

Evaluación de las propiedades físicas de un *scaffold* compuesto de PEG y nanohidroxiapatita embebida con puntos de carbono según su composición y uso de espaciadores

Juan Sebastian Ballestas Pineda

Trabajo Dirigido

Tutora

Marcela Cristina Múnera Ramírez, PhD

Co-Tutora

Diana Consuelo Rodríguez Burbano, PhD



UNIVERSIDAD DEL ROSARIO  
ESCUELA COLOMBIANA DE INGENIERÍA JULIO GARAVITO  
PROGRAMA DE INGENIERÍA BIOMÉDICA  
BOGOTÁ D.C  
2022

## Agradecimientos

Agradezco a mi mamá Marggie Lizbeth Pineda Baez quien se ha asegurado de que no me falte absolutamente nada y además ha sido mi confidente, consejera y mi apoyo incondicional, estaré toda mi vida en deuda, intentado retribuir todo el amor que me ha dado y me sigue dando. Agradezco a todos los integrantes de mi familia que siempre han estado dispuestos a ayudarme cuando lo necesito, cada uno ha aportado a su manera conocimientos y enseñanzas en mi vida que me permitieron convertirme en la persona que soy actualmente.

Agradezco a Ana María Alvarado Alvarez quien ha sido mi compañera de aventuras, mi motivación de todos los días, mi mayor soporte y razón para seguir adelante en los tiempos más difíciles. Este triunfo no sería posible sin ti, y sin todas tus locuras que me llenan de alegría. Te agradezco por todos los momentos de felicidad que me has dado en los últimos cinco años.

Gracias a Andrés Peñuela y Daniel Cano que desde que nos conocimos hemos pasado por tantas cosas juntos, que se han vuelto parte de mi familia. Les agradezco siempre estar dispuestos a escucharme y aconsejarme. Agradezco a Paula Cifuentes y Valentina Roa con las que he estudiado, reído y llorado. Se convirtieron en mis confidentes y en las personas en las que más confío. Agradezco a Mayerly Natalia Ochoa Paipilla, quien conocí hace poco tiempo pero se convirtió en una persona muy importante para mí. Gracias por aconsejarme y motivarme cuando sentía que no podía más, sabes que tienes un lugar especial en mi corazón y que siempre vas a poder contar conmigo.

Agradezco a mis tutoras, la doctora Diana Consuelo Rodríguez Burbano y la doctora Marcela Cristina Múnera Ramírez quienes que me introdujeron al mundo de la investigación y han sido mis guías resolviendo mis dudas y orientándome en este maravilloso campo de la ingeniería. Agradezco a Stefania Degiovanni quien también me guió y ayudo en el desarrollo de este proyecto. Gracias a Juan Guarín y Sonia Perilla por la ayuda y tiempo que me brindaron. Agradezco a todos mis compañeros de laboratorio con los que nos apoyamos mutuamente y los que hicieron que fuera más ameno trabajar en el laboratorio.

Por último, les quiero agradecer a todos los profesores de la Universidad del Rosario y la Escuela Colombiana de Ingeniería Julio Garavito por sus enseñanzas a lo largo de esta carrera. Gracias a todas las personas que han sido parte de esta aventura.

## Resumen

El uso de injertos es el método más utilizado en el tratamientos de defectos óseos. Estos presentan limitaciones en su disponibilidad y respuesta inmunológica por lo que es de gran importancia encontrar un tratamiento alternativo. Desde el campo de la ingeniería de tejidos se ha propuesto el desarrollo de *scaffolds* para regeneración ósea, fabricados haciendo uso de biomateriales que favorecen la osteointegración y osteoinducción. Dentro de los diferentes *scaffolds*, aquellos realizados con materiales compuestos permiten combinar unas adecuadas propiedades mecánicas con una buena interacción biológica. En esta investigación se sintetizó un *scaffold* poroso a base de un compuesto de polietilenglicol y nanohidroxiapatita con puntos de carbono embebidos (PEG-nHA-PC). La síntesis de los puntos de carbono (PC) se hizo por reacción asistida por microondas, los cuales exhibieron una fluorescencia característica en el rango de 400 nm a 500 nm. La nanohidroxiapatita embebida con puntos de carbono (nHA-PC) fue sintetizada por el método de precipitación continua rápida. Se estimó un 24.5 % de incorporación de PC en la nanohidroxiapatita y el producto final nHA-PC, conservaba las mismas propiedades fluorescentes de los PC originales. Diferentes *scaffolds* de PEG-nHA-PC fueron sintetizados por el método de mezcla directa, variando la relación de composición PEG:nHA-PC en 80:20, 70:30 y 60:40. La probeta con relación de composición de 60:40 compactada con una fuerza de 4000 N, presentó los resultados más prometedores, con una densidad de  $0,619 \frac{g}{cm^3}$ . Por último, se proponen e implementan dos protocolos que permiten la introducción de compuestos espaciadores con el propósito de aumentar la porosidad del *scaffold*. Se determinó que el protocolo que hace uso de bicarbonato de amonio como compuesto espaciador como el más apropiado, al demostrarse la remoción total del compuesto espaciador y un tener procedimiento experimental más simple. La densidad estimada del scaffold PEG-nHA-PC poroso fue de  $0,504 \frac{g}{cm^3}$ , similar a la densidad del hueso trabecular. Esta similitud encontrada aporta en el potencial de este *scaffold* en su posible uso para el tratamiento de defectos óseos.

# Índice general

Agradecimientos . . . . .	I
Resumen . . . . .	II
<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
1.1. Motivación . . . . .	1
1.2. Proyecto relacionado . . . . .	3
1.3. Objetivos del proyecto . . . . .	4
1.3.1. Objetivo general . . . . .	4
1.3.2. Objetivos específicos . . . . .	4
1.4. Contribuciones . . . . .	4
1.5. Organización del documento . . . . .	5
<b>2. ESTADO DEL ARTE</b>	<b>6</b>
2.1. Tejido óseo . . . . .	6
2.1.1. Arquitectura del tejido óseo . . . . .	6
2.1.2. Composición . . . . .	7
2.1.3. Propiedades mecánicas . . . . .	8
2.2. Defectos óseos . . . . .	9
2.3. <i>Scaffolds</i> para regeneración ósea . . . . .	10
2.3.1. <i>Scaffolds</i> poliméricos . . . . .	11
2.3.2. <i>Scaffolds</i> cerámicos . . . . .	12
2.3.3. Materiales compuestos . . . . .	13
2.4. Puntos de carbono (PC) . . . . .	14
2.5. Revisión bibliográfica: Espaciadores . . . . .	14
<b>3. METODOLOGÍA</b>	<b>17</b>
3.1. Síntesis de puntos de carbono (PC) . . . . .	17
3.2. Síntesis de nanohidroxiapatita embebida con puntos de carbono (nHA-PC) . . . . .	18
3.3. Síntesis de <i>scaffold</i> de PEG-nHA-PC en función de la composición . . . . .	19
3.3.1. Inclusión de compuesto espaciador: Cloruro de sodio . . . . .	20
3.3.2. Inclusión de compuesto espaciador: Bicarbonato de amonio . . . . .	21
3.4. Pruebas de caracterización . . . . .	21
3.4.1. Espectrofotometría UV-Vis . . . . .	22
3.4.2. Espectrofotometría de fluorescencia . . . . .	22
3.4.3. Espectroscopía infrarroja de transformada de Fourier (FTIR) . . . . .	22
3.4.4. Pruebas de densidad . . . . .	23

<b>4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	<b>24</b>
4.1. Puntos de carbono (PC) . . . . .	24
4.2. Nanohidroxiapatita con puntos de carbono embebidos (nHA-PC) . . . . .	26
4.3. <i>Scaffolds</i> de PEG-nHA-PC . . . . .	28
4.4. Caracterización por FTIR . . . . .	34
<b>5. CONCLUSIONES</b>	<b>36</b>
<b>6. RECOMENDACIONES Y TRABAJOS FUTUROS</b>	<b>38</b>
6.1. Recomendaciones . . . . .	38
6.2. Trabajos futuros . . . . .	38
<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>40</b>
<b>ANEXO</b>	<b>46</b>

# Índice de figuras

2.1. Anatomía macroscópica de un hueso largo [6]. . . . .	7
2.2. Anatomía en las distintas escalas de un hueso largo[6]. . . . .	8
2.3. Distintas estructuras del PEG [49]. . . . .	12
3.1. Diagrama de la metodología. . . . .	17
3.2. Diagrama del proceso de síntesis de PC. . . . .	18
3.3. Diagrama del proceso de síntesis de nHA-PC. . . . .	19
3.4. Diagrama del proceso de síntesis de <i>scaffold</i> de PEG-nHa-PC con variaciones en la composición. . . . .	20
4.1. Puntos de carbono sintetizados a partir de ácido cítrico, N,N-dimetilformamida y etanol bajo irradiación de 365 nm. A) Puntos de carbono secos. B) Solución de puntos de carbono a una concentración de $10 \frac{mg}{mL}$ . . . . .	24
4.2. Espectros de absorción de PC en función de la concentración dispersos en solución de agua:etanol (1:1) excitados con fuente de luz de deuterio. . . . .	25
4.3. Espectro de emisión de solución de PC irradiada con un LED con longitud de onda de 365 nm. Valores normalizados con respecto al máximo. . . . .	26
4.4. Foto del producto de síntesis de nHA-PC. A) Muestra con luz natural. B) Muestra excitada con una lampara con longitud de onda de 365nm. . . . .	26
4.5. Curva de calibración obtenida por medio del proceso descrito en la sección 3.4.1. . . . .	27
4.6. Espectros de absorbancia, nHA-PC (rojo), PC (azul). . . . .	28
4.7. Espectros de emisión de nHA-PC, irradiada con un LED con longitud de onda de 365 nm. Curva normalizada con respecto al valor máximo. . . . .	29
4.8. Polvo macerado de PEG-nHA-PC. . . . .	30
4.9. Probetas obtenidas después de compactar los polvos de PEG-nHA-PC. . . . .	31
4.10. Probetas con composición 60-40 después del ensayo de densidad. A) Compactada a 2000 N. B) Compactada a 3000 N. C) Compactada a 4000 N. . . . .	31
4.11. Densidad obtenida en función de la fuerza de compactación. . . . .	31
4.12. Probetas compactadas con compuestos espaciadores antes de realizar el proceso de remoción. A) Espaciador: NaCl. B) Espaciador: Bicarbonato de amonio. . . . .	32
4.13. <i>Scaffold</i> poroso sintetizado por medio de la técnica de espaciadores, usando bicarbonato de amonio como compuesto espaciador. A) Vista frontal del <i>scaffold</i> . B) Vista superior del <i>scaffold</i> . . . . .	33
4.14. Espectro FTIR de las diferentes muestras de PEG-nHA-PC, nHA-PC, nHA y PC. . . . .	34

# Índice de tablas

2.1. Distintos niveles jerárquicos del hueso [36]. . . . .	7
2.2. Valores de resistencia máxima y módulo elástico del hueso cortical humano para los distintos tipos de ensayos mecánicos [36]. . . . .	9
2.3. Requerimientos de diseño de un <i>scaffold</i> para tejido óseo [8], [21] . . . . .	11
2.4. Ecuaciones de búsqueda usadas para la revisión bibliográfica. . . . .	15
2.5. Lista de compuestos espaciadores y sus principales ventajas [72]. . . . .	16
3.1. Cantidad de reactivos usados para las distintas composiciones de PEG-nHA-PC. . . . .	20
4.1. Fuerzas de compactación y masas promedio obtenidas en cada síntesis de cada composición de PEG-nHA-PC. . . . .	30
4.2. Gravedad específica y densidades obtenidas para las distintas composiciones y fuerzas de compactación. . . . .	32
4.3. Masas obtenidas en el proceso de remoción del compuesto espaciador. . . . .	33

# Capítulo 1

## INTRODUCCIÓN

En este capítulo se contextualiza la problemática que genera los defectos óseos de gran tamaño y las limitaciones que están presentes en los tratamientos actuales. También se mencionan algunas de las soluciones que se están proponiendo desde la ingeniería de tejidos, por medio del uso de *scaffolds* como estructuras de soporte que permiten la rehabilitación regenerativa del hueso. Posteriormente, se describen las características que deben tener los biomateriales para este tipo de aplicaciones lo cual fundamenta el objetivo general de este proyecto de grado.

### 1.1 Motivación

Los huesos son estructuras rígidas cuyas funciones principales implican el soporte de carga mecánica y protección, homeostasis mineral y hematopoyesis [1]. El hueso está compuesto principalmente por una fase mineral (aproximadamente 65 % de su peso) en su mayor parte hidroxiapatita (HA), un mineral de fosfato de calcio. El hueso también cuenta con un componente orgánico (responsable de aproximadamente 20 %-25 % del resto de su composición) que en su mayor parte es colágeno tipo I [1]-[3].

El hueso a nivel macroscópico consta principalmente de dos tipos de estructuras: el hueso trabecular y el hueso compacto. El hueso trabecular se encuentra localizado en el interior del tejido óseo y tiene una estructura esponjosa diseñada para dar tenacidad al hueso con un peso mínimo [4]. El hueso compacto está localizado en la parte exterior del hueso y está diseñado para ser resistente a los movimientos de torsión, flexión y fuerza compresiva [5]. Es debido a estas dos estructuras que el hueso puede cumplir con sus funciones mecánicas ya que tiene una estructura rígida resistente a la deformación y al mismo tiempo flexible para absorber y disipar energía mecánica en la propagación de la fractura [6].

El tejido óseo se mantiene en constante remodelación lo que le permite al hueso actuar como reserva de calcio y realizar correctamente su función de soporte mecánico sin perder sus características mecánicas [7]. Esta remodelación es posible dado que este tejido cuenta con células madre mesenquimales y tres tipos de células óseas responsables de la regeneración: osteoblastos, osteoclastos y osteocitos [8]. Esta capacidad hace que el tejido óseo se pueda regenerar correctamente cuando sufre algún daño en su estructura. Sin embargo, hay casos en donde el proceso regenerativo se ve comprometido debido a la necrosis vascular, osteoporosis

o defectos óseos de gran tamaño, haciendo que el hueso pierda sus propiedades mecánicas y su integridad [9].

A nivel mundial aproximadamente 1710 millones de personas sufren de trastornos musculoesqueléticos los cuales, en gran medida, limitan la movilidad y destreza de las personas afectadas; como consecuencia presentan una menor calidad de vida al tener menor capacidad de participación social y bienestar [10]. Dentro de estos trastornos se encuentran patologías que causan defectos óseos como osteoporosis, osteopenia y fracturas. En algunas de estas patologías, se evidencia la falta de tejido óseo en un área donde normalmente debería de haber hueso [11].

Anualmente 200 millones personas a nivel mundial sufren de osteoporosis lo que la hace un problema de salud pública [12], y cerca de 9 millones de fracturas de hueso se dan por esta causa [13]. El tratamiento más común actualmente para los defectos óseos es el uso de injertos óseos [9]. Debido a la gran cantidad de personas que necesitan un injerto, el tejido óseo es el segundo tejido más trasplantado en el ser humano [14]. Estos pueden ser de tres distintas fuentes: Auto-injertos, aloinjertos y xenoinjertos. El primer tipo, y más utilizado, consiste en extraer el tejido de una parte sana del paciente a tratar [15]. Sin embargo, este requiere un segundo sitio de morbilidad lo que puede llevar a una infección o molestia en este sitio, y para defectos muy grandes la cantidad de tejido es insuficiente [16]. Por otro lado, los aloinjertos son trasplantes provenientes de un donador de la misma especie, y los xenoinjertos los cuales son trasplantes provenientes de otra especie [17]. A pesar de no tener la limitación del tejido, estos presentan problemas de inmunocompatibilidad y pueden ser portadores de enfermedades del donante [16].

Debido a las limitaciones expuestas, desde el campo de la ingeniería de tejidos se ha propuesto el desarrollo de *scaffolds* con propiedades mecánicas y características físicas similares a las del hueso, que sean un soporte para el crecimiento del tejido y que pueden ser usadas con células progenitoras y moléculas de señalización [8]. En este caso un *scaffold* puede tener características osteoinductoras, es decir, ser capaz de promover la diferenciación de células progenitoras de osteoblastos. También puede ser osteoconductor, y permitir el crecimiento del tejido óseo en su interfaz, proporcionando las propiedades mecánicas adecuadas para soportar la carga [18].

