



Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Ingeniería
Doctorado en Ingeniería

Obtención de un nano-biomaterial compuesto con porosidad
interconectada para su aplicación como implante en el tejido óseo

Tesis

Que como parte de los requisitos para obtener el Grado de
Doctor en Ingeniería

Presenta
José Rafael Alanis Gómez

Dirigido por:
Dr. Rodrigo Rafael Velázquez Castillo

Dr. Rodrigo Rafael Velázquez Castillo
Presidente

Dr. Eric Mauricio Rivera Muñoz
Secretario

Dr. Rufino Nava Mendoza
Vocal

Dr. Martín Alfonso Gutiérrez López
Suplente

Dr. Carlos Santiago López Cajún
Suplente

Centro Universitario, Querétaro, Qro.
Junio, 2019
México

RESUMEN

Los biomateriales a base de hidroxiapatita (HAp) son estudiados frecuentemente debido a la respuesta favorable que presentan al ser utilizados para la sustitución de tejido óseo. Para que la HAp pueda ser utilizada como reemplazo de tejido óseo humano es importante que tenga una morfología, tamaño y composición química similar a la que muestra estando presente en dicho tejido, obteniendo así una mayor probabilidad de aceptación por parte del organismo receptor. Además, el material de reemplazo óseo debe poseer propiedades mecánicas similares al tejido duro, como elasticidad, resistencia a la compresión y flexibilidad; de esta forma el individuo que ha recibido un implante de este tipo, podrá llevar a cabo actividades cotidianas comunes. Paralelamente, el material de reemplazo óseo debe ser lo suficientemente poroso para permitir que los fluidos y células encargadas de la regeneración del tejido óseo, puedan llevar a cabo su labor, permitiendo con ello el restablecimiento natural del hueso, y al mismo tiempo que se permita el paso de nutrientes necesarios para sus funciones biológicas. El presente trabajo describe la obtención de nanoestructuras de HAp con morfología controlada a través de la síntesis hidrotérmica asistida por microondas, las nanoestructuras obtenidas son sometidas a un proceso denominado gelcasting modificado con el cual se producirá una cerámica con porosidad controlada, misma que será utilizada para la elaboración posterior de un biomaterial compuesto al difundir una fase orgánica en el interior de la estructura cerámica porosa. Ambas fases generarán un material compuesto con propiedades mecánicas sinérgicas, con la elasticidad, flexibilidad y resistencia requeridas. Las muestras se analizaron por medio de difracción de rayos X de polvos (XRD), espectroscopia de dispersión de energía (EDS), fluorescencia de rayos X, microscopía electrónica de barrido de (SEM), microscopía de transmisión de alta resolución (TEM) y adsorción y desorción de nitrógeno. Así mismo a las muestras de material compuesto se les efectuó un estudio de su resistencia a la compresión por medio de una máquina universal de pruebas mecánicas.

(Palabras clave: Biomaterial, hidroxiapatita, gel casting modificado, nanotecnología)

SUMMARY

Biomaterials based on hydroxyapatite (HAp) are frequently studied because of the favorable answer presented when they are used as a bone tissue implant. The HAp used as a human bone tissue replacement material needs a morphology, dimensions and chemical composition similar to those observed in the natural bone, thereby, there is a higher probability of acceptance by the receiving organism. Furthermore, the bone replacement material should have similar mechanical properties to those existing in the hard tissue, such as elasticity, compressive strength and flexibility; thus the patient who has received an implant of this type, may do common daily activities. At the same time, the bone replacement material must possess a large enough average porous size to allow the movement of fluids and cells, which are responsible for bone tissue regeneration; so, they can carry out their work, and the natural bone restoration will take place. Moreover, the flux of nutrients necessities for the biological functions will also be enabled. This work describes the preparation of HAp nanostructures with controlled morphology through the microwave assisted hydrothermal method. The nanostructures obtained were subjected to a process so called "modified gelcasting", which was suitable to obtain a ceramic with controlled porosity. Posteriorly, the porous ceramic was used for the subsequent preparation of an organic-inorganic composite material by spreading an organic phase within the ceramic porosity. Chemical interaction between both phases, in the composite material, generated synergic mechanical properties producing the elasticity, flexibility and strength required for a bone-tissue replacement material. All samples were analyzed by X- Ray Diffraction (XRD), Energy dispersive spectroscopy (EDS), X-ray fluorescence, Scanning electron microscopy (SEM), High-resolution transmission electron microscopy and Adsorption and desorption of nitrogen. Besides, compression tests were performed to all composite material samples using a universal mechanical testing machine, and their mechanical resistance under compression was registered and compared.

(Key words: Biomaterial, Hydroxyapatite, Modified Gel-Casting, Nanotechnology)

Siempre me he sentido muy agradecido con la vida por la linda familia que tengo,
se han preocupado por mí desde que tengo uso de razón, me han educado, me
han dado su amor y me han enseñado con su ejemplo.

Muchos años después, sus enseñanzas no cesan, y aquí estoy, con un nuevo
logro, gracias a todos.

AGRADECIMIENTOS

Quiero aprovechar este espacio para agradecer a todo el grupo de trabajo que hizo posible esta investigación, pero principalmente a los pilares de este trabajo, al Dr. Rodrigo que durante todo este tiempo a sido más que un tutor, es como un padre para mí y eso se lo agradezco de corazón; y al Dr Eric que siempre mostro su disposición para darme un poco de su enorme conocimiento además siempre lo hizo con una sonrisa.

A mi comité tutorial (Dr. Rodrigo, Dr. Eric, Dr. Rufino, Dr. Alfonso y Dr. Carlos) por todo su tiempo, sabiduría y comentarios

A mis maestros de posgrado por sus valiosas enseñanzas.

Al M. en C. José Luis Cabrera Torres por su tiempo y su experiencia en los análisis de Microscopía Electrónica de Barrido y Espectroscopía de Dispersión de Energía.

Al Dr. Ventura por su apoyo con la caracterización de Microtomografía de Rayos X.

Al LUMIR que me ayudo con la interpretación de la caracterización de microtomografía

Al Dr. Jesús Arenas Alatorre por su valiosa ayuda en la obtención de las imágenes de Microscopía Electrónica de Transmisión de Alta Resolución.

Al Dr. Almanza por su apoyo con las pruebas in vivo y su experiencia en el tema.

A mis compañeros y amigos que hicieron este camino más feliz

Y al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) y al fondo de salud CONACyT-IMSS-ISSSTE-SSA 2013-1 No 201329 por su apoyo económico.

Tabla de contenido

1. INTRODUCCIÓN	14
1.1 JUSTIFICACIÓN	16
1.2 DESCRIPCIÓN DEL PROBLEMA	17
1.3 HIPÓTESIS	19
1.4 OBJETIVOS	19
1.4.1. <i>Objetivo General</i>	19
1.4.2. <i>Objetivos Específicos</i>	20
1.5 ESTRUCTURA DE LA TESIS	20
2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	21
2.1 BIOMATERIALES	21
2.1.1. <i>Matriz Extracelular (ECM)</i>	24
2.1.2. <i>Polímeros Naturales y Artificiales</i>	25
2.1.3. <i>Biocerámicos y Biocristales</i>	26
2.1.4. <i>Biocompuestos</i>	26
2.2. <i>Método de fabricación de los andamios</i>	27
2.2.1. <i>Moldeado en frío</i>	27
2.2.2. <i>Moldeo por fusión</i>	28
2.2.3. <i>Formación de red de espuma</i>	29
2.2.4. <i>Moldeado en Gel</i>	29
2.2.5. <i>Moldeado por solvente y Lixiviación del soluto</i>	29
2.2.6. <i>Prototipados Rápidos</i>	30
2.3. <i>Tejido Óseo</i>	30
2.3.1. <i>Fase Inorgánica</i>	35
2.3.2. <i>Fase Orgánica</i>	40
2.4 ESTADO DEL ARTE	41
3. METODOLOGÍA	47
3.1 SÍNTESIS DE HAP POR EL MÉTODO HIDROTERMAL ASISTIDO POR MICROONDAS	47
3.2 CARACTERIZACIÓN DE LA SÍNTESIS DE HAP	50
3.2.1. <i>Difracción de Rayos X por Polvos (DRX)</i>	50
3.2.2. <i>Espectroscopia de Dispersión de Energía (EDS)</i>	51
3.2.3. <i>Fluorescencia de Rayos X (XRF)</i>	52

3.2.4.	<i>Espectroscopía Infrarroja por Transformadas de Fourier (FTIR)</i>	54
3.2.5.	<i>Microscopia Electrónica de Barrido (SEM)</i>	55
3.2.6.	<i>Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM)</i>	56
3.3	SÍNTESIS DEL MATERIAL COMPUESTO MEDIANTE EL MÉTODO GEL CASTING MODIFICADO (MGCM)	59
3.4	CARACTERIZACIÓN DEL GEL CASTING MODIFICADO	64
3.4.1.	<i>Pruebas Mecánicas</i>	64
3.4.2.	<i>Microtomografía 3D de Rayos X</i>	65
3.4.3.	<i>Ensayos de pruebas In Vivo para evaluar la biocompatibilidad en ratas</i>	66
3.4.4.	<i>Ensayos de pruebas In Vivo para evaluar la biocompatibilidad en conejos</i>	70
4.	RESULTADOS	73
4.1.	<i>Difracción de Rayos X</i>	73
4.2.	<i>Espectroscopia de Dispersión de Energía</i>	78
4.3.	<i>Fluorescencia de Rayos X</i>	79
4.4.	<i>Espectroscopía Infrarroja con Transformada de Fourier (FTIR)</i>	80
4.5.	<i>Microscopia Electrónica de Barrido</i>	81
4.6.	<i>Microscopia Electrónica de Transmisión de Alta Resolución (HRTEM)</i>	87
4.7.	<i>Propiedades mecánicas</i>	92
4.8.	<i>Microtomografía 3D de Rayos X</i>	98
4.9.	<i>Ensayos de pruebas In Vivo para evaluar la biocompatibilidad en ratas</i>	103
4.10.	<i>Ensayos de pruebas In Vivo en conejos</i>	107
5.	CONCLUSIONES	112
6.	PERSPECTIVAS	114
	REFERENCIAS	115

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla

Tabla 2-1 Materiales para implantes óseos (Velasco y Garzón, 2010).	23
Tabla 2-2 Porcentaje en peso y volumen de los componentes de la matriz ósea (Campa, et al., 2007).	34
Tabla 4-1 Tabla del contenido promedio elemental en porcentajes en peso y atómico y de la relación Ca/P de la HAp.	78
Tabla 4-2 Tabla del contenido promedio elemental en porcentajes en peso y atómico y de la relación Ca/P de la HAp analizada por XRF.	79
Tabla 4-3 Tabla de los valores de resistencia mecánica de los materiales compuestos.	97
Tabla 4-4 Información estadística de los poros de la muestra	102
Tabla 4-5 Resultados de porosidad y permeabilidad de la muestra	103

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura

Figura 2.1 Fotografía de un disco intervertebral cortado por la parte frontal de un adulto joven, el hueso se compone en su mayor parte por hueso trabecular (Geneser 2000).	31
Figura 2.2 Fotomicrografía de un preparado por desgaste de tejido óseo compacto (Geneser, 2000).	32
Figura 2.3 Imagen de hueso donde se muestra osteoblastos activos (1a) e inactivos (1b) y osteoclastos (2) (Lee, 2013).	33
Figura 2.4 Átomo de Calcio Tipo I rodeado de 9 átomos de oxígeno en forma de prisma triangular triapuntado (izquierda) y átomo de Calcio Tipo II rodeado de 7	

átomos de oxígeno en forma de bipirámide pentagonal ideal (derecha) (Campa <i>et al.</i> , 2007).	36
Figura 2.5 Vista lateral de la malla hexagonal de oxígenos sobre una superficie cilíndrica. Los grupos OH están sobre el eje del cilindro y los Ca Tipo II (esferas blancas) están un poco desplazados del centro. Los Tetraedros de los grupos PO ₄ se unen al calcio Tipo II con dos de sus oxígenos formando parte de la malla hexagonal y los otros dos proyectados hacia fuera (Campa <i>et al.</i> , 2007).	36
Figura 2.6 Calcio Tipo II formando una malla hexagonal y unidos al PO ₄ (Campa <i>et al.</i> , 2007).	37
Figura 2.7 Vista lateral del apilamiento de Calcio Tipo I unidos a los tetraedros de PO ₄ (Campa <i>et al.</i> , 2007).	37
Figura 2.8 Imagen de fibras de colágeno en la dermis, en la parte inferior derecha se muestran fibrillas paralelas en sentido longitudinal y en la parte inferior izquierda se muestran fibrillas en sentido transversal y formando claramente una fibra de colágeno (Geneser, 2000).	40
Figura 2.9 Representación 3D del colágeno Tipo I (Campa <i>et al.</i> , 2007).	41
Figura 3.1 Fotografía del horno de microondas Synthos 3000 y del rotor XQ-80..	48
Figura 3.2 HAp sintetizada mediante el método hidrotermal asistido por microondas	50
Figura 3.3 Diagrama del Gel Casting Modificado	59
Figura 3.4 Gráfica de tratamiento térmico a las piezas de HAp	61
Figura 3.5 Diagrama de la elaboración del material compuesto al añadir la fase orgánica.....	62
Figura 3.6 Imágenes de las piezas de material compuesto orgánico-inorgánico. .	63
Figura 3.7 Muestra de un material compuesto en su montaje previo al análisis por microtomografía.	66

Figura 3.8 Rata Wistar con el dorso rasurado	67
Figura 3.9 Fotografía del objeto de estudio con una pequeña incisión en el dorso	68
Figura 3.10 Fotografía del objeto de estudio previo a la implantación de la muestra en el dorso.....	68
Figura 3.11 Material compuesto de 1.5 mm ² previo a ser implantado.....	69
Figura 3.12 Implantación del material compuesto en el dorso de la Wistar	69
Figura 3.13 Imagen del fémur del conejo en el momento en el que se realizaron las perforaciones para los implantes.....	71
Figura 3.14 Imagen del fémur del conejo posteriormente a la colocación del implante	71
Figura 3.15 Imagen del fémur del conejo posteriormente a la colocación del implante	72
Figura 3.16 Imagen de la pata del conejo una vez saturada la herida	72
Figura 4.1 Difractograma de la HAp sintética y su identificación con el PDF # 09-432	74
Figura 4.2 Difractograma de HAp comercial [Sigma Aldrich] (arriba) y sintetizada por el método hidrotérmal asistido por microondas usando Acido Glutámico como orientador.	76
Figura 4.3 Difractograma de HAp comercial de origen humano.....	77
Figura 4.4. Espectro FTIR de la HAp utilizando ácido glutámico como orientador.	80
Figura 4.5 Micrografía de SEM en la que se muestran las nano fibras de HAp obtenidas por el método hidrotérmal asistido por microondas	82
Figura 4.6 Micrografía del acercamiento a una fibra de HAp	83
Figura 4.7 Micrografía de la microfibra cubierta de nanofibras de HAp.....	83

Figura 4.8 Micrografía del material compuesto HAp-grenetina	85
Figura 4.9 Micrografía de las fibras hexagonales de HAp antes y después de agregar la fase orgánica	85
Figura 4.10 Micrografías de la HAp sintetizada por el método hidrotérmal asistido por microondas utilizando diferentes aminoácidos como orientadores del crecimiento cristalino.....	86
Figura 4.11 Micrografía de la HAp sintetizada en donde se observa su espesor homogéneo y su diámetro.....	88
Figura 4.12 Micrografía de HRTEM de una nanofibra de HAp en donde se muestra el ordenamiento cristalino. El recuadro superior derecho es una FFT de la región de la imagen dentro del recuadro y la imagen inferior derecha, es el resultado de la aplicación de un filtrado a la imagen.	91
Figura 4.13 Micrografía de HRTEM de una nanofibra de HAp mostrando su ordenamiento cristalino. En el recuadro superior derecho se presenta la FFT y por debajo, la imagen generada después del filtrado, en donde se observan los planos de la familia {100}.....	91
Figura 4.14 Gráfica típica de esfuerzo vs deformación para un material celular bajo compresión.....	93
Figura 4.15 Gráfica esfuerzo-deformación de los materiales compuestos con concentración de grenetina de 14.9% en peso.	94
Figura 4.16 Gráfica esfuerzo-deformación de los materiales compuestos con concentración de grenetina de 19.5% en peso.	95
Figura 4.17 Curvas esfuerzo-deformación para los dos tipos de materiales nanocompuestos (sintética y comercial) con 14.9% y 19.5% en peso de solución de grenetina.	96
Figura 4.18 Imagen 3D Digitalizada de la muestra del material compuesto de HAp con fibras.....	98

Figura 4.19 Submuestra del material compuesto con 600 voxeles de lado	99
Figura 4.20 Muestra del material compuesto hecho con fibras después de la aplicación de los filtros	99
Figura 4.21 (a) Matriz de la muestra de material compuesto hecho con fibras de HAp con visualización de sección interna, (b) medio poroso de la muestra.....	100
Figura 4.22 (a) muestra filtrada del material compuesto hecho de fibras, (b) poros de la muestra demarcados en azul, (c) porosidad interconectada señalada en el material compuesto.	100
Figura 4.23 a) Líneas de flujo dentro de la muestra de material compuesto hecho con fibras, en azul se observa la matriz sólida, b) líneas de flujo al interior de la muestra.	101
Figura 4.24 Muestra con matriz en azul y poros en verde, b) muestra con los poros separados, para esta muestra de material hecho con fibras, se contabilizaron 276 006 poros	102
Figura 4.25 Control negativo del músculo	104
Figura 4.26 a) Corte histológico de musculo con inflamación crónica (45 días) (presencia de células gigante tipo cuerpo extraño) producida por material compuesto con HAp sintética 14.9%. b) Acercamiento de la inflamación en el músculo.....	104
Figura 4.27 Corte histológico de musculo con inflamación crónica con presencia de células gigante tipo cuerpo extraño (45 días), producida por el material compuesto con HAp sintética 19.5%.	105
Figura 4.28 Corte histológico de musculo con inflamación crónica producida por el material compuesto con HAp sintética 14.9% pero sin presencia de células (90 días)	106

Figura 4.29 Corte histológico de musculo con inflamación crónica producida por el material compuesto con HAp sintética 19.5% pero sin presencia de células (90 días) 106

Figura 4.30 a) Fotografía del fémur de control en donde se puede observar la lesión ósea sin implante. b) Radiografía lateral del fémur en donde se observan que los bordes son más redondeados y hay crecimiento óseo alrededor. c) Fotografía ampliada de la lesión del fémur sin implante, en donde se observan que los bordes son más redondeados y hay presente crecimiento óseo alrededor. 107

Figura 4.31 a) Fotografía del fémur en donde se implanto el material compuesto formado de HAp comercial y con 19.5% de fase orgánica. b) Radiografía lateral del fémur los bordes son poco redondeados y hay un ligero crecimiento óseo alrededor. c) Fotografía ampliada de la lesión del fémur, en donde se observa la lesión y sus bordes ligeramente redondeados. 108

Figura 4.32 a) Fotografía del fémur en donde se implanto el material compuesto con HAp de nanofibras y con un contenido de 19.5% de fase orgánica. b) Radiografía lateral del fémur en donde se observan que no existe diferencia en el tejido óseo en los bordes de la lesión y hay un crecimiento óseo homogéneo. c) Fotografía ampliada de la lesión del fémur con implante, en donde se observa que sus bordes son planos y que se ha presentado un claro crecimiento óseo de las paredes del orificio hacia el centro del mismo. 111

Dirección General de Bibliotecas UNAQ

1. INTRODUCCIÓN

El tejido óseo es un tejido conjuntivo que se caracteriza por tener una matriz extracelular mineralizada. La característica que distingue el tejido óseo de los otros tejidos conjuntivos es la mineralización de su matriz, que produce un tejido muy duro capaz de proveer sostén y protección a ciertos órganos. El mineral es fosfato de calcio en la forma de cristales de hidroxiapatita (HAp) (Ross y Pawlina, 2013).

Desde hace muchos años, la obtención de HAp sintética ha sido objeto de estudio de varios investigadores; La razón principal es que la HAp es un material bioactivo y tiene una composición química similar a la del componente inorgánico de los tejidos óseos naturales (Valeri y Aleksandra, 2012).

La HAp puede ser sintetizada, por medio de diferentes rutas químicas utilizando soluciones precursoras sometidas a altas condiciones de presión y temperatura, obteniendo materiales con propiedades físicas y químicas diversas, y características morfológicas controladas, además de alta pureza, composición homogénea y tamaños de partícula nanométricos (Arami *et al.*, 2008).

Para este trabajo se usó el método hidrotermal asistido por microondas para la obtención de nanoestructuras de HAp por ser un método rápido, simple y eficaz para sintetizar materiales inorgánicos de tamaño nanométrico y en comparación con los métodos convencionales, la síntesis de HAp por microondas tiene las ventajas de un rápido crecimiento cristalino, tamaño de partícula pequeño y una distribución estrecha de tamaño de partícula debido a la nucleación rápida (Jansen, *et al.*, 1992).

