos también suelen presentar mayor resistencia a la compresión, a la flexión y a la fractura comparándolos con los fosfatos de calcio (106,107), permitiendo obtener dispositivos implantables que soportan mayor carga, lo cual es deseable cuando se pretenden reemplazar o reparar defectos en huesos largos (12). La bioactividad *in vitro* también ha mostrado ser mucho más alta gracias a la capa rica en silicio que induce formación de depósitos de apatita y a su vez va controlando la precipitación de esta apatita (107). Es importante mencionar que los silicatos de calcio bioactivos se unen fácilmente con tejidos naturales mientras que los fosfatos de calcio son reabsorbibles, permiten el crecimiento interno y la sustitución de los tejidos naturales en los poros de los dispositivos implantables (106). Las ventajas mencionadas demuestran que este material podría ser mucho más deseable para reparar defectos largos o en huesos que requieren una alta carga, pero para huesos cortos o esponjosos podría ser más eficiente usar una mezcla que incluya fosfatos de calcio para inducir la reabsorción.

1.2 Osteomielitis

Más allá de obtener dispositivos implantables con geometrías complejas que favorecen la proliferación celular y emplear materiales biocompatibles y osteoinductores, existe un reto importante en la ingeniería de tejidos óseos y es superar el fallo de implantes debido a las infecciones bacterianas, en especial, la osteomielitis. La osteomielitis es una infección que se da por un organismo piogénico que puede presentarse en tres niveles: aguda, subaguda y crónica. Su clasificación depende de los tiempos en que se desarrolla la enfermedad y de la severidad de los síntomas. El tipo agudo, suele desarrollarse en las dos semanas siguientes al inicio de la enfermedad, la subaguda entre uno y varios meses después, mientras que la crónica sucede varios meses después (15).

Existen otro tipo de clasificaciones basadas en la fuente de infección, es decir, pueden ser de foco hematógeno o contiguo al foco. La osteomielitis hematógena es causada por bacterias que proceden del torrente sanguíneo propiamente y tienen una incidencia del 20 % en los casos de osteomielitis, presentando mayor frecuencia en niños e infantes (108). Los adultos con este tipo de osteomielitis, generalmente la adquieren como una infección secundaria en la que la especie bacteriana logra entrar al torrente sanguíneo y se localiza en el hueso distal y en la médula, también puede ocurrir en adultos una reactivación de un foco quiescente de osteomielitis hematógena que se desarrolló en la infancia o en la niñez y se detuvo (17). Sin embargo, en los últimos años se ha notado un descenso en la osteomielitis de este tipo, generando un aumento simultáneo en la enfermedad contigua. Este tipo de condiciones se genera principalmente en tejidos blandos adyacentes, pero también puede ocurrir empezando con una infección aguda debida a microorganismos que se inoculan directamente en el hueso por un traumatismo, ocasionando inflamaciones en el tejido circundante (18). Otras infecciones pueden propagarse por contaminación nosocomial durante procedimientos preoperatorios o intraoperatorios. Este tipo de osteomielitis es bifásico en cuanto a las edades ya que en personas jóvenes suele producirse a causa de un traumatismo o de una cirugía relacionada, mientras que en adultos mayores se produce por procedimientos quirúrgicos y úlceras de cúbito (109). La osteomielitis hematógena suele ser monomicrobiótica, es decir, una sola especie bacteriana ocasiona el proceso infeccioso (108). En los demás tipos de osteomielitis se puede encontrar cierta variedad de las especies relacionadas con la infección dependiendo

de la edad. En infantes, es común encontrar *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae* y *Escherichia coli*, en niños suele encontrarse *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes* y *Haemophilus influenzae* (17), mientras en adultos suele existir una variedad más marcada, se pueden encontrar *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus spp.*, *Streptococcus spp.*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter spp.*, *Mycobacterium spp.*, *Candida albicans*, *Staphylococcus epidermidis* (105,106).

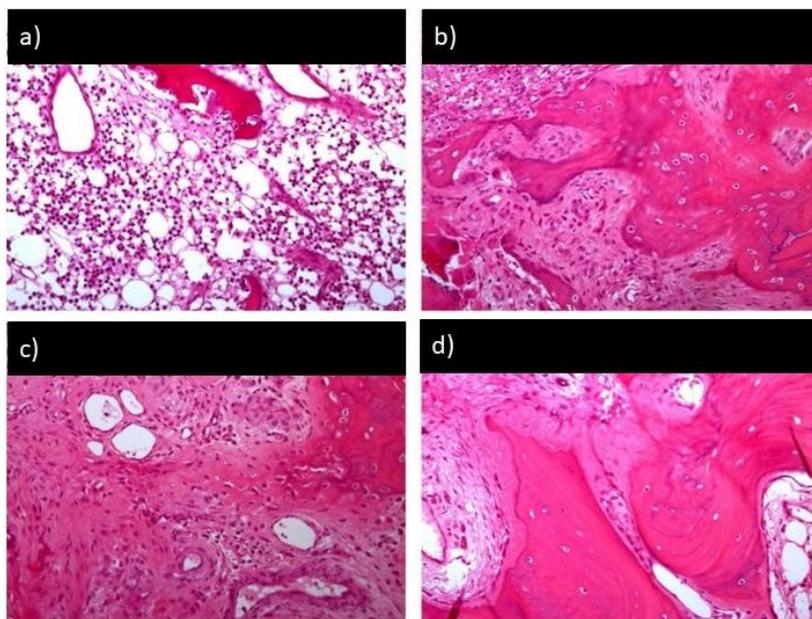
Para el desarrollo de la osteomielitis en un tejido, es necesaria la formación de biopelículas que facilitan el proceso infeccioso, por esto entender cómo funcionan estos fenómenos resulta importante para diseñar estrategias de control efectivas (111). Las biopelículas se definen como comunidades microbióticas sésiles derivadas que se caracterizan porque las células forman una interfaz al unirse a un sustrato que funciona como matriz y exhiben un fenotipo alterado a medida que crecen. Estas comunidades requieren órdenes jerárquicos en los que las especies que conforman las primeras capas cuentan con sistemas proteicos ricos en adhesinas, facilitando la unión a la matriz o sustrato (105). Algunos estudios han mostrado que las biopelículas gruesas poseen una arquitectura compleja en la que las micro colonias pueden existir en pilares distintos o en formas de hongos. Estas configuraciones permiten distribución de nutrientes hasta las capas más profundas de las biopelículas, además pueden generar reservas de fuentes de carbono, nitrógeno y fósforo al interior de las capas de la biopelícula (112). Las formaciones de esas estructuras tienen una ventaja adicional y es la resistencia, ya que al ser comunidades sinérgicas se fortalecen contra la acción de ciertas tácticas de remoción, lo que se traduce en infecciones severas y difíciles de tratar (113).

La osteomielitis es una condición preocupante en ingeniería de tejidos óseos, porque como se ha expuesto hasta ahora es un proceso bastante complejo y que puede terminar en el fallo de un implante. Cuando un proceso de cicatrización después de una implantación no se lleva a cabo en un tiempo razonable, puede ser el primer indicio de que existe un proceso patológico que va más allá de la inflamación normal (17).

En 2014 se presentaron 5 casos de pacientes que recibieron implantes dentales y su proceso terminó en falla debida a la osteomielitis; dos de estos casos exhibieron características de fallos rápidamente, mientras que los otros tres tardaron meses. Tres de los pacientes presentaron lesiones en los tejidos adyacentes a los implantes, mientras en los otros dos casos se observó daño en el implante y mucho más allá del implante (114).

Los procesos inflamatorios suelen dificultar el diagnóstico real de una osteomielitis, por ello en muchas ocasiones es imperativo recurrir a varias metodologías para llevar a cabo el diagnóstico correcto. Pueden emplearse técnicas radiológicas y reforzar con técnicas histológicas en biopsias para llegar al diagnóstico (109,110). En la figura 1-4 se observa un sistema de valoración para detectar los niveles de osteomielitis haciendo uso de la histoquímica. Este tipo de prácticas y valoraciones es importante porque permite el diagnóstico a tiempo de estas afecciones, como sucedió con la histopatología realizada a una biopsia proveniente de una mujer con dolor severo en el área de la sínfisis maxilar, se le aplicó una tinción de eosina hematoxilina y permitió diagnosticar osteomielitis. El tejido presentó hueso necrótico e inflamaciones agudas en el hueso compacto. A esta mujer se le había tomado un TAC y se observaron algunas lesiones líticas en el plato lingual, lo que dio un primer indicio de la presencia de osteomielitis, pero fue mediante la histología que se pudo confirmar (115).

Figura 1-4: Presentación histopatológica de las características de la puntuación de la evaluación histopatológica de la osteomielitis (HOES) por graduación (I-IV): a). Signos de una osteítis/osteomielitis aguda, b). Signos de una osteítis/osteomielitis crónica activa, c). Signos de una osteítis/osteomielitis crónica, d). Signos de una osteítis/osteomielitis remitida/calmada.



Nombre de la Fuente: Sedef, T. Merve, P. Selma, A. Basak, B. Hasan, H. and Funda, T. *Histopathological Osteomyelitis Evaluation Score (HOES) – an innovative approach to histopathological diagnostics and scoring of osteomyelitis*. ACS Applied Bio Materials. 6(4). 2023. DOI: 10.3205/iprs000049.

La osteomielitis asociada a implantes dentales es un poco más escasa que la asociada a implantes en el resto del cuerpo, pero suele ser bastante agresiva. Generalmente se puede identificar justo después de llevar a cabo un proceso de implantación, pero en los casos en que esto no ocurre, las consecuencias pueden desencadenar en procesos de reabsorción. Por esta razón, un diagnóstico adecuado en etapas tempranas resulta crucial para prevenir la pérdida permanente de tejido óseo (116).

1.3 Resistencia antibiótica y productos naturales como emergentes antibacterianos

La osteomielitis es uno de los principales retos que aún se mantienen presentes en el campo de la regeneración ósea. Normalmente se emplean antibióticos de amplio espectro para tratar este tipo de infecciones. Sin embargo, cuando estos tratamientos no se siguen con rigurosidad en cuanto a las dosis y los tiempos requeridos, pueden emerger cepas resistentes. En el caso de las infecciones que ocurren cuando hay un reemplazo óseo, la generación de este tipo de infecciones puede requerir una nueva cirugía y la remoción de todo el tejido que presente infecciones (117). La resistencia bacteriana asociada directamente a la osteomielitis se ve afectada por algunos factores de los pacientes como el que sean inmunodeprimidos, la edad, la inyección de drogas entre otros (118).

El tratamiento de la resistencia antibiótica genera costos muy elevados. En Estados Unidos el impacto anual de costos para este tipo de tratamiento asciende a los 20.000 millones de dólares y 8 millones más de días adicionales de hospitalización, y en la Unión Europea el costo es de 1.6 Millones de Euros y 2,5 millones más correspondientes a días de exceso de hospitalización. El 30% del presupuesto de las farmacéuticas de Estados Unidos está destinado al componente antimicrobiano y se desperdician 1.1 billones de dólares en antibióticos prescritos innecesariamente en ese país (114).

Como estrategias para evitar la resistencia antibiótica se han planteado algunas alternativas, entre ellas el uso de péptidos con actividad antimicrobiana conocidos como

AMPs. Ellos requieren el diseño de un sistema de carga, es decir, un vehículo que permita mantener su integridad hasta llegar al sitio que requiere su acción (113). Se han empleado vehículos de diferente naturaleza, como los liposomas. Esta opción presenta ciertas limitaciones como su baja estabilidad y su bajo control de administración del fármaco, pero son biocompatibles y tienen muy bajos niveles de citotoxicidad (119). También se pueden usar micelas poliméricas que tienen mejor estabilidad que los liposomas, pero se ven fuertemente afectadas por los cambios ambientales lo que puede desencadenar una liberación prematura de los péptidos(119). Algunos investigadores han empleado nanopartículas de metales, pero estas tienen altos niveles de citotoxicidad (120). Con el fin de plantear una estrategia eficaz, se han desarrollado anticuerpos que presentan la estabilidad requerida, además son altamente específicos y su efecto citotóxico es nulo, pero sus desventajas radican en que tienen asociados altos costos de fabricación y cuando se tratan infecciones polimicrobianas la especificidad puede tener un efecto negativo (121).

Otras alternativas para evitar la emergencia de cepas resistentes a antibióticos son los bacteriófagos de lisina. En estos la lisina se encarga de interrumpir la capa de peptidoglicano e iniciar la lisis celular (118). Se pueden obtener nanopartículas que pueden tener una actividad antimicrobiana inherente o inducida. Se fabrican nanopartículas de materiales biocompatibles con actividad inherente como las nanopartículas de plata o bien se pueden cargar con sustancias como aceites naturales para conferir la actividad antimicrobiana (123).

Otras estrategias para evitar la resistencia antibiótica se han centrado en la utilización de aceites naturales o algunos de sus compuestos, ya que pueden ser de fácil acceso y de menor costo que muchas de las alternativas que se han expuesto aquí. Muchos científicos han empezado a realizar esfuerzos con el fin de descubrir nuevos fitoquímicos que puedan desarrollarse para el tratamiento de enfermedades infecciosas. Aunque entre el 25 y el 50 % de los fármacos actuales proceden de las plantas (124), en general no se emplean como agentes antimicrobianos, sino que se explotan sus demás capacidades como la regulación de los procesos inflamatorios o su capacidad antioxidante (125). Las plantas son ricas en

metabolitos secundarios como los taninos, terpenoides, flavonoides, entre otros, y estos han mostrado de forma *in vitro* tener relación con la actividad antimicrobiana, mostrando un nuevo punto que podría ser explotado y potenciado en el aprovechamiento de los productos naturales y las plantas (126). El reciente interés en poder emplear productos naturales como agentes antimicrobianos obedece a que existe un descenso en las últimas décadas en el descubrimiento de antibióticos derivados de microorganismos, así como el hecho de que su vida útil es muy limitada, esto sin mencionar la problemática que se ha generado por la resistencia antibiótica, por lo que es necesario buscar alternativas que sean igual o más efectivas y se ha visto en los productos naturales un creciente potencial (123).

- **1.3.1 Propóleos**

Los propóleos son un compuesto fabricado por las abejas que han demostrado tener actividad antimicrobiana frente a especies como *S. aureus* (18), *E. coli* (128), *C. albicans* y *S. pyogenes* (125), las cuales están directamente relacionadas con el desarrollo de osteomielitis. Los propóleos se fabrican a partir de la saliva de las abejas y de los exudados de las plantas que están al alcance de las abejas, lo que genera variaciones composicionales entre propóleos de diferentes regiones, generando propóleos verdes, rojos, amarillos y marrones (26). A raíz de que la composición varía, el potencial de ellos también depende de la región en que se cosechan. Existen propóleos muy famosos de algunas regiones como Brasil, que se caracterizan por tener buena actividad antimicrobiana y antioxidante (130).

Recientemente se ha desarrollado una investigación en la que se fabricaron andamios de fosfatos de calcio, alginato y gelatina y se cargaron con extractos de propóleos de Giza, Egipto. Los andamios se evaluaron frente a especies *gram* positivas y *gram* negativas, *S. aureus*, *E. coli*, *S. mutans* y *Lactobacillus caseii*. El efecto antimicrobiano óptimo se obtuvo cargando los andamios con una concentración de 25% en peso de extractos de propóleos permitiendo observar efecto inhibitorio frente a todas las especies evaluadas (20).

Además de la actividad antimicrobiana, algunos estudios han logrado demostrar un efecto positivo del uso de los propóleos en los procesos de cicatrización ósea. Para esto se

diseñaron andamios naturales con una matriz ósea desmineralizada y se cargaron con propóleos. Se ocasionaron defectos óseos críticos en ratones y luego se emplearon los andamios en estos sitios. Se encontró que los animales en que se cargaron los andamios con propóleos mostraron procesos de cicatrización óptimos en defectos óseos críticos. Adicionalmente, en estos no se desencadenaron procesos inflamatorios devastadores después de hacer la implantación, a diferencia de aquellos en que no se utilizó el propóleo. Este indicador abre la puerta a seguir explorando estas posibles características de los propóleos de diferentes regiones (131).

El propóleo verde de Brasil es uno de los propóleos más estudiados. No sólo está asociado con una actividad antimicrobiana prometedora, sino que también se demostró que en concentraciones $\leq 400 \mu\text{g/mL}$ facilita la proliferación de células estromales mesenquimatosas de la médula ósea y no presenta efecto citotóxico, pero en concentraciones más altas puede dificultar el proceso de proliferación y tiene efecto citotóxico asociado. Además de la proliferación, el propóleo potenció los procesos de diferenciación condrogénica y adipogénica (132). Todo esto permite pensar que los propóleos pueden ser candidatos ideales para la funcionalización de andamios, ya que no sólo cuentan con potencial antimicrobiano frente a especies implicadas en el desarrollo de la osteomielitis, sino que además pueden generar otro tipo de efectos positivos y deseables en los procesos de sanación y cicatrización de las fracturas óseas.

2. Extractos etanólicos de propóleos de Tame (Arauca). Producción y caracterización de su actividad antioxidante y antimicrobiana

Abstract

Propolis are produced by bees from exudates and resins of the surrounding flora near their hives. Its purpose is to protect the hive from insects and pests, and due to its resinous nature, it insulates the brood from cold and rain. Throughout history, propolis has been characterized by various desirable properties such as its anti-inflammatory, antioxidant, and antimicrobial activity. This chapter summarizes the results obtained regarding the antimicrobial activity of propolis extracts harvested in Tame against *S. aureus* and *S. epidermidis*, strains related to the development of osteomyelitis, as well as their antioxidant capacity. A comparison methodology was employed for organoleptic characterization, and thermogravimetric techniques were used to obtain a physicochemical profile. Additionally, the quantification of total phenols and flavonoids was carried out using colorimetric techniques. The antioxidant capacity of propolis extracts was evaluated using the methods of free radical capture, 2,2-Diphenyl-1-Picrylhydrazyl (DPPH), and 2,2'-Azinobis-3-ethylbenzo-thiazoline-6-sulfonic acid (ABTS). Finally, antimicrobial activity was characterized through the measurement of inhibition zones, and the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and Minimum Bactericidal Concentration (MBC) were calculated. The evaluated propolis met the quality parameters established by the regulations of Brazil and El Salvador, as there is no such regulation in Colombia although when obtaining the correlation index, the relationships were positive but weak, indicating that the antioxidant activity may be contributed by other types of components that were not evaluated in this study. Additionally, propolis extracts showed effectiveness against bacterial strains of *S. aureus*

and *S. epidermidis*, requiring concentrations of up to 1.0 mg propolis/mL of extracts to be effective, and showed antioxidant capacity against DPPH and ABTS free radical scavenging. These results lead to the conclusion that these propolis samples have the potential to be used in the modification of biomaterials, providing antimicrobial activity to combat species related to the development of infections such as osteomyelitis.

Resumen

Los propóleos son fabricados por las abejas a partir de exudados y resinas de la flora circundante a sus colmenas. Tienen como objetivo proteger la colmena de insectos, plagas y gracias a su carácter resinoso aíslan las crías del frío y la lluvia. Se han caracterizado a través de la historia por tener diferentes propiedades deseables como su actividad antiinflamatoria, antioxidante y antimicrobiana. En este capítulo se resumen los resultados obtenidos sobre la actividad antimicrobiana de los extractos de propóleos cosechados en Tame, frente a *S. aureus* y *S. epidermidis*, cepas relacionadas con el desarrollo de la osteomielitis, así como su capacidad antioxidante. Se empleó una metodología de comparación para lograr una caracterización organoléptica y técnicas termogravimétricas para obtener un perfil fisicoquímico, además se realizó la cuantificación de fenoles y flavonoides totales mediante técnicas colorimétricas. Empleando los métodos de captación de los radicales libres 2,2-Difenil-1-Picrilhidrazilo (DPPH) y 2, 2'-Azinobis-3-etil- benzo-tiazolina-6-acido sulfónico (ABTS) se evaluó la capacidad antioxidante de los extractos de propóleos y por último mediante la medida de zonas de inhibición se caracterizó la actividad antimicrobiana y se calculó la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y la Concentración Mínima Bactericida (CMB). Los propóleos evaluados cumplieron con los parámetros de calidad establecidos por la normativa del Brasil y El Salvador, debido a que no existe una normativa como éstas en Colombia. Dentro de los propóleos estudiados se detectó la presencia de compuestos fenólicos y flavonoides, aunque al obtener el índice de correlación, las relaciones fueron positivas pero débiles, indicando que la actividad antioxidante puede ser aportada por otro tipo de componentes que no fueron evaluados en este estudio. Adicionalmente, los extractos de propóleos mostraron efectividad frente a cepas bacterianas de *S. aureus* y *S. epidermidis*, requiriendo concentraciones de hasta 1.0 mg de propóleos / mL de extractos para ser efectivas, además mostraron tener capacidad antioxidante frente a la captación de radicales libres de DPPH y ABTS. Estos

resultados permitieron concluir que estos propóleos tienen potencial para ser empleados en la modificación de biomateriales confiriendo una actividad antimicrobiana para combatir especies relacionadas con el desarrollo de infecciones como la osteomielitis.

2.1 Introducción

Los propóleos son un producto resinoso de la colmena, el cual puede tener un perfil general de su composición basado en componentes tales como goma y resina ámbar (50% a 70%), aceite y cera (30% a 50%), polen (5% a 10%), también pueden encontrarse vitaminas B, C y E minerales, azúcares, flavonoides, fenoles, aminoácidos, así como una gran variedad de compuestos aromáticos (133). En la literatura se han reportado algunas propiedades de los propóleos como potenciales agentes antioxidantes, citotóxicos y actividad antimicrobiana (134,135). Sin embargo, la composición específica de los propóleos varía de acuerdo con diferentes factores, por lo que resulta imprescindible tener una caracterización general con el fin de potenciar su aplicación en diferentes campos.

La capacidad cicatrizante, anestésica, antiinflamatoria, antibacteriana, antimicótica, antiviral, vaso protectora y antitumoral son algunas de las tantas propiedades que poseen los propóleos. Sin embargo, debido a la complejidad de su composición, su caracterización resulta dispendiosa y costosa, por lo que aún necesitan ser estudiados a profundidad. No obstante, se ha descubierto en los propóleos la presencia de componentes como el ácido benzoico, el ácido cinámico, el ácido ferúlico, ácidos grasos como el ácido linoleico, palmítico y oleico (136). que han sido relacionados con capacidad antioxidante, así como antimicrobiana frente a bacterias *gram* positivas y *gram* negativas. Los propóleos pueden tener diferentes coloraciones que incluyen amarillo, verde, rojo y marrón. Estudios realizados han mostrado que la coloración puede ser un indicativo para usos específicos (23). En el caso de los propóleos verdes han mostrado excelente actividad antioxidante y antimicrobiana(137,138), mientras los propóleos amarillos han mostrado ser anti proliferativos de líneas celulares de cáncer (139), y en el caso de los propóleos marrones han mostrado buen efecto antimicrobiano y fitoinhibitorio (140,141).

En este capítulo se recopilan los resultados obtenidos de la evaluación de la actividad antioxidante y antimicrobiana de los extractos etanólicos de propóleo (EEP) y la valoración de si la composición de los propóleos crudos se encuentra dentro de los rangos de calidad establecidos por la normatividad internacional. Se describe la caracterización fisicoquímica

de los propóleos cosechados en Tame (Asociación de apicultores Colmiel), mediante metodologías que permiten obtener características como el perfil organoléptico, el porcentaje de ceras y el material extractable en hexano, para garantizar que este cumple con normas de calidad establecidas. Así mismo se evalúa la capacidad antioxidante mediante dos metodologías diferentes y se hace una cuantificación de compuestos fenólicos y flavonoides, ya que la presencia de estos componentes puede estar relacionada con la actividad antimicrobiana. Adicionalmente, se valora la actividad antimicrobiana *in vitro* frente a cepas de *S. aureus* y *S. epidermidis* y su co-cultivo dada su relación con el desarrollo de osteomielitis.

2.2 Metodología

2.2.1 Recolección de propóleos

Figura 2-1: Recolección de propóleos con asociación de apicultores Colmiel



Nombre de la fuente: Ana Isabel Moreno

Las muestras de propóleos provienen de colmenas de abejas *Apis mellifera* (africanizada) del departamento de Arauca, Municipio de Tame (Colombia) de diez apiarios diferentes (Latitud: 6° 27' 30" N, Longitud: 71° 44' 41" W, 340 m.s.n.m). La recolección se realizó

mediante el método de trampa, tal como se muestra en la figura 2.1, utilizando una espátula para desprender los propóleos. La vegetación circundante entre los apiarios es diferente. En las áreas de recolección predominan especies como *Acacia mangium*, *Acalypha diversifolia*, *Alismataceae spp.*, *Passiflora foetida*, *Begonia guaduensis* y *Mimosa somnians*. La recolección se hizo en época de sequía en el mes de enero. Las muestras recolectadas se almacenaron a 4°C.

2.2.2 Caracterización Organoléptica

De acuerdo con la norma salvadoreña (138) para la calidad del propóleo crudo y con Lozina et al (139), se definieron parámetros como el aspecto, la consistencia, el color, el olor y el sabor para determinar, mediante pruebas comparativas con un banco de muestras de propóleos que sirvieron como referencia, la calidad de los propóleos cosechados. Para evaluar el aspecto y olor se emplearon escalas de 5 niveles de la siguiente manera: **aspecto:** circular brillante 1, amorfo con poco brillo 2, trozos irregulares opacos 3, trozos irregulares con brillo 4, polvo o granulado 5; **olor:** inodoro 1, resinoso 2, resinoso suave 3, resinoso aromático 4 y resinoso muy aromático 5. Para la evaluación de los atributos consistencia y sabor se utilizó una escala de 4 niveles; **consistencia:** muy blanda 1, blanda 2, poco blanda 3, dura 4; **sabor:** picante 1, dulce 2, amargo 3 e Insípido 4. El aspecto y el color se determinaron por observación visual y la consistencia por presión de la muestra con los dedos.

2.2.3 Caracterización Fisicoquímica

- **Porcentaje de humedad**

Para obtener el porcentaje de humedad se empleó el método termogravimétrico. Se pesó aproximadamente 1,00 g de propóleo crudo W_i , en una cápsula de porcelana y se colocó en una estufa a 105°C por tres horas. Posteriormente, se dejó enfriar en un desecador hasta obtener un peso constante W_f (donde dos evaluaciones del peso sucesivas no deben diferir en más ± 5 mg) (142). La norma establece que el propóleo debe tener un máximo de humedad del 10 %.

$$\% \text{ humedad} = W_i - W_f \quad (2.1)$$

- **Cuantificación de material extractable en Hexano y porcentaje de ceras**

La cuantificación del material extractable se llevó a cabo empleando el método termogravimétrico del residuo obtenido mediante una extracción con hexano (40 – 60 °C). Se utilizó un equipo soxhlet (Glasstech, China) en donde se dispuso 1 g de propóleo crudo en un dedal de celulosa. Se empleó hexano como solvente. Luego se llevó a cabo la extracción durante 8 h y se destiló el solvente. El proceso de secado se llevó a cabo en un horno (Ovens medic, Perú) a 105 °C hasta obtener peso constante (141) . Posteriormente, el extracto se almacenó en un congelador a una temperatura de -20 °C durante 24 h. Se realizó un proceso de filtración por gravedad con un filtro de papel (Whatman, Inglaterra). El material ceroso recolectado en el papel se secó a 40 °C, se pesó y la diferencia de peso entre el peso del propóleo inicial (W_i) y el residuo final (W_f) se expresó como el porcentaje de ceras, tal como se muestra en la ecuación 2.2. La norma establece que el porcentaje de ceras de un propóleo debe ser máximo del 40%. El filtrado se pasó por un rotaevaporador RE-20000E a 40°C y 2.5 Bar de presión con el fin de eliminar el solvente y el residuo se consideró el porcentaje de material extractable en hexano.

$$\% \text{ ceras} = W_i - W_f \quad (2.2)$$

- **Determinación de Cenizas**

El contenido de cenizas se obtuvo pesando 1.00 g de propóleos crudos (P_i) en un crisol , luego se sometió a calcinación a 550 °C usando un horno (SX1700, Sentro Tech, USA) durante tres horas. Se pasó a un desecador hasta obtener un peso constante (P_f), tal como se resume en la ecuación 2.3 (142).

$$\text{Cenizas} = P_i - P_f \quad (2.3)$$

• Obtención de Extractos Etanólicos de Propóleos

Todas las muestras de propóleos se almacenaron a 4°C antes de la extracción. Los propóleos se trituraron hasta disminuir su tamaño dejándolos en granos de aproximadamente 5 - 7 mm para facilitar su extracción, tal como se muestra en la figura 2.2a. Los extractos etanólicos de propóleos (EEP) se prepararon utilizando 10 g de cada muestra de propóleos mezclados con 100 mL de etanol al 70% v/v. La mezcla se agitó durante 24 horas en un agitador orbital (Thermo Scientific, USA) a una velocidad controlada de 120 rpm a temperatura ambiente y luego se filtró por gravedad (figura 2.2b). Los filtrados se mantuvieron en el congelador durante una noche, a -20°C, y luego se filtraron de nuevo para eliminar las ceras. El disolvente de las soluciones se eliminó en un rotaevaporador RE-20000E a 40°C y 2.5 Bar de presión (figura 2.2c) hasta obtener un tercio del volumen inicial de los extractos. Adicionalmente, se tomaron alícuotas de 10 mL de cada extracto y se llevaron a roto evaporación bajo las condiciones anteriormente descritas hasta alcanzar evaporación total del solvente, y se consideró que cada extracto correspondía a una mezcla homogénea, esto se hizo para estimar la concentración de propóleos evaporada en el solvente.

Figura 2-2: Obtención de extractos etanólicos de propóleos. Propóleos pulverizados, filtración por gravedad y rotoevaporación.

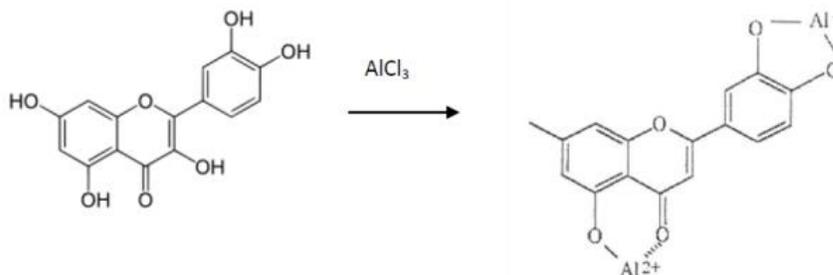


2.2.4 Actividad Antioxidante

- **Cuantificación del contenido total de Flavonoides**

El contenido total de flavonoides de los extractos etanólicos se determinó mediante el método descrito por Kumazawa et al. (144). Este método consiste en formar un complejo tricloruro de aluminio – flavonoide (figura 2.3). Esta unión genera un complejo coloreado que puede ser cuantificada mediante lecturas de absorbancia, ya que, a mayor concentración de flavonoides, mayor es la intensidad del color formado. Se añadieron 100 μL de EEP y 100 μL de 10% de nitrato de aluminio ($\text{Al}(\text{NO}_3)_3$) a una microplaca de 96 pozos. La placa se agitó y se dejó reposar durante 1h a temperatura ambiente en la oscuridad. A continuación, se midió la absorbancia a 420 nm en un lector de microplacas (Thermo Fisher Scientific, USA.). Para realizar la curva de calibración ($r^2=0.990$), se utilizó como flavonoide referencia quercetina (Sigma-Aldrich, USA.), en concentraciones entre 5 y 350 $\mu\text{g/mL}$. Los valores se expresan como la media de tres repeticiones. Los resultados se expresan como mg de equivalentes de quercetina g^{-1} (mg QE g^{-1} EEP).

Figura 2-3: Estructura del complejo Tricloruro de Aluminio- Flavonoide

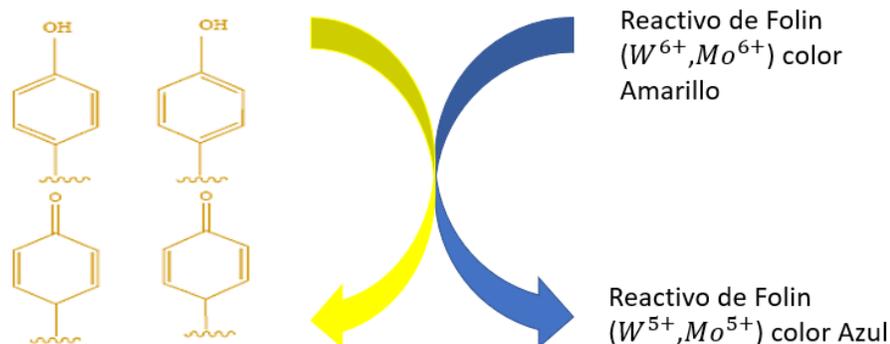


Nombre de la fuente: Amaya-Rodriguez y Portillo-Membreno. *Determinación de fenoles, flavonoides y capacidad antioxidante en melaza, azúcar blanco y moreno en el ingenio Chaparrastique por el método de espectrofotometría ultravioleta-visible.* 2013

• Cuantificación del contenido total de Fenoles

Para cuantificar el contenido total de fenoles en los extractos, se utilizó el método colorimétrico de Singleton y cols (145). El método consiste en la capacidad de los compuestos fenólicos para reaccionar con agentes oxidantes y la formación de complejos fosfomolibdico—fosfotúngstico (figura 2.4). Estos complejos presentan coloraciones que pueden ser cuantificadas mediante la medida de absorbancia. Se añadieron 20 μl de extracto de propóleo en etanol (EEP) y 100 μl de reactivo Folin-Ciocalteu a una placa de 96 pozos. La placa se agitó y se dejó reposar durante 8 minutos en la oscuridad. A continuación, se añadieron 80 μl de Na_2CO_3 (0.7N). La mezcla se incubó a 20°C durante 2h en la oscuridad. La absorbancia a 760 nm se midió con un lector de microplacas (Thermo Fisher Scientific, USA). Se realizó una curva de calibración de una concentración de ácido gálico entre 50 y 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ($r^2= 0.998$). Los resultados se expresan como mg de equivalentes de ácido gálico (GAE) en g^{-1} EEP. Los valores se expresan como la media de tres repeticiones.

Figura 2-4: Mecanismo de acción del reactivo de Folin-Ciocalteu



Nombre de la fuente: Universidad Politécnica de Valencia. *Determinación de polifenoles totales por el método de Folin-Ciocalteu*. 2015

- **Actividad antioxidante mediante captación del radical libre 2,2-Difenil-1-Picrilhidrazilo DPPH'**

Para el ensayo de la capacidad captadora del radical libre 2,2-Difenil-1-Picrilhidrazilo DPPH', se utilizó la metodología reportada previamente por Kumazawa (145) con algunas modificaciones. El método de DPPH consiste en la captación de radicales libres con la capacidad de aceptar un electrón proveniente de la molécula 1,1-Difenil-2-Picrilhidrazilo, que en solución metanólica presenta una coloración violeta intenso. Cuando los radicales libres tienen la capacidad de oxidar el electrón, generalmente estos donan un átomo de hidrógeno que genera el desvanecimiento de la coloración violeta y se observa la formación de una solución amarillenta. En una placa de 96 pozos, se agregaron 10 µl de extracto etanólico de Propóleos (EEP) (Se evaluaron concentraciones entre 0.7 – 0.05 g EEP/mL) y 190 µl de una solución metanólica de DPPH. Se agitó y se dejó en reposo durante 30 minutos a temperatura ambiente en ausencia de luz. Se midió la absorbancia a 517nm en un espectrofotómetro (Zeiss, Alemania). Se utilizó una solución de Trolox 50 µg/mL (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid) como control positivo. Los resultados se expresaron como porcentaje de actividad antioxidante empleando la fórmula expresada en la ecuación 2.4.

$$\% \text{ Actividad Antioxidante} = \frac{(A_{DPPH} - A_s)}{A_{DPPH}} \times 100 \quad (2.4)$$

Donde A_{DPPH} es la absorbancia del DPPH y A_s la Absorbancia de la muestra. Los valores se expresan como la media de tres réplicas. Todas las comparaciones fueron realizadas con la prueba de ANOVA con un post-test de Tukey. Se establecieron diferencias para valores de $p \leq 0.05$.

- **Actividad antioxidante mediante captación del radical libre 2, 2'-Azinobis-3-etil- benzo-tiazolina-6-acido sulfónico ABTS^{·+}**

Para el ensayo del 2, 2'-Azinobis-3-etil- benzo-tiazolina-6-acido sulfónico ABTS^{·+} se empleó el método propuesto por Re et al. (147). Este método consiste en la generación de un catión radical conocido como ABTS^{·+}, el cual presenta una coloración verde - azul intensa. En el momento en que los compuestos de interés con capacidad antioxidante interactúan con éste radical, se observa una disminución de la coloración. Este método no se ve afectado por la fuerza iónica, por tanto, es capaz de evaluar antioxidantes hidrofílicos y lipofílicos. El radical se generó por una reacción de oxidación del ABTS con persulfato de potasio. Se tomaron 4 µL de los extractos etanólicos de propóleos preparados previamente (Se evaluaron concentraciones entre 0.7 – 0.05 g EEP/mL) y se mezclaron con 196 µL de la solución de ABTS en una solución buffer fosfato a un pH de 7.4. Las soluciones obtenidas se incubaron a temperatura ambiente en ausencia de luz durante 30 minutos y se midió la absorbancia a 734 nm en un espectrofotómetro (Zeiss, Alemania). Se utilizó una solución de Trolox 50 µg/mL (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid) como control positivo y los resultados se expresaron como porcentaje de actividad antioxidante empleando la fórmula expresada en la ecuación 2.5.

$$\% \text{ Actividad Antioxidante} = \frac{(A_{ABTS} - A_s)}{A_{ABTS}} \times 100 \quad (2.5)$$

Donde A_{ABTS} es la absorbancia del ABTS y A_s es la Absorbancia de la muestra. Los valores se expresan como la media de tres réplicas. Todas las comparaciones fueron realizadas con la prueba de ANOVA con un post-test de Tukey. Se establecieron diferencias para valores de $p \leq 0.05$.

2.2.5 Actividad antimicrobiana

La actividad antimicrobiana se evaluó mediante tres metodologías diferentes que incluyen la medida de las zonas de inhibición, la determinación de la CMI y la CMB, y la valoración de la viabilidad de las biopelículas formadas en presencia de los EEP. La evaluación se hizo frente a cepas estándar de *Staphylococcus aureus* (ATCC 25175), *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 12228) y su co-cultivo, siguiendo el procedimiento descrito por el Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Las cepas se inocularon previamente en placas de petri que contenían agar Mueller Hinton (Merck, Alemania) y se incubaron a 37°C durante 24 horas. Para obtener los inóculos bacterianos, las cepas se cultivaron hasta la fase exponencial en medio Brain Heart Infusion (Merck, Alemania) a 37°C durante 24 horas y se ajustaron diluyendo cultivos frescos hasta alcanzar una turbidez equivalente a 90 NTU (aproximadamente 1.5×10^8 UFC/mL). Para el co-cultivo se realizaron diluciones seriadas hasta obtener una concentración de 1.5×10^6 UFC/mL para mezclarse en partes iguales.

- **Medidas de Zona de Inhibición**

Para la valoración del efecto inhibitorio mediante la técnica de Kirby-Bauer (148) se prepararon inóculos de *S. aureus* y *S. epidermidis* correspondientes a 1.5×10^8 UFC/mL. A continuación, se tomó 1 mL de esta suspensión y se extendió en placas con medio de agar Mueller Hinton mediante frotis con hisopo. Se sembraron 50 µL de EEP (1.5 g/mL) en pozos de 0.5 mm de diámetro en el agar. Discos de papel (Advantec, USA) de 5.0 mm de diámetro embebidos con solución salina y Clorhexidina Digluconato (0.20 g) (Farpag, Colombia) se emplearon como controles negativos y positivos respectivamente. Finalmente se incubaron las placas a 37°C por 24 horas. La actividad antimicrobiana se evaluó midiendo el diámetro de la zona de inhibición del crecimiento (IZ) en milímetros (incluyendo el diámetro del disco) utilizando el programa ImageJ.

- **Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI)**

En microbiología, la concentración mínima inhibitoria (CMI) se conoce como la concentración más baja de un fármaco antimicrobiano que es capaz de inhibir el crecimiento de forma visible tras una noche de incubación (147). Para determinar la CMI,

se realizaron diluciones en caldo en microplacas de 96 pozos. Se añadió un volumen de 50 μL de caldo Mueller Hinton (Merck, USA) y 50 μL por pozo del EEP, siguiendo el procedimiento descrito por el CLSI con algunas modificaciones (150). Se preparó una solución madre de 70 mg/mL de EEP y luego se diluyó en caldo Mueller Hinton mediante diluciones seriadas (en proporción 1:2, v/v) a concentraciones que oscilaron entre 50 y 50000 $\mu\text{g/mL}$ en las microplacas. Se añadieron aproximadamente 50 μL de suspensión bacteriana, con una concentración aproximada de 1.5×10^6 UFC/mL, a los pozos que contenían 50 μL de caldo Mueller Hinton con diferentes concentraciones finales de EEP. Se agregaron 50 μL de solución de resazurina (100 $\mu\text{g/mL}$) y se incubó de nuevo a 37 °C durante 2 h. La tinción azul indica ausencia de crecimiento bacteriano para *S. aureus* y *S. epidermidis* y la tinción rosa indica crecimiento bacteriano. Se utilizó etanol al 70% v/v (disolvente de los extractos) en caldo Mueller Hinton como control del solvente de los extractos, y se utilizó caldo Mueller Hinton como control negativo. Los valores MIC se definieron como la concentración que inhibió el crecimiento bacteriano. Este ensayo se realizó por triplicado.