Dependiendo el material que se use en los *scaffolds*, se van a tener ciertas ventajas y limitaciones. Los materiales que cuentan con mejores propiedades mecánicas son los metales [19]. Estos son biocompatibles, sin embargo, tienen desventajas tales como su estabilidad a largo plazo y su elevado módulo elástico que puede aumentar el riesgo de osteopenia [19], [20]. Es por esta razón, que la mayoría de *scaffolds* que están siendo usados para esta aplicación son diseñados a base de polímeros, cerámicos bioactivos y compuestos [21]. Los polímeros pueden provenir de fuentes naturales o sintéticas y pueden ser bioactivos y biodegradables [22], pero cuentan con baja resistencia mecánica y su tasa de degradación puede ser difícil de controlar [21]. Los cerámicos bioactivos presentan propiedades osteoconductoras y osteoinductivas, no obstante, controlar su tasa de reabsorción puede presentar un problema y su manipulación a formas 3D sigue siendo un desafío [19]. Los compuestos son aquellos que están hechos de dos o más materiales con el propósito de mejorar alguna característica de los materiales usados

por separado [21], [22].

Uno de los materiales más usados actualmente es la hidroxiapatita (HA). Este es un mineral que comprende alrededor del 50% del peso del tejido óseo, y cuenta con propiedades de osteoconducción y osteointegración [23]. Es importante destacar que al usar la HA en la escala nanométrica se han reportado ventajas en términos de biocompatibilidad, mejores propiedades osteoconductoras, y cuenta con la capacidad de promover la proliferación celular [24], [25]. Sin embargo, las propiedades mecánicas de la HA son limitadas, ya que presenta fragilidad tanto en escala nanométrica como micrométrica [24], [26]. Para mejorar sus propiedades mecánicas se han propuesto *scaffolds* compuestos de HA con una matriz polimérica [19]. En 2019 se logró la fabricación de un *scaffold* con un compuesto de nano-hidroxiapatita (nHA), gelatina y PLGA que mostró migración mejorada de células madre mesenquimales en un modelo *in vivo* [25]. Una manera de implementar la HA a escala nanométrica y al mismo tiempo mejorar las propiedades mecánicas es por medio de puntos de carbono, los cuales son nanopartículas fluorescentes biocompatibles basadas en carbono [27]. El uso de estas partículas no solo ayuda a mejorar las propiedades mecánicas, también mejora la adhesión de osteoblastos, la diferenciación osteogénica y la proliferación celular [28]. En 2021 Degiovanni et al., [29] desarrollaron el protocolo para la síntesis de puntos de carbono embebidos en nanopartículas de HA (nHA-PC) y posteriormente, Molina et al., [30] sintetizaron un compuesto de polietilenglicol-nHA incorporando los puntos de carbono embebidos (PEG-nHA-PC). Esto con el fin de desarrollar un *scaffold* multiescala para la regeneración del tejido óseo que aproveche las ventajas del compuesto nHA-PC como biomaterial para regeneración ósea y que cuente con propiedades mecánicas mejoradas de un compuesto polímero-cerámico, al añadirle polietilenglicol al *scaffold*.

Además de contar con las propiedades mecánicas necesarias, la geometría y morfología de los *scaffolds* diseñados es de vital importancia, ya que si se tiene una porosidad e interconectividad definida se puede obtener una osteoconductividad mejorada [31]. Una manera de lograr obtener un *scaffold* poroso, es el uso de espaciadores, los cuales son compuestos que usados en el proceso de fabricación del *scaffold* que posterior a este proceso, son retirados, favoreciendo la generación de poros en la estructura del *scaffold* [32]. Con esta técnica se puede controlar la localización y la uniformidad de los poros a un bajo costo [33].

Dado que la HA es uno de los materiales más usados en para el tratamiento de defectos óseos por sus propiedades y que con la técnica de espaciadores se puede lograr un buen control sobre la geometría del *scaffold*, este proyecto busca sintetizar y estudiar un *scaffold* con cambios en la proporción PEG:nHA-PC y posteriormente hacer la introducción de compuestos espaciadores que permitan incrementar la porosidad del material.

## 1.2 Proyecto relacionado

Este proyecto se realiza bajo el marco del proyecto "*Modificación de scaffolds poliméricos a base de PEG mediante la incorporación de puntos de carbono y nanohidroxiapatita para aplicaciones de regeneración de tejidos óseos*" que tiene como objetivo evaluar las propiedades biológicas y mecánicas de espumas de PEG modificadas con puntos de carbono embebidos en

nanopartículas de hidroxiapatita para aplicaciones de tejidos óseos. Este proyecto fue beneficiado para ser financiado en la Convocatoria Interna - Proyectos de programa de la Escuela Colombiana de Ingeniería Julio Garavito, y desarrollado por el semillero de investigación Synergia del programa de Ingeniería Biomédica de la Escuela Colombiana de Ingeniería Julio Garavito en convenio con la Universidad del Rosario y en colaboración con el semillero SiBio perteneciente a la Universidad del Rosario.

### 1.3 Objetivos del proyecto

Teniendo en cuenta el contexto presentado, se plantean los siguientes objetivos para este trabajo de grado.

#### 1.3.1. Objetivo general

Evaluar el impacto de la composición y la introducción de compuestos espaciadores en la densidad de un *scaffold* de PEG y nanohidroxiapatita embebida con puntos de carbono.

#### 1.3.2. Objetivos específicos

- Sintetizar un *scaffold* a base de un compuesto de PEG y nanohidroxiapatita embebida con puntos de carbono variando las proporciones del componente polímero-cerámico.
- Establecer el efecto de la variación de la composición en la densidad de los scaffolds obtenidos, a través de una prueba estándar.
- Diseñar un protocolo para incorporar espaciadores en la síntesis de un *scaffold* a base de un compuesto de PEG y nanohidroxiapatita embebida con puntos de carbono.

### 1.4 Contribuciones

En esta investigación se logró sintetizar puntos de carbono por el método hidrotermal, los cuales presentaban fluorescencia en el rango de 450 nm a 500 nm. También se realizó la síntesis de nanohidroxiapatita embebida con puntos de carbono mediante el método de precipitación continua rápida. Se confirmó la presencia de puntos de carbono en la muestra y se logró cuantificar el porcentaje de pérdida de puntos de carbono en el proceso de síntesis de la nanohidroxiapatita.

Se desarrollaron *scaffolds* con forma cilíndrica de PEG y nanohidroxiapatita embebida con puntos de carbono por el método de mezcla directa. Se propusieron e implementaron 2 protocolos para la inclusión de compuestos espaciadores en los *scaffolds*. Los compuestos espaciadores usados fueron cloruro de sodio y bicarbonato de amonio, el segundo evidenció ventajas en su procedimiento experimental y su completa remoción. De esta manera se determinó que el protocolo propuesto para el uso de bicarbonato de amonio como compuesto espaciador en la síntesis de *scaffolds* de PEG-nHA-PC permite crear *scaffolds* porosos.

## 1.5 Organización del documento

En este documento se divide en seis capítulos principales. El primer capítulo presenta la introducción donde se muestra la problemática a tratar con la presente investigación, se plantean los objetivos para abordar esta problemática y se expone la organización del documento. El segundo capítulo consiste en el estado del arte, donde se abarcan todos los conceptos necesarios para entender la problemática tales como la arquitectura, composición y propiedades mecánicas del tejido óseo. Posteriormente, se abordan los defectos óseos y la importancia de encontrar un tratamiento para estos, como el uso de *scaffolds*. Se exploraran los requerimientos biológicos y estructurales para que un *scaffold* sea capaz de realizar una regeneración ósea. Por último, en este capítulo se discuten los distintos materiales y técnicas que pueden ser usadas para fabricar *scaffolds*.

Los materiales y la metodología son expuestos en el tercer capítulo donde se explica en detalle los procedimientos experimentales llevados a cabo para la síntesis de PC, nHA-PC y *scaffolds* compuestos de PEG-nHA-PC y las técnicas de caracterización de todos los materiales desarrollados. Los resultados son presentados y discutidos en el cuarto capítulo. En el quinto capítulo se concluyen los resultados encontrados, por último, en el sexto capítulo se realizan las recomendaciones a tener en cuenta y se proponen trabajos futuros que se puedan llegar a realizar con base en los resultados obtenidos.

# Capítulo 2

## ESTADO DEL ARTE

En este capítulo se aborda la arquitectura, composición y propiedades mecánicas del tejido óseo, así como la definición y mayores desafíos que presentan los defectos óseos. Posteriormente, se muestran las características de los *scaffolds* para la regeneración ósea.

### 2.1 Tejido óseo

El tejido óseo es una estructura jerárquica que soporta el movimiento del cuerpo y su locomoción [34]. Gracias a su organización multiescala, el hueso también está adaptado para soportar cargas repetitivas y evitar fallas por fatiga [1]. El esqueleto humano contiene más de 200 huesos los cuales se clasifican en 4 distintos grupos según su forma. Los huesos largos, los cuales se encuentran en las extremidades y son los encargados de producir los principales movimientos en el cuerpo. Los cortos localizados en la muñeca y son casi iguales de ancho que de largo. Los planos que se encuentran la mayoría en en cráneo y aquellos que no corresponden a ninguna otra de las tres categorías se clasifican como irregulares [4], [6]. Los huesos son responsables por la producción de eritrocitos, y el almacenamiento de minerales y factores de crecimiento, el almacenamiento de iones de fosfato y calcio para mantener el equilibrio hidroelectrolítico en el tejido tisular y sangre. El tejido óseo también sirve de amortiguador en la sangre ya que libera o absorbe sales alcalinas de fosfato y carbonato cuando hay cambios excesivos de pH [4], [34].

#### 2.1.1. Arquitectura del tejido óseo

Dependiendo de su arquitectura el hueso se puede clasificar en dos tipos: Trabecular (o esponjoso) y cortical (o compacto) [5], [6]. El hueso cortical corresponde al 80 % de la masa total del tejido óseo, y cuenta con una estructura densa que se encuentra como una cubierta externa del hueso como se puede observar en la figura 2.1. Esta cubierta encierra la cavidad medular la cual contiene la médula ósea que se divide en dos tipos, la médula ósea roja (tejido mieloide) que es un tejido hemopoyético encargado de producir sangre y la médula ósea amarilla que es médula ósea roja transformado en grasa y que carece de la habilidad de producir sangre [4]. Por otro lado, el hueso trabecular cuenta con una alta porosidad de un 50 % - 90 % de su volumen total, lo que le confiere una mayor área de contacto para la médula espinal roja, los vasos sanguíneos, y los tejidos conectivos que están en contacto con el hueso, estas

características facilitan el rol del hueso en la hematopoyesis y la homeostasis mineral [6].

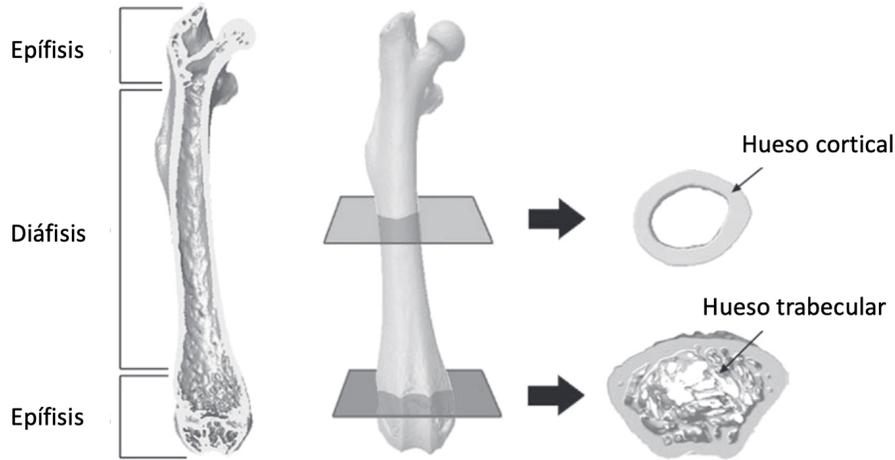


Figura 2.1: Anatomía macroscópica de un hueso largo [6].

### 2.1.2. Composición

El hueso está compuesto de aproximadamente 65 % de mineral, principalmente HA [1]. Su componente orgánico corresponde a 30 % de su composición, que en su mayoría son fibras de colágeno tipo I y el porcentaje restante del hueso es agua [35]. Existe un intercambio de agua en razón 1:1 con el mineral, lo que hace que cuando el hueso pasa por un proceso de mineralización el contenido del agua disminuye y viceversa [1].

El hueso es una estructura jerárquica que varía desde el nivel macroscópico hasta la escala nanométrica [6] como se puede observar en la figura 2.2 y es descrita en mayor detalle en la tabla 2.1. En esta estructura el colágeno fibrilar y componentes minerales como HA conforman en menor nivel a una escala nanométrica, seguido a esto en un rango de 1 mm a 1  $\mu\text{m}$  se encuentran las láminas y los osteones que son cilindros de matrices mineralizadas. Por último, en la escala macroscópica se encuentra el hueso trabecular y cortical. Conocer todas las escalas del hueso es de vital importancia puesto que las propiedades mecánicas varían dependiendo la escala en la que se trabaje [36].

Tabla 2.1: Distintos niveles jerárquicos del hueso [36].

Nivel jerárquico	Componentes principales
Macroestructura	Hueso cortical y trabecular
Microestructura	Osteones y trabéculas individuales
Submicroestructura	Láminas
Nanoestructura	Colágeno fibrilar y componentes minerales como HA

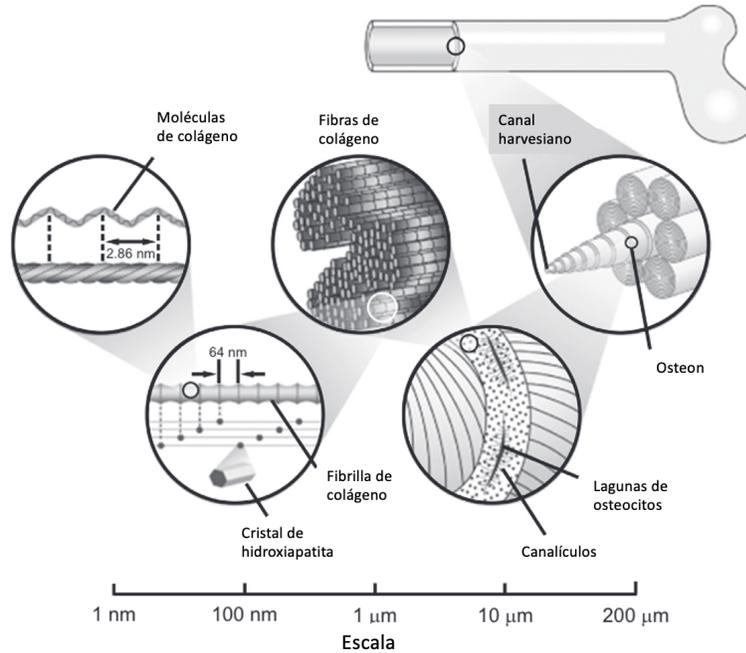


Figura 2.2: Anatomía en las distintas escalas de un hueso largo[6].

### 2.1.3. Propiedades mecánicas

En términos mecánicos, el hueso es un componente compuesto con varias fases sólidas y líquidas [37]. Su componente inorgánico le confiere flexibilidad y resiliencia mientras que su componente orgánico le da gran resistencia a la tracción en sentido longitudinal gracias a unión mediante enlaces cruzados de una triple hélice de cadenas que forman las fibras de colágeno [36], [37]. El hueso es un material anisotrópico porque sus propiedades mecánicas difieren dependiendo la dirección en la que se aplique la fuerza [37]. También es un material viscoelástico donde dependiendo el tiempo y la frecuencia en la que se aplique la carga se van a tener distintas respuestas mecánicas. Para el caso del hueso, este muestra mayor resistencia a cargas aplicadas con alta velocidad de deformación [37], [38].

Para comprender en mayor medida las propiedades mecánicas del hueso, este se puede exponer a pruebas de tensión, compresión, flexión y torsión. Las pruebas de tensión o compresión son las más importantes puesto que proveen información del cambio de las dimensiones de un material cuando se le aplica una fuerza perpendicular al área de interés[38]. Al hacer esta prueba se obtiene información como el módulo de young asociado a la rigidez o flexibilidad del hueso. También se obtiene el valor de resiliencia el cual da información sobre cuánta energía puede absorber el hueso antes de sufrir una deformación permanente. De igual manera, con estas pruebas se puede determinar la zona elástica para comprender cuáles esfuerzos puede soportar el hueso con deformación reversible, y la zona plástica que permite cuantificar la deformación que se va a obtener antes de una rotura [35]. En la tabla 2.2 se muestran los valores de resistencia y módulo elástico para el hueso cortical humano, donde las variaciones en los valores se deben a la región de procedencia y la edad de la muestra [36]. Las densidades

son  $1.88 \text{ g/cm}^3$  y  $0,48 \text{ g/cm}^3$  para el hueso cortical y trabecular respectivamente[36], [39].

Tabla 2.2: Valores de resistencia máxima y módulo elástico del hueso cortical humano para los distintos tipos de ensayos mecánicos [36].