En el tejido óseo humano, la HAp presenta una forma cristalina del fosfato de calcio y tiene dimensiones de unos 3 nm de espesor por 60 nm de largo (Geneser, 2000). Con la síntesis por el método hidrotermal asistido por microondas y con el uso del ácido glutámico como guía para el crecimiento cristalino, fibras hexagonales de HAp pueden ser sintetizadas (Alanis *et al.*, 2016). Una vez sintetizadas las fibras, fue necesaria la fabricación de una cerámica porosa para permitir el paso de los nutrientes y de la fase orgánica que provee la flexibilidad al material compuesto, el

método utilizado para fabricar la cerámica porosa en este trabajo fue el proceso Gelcasting modificado.

El proceso Gelcasting es una metodología en el que un monómero se añade a una suspensión de cerámica a base de agua, ahí los monómeros se polimerizan y la suspensión se consolida, lo que permite que la pieza pueda ser moldeada y al secarse, puede ser manipulada con facilidad (Janney *et al.*, 1998). A diferencia de otros procesos de fabricación de cerámicos. Este proceso tiene el potencial de mejorar la microestructura del cerámico, al reducir la cantidad de aglomerados favoreciendo su homogeneidad. El último paso de este proceso consiste en la sinterización de la muestra cerámica con el objetivo de transformarlo en un producto denso y resistente, como resultado de la unión entre las partículas adyacentes del material, sin que se llegue a la fusión total (Guo, 2011).

Existen algunas variantes de este proceso como es el caso del proceso Gel-Casting modificado, en el cual se usa una solución de polímeros para formar un gel reticulado que proporciona un mecanismo para inmovilizar permanentemente la mezcla cerámica en la forma deseada, después de que se vacía en un molde, además de añadir agentes porógenos para mayor control sobre su porosidad (Alonso *et al.*, 2017).

El material de reemplazo óseo deberá poseer una morfología, porosidad y resistencia a la compresión, muy similares al tejido óseo humano, obteniendo una mayor probabilidad de aceptación por parte del organismo receptor (Alanís *et al.*, 2016); dichas propiedades están directamente relacionadas con la composición química y la estructura que posea el biocerámico.

Esta investigación consiste en la síntesis de un bio-nanomaterial compuesto a base de HAp con diferentes cantidades de fase orgánica, la HAp que se utilizó para la síntesis fue analizada por Rayos X, Microscopía Electrónica de Barrido (SEM) y Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM) para examinar la calidad cristalina de la HAp. El método gel casting modificado fue empleado para obtener una cerámica con la forma adecuada y una porosidad lo suficientemente interconectada la cual favorecerá el flujo de sustancias y células que lleven a cabo

los procesos biológicos propios del tejido óseo humano, incluyendo su regeneración natural. A esta cerámica porosa se le introdujo una fase orgánica para obtener materiales compuestos, a los cuales se les realizaron análisis de porosidad, pruebas de compresión y de biocompatibilidad. Con lo anterior, se asegura que el material compuesto tendrá un mayor potencial para ser utilizado como implante para el tejido óseo.

1.1 Justificación

Debido a que la HAp tiene propiedades como biocompatibilidad, bioactividad, lenta degradación, osteoconducción, osteointegración y excelentes propiedades mecánicas es ideal para su uso como biomaterial, particularmente como sustituto de tejido óseo. El creciente interés en HAp es debido a su similar composición química a la del componente inorgánico del hueso humano natural. La presencia del colágeno o gretina como fase orgánica, le proporciona flexibilidad al hueso; es por eso que, aprovechando las propiedades de estos dos componentes, en este trabajo se sintetizó un compuesto orgánico-inorgánico biomimético para su uso como implante de tejido óseo.

La síntesis de materiales a través del método hidrotermal asistido por microondas ofrece las ventajas de proporcionar un calentamiento homogéneo en todo el volumen del sitio de reacción y una muy eficiente transferencia de la energía (Rivera, et al., 2010), lo que hace que se emplee una menor cantidad de ella, y por lo tanto, que el método sea más económico. Además, tiene las ventajas de un rápido crecimiento cristalino, obtención de tamaños de partícula pequeños y una distribución estrecha de dichos tamaños debido a la nucleación rápida (Jansen, et al., 1992). Asimismo, utilizando el método hidrotermal asistido por microondas es posible tener un control sobre la orientación cristalina de la HAp lo cual es deseable en este trabajo.

La demanda de biomateriales en México ha ido incrementando en los años recientes, y los materiales utilizados por el sector salud del país son

mayoritariamente de producción extranjera, lo cual los hace costosos y por ello, lejos del alcance de la mayoría de la población. Lo anterior crea un área de oportunidad para la innovación de biomateriales y principalmente, para la generación de tecnologías nacionales para la producción de dichos biomateriales, los cuales satisfagan la demanda interna del país, y de ser posible, con menores costos que los productos de importación. Un biomaterial más económico, estaría al alcance de un mayor sector de la comunidad, con lo cual se produciría un impacto favorable en la salud pública y en la sociedad en general.

1.2 Descripción del problema

La osteoporosis es una patología que afecta a los huesos y es provocada por la disminución del tejido que lo forma, tanto de las proteínas que constituyen su matriz o estructura como de los componentes minerales de calcio que contiene. Como consecuencia de ello, el hueso es menos resistente y más frágil de lo normal, tiene menos resistencia al impacto y se rompe con relativa facilidad tras un traumatismo, produciéndose fracturas o microfracturas.

De acuerdo con el estudio de Latin American Audit: Epidemiología, Costos e Impacto de la Osteoporosis 2012 de la Fundación Internacional de Osteoporosis. En México, el riesgo de sufrir una fractura de cadera a los 50 años se estima de 8,5% en las mujeres y el 3,8% en los hombres. En otras palabras, una de cada 12 mujeres y uno de cada 20 hombres mayores de 50 años sufrirán una fractura de cadera en la edad adulta (Zanchetta y MacDonald, 2012).

El costo total directo de las fracturas de cadera estimado para 2006 según la incidencia anual proyectada de las fracturas de cadera en México superó levemente los 97 millones de dólares. Este cálculo se basó en la existencia de casi 22,000 casos de fracturas de cadera, con un costo individual por evento de 4,365.50 dólares y se estima, de acuerdo al estudio de Johansson, *et al.* en 2011 que la tendencia de las fracturas de cadera irá en aumento; cabe aclarar que el estudio de las fracturas de caderas son las más estudiadas por la facilidad de recolección de

datos, pero según las estimaciones, es el segundo lugar en incidencia ya que la fractura que más se presenta en México es la de la muñeca.

Tomando en cuenta lo anterior es claro que las oportunidades de mercado para nuevos desarrollos en el área de los biomateriales son muy prometedoras, razón por la cual no sólo motiva, sino que además es necesario el desarrollo de tecnologías nacionales para la producción de biomateriales con aplicaciones en el área de la salud. La mayor parte de los biomateriales que se consumen en México son de importación.

Sin embargo, para que una cerámica de HAp funcione adecuadamente como biomaterial, debe ser lo suficientemente porosa para permitir el paso de fluidos y el suministro de nutrientes (Chu y Liu 2008), además de permitir la penetración celular y la incursión vascular rápida, lo cual podría favorecer el crecimiento de tejido óseo natural, con lo que se llevaría a cabo una regeneración del tejido óseo dañado. Así pues, el control de la porosidad a escalas meso, micro y macroscópicas es fundamental en el desarrollo de nuevas biocerámicas y sus aplicaciones.

Otro factor que favorece la aceptación del material compuesto por el cuerpo receptor es la relación Ca/P, es decir, si el material a implantar tiene una relación Ca/P similar a la de la zona dañada la biocompatibilidad se verá favorecida, por eso es necesario sintetizar HAp con relación Ca/P similar a la que se presenta en el sistema óseo.

Finalmente, para el uso de un biomaterial como implante óseo, este debe ser capaz de satisfacer las exigentes demandas mecánicas a las que puede ser sometido, ya que, al ser usado como sustituto temporal del hueso, el biomaterial deberá ser flexible, resistente a la compresión y al impacto.

1.3 Hipótesis

La incorporación de Acido Glutámico al sintetizar HAp por el método hidrotermal asistido por microondas influirá en su mecanismo de cristalización, en consecuencia, se obtendrán nanofibras de HAp con una orientación cristalina preferencial que optimizará las propiedades mecánicas de este material. Al elaborar una cerámica porosa con estas nanofibras a través del método gelcasting modificado se logrará un mayor tamaño promedio de poro, lo cual permitirá el flujo de sustancias, nutrientes y células que se encargarán de llevar a cabo el proceso de regeneración natural del tejido óseo dañado. Se generará el biomaterial compuesto al integrar la fase orgánica al material poroso, en el cual se producirá un número relevante de enlaces químicos secundarios entre ambas fases, los cuales incrementarán de forma sinérgica las propiedades mecánicas del biomaterial. Con lo anterior, el biomaterial compuesto tendrá el potencial para ser utilizado como material de implante en el sistema óseo dañado, permitiendo la recuperación y la regeneración del tejido óseo del organismo receptor, brindándole el suficiente soporte mecánico durante el tiempo de recuperación.

1.4 Objetivos

1.4.1. Objetivo General

Generar un nano-biomaterial compuesto inorgánico-orgánico, a base de nanofibras de HAp, con una porosidad de dimensiones e interconectividad suficientes para permitir el flujo de sustancias y células, y con una resistencia mecánica en compresión similar al tejido óseo, para tenga el potencial para ser implantado en el hueso dañado, y permitir su regeneración.

1.4.2. Objetivos Específicos

1. Sintetizar nanofibras de HAp en las cuales se tenga el control de la morfología y orientación de crecimiento en la dirección “C”.
2. Obtener nanofibras con una relación Ca/P similar a la presente en el tejido óseo humano.
3. Elaborar una cerámica a base de nanofibras de HAp con una porosidad de dimensiones e interconectividad adecuadas para permitir el flujo de sustancias, nutrientes y células.
4. Generar el material compuesto con la integración de la fase orgánica en la cerámica porosa y evaluar su resistencia mecánica en compresión.
5. Validar mediante pruebas “in vitro” e “in vivo” la biocompatibilidad del material compuesto que se propone.

1.5 Estructura de la tesis

En el capítulo siguiente se abordan algunos de los métodos de síntesis de HAp en los cuales se destaca el método hidrotérmal asistido por microondas; se describe también el efecto que tienen los aminoácidos en la generación de orientaciones preferenciales en la misma. Se describe también el método “gel casting” modificado que se utiliza para la obtención del material compuesto con porosidad controlada. Finalmente se abordan los estudios existentes sobre las características que debe de tener el material compuesto con respecto a la porosidad, las propiedades mecánicas, la biocompatibilidad y la relación Ca/P.

En el capítulo 3 y 4 se describe detalladamente el proceso de síntesis de la fase inorgánica, así como su moldeado para generar el material poroso a base de HAp con el método de gel casting modificado, y la introducción de la fase orgánica en el material poroso para formar el biomaterial compuesto. Finalmente se detallan los métodos de caracterización utilizados para validar el biomaterial propuesto.

En el capítulo 5 se lleva a cabo un análisis a fondo de los resultados de las diferentes técnicas de caracterización utilizadas tanto en el material compuesto como en sus componentes, y se puntualizan las conclusiones.

2. Revisión Bibliográfica

En este capítulo, como se había mencionado antes, se abordarán los diferentes métodos de síntesis de la fase inorgánica y las diferentes formas de fabricación de los andamios compuestos HAp-fase orgánica que se utilizan como biomateriales, especialmente los que son utilizados como reemplazo óseo, también se describirán generalidades del hueso y se detallará como está compuesta estructural y químicamente el sistema óseo.

2.1 Biomateriales

Los tejidos que conforman la anatomía de los animales y seres humanos pueden ser duros, como son los huesos y dientes; o suaves en los que se incluye el cartílago, tendón, el ligamento, la piel, el hígado, los músculos, los nervios entre otros. Debido a que las características de los diferentes tejidos que conforman el cuerpo varían significativamente, los biomateriales que se emplean deben ser cuidadosamente seleccionados para satisfacer las propiedades fisicoquímicas y biológicas del organismo huésped. Durante la última década, el desarrollo científico en estas áreas ha llevado al diseño y la fabricación de varios biomateriales para diferentes tipos de tejidos.

La definición más sencilla de un biomaterial es, cualquier sustancia sintética o natural que pueda ser utilizada como un sistema o una parte de un sistema, que trata, aumenta o reemplaza cualquier tejido, órgano o función del cuerpo (Williams, 1999). Más específicamente, un biomaterial es una sustancia que ha sido diseñada

para adoptar una forma que, sola o como parte de un sistema complejo, se utiliza para dirigir, mediante el control de interacciones con componentes de sistemas vivos, el curso de cualquier procedimiento terapéutico, en humanos o en la medicina veterinaria (Williams, 2009).

Cada material utilizado como biomaterial en el campo médico, ya sea para sustitución de órganos, soporte para el crecimiento del tejido o liberación de fármaco, debe tener características específicas para no estimular o causar ningún nivel de respuesta alérgica o inflamatoria al cuerpo humano. Las características que necesitan tener los biomateriales que se quieren utilizar como implante incluyen biocompatibilidad, biofuncionalidad y estabilidad química y mecánica. Además de estas características, el material debe ser esterilizable para evitar irritación, rechazo y/o problemas en el lugar del implante (Dos Santos *et al.*, 2017).

La biocompatibilidad de un biomaterial se relaciona con el organismo que acepta el cuerpo, hasta entonces una materia extraña, y lo admite como parte del conjunto y no exhibe signos de efectos nocivos en su lugar de operación. La expresión biocompatibilidad comprende diferentes propiedades de materiales, tales como no toxicidad, compatibilidad de tejidos, compatibilidad sanguínea (hemocompatibilidad) y propiedades de biofuncionalidad (Dos Santos *et al.*, 2017).

La biofuncionalidad es esencial para que el material realice las funciones para las que ha sido diseñado, en el tiempo requerido y con eficacia. La biofuncionalidad se refiere a que el material no debe degradarse por contacto con el tejido, así como también mantener su estabilidad química y mecánica a lo largo de todo el proceso (Dos Santos *et al.*, 2017). En cuanto a la respuesta del cuerpo, los biomateriales se pueden caracterizar como biotolerable, bioinerte, bioactivo y biodegradable (Hench y Wilson, 1999).

El que un material se considere biotolerante quiere decir que una vez dentro del organismo interactuará con él, encapsulándolo mediante una capa de tejido fibroso conjuntivo. Los biomateriales que son bioinertes, no causan ninguna respuesta de su huésped y esto se debe generalmente a que no producen ningún tipo de reacción química entre ambos. Se define como bioactividad a la capacidad

que tiene un material de interactuar químicamente con los tejidos del organismo y provocar una respuesta o efecto benéfico sobre el tejido vivo. La biodegradabilidad es cuando un biomaterial se descompone en los elementos químicos que la componen, por la acción de organismos vivos (Hench y Wilson, 1999).

Los biomateriales que se utilizan como andamios para tejidos óseos los podemos dividir en: Matriz Extracelular, Polímeros Naturales y Artificiales, Biocerámicas, Biocristales y Biocompuestos. La Tabla 2-1 resume los biomateriales utilizados en tejidos óseos.

Tabla 2-1 Materiales para implantes óseos (Velasco y Garzón, 2010).

Composición	Tipo	Origen	Aplicaciones clínicas	Propiedades
Fosfatos de calcio Ej.: hidroxiapatita, fosfato tricalcico, fosfato de octacalcio	Cerámico	Sintético	Regeneración ósea, de sitios sin carga mecánica, relleno de defectos óseos (cementos, gránulos, recubrimientos)	Adhesión de tejido óseo (bioactividad), biodegradable, tasa de degradación variable
Fosfatos de calcio con silicio (biovidrios)	Vidrios cerámicos	Sintético	Regeneración ósea, de sitios sin carga mecánica, relleno de defectos óseos (gránulos, recubrimientos)	Adhesión de tejido óseo (bioactividad), biodegradable
Alumina (óxido de aluminio)	Cerámico	Sintético	Reemplazo de articulaciones (rodilla, hombro)	Alta resistencia a la tensión, resistencia a la fatiga, sin adhesión de tejido óseo, alta resistencia a la fatiga, baja fricción
Titanio y sus aleaciones	Metal	Sintético	Reemplazo de hueso en sitios con carga mecánica. Prótesis dentales o de cadera, vertebras	Adhesión de tejido óseo (bioactividad) en algunos casos. Resistente a la corrosión. Alta resistencia mecánica
Acero inoxidable, aleaciones de cobalto y cromo	Metal	Sintético	Reemplazo de hueso en sitios con carga mecánica, prótesis dentales y de cadera, vértebras y fijaciones	Corrosión a largo plazo

Polimetilmetacrilato	Polímero	Sintético	Reemplazo de hueso en zonas con carga mecánica, relleno de defectos óseos (cemento óseo). Fijación de prótesis de cadera y vertebroplastia	No degradable
Poliésteres como el ácido poliláctico, ácido poliglicólico, policaprolactona y poliuretano.	Polímero	Sintético	Fijación degradable de hueso, hilo de sutura, relleno de defectos óseos, regeneración de tejido blando y liberación controlada de fármacos	La tasa de degradación y las propiedades mecánicas se pueden controlar variando su peso molecular
Poliétileno de ultra alto peso molecular	Polímero	Sintético	Componente de prótesis articulares en la zona de movimiento relativo (junta)	Capacidad de lubricación
Tereftalato de polietileno	Polímero	Sintético	Cemento y relleno de defectos óseos.	La tasa de degradación y las propiedades mecánicas se pueden controlar. Bioactivo
Poliétilenglicol	Polímero	Sintético	Excipiente en fármacos y alimentos. Reparación de tejidos duros y blandos	Gel acuoso inyectable y degradable
Coral	Mineral	Natural (animal)	Relleno de defectos óseos	Alta interconexión, biodegradable
Matriz ósea desmineralizada	Proteína	Natural (humano)	Relleno de defectos, regeneración de cartílago	Biodegradable, fuente natural de proteínas osteoinductivas (BMPs)
Colágeno	Proteína	Natural (bovino)	Reparación de tejidos duros y blandos	Biodegradable

2.1.1. Matriz Extracelular (ECM)

La naturaleza del desarrollo de un ECM durante la generación de tejidos es muy compleja. Sin embargo, su presencia es crucial para el éxito de cualquier enfoque de ingeniería de tejidos, ya que juega un papel crítico en el control o imitación de la función celular específica. Se sabe que la matriz extracelular funciona como una estructura, así como un andamio de señalización para las células. El grado en que la disposición espacial, la composición y la inmovilización de la ECM

varían depende de cada tipo de tejido. La ECM ósea, consiste principalmente en proteínas estructurales de colágeno tipo I, proteínas minerales y no colágenas de apatita tales como osteocalcina, fibronectina y vitronectina. Al diseñar ECM sintética exógena se incorpora bioactividad en el armazón introduciendo agentes bioactivos solubles, que pueden desencadenar o modular la formación de nuevos tejidos (Khang *et al.*, 2006).

2.1.2. Polímeros Naturales y Artificiales

Muchos polímeros sintéticos y naturales son utilizados como ECM generalmente como andamio para aplicaciones de ingeniería de tejidos. Los polímeros naturales son proteínas, polisacáridos colágenos, alginato, celulosa, almidón, quitosano, fibrinas, albúmina, gluten, elastina, fibroína, esclerolucano, elsinano, pectina, galactano, levano, emulsano, dextrano, pululano, entre otros. Estos polímeros naturales relativamente abundantes exhiben una notable biocompatibilidad y una respuesta inmunogénica adversa mínima. Sin embargo, aunque están comercialmente disponibles principalmente debido a la facilidad de procesamiento, éstas son caras y existen escaseces de algunos de estos polímeros naturales. También existe la probabilidad de contaminación cruzada y transmisión de virus o enfermedad durante la extracción y procesamiento enzimático a partir de tejido vegetal, animal o humano. Por el contrario, para los polímeros derivados sintéticamente, pueden controlarse fácilmente diversas propiedades fisicoquímicas, la naturaleza de los subproductos durante la polimerización, la pureza, el peso en lote, la consistencia de la composición y la ausencia de inmunogenicidad de los polímeros derivados sintéticamente (Mallick y Cox, 2013). Aunque se desarrollan andamios poliméricos para tejidos duros su mayor utilización es como andamio de tejidos blandos, como aplicaciones oftalmológicas y dispositivos de liberación de fármacos.

2.1.3. Biocerámicos y Biocristales

De todos los compuestos inorgánicos, las biocerámicas y las cerámicas derivadas del biocristales son las más utilizadas para la sustitución de los tejidos duros debido a su similitud química y cristalográfica con el mineral natural, la bioactividad, la buena biocompatibilidad y la capacidad de formar una interfaz estable con el tejido huésped. Las biocerámicas están ahora enfocadas en proporcionar un sistema de andamiaje adecuado para que las células óseas imiten las funcionalidades de biomineralización. Las biocerámicas porosas son una familia de fosfatos de calcio (hidroxiapatita y/o fluoroapatita) donde la relación Ca/P puede variar entre 1.5 y 1.67. Estos son ampliamente utilizados en la fabricación para las aplicaciones de ingeniería de tejidos como andamios porosos y revestimientos. Se ha demostrado que la HAp sintética estimula la osteoconducción y puede integrarse en el hueso sin provocar una reacción inmune y que su tamaño de poro, morfología y área superficial, son críticas para permitir la osteoconducción, el crecimiento y la transferencia de nutrientes a través del andamio (Mallick y Cox, 2013). Además la porosidad debe estar interconectada para mantener la resistencia mecánica del andamio, la penetración completa de las células y nutrientes en todo el andamio, evitando así la formación de tejido necrótico en el centro del andamio (Ducheyne y Qiu, 1999), pero el uso de biocerámicas y biocristales para aplicaciones de carga son limitadas debido a su fragilidad, su rigidez y su pobre resistencia a la compresión en comparación con el hueso humano (Mallick y Cox, 2013).