- **Determinación de la Concentración Mínima Bactericida (CMB)**

La Concentración Mínima Bactericida (CMB) se define como la menor concentración de un agente antimicrobiano que es capaz de eliminar el 99.9 % de inóculo original, es decir que equivale a la disminución de 3 logaritmos decimales (147). Para el cálculo de la CMB se utilizaron 10 μL de muestra de uno de los pozos evaluados en la CMI que no presentaron coloración. Esta gota se sembró en medio Agar Mueller Hinton (Merck, USA) y se incubó a 37 °C durante 18 h y 5 % CO_2 , esto se hace con el fin de confirmar la ausencia de microorganismos viables. Este ensayo se realizó por triplicado.

2.2.6 Análisis Estadístico

Todos los experimentos se realizaron por triplicado. Los resultados se expresaron como media \pm desviación estándar (DE). El análisis estadístico se realizó con el programa SPSS Statistics (V21, IBM, USA.). Se utilizó una prueba t-Student no emparejada para evaluar la significación entre los grupos experimentales. Un valor $p \leq 0.05$ se consideró estadísticamente significativo. Las gráficas se realizaron utilizando Python (v 3.11, USA).

2.3 Resultados y Discusión

• 2.3.1 Caracterización Organoléptica

La caracterización organoléptica se muestra en la tabla 2-1. Los propóleos evaluados mostraron un 20 % de propóleos granulados y un 20 % de propóleos con trozos irregulares con brillo. El 60 % restante correspondió a masas irregulares con poco brillo y a trozos irregulares opacos, distribuidos en igual proporción, dejando ver que los propóleos son muy variados incluso siendo colectados en una misma región geográfica. La falta de brillo puede estar relacionada con la presencia de compuestos específicos que varían de acuerdo con la flora circundante, así como a procesos de oxidación externa a los que se expone la resina (151).

La consistencia de los propóleos mostró un 50 % dura y 50 % poco blanda, mientras que el olor se caracterizó por ser resinoso, el 40 % mostró ser resinoso Suave, 40 % Resinoso aromático y sólo un 20 % Resinoso muy aromático. El sabor predominante fue amargo y todas las muestras colectadas presentaron coloración marrón. El color de los propóleos puede presentar variaciones que van desde el café hasta el verde. Se han encontrado coloraciones rojas, amarillas e incluso negras. Las variaciones de color dependen de las plantaciones que se encuentran cerca a la colmena. Existen compuestos muy específicos que pueden ocasionar estas variaciones en el color. Sin embargo, en las muestras de esta región no se observaron este tipo de variaciones.

Tabla 2-1: Caracterización organoléptica de los Propóleos crudos

Muestra	Aspecto	Consistencia	Olor	Sabor	Color
1	Granulada	Poco blanda	Resinoso suave	Amargo	Marrón
2	Granulada	Poco blanda	Resinoso suave	Amargo	Marrón
3	Masa irregular con poco brillo	Dura	Resinoso Aromático	Amargo	Marrón
4	Trozos irregulares opacos	Dura	Resinoso Aromático	Amargo	Marrón
5	Trozos irregulares opacos	Poco blanda	Resinoso suave	Amargo	Marrón
6	Masa irregular con poco brillo	Poco blanda	Resinoso Aromático	Amargo	Marrón
7	Masa irregular con poco brillo	Poco blanda	Resinoso suave	Amargo	Marrón
8	Trozos irregulares con brillo	Dura	Resinoso muy Aromático	Amargo	Marrón
9	Trozos irregulares con brillo	Dura	Resinoso Aromático	Amargo	Marrón
10	Trozos irregulares con brillo	Dura	Resinoso muy Aromático	Amargo	Marrón
11	Trozos irregulares con brillo	Poco blanda	Resinoso suave	Amargo	Marrón

La caracterización organoléptica encontrada mostró variaciones en algunos parámetros y esto se debe a que los propóleos a pesar de que se cosechan en la misma región provienen de diferentes zonas. Algunas colmenas se encuentran en zona de piedemonte, otras están cerca de la montaña de la sierra nevada del Cocuy y otras se sitúan en la meseta. Por tanto, aquellos que fueron colectados en zonas cercanas presentan similitudes entre ellos en cuanto al aspecto y la consistencia. Este resultado se encuentra en sintonía con lo que se encuentra en la literatura, sobre las características propias de cada propóleo y su relación con la fitogeografía (152,153).

2.3.2 Caracterización Físicoquímica

La caracterización físicoquímica es una de las principales bases para garantizar la calidad de los propóleos. Sin embargo, en Colombia no se tiene una normativa vigente por lo que la regulación debe basarse en las normativas que han establecido otros países. Generalmente puede recurrirse a la normativa de Brasil (Normativa N° 11, del 20 de octubre de 2000) o la del Salvador (NSO67.03.01:01) que tienen especificaciones iguales entre sí o también se puede recurrir a la normatividad mexicana (NOM-003-SAG/GAN-2017). En estas normativas es posible encontrar parámetros generales para evaluar la calidad de los propóleos, aunque todas ellas carecen de una estandarización armónica y de metodologías claras, siendo un problema complejo lograr una comparación entre propóleos cosechados en diferentes regiones. En este trabajo se emplearon las normativas nacionales de Brasil y El Salvador para garantizar los parámetros de calidad evaluados de los propóleos.

En la tabla 2-2 se muestran los resultados obtenidos de la caracterización físicoquímica de los propóleos cosechados por la asociación de apicultores, Colmiel. Al ser comparados con los parámetros de calidad establecidos por la normativa brasileña se encontró que todas las muestras evaluadas cumplen con los requerimientos de calidad. En Colombia existen muy pocos estudios que caractericen los propóleos, pero la mayor parte de los estudios se han realizado en propóleos de la región antioqueña (154–156), y los resultados que se han encontrado son similares a los mostrados en este trabajo, permitiendo asegurar que los propóleos colombianos se ajustan a los criterios de calidad de la normativa salvadoreña y brasilera.

Tabla 2-2: Caracterización Físicoquímica de los Propóleos crudos

Parámetros				
Muestras	Humedad (%)	Cenizas (%)	Ceras (%)	Material extractable en hexano (%)
1	3.9 ± 0.1	1.5 ± 0.3	4.0 ± 0.3	3.2 ± 0.9
2	4.1 ± 0.2	1.6 ± 0.2	3.8 ± 0.4	4.1 ± 0.9
3	3.9 ± 0.3	1.3 ± 0.3	4.6 ± 0.8	3.3 ± 1.0
4	4.2 ± 0.1	1.9 ± 0.1	5.3 ± 0.2	5.2 ± 0.5
5	2.8 ± 0.2	1.2 ± 0.2	2.7 ± 0.5	3.3 ± 0.6

6	3.9 ± 0.1	1.8 ± 0.2	3.7 ± 0.2	4.2 ± 1.0
Muestras	Humedad (%)	Cenizas (%)	Ceras (%)	Material extractable en Hexano (%)
7	3.5 ± 0.6	1.7 ± 0.2	4.2 ± 0.2	5.1 ± 0.5
8	3.0 ± 0.1	1.1 ± 0.1	3.6 ± 0.3	4.3 ± 0.9
9	4.2 ± 0.2	1.5 ± 0.2	2.5 ± 0.1	4.1 ± 0.6
10	3.9 ± 0.3	1.7 ± 0.3	5.2 ± 0.4	4.2 ± 1.0
11	3.7 ± 0.2	1.4 ± 0.2	3.6 ± 0.3	4.3 ± 0.3
Normativa	< 8 %	≤ 5 %	≤ 25 %	

Los resultados encontrados en cuanto al porcentaje de humedad son mucho menores que los reportados por otros autores de regiones como Vitória da Conquista y Canavieiras de Brasil (154) uno de los países que ha más ha publicado estudios sobre la caracterización y el potencial de sus propóleos. Sin embargo, los resultados reportados en este trabajo en cuanto a la humedad son similares a los reportados por otros autores sobre el estudio de propóleos colombianos de la región antioqueña. En cuanto al porcentaje de cenizas, los propóleos de Tame mostraron un contenido muy bajo, que se ajusta incluso a los parámetros de calidad. Este resultado difiere de lo que se encontró en muestras de propóleos de la región antioqueña colombiana, pero es similar a lo reportado en propóleos provenientes de Brasil (153). El parámetro del porcentaje de cenizas tiene importancia en la caracterización debido a que es posible comercializar propóleos pulverizados, por lo que es necesario mantener un control para evitar adulteraciones (158). Conocer el porcentaje de ceras es importante porque los propóleos pueden comercializarse en diferentes presentaciones y son utilizados en la formulación de diferentes productos que incluyen desde tópicos hasta cápsulas blandas o jarabes, etc. Por ende, en algunas presentaciones es necesario remover la fracción cerosa ya que puede dificultar su tratamiento. Entre más ceras contenga, es más difícil conseguir polvos o jarabes homogéneos (159)

2.3.3 Actividad Antioxidante

- **Cuantificación de Fenoles y Flavonoides Totales**

La caracterización de propóleos de diferentes zonas geográficas ha permitido encontrar una amplia variedad de compuestos y perfiles químicos que incluyen diferentes tipos de fenoles, flavonoides, ácidos alifáticos y aromáticos, ácidos grasos, terpenos, saponinas,

taninos, lactonas, alcaloides y triterpenos, entre otros (160–162). Dichos compuestos suelen estar asociados a una actividad biológica. Por lo tanto, los extractos de propóleos se han utilizado ampliamente en la medicina tradicional debido a sus propiedades antioxidantes, antiinflamatorias, analgésicas y antiproliferativas (162–165).

Los extractos etanólicos obtenidos en este estudio mostraron un contenido total de fenoles entre 4.23 ± 0.02 y 13.8 ± 0.01 mg EAG g⁻¹ EEP y un contenido de flavonoides totales entre 0.32 ± 0.22 y 5.03 ± 0.18 mg EQ g⁻¹ EEP, los datos se muestran a detalle en la tabla 2.3. Estos valores son menores en comparación con aquellos presentados por propóleos de Brasil (Estado de Paraná), en donde se obtuvieron resultados entre 48 - 76 mg EAG g⁻¹ EEP para el contenido total de Fenoles y entre 10 - 26 mg EQ g⁻¹ EEP para el contenido total de flavonoides (166). Sin embargo, los propóleos estudiados (Tame, Arauca) mostraron un comportamiento más cercano a los reportados por Pobiega et al. en 2019 (167) quien evaluó propóleos de Polonia (zona central sur), obteniendo valores entre 11-16 mg EQ g⁻¹ EEP. La cuantificación de compuestos orgánicos puede verse afectada por los métodos de extracción, así como por los solventes orgánicos utilizados para obtener los extractos (167,168). La presencia de fenoles y flavonoides en los extractos de propóleo puede estar relacionada con actividad antimicrobiana. Sin embargo, se debe considerar que lograr una caracterización química composicional no garantiza la identificación del ingrediente activo, debido a la alta complejidad y variabilidad en la composición de los propóleos. Es posible que los potenciales efectos bactericidas de los propóleos estén asociados a la presencia de más de un componente (169).

Tabla 2-3: Cuantificación de Fenoles y flavonoides totales

# Muestra	Fenoles totales (mg EAG g ⁻¹ EEP)	Flavonoides totales (mg EQ g ⁻¹ EEP)
1	13.8 ± 0.01	5.32 ± 0.21
2	10.5 ± 0.52	0.92 ± 0.03
3	7.95 ± 0.03	0.41 ± 0.17
4	4.21 ± 0.02	0.62 ± 0.22
5	5.64 ± 0.32	0.32 ± 0.24
6	6.55 ± 0.24	0.41 ± 0.25
7	8.51 ± 0.21	0.50 ± 0.51
8	7.48 ± 0.22	2.34 ± 0.01
9	9.85 ± 0.04	3.81 ± 0.33

10	11.3 ± 0.05	4.92 ± 0.45
11	10.3 ± 0.01	5.01 ± 0.22

- **Captación de radicales libres de DPPH y ABTS**

Los ensayos para evaluar la actividad antioxidante de los EEP mostraron actividad frente a los dos radicales analizados. El método de DPPH[•] consiste en identificar compuestos poco polares que eliminen el radical libre DPPH mediante su capacidad para donar hidrógenos, mientras que con el método ABTS se puede medir la actividad de compuestos hidrofílicos y lipofílicos. En la tabla 2.4 se muestran los resultados de la actividad antioxidante de los EEP. La medida de la actividad antioxidante con el método DPPH se encontró entre 30.3 % ± 0.2 % y 72.2 % ± 0.3% y la actividad medida con el método ABTS resultó entre 25.3 % ± 0.2 % y 63.2 % ± 0.2 % mientras la medida de la actividad antioxidante de la solución de Trolox, que sirve de control, mostró valores de 79.7± 1.9 % y 50.8 % ± 1.3 % en los ensayos de DPPH y ABTS respectivamente. La actividad presentada por los EEP es prometedora ya que implica que en su composición se encuentran componentes con naturaleza polar, así como hidrofílica que les permite ser eficaces empleando varios mecanismos para captar y eliminar radicales libres.

Tabla 2-4: Capacidad antioxidante mediante la captación de los radicales libres DPPH y ABTS de los Extractos de Propóleos de Tame

# Muestra	DPPH [•] (%)	ABTS ^{•+} (%)
1	48.8 ± 0.2	35.1 ± 0.5
2	35.8 ± 0.2	37.2 ± 0.4
3	30.3 ± 0.3	28.6± 0.2
4	35.6 ± 0.2	25.3 ± 0.2
5	58.6 ± 0.2	41.3 ± 0.1
6	45.9 ± 0.2	28.6 ± 0.2
7	59.2 ± 0.4	37.5 ± 0.2
8	60.3 ± 0.4	48.2 ± 0.3
9	66.2 ± 0.2	26.2 ± 0.2
10	58.2 ± 0.2	50.2 ± 0.4
11	72.2 ± 0.4	63.2 ± 0.2
Trolox	79.7 ± 2.0	50.8 ± 1.0

Los valores de actividad reportados en este trabajo mostraron estar acordes con otros estudios, en los que se han encontrado valores de actividad antioxidante frente al radical libre DPPH entre el 17 y el 70 %, y frente al radical libre ABTS entre 5 - 28 % (170). El principio de las dos técnicas es básicamente el mismo, por lo cual se esperaría encontrar resultados similares. En este caso, los resultados con el método de DPPH fueron mucho mayores que con el método de ABTS. Esto puede deberse a los mecanismos de reacción del ABTS y los eliminadores de radicales libres en el que puede afectar a las conformaciones estructurales de los antioxidantes (171).

Tabla 2-5: Correlación de la capacidad antioxidante mediante la captación de los radicales libres DPPH y ABTS de los Extractos de Propóleos de Tame y el contenido total de fenoles y flavonoides.

Parámetros	Fenoles Totales	Flavonoides	DPPH	ABTS⁺
Fenoles Totales	1	-0.010	0.410	0.277
Flavonoides		1	0.677**	0.568**
DPPH			1	-0.411**
ABTS⁺				1

*Nivel de significancia de 95% ($p < 0.05$)

** Nivel de significancia de 99% ($p < 0.01$)

La actividad antioxidante puede explicarse por la presencia de componentes como los fenoles y flavonoides, los cuales se presentan en los propóleos de esta región, aunque puede haber otros compuestos como los terpenoides y los triterpenos que también aportan propiedades y que han sido reportados en otros estudios de propóleos de Colombia (172). La actividad antioxidante, así como la presencia de componentes fenólicos y flavonoides, puede estar asociada a su vez con la actividad antimicrobiana, en la tabla 2.5 se muestra el índice de correlación entre a actividad antioxidante y los fenoles y flavonoides totales encontrados en las muestras, donde las relaciones encontradas fueron débiles, en este sentido resulta importante realizar una caracterización más extensa para validar las relaciones entre las propiedades de los propóleos de Tame y sus diferentes capacidades.

2.3.4 Actividad Antimicrobiana

- **Medidas de Zonas de Inhibición**

Los resultados de la medida de zona de Inhibición mostraron mayor sensibilidad de *S. aureus* a la acción de los propóleos que la cepa de *S. epidermidis*. En la tabla 2-5 se especifican las medidas obtenidas para cada una de las muestras, y en la figura 2.5 se muestran las medidas obtenidas de la Zona de Inhibición en mm. Todas las muestras evaluadas formaron halos frente a las dos cepas. La muestra con mejor actividad fue la muestra 1, correspondiente a propóleos colectados en la finca San Vicente, ubicada en zonas de piedemonte Araucano, que arrojó zonas de inhibición de 14.2 ± 0.06 mm frente a *S. aureus* y 9.77 ± 0.28 mm frente a *S. epidermidis*. La actividad de los propóleos es significativa, aunque difiere de la actividad de la clorhexidina digluconato, empleada como control positivo. Los resultados obtenidos en este estudio concuerdan con los encontrados por varios autores que han reportado halos de inhibición entre 10 y 14 mm frente a *S. aureus* generados con propóleos de Canadá y Brasil (148,169) .

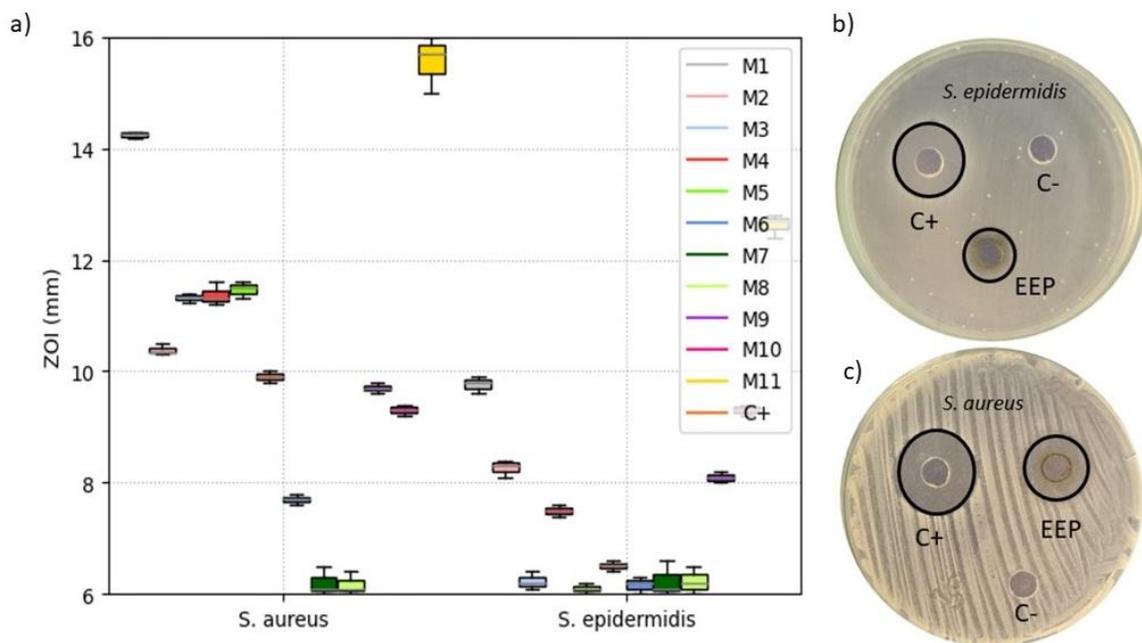
La actividad antimicrobiana frente a *S. aureus* de los propóleos ha sido atribuida en algunos casos a la presencia de flavonoides como flavonas, flavonoles, flavonoides e isoflavonas (174). Los propóleos evaluados en este estudio mostraron presencia de compuestos fenólicos y flavonoides, lo cual podría estar relacionado con la actividad antimicrobiana expuesta.

El propóleo y algunos de sus derivados pueden llegar a afectar la permeabilidad de la membrana celular, provocando una reducción de la producción de Adenosin Trifosfato (ATP) y de esta forma comprometiendo la movilidad bacteriana y su metabolismo (169–171). Una razón por la que generalmente los propóleos son más eficaces frente a bacterias *gram* positivas, como las evaluadas en este estudio, es que este tipo de bacterias no producen una gran concentración de enzimas hidrolíticas en su membrana externa, como lo hacen las bacterias *gram* negativas, evitando contrarrestar el efecto de los propóleos (150).

Tabla 2-6: Zonas de inhibición de los Extractos de Propóleo frente a *S. aureus* y *S. epidermidis*

Muestra	<i>S. aureus</i> (mm)	<i>S. epidermidis</i> (mm)
1	14.2 ± 0.06	9.77 ± 0.28
2	10.4 ± 0.13	8.27 ± 0.24
3	11.3 ± 0.07	6.23 ± 0.24
4	11.4 ± 0.22	7.50 ± 0.15
5	11.5 ± 0.18	6.10 ± 0.14
6	9.60 ± 0.45	6.51 ± 0.13
7	7.70 ± 0.12	6.17 ± 0.25
8	6.20 ± 0.33	6.23 ± 0.34
9	6.17 ± 0.25	6.23 ± 0.22
10	9.70 ± 0.10	8.10 ± 0.15
11	9.30 ± 0.14	9.30 ± 0.14
C+	15.6 ± 0.50	12.6 ± 0.20

Figura 2-7: Medidas de la Zona de Inhibición de los Extractos de Propóleos (EEP) frente a *S. aureus* y *S. epidermidis*



Nombre de la fuente: Ana Isabel Moreno

- **Determinación de la concentración Mínima Inhibitoria CMI y Concentración Mínima bactericida CMB**

La concentración Mínima Inhibitoria (CMI) se define como la menor concentración requerida para controlar el crecimiento microbiano visible y se diferencia de la Concentración Mínima bactericida (CMB) en que esta última es la menor concentración necesaria para eliminar más del 99.9 % de los microorganismos. Por tanto, una CMI puede tener un efecto bacteriostático, pero permitir cierto crecimiento bacteriano al cabo de un tiempo. Sin embargo, en muchas ocasiones la CMI y la CMB de un compuesto pueden llegar a ser las mismas. Conocer la CMI de un compuesto es de vital importancia cuando se pretende usar como compuesto activo, puesto que lo ideal es garantizar que se usa al menos esa concentración mínima requerida para garantizar un control de proliferación de los microorganismos (177).

Los extractos obtenidos mostraron una CMI entre 1.0 ± 0.1 y 20 ± 0.1 mg/mL frente a *S. aureus* y de 1.5 ± 0.2 y 20 ± 0.3 mg/mL frente a *S. epidermidis*. Estos valores son mayores que los reportados por Moussaoui et al. (174) quienes estudiaron extractos de propóleos obtenidos de Argelia (zona este), encontrando CMI de 0.04 y 0.06 mg/mL frente a *S. aureus* y *S. epidermidis* respectivamente. Dichos extractos también se utilizaron para evaluar los EEP frente a cepas resistentes a antibióticos mostrando una neutralización de la resistencia antibiótica. De la misma forma, se han evaluado extractos etanólicos de propóleos rojos de Brasil (Marechal Deodoro-Alagoas) encontrando una MIC de 0.256 mg/mL frente a *S. aureus*. Este tipo de extractos mostraron mayor CMI que extractos de propóleos rojos obtenidos con cloroformo y acetona (179). Esto demuestra que los EEP tienen potencial para controlar el crecimiento de *S. aureus* y *S. epidermidis*, los cuales han sido asociados con los procesos de formación de biopelículas responsables de la osteomielitis crónica (17).

Tabla 2-8: Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y Concentración Mínima Bactericida (CMB) frente a *S. aureus* y *S. epidermidis*

Muestra	CMI <i>S. aureus</i> (mg/mL)	CMB <i>S. aureus</i> (mg/mL)	CMI <i>S. epidermidis</i> (mg/mL)	CMB <i>S. epidermidis</i> (mg/mL)
1	1.0 ± 0.1	1.0 ± 0.1	1.3 ± 0.1	1.3 ± 0.1
2	9.0 ± 0.2	9.0 ± 0.2	1.7 ± 0.3	1.7 ± 0.3
3	9.0 ± 0.1	9.0 ± 0.1	9.0 ± 0.1	9.0 ± 0.1
4	3.0 ± 0.2	3.0 ± 0.2	3.0 ± 0.1	3.0 ± 0.1
5	9.0 ± 0.1	9.0 ± 0.1	9.0 ± 0.2	9.0 ± 0.2
6	6.0 ± 0.1	6.0 ± 0.1	6.0 ± 0.1	6.0 ± 0.1
7	15 ± 0.2	15 ± 0.2	15 ± 0.3	15 ± 0.3
8	20 ± 0.1	20 ± 0.1	20 ± 0.2	20 ± 0.2
9	20 ± 0.1	20 ± 0.1	20 ± 0.3	20 ± 0.3
10	2.0 ± 0.2	2.0 ± 0.2	2.0 ± 0.2	2.0 ± 0.2
11	1.5 ± 0.1	1.5 ± 0.1	1.5 ± 0.2	1.5 ± 0.2
C (+)	0.1 ± 0.2	0.1 ± 0.2	0.1 ± 0.3	0.1 ± 0.3

2.4 Conclusión

Las muestras de propóleos cosechadas por la asociación de apicultores, Colmiel mostraron características fisicoquímicas que cumplen con los requerimientos normativos brasileños y salvadoreños de calidad. Adicionalmente, se logró comprobar que sus extractos etanólicos cuentan con capacidad antioxidante y actividad antimicrobiana frente a *S. aureus* y *S. epidermidis*. Dicha actividad puede ser atribuida a la presencia de fenoles y flavonoides, aunque no necesariamente son la única razón, ya que los propóleos se caracterizan por ser matrices complejas con una gran variedad de componentes. Los extractos etanólicos de propóleos de esta región pueden conferir actividad antimicrobiana a biomateriales con el fin de reducir el desarrollo de infecciones como la osteomielitis.

3. Obtención de un andamio poroso para regeneración ósea mediante impresión 3D

Abstract

The evolution in tissue repair and regeneration processes necessarily involves the participation of various disciplines such as materials engineering, cell cultures, and biochemistry. The field of bone tissue repair and regeneration has been intensely studied, with significant efforts devoted to the manufacturing of devices with geometries and characteristics that, in addition to being biocompatible, can promote cell proliferation and facilitate bone regeneration. This chapter describes the process by which scaffolds with Gyroid TPMS geometry were developed through 3D printing with potential applications in bone repair and regeneration. For scaffold manufacturing, a fractional factorial Design of Experiments (DOE) was employed to obtain the ceramic paste used as ink for 3D printing. Using computer-aided design (CAD), devices with Gyroid TPMS geometry were generated and subsequently printed. By calculating the density difference, it was possible to determine the porosity of the manufactured scaffolds, which were later impregnated with propolis extracts using positive pressure. The impregnation of propolis extracts was confirmed by obtaining FTIR spectra. Additionally, changes in pH over time were analyzed since this aspect is relevant for evaluating in vitro assays on cell cultures. The results demonstrated that it was feasible to print ceramic scaffolds with complex geometries, and the methodology used for propolis impregnation was successful. In conclusion, the use of tools such as CAD and DOE facilitate the fabrication of three-dimensional devices with complex geometries with potential applications in the repair and regeneration of bone tissues.

Resumen

La evolución en los procesos de reparación y regeneración de tejidos implica necesariamente la participación de varias disciplinas como son la ingeniería de materiales, los cultivos celulares y la bioquímica. El campo de la reparación y regeneración de tejidos óseos ha sido uno de los campos intensamente intervenidos, puesto que se ha dedicado un gran esfuerzo a la fabricación de dispositivos con geometrías y características que además de ser biocompatibles, pueden llegar a favorecer los procesos de proliferación celular y podrían facilitar la regeneración ósea. En este capítulo se describe el proceso por medio del cual se desarrollaron andamios con geometría de TPMS Gyroide mediante impresión 3D con potencial aplicación en reparación y regeneración ósea. Para la fabricación de los andamios se recurrió a un diseño de Experimentos factorial fraccionado que permitió obtener la pasta cerámica usada como tinta para la impresión 3D y mediante el modelado asistido por computadora (CAD) se generaron los dispositivos con la geometría de TPMS Gyroide que luego se imprimieron. Mediante el cálculo de la diferencia de densidades fue posible calcular la porosidad de los andamios fabricados, los cuales fueron posteriormente impregnados con extractos de propóleos mediante la utilización de presión positiva. La impregnación de los extractos de propóleos se comprobó mediante la obtención de espectros FTIR. Además, se analizó el cambio de pH en el tiempo debido a que este aspecto es relevante para evaluar ensayos *in vitro* sobre cultivos celulares. Los resultados mostraron que fue posible imprimir andamios cerámicos con geometrías complejas y que la metodología empleada para la impregnación de propóleos fue exitosa. En conclusión, el uso de herramientas como el CAD y el DOE facilitan la fabricación de dispositivos tridimensionales con geometrías complejas con aplicación potencial en la reparación y regeneración de tejidos óseos.

3.1 Introducción

La ingeniería de tejidos está basada en el uso de métodos de ingeniería de materiales en conjunto con el uso de células, bioquímica y fisicoquímica para reemplazar o mejorar tejidos u órganos con funciones biológicas específicas (180). La impresión 3D es una de las herramientas más adecuadas para la creación de soluciones en la ingeniería de tejidos, gracias a su proceso de fabricación rápido, preciso y controlable. Esta técnica ha resultado ser muy versátil y útil, permitiendo el uso de diferentes biomateriales para la reparación y remodelación ósea. Tal es el caso de los biopolímeros que son muy utilizados gracias a su bajo costo y a su facilidad para ser mezclados con otros materiales permitiendo mejorar características reológicas, mecánicas y funcionales. Sin embargo, los polímeros presentan propiedades mecánicas deficientes para usarse en dispositivos que requieran soportar cargas (180). Los metales fueron de los primeros materiales que se usaron como biomateriales de implante, dada su elevada resistencia a la tracción y a la fatiga. Sin embargo, presentan limitaciones relacionadas con la corrosión, así como cierta toxicidad e incluso reacciones de hipersensibilidad (181). En la búsqueda del perfeccionamiento de la fabricación de dispositivos biocerámicos implantables con potencial aplicación en la regeneración ósea, se han hecho grandes esfuerzos por lograr controlar la estructura a niveles macro, micro y nano escala (182). Los biocerámicos han mostrado características de biocompatibilidad, bioactividad y propiedades mecánicas que los han convertido en materiales deseables en este campo. El término biocerámicos incluye una amplia gama de materiales inorgánicos no metálicos con estructura cristalina, un elevado punto de fusión, resistividad eléctrica y resistencia a la corrosión (183,184).

Dentro de los cerámicos que se han estudiado para la reparación ósea se encuentran los fosfatos de calcio y la hidroxiapatita (HA), siendo los más comúnmente usados gracias a su similitud con la matriz ósea(185). Los silicatos de calcio, entre los que se encuentra la wollastonita, se han destacado por contar con mayor resistencia, convirtiéndolos en candidatos deseables para la regeneración de tejidos duros (185–187). La wollastonita se caracteriza por su capacidad para inducir la formación de una capa de HA en las superficies de los andamios fabricados con este material, facilitando la integración entre los andamios y el tejido óseo natural en los procesos de reparación ósea. Además, los andamios de wollastonita han mostrado tener una resistencia mecánica 120 veces mayor

que otros andamios fabricados utilizando poliuretano y tienen propiedades de consolidación espontánea en medio acuoso (188,189). Algunos estudios se han centrado en estructurar los andamios de wollastonita mediante la adición de nanopartículas, logrando mejores resultados en cuanto a la proliferación celular en estudios *in vivo* que cuando se usa wollastonita pura. Su principal desventaja es su alta tasa de disolución, lo cual genera un aumento de pH en los microambientes y que tienen un efecto negativo en la proliferación celular, ya que los medios básicos afectan el crecimiento celular y la oseointegración (190).

El proceso de regeneración ósea tiene cuatro etapas. La formación de hematoma, formación de fibrocartílago, formación de callo óseo y remodelación ósea. En todo el proceso intervienen diversas citocinas, factores de crecimiento y moléculas de señalización que servirán como guía para el crecimiento celular que dará como resultado la reparación del defecto óseo (191–193). Por estas razones, cuando se fabrican dispositivos implantables para reparar tejido óseo es importante considerar la geometría de los andamios, con el fin de garantizar suficiente área superficial para el alojamiento de todos los componentes de señalización que se encargaran de guiar el crecimiento celular. Las superficies mínimas triplemente periódicas (TPMS) constituyen una alternativa efectiva ante estas consideraciones(192,194,195). Las TPMS son una superficie de área mínima que tiene un límite definido por una curva cerrada. Se caracterizan por la repetición periódica de poros interconectados (194), lo cual es distintivo en el hueso natural trabecular, por lo que este tipo de estructuras se perfilan como una alternativa en la ingeniería de tejidos dada su capacidad mimética y de osteointegración. Adicionalmente, permiten la difusión de oxígeno, el intercambio de iones y el transporte de nutrientes (196,197). El objetivo de este capítulo es describir el proceso por medio del cual se desarrollaron andamios cerámicos compuestos de wollastonita con geometría de TPMS Gyroide mediante impresión 3D con potencial aplicación en reparación y regeneración ósea.

3.2 Metodología

3.2.1 Diseño de Experimentos y formulación de la pasta cerámica

Para obtener la formulación de una pasta cerámica que pueda ser usada como tinta de impresión 3D para la fabricación de los andamios, se empleó un diseño de experimentos (DOE) factorial fraccionado en el cual cada uno de los componentes involucrados en la formulación de la pasta cerámica se definieron como los factores y como variable respuesta, la fuerza requerida para que la suspensión formulada fuera extruida a través de una jeringa mientras se aplicaba fuerza en dirección perpendicular al émbolo. Este ensayo se realizó empleando una máquina de ensayos universal (Instron 3366 Universal Testing System, USA). Se empleó una celda de carga de 500 N para simular el proceso de impresión. Los componentes empleados fueron polvo de wollastonita NYAD \square M1250 (Imerys, París), con un tamaño medio de partícula de 4 μ m y morfología acicular, PVA (Merck, Alemania) como aglutinante, Carboximetilcelulosa (CMC) (Sigma, USA) como modificador reológico y agua destilada como fracción líquida. Los niveles para cada uno de los factores se seleccionaron como se expresan en la tabla 3-1.

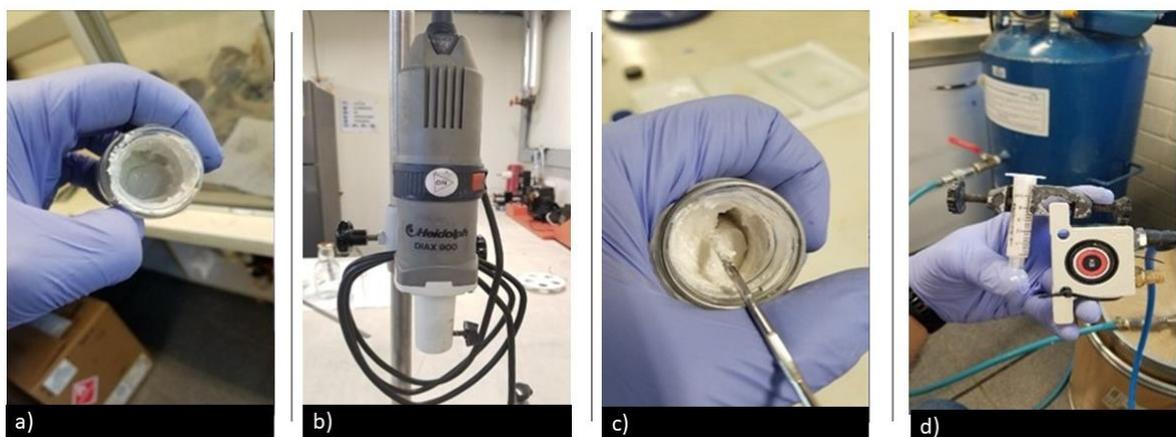
Tabla 3-1: Niveles y factores del DOE utilizado para la formulación de la pasta

Factor	Componente	Rango de Evaluación
1	Wollastonita	40 - 60 % w/v
2	PVA	3 - 6 % w/v
3	CMC	0 - 0.3 % w/w

Se preparó una solución acuosa al 5% v/v de alcohol polivinílico (PVA). Por separado, se añadió CMC al 0,01% en peso al polvo seco de wollastonita en un vaso de precipitado. Las premezclas se homogeneizaron. La solución acuosa de PVA se añadió a la mezcla de polvo. La masa del polvo fue 1.5 veces la masa de la mezcla acuosa de PVA. Las suspensiones se mezclaron manualmente con una espátula y luego se utilizó un homogeneizador axial (Heidolph DIAX 900), (figura 3-1 b), a una velocidad de 8000 rpm durante 4 minutos. Posteriormente, las suspensiones se refrigeraron a 4°C durante 24 horas. Las suspensiones se volvieron a mezclar antes de la impresión. Esto se realizó para

garantizar un flujo homogéneo y suave de la suspensión durante la impresión. El perfeccionamiento de la formulación se llevó a cabo después de establecer una fórmula inicial y hacer un análisis de fluidez reológica. En la figura 3-1 se observa el procedimiento seguido experimentalmente.

Figura 3-1: Obtención de la pasta cerámica. a) Mezcla manual con espátula. b) Agitación con el homogeneizador axial. c) Pasta cerámica homogénea d) Proceso de llenado de la jeringa para posterior impresión



Nombre de la fuente: Ana Isabel Moreno

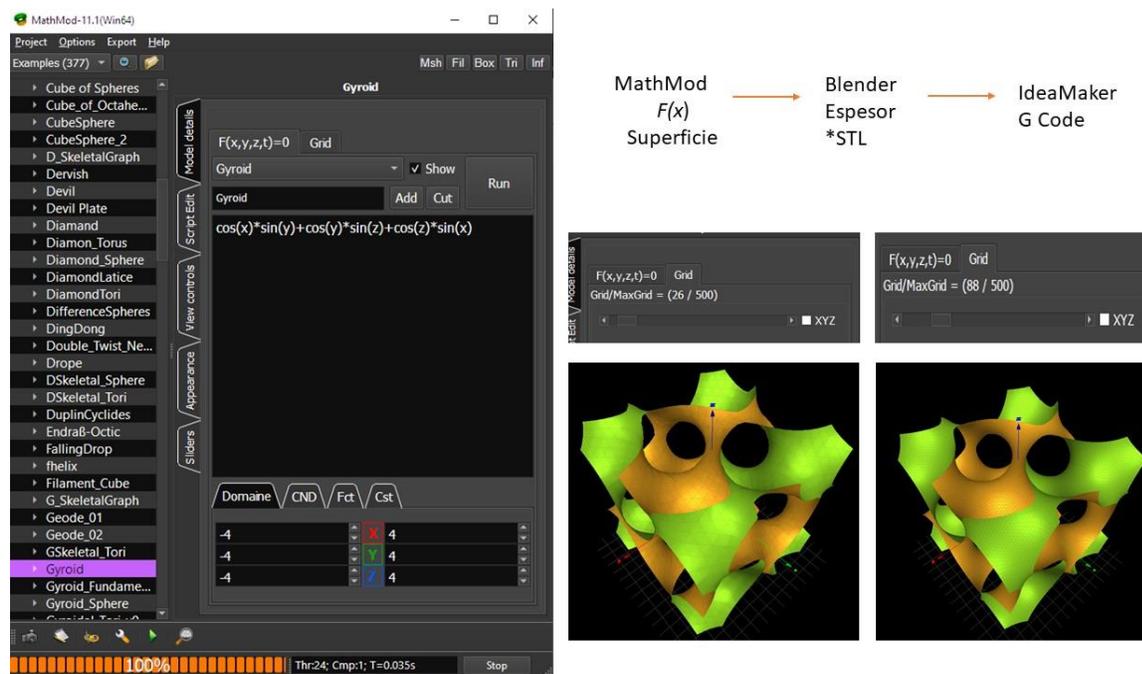
3.2.2 Comportamiento Reológico

El comportamiento reológico de las suspensiones se evaluó utilizando un reómetro de cizallamiento dinámico automático (RHEOTEST \square medingen GmbH 81-PV6202). Se empleó una configuración de placa de 36 mm de diámetro (P1) con una separación de 0.5 mm. Se evaluó una gama de velocidades de cizallamiento entre 0.01 a 100 s⁻¹ y se midieron las tensiones de cizallamiento.

3.2.3 Impresión de Andamios

Los andamios se imprimieron con una impresora 3D (Delta WASP 2040). El código G utilizado para imprimir los andamios se generó utilizando el software Cura (Ultimaker, Países Bajos)(<https://ultimaker.com/es/software/ultimaker-cura>). Se utilizó un archivo *.STL para definir el volumen de la muestra y la geometría Gyroid se precisó a partir del Software Mathmod (Abderrahman Taha, Montreal). El procedimiento se ilustra en la figura 3-2. Los parámetros utilizados para el proceso de impresión se enumeran en la Tabla 3-2.

