

**Evaluación de las propiedades mecánicas de un scaffold poroso compuesto de PEG y nanohidroxiapatita, con variaciones en la concentración de los puntos de carbono**

**Jhoan Manuel Cadena Suarez**

**Trabajo Dirigido**

**Tutora**

**Diana Consuelo Rodríguez Burbano, PhD**

**Cotutor**

**David Leonardo Blanco Estupiñán, PhD**



**Universidad del  
Rosario**



**ESCUELA  
COLOMBIANA  
DE INGENIERÍA  
JULIO GARAVITO**

**UNIVERSIDAD DEL ROSARIO  
ESCUELA COLOMBIANA DE INGENIERÍA JULIO GARAVITO**

**PROGRAMA DE INGENIERÍA BIOMÉDICA  
BOGOTÁ D.C  
2022  
AGRADECIMIENTOS**

Primeramente, agradezco a Dios por darme la oportunidad de haber estudiado esta carrera y haber logrado llegar hasta aquí, también agradezco de todo corazón al amor de mi vida Natalia Posada, por todo el esfuerzo que ha hecho para motivarme en salir adelante sin importar lo dura que este la situación para los dos, ella siempre ha estado conmigo incluso cuando más la necesito, esta tesis es en dedicatoria a ella. También agradezco el apoyo que me ha dado en la vida mi familia, no solamente cercana, sino toda la ayuda recibida por aquellos que considero mi familia, mi padres y su apoyo monetario, mis hermanos y mi mamita Ana y Leonor, así como mis tías Briggitt, Dilma, Dora , Francy, Gloria, Shirley, Yadira y Yuliana , mis tíos Carlos Margarín, Danny Atehortúa, Jaime Gómez, Cristian Romero, Juan y mis dos tíos Manuel, mis primos Angelica, Brandon, Carlos, David, Idelfonso, Francy, Gloria, Gustavo, mis dos primos Humberto, Julián, Jimmy, Lucy, Michelle, Nicol, Nicolas, mis dos primos Sebastián y Steven; también considero familia no solo el amor de mi vida, sino también a mis amigos y amigas, tanto de la universidad como del colegio y de la vida, y para no dar una preferencia, prefiero nombrarlos en orden alfabético: Paloma Álvarez, Juan Álvarez, Juan Esteban Aldana, Sebastián Alfonso, Juan David Castillo, Laura Daniela Fandiño, Tatiana García, María Helena Garzón, Sergio Gonzales, Camilo Llanos, Zahir Obando, Héctor Prieto, Camilo Martínez , Daniel Silva, Andrés Felipe(Pipe) Salazar, Christian Torres y Juan David Tovar, a mis profesores Ms. Annie, Ms. Mireya, Ms. Claudia, Mr. William, Mr. Jorge y Mr. Diego. Y darles las gracias a mis compañeras de laboratorio Lina Bello y Karol Baquero, los laboratoristas por la ayuda recibida, y a los profesores de la Julio y el Rosario, que a pesar de sus exigencias me ayudaron a ser mejor persona.

## 1 INDICE GENERAL

1	INDICE GENERAL.....	3
1)	INTRODUCCIÓN .....	9
2)	PROYECTO RELACIONADO.....	11
3)	OBJETIVOS .....	12
3.1.	General .....	12
3.2.	Específicos.....	12
4)	ESTADO DEL ARTE.....	13
4.1.	ESTRUCTURA DEL TEJIDO ÓSEO.....	13
4.2.	PROBLEMÁTICA.....	14
4.3.	ALTERNATIVAS.....	14
4.4.	HIDROXIAPATITA.....	14
4.5.	PUNTOS DE CARBONO.....	14
4.6.	POLIETILENGLICOL.....	15
4.7.	POROSIDAD.....	15
4.8.	CARACTERIZAR PROPIEDADES MECÁNICAS.....	15
4.8.1.	COMPRESIÓN AXIAL .....	15
4.8.2.	COMPRESIÓN DIAMETRAL.....	16
5)	METODOLOGÍA.....	17
5.1.	SÍNTESIS DE PUNTOS DE CARBONO(PC) .....	17
5.2.	SÍNTESIS DE NANOHIPOXIAPATITA EMBEDIDA EN PC (nHA-PC) .....	19
5.3.	SÍNTESIS DE SCAFFOLDS DE PEG-nHA-PC CON INCLUSIÓN DEL ESPACIADOR BICARBONATO DE AMONIO.....	20
5.4.	CARACTERIZACIÓN DE PROPIEDADES MECÁNICAS .....	22
5.4.1.	COMPRESIÓN AXIAL .....	22
5.4.2.	COMPRESIÓN DIAMETRAL.....	22
6)	RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	23
6.1.	SÍNTESIS DE PC.....	23
6.2.	SÍNTESIS DE nHA Y nHA-PC.....	24
6.3.	SÍNTESIS DE PEG-nHA Y PEG-nHA-PC.....	24
6.4.	CARACTERIZACIÓN DE PROPIEDADES MECÁNICAS .....	26
6.4.1.	COMPRESIÓN AXIAL .....	26
6.4.2.	COMPRESIÓN DIAMETRAL.....	28
7)	CONCLUSIONES.....	33

8) RECOMENDACIONES Y TRABAJOS FUTUROS .....	34
9) REFERENCIAS.....	35

## INDICE FIGURAS

Figura 5.0: Diagrama de la metodología general, dividido en cuatro etapas principales. Empezando con la síntesis de PC, pasando a la síntesis de nHA con y sin pc, siguiendo a la creación de scaffolds hechos de sintetizar PEG-nHA con y sin PC y la inclusión de Bicarbonato de Amonio, para finalizar con la evaluación de las de diferentes propiedades mecánicas de los scaffolds con y sin pc. ....	17
Figura 5.1-1: Proceso de síntesis de PC. Donde se empieza con la mezcla de los reactivos (Ácido Cítrico, Etanol y Dimetilformamida); esta mezcla se pone en un reactor microondas configurado en AFAP, a 175°C por 5 minutos por medio de un Falcón de cristal y un agitador magnético; posteriormente se filtra con un filtro 0.2 µm y una diálisis por filtrado por 24 horas con un papel de filtro de celulosa de 0,22 µm. Para finalmente secarse por 40 horas a 65°C y verificar su excitación con luz ultravioleta a 365nm de longitud de onda. ....	18
Figura 5.2-1: Diagrama de síntesis de nHA-PC. Empezando con la mezcla de Hidróxido de Calcio en una solución de agua destilada y filtrada, mientras se agita u se calienta a 85°C se gotea sobre esta mezcla una solución de Ácido Meta-Fosfórico con agua destilada. Finalizando el goteo se debe mantener en agitación sin temperatura por 24 horas, se centrifuga y se reduce su pH entre 6 y 7 con agua destilada filtrada y Etanol; posteriormente se seca en un horno entre 100 y 110°C por 6 horas. Para finalmente macerar y almacenar para su uso. ....	20
Figura 5.3-1: Diagrama del proceso de síntesis de scaffold de PEG-nHA-PC y Bicarbonato de Amonio. Donde se inicia con la mezcla de los reactivos de nHA con o sin PC y PEG en metanol y agua destilada filtrada respectivamente, estas dos soluciones se mezclan por medio de gotear la solución de PEG en la nHA con agitación, finalizando el goteo se esperan 4 horas en agitación y posteriormente a una temperatura de 40°C, se seca dos veces en un horno, primero entre 80-85°C por 24 horas y luego a 200°C por 6 horas, se macera y se mezcla con Bicarbonato de Amonio, se compacta y se vuelve a secar a 200°C por 2 horas para evaporar el Bicarbonato de Amonio. ....	21
Figura 5.4.2-1: Figura que muestra las diferentes formas que los platos pueden tener para ensayo de Brasil. A) son dos platos planos la distribución de las fuerzas no es uniforme y la probeta puede moverse) y C) son platos que focalizan en un mismo punto o región toda la fuerza para ocasionar una falla focalizada. D) los platos son curvos y distribuyen la fuerza alrededor de toda la probeta [72]. ....	22
Figura 6.1-1: Resultados de la síntesis de PC. A) PC en estado puro luego del secado, aproximadamente 100mg por tubos de Eppendorf, sin someterse a luz ultravioleta de 365 nm de longitud de onda B) los PC ya secados fluoresciendo al ser expuestos a la luz UV de 365 nm de longitud de onda. C) Solución de PC diluidos en una mezcla 1:1 de Etanol y agua destilada filtrada en una concentración de 75mg/mL fluoresciendo al ser expuestos a la luz UV de 365 nm de longitud de onda. ....	23
Figura 6.2-1: A) nHA imbuida en PC con una muy pequeña fluorescencia al exponerse a 365 nm de longitud de onda con una lampara UV. B) nHA sin PC al exponerse a 365 nm de longitud de onda con una lampara UV. ....	24
Figura 6.3-1: Resultado de la síntesis de PEG-nHA-PC luego de los dos secados y la maceración. ....	25
Figura 6.3-2: A) Scaffold compactado de PEG-nHA-PC con compuestos espaciadores de Bicarbonato de amonio, B) Scaffold compactado de PEG-nHA-PC luego de la remoción de los compuestos espaciadores de Bicarbonato de Amonio mediante el secado. ....	26
Figura 6.4.1-1: A) Scaffold compactado de PEG-nHA-PC con remoción del Bicarbonato de Amonio en posición para someterse a la prueba de compresión axial. B) Scaffold	

compactado de PEG-nHA-PC con remoción del Bicarbonato de amonio después de someterse a la prueba de compactación axial. ....	27
Figura 6.4.1-2: Grafica de pruebas de compresión axial, en scaffolds de PEG-nHA-compactados después de realizar el proceso de remoción del Bicarbonato de amonio. A) Grafica de fuerza en Newtons(N) contra el desplazamiento(mm). B) presión o e esfuerzo aparente (MPa) contra la deformación (mm/mm).....	27
Figura 6.4.1-3: Grafica de pruebas de compresión axial, en scaffolds de PEG-nHA-PC compactados después de realizar el proceso de remoción del Bicarbonato de amonio. A) Grafica de fuerza en Newtons(N) contra el desplazamiento(mm). B) presión o esfuerzo aparente (MPa) contra la deformación (mm/mm).....	28
Figura 6.4.2-1: A) Scaffold compactado de PEG-nHA-PC con remoción del Bicarbonato de Amonio en posición para someterse a la prueba de compresión diametral. B) Scaffold compactado de PEG-nHA-PC con remoción del Bicarbonato de amonio después de someterse a la prueba de compactación diametral.....	29
Figura 6.4.2-2: Graficas de compresión diametral sin sinterizado para scaffolds con PC y para scaffolds sin PC A) fuerza a tensión(N) contra desplazamiento. B) esfuerzo aparente (MPa) contra deformación (mm/mm). ....	30
Figura 6.4.2-3: Grafica de pruebas de compresión diametral, en scaffolds de PEG-nHA-compactados después de realizar el proceso de remoción del Bicarbonato de amonio. A) Grafica de fuerza en Newtons(N) contra el desplazamiento(mm). B) presión o e esfuerzo aparente (MPa) contra la deformación (mm/mm).....	31
Figura 6.4.2-4: Grafica de pruebas de compresión diametral, en scaffolds de PEG-nHA-PC compactados después de realizar el proceso de remoción del Bicarbonato de amonio. A) Grafica de fuerza en Newtons(N) contra el desplazamiento(mm). B) presión o esfuerzo aparente (MPa) contra la deformación (mm/mm).....	31

## INDICE TABLAS

Tabla 4.1-1: Promedio de los valores en la población mundial sana entre la niñez y la adultez sobre las propiedades mecánicas longitudinales de hueso cortical y esponjoso [9], [12]..	13
Tabla 6.4.1-1: . Tabla comparativa de máxima fuerza(N) y máximo esfuerzo aparente (MPa) entre de las pruebas de compresión axial entre scaffolds de PEG-nHA con y sin PC. ....	28
Tabla 6.4.2-1: Tabla donde se presentan los resultados de máxima fuerza(N) y máximo esfuerzo aparente (MPa) entre las pruebas de compresión diametral, para los scaffolds de PEG-nHA con o sin PC. ....	32

## RESUMEN

El tejido óseo tiene una gran capacidad regenerativa, que puede verse afectada o ser insuficiente cuando existen grandes defectos por lesiones o patologías, lo que genera la necesidad de encontrar un tratamiento. Los tratamientos actuales se basan en injertos para los defectos óseos, sin embargo, no logran satisfacer la demanda y pueden generar otros problemas como la necesidad de un segundo sitio de morbilidad y el riesgo de contraer o desarrollar infecciones. Para resolver estos problemas, en el año 2021 y en continuación al 2022, se desarrollaron scaffolds compuestos de polietilenglicol y nanohidroxiapatita embebida en puntos de carbono con espaciador de Bicarbonato de Amonio y como parte de un macroproyecto entre el semillero SYNERGIA de la Universidad del rosario (UR) y la Escuela Colombiana de Ingeniería Julio Garavito (ECIJG), siendo sus principales expositores Degiovanni. S, Molina M, Mancipe. P y Ballestas. J. Teniendo esto en cuenta, se desea continuar y expandir en el desarrollo de este, por medio de llevar a cabo la evaluación de la resistencia a la tensión y la resistencia a la compresión en términos del esfuerzo aparente en los scaffolds de PEG-nHA y scaffolds de PEG-nHA-PC luego de la remoción del espaciador Bicarbonato de Amonio.