2.1.4. Biocompuestos

Los bicompuestos son materiales formados por una matriz y un refuerzo de fibras naturales. Este tipo de materiales a menudo imitan la estructura de los tejidos vivos. Generalmente la fase de la matriz está formada por polímeros naturales y sintéticos; la matriz es importante para proteger las fibras de la degradación ambiental y daño mecánico, para mantener las fibras juntas y para transferir las

cargas sobre todo el material (Mohanty *et al.*, 2005). Gran parte de la investigación actual se dedica al desarrollo de andamios compuestos por dos o más biomateriales debido a que se ha demostrado que los sistemas biocompuestos tienen grandes ventajas al combinar diversas propiedades de los biomaterial como son la biodegradación, la biocompatibilidad y la resistencia mecánica sin alterar las dimensiones para sus aplicaciones tanto en tejidos duros como blandos, cabe mencionar que esto es de vital importancia ya que el objetivo principal es el diseñar, fabricar y caracterizar andamios para su utilización como reemplazo.

2.2. Método de fabricación de los andamios

Como se mencionó anteriormente los biomateriales utilizados en el sistema óseo cumplen funciones de liberación de fármacos, relleno óseo, como andamio y como reemplazo óseo. El desarrollo de estructuras de andamios porosos para su utilización como reemplazo óseo está motivado para replicar la naturaleza del hueso natural. Dado que la porosidad está asociada a las propiedades mecánicas del biomaterial así como al transporte de nutrientes dentro del mismo, se ha dedicado mucha atención a la fabricación de andamios porosos. A continuación se describirán los métodos de fabricación de andamios porosos más comunes.

2.2.1. Moldeado en frío

El moldeado de los andamios en frío "Freeze Casting" es un método simple utilizado originalmente para producir estructuras porosas complejas de componentes cerámicos o poliméricos que utilizan agua, camfeno y glicerol principalmente como disolventes. Al someter una suspensión acuosa a un gradiente de temperatura, los cristales de hielo se nuclean en un lado de la suspensión y crecen a lo largo del gradiente de temperatura. Los cristales de hielo redistribuyen las partículas de cerámica suspendidas a medida que crecen dentro de la

suspensión, una vez finalizada la solidificación, la cerámica congelada y templada se coloca en un liofilizador para eliminar los cristales de hielo. El andamio resultante contiene macroporos anisotrópicos en una réplica de los cristales de hielo sublimados y microporos que se encuentran entre las partículas de cerámica en las paredes. Posteriormente se sinteriza a temperaturas apropiadas para proporcionar una mejor resistencia mecánica (Mallick, 2009). Aunque el rango de porosidad registrado en estos andamios es muy variable debido a que es difícil controlar la cristalización de los disolventes.

2.2.2. Moldeo por fusión

El moldeo por fusión es una forma fácil de ajustar la morfología tridimensional de los andamios de polímeros sin el uso de disolventes químicos agresivos. Muchos de los polímeros sintéticos utilizados son termoplásticos, por lo que se pueden calentar y enfriar fácilmente en varias formas sólidas. Para esta técnica de fabricación, los polímeros se calientan por encima de su temperatura de transición vítrea, por lo que pueden asumir una forma líquida. El polímero resultante se deja enfriar y se solidifica en forma de molde. El moldeo por fusión se utiliza junto con la lixiviación de partículas para introducir la porosidad en el andamio. (Oh *et al.*, 2006) (Gorth y Webster, 2011)

Pero el moldeo por fusión tiene una serie de limitaciones y desventajas. El moldeo por fusión crea capas no porosas en la superficie y probablemente deja compuestos de porógeno en el andamio, debido a la dificultad de lixiviar las partículas. Además de que el proceso de fabricación requiere altas temperaturas de operación. (Chung y Webster, 2016)

2.2.3. Formación de red de espuma

Los materiales porosos que se producen por la formación de red de espuma “Foam Reticulation” solo tienen material en los bordes de los poliedros, es decir solo la arista y no las caras del poliedro. Su síntesis es mediante la incorporación de aire en una suspensión, que se ajusta a un molde para mantener la estructura de las burbujas de aire creadas. Después se sinterizan las espumas consolidadas. Por lo tanto, la porosidad total es proporcional a la cantidad de gas incorporada en la suspensión y el tamaño de poro varía según la estabilidad de la espuma antes de que se produzca la fijación (Mucalo, 2015).

2.2.4. Moldeado en Gel

En el moldeado en gel “Gel Casting”, se crea una suspensión cerámica concentrada mezclando un polvo cerámico y una solución de monómero. Después esta suspensión se vierte en un molde para obtener la forma deseada y durante el calentamiento los monómeros se polimerizan para formar una estructura de red. Luego, para obtener la parte cerámica pura, el disolvente de la suspensión de cerámica debe ser removida por secado en el aire. Por último, se sinteriza la suspensión para obtener la densidad completa del material cerámico (Guo, 2011). El proceso puede ser rentable pero los aspectos negativos son la toxicidad aditiva, el control del proceso de secado y las difíciles reacciones de polimerización en las que se usa gel orgánico.

2.2.5. Moldeado por solvente y Lixiviación del soluto

Estos métodos se han utilizado con éxito limitado para fabricar andamios porosos y aunque pueden usarse por separado, normalmente se combinan estos dos métodos para generar el andamio poroso para tener menos problemas de

procesamiento. Los pasos a seguir cuando se utilizan ambos métodos en conjunto para la creación del andamio son: mezclar sal o azúcar en una solución polimérica, después, la mezcla se funde en un molde lo que da lugar a la evaporación del disolvente, finalmente, las partículas solubles en agua se extraen por lixiviación para producir una estructura porosa; las principales desventajas de este método son la probabilidad de retener disolvente tóxico, soluto atrapado y la desnaturalización de las proteínas, además de presentar baja resistencia mecánica (Mallick y Cox, 2013).

2.2.6. Prototipados Rápidos

Con el avance de la tecnología, se han presentado más de 20 sistemas de prototipados rápidos con respecto a la ingeniería de tejidos duros. Los métodos más notables son la estereolitografía, el sinterizado selectivo por láser, el modelado de deposición, la impresión de cera y el bioplotador (Mallick y Cox, 2013). La mayoría de estas impresiones 3D consisten en poner una capa del material a implantar y después fundir la parte superior, ya sea por láser, calor o CO₂ para después poner la siguiente capa. Estos métodos permiten un control preciso de la arquitectura del andamio, tamaño, forma, interconectividad, ramificación, geometría y orientación, además de no incluir disolventes orgánicos tóxicos. Sin embargo, estos métodos son muy costosos, consumen mucho tiempo porque los andamios son construidos capa por capa y las impresiones son personalizadas lo que significa tiempo de diseño computacional y sobre todo depende mucho de la disponibilidad de biomateriales con morfologías exactas.

2.3. Tejido Óseo

Es importante describir generalidades del tejido óseo debido a que el biomaterial sintetizado en esta tesis será utilizado como reemplazo óseo. El tejido óseo representa la parte principal del esqueleto. Desde el punto de vista tecnológico

es único debido a la gran dureza y fortaleza que posee y con un peso relativamente ligero. A pesar de su dureza y resistencia, el tejido óseo posee cierta elasticidad, propiedades que lo hacen especialmente apto como material esquelético (Geneser, 2000). El tejido óseo es un tejido conjuntivo que se caracteriza por tener una matriz extracelular mineralizada. La característica que distingue el tejido óseo de los otros tejidos conjuntivos es la mineralización de su matriz, que produce un tejido muy duro capaz de proveer sostén y protección. El mineral es fosfato de calcio en la forma de cristales de HAp ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) (Ross y Pawlina, 2013).

Desde el punto de vista macroscópico, el tejido óseo se organiza en los huesos de dos formas diferentes. El tejido óseo esponjoso o hueso trabecular (Figura 2.1) que está compuesto de delgadas espículas de tejido óseo, las trabéculas, que se entrecruzan en diferentes direcciones y forman un reticulado esponjoso, cuyos espacios huecos intercomunicantes están ocupados por médula ósea y vasos sanguíneos (Geneser, 2000) (Ross y Pawlina, 2013). Por el contrario, el tejido óseo compacto o hueso cortical (Figura 2.2), forma a simple vista, una masa compacta sin espacios visibles (Geneser, 2000).



Figura 2.1 Fotografía de un disco intervertebral cortado por la parte frontal de un adulto joven, el hueso se compone en su mayor parte por hueso trabecular (Geneser 2000).

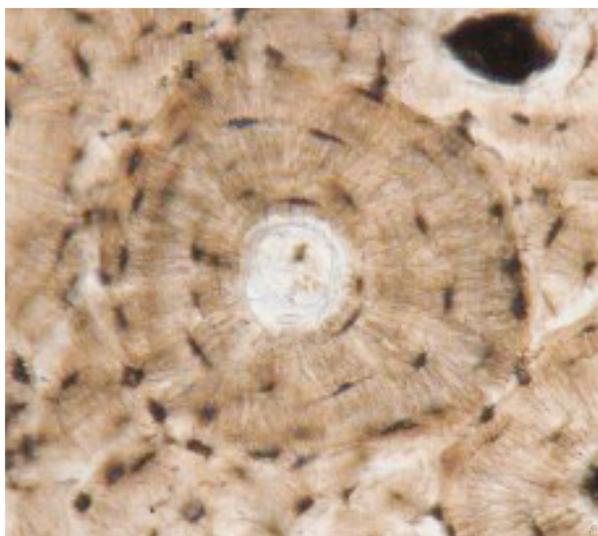


Figura 2.2 Fotomicrografía de un preparado por desgaste de tejido óseo compacto (Geneser, 2000).

Todos los huesos se componen de tejido óseo cortical y trabecular, aunque en cantidad y distribución muy variables de ambos tipos; en la matriz ósea hay espacios llamados osteoplastos (Figura 2.3), en los cuales interactúan la célula osteoprogenitora que es una célula en reposo que puede transformarse en un osteoblasto y secretar matriz ósea, el osteoblasto es la célula osteoformadora diferenciada que secreta matriz ósea y los osteoclastos que son células de resorción ósea presentes en las superficies óseas en las que el hueso se está eliminando, remodelando o donde el hueso ha sido lesionado (Ross y Pawlina, 2013).

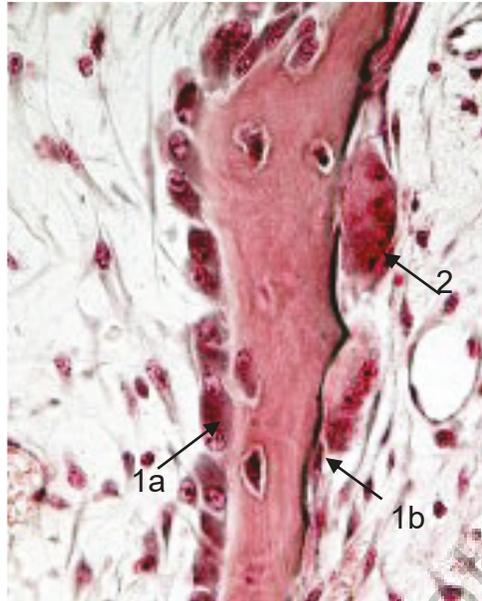


Figura 2.3 Imagen de hueso donde se muestra osteoblastos activos (1a) e inactivos (1b) y osteoclastos (2) (Lee, 2013).

A todos los niveles de organización de los huesos, desde su forma macroscópica hasta su estructura submicroscópica, el modo de estar constituidos les asegura la máxima resistencia con la mayor economía del material y el peso mínimo. A pesar de su fuerza y dureza el hueso es un material vivo y dinámico que está siendo renovado continuamente y que experimenta una permanente reconstrucción durante la vida del individuo (Fawcett, 1995).

Además el hueso debe ser capaz de desempeñar las siguientes funciones básicas (Tortora y Derrickson, 2006):

1. **Sostén.** El esqueleto es la estructura del organismo que da sostén a los tejidos blandos y provee los puntos de inserción para los tendones de la mayoría de los músculos esqueléticos.
2. **Protección.** El esqueleto protege de las lesiones a los órganos internos más importantes.
3. **Asistencia en el movimiento.** La mayoría de los músculos esqueléticos se fijan a los huesos para producir el movimiento.
4. **Homeostasis mineral.** El tejido óseo almacena diversos minerales, especialmente calcio y fósforo, lo cual contribuye a la solidez del hueso. Los

huesos liberan hacia la sangre los minerales necesarios para mantener su equilibrio y distribuirlos a otras partes del organismo.

5. Producción de células sanguíneas. Dentro de algunos huesos, un tejido conectivo denominado médula ósea roja produce glóbulos rojos, glóbulos blancos y plaquetas, proceso llamado hemopoyesis.
6. Almacenamiento de triglicéridos. La médula ósea amarilla está constituida principalmente por adipocitos, los cuales almacenan triglicéridos.

Desde el punto de vista de la Ciencia e ingeniería de Materiales, el tejido óseo es considerado un biomaterial compuesto orgánico-inorgánico. La porción inorgánica de la matriz ósea (aproximadamente el 65% del peso seco) está compuesta de calcio, fosfato, bicarbonato, citrato, magnesio, potasio y sodio. Presente principalmente en cristales de HAp. La porción orgánica de la matriz ósea (aproximadamente el 35% del peso seco) consiste principalmente en colágeno tipo I (95%) y una contribución menor del colágeno tipo V.

La estructura del tejido óseo varía dependiendo de su localización en el cuerpo. La selección del biomaterial apropiado depende del sitio anatómico en el cual se requiera el implante (Gartner *et al.*, 2014). A continuación se muestra una tabla que desglosa el porcentaje en peso y volumen de los componentes de la matriz ósea (Tabla 2-2).

Tabla 2-2 Porcentaje en peso y volumen de los componentes de la matriz ósea (Campa, et al., 2007).

	Componente	% Peso	% Volumen
Mineral	Hidroxiapatita, $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{OH}$ ($\approx 80\%$)	70	45
	Carbonatos de Calcio ($\approx 15\%$)		
	Otras Sales Minerales ($\approx 5\%$)		
Orgánico	Colágena Tipo 1 ($\approx 90\%$)	20	33
	Glicoproteínas		
	Osteonectina		
	Osteocalcina		
Agua	Agua	10	22

2.3.1. Fase Inorgánica

La fase inorgánica está conformada por una forma cristalina del fosfato de calcio, la HAp. Las funciones del mineral son fortalecer el compuesto de colágeno, proporcionando más resistencia mecánica al tejido y también servir como una fuente de iones de calcio, fosfato y magnesio para la homeostasis mineral (Robey y Boskey, 2009). La HAp está compuesta esencialmente por fósforo y calcio, con una relación Ca/P elemental promedio de 1.67. Aunque puede considerarse como HAp cuando tiene una relación Ca/P en el rango de 1.5 a 1.8 (Driessens *et al.*, 2002).

La HAp se encuentra en la naturaleza formando parte de rocas metamórficas y, en tejidos vivos, la HAp están organizados en diferentes grupos animales como los corales marinos, exoesqueletos de estrellas de mar y en vertebrados principalmente bovinos y porcinos se encuentra en sus esqueletos y en el esmalte y dentina de sus dientes. Es importante mencionar que la HAp contiene porcentajes mínimos de sodio, cloro, carbonatos y magnesio los cuales pueden variar dependiendo el lugar de procedencia (García y Reyes, 2006).

En el sistema óseo humano la fase inorgánica la forman cristales de HAp de una dimensión de unos 3 nm de espesor por 60 nm de largo (Geneser, 2000), que se disponen en relación estrecha con las fibras de colágeno. Estos cristales de HAp están ordenados sobre colágeno tipo I, mientras que la superficie libre de estos cristales está rodeada de sustancia amorfa fundamental lo que atrae agua y forma una superficie hidratada que permite intercambio de iones con el líquido extracelular (Fortoul, 2013).

La HAp sintética presenta dos tipos de estructura cristalina, la hexagonal que se presenta a una temperatura menor a los 212°C y monoclinica que se presenta superior a esta temperatura (Prakasam, *et al.*, 2015). La estructura consiste en una matriz de tetraedros de fosfato (PO₄) mantenidos juntos por iones de Ca enlazados entre ellos (Figura 2.5). Los iones de Calcio (Ca) se presentan de dos maneras, exactamente alineados como columna (Ca tipo I) y en triángulos

equiláteros (Ca tipo II) centrados en el eje de una columna (Figura 2.6). Mientras que los OH se encuentran en el eje de la columna (Ma y Liu, 2009). En la definición de la estructura hexagonal de la HAp se menciona la existencia de dos tipos de Ca en la Figura 2.4 se muestra la estructura de los Ca. Además, en la Figura 2.7 se muestra una vista lateral del apilamiento de los Calcio Tipo I unidos al PO₄ y al Calcio Tipo II.



Figura 2.4 Átomo de Calcio Tipo I rodeado de 9 átomos de oxígeno en forma de prisma triangular triapuntado (izquierda) y átomo de Calcio Tipo II rodeado de 7 átomos de oxígeno en forma de bipirámide pentagonal ideal (derecha) (Campa *et al.*, 2007).

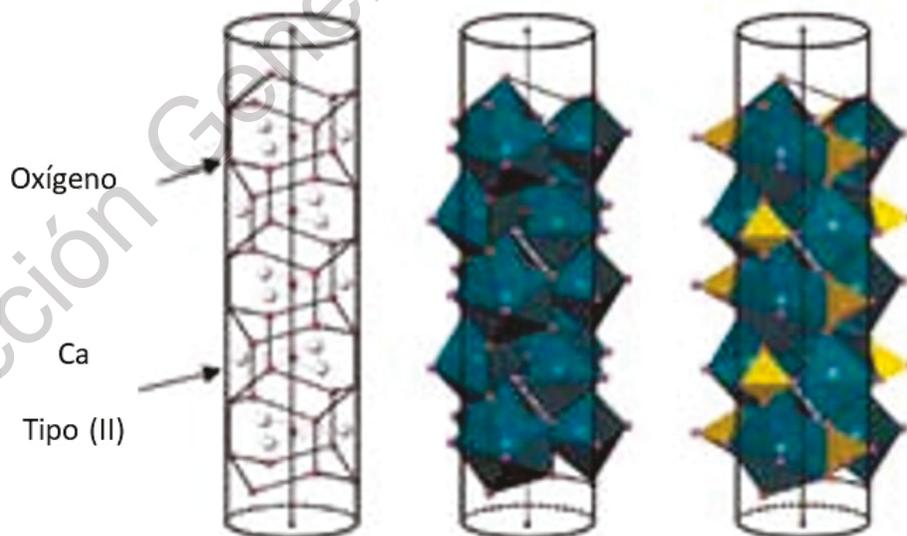


Figura 2.5 Vista lateral de la malla hexagonal de oxígenos sobre una superficie cilíndrica. Los grupos OH están sobre el eje del cilindro y los Ca Tipo II (esferas blancas) están un poco desplazados del centro. Los Tetraedros de los grupos PO₄ se unen al calcio Tipo II con dos

de sus oxígenos formando parte de la malla hexagonal y los otros dos proyectados hacia fuera (Campa *et al.*, 2007).

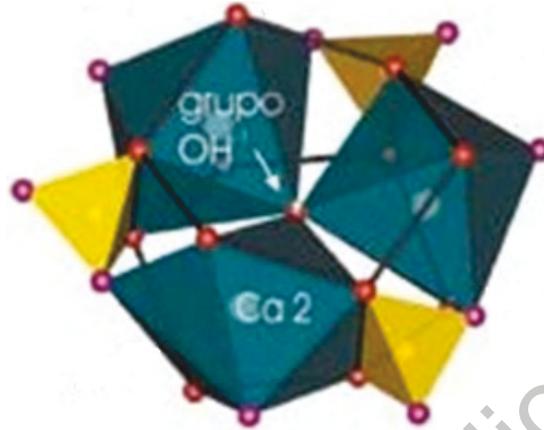


Figura 2.6 Calcios Tipo II formando una malla hexagonal y unidos al PO₄ (Campa *et al.*, 2007).

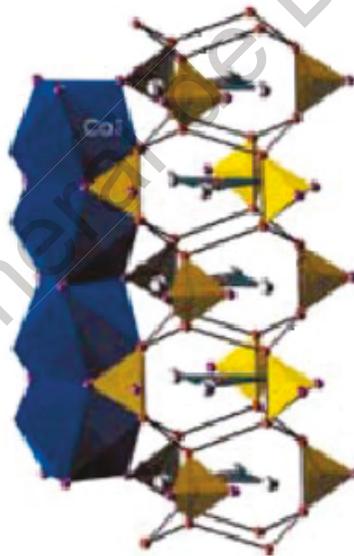


Figura 2.7 Vista lateral del apilamiento de Calcios Tipo I unidos a los tetraedros de PO₄ (Campa *et al.*, 2007).

Como se mencionó anteriormente la HAp también se puede presentar en la fase cristalina monoclinica. La mayor diferencia entre la HAp monoclinica y el HAp hexagonal es la orientación de los grupos OH. En la HAp monoclinica, todos los OH en una columna dada están apuntando en la misma dirección, mientras que

en la HAp hexagonal se intercala la orientación del hidrógeno hacia arriba y hacia abajo (Ma y Liu, 2009).