Figura 3-2: obtención del G code a partir de la superficie obtenida mediante MathMod



Nombre de la fuente: Ana Isabel Moreno

Tabla 3-2: Parámetros de impresión

Parámetro	Valor
Altura de Capa	0.7 mm
Altura de la Capa inicial	0.4 mm
Ancho de línea	0.3 mm
Recuento de líneas por capa	0
Grosor de capa Inicio/Fin	0.0 mm
Densidad de relleno	10 %
Distancia entre línea de relleno	1.5 mm
Patrón de relleno	Gyroid
Porcentaje de Solapamiento en el relleno	5.0 %
Solapamiento de relleno	0.015 mm
Flujo	20 %
Velocidad de Impresión	3.0 mm/s
Velocidad de desplazamiento	40 mm/s

Se utilizó un cabezal de impresión hecho a la medida para sujetar una jeringa de 5 ml con una aguja de calibre 18. Se utilizó un portaobjetos de vidrio como sustrato de impresión. Los andamios se imprimieron utilizando un patrón de relleno de superficie mínima triplemente periódica (TPMS) tipo Gyroid (193).

Se imprimieron dos formas externas de andamios diferentes: a) cilíndrica ($\varnothing = 10$ mm y $h = 5$ mm), y b) cúbica ($w = 16$ mm, $l = 16$ mm y $h = 10$ mm) para la caracterización biológica y mecánica, respectivamente.

Los andamios se imprimieron y se secaron al aire durante 24 horas. Para eliminar la humedad restante, las muestras se secaron a 200°C durante una hora. Luego se trataron durante 3 horas a 500°C para eliminar cualquier residuo orgánico. A continuación, las muestras se sometieron a un tratamiento térmico a 1180°C (Sentro Tech SX1700) durante 3 horas para llevar a cabo el proceso de sinterización (199). La wollastonita presenta dos fases polimórficas dependiendo de la temperatura de síntesis. El polimorfo α -CaSiO₃ correspondiente a altas temperaturas (1125 – 1460°C) y el polimorfo β -CaSiO₃ a bajas temperaturas (800 – 1125°C). Tras el tratamiento térmico, las muestras se enfriaron de forma natural.

Los andamios fueron evaluados mediante la técnica de Microscopía de barrido electrónico (SEM) para medir el tamaño del poro y garantizar la geometría sinusoidal en las capas impresas. Además, se utilizó Caracterización por Espectroscopía Energética Dispersiva de Rayos X (EDS) para corroborar la composición elemental de los andamios sin impregnar.

3.2.4 Difracción de Rayos x

Para identificar las estructuras cristalinas se empleó el método de difracción de Rayos X de andamios que fueron impresos y pulverizados tras el proceso de secado a temperatura ambiente durante 24 h y de polvo de andamios tras ser sometidos al tratamiento térmico anteriormente descrito. Para este ensayo se utilizó un difractómetro Malvern-PANalytical Modelo Empyrean 2012, con detector de pixel 3D y fuente de Cu ($\lambda = 1.541 \text{ \AA}$) a 45 kV y 40 mA, Goniómetro : Omega / 2θ , configuración de la plataforma: Reflexión Transmisión Spinner girando a 4 rpm. El ensayo se realizó en pasos de 0.05° con un tiempo de 50 s por paso. Las especies mineralógicas se identificaron utilizando los archivos ICDD para fases cristalinas puras.

3.2.5 Porosidad e interconectividad de los andamios

Para medir la porosidad y la interconectividad de los poros en los andamios, se utilizó la norma ASTM C373-88 (201) y el método descrito por Liu et al. (202). La densidad aparente del andamio se calcula utilizando la ecuación 3.1.

$$\rho_a = \left(\frac{M_s}{M_{sat} - M_i} \right) \quad (3.1)$$

Donde M_s es el peso de los andamios secos, M_i es el peso de los andamios sumergidos y M_{sat} es el peso de los andamios saturados. Luego, se calculó la porosidad total del andamio ϕ_t mediante la ecuación 3.2 para determinar la capacidad de absorción de agua del andamio.

$$\phi_t = \left(\frac{M_{sat} - M_s}{M_s} \right) \times 100 \quad (3.2)$$

Para obtener una medida de la interconectividad entre los poros, fue necesario calcular la porosidad abierta ϕ_a utilizando la ecuación 3.3. Por último, el porcentaje de poros interconectados P_i se calculó mediante la ecuación 3.4 ρ_a corresponde a la densidad

teórica del agua, y r es la densidad real del andamio. Para obtener la densidad real ρ_r del andamio, se empleó el método del picnómetro (203). Para ello, se pulverizó un andamio y se midió el peso de un picnómetro M_1 limpio y seco. A continuación, se llenó el picnómetro con agua destilada hasta el menisco, y se obtuvo su masa M_2 . Luego, se vació el picnómetro hasta la mitad de su volumen y se midió su peso M_3 . Después, se añadió al picnómetro el andamio pulverizado y se determinó el peso M_4 . Por último, se volvió a llenar el picnómetro con agua destilada, asegurando la eliminación de las burbujas de aire y evitando su formación. El peso después del llenado se midió como M_5 . La masa del andamio se calculó como $M_4 - M_3$, y el volumen que ocupa dicha masa es el volumen del líquido desplazado.

$$\Phi_a = \left(\frac{M_{sat} - M_s}{\rho_a \times V} \right) \times 100 \quad (3.3)$$

$$P_i = \left(\frac{\rho_a}{\rho_r} \right) \times 100 \quad (3.4)$$

3.2.5 Impregnación de los andamios

Para la impregnación de los andamios, se añadieron a cada andamio 150 μL de extracto Etanólico de propóleo obtenido tal como se describió en el capítulo 2, sección 2.2.4 sobre la superficie. Los andamios mojados con el extracto de propóleo se colocaron en una cámara de presión positiva (Wiropress, BEGO, Alemania) y se agregaron gotas de 20 μL y una última de 10 μL hasta completar el volumen descrito, cada gota se dejó durante 3 minutos en la cámara hasta ser absorbida por el andamio. La absorción del extracto por parte del andamio se confirmó mediante la observación del cambio de coloración del andamio y la revisión de la humedad de una servilleta ubicada en el fondo del andamio.

3.2.6 Espectro FTIR

Los extractos de propóleos, la wollastonita sinterizada y la wollastonita impregnada de propóleos se sometieron a un análisis por infrarrojos con transformada de Fourier (FT-IR),

utilizando un espectrómetro (Spectrum 2, PerkinElmer, USA) con un accesorio de reflectancia total atenuada. Se obtuvieron al menos 3 espectros de diferentes zonas de cada muestra (cada espectro representa la media de 100 exploraciones entre 400 cm^{-1} y 4000 cm^{-1} con una resolución de 4 cm^{-1}). Posteriormente, se calcularon la corrección de la línea de base y el espectro medio mediante una rutina escrita en Matlab (Mathworks, Mass).

3.2.7 Curva de pH

En dispositivos de restauración o regeneración ósea es importante evaluar las variaciones de pH que estos pueden causar cuando se sumergen en un líquido, debido a que las células involucradas en el proceso son sensibles a cambios de pH. En este caso se evaluó la variación del pH que tuvo lugar al sumergir andamios con y sin impregnación de propóleo en 100 mL de PBS (Merck, Alemania). El pH se midió usando un pHímetro de mesa PH700 (Apera, USA). Las medidas se tomaron cada hora durante 70 horas a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ y 120 rpm.

2.4 Resultados y Discusión

• 3.3.1 Diseño de Experimentos

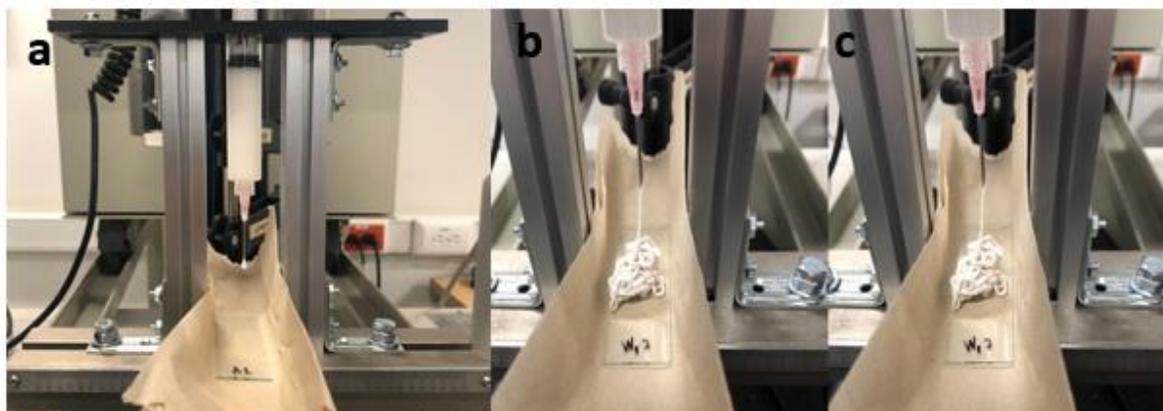
El resultado del DOE se ilustra en la tabla 3-3. Las condiciones de laboratorio empleadas para realizar la parte experimental del diseño de experimentos fueron temperatura de $22.1\text{ }^{\circ}\text{C}$, Humedad 51.9% y se realizó en horas de la mañana.

Tabla 3-3: Diseño de experimentos realizado para obtener la formulación óptima de la pasta de wollastonita

Orden	Orden Std.	Wollastonita (% w/w)	PVA (%w/w)	CMC (% w/w)
1	2	60	3	0
2	4	60	6	0.3
3	1	40	3	0.3
4	3	40	6	0

Los materiales fueron extruidos empleando un portaobjetos de vidrio como sustrato para la deposición del material. En la primera fase se realizaron 4 ensayos independientes con tres réplicas, cada uno correspondiente a las formulaciones planteadas en la tabla 3.3. Al final del proceso de extrusión, se evaluó la calidad de cada una de las formulaciones en cuanto a consistencia y capacidad de la formación capa a capa. A partir de estas observaciones se hicieron algunas variaciones en las cantidades de cada componente con el fin de comprender el comportamiento del material ante el cambio de cada uno de los factores y así poder optimizar el proceso de extrusión. En la figura 3-3 se puede apreciar el montaje para evaluar el proceso de extrusión y algunos de los resultados obtenidos con este montaje y con las primeras formulaciones obtenidas.

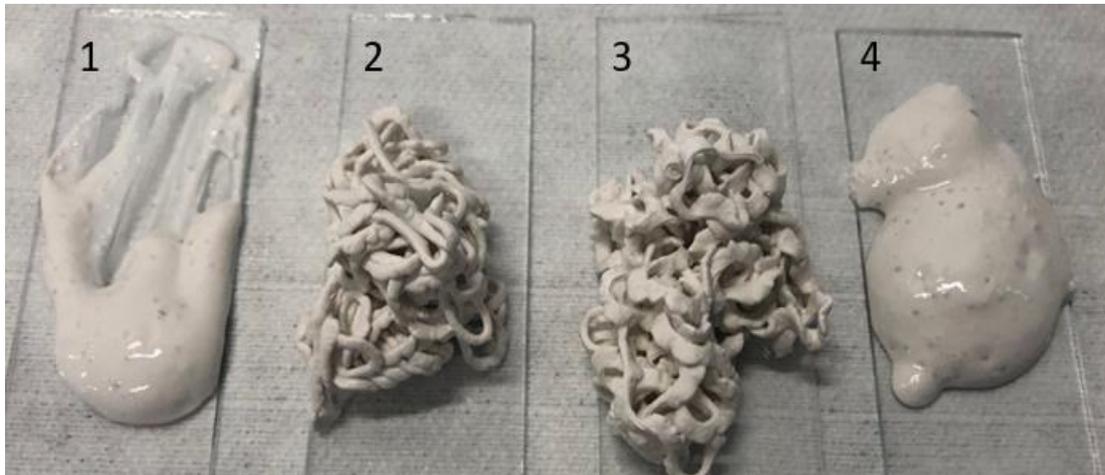
Figura 3-3: Montaje experimental del DOE. a) Montaje para evaluar la “printabilidad” de las formulaciones obtenidas según el DOE. b y c) Material siendo extruido mediante el montaje empleado para evaluar cada formulación del DOE.



Nombre de la fuente: Ana Isabel Moreno

Las formulaciones que no incluyeron CMC, mostraron no ser aptas para la formación capa a capa requerida en la manufactura aditiva. Este resultado se aprecia en la figura 3-4, en donde 1 y 4 corresponden a los resultados obtenidos con las formulaciones de orden 1 y 4 mostradas en la tabla 3-3. Se aprecia una consistencia demasiado líquida que no es deseable en la impresión 3D, dejando clara y necesaria la importancia de adicionar CMC en la formulación de la pasta.

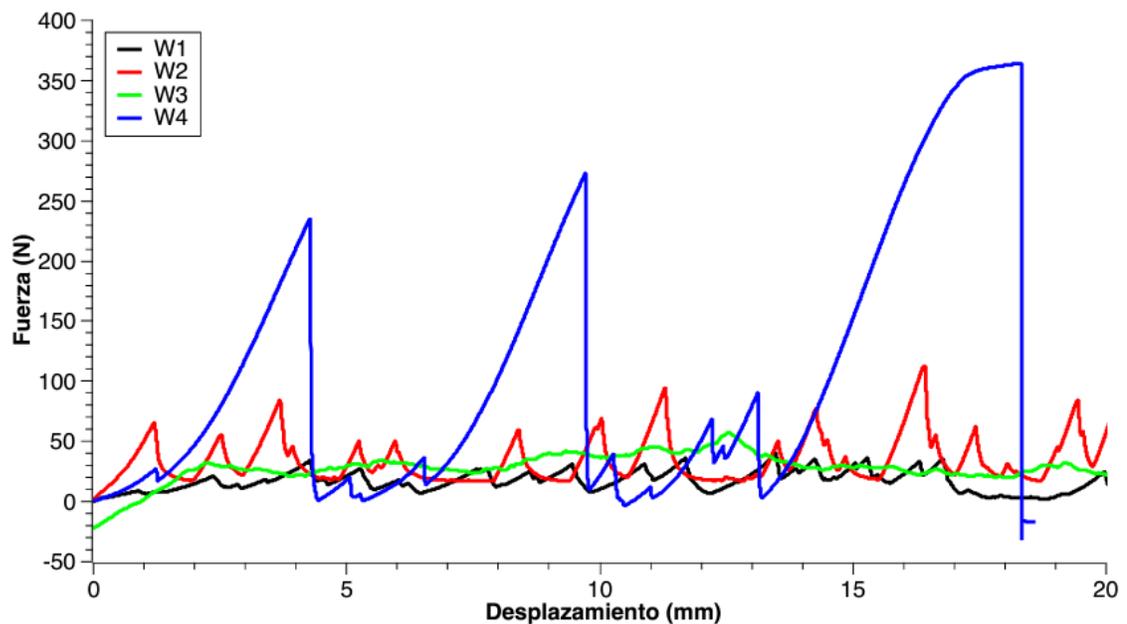
Figura 3-4: Resultados final de la extrusión de las formulaciones 1-4 del DOE.



Nombre de la fuente: Ana Isabel Moreno

Se tomaron medidas de la fuerza para extruir el material a través de una jeringa, tal y como se describió en la metodología. La formulación 4 mostró un comportamiento poco uniforme en el flujo del material, requiriendo una fuerza considerable para extruir el material. Las curvas de Fuerza vs. Desplazamiento obtenidas se muestran en la figura 3-5. Estos datos se normalizaron y tomando en cuenta las variaciones aportadas por las condiciones de desplazamiento de la pasta al interior de la jeringa fue posible obtener una formulación de pasta con las condiciones requeridas para lograr las impresiones deseadas.

Figura 3-5: Curvas de Fuerza vs Desplazamiento obtenidas como resultado de la extrusión de las formulaciones 1-4 del DOE.



Nombre de la fuente: Ana Isabel Moreno

La formulación final optimizada se caracteriza por las siguientes proporciones: Wollastonita 59.97 % w/w, PVA 2.25 % w/w, CMC 0.03% w/w y agua desionizada 37.75 % w/w. Este tipo de diseño de experimentos ha sido utilizado en otros estudios (204,205) para el diseño y formulación de pastas cerámicas gracias a que permite la combinación de parámetros, y toma cada uno de ellos de forma específica con el fin de lograr un resultado apto para la construcción de capas en el proceso de impresión 3D. En la impresión 3D de cerámicos es importante obtener pastas con reologías muy específicas para lograr el diseño capa a capa, especialmente cuando el reto consiste en desarrollar dispositivos con geometrías complejas (204–206).

3.3.2 Comportamiento Reológico

La respuesta reológica de la suspensión reveló un comportamiento no newtoniano de adelgazamiento por cizallamiento. Los datos se ajustaron utilizando el modelo de Herschel-Bulkley, que se muestra en la ecuación 3.5. En la figura 3-6 se aprecia la gráfica obtenida.

$$\tau = \tau_0 + \kappa\gamma e^n \quad (3.5)$$

Donde τ corresponde a la tensión de cizallamiento (Pa), τ_0 es la tensión de fluencia (Pa), κ el índice de consistencia (Pa * sⁿ), γ es la velocidad de cizallamiento (s⁻¹) y n es el índice de flujo (adimensional). Los valores medidos en la suspensión se presentan en la Tabla 3-4. El valor R² ajustado fue de 0.99.

Tabla 3-4: Parámetros de ajuste de Herschel-Bulkley para la suspensión de wollastonita

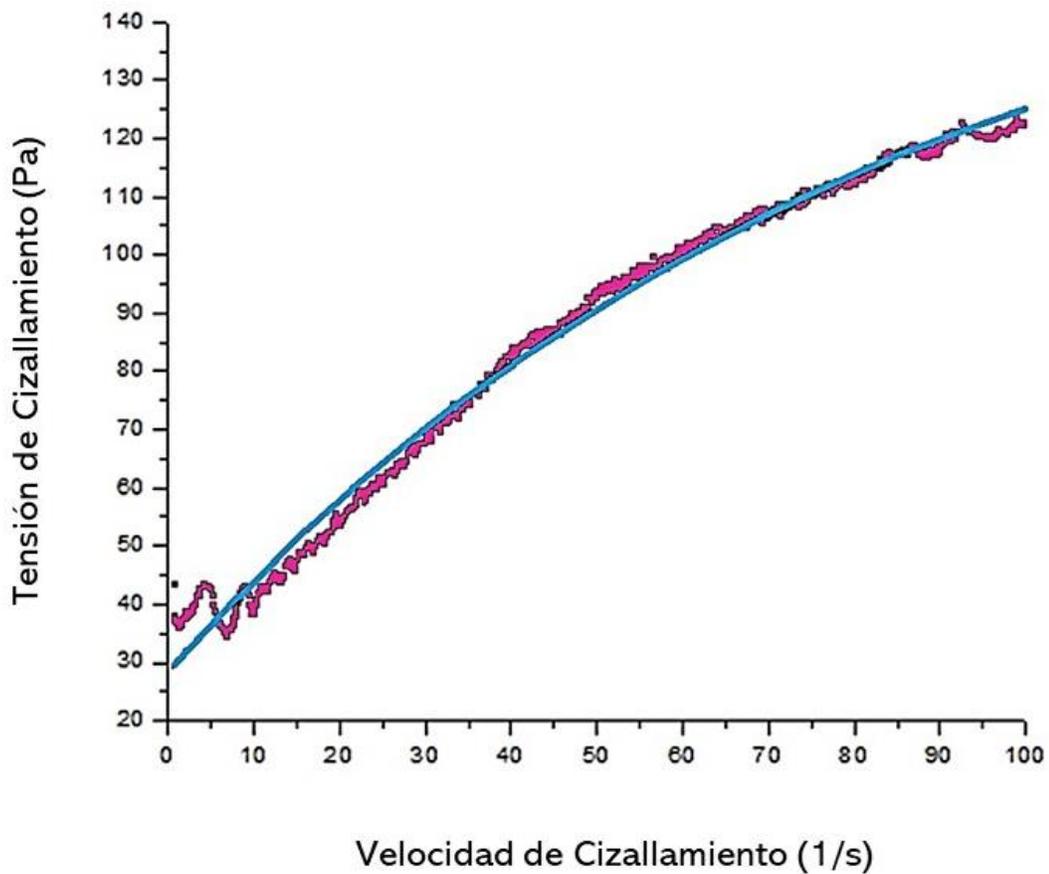
Parámetro	Valor
τ_0	167.66
κ	-139.22
n	0.01

Teniendo en cuenta las condiciones de impresión, el diámetro interior de la aguja y el caudal volumétrico de la suspensión, se calculó la velocidad de cizallamiento mediante la ecuación 3.6.

$$\gamma = \frac{4Q}{\pi R^3} \quad (3.6)$$

Donde $Q = 3.32 \times 10^{-9} \text{ m}^3/\text{s}$ es el caudal en la punta de la aguja y se calculó como el volumen de la pasta impresa dividido por el tiempo necesario para imprimir ese volumen, y $R = 4.19 \times 10^{-4} \text{ m}$ es el radio interno de la aguja. Por tanto, se calculó que la velocidad de cizallamiento (γ) de las suspensiones durante la impresión era de 57.43 s^{-1} , con una viscosidad aproximada de $0.155 \text{ Pa}\cdot\text{s}$.

Figura 3-6: Comportamiento reológico de las suspensiones de wollastonita y ajuste lineal mediante el modelo de Herschel-Bulkley.



Nombre de la fuente: Ana Isabel Moreno

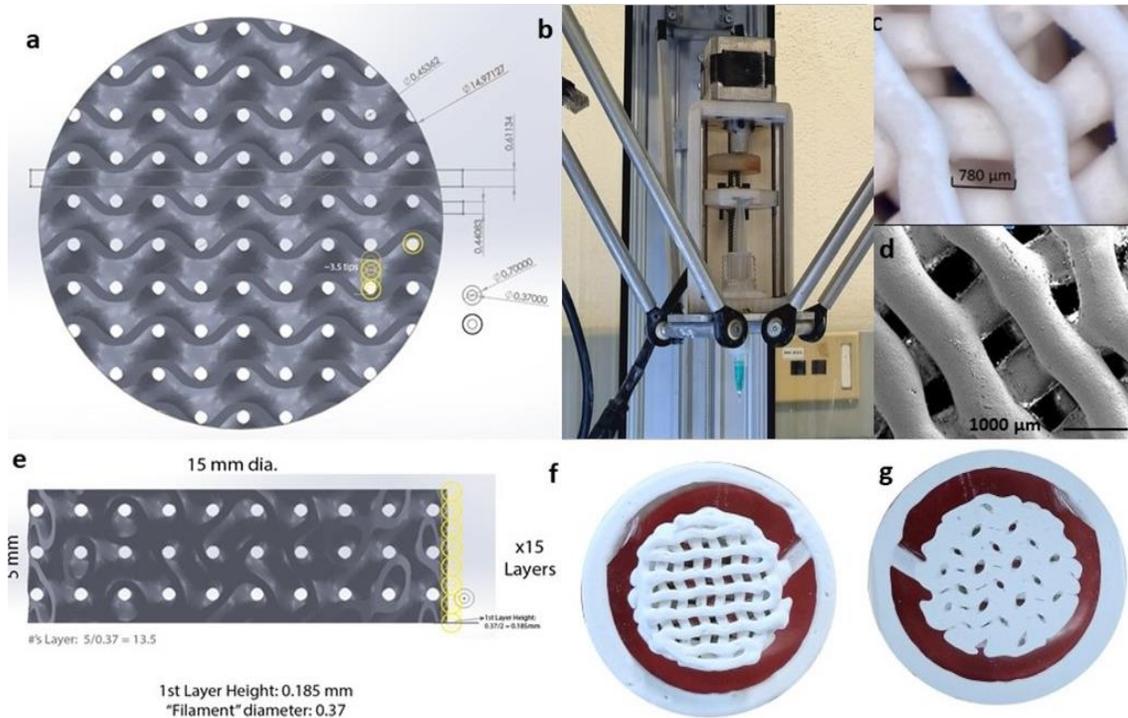
Cuando se trabaja con impresión 3D por inyección de tinta, los fluidos suelen estar sometidos a velocidades de cizallamiento superiores a 10^4 s^{-1} y tiempos de residencia del orden de $5 - 250 \mu\text{s}$ (63). Sin embargo, el valor reportado en este estudio es significativamente menor, lo que se debe a la presencia de tinta cargada de partículas, cuyo comportamiento reológico puede diferir del de la tinta libre de partículas (207). Los valores comunicados son similares a los encontrados en estudios de materiales de cemento utilizados para la impresión 3D, que también presentan una composición particulada (208). La viscosidad aparente de un fluido, que representa su resistencia al flujo, se define como el esfuerzo cortante dividido por la velocidad de cizallamiento (209). Es una de las variables más significativas en el análisis del comportamiento reológico de las tintas utilizadas en la impresión 3D. Sin embargo, en el diseño de tintas para impresión 3D, la viscosidad varía en función de la temperatura y del esfuerzo cortante aplicado

durante el proceso de impresión. En general, las tintas para impresión 3D deben presentar un comportamiento no newtoniano (28). Los flujos que siguen el modelo de Herschel-Bulkley muestran un comportamiento no newtoniano dentro de ciertos rangos de velocidad de cizallamiento. Sin embargo, fuera de estos rangos, se obtiene una respuesta de viscosidad constante, como se observa en los resultados de este estudio. Tales flujos se caracterizan por su estabilidad dentro de estos rangos, facilitando los procesos de impresión (210). La pasta de arcilla es uno de los modelos más referenciados en la impresión 3D de cerámica (211). Se caracteriza por tener viscosidades no superiores a 0.2 Pa*s, lo que permite alcanzar detalles de alta resolución en el modelado capa a capa. El valor de viscosidad obtenido con la pasta de Wollastonita formulada en este estudio es muy cercano al de la pasta de arcilla, lo que explica su capacidad para formar estructuras tridimensionales mediante impresión 3D.

3.3.3 Impresión de Andamios

La pasta cerámica formulada permitió imprimir andamios cilíndricos con geometría interna de TPMS Gyroid, de 5 mm de altura y 5 mm de radio, con un tamaño medio de poro de 780 μm . También se obtuvieron andamios cúbicos de 5 mm por cada lado, con un tamaño de poro igual a los cilíndricos, los cuales fueron utilizados para realizar valoraciones de resistencia mecánica y que serán descritos en el capítulo 5. La figura 3-7 muestra el diseño obtenido mediante el software de MathMod para la impresión de los andamios cilíndricos (a) y cúbicos (e), además se observa el montaje de la pasta en la jeringa para realizar la extrusión (b), y fotografías del tamaño de poro (c) y de las capas sinusoidales (d). En (f y g) se pueden observar fotografías de los andamios impresos y sinterizados. Cada capa impresa mide aproximadamente 500 μm .

Figura 3-7: a) Diseño CAD para los andamios cilíndricos, b) Montaje en jeringa para la extrusión e impresión de los andamios, c) Microfotografía de la medida de los poros en los andamios, d) Microfotografía de las capas sinusoidales en el andamio, e) Diseño CAD de los andamios cúbicos, f) Vista frontal de un andamio impreso y g) Vista de la capa posterior de un andamio impreso

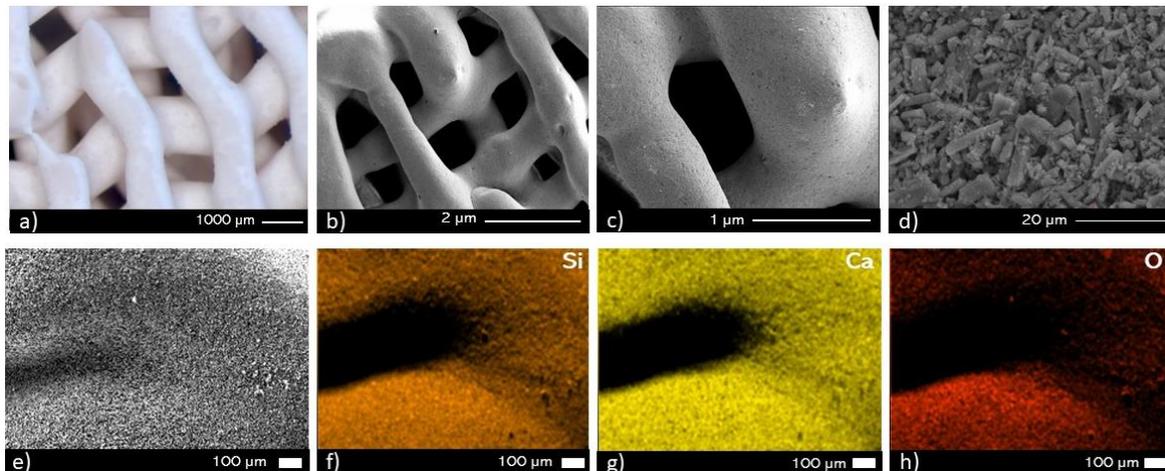


Nombre de la fuente: Ana Isabel Moreno

Las fotomicrografías SEM de los andamios de wollastonita sinterizados exhibieron la forma prismática característica de los cristales de wollastonita y el análisis elemental con el EDS reveló la presencia de los componentes químicos característicos de la wollastonita. (Si, Ca y O). (figura 3-8).

Figura 3-8: a) Imágenes de Microscopía Electrónica de Barrido (SEM) de los andamios obtenidos mediante impresión 3D. a-b) Muestra la curvatura en las capas impresas, así como la c) estructura tridimensional de las paredes de los macroporos, y finalmente, d-e) la estructura prismática de los cristales característicos de wollastonita. f-h) Caracterización

por Espectroscopía Energética Dispersiva de Rayos X (EDS) elemental del andamio obtenido mediante impresión 3D, mostrando la presencia de Si, Ca, y O

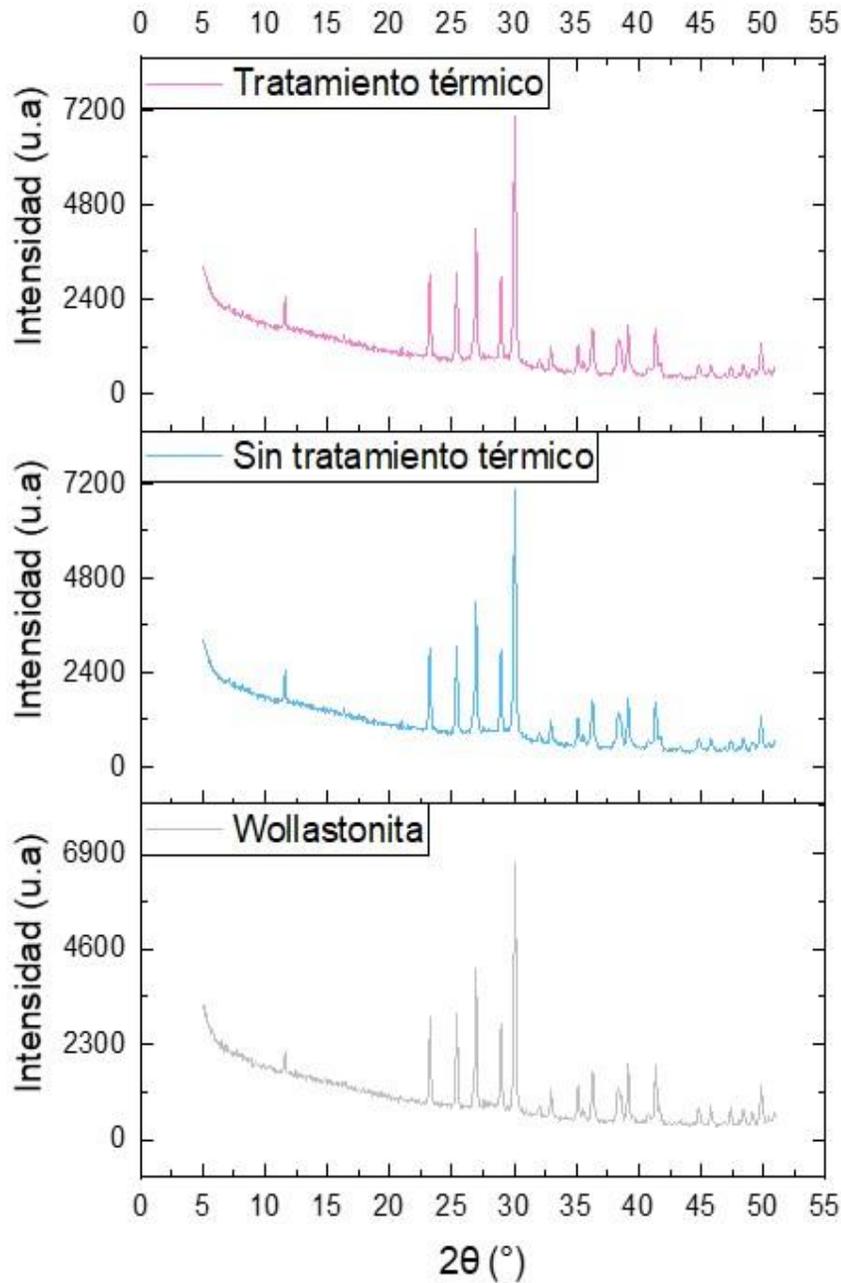


Nombre de la fuente: Ana Isabel Moreno

1.3.4 Difracción de Rayos X e impregnación de andamios

En la figura 3.9 se exponen los difractogramas de Rayos X del patrón de la Wollastonita (JCPDS 01-074-0874) mostrado en el cuadro inferior de la imagen, así como los resultados obtenidos para una muestra de la wollastonita empleada en la formulación de la pasta sin someterse a tratamiento térmico y en el cuadro superior se observa el patrón de intensidad obtenido por la muestra de wollastonita después de someterse al tratamiento térmico descrito. Los patrones de intensidad obtenidos por la muestra sin tratamiento y después del tratamiento térmico corresponden a la fase cristalina de la wollastonita, evidenciando que el tratamiento térmico no genera cambios en dichas fases.

Figura 3-9: Difractograma Wollastonita y muestras de wollastonita sin tratamiento térmico y wollastonita con tratamiento térmico a 1180 °C

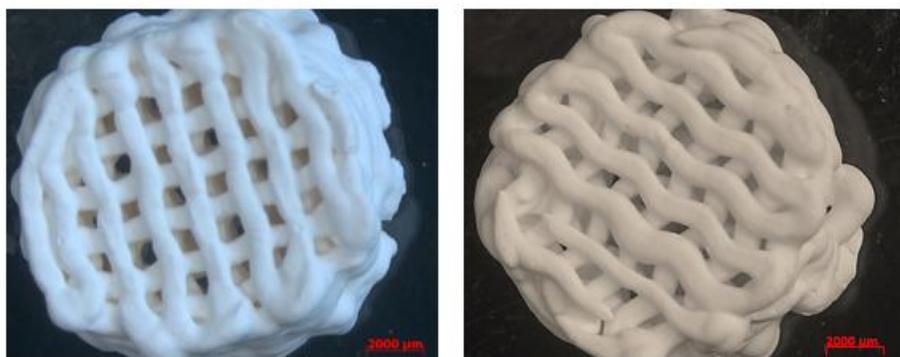


La sinterización de la wollastonita suele ser un tratamiento crucial cuando se trabaja con materiales cerámicos, debido a que generalmente es allí donde se obtienen las fases cristalinas, en la wollastonita se emplean rangos entre 1300 y 1500 °C para lograr la fusión de núcleos mediante una reorganización estructural, eliminando las porosidades y generando un material mucho más denso (212). En este trabajo se pretendía mantener las

propiedades porosas del material, para facilitar los procesos metabólicos celulares, por esto no se emplearon temperaturas tan elevadas, sino que se buscó conferir mayor resistencia a los andamios con el tratamiento térmico sin perder las propiedades porosas del material.

Después del proceso de impregnación de los andamios con los extractos de propóleos, los andamios conservaron su forma geométrica sin variaciones perceptibles. La impregnación de los andamios causó un cambio en su coloración la cual se puede apreciar en la figura 3-10.

Figura 3-10: Fotografías de los andamios sinterizados sin impregnar (Izquierda) e impregnados con el EEP (Derecha).



Nombre de la fuente: Ana Isabel Moreno

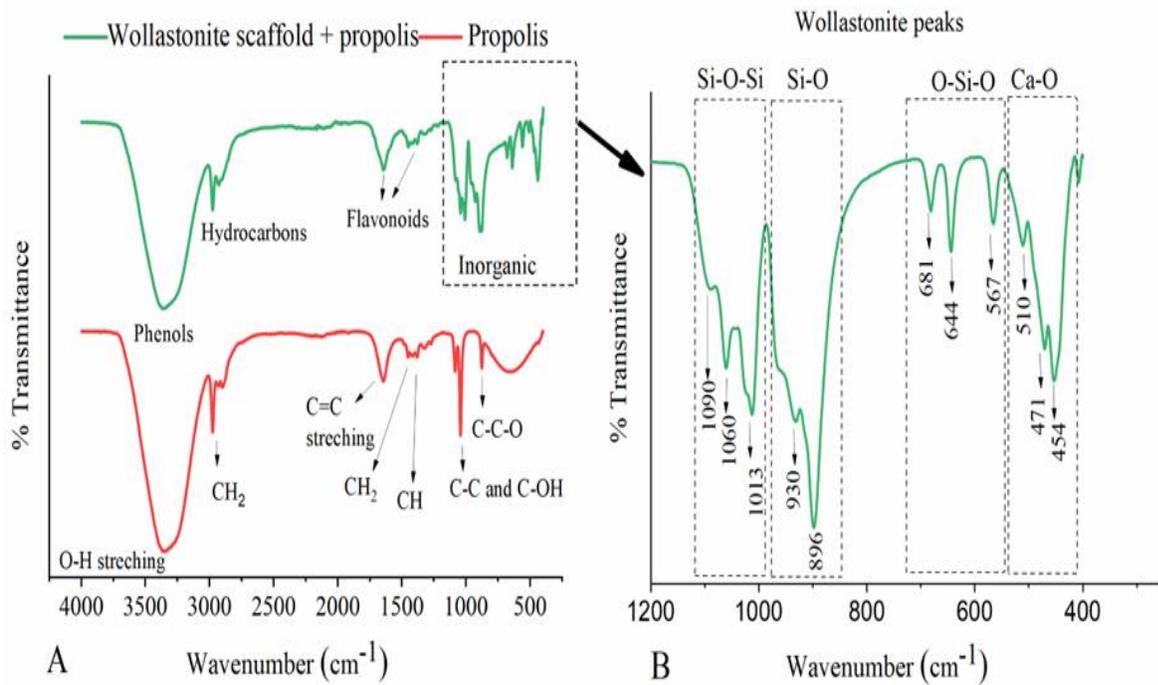
• 3.3.4 Porosidad e interconectividad de los andamios.

Los andamios mostraron una porosidad total de 49.5 ± 4.0 %, una porosidad abierta de 58.7 ± 4.0 %, y un porcentaje de interconectividad de poros de 84.2 ± 1.0 %. Cuando se diseñan andamios para reparación de tejido óseo se espera obtener estructuras porosas para favorecer los procesos de proliferación celular (213). Los porcentajes de porosidad presentes en el tejido óseo natural varían en función del tipo de hueso (214). En el caso del hueso trabecular, se ha descrito una porosidad total entre el 30% y el 90%. Concretamente, para el hueso trabecular mandibular, la porosidad total oscila entre el 70% y el 90%, mientras que en el hueso cortical se encuentra entre el 5% y el 30% (213,214). Los andamios diseñados en este estudio tienen potencial aplicación en la reparación de

tejido óseo trabecular. Los tamaños de poro superiores a 300 μm permiten la adhesión, migración y proliferación de osteoblastos a través de la vía de activación de mecanorreceptores, lo que constituye un paso crucial en el desarrollo de dispositivos de inserción ósea, esto a su vez permite la reparación de defectos óseos de gran tamaño (215,216).