Ensayo	Resistencia (MPa)	Módulo de Young (GPa)
Compresión	167 - 213	14,7 - 34,3
Tensión	107 - 170	11,4 - 29,2
Flexión	103 - 238	9,8 - 15,7
Torsión	65 - 71	3,1 - 3,7

A la hora de desarrollar un *scaffold* se requiere que sus propiedades mecánicas sean lo más parecidas a las del hueso para que pueda soportar la carga y se integre de mejor manera. Si un *scaffold* presenta un modulo de elasticidad significativamente inferior al del hueso, el implante puede fallar al no soportar la carga, pero si el modulo de elasticidad del implante es altamente superior puede causar blindaje por estrés en el hueso.

## 2.2 Defectos óseos

Cuando hay una falta de tejido en un área donde normalmente debería haber hueso, se considera como defecto óseo y las causas más comunes de estos son grandes traumas o infecciones posteriores [11]. El tejido óseo es capaz de regenerarse ya que cuenta con células madre mesenquimales las cuales establecen una base de cartilago para que sea mineralizado durante la mineralización endocondrial [8]. También cuenta con células óseas (osteoblastos, oteoclastos y osteocitos), que son células progenitoras de hueso [9]. El proceso de remodelación ósea ocurre durante toda la vida de la persona y es capaz de reparar microfracturas. Esto se da por una acción conjunta de los osteoblastos y osteoclastos donde dependiendo de señales mecánicas, endocrinas o fisiológicas que el hueso reciba se va a aumentar (por acción de los osteoblastos) o disminuir (por acción de los osteoclastos) la densidad ósea. Si este proceso no ocurre en sincronía y uno de los dos desplaza al otro u ocurren demasiado rápido esto puede llegar a patologías como osteoporosis [4].

Cuando este proceso se ve comprometido el hueso pierde su integridad y en consecuencia sus propiedades mecánicas [9]. Adicionalmente, cuando el defecto es muy grande la capacidad de regeneración del hueso es insuficiente e incluso no se realiza después de intervenciones quirúrgicas[40]. Estos defectos se definen como críticos y son demasiado grandes para sanar espontáneamente o por medio de un injerto estándar de hueso esponjoso [41].

El tratamiento para defectos óseos más usado actualmente es por medio de injertos óseos [9]. Los injertos más utilizados son los autoinjertos, los cuales consisten en extraer tejido de una parte sana del paciente que no esté expuesta a una carga mecánica muy alta, buscando así una mejor respuesta inmunológica. Sin embargo, este tipo de tratamiento necesita de un segundo sitio de morbilidad y su disponibilidad es muy limitada por lo que se dificulta tratar defectos de gran tamaño con este tipo de injertos [16], [42]. Por esta misma razón se hace

uso de aloinjertos y xenoinjertos que son trasplantes provenientes de un donador donde se tiene una mayor disponibilidad, pero esto conlleva a problemas de inmunocompatibilidad y transporte de enfermedades del donante [17], [42]. Adicionalmente es importante mencionar que debido a la cantidad de personas con esta patología la demanda de injertos sigue siendo superior a los disponibles.

Por las razones previamente expuestas, desde la ingeniería de tejidos se ha propuesto el desarrollo de *scaffolds* con el propósito de suplir la demanda de injertos y favorecer la regeneración del tejido óseo en situaciones donde las intervenciones quirúrgicas actuales no son suficientes o no logran la rehabilitación del hueso.

### 2.3 *Scaffolds* para regeneración ósea

En la ingeniería de tejidos óseos se busca superar las limitaciones que los implantes comunes suelen tener tales como la escasez de donantes, insuficiencia de suministros de injertos, transmisión de patologías y rechazo inmunológico del implante [43].

A la hora de diseñar *scaffolds* se tiene que tener en cuenta que estos deben de cumplir ciertos requisitos. En primer lugar, los *scaffolds* deben de estar compuestos por un biomaterial, que se define como una matriz temporal que provee la arquitectura y el entorno para que el hueso pueda crecer [21]. El biomaterial debe ser capaz de ayudar a la adhesión, migración y proliferación celular, de manera que debe contar con una microestructura porosa con una alta interconectividad de los poros que permita un buen intercambio de nutrientes en el *scaffold* [8]. Teniendo en cuenta la anatomía del hueso y que las propiedades mecánicas varían dependiendo de la escala, se tiene que un *scaffold* para la regeneración del tejido óseo debe tener una macroporosidad y microporosidad con tamaño de poro mayor a 20  $\mu\text{m}$  y menor a 100  $\mu\text{m}$  respectivamente [22]. Esto se hace con el propósito de imitar la arquitectura del hueso para que este sea capaz de soportar las cargas mecánicas sin causar blindaje de estrés o sufrir una falla. Por esta misma razón se ha estudiado la inclusión de nanocompuestos ya que estos tienen buenas propiedades mecánicas y una buena integración con su entorno y pueden simular las dimensiones de alguno de los componentes del hueso como las fibras de colágeno [44].

En segundo lugar están los requerimientos biológicos donde se busca la mayor integración posible del *scaffold* con el tejido óseo. Esto se logra diseñando biomateriales que sean biocompatibles, y biodegradables teniendo en cuenta que sus productos de degradación tampoco pueden ser tóxicos [8], [21]. En algunos casos, el uso de células juega un papel importante en el aspecto biológico del *scaffold* porque se necesita que estas sean osteoprogenitoras y ayuden al crecimiento del hueso. Las células madre mesenquimales son usadas porque son de fácil obtención y cultivo, además son multipotentes y tienen baja inmunogenicidad lo que les permite diferenciarse en hueso o cartílago [8], [45]. También se han usado células madre derivadas de tejido adiposo ya que estas contienen células endoteliales, células musculares lisas y células madres mesenquimales [46]. Por último, un factor importante en la integración biológica del *scaffold* con el tejido óseo son las señales, es decir, todas las biomoléculas que permiten a las células del *scaffold* y del hueso facilitar la regeneración de este mismo. Por lo general estas biomoléculas son proteínas y factores de crecimiento como el factor de crecimiento transfor-

mante  $\beta$ , factor de crecimiento insulínico, factor de crecimiento de fibroblastos, la proteína morfogénica ósea, y el factor de crecimiento endotelial vascular [22]. Estos factores pueden facilitar la migración de las células o inducir etapas de proliferación. En la tabla 2.3 se resumen las características previamente mencionadas y se resaltan otros aspectos importantes en los criterios de diseño de un *scaffold*.

Tabla 2.3: Requerimientos de diseño de un *scaffold* para tejido óseo [8], [21]

<b>Requerimientos biológicos</b>	Biocompatible
	Biodegradable
	Bioabsorbible
	No inmunogénico
	No tóxico (ni sus productos de degradación)
<b>Requerimientos estructurales</b>	Biomimético
	Alta porosidad
	Poros altamente interconectados
	Arquitectura correcta a todos los niveles
	Topografía de superficie
	Propiedades mecánicas similares a las del hueso

### 2.3.1. *Scaffolds* poliméricos

Los polímeros son una buena opción para su uso en *scaffolds* al ser biocompatibles y biodegradables, y ofrecer un gran control sobre sus propiedades mecánicas, composición y forma [47]. Los polímeros naturales ofrecen una mejor integración biológica que contribuye a la adhesión celular, sin embargo, sus propiedades son más difíciles de controlar debido a la presencia de impurezas naturales lo que dificulta la tarea de controlar su tasa de degradación y composición. Además, su disponibilidad es limitada lo que los hace más costosos en comparación a los polímeros sintéticos [43]. Por el contrario, estos últimos tienen la característica que son altamente reproducibles y sus propiedades mecánicas se pueden controlar fácilmente porque pueden ser sintetizados de manera que se obtiene mayor uniformidad y predictibilidad en su estructura. Dentro de los polímeros sintéticos más frecuentemente utilizados se encuentran el ácido poliglicólico (PGA), el ácido poliláctico (PLA), la policaprolactona (PCL) y el polietilenglicol (PEG) [48], [49].

El PGA es un material termoplástico y cuenta con una alta cristalinidad lo que hace que no sea soluble en compuestos orgánicos. Este material puede ser procesado por técnicas como extrusión, inyección y modelado por compresión. Es un material utilizado en la ingeniería de tejidos puesto que cuenta con una buena biodegradabilidad y sus productos de degradación son metabolitos naturales [48], [50]. El PLA tiene una alta resistencia a la tracción, elongación y un módulo de Young lo que hace que sea ideal para aplicaciones con carga. Este puede ser usado para la fabricación de *scaffolds* 3D por medio de las técnicas como fundición por disolvente, fundición en gel, lixiviación de partículas y electrohilado [48]. Los polímeros mencionados anteriormente están limitados por su naturaleza hidrofóbica, es por esto que el PEG es de gran interés, ya que éste no presenta respuestas inmunogénicas ni tóxicas y puede generar

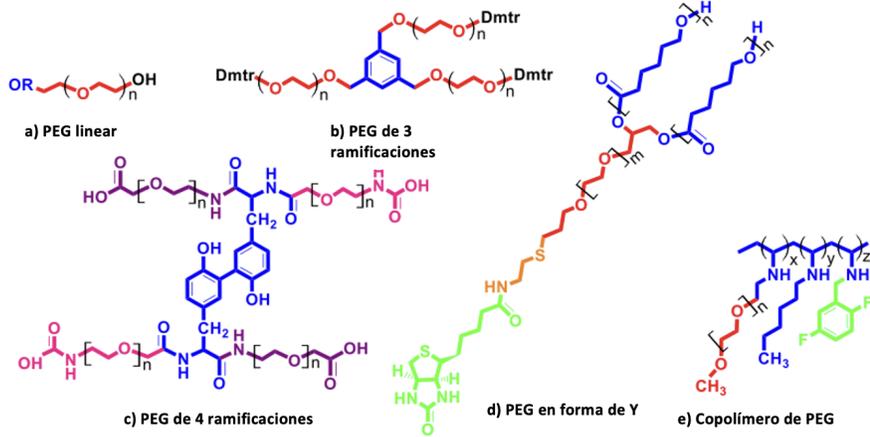


Figura 2.3: Distintas estructuras del PEG [49].

interacciones hidrofílicas. Sus posibles estructuras se pueden ver en la figura 2.3, y gracias a éstas se favorecen los enlaces PEG-OH lo que atrae a las moléculas de calcio y fósforo que a su vez mejora la osteointegración [49], [51]. Este es un polímero que permite modificar las propiedades mecánicas y la tasa de degradación de los biomateriales haciendo posible el diseño de un *scaffold* que pueda igualar la tasa de regeneración ósea [52]. Los diferentes grupos funcionales terminales del PEG facilitan la copolimerización lo que puede cambiar las propiedades del polímero como cristalinidad, punto de fusión, y sus propiedades mecánicas [53]. Es por esto que el PEG se ha utilizado para diseñar materiales biomiméticos para permitir la inmovilización de compuestos bioactivos, de manera que los polímeros sean capaces de unirse a las proteínas en una reacción instantánea y de esta manera mejorar la capacidad del *scaffold* de apoyar el crecimiento del tejido [53]. De igual manera, las propiedades mecánicas del PEG se pueden controlar fácilmente, donde cambios en el proceso de síntesis pueden hacer que se mejore el módulo de Young y se obtenga una mayor resistencia a la tensión, pero también puede llegar a ocurrir que el material presente fragilidad, si tiene una alta cristalinidad al final del proceso de síntesis [49].

### 2.3.2. *Scaffolds* cerámicos

Para la regeneración de tejido óseo, los *scaffolds* fabricados a base de cerámicos de fosfato de calcio son ampliamente utilizados debido a sus propiedades de superficie que contribuyen a la proliferación y adhesión de osteoblastos [54]. Este tipo de materiales, es libre de proteínas lo que le confiere una mínima respuesta inmunológica, reacción de cuerpo extraño y toxicidad sistémica al ser implantados [55]. El fosfato tricálcico cumple con estas características ya que cuenta con buenas características de osteoconducción, osteointegración y osteoinducción, lo que le provee una excelente biocompatibilidad, sin embargo, presenta una limitación en sus propiedades mecánicas ya que tiene tenacidad baja y alta fragilidad [56]. Otros cerámicos como la HA, el fosfato de calcio amorfo, y el fosfato de calcio bifásico son comúnmente utilizados por aplicaciones de ingeniería de tejidos óseos [54], [57].

La HA es un material con propiedades de osteoconducción y osteointegración y al ser uno

de los mayores componentes del hueso hacen que sea un material prometedor para el diseño de *scaffolds* [23]. La HA puede ser obtenida de fuentes naturales como huesos de pescado o cáscaras de huevo, o de fuentes sintéticas al implementar métodos de síntesis como precipitación continua rápida, síntesis hidrotermal e hidrólisis [58]. Sin embargo, las limitaciones de este material están relacionadas con su alta fragilidad debido a su naturaleza cerámica [26]. Para intentar mejorar estas propiedades mecánicas la HA se ha trabajado a nivel nanométrico donde se encontró que presenta mejores propiedades en términos de biocompatibilidad, porque en estas escalas los compuestos presentan una mayor superficie de área que genera un aumento en la adsorción de proteínas. También presentan una mejor osteoconductividad, adhesión y proliferación celular debido a que los *scaffolds* con estructuras nanométricas proveen un soporte estructural a las células [24], [28], [59]. No obstante, en la escala nanométrica la nHA sigue presentando alta fragilidad por lo que es necesario reforzar el material creando un compuesto con propiedades mejoradas [24].

### 2.3.3. Materiales compuestos

Los materiales compuestos son diseñados con el propósito de mejorar una o más propiedades que los materiales de forma individual presentan [60]. Para el desarrollo de *scaffolds* para regeneración de tejido óseo, se han sintetizado compuestos de polímeros y cerámicos con el propósito de mejorar la estabilidad mecánica del *scaffold* al mismo tiempo que se mejora la integración con el tejido óseo [61]. Un ejemplo de esto es el trabajo reportado por Wei et al., quienes sintetizaron un *scaffold* a base de nHA y ácido poliláctico y se obtuvo una porosidad de más de 90 % lo que permitió que el compuesto tuviera una capacidad mejorada de adsorción de proteínas al mismo tiempo que sus propiedades mecánicas mejoraban [62]. Una manera de integrar la HA con el ácido poliláctico es creando un recubrimiento delgado de HA sobre el *scaffold* polimérico, lo que mejoró la interacción del *scaffold* con los osteoblastos [63].

Otros polímeros como el PLA han sido usados para la creación de compuestos cerámico-polímero, este polímero cuando se une con HA o con fosfato tricálcico presenta un comportamiento viscoelástico con un módulo de tensión aumentado lo que le confiere la arquitectura necesaria para aplicaciones en ingeniería de tejidos óseos [64]. Para obtener un mayor control sobre la arquitectura, el PLA ha sido usado en un compuesto con nHA para sintetizar un *scaffold* por medio de modelado por deposición fundida, la cual es una técnica de impresión 3D que permite obtener mayor control en la geometría del *scaffold*. Al implementar esta técnica se logró obtener mejores propiedades mecánicas junto con una biocompatibilidad y osteogenicidad mejorada [65]. Una de las limitaciones de este tipo de tecnologías es la eficiencia de costos y el tiempo de impresión necesario para obtener un *scaffold* [66], [67].

Una manera de controlar la porosidad a bajo costo es por medio de compuestos espaciadores. Kumar et al., desarrollaron un *scaffold* compuesto de nanopartículas de HA con PEG con el propósito de evaluar sus propiedades morfológicas y mecánicas. El *scaffold* se sintetizó por el método hidrotermal y para controlar su porosidad se usó la técnica de espaciadores. Se encontró que los *scaffolds* presentaban un módulo elástico de 134.189 MPa y un esfuerzo de compresión de 12.01 MPa. En la caracterización morfológica se pudo evidenciar la formación de poros y se concluyó que la topografía era la apropiada para que hubiera una buena degra-

dación y absorción del injerto [51].

## 2.4 Puntos de carbono (PC)

Los puntos de carbono (PC) son nanopartículas fluorescentes y biocompatibles de tamaños hasta de 10 nm y baja citotoxicidad lo que les confiere excelentes propiedades para aplicaciones en bioimagen [68]. Estas partículas usualmente están compuestas por grupos de carbono  $sp^2$  con un alto contenido de oxígeno, y exhiben una buena fotoluminiscencia en la región espectral en el UV-Vis [69], [70]. Los PC se pueden obtener por medio de enfoques *top-down* o *bottom-up*. Los enfoques *top-down* consisten en obtener los PC a partir estructuras de carbono más grandes como lo son los polvos de carbono, nanotubos o nanofibras de carbono, columnas de grafito, grafeno, entre otras. Para poder lograr esto se pueden utilizar técnicas como la síntesis electroquímica, oxidación química o síntesis solvotermal [69], [71]. Para el enfoque *bottom-up* se obtienen los puntos de carbono a partir de precursores que bajo las condiciones necesarias hacen una transformación en su estructura molecular. El método hidrotermal es directo y eficiente para lograr esta transformación a través de reacciones de carbonización y polimerización. También se tiene la síntesis asistida por microondas que cuenta con una velocidad de reacción mayor y a su vez aumenta la calidad del producto. Por último, se pueden obtener puntos de carbono por medio de la carbonización de los precursores donde se calienta pequeñas moléculas orgánicas haciendo que se deshidraten [71].