También existen pequeñas variaciones químicas de Fosfatos de Calcio que se utilizan como biomaterial, estas a diferencia de la HAp, presenta una forma cristalina Romboidal, Monoclínica y Triclínica; los Fosfatos de Calcio presentan menor densidad que la HAp lo que se ve reflejado en menor resistencia mecánica (Prakasam, *et al.*, 2015).

La HAp se puede sintetizar por diferentes métodos, que se pueden dividir en métodos secos, métodos húmedos y métodos de energía alterna.

La preparación de HAp por métodos secos consiste en un tratamiento térmico a precursores finamente triturados. El requisito esencial para el método de la ruta en seco es tener una mezcla que sea perfectamente homogénea. La pureza del producto final puede ser afectada por el peso de la preparación; además requiere altas temperaturas lo que afecta la resistencia mecánica (Fihri *et al.*, 2017).

En cuanto a los métodos húmedos, son muy utilizados porque permiten un perfecto control sobre la estructura, textura y morfología, y conducen a un alto rendimiento de HAp. El inconveniente de estos métodos es que a veces dan lugar a estructuras que no son cristalográficamente puras; otras fases de Fosfatos están presentes con HAp (Fihri *et al.*, 2017). Los métodos húmedos más utilizados son el método hidrotermal y el método Sol-Gel.

En el método hidrotermal, la reacción se lleva a cabo en presencia de agua a una temperatura y presión relativamente altas. Los reactivos se calientan en un sistema sellado en el que la mezcla reaccionante se presuriza a medida que se calienta continuamente; pero como se mencionó anteriormente con este método se obtienen otras fases de Fosfatos de Calcio. El método Sol-Gel permite la formación de cristales de HAp en condiciones de baja temperatura y presión debido a la alta reactividad de los reactivos. Pero además de obtener otras fases de Fosfato de Calcio, la principal desventaja del método Sol-Gel es el tiempo, que es excesivamente largo (Zakaria *et al.*, 2013).

Los métodos de energía alterna a menudo se combinan con otros métodos convencionales para crear una sinergia entre las diferentes técnicas para aumentar el rendimiento. Los métodos de este tipo más utilizados son el método de molienda “Ball-Milling” y los métodos asistidos por microondas.

El método de Ball-Milling ha sido utilizado para sintetizar HAP con ventajas como la simplicidad, la reproducibilidad, y la producción a gran escala de HAP. El control del crecimiento de HAP mediante esta técnica depende estrechamente del tipo de reactivos utilizados, del medio de molienda, del diámetro de las bolas de molienda, del tipo de atmósfera y de la duración de las etapas de molienda (Fihri *et al.*, 2017).

La síntesis de materiales a través de métodos asistidos por microondas ofrecen las ventajas de proporcionar un calentamiento homogéneo durante todo el volumen y una muy eficiente transformación de energía (Rivera *et al.*, 2010). La HAP sintetizada por este método es particularmente homogénea en términos de tamaño, porosidad y morfología (Fihri *et al.*, 2017). Además tiene las ventajas de un rápido crecimiento, tamaño de partícula pequeño y la distribución estrecha de tamaño de partícula debido a la rápida nucleación (Jansen *et al.*, 1992).

Los dos factores principales que contribuyen a que la síntesis sea homogénea en términos de energía y temperatura son: la agitación molecular causada por la inversión del dipolo con las alternancias extremadamente rápidas del campo eléctrico y segundo las interacciones dipolo-dipolo que suceden entre las moléculas polares y el campo eléctrico (Fihri *et al.*, 2017).

A pesar de las grandes ventajas que trae consigo el uso de microondas en el proceso hidrotermal convencional aún se sigue trabajando para tratar de controlar la orientación del crecimiento cristalino, actualmente se utilizan algunos aminoácidos como promotores del crecimiento y orientación cristalina, la función que los aminoácidos realizan es inhibir o favorecer el crecimiento de la HAP en determinada dirección, mediante un anclaje realizado con sus cargas netas y los átomos de Ca^{2+} . (Vallet, 2011)

2.3.2. Fase Orgánica

La matriz orgánica es la encargada de proporcionar flexibilidad al sistema óseo y está formada por fibras de colágeno (Figura 2.8) que representa aproximadamente el 90% de la matriz, mientras que el resto de la matriz orgánica está conformada por proteínas no colágenas que son indispensables para el desarrollo, crecimiento y reparación del hueso (Campa *et al.*, 2007). El bloque básico de la red de fibra de la matriz ósea es el colágeno Tipo I, que es una molécula de triple helicoidal que contiene dos cadenas α (1) idénticas y una cadena α (2), estructuralmente similar pero genéticamente diferente (Figura 2.9) (Robey y Boskey, 2009) y tiene una secuencia de aminoácidos, aproximadamente mil cincuenta residuos de aminoácidos han sido reportados en el colágeno, donde los aminoácidos principales de la cadena son la glicina, la prolina y la hidroxiprolina (Ramachandran, G.N. y Ramakrishnan, 1976).

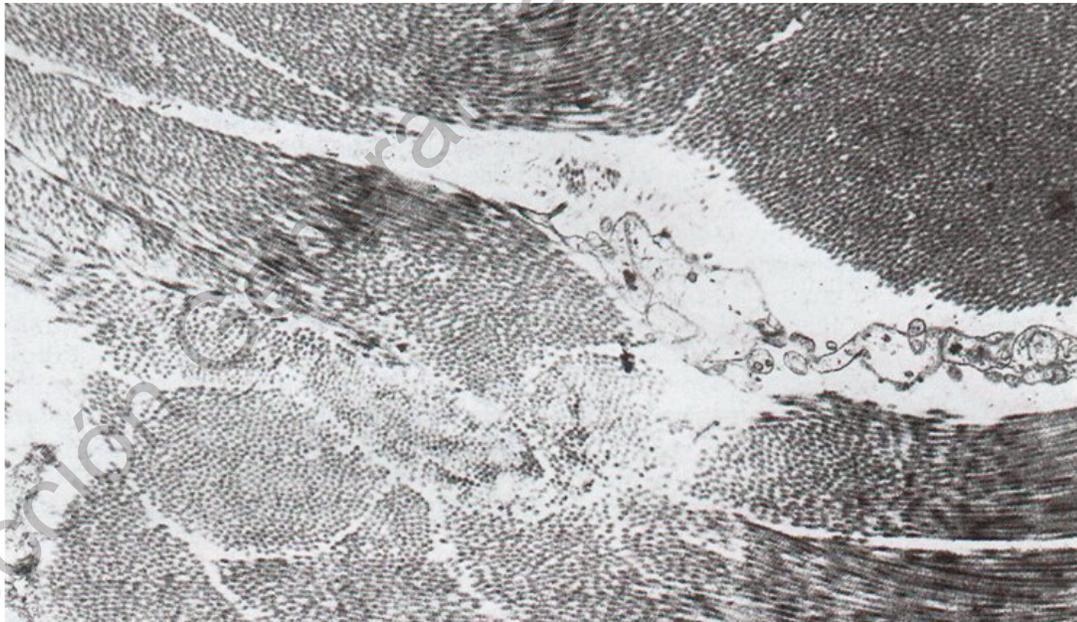


Figura 2.8 Imagen de fibras de colágeno en la dermis, en la parte inferior derecha se muestran fibrillas paralelas en sentido longitudinal y en la parte inferior izquierda se muestran fibrillas en sentido transversal y formando claramente una fibra de colágeno (Geneser, 2000).

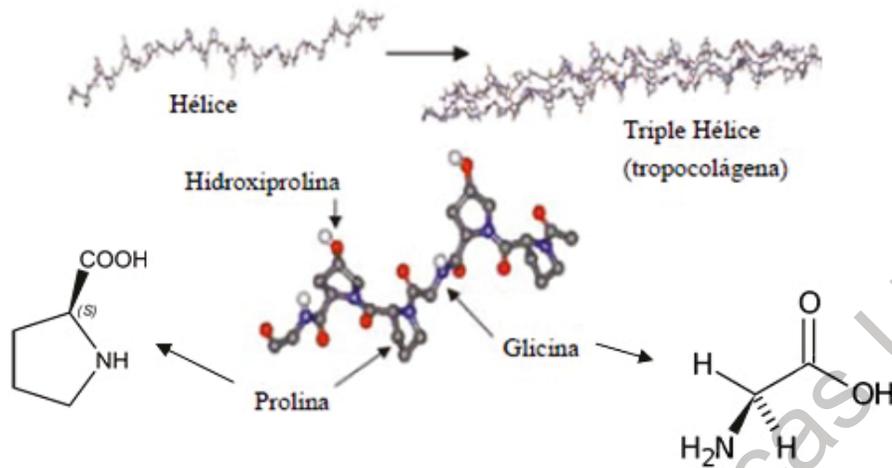


Figura 2.9 Representación 3D del colágeno Tipo I (Campa *et al.*, 2007).

La matriz orgánica como ya se mencionó consiste principalmente en colágeno tipo I; sin embargo, trazas de colágenos Tipos III, V y fibrillas asociadas con colágeno pueden estar presentes durante ciertas etapas de formación ósea y pueden regular el diámetro de las fibras de colágeno Tipo I (Robey y Boskey, 2009).

Las proteínas no colágenas constituyen el 10% de las proteínas totales del hueso y sus funciones son muy importante pues son las encargadas de la calcificación del hueso, retienen el agua y los iones necesarios para el hueso, son los encargados de coordinar el intercambio celular y mineral en el hueso y ayuda la estructura, el crecimiento y el tamaño de las fibras de colágeno (Robey y Boskey, 2009).

2.4 Estado del arte

A continuación se describe detalladamente algunos de las formas en las que se están sintetizando estos materiales compuestos en la actualidad y debido a que la HAp es la fase inorgánica más utilizada como reemplazo óseo también se abordaran las técnicas de síntesis de HAp más importantes en la actualidad.

Los andamios para reemplazo óseo están siendo desarrollados y estudiados por todo el mundo pero principalmente en China donde los grupos de trabajo como los de Zhang, Liu y Lin que están desarrollando diferentes tipos de síntesis de andamios con diferentes tipos de fases orgánicas y dopándolas para tener mejores propiedades mecánicas. Aunque gran parte de las investigaciones se están desarrollando en China también cabe destacar grupos de trabajo como el de Fikai en Rumania o el de Mucalo en Nueva Zelanda, y aunque muchos trabajos han sido desarrollados, aún se está trabajando para poder obtener un material de reemplazo óseo que sea aceptado por el cuerpo y que tenga propiedades parecidas a las del hueso en cuanto a propiedades mecánicas, osteodegradación y osteoregeneración.

En 2014 en China, Zeng y colaboradores sintetizaron HAp con mesoporos de una manera aceptablemente controlada para utilizarlo como andamio, la forma en la que sintetizo fue agregando micelas a la mezcla de Fosfato de Potasio, que posteriormente reaccionaron con los Cloruro de Calcio para formar la HAp, las micelas tenían en el centro 1,3,5 Trimetil benceno e iban unidas al Bromuro de Cetil, Trimetil Amonio donde la parte hidrófoba forma el centro de la micela y la parte hidrofílica forma el exterior para provocar que la unión con la HAp, cabe mencionar que la mezcla fue sometida a ultrasonificación para lograr la completa disolución de los reactivos; para la remoción de las micelas y la formación los poros, la mezcla se sometió a reflujo durante dos días a 120°C, luego se dejó enfriar a temperatura ambiente, se lavó con alcohol y agua y se centrifugo para obtener el precipitado (HAp), finalmente se calcinó para remover cualquier residuo. Por este método es posible obtener una porosidad interconectada con un tamaño de poro controlable lo cual es deseable, aunque también es un método muy costoso en tiempo y recursos.

Los materiales compuestos de HAp con colágeno son los más utilizados como andamios en la ingeniería de tejidos óseos debido a su excelente propiedad osteoconductor. Se ha demostrado que el andamiaje compuesto de estos dos materiales naturales es muy prometedor gracias a las propiedades del colágeno que aumenta la tenacidad a la fractura y disminuye la rigidez de la HAp, mientras que la adición de HAp a la matriz de colágeno mejora la estabilidad mecánica del andamio

en condiciones tanto secas como húmedas, y acelera la osteogénesis (Wang y Liu, 2014).

La manera de fabricar materiales compuestos de HAp/colágeno es muy diversa; en 2014 Wang y Liu fabricaron un andamio de este tipo usando el método de mineralización de colágeno in situ modificado. La mineralización in situ del colágeno se basó en la solución de Hidróxido de Calcio y Fosfatos en presencia de colágeno Tipo 1 de tendón de bovino. La reacción se realizó en un reactor de microondas con temperatura mantenida a 90 °C. Después de la reacción, la suspensión se incubó durante 5 días a 37 °C, luego se desgasificó y se centrifugó para obtener el compuesto de HAp/colágeno. Finalmente se congeló a -20°C durante 24 horas y se liofilizó para obtener los andamios porosos.

La gelatina es otra de las fases orgánicas que son de las más importantes y estudiadas para la ingeniería de tejidos óseos debido a que la gelatina es una sustancia translúcida y sólida derivada del colágeno de diversos subproductos animales. Es por eso que, en 2011 se sintetizaron una serie de materiales compuestos con HAp y gelatina a diferentes concentraciones, la dilución de la gelatina fue realizada mediante el método de irradiación ultrasónica de baja potencia asistido térmicamente. El material compuesto se preparó usando Nitrato de Calcio y Fosfato Ácido de Potasio en presencia de la solución acuosa de gelatina. Los productos sintetizados se trataron térmicamente entre 100 y 400°C y se obtuvieron propiedades favorables en materia de biocompatibilidad para la utilización como reemplazo óseo (Brundavanam *et al.*, 2011).

Referente a esto, nuestro grupo de trabajo publicó (Alonso *et al.*, 2017) la síntesis de dos tipos de materiales compuestos a base de HAp y como fase orgánica colágeno tipo I y gelatina en diferentes concentraciones, el método utilizado para la fabricación del andamio fue el de Gel Casting modificado, el material compuesto sintético demostró tener una porosidad interconectada lo cual es deseable en este tipo de materiales y además logro tener una resistencia mecánica a la compresión superior a la que se presenta en el tejido óseo trabecular, además de lo antes

mencionadas, el método de fabricación ocupa mucho menos energía y la fabricación del material es más rápida que otros métodos de fabricación de andamios porosos.

También hemos sintetizado materiales compuestos por este método utilizando HAp sintética, el método hidrotermal asistido por microondas es el utilizado en la actualidad para obtener nanofibras hexagonales con una notable cristalinidad y una morfología bien definida (Alanis *et al.*, 2016) (Mendez *et al.*, 2017). Es importante mencionar que este tipo de fibras hexagonales, no ha sido reportado en otros trabajos y menos con esa cristalinidad. Esto se lo podemos atribuir al método utilizado y a la adición de aminoácidos específicamente el Acido glutámico que ha demostrado ser un inhibidor el crecimiento de la hidroxiapatita en algunas direcciones acoplándose a las moléculas de hidroxiapatita en la etapa de nucleación dando como resultado nanofibras de HAp altamente cristalinas con una orientación preferencial deseada.

Otra fase orgánica de origen natural que se utiliza mucho para fabricar andamios compuestos en la actualidad es el Quitosano. En 2014 se publicó un trabajo de Zhang y colaboradores, donde se sintetizó un material compuesto de HAp y Quitosano, dicho material fue sintetizado al mezclar Cloruro de Calcio y Fosfato de Potasio en Ácido Acético, una vez sintetizados se agregaron polvos de Quitosano, a esta mezcla se le aplico un tratamiento de liofilización para quitar los posibles restos de ácido ("Freeze Casting"). Los resultados mostrados en materia de biocompatibilidad fueron buenos ya que mostraron tener un promedio de adhesión y de actividad de Fosfatos alcalinos de los osteoblastos superior a andamios puros de HAp, además de no ser tóxicos y tener buena citocompatibilidad, actualmente los materiales compuestos de HAp y Quitosano están siendo dopados de nano partículas de metales como son Cobre, Zinc y Plata para mejorar sus propiedades mecánicas, también se ha utilizado Óxido de Grafeno o algunos polímeros como la Pectina con el mismo fin (Venkatesan y Kim, 2014).

Hablando de polímeros sintéticos, la Poli(ϵ -caprolactona) se ha utilizado como fase orgánica para formar junto con HAp materiales compuestos, en 2014 Mkhabela y Sinha publicaron que sus materiales compuestos sintetizados utilizando

la Poli(ϵ -caprolactona) presentaron buena biodegradación, bioactividad y buenas propiedades mecánicas. En general la mayoría de los autores que han sintetizado materiales compuestos de HAp/Poli(ϵ -caprolactona) utilizan el método de "Freeze Casting" o algún método de Rápido Prototipo para generar su andamio los cuales permiten la fabricación de andamios con porosidad interconectada pero ocupan mucho tiempo de fabricación. También el Polihidroxitirato es un polímero sintético utilizado como fase orgánica para generar un material compuesto, este material compuesto, a comparación con el que utiliza Poli(ϵ -caprolactona) como fase orgánica, se fabrica utilizando el método de "Electro Spinning" donde se utilizan campos eléctricos para formar fibras de aproximadamente 2.5 μ m de largo, sus propiedades más destacadas son su interconectividad y su osteoconductividad (Lu *et al.*, 2013).

Por otro lado los recubrimientos y/o películas que se utilizan como andamios o implantes se pueden dividir en inorgánicos, orgánicos e híbridos (Wu *et al.*, 2014). Donde los materiales inorgánicos que se utilizan como recubrimiento son minerales cerámicos de Fosfato de Calcio, el candidato principal es la HAp; generalmente estos recubrimientos se fabrican dopando HAp a una red metálica, debido a que por sí sola la HAp carece de resistencia mecánica, la red metálica más utilizada es la de titanio, cabe mencionar que debido a las propiedades de la HAp es posible que el material osteoregenere aunque la red metálica al no ser biodegradable seguirá en el lugar implantado (Hirota *et al.*, 2012).

Las proteínas como son la elastina, colágeno, fibronectina, gelatina, alginato entre otras se utilizan como recubrimientos orgánicos principalmente en metales como el titanio; los métodos utilizados para la unión de la fase orgánica al metal son: reticulado, fotopolimerización y anclajes químicos. Aunque por lo general se utilizan metales también se pueden utilizar polímeros como por ejemplo, en 2013 Wojak y colaboradores utilizaron Poli(L-lactido-co-glicolido) recubierto por colágeno y Glicosaminoglicanos como material candidato para implantar y además de ser un material biocompatible demostró tener un depósito mineral importante para la regeneración ósea. La fotopolimerización es poco utilizado como método de recubrimiento aunque, en 2011 Li y colaboradores explican que para la

fotopolimerización se utiliza un recubrimiento en gel, ellos utilizaron Dimetildecilamonio Quitosano con injerto Poli(Etilen Glicol) Metacrilato (DMDC-Q-g-EM), y se mezcló con un fotoiniciador, en ese caso utilizaron el (2-Hydroxy-1-[4-(2-hydroxyethoxy) phenyl]-2-methyl-1-propanone) o como comercialmente lo llaman Irgacure 2959, esta mezcla aplicada al material que se va a recubrir se irradia con luz ultravioleta por 15 minutos, este recubrimiento tiene excelente biocompatibilidad, además de tener una buena adhesión y puede ser reutilizable.

El anclaje químico es el método más utilizado como recubrimiento orgánico para biomateriales, los agentes químicos varían dependiendo del material a recubrir, el más utilizado el titanio. Rechenmacher y colaboradores en 2013 describieron que el método de anclaje debe adherirse o generar enlaces con el material a recubrir y además anclarse a la integrina, glicoproteínas que mandan las señales del crecimiento celular (Lodish, 2008), los Fosfonatos como se describe en el artículo sirven muy bien como anclaje entre el Titanio y la integrina.

Los recubrimientos compuestos de biomoléculas y HAp son los revestimientos híbridos más comunes, y pueden dar a los implantes, múltiples funciones biológicas o una eficiencia mucho mayor, como una mejor inductividad ósea, buen comportamiento antibacteriano, deseable rigidez superficial, así como una mayor adsorción de proteínas (Liu *et al.*, 2014) (Wu *et al.* 2014). Recientemente se ha demostrado que a pesar de que los materiales recubiertos de HAp y proteínas presentan buena resistencia mecánica y biocompatibilidad, si se les agrega Grafeno presentan una mejora considerable en dichas propiedades y en la conductividad eléctrica lo que es deseable para utilizarse como reemplazo óseo (Fabbri *et al.*, 2013).

En resumen, como reemplazo óseo lo más utilizado son los andamios compuestos de HAp y diferentes fases orgánicas, en las que destacan aquellas de origen natural como lo son el colágeno, la gelatina y el Quitosano. Actualmente el método que más se utiliza para generar el andamio poroso es el "Freeze Casting" o los métodos de rápido prototipo, los cuales son costosos y tardan en promedio de dos a seis días para los fabricados por "Freeze Casting" y tres días más el tiempo

de diseño de la pieza en los métodos de rápido prototipo, en general estos materiales compuestos presentan muy buena biocompatibilidad; recientemente se está experimentado dopando los material compuesto con Grafeno y diversas nano partículas de metales para mejorar las propiedades mecánicas. Por otro lado los materiales con recubrimiento también siguen siendo investigados principalmente los híbridos de fase orgánica-inorgánica debido a su buena aceptación por el órgano receptor, su biocompatibilidad y sus propiedades mecánicas, la desventaja que presenta es su poca flexibilidad es decir que pueden llegar a ser muy rígidos y que el material recubierto no es degradable por lo cual permanecerá en el organismo huésped.