• 3.3.5 Espectro FTIR

La figura 3-11 muestra los espectros FTIR correspondientes al propóleo y a los andamios de wollastonita impregnados con propóleo. Los modos vibracionales característicos del propóleo se observan en la región de 3200 cm^{-1} a 3600 cm^{-1} . Es posible observar un pico amplio asociado al modo vibracional de estiramiento O-H, que podría estar relacionado a grupos fenólicos. En la región de 1340 cm^{-1} a 1360 cm^{-1} se encuentran señales relacionadas con flexiones simétricas del CH_3 lo que implica la presencia de compuestos orgánicos en las muestras analizadas. Adicionalmente la señal encontrada en la región próxima a 1600 cm^{-1} se encontró un pico que puede relacionarse con el estiramiento C=C, el cuál puede estar relacionado a la presencia de compuestos con anillo aromático, los cuales podrían ser compuestos fenólicos o flavonoides. Los alcoholes primarios y secundarios pueden identificarse como bandas características asociadas a grupos C-C, C-OH y C-C-C en la región de 800 cm^{-1} a 1100 cm^{-1} (217,218). Los picos correspondientes a la wollastonita pueden identificarse en la región de 400 cm^{-1} a 1200 cm^{-1} . En la región de 1010 cm^{-1} a 1100 cm^{-1} , se encuentran los modos vibracionales correspondientes al estiramiento antisimétrico Si-O-Si y al estiramiento simétrico y antisimétrico O-Si-O. Además, los picos situados a 896 cm^{-1} y 930 cm^{-1} pueden asociarse con el enlace silicio-oxígeno no puente de Si-O, mientras que los picos de absorción situados entre 450 cm^{-1} y 450 cm^{-1} se asocian con los modos vibracionales de Ca-O (219,220). La Tabla 3-5 resume la información de los principales picos identificados en los espectros FTIR. Estos resultados muestran que la impregnación de los andamios mediante la metodología descrita anteriormente fue efectiva. **Figura 3-10:** Análisis FTIR. A) Espectro FTIR de los propóleos y de la Wollastonita impregnada con propóleo. B) Ampliación de los espectros entre 400 cm^{-1} y 1200 cm^{-1} .



Nombre de la fuente: Artículo propio sometido a Heliyon. Ana Isabel Moreno Florez, Sarita Malagón, Sebastián Ocampo, Sara Leal-Marín, Jesús Humberto Gil González. Alex Lopera, Carlos Paucar, Alex Ossa, Birgit Glasmacher, Alejandro Peláez-Vargas, Claudia García. *In vitro* evaluation of the osteogenic and antimicrobial potential of porous Wollastonite scaffold impregnated with ethanolic extracts of propolis.

Tabla 3-5: Principales picos identificados en el espectro FTIR obtenidos en los andamios.

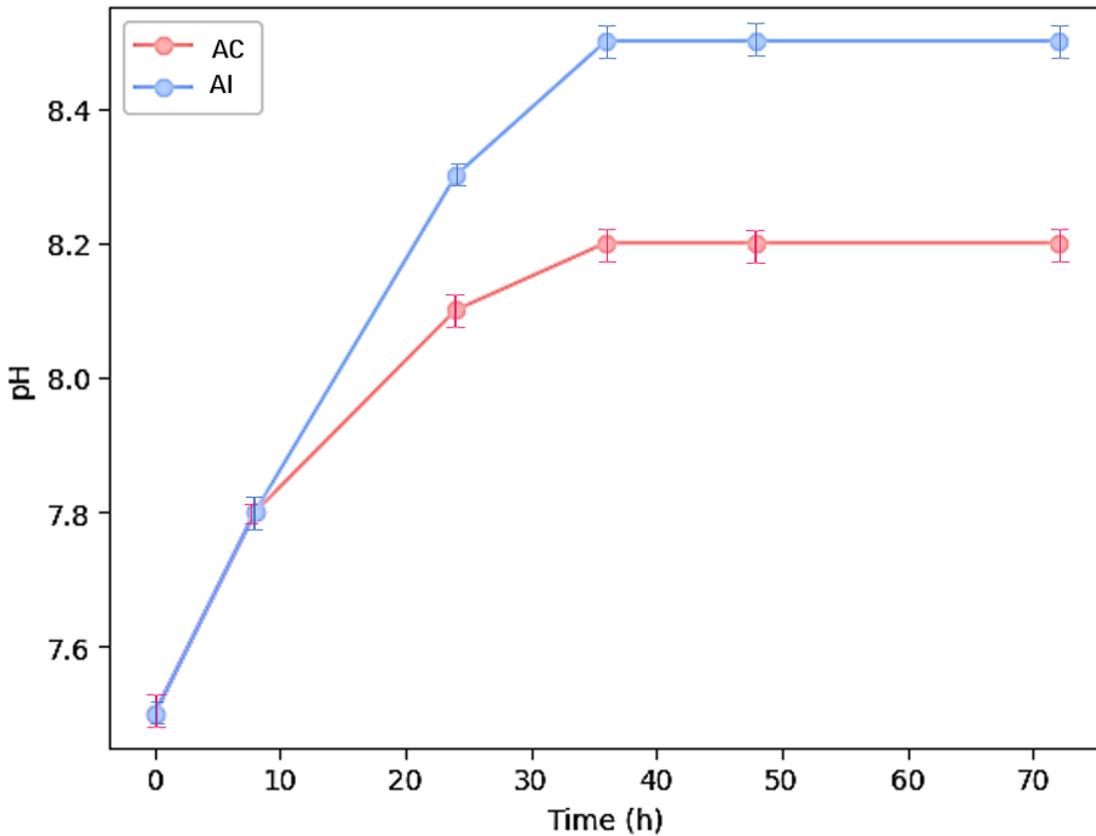
Frecuencia (cm^{-1})	Enlace Químico	Asignación
3335	O-H	Enlace OH

2973	C-H	Grupos Saturados C-H
2845	C-H	Hidrocarburos
1625	C=C	Aminoácidos, Flavonoides, Lípidos
1647	C=O	Lípidos, alcoholes Terciarios
1513	H-O-H	Agua
1453	Flexión simetría en el plano CH ₂ y Flexión asimétrica CH ₃	Flavonoides y anillos aromáticos
1380	CH	Grupos CH o Flavonoides
1269	OH C-CO	Hidrocarburos
1080	C-C, C-OH	Flavonoides y alcoholes secundarios
1043	=C-O-C, C-C, C-OH	Alcoholes primarios
1070-902	O-Si-O	Sílice
881	C-C-O-	Alcoholes primarios y secundarios
567-453	SiO	Grupo silicato
453	CaO	Grupo CaO

• 3.3.6 Curva de pH

En la figura 3-12 se exponen las curvas correspondientes a la variación del pH en el tiempo para los andamios impregnados (AI) y sin impregnar o andamios control (AC) con propóleo. Al iniciar el ensayo, el pH del agua destilada en el que se sumergieron las muestras corresponde a 7.5. Dicho valor no cambió, independientemente del tipo de muestra sumergida durante las primeras 8 horas. Sin embargo, transcurridas 12 horas se observa un aumento del pH en la solución correspondiente a los andamios impregnados con propóleo (AI) hasta alcanzar un valor de 8.5 después de 30 h, luego de lo cual se mantuvo estable. Las soluciones correspondientes a los andamios sin impregnar (AC) alcanzaron un pH máximo de 8.2. Esto indica que los EEP causan ambientes más alcalinos lo cual podría tener un efecto nocivo frente a especies bacterianas acidófilas.

Figura 3-11: Curva de pH de los andamios impregnados (AI) y sin impregnar (AC) durante 70 horas.



Nombre de la fuente: Ana Isabel Moreno

3.4 Conclusiones

El diseño de experimentos fraccional factorial es una herramienta útil y funcional en la formulación de pastas cerámicas. Dicha herramienta permitió formular en este trabajo una pasta cerámica con propiedades reológicas aptas para la impresión 3D. El uso del diseño asistido por computador (CAD) cobró relevancia en este trabajo y lo perfila como un

elemento fundamental en el campo de la ingeniería de tejidos, particularmente en la fabricación de dispositivos implantables con geometrías complejas como las TPMS que favorecen y facilitan la proliferación celular gracias a su porosidad e interconectividad. En el presente trabajo se obtuvieron andamios porosos con geometría de TPMS Gyroid, se encontró que las fases cristalinas de los andamios después del tratamiento térmico corresponden a la wollastonita, por lo que este tratamiento no genera cambios en la estructura cristalina del material y gracias al método de impregnación fue posible modificar estos andamios con extractos etanólicos de propóleos los cuales cuentan con actividad antioxidante y antimicrobiana tal como se demostró en el capítulo anterior

4. Actividad antimicrobiana de andamios porosos impregnados con Extractos Etanólicos de Propóleos

Abstract

The implantation of devices is one of the most studied therapies in bone tissue repair, as it allows for the customization of treatments by generating options that meet the specific requirements of patients. However, such practices require surgery for implantation, which is associated with the risk of contracting infections that can lead to serious consequences, ranging from surgical reintervention to irreversible tissue loss. Infections have been linked to the proliferation of bacterial species, especially *Staphylococcus aureus*. To mitigate such situations, natural products have been used to inhibit this bacterial species, known for easily developing antibiotic resistance. Propolis is a natural alternative that has proven effective in controlling pathogens like *S. aureus*. This chapter presents the results of the evaluation of the antimicrobial activity of porous ceramic scaffolds with potential applications in bone repair, impregnated with ethanolic extracts of propolis against strains of *S. aureus* and *S. epidermidis*, as well as their co-culture. Methodologies, including the measurement of inhibition zones and the quantification of the viability of biofilms formed by mono-species and co-culture strains on porous scaffolds, were employed. The obtained results showed inhibition zones of 13.4 ± 0.1 mm and 11.0 ± 0.61 mm, against *S. aureus* and *S. epidermidis* respectively in the propolis-impregnated scaffolds, while no inhibition halos were observed in the control scaffolds. A significant reduction in the viability of the biofilms formed by the

monospecies and co-culture cultures on the propolis-impregnated scaffolds was also observed when compared to the control scaffolds. These results lead to the conclusion that the impregnation of ethanolic propolis extracts in porous scaffolds constitutes a promising alternative to reduce the incidence of implant failure caused by the development of osteomyelitis.

Resumen

La implantación de dispositivos es una de las terapias más estudiadas en la reparación de tejido óseo y esto es porque permite personalizar los tratamientos generando opciones que se ajustan a los requerimientos específicos de los pacientes. Sin embargo, este tipo de prácticas requieren cirugía para su implantación, lo cual tiene asociada la probabilidad de contraer infecciones que pueden desencadenar consecuencias graves que incluyen desde la reintervención quirúrgica hasta la pérdida de tejido de forma irreversible. Las infecciones han sido relacionadas con la proliferación de especies bacterianas, en especial de *Staphylococcus aureus*. Para mitigar este tipo de situaciones se ha recurrido al uso de productos naturales para inhibir esta especie bacteriana, que se caracteriza por generar resistencia antibiótica con facilidad. Los propóleos son una alternativa natural que ha mostrado ser efectiva en el control de patógenos como *S. aureus*. En este capítulo se registran los resultados de la evaluación de la actividad antimicrobiana de andamios cerámicos porosos con potencial aplicación en reparación ósea, impregnados con extractos etanólicos de propóleos frente a cepas de *S. aureus* y *S. epidermidis* y su co-cultivo. Para ello se emplearon metodologías que incluyen la medida de las zonas de inhibición, así como la cuantificación de la viabilidad de las biopelículas formadas por las cepas mono especie y por su co-cultivo sobre los andamios porosos. Los resultados obtenidos mostraron zonas de inhibición de 13.4 ± 0.1 mm y 11.0 ± 0.61 mm, frente a *S. aureus* y *S. epidermidis* respectivamente en los andamios impregnados con propóleos, mientras que en los andamios control no se vio formación de halos de inhibición, también se observó una reducción significativa de la viabilidad de las biopelículas formadas por los cultivos en monoespecie y en co-cultivo sobre los andamios impregnados con propóleos al ser comparados con los andamios control. Con estos resultados se llegó a la conclusión

de que la impregnación de extractos etanólicos de propóleos en los andamios porosos constituye una alternativa prometedora para lograr una reducción en la incidencia del fallo de implantes causada por el desarrollo de osteomielitis.

4.1 Introducción

Después de una lesión aguda, viene un proceso de reparación o regeneración de tejidos. La regeneración implica la restauración total del tejido afectado, y es un proceso complejo cuyo éxito depende de una gran cantidad de factores incluyendo el tamaño y la complejidad del daño, así como de la misma capacidad del tejido para regenerarse (221). Para la reparación de lesiones óseas se emplean técnicas que incluyen la inserción de injertos que pueden tener su origen en el mismo paciente, así como de pacientes donadores (222). Sin embargo, dadas las complicaciones y limitaciones que existen alrededor de estas terapias, se ha recurrido a la fabricación de dispositivos implantables que cumplan las mismas funciones, evitando el rechazo de los pacientes y disminuyendo los procesos de senescencia que pueden ocurrir en las zonas de tejido donante cuando se recurre a los aloinjertos (119,223,224).

Los dispositivos implantables han mostrado ser efectivos en los procesos de reparación y regeneración ósea. Sin embargo, requieren cirugías para su implantación, lo cual conlleva riesgos asociados a la contracción de infecciones que pueden entorpecer la cicatrización necesaria para la reparación de las lesiones óseas. Dentro de las infecciones más importantes en este tipo de procedimientos, se encuentra la osteomielitis (225). Se define como la inflamación ósea causada por la proliferación bacteriana. Existen varias formas de clasificarla, una de ellas es en osteomielitis endógena o hematógena, frecuente en la tibia y el fémur de los niños generada por la proliferación bacteriana oportunista. Ocurre con muy poca frecuencia en adultos y cuando se presenta, generalmente sucede en las costillas (226,227). La osteomielitis exógena o contigua generalmente es causada por más de un microorganismo y ocurre cuando hay traumatismos, cirugías o infecciones en tejidos blandos adyacentes, por tanto, es más común en pacientes adultos e incluso en pacientes diabéticos (228).

El *Staphylococcus aureus* suele ser la bacteria más común en los aislados de diferentes tipos de osteomielitis, incluyendo la osteomielitis endógena, posquirúrgica y la relacionada

con las infecciones en implantes (108). La osteomielitis suele iniciar con una etapa aguda que incluye procesos inflamatorios persistentes, pero en muchas ocasiones suele evolucionar rápidamente hasta convertirse en una enfermedad crónica. Luego de que alcance la etapa de enfermedad crónica, se vuelve más difícil tratarla y se requiere una combinación de antibióticos, desbridamiento óseo y cirugía reconstructiva que generalmente da como resultado deformaciones óseas, pérdida de tejido y discapacidad persistente e incluso amputación de extremidades (36,225). Por estas razones, evitar que se presente esta enfermedad, es un reto apremiante ya que además de ser un problema clínico grave y costoso, puede comprometer la calidad de vida de los pacientes. Para iniciar el proceso infeccioso *S. aureus* suele expresar varias adhesinas que le permiten la primera interacción efectiva con las superficies para luego proceder con la proliferación (219,229). Al ser un colonizador primario en la formación de biopelículas y ser una bacteria conocida por su facilidad para generar resistencia antibiótica, resulta de gran interés desarrollar estrategias que logren inhibirlo (230).

Una estrategia que ha tomado fuerza en los últimos años es la utilización de productos naturales. Estos pueden ser obtenidos de diferentes fuentes que incluyen plantas, animales y algas. Entre muchos compuestos derivados de las plantas, los polifenoles han sido los que mayores variaciones composicionales y químicas han mostrado, lo cual se refleja algunas veces en una efectividad favorable frente a microorganismos patógenos (124). Además de los polifenoles, existen otros compuestos que también se han relacionado con la actividad antimicrobiana de los productos naturales, entre los que se encuentran los flavonoides, los terpenos, entre otros (231). Uno de los productos naturales que se potencia como una alternativa prometedora para el control bacteriano son los propóleos.

Los propóleos son compuestos resinosos fabricados por las abejas de los exudados de las plantas circundantes a las colmenas. Su función es mantener las crías dentro de la colmena aisladas de las plagas y de las condiciones climáticas desfavorables. Estos compuestos han mostrado tener efectividad en la inhibición del crecimiento de bacterias *gram* positivas en mayor medida, aunque también se ha reportado actividad frente a algunas especies *gram* negativas, así como en cepas de bacterias multirresistentes, especialmente de *S. aureus* resistente a la metilcilina (MRSA) (232,233). En el presente

capítulo se recopilan los resultados de la evaluación de la actividad antimicrobiana frente a cepas de *S. aureus* y *S. epidermidis*, y su co-cultivo. de andamios cerámicos porosos cargados con propóleos procedentes del departamento de Arauca (Colombia) con potencial aplicación en reparación ósea.

2.5 Metodología

Para el desarrollo de este trabajo se emplearon andamios cerámicos porosos de wollastonita fabricados mediante impresión 3D tal y como se describió en el capítulo 3. Se utilizaron dos grupos de andamios, el grupo (AI) en el cual los andamios se impregnaron con los extractos etanólicos de propóleos (EEP) obtenidos en el capítulo 1, mediante la técnica descrita en el capítulo 3, sección 3.2.5. El segundo grupo, que fue empleado como grupo control (AC) correspondiente a los andamios sin impregnación.

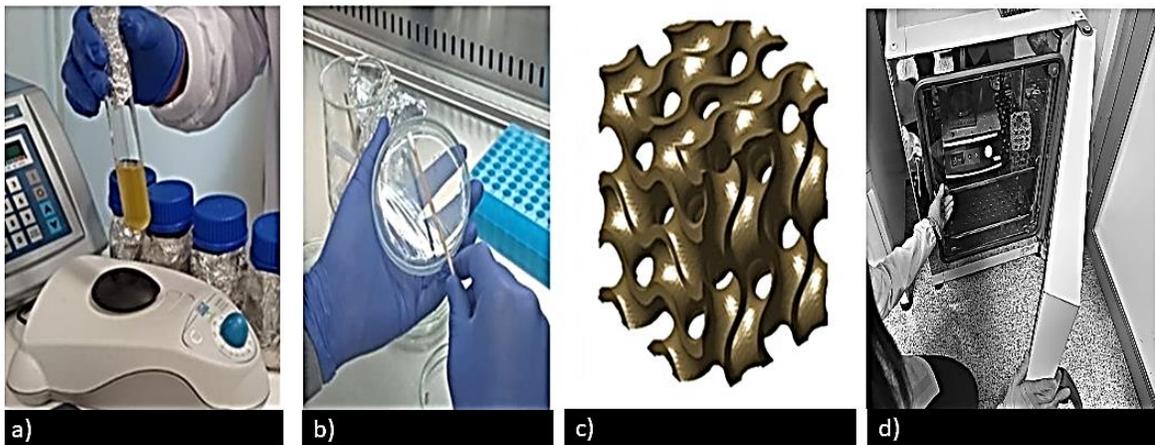
La actividad antibacteriana se evaluó frente a las cepas estándar *Staphylococcus aureus* (ATCC 25175) y *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 12228) siguiendo el procedimiento descrito por el Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Las cepas se inocularon previamente en placas de Petri que contenían agar Mueller Hinton (Merck, Alemania) y se incubaron a 37°C durante 24 horas. Para obtener los inóculos bacterianos, las cepas se cultivaron hasta la fase exponencial en medio Brain Heart Infusion (Merck, Alemania) a 37°C durante 24 horas y se ajustaron diluyendo cultivos frescos hasta alcanzar una turbidez equivalente a 90 NTU (aproximadamente 1.5×10^8 UFC/mL).

4.2.1 Zonas de Inhibición

Para obtener las medidas de la zona de inhibición se vertieron 20 mL de medio Agar Mueller-Hinton en placas de Petri. Cada placa de Petri se inoculó con el inóculo bacteriano (aproximadamente 1.5×10^8 UFC/mL) homogeneizado a 80 rpm durante 1 min en un vortex (VELP, Netherlands), tal como se muestra en la figura 4.1 a. A continuación, se colocaron los andamios impregnados con extractos de propóleo (AI) y sin extractos de propóleo (AC). Se utilizaron clorhexidina y PBS (Merck, Alemania) como controles positivo y negativo,

respectivamente. Tras 24 horas de incubación a 37°C y 5% CO₂ en una incubadora (Thermo Scientific, USA) tal como se muestra en la figura 4.1d, se midió la zona de inhibición en mm utilizando el software Image J. Cada experimento se realizó por triplicado.

Figura 4-1: Procedimiento para medir las zonas de inhibición de los andamios. a) Obtención del inóculo. b) Siembra en placa del inóculo. c) Andamio sembrado en la placa. d) Incubación de las placas.



Nombre de la fuente: Ana Isabel Moreno

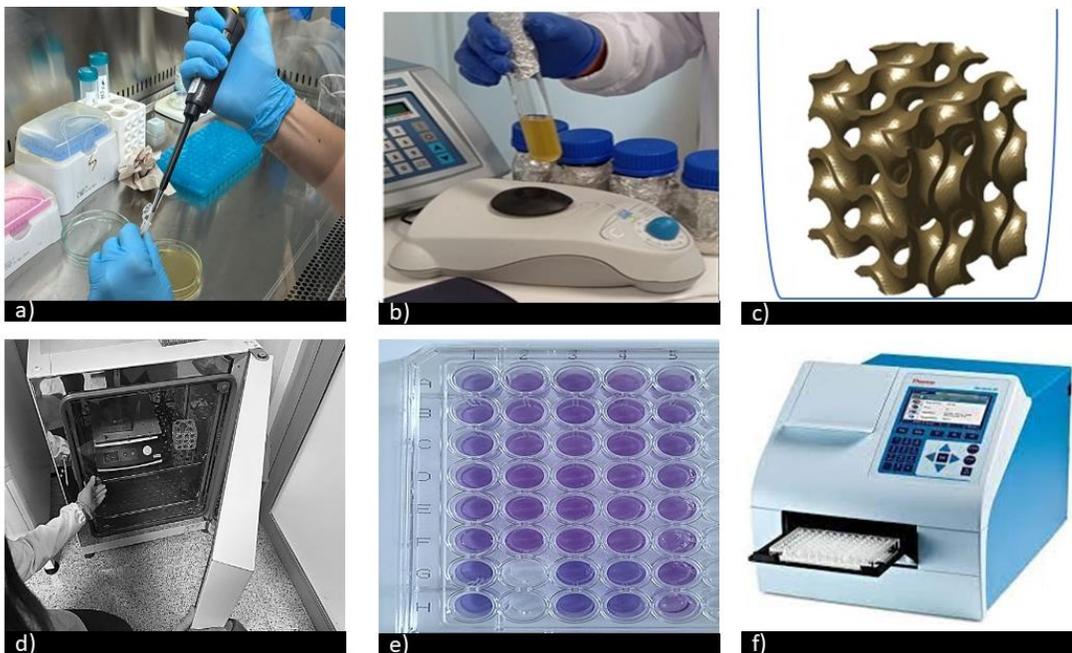
4.2.2 Viabilidad de Biopelículas monoespecie

Para las pruebas de inhibición de la formación de biopelículas se prepararon inóculos de 90 NTU (aproximadamente 1.5×10^8 UFC/mL) como se muestra en la figura 4.2 y se realizaron dos diluciones seriadas en una proporción de 1:10 para obtener una concentración de 1.5×10^6 UFC/mL para cada cepa (*S. aureus* y *S. epidermidis*). Los andamios fueron esterilizados mediante la exposición a luz UVC durante 30 min por cada una de sus caras. Aquí se utilizaron andamios impregnados con extractos de propóleos (AI) y andamios sin impregnar (AC). Cada grupo se inoculó con 1 mL del inóculo de la cepa respectiva siguiendo el proceso registrado en las fotografías de la figura 4.2. Los andamios se incubaron durante 24 y 48 horas a 37°C y 5% de CO₂. Tras el periodo de incubación, se realizaron tres lavados con PBS (Merck, Alemania) para eliminar las bacterias no adheridas y luego se añadieron 900 µL de bromuro de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazolio (MTT, Merck, Alemania) y 100 µL de medio BHI. Los andamios se incubaron

durante 2 horas a 37°C y 5% de CO₂. A continuación, se retiró la solución de MTT y se añadieron 500 µL dimetilsulfóxido (DMSO, Sigma, USA.). Se observaron cambios de coloración como los mostrados en la placa de la figura 4.2e. Se midió la absorbancia a 550 nm en un espectrofotómetro (Multiscan Go, Zeiss, Alemania).

Al finalizar los tiempos de incubación, los andamios se trataron con glutaraldehído 3% (Farpag, Colombia) para fijar las bacterias. Luego se sometieron a un proceso de deshidratación con soluciones de Etanol desde el 50% hasta 99% en pasos de 10 . Los andamios fueron metalizados con una capa de 30 nm de Au-Pd empleando un metalizador (Quorum, USA) para luego ser observados mediante microscopía electrónica de barrido (SEM, ZEISS EVO 10, Alemania).

Figura 4-2: Procedimiento para medir la viabilidad de las biopelículas formadas en los andamios. a) Cepas bacterianas. b) Obtención del inóculo. c) Andamio sembrado en placa. d) Período de incubación. e) Lectura de las coloraciones formadas al agregar reactivo de MTT. F) Equipo para medir absorbancias de MTT



Nombre de la fuente: Ana Isabel Moreno

4.2.3 Viabilidad de biopelículas multiespecie

Para las pruebas de inhibición de la formación de biopelículas se prepararon inóculos de 90 NTU (aproximadamente 1.5×10^8 UFC/mL) y se realizaron dos diluciones seriadas en una proporción de 1:10 para obtener una concentración de 1.5×10^6 UFC/mL para cada

cepa (*S. aureus* y *S. epidermidis*). Luego se mezclaron en fracciones iguales para obtener un inóculo multiespecie. Los andamios fueron esterilizados mediante la exposición a luz UVC durante 30 min por cada una de sus caras. Aquí se utilizaron andamios impregnados con extractos de propóleos (AI) y andamios sin impregnar (AC). Cada grupo se inoculó con 1 mL del inóculo. Los andamios se incubaron durante 24 y 48 horas a 37°C y 5% de CO₂. Tras el periodo de incubación, se realizaron tres lavados con PBS (Merck, Alemania) para eliminar las bacterias no adheridas y luego se añadieron 900 µL de bromuro de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazolio (MTT, Merck, Alemania) y 100 µL de medio BHI. Los andamios se incubaron durante 2 horas a 37°C y 5 % de CO₂. A continuación, se retiró la solución de MTT y se añadieron 500 µL dimetilsulfóxido (DMSO, Sigma, USA.). Se midió la absorbancia a 550 nm en un espectrofotómetro (Multiscan Go, Zeiss, Alemania).

Al finalizar los tiempos de incubación, los andamios se trataron con glutaraldehído 3% (Farpag, Colombia) para fijar las bacterias. Luego se sometieron a un proceso de deshidratación con soluciones de Etanol desde el 50% hasta 99% en pasos de 10. Los andamios fueron metalizados con una capa de 30 nm de Au-Pd empleando un metalizador (Quorum, USA) para luego ser observados mediante microscopía electrónica de barrido (SEM, ZEISS EVO 10, Alemania).

4.1.4 Análisis Estadístico

Todos los experimentos se realizaron por triplicado. Los resultados se expresaron como media \pm desviación estándar (DE). El análisis estadístico se realizó con el programa SPSS Statistics (V21, IBM, USA). Se utilizó una prueba t-Student pareada para evaluar la significación entre los grupos experimentales. Un valor $p \leq 0,05$ se consideró estadísticamente significativo. Las gráficas se realizaron mediante el software Python (v 3.11, USA).

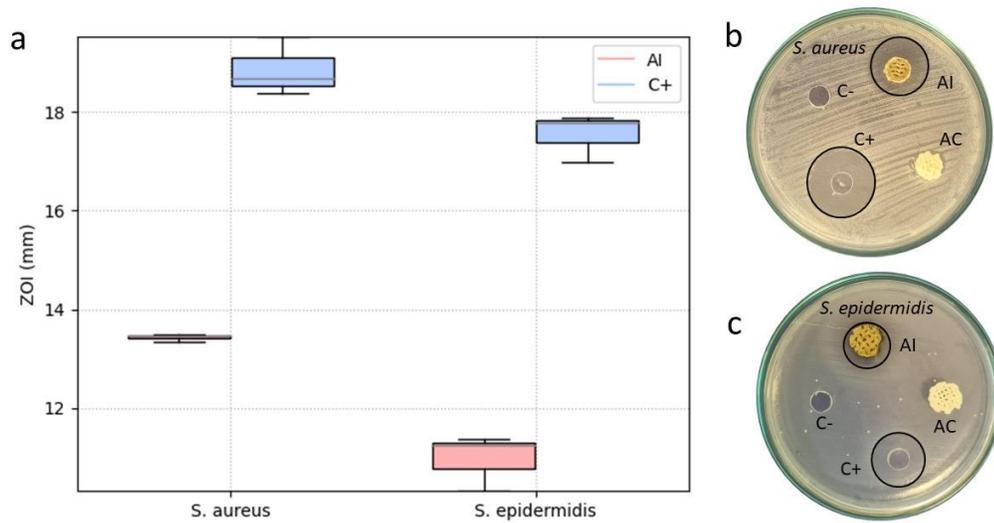
4.3 Resultados y Discusión

4.3.1 Zonas de Inhibición

La figura 4-3 muestra las medidas de las zonas de inhibición que se obtuvieron frente a las dos cepas evaluadas. Los resultados obtenidos mostraron que el efecto antimicrobiano de los Extractos de propóleos (EEP) se mantienen funcionales después del proceso de impregnación en los andamios, teniendo mayor actividad frente a *S. aureus* que a *S. epidermidis*. Estos resultados concuerdan con los resultados encontrados con la CMI y expuestos en el capítulo 2, ya que al requerir una menor concentración de propóleos para inhibir el crecimiento de *S. aureus*, esta cepa resulta ser más sensible y por tanto se pueden generar zonas de inhibición mayores que las encontradas en *S. epidermidis* ($p < 0.001$), efecto visto al emplear una concentración de propóleos determinada.

La actividad de los propóleos encontrada es significativamente menor que la del control positivo frente a las dos cepas. La Zona de inhibición encontrada en el control positivo fue de 18.90 ± 0.62 y 17.50 ± 0.53 mm frente a *S. aureus* y *S. epidermidis* respectivamente, mientras que en los andamios impregnados (AI) fue de 13.4 ± 0.1 mm y 11.0 ± 0.61 mm frente a *S. aureus* y *S. epidermidis* ($p < 0.001$), mientras que los andamios sin impregnar (AC) no mostraron formación de zona inhibitoria. Las muestras de propóleos procedentes de diferentes regiones de Anatolia (Turquía) presentaron zonas de inhibición que oscilaban entre 8 y 11 mm contra *S. aureus* y entre 8 y 12 mm contra *S. epidermidis* (234). Este tipo de actividad del propóleo ha sido ampliamente señalado por autores que han estudiado propóleos de diferentes regiones, destacando que el efecto es más pronunciado contra bacterias *gram* positivas que contra bacterias *gram* negativas (235).

Figura 4-3: Actividad antibacteriana de los andamios impregnados (AI) y los andamios sin impregnar (AC). a) Mediciones de las zonas de inhibición de AI y la Clorhexidina digluconato (C+). b) Imagen de la zona de inhibición de AC, AI, C+ y C- frente a *S. aureus*. c) Imagen de la zona de inhibición de AC, AI, C+ y C- frente a *S. epidermidis*.



Nombre de la fuente: Ana Isabel Moreno

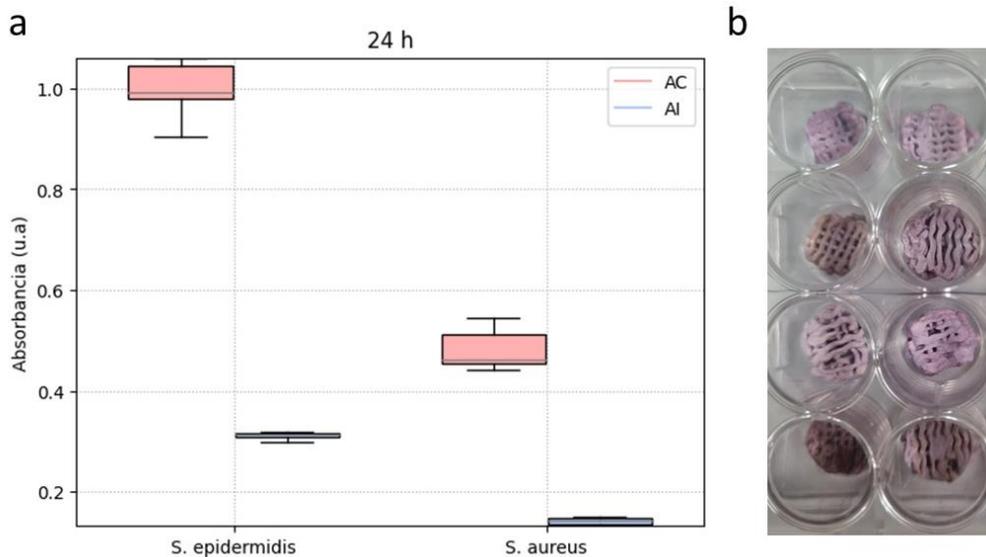
4.3.2 Viabilidad de Biopelículas monoespecie

El ensayo de formación de biopelículas bacterianas confirmó el comportamiento observado en las pruebas anteriores. Se encontraron mediciones de absorbancia significativamente superiores en los cultivos de *S. epidermidis* en comparación con los cultivos de *S. aureus*, lo que indica que *S. aureus* es más sensible al efecto del propóleo. Los andamios impregnados de propóleo (AI) mostraron una reducción significativa en la formación de biopelículas en comparación con los andamios control (AC), y este efecto se mantuvo tras 48 horas de cultivo bacteriano. En la figura 4-4 se observan los datos obtenidos. En los AC se obtuvo una medida de 0.99 ± 0.14 u.a a las 24 h y de 1.78 ± 0.13 u.a tras 48 h de cultivo frente a *S. epidermidis*, mientras que en los AI fue de 0.31 ± 0.01 u.a a las 24 h de cultivo y de 0.84 ± 0.03 u.a tras las 48 h contra la misma cepa bacteriana ($p < 0.001$). En el caso de *S. aureus* los AC arrojaron una absorbancia de 0.48 ± 0.04 u.a y los AI de 0.14 ± 0.01 u.a a las 24 h de cultivo.

La actividad antimicrobiana del propóleo ha sido asociada ampliamente a ciertos compuestos orgánicos como fenoles, flavonoides, flavononas, terpenos, entre otros que generalmente hacen parte de su composición (230,231). El propóleo utilizado en este estudio mostró la presencia de compuestos fenólicos y flavonoides, indicando que éstos

pueden influir en la actividad antimicrobiana encontrada frente a las especies evaluadas (172). El propóleo se caracteriza por su composición variada y compleja, que le permite afectar a las especies bacterianas a través de mecanismos que incluyen el daño de la membrana celular bacteriana (232), la inhibición de la actividad enzimática bacteriana (238), la inducción del estrés oxidativo (161) y la modulación de los factores de virulencia (160). El propóleo rojo de Shandong (China) ha demostrado su capacidad para afectar a las concentraciones de metabolitos intracelulares y a las vías metabólicas, lo que conduce a una disminución de la formación de biopelículas bacterianas, la deformación de la pared celular y la reducción de la virulencia de cepas multirresistentes de *S. aureus* (239). Este efecto antimicrobiano es común entre los propóleos de diferentes regiones e incluso se ha observado que tienen actividad antifúngica y actividad frente a las micobacterias (240), e incluso actividad contra ciertos virus (235).

Figura 4-4: a) Viabilidad de las biopelículas formadas por *S. epidermidis* y *S. aureus* sobre los andamios control (AC) y los andamios impregnados con EEP (AI) tras 24 h de cultivo. b) Fotografía de los andamios AC (filas 1 y 3) y AI (Filas 2 y 4) tras agregar MTT y 2 horas de incubación.

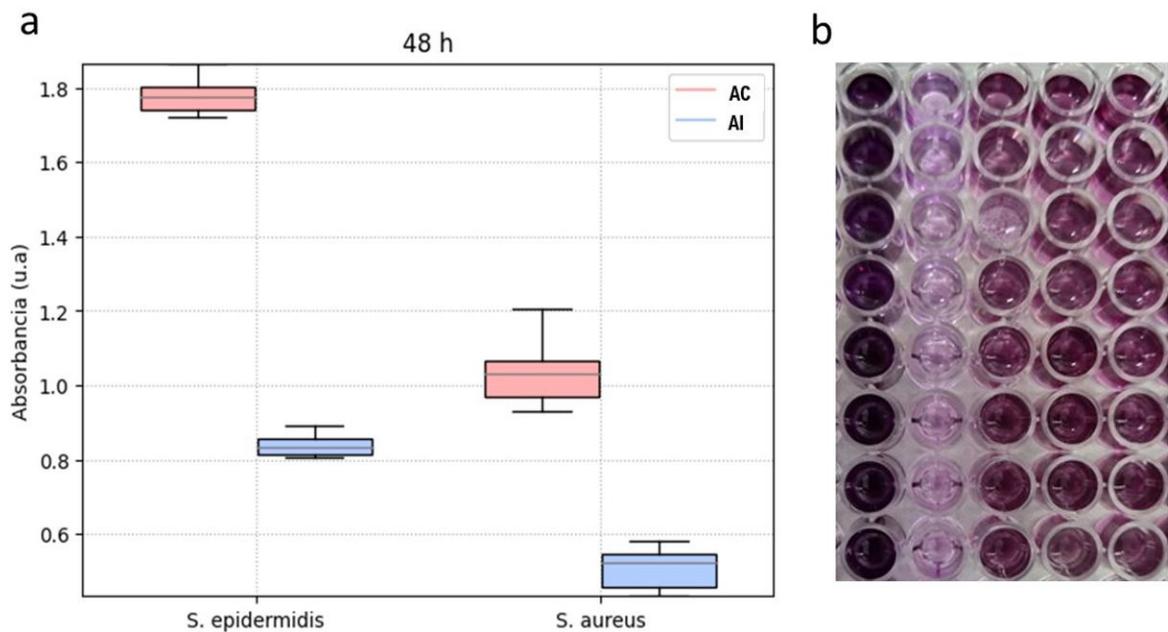


Nombre de la fuente: Ana Isabel Moreno

La actividad del propóleo contra cepas como *S. aureus* es un hallazgo significativo, ya que se trata de una de las bacterias con mayor potencial para desarrollar resistencia a los antibióticos, incluidos los macrólidos, los aminoglucósidos y las fluoroquinolonas. Esto se

debe a la capacidad de estas bacterias para adaptarse rápidamente a la presencia de antibióticos gracias a su actividad enzimática (242). Las especies de *Staphylococcus* se caracterizan por su capacidad para codificar péptidos anfipáticos α -helicoidales conocidos como modulinas solubles en fenol (PSM) (243). Estos PSMs han sido asociados con su virulencia, ya que se relacionan con los procesos proinflamatorios y citolíticos, además, juegan un papel importante en la modulación de las adhesinas responsables de la formación de biopelículas. Los PSMs varían entre especies, por lo que pueden presentar diferentes niveles de sensibilidad a los agentes antimicrobianos (242,243). Siendo esta la posible explicación a la variación en la sensibilidad de la actividad del propóleo frente a *S. aureus* y *S. epidermidis*.

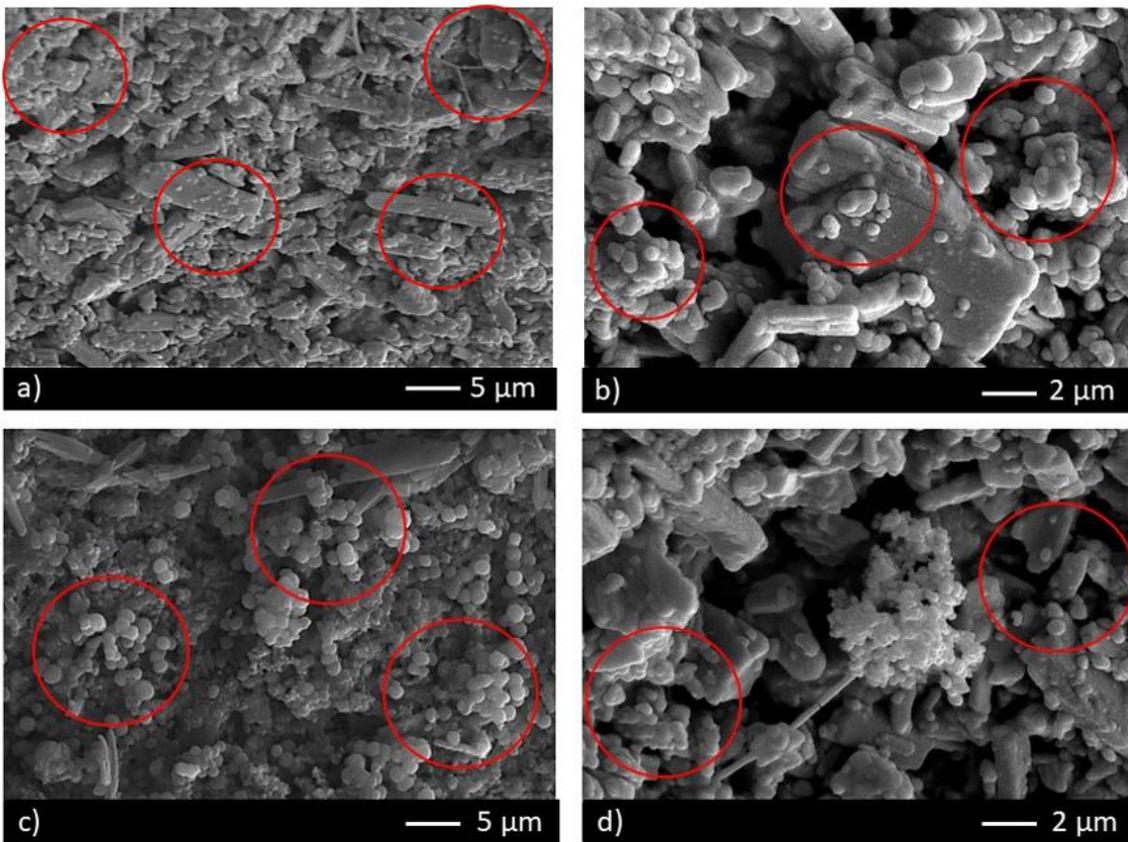
Figura 4-5: a) Viabilidad de las biopelículas formadas por *S. epidermidis* y *S. aureus* sobre los andamios control (AC) y los andamios impregnados con EEP (AI) tras 48 h de cultivo. b) Fotografía de la placa con las soluciones de DMSO obtenidos de los andamios tras 24 y 48 h de cultivo (Columna de la izquierda control bacteriano, es decir, cepa sobre los pozos para garantizar crecimiento, siguientes columnas muestran medidas de andamios impregnados y sin impregnar tras 24 h y 48 h de cultivo)



Nombre de la fuente: Ana Isabel Moreno

Las fotomicrografías obtenidas mediante el SEM mostraron la morfología característica de los *Staphylococcus*, (figura 4-6). En las figuras 4-6 b y d se encontró una menor población bacteriana que en 4-6 a y c, las cuales correspondían a los andamios control (AC). Esto es congruente con los resultados obtenidos mediante la medida de zona de inhibición y la cuantificación de la viabilidad de las biopelículas formadas sobre cada grupo de andamios.