## 1) INTRODUCCIÓN

A nivel mundial, alrededor de 1710 millones de personas sufren de trastornos musculoesqueléticos [16], los cuales limitan en gran medida la movilidad y destreza de las personas afectadas. Adicionalmente, cada año 200 millones de personas a nivel mundial sufren de osteoporosis convirtiéndolo en un problema de salud pública [18], y cerca de 9 millones de fracturas de hueso se dan por esta causa [19]. Para Colombia se evidenciaron 2,440 casos por cada 100,000 habitantes [20]. Por otro lado, la Sociedad Americana Contra el Cáncer, estimó que se diagnosticaron 3600 nuevos casos de cáncer de hueso durante el 2020, donde el tratamiento primario era la cirugía de extracción de tejido [22].

Las personas que sufren de estos trastornos presentan una menor calidad de vida, debido a que se reduce su capacidad de participación social y bienestar. Asimismo, los huesos con grandes defectos óseos, derivados de osteosarcoma o traumatismos severos, pueden presentar fallas en su remodelación, produciendo pérdida permanente de masa y una disminución de la movilidad [21].

El tratamiento más común actualmente, es el uso de injertos óseos [15]. Estos pueden ser de tres distintas fuentes: Autoinjertos, aloinjertos y xenoinjertos. El primer método es el más usado y consiste en la extracción de tejido de una parte sana del paciente a tratar [23]. Al requerir un segundo sitio de morbilidad, pueden llegarse a presentar infecciones o molestias en este sitio. Adicionalmente su capacidad se ve limitada e insuficiente, al aplicarse con grandes defectos en el tejido [24].

Por otro lado, están los trasplantes provenientes de otro donador, y se diferencian según su procedencia. Siendo los aloinjertos de la misma especie, y los xenoinjertos de otra especie [25]. Los cuales pueden proveer una mayor cantidad de tejido, pero pueden presentar problemas de compatibilidad o inmunidad, hasta la transmisión de enfermedades o infecciones del donante [24].

Debido a estas limitantes, se han propuesto varias soluciones; una de ellas es la creación de scaffolds, que consisten en matrices sintéticas, generalmente de cerámicos, metales o polímeros para la reconstrucción de los tejidos, mediante las cuales es posible la proliferación de las células provenientes de paciente a tratar [26]. Se necesita que sus propiedades mecánicas, como la resistencia a la compresión y la resistencia a la tensión, sean lo más similares posibles a las del hueso y se complementen con el uso de células (osteoblastos, osteoclastos y osteocitos), factores de crecimiento, diferenciación (osteoinductor), fármacos y otros componentes [14]. También puede promover el crecimiento e integración del hueso (osteoconductor y osteointegrador) [27].

Además de contar con las propiedades mecánicas necesarias, es importante que el scaffold cuente con una buena porosidad. Dado que, en la literatura, el tamaño de poro es importante para la integración del implante con el tejido, los poros interconectados entre 50 y 150  $\mu\text{m}$  permiten la penetración ósea [64], y entre 150 y 500  $\mu\text{m}$  [65] la osteoconducción. Una manera de cumplir con este requisito es el uso de espaciadores, los cuales son partículas, que usadas en el proceso de fabricación del scaffold que se remueven antes o durante el sinterizado [49], dejando así espacio para los poros. Con esta técnica se puede controlar la localización y la uniformidad de los poros a un bajo costo [50][51][52].

En la actualidad, uno de los espaciadores que generan mejores resultados cuando trabaja en conjunto con la hidroxiapatita es el Bicarbonato de Amonio [4][45], el cual, comparado con otros espaciadores, presenta una diferencia significativa en el porcentaje de remoción de los espaciadores, y dado que requiere una menor cantidad de procesos experimentales de igual forma requiere de un menor tiempo de preparación [45].

Gracias a estos requerimientos, surge la necesidad de evaluar las propiedades mecánicas de resistencia a la compresión y resistencia a la tensión en scaffolds, para identificar cuales corresponden a un comportamiento similar al tejido óseo.

## 2) PROYECTO RELACIONADO

En el año 2021, Molina. M como trabajo de grado determino protocolos para la creación de scaffolds de Polietilenglicol (PEG) con nanohidroxiapatita(nHA) embebida en puntos de carbono (PC) [2], basándose en el proyecto propuesto por S. Degiovanni Morales sobre síntesis de nanohidroxiapatita embebida a diferentes concentraciones de PC (5,10,20 y 40mg/mL)[1] agregando el método de mezcla directa para síntesis de scaffolds a base de PEG modificado por Kumar [46]. Con una composición 20% PEG y 80% nanohidroxiapatita embebida a diferentes concentraciones de PC, evaluó la distribución uniforme de las partículas mediante Microscopía electrónica de barrido (SEM), las propiedades mecánicas mediante pruebas de compactación, usando una maquina Universal Shimadzu AGS-X con un molde para compresión [47]. Y pruebas de densidad usando el “Standard Test Methods for Density and Specific Gravity (Relative Density) of Plastics by Displacement” designado por la norma ASTM -D792-13. C, la cual permite calcular la densidad del agua según la temperatura usada [2]. Los resultados de Molina. M, determinaron nHA homogéneas y con tamaños similares a los cristales de nHA presentes en el hueso natural (50nm), aumentando la similitud con el tejido huésped [48]. Los resultados de compresión indican valores parecidos a la resistencia de compresión del hueso trabecular o esponjoso según la presión usada, y las densidades indican la ausencia de poros, por lo que recomienda hacer uso de espaciadores para futuros proyectos [2].

Por lo cual, en el año 2022, como trabajo de grado y continuación del macroproyecto, Mancipe. P realizo pruebas de citotoxicidad de evaluación de la viabilidad celular de las líneas celulares 3T3 y VERO con los ensayos de MTT y Azul Tripán a diferentes composiciones de scaffolds de PEG y nHA (80–20 %,70–30 % y 60– 40 % de composición, manteniendo siempre el de mayor porcentaje al PEG y el de menor la nHA) con y sin PC. Donde determino, que el scaffold que presento mayor viabilidad celular en ambas líneas fue el scaffold de composición 60% PEG y 40% nanohidroxiapatita embebida en PC. Recomendando para siguientes proyectos el uso de esta composición con esas proporciones [2].

Para determinar qué tipo de espaciador se debe usar en la síntesis de los scaffolds de este macroproyecto, en el año 2022 Ballestas. J en la realización de su trabajo de grado [4], realizo una revisión bibliográfica, donde determino que los dos mejores espaciadores usados con la hidroxiapatita presentados en la literatura hasta esa fecha y que presentan una alta solubilidad en agua [53] [54] y una porosidad uniforme [55],[56]; corresponden al cloruro de sodio (NaCl) y al bicarbonato de amonio. El primero requiere un proceso de inmersión para remover el espaciador [55]. Mientras que el bicarbonato de amonio presenta no requiere de una inmersión, [54], [58].

Por lo que Ballestas. J desarrollo dos protocolos para la incorporación de los espaciadores en los scaffolds definidos en el macroproyecto, el primero con el uso de espaciador NaCl y el segundo con bicarbonato de amonio. Sus resultados determinaron un 17.99% de remoción para el espaciador de NaCl y un 100% de remoción para el espaciador de bicarbonato de amonio [4], y que requiere una menor cantidad de procesos experimentales y un menor tiempo de preparación respecto al NaCl [45]. Estableciendo de esta forma el uso de espaciador de bicarbonato de amonio en la síntesis de los scaffolds para los siguientes proyectos [4].

### 3) OBJETIVOS

Para este trabajo de grado se plantean los siguientes objetivos, basándose en el contexto anteriormente presentado. Generando así la posibilidad de preguntarse ¿Cómo se comportan las propiedades mecánicas en los scaffolds propuestos de nano hidroxiapatita y PEG y bicarbonato de amonio, pero cambiando la inclusión de con o sin PC, Para identificar cómo se ven afectados por el uso de puntos de carbono?

#### 3.1. General

Evaluar el impacto de variar la inclusión o no de los PC en las propiedades mecánicas de un scaffold de PEG y nano hidroxiapatita con puntos de carbono embebidos y con espaciador bicarbonato de amonio.

#### 3.2. Específicos

Objetivos específicos del proyecto.

- a) Sintetizar los diferentes scaffolds según el protocolo establecido en el macroproyecto, variando si se incluyen PC o si no se incluyen PC en la composición de estos.
- b) Realizar y evaluar pruebas mecánicas de tensión/ compresión a los scaffolds sintetizados, para la medición de resistencia a la tensión y resistencia a la compresión.

## 4) ESTADO DEL ARTE

### 4.1. ESTRUCTURA DEL TEJIDO ÓSEO

Los huesos son estructuras rígidas cuyas funciones principales implican el soporte de carga mecánica y protección, homeostasis mineral y hematopoyesis [1]. Adicionalmente, el hueso debe encontrar un equilibrio entre ser una estructura rígida que se resiste a la deformación, y al mismo tiempo flexible para permitir la movilidad [6].

La composición del hueso es un alrededor del 65% mineral, el otro 20-25 % restante es de componente orgánica, principalmente colágeno tipo I [5]. Es de esta forma que el hueso se compone principalmente de dos tipos diferentes de estructura:

El hueso trabecular, localizado en el interior del tejido óseo, compuesto de una estructura esponjosa, diseñado para distribuir la fuerza en el hueso con el menor peso posible [7]. Por otro lado, el hueso compacto, localizado en la parte exterior, diseñado para ser resistente a los movimientos de torsión, flexión y fuerza compresiva [8].

*Tabla 4.1-1: Promedio de los valores en la población mundial sana entre la niñez y la adultez sobre las propiedades mecánicas longitudinales de hueso cortical y esponjoso [9], [12].*

<b>Material</b>	<b>Resistencia a la tensión (MPa)</b>	<b>Resistencia a la compresión (MPa)</b>	<b>Módulo de Young tensión (MPa)</b>	<b>Porcentaje de elongación (%)</b>	<b>Densidad ( g/cm<sup>3</sup> )</b>
<b>Hueso cortical</b>	107-170	156-212	11,4-29,2	1-3	1,88
<b>Hueso esponjoso</b>	1-20	1,5-9,4	0,2-5	1-5	0,48

Para identificar el comportamiento general del hueso en la población sana entre la niñez y la adultez, en la tabla 4.1-1 se recopilan las diferentes pruebas mecánicas que evalúan las estructuras del tejido óseo. Donde se establece, a partir de sus propiedades, que el hueso cortical es un material con una gran rigidez, dureza y una alta resistencia al soportar cargas. En contraste, el hueso esponjoso, posee menor resistencia a la tracción y a la compresión debido a la orientación de las fibras de colágeno [9], [10]. Por tanto, es necesario que los materiales que interactúen con el tejido óseo no interfieran en las propiedades mecánicas de este [11].

Si se desea asegurar, de forma constante las características mecánicas del tejido, es necesario mantener periódicamente una remodelación del tejido [13], la cual es posible gracias a las células óseas (osteoblastos, osteoclastos y osteocitos) y a las células madre mesenquimales, brindándole al tejido una capacidad regenerativa

[14]. Sin embargo, en ocasiones se puede llegar a comprometer este proceso, debido a una necrosis vascular u osteoporosis, induciendo a la pérdida de propiedades mecánicas e integridad [15].

#### **4.2. PROBLEMÁTICA**

Estas pérdidas de propiedades mecánicas están asociadas a defectos óseos, los cuales se definen como la falta de tejido óseo, en un área donde normalmente debería de haber hueso y son ocasionados comúnmente por grandes traumas, infecciones o enfermedades como osteoporosis, osteopenia, fracturas y otras patologías que afectan al hueso [17]. Asimismo, estos trastornos pueden derivarse de osteosarcoma o traumatismos severos, provocando fallas en su remodelación [21].

#### **4.3. ALTERNATIVAS**

Los materiales usados en la síntesis de scaffolds están basados en: metales, que cuentan con buenas propiedades mecánicas, pero pueden reducir la densidad ósea en el sitio del implante y en algunos casos es necesario remover el implante por medio de una cirugía [28], [29]; polímeros (naturales o sintéticas), cuyas propiedades mecánicas son bajas y difíciles de controlar [30], sin embargo, pueden ser bioactivos y biodegradables [31]; cerámicos bioactivos, buenos osteoconductores y osteoinductores, aunque, difíciles de controlar y manipular [28]. Y compuestos, dos o más materiales combinados para mejorar sus características [30] [31].

#### **4.4. HIDROXIAPATITA**

Uno de los materiales más usados en la actualidad es la cerámica hidroxiapatita [32], [33], [34], [35], [36]. Un mineral que constituye el 50 % del peso del tejido óseo y cuenta con propiedades de osteoconducción y osteointegración [37]. Destacando su uso a nivel nanométrico, debido a que ha presentado ventajas en términos de biocompatibilidad, osteoconducción, deposición de calcio en sus superficies y proliferación celular [38]. [40], además de mejorar la citocompatibilidad y formación de hueso, gracias a su relación superficie/volumen, que aumenta la tasa de reabsorción [41].