3. METODOLOGÍA

3.1 Síntesis de HAp por el método hidrotermal asistido por microondas

La síntesis de compuestos inorgánicos utilizando microondas crea posibilidades completamente nuevas. Debido a que las microondas transfieren energía directamente a especies reactivas, el llamado "calentamiento molecular". Las microondas también brindan la opción de realizar "reacciones frías". La energía se aplica directamente a los reactivos, sin embargo, mediante el uso de enfriamiento simultáneo el calentamiento se minimiza y esto permite reacciones mejoradas de moléculas sensibles al calor, ya que las temperaturas son lo suficientemente bajas como para eliminar la degradación térmica (Hayes, 2002).

El momento dipolo de las moléculas que están presentes en la mezcla de reacción, interactúa con el campo eléctrico de las microondas y trata de alinearse con él, pero como el campo eléctrico rota del orden de 5×10^9 veces cada segundo, el momento dipolo de las moléculas no tiene suficiente tiempo para alinearse; por ello, la energía se pierde en forma de calor mediante fricciones moleculares y pérdidas dieléctricas, lo que lleva a un aumento rápido de la temperatura. Debido a que el proceso no depende de la conductividad térmica de los materiales del recipiente, el resultado es un calentamiento localizado instantáneo de cualquier

reactivo que reaccione a la “rotación dipolar” o a la “conducción iónica”, que son los dos mecanismos fundamentales para transferir energía por microondas a la sustancia (Hayes, 2002).

Rotación dipolar: Las moléculas con una estructura dipolar oscilan en un campo de microondas fluctuante. Esta oscilación genera un movimiento molecular que da como resultado la fricción y, por lo tanto, el calor.

Conducción iónica: El campo eléctrico genera movimiento iónico debido a que las moléculas intentan orientarse hacia un campo que cambia rápidamente, lo que genera calor (Kremsner y Stadler, 2013).

El método hidrotermal asistido por microondas utilizado para la síntesis de HAp, consiste en promover la formación de la misma a partir de disoluciones acuosas a una temperatura interna alrededor de 170°C. Para alcanzar tal temperatura sin permitir la evaporación del solvente, la presión también es elevada y controlada; así, la temperatura de ebullición del solvente aumenta con el incremento de la presión (propiedad coligativa). La síntesis de la HAp se llevó a cabo en el horno de microondas Synthos 3000 de Anton Paar utilizando el rotor XQ-80 en viales de cuarzo (Figura 3.1).

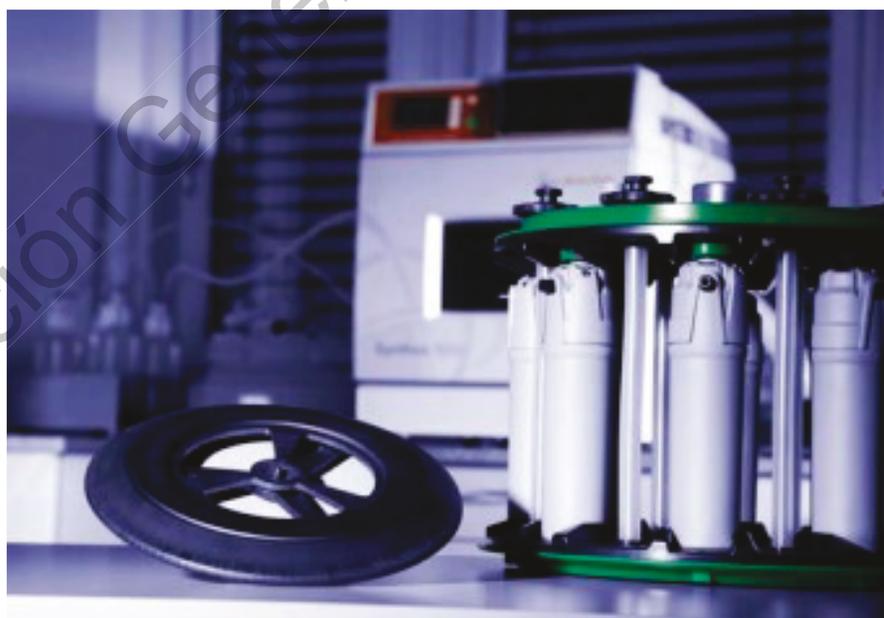


Figura 3.1 Fotografía del horno de microondas Synthos 3000 y del rotor XQ-80

El procedimiento de síntesis por el método hidrotermal asistido por microondas se desarrolló de la siguiente manera:

Primero se preparó una disolución de Ácido Glutámico [$C_5H_9NO_4 \cdot H_2O$] (J.T. Baker FW 147.13) y Nitrato de Calcio Tetrahidratado [$Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$] (Golden Bell FW 236.16) en 200 ml de Agua Desionizada, calentada y agitada. Por otro lado, se preparó una disolución de Fosfato de Potasio Monobásico [KH_2PO_4] (Mallinckrodt Chemicals FW 136.09) junto con Hidróxido de Potasio [KOH] (SIGMA-ALDRICH 221473) en 200 ml de agua desionizada, calentada y agitada vigorosamente. Una vez obtenidas ambas disoluciones, se mezclaron bajo las mismas condiciones de temperatura y agitación.

Posteriormente se llenaron y se prepararon los viales con la disolución resultante para luego calentarlo en el horno de microondas con las siguientes condiciones de reacción: temperatura interna de $170^{\circ}C$, con un tiempo de rampa temperatura de 10 minutos, un tiempo de reacción de 45 minutos y un tiempo de enfriamiento de 10 minutos.

Para el llenado de los viales fue necesario mantenerlos en forma vertical y agregarles la disolución, sin pasar el límite de volumen permitido. Se abrieron las tapas de los viales cuidadosamente con el dispositivo para el sellado y se abrió el tornillo de ventilación, después se colocó la tapa sellando el vial a presión. Finalmente se cerró el tornillo de ventilación y se introdujo en el rotor XQ-80.

Después de la síntesis por microondas, la HAp quedó depositada en el fondo de los viales con una apariencia de polvo blanco, se filtró este precipitado y se lavó repetidas veces con Isopropanol y agua, luego se llevó al desecador por un día y finalmente se recolectó el producto (Figura 3.2).



Figura 3.2 HAp sintetizada mediante el método hidrotérmal asistido por microondas

3.2 Caracterización de la síntesis de HAp

3.2.1. Difracción de Rayos X por Polvos (DRX)

La Difracción de Rayos X por polvos es una técnica ampliamente utilizada para la identificación de las fases cristalinas presentes en las muestras y para determinar variables cristalinas como parámetros de red, tamaño de cristalito y orientación preferencial de los cristales. Esta técnica consiste en hacer incidir un haz de Rayos X monocromático, con una longitud de onda entre 0.5 a 2 Å, este haz es difractado por los planos cristalinos de la muestra, de acuerdo con la ley de Bragg (Ecuación 3.1).

$$2d \sin \theta = n\lambda \quad (3.1)$$

Donde d es la distancia entre los planos que forman a la fase cristalina, λ es la longitud de onda de los fotones incidentes y θ es el ángulo de incidencia.

Cuando las ondas de los Rayos X inciden sobre los cristales, la nube electrónica de los átomos que forman a la estructura cristalina, las dispersan en todas direcciones siguiendo el principio de Huygens; posteriormente, estas ondas

interfieren constructivamente y dan lugar a nuevas ondas con una dirección diferente a las ondas incidentes. Al variar el ángulo de incidencia de los Rayos X sobre el cristal, se colectan aquellos haces producidos por la difracción y que lograron satisfacer la ley de Bragg y las ecuaciones de von Laue, generándose así, un difractograma, el cual es una gráfica de intensidad versus el ángulo 2θ , el cual es característico de cada fase cristalina (como una huella digital).

Para identificar los componentes cristalinos contenidos en el producto final, todas las muestras obtenidas de las reacciones de síntesis se analizaron por medio del difractómetro D8 Advance fabricado por Bruker. Las condiciones de operación en el equipo fueron 30 kV de voltaje de aceleración y una corriente de 30 mA con radiación Cu K α (longitud de onda de $\lambda = 1.54 \text{ \AA}$). Todos los experimentos de difracción se realizaron desde 10° a 90° en una escala de 2θ con un tamaño de paso de 0.05° . Adicionalmente, como referencia se analizaron muestras de HAp comercial [Sigma Aldrich].

No se requirió la preparación previa de la muestra, todas las muestras se colocaron dentro de un porta-muestra hecho de polímero acrílico y no se realizó ningún proceso de molienda. La decisión de no moler la muestra fue para tener la posibilidad de determinar una potencial orientación cristalográfica preferencial en las nanoestructuras de HAp. Finalmente, la fase cristalina se comparó con el banco de archivos de difracción por polvo (PDF de sus siglas en inglés) proporcionado por el Centro Internacional de Datos de Difracción (ICDD de sus siglas en inglés).

3.2.2. Espectroscopia de Dispersión de Energía (EDS)

La detección de rayos X emitidos por una muestra permite realizar análisis para determinar la composición elemental de la misma. Estos análisis pueden ser cualitativos o incluso cuantitativos, y si se forma una imagen de la muestra con estos rayos X emitidos, se puede obtener la distribución de los diferentes elementos

constitutivos en el volumen de la muestra de estudio, y estimar cuantitativamente la abundancia de cierto elemento.

Para producir los rayos X característicos, la muestra es bombardeada con electrones primarios provenientes del filamento de un microscopio electrónico, los cuales tienen la energía suficiente para expulsar electrones de las capas internas de los átomos que forman a la muestra, dejando vacancias también conocidos como pares electrón-hueco. Estos huecos son atractivos para los electrones de niveles energéticos superiores, los cuales pueden experimentar la atracción del núcleo atómico y pueden “decaer” para cubrir la vacancia, los más probables, son los electrones del nivel energético inmediato superior. Al llevarse a cabo este decaimiento, el electrón que ocupará la vacante tiene que liberar su energía “excedente” y lo hace emitiendo un fotón de rayos X, el cual es característico del elemento debido a la diferencia de energía entre los orbitales de transición del electrón y al núcleo atómico con el que están interactuando. Este fotón impacta sobre la superficie de un detector produciendo una diferencia de potencial. La señal se aumenta mediante un amplificador lineal y luego se pasa a un analizador multicanal donde los datos se muestran como un histograma de intensidad versus energía. Es importante mencionar que el pulso de voltaje producido es proporcional a la energía del fotón de rayos X entrante (Hafner, 2006).

El procedimiento para analizar las muestras de HAp fue el siguiente: Se adhirió la muestra de HAp a un porta-muestras hecho de latón, utilizando cinta de carbón para fijarla. La muestra se analizó por medio de un EDS (poner marca del equipo usado), unido a un microscopio electrónico de barrido marca JEOL modelo JSM-6390 LV, y se empleó un voltaje de aceleración de 20 kV.

3.2.3. Fluorescencia de Rayos X (XRF)

El análisis de fluorescencia de rayos X (XRF) es una poderosa herramienta analítica para la determinación espectroquímica de casi todos los elementos

presentes en una muestra. La radiación característica se produce cuando fotones de energía suficientemente alta, emitidos por una fuente de rayos X, inciden sobre un material. Estos rayos X primarios experimentan procesos de interacción con los átomos de la muestra. Los fotones de alta energía inducen la ionización de los electrones de orbitales interiores por el efecto fotoeléctrico y así se crean vacantes de electrones en las capas internas (K, L, M,...). La rápida transición de los electrones del orbital inmediato de mayor energía hacia estas vacantes causa la emisión de rayos X característicos.

El principio de funcionamiento del análisis XRF es la medición de la longitud de onda o la energía y la intensidad de los fotones característicos emitidos por la muestra. Esto permite la identificación de los elementos presentes en la muestra y la determinación de su concentración en por ciento atómico o por ciento. Toda la información del análisis se concentra en el espectro obtenido, que es una gráfica de intensidad versus energía en donde aparecen las señales de las emisiones características de cada uno de los elementos presentes en la muestra. La posición de las señales indica la energía de los fotones emitidos, y por ende, de los elementos presentes. La altura de la señal es un indicio de la abundancia (concentración) de el elemento en cuestión, aunque también hay que mencionar que el número atómico también influye en la emisión de fotones, siendo los elementos de mayor número atómico los que más emiten. Otros procesos de interacción, principalmente la dispersión elástica e inelástica de la radiación primaria en la muestra y el sustrato, inducen en el fondo (Janssens, 2003).

En principio, el análisis XRF es una técnica analítica de elementos múltiples y, en particular, la determinación secuencial y simultánea de todos los elementos detectables presentes en la muestra es intrínsecamente posible por la longitud de onda dispersiva.

Esta técnica analítica también fue utilizada para llevar a cabo un análisis elemental de las muestras de HAp. Los principios físicos en los que se fundamenta esta técnica de caracterización, son similares a los del EDS. Sus capacidades de análisis se deben en gran parte al principio fundamental de que cada elemento tiene

una estructura atómica única, la cual genera fotones de rayos X con longitudes de onda específicos; estos fotones se registran y cuantifican y con ello se produce el mencionado espectro de emisión de rayos X (Goldstein, J. I., 2003).

Para este proyecto, se realizó el análisis de las muestras dispersadas en 1 ml de Alcohol Isopropílico y se añadió Hierro como estándar interno. Las condiciones de operación en el equipo Bruker S2 Picofox, fueron de un voltaje de 50 kV y una radiación de Potasio-Molibdeno para generar la excitación.

3.2.4. Espectroscopía Infrarroja por Transformadas de Fourier (FTIR)

En la espectroscopía infrarroja se estudia la interacción de las ondas electromagnéticas, en el intervalo del infrarrojo, con la materia. La energía que aportan las ondas es absorbida por las moléculas provocando un cambio en la frecuencia en la que vibran sus enlaces. Una molécula absorberá la energía de un haz de luz infrarroja cuando dicha energía incidente sea igual a la necesaria para que se provoque una transición vibracional en alguno de los enlaces de la molécula. Este enlace absorberá esa radiación y se traducirá en un aumento en la distancia media del enlace, haciendo que ambos átomos se alejen más uno del otro, es decir, los átomos vibren a una distancia promedio mayor a la distancia de enlace, lo que se traduce en que el enlace ha pasado entonces a otro estado de alta energía que está cuantizado, conocido como estado excitado.

Como resultado de un análisis de infrarrojo se obtiene un gráfico (espectro) de números de onda contra intensidad donde las bandas que aparecen están asociadas a los grupos funcionales presentes en la muestra que se analiza. Apoyándose de patrones espectrales existentes, es posible establecer los tipos de enlaces presentes en una muestra. La amplitud de las bandas está determinada por las interacciones químicas del segmento de la molécula o grupo funcional que presenta vibraciones en determinada longitud de onda, cuando hay varias interacciones químicas el pico resultante es amplio. Si hay pocas interacciones

químicas, el pico será agudo y la intensidad estará directamente relacionada con la concentración, a mayor concentración más intenso es el pico.

Para este análisis se utilizó un espectrofotómetro Brucker, Vectro 33 a 16 barridos. El análisis se realizó colocando las muestras previamente molidas directamente en el detector, presionando el polvo mediante un tornillo especial; la limpieza entre análisis se realizó con alcohol etílico.

3.2.5. Microscopia Electrónica de Barrido (SEM)

En un microscopio electrónico de barrido (SEM), la emisión de electrones es producida por un filamento (tungsteno o LaB_6), ya sea por acción termoiónica o por la presencia de un campo eléctrico intenso. Estos electrones son atraídos por la cápsula de Wehnelt y posteriormente son colectados y enfocados por lentes condensadoras, las cuales controlan el tamaño de la sección transversal del haz (spot size). La lente objetiva enfoca el haz sobre la superficie de la muestra y una bobina deflectora, se encarga de hacer oscilar el haz y que éste barra la superficie de la muestra. El haz incide momentáneamente sobre un punto de la superficie de la muestra y diferentes radiaciones son producidas (electrones secundarios, retrodispersados, rayos X, etc.). Los electrones secundarios o retrodispersados son los más utilizados para formar imágenes, éstos son registrados por un detector y la imagen de la muestra se construye recibiendo los electrones emitidos punto por punto. Para ello, se sincroniza la oscilación del haz con la oscilación de un tubo de rayos catódicos, el cual produce la imagen de la superficie de la muestra irradiada en una pantalla de TV. Otras radiaciones útiles para hacer análisis en el SEM son los rayos X característicos, los electrones Auger y fotones de diversas energías.

El SEM construye indirectamente un patrón o mapa que puede interpretarse como una imagen del objeto. La interpretación de la "imagen" SEM es promovida por muchos otros atributos que contribuyen a la visibilidad,

particularmente la resolución, el contraste, la profundidad de foco, la morfología, la iluminación aparente y el aspecto tridimensional (Rochow, 1978).

Para la observación de las muestras en el microscopio electrónico de barrido es necesario fijarlas en un porta muestras cilíndrico metálico (Cobre, latón aluminio, etc.), previamente pulido y limpio, utilizando cinta adhesiva de doble cara o pintura de carbón o aluminio. En la presente investigación, las observaciones se realizaron en un microscopio electrónico de barrido marca JEOL modelo JSM-6390L, utilizando un voltaje de aceleración de 20 kV y formando las imágenes con electrones secundarios.

3.2.6. Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM)

En un TEM, el haz de electrones también es producido por un filamento, de forma similar a lo descrito para el SEM, pero los electrones emitidos tienen una mayor energía. Típicamente un TEM contiene tres conjuntos de lentes con muchas posibles variantes en la configuración de las mismas. Los conjuntos se denominan respectivamente lentes condensadoras, lentes objetivas y lentes de proyección. Las lentes condensadoras se encargan de la formación inicial del haz tras la emisión de los electrones, lo condensan hasta formar la sección transversal más pequeña posible. Las lentes objetivas focalizan el haz sobre la muestra y finalmente las lentes de proyección se encargan de expandir el haz transmitido (que cruzo el espesor de la muestra) hacia la pantalla de visualización.

Para evitar que los electrones primarios interactúen con átomos de gas en su trayectoria hacia la muestra y así conseguir el flujo ininterrumpido de los mismos y de esta forma evitar que ellos aporten información parasita a la observación de la muestra, el TEM debe operar a bajas presiones, típicamente en el orden de 10^{-4} a 10^{-8} Pa, lo cual puede ser una limitación de la técnica debido a que algunos materiales no resisten las condiciones de alto vacío y tampoco el impacto de electrones de alta energía. La necesidad de un alto vacío ya se mencionó

anteriormente, y los electrones de alta energía tienen un impacto directo en la resolución del equipo. Un electrón describe una longitud de onda durante su movimiento, la cual será más corta cuando aumente la energía del electrón. Una longitud de onda más pequeña permitirá la observación de objetos y detalles más pequeños de la muestra. Por ello, entre más energía tengan los electrones, la calidad de las imágenes formadas en el TEM será mayor, pero con su respectivo costo tecnológico.

Para microscopía electrónica de transmisión, se requiere de una muestra lo suficientemente delgada para que los electrones puedan pasar a través de la misma. La capacidad para dispersar a los electrones por un átomo, se incrementa con el número atómico, ya que una nube electrónica con mayor densidad interactúa más con los electrones primarios producido por el microscopio. Por ello, si la muestra está formada por elementos pesados, el espesor de la muestra tendrá que ser menor. Esta necesidad de muestras delgadas puede ser otra limitante de la técnica, ya que no es fácil lograr esos espesores en algunos materiales, y en otros, el proceso para obtenerlos puede causar daños en la muestra, o bien, alterar su microestructura original.

Cuando la muestra ya tiene el espesor suficiente, se monta en una rejilla de cobre de 3mm de diámetro, la cual es recubierta por una película de polímero, en la mayoría de las veces por colodión, y para hacer que la rejilla recubierta vuelva a tener capacidad para conducir a los electrones, se coloca sobre ella una película delgada de carbón, aluminio u oro. Los electrones inciden sobre la muestra y para formar la imagen, se utilizan aquellos que lograron pasar a través de la misma. Algunos electrones pasan por el espesor de la muestra con una interacción nula o casi nula sin cambiar su dirección, y otros más son desviados de su trayectoria original (difractados), y todos ellos generan un patrón de difracción, que puede ser transformado directamente en imagen mediante las lentes magnéticas, ambas técnicas ofrecen información relevante de la muestra. El patrón de difracción es una proyección bidimensional de la red recíproca, la cual, a su vez, es generada por la

estructura cristalina de los componentes de la muestra, y a través de él, es posible analizar a detalle dicho arreglo cristalino. A su vez, la imagen se forma al transformar el espacio recíproco a espacio real, por medio de las lentes magnéticas, para poder observar los detalles de la microestructura de la muestra, El poder de resolución depende de la longitud de onda de los electrones y de la calidad de las lentes objetivas. En las mejores condiciones con aparatos de buena calidad, se puede obtener una resolución de aproximadamente 1.5 Å.