Los PC han sido utilizados para reforzar un *scaffold* de nHA donde se encontró que no solo mejoraba las propiedades mecánicas sino que también contribuía a mejorar la adhesión de los osteoblastos, la diferenciación osteogénica y la proliferación celular [27], [51].

## 2.5 Revisión bibliográfica: Espaciadores

Una manera de controlar la porosidad (localización y uniformidad de los poros) que se obtiene al sintetizar un *scaffold* es con la técnica de espaciadores, donde compuestos son añadidos al polvo predecesor del *scaffold*, luego este es compactado y los espaciadores son removidos antes o durante el sinterizado dejando así el espacio para los poros [32], [33].

Se desarrolló una revisión bibliográfica con el propósito de desarrollar un protocolo para la adición de compuestos espaciadores en un *scaffold* compuesto de PEG y nanohidroxiapatita embebida con puntos de carbono. La búsqueda se realizó en las bases de datos de *Google Scholar*, *Science Direct* y *Pubmed*. Los criterios de inclusión fueron libros, artículos de investigación, y artículos de revisión en inglés y/o español. En el criterio de exclusión fueron incluidos los artículos previos a 2013. Las ecuaciones de búsqueda implementadas se pueden observar en la tabla 2.4.

En esta revisión se encontró que solo con el sinterizado de los *scaffolds* se puede obtener una porosidad. El máximo porcentaje de porosidad obtenible es del 35 % y la porosidad resultante depende únicamente de las características del polvo que se esté compactando, esto hace que los espaciadores sean una manera económica de controlar en gran medida la porosidad

Tabla 2.4: Ecuaciones de búsqueda usadas para la revisión bibliográfica.

Ecuación de búsqueda	Base de datos	Número de resultados
“Bone tissue Engineering“ AND “space holder“	Science direct	183
	Google Scholar	903
	Pubmed	11
“Bone“ AND “space holder“	Science direct	733
	Google Scholar	2.240
	Pubmed	54
“Bone tissue Engineering“ AND “porogen“	Science direct	747
	Google Scholar	5.910
	Pubmed	61

[33]. Esta porosidad va a depender en gran medida del tamaño de la partícula espaciadora seleccionada, la cantidad de esta misma con relación al material del *scaffold* y la manera como se mezcle [32]. Para determinar la fracción de volumen de los espaciadores se puede utilizar la ecuación 2.1 donde P es la porosidad,  $V_{pore}$  es el volumen de poro,  $V_{sc}$  es el volumen total del *scaffold*,  $V_{sh}$  y  $V_{scp}$  son los volúmenes de los compuestos espaciadores y el volumen total de la preforma del *scaffold* respectivamente. Usando la ecuación 2.2 se puede definir la porosidad por medio de la masa m y la densidad  $\rho$  del polvo predecesor del *scaffold*, los subíndices sh y m en la ecuación 2.2 corresponden a el espaciador y el polvo de la matriz respectivamente [72].

$$P = \frac{V_{pore}}{V_{sc}} \approx \frac{V_{sh}}{V_{scp}} \quad (2.1)$$

$$P = \frac{\frac{m_{sh}}{\rho_{sh}}}{\frac{m_{sh}}{\rho_{sh}} + \frac{m_m}{\rho_m}} \quad (2.2)$$

Los compuestos espaciadores también deben de cumplir con el requisito de ser biocompatibles y no citotóxicos, ser químicamente estables para que no interaccionen con los biomateriales del *scaffold* y deben de tener la capacidad de poder ser removidas de este mismo [73].

En 2015 Rupérez et al., desarrollaron un *scaffold* poroso a base de tántalo utilizando NaCl como compuesto espaciador. En este estudio se evaluaron las propiedades de las estructuras porosas de tántalo con una porosidad de 60 %, 70 % y 80 % y fuerzas de compactación de 350 y 450 MPa. Se logró obtener un scaffold a base de tántalo con 70 % de porosidad y un modulo de elasticidad similar al del hueso trabecular [73]. En 2018 se usaron espaciadores de este mismo material para sintetizar un *scaffold* con porosidad distribuida simétricamente en una matriz de  $TiAl_3$ , donde se encontró que la remoción de las partículas espaciadoras por el método de lixiviación en agua fue efectiva ya que se removieron todas y en la fase de sinterización no había residuos de estas. También se evidenció la formación de poros en los rangos de 300-500  $\mu m$  junto con una porosidad total de más del 70 % en la totalidad del *scaffold* [74].

Los espaciadores de NaCl también se han utilizado en *scaffolds* que cuentan con HA. Sahmani et al., sintetizaron un scaffold con un nanocompuesto recubierto con HA y óxido de

magnesio con una porosidad de 65 % - 70 % [75]. De igual manera, en 2021 se hizo un *scaffold* con compuesto de HA y titanio con NaCl como compuesto espaciador. En este estudio se combina la técnica de espaciadores con el modelado por inyección de polvo donde se consiguió una porosidad de 37.03 % y las propiedades mecánicas medidas (modulo de Young, dureza y modulo de ruptura) fueron similares a las del hueso trabecular [76].

La sacarosa es otro compuesto espaciador utilizado por su capacidad de diluirse en el agua y ser biocompatible [32]. En 2013 se sintetizó un *scaffold* con titanio y sacarosa como espaciador, el método de remoción de las partículas espaciadoras fue lixiviación con agua. Se logró obtener una porosidad de cerca a 72 % con un diámetro de poro variando de 0.8 - 1.0 mm [77]. También se encontró que al trabajar con estos dos materiales se puede obtener una alta interconectividad y se tiene gran control sobre el tamaño de los poros [78].

Hay compuestos espaciadores como la urea y el bicarbonato de amonio que son de gran interés porque poseen temperaturas de degradación bajas lo que permite que estos solo necesiten de un tratamiento térmico para realizar su remoción del *scaffold* [72]. El bicarbonato de amonio presenta una degradación completa a 150°C donde se descompone en dióxido de carbono, amoniaco y agua [79]. Por esta razón, este compuesto ha sido utilizado en la fabricación de un *scaffold* de magnesio recubierto con PCL donde se obtuvo una fuerza de compresión y resistencia a la degradación mejorada al mismo tiempo que se lograba una porosidad uniformemente distribuida [80].

Hay otros materiales que son comúnmente usados como espaciadores para el diseño de *scaffolds*, estos materiales y sus principales ventajas se encuentran en la tabla 2.5.

Tabla 2.5: Lista de compuestos espaciadores y sus principales ventajas [72].

<b>Compuesto espaciador</b>	<b>Principal ventaja</b>
Bicarbonato de amonio	Baja temperatura de descomposición
Urea	Muy alta solubilidad en agua
Sacarosa	Alta solubilidad en agua, biocompatible
Cloruro de Sodio	Alta solubilidad en agua, biocompatible
Magnesio	Buenas propiedades mecánicas, biocompatible

## Capítulo 3

# METODOLOGÍA

La realización de este proyecto se dividió en 5 etapas que se muestran en la figura 3.1. La primera consiste en la síntesis de puntos de carbono seguida por la síntesis de nanopartículas de hidroxiapatita con puntos de carbono embebidos y la síntesis de *scaffolds* de PEG-nHA-PC con cambios en su composición donde se va a evaluar su densidad para escoger una composición y proponer un protocolo para realizar la inclusión de compuestos espaciadores en la composición escogida.



Figura 3.1: Diagrama de la metodología.

### 3.1 Síntesis de puntos de carbono (PC)

Los PC se sintetizaron por reacción asistida por microondas. Se utilizó ácido cítrico monohidrato como precursor de carbono y N,N-dimetilformamida, y etanol absoluto como solventes. Todos los reactivos fueron adquiridos de la empresa Sharlau, España. El diagrama del proceso

se puede ver en la figura 3.2

Se dispersaron 0,5g de ácido cítrico en una solución de N,N-dimetilformamida : etanol en relación de volumen 1:1 (volumen total de 6mL). La solución resultante es homogeneizada por sonicación y posteriormente se hace reaccionar por microondas en un reactor Monowave 50 (Anton Paar, Austria), a 175°C, por 5 minutos en el modo AFAP (As fast as posible).

Una vez terminada la reacción, la solución es centrifugada a 10000 rpm durante 10 minutos y filtrada a 0,2  $\mu\text{m}$  (Minisart NY 25, PTFE). Para hacer la separación de los PC se empleó el método modificado de columna de cromatografía reportado por Hinterberg et al., [81]. Se separó 1,5 mL de solución de PC en una columna de vidrio con longitud de 230 mm y volumen total de 3 mL. La fase estacionaria de la columna corresponde a gel de sílice con alto grado de pureza, con un tamaño de poro de 4 nm y un tamaño de partícula de 0.063-0.200 mm (Sigma Aldrich, USA). Se implementó una solución de etanol : agua (con relación de volumen 1:1) como eluyente. La solución resultante de PC altamente fluorescentes fue filtrada con un filtro marca Sartorius con tamaño de poro de 0,2  $\mu\text{m}$  y secada en un horno concentrador de vacío (CentriVap micro IR Vacuum Concentrator, Labconco) a 65°C en la opción IR/HEAT (Infrarrojo/Calor).



Figura 3.2: Diagrama del proceso de síntesis de PC.

### 3.2 Síntesis de nanohidroxiapatita embebida con puntos de carbono (nHA-PC)

La síntesis de nanohidroxiapatita embebida con puntos de carbono se realizó por el método de precipitación continua rápida, basada en el procedimiento modificado al reportado por Mercado et al., [82]. Los reactivos para la síntesis de nHA fueron ácido metafosfórico (Sigma-Aldrich, USA) e hidróxido de calcio (Emsure, Alemania). El diagrama del proceso se puede ver en la figura 3.3.

Se prepara una solución acuosa de PC a una concentración de 2,5  $\frac{\text{mg}}{\text{mL}}$  (volumen total: 30 mL). A esta solución se le añaden 2,22 g de ácido metafosfórico, se homogeniza y se agita por medio de agitación magnética durante 2 horas. Se agregaron 2,5 g de hidróxido de calcio a 20

$mL$  de agua y se agitó esta solución durante 5 minutos a  $85^{\circ}C$ . Posteriormente se añadió gota a gota la solución de ácido metafósforico a la suspensión de hidróxido de calcio y se agitó la solución resultante durante 24 horas a temperatura ambiente.

El precipitado se separó al centrifugar la muestra a  $4000\ rpm$  por 10 minutos y se lavó la suspensión 5 veces con agua destilada y 3 veces con etanol. Para el secado de la nHA se usó un horno (UM100, Memmert, Países Bajos), a  $100^{\circ}C$  durante 12 horas.



Figura 3.3: Diagrama del proceso de síntesis de nHA-PC.

### 3.3 Síntesis de *scaffold* de PEG-nHA-PC en función de la composición

El proceso de síntesis del *scaffold* está basado en el procedimiento modificado de Kumar et al. [51]. En este procedimiento se implementó el método de mezcla directa. Los reactivos utilizados fueron metanol (Sharlau, Sharlab, Barcelona, España), polietilenglicol (polvo  $M_n$  3.350, Sigma Aldrich, Alemania) y la nHA-PC cuya síntesis se describe en la sección 3.2. El diagrama del proceso se puede ver en la figura 3.4.

Se sintetizaron 3 distintas composiciones de *scaffolds*, donde se dispersaron distintas cantidades de nanohidroxiapatita en metanol y PEG en agua. Las cantidades y composiciones usadas se encuentran en la tabla 3.1. Posteriormente, se añadió lentamente la solución de PEG en la solución de nHA con metanol, y se agitó esta muestra de forma continua durante 4 horas. Luego de este tiempo cuando la mezcla quedó completamente homogenizada, se calentó a  $40^{\circ}C$  durante 2 horas con el propósito de eliminar los excesos de metanol.

Por último, la solución fue centrifugada a  $5000\ rpm$  durante 1 minuto para eliminar el sobrenadante restante. El precipitado obtenido se secó en un horno (UM100, Memmert, Países Bajos) a  $80^{\circ}C$  durante 24 horas. Luego de este tiempo se dispuso la mezcla saturada

Tabla 3.1: Cantidad de reactivos usados para las distintas composiciones de PEG-nHA-PC.

Composición (%)		Cantidad de reactivos (g)		Fuerza de compactación (N)
PEG	nHA-PC	PEG	nHA-PC	
80	20	2,00	0,50	1500
70	30	1,75	0,75	1745
60	40	1,50	1,00	2000, 3000, 4000

en un horno a 200°C durante 6 horas. El producto final en forma de polvo fue macerado y compactado con una Máquina Universal Shimadzu AGS-X a distintas fuerzas dependiendo de su composición (Tabla 3.1). Esto se hace ya que los materiales poliméricos y cerámicos son compactados a distintas fuerzas debido a sus limitaciones mecánicas, en consecuencia se escogen distintos valores de compactación dependiendo la cantidad de polímero o cerámico en cada composición. Los valores usados se basan en los reportados previamente en compuestos de este tipo [83], [84].



Figura 3.4: Diagrama del proceso de síntesis de *scaffold* de PEG-nHa-PC con variaciones en la composición.

### 3.3.1. Inclusión de compuesto espaciador: Cloruro de sodio

Con la información encontrada en la revisión bibliográfica expuesta en la sección 2.5, se propone un protocolo para hacer la introducción de cloruro de sodio (NaCl) como compuesto espaciador del *scaffold*. Se escoge este compuesto por su alta solubilidad en agua y compatibilidad. El porcentaje de volumen de porosidad teórica se calcula con la ecuación 3.1 reportada previamente por E. Rupérez et. al, donde  $m_{esp}$  y  $\rho_{esp}$  es la masa y densidad del compuesto espaciador respectivamente y  $m_{com}$  y  $\rho_{com}$  es la masa y densidad del compuesto de PEG-nHA-PC [73].

$$\%vol.Porosidad = \frac{m_{esp}/\rho_{esp}}{m_{esp}/\rho_{esp} + m_{com}/\rho_{com}} * 100 \% \quad (3.1)$$

Para obtener un volumen de porosidad de aproximadamente 40 %, se mezcló NaCl (70 % p/p de PEG-nHA-PC) con el polvo seco y macerado de PEG-nHA-PC. Se agitó continuamente durante 2 minutos hasta que se obtuvo un polvo uniformemente distribuido. Este polvo fue compactado a 4000 N en la Máquina Universal Shimadzu AGS-X. Primero se hizo un tratamiento térmico a 200°C y luego se depositó el *scaffold* en agua a 60°C durante 4 horas para remover completamente el espaciador. Por último, se metió al horno a una temperatura de 150°C durante 1 hora para el secado de la muestra.

La evaluación de la cantidad de compuesto espaciador que es removido se hizo por medio de la ecuación 3.2 donde  $E_r$  es el porcentaje de espaciador removido,  $m_i$  es la masa de la probeta antes del proceso de remoción,  $m_f$  es la masa de la probeta después del proceso y  $m_{esp}$  es la masa de compuesto espaciador que inicialmente se agrega a la probeta.

$$\%E_r = \frac{m_i - m_f}{m_{esp}} * 100 \% \quad (3.2)$$

### 3.3.2. Inclusión de compuesto espaciador: Bicarbonato de amonio

El segundo compuesto espaciador implementado fue bicarbonato de amonio ya que este presenta una baja temperatura de descomposición, lo que implica que se puede prescindir del proceso de inmersión necesario para remover el NaCl. Con el bicarbonato de amonio se puede obtener un volumen de porosidad de aproximadamente 47 % usando la el mismo porcentaje de peso a peso en el proceso descrito en la sección 3.3.1.

Para sintetizar el *scaffold* con bicarbonato de amonio como compuesto espaciador se mezcló el bicarbonato de amonio (70 % p/p de PEG-nHA-PC) con el polvo seco y macerado de PEG-nHA-PC. Se agitó continuamente durante 2 minutos hasta que se obtuvo un polvo uniformemente distribuido. Este polvo fue compactado a 4000 N en la Máquina Universal Shimadzu AGS-X. Posteriormente, se depositó la muestra en el horno a una temperatura de 200°C durante 2 horas para hacer una remoción completa del espaciador y obtener un *scaffold* poroso. La evaluación de la cantidad de compuesto espaciador que es removido se hizo por medio de la ecuación 3.2.

## 3.4 Pruebas de caracterización

Para caracterizar las propiedades ópticas de los puntos de carbono, la nHA-PC y las distintas composiciones de los *scaffolds* de PEG-nHA-PC se realizaron medidas de espectrofotometría UV-Vis. De igual manera, para caracterizar los enlaces superficiales de estos compuestos se realizaron medidas de espectroscopia infrarroja de transformada de Fourier (FTIR). Para las pruebas de densidad y compactación se caracterizaron los *scaffolds* por medio de pruebas estandarizadas descritas en esta sección.