#### **4.5. PUNTOS DE CARBONO**

Una manera de complementar la hidroxiapatita a escala nanométrica (nanohidroxiapatita) y al mismo tiempo mejorar las propiedades mecánicas es por medio de puntos de carbono (Pc), los cuales son nanopartículas basadas en carbono que poseen propiedades ópticas como la absorción y emisión de luz por fluorescencia en el espectro UV-VIS [42]. El uso de estas partículas no solo ayuda a mejorar las propiedades mecánicas como la resistencia a la tensión y a la compresión, también se estima que puede mejorar la adhesión de osteoblastos, la diferenciación osteogénica y la proliferación celular [42]. No obstante, a pesar de

estas mejoras, la nanohidroxiapatita embebida de puntos de carbono (nHA-PC) aún puede aumentar los valores de resistencia a la tensión y resistencia a la compresión. Por lo que se han hecho compuestos de hidroxiapatita con una matriz polimérica para mejorar las propiedades mecánicas y biológicas [28], [38], [43].

#### **4.6. POLIETILENGLICOL**

El polietilenglicol (PEG) es un poli éter no degradable, que presenta una excelente biocompatibilidad y alta hidrofiliidad en su superficie, favoreciendo la absorción de proteínas y la adhesión celular. Siendo apto para aplicaciones en ingeniería de tejidos [44], en conjunto con la nanohidroxiapatita mejora características como la osteoconductividad, viabilidad, adhesión y proliferación celular [45].

#### **4.7. POROSIDAD**

Existe también la necesidad de tener una estructura con poros, que permita el transporte de nutrientes y el crecimiento celular. Para esto se propone el espaciador Bicarbonato de Amonio, el cual es de los que mejor compatibilidad tienen en el uso de la hidroxiapatita hasta esa fecha y que presentan una alta solubilidad en agua [53] [54] y una porosidad uniforme [55],[56], y no requiere de una inmersión, debido a que se genera una degradación completa al sinterizarse a temperaturas entre 150°C y 175°C descomponiéndose en dióxido de carbono, amoniaco y agua en estado gaseoso, de tal forma que a medida que se abre espacio para salir del scaffold, va dejando una red de poros interconectados [54], [58].  
específicos del proyecto.

#### **4.8. CARACTERIZAR PROPIEDADES MECÁNICAS**

Para determinar la rigidez o elasticidad de un material, se debe someter a pruebas de caracterización, donde el material se somete a una fuerza constante en una misma dirección, con el fin de observar el esfuerzo máximo que resiste por unidad de área [67][69], estas pruebas pueden ser:

##### **4.8.1. COMPRESIÓN AXIAL**

Normalmente en este tipo de pruebas se suele usar la normativa ASTM d695 [68], además de haber sido la que se usó para determinar la resistencia a la compresión del hueso compacto que oscila entre los valores 156-212 MPa y para el hueso esponjoso que esta entre 5-9,4 MPa [9][10][11].

En esta metodología se va a usar de igual forma como referencia esta normativa, sin embargo, esta requiere que la altura sea el doble del diámetro, por lo que requiere el doble de recursos por scaffold [68]. Adicionalmente como se mencionó anteriormente, no solo es una cuestión de ahorrar material, sino que facilita la comparación con la prueba de resistencia a la tensión al reducir el número total de variables que entran en juego.

Una vez determinada las fuerzas y el desplazamiento de cada scaffold, es necesario calcular la resistencia a la compresión, o, en otras palabras, el máximo esfuerzo aparente, el cual es posible calcular conociendo la fuerza y el área del scaffold como se puede ver en la ecuación 4.8.1.1 [67][69]

$$\sigma_t = F/A \quad (4.8.1.1)$$

Por lo cual solo hace falta conocer el área del scaffold, para una probeta cilíndrica en posición frontal a los platos sería la ecuación. 4.8.1.2 [70]

$$2\pi r h + 2\pi r^2. \quad (4.8.1.2)$$

#### 4.8.2. COMPRESIÓN DIAMETRAL

Normalmente en este tipo de pruebas se suele usar la normativa ASTM Standard D638, y a pesar de que se usó esta prueba para determinar la resistencia a la tensión para el hueso compacto 107-70 MPa y 3-20 MPa para el hueso esponjoso [9][10][11], esta normativa es para polímeros [71].

Es posible usar otros materiales como cerámicos y metales, pero la complejidad de la producción de las piezas lo hace una opción bastante complicada de realizar. Sin embargo, existe otra alternativa, el método brasileño o también conocido como el ensayo de tensión indirecto, este ensayo funciona de forma parecida al ensayo de compresión axial, con la diferencia de la disposición del scaffold, en este caso la cara frontal está mirando a los lados, para que la fuerza se haga en un costado de forma diametral, de aquí su otro nombre, esta prueba esta estandarizada por la normativa ASTM Standard D3967 del 2016. [72].

Ahora, la otra diferencia son las ecuaciones aplicadas, dado que el área donde se aplica la fuerza es diferente, la normativa sugiere la ecuación 4.8.2 donde  $\sigma_t$  es la resistencia a la tensión por rotura (MPa), P es carga máxima aplicada(N), indicada por la máquina de ensayo t es el espesor de la muestra(mm) y D es el diámetro de la muestra(mm) [72][67][69].

$$\sigma_t = 2P/(\pi t D) \quad (4.8.2)$$

## 5) METODOLOGÍA

La realización de este proyecto se dividió en 4 etapas que se muestran en la figura 5.0. Empezando con la síntesis de puntos de carbono, le sigue la síntesis de nanopartículas de hidroxiapatita con puntos de carbono embebidos, luego se encuentra la síntesis de scaffolds de PEG-nHA-PC y espaciador de Bicarbonato de Amonio, para finalmente realizar pruebas mecánicas a estos scaffolds y determinar sus propiedades mecánicas.

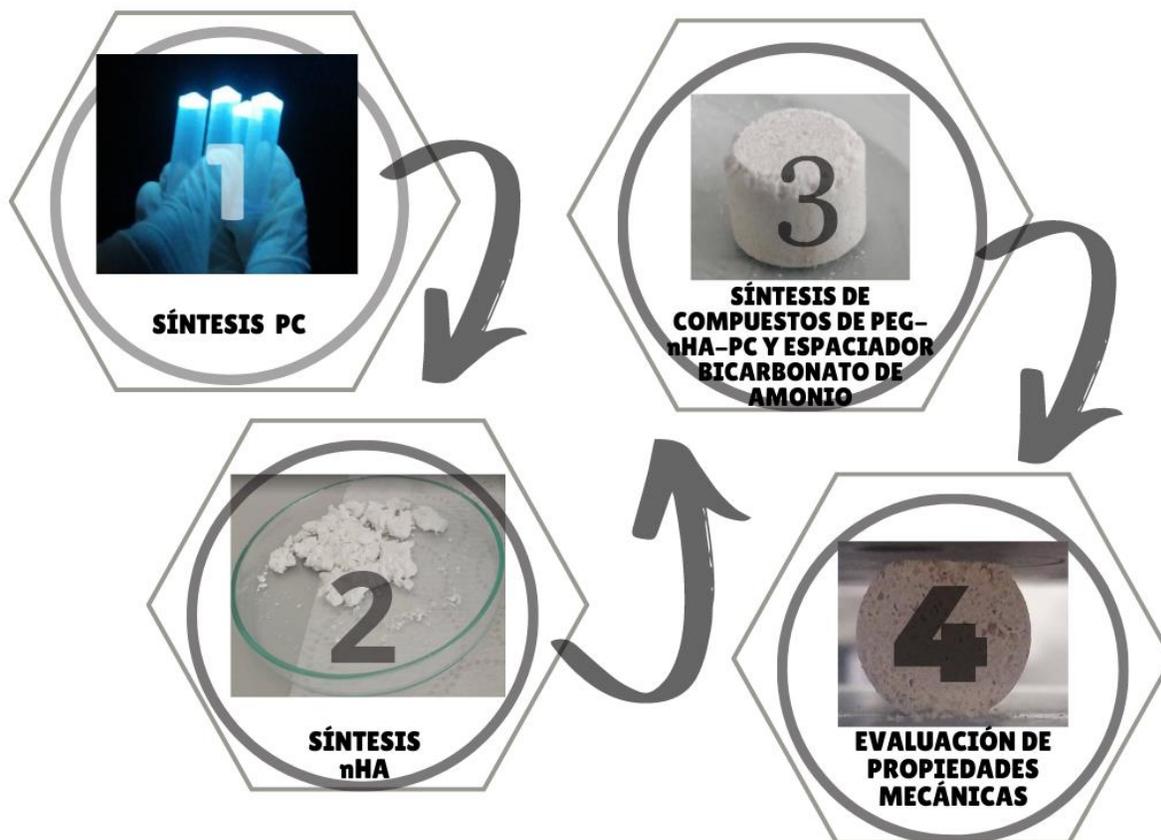


Figura 5.0: Diagrama de la metodología general, dividido en cuatro etapas principales. Empezando con la síntesis de PC, pasando a la síntesis de nHA con y sin pc, siguiendo a la creación de scaffolds hechos de sintetizar PEG-nHA con y sin PC y la inclusión de Bicarbonato de Amonio, para finalizar con la evaluación de las de diferentes propiedades mecánicas de los scaffolds con y sin pc.

### 5.1. SÍNTESIS DE PUNTOS DE CARBONO(PC)

Los PC se sintetizaron por medio de una metodología dividida principalmente en tres fases: síntesis, purificación y secado, cuyo bosquejo aproximado se puede ver en el diagrama de la figura 5.1-1 usando como referencia el método reportado por D. Gao en el 2018 [59].

Siendo la primera fase, la síntesis, la cual consiste en la creación de una mezcla homogénea empezando con una agitación a una velocidad de 3.200 rpm y una órbita de agitado de 5 mm con un Reax top (heidolph Alemania) y una sonicación a una frecuencia de 37 kHz con el Elmasonic Easy+(Elma, Alemania) durante un tiempo entre 2 a 5 minutos; este proceso se repite las veces que sea necesario hasta

que la mezcla este hasta homogenizar, usando como precursor orgánico de carbono 0.5g de ácido cítrico monohidratado(Sharlau, España), en tanto que la N, N-Dimetilformamida y el etanol absoluto al 99 % se usaron como solventes en una relación 1:1 de un total de volumen de 6mL; Para nuevamente homogenizar y llevar a cabo una reacción por microondas usando un reactor Monowave 50 (Anton Paar, Austria), a 175°C, por 5 minutos en el modo AFAP (As Fast As Posible).

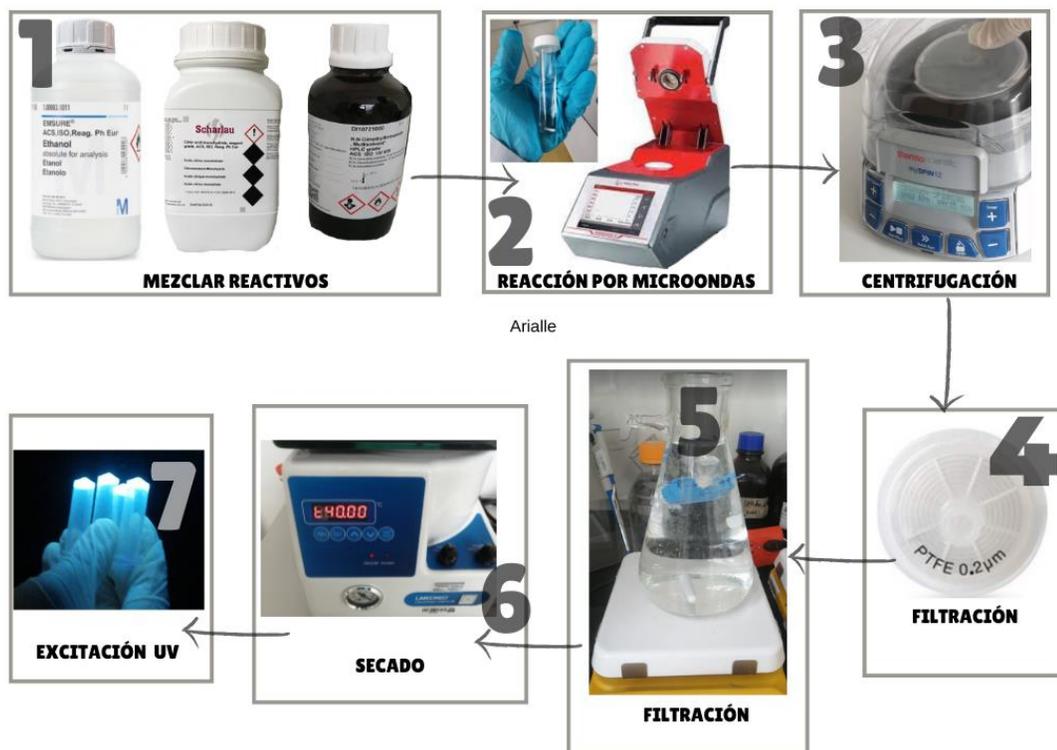


Figura 5.1-1: Proceso de síntesis de PC. Donde se empieza con la mezcla de los reactivos (Ácido Cítrico, Etanol y Dimetilformamida); esta mezcla se pone en un reactor microondas configurado en AFAP, a 175°C por 5 minutos por medio de un Falcón de cristal y un agitador magnético; posteriormente se filtra con un filtro 0.2 µm y una diálisis por filtrado por 24 horas con un papel de filtro de celulosa de 0,22 µm. Para finalmente secarse por 40 horas a 65°C y verificar su excitación con luz ultravioleta a 365nm de longitud de onda.