Las imágenes se pueden producir al coleccionar todos los electrones transmitidos y difractados, y con ellos formar la imagen de la muestra (campo claro). También, se puede seleccionar uno o más haces difractados, y a partir de esos electrones formar la imagen (campo oscuro), la cual, tiene la característica de un fondo oscuro y en la imagen, las zonas más brillantes serán de aquellas zonas de la muestra en donde se encuentran los planos cristalinos que produjeron los haces de electrones que fueron seleccionados. Hay que tener en cuenta el espesor de la muestra y de las condiciones de focalización. Microcristales muy delgados son los ideales (espesor < 500 Å) y es recomendable registrar varias imágenes con diferentes condiciones de focalización para tener una buena observación de la muestra.

En nuestro estudio, para la preparación de la muestra, ésta se secó y después, una pequeña cantidad de material fue colocado en una rejilla de cobre preparada con una película de colodión y una delgada capa de carbón. Dichas observaciones se llevaron a cabo utilizando un JEOL JEM-2100F, usando 120 kV de voltaje de aceleración, y las imágenes se formaron en campo claro convencional.

3.3 Síntesis del material compuesto mediante el método Gel Casting Modificado (MGCM)

El MGCM tiene la ventaja de la formación rápida de un gel y además, pueden producirse piezas de tamaño, forma y porosidad controlada (Alonso *et al.*, 2017). El biomaterial compuesto, hecho a base de las fibras de HAp, se sintetizó por el método Gel Casting Modificado. El diagrama de flujo del procedimiento se describe en la Figura 3.3

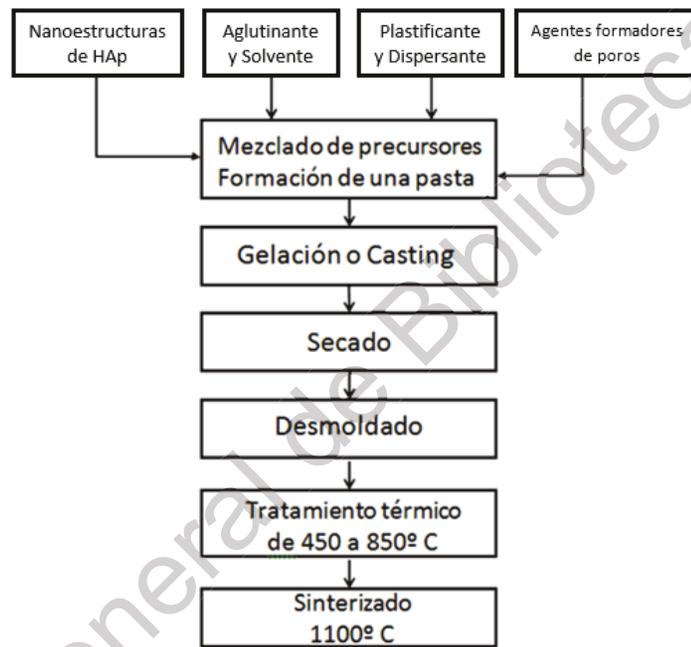


Figura 3.3 Diagrama del Gel Casting Modificado

Las fibras hexagonales de HAp, sintetizadas previamente por el método hidrotermal asistido por microondas, constituyen la fase inorgánica del material compuesto y con ellas se prepara una pasta cerámica, la cual es moldeada por el método de Gel Casting Modificado, y con ella se forman piezas de cerámica porosa. Esta porosidad es necesaria para permitir la posterior introducción de la fase orgánica que es la que le confiere la flexibilidad al material compuesto, es por esta razón que se necesitan agentes formadores de poros para elaborar la pasta cerámica. El Ácido Oxálico es un aminoácido que tiene un bajo punto de fusión, es fácilmente solubilizado por el etanol, es biodegradable, no reacciona con los demás

compuestos utilizados en el MGCM y además al tratarse térmicamente genera dióxido de Carbono (CO₂), cuyas burbujas harán la formación de microporos. Las microesferas de Polimetilmetacrilato (PMMA), son ideales para la formación de macroporos debido a su fácil combustión y formación de gases, principalmente CO₂; además, tienen alta compatibilidad con los tejidos humanos.

El solvente a utilizar debe ser capaz de disolver a los polímeros que se van a utilizar, pero sin reaccionar con los polvos cerámicos, así como evaporarse a temperaturas relativamente bajas, el Etanol es un solvente que cumple con estas características además de ser biodegradable. Los aglutinantes confieren resistencia mecánica a las piezas cerámicas, para que puedan ser fácilmente removidas del molde, almacenadas y trabajadas sin romperse. Conforme el solvente se evapora, se forma un polímero entrecruzado por la presencia del polivinil butiral (PVB) y el polietilen glicol (PEG), y se forma un sistema entrelazado que le da la resistencia mecánica necesaria a las piezas de cerámica.

También debe utilizarse un dispersante para prevenir la aglomeración de los productos sólidos y mantener la pasta cerámica manejable y estable durante todo el proceso, disminuyendo la viscosidad de la suspensión. El Ácido Poliacrílico (APA) es una resina adhesiva que su principal aplicación es como agente dispersante. El PEG también es utilizado en las piezas cerámicas para cumplir funciones de plastificante, aglutinante y lubricante. Para lubricar se utilizan PEG de bajo peso molecular, mientras que para plastificar se usa el PEG de alto peso molecular. Se utiliza el PEG porque no es tóxico es biodegradable y cumple sus funciones de lubricar y plastificar muy bien en cerámicos y la HAp es uno de ellos.

Para la preparación del cerámico se llevaron a cabo los siguientes pasos:

1. Se mezcla Etanol de J.T Baker (Solvente) con PVB de la marca ACROS con peso molecular de 36 000 (Aglutinante) el cual es agregado lentamente a temperatura ambiente hasta obtener una solución homogénea.
2. Por otro lado, se funde PEG de la marca FLUKA con peso molecular de 6000 (Plastificante) y a continuación se añade el APA de FLUKA (Dispersante) y se pone en agitación hasta que se disuelva.

3. La mezcla de polvos está conformada por HAp sintética, con Ácido Oxálico y microesferas de PMMA que se añaden lentamente.
4. Posteriormente se mezcla la solución del paso 1 con la solución del paso 2 hasta que queden mezcladas por completo ambas fases. Esta solución (paso 4) es añadida a la mezcla del paso 3.
5. Después se rellenan los moldes (previamente preparados) plenamente con la pasta cerámica resultante del paso 4. Debe comprimirse la pasta utilizando una espátula para asegurar el completo llenado del molde.
6. Se dejan secar las muestras en el molde a temperatura ambiente hasta que se evapore el etanol.
7. Finalmente se desmoldan las piezas

Una vez desmoldadas las piezas cerámicas es necesario hacerles un tratamiento térmico que elimine los polímeros y demás sustancias orgánicas, el tratamiento térmico se lleva a cabo en la mufla con un incremento de temperatura a razón de $1^{\circ}\text{C}/\text{min}$ hasta una temperatura de 1100°C temperatura y tiempo suficiente para eliminar los polímeros por completo, una vez alcanzado esta temperatura (1100°C) se mantiene calentando por 2 horas para lograr el sinterizado del material (Figura 3.4), finalmente se deja enfriar la muestra a temperatura ambiente.

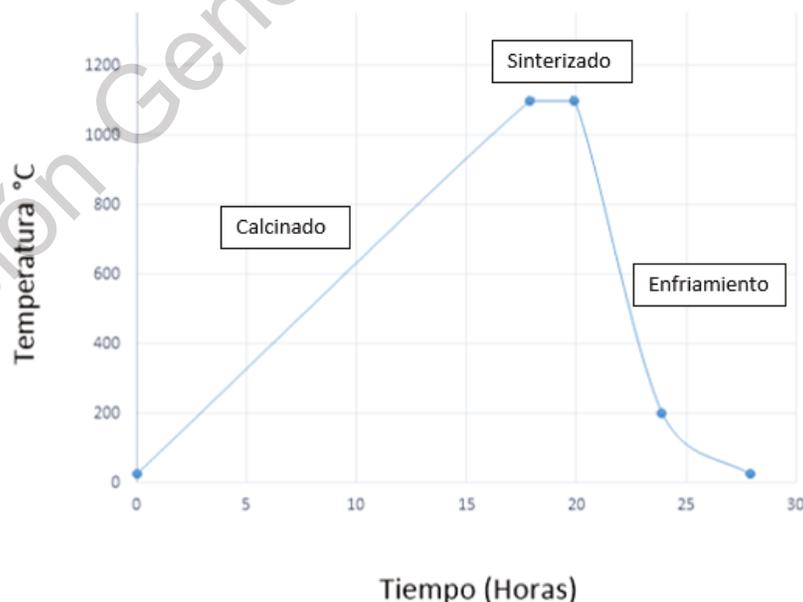


Figura 3.4 Gráfica de tratamiento térmico a las piezas de HAp

Ya que se obtienen las piezas cerámicas sinterizadas de HAp, se les agrega la fase orgánica para obtener finalmente el material compuesto orgánico-inorgánico. Para esta última etapa del método de elaboración del material compuesto, se lleva a cabo la adición de la fase orgánica, siguiendo el siguiente procedimiento:

1. A las piezas cerámicas se les añade la fase orgánica, en este caso grenetina en dos diferentes concentraciones (14.9 % o 19.5 %) para el refuerzo de la matriz cerámica. Para la solución de la proteína se disuelven las cantidades antes mencionadas por separado en 50 mL de agua desionizada a una temperatura de 80 °C, se mantiene la solución con agitación magnética y se determina su viscosidad, la cual debe tener valores de 3.92 y 4.1 centipoise respectivamente.
2. Agregar la solución de proteína a la cerámica porosa por el método de goteo o por el método de inmersión.
3. Dejar secar a temperatura ambiente.
4. Una vez que se obtiene el material compuesto, se eliminan los excesos de grenetina de las piezas cerámicas y por último estas piezas se someten a un proceso de desbaste para ajustarlas a la forma y las dimensiones necesarias.

La última etapa del método de elaboración del material compuesto se resume en el siguiente diagrama

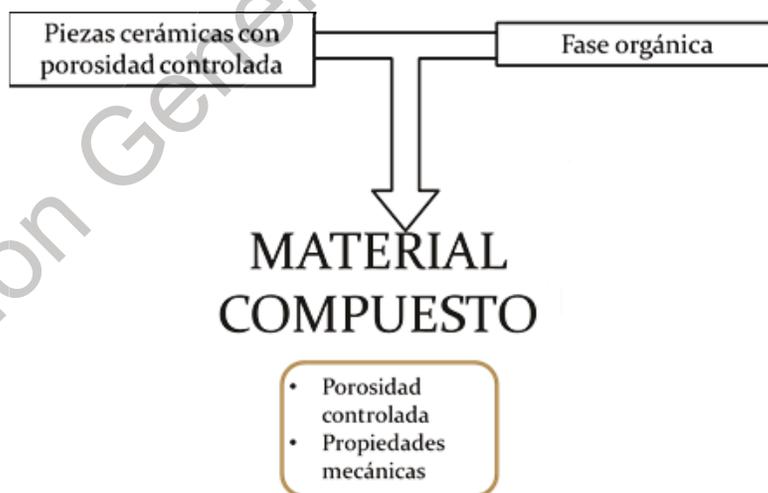


Figura 3.5 Diagrama de la elaboración del material compuesto al añadir la fase orgánica.

El resultado final se puede observar en la Figura 3.6 que muestra las fotografías de las piezas de material compuesto orgánico-inorgánico.

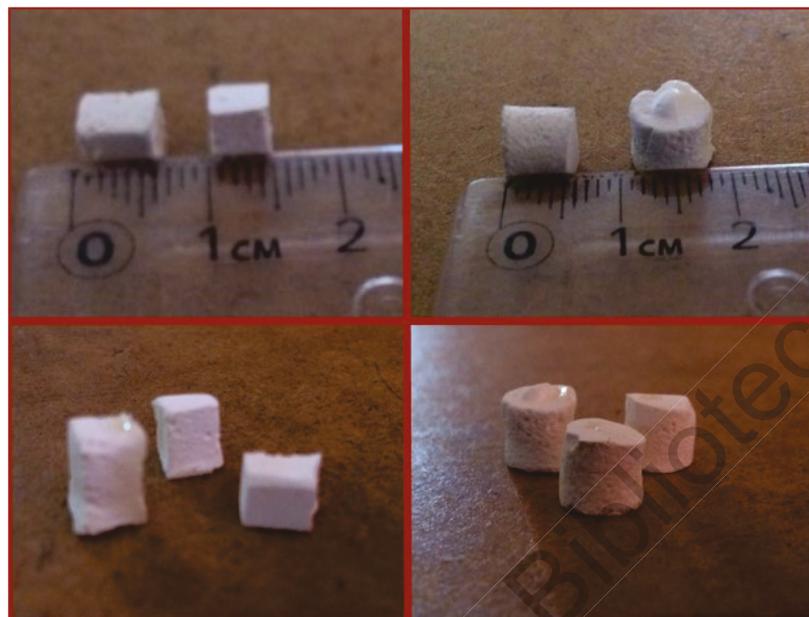


Figura 3.6 Imágenes de las piezas de material compuesto orgánico-inorgánico.

Como se mencionó anteriormente se consideran dos concentraciones diferentes de fase orgánica con el objetivo de analizar la influencia, tanto de su concentración como de la porosidad, en las propiedades mecánicas del material compuesto.

La concentración de la fase orgánica se obtuvo como porcentaje en peso de la grenetina disuelta en agua, de la siguiente forma:

$$\% FO = \left(\frac{W_{fo}}{W_s} \right) \times 100 \quad (3.2)$$

Donde W_{fo} es la cantidad en peso de fase orgánica hidratada, añadida a las piezas de HAp porosa. Este registro se obtiene al pesar las muestras antes, durante y después de la adición de dicha fase, así como posterior al secado de las muestras. W_s es el peso de las muestras cerámicas después de la síntesis por el método Gel Casting Modificado y antes de la adición de la fase orgánica, es decir, únicamente el material cerámico.

3.4 Caracterización del gel casting modificado

3.4.1. Pruebas Mecánicas

Las pruebas mecánicas son pruebas destructivas en las que los materiales de estudio son sometidos a esfuerzos mediante la aplicación de una fuerza externa hasta su deformación y/o ruptura, para determinar sus propiedades de dureza, elasticidad, fragilidad, flexibilidad e impacto.

El esfuerzo de compresión es la resultante de las fuerzas o presiones que existe dentro de un sólido deformable o medio continuo, caracterizada porque tiende a una reducción de volumen del objeto, y a un acortamiento del mismo en determinada dirección.

Las distintas cargas que actúan sobre los huesos se encuentran relacionadas con las diversas actividades del individuo. El hueso debe ser capaz de soportar fuerzas de compresión, tracción y cizalladura.

Los ensayos de compresión se realizan con fuerzas que operan llevando a cabo un aplastamiento de la probeta, la cual reduce su longitud a lo largo de la dirección de aplicación de la fuerza. El material es deformado hasta la ruptura, con una carga de compresión que aumenta gradualmente y que se aplica de forma uniaxial a lo largo del eje de prueba de la probeta.

Para calcular el esfuerzo de compresión se utiliza la relación:

$$\sigma = \frac{F}{A_0} \quad (3.3)$$

Donde F es la fuerza instantánea aplicada perpendicularmente a la sección de la probeta, en unidades de newtons (N) o libras (lb), y A_0 es el área (m^2 o in^2) de la sección original antes de aplicar la carga, por lo tanto, las unidades del esfuerzo a la compresión son lb/in^2 o N/m^2 (Pascales).

La deformación se calcula mediante la siguiente ecuación:

$$\varepsilon = \frac{L_i - L_o}{L_o} = \frac{\Delta L}{L_o} \quad (3.4)$$

Donde L_o es la longitud original antes de aplicar la carga, L_i es la longitud instantánea y $L_i - L_o$ es el cambio de la longitud instantáneo de la probeta igual a ΔL en un instante determinado con respecto a la longitud inicial producida por la deformación.

En este trabajo, los ensayos de pruebas mecánicas fueron de compresión y se llevaron a cabo en una máquina universal Zwick/Roell Z005 con una celda de carga de 5 KN y una velocidad de avance del cabezal de 1mm/min. Las piezas a ensayar (5 por cada tipo de muestra), tenían una forma cúbica y se sometieron previamente, a un proceso de desbaste para ajustarlas a las dimensiones de 5 mm de lado asegurándose de tener caras perfectamente paralelas.

3.4.2. Microtomografía 3D de Rayos X

La porosidad del material compuesto es una propiedad muy importante, y se requiere que exista en su volumen, un tamaño de poro adecuado y que dicha porosidad esté lo suficientemente interconectada, para permitir el paso de sustancias químicas, nutrientes y células que faciliten y promuevan la regeneración natural del tejido óseo. Por ello, se realizaron análisis de porosidad y estimación de la permeabilidad en las muestras de los materiales compuestos, utilizando un microscopio de rayos X (XRM) Zeiss Xradia 510 Versa 3D, con un voltaje de 40 kV, una potencia de 3 W, una resolución de 8.00 $\mu\text{m}/\text{pixel}$ y un tiempo de exposición de 3 segundos. Se obtuvieron 6000 imágenes de corte de cada muestra, y para reconstruir el volumen total de la misma, se utilizó el software de procesamiento de imágenes Avizo 9. En la Figura 3.7 se puede ver la forma de la muestra analizada.



Figura 3.7 Muestra de un material compuesto en su montaje previo al análisis por microtomografía.

3.4.3. Ensayos de pruebas In Vivo para evaluar la biocompatibilidad en ratas

Para que un material pueda denominarse biomaterial, debe tener una adecuada biocompatibilidad; por ello, a los materiales compuestos orgánico-inorgánico generados en este trabajo, se les llevó a cabo ensayos de biocompatibilidad, implantando pequeñas muestras de los diferentes materiales en ratas, algunas debajo de su piel y otras en contacto con su tejido muscular. Para estos ensayos de sensibilización cutánea e implantación en musculo se utilizaron un total de 54 ratas macho (150 gr a 290 gr) y se dividieron en tres grupos que corresponden al día de desafío (7, 30 y 90 días pos-implante) para la toma de muestras histológicas. Cada grupo estuvo constituido por 12 ratas para el implante de material compuesto y 3 ratas como control positivo, a las cuales se les implanto una pieza de gasa estéril, y 3 ratas como control negativo, a las que se les implantó un fragmento de sutura.

Se colocó por vía intradérmica e intramuscular un fragmento de un tipo de biomaterial compuesto para evaluar su efecto in vivo en cada uno de los 5 ratones

de cada grupo, dos ratones más por grupo se utilizaron como control positivo para evaluación del efecto del material no biocompatible y otros dos más como control negativo para su evaluación como material biocompatible por histología. Se anestesiaron las ratas con cloroformo, y una vez anestesiado el animal, se realizó antisepsia con Isodine en el dorso de la rata en el lugar en donde se inoculó el biomaterial de HAp. Se rasuró el área tratada (Figura 3.8) y una vez eliminado el pelaje se realizaron incisiones en la piel (Figura 3.9) y se desbrida el área (Figura 3.10) para colocar una laminilla del biomaterial de aproximadamente de 1.5 mm^2 (Figura 3.11 y 3.12) dentro de la incisión; posteriormente, se cerró la herida con un punto de sutura quirúrgica. Se realizaron controles con un trozo de gasa, y se realizó un punto de sutura en el dorso del animal. Se mantuvieron en observación a los animales, y a los 7, 30 y 90 días, se sacrificaron mediante una inyección intracardiaca de una solución de cloruro de potasio previa anestesia general.



Figura 3.8 Rata Wistar con el dorso rasurado



Figura 3.9 Fotografía del objeto de estudio con una pequeña incisión en el dorso



Figura 3.10 Fotografía del objeto de estudio previo a la implantación de la muestra en el dorso



Figura 3.11 Material compuesto de 1.5 mm² previo a ser implantado



Figura 3.12 Implantación del material compuesto en el dorso de la Wistar

Para el estudio histopatológico, las muestras de tejido fueron fijados en formol al 10% durante 48 horas; posteriormente, se llevó a cabo una deshidratación manual, prosiguiendo con una inclusión en parafina, después se procedió a la realización de cortes de dos micras de espesor, se recurrió a la tinción con hematoxilina eosina y se tomaron 33 microfotografías en secuencia con el orden alfabético de las cápsulas- Las observaciones se realizaron con un microscopio

óptico Nikon Modelo Eclipse E 200, con oculares 10 x y cámara Sony modelo Cyber-shot de 10.1 megapíxeles.

3.4.4. Ensayos de pruebas In Vivo para evaluar la biocompatibilidad en conejos

Para probar la capacidad de regeneración del tejido óseo de los materiales compuestos inorgánico-orgánico, se llevaron a cabo ensayos “In vivo” en conejos. En estos ensayos se utilizaron como modelo experimental 32 conejos adultos, blancos Nueva Zelanda (*Oryctolagus Cunicular L.*), machos, de un peso promedio de 2.5 Kg. Todos los animales fueron sometidos a implante con alguno de los materiales compuestos. Para estos ensayos, se utilizaron los materiales que contenían 19.5% en peso de fase orgánica, y cuya fase inorgánica estaba formada por HAp comercial o HAp sintetizada por nuestro grupo de trabajo. A través del proceso Gelcasting modificado, se obtuvieron especímenes cilíndricos de 5 mm de diámetro y 10 mm de altura para su implantación en el tejido óseo de los conejos.