### 3.4.1. Espectrofotometría UV-Vis

Para evaluar la absorción de los PC, la nHA y la nHA-PC se empleó el espectrofotómetro FLAMES-S-XR1-ES, junto con una fuente de luz de deuterio y lámparas halógenas, y el software Ocean View<sup>®</sup>. Se tomaron medidas en un rango de 200-500 nm, utilizando una celda de cuarzo de 1cm de paso óptico. Los datos obtenidos fueron procesados con los software Origin Lab<sup>®</sup> y Prism<sup>®</sup>.

Las concentraciones de las soluciones usadas para evaluar los espectros de absorción PC fueron de 0.5 *mg/mL* a 5 *mg/mL* con un incremento de 0.5 *mg/mL*. Se tomó una solución de nHA y nHA-PC con concentraciones de 100 *mg/mL* y 120 *mg/mL* respectivamente, estas dos muestras fueron filtradas a 0,2  $\mu\text{m}$  (Minisart NY 25, PTFE) para evaluar los espectros. Para evaluar la cantidad de PC embebidos en la nHA se procedió a hacer una curva de calibración calculado el área bajo la curva de las absorbancias presentadas en la figura 4.2. Con la regresión lineal de la curva de calibración se obtiene la ecuación 3.3 donde  $x$  es la concentración de PC en una determinada solución y  $y$  es el área de la curva de absorbancia que presenta dicha solución.

$$y = 18,49x + 29 \quad (3.3)$$

Para evaluar la cantidad de PC que están siendo embebidos en las muestras de nHA-PC haciendo uso de la ecuación 3.4 donde  $m_{PC}$  es la masa total de puntos en la muestra que se encuentra multiplicando la concentración obtenida por medio de la curva de calibración con el volumen de la solución inicial y  $m_t$  es la masa total de la muestra.

$$\%PC = \frac{m_{PC}}{m_t} * 100 \% \quad (3.4)$$

### 3.4.2. Espectrofotometría de fluorescencia

Para evaluar la emisión de los PC, la nHA y la nHA-PC se empleó el espectrofotómetro FLAMES-S-XR1-ES, en conjunto con una fuente de luz la cual consistía de un LED con longitud de onda de 365 nm. Se tomaron medidas en un rango de 200-800 nm, utilizando una celda de cuarzo de 1cm de paso óptico. Los datos obtenidos fueron procesados con los software Origin Lab<sup>®</sup> y Prism<sup>®</sup>.

Para evaluar la emisión de los PC se tomo una solución de 10 *mg/mL*. Y para evaluar la emisión de la nHA-PC se realizó una solución con concentración 100 *mg/mL* filtrada a 0,2  $\mu\text{m}$  (Minisart NY 25, PTFE).

### 3.4.3. Espectroscopía infrarroja de transformada de Fourier (FTIR)

Los espectros infrarrojos de las muestras de PC, nHA-PC y las distintas composiciones de PEG-nHA-PC se midieron con el espectrómetro FTIR Nicolet iS5 con un módulo de ATR, por medio del software de adquisición OMNIC<sup>®</sup>. Los datos fueron adquiridos con una resolución

de  $4 \text{ cm}^{-1}$  con 64 barridos. Los datos resultantes permiten identificar los enlaces covalentes presentes en las muestras analizadas en un rango espectral de  $4000 \text{ cm}^{-1}$  a  $400 \text{ cm}^{-1}$ . Los datos obtenidos fueron procesados mediante el software OriginLab®.

#### 3.4.4. Pruebas de densidad

Se evaluó la densidad de todas las composiciones de las muestras compactadas de PEG-nHA-PC implementando el método A del “Standard Test Methods for Density and Specific Gravity (Relative Density) of Plastics by Displacement” designado por la norma D792-13. Donde se usa una balanza analítica y un termómetro para realizar la medición. El *scaffold* compactado tiene que tener un volumen mayor a  $1 \text{ cm}^3$  y su superficie y bordes tienen que estar lisos, también debe de contar un espesor de al menos 1 mm por cada 1 g de peso.

Primero se midió la temperatura del agua y se pesó el *scaffold* en aire. Luego se hizo la inmersión de la muestra en el agua a temperatura de  $23^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$  con ayuda de un alambre y se remueven las burbujas que estén pegadas al *scaffold*. Una vez sumergido se tomó el peso de la muestra.

Para hallar la gravedad específica (sp gr) de la muestra evaluada se emplea la ecuación 3.5 donde  $a$  es la masa aparente de la muestra en el aire sin el alambre,  $b$  es la masa aparente del espécimen totalmente inmerso y con el alambre parcialmente inmerso en el agua y  $w$  es la masa aparente de alambre sumergido.

$$spgr \frac{23^\circ}{23} C = \frac{a}{a + w - b} \quad (3.5)$$

Una vez se halla la gravedad específica, se emplea la ecuación 3.6 para hallar la densidad de la muestra donde  $D$  es la densidad,  $t_w$  es la temperatura del agua.

$$D\left[\frac{kg}{cm^3}\right] = spgr \frac{23^\circ}{23} * [997,5 + (t_w - 23)] \quad (3.6)$$

## Capítulo 4

# RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En este capítulo se exponen y analizan los resultados obtenidos con la metodología previamente explicada para la síntesis y caracterización de PC, nHA-PC, y el *scaffold* de PEG-nHA-PC.

### 4.1 Puntos de carbono (PC)

Al realizar la síntesis de PC por el método de reacción asistida por microondas el ácido cítrico actúa como precursor de carbono, donde el reactor funciona como intermediario para transferir la energía térmica de la fuente externa a los solventes y en consecuencia a los reactivos [85]. Este es un método de síntesis *bottom up* donde se saca provecho de la polaridad de los solventes para obtener una reacción con calentamiento homogéneo para que se de una rápida reacción de polimerización y carbonización haciendo de este un método directo y eficiente. Los resultados de esta síntesis se pueden ver en la figura 4.1 donde se puede apreciar la fluorescencia de los PC al irradiarse con una lámpara-UV con longitud de onda de excitación de 365 nm.

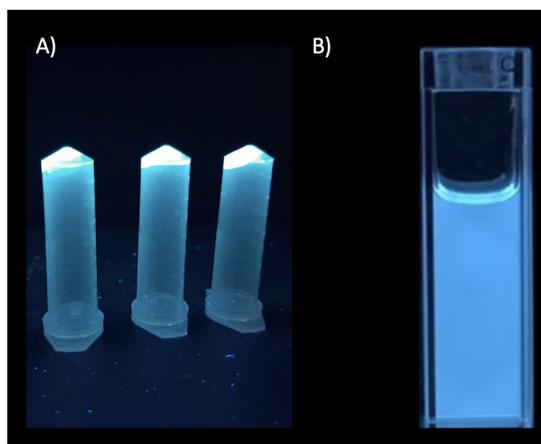


Figura 4.1: Puntos de carbono sintetizados a partir de ácido cítrico, N,N-dimetilformamida y etanol bajo irradiación de 365 nm. A) Puntos de carbono secos. B) Solución de puntos de carbono a una concentración de  $10 \frac{mg}{mL}$ .

Según la literatura los PC presentan una banda de absorción significativa en la región UV debido a la transición de  $\pi \rightarrow \pi^*$  de los carbonos aromáticos  $sp^2$  con enlaces C=C [69], [71], [86]. Esto se puede comprobar en la figura 4.2 donde se muestran los espectros de absorción de las muestras de PC a varias concentraciones diluidas en agua : etanol (1:1) obtenidas con la espectrofotometría UV-Vis. En la figura se observa como el la mayor absorbancia es obtenida en en el rango de 220-230nm dependiendo de la concentración. Este corrimiento en el pico de cada curva se atribuye a la formación de puentes de hidrógeno en la superficie de los PC con las moléculas de agua y etanol que generan un cambio en los niveles de energía de los grupos funcionales presentes [87].

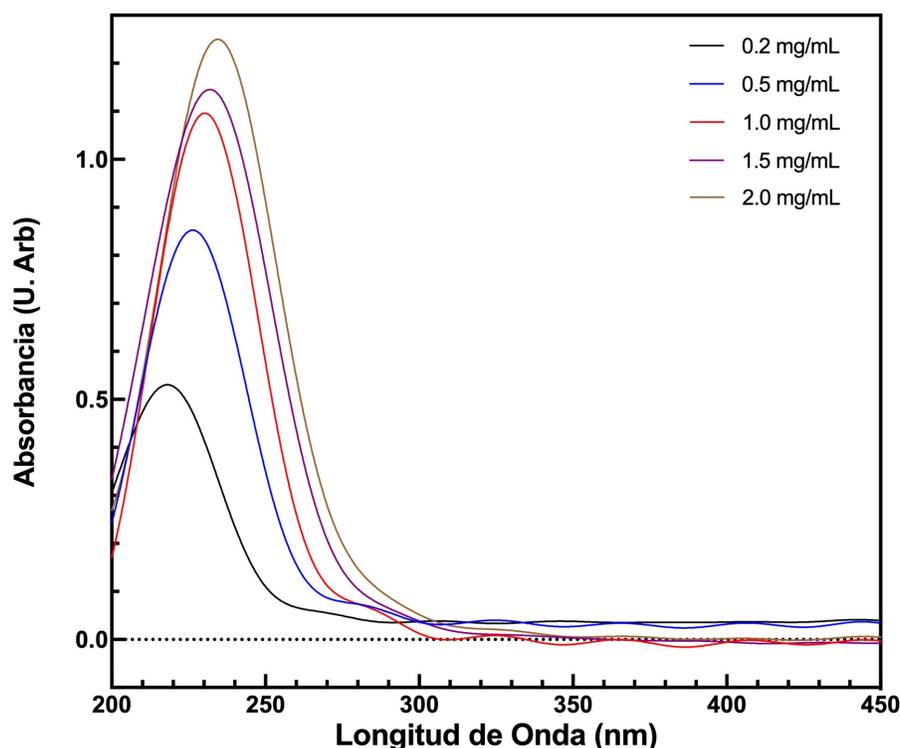


Figura 4.2: Espectros de absorción de PC en función de la concentración dispersos en solución de agua:etanol (1:1) excitados con fuente de luz de deuterio.

Para evaluar la fluorescencia de los PC sintetizados, estos fueron irradiados con un LED con longitud de onda de 365 nm. En la figura 4.3 se puede observar una banda con máximo en a 365 nm correspondiente a la luz de excitación. Adicionalmente se detalla dos bandas de emisión en el rango de 400 a 600 nm correspondiente a la fluorescencia exhibida por los PC en la figura 4.1. Este efecto de fluorescencia se debe a los defectos en la superficie de los PC donde hay presencia de dominios  $sp^2$  imperfectos, los cuales crean trampas de energía que pueden servir para capturar excitones[86]. También contribuyen los grupos funcionales presentes en la superficie y la formación de impurezas fluorescentes durante el proceso de síntesis [70]. Todo esto aporta al proceso de luminiscencia que ocurre cuando los electrones realizan un salto de banda al ser excitados con determinada longitud de onda, dejando así espacios en la banda de

valencia, lo que crea huecos que interactúan con los electrones en la superficie, ocasionando la liberación de fotones con una energía dependiente de la distancia entre las dos bandas [69], [70].

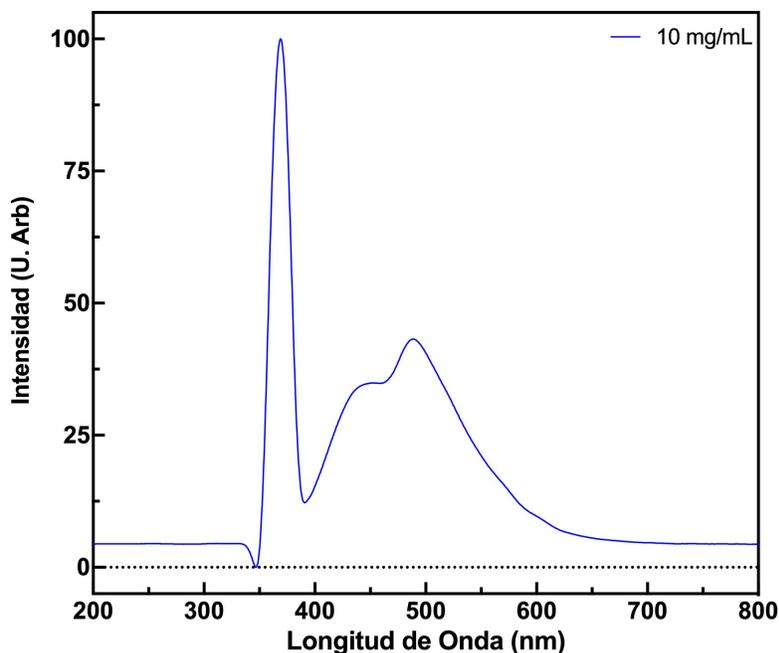


Figura 4.3: Espectro de emisión de solución de PC irradiada con un LED con longitud de onda de 365 nm. Valores normalizados con respecto al máximo.

#### 4.2 Nanohidroxiapatita con puntos de carbono embebidos (nHA-PC)

Después de implementar el proceso de síntesis expuesto en la sección 3.2 se obtiene la nHA y nHA-PC (figura 4.4). Para evaluar la cantidad de PC embebidos en la nHA se procedió a construir una curva de calibración por medio del proceso descrito en la sección 3.4.1. La curva de calibración obtenida se puede ver en la figura 4.5.

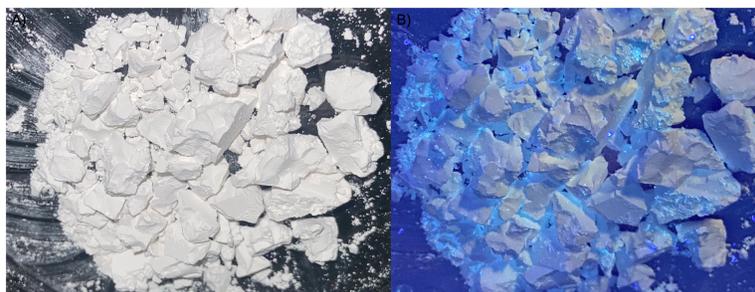


Figura 4.4: Foto del producto de síntesis de nHA-PC. A) Muestra con luz natural. B) Muestra excitada con una lámpara con longitud de onda de 365nm.

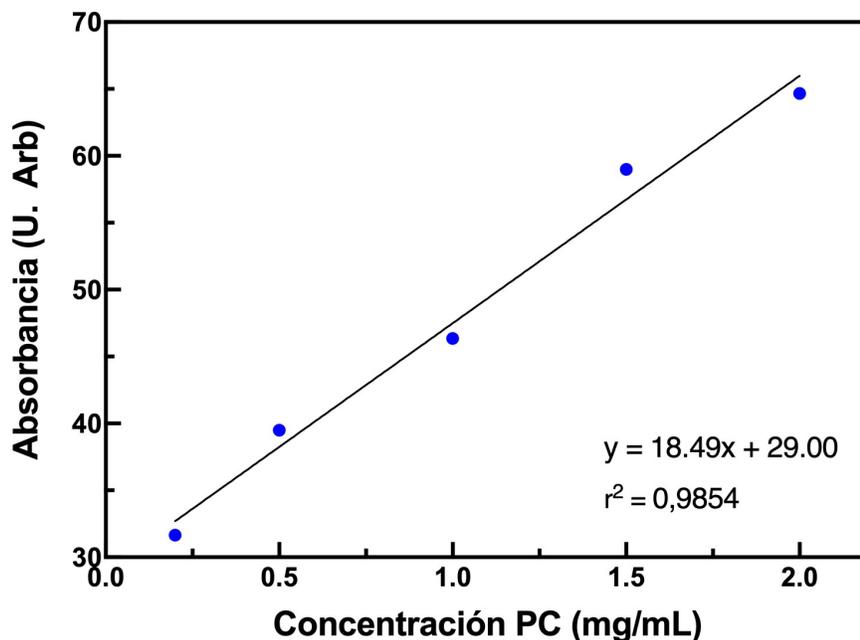


Figura 4.5: Curva de calibración obtenida por medio del proceso descrito en la sección 3.4.1.

Una vez se obtiene la curva de calibración, se adquirieron los espectros de absorción de las muestras de nHA y nHA-PC. En la figura 4.6 se puede evidenciar la similitud entre los espectros de nHA-PC y PC donde se aprecia la misma banda de absorción en un rango de 200 a 260 nm que de nuevo confirma la presencia de enlaces C=C junto con la transición de  $\pi \rightarrow \pi^*$  de los carbonos aromáticos  $sp^2$  en las muestras de nHA-PC. Adicionalmente, estas muestras presentan una segunda banda de absorbancia reducida con pico en 205 nm que se puede deber al ambiente químico proporcionado por la nHA. El área de bajo la curva de la muestra de nHA-PC fue de 43.68 U.Arb., valor que se reemplaza como  $y$  en la ecuación 3.3, al despejar  $x$  se obtiene que en la muestra usada hay una concentración de  $0,794 \frac{mg}{mL}$ .