En la segunda fase, se desea purificar la solución, para esto se debe eliminar los restos del precursor que quedaron en la muestra, empezando centrifugando la solución por 10 minutos a 10000 rpm durante 10 minutos con una Minicentrífuga mySPIN (Thermo Fisher Scientific, USA) posteriormente se filtra con un filtro de 0,2 µm (Minisart NY 25, PTFE), finalizando esta fase se filtra mediante un proceso de diálisis por 24 horas con una bolsa de filtrado a través de un papel de filtro de celulosa de 0,22 µm y un máximo de 6ml de la solución, esta bolsa se sumerge en un Matraz de Erlenmeyer con 1 litro de agua destilada y se deja en agitación magnética constante de 200rpm por 24 horas[73].

En la tercera fase, se realizó el secado con la modificación reportada por Molina D [3] en un horno concentrador de vacío (CentriVap micro IR Vacuum Concentrator, Labconco) a 65°C en la opción IR/HEAT (Infrarrojo/Calor) por un periodo

aproximado de 40 horas, donde finalmente se seca y se deja en una solución 1:1 de agua destilada y del mismo etanol usado con anterioridad a una concentración de 75mg/ml, se verifica la presencia de los PC al excitar la solución con una lámpara de luz ultravioleta(UV) de 365nm de longitud de onda. Se recomienda usar esta concentración debido a que se desea usar para la síntesis de nanohidroxiapatita embebida puntos de carbono (nHA-PC).

Teniendo esto en cuenta, se siguió el procedimiento planteado en el macroproyecto y se caracterizó por medio de pruebas de espectrofotometría de fluorescencia(absorbancia), espectrofotometría UV-Vis(emisión) y espectroscopía infrarroja de transformada de Fourier (FTIR) [ 2]. Dado que los datos efectivamente son iguales a los reportados con anterioridad, no serán el objetivo de este trabajo.

## 5.2. SÍNTESIS DE NANOHIPOXIAPATITA EMBEDIDA EN PC (nHA-PC)

Para la síntesis de nanopartículas de hidroxiapatita(nanohidroxiapatita) se sintetiza por medio de una metodología nuevamente dividida principalmente en tres fases: síntesis, purificación y secado, cuyo bosquejo aproximado se puede ver en el diagrama de la figura 5.2, usando como referencia el método reportado por Mercado et al [60].

Síntesis, la primera fase, consiste en la creación de una mezcla homogénea de 2.5g hidróxido de calcio (Emsure, Alemania) en una suspensión de 20mL de agua destilada filtrada, la cual se agitó magnéticamente a 200 rpm y calentó hasta alcanzar una temperatura de 85°C durante 5 minutos., luego manteniendo la agitación y la temperatura se agrega por medio de una bureta un goteo de 12.5µL por segundo(o una gota cada 4 segundos) de una mezcla homogénea de 2.22g de ácido meta-fosfórico (Sigma-Aldrich, USA) en 30 mL agua destilada filtrada.

Siendo esto último la modificación reportada por Degiovanni M. [2] con la inclusión de PC, donde los 30 mL de agua destilada filtrada se sustituyen por 22.5mL de agua destilada filtrada más 7.5mL de solución de PC para obtener una concentración de 2.5mg/mL. Para esto último los 7.5mL deben ser de la solución anterior de PC concentrados a 7.5mg/mL, dado que se desea diluir en un total de 30 mL, por lo que 7.5mg/mL en 30mL da una concentración de 2.5mg/mL como se puede ver en las ecuaciones 5.2-1 donde CPC es la concentración de puntos de carbono que hay por cada gramo de nHA cuando se tiene una concentración de PC diluida en un volumen de agua destilada(V) [2] y 5.2.1 es si se usaran 7.5 mg de PC por cada 30 mL necesarios para la síntesis de PC según lo establecido en el macroproyecto. Finalizado el goteo, se apaga la temperatura y se mantiene en la misma agitación por 24 horas para obtener una suspensión de nanohidroxiapatita(nHA).

$$CPC = PC / V [2] \quad (5.2.1)$$

$$2.5\text{mg/mL} = 7.5 \text{ mg} / 30\text{mL} \quad (5.2.2)$$

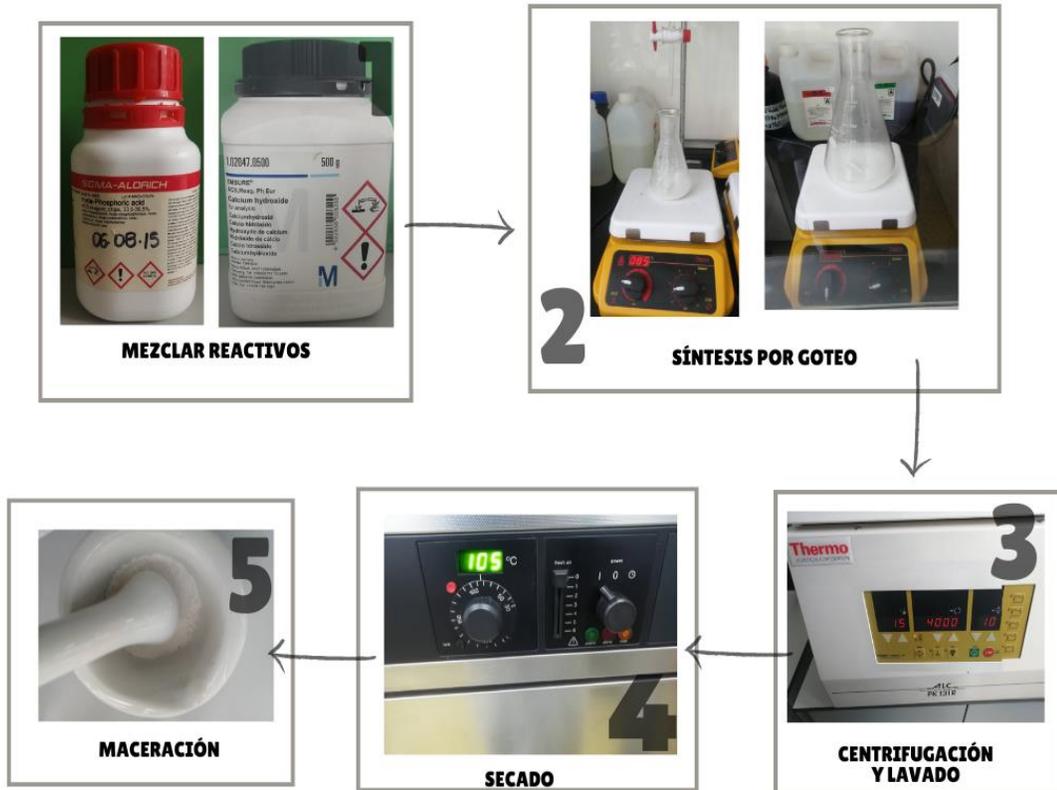


Figura 5.2-1: Diagrama de síntesis de nHA-PC. Empezando con la mezcla de Hidróxido de Calcio en una solución de agua destilada y filtrada, mientras se agita u se calienta a 85°C se gotea sobre esta mezcla una solución de Ácido Meta-Fosfórico con agua destilada. Finalizando el goteo se debe mantener en agitación sin temperatura por 24 horas, se centrifuga y se reduce su pH entre 6 y 7 con agua destilada filtrada y Etanol; posteriormente se seca en un horno entre 100 y 110°C por 6 horas. Para finalmente macerar y almacenar para su uso.

Para el lavado, la segunda fase, la solución se homogeniza y se centrifuga 4000 rpm por 10 minutos con un PK 131 R Centrifugadora MTP Rotor (Thermo Electron, USA), se desecha el sobrenadante líquido y se realiza un lavado para reducir su pH a 6 o 7, realizando 5 veces una solución homogénea con agua destilada centrifugando de igual forma y se desecha el sobrenadante líquido, se repite tres veces lo anterior, pero reemplazando el agua por etanol absoluto al 99 % (Sharlau, España).

Para la tercera fase, el secado, se hace uso de otra modificación reportada por Molina D. [3], donde se deja secando la solución entre 100 a 110°C por 6 horas para hacer remoción del agua, se macera hasta dejar en polvo y se almacena.

### 5.3. SÍNTESIS DE SCAFFOLDS DE PEG-nHA-PC CON INCLUSIÓN DEL ESPACIADOR BICARBONATO DE AMONIO

Para la síntesis de los scaffold de PEG-nHA-PC con inclusión de Bicarbonato de Amonio, se sintetiza por medio de una metodología dividida principalmente en cuatro

fases: síntesis, secado, compresión y secado final, cuyo bosquejo aproximado se puede ver en el diagrama de la figura 5.3, usando como referencia el método de mezcla directa modificado de Kumar et al [61]. En la fase de síntesis y secado son parecidas a las descritas en la sección 5.2 pero con diferentes variaciones reportadas por los aportes de Ballestas J [4].



Figura 5.3-1: Diagrama del proceso de síntesis de scaffold de PEG-nHA-PC y Bicarbonato de Amonio. Donde se inicia con la mezcla de los reactivos de nHA con o sin PC y PEG en metanol y agua destilada filtrada respectivamente, estas dos soluciones se mezclan por medio de gotear la solución de PEG en la nHA con agitación, finalizando el goteo se esperan 4 horas en agitación y posteriormente a una temperatura de 40°C, se seca dos veces en un horno, primero entre 80-85°C por 24 horas y luego a 200°C por 6 horas, se macera y se mezcla con Bicarbonato de Amonio, se compacta y se vuelve a secar a 200°C por 2 horas para evaporar el Bicarbonato de Amonio.

Para su compactación, el resultado debe ser macerado hasta quedar en forma de polvo, ahora con los aportes de Ballestas J [4], 0.477g de este compuesto se mezclan con 1.113g de Bicarbonato de Amonio también macerado para obtener un compuesto 70% PEG Y 30% Bicarbonato de Amonio según las recomendaciones de Ballestas. J [4], el compuesto final en forma de polvo debe quedar uniformemente distribuido, para esto se sugirió dejar una fina capa de Bicarbonato de Amonio y agregar lentamente el PEG-nHA-PC. Con este polvo se compacta con una Maquina Universal Shimadzu AGS-X a 4000N. Este valor se hace para obtener una densidad (0.541 mg/m<sup>3</sup>) parecía al tejido óseo según el reporte de Ballestas J [4] y en otros compuestos de este tipo reportados anteriormente [62], [63]. Finalmente se vuelve a secar a 200°C por 2 horas para evaporar el Bicarbonato de Amonio para obtener una estructura porosa.

## 5.4. CARACTERIZACIÓN DE PROPIEDADES MECÁNICAS

Para facilitar la comparación de los resultados de los dos tipos de compresión, se optó por usar el mismo molde y la misma cantidad de material, es decir un compuesto de 70% Bicarbonato de Amonio y 30%, en un cilindro de volumen 1, por tanto, se dejó a un diámetro de 13mm y una altura de 8mm basándose en la caracterización de compuestos de síntesis de compuestos. similares [66][67].

### 5.4.1. COMPRESIÓN AXIAL

Se usará una máquina de prensa, en nuestro caso es una Máquina Universal Shimadzu AGS-X con una velocidad constante de 1mm/min, se posiciona el scaffold en forma de cilindro y se deja centrado con la cara frontal entre los platos de la prensa en el momento que se evidencien claras discontinuidades en la gráfica de fuerza contra desplazamiento, es donde probablemente existirá una ruptura, esa será la fuerza máxima que puede soportar [69]

### 5.4.2. COMPRESIÓN DIAMETRAL

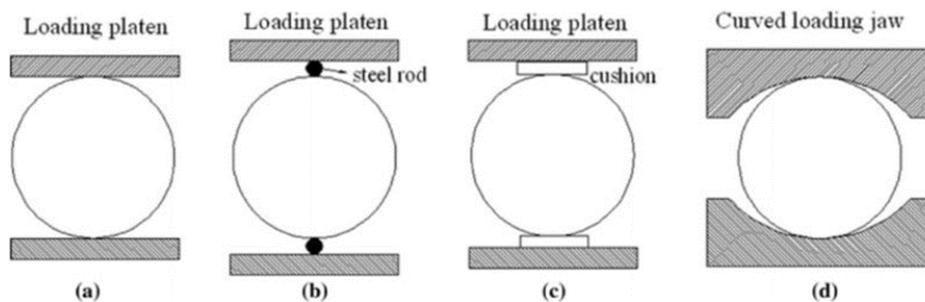


Figura 5.4.2-1: Figura que muestra las diferentes formas que los platos pueden tener para ensayo de Brasil. A) son dos platos planos la distribución de las fuerzas no es uniforme y la probeta puede moverse y C) son platos que focalizan en un mismo punto o región toda la fuerza para ocasionar una falla focalizada. D) los platos son curvos y distribuyen la fuerza alrededor de toda la probeta [72].

Entonces nuevamente se usará una máquina de prensa, en nuestro caso es una Máquina Universal Shimadzu AGS-X con una velocidad constante de 1mm/min, se posiciona el scaffold en forma de cilindro y se deja centrado con la cara frontal entre los platos de la prensa, estos platos pueden ser diferentes formas como lo plantea la normativa y como se puede ver en la figura 5.4.2-1 [72], cada forma se usa para ocasionar un tipo de fallo en específico [72][67], en esta metodología se usaron platos planos que no distribuyen de forma uniforme la fuerza de compresión diametral, para mantener coherencia con la compresión axial.