Se procedió a la implantación de los materiales compuestos en la parte frontal del hueso fémur bajo anestesia por inyección intramuscular de Xilazina/Ketamina. El procedimiento quirúrgico, se realizó abordando el fémur a través de una incisión amplia en la piel de su cara lateral, profundizada mediante disección roma separando los músculos para descubrir la superficie frontal del fémur, en donde se realizó un defecto óseo utilizando una broca quirúrgica de 5 mm de diámetro por 10 mm de largo (ver figura 3.13), y posteriormente, rellenándolo con cada uno de los materiales (ver figura 3.14). Una vez colocado el implante, se realizó una sutura de la herida y se aplicó povidona iodada (figuras 3.15 y 3.16). Se esperó que el conejo tuviera una recuperación de la anestesia para reintegrarlos a su alojamiento, donde continuaron durante todo el periodo experimental. Como medida preventiva para evitar contaminaciones secundarias se administró una dosis de antibióticos durante 2 semanas tras la cirugía.

En todos los animales se colocó un implante en el hueso del fémur y como control, en uno de los fémures solo se realizó el defecto óseo sin implantar el material compuesto, para ver cómo se llevaba a cabo la recuperación de la lesión. El periodo de los ensayos fue de 90 días.

Tras el periodo de ensayo se sacrificaron los conejos utilizando una sobredosis de barbitúricos por vía intravenosa. Posteriormente se recuperaron los implantes y se realizaron radiografías a los diferentes fémures utilizados.

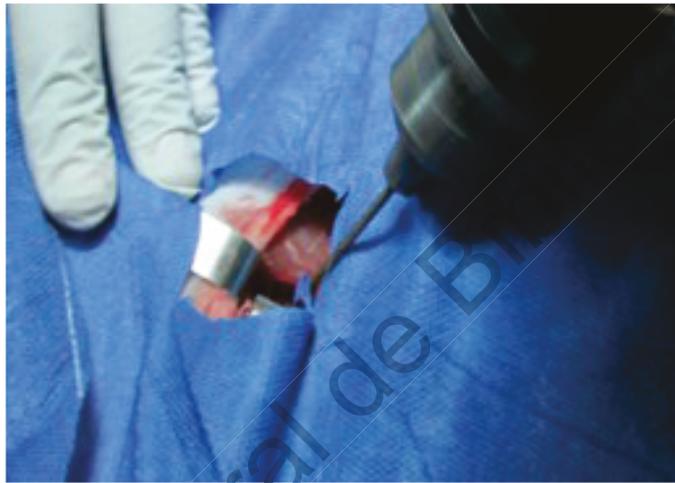


Figura 3.13 Imagen del fémur del conejo en el momento en el que se realizaron las perforaciones para los implantes

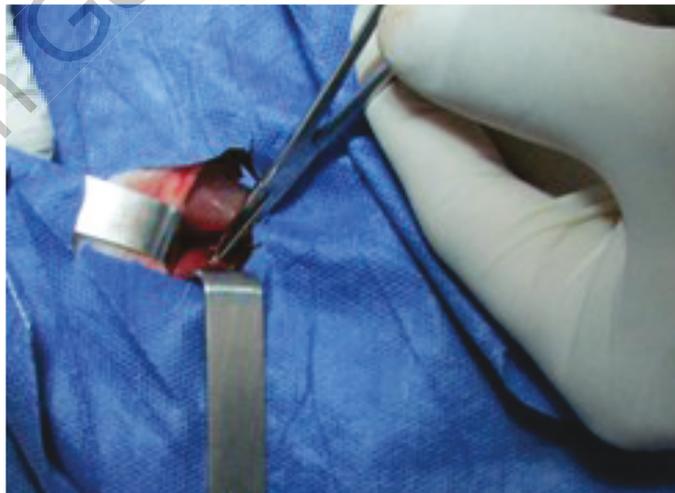


Figura 3.14 Imagen del fémur del conejo posteriormente a la colocación del implante

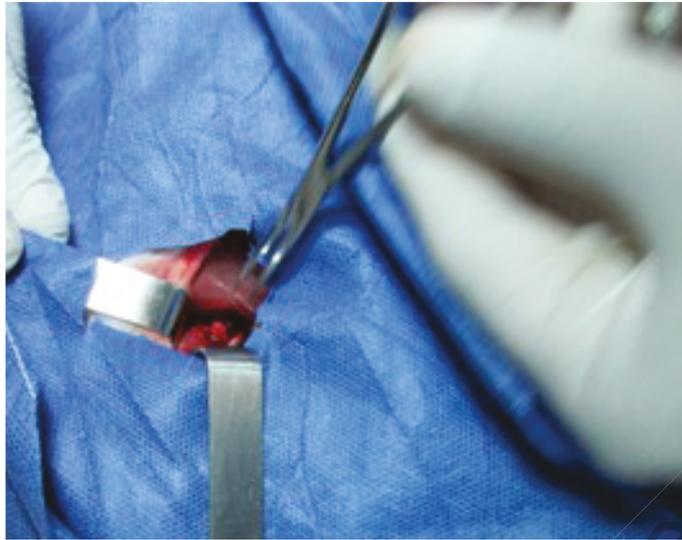


Figura 3.15 Imagen del fémur del conejo posteriormente a la colocación del implante



Figura 3.16 Imagen de la pata del conejo una vez saturada la herida

4. RESULTADOS

4.1. Difracción de Rayos X

Los resultados de los análisis de difracción de rayos X por polvos de todas las muestras de HAp obtenidas por el método hidrotermal asistido por microondas, fueron similares y han revelado un difractograma de HAp típico como el que se muestra en la figura 4.1. La identificación de las fases cristalinas presentes fue por comparación utilizando el banco de archivos de difracción de polvo "Powder Diffraction File" (PDF) proporcionado por el Centro Internacional de Datos de Difracción "International Centre for Diffraction Data" (ICDD). Todas las muestras analizadas contienen la misma fase cristalina, la cual fue identificada como HAp según el ICDD-PDF # 09-432 y no se identificó ningún otro constituyente cristalino. Esto indica que la HAp obtenida por el método hidrotermal asistido por microondas es de alta pureza, y a su vez, esta HAp es la que se utilizó para generar el material compuesto.

El PDF # 09-432 indica que la reflexión de Bragg más intensa corresponde a los (211), pero como se puede observar en el difractograma de HAp de la figura 4.1, la señal más intensa es la registrada para los planos (300). Lo anterior indica que hay una marcada orientación cristalina preferencial en la HAp.

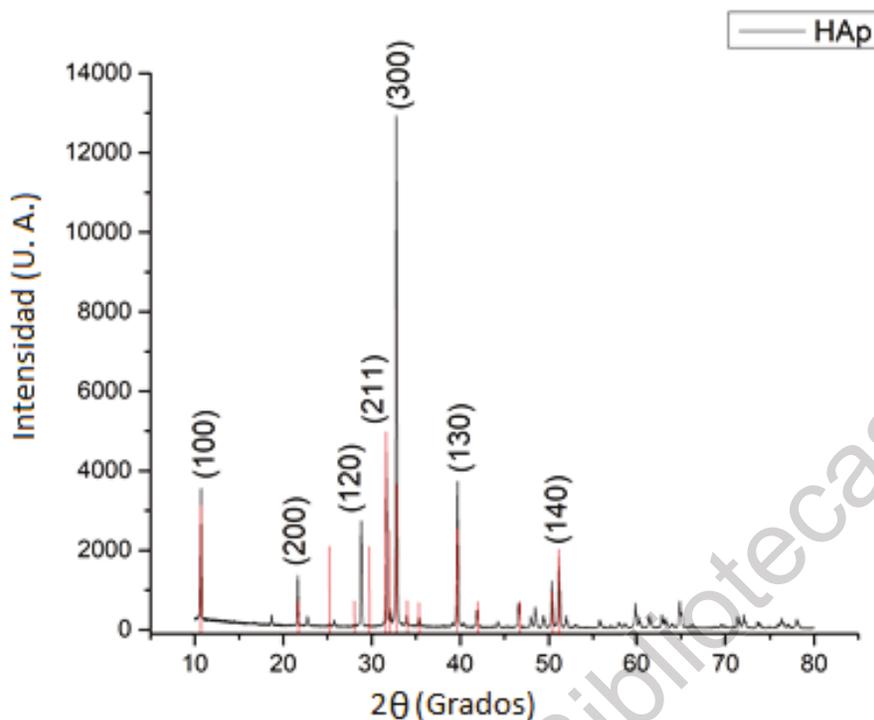


Figura 4.1 Difractograma de la HAp sintética y su identificación con el PDF # 09-432

En el difractograma que aparece en la Figura 4.1 están indicados los índices de Miller para las principales reflexiones de Bragg, las cuales corresponden a los planos 300, 211, 100, 130, 120, 140 y 200 de la HAp acorde al PDF # 09-432. Cabe hacer notar que las reflexiones en el difractograma están bien definidas y tienen bajo nivel de ruido, lo cual indica la presencia de HAp altamente cristalina (Tripathi, G. y Basu, B. 2011). El uso del ácido glutámico en la mezcla de reacción y el control de la temperatura y la presión dentro del reactor dieron como resultado la obtención de una HAp con una alta calidad cristalina, pureza y una marcada orientación preferencial en la dirección [300]. Además, utilizando el programa “EVA” provisto por Bruker, se determinó el tamaño promedio de cristalito en la HAp a través de la ecuación de Scherrer y se encontró un valor de 64.15 nm.

Además de que la reflexión de Bragg más intensa en el difractograma de la HAp fue la de (300) y que la intensidad para la reflexión correspondiente a la (211) es de aproximadamente el 30% en comparación a la del (300), otras mostraron un incremento en sus intensidades, ya que la intensidad que presentan las reflexiones

correspondientes a los planos (100) y (200) que tienen una intensidad que los ubica entre las más grandes en el difractograma (25 y 8.34% respectivamente), según el PDF correspondiente a la HAp; suelen presentar intensidades de sólo el 17.7 y 6.3% respectivamente.

En contraste, otras reflexiones redujeron sus intensidades, la más considerable fue aquella correspondiente al (002) encontrada aproximadamente a 25 grados en 2θ , que típicamente posee una intensidad muy elevada de aproximadamente 36% en relación a la intensidad del (211) según el PDF # 09-432, pero en el difractograma de la figura 4.1, esta reflexión es demasiado pequeña, y en relación con la intensidad registrada para la reflexión (300) se pierde y es casi parte del fondo. La variación en la intensidad de las reflexiones antes mencionadas es evidencia de una notable orientación cristalina preferencial a lo largo del eje "a" de la estructura cristalina de la HAp.

Con el fin de poner en perspectiva la alta cristalinidad de la HAp sintetizada por el método hidrotérmal asistida por microondas, en la figura 4.2 se muestra el difractograma de rayos X por polvos de la HAp comercial (Sigma Aldrich) y la HAp sintetizada por el método hidrotérmico asistido por microondas. Es importante mencionar que el ancho de las reflexiones encontradas en el difractograma de la HAp comercial es mayor a aquellas correspondientes a la HAp sintetizada en este trabajo, Las características de reflexiones Bragg más angostas y mejor definidas, y un menor ruido de fondo en el difractograma, son indicativos de que la hidroxiapatita sintetizada en esta investigación posee una alta cristalinidad y un mayor tamaño promedio de cristalito.

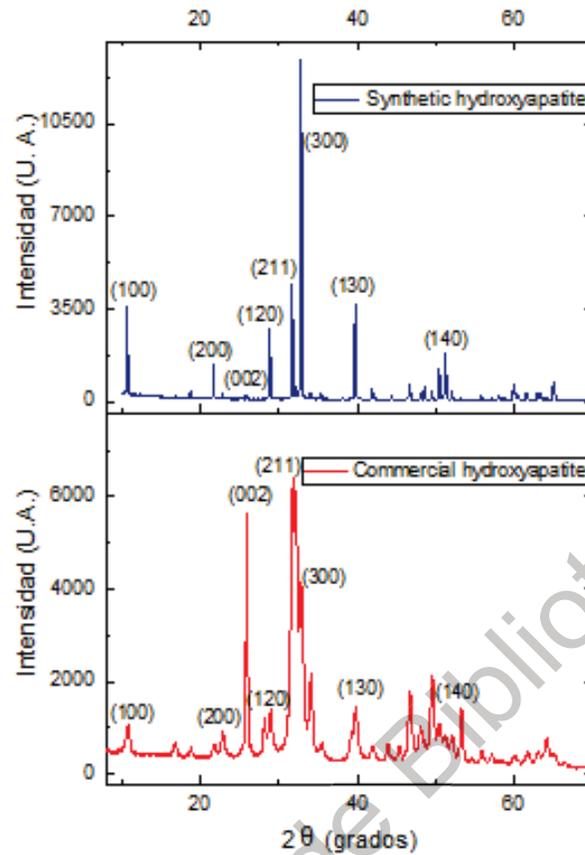


Figura 4.2 Difractograma de HAP comercial [Sigma Aldrich] (arriba) y sintetizada por el método hidrotérmal asistido por microondas usando Acido Glutámico como orientador.

Además, en la figura 4.3 se presenta un difractograma de una HAp comercial de origen humano. La cristalinidad de la HAp sintetizada por nuestro grupo de trabajo es mucho mayor a la que presenta la HAp comercial (Sigma Aldrich), y comparada con la HAp comercial de origen humano, las diferencias son muy notorias, ya que el difractograma para esta última, presenta mucho ruido y las reflexiones de Bragg son anchas y todo ello indica una baja cristalinidad.

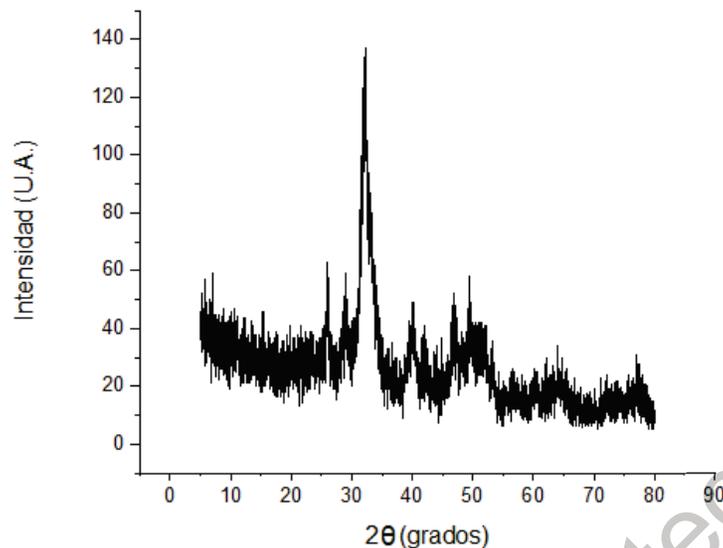


Figura 4.3 Difractograma de HAp comercial de origen humano.

La morfología de fibra encontrada en la HAp sintetizada en el presente trabajo y observada en el SEM (reportadas en capítulos posteriores), muestra una sección transversal hexagonal, lo cual permite explicar los resultados de DRX de una mejor manera. En el método de preparación de las muestras para esta técnica analítica, las fibras son depositadas en el portamuestras, y la mayoría de ellas adquieren un arreglo tal que sus secciones transversales hexagonales son perpendiculares a la superficie del portamuestras mientras que las longitudes de las fibras son paralelas a la mencionada superficie. Como consecuencia, la mayoría de los vectores a^* (del espacio recíproco) de la estructura cristalina de HAp son ortogonales a esa superficie y aumentan las posibilidades de satisfacer las condiciones de difracción. En contraste, un gran número de vectores c^* se encuentran paralelos a la superficie del portamuestra y la probabilidad de satisfacer la condición de difracción disminuye considerablemente.

Por lo tanto, esta distribución de las fibras hace posible que las reflexiones de Bragg producidas por aquellos planos cristalinos ortogonales al eje "a" de la estructura cristalina de la HAp, tengan una gran intensidad; por el contrario, las reflexiones generadas por los planos perpendiculares al eje "c" disminuyen

significativamente su intensidad. Por esa razón, en los difractogramas de la figura 4.1 y la parte superior de la figura 4.2, los planos (300), (200) y (100) poseen intensidades más altas que las reportadas en el correspondiente PDF, mientras que la intensidad correspondiente al plano (002) es casi nula. En conclusión, las fibras de HAp presentan una marcada orientación preferencial a lo largo del eje "a" de la estructura cristalina de la HAp y tienen una alta cristalinidad.

4.2. Espectroscopia de Dispersión de Energía

En la Tabla 4-1 se muestran los resultados promedio del contenido en porcentaje atómico y en peso de los elementos detectados que constituyen a las muestras de HAp. Los elementos que se detectaron fueron el oxígeno, el fosforo y el calcio lo cual era de esperarse debido a que son los elementos principales por los cuales está constituida la HAp. Cabe mencionar que el hidrógeno no puede ser detectado por este método debido a que sólo posee un electrón y como tal participa en enlaces químicos lo cual impide la formación de un par electrón-hueco (Stojilovic, 2012). Como se mencionó anteriormente en el sistema óseo humano existe una relación Ca/P atómica de entre 1.5 y 1.8 y es importante esta relación para la biocompatibilidad. Es por esta razón, que de los valores de porcentaje atómico y en peso para el fosforo y el calcio, se calcularon las relaciones Ca/P atómica y en peso.

Tabla 4-1Tabla del contenido promedio elemental en porcentajes en peso y atómico y de la relación Ca/P de la HAp.

<i>Elemento</i>	<i>% Peso</i>	<i>% Atómico</i>
<i>Oxígeno (O)</i>	39.90	51.37
<i>Fosforo (P)</i>	18.41	17.66
<i>Calcio (Ca)</i>	41.70	30.97
<i>Relación Ca/P</i>	2.27	1.75

Este tipo de análisis elemental es puntual y de una región muy cercana a la superficie de la muestra, es decir, se analiza solo las zonas de la muestra que se seleccionaron y los rayos X característicos provienen de una región poco profunda, a pesar de esto, nos da una perspectiva de la relación Ca/P de la muestra la cual fue de 1.75 elemental y de 2.27 en peso, lo que está dentro de los rangos que se presentan en el sistema óseo humano. En un futuro, el objetivo será el de obtener una relación Ca/P específica para cada zona del sistema óseo humano, pues ésta cambia dependiendo del órgano tisular.

4.3. Fluorescencia de Rayos X

En la Tabla 4-2 se presentan los resultados de la concentración promedio elemental, en porcentajes de peso y atómicos de los elementos fosforo y calcio presentes en las muestras de HAp; después, con estos valores se calculó la relación Ca/P dando como resultado una relación atómica de 1.6 y una relación 2.07 en peso.

Tabla 4-2 Tabla del contenido promedio elemental en porcentajes en peso y atómico y de la relación Ca/P de la HAp analizada por XRF.

<i>Elemento</i>	Peso	Atómico
<i>Fosforo (P)</i>	32.54	31.22
<i>Calcio (Ca)</i>	67.46	50.10
<i>Relación Ca/P</i>	2.07	1.60

En las muestras analizadas se registraron valores de la relación Ca/P entre aquellos reportados para el sistema óseo. Este análisis complementó la información obtenida por EDS y la cual resultó ser muy favorable, pues es deseable en este material tener una relación Ca/P adecuada para favorecer la biocompatibilidad. Es importante mencionar que se utilizó hierro como elemento estándar interno para hacer la cuantificación, y que a diferencia del análisis por EDS, este análisis es global (volumétrico) y no puntual.

4.4. Espectroscopía Infrarroja con Transformada de Fourier (FTIR)

En la figura 4.4 se muestra el espectro de FTIR correspondiente a la muestra de HAp sintetizada por el método hidrotérmal asistido por microondas, empleando el ácido glutámico como orientador del crecimiento cristalino.

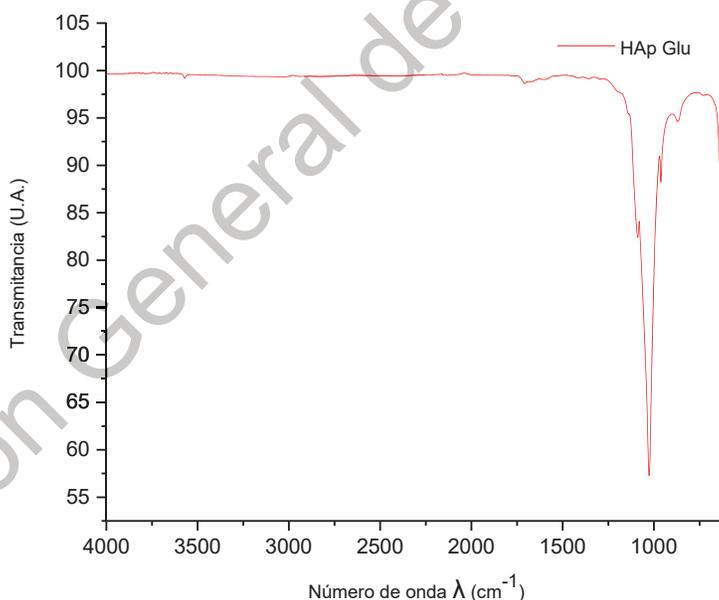


Figura 4.4. Espectro FTIR de la HAp utilizando ácido glutámico como orientador.