Para cuantificar el porcentaje final de puntos de carbono en la muestra de nHA-PC se tiene una solución inicial de  $25mL$  a  $120 \frac{mg}{mL}$  de manera que se tiene una masa total de 3000 mg. Haciendo uso de la ecuación 3.4 se determina que el porcentaje de puntos de carbono en la muestra es de 0.66 % (ecuación 4.1).

$$\%PC = \frac{19,85mg}{3000mg} * 100 \% = 0,66 \% \quad (4.1)$$

Para determinar el porcentaje de pérdida se compara la masa inicial de PC usada con la masa calculada con la curva de calibración. Al hacer esta comparación se obtiene un dopaje de PC de 25.3 % en la matriz de nHA, es decir, que se está perdiendo un 74,6 % de los mismos.

Se midió el espectros de emisión de una muestra de nHA-PC se puede ver en la figura 4.7 que fue irradiada con un LED con longitud de onda de 365 nm. Se puede observar una banda con máximo en a 365 nm correspondiente a la luz de excitación. También se pueden detallar

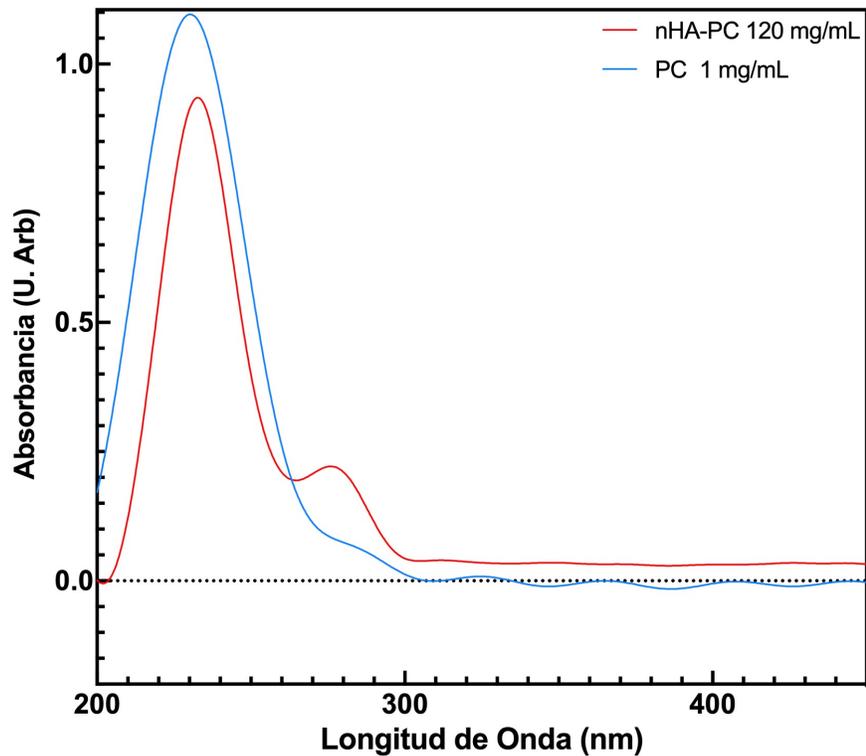


Figura 4.6: Espectros de absorción, nHA-PC (rojo), PC (azul).

dos bandas de emisión en el rango de 400 a 600 nm similares a las obtenidas en la figura 4.3 pero de menor tamaño. La similitud entre la espectrofotometría de fluorescencia de los PC y la nHA-PC confirma que el efecto de fluorescencia que presenta la muestra de nHA-PC se debe al proceso de dopaje con PC realizado.

De esta manera se pudo comprobar que el método de precipitación rápida permite obtener una cantidad significativa de nHA y a su vez permite incorporar en esta PC conservando sus propiedades ópticas.

### 4.3 *Scaffolds* de PEG-nHA-PC

Al finalizar el proceso de síntesis del compuesto de PEG-nHA-PC se obtiene un polvo como se reporta en la figura 4.8. En la tabla 4.1 se puede observar la cantidad promedio de masa obtenida por síntesis para cada una de las composiciones. Posteriormente, los polvos fueron compactados a distintas fuerzas dependiendo su composición usando como referencia valores de compactación para compuestos poliméricos reportados previamente en la literatura [83], [84].

Después de hacer la compactación se obtienen probetas de la figura 4.9 con dimensiones de 1,27 cm de diámetro y 1,1 cm de alto. Posteriormente se realizó la prueba de densidad

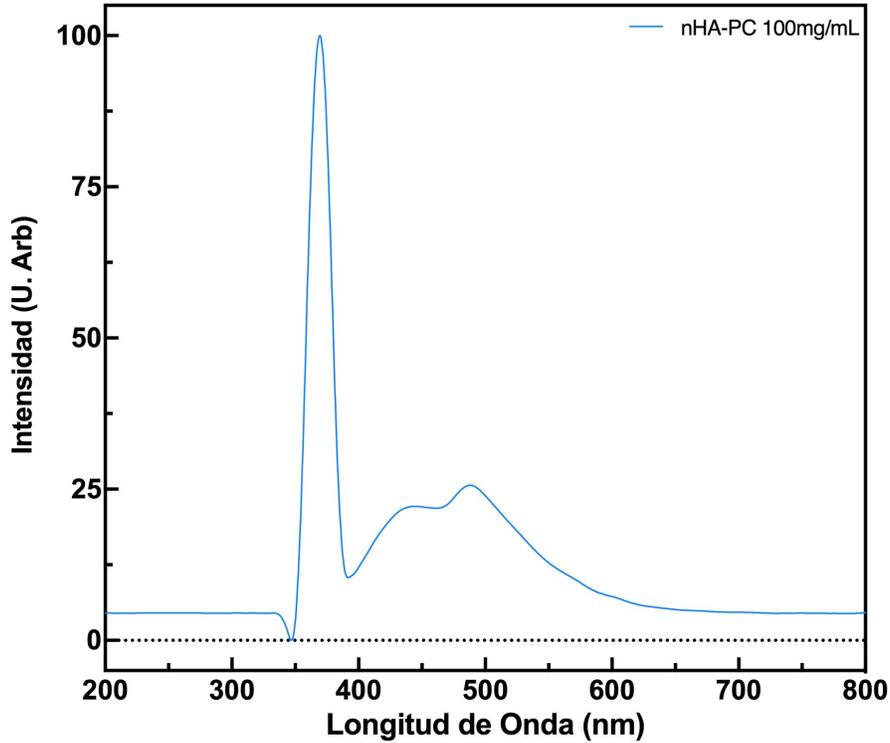


Figura 4.7: Espectros de emisión de nHA-PC, irradiada con un LED con longitud de onda de 365 nm. Curva normalizada con respecto al valor máximo.

donde la probeta con composición de 80:20 se deshizo totalmente en el agua, la composición de 70:30 perdió más de la mitad de la masa mientras que la de 60:40 fue la que presentó mejores resultados ya que perdió menos de la mitad de la masa. Para hacer la prueba de compactación a distintas fuerzas se escogió la composición que mejor presentara resultados. Teniendo en cuenta el estado final de las probetas después de la prueba de densidad, y los resultados esta misma que se encuentran en la tabla 4.2, se continuó con el desarrollo de los *scaffolds* manteniendo una composición de 60:40 ya que se obtuvo una densidad de  $0,541 \frac{g}{cm^3}$ , valor que es similar a la densidad ósea del hueso trabecular.

La densidad del *scaffold* de 60:40 compactado a 2000 N es superior a la del hueso trabecular, se desea un valor superior al de esta densidad porque se espera que al introducir compuestos espaciadores, haya un aumento en la porosidad y como consecuencia, una disminución la densidad del *scaffold*. Con el propósito de aumentar la densidad de las muestras se decidió variar la fuerza de compactación usando los valores expuestos en la figura 4.11 y de esta manera se logró obtener un *scaffold* con densidad de  $0,619 \frac{g}{cm^3}$ . Es importante destacar en en la figura 4.11 la probeta con composición 80:20 muestra un resultado de densidad superior a las demás pero este valor se descarta porque la prueba no da un resultado concluyente en vista del estado final de la probeta después de la prueba.

En la segunda serie de pruebas de densidad las probetas presentaron menos perdida de



Figura 4.8: Polvo macerado de PEG-nHA-PC.

Tabla 4.1: Fuerzas de compactación y masas promedio obtenidas en cada síntesis de cada composición de PEG-nHA-PC.

Composición <sup>a</sup>	Masa promedio obtenida (g)	Fuerza de compactación (N)
60:40	0,7	2000
70:30	0,5	1745
80:20	0,3	1500

<sup>a</sup>El primer valor de la columna izquierda corresponde a al porcentaje de PEG, mientras el segundo valor la cantidad de nHA-PC.

masa como se puede comprobar en la figura 4.10 donde la probeta compactada a 2000 N sufrió una falla y se quebró, la fuerza de compactación de 3000 N permitió que la probeta quedara en mejores condiciones, sin embargo, también sufrió una pérdida de masa significativa en la parte superior. Por otro lado, la probeta compactada a 4000 N presentó una menor pérdida de masa en los extremos. Teniendo en cuenta la densidad deseada, se decidió proceder con la composición de 60:40 compactada a 4000 N.

El primer compuesto espaciador propuesto es NaCl. Al implementar el protocolo propuesto en la sección 3.3.1, se obtuvieron dos probetas con diámetro de 1,27 *cm* y alto de 0,75 *cm* (figura 4.12), antes de hacer el proceso de remoción de los espaciadores. Al completar el protocolo propuesto se encontraron problemas con la fase de remoción del compuesto espaciador ya que después de sumergir la probeta en agua, está presentó una falla después de un tiempo de estar sumergida. De manera que se realizó una segunda prueba modifican-



Figura 4.9: Probetas obtenidas después de compactar los polvos de PEG-nHA-PC.

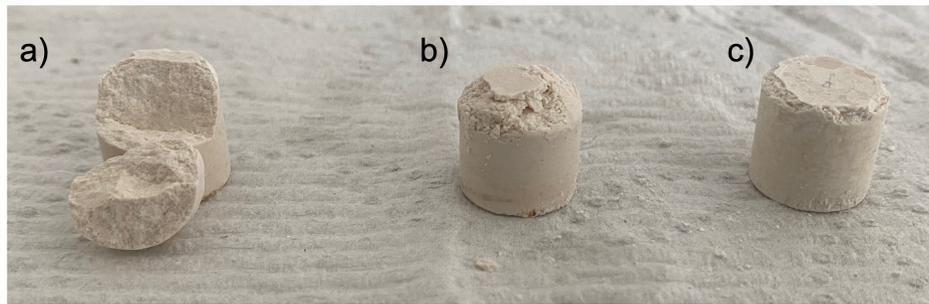


Figura 4.10: Probetas con composición 60-40 después del ensayo de densidad. A) Compactada a 2000 N. B) Compactada a 3000 N. C) Compactada a 4000 N.

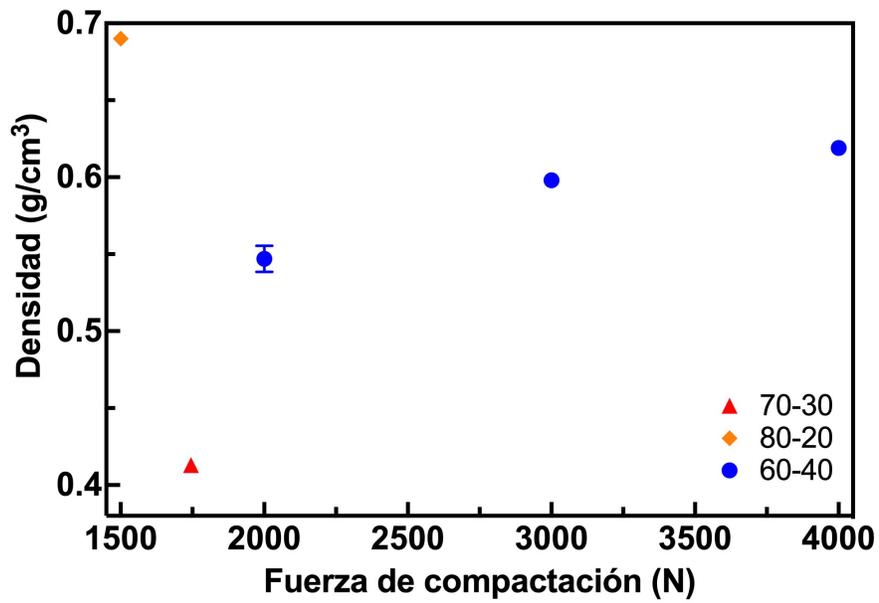


Figura 4.11: Densidad obtenida en función de la fuerza de compactación.

Tabla 4.2: Gravedad específica y densidades obtenidas para las distintas composiciones y fuerzas de compactación.

Composición	Fuerza de compactación	Gravedad Específica	Densidad [ $\frac{g}{cm^3}$ ]
80:20	1500 N	-	-
70:30	1745 N	0,415	0,413
60:40	2000 N	0,545	0,541
60:40	2000 N	0,556	0,553
60:40	3000 N	0,601	0,598
60:40	4000 N	0,622	0,619

do el protocolo al hacer la inmersión por un menor tiempo para evitar el colapso de la probeta.

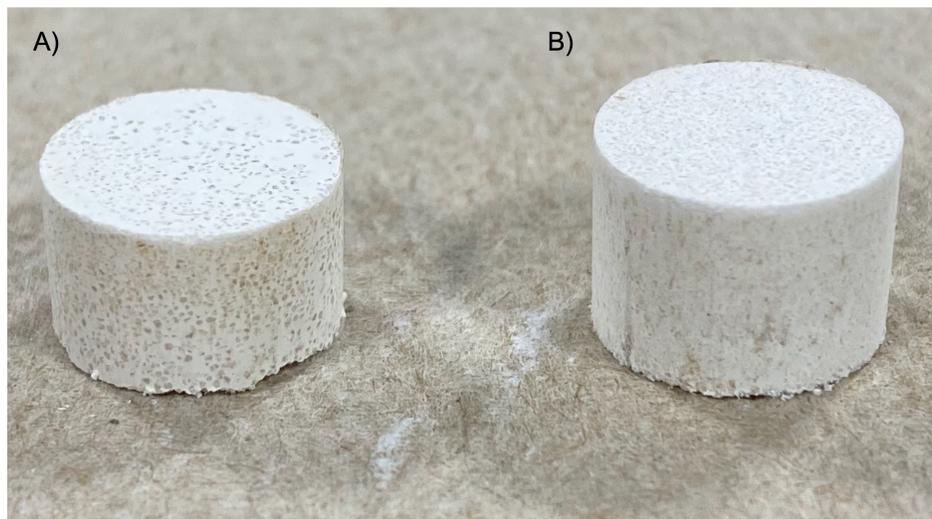


Figura 4.12: Probetas compactadas con compuestos espaciadores antes de realizar el proceso de remoción. A) Espaciador: NaCl. B) Espaciador: Bicarbonato de amonio.

El segundo compuesto espaciador implementado fue bicarbonato de amonio. Al llevar a cabo el protocolo propuesto en la sección 3.3.2 se obtuvo una probeta con diámetro de  $1,27\text{ cm}$  y alto de  $0,9\text{ cm}$  (figura 4.12) antes de hacer la remoción de los compuestos espaciadores. Para cuantificar la cantidad de compuesto espaciador removido se pesaron las probetas antes y después del proceso de remoción (tabla 4.3), y se aplica la ecuación 3.2. Se asume que toda la masa perdida corresponde a los compuestos espaciadores, aunque se debe de tener en cuenta que a pesar que la estabilidad térmica de la nHA-PC ha sido comprobada a  $200^{\circ}\text{C}$  en trabajos anteriores, esta presentó una perdida de masa de aproximadamente el 6 % a esta temperatura [30], lo que significa que en el proceso de remoción también se podría estar perdiendo masa de PEG-nHA-PC.

Después del tratamiento térmico, los *scaffolds* con compuestos espaciadores de NaCl presentaron un  $\%E_r$  de 4.47 % para el caso de la muestra 1 y 2.65 % para el caso de la muestra 2. Debido al alto punto de fusión del NaCl se espera que la mayor parte del compuesto sea remo-

Tabla 4.3: Masas obtenidas en el proceso de remoción del compuesto espaciador.