Figura 4-6: Fotomicrografías de barrido electrónico (SEM) a) Andamios sin impregnar (AC) frente a *S. aureus*. b) Andamios impregnados (AI) frente a *S. aureus*. c) Andamios sin impregnar (AC) frente a *S. epidermidis*. d) Andamios impregnados (AI) frente a *S. epidermidis*.

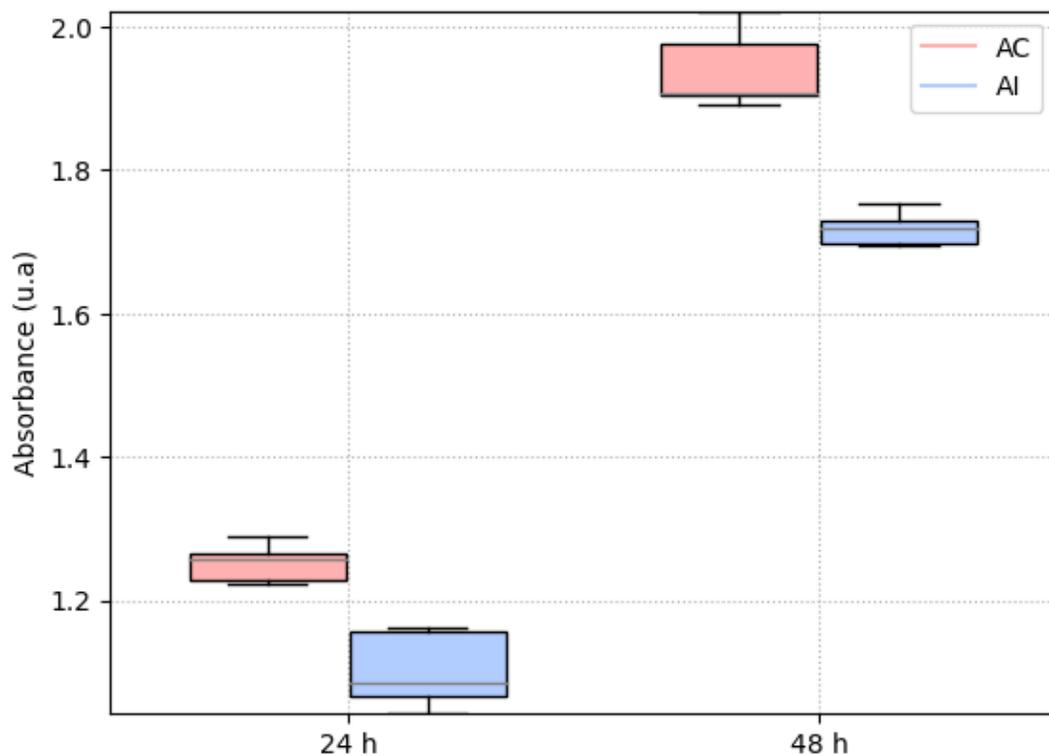


Nombre de la fuente: Ana Isabel Moreno

4.3.3 Viabilidad de Biopelículas multiespecie

La figura 4-7 exhibe los resultados de la formación de biopelículas del co-cultivo. Las gráficas muestran que hubo una reducción significativa de la viabilidad bacteriana sobre el grupo de los andamios impregnados con propóleo (AI) comparado con el grupo de los andamios control (AC) en los dos tiempos evaluados. Transcurridas 24 h de cultivo la medida de absorbancia encontrada en los AI correspondió a 1.10 ± 0.05 u.a, mientras en los AC fue de 1.25 ± 0.03 u.a. Después de 48 h de cultivo, la medida en AI fue de 1.71 ± 0.06 u.a, mientras que en los AC fue de 1.9 ± 0.1 u.a, mostrando así un control significativo de la viabilidad bacteriana conferida por los EEP.

Figura 4-7: Viabilidad de las biopelículas del co-cultivo sobre los andamios impregnados con EEP (AI) y de los andamios sin impregnar (AC) tras 24 y 48 h de co-cultivo.

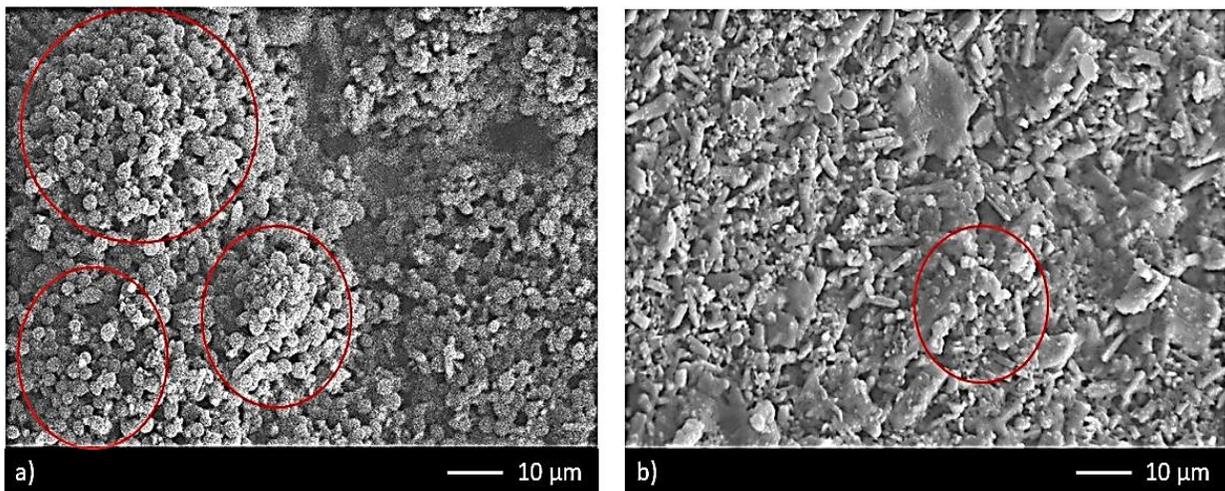


Nombre de la fuente: Ana Isabel Moreno

Los mecanismos de acción de los propóleos suelen ser más eficaces frente a bacterias *gram* positivas que frente a bacterias *gram* negativas y frente a bacterias aerobias que frente a las anaerobias (230). Las dos cepas evaluadas en este estudio son *gram* positivas y anaerobias facultativas, además se caracterizan por tener mecanismos que les permiten ser resistentes a la meticilina (244) y tener un factor de virulencia alto, debido a los PSMs que les permiten formar biopelículas con mucha facilidad (243). Adicionalmente, estas dos bacterias pueden formar co-cultivos incrementando su capacidad de formar biopelículas y su virulencia. Los EEP mostraron ser efectivos frente al co-cultivo ya que se obtuvo una reducción considerable en la viabilidad de las biopelículas formadas sobre los AI en comparación con los AC ($p < 0.001$). Además de los mecanismos de acción que se han descrito, se puede agregar que en el caso de los AI el pH que generan en su microambiente es más básico que en los AC. Estas condiciones de pH también generan efectos nocivos frente a las cepas bacterianas evaluadas, ya que éstas suelen presentar un crecimiento óptimo en condiciones de pH ácido o neutro (245).

Las fotomicrografías obtenidas en el SEM mostraron poblaciones bacterianas sobre los dos grupos de andamios, siendo mayores en los andamios control (AC) que en los andamios impregnados (AI). Sin embargo, debido a que la morfología de las dos cepas es muy similar, no fue posible lograr una diferenciación efectiva entre ellas.

Figura 4-8: Fotomicrografías de barrido electrónico (SEM) a) Andamios sin impregnar (AC) frente al co-cultivo de *S. aureus* y *S. epidermidis*. b) Andamios impregnados (AI) frente al co-cultivo de *S. aureus* y *S. epidermidis*.



4.4 Conclusión

Los andamios impregnados con los extractos etanólicos de propóleos mostraron tener actividad antimicrobiana frente a las cepas de *S. aureus* y *S. epidermidis*, así como frente a su co-cultivo tras 24 y 48 h de incubación. Estas cepas han sido ampliamente relacionadas con el desarrollo de osteomielitis, una de las principales infecciones causantes del fallo de implantes óseos. Los resultados dejan al descubierto el potencial de la impregnación con los extractos de propóleos de andamios cerámicos para regeneración ósea como una estrategia efectiva para reducir las probabilidades de fallo. Así mismo, se potencia la reducción de costos en las terapias de reparación y regeneración ósea asociados a nuevas implantaciones luego de contraer infecciones y de todos los costos hospitalarios ligados a los cuidados de estos pacientes.

5. Actividad biológica *in vitro* de andamios porosos impregnados con Extractos Etanólicos de Propóleos

Abstract

The repair and regeneration of defective bones aim to be overcome by the insertion of porous implantable devices, facilitating the processes of cell infiltration, proliferation, and differentiation. The therapy involves providing a three-dimensional structure that offers support, a pluripotent cell culture responsible for initiating extracellular matrix formation processes, and finally, a signal generation system that will be sensed by the cell culture to initiate new tissue formation. *In vitro* evaluation allows identifying whether the parameters chosen in the scaffold design are suitable for achieving the objective of bone repair, through the assessment of cell proliferation and metabolic activity. The goal of this chapter is to present the findings from evaluating the *in vitro* metabolic activity of bioceramic scaffolds impregnated with ethanolic propolis extracts, against a line of mesenchymal stem cells obtained from human bone marrow and in a human osteosarcoma culture to monitor their potential application in bone regeneration. Mechanical compression tests were performed to evaluate the compressive strength of the scaffolds after being subjected to 21 and 28 days of culture and compared to scaffolds without incubation. The Alamar blue assay was employed to measure cell proliferation over 28 days of culture, Von Kossa staining, and Alizarin red staining to detect calcium deposit formation. Additionally, alkaline phosphatase (ALP) activity was visualized as a marker of the mineralization process. The results showed proliferation of both evaluated cell lines on scaffolds impregnated with propolis (AI), with observed calcium deposits and indications of ALP activity on these scaffolds.

The assessment of the mechanical properties showed that the scaffolds do not lose their mechanical properties after being subjected to culture for 28 days, furthermore it was found that propolis has no effect on the mechanical properties of the scaffolds and the compression results obtained showed to be like those of trabecular bone. These results led to the conclusion that porous scaffolds modified with ethanolic extracts of propolis have potential application in the repair and regeneration of injured trabecular bone tissues.

Resumen

La reparación y regeneración ósea de huesos defectuosos busca ser superada con la inserción de dispositivos implantables porosos, que facilitan los procesos de infiltración, proliferación y diferenciación celular. La terapia consiste en proporcionar una estructura tridimensional que brinda soporte, un cultivo celular pluripotente que será el encargado de iniciar los procesos de formación de matriz extracelular y, por último, un sistema generador de señales que serán captadas por el cultivo celular para iniciar la formación de nuevo tejido. La evaluación *in vitro* permite identificar si los parámetros elegidos en el diseño del andamio son adecuados para lograr el objetivo de reparación ósea, mediante la valoración de la proliferación celular y la actividad metabólica. El objetivo de este capítulo es mostrar lo obtenido al evaluar la actividad metabólica *in vitro* de andamios biocerámicos impregnados con extractos etanólicos de propóleos, frente a una línea de células madre mesenquimales obtenidas de médula ósea humana y en un cultivo de osteosarcoma humano para monitorear su potencial aplicación en regeneración ósea. Se empleó la prueba de Alamar blue para medir la proliferación celular durante 28 días de cultivo, la tinción de Von Kossa, y la tinción con Alizarin red para detectar formación de depósitos de calcio. Además, se visualizó la actividad de la ALP como marcador del proceso de mineralización. Se realizaron pruebas de compresión mecánica para evaluar la resistencia a la compresión de los andamios tras ser sometidos a 21 y 28 días de cultivo y se comparó con andamios sin incubación. Los resultados mostraron proliferación de las dos líneas celulares evaluadas sobre los andamios impregnados con propóleos (AI) tras 21 días de cultivo y las señales se hicieron mucho más intensas tras 28 días de cultivo, se observaron depósitos de calcio e indicios de la actividad de la ALP sobre estos andamios. La valoración

de las propiedades mecánicas mostró que los andamios no pierden sus propiedades mecánicas tras ser sometidos a cultivos durante 28 días, además se encontró que los propóleos no tienen ningún efecto sobre las propiedades mecánicas de los andamios y los resultados de compresión obtenidos mostraron ser similares a los del hueso trabecular. Estos resultados permitieron concluir que los andamios porosos modificados con extractos etanólicos de propóleos tienen potencial aplicación en la reparación y regeneración de tejidos óseos trabeculares lesionados.

5.1 Introducción

El uso de sustitutos óseos es una de las técnicas más prometedoras de la ingeniería de tejidos para lograr la reparación y remodelación de defectos óseos. Las terapias desarrolladas consisten en cargar estos dispositivos con células multipotentes, para que ocurran los procesos de osteointegración, migración y proliferación necesarios para la formación de nuevo tejido óseo (9). Para lograr este cometido, se requieren estructuras porosas que faciliten la distribución de oxígeno y nutrientes, así como el transporte de desechos (246).

Los andamios porosos son el modelo deseado para este tipo de aplicaciones, convirtiendo las características relacionadas con el poro en un factor vital en el desarrollo de estos dispositivos. El tamaño de poro debe ser adecuado no solo para la difusión de oxígeno y el transporte de nutrientes, sino que también debe permitir la penetración de las células en los andamios para favorecer el proceso de osteointegración (9). Adicionalmente, se requiere una interconexión entre los poros, para que ocurran los procesos metabólicos celulares, sin afectar las propiedades mecánicas que están relacionadas con su función de soporte (247).

En el proceso de desarrollo de sustitutos óseos la evaluación *in vitro* es crucial, puesto que es la primera aproximación para detectar si los parámetros elegidos en cuanto al tamaño de poros, interconexión, geometría y materiales cumplen con los requisitos necesarios para

garantizar el éxito del dispositivo de reemplazamiento óseo. Para lograr un resultado óptimo se han identificado cuatro factores indispensables: envío de señales osteogénicas, células huésped que respondan a las señales e inicien el proceso de formación de matriz extracelular, un andamio tridimensional adecuado que permita el crecimiento de las células huésped y un lecho huésped vascularizado (248). Las células madre multipotentes actúan como las células huésped receptoras de señales y estas señales vienen dadas por factores de crecimiento presentes en el medio, así como por ciertas proteínas. Algunos ejemplos de éstos son la proteína morfogénica 2 (BMP-2), el factor de crecimiento de fibroblastos-2 (FGF-2) y el factor de crecimiento transformante β -1 (TGF β -1), los cuales están involucrados en el proceso de osteogénesis. Cuando se hacen estudios *in vitro*, generalmente se excluye el cuarto factor mencionado, correspondiente a la evaluación del comportamiento del sistema en un lecho huésped vascularizado, ya que se trabajan con cultivos celulares y en ellos no es posible lograr la vascularización.

La proliferación celular es uno de los primeros aspectos que deben ser evaluados para identificar si el diseño de los andamios es adecuado, pues si no hay correcta difusión de oxígeno y nutrientes, el crecimiento celular se verá afectado. Para la evaluación de la proliferación se han utilizado diferentes técnicas que incluyen la detección de compuestos químicos, metabolitos secundarios y nanomateriales; estos métodos aprovechan diferentes principios relacionados con la integridad de la membrana (Ensayo de exclusión con Azul de Tripano) (249), crecimiento celular relativo (mide el número de células viables en una población y refleja la muerte celular y los cambios en la proliferación) (244,245), la capacidad para formar colonias (ensayo de eficiencia de formación de colonias (CFE)) (252) y la competencia metabólica celular (253).

Las técnicas de competencia metabólica celular están basadas en la relación de la actividad metabólica y la viabilidad celular. Las células metabólicamente activas se caracterizan por tener un citosol reductor, por lo que al emplear indicadores redox colorimétricos o fluorométricos, es posible tener una cuantificación de la actividad metabólica y por ende de la viabilidad celular (254). Un ejemplo de estas técnicas es la de alamar blue, la cual se basa en el uso del indicador redox fluorométrico (7-hidroxi-3H-fenoxazin -3-ona-10 óxido) que es captado por las células en su forma de resarzurina oxidada, para luego ser reducida dentro del citosol a resorufina fluorescente (7-hidroxi-3H-

fenoxazin-3-ona), y de esta forma es posible cuantificarla con un lector de fluorescencia; esta conversión está mediada por diaforasas intracelulares, con NADPH o NADH como agente reductor (255).

Además de la proliferación celular, es necesario medir, ya sea cuantitativa o cualitativamente, la actividad metabólica relacionada con el proceso de mineralización para garantizar que se ha logrado la diferenciación celular y que se ha cumplido el objetivo de formar nuevo hueso. Para ello existen una variedad de metodologías y generalmente se suelen usar al menos dos técnicas con el fin de corroborar los resultados. Entre las técnicas más comunes se encuentran la tinción de Von Kossa, la tinción de Alizarin Red y la actividad de la fosfatasa alcalina (ALP) (256). Las dos primeras, permiten visualizar y cuantificar los depósitos mineralizados. La técnica de Von kossa es una reacción de dos pasos: primero, los cationes reaccionan con los componentes de los depósitos de calcio dando paso a una coloración transitoria amarilla con la cual se identifica la presencia de fosfatos de calcio. En el segundo paso, el material orgánico reduce la plata ligada a plata metálica negra con la ayuda de la luz UV (257). En el caso del Alizarin red, éste reacciona con los cationes de calcio para formar un quelato que colorea de rojo los depósitos de calcio (258). La ALP es una glicoproteína asociada con la formación de tejidos calcificados, por lo que su actividad ha sido asociada con la actividad celular, encaminada a un fenotipo de mineralización. Estas técnicas suelen ser ampliamente utilizadas por ser sencillas de realizar, económicas y reproducibles (259).

En el presente capítulo, se reportarán los resultados obtenidos al evaluar la actividad metabólica *in vitro* de andamios biocerámicos impregnados con extractos etanólicos de propóleos frente a una línea de células madre mesenquimales obtenidas de médula ósea humana y a una línea de osteosarcoma humano. De esta manera se monitorea potencial aplicación de los andamios impregnados en los procesos de regeneración ósea.

5.2 Metodología

Para el desarrollo de este trabajo se emplearon andamios cerámicos porosos de wollastonita fabricados mediante impresión 3D e impregnados con propóleos tal y como se describió en el capítulo 3. Se utilizaron dos grupos de andamios, el grupo (AI) en el cual los andamios se impregnaron con los extractos etanólicos de propóleos (EEP) obtenidos en el capítulo 1 mediante la técnica descrita en el capítulo 3, sección 3.2.5 y el segundo empleado como grupo control (AC) correspondiente a los andamios sin impregnación. Para la valoración de la actividad metabólica *in vitro* de los andamios se emplearon dos cultivos celulares. Células de osteosarcoma humano (SaOS) proporcionadas por la Dra. Yvonne Roger de la Clínica de Ortopedia de la Facultad de Medicina de Hannover, que fueron aisladas de osteosarcoma humano (tejidos conectivos y de sostén). Las células se sembraron en medio DMEM con alto contenido en glucosa (Roth, Alemania) suplementado con un 10% de suero fetal bovino inactivado por calor (FBS) (Bio&sell, Alemania) y 1% de penicilina-estreptomicina a 37°C y 5% de CO₂, durante los primeros 7 días. El medio se cambió cada 24 horas. Posteriormente, las células se expusieron a un medio de diferenciación añadiendo 5 mM de β-glicerofosfato (Merck, Alemania), 50 mM de ácido ascórbico (Merck, Alemania) y 10 nM de dexametasona (Merck, Alemania) durante 28 días (260). Además, se utilizó un cultivo de células madre mesenquimales aisladas de médula ósea humana (bmMSC) proporcionadas por la Dra. Yvonne Roger de la Clínica de Ortopedia de la Facultad de Medicina de Hannover. Las bmMSC (6-8 pasajes) se sembraron en los andamios (prehumedecidos en medio suplementado durante la noche) a una densidad de 25.000 cell/cm². Estas células se sembraron en medio de crecimiento suplementado a base de medio de Eagle modificado de Dulbecco (DMEM) (Bio&Sell, Alemania) con 2.3 % (v/v) de glutamina estable, 2.3 % (v/v) de HEPES, 0.002 % (v/v) de FGF-2, 11.6 % (v/v) de suero bovino fetal (Bio&Sell, Alemania) y 1.2 % (v/v) de penicilina/estreptomicina. El medio se sustituyó cada 2 días durante los primeros 7 días de cultivo (261). Posteriormente, las células se expusieron a medio de diferenciación añadiendo 5 mM de β-glicerofosfato (Merck, Alemania), 50 mM de ácido ascórbico (Merck, Alemania) y 10 nM de dexametasona (Merck, Alemania) durante 28 días (260).

Se evaluaron andamios control (AC) y andamios impregnados con 150 µL de propóleo (AI), estos fueron esterilizados exponiendo cada una de sus caras durante 30 min con luz uv y entonces fueron sumergidos en PBS (Merck, Alemania) durante 72 horas para evitar la

liberación inicial de iones de calcio que podría dañar las células. Como control, se sembraron células en un plato de 24 pozos (TPP, Switzerland).

5.2.1 Ensayo de proliferación celular

La proliferación celular se midió en los tiempos 1, 3, 7, 14, 21 y 28 días de cultivo empleando el método de reducción de resazurina (261). Se preparó una solución de trabajo de 44 μM de reactivo azul Alamar en medio de cultivo precalentado inmediatamente antes de los experimentos. Se añadió 1 mL de solución de trabajo sobre los andamios. Los cultivos se incubaron durante 1.5 horas con el reactivo de Alamar Blue, luego se tomaron medidas de fluorescencia en un lector de fluorescencia (Tecan Infinite M200 Nanoquant, USA.) a una longitud de onda de excitación de 570 nm y una longitud de onda de emisión de 600 nm, con el fin de lograr una cuantificación de la población celular viable. Se construyó una curva de calibración del número de células y la medición de fluorescencia ($r^2 = 0.98$). Los resultados se expresan como el porcentaje de viabilidad encontrado en los andamios en relación con las muestras de control sembradas en los pozos sin andamios. Estos ensayos se realizaron por triplicado. Para evaluar la morfología celular y la adhesión sobre los andamios se empleó un microscopio electrónico de barrido (SEM, S3400N, Hitachi, Japón) obteniendo imágenes con electrones secundarios (SE) y electrones retrodispersados (BE) utilizando una distancia de trabajo de 30 mm y un voltaje de aceleración de 20kV. Los andamios se prepararon lavándolos con tampón de cacodilato 0,1 M (Merck, Alemania), y luego se fijaron con glutaraldehído al 3% (Merck, Alemania) durante 10 minutos. Posteriormente se lavaron con PBS (Merck, Alemania) y se deshidrataron utilizando soluciones secuenciales de etanol (del 25 al 99% v/v). Tras una noche de secado, las muestras se recubrieron con una capa de 35 nm de Au-Pd utilizando un Minisputter SC7620 (Quorum Technologies, Reino Unido). Se realizaron pruebas histológicas con el fin de determinar de forma cualitativa el proceso de osteogénesis, identificando depósitos de calcio sobre los andamios (ensayo de Von Kossa y Alizarin Red) así como la actividad de la fosfatasa alcalina (ensayo ALP), para ello se sembraron 25000

cell /cm² en los IS y CS, así como en platos de 24 pozos y se mantuvieron bajo las condiciones de cultivo mencionadas anteriormente, siendo cultivadas en medio de diferenciación desde el día 7 hasta el día 28. Para las tinciones se tomaron medidas en los días 21 y 28, para lo cual las células fueron fijadas con glutaraldehído al 3% (Merck, Alemania) durante 15 minutos y luego se lavaron con PBS (Merck, Alemania). A continuación, se describen los procedimientos empleados para cada una de las tinciones específicas.

5.2.2 Tinción de Alizarin Red

Para la tinción de Alizarin Red se trataron los andamios y los pozos control con una solución estéril de Rojo Alizarina 4nM (Merck, Alemania) durante 2 min. Transcurrido el tiempo se realizó un lavado con agua desionizada y a continuación se aplicó HCl 10 mM en etanol al 70% durante 15s. Los andamios se dejaron toda la noche a temperatura ambiente para eliminar los excesos de humedad (262)

5.2.3 Tinción de Von Kossa

Para la tinción con Von Kossa se empleó una solución de Nitrato de plata al 1% (Merck, Alemania). Se añadió 1 mL de esta solución sobre los andamios y los pozos control y luego se expusieron a luz UV durante 1 hora. Cumplido el tiempo se hizo un lavado con agua destilada y, luego se agregó 1 mL de una solución de tiosulfato sódico al 5% (Merck, Alemania) durante 3 minutos. Para finalizar se realizó un lavado con agua destilada y se dejaron secar durante toda la noche a temperatura ambiente (263).

5.2.4 Tinción de actividad de la Fosfatasa alcalina (ALP)

En la tinción de ALP se usó una solución de trabajo constituida por Na-naftilfosfato (Merck, Alemania) con tampón Tris (Sigma, USA.), la cual se agitó durante 10 min y luego se agregó una sal de r-fast blue (Sigma, USA.). Esta solución se mantuvo en agitación durante 5 min hasta lograr una mezcla lo más homogénea posible. Se agregó 1 mL de la solución de trabajo sobre los andamios y sobre los pozos control, luego fueron incubados en

Producción por manufactura aditiva de andamios con propiedades antimicrobianas a partir de Propóleos de Tame (Arauca) para regeneración ósea.

ausencia de luz durante 1 h; posteriormente se realizó un lavado con PBS y se dejaron secar durante toda la noche a temperatura ambiente (260).

Los andamios sometidos a estas tinciones fueron observados en un microscopio óptico (Zeiss Stemi DV4). Se utilizaron andamios sin cultivo de células con cada una de las tinciones como control de tinción en el material. Estos experimentos se realizaron por triplicado. Los pozos usados como control se observaron en un microscopio invertido (Zeiss Axio Vert A1).

5.2.5 Propiedades Mecánicas

Los andamios se sometieron a ensayos monotónicos cuasi estáticos de compresión utilizando un Sistema de prueba universal UTS (Instron 3366, Instron, MA, USA.) con una célula de carga de 10 kN a una velocidad de 0.5 mm/min. La carga de compresión y los desplazamientos se registraron a lo largo de los ensayos, y la carga máxima o carga de fallo se utilizó para determinar la resistencia máxima a la compresión de cada muestra de andamio. El ensayo se realizó sobre andamios después de la sinterización, tomado como tiempo 0, así como en andamios tras 21 y 28 días de cultivo celular para detectar posibles alteraciones en la respuesta mecánica.

5.2.6 Análisis Estadístico

Todos los experimentos se realizaron por triplicado. Los resultados se expresaron como media \pm desviación estándar (DE). El análisis estadístico se realizó con el programa SPSS Statistics (V21, IBM, USA.). Se utilizó una prueba t-Student no emparejada para evaluar la significación entre los grupos experimentales. Un valor $p \leq 0,05$ se consideró estadísticamente significativo. Las gráficas se realizaron mediante el software Python (v 3.11, USA).

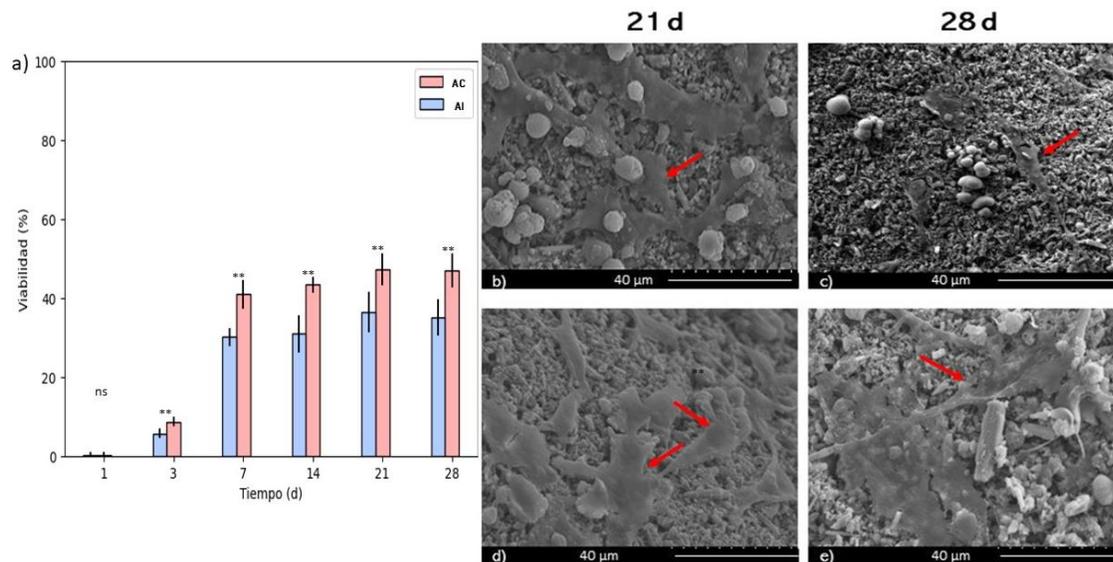
5.3 Resultados y discusión

5.3.1 Ensayo de proliferación celular

La proliferación celular se midió mediante el ensayo de Resazurin Alamar blue, tomando medidas desde el día 1 hasta el día 28. A partir del día 7 las células se cultivaron en medio de diferenciación. Este cambio de medio no mostró un efecto negativo en la proliferación celular con los cultivos estudiados. En cuanto a los resultados obtenidos con el cultivo de las bmMSC, se encontró una viabilidad del 50% del cultivo celular sobre los AC a partir del día 21 y esta tendencia se mantuvo hasta el final del experimento. En los AI se alcanzó una viabilidad cercana al 40%, la cual se mantuvo hasta el día 28. En la figura 5-1 se observan fotos de microscopía electrónica de barrido SEM de la morfología celular encontrada sobre los dos grupos de andamios (AI y AC) la cual corresponde a la morfología de stem cells reportadas por otros autores (264–266). En la figura 5-1 las flechas señalan las células adheridas a la superficie de los andamios.

Figura 5-1: Proliferación celular de células madre mesenquimales de médula ósea humana (bmMSC). a) Porcentaje de viabilidad de bmMSC en andamios impregnados de propóleos (AI) y en andamios sin impregnación de propóleos (AC). b-c) SEM de bmMSC adheridas en andamios sin impregnación de propóleos (AC) durante 21 y 28 días de cultivo. d-e) SEM de bmMSC adheridas en andamios impregnados con propóleos (AC) durante 21 y 28 días de cultivo.

Producción por manufactura aditiva de andamios con propiedades antimicrobianas a partir de Propóleos de Tame (Arauca) para regeneración ósea.



Nombre de la fuente: Ana Isabel Moreno

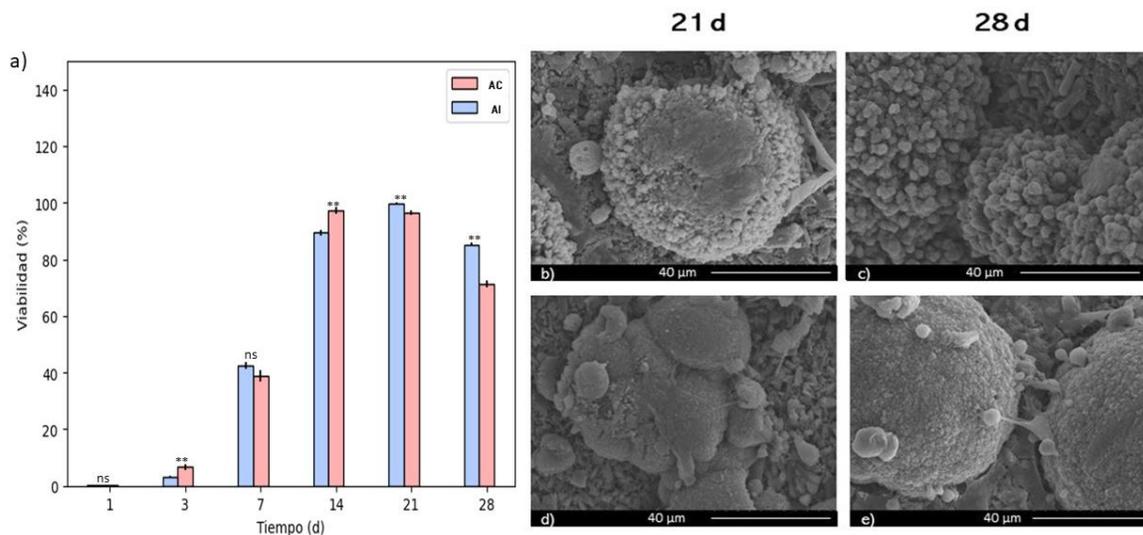
Frente a las bmMSC, los AI mostraron un 10% menos de viabilidad celular y proliferación, en comparación con los AC. Este efecto puede ser atribuido a las condiciones de pH, pues a pesar de haber aplicado un pretratamiento para neutralizar este efecto, el pH de los AI mostró valores más altos que el de los AC. Además, los propóleos suelen contener componentes resinosos que pueden llegar a dificultar el proceso de proliferación celular, aunque no lo inhiben por completo (267). Los propóleos han sido empleados en el pasado en procesos de reparación de tejido óseo, mostrando incluso un incremento de la proliferación celular de bmMSC cuando se usan concentraciones menores a 400 g/mL (132). Sin embargo, concentraciones muy altas pueden generar disminución en la proliferación celular. Hasta ahora se ha encontrado dicho efecto en concentraciones mayores a 2000 g/mL (132,268). Además, se ha demostrado que la presencia de propóleos puede aumentar la capacidad de proliferación de los fibroblastos del ligamento periodontal y de células madre derivadas de dientes de leche exfoliados (269,270). Esto demuestra el potencial que existe en la utilización de propóleos en el campo de la regeneración ósea, haciendo pertinente el estudio de su uso en diferentes concentraciones, así como su actividad antimicrobiana y la respuesta celular.

Los ensayos de proliferación celular en el cultivo de SaOS mostraron un crecimiento celular tanto en los andamios impregnados de propóleo (AI) como en los no tratados (AC) (Figura 5-2). Las señales de fluorescencia fueron muy bajas en ambos grupos de andamios durante los primeros 3 días, mostrando una viabilidad celular inferior al 10%. A partir del día 7, se produjo un aumento de la población celular en ambos grupos de andamios, alcanzando una tasa de proliferación del 50%. A partir del día 14, las señales encontradas en ambos grupos superaron el 80%, aunque se encontraron diferencias significativas entre estos. En los AI, el proceso de proliferación fue considerablemente más lento. Esta tendencia persistió hasta el día 21, momento en el que la proliferación se aproximó al 100% en ambos grupos de andamios sin diferencias significativas. A partir del día 28, se observó una disminución de la proliferación celular, con un descenso de aproximadamente 30% en comparación con la proliferación alcanzada el día 21. Las imágenes SEM de los días 21 y 28 revelaron que las células SaOS fueron capaces de adherirse, extenderse y propagarse en los andamios fabricados. En general, las células SaOS presentaron una morfología típica de los osteoblastos maduros y numerosos filopodios que interactúan con otras células y con la superficie de los andamios (271). También se observaron estructuras laminares multicapas formadas por células y presumiblemente otros componentes de la matriz extracelular (272).

La estructura química de la wollastonita proporciona una superficie que promueve la adhesión celular, facilitando la proliferación de osteoblastos y la formación de matriz ósea (273), esto explica el comportamiento encontrado en los andamios fabricados en donde los resultados obtenidos de proliferación y adhesión celular fueron bastante satisfactorios. Además, la wollastonita sigue liberando iones de calcio en el entorno circundante, lo que estimula la diferenciación celular y fortalece la mineralización del hueso nuevo (274). Gracias a estas condiciones la wollastonita ha mostrado ser un material eficaz para la regeneración ósea.

Figura 5-2: Proliferación celular de células de osteosarcoma humano (SaOS). a) Porcentaje de viabilidad de SaOS en andamios impregnados de propóleos (AI) y en andamios sin impregnación de propóleos (AC). b-c) SEM de SaOS adheridas en andamios sin impregnación de propóleos (AC) durante 21 y 28 días de cultivo. d-e) SEM de SaOS adheridas en andamios impregnados con propóleos (AI) durante 21 y 28 días de cultivo.

Producción por manufactura aditiva de andamios con propiedades antimicrobianas a partir de Propóleos de Tame (Arauca) para regeneración ósea.



Nombre de la fuente: Ana Isabel Moreno

El propóleo se ha probado en líneas celulares humanas y ha mostrado ser seguro, es decir, sin efectos citotóxicos en concentraciones hasta de 1.4 kg/mL (275). Sin embargo, cuando se evalúa su efecto en determinados tipos de células cancerosas, entre ellas SaOS, se ha observado que el propóleo influye en los procesos de transporte de elementos al interior de la célula, bloqueando hasta cierto punto los procesos de proliferación (276). Esta actividad se ha asociado a la presencia de compuestos fenólicos existentes en el propóleo (277), lo que concuerda con los hallazgos de este estudio, en el que los andamios impregnados de propóleo retrasaron el proceso de proliferación celular durante la primera semana hasta alcanzar una población celular lo suficientemente densa como para sobrevivir al efecto del propóleo.

Además del efecto del propóleo, uno de los objetivos de este estudio era comprobar si la geometría tridimensional empleada facilita los procesos proliferativos. Esto se demostró al alcanzar un porcentaje de viabilidad cercano al 100% en el día 21, lo que indica que la geometría de TPMS Gyroid empleada podría promover el crecimiento celular debido a su porosidad interconectada y a las curvas generadas capa a capa. Estos resultados son

consistentes con estudios previamente reportados, donde andamios biocerámicos 3D utilizando materiales como vidrio bioactivo y fosfatos de calcio han demostrado mejorar el proceso de proliferación celular (278,279). La geometría de TPMS Gyroid facilita el transporte de nutrientes y la eliminación de desechos, por lo que se considera que hace un proceso de imitación efectiva de la microarquitectura del hueso natural (280). Además, se ha demostrado que esta geometría promueve la vascularización, el cual es uno de los procesos esenciales para el suministro sanguíneo en la región de implantación, esto permite acelerar el proceso de regeneración (281). Adicionalmente se ha visto que esta geometría facilita la adhesión celular y ofrece una mayor área superficial para la interacción célula-material, estimulando así la formación de tejido óseo funcional (197,281).

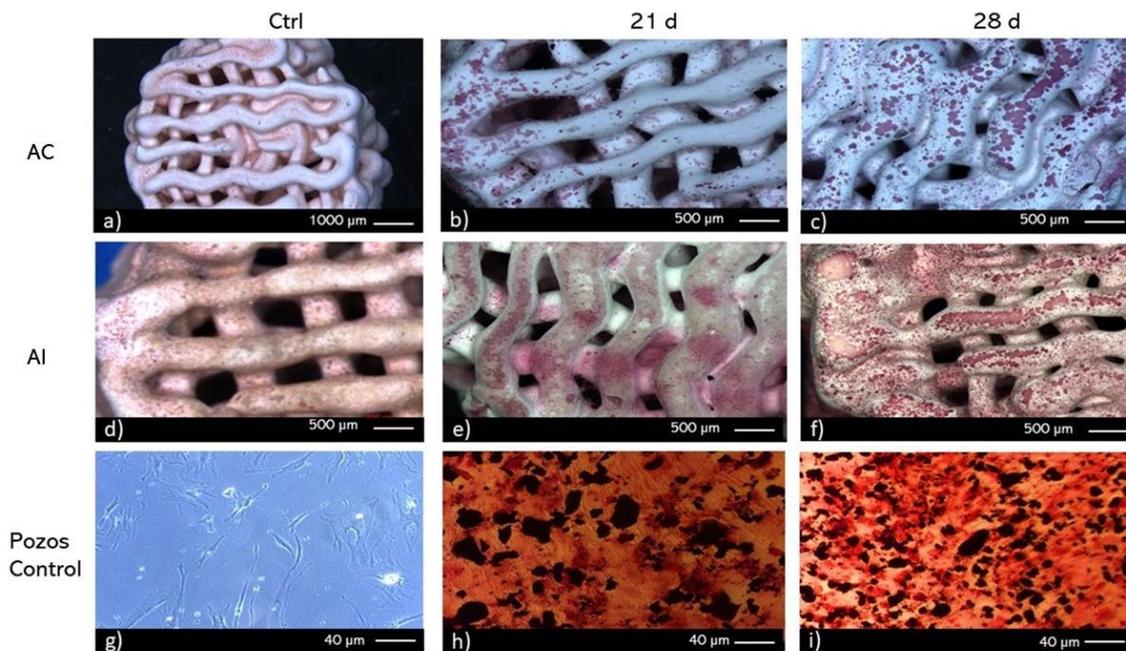
Mediante técnicas de histoquímica se identificaron regiones en los andamios con presencia de depósitos de calcio y con actividad de la ALP. Para la visualización de los depósitos de calcio se usaron tinción por Alizarin Red y Tinción de Von kossa.