Las señales observadas en el espectro pertenecen a los grupos funcionales (PO_4) encontrados en las bandas alrededor de 1034 y 563 cm^{-1} , donde la banda de los 1034 cm^{-1} es muy intensa y corresponde a la vibración del grupo fosfato mientras que la banda en 563 cm^{-1} es originada por la deformación del mismo grupo funcional. La

pequeña banda que se observa alrededor de 3570 cm^{-1} pertenece al grupo OH^- , el tamaño de esta señal se debe a que los grupos OH^- están muy aislados y no forman ningún tipo de unión secundaria, como un puente de hidrógeno. En el agua o para las moléculas de alcohol, esta banda es ancha debido a la formación de puentes de hidrógeno entre las moléculas. Otra banda pequeña en 1550 cm^{-1} corresponde al estiramiento de la sustitución del grupo CO_3^{2-} , esta señal puede deberse a la introducción de CO_2 del medio ambiente hacia el equipo. El análisis de FTIR permiten corroborar la obtención de HAp, y como no se registró la presencia de alguna otra sustancia, se demuestra que el producto tiene una alta pureza.

4.5. Microscopia Electrónica de Barrido

De la observación de las muestras de HAp sintética, se encontraron resultados interesantes. En la figura 4.5 se presenta una micrografía de una muestra típica de HAp y en ella se corrobora lo que se comentó previamente en el análisis de DRX, y es que la HAp sintética tiene una morfología de fibra, la cual tiene una sección transversal hexagonal bien definida; además, las facetas laterales del cuerpo de las fibras tienen una superficie lisa, y todo lo anterior es evidencia de un crecimiento cristalino de buena calidad. En el extremo de las fibras, se puede ver con claridad el perfil hexagonal con un diámetro que varía de 0.5 a $2\text{ }\mu\text{m}$ en promedio y con una longitud de unas pocas decenas de micrómetros. Es importante tener en cuenta que, además de mostrar una buena cantidad de fibras, la micrografía de la figura 4.5 muestra que éstas son sólidas y con cierta rigidez, lo cual hace presuponer que ellas tendrán buenas propiedades mecánicas en compresión, y esto es deseable en esta investigación, ya que las fibras aportarán resistencia mecánica al material compuesto.

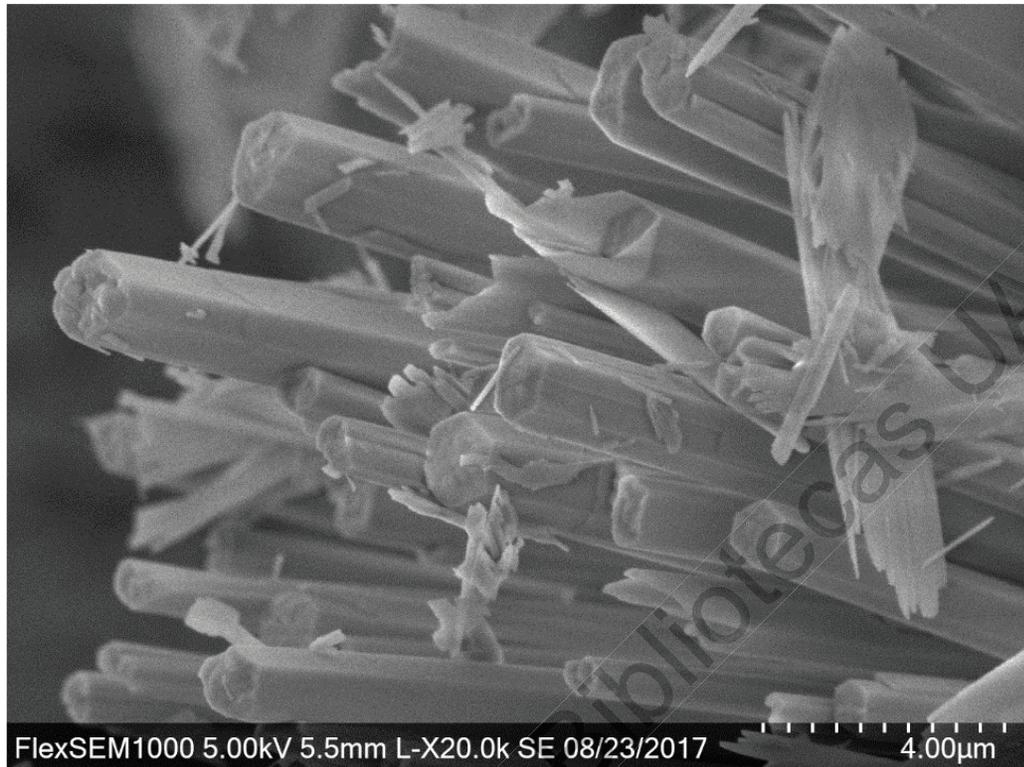


Figura 4.5 Micrografía de SEM en la que se muestran las nano fibras de HAp obtenidas por el método hidrotermal asistido por microondas

Con el fin de confirmar la solidez de la estructura de las nanofibras de HAp y mostrar con mayor detalle su perfil hexagonal, en la figura 4.6 se muestra una micrografía con mayor amplificación, en la cual podemos corroborar estas características de la fibra. Además, en la imagen se pueden ver algunas laminillas de HAp que probablemente, son fragmentos que formaron parte de otras fibras que probablemente se rompieron durante el proceso de síntesis o debido a la manipulación de la muestra.

Estas fibras de tamaño micrométrico a su vez están formadas por pequeñas nanofibras, las cuales también tienen un perfil hexagonal (Alanis *et al.*, 2016). Este arreglo estructural aunado a las características cristalinas de la HAp previamente mencionadas, son relevantes para lograr buenas propiedades mecánicas. Esta característica estructural de nanofibras contenidas dentro de microfibras se reportó por primera vez por nuestro grupo de trabajo.

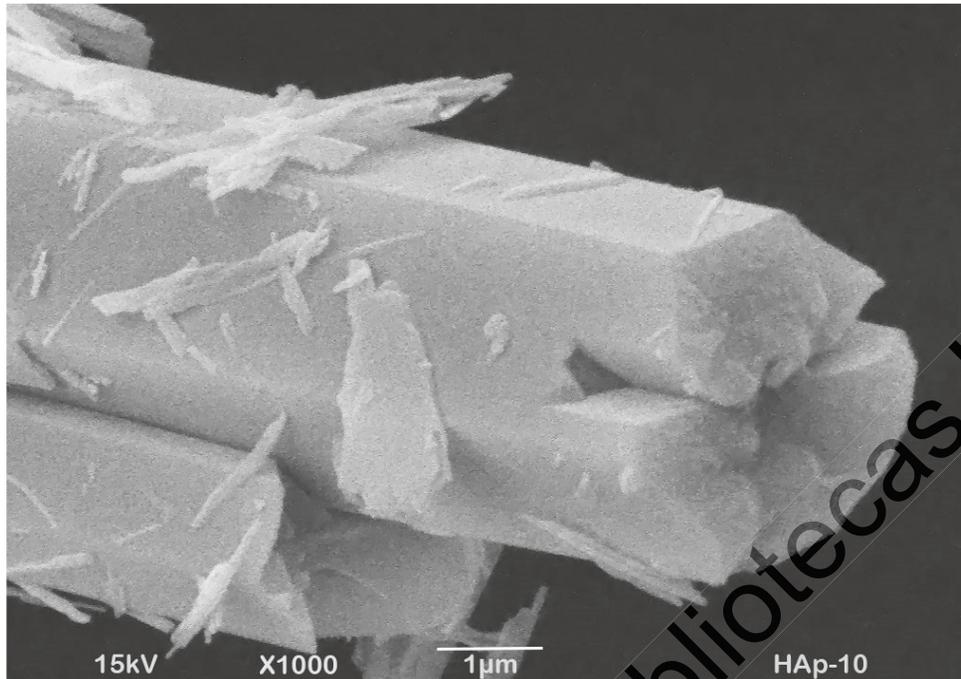


Figura 4.6 Micrografía del acercamiento a una fibra de HAp

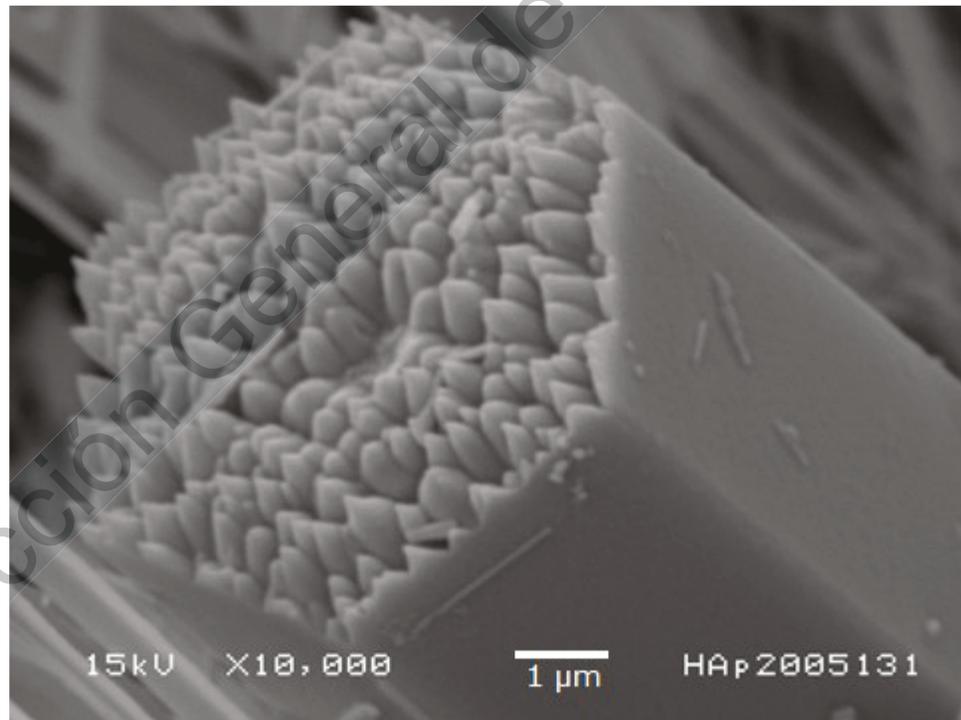


Figura 4.7 Micrografía de la microfibras cubierta de nanofibras de HAp

En la figura 4.7 el área de la sección transversal permite ver que las microfibras se encuentran llenas de nanofibras de HAp, las cuales al ser calentadas

forman una microfibras sólida lo cual es deseable por que le confiere a la microfibras una mayor resistencia mecánica a la compresión.

Asimismo, se realizaron observaciones en el SEM al material compuesto de fibras de HAp con grenetina. La figura 4.8 muestra una micrografía del material compuesto inorgánico-orgánico en donde se puede observar que la superficie de algunas fibras de HAp están totalmente recubiertas con grenetina, lo cual implica que hay buena adherencia e interacción química entre ambos componentes. Al igual que en el tejido óseo humano, ambas fases (orgánica e inorgánica) se unen para formar un material compuesto. Lo importante en esta micrografía es ver que las fibras no se fracturaron y su morfología permaneció después del moldeado por el método Gel Casting Modificado, lo cual es deseable para obtener las mejores propiedades mecánicas posibles para el material compuesto. Además, en la micrografía se puede ver con claridad la gran porosidad que tiene el material compuesto, generada por el arreglo de las fibras en su volumen. Esta porosidad tiene un tamaño adecuado para permitir el paso de sustancias y células, haciendo que sea posible, que se lleve a cabo el proceso de regeneración natural del tejido óseo.

Las micrografías mostradas en la figura 4.9 comparan el aspecto superficial que tienen las fibras, de algunos cientos de micrones de largo y 10 micrones de apotema, antes (izquierda) y después de ser recubiertas con grenetina (derecha). Ambos grupos de fibras tienen un arreglo similar, el cual es el típico observado después de que la HAp está recién sintetizada. Esto confirma que las fibras conservan su forma y arreglo después del método Gel Casting Modificado.

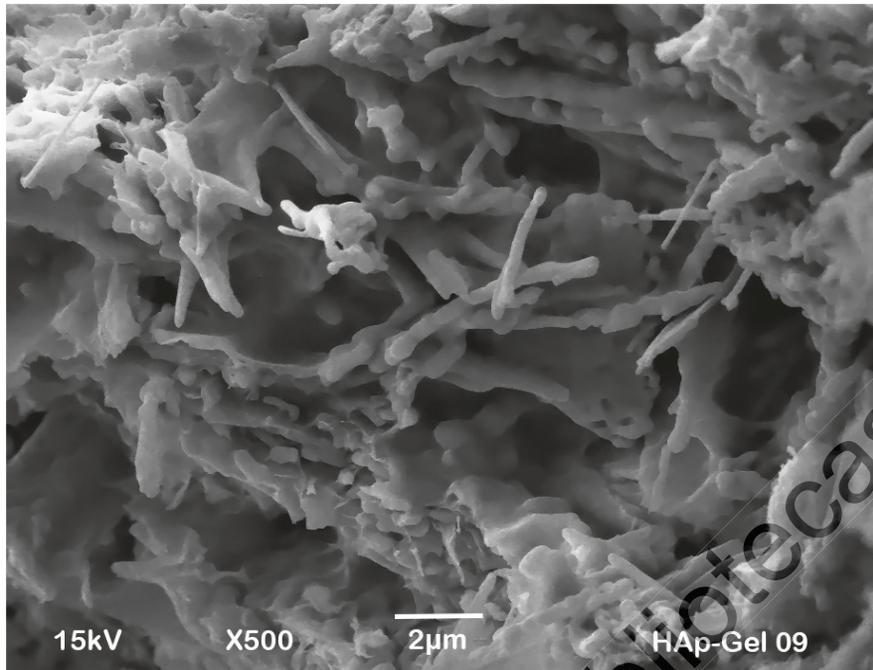


Figura 4.8 Micrografía del material compuesto HAp-grenetina

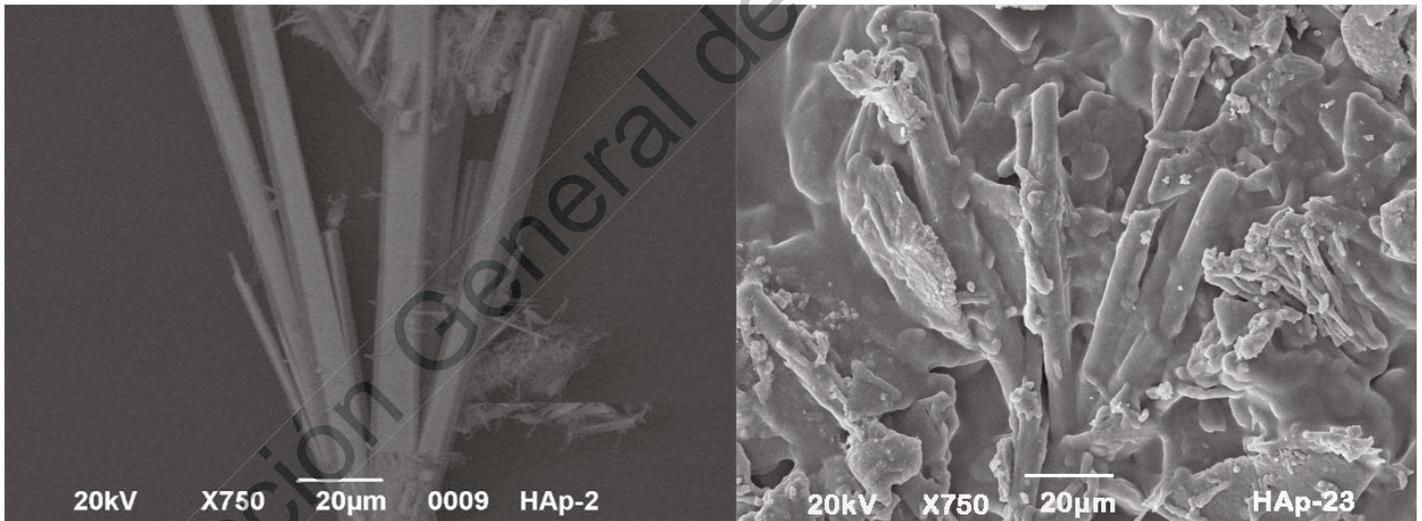


Figura 4.9 Micrografía de las fibras hexagonales de HAp antes y después de agregar la fase orgánica

Para mostrar la capacidad que tiene el ácido glutámico para orientar el crecimiento cristalino de la HAp sintetizada por el método hidrotérmico asistido por microondas, en la figura 4.10 se presentan diferentes morfologías obtenidas cuando se utilizan diferentes tipos de aminoácidos en la mezcla de reacción. Estos aminoácidos pueden ser ácidos, neutros o básicos.

En la parte superior izquierda de la figura 4.10 se observan prismas romboidales de HAp obtenida al utilizar Arginina como orientador del crecimiento cristalino (que es un aminoácido básico), en la parte superior derecha de la figura se observa la HAp sintetizada con Alanina, el cual es un aminoácido neutro y no se observa una morfología definida. En la parte inferior de la figura 4.10 se encuentra la HAp con morfología de fibra sintetizada con los aminoácidos ácidos. En la parte izquierda, la HAp sintetizada con ácido aspártico, la cual presenta una morfología principalmente de agujas y también, se ven algunas placas delgadas, mientras que en la parte inferior derecha, se tiene a la HAp sintetizada con ácido glutámico, y una vez más, se pueden observar las fibras con perfil hexagonal y morfología bien definida.

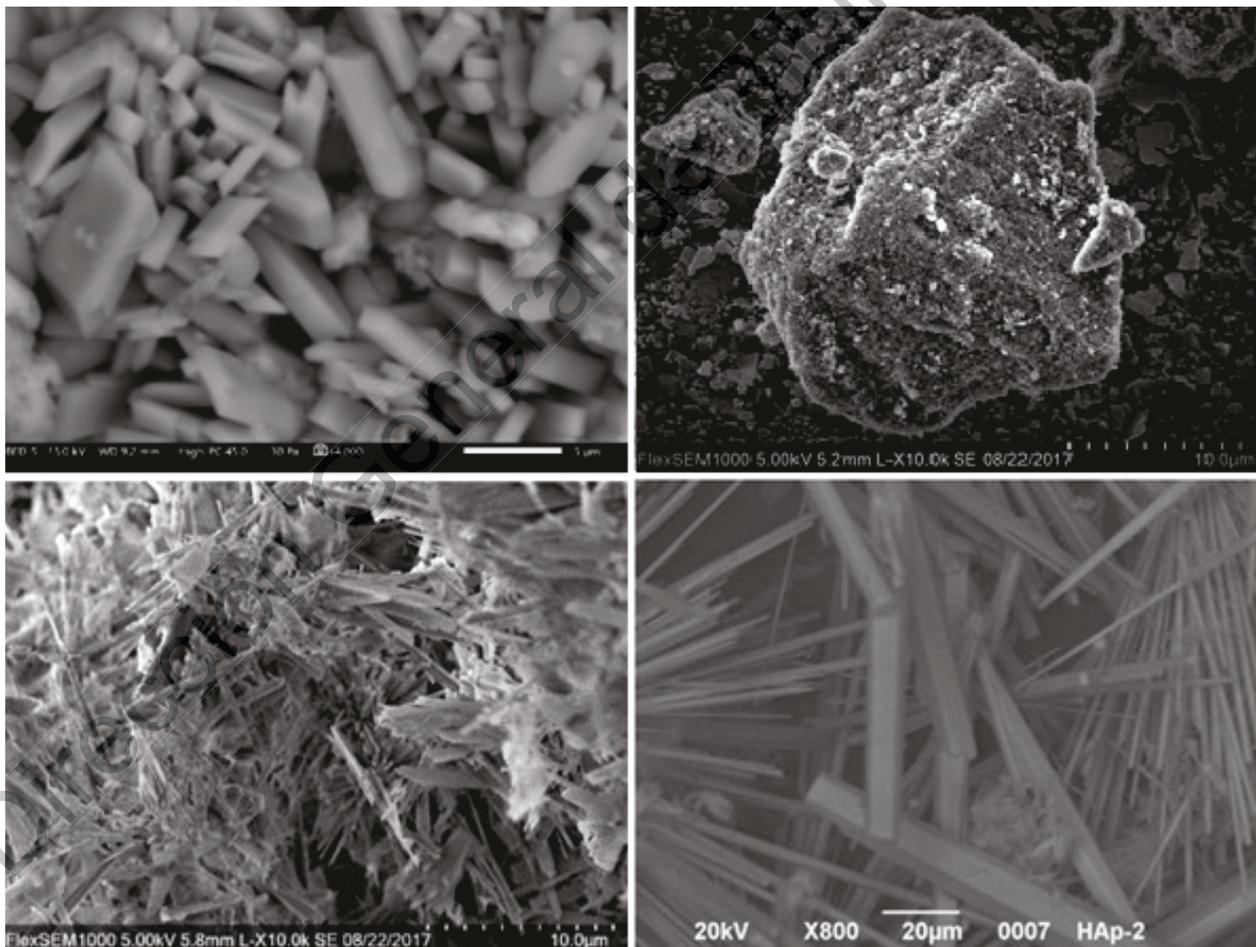


Figura 4.10 Micrografías de la HAp sintetizada por el método hidrotérmal asistido por microondas utilizando diferentes aminoácidos como orientadores del crecimiento cristalino.

Para los objetivos de esta investigación, es de primordial interés el obtener las nanoestructuras de HAp con las mejores propiedades mecánicas; por ello, se decidió utilizar las fibras, ya que su perfil hexagonal es resultado de su estructura cristalina (