Compuesto Espaciador	$m_i^a$ (g)	$m_1^b$ (g)	$m_2^c$ (g)
NaCl-1	1,5743	1,5476	-
NaCl-2	1,5541	1,5247	1,3544
Bicarbonato de amonio	1,5465	0,4560	-

<sup>a</sup> $m_i$  es la masa de la probeta después de la compactación

<sup>b</sup> $m_1$  es la masa de la probeta después de ponerla en el horno a 200°C

<sup>c</sup> $m_2$  es la masa de la probeta después de hacer sumergirla en agua y secarla

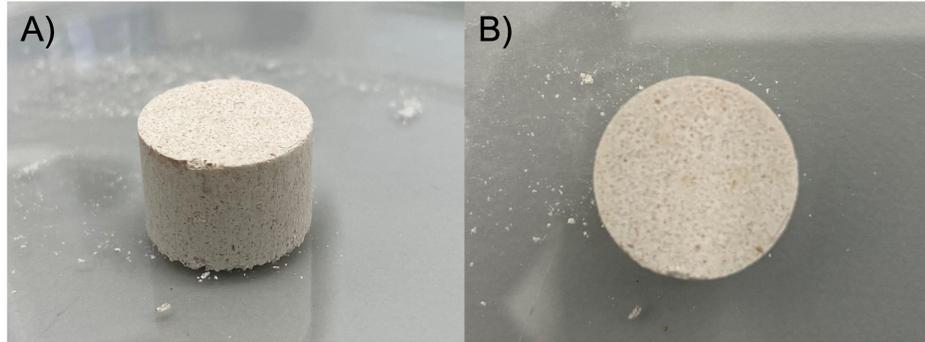


Figura 4.13: *Scaffold* poroso sintetizado por medio de la técnica de espaciadores, usando bicarbonato de amonio como compuesto espaciador. A) Vista frontal del *scaffold*. B) Vista superior del *scaffold*.

vido después de sumergir las muestras en agua y no en el tratamiento térmico. Sin embargo, como se mencionó anteriormente las probetas no soportaron el tiempo de 4 horas inicialmente propuesto y al hacer la modificación del protocolo con la muestra 2, solo se logró un  $\%E_r$  de 17.99%. Por otro lado, el *scaffold* con compuestos espaciadores de bicarbonato de amonio logró un  $\%E_r$  del 100% debido a que el bicarbonato de amonio presenta un punto de descomposición entre los 150°C y 175°C [72]. La masa final de este *scaffold* es ligeramente menor a la del polvo de PEG-nHA-PC inicialmente introducido por lo que se puede asumir que hay una pérdida de masa de solvente remanente en el proceso de remoción de los espaciadores, confirmado los resultados de estabilidad térmica del compuesto a 200°C reportada previamente [30].

Por último, se hizo la evaluación de la densidad del *scaffold* poroso sintetizado usando bicarbonato de amonio como compuesto espaciador. Se obtuvo un valor de  $0,504 \frac{g}{cm^3}$  que es menor comparado con el valor de densidad del *scaffold* compactado a la misma fuerza sin compuestos espaciadores, confirmando de esta manera la correcta creación de poros. Este valor de densidad obtenido en el *scaffold* final es comparable con el de la densidad del hueso trabecular ( $0,48 \frac{g}{cm^3}$ ) lo que confirma el potencial del compuesto de PEG-nHA-PC para tratar los defectos óseos sin causar fallas debido a la diferencia de las densidades del implante y el hueso. Con estos resultados se propone que la inclusión de compuestos espaciadores se haga por medio del protocolo propuesto en la sección 3.3.2 para obtener probetas como la que se observa en la figura 4.13. Teniendo en cuenta que la evaluación que se hizo del  $\%E_r$  solo tiene en consideración el peso de los compuestos del *scaffold* para obtener una mejor cuantificación

del porcentaje compuesto espaciador removido se propone una caracterización óptica como una microscopía electrónica de barrido y una caracterización química como una espectroscopia de energía dispersiva que me permita conocer la información de los elementos presentes en la muestra.

#### 4.4 Caracterización por FTIR

La caracterización por FTIR permite analizar la superficie de las muestras y determinar los enlaces y estructuras de las moléculas presentes en la muestra. En la figura 4.14 se puede apreciar el espectro FTIR de las muestras de PC, nHA, nHA-PC y PEG-nHA-PC. Debido a la presencia de PO formado en la reacción del hidróxido de calcio y el ácido fosfórico, todas las muestras con nHA presentan una banda característica en  $1015\text{ cm}^{-1}$ . En  $553\text{ cm}^{-1}$  se puede apreciar otra banda correspondiente a bandas características de O-P-O de grupos fosfato lo que representa una buena cristalización de la nHA [88].

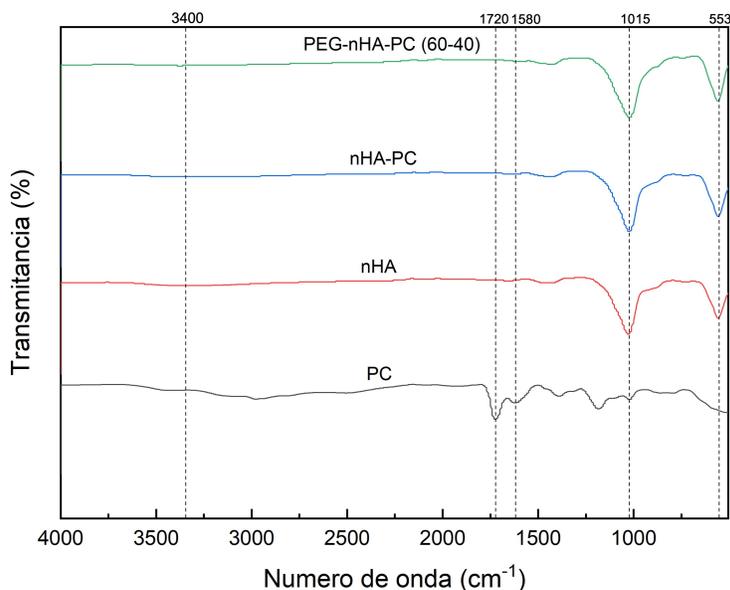


Figura 4.14: Espectro FTIR de las diferentes muestras de PEG-nHA-PC, nHA-PC, nHA y PC.

Para las muestra de puntos de carbono se puede apreciar una banda cerca a los  $3400\text{ cm}^{-1}$  que corresponde a las vibraciones de los enlaces -OH. También se observa presencia de bandas de  $1800\text{ cm}^{-1}$  a  $1500\text{ cm}^{-1}$  debido a los enlaces dobles presentes en los PC, más específicamente, la banda en  $1580\text{ cm}^{-1}$  representa los enlaces C=C y la banda presente en  $1720\text{ cm}^{-1}$  corresponde al estiramiento de los enlaces C=O de los grupos carboxilos formados con moléculas resultantes de la descomposición del ácido cítrico en el proceso de síntesis. Debido al bajo contenido de PC en la muestra de nHA-PC en  $1720\text{ cm}^{-1}$  se puede apreciar

una banda de baja intensidad en la muestra que correspondiente al enlace C=O de los PC [89].

Con esta caracterización se puede confirmar la presencia de nHA y PC en las distintas muestras, indicando que el procesos de síntesis de reacción de microondas, método de precipitación continua rápida y el método de mezcla directa mantienen la estructura multiescala del *scaffold* PEG-nHA-PC. .

## Capítulo 5

# CONCLUSIONES

Con el objetivo de desarrollar un scaffold de PEG-nHA-PC con potencial para la regeneración tejido óseo, se logró sintetizar puntos de carbono por el método asistido por microondas, y por medio de la espectrofotometría se hizo una caracterización de sus propiedades ópticas. La espectrofotometría UV-Vis permitió comprobar que los PC tienen una banda de absorción significativa en la región UV debido a las transiciones  $\pi \rightarrow \pi^*$  de los carbonos aromáticos, y mediante la espectrofotometría de fluorescencia se evidenció que los PC presentaban una fluorescencia en el rango de 400 nm a 600 nm al ser excitados por una fuente de 365 nm de longitud de onda. Estas propiedades se deben a los grupos funcionales presentes en los solventes utilizados para su síntesis. También se realizó la síntesis de nanohidroxiapatita embebida con puntos de carbono (nHA-PC) mediante el método de precipitación continua rápida. Los espectros de emisión de la nHA-PC confirmaron la presencia de puntos de carbono en la muestra y los espectros de absorción de puntos de carbono permitieron crear una curva de calibración para posteriormente cuantificar el porcentaje de dopaje de PC en el proceso de síntesis de la nHA. Se obtiene un dopaje de PC de 25.3 % de PC en la matriz de nHA, y sus propiedades ópticas se conservan ya que estos presentan fluorescencias similares.

Se desarrollaron *scaffolds* de PEG y nanohidroxiapatita embebida con puntos de carbono (PEG-nHA-PC) con el método de mezcla directa variando la composición PEG:nHA-PC. Los *scaffolds* sintetizados presentaron una forma cilíndrica con diámetro de 1,27 cm y alto de 1,1 cm. Al variar el porcentaje cerámico:polímero se obtuvieron cambios en la densidad y en el comportamiento del *scaffold* al sumergirlo en agua. La composición de 60:40 fue la que mejor se conservó después de la prueba de densidad, y fue la que mejor densidad presentó ( $0,541 \frac{mg}{cm^3}$ ) de manera que se continuó trabajando con esta composición. Al experimentar distintas fuerzas de compactación se obtuvo mejores resultados con el *scaffold* compactado a 4000 N ya que a esta fuerza el compuesto presentó una densidad superior con respecto a las otras probetas y por ende se conservó mejor después de la prueba.

Después de realizar la revisión bibliográfica sobre el uso de compuestos espaciadores, se propusieron e implementaron 2 protocolos. Al ensayar el protocolo de implementación de NaCl en los compuestos, este tuvo que ser modificado para que las probetas lo pudieran soportar sin colapsar, aun así, se presentó un bajo porcentaje de remoción de espaciadores (17,99 %) por lo que se descarta este protocolo. Cuando se implementó el segundo protocolo para el uso de bicarbonato de amonio como compuesto espaciador, no solo presentó una diferencia signi-

ficativa en el porcentaje de remoción de los espaciadores al ser eliminados por completo, sino que es un proceso que requiere de menos tiempo y procesos experimentales. La densidad de este *scaffold* dio un resultado menor al obtenido en la probeta compactada a la misma fuerza sin compuestos espaciadores, confirmando la creación de poros. De esta manera se determinó que el protocolo propuesto para el uso de bicarbonato de amonio como compuesto espaciador en la síntesis de *scaffolds* de PEG y nanohidroxiapatita embebida con puntos de carbono, permitiendo el desarrollo de *scaffolds* porosos.

## Capítulo 6

# RECOMENDACIONES Y TRABAJOS FUTUROS

En este capítulo se exponen las recomendaciones y trabajos futuros del proyecto.

### 6.1 Recomendaciones

Se recomienda hacer las replicas de los ensayos de densidad como se hizo con el *scaffold* compactado a 2000 N (figura 4.11), con el propósito de reconfirmar los datos y lograr hacer un análisis estadístico de los valores para obtener una mejor caracterización de la variación de la densidad del *scaffold* en función de la composición y fuerza de compactación. También es importante hacer la evaluación del porcentaje de remoción de espaciador, porosidad e interconectividad de los poros por medio de un ensayo de desplazamiento volumétrico, o por medio de una microscopía electrónica de barrido (SEM) que permita caracterizar óptimamente estas propiedades.

### 6.2 Trabajos futuros

A corto plazo se plantea hacer un proceso de optimización para encontrar la mejor fuerza de compactación donde se obtenga un *scaffold* con una densidad similar a la ósea y que presente buenas propiedades físicas. De igual manera, es de vital importancia determinar las propiedades mecánicas del *scaffold* sintetizado con espaciadores por medio de ensayos de compresión y tensión con el fin de determinar su viabilidad mecánica en aplicaciones óseas. También se plantea evaluar las propiedades mecánicas en *scaffolds* porosos sin puntos de carbono con el fin de compararlas con las obtenidas en los que si cuentan con puntos de carbono y de esta manera cuantificar en que medida los puntos de carbono mejoran las propiedades mecánicas del *scaffold*.

A mediano plazo, se plantea evaluar la viabilidad biológica del *scaffold* poroso con ensayos de citotoxicidad y migración celular por medio de protocolos como MTT o azul tripan.

Finalmente, a largo plazo se espera diseñar un protocolo para realizar la funcionalización

del *scaffold* con factores de crecimiento o células madre que permitan mejorar la osteointegración y osteoinducción del *scaffold* para regeneración ósea.

# Bibliografía

- [1] D. B. Burr, «Bone morphology and organization,» en *Basic and applied bone biology*, Elsevier, 2019, págs. 3-26.
- [2] A. K. Nayak, «Hydroxyapatite synthesis methodologies: an overview,» *International Journal of ChemTech Research*, vol. 2, n.º 2, págs. 903-907, 2010.
- [3] M. V. Garcia-Garduño y J. Reyes-Gasga, «La hidroxiapatita, su importancia en los tejidos mineralizados y su aplicación biomédica,» *TIP Revista especializada en ciencias quimico-biológicas*, vol. 9, n.º 2, págs. 90-95, 2006.
- [4] K. S. Saladin, *Anatomía y fisiología*. McGraw Hill, 2013, págs. 207-230.
- [5] N. Tripathy, E. Perumal, R. Ahmad, J. E. Song y G. Khang, «Hybrid composite biomaterials,» en *Principles of Regenerative Medicine*, Elsevier, 2019, págs. 695-714.
- [6] R. K. Fuchs, W. R. Thompson y S. J. Warden, «Bone biology,» en *Bone Repair Biomaterials*, Elsevier, 2019, págs. 15-52.
- [7] P. Chavassieux y P. Meunier, «Histología y citología del hueso normal,» *EMC-Aparato Locomotor*, vol. 36, n.º 3, págs. 1-6, 2003.
- [8] K. J. Rambhia y P. X. Ma, «Biom mineralization and bone regeneration,» en *Principles of Regenerative Medicine*, Elsevier, 2019, págs. 853-866.
- [9] R. Dimitriou, E. Jones, D. McGonagle y P. V. Giannoudis, «Bone regeneration: current concepts and future directions,» *BMC medicine*, vol. 9, n.º 1, págs. 1-10, 2011.
- [10] O. M. de la salud. «Trastornos musculoesqueléticos.» (2021).
- [11] D. Smrke, P. Rožman, M. Veselko y B. Gubina, *Treatment of bone defects—allogenic platelet gel and autologous bone technique*. IntechOpen, 2013.
- [12] A. Barrios-Moyano y C. De la Peña-García, «Prevalencia de osteoporosis y osteopenia en pacientes laboralmente activos,» *Acta ortopédica mexicana*, vol. 32, n.º 3, págs. 131-133, 2018.
- [13] Y. Xie, L. Zhang, Q. Xiong, Y. Gao, W. Ge y P. Tang, «Bench-to bedside strategies for osteoporotic fracture: From osteoimmunology to mechanosensation,» *Bone research*, vol. 7, n.º 1, págs. 1-13, 2019.
- [14] W. F. Montaña-Chaparro, K. A. Díaz-Roa y E. H. Otálvaro-Cifuentes, «Situación actual de los bancos de tejidos en Colombia: tejido osteomuscular,» *Revista Colombiana de Ortopedia y Traumatología*, vol. 34, n.º 2, págs. 93-101, 2020.
- [15] T. W. Bauer y G. F. Muschler, «Bone graft materials: an overview of the basic science,» *Clinical Orthopaedics and Related Research®*, vol. 371, págs. 10-27, 2000.