## 6) RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 6.1. SÍNTESIS DE PC

Objetivos específicos Para poder obtener suficiente material para 9 scaffolds, se tuvo que hacer 2 síntesis de puntos de carbono(PC), con un total de 12mL entre las dos, de los cuales solo 9mL se pusieron en diálisis y a secar, los resultados de estas síntesis se pueden observar en la figura 6.1, donde se puede ver en la figura 6.1-1.A el resultado de los PC(donde se puede apreciar un tenue color amarillo translucido) luego de aplicar la metodología en la sección 5.1, es decir mezclar los reactivos, centrifugar, filtrar, dializar y secar. Para verificar la existencia de PC se sometieron a una emisión de luz UV a 365nm de longitud de onda, siendo la evidencia de fluorescencia la figura 6.1-1.B. Finalmente estos PC se tienen que diluir en una solución 1:1 de Etanol y agua destilada filtrada en una concentración de 75mg/mL, cuyo resultado al ser nuevamente sometido a una luz UV de a 365nm de longitud de onda, siendo la evidencia de fluorescencia la figura 6.1.C, esta solución se dejó de esta forma para facilitar su uso en la siguiente síntesis.

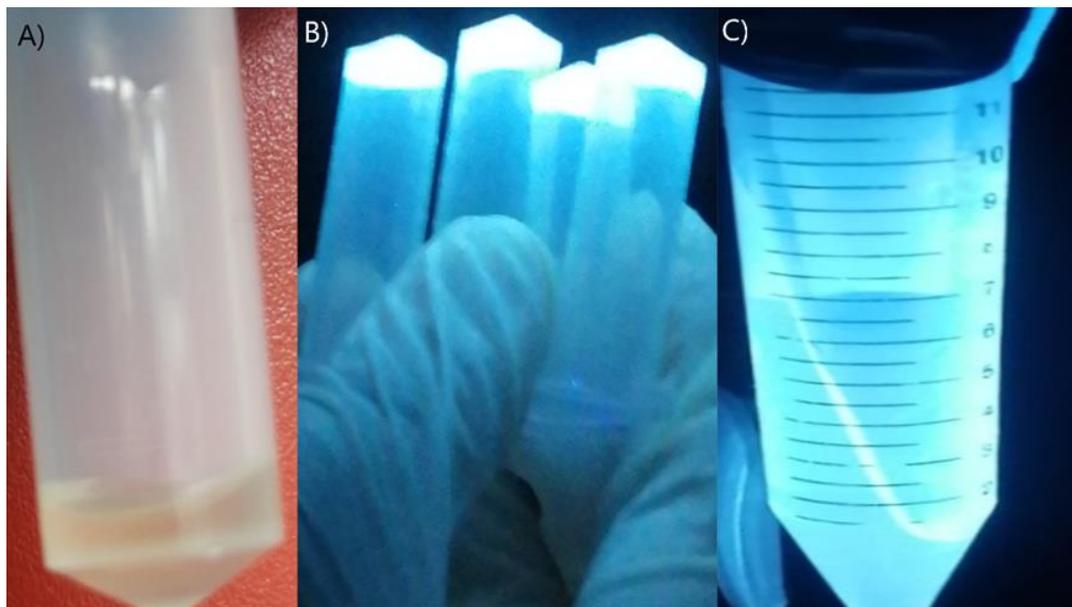


Figura 6.1-1: Resultados de la síntesis de PC. A) PC en estado puro luego del secado, aproximadamente 100mg por tubos de Eppendorf, sin someterse a luz ultravioleta de 365 nm de longitud de onda B) los PC ya secados fluoresciendo al ser expuestos a la luz UV de 365 nm de longitud de onda. C) Solución de PC diluidos en una mezcla 1:1 de Etanol y agua destilada filtrada en una concentración de 75mg/mL fluoresciendo al ser expuestos a la luz UV de 365 nm de longitud de onda.

Se caracterizaron los PC, sin embargo, no se reportaron diferencias en las de pruebas de espectrofotometría de fluorescencia(absorbancia), espectrofotometría UV-Vis(emisión) y espectroscopía infrarroja de transformada de Fourier (FTIR) establecidas en el macroproyecto [2].

## 6.2. SÍNTESIS DE nHA Y nHA-PC

Usando los PC de la síntesis anterior, se sinterizaron 9 gramos de nHA -PC, el resultado se puede ver en la figura 6.2-1.A, donde expuestos a 365 nm de longitud de onda con una lámpara UV, estas nHA tienen una pequeña fluorescencia, gracias a la pequeña concentración de PC.

También se sintetizaron otros 9 gramos de nHA, pero sin PC, al exponerlos a la lámpara de UV con 365 nm de longitud de onda, se puede ver en la figura 6.2-1.B, que no presenta fluorescencia, los puntos que flúoresen eran polvo o algún contaminante, por lo que se realizó su debida extracción.

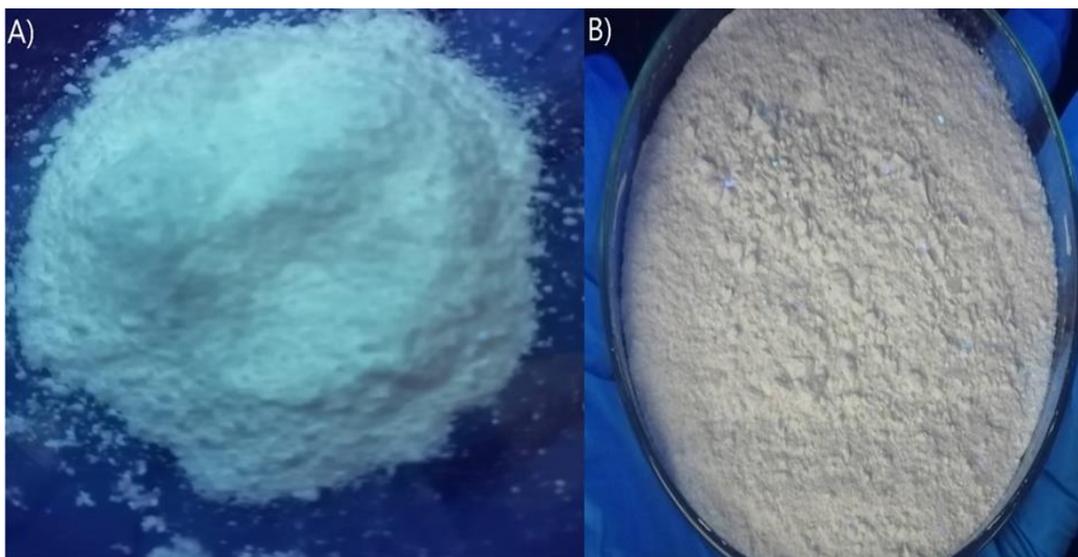


Figura 6.2-1: A) nHA imbuida en PC con una muy pequeña fluorescencia al exponerse a 365 nm de longitud de onda con una lámpara UV. B) nHA sin PC al exponerse a 365 nm de longitud de onda con una lámpara UV.

Se caracterizaron los nHA-PC, sin embargo, no se reportaron diferencias en las de pruebas de espectrofotometría de fluorescencia(absorbancia), espectrofotometría UV-Vis(emisión) y espectroscopía infrarroja de transformada de Fourier (FTIR) establecidas en el macroproyecto [2].

## 6.3. SÍNTESIS DE PEG-nHA Y PEG-nHA-PC

Objetivos específicos Con la nHA sintetizadas anteriormente, tanto con PC como sin PC, se sintetizaron alrededor de 4.5 gramos de PEG-nHA y otros 4.5 gramos de PEG-nHA-PC. Luego de secar el resultado del PEG-nHA-PC se presenta en la figura 6.3-1.

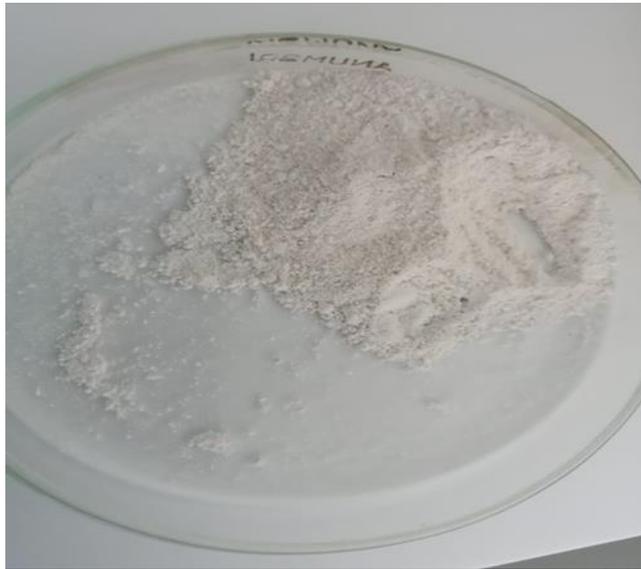


Figura 6.3-1: Resultado de la síntesis de PEG-nHA-PC luego de los dos secados y la maceración.

Se caracterizaron los PEG-nHA-PC, sin embargo, tampoco se reportaron diferencias en las de pruebas de espectrofotometría de fluorescencia(absorbancia), espectrofotometría UV-Vis(emisión) y espectroscopía infrarroja de transformada de Fourier (FTIR) establecidas en el macroproyecto [3].

Usando estos resultados, se mezclaron de forma homogénea 0.477 gramos de PEG-nHA con 1.113 gramos de Bicarbonato de Amonio, de igual forma se mezcló PEG-nHA-PC con el Bicarbonato de Amonio, debido a que los 2.5mg de PC disminuyen en el proceso de síntesis de PEG tal como lo demostró Ballestas. J [4] y Mancipe. P [5], sus densidades son prácticamente iguales y se desea esta composición para tener scaffolds de un 70% de Bicarbonato de Amonio y 30% de PEG-nHA o PEG-nHA-PC. Los resultados de la compactación de estos scaffolds se pueden observar en la figura 6.3-2.A, y los scaffolds luego de la remoción del Bicarbonato de amonio por medio del secado en la figura 6.3-2.B, donde se pude apreciar algunos poros que presenta y el polvo a su alrededor, reflejo de una inestabilidad estructural que no presentaba antes del secado.

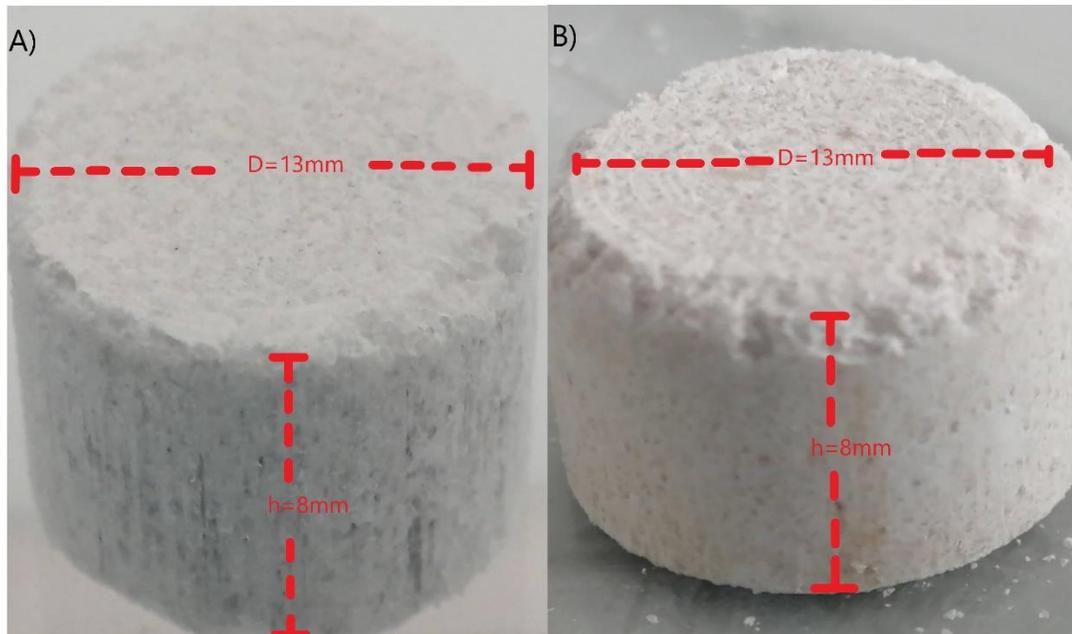


Figura 6.3-2: A) Scaffold compactado de PEG-nHA-PC con compuestos espaciadores de Bicarbonato de amonio, B) Scaffold compactado de PEG-nHA-PC luego de la remoción de los compuestos espaciadores de Bicarbonato de Amonio mediante el secado.

## 6.4. CARACTERIZACIÓN DE PROPIEDADES MECÁNICAS

### 6.4.1. COMPRESIÓN AXIAL

Para la caracterización de los scaffolds, se usaron 3 scaffolds de PEG nHA y 3 scaffolds de PEG nHA-PC para la prueba de compresión axial, donde en la figura 6.4.1-1.A se puede ver el antes de la prueba, del scaffold en la correcta disposición visto desde una vista frontal. Mientras que la figura 6.4.1-1.B se puede observar el después de la prueba, la cual se termina una vez la fractura pulveriza el scaffold.

Los resultados de estas pruebas se pueden observar en las figuras 6.4.1-2 para los scaffolds sin PC y 6.4.1-3 para los scaffolds con PC, donde las A corresponden a las gráficas de los datos de la fuerza en Newtons(N) contra el desplazamiento(mm). Mientras las gráficas B corresponden a los datos procesados para observar con mayor facilidad a la presión o el esfuerzo aparente (MPa) contra la deformación (%) en la altura de los scaffolds, las pruebas se realizaron hasta observar grandes discontinuidades generadas por la compresión.