5.3.2 Tinción de Alizarin Red

La figura 5-3 muestra los resultados de la tinción realizada con Alizarin Red en los cultivos con células madre mesenquimales de médula ósea humana (bmMSC). Esta permitió visualizar depósitos cálcicos en mayor proporción sobre los AI que en los AC después de 28 días de cultivo. Esta tinción además mostró un cambio de coloración en los andamios control, correspondientes a aquellos que no se sometieron a cultivo celular, hecho que pudiera generar falsos positivos, aunque la intensidad de esta coloración fue notablemente menor que la encontrada en los andamios con presencia celular. Por ello, se tomó como resultado positivo las regiones en las que la coloración mostró coloración intensa. La tinción con Alizarin Red reveló la presencia de depósitos de calcio en capas internas con coloraciones intensas. Esta tendencia se observó en los dos tiempos medidos y en ambos grupos de andamios.

Figura 5-3: Tinción de Alizarin Red de los andamios en cultivo con células madre mesenquimales de médula ósea humana (bmMSC). a-c) Andamios sin impregnar con propóleos (AC) sin células (CTRL), tras 21 y 28 días de cultivo. d-f) Andamios impregnados con propóleos (AI) sin células (CTRL), tras 21 y 28 días de cultivo. g-i) Pozos sin andamios

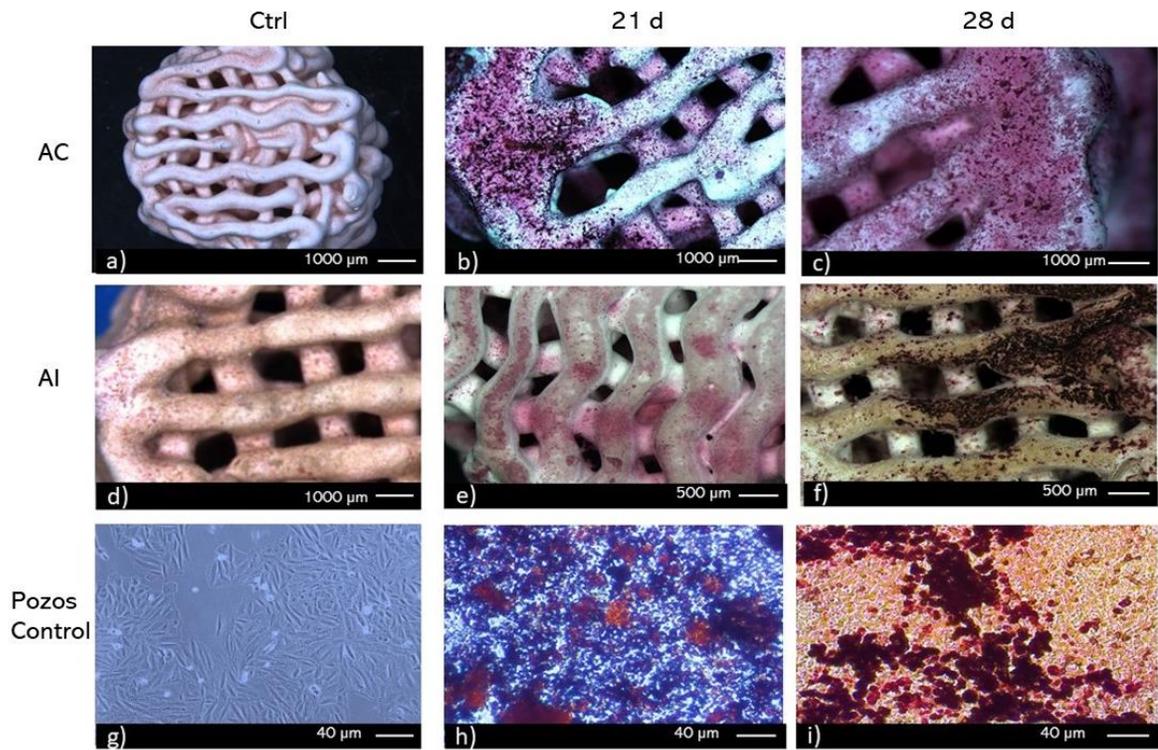
usados como control, cultivo sin tinción al inicio del experimento y con tinción tras 21 y 28 días de cultivo.



Nombre de la fuente: Ana Isabel Moreno

En la figura 5-4 se muestran los resultados de esta técnica histológica frente a los andamios que fueron cultivados con células de osteosarcoma humano (SaOS). Siguiendo los parámetros expuestos sobre las regiones que fueron consideradas como positivas para la presencia de depósitos de calcio, se concluyó que, en las muestras empleadas como control, no se marcaron depósitos de calcio considerables, tal como se observa en la figura 5-4 a y d. En los andamios sometidos al cultivo celular se encontraron coloraciones intensas en los dos tiempos evaluados y esta intensidad es comparable a la encontrada en los pozos de control, en donde se aprecian nódulos rojos intensos (Fig. 5-4 h,i).

Figura 5-4: Tinción de Alizarin Red de los andamios en cultivo con células de osteosarcoma humano (SaOS). a-c) Andamios sin impregnar con propóleos (AC) sin células (CTRL), tras 21 y 28 días de cultivo. d-f) Andamios impregnados con propóleos (AI) sin células (CTRL), tras 21 y 28 días de cultivo. g-i) Pozos sin andamios usados como control, cultivo sin tinción al inicio del experimento y con tinción tras 21 y 28 días de cultivo.



Nombre de la fuente: Ana Isabel Moreno

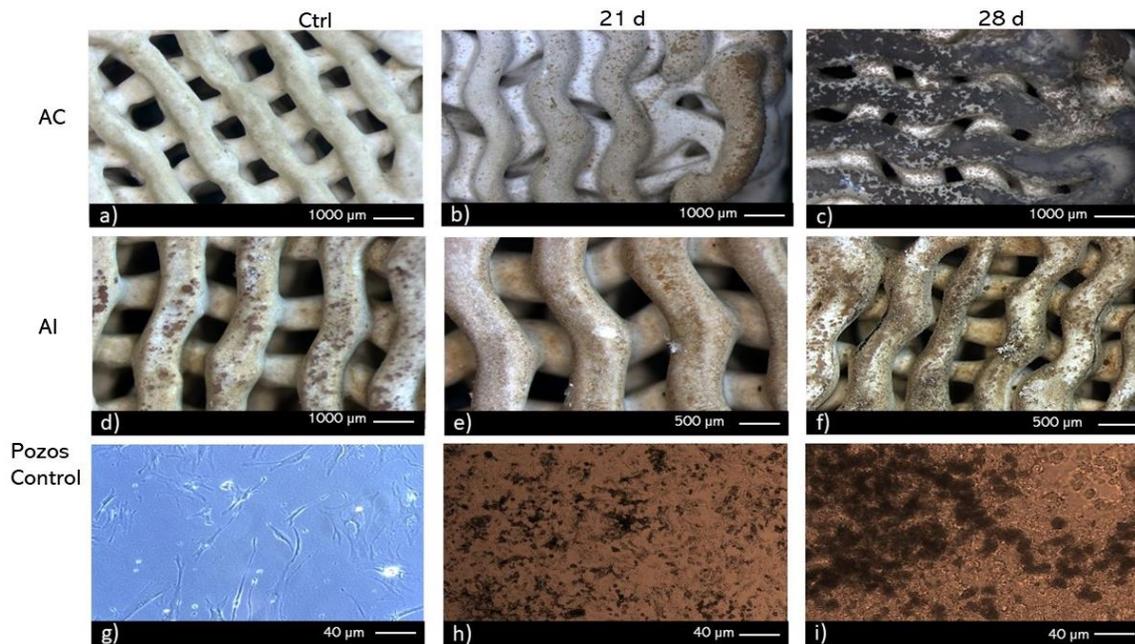
5.3.3 Tinción de Von Kossa

La tinción de Von Kossa se utilizó como método cualitativo para evaluar la presencia de fosfato cálcico en la matriz extracelular de cultivos celulares o en construcciones de células/biomateriales (279). Una matriz extracelular mineralizada podría ser un indicador fiable de la capacidad osteoinductora de los biomateriales (282). Los resultados obtenidos mediante la tinción de Von kossa en los andamios cultivados con bmMSC se muestran en la Figura 5-5. En las imágenes g-i se encuentran los cultivos celulares sobre los pozos

Producción por manufactura aditiva de andamios con propiedades antimicrobianas a partir de Propóleos de Tame (Arauca) para regeneración ósea.

empleados como controles. Con esta tinción los depósitos de calcio se identifican mediante la formación de coloración marrón a negra.

Figura 5-5: Tinción de Von kossa de los andamios en cultivo con células madre mesenquimales de médula ósea humana (bmMSC). a-c) Andamios sin impregnar con propóleos (AC) sin células (CTRL), tras 21 y 28 días de cultivo. d-f) Andamios impregnados con propóleos (AI) sin células (CTRL), tras 21 y 28 días de cultivo. g-i) Pozos sin andamios usados como control, cultivo sin tinción al inicio del experimento y con tinción tras 21 y 28 días de cultivo.

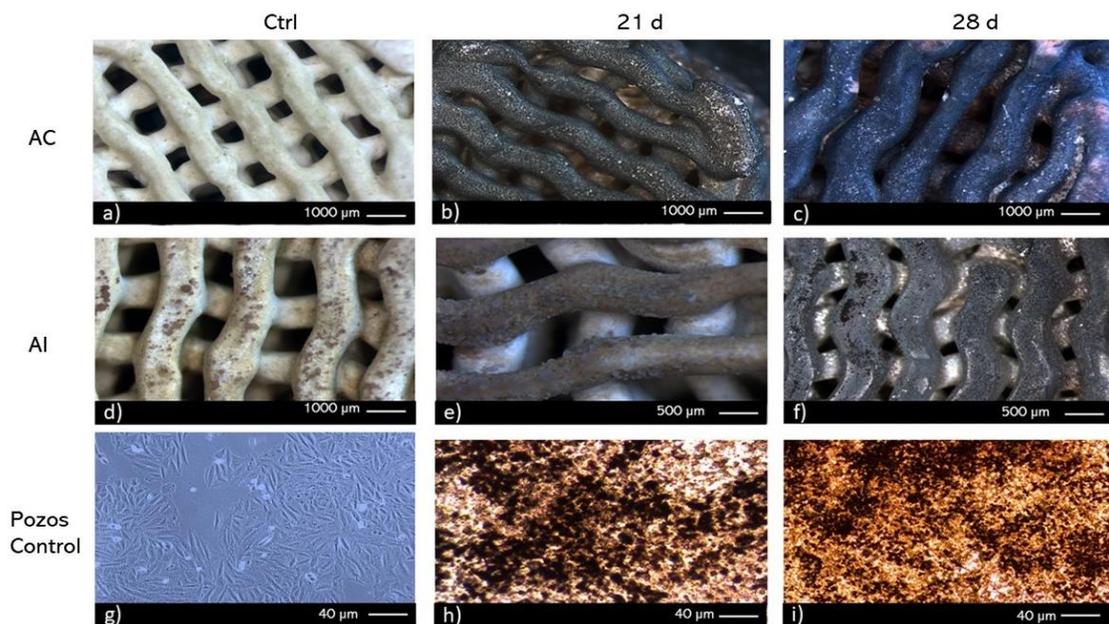


Nombre de la fuente: Ana Isabel Moreno

En la figura 5-6 se observan los resultados de la tinción de Von Kossa de los andamios cultivados con SaOS. Se encontraron depósitos de fosfato cálcico en los dos grupos de andamios durante los dos tiempos evaluados, al igual que en los pozos del cultivo celular sin andamios empleados como control. La deposición aumenta con el tiempo de incubación, tal como se puede ver en las Figuras 5-6 c,f,i, 28 días. Ambos grupos de andamios mostraron nódulos de calcio-fosfato altamente distinguibles en comparación con

el control (Figura 5-6 a,d). Aunque Von Kossa es una evaluación cualitativa, a los 21 días podían observarse diferencias significativas en intensidad y área cubierta entre ambos grupos. A los 28 días de cultivo, la deposición de fosfato cálcico difiere en los dos grupos de andamios. En el grupo AI (Figura 5-6 f) se observa una menor superficie e intensidad de depósitos de fosfato cálcico en la matriz extracelular en comparación con los andamios del grupo AC (Figura 5-6 c). Estos hallazgos concuerdan con informes anteriores (283), en los que los resultados positivos mostraron que las células presentaban una fuerte proliferación y capacidad osteogénica (284). Las áreas mostradas son representativas de la capa celular correspondiente en las condiciones experimentales seleccionadas.

Figura 5-6: Tinción de Von Kossa de los andamios en cultivo con de osteosarcoma humano (SaOS). a-c) Andamios sin impregnar con propóleos (AC) sin células (CTRL), tras 21 y 28 días de cultivo. d-f) Andamios impregnados con propóleos (AI) sin células (CTRL), tras 21 y 28 días de cultivo. g-i) Pozos sin andamios usados como control, cultivo sin tinción al inicio del experimento y con tinción tras 21 y 28 días de cultivo.

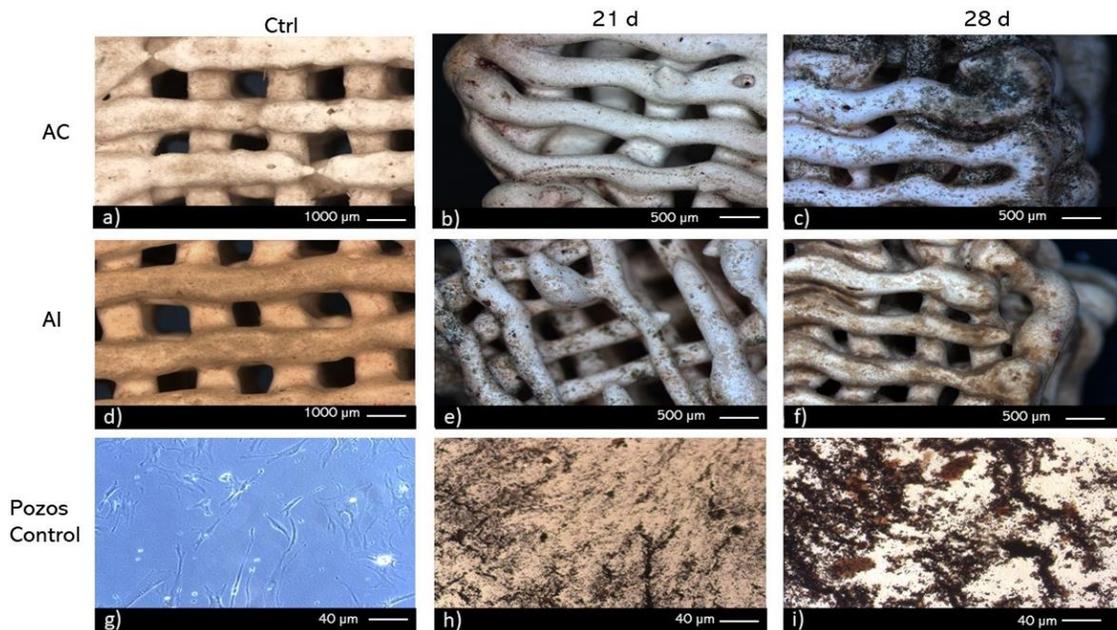


Nombre de la fuente: Ana Isabel Moreno

5.3.4 Tinción de actividad de la Alcalino Fosfatasa (ALP)

La fosfatasa alcalina (ALP) es un marcador del fenotipo osteoblástico que se expresa cuando las células progenitoras se diferencian en osteoblastos. Por lo tanto, a medida que aumenta el número de osteoblastos, su actividad va en aumento (285). Los resultados de la tinción correspondiente a la actividad de la ALP de los andamios cultivados con bmMSC se muestran en la figura 5-7. Es posible observar que la actividad de la ALP se presentó con mayor intensidad en los AC después de 28 días de cultivo. Sin embargo, en los AI también se encontró actividad de la ALP después de 21 días de cultivo. Las zonas de los andamios que mostraron más actividad son aquellas ubicadas en las esquinas y en las que se encuentran curvaturas bien pronunciadas. Los andamios empleados como control de la tinción mostraron una tonalidad marrón leve, mucho menos intensa que la expuesta por los andamios expuestos al cultivo celular.

Figura 5-7: Tinción de la actividad de la alcalina fosfatasa (ALP) de los andamios en cultivo con células madre mesenquimales de médula ósea humana (bmMSC). a-c) Andamios sin impregnar con propóleos (AC) sin células (CTRL), tras 21 y 28 días de cultivo. d-f) Andamios impregnados con propóleos (AI) sin células (CTRL), tras 21 y 28 días de cultivo. g-i) Pozos sin andamios usados como control, cultivo sin tinción al inicio del experimento y con tinción tras 21 y 28 días de cultivo.

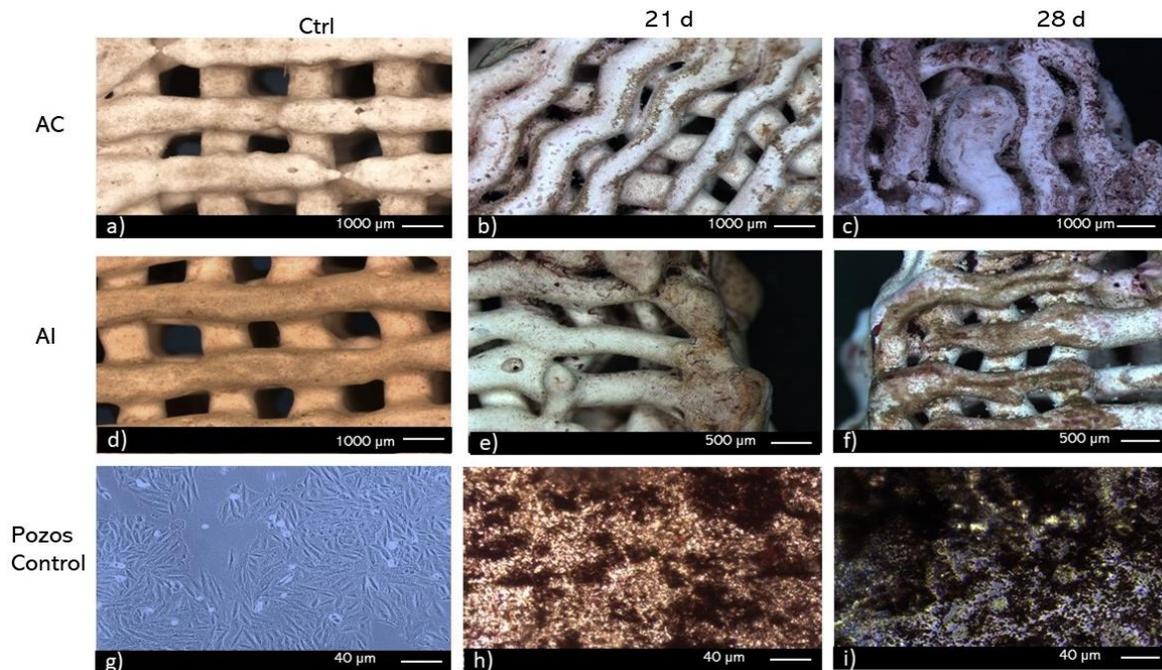


Nombre de la fuente: Ana Isabel Moreno

Los resultados de la tinción en los pozos utilizados como controles fueron positivos tras 21 y 28 días de cultivo (Figura 5-8h-i). Los resultados muestran que en este cultivo de control se observó actividad de la ALP en los dos tiempos evaluados, con una tinción mucho más intensa en el día 28. En el caso de la tinción en los andamios, se puede observar que los andamios de control presentaban una escasa coloración marrón, mientras que los andamios sometidos a cultivo con SaOS mostraron una intensa tinción marrón o negra a los 28 días (Figura 5-8a,d). Esta tinción es menos marcada que la utilizada para identificar los depósitos de calcio, pero sigue la misma tendencia. Tras 21 días de cultivo (figura 5-8 b, c, f, h), el grupo AI mostró una tinción de ALP inferior a la del grupo AC. Sin embargo, tras 28 días de cultivo, se observa una mayor tinción de ALP en el grupo AI en comparación con el grupo AC (figura 5-8c, f).

Figura 5-8: Tinción de la actividad de la alcalina fosfatasa (ALP) de los andamios en cultivo con células de osteosarcoma humano (SaOS). a-c) Andamios sin impregnar con propóleos (AC) sin células (CTRL), tras 21 y 28 días de cultivo. d-f) Andamios impregnados con propóleos (AI) sin células (CTRL), tras 21 y 28 días de cultivo. g-i) Pozos sin andamios usados como control, cultivo sin tinción al inicio del experimento y con tinción tras 21 y 28 días de cultivo.

Producción por manufactura aditiva de andamios con propiedades antimicrobianas a partir de Propóleos de Tame (Arauca) para regeneración ósea.



Nombre de la fuente: Ana Isabel Moreno

La tinción de ALP se utiliza para evaluar el potencial de diferenciación de las células preosteoblásticas para formar tejidos mineralizados (286). Dado que los andamios evaluados aumentaron la actividad de la ALP a tiempos de cultivo más largos, pueden utilizarse como sustitutos óseos permanentes, ya que facilitan la proliferación celular e inducen la formación de nuevo tejido óseo. Esta tendencia podría observarse en otros estudios en los que se evaluó la actividad ALP cuantitativa. Allí se observó un incremento significativo y comparable de ALP, marcadas tinciones de Von Kossa y alizarin red en los andamios en puntos temporales posteriores (21 y 28 días) (272).

5.3.5 Propiedades Mecánicas

En las Figuras 5-9 y 5-10 se muestran los resultados obtenidos de la resistencia a la compresión de los andamios antes y después de las pruebas de proliferación celular durante 21 y 28 días. El análisis estadístico no mostró diferencias significativas entre los

grupos. Además, la resistencia a la compresión de los andamios se mantuvo dentro del rango normal para el hueso trabecular, que normalmente se sitúa entre 0,1-16 MPa (287–289). Estos hallazgos sugieren que el tratamiento de impregnación con propóleo no tiene un impacto significativo en la respuesta mecánica o la función de los andamios. Cabe destacar que, aunque no hubo diferencias estadísticamente significativas en los resultados mecánicos, se produjo un cambio notable en la variabilidad de los resultados de los andamios después de 28 días de proliferación celular, en comparación con los resultados a los 0 y 21 días, como se observa en la Figura 5-9. Este cambio se puede atribuir a la adhesión de las células al andamio, que provocó la eliminación de partículas de wollastonita de la superficie en determinadas zonas, alterando así la repetibilidad de los resultados.

Figura 5-9: Respuesta mecánica de los andamios impregnados (AI) y sin impregnar (AC) en cultivos con células madre mesenquimales de médula ósea humana (bmMSC). No se encontraron diferencias significativas entre los dos grupos ($p < 0.001$).

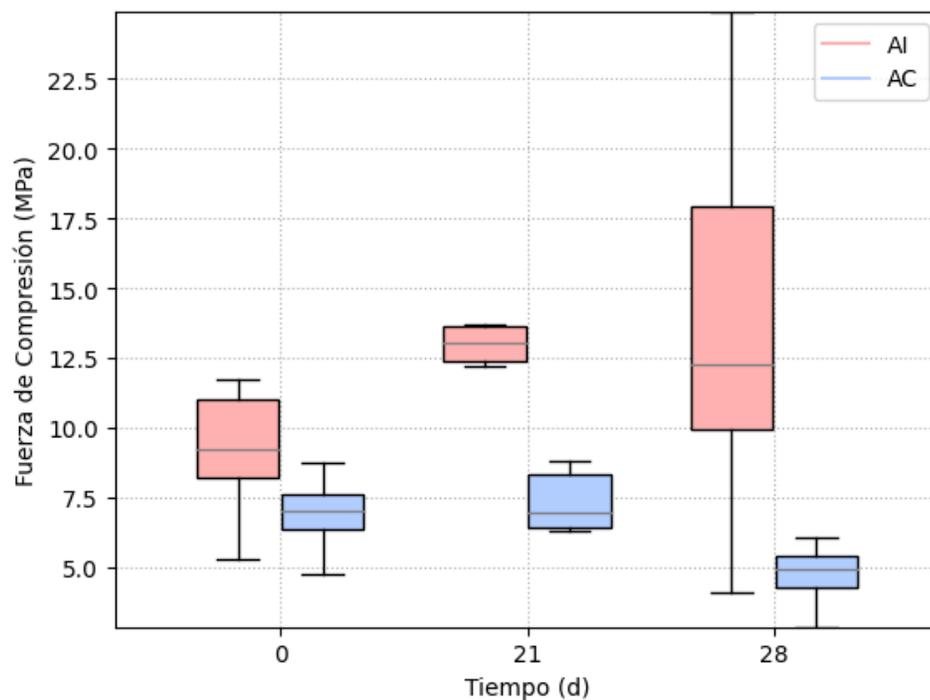
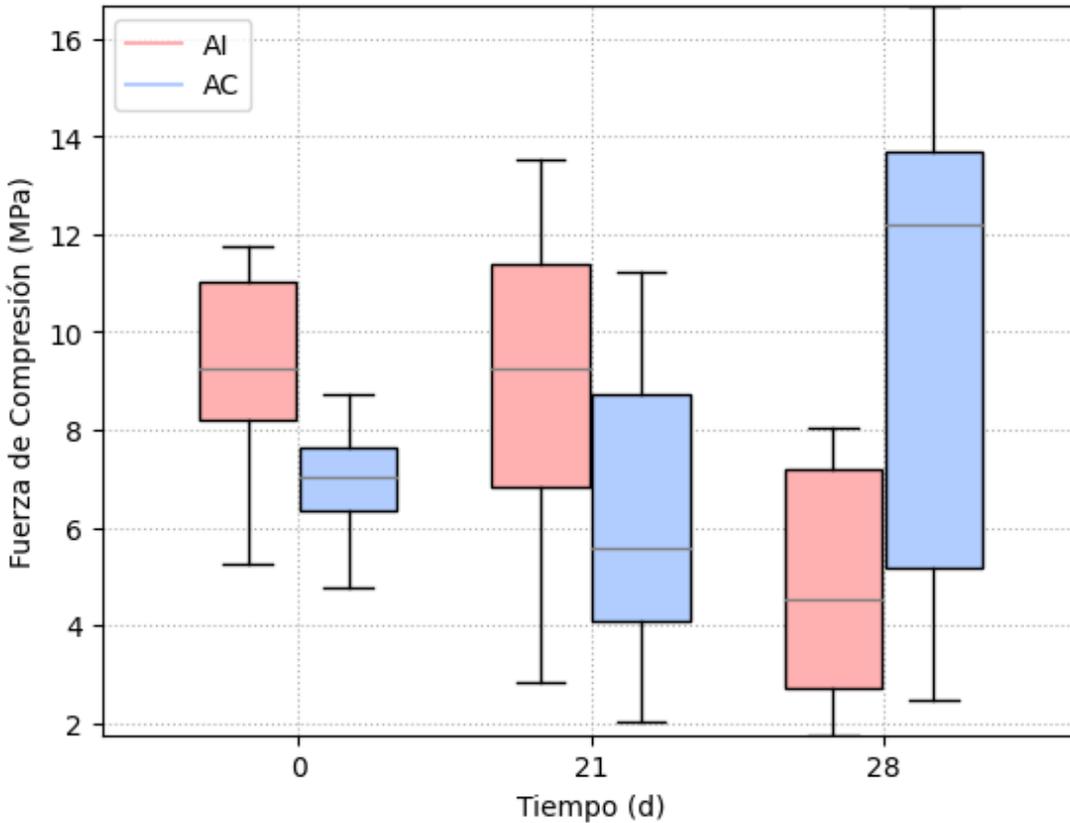


Figura 5-10: Respuesta mecánica de los andamios impregnados (AI) y sin impregnar (AC) en cultivos con células de osteosarcoma humano (SaOS). No se encontraron diferencias significativas entre los dos grupos ($p < 0.001$).



Nombre de la fuente: Ana Isabel Moreno

Los dispositivos cerámicos con formas geométricas de TPMS Gyroid obtenidos en este trabajo, mostraron propiedades mecánicas apropiadas para ser empleadas en aplicaciones de ingeniería de tejido óseo, siendo incluso comparables a la de otras TPMS que han sido ampliamente usadas en este campo (290,291). Esto soporta la idea de que la porosidad y sinuosidad en la geometría conferida a las piezas mediante la conformación por manufactura aditiva de andamios cerámicos, es apta para su utilización en la

reparación y regeneración de lesiones óseas. Adicionalmente, la impregnación de los andamios con propóleo no afectó sus propiedades mecánicas.

5.4 Conclusión

Los andamios porosos obtenidos mediante impresión 3D con geometría de TPMS Gyroid mostraron propiedades mecánicas aptas para ser empleados en la reparación y regeneración de tejido óseo trabecular. Las propiedades mecánicas evaluadas no se vieron alteradas significativamente por la impregnación de los andamios con los extractos etanólicos de propóleos. Los andamios impregnados con los extractos etanólicos de propóleos (EEP) mostraron proliferación celular tanto de células madre mesenquimales obtenidas de médula ósea, así como de la línea de osteosarcoma humano (SaOS) con un comportamiento similar al obtenido en los andamios que no se impregnaron con los EEP. La biocompatibilidad y bioactividad de la wollastonita, así como la geometría empleada favorecieron los procesos proliferativos, gracias a que proporcionan mayor área superficial y liberan iones necesarios para las células. Además, se evidenció un avance en el proceso de mineralización tras 28 días de cultivo en los AI, mostrando así que los propóleos no bloquean este tipo de procesos metabólicos. Con estos resultados se establece una motivación para seguir investigando en la utilización de EEP con el fin de mantener la actividad antimicrobiana y disminuir el impacto que pueden tener en el microambiente celular

6. Conclusiones y recomendaciones

6.1 Conclusiones

La experiencia del grupo de Investigación en Odontología Multidisciplinar (GIOM) en valoración de extractos naturales permitió evaluar de forma eficiente los extractos etanólicos de propóleos y concluir que este producto natural cosechado en Tame (Arauca), cuenta con propiedades fisicoquímicas de calidad de acuerdo con normativas internacionales. Los extractos etanólicos de propóleos evaluados en este trabajo exhibieron una notable capacidad antimicrobiana frente a patógenos relacionados con el desarrollo de osteomielitis, estableciendo una base sólida para su potencial aplicación en el campo de la salud.

Gracias a la trayectoria del grupo de investigación de Materiales Cerámicos y Vítreos de la Universidad Nacional de Colombia fue posible obtener andamios cerámicos porosos con geometrías de TPMS Gyroid mediante impresión 3D, una de las técnicas menos complejas y económicas de la manufactura aditiva. Estos andamios mostraron ser biocompatibles y con potencial antimicrobiano frente a cepas relacionadas con el desarrollo de osteomielitis gracias a su modificación con extractos etanólicos de propóleos. Estas características los convierten en una herramienta prometedora para regeneración ósea.

La evaluación del comportamiento mecánico de los andamios arrojó una resistencia a la compresión similar a la del hueso trabecular natural, además se constató que esta capacidad de resistencia a la carga no se ve afectada en los andamios tras ser expuestos a 28 días de cultivo celular, indicando que podrían seguir siendo funcionales durante un período de tiempo mientras el tejido óseo natural realiza los procesos de regeneración. Adicionalmente se encontró que la impregnación con propóleos no genera ningún tipo de efecto en las propiedades mecánicas en los andamios.

La valoración *in vitro* de los andamios mostró biocompatibilidad frente a los cultivos empleados y bajo efecto citotóxico de los extractos etanólicos de propóleos. Aunque la evaluación no fue realizada en células de linaje osteoblástico, los andamios mostraron funcionar de forma óptima como soporte para que ocurrieran los procesos de diferenciación celular y mineralización. Adicionalmente, estos ensayos demostraron el potencial de la wollastonita para la fabricación de dispositivos implantables a nivel óseo y constataron que la geometría de TPMS Gyroid facilita la proliferación celular dada su morfología sinusoidal. Aunque el porcentaje de porosidad de los andamios obtenidos es mayor al 80% en la estructura del andamio, las propiedades mecánicas se mantienen adecuadas para soportar cargas similares a las soportadas por el hueso esponjoso o trabecular.

La impregnación de los extractos etanólicos de propóleos mostró efectividad frente al control de dos cepas involucradas en el desarrollo de osteomielitis y con una elevada capacidad de desarrollar resistencia antibiótica, logrando una reducción significativa en la formación de biopelículas en los andamios impregnados con los extractos frente a los andamios que no se modificaron con los propóleos. Esta efectividad se mantuvo incluso al evaluar el efecto antibacteriano frente a cultivos multiespecie de estas cepas, los cuales se caracterizan por tener un factor de virulencia considerablemente mayor. Este hecho es importante ya que representa una estrategia prometedora para disminuir la incidencia del fallo de implantes debido a la osteomielitis.

6.2 Recomendaciones

Los resultados encontrados en este trabajo representan un punto de partida para seguir ampliando el conocimiento en el campo de la regeneración ósea. Sin embargo, existen algunas recomendaciones que requieren ser abordadas en el futuro con el fin de seguir ampliando el conocimiento en este sentido:

Se recomienda realizar estudios que aborden otras metodologías de la manufactura aditiva con el fin de lograr una estandarización frente al proceso de fabricación de los andamios,

debido a que, aunque la impresión 3D mostró un rendimiento bastante satisfactorio, resulta ser un proceso dispendioso y en ocasiones problemático para obtener en todas las muestras el nivel de resolución deseado.

Se recomienda realizar más estudios en los cuales se evalúe la acción antibacteriana de los extractos etanólicos de propóleos frente a cultivos multiespecie más elaborados e incluso frente a cultivos con cepas multirresistentes, puesto que el control de este tipo de cepas presenta uno de los mayores retos sanitarios en la actualidad. Aunque a la fecha existen algunos estudios que han mostrado cierto efecto de los extractos etanólicos de propóleos frente a cepas multirresistentes de *S. aureus*, es importante corroborar que este efecto se mantiene al modificar andamios para inserción ósea con estos agentes.

Adicionalmente, es importante evaluar el efecto de los andamios en cultivos celulares expuestos durante más tiempo, para comprender a profundidad la interacción del material y de la estructura del andamio en el tiempo, permitiendo garantizar que sus características de resistencia mecánicas van a seguir siendo óptimas mientras el hueso se regenera. Posteriormente, es necesario realizar estudios *in vivo* que permitan evaluar el comportamiento de los andamios en un organismo vivo y demostrar su potencial aplicación.

Se recomienda presentar los resultados de este estudio a empresas del sector de la salud, que puedan interesarse en continuar con la investigación para consolidar la posibilidad de tener este tipo de andamios como un producto en el mercado en un futuro cercano. De esta manera, la universidad a través de sus investigaciones podrá impactar el sistema de salud y mejorar la calidad de vida de muchos pacientes.

A. Anexo: Artículo 1.

MRS Advances (2021) 6:434–443
https://doi.org/10.1557/s43580-021-00036-x



ORIGINAL PAPER



Influence of composition of β -TCP and borate bioglass scaffolds on cell proliferation of adipose tissue-derived mesenchymal stem cells: osteogenic differentiation

N. Jaramillo^{1,3} · A. Moreno² · R. Sánchez³ · V. Ospina⁴ · A. Peláez-Vargas² · C. García¹ · Carlos Paucar¹

Received: 17 December 2020 / Accepted: 23 February 2021 / Published online: 3 March 2021
© The Author(s), under exclusive licence to The Materials Research Society 2021

Abstract

Scaffolds with Schwarz D geometry based on triply periodic minimal surfaces (TPMS) were obtained by 3D printing with a biodegradable and bioactive paste (66.5% calcium phosphate with and without magnesium, 28.5% bioglass borate (BGBS), 3% attapulgite, and 2% water by weight). The osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells (hMSC) was performed from human adipose tissue (ADSCs) in the presence of the scaffolds, which were characterized by degradability (International Organization for Standardization ISO 10993—Part: 14), *in vitro* bioactivity by immersion tests in SBF arranged by Kokubo at different time intervals, cell proliferation, and osteogenic differentiation by alkaline phosphatase activity. Calcium phosphate is associated with β -tricalcium phosphate (β -TCP), in addition to amorphous Bioglass Borate. Scaffolds with calcium and magnesium phosphate (β -TCP/Mg) showed better degradability and bioactivity than scaffolds without Mg. Both scaffolds showed porosity and pore interconnectivity. Mesenchymal stem cells showed good adhesion and cell proliferation in contact with the scaffolds. Scaffolds doped with Mg were better promoters of cellular proliferation, additionally they did not show a cytotoxic effect. Differentiation of the osteogenic environment was verified by alkaline phosphatase activity.

Introduction

The bone is the second most commonly transplanted tissue making the use of bone grafts and or bone substitute materials with limitation associated to risks of disease transmission and the lack of cellular component generating stress and failure at long term [1, 2]. Different treatments for diseases related to bone tissue regeneration use the combination of different areas like tissue engineering by manufacture of porous 3D scaffolds of different composition

and regenerative medicine by mesenchymal stem cells adhesion to the surface of the scaffold that promotes bone regeneration and cell survival as top alternative solutions [3]. As adipose-derived mesenchymal stem cells (ADSC) have to be characterized with cell surface markers like CD73, CD90, and CD105 with expression over 90%, they have the ability to differentiate into several tissue including osteocytes (bone), chondrocytes, and adipocytes, making them appropriate to be used for tissue regeneration with different materials. Hydroxyapatite (HA), tricalcium phosphate (TCP), or their mixture biphasic calcium phosphate (BCP) and their osteoconductive properties and easy 3D geometry play a significant role in the cell survival and proliferation due to the closely mimics of the native tissue [4]. In bone regeneration, some implants are based on magnesium because of biodegradability of and ability to enhance bone healing. Despite having good contributions to bone regeneration by magnesium, its role in osteogenesis is still unclear [5]. Knowing that these materials promote cell survival, adhesion, and proliferation of mesenchymal stem cells, we evaluated the *in vitro* capacity of osteogenic differentiation of adipose-derived mesenchymal stem cells in scaffolds composed of bioglass of borate and β -TCP embed with or without Mg (doping). The optimal formulation of the ceramic paste

✉ Carlos Paucar
cgpauca@unal.edu.co

¹ Grupo de Cerámicos y vítreos, Universidad Nacional de Colombia Sede Medellín, 050034 Medellín, Colombia

² GIOM Group, Facultad de Odontología, Universidad Cooperativa de Colombia Sede Medellín, Medellín, Colombia

³ Grupo SUMAR, Facultad de Ciencias Empresariales, Fundación Universitaria María Cano Sede Medellín, Medellín, Colombia

⁴ Laboratorio de Genética, Grupo de Biotecnología Animal, Universidad Nacional de Colombia Sede Medellín, 050034 Medellín, Colombia

B. Anexo: Artículo 2.

Heliyon 9 (2023) e13176



Research article

Fabrication of polycaprolactone/calcium phosphates hybrid scaffolds impregnated with plant extracts using 3D printing for potential bone regeneration

Claudia García^{a,*}, Yeison Orozco^b, Alejandra Betancur^b, Ana Isabel Moreno^b, Katherine Fuentes^c, Alex Lopera^d, Oscar Suarez^e, Tatiana Lobo^f, Alexander Ossa^g, Alejandro Peláez-Vargas^h, Carlos Paucarⁱ

^a Universidad Nacional de Colombia sede Medellín, Physics school, Grupo de Materiales Cerámicos y Vítreos, Colombia

^b Universidad Nacional de Colombia sede Medellín, Grupo de Materiales Cerámicos y Vítreos, Colombia

^c Universidad Nacional de Colombia sede Medellín, Colombia

^d Grupo de Nanoestructuras y Física Aplicada (NANOUPAR), Dirección Académica, Universidad Nacional de Colombia, Sede de La Paz, Km 9 vía Vallejupar La Paz, La Paz 202010, Colombia

^e Universidad Nacional de Colombia sede Orinoquía, Colombia

^f Universidad Nacional de Colombia sede Medellín, Chemistry school, Colombia

^g School of Applied Sciences and Engineering, Universidad Eafit, Medellín, Colombia

^h Universidad Cooperativa de Colombia, Medellín, Colombia

ⁱ Universidad Nacional de Colombia sede Medellín, Chemistry school, Grupo de Materiales Cerámicos y Vítreos, Colombia

ARTICLE INFO

Keywords:

Scaffold
3-D printing
Natural extracts
Impregnation method
Polycaprolactone
Calcium phosphate

ABSTRACT

The increase in critical bone diseases and defects in the world's population increases the need for bone substitutes to restore form and function. Organic and inorganic scaffolds with antibacterial properties could provide advantages for bone regeneration. In this study, we obtained scaffolds of polycaprolactone (PCL) charged with calcium phosphates nanoparticles and impregnated with extracts of Colombian plants as an alternative for potential bone regeneration. Calcium phosphate nanoparticles were obtained via auto-combustion synthesis. The nanoparticles were incorporated into the PCL with a chemical dissolution-disperse process. The composite obtained was used to produce a filament to print Triply Periodic Minimal Surface (TPMS) based scaffolds. Such geometry facilitates cellular growth thanks to its interconnected porosity. The scaffolds were impregnated with extracts of *Justicia cf colorifera* (Acanthaceae), and *Bilia rosea* (Sapindaceae) due to their ancestral medical applications. A physical and biological characterization was conducted. The process to print scaffolds with an enhanced geometry to facilitate the flux of biological fluids was successful. The scaffolds loaded with *B. rosea* showed strong antibacterial behavior, suggesting the presence of reported terpenoids with antibacterial properties. The approach used in this study evidenced promising prospects for bone defect repair.