- [16] W. Wang y K. W. Yeung, «Bone grafts and biomaterials substitutes for bone defect repair: A review,» *Bioactive materials*, vol. 2, n.º 4, págs. 224-247, 2017.
- [17] A. S. Herford, E. Stoffella y C. M. Stanford, «Bone grafts and bone substitute materials,» en *Principles and practice of single implant and restorations*, Elsevier, 2014, págs. 75-86.
- [18] A. M. Cícero, J. P. M. Issa y S. Feldman, «Matrices de tercera generación en la ingeniería de tejidos óseos,» *Actualizaciones en Osteología*, vol. 13, n.º 2, págs. 157-176, 2017.
- [19] G. Turnbull, J. Clarke, F. Picard et al., «3D bioactive composite scaffolds for bone tissue engineering,» *Bioactive materials*, vol. 3, n.º 3, págs. 278-314, 2018.
- [20] H. Qu, H. Fu, Z. Han e Y. Sun, «Biomaterials for bone tissue engineering scaffolds: a review,» *RSC advances*, vol. 9, n.º 45, págs. 26 252-26 262, 2019.
- [21] L. Roseti, V. Parisi, M. Petretta et al., «Scaffolds for bone tissue engineering: state of the art and new perspectives,» *Materials Science and Engineering: C*, vol. 78, págs. 1246-1262, 2017.
- [22] S. Bose, M. Roy y A. Bandyopadhyay, «Recent advances in bone tissue engineering scaffolds,» *Trends in biotechnology*, vol. 30, n.º 10, págs. 546-554, 2012.
- [23] T. T. Roberts y A. J. Rosenbaum, «Bone grafts, bone substitutes and orthobiologics: the bridge between basic science and clinical advancements in fracture healing,» *Organogenesis*, vol. 8, n.º 4, págs. 114-124, 2012.
- [24] R. E. McMahon, L. Wang, R. Skoracki y A. B. Mathur, «Development of nanomaterials for bone repair and regeneration,» *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, vol. 101, n.º 2, págs. 387-397, 2013.
- [25] A. Kamali, A. Oryan, S. Hosseini et al., «Cannabidiol-loaded microspheres incorporated into osteoconductive scaffold enhance mesenchymal stem cell recruitment and regeneration of critical-sized bone defects,» *Materials Science and Engineering: C*, vol. 101, págs. 64-75, 2019.
- [26] J. S. Carson y M. P. Bostrom, «Synthetic bone scaffolds and fracture repair,» *Injury*, vol. 38, n.º 1, S33-S37, 2007.
- [27] R. Eivazzadeh-Keihan, A. Maleki, M. De La Guardia et al., «Carbon based nanomaterials for tissue engineering of bone: Building new bone on small black scaffolds: A review,» *Journal of advanced research*, vol. 18, págs. 185-201, 2019.
- [28] S. Gogoi, M. Kumar, B. B. Mandal y N. Karak, «A renewable resource based carbon dot decorated hydroxyapatite nanohybrid and its fabrication with waterborne hyperbranched polyurethane for bone tissue engineering,» *RSC advances*, vol. 6, n.º 31, págs. 26 066-26 076, 2016.
- [29] S. Degiovanni Morales et al., «Modificación de nanopartículas de hidroxiapatita con puntos de carbono para la fabricación de scaffolds multiescala,» Tesis pregrado, Universidad del Rosario, Escuela Colombiana de Ingeniería, 2021.
- [30] M. A. Molina Daza, «Evaluación de propiedades de compuestos poliméricos con puntos de carbono embebidos en nanohidroxiapatita para aplicaciones en regeneración de tejido óseo,» Tesis pregrado, Universidad del Rosario, Escuela Colombiana de Ingeniería, 2021.

- [31] J.-P. Carrel, A. Wiskott, M. Moussa, P. Rieder, S. Scherrer y S. Durual, «A 3D printed TCP/HA structure as a new osteoconductive scaffold for vertical bone augmentation,» *Clinical Oral Implants Research*, vol. 27, n.º 1, págs. 55-62, 2016.
- [32] B. Arifvianto, M. Leeflang, J. Duszczuk y J. Zhou, *Characterisation of space holder removal through water leaching for preparation of biomedical titanium scaffolds*, 2014.
- [33] B. Goyal y A. Pandey, «Critical review on porous material manufacturing techniques, properties & their applications,» *Materials Today: Proceedings*, 2021.
- [34] B. M. Manzini, L. M. R. Machado, P. Y. Noritomi y J. V. L. da Silva, «Advances in Bone tissue engineering: A fundamental review,» *Journal of biosciences*, vol. 46, n.º 1, págs. 1-18, 2021.
- [35] M. Nordin y V. H. Frankel, *Basic biomechanics of the musculoskeletal system*. Lippincott Williams & Wilkins, 2001, págs. 373-377.
- [36] J. Caeiro, P. González y D. Guede, «Biomecánica y hueso (y II): ensayos en los distintos niveles jerárquicos del hueso y técnicas alternativas para la determinación de la resistencia ósea,» *Revista de osteoporosis y metabolismo mineral*, vol. 5, n.º 2, págs. 99-108, 2013.
- [37] N. Özkaya, M. Nordin, D. Goldsheyder y D. Leger, *Fundamentals of biomechanics*. Springer, 2012, vol. 86.
- [38] D. Guede, P. González y J. Caeiro, «Biomechanics and bone (I): Basic concepts and classical mechanical tests,» *Miner Metab Rev Osteoporos*, vol. 5, n.º 1, págs. 43-50, 2013.
- [39] N. Reina y J. Laffosse, «Biomecánica del hueso: aplicación al tratamiento ya la consolidación de las fracturas,» *EMC-Aparato locomotor*, vol. 47, n.º 3, págs. 1-17, 2014.
- [40] E. Q. M. Souza, A. E. C. Klaus, B. F. E. Santos et al., «Evaluations of hydroxyapatite and bioactive glass in the repair of critical size bone defects in rat calvaria,» *Journal of Oral Biology and Craniofacial Research*, vol. 10, n.º 4, págs. 422-429, 2020.
- [41] J.-C. Aurégan y T. Bégué, «Induced membrane for treatment of critical sized bone defect: a review of experimental and clinical experiences,» *International orthopaedics*, vol. 38, n.º 9, págs. 1971-1978, 2014.
- [42] M. San Julián y A. Valenti, «Trasplante óseo,» en *Anales del Sistema Sanitario de Navarra*, SciELO Espana, vol. 29, 2006, págs. 125-136.
- [43] X. Liu y P. X. Ma, «Polymeric scaffolds for bone tissue engineering,» *Annals of biomedical engineering*, vol. 32, n.º 3, págs. 477-486, 2004.
- [44] X. Li, L. Wang, Y. Fan, Q. Feng, F.-Z. Cui y F. Watari, «Nanostructured scaffolds for bone tissue engineering,» *Journal of biomedical materials research Part A*, vol. 101, n.º 8, págs. 2424-2435, 2013.
- [45] L. Meinel, V. Karageorgiou, R. Fajardo et al., «Bone tissue engineering using human mesenchymal stem cells: effects of scaffold material and medium flow,» *Annals of biomedical engineering*, vol. 32, n.º 1, págs. 112-122, 2004.

- [46] H. Afizah, Z. Yang, J. H. Hui, H.-W. Ouyang y E.-H. Lee, «A comparison between the chondrogenic potential of human bone marrow stem cells (BMSCs) and adipose-derived stem cells (ADSCs) taken from the same donors,» *Tissue engineering*, vol. 13, n.º 4, págs. 659-666, 2007.
- [47] N. Ramesh, S. C. Moratti y G. J. Dias, «Hydroxyapatite–polymer biocomposites for bone regeneration: A review of current trends,» *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, vol. 106, n.º 5, págs. 2046-2057, 2018.
- [48] M. I. Sabir, X. Xu y L. Li, «A review on biodegradable polymeric materials for bone tissue engineering applications,» *Journal of materials science*, vol. 44, n.º 21, págs. 5713-5724, 2009.
- [49] J.-Z. Wang, M.-L. You, Z.-Q. Ding y W.-B. Ye, «A review of emerging bone tissue engineering via PEG conjugated biodegradable amphiphilic copolymers,» *Materials Science and Engineering: C*, vol. 97, págs. 1021-1035, 2019.
- [50] R. J. Kroeze, M. N. Helder, L. E. Govaert y T. H. Smit, «Biodegradable polymers in bone tissue engineering,» *Materials*, vol. 2, n.º 3, págs. 833-856, 2009.
- [51] P. Kumar, B. S. Dehiya y A. Sindhu, «Synthesis and characterization of nHA-PEG and nBG-PEG scaffolds for hard tissue engineering applications,» *Ceramics International*, vol. 45, n.º 7, págs. 8370-8379, 2019.
- [52] B. Bhaskar, R. Owen, H. Bahmaee, Z. Wally, P. Sreenivasa Rao y G. C. Reilly, «Composite porous scaffold of PEG/PLA support improved bone matrix deposition in vitro compared to PLA-only scaffolds,» *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, vol. 106, n.º 5, págs. 1334-1340, 2018.
- [53] J. K. Tessmar y A. M. Göpferich, «Customized PEG-derived copolymers for tissue-engineering applications,» *Macromolecular bioscience*, vol. 7, n.º 1, págs. 23-39, 2007.
- [54] S. Samavedi, A. R. Whittington y A. S. Goldstein, «Calcium phosphate ceramics in bone tissue engineering: a review of properties and their influence on cell behavior,» *Acta biomaterialia*, vol. 9, n.º 9, págs. 8037-8045, 2013.
- [55] K. J. Burg, S. Porter y J. F. Kellam, «Biomaterial developments for bone tissue engineering,» *Biomaterials*, vol. 21, n.º 23, págs. 2347-2359, 2000.
- [56] R. G. Ribas, V. M. Schatkoski, T. L. do Amaral Montanheiro et al., «Current advances in bone tissue engineering concerning ceramic and bioglass scaffolds: A review,» *Ceramics International*, vol. 45, n.º 17, págs. 21 051-21 061, 2019.
- [57] I. Denry y L. T. Kuhn, «Design and characterization of calcium phosphate ceramic scaffolds for bone tissue engineering,» *Dental Materials*, vol. 32, n.º 1, págs. 43-53, 2016.
- [58] A. Szcześ, L. Hołysz y E. Chibowski, «Synthesis of hydroxyapatite for biomedical applications,» *Advances in colloid and interface science*, vol. 249, págs. 321-330, 2017.
- [59] H. Yoshikawa y A. Myoui, «Bone tissue engineering with porous hydroxyapatite ceramics,» *Journal of Artificial Organs*, vol. 8, n.º 3, págs. 131-136, 2005.
- [60] K. Alvarez y H. Nakajima, «Metallic scaffolds for bone regeneration,» *Materials*, vol. 2, n.º 3, págs. 790-832, 2009.

- [61] K. Rezwan, Q. Chen, J. J. Blaker y A. R. Boccaccini, «Biodegradable and bioactive porous polymer/inorganic composite scaffolds for bone tissue engineering,» *Biomaterials*, vol. 27, n.º 18, págs. 3413-3431, 2006.
- [62] G. Wei y P. X. Ma, «Structure and properties of nano-hydroxyapatite/polymer composite scaffolds for bone tissue engineering,» *Biomaterials*, vol. 25, n.º 19, págs. 4749-4757, 2004.
- [63] M. Wang, «Composite scaffolds for bone tissue engineering,» *American Journal of Biochemistry and Biotechnology*, 2006.
- [64] L. M. Mathieu, T. L. Mueller, P.-E. Bourban, D. P. Pioletti, R. Müller y J.-A. E. Månson, «Architecture and properties of anisotropic polymer composite scaffolds for bone tissue engineering,» *Biomaterials*, vol. 27, n.º 6, págs. 905-916, 2006.
- [65] W. Wang, B. Zhang, M. Li et al., «3D printing of PLA/n-HA composite scaffolds with customized mechanical properties and biological functions for bone tissue engineering,» *Composites Part B: Engineering*, vol. 224, págs. 109-119, 2021.
- [66] T. Genova, I. Roato, M. Carossa, C. Motta, D. Cavagnetto y F. Mussano, «Advances on bone substitutes through 3D bioprinting,» *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 21, n.º 19, págs. 7012, 2020.
- [67] S. V. Murphy, P. De Coppi y A. Atala, «Opportunities and challenges of translational 3D bioprinting,» *Nature biomedical engineering*, vol. 4, n.º 4, págs. 370-380, 2020.
- [68] A. Saranti, A. Tiron-Stathopoulos, L. Papaioannou et al., «3D-printed bioactive scaffolds for bone regeneration bearing carbon dots for bioimaging purposes,» *Smart Materials in Medicine*, vol. 3, págs. 12-19, 2022.
- [69] A. M. Ibarra-Ruiz, D. C. Rodríguez Burbano y J. A. Capobianco, «Photoluminescent nanoplatforms in biomedical applications,» *Advances in Physics: X*, vol. 1, n.º 2, págs. 194-225, 2016.
- [70] M. L. Liu, B. B. Chen, C. M. Li y C. Z. Huang, «Carbon dots: synthesis, formation mechanism, fluorescence origin and sensing applications,» *Green chemistry*, vol. 21, n.º 3, págs. 449-471, 2019.
- [71] Z. L. Wu, Z. X. Liu e Y. H. Yuan, «Carbon dots: materials, synthesis, properties and approaches to long-wavelength and multicolor emission,» *Journal of Materials Chemistry B*, vol. 5, n.º 21, págs. 3794-3809, 2017.
- [72] B. Arifvianto y J. Zhou, «Fabrication of metallic biomedical scaffolds with the space holder method: a review,» *Materials*, vol. 7, n.º 5, págs. 3588-3622, 2014.
- [73] E. Rupérez, J. Manero, K. Riccardi, Y. Li, C. Aparicio y F. Gil, «Development of tantalum scaffold for orthopedic applications produced by space-holder method,» *Materials & Design*, vol. 83, págs. 112-119, 2015.
- [74] X. Jiao, X. Ren, X. Wang, S. Wang, P. Feng y J. Wang, «Porous TiAl<sub>3</sub> intermetallics with symmetrical graded pore-structure fabricated by leaching space holder and thermal explosion process,» *Intermetallics*, vol. 95, págs. 144-149, 2018.

- [75] S. Sahmani, S. Saber-Samandari, A. Khandan y M. M. Aghdam, «Influence of MgO nanoparticles on the mechanical properties of coated hydroxyapatite nanocomposite scaffolds produced via space holder technique: fabrication, characterization and simulation,» *Journal of the mechanical behavior of biomedical materials*, vol. 95, págs. 76-88, 2019.
- [76] M. Y. Zakaria, M. I. Ramli, A. B. Sulong, N. Muhamad y M. H. Ismail, «Application of sodium chloride as space holder for powder injection molding of alloy Titanium–Hydroxyapatite composites,» *Journal of Materials Research and Technology*, vol. 12, págs. 478-486, 2021.
- [77] J. Jakubowicz, G. Adamek y M. Dewidar, «Titanium foam made with saccharose as a space holder,» *Journal of Porous Materials*, vol. 20, n.º 5, págs. 1137-1141, 2013.
- [78] Y. Chen, D. Kent, M. Bermingham, A. Dehghan-Manshadi y M. Dargusch, «Manufacturing of biocompatible porous titanium scaffolds using a novel spherical sugar pellet space holder,» *Materials Letters*, vol. 195, págs. 92-95, 2017.
- [79] A. Laptev y M. Bram, «Manufacturing hollow titanium parts by powder metallurgy route and space holder technique,» *Materials letters*, vol. 160, págs. 101-103, 2015.
- [80] M. Yazdimamaghani, M. Razavi, D. Vashae y L. Tayebi, «Development and degradation behavior of magnesium scaffolds coated with polycaprolactone for bone tissue engineering,» *Materials Letters*, vol. 132, págs. 106-110, 2014.
- [81] V. Hinterberger, C. Damm, P. Haines, D. M. Guldi y W. Peukert, «Purification and structural elucidation of carbon dots by column chromatography,» *Nanoscale*, vol. 11, n.º 17, págs. 8464-8474, 2019.
- [82] D. F. Mercado, G. Magnacca, M. Malandrino et al., «Paramagnetic iron-doped hydroxyapatite nanoparticles with improved metal sorption properties. A bioorganic substrates-mediated synthesis,» *ACS Applied Materials & Interfaces*, vol. 6, n.º 6, págs. 3937-3946, 2014.
- [83] Y. Cui, Y. Liu, Y. Cui, X. Jing, P. Zhang y X. Chen, «The nanocomposite scaffold of poly (lactide-co-glycolide) and hydroxyapatite surface-grafted with L-lactic acid oligomer for bone repair,» *Acta biomaterialia*, vol. 5, n.º 7, págs. 2680-2692, 2009.
- [84] S.-S. Kim, M. S. Park, O. Jeon, C. Y. Choi y B.-S. Kim, «Poly (lactide-co-glycolide)/hydroxyapatite composite scaffolds for bone tissue engineering,» *Bio-materials*, vol. 27, n.º 8, págs. 1399-1409, 2006.
- [85] S. Horikoshi y N. Serpone, «14. Microwave-assisted synthesis of nanoparticles,» en *Microwave Chemistry*, De Gruyter, 2017, págs. 248-269.
- [86] F. Meierhofer, F. Dissinger, F. Weigert et al., «Citric acid based carbon dots with amine type stabilizers: pH-specific luminescence and quantum yield characteristics,» *The Journal of Physical Chemistry C*, vol. 124, n.º 16, págs. 8894-8904, 2020.
- [87] D. L. Pavia, G. M. Lampman, G. S. Kriz y J. A. Vyvyan, *Introduction to spectroscopy*. Cengage learning, 2014.

- [88] S. Siswanto, D. Hikmawati, U. Kulsum, D. I. Rudyardjo, R. Apsari y A. Aminatun, «Biocompatibility and osteoconductivity of scaffold porous composite collagen-hydroxyapatite based coral for bone regeneration,» *Open Chemistry*, vol. 18, n.º 1, págs. 584-590, 2020.
- [89] V. Țucureanu, A. Matei y A. M. Avram, «FTIR spectroscopy for carbon family study,» *Critical reviews in analytical chemistry*, vol. 46, n.º 6, págs. 502-520, 2016.