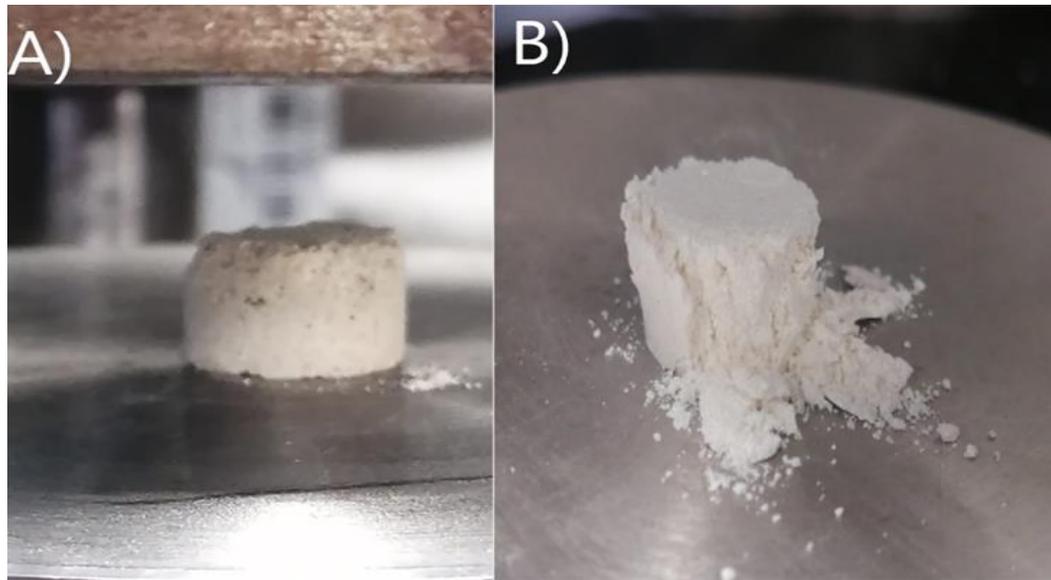


Figura 6.4.1-1: A) Scaffold compactado de PEG-nHA-PC con remoción del Bicarbonato de Amonio en posición para someterse a la prueba de compresión axial. B) Scaffold compactado de PEG-nHA-PC con remoción del Bicarbonato de amonio después de someterse a la prueba de compactación axial.

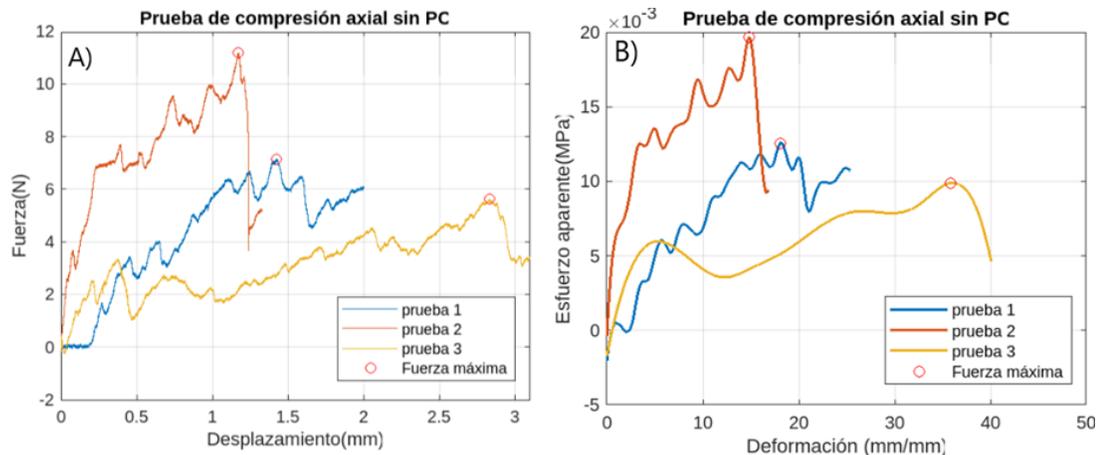


Figura 6.4.1-2: Grafica de pruebas de compresión axial, en scaffolds de PEG-nHA- compactados después de realizar el proceso de remoción del Bicarbonato de amonio. A) Grafica de fuerza en Newtons(N) contra el desplazamiento(mm). B) presión o e esfuerzo aparente (MPa) contra la deformación (mm/mm).

Comparando los resultados, se puede intuir que los scaffolds sin PC tienen un comportamiento más rígido, dado que soportan un mayor rango de fuerza a compresión y de esfuerzo aparente y por tanto más parecido al hueso compacto [8]; mientras que los scaffolds con PC son menos rígidos, debido a un menor rango de fuerza y de esfuerzo aparente siendo más parecidos al hueso esponjoso [7]. Adicionalmente, al comparar las gráficas de las pruebas de compresión axial con PC y las gráficas de compresión axial sin PC, se pueda identificar que las pruebas con PC tienen mayores discontinuidades y una mayor dispersión.

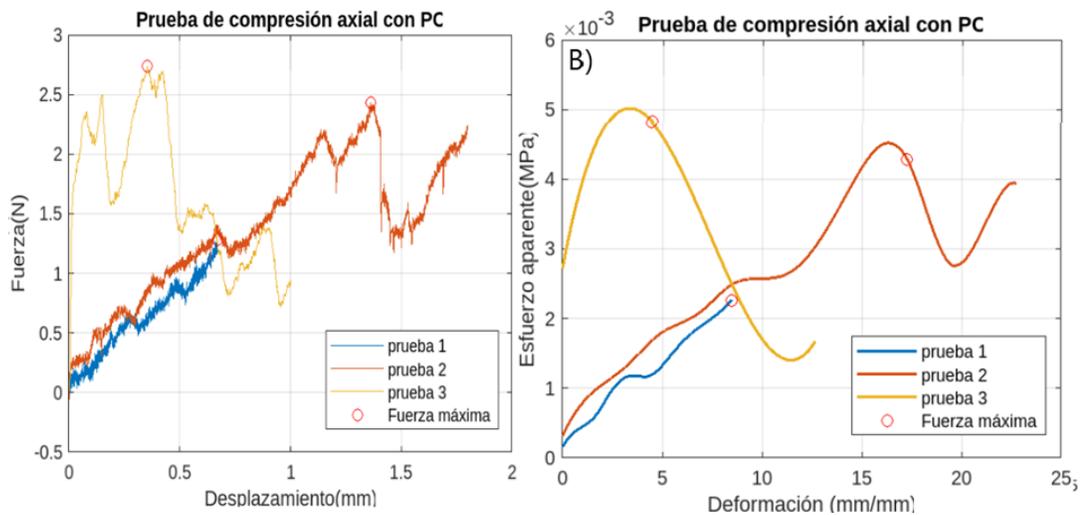


Figura 6.4.1-3: Grafica de pruebas de compresión axial, en scaffolds de PEG-nHA-PC compactados después de realizar el proceso de remoción del Bicarbonato de amonio. A) Grafica de fuerza en Newtons(N) contra el desplazamiento(mm). B) presión o esfuerzo aparente (MPa) contra la deformación (mm/mm).

Sin embargo, gracias a los aportes de Ballestas. J, sabemos que la densidad de estos scaffolds de PEG-nHA-PC es de 0,541 mg/cm<sup>3</sup> [4], y que por la teoría que la densidad del hueso esponjoso es de 0,48 g/cm<sup>3</sup>[8], los scaffolds están más cerca de las propiedades del hueso esponjoso que del compacto. Y si observamos los resultados recopilados en la tabla 6.4.1-1, es posible identificar que el máximo esfuerzo aparente de ambas composiciones de scaffolds, no son suficientes ni para el mínimo de la resistencia en compresión del hueso que es de 3 MPa, siendo la más cercana 0.0126MPa para la composición sin PC, en tanto que el más alejado es de 0.0209 para la con PC.

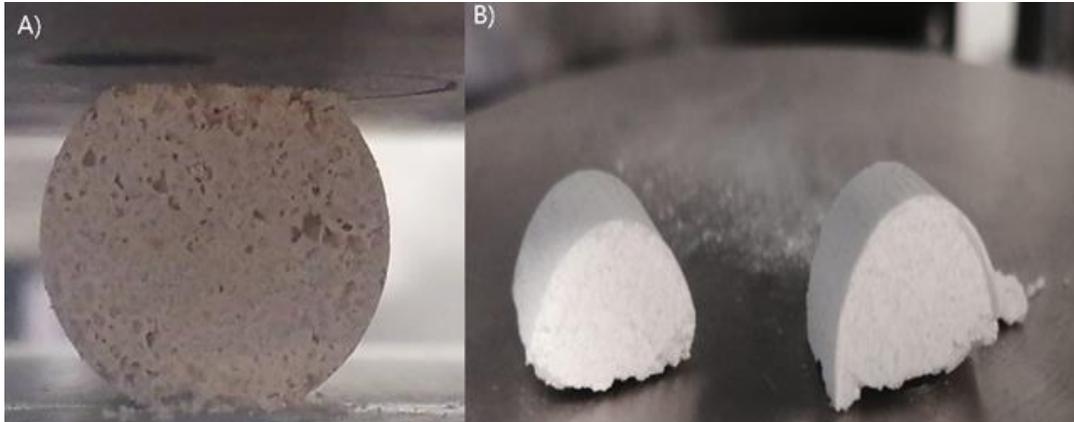
Tabla 6.4.1-1: . Tabla comparativa de máxima fuerza(N) y máximo esfuerzo aparente (MPa) entre de las pruebas de compresión axial entre scaffolds de PEG-nHA con y sin PC.

Composición	Máxima fuerza(N)	Máximo esfuerzo aparente (MPa)
1°. Sin pc	7.1446	0.0126
2°. Sin pc	11.723	0.0197
3°. Sin pc	5.6108	0.0099
1°. Con pc	1.2805	0.0023
2°. Con pc	2.4350	0.0043
3°. Con pc	2.7402	0.0048

## 6.4.2. COMPRESIÓN DIAMETRAL

Se usaron 4 scaffolds de PEG nHA y 4 scaffolds de PEG nHA-PC para la prueba de compresión, de los cuales 1 de cada composición se realizó sin haber realizado la remoción del Bicarbonato de Amonio para identificar los cambios que presentan al

someterse a la compresión diametral y poder compararlos con aquellos que sí estuvieron en el horno, es decir 3 scaffolds de PEG nHA-PC y 3 scaffolds de PEG nHA que si fueron al horno, mientras, 1 scaffold de cada tipo de composición que no fueron al horno, con el fin de identificar si existe una reducción a la resistencia de la tensión cuando el scaffold presenta poros y cuando no, donde en la figura 6.4.2-1.A se puede ver el antes de la prueba, del scaffold en la correcta disposición visto desde una vista superior. Mientras que la figura 6.4.2-1.B se puede observar el después de la prueba, la cual finaliza una vez la fractura divide en dos al scaffold.



*Figura 6.4.2-1: A) Scaffold compactado de PEG-nHA-PC con remoción del Bicarbonato de Amonio en posición para someterse a la prueba de compresión diametral. B) Scaffold compactado de PEG-nHA-PC con remoción del Bicarbonato de amonio después de someterse a la prueba de compactación diametral.*

Los resultados de estas pruebas se pueden observar, primeramente, en la figura 6.4.2-2 donde esta tanto para la composición con PC como sin PC. Y en las figuras 6.4.2-3 para los scaffolds sin PC y 6.4.1-4 para los scaffolds con PC, donde las A corresponden a las gráficas de los datos crudos de la fuerza en Newtons(N) contra el desplazamiento(mm). Mientras las gráficas B corresponden a los datos procesados para observar con mayor facilidad a la presión o el esfuerzo aparente (MPa) contra la deformación (mm/mm) en la altura de los scaffolds, las pruebas se realizaron hasta el momento donde se pudo apreciar discontinuidades notables en esfuerzo o una ruptura en la composición del scaffold.