* Corresponding author. Universidad Nacional de Colombia sede Medellín, Carrera 65 # 59A-100, Medellín, Colombia.

E-mail addresses: cpgarcia@unal.edu.co (C. García), yaorozco@unal.edu.co (Y. Orozco), albetancurpa@unal.edu.co (A. Betancur), animoreno@unal.edu.co (A.I. Moreno), kfuentesar@unal.edu.co (K. Fuentes), aalopera@unal.edu.co (A. Lopera), oesuarzmo@unal.edu.co (O. Suarez), tloboech@unal.edu.co (T. Lobo), eossa@eafit.edu.co (A. Ossa), alejandro.pelaezv@campusucc.edu.co (A. Peláez-Vargas), cgpauca@unal.edu.co (C. Paucar).

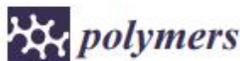
<https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2023.e13176>

Received 8 October 2022; Received in revised form 19 January 2023; Accepted 20 January 2023

Available online 25 January 2023

2405-8440/© 2023 The Authors. Published by Elsevier Ltd. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

C. Anexo: Artículo 3.



Article

Effects of Propolis Impregnation on Polylactic Acid (PLA) Scaffolds Loaded with Wollastonite Particles against *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, and Their Coculture for Potential Medical Devices

Ana Isabel Moreno ¹, Yeison Orozco ¹, Sebastián Ocampo ¹, Sarita Malagón ², Alex Ossa ³, Alejandro Peláez-Vargas ², Carlos Paucar ¹, Alex Lopera ⁴ and Claudia García ^{1,*}

¹ Grupo de Cerámicos y Vitreos, Universidad Nacional de Colombia sede Medellín, Medellín 050034, Colombia

² Faculty of Dentistry, Universidad Cooperativa de Colombia sede Medellín, Medellín 055422, Colombia

³ School of Applied Sciences and Engineering, Universidad Eafit, Medellín 050022, Colombia

⁴ Grupo de Nanoestructuras y Física Aplicada (NANOUFAR), Universidad Nacional de Colombia, La Paz 202017, Colombia

* Correspondence: cpgarcia@unal.edu.co; Tel: +57-604-4309842



Citation: Moreno, A.I.; Orozco, Y.; Ocampo, S.; Malagón, S.; Ossa, A.; Peláez-Vargas, A.; Paucar, C.; Lopera, A.; García, C. Effects of Propolis Impregnation on Polylactic Acid (PLA) Scaffolds Loaded with Wollastonite Particles against *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, and Their Coculture for Potential Medical Devices. *Polymers* **2023**, *15*, 2629. <https://doi.org/10.3390/polym15122629>

Academic Editor: Alberto Romero García

Received: 17 April 2023

Revised: 9 May 2023

Accepted: 13 May 2023

Published: 9 June 2023



Copyright: © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: Several diseases and injuries cause irreversible damage to bone tissues, which may require partial or total regeneration or replacement. Tissue engineering suggests developing substitutes that may contribute to the repair or regeneration process by using three-dimensional lattices (scaffolds) to create functional bone tissues. Herein, scaffolds comprising polylactic acid and wollastonite particles enriched with propolis extracts from the Arauca region of Colombia were developed as gyroid triply periodic minimal surfaces using fused deposition modeling. The propolis extracts exhibited antibacterial activity against *Staphylococcus aureus* (ATCC 25175) and *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 12228), which cause osteomyelitis. The scaffolds were characterized using scanning electron microscopy, Fourier-transform infrared spectroscopy, differential scanning calorimetry, contact angle, swelling, and degradation. Their mechanical properties were assessed using static and dynamic tests. Cell viability/proliferation assay was conducted using hDP-MS-C cultures, while their bactericidal properties against monospecies cultures (*S. aureus* and *S. epidermidis*) and cocultures were evaluated. The wollastonite particles did not affect the physical, mechanical, or thermal properties of the scaffolds. The contact angle results showed that there were no substantial differences in the hydrophobicity between scaffolds with and without particles. Scaffolds containing wollastonite particles suffered less degradation than those produced using PLA alone. A representative result of the cyclic tests at $F_{max} = 450$ N showed that the maximum strain reached after 8000 cycles is well below the yield strain (i.e., <7.5%), thereby indicating that even under these stringent conditions, these scaffolds will be able to work properly. The scaffolds impregnated with propolis showed a lower % of cell viability using hDP-MS-C on the 3rd day, but these values increased on the 7th day. These scaffolds exhibited antibacterial activity against the monospecies cultures of *S. aureus* and *S. epidermidis* and their cocultures. The samples without propolis loads did not show inhibition halos, whereas those loaded with EEP exhibited halos of 17.42 ± 0.2 mm against *S. aureus* and 12.9 ± 0.5 mm against *S. epidermidis*. These results made the scaffolds possible bone substitutes that exert control over species with a proliferative capacity for the biofilm-formation processes required for typical severe infectious processes.

Keywords: scaffolds; propolis; antibacterial activity; TPMS; additive manufacturing

1. Introduction

Several tissues of the human body require partial or total regeneration or replacement owing to different diseases and injuries that cause irreversible damage. Bones are the

D. Anexo: Artículo 4.

Materials Letters 350 (2023) 134907



Contents lists available at ScienceDirect

Materials Letters

journal homepage: www.elsevier.com/locate/matlet

Effect of synthesis on the antimicrobial response of β -TCP/Mg with potential applications in the regeneration of dental tissue: 3D printing of ceramic paste in a β -TCP/Mg/bioglass system

N. Jaramillo^{a,b,*}, A. Moreno^{a,c}, V. Ospina^d, A. Lopera^{a,e}, A. Peláez-Vargas^c, N.I Cupitra^f, C. García^a, C. Paucar^a

^a Grupo de Cerámicas y Vitreos, Escuela de Física, Universidad Nacional de Colombia, Calle 59A.63-20, 050034 Medellín, Colombia

^b Grupo SUMAR, Fundación Universitaria María Cano, 050012 Medellín, Colombia

^c GIOM group, Universidad Cooperativa de Colombia, 050012 Medellín, Colombia

^d Animal Biotechnology Group, Universidad Nacional de Colombia, 050034 Medellín, Colombia

^e Grupo de Nanoestructuras y Física Aplicada (NANOUPAR), Dirección Académica, Universidad Nacional de Colombia, Sede de La Paz, Km 9 vía Valledupar La Paz, 202010 La Paz, Colombia

^f Grupo FISOTER, Fundación Universitaria María Cano, 050012 Medellín, Colombia

ARTICLE INFO

Keywords:

Calcium phosphate synthesis
Co-culture
Streptococcus mutans
Candida albicans
Regeneration of dental tissue

ABSTRACT

This work aims to determine the most suitable synthesis route using calcium phosphate ceramic pastes with Mg to generate scaffolds with antimicrobial activity against *Candida albicans* and *Streptococcus mutans* from ceramic powders obtained by sol-gel (SGM) and self-combustion (SCM) routes. Calcium phosphates in SGM processes present a mixture of several types of crystalline phases, whereas SCM leads to a single β -TCP phase. The *in vitro* antimicrobial activity study showed that CP-C/Mg by SCM had a better effect than CP-S by SGM against *C. albicans*. For *S. mutans*, no inhibitory effect was found. In addition, the co-culture of these two species showed an inhibitory effect on the evaluated materials. These results formulated a ceramic paste based on the β -TCP/Mg/bioglass system by the design of experiments to obtain 3D-printed scaffolds. These ceramic materials show promise as devices for the regeneration of dental tissues.

1. Introduction

The formation of dental plaque can lead to the development of caries, leading to the destruction of hard tissues and an imbalance between the processes of mineralization and demineralization of tooth enamel [1], so it is necessary to consider the effect of the designed materials in relation to specific pathogens of the dental area *S. mutans* and *C. albicans*. Sol-gel (SGM) and self-combustion (SCM) routes have been used to synthesize calcium phosphates with biologically suitable size, morphology as well as behavior. The objective of this study is to compare the antimicrobial activity of magnesium-doped and undoped calcium phosphate powders obtained by the SGM and SCM routes against *C. albicans* and *S. mutans* strains and their respective co-cultures, as well as their use in obtaining 3D scaffolds for bone tissue engineering applications.

2. Experimental

The calcium phosphate powders were synthesized by SGM (CP-S) and SCM (CP-C). CP-S and CP-C were doped with 5% by weight of Mg. For SCM, aqueous solutions of tetrahydrate calcium nitrate were mixed in a molar ratio Ca/P = 1.50, necessary to form β -tricalcium phosphate, triethyl phosphate (TEP- $C_6H_{15}O_4P$ -Merck, purity $\geq 99.0\%$) as raw material, and ($C_2H_5NO_2$, Merck, purity $\geq 98.5\%$) as fuel. Ceramic powders were characterized by X-ray diffraction (XRD) and Fourier-Transform Infrared Spectroscopy (FTIR). A boron bioglass within the X B₂O₃ [100-X] (61SiO₂-9P₂O₅-30CaO) system with x = 30 mol% was used by SGM from Si(OC_2H_5)₄, (C_2H_5O)₃PO, Ca(NO₃)₂·4H₂O and H₃BO₃ solutions. The syntheses were carried out by hydrolysis and polycondensation of stoichiometric amounts of oxide precursors. Each precursor was mixed with the appropriate solvent. Synthesized by Sol-gel. They were sintered at a temperature of 600 °C/2h. After that, the

* Corresponding author at: Ceramics and Vitreous group, Universidad Nacional de Colombia, 59A St.#63-20, Medellín, Colombia.
E-mail address: njarami@unal.edu.co (N. Jaramillo).

<https://doi.org/10.1016/j.matlet.2023.134907>

Received 31 January 2023; Received in revised form 2 May 2023; Accepted 10 July 2023

Available online 12 July 2023

0167-577X/© 2023 Published by Elsevier B.V.

E. Anexo: Artículo 5.

Heliyon 10 (2024) e23955



Contents lists available at [ScienceDirect](#)

Heliyon

journal homepage: www.cell.com/heliyon



Antibacterial and osteoinductive properties of wollastonite scaffolds impregnated with propolis produced by additive manufacturing

Ana Isabel Moreno Florez^a, Sarita Malagon^b, Sebastian Ocampo^a, Sara Leal-Marin^c, Jesús Humberto Gil González^d, Andres Diaz-Cano^a, Alex Lopera^e, Carlos Paucar^a, Alex Ossa^f, Birgit Glasmacher^c, Alejandro Peláez-Vargas^b, Claudia Garcia^{a,*}

^a Grupo de Cerámicos y Vitreos, Universidad Nacional de Colombia sede Medellín, Medellín 050034, Colombia

^b Faculty of Dentistry, Universidad Cooperativa de Colombia sede Medellín, Medellín 055422, Colombia

^c Institute for Multiphase Processes (IMP), Leibniz University Hannover, Garbsen, Germany, Lower Saxony Center for Biomedical Engineering, Implant Research and Development, Hannover, Germany

^d Departamento de ingeniería agrícola y alimentos. Facultad de ciencias agrarias. Universidad Nacional de Colombia sede Medellín, Colombia

^e Grupo de Nanoestructuras y Física Aplicada (NANOUFAR), Universidad Nacional de Colombia, La Paz 202017, Colombia

^f School of Applied Sciences and Engineering, Universidad Eafit, Medellín 050022, Colombia

ARTICLE INFO

Keywords:
Scaffolds
Propolis
3D printing
Antibacterial activity
Cell proliferation

ABSTRACT

Biocompatible ceramic scaffolds offer a promising approach to address the challenges in bone reconstruction. Wollastonite, well-known for its exceptional biocompatibility, has attracted significant attention in orthopedics and craniofacial fields. However, the antimicrobial properties of wollastonite have contradictory findings, necessitating further research to enhance its antibacterial characteristics. This study aimed to explore a new approach to improve *in vitro* biological response in terms of antimicrobial activity and cell proliferation by taking advantage of additive manufacturing for the development of scaffolds with complex geometries by 3D printing using propolis-modified wollastonite. The scaffolds were designed with a TPMS (Triply Periodic Minimal Surface) gyroid geometric shape and 3D printed prior to impregnation with propolis extract. The paste formulation was characterized by rheometric measurements, and the presence of propolis was confirmed by FTIR spectroscopy. The scaffolds were comprehensively assessed for their mechanical strength. The biological characterization involved evaluating the antimicrobial effects against *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. *emplovine* Minimum Inhib-

F. Anexo: Artículo 6.



OPEN ACCESS

EDITED BY
Christiane Laranjo Salgado,
Universidade do Porto, Portugal

REVIEWED BY
Joana Barros,
Universidade do Porto, Portugal
Arnaldo R. Santos Jr.,
Federal University of ABC, Brazil

*CORRESPONDENCE
Alejandro Pelaez-Vargas,
✉ alejandro.pelaezv@campusucc.edu.co

RECEIVED 14 October 2023
ACCEPTED 11 January 2024
PUBLISHED 01 February 2024

CITATION
Moreno Florez AI, Malagon S, Ocampo S,
Leal-Marín S, Ossa EA, Glasmacher B, Garcia C
and Pelaez-Vargas A (2024), *In vitro* evaluation
of the osteogenic and antimicrobial potential of
porous wollastonite scaffolds impregnated with
ethanolic extracts of propolis.
Front. Bioeng. Biotechnol. 12:1321466.
doi: 10.3389/fbioe.2024.1321466

COPYRIGHT
© 2024 Moreno Florez, Malagon, Ocampo,
Leal-Marín, Ossa, Glasmacher, Garcia and
Pelaez-Vargas. This is an open-access article
distributed under the terms of the [Creative
Commons Attribution License \(CC BY\)](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/). The use,
distribution or reproduction in other forums is
permitted, provided the original author(s) and
the copyright owner(s) are credited and that the

In vitro evaluation of the osteogenic and antimicrobial potential of porous wollastonite scaffolds impregnated with ethanolic extracts of propolis

Ana Isabel Moreno Florez¹, Sarita Malagon², Sebastian Ocampo¹,
Sara Leal-Marín^{3,4}, Edgar Alexander Ossa⁵, Birgit Glasmacher^{3,4},
Claudia Garcia¹ and Alejandro Pelaez-Vargas^{2*}

¹Grupo de Materiales Cerámicos y Vitreos, Universidad Nacional de Colombia Sede Medellín, Medellín, Colombia, ²Grupo GIOM, Facultad de Odontología, Universidad Cooperativa de Colombia, Sede Medellín, Colombia, ³Institute for Multiphase Processes (IMP), Leibniz University Hannover, Garbsen, Germany, ⁴Lower Saxony Center for Biomedical Engineering, Implant Research and Development, Hannover, Germany, ⁵School of Applied Sciences and Engineering, Universidad Eafit, Medellín, Colombia

Context: The development of porous devices using materials modified with various natural agents has become a priority for bone healing processes in the oral and maxillofacial field. There must be a balance between the proliferation of eukaryotic and the inhibition of prokaryotic cells to achieve proper bone health. Infections might inhibit the formation of new alveolar bone during bone graft augmentation.

Objective: This study aimed to evaluate the *in vitro* osteogenic behavior of human bone marrow stem cells and assess the antimicrobial response to 3D-

Bibliografía

1. Nickolas TL, Leonard MB, Shane E. Chronic kidney disease and bone fracture: a growing concern. *Kidney Int.* 2008;74(6):721-31.
2. Iqbal MM. Osteoporosis: Epidemiology, Diagnosis, and Treatment: *South Med J.* 2000;93(1):2-19.
3. Compston J. HIV infection and bone disease. *J Intern Med.* 2016;280(4):350-8.
4. Kanis JA, Johnell O, Oden A, Johansson H, McCloskey E. FRAX™ and the assessment of fracture probability in men and women from the UK. *Osteoporos Int.* 2008;19(4):385-97.
5. Tu KN, Lie JD, Wan CKV, Cameron M, Austel AG, Nguyen JK, et al. Osteoporosis: A Review of Treatment Options. *P T Peer-Rev J Formul Manag.* 2018;43(2):92-104.
6. Levy S, Feduska JM, Sawant A, Gilbert SR, Hensel JA, Ponnazhagan S. Immature myeloid cells are critical for enhancing bone fracture healing through angiogenic cascade. *Bone.* 2016;93:113-24.
7. Miranda LL, Guimarães-Lopes VDP, Altoé LS, Sarandy MM, Melo FCSA, Novaes RD, et al. Plant Extracts in the Bone Repair Process: A Systematic Review. *Mediators Inflamm.* 2019;2019:1-22.
8. Hoexter DL. Bone Regeneration Graft Materials. *J Oral Implantol.* 2002;28(6):290-4.
9. Limmahakhun S, Oloyede A, Sitthiseripratip K, Xiao Y, Yan C. 3D-printed cellular structures for bone biomimetic implants. *Addit Manuf.* 2017;15:93-101.
10. Kashirina A, Yao Y, Liu Y, Leng J. Biopolymers as bone substitutes: a review. *Biomater Sci.* 2019;7(10):3961-83.
11. Qu H, Fu H, Han Z, Sun Y. Biomaterials for bone tissue engineering scaffolds: a review. *RSC Adv.* 2019;9(45):26252-62.
12. Venkatraman SK, Swamiappan S. Review on calcium- and magnesium-based silicates for bone tissue engineering applications. *J Biomed Mater Res A.* 2020;108(7):1546-62.
13. Liu A, Sun M, Shao H, Yang X, Ma C, He D, et al. The outstanding mechanical response and bone regeneration capacity of robocast dilute magnesium-doped wollastonite scaffolds in critical size bone defects. *J Mater Chem B.* 2016;4(22):3945-58.
14. Shao H, Liu A, Ke X, Sun M, He Y, Yang X, et al. 3D robocasting magnesium-doped wollastonite/TCP bioceramic scaffolds with improved bone regeneration capacity in critical sized calvarial defects. *J Mater Chem B.* 2017;5(16):2941-51.
15. Saleh Alghamdi S, John S, Roy Choudhury N, Dutta NK. Additive Manufacturing of Polymer Materials: Progress, Promise and Challenges. *Polymers.* 2021;13(5):753.

Bibliografia

16. Jorge LS, Chueire AG, Rossit ARB. Osteomyelitis: a current challenge. *Braz J Infect Dis Off Publ Braz Soc Infect Dis.* 2010;14(3):310-5.
17. Carek P, Dickerson L, Sack J. Diagnosis and Management of Osteomyelitis. *Am Fam Physician.* 2001; 63(12):2413-20.
18. Healy B, Freedman A. Infections. *BMJ.* 2006;332(7545):838-41.
19. Ciampolini J. Pathophysiology of chronic bacterial osteomyelitis. Why do antibiotics fail so often? *Postgrad Med J.* 2000;76(898):479-83.
20. Hesham M, Elshishtawy H, El Kady S, Wahied D. Antibacterial Effect of Pre-constructed 3D Bone Scaffolds before and after Modification with Propolis. *Open Access Maced J Med Sci.* 2022;10(A):295-300.
21. Marcucci MC. Propolis: chemical composition, biological properties and therapeutic activity. *Apidologie.* 1995;26(2):83-99.
22. El Menyiy N, Bakour M, El Ghouzi A, El Guendouz S, Lyoussi B. Influence of Geographic Origin and Plant Source on Physicochemical Properties, Mineral Content, and Antioxidant and Antibacterial Activities of Moroccan Propolis. Alencar SMD, editor. *Int J Food Sci.* 2021;2021:1-12.
23. Hegazi AG, El Hady FKA. Egyptian Propolis: 3. Antioxidant, Antimicrobial Activities and Chemical Composition Of Propolis From Reclaimed Lands. *Z Für Naturforschung C.* 2002;57(3-4):395-402.
24. Sabir A, Sumidarti A. Interleukin-6 expression on inflamed rat dental pulp tissue after capped with *Trigona* sp. propolis from south Sulawesi, Indonesia. *Saudi J Biol Sci.* 2017;24(5):1034-7.
25. Forma E, Brys M. Anticancer Activity of Propolis and Its Compounds. *Nutrients.* 2021;13(8):2594.
26. Machado CS, Mokochinski JB, Lira TOD, De Oliveira FDCE, Cardoso MV, Ferreira RG, et al. Comparative Study of Chemical Composition and Biological Activity of Yellow, Green, Brown, and Red Brazilian Propolis. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2016;2016:1-11.
27. Fallahiarezoudar E, Ahmadipourroudposht M, Idris A, Mohd Yusof N. A review of: Application of synthetic scaffold in tissue engineering heart valves. *Mater Sci Eng C.* 2015;48:556-65.
28. Zhang L, Yang G, Johnson BN, Jia X. Three-dimensional (3D) printed scaffold and material selection for bone repair. *Acta Biomater.* 2019;84:16-33.
29. Farré-Guasch E, Wolff J, Helder MN, Schulten EAJM, Forouzanfar T, Klein-Nulend J. Application of Additive Manufacturing in Oral and Maxillofacial Surgery. *J Oral Maxillofac Surg.* 2015;73(12):2408-18.

30. Bhumiratana S, Vunjak-Novakovic G. Concise Review: Personalized Human Bone Grafts for Reconstructing Head and Face. *Stem Cells Transl Med.* 2012;1(1):64-9.
31. Jazayeri HE, Tahriri M, Razavi M, Khoshroo K, Fahimipour F, Dashtimoghadam E, et al. A current overview of materials and strategies for potential use in maxillofacial tissue regeneration. *Mater Sci Eng C.* 2017;70:913-29.
32. Mallick M, Are RP, Babu AR. An overview of collagen/bioceramic and synthetic collagen for bone tissue engineering. *Materialia.* 2022;22:101391.
33. Melek LN. Tissue engineering in oral and maxillofacial reconstruction. *Tanta Dent J.* 2015;12(3):211-23.
34. Henkel J, Woodruff MA, Epari DR, Steck R, Glatt V, Dickinson IC, et al. Bone Regeneration Based on Tissue Engineering Conceptions — A 21st Century Perspective. *Bone Res.* 2013;1(3):216-48.
35. Peacock ZS. Controversies in Oral and Maxillofacial Pathology. *Oral Maxillofac Surg Clin N Am.* 2017;29(4):475-86.
36. Rao N, Ziran BH, Lipsky BA. Treating Osteomyelitis: Antibiotics and Surgery: *Plast Reconstr Surg.* 2011;127:177S-187S.
37. Fischbach MA, Walsh CT. Antibiotics for Emerging Pathogens. *Science.* 2009;325(5944):1089-93.
38. Harvey A. Natural products in drug discovery. *Drug Discov Today.* 2008;13(19-20):894-901.
39. Butler MS, Buss AD. Natural products — The future scaffolds for novel antibiotics? *Biochem Pharmacol.* 2006;71(7):919-29.
40. Lee SH, Shin H. Matrices and scaffolds for delivery of bioactive molecules in bone and cartilage tissue engineering. *Adv Drug Deliv Rev.* 2007;59(4-5):339-59.
41. O'Brien CM, Holmes B, Faucett S, Zhang LG. Three-Dimensional Printing of Nanomaterial Scaffolds for Complex Tissue Regeneration. *Tissue Eng Part B Rev.* 2015;21(1):103-14.
42. D. S, C. R. Biology of bone and how it orchestrates the form and function of the skeleton. *Eur Spine J.* 2001;10(0):S86-95.
43. Gong H, Zhu D, Gao J, Lv L, Zhang X. An adaptation model for trabecular bone at different mechanical levels. *Biomed Eng OnLine.* 2010;9(1):32.

Bibliografía

44. Greene DA, Naughton GA, Bradshaw E, Moresi M, Ducher G. Mechanical loading with or without weight-bearing activity: influence on bone strength index in elite female adolescent athletes engaged in water polo, gymnastics, and track-and-field. *J Bone Miner Metab.* 2012;30(5):580-7.
45. Hart NH, Nimphius S, Rantalainen T, Ireland A, Siafarikas A, Newton RU. Mechanical basis of bone strength: influence of bone material, bone structure and muscle action. *J Musculoskelet Neuronal Interact.* 2017;17(3):114-39.
46. Belavý DL, Beller G, Armbrecht G, Perschel FH, Fitzner R, Bock O, et al. Evidence for an additional effect of whole-body vibration above resistive exercise alone in preventing bone loss during prolonged bed rest. *Osteoporos Int.* 2011;22(5):1581-91.
47. Lanyon LE. Bone: The Architecture of Bone and How it is Influenced by External Loading. En: Older J, editor. *Implant Bone Interface* [Internet]. London: Springer London; 1990 [citado 6 de noviembre de 2023]. p. 101-13. Disponible en: http://link.springer.com/10.1007/978-1-4471-1811-4_15
48. Sikavitsas VI, Temenoff JS, Mikos AG. Biomaterials and bone mechanotransduction. *Biomaterials.* 2001;22(19):2581-93.
49. Bilezikian JP, Bouillon R, Clemens T, Compston J, Bauer DC, Ebeling PR, et al., editores. *Primer on the Metabolic Bone Diseases and Disorders of Mineral Metabolism* [Internet]. 1.^a ed. Wiley; 2018 [citado 12 de octubre de 2023]. Disponible en: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/book/10.1002/9781119266594>
50. Davies, J.E. *Bone Engineering*. First Edition. Toronto: EM Squared Inc.; 2000. 454 p. (1; vol. 1).
51. Bilezikian JP, Martin TJ, Clemens TL, Rosen CJ, editores. *Principles of bone biology*. Fourth edition. London: Academic Press, an imprint of Elsevier; 2020. 51 p.
52. Ducy P, Schinke T, Karsenty G. The Osteoblast: A Sophisticated Fibroblast under Central Surveillance. *Science.* 2000;289(5484):1501-4.
53. Cowan JA, Dimick JB, Wainess R, Upchurch GR, Chandler WF, La Marca F. Changes in Utilization of Spinal Fusion in the United States. *Neurosurgery.* 2006;59(1):15-20.
54. Stevens MM. Biomaterials for bone tissue engineering. *Mater Today.* 2008;11(5):18-25.
55. Soucacos PN, Johnson EO. Current concepts and applications in the musculoskeletal and peripheral nervous systems. *Curr Orthop.* 2005;19(6):453-60.
56. Frohlich M, Grayson W, Wan L, Marolt D, Drobnic M, Vunjak-Novakovic G. Tissue Engineered Bone Grafts: Biological Requirements, Tissue Culture and Clinical Relevance. *Curr Stem Cell Res Ther.* 2008;3(4):254-64.

57. Stevens MM, Marini RP, Schaefer D, Aronson J, Langer R, Shastri VP. *In vivo* engineering of organs: The bone bioreactor. *Proc Natl Acad Sci*. 2005;102(32):11450-5.
58. Calvo R, Figueroa D, Díaz-Ledezma C, Vaisman A, Figueroa F. Aloinjertos óseos y la función del banco de huesos. *Rev Médica Chile*. 2011;139(5):660-6.
59. Rose FRAJ, Oreffo ROC. Bone Tissue Engineering: Hope vs Hype. *Biochem Biophys Res Commun*. 2002;292(1):1-7.
60. Petite H, Viateau V, Bensaïd W, Meunier A, De Pollak C, Bourguignon M, et al. Tissue-engineered bone regeneration. *Nat Biotechnol*. 2000;18(9):959-63.
61. Borandeh S, van Bochove B, Teotia A, Seppälä J. Polymeric drug delivery systems by additive manufacturing. *Adv Drug Deliv Rev*. 2021;173:349-73.
62. Ashley S. Rapid prototyping Systems. *Mech Eng*. 1991;113(4):34.
63. Guo Y, Patanwala HS, Bognet B, Ma AWK. Inkjet and inkjet-based 3D printing: connecting fluid properties and printing performance. *Rapid Prototyp J*. 2017;23(3):562-76.
64. Cooper K. *Rapid Prototyping Technology: selection and application*. CRC press.; 2001.
65. Horvath D, Noorani R, Mendelson M. Improvement of Surface Roughness on ABS 400 Polymer Using Design of Experiments (DOE). *Mater Sci Forum*. 2007;561-565:2389-92.
66. Kruth JP. Material Incess Manufacturing by Rapid Prototyping Techniques. *CIRP Ann*. 1991;40(2):603-14.
67. Kim H, Choi J, Wicker R. Scheduling and process planning for multiple material stereolithography. *Rapid Prototyp J*. 2010;16(4):232-40.
68. Halloran JW, Tomeckova V, Gentry S, Das S, Cilino P, Yuan D, et al. Photopolymerization of powder suspensions for shaping ceramics. *J Eur Ceram Soc*. 2011;31(14):2613-9.
69. Bandyopadhyay A, Mitra I, Bose S. 3D Printing for Bone Regeneration. *Curr Osteoporos Rep*. 2020;18(5):505-14.
70. Doberenz F, Zeng K, Willems C, Zhang K, Groth T. Thermoresponsive polymers and their biomedical application in tissue engineering – a review. *J Mater Chem B*. 2020;8(4):607-28.

Bibliografía

71. Wong KV, Hernandez A. A Review of Additive Manufacturing. *ISRN Mech Eng.* 2012;2012:1-10.
72. Tang HH, Chiu ML, Yen HC. Slurry-based selective laser sintering of polymer-coated ceramic powders to fabricate high strength alumina parts. *J Eur Ceram Soc.* 2011;31(8):1383-8.
73. Salmoria GV, Paggi RA, Lago A, Beal VE. Microstructural and mechanical characterization of PA12/MWCNTs nanocomposite manufactured by selective laser sintering. *Polym Test.* 2011;30(6):611-5.
74. Krznar M, Dolinsek S. Selective laser sintering of composite materials technologies. 2010; 1527-1529 p.
75. Song SJ, Choi J, Park YD, Hong S, Lee JJ, Ahn CB, et al. Sodium Alginate Hydrogel-Based Bioprinting Using a Novel Multinozzle Bioprinting System: THOUGHTS AND PROGRESS. *Artif Organs.* 2011;35(11):1132-6.
76. Chu T, Park S, Fu K (Kelvin). 3D printing-enabled advanced electrode architecture design. *Carbon Energy.* 2021;3(3):424-39.
77. Karkun MS, Dharmalinga S. 3D Printing Technology in Aerospace Industry – A Review. *Int J Aviat Aeronaut Aerosp [Internet].* 2022 [citado 12 de octubre de 2023]; Disponible en: <https://commons.erau.edu/ijaaa/vol9/iss2/4/>
78. James WJ, Slabbekoorn MA, Edgin WA, Hardin CK. Correction of congenital malar hypoplasia using stereolithography for presurgical planning. *J Oral Maxillofac Surg.* 1998;56(4):512-7.
79. Tian Y, Chen C, Xu X, Wang J, Hou X, Li K, et al. A Review of 3D Printing in Dentistry: Technologies, Affecting Factors, and Applications. Relucenti M, editor. *Scanning.* 2021;2021:1-19.
80. Hrusak D, Bolek M, Bolek L. On site 3D printing in oral and maxillofacial surgery for trauma and oncological bone reconstruction. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2015;44:e225-6.
81. Fielding GA, Bandyopadhyay A, Bose S. Effects of silica and zinc oxide doping on mechanical and biological properties of 3D printed tricalcium phosphate tissue engineering scaffolds. *Dent Mater.* 2012;28(2):113-22.
82. Suwanprateeb J, Sanngam R, Suvannapruk W, Panyathanmaporn T. Mechanical and in vitro performance of apatite–wollastonite glass ceramic reinforced hydroxyapatite composite fabricated by 3D-printing. *J Mater Sci Mater Med.* 2009;20(6):1281-9.
83. Katalinic B, Danube Adria Association for Automation & Manufacturing, editores. *Annals of DAAAM for 2010 & proceedings of the 21st International DAAAM Symposium «Intelligent Manufacturing & Automation», 20 - 23rd October 2010, Zadar, Croatia: & 4th*

European DAAAM International Young Researchers' and Scientists Conference]; [the 21st DAAAM world symposium. 2010. 1618 p.

84. Hollister SJ. Porous scaffold design for tissue engineering. *Nat Mater.* 2005;4(7):518-24.
85. Wang J, Dai X, Peng Y, Liu M, Lu F, Yang X, et al. Digital light processing strength-strong ultra-thin bioceramic scaffolds for challengeable orbital bone regeneration and repair in Situ. *Appl Mater Today.* 2021;22:100889.
86. Hua J, Ng PF, Fei B. High-strength hydrogels: Microstructure design, characterization and applications. *J Polym Sci Part B Polym Phys.* 2018;56(19):1325-35.
87. Manavitehrani I, Le TYL, Daly S, Wang Y, Maitz PK, Schindeler A, et al. Formation of porous biodegradable scaffolds based on poly(propylene carbonate) using gas foaming technology. *Mater Sci Eng C.* 2019;96:824-30.
88. Kazimierczak P, Benko A, Palka K, Canal C, Kolodynska D, Przekora A. Novel synthesis method combining a foaming agent with freeze-drying to obtain hybrid highly macroporous bone scaffolds. *J Mater Sci Technol.* 2020;43:52-63.
89. Yao H, Kang J, Li W, Liu J, Xie R, Wang Y, et al. Novel β -TCP/PVA bilayered hydrogels with considerable physical and bio-functional properties for osteochondral repair. *Biomed Mater.* 2017;13(1):015012.
90. Nahanmoghadam A, Asemani M, Goodarzi V, Ebrahimi-Barough S. Design and fabrication of bone tissue scaffolds based on PCL / PHBV CONTAINING hydroxyapatite nanoparticles: DUAL-LEACHING technique. *J Biomed Mater Res A.* 2021;109(6):981-93.
91. Bendtsen ST, Quinnell SP, Wei M. Development of a novel alginate-polyvinyl alcohol-hydroxyapatite hydrogel for 3D bioprinting bone tissue engineered scaffolds. *J Biomed Mater Res A.* 2017;105(5):1457-68.
92. Wang Y, Huang X, Zhang X. Ultrarobust, tough and highly stretchable self-healing materials based on cartilage-inspired noncovalent assembly nanostructure. *Nat Commun.* 2021;12(1):1291.
93. Hua M, Wu S, Ma Y, Zhao Y, Chen Z, Frenkel I, et al. Strong tough hydrogels via the synergy of freeze-casting and salting out. *Nature.* 2021;590(7847):594-9.
94. Wang C, Huang W, Zhou Y, He L, He Z, Chen Z, et al. 3D printing of bone tissue engineering scaffolds. *Bioact Mater* 2020;5(1):82-91.

Bibliografia

95. Aldana AA, Valente F, Dilley R, Doyle B. Development of 3D bioprinted GelMA-alginate hydrogels with tunable mechanical properties. *Bioprinting*. 2021;21:e00105.
96. Rajzer I, Rom M, Menaszek E, Pasierb P. Conductive PANI patterns on electrospun PCL/gelatin scaffolds modified with bioactive particles for bone tissue engineering. *Mater Lett*. 2015;138:60-3.
97. Chimene D, Lennox KK, Kaunas RR, Gaharwar AK. Advanced Bioinks for 3D Printing: A Materials Science Perspective. *Ann Biomed Eng*. 2016;44(6):2090-102.
98. Yang Y, Song X, Li X, Chen Z, Zhou C, Zhou Q, et al. Recent Progress in Biomimetic Additive Manufacturing Technology: From Materials to Functional Structures. *Adv Mater*. 2018;30(36):1706539.
99. Ouyang L, Yao R, Zhao Y, Sun W. Effect of bioink properties on printability and cell viability for 3D bioplotting of embryonic stem cells. *Biofabrication*. 2016;8(3):035020.
100. Wei Y, Zhao D, Cao Q, Wang J, Wu Y, Yuan B, et al. Stereolithography-Based Additive Manufacturing of High-Performance Osteoinductive Calcium Phosphate Ceramics by a Digital Light-Processing System. *ACS Biomater Sci Eng*. 2020;6(3):1787-97.
101. Abudhahir M, Saleem A, Paramita P, Kumar SD, Tze-Wen C, Selvamurugan N, et al. Polycaprolactone fibrous electrospun scaffolds reinforced with copper doped wollastonite for bone tissue engineering applications. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2021;109(5):654-64.
102. Curti F, Stancu IC, Voicu G, Iovu H, Dobrita CI, Ciocan LT, et al. Development of 3D Bioactive Scaffolds through 3D Printing Using Wollastonite–Gelatin Inks. *Polymers*. 2020;12(10):2420.
103. Kamboj N, Kazantseva J, Rahmani R, Rodríguez MA, Hussainova I. Selective laser sintered bio-inspired silicon-wollastonite scaffolds for bone tissue engineering. *Mater Sci Eng C*. 2020;116:111223.
104. Palakurthy S, K. VGR, Samudrala RK, P. AA. In vitro bioactivity and degradation behaviour of β -wollastonite derived from natural waste. *Mater Sci Eng C*. 2019;98:109-17.
105. Ge R, Xun C, Yang J, Jia W, Li Y. *In vivo* therapeutic effect of wollastonite and hydroxyapatite on bone defect. *Biomed Mater*. 2019;14(6):065013.
106. Wei J, Chen F, Shin JW, Hong H, Dai C, Su J, et al. Preparation and characterization of bioactive mesoporous wollastonite – Polycaprolactone composite scaffold. *Biomaterials*. 2009;30(6):1080-8.
107. Emadi R, Roohani Esfahani SI, Tavangarian F. A novel, low temperature method for the preparation of β -TCP/HAP biphasic nanostructured ceramic scaffold from natural cancellous bone. *Mater Lett*. 2010;64(8):993-6.

108. Lew DP, Waldvogel FA. Osteomyelitis. *The Lancet*. 2004;364(9431):369-79.
109. Brady RA, Leid JG, Calhoun JH, Costerton JW, Shirtliff ME. Osteomyelitis and the role of biofilms in chronic infection. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2008;52(1):13-22.
110. Garcia Del Pozo E, Collazos J, Carton JA, Camporro D, Asensi V. Factors predictive of relapse in adult bacterial osteomyelitis of long bones. *BMC Infect Dis*. 2018;18(1):635.
111. Donlan RM, Costerton JW. Biofilms: Survival Mechanisms of Clinically Relevant Microorganisms. *Clin Microbiol Rev*. 2002;15(2):167-93.
112. Kristian SA, Golda T, Ferracin F, Cramton SE, Neumeister B, Peschel A, et al. The ability of biofilm formation does not influence virulence of *Staphylococcus aureus* and host response in a mouse tissue cage infection model. *Microb Pathog*. 2004;36(5):237-45.
113. Chan C, Burrows LL, Deber CM. Helix Induction in Antimicrobial Peptides by Alginate in Biofilms. *J Biol Chem*. 2004;279(37):38749-54.
114. Dental implants and osteomyelitis in a patient with osteopetrosis. *Quintessence Int*. 2014;45(9):765-8.
115. Semel G, Wolff A, Shilo D, Akriş S, Emodi O, Rachmiel A. Mandibular osteomyelitis associated with dental implants. A case series. *Eur J Oral Implantol*. 2016;9(4):435-42.
116. Shnaiderman-Shapiro A, Dayan D, Buchner A, Schwartz I, Yahalom R, Vered M. Histopathological Spectrum of Bone Lesions Associated with Dental Implant Failure: Osteomyelitis and Beyond. *Head Neck Pathol*. 2015;9(1):140-6.
117. Drayton M, Kizhakkedathu JN, Straus SK. Towards Robust Delivery of Antimicrobial Peptides to Combat Bacterial Resistance. *Molecules*. 2020;25(13):3048.
118. Fair RJ, Tor Y. Antibiotics and Bacterial Resistance in the 21st Century. *Perspect Med Chem*. 2014;6:PMC.S14459.
119. Lu Y, Zhang E, Yang J, Cao Z. Strategies to improve micelle stability for drug delivery. *Nano Res*. 2018;11(10):4985-98.
120. Makowski M, Silva ÍC, Pais Do Amaral C, Gonçalves S, Santos NC. Advances in Lipid and Metal Nanoparticles for Antimicrobial Peptide Delivery. *Pharmaceutics*. 8 de 2019;11(11):588.
121. Zurawski DV, McLendon MK. Monoclonal Antibodies as an Antibacterial Approach Against Bacterial Pathogens. *Antibiotics*. 2020;9(4):155.

Bibliografía

122. Caplin JD, García AJ. Implantable antimicrobial biomaterials for local drug delivery in bone infection models. *Acta Biomater.* 2019;93:2-11.
123. Patrascu JM, Nedelcu IA, Sonmez M, Ficai D, Ficai A, Vasile BS, et al. Composite Scaffolds Based on Silver Nanoparticles for Biomedical Applications. *J Nanomater.* 2015;2015:1-8.
124. Gyawali R, Ibrahim SA. Natural products as antimicrobial agents. *Food Control.* 2014;46:412-29.
125. López-Alarcón C, Denicola A. Evaluating the antioxidant capacity of natural products: A review on chemical and cellular-based assays. *Anal Chim Acta.* febrero de 2013;763:1-10.
126. Cowan MM. Plant Products as Antimicrobial Agents. *Clin Microbiol Rev.* octubre de 1999;12(4):564-82.
127. Clark AM. Natural products as a resource for new drugs. *Pharm Res.* 1996;13(8):1133-41.
128. Ugur A, Barlas M, Ceyhan N, Turkmen V. Antimicrobial Effects of Propolis Extracts on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* Strains Resistant to Various Antibiotics and Some Microorganisms. *J Med Food.* 2000;3(4):173-80.
129. Mattigatti S, Jain D, Ratnakar P, Moturi S, Varma S, Rairam S. Antimicrobial Effect of Conventional Root Canal Medicaments vs Propolis against *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus* and *Candida albicans*. *J Contemp Dent Pract.* 2012;13(3):305-9.
130. Oda H, Nakagawa T, Maruyama K, Dono Y, Katsuragi H, Sato S. Effect of Brazilian green propolis on oral pathogens and human periodontal fibroblasts. *J Oral Biosci.* 2016;58(2):50-4.
131. Meimandi-Parizi A, Oryan A, Sayahi E, Bigham-Sadegh A. Propolis extract a new reinforcement material in improving bone healing: An in vivo study. *Int J Surg.* 2018;56:94-101.
132. Elkhenany H, El-Badri N, Dhar M. Green propolis extract promotes in vitro proliferation, differentiation, and migration of bone marrow stromal cells. *Biomed Pharmacother.* 2019;115:108861.
133. Afrouzan H, Tahghighi A, Zakeri S, Es-haghi A. Chemical Composition and Antimicrobial Activities of Iranian Propolis. *Iran Biomed J [Internet].* enero de 2018 [citado 13 de octubre de 2023];22(1). Disponible en: <https://doi.org/10.22034/ibj.22.1.50>
134. Oryan A, Alemzadeh E, Moshiri A. Potential role of propolis in wound healing: Biological properties and therapeutic activities. *Biomed Pharmacother.* 2018;98:469-83.
135. Pasupuleti VR, Sammugam L, Ramesh N, Gan SH. Honey, Propolis, and Royal Jelly: A Comprehensive Review of Their Biological Actions and Health Benefits. *Oxid Med Cell Longev.* 2017;2017:1-21.

136. Popova M, Giannopoulou E, Skalicka-Woźniak K, Graikou K, Widelski J, Bankova V, et al. Characterization and Biological Evaluation of Propolis from Poland. *Molecules*. 2017;22(7):1159.
137. Veiga RS, De Mendonça S, Mendes PB, Paulino N, Mimica MJ, Lagareiro Netto AA, et al. Artepillin C and phenolic compounds responsible for antimicrobial and antioxidant activity of green propolis and *Baccharis dracunculifolia* DC. *J Appl Microbiol*. 2017;122(4):911-20.
138. Pazin WM, Mônico LDM, Egea Soares AE, Miguel FG, Berretta AA, Ito AS. Antioxidant activities of three stingless bee propolis and green propolis types. *J Apic Res*. 2017;56(1):40-9.
139. Cuesta-Rubio O, Piccinelli AL, Campo Fernandez M, Márquez Hernández I, Rosado A, Rastrelli L. Chemical Characterization of Cuban Propolis by HPLC–PDA, HPLC–MS, and NMR: the *Brown*, *Red*, and *Yellow* Cuban Varieties of Propolis. *J Agric Food Chem*. 2007;55(18):7502-9.
140. Ribeiro VP, Arruda C, Aldana-Mejia JA, Bastos JK, Tripathi SK, Khan SI, et al. Phytochemical, Antiplasmodial, Cytotoxic and Antimicrobial Evaluation of a Southeast Brazilian Brown Propolis Produced by *Apis mellifera* Bees. *Chem Biodivers*. 2021;18(9):e2100288.
141. Ribeiro VP, Arruda C, Mejía JAA, Candido ACBB, Dos Santos RA, Magalhães LG, et al. Brazilian southeast brown propolis: gas chromatography method development for its volatile oil analysis, its antimicrobial and leishmanicidal activities evaluation. *Phytochem Anal*. 2021;32(3):404-11.
142. AOAC. Official methods of analysis of the AOAC. 15th ed. Vol. 1. Arlington, VA: The Association; 1990.
143. Martinez J, Garcia C, Durango D, Gil J. Caracterización de propóleos provenientes del municipio de Caldas obtenido por dos métodos de recolección. *Rev MVZ Cordoba* [Internet]. 2017;17(1). Disponible en: http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0122-02682012000100008
144. Kumazawa S, Hamasaka T, Nakayama T. Antioxidant activity of propolis of various geographic origins. *Food Chem*. 2004;84(3):329-39.
145. Singleton VL, Rossi JA. Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents. *Am J Enol Vitic*. 1965;16(3):144-58.
146. Andonian MR, Barrett AS, Vinogradov SN. Physical properties and subunits of *Haemopsis grandis* erythrocrucorin. *Biochim Biophys Acta*. 1975;412(2):202-13.

Bibliografía

147. Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic Biol Med.* 1999;26(9-10):1231-7.
148. Phiri N, Mainda G, Mukuma M, Sinyangwe NN, Banda LJ, Kwenda G, et al. Antibiotic-resistant *Salmonella species* and *Escherichia coli* in broiler chickens from farms, abattoirs and open markets in selected districts of Zambia [Internet]. *Scientific Communication and Education*; 2020 [citado 20 de noviembre de 2023]. Disponible en: <http://biorxiv.org/lookup/doi/10.1101/2020.04.20.050914>
149. Kowalska-Krochmal B, Dudek-Wicher R. The Minimum Inhibitory Concentration of Antibiotics: Methods, Interpretation, Clinical Relevance. *Pathogens.* 2021;10(2):165.
150. Seidel V, Peyfoon E, Watson DG, Fearnley J. Comparative study of the antibacterial activity of propolis from different geographical and climatic zones: ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF PROPOLIS FROM DIFFERENT ZONES. *Phytother Res.* 2008;22(9):1256-63.
151. Lozina L analía, Peichoto ME, Acosta O, Granero G. Estandarización y caracterización organoléptica y fisicoquímica de 15 propóleos argentinos. *Acta Farm Bonaer.* 2010;29(1):102-10.
152. Marly SS, Maria LMFE, Carlos ALDC, Karina TMG, Rosane FS, Rogeria CDCA. Propolis as natural additive: A systematic review. *Afr J Biotechnol.* 2018;17(41):1282-91.
153. Irigoiti Y, Navarro A, Yamul D, Libonatti C, Tabera A, Basualdo M. The use of propolis as a functional food ingredient: A review. *Trends Food Sci Technol.* 2021;115:297-306.
154. Viloría J, Gil J, Durango D, García C. Physicochemical characterization and antimicrobial activity of propolis from municipality of la union (antioquia, colombia). *Rev Biotecnol En El Sect Agropecu Agroindustrial.* 2010;63(1):5373-83.
155. Barrientos-Lezcano JC, Gallo-Machado J, Marin-Palacio LD, Builes S. Extraction kinetics and physicochemical characteristics of Colombian propolis. *J Food Process Eng.* 2023;46(11):e14272.
156. Daza-Leon C, Gomez AP, Álvarez-Mira D, Carvajal-Diaz L, Ramirez-Nieto G, Sanchez A, et al. Characterization and evaluation of Colombian propolis on the intestinal integrity of broilers. *Poult Sci.* 2022;101(12):102159.
157. Devequi-Nunes D, Machado BAS, Barreto GDA, Rebouças Silva J, Da Silva DF, Da Rocha JLC, et al. Chemical characterization and biological activity of six different extracts of propolis through conventional methods and supercritical extraction. *Lightfoot DA, editor. PLOS ONE.* 2018;13(12):e0207676.
158. Park YK, Alencar SM, Aguiar CL. Botanical Origin and Chemical Composition of Brazilian Propolis. *J Agric Food Chem.* 2002;50(9):2502-6.

159. Wagh VD. Propolis: A Wonder Bees Product and Its Pharmacological Potentials. *Adv Pharmacol Sci.* 2013;2013:1-11.
160. Silva-Carvalho R, Baltazar F, Almeida-Aguiar C. Propolis: A Complex Natural Product with a Plethora of Biological Activities That Can Be Explored for Drug Development. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2015;2015:1-29.
161. Vera N, Solorzano E, Ordoñez R, Maldonado L, Bedascarrasbure E, Isla MI. Chemical composition of Argentinean propolis collected in extreme regions and its relation with antimicrobial and antioxidant activities. *Nat Prod Commun.* 2011;6(6):1934578X1100600618.
162. Andrade JKS, Denadai M, De Oliveira CS, Nunes ML, Narain N. Evaluation of bioactive compounds potential and antioxidant activity of brown, green and red propolis from Brazilian northeast region. *Food Res Int.* 2017;101:129-38.
163. Kudo D, Inden M, Sekine S ichiro, Tamaoki N, Iida K, Naito E, et al. Conditioned medium of dental pulp cells stimulated by Chinese propolis show neuroprotection and neurite extension in vitro. *Neurosci Lett.* 2015;589:92-7.
164. Alshaher A, Wallace J, Agarwal S, Bretz W, Baugh D. Effect of Propolis on Human Fibroblasts from the Pulp and Periodontal Ligament. *J Endod.* 2004;30(5):359-61.
165. Burdock GA. Review of the biological properties and toxicity of bee propolis (propolis). *Food Chem Toxicol.* 1998;36(4):347-63.
166. Cottica SM, Sawaya ACHF, Eberlin MN, Franco SL, Zeoula LM, Visentainer JV. Antioxidant activity and composition of propolis obtained by different methods of extraction. *J Braz Chem Soc.* 2011;22(5):929-35.
167. Pobiega K, Kraśniewska K, Derewiaka D, Gniewosz M. Comparison of the antimicrobial activity of propolis extracts obtained by means of various extraction methods. *J Food Sci Technol.* 2019;56(12):5386-95.
168. Trusheva B, Trunkova D, Bankova V. Different extraction methods of biologically active components from propolis: a preliminary study. *Chem Cent J.* 2007;1(1):13.
169. Heinrich M, Modarai M, Kortenkamp A. Herbal Extracts used for Upper Respiratory Tract Infections: Are there Clinically Relevant Interactions with the Cytochrome P450 Enzyme System? *Planta Med.* 2008;74(6):657-60.
170. Ahn MR, Kumazawa S, Hamasaka T, Bang KS, Nakayama T. Antioxidant Activity and Constituents of Propolis Collected in Various Areas of Korea. *J Agric Food Chem.* 2004;52(24):7286-92.

Bibliografía

171. Akhir RAM, Bakar MFA, Sanusi SB. Antioxidant and antimicrobial activity of stingless bee bread and propolis extracts. En Kedah, Malaysia; 2017 [citado 13 de octubre de 2023]. p. 0200901-7. Disponible en: <https://pubs.aip.org/aip/acp/article/886523>
172. Moreno AI, Orozco Y, Ocampo S, Malagón S, Ossa A, Peláez-Vargas A, et al. Effects of Propolis Impregnation on Polylactic Acid (PLA) Scaffolds Loaded with Wollastonite Particles against *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, and Their Coculture for Potential Medical Devices. *Polymers*. 2023;15(12):2629.
173. Gonsales GZ, Orsi RO, Fernandes Júnior A, Rodrigues P, Funari SRC. Antibacterial activity of propolis collected in different regions of Brazil. *J Venom Anim Toxins Trop Dis* [Internet]. 2006 [citado 13 de octubre de 2023];12(2). Disponible en: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1678-91992006000200009&lng=en&nrm=iso&tng=en
174. Lu LC, Chen YW, Chou CC. Antibacterial activity of propolis against *Staphylococcus aureus*. *Int J Food Microbiol*. 2005;102(2):213-20.
175. Abd Rashid N, Mohammed SNF, Syed Abd Halim SA, Ghafar NA, Abdul Jalil NA. Therapeutic Potential of Honey and Propolis on Ocular Disease. *Pharmaceuticals*. 2022;15(11):1419.
176. Górnjak I, Bartoszewski R, Króliczewski J. Comprehensive review of antimicrobial activities of plant flavonoids. *Phytochem Rev*. 2019;18(1):241-72.
177. Horna Quintana G, Silva Diaz M, Vicente Taboada W, Tamariz Ortiz J. Concentración mínima inhibitoria y concentración mínima bactericida de ciprofloxacina en bacterias uropatógenas aisladas en el Instituto Nacional de Enfermedades Neoplásicas. *Rev Medica Hered*. 2012;16(1):39.
178. Moussaoui S, Lahouel M. Propolis Extract: A Potent Bacteria Efflux Pump Inhibitor. *J Biol Act Prod Nat*. 2014;4(3):216-23.
179. Da Cruz Almeida ET, Da Silva MCD, Oliveira JMDS, Kamiya RU, Arruda RE dos S, Vieira DA, et al. Chemical and microbiological characterization of tinctures and microcapsules loaded with Brazilian red propolis extract. *J Pharm Anal*. 2017;7(5):280-7.
180. Van Der Heide D, Cidonio G, Stoddart MJ, D'Este M. 3D printing of inorganic-biopolymer composites for bone regeneration. *Biofabrication*. 2022;14(4):042003.
181. Bakhsheshi-Rad HR, Hamzah E, Daroonparvar M, Ebrahimi-Kahrizsangi R, Medraj M. In-vitro corrosion inhibition mechanism of fluorine-doped hydroxyapatite and brushite coated Mg–Ca alloys for biomedical applications. *Ceram Int*. 2014;40(6):7971-82.
182. Ratner BD, editor. *Biomaterials science: an introduction to materials in medicine*. 2nd ed. Amsterdam ; Boston: Elsevier Academic Press; 2004. 851 p.

183. Hench LL. Bioceramics. *J Am Ceram Soc.* 2005;81(7):1705-28.
184. Ratner BD, editor. *Biomaterials science: an introduction to materials in medicine.* 2nd ed. Amsterdam ; Boston: Elsevier Academic Press; 2004. 851 p.
185. Brunello G, Sivoletta S, Meneghello R, Ferroni L, Gardin C, Piattelli A, et al. Powder-based 3D printing for bone tissue engineering. *Biotechnol Adv.* 2016;34(5):740-53.
186. Brunello G, Elsayed H, Biasetto L. Bioactive Glass and Silicate-Based Ceramic Coatings on Metallic Implants: Open Challenge or Outdated Topic? *Materials.* 2019;12(18):2929.
187. Wu C, Chang J. A review of bioactive silicate ceramics. *Biomed Mater.* de 2013;8(3):032001.
188. Xu S, Lin K, Wang Z, Chang J, Wang L, Lu J, et al. Reconstruction of calvarial defect of rabbits using porous calcium silicate bioactive ceramics. *Biomaterials.* 2008;29(17):2588-96.
189. Ma H, Feng C, Chang J, Wu C. 3D-printed bioceramic scaffolds: From bone tissue engineering to tumor therapy. *Acta Biomater.* 2018;79:37-59.
190. Yang C, Wang X, Ma B, Zhu H, Huan Z, Ma N, et al. 3D-Printed Bioactive Ca_3SiO_5 Bone Cement Scaffolds with Nano Surface Structure for Bone Regeneration. *ACS Appl Mater Interfaces.* 2017;9(7):5757-67.
191. Marsell R, Einhorn TA. The biology of fracture healing. *Injury.* 2011;42(6):551-5.
192. Yang Y, Xu T, Zhang Q, Piao Y, Bei HP, Zhao X. Biomimetic, Stiff, and Adhesive Periosteum with Osteogenic–Angiogenic Coupling Effect for Bone Regeneration. *Small.* 2021;17(14):2006598.
193. Morgan EF, De Giacomo A, Gerstenfeld LC. Overview of Skeletal Repair (Fracture Healing and Its Assessment). En: Hilton MJ, editor. *Skeletal Development and Repair [Internet].* Totowa, NJ: Humana Press; 2014 [citado 1 de noviembre de 2023]. p. 13-31. (Methods in Molecular Biology; vol. 1130). Disponible en: https://link.springer.com/10.1007/978-1-62703-989-5_2
194. Restrepo S, Ocampo S, Ramírez JA, Paucar C, García C. Mechanical properties of ceramic structures based on Triply Periodic Minimal Surface (TPMS) processed by 3D printing. *J Phys Conf Ser.* 2017;935:012036.
195. Dong Z, Zhao X. Application of TPMS structure in bone regeneration. *Eng Regen.* 2021;2:154-62.

Bibliografía

196. Fantini M, Curto M, De Crescenzo F. TPMS for interactive modelling of trabecular scaffolds for Bone Tissue Engineering. En: Eynard B, Nigrelli V, Oliveri SM, Peris-Fajarnes G, Rizzuti S, editores. *Advances on Mechanics, Design Engineering and Manufacturing* [Internet]. Cham: Springer International Publishing; 2017 [citado 1 de noviembre de 2023]. p. 425-35. (Lecture Notes in Mechanical Engineering). Disponible en: http://link.springer.com/10.1007/978-3-319-45781-9_43
197. Vijayavenkataraman S, Zhang L, Zhang S, Hsi Fuh JY, Lu WF. Triply Periodic Minimal Surfaces Sheet Scaffolds for Tissue Engineering Applications: An Optimization Approach toward Biomimetic Scaffold Design. *ACS Appl Bio Mater*. 2018;1(2):259-69.
198. Fogden A, Haerberlein M, Lidin S. Generalizations of the gyroid surface. *J Phys I*. 1993;3(12):2371-85.
199. Shao H, He Y, Fu J, He D, Yang X, Xie J, et al. 3D printing magnesium-doped wollastonite/ β -TCP bioceramics scaffolds with high strength and adjustable degradation. *J Eur Ceram Soc*. 2016;36(6):1495-503.
200. Pita Migueléz I. Diseño, sinterización y caracterización de estructuras 3D con porosidad gradual de Wollastonite y Fosfato tricálcico para regeneración ósea [Internet]. [Madrid]: Politécnica de Madrid; 2019. Disponible en: https://oa.upm.es/72060/3/TFG_Ines_Pita_Migueléz.pdf
201. C21 Committee. Test Method for Water Absorption, Bulk Density, Apparent Porosity, and Apparent Specific Gravity of Fired Whiteware Products, Ceramic Tiles, and Glass Tiles [Internet]. ASTM International; [citado 1 de noviembre de 2023]. Disponible en: <http://www.astm.org/cgi-bin/resolver.cgi?C373-88R06>
202. Liu J, Miao X. Porous alumina ceramics prepared by slurry infiltration of expanded polystyrene beads. *J Mater Sci*. 2005;40(23):6145-50.
203. D04 Committee. Test Method for Density of Semi-Solid Asphalt Binder (Pycnometer Method) [Internet]. ASTM International; [citado 1 de noviembre de 2023]. Disponible en: <http://www.astm.org/cgi-bin/resolver.cgi?D70D70M-21>
204. Yang T, Van Olmen R. Robust design for a multilayer ceramic capacitor screen-printing process case study. *J Eng Des*. 2004;15(5):447-57.
205. Yoon DH, Lee BI. Processing of barium titanate tapes with different binders for MLCC applications—Part I: Optimization using design of experiments. *J Eur Ceram Soc*. 2004;24(5):739-52.
206. Renteria A, Fontes H, Diaz JA, Regis JE, Chavez LA, Tseng TL (Bill), et al. Optimization of 3D printing parameters for BaTiO₃ piezoelectric ceramics through design of experiments. *Mater Res Express*. 2019;6(8):085706.
207. Prasad PSRK, Reddy AV, Rajesh PK, Ponnambalam P, Prakasan K. Studies on rheology of ceramic inks and spread of ink droplets for direct ceramic ink jet printing. *J Mater Process Technol*. 2006;176(1-3):222-9.

208. Jayathilakage R, Rajeev P, Sanjayan J. Rheometry for Concrete 3D Printing: A Review and an Experimental Comparison. *Buildings*. 2022;12(8):1190.
209. Mott RL, Untener JA. *Applied fluid mechanics*. Seventh edition. Boston: Pearson; 2015. 531 p.
210. Lilliman M. Control of mortar rheology for 3D concrete printing. [Internet]. Loughborough; 2017. Disponible en: <https://hdl.handle.net/2134/25216>
211. Chan SSL, Pennings RM, Edwards L, Franks GV. 3D printing of clay for decorative architectural applications: Effect of solids volume fraction on rheology and printability. *Addit Manuf*. 2020;35:101335.
212. Sainz MA, Pena P, Serena S, Caballero A. Influence of design on bioactivity of novel CaSiO₃-CaMg(SiO₃)₂ bioceramics: In vitro simulated body fluid test and thermodynamic simulation. *Acta Biomater*. 2010;6(7):2797-807.
213. Teixeira S, Rodriguez MA, Pena P, De Aza AH, De Aza S, Ferraz MP, et al. Physical characterization of hydroxyapatite porous scaffolds for tissue engineering. *Mater Sci Eng C*. 2009;29(5):1510-4.
214. Cunningham E, Dunne N, Walker G, Maggs C, Wilcox R, Buchanan F. Hydroxyapatite bone substitutes developed via replication of natural marine sponges. *J Mater Sci Mater Med*. 2010;21(8):2255-61.
215. Zeltinger J, Sherwood JK, Graham DA, Müller R, Griffith LG. Effect of Pore Size and Void Fraction on Cellular Adhesion, Proliferation, and Matrix Deposition. *Tissue Eng*. 2001;7(5):557-72.
216. Kramschuster A, Turng LS. *Fabrication of Tissue Engineering Scaffolds*. 17.^a ed. Boston: William Andrew Publishing; 2013. 427-446 p.
217. Del Carpio-Perochena A, Kishen A, Felitti R, Bhagirath AY, Medapati MR, Lai C, et al. Antibacterial Properties of Chitosan Nanoparticles and Propolis Associated with Calcium Hydroxide against Single- and Multispecies Biofilms: An In Vitro and In Situ Study. *J Endod*. 2017;43(8):1332-6.
218. Delgado Aceves MDL, Andrade Ortega JÁ, Ramírez Barragán CA. Caracterización fisicoquímica de propóleos colectados en el Bosque La Primavera Zapopan, Jalisco. *Rev Mex Cienc For*. 2018;6(28):74-87.
219. Sedelnikova MB, Ugodchikova AV, Tolkacheva TV, Chebodaeva VV, Ciuklkhov IA, Khimich MA, et al. Surface Modification of Mg_{0.8}Ca Alloy via Wollastonite Micro-Arc Coatings: Significant Improvement in Corrosion Resistance. *Metals*. 2021;11(5):754.

Bibliografia

220. Chen W, Liang Y, Hou X, Zhang J, Ding H, Sun S, et al. Mechanical Grinding Preparation and Characterization of TiO₂-Coated Wollastonite Composite Pigments. *Materials*. 2018;11(4):593.
221. Dabiri G, Tumbarello DA, Turner CE, Van De Water L. Hic-5 Promotes the Hypertrophic Scar Myofibroblast Phenotype by Regulating the TGF- β 1 Autocrine Loop. *J Invest Dermatol*. 2008;128(10):2518-25.
222. Hu J, Qu J, Xu D, Zhou J, Lu H. Allograft versus autograft for anterior cruciate ligament reconstruction: an up-to-date meta-analysis of prospective studies. *Int Orthop*. 2013;37(2):311-20.
223. Samorezov JE, Alsberg E. Spatial regulation of controlled bioactive factor delivery for bone tissue engineering. *Adv Drug Deliv Rev*. 2015;84:45-67.
224. Rambhia KJ, Ma PX. Controlled drug release for tissue engineering. *J Controlled Release*. 2015;219:119-28.
225. Kalinka J, Hachmeister M, Geraci J, Sordelli D, Hansen U, Niemann S, et al. *Staphylococcus aureus* isolates from chronic osteomyelitis are characterized by high host cell invasion and intracellular adaptation, but still induce inflammation. *Int J Med Microbiol*. 2014;304(8):1038-49.
226. Wang X, Sparkman J, Gou J. Strain sensing of printed carbon nanotube sensors on polyurethane substrate with spray deposition modeling. *Compos Commun*. 2017;3:1-6.
227. Lima ALL, Oliveira PR, Carvalho VC, Cimerman S, Savio E. Recommendations for the treatment of osteomyelitis. *Braz J Infect Dis*. 2014;18(5):526-34.
228. Gama E Silva GL, Sato De Souza Bustamante Monteiro M, Dos Santos Matos AP, Santos-Oliveira R, Kenechukwu FC, Ricci-Júnior E. Nanofibers in the treatment of osteomyelitis and bone regeneration. *J Drug Deliv Sci Technol*. 2022;67:102999.
229. Patti JM, Bremell T, Krajewska-Pietrasik D, Abdelnour A, Tarkowski A, Rydén C, et al. The *Staphylococcus aureus* collagen adhesin is a virulence determinant in experimental septic arthritis. *Infect Immun*. 1994;62(1):152-61.
230. Gordon RJ, Lowy FD. Pathogenesis of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Infection. *Clin Infect Dis*. 2008;46(S5):S350-9.
231. Zhou M, Luo H, Li Z, Wu F, Huang C, Ding Z, et al. Recent Advances in Screening of Natural Products for Antimicrobial Agents. *Comb Chem High Throughput Screen*. 2012;15(4):306-15.
232. Almuhayawi MS. Propolis as a novel antibacterial agent. *Saudi J Biol Sci*. 2020;27(11):3079-86.

233. Yildirim Z, Hacievliyagil S, Kutlu NO, Aydin NE, Kurkcuoglu M, Iraz M, et al. Effect of water extract of Turkish propolis on tuberculosis infection in guinea-pigs. *Pharmacol Res.* 2004;49(3):287-92.
234. Uzel A, Sorkun K, Önçağ Ö, Çoğulu D, Gençay Ö, Sali'h B. Chemical compositions and antimicrobial activities of four different Anatolian propolis samples. *Microbiol Res.* 2005;160(2):189-95.
235. Qureshi UA, Khatri Z, Ahmed F, Khatri M, Kim IS. Electrospun Zein Nanofiber as a Green and Recyclable Adsorbent for the Removal of Reactive Black 5 from the Aqueous Phase. *ACS Sustain Chem Eng.* 2017;5(5):4340-51.
236. Ito J, Chang FR, Wang HK, Park YK, Ikegaki M, Kilgore N, et al. Anti-AIDS Agents. 48. Anti-HIV Activity of Moronic Acid Derivatives and the New Melliferone-Related Triterpenoid Isolated from Brazilian Propolis. *J Nat Prod.* 2001;64(10):1278-81.
237. Duke CC, Tran VH, Duke RK, Abu-Mellal A, Plunkett GT, King DI, et al. A sedge plant as the source of Kangaroo Island propolis rich in prenylated p-coumarate ester and stilbenes. *Phytochemistry.* 2017;134:87-97.
238. Mirzoeva OK, Grishanin RN, Calder PC. Antimicrobial action of propolis and some of its components: the effects on growth, membrane potential and motility of bacteria. *Microbiol Res.* 1997;152(3):239-46.
239. Zhang W, Margarita GE, Wu D, Yuan W, Yan S, Qi S, et al. Antibacterial Activity of Chinese Red Propolis against *Staphylococcus aureus* and MRSA. *Molecules.* 2022;27(5):1693.
240. Saeed F, Ahmad RS, Arshad MU, Niaz B, Batool R, Naz R, et al. Propolis to Curb Lifestyle Related Disorders: An Overview. *Int J Food Prop.* 2016;19(2):420-37.
241. Demir S, Aliyazicioglu Y, Turan I, Misir S, Mentese A, Yaman SO, et al. Antiproliferative and proapoptotic activity of Turkish propolis on human lung cancer cell line. *Nutr Cancer.* 2016;68(1):165-72.
242. Pantosti A, Sanchini A, Monaco M. Mechanisms of antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus*. *Future Microbiol.* 2007;2(3):323-34.
243. Periasamy S, Chatterjee SS, Cheung GYC, Otto M. Phenol-soluble modulins in staphylococci: What are they originally for? *Commun Integr Biol.* 2012;5(3):275-7.
244. Eladli MG, Alharbi NS, Khaled JM, Kadaikunnan S, Alobaidi AS, Alyahya SA. Antibiotic-resistant *Staphylococcus epidermidis* isolated from patients and healthy students comparing with antibiotic-resistant bacteria isolated from pasteurized milk. *Saudi J Biol Sci.* 2019;26(6):1285-90.

Bibliografía

245. Iyer V, Raut J, Dasgupta A. Impact of pH on growth of *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus aureus* in vitro. *J Med Microbiol* [Internet]. 2021 [citado 1 de noviembre de 2023];70(9). Disponible en: <https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/jmm/10.1099/jmm.0.001421>
246. Abbasi N, Hamlet S, Love RM, Nguyen NT. Porous scaffolds for bone regeneration. *J Sci Adv Mater Devices*. 2020;5(1):1-9.
247. Clarke B. Normal Bone Anatomy and Physiology. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2008;3(Supplement_3):S131-9.
248. Wang S, Wang X, Draenert FG, Albert O, Schröder HC, Mailänder V, et al. Bioactive and biodegradable silica biomaterial for bone regeneration. *Bone*. 2014;67:292-304.
249. Strober W. Trypan Blue Exclusion Test of Cell Viability. *Curr Protoc Immunol* [Internet]. marzo de 1997 [citado 17 de noviembre de 2023];21(1). Disponible en: <https://currentprotocols.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/0471142735.ima03bs21>
250. Méry B, Guy JB, Vallard A, Espenel S, Ardail D, Rodriguez-Lafrasse C, et al. In Vitro Cell Death Determination for Drug Discovery: A Landscape Review of Real Issues. *J Cell Death*. 2017;10:117967071769125.
251. Liu Y, Li X, Bao S, Lu Z, Li Q, Li CM. Plastic protein microarray to investigate the molecular pathways of magnetic nanoparticle-induced nanotoxicity. *Nanotechnology*. 2013;24(17):175501.
252. Nakatsu MN, Gonzalez S, Mei H, Deng SX. Human Limbal Mesenchymal Cells Support the Growth of Human Corneal Epithelial Stem/Progenitor Cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2014;55(10):6953-9.
253. Raorane ML, Manz C, Hildebrandt S, Mielke M, Thieme M, Keller J, et al. Cell type matters: competence for alkaloid metabolism differs in two seed-derived cell strains of *Catharanthus roseus*. *Protoplasma*. 2023;260(2):349-69.
254. Longhin EM, El Yamani N, Rundén-Pran E, Dusinska M. The alamar blue assay in the context of safety testing of nanomaterials. *Front Toxicol*. 2022;4:981701.
255. O'Brien J, Wilson I, Orton T, Pognan F. Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. *Eur J Biochem*. 2000;267(17):5421-6.
256. Arora S, Cooper PR, Ratnayake JT, Friedlander LT, Rizwan SB, Seo B, et al. A critical review of *in vitro* research methodologies used to study mineralization in human dental pulp cell cultures. *Int Endod J*. 2022;55(S1):3-13.
257. Schneider MR. Von Kossa and his staining technique. *Histochem Cell Biol* [Internet]. 20 de noviembre de 2021 [citado 17 de noviembre de 2023]; Disponible en: <https://link.springer.com/10.1007/s00418-021-02051-3>

258. Wang YH, Liu Y, Maye P, Rowe DW. Examination of Mineralized Nodule Formation in Living Osteoblastic Cultures Using Fluorescent Dyes. *Biotechnol Prog.* 2006;22(6):1697-701.
259. Stucki U, Schmid J, Hämmerle CF, Lang NP. Temporal and local appearance of alkaline phosphatase activity in early stages of guided bone regeneration: A descriptive histochemical study in humans. *Clin Oral Implants Res.* 2001;12(2):121-7.
260. Pelaez-Vargas A, Gallego-Perez D, Higuera-Castro N, Carvalho A, Grenho L, Arismendi JA, et al. Micropatterned Coatings for Guided Tissue Regeneration in Dental Implantology. En: Gowder S, editor. *Cell Interaction* [Internet]. InTech; 2012 [citado 17 de noviembre de 2023]. Disponible en: <http://www.intechopen.com/books/cell-interaction/micropatterned-coatings-for-guided-tissue-regeneration-in-dental-implantology>
261. Leal-Marin S, Gallaway G, Höltje K, Lopera-Sepulveda A, Glasmacher B, Gryshkov O. Scaffolds with Magnetic Nanoparticles for Tissue Stimulation. *Curr Dir Biomed Eng.* 2021;7(2):460-3.
262. Abbasi N, Ivanovski S, Gulati K, Love RM, Hamlet S. Role of offset and gradient architectures of 3-D melt electrowritten scaffold on differentiation and mineralization of osteoblasts. *Biomater Res.* 2020;24(1):2.
263. Sundaram B, C. John Milton M. Porous Polycaprolactone Scaffold Engineered with Naringin Loaded Bovine Serum Albumin Nanoparticles for Bone Tissue Engineering. *Biosci Biotechnol Res Asia.* 2017;14(4):1355-62.
264. Gutiérrez-Prieto SJ, Perdomo-Lara SJ, Diaz-Peraza JM, Sequeda-Castañeda LG. Analysis of *In Vitro* Osteoblast Culture on Scaffolds for Future Bone Regeneration Purposes in Dentistry. *Adv Pharmacol Sci.* 2019;2019:1-9.
265. Qiu Y, Chen X, Hou Y, Hou Y, Tian S, Chen Y, et al. Characterization of different biodegradable scaffolds in tissue engineering. *Mol Med Rep* [Internet]. 2019 [citado 17 de noviembre de 2023]; Disponible en: <http://www.spandidos-publications.com/10.3892/mmr.2019.10066>
266. Bahraminasab M, Janmohammadi M, Arab S, Talebi A, Nooshabadi VT, Koohsarian P, et al. Bone Scaffolds: An Incorporation of Biomaterials, Cells, and Biofactors. *ACS Biomater Sci Eng.* 2021;7(12):5397-431.
267. Huang S, Zhang CP, Wang K, Li G, Hu FL. Recent Advances in the Chemical Composition of Propolis. *Molecules.* 2014;19(12):19610-32.

Bibliografía

268. Búfalo MC, Candeias JMG, Sforcin JM. *In Vitro* Cytotoxic Effect of Brazilian Green Propolis on Human Laryngeal Epidermoid Carcinoma (HEp-2) Cells. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2009;6(4):483-7.
269. Ahn MR, Kumazawa S, Usui Y, Nakamura J, Matsuka M, Zhu F, et al. Antioxidant activity and constituents of propolis collected in various areas of China. *Food Chem.* 2007;101(4):1383-92.
270. Fung C, Mohamad H, Hashim S, Htun A, Ahmad A. Proliferative Effect of Malaysian Propolis on Stem Cells from Human Exfoliated Deciduous Teeth: An *In vitro* Study. *Br J Pharm Res.* 2015;8(1):1-8.
271. Gandolfi MG, Perut F, Ciapetti G, Mongiorgi R, Prati C. New Portland Cement-based Materials for Endodontics Mixed with Articaine Solution: A Study of Cellular Response. *J Endod.* 2008;34(1):39-44.
272. Higueta-Castro N, Gallego-Perez D, Pelaez-Vargas A, García Quiroz F, Posada OM, López LE, et al. Reinforced Portland cement porous scaffolds for load-bearing bone tissue engineering applications. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2012;100B(2):501-7.
273. Venkatraman SK, Choudhary R, Genasan K, Murali MR, Raghavendran HRB, Kamarul T, et al. Antibacterial wollastonite supported excellent proliferation and osteogenic differentiation of human bone marrow derived mesenchymal stromal cells. *J Sol-Gel Sci Technol.* 2021;100(3):506-16.
274. Matsuoka H, Akiyama H, Okada Y, Ito H, Shigeno C, Konishi J, et al. *In vitro* analysis of the stimulation of bone formation by highly bioactive apatite- and wollastonite-containing glass-ceramic: Released calcium ions promote osteogenic differentiation in osteoblastic ROS17/2.8 cells. *J Biomed Mater Res.* 1999;47(2):176-88.
275. Banskota AH, Tezuka Y, Kadota S. Recent progress in pharmacological research of propolis. *Phytother Res.* 2001;15(7):561-71.
276. Tyszka-Czochara M, Paško P, Reczyński W, Szłósarczyk M, Bystrowska B, Opoka W. Zinc and Propolis Reduces Cytotoxicity and Proliferation in Skin Fibroblast Cell Culture: Total Polyphenol Content and Antioxidant Capacity of Propolis. *Biol Trace Elem Res.* 2014;160(1):123-31.
277. Banskota AH, Tezuka Y, Prasain JK, Matsushige K, Saiki I, Kadota S. Chemical Constituents of Brazilian Propolis and Their Cytotoxic Activities. *J Nat Prod.* 1998;61(7):896-900.
278. Su J, Hua S, Chen A, Chen P, Yang L, Yuan X, et al. Three-dimensional printing of gyroid-structured composite bioceramic scaffolds with tuneable degradability. *Biomater Adv.* 2022;133:112595.

279. Battulga B, Shiizaki K, Miura Y, Osanai Y, Yamazaki R, Shinohara Y, et al. Correlative light and electron microscopic observation of calcium phosphate particles in a mouse kidney formed under a high-phosphate diet. 2023;852.
280. Kanwar S, Vijayavenkataraman S. 3D printable bone-mimicking functionally gradient stochastic scaffolds for tissue engineering and bone implant applications. *Mater Des.* 2022;223:111199.
281. Feng J, Fu J, Yao X, He Y. Triply periodic minimal surface (TPMS) porous structures: from multi-scale design, precise additive manufacturing to multidisciplinary applications. *Int J Extreme Manuf.* 2022;4(2):022001.
282. Huang YC, Hsiao PC, Chai HJ. Hydroxyapatite extracted from fish scale: Effects on MG63 osteoblast-like cells. *Ceram Int.* 2011;37(6):1825-31.
283. Gomes PS, Fernandes MH. Effect of therapeutic levels of doxycycline and minocycline in the proliferation and differentiation of human bone marrow osteoblastic cells. *Arch Oral Biol.* 2007;52(3):251-9.
284. Song K, Kong Q, Li L, Wang Y, Parungao R, Zheng S, et al. In Vitro Fabrication and Biocompatibility Assay of a Biomimetic Osteoblastic Niche. *Appl Biochem Biotechnol.* 2019;189(2):471-84.
285. Huang YC, Hsiao PC, Chai HJ. Hydroxyapatite extracted from fish scale: Effects on MG63 osteoblast-like cells. *Ceram Int.* 2011;37(6):1825-31.
286. Iqbal H, Ali M, Zeeshan R, Mutahir Z, Iqbal F, Nawaz MAH, et al. Chitosan/hydroxyapatite (HA)/hydroxypropylmethyl cellulose (HPMC) spongy scaffolds-synthesis and evaluation as potential alveolar bone substitutes. *Colloids Surf B Biointerfaces.* 2017;160:553-63.
287. Rincón-Kohli L, Zysset PK. Multi-axial mechanical properties of human trabecular bone. *Biomech Model Mechanobiol.* 2009;8(3):195-208.
288. Gerhardt LC, Boccaccini AR. Bioactive Glass and Glass-Ceramic Scaffolds for Bone Tissue Engineering. *Materials.* 2010;3(7):3867-910.
289. Kaur G, Kumar V, Baino F, Mauro JC, Pickrell G, Evans I, et al. Mechanical properties of bioactive glasses, ceramics, glass-ceramics and composites: State-of-the-art review and future challenges. *Mater Sci Eng C.* 2019;104:109895.
290. Abueidda DW, Elhebeary M, Shiang CS (Andrew), Pang S, Abu Al-Rub RK, Jasiuk IM. Mechanical properties of 3D printed polymeric Gyroid cellular structures: Experimental and finite element study. *Mater Des.* 2019;165:107597.

Bibliografia

291. Abueidda DW, Elhebeary M, Shiang CS (Andrew), Pang S, Abu Al-Rub RK, Jasiuk IM. Mechanical properties of 3D printed polymeric Gyroid cellular structures: Experimental and finite element study. *Mater Des.* 2019;165:107597.