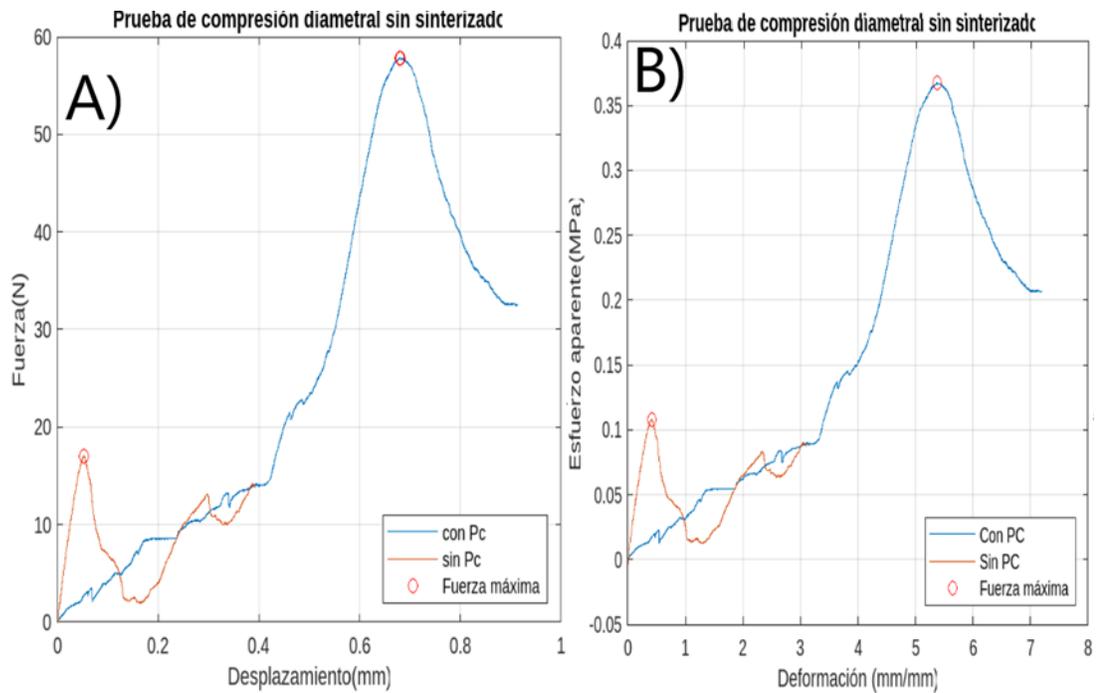


Figura 6.4.2-2: Gráficas de compresión diametral sin sinterizado para scaffolds con PC y para scaffolds sin PC A) fuerza a tensión(N) contra desplazamiento. B) esfuerzo aparente (MPa) contra deformación (mm/mm).

Comparando el comportamiento de las gráficas de los resultados, es más difícil intuir cual es el comportamiento, debido a que la figura 6.4.2-2 está contradiciendo tanto a la figura 6.4.2-3 como a la figura 6.4.2-4, dado que en estas indican que los scaffolds que deberían tener la mayor fuerza y el mayor esfuerzo aparente debería ser las de composición sin PC; sin embargo, en la figura 6.4.2-2, sucede, al contrario. Es necesario destacar, que, ese scaffold antes de ponerlo en el horno, ya se estaba rompiendo en pequeños al presentar pequeñas fricciones, y dado que los otros tienen un mayor número de pruebas, es posible asumir que el scaffold de la composición sin puntos de carbono que no se puso en el horno, tenía un defecto en su fabricación.

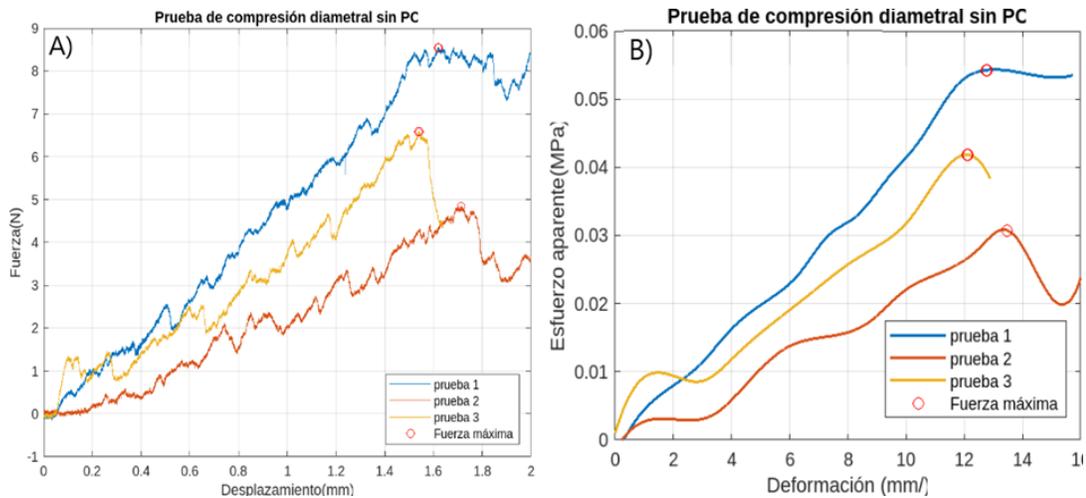


Figura 6.4.2-3: Grafica de pruebas de compresión diametral, en scaffolds de PEG-nHA- compactados después de realizar el proceso de remoción del Bicarbonato de amonio. A) Grafica de fuerza en Newtons(N) contra el desplazamiento(mm). B) presión o esfuerzo aparente (MPa) contra la deformación (mm/mm).

De acuerdo con los ensayos anteriores, las propiedades mecánicas de estos scaffolds siguen estando lejos de las del hueso, ya que nuevamente, mirando la tabla 6.4.2-1 siguen sin alcanzar las mismas propiedades que requiere el tejido óseo, ya que la más alta es de 0.0543 MPa correspondiente a la composición sin PC cuando la mínima resistencia a la tensión correspondiente al tejido óseo sería de 1.5 MPa para el hueso esponjoso. También es necesario destacar, que los resultados sin sinterizado tienen mayor concordancia con los valores reportados en la literatura, recordemos que los PC en teoría según se mencionó en la sección 4.5 los puntos de carbono deben aumentar las resistencias no disminuirlas [42], como si se presentó en los sinterizados, por lo que es posible que la forma en que se está usando el bicarbonato y el sinterizado están afectando la resistencia de los scaffolds.

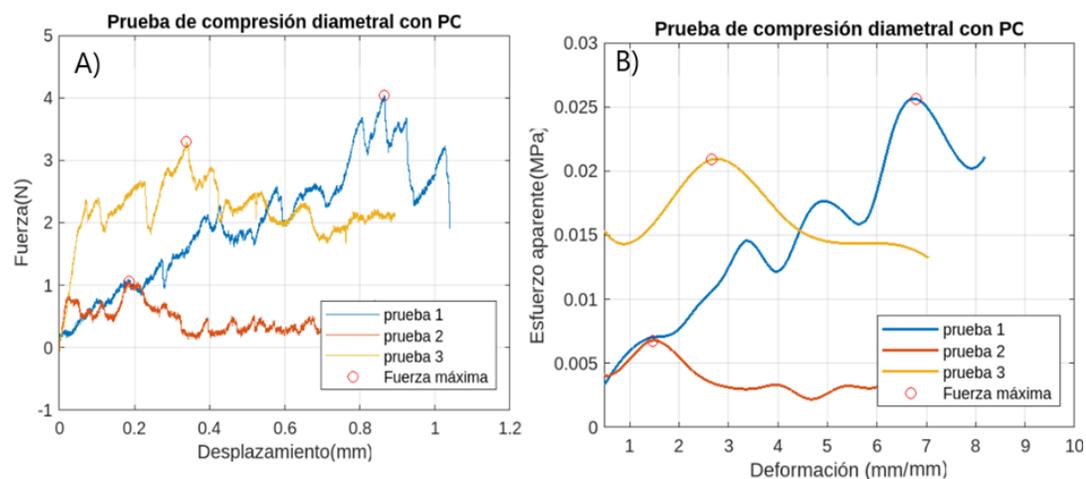


Figura 6.4.2-4: Grafica de pruebas de compresión diametral, en scaffolds de PEG-nHA-PC compactados después de realizar el proceso de remoción del Bicarbonato de amonio. A) Grafica de fuerza en Newtons(N) contra el desplazamiento(mm). B) presión o esfuerzo aparente (MPa) contra la deformación (mm/mm).

Finalmente, comparando con la prueba anterior, también se puede apreciar que, en promedio, estos scaffolds sin importar si están compuestos de PC o no, tienden a soportar mayores cargas en una compresión axial que en diametral, y por tanto su comportamiento se debe a la composición del compuesto, siendo el PEG la matriz, mientras que el refuerzo corresponde a la nHA.

*Tabla 6.4.2-1: Tabla donde se presentan los resultados de máxima fuerza(N) y máximo esfuerzo aparente (MPa) entre las pruebas de compresión diametral, para los scaffolds de PEG-nHA con o sin PC.*

<b>Composición</b>	<b>Máxima fuerza(N)</b>	<b>Máximo esfuerzo aparente (MPa)</b>
Sin sinterizar sin PC	17.031	0.1081
Sin sinterizar Con PC	57.260	0.3672
1°. Sin pc	8.5449	0.0543
2°. Sin pc	4.8447	0.0308
3°. Sin pc	6.5883	0.0418
1°. Con pc	4.0340	0.0256
2°. Con pc	1.0649	0.0068
3°. Con pc	3.2902	0.0209

## **7) CONCLUSIONES**

Se sintetizaron scaffolds sin PC, cuyos rangos de resistencia a la compresión y resistencia a la tensión en el orden de MPa fueron de: 0.0099-0.0126 y 0.0308-0.0543 respectivamente.

Se sintetizaron scaffolds con PC, cuyos rangos de resistencia a la compresión y resistencia a la tensión en el orden de MPa fueron de: 0.0023-0.0048 y 0.0068-0.0256 respectivamente.

Se evidencia dificultades en la homogenización del espaciador Bicarbonato de Amonio, lo que puede afectar su estructura y por tanto la resistencia a la compresión y a la tensión.

Es necesario buscar alternativas que permitan a los scaffolds alcanzar la resistencia a la compresión y la resistencia a la tensión del tejido óseo. Es decir, mínimo un 1.5 y un 1 MPa respectivamente.

## **8) RECOMENDACIONES Y TRABAJOS FUTUROS**

Aumentar el número de ensayos en las pruebas de resistencia a la compresión y resistencia a la tensión, para asegurar una mayor rigurosidad estadística.

Mejorar el método de homogenización del Bicarbonato de Amonio, por medio de otras técnicas, como macerar con bolas de acero.

Estudiar diferentes cantidades de espaciador del Bicarbonato de Amonio en el scaffold; así como diferentes temperaturas y tiempos de sinterizado. Para mejorar la resistencia a la tensión y la resistencia a la compresión de estos.

Realizar un análisis de la porosidad en los scaffolds luego del sinterizado con el Bicarbonato de Amonio, mediante un microscopio electrónico de barrido.

Verificar la viabilidad celular, a través del análisis de citotoxicidad, migración y adhesión celular.

## 9) REFERENCIAS

- [1] D. B. Burr, «Bone morphology and organization,» en Basic and applied bone biology, Elsevier, 2019, págs. 3-26.
- [2] S. Degiovanni Morales et al., «Modificación de nanopartículas de hidroxiapatita con puntos de carbono para la fabricación de scaffolds multiescala,» Ph.D. dissertation, Universidad del Rosario, 2021.
- [3] M. Antonia Molina et al., «Evaluación de propiedades de compuestos poliméricos con puntos de carbono embebidos en nanohidroxiapatita para aplicaciones en regeneración de tejido óseo» Ph.D. dissertation, Universidad del Rosario, 2021.
- [4] J. Ballestas Pineda et al., «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» Ph.D. dissertation, Universidad del Rosario, 2022.
- [5] P. Andrea Mancipe et al., «Evaluación de propiedades biológicas de una matriz polimérica de polietilenglicol/nanohidroxiapatita/puntos de carbono para regeneración ósea» Ph.D. dissertation, Universidad del Rosario, 2022.
- [6] D. B. Burr, «Bone morphology and organization,» in Basic and applied bone biology. Elsevier, 2019, pp. 3–26.
- [7] R. K. Fuchs, W. R. Thompson, and S. J. Warden, «Bone biology,» in Bone Repair Biomaterials. Elsevier, 2019, pp. 15–52.
- [8] K. S. Saladin, Anatomía y fisiología. McGraw Hill, 2013.
- [9] N. Tripathy, E. Perumal, R. Ahmad, J. E. Song, and G. Khang, «Hybrid composite biomaterials,» in Principles of Regenerative Medicine. Elsevier, 2019, pp. 695–714
- [10] J. R. Caeiro, P. González, and D. Guede, «Biomecánica y hueso (y II): ensayos en los distintos niveles jerárquicos del hueso y técnicas alternativas para la determinación de la resistencia ósea,» Rev. Osteoporos. y Metab. Miner., vol. 5, no. 2, pp. 99–108, Jun. 2013, doi: 10.4321/S1889-836X2013000200007.
- [11] N. Reina and J. M. Laffosse, «Biomecánica del hueso: aplicación al tratamiento y a la consolidación de las fracturas,» EMC - Apar. Locomot., vol. 47, no. 3, pp. 1–17, Sep. 2014, doi: 10.1016/S1286-935X(14)68513-0.
- [12] M. Nordin, D. Leger, and V. H. Frankel, «Biomechanics of bone» Basic biomechanics of the musculoskeletal system Margaret Nordin, Victor H. Frankel ; Dawn Leger, editor. 2012.
- [13] J. S. Kashan, S. M. Ali, J. S. Kashan, and S. M. Ali, «Modeling and simulation for mechanical behavior of modified biocomposite for scaffold application,» Ing. e Investig., vol. 39, no. 1, pp. 63–75, 2019, doi: 10.15446/ING.INVESTIG.V39N1.73638.
- [14] P. Chavassieux and P. Meunier, «Histología y citología del hueso normal,» EMC-Aparato Locomotor, vol. 36, no. 3, pp. 1–6, 2003.
- [15] K. J. Rambhia and P. X. Ma, «Biom mineralization and bone regeneration,» in Principles of Regenerative Medicine. Elsevier, 2019, pp. 853–866.
- [16] R. Dimitriou, E. Jones, D. McGonagle, and P. V. Giannoudis, «Bone regeneration: current concepts and future directions,» BMC medicine, vol. 9, no. 1, pp. 1–10, 2011.
- [17] O. M. de la salud. (2021) Trastornos musculoesqueléticos. [Online]. Available: <https://www.who.int/es/news-room/factsheets/detail/musculoskeletal-conditions>.
- [18] D. Smrke, P. Rozman, M. Veselko, and B. Gubina, Treatment of bone defects—allogenic platelet gel and autologous bone technique. IntechOpen, 2013.

- [19] A. Barrios-Moyano and C. De la Pena-García, “Prevalencia de osteoporosis y osteopenia en pacientes laboralmente activos,” *Acta ortopédica mexicana*, vol. 32, no. 3, pp. 131–133, 2018.
- [20] Y. Xie, L. Zhang, Q. Xiong, Y. Gao, W. Ge, and P. Tang, “Benchtop bedside strategies for osteoporotic fracture: From osteoimmunology to mechanosensation,” *Bone research*, vol. 7, no. 1, pp. 1–13, 2019.
- [21] D. G. Fernández-Avila, S. Bernal-Macías, M. J. Parra, D. N. Rincón, J. M. Gutiérrez, and D. Rosselli, “Prevalencia de osteoporosis en Colombia: datos del registro nacional de salud del 2012 al 2018,” *Reumatol. Clínica*, 2020, doi: <https://doi.org/10.1016/j.reuma.2020.07.008>.
- [22] M. Orciani, M. Fini, R. Di Primio, and M. Mattioli-Belmonte, “Biofabrication and Bone Tissue Regeneration: Cell Source, Approaches, and Challenges,” *Front. Bioeng. Biotechnol.*, vol. 0, no. MAR, p. 17, Mar. 2017, doi: 10.3389/FBIOE.2017.00017.
- [23] American Cancer Society, “Cancer Facts Figures 2021.” American Cancer Society, Atlanta, 2021, Accessed: Sep. 07, 2021. [Online]. Available: <https://www.cancer.org/content/dam/cancerorg/research/cancer-facts-andstatistics/annual-cancer-facts-andfigures/2021/cancer-facts-and-figures-2021.pdf>.
- [24] T. W. Bauer and G. F. Muschler, “Bone graft materials: an overview of the basic science,” *Clinical Orthopaedics and Related Research®*, vol. 371, pp. 10–27, 2000.
- [25] W. Wang and K. W. Yeung, “Bone grafts and biomaterials substitutes for bone defect repair: A review,” *Bioactive materials*, vol. 2, no. 4, pp. 224–247, 2017.
- [26] A. S. Herford, E. Stoffella, and C. M. Stanford, “Bone grafts and bone substitute materials,” in *Principles and practice of single implant and restorations*. Elsevier, 2014, pp. 75–86.
- [27] K. Dzobo et al., “Advances in Regenerative Medicine and Tissue Engineering: Innovation and Transformation of Medicine.,” *Stem Cells Int.*, vol. 2018, p. 2495848, 2018, doi: 10.1155/2018/2495848.
- [28] A. M. Cícero, J. P. M. Issa, and S. Feldman, “Matrices de tercera generación en la ingeniería de tejidos óseos,” 2017.
- [29] G. Turnbull, J. Clarke, F. Picard, P. Riches, L. Jia, F. Han, B. Li, and W. Shu, “3D bioactive composite scaffolds for bone tissue engineering,” *Bioactive materials*, vol. 3, no. 3, pp. 278–314, 2018.
- [30] H. Qu, H. Fu, Z. Han, and Y. Sun, “Biomaterials for bone tissue engineering scaffolds: a review,” *RSC advances*, vol. 9, no. 45, pp. 26 252–26 262, 2019.
- [31] L. Roseti, V. Parisi, M. Petretta, C. Cavallo, G. Desando, I. Bartolotti, and B. Grigolo, “Scaffolds for bone tissue engineering: state of the art and new perspectives,” *Materials Science and Engineering: C*, vol. 78, pp. 1246–1262, 2017.
- [32] S. Bose, M. Roy, and A. Bandyopadhyay, “Recent advances in bone tissue engineering scaffolds,” *Trends in biotechnology*, vol. 30, no. 10, pp. 546–554, 2012.
- [33] J.-P. Carrel, A. Wiskott, M. Moussa, P. Rieder, S. Scherrer, and S. Durual, “A 3D printed TCP/HA structure as a new osteoconductive scaffold for vertical bone augmentation,” *Clinical Oral Implants Research*, vol. 27, no. 1, pp. 55–62, 2016.
- [34] Z. M. Johnson, Y. Yuan, X. Li, T. Jashashvili, M. Jamieson, M. Urata, Y. Chen, and Y. Chai, “Mesenchymal stem cells and three-dimensional osteoconductive scaffold regenerate calvarial bone in critical size defects in swine,” *Stem cells translational medicine*, 2021.
- [35] A. Kamali, A. Oryan, S. Hosseini, M. H. Ghanian, M. Alizadeh, M. B. Eslaminejad, and H. Baharvand, “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, pp. 64–75, 2019.

[36] Y. P. Yang, K. M. Labus, B. C. Gadowski, A. Bruyas, J. Easley, B. Nelson, R. H. Palmer, K. McGilvray, D. Regan, C. M. Puttlitz et al. , “Osteoinductive 3d printed scaffold healed 5 cm segmental bone defects in the ovine metatarsus,” *Scientific Reports*, vol. 11, no. 1, pp. 1–12, 2021.

[37] Y. Sun, R. Li, X. Yu, X. Li, Z. Han, J. Sun, W. Bi, W. Liu, Y. Yu, and W. Cui, “Highly active biological dermal acellular tissue scaffold composite with human bone powder for bone regeneration,” *Materials & Design*, vol. 209, p. 109963, 2021.

[38] T. T. Roberts and A. J. Rosenbaum, “Bone grafts, bone substitutes and orthobiologics: the bridge between basic science and clinical advancements in fracture healing,” *Organogenesis*, vol. 8, no. 4, pp. 114–124, 2012.

[39] R. E. McMahon, L. Wang, R. Skoracki, and A. B. Mathur, “Development of nanomaterials for bone repair and regeneration,” *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, vol. 101, no. 2, pp. 387–397, 2013.

[40] C. Shuai, Y. Nie, C. Gao, P. Feng, J. Zhuang, Y. Zhou y S. Peng, «The microstructure evolution of nanohydroxyapatite powder sintered for bone tissue engineering,» *Journal of Experimental Nanoscience*, vol. 8, n.o 5, págs. 762-773, 2013, issn: 17458099. doi: 10.1080/17458080.2011.606507.

[41] A. Szcze, L. Ho y E. Chibowski, «Synthesis of hydroxyapatite for biomedical applications,» vol. 249, n.o April, págs. 321-330, 2017. doi: 10.1016/j.cis.2017.04.007

[42] R. Eivazzadeh-Keihan, A. Maleki, M. De La Guardia, M. S. Bani, K. K. Chenab, P. Pashazadeh-Panahi, B. Baradaran, A. Mokhtarzadeh, and M. R. Hamblin, “Carbon based nanomaterials for tissue engineering of bone: Building new bone on small black scaffolds: A review,” *Journal of advanced research*, vol. 18, pp. 185–201, 2019.

[43] S. Gogoi, M. Kumar, B. B. Mandal, and 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, no. 31, pp. 26 066–26 076, 2016.

[44] J. S. Carson and M. P. Bostrom, “Synthetic bone scaffolds and fracture repair,” *Injury*, vol. 38, no. 1, pp. S33–S37, 2007.

[45] 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, issn: 02728842. doi: 10.1016/j.ceramint.2019.01.145.

[46] M. C. Hacker, J. Krieghoff y A. G. Mikos, «Synthetic polymers,» en *Principles of regenerative medicine* 3rd ed, 2019, págs. 559-590

[47] P. Kumar, B. S. Dehiya, and A. Sindhu, “Synthesis and characterization of nHA-PEG and nBG-PEG scaffolds for hard tissue engineering applications,” *Ceram. Int.*, vol. 45, no. 7, pp. 8370–8379, May 2019, doi: 10.1016/j.ceramint.2019.01.145.

[48] E. Rosero, “Procesamiento de espumas para regeneraciones ósea formadas a partir de hidroxiapatita, titanato de calcio y alúmina y sus propiedades m´ecanicas y bioactividad,” trabajo de fin de grado, Univ. Rosario- ECI, Mayo 2019, uri: <https://repositorio.escuelaing.edu.co/handle/001/1186>.

[49] A. A. Mostafa, H. Oudadesse, M. B. Mohamed, E. S. Foad, Y. Le Gal, and G. Cathelineau, “Convenient approach of nanohydroxyapatite polymeric matrix composites,” *Chem. Eng. J.*, vol. 153, no. 1–3, pp. 187–192, Nov. 2009, doi: 10.1016/J.CEJ.2009.05.039.

- [50] B. Arifvianto, M. Leeflang, J. Duszczyk, and J. Zhou, "Characterisation of space holder removal through water leaching for preparation of biomedical titanium scaffolds," 2014.
- [51] B. Goyal and A. Pandey, "Critical review on porous material manufacturing techniques, properties & their applications," *Materials Today: Proceedings*, 2021.
- [52] 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.
- [53] B. Arifvianto, M. Leeflang, J. Duszczyk y J. Zhou, Characterisation of space holder removal through water leaching for preparation of biomedical titanium scaffolds, 2014.
- [54] 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.
- [55] 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.
- [56] 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.
- [57] 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.
- [58] 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.
- [59] D. Gao, X. Liu, D. Jiang, H. Zhao, Y. Zhu, X. Chen, H. Luo, H. Fan y X. Zhang, «Exploring of multicolor emissive carbon dots with novel double emission mechanism,» *Sensors and Actuators, B: Chemical*, vol. 277, n.o September, págs. 373-380, 2018, issn: 09254005. doi: 10.1016/j.snb.2018.09.031.
- [60] D. F. Mercado, G. Magnacca, M. Malandrino, A. Rubert, E. Montoneri, L. Celi, A. Bianco Prevot y M. C. Gonzalez, «Paramagnetic iron-doped hydroxyapatite nanoparticles with improved metal sorption properties. A bioorganic substrates-mediated synthesis,» *ACS Applied Materials and Interfaces*, vol. 6, n.o 6, págs. 3937-3946, 2014, issn: 19448252. doi: 10.1021/am405217j.
- [61] 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.
- [62] 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.
- [63] 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,» *Biomaterials*, vol. 27, n.o 8, págs. 1399-1409, 2006.
- [64] M. Sinha, D. Basu, B. Sen. 'Cerámica de hidroxapatita porosa y sus aplicaciones clínicas' *Interceramic* vol. 49. 2000. págs. 102-105
- [65] H. Ramay, M. Zhang. 'Preparación de andamios de hidroxapatita porosa mediante la combinación de métodos de fundición en gel y esponja de polímero'. *Biomateriales* . vol. 24. 2003. págs. 3293-3302.
- [66] Author links open overlay panel PatriciaRos-Tárragaa Person Envelope AngelMurcianob PatriciaMazónb Sergio A.Gehrkec Piedad N.De Azaa, PatriciaRos-Tárragaa Person Envelope, a, AngelMurcianob, b, PatriciaMazónb, S.

- A.Gehrkec, c, P. N. D. Azaa, and AbstractThe aim of this research was to develop and characterize a novel stratified porous scaffold for future uses in bone tissue engineering. In this study, “New 3D stratified si-ca-P porous scaffolds obtained by sol-gel and polymer replica method: Microstructural, Mineralogical and chemical characterization,” *Ceramics International*, 20-Feb-2017. [Online]. Available: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0272884217302675>. [Accessed: 10-Jul-2022].
- [67] Morejón L, Delgado JA, Antunes Ribeiro A, Varella de Oliveira M, Mendizábal E, García I, Alfonso A, Poh P, van Griensven M, Balmayor ER. Development, Characterization and In Vitro Biological Properties of Scaffolds Fabricated From Calcium Phosphate Nanoparticles. *Int J Mol Sci*. 2019 Apr 11;20(7):1790. doi: 10.3390/ijms20071790. PMID: 30978933; PMCID: PMC6480082.
- [68] “Standard Test Method for Compressive Properties of Rigid Plastics,” ASTM Standard D695, 2002.
- [69] Esaú Vargas S. Seguir (no date) Ensayos en Mecánica de Rocas, Share and Discover Knowledge on SlideShare. Available at: <https://es.slideshare.net/Evargs1992/ensayos-en-mecnica-de-rocas> (Accessed: August 10, 2022)..
- [70] “Volumen y área de la superficie de un cilindro (video),” Khan Academy. [Online]. Available: <https://es.khanacademy.org/math/geometry/hs-geo-solids/hs-geo-solids-intro/v/cylinder-volume-and-surface-area#:~:text=El%20volumen%20de%20un%20cilindro,es%202%CF%80%20r%20h%20%2B%202%CF%80%20r%C2%B2>. [Accessed: 15-Aug-2022].
- [71] “Standard Test Method for Tensile Properties of Plastics,” ASTM Standard D638, 2014.
- [72] Standard Test Method for Splitting Tensile Strength of Intact Rock Core Specimens” ASTM Standard D3967, 2016.
- [73] Xiao, Q., Liang, Y., Zhu, F. et al. Microwave-assisted one-pot synthesis of highly luminescent N-doped carbon dots for cellular imaging and multi-ion probing. *Microchim Acta* 184, 2429–2438 (2017). <https://doi.org/10.1007/s00604-017-2242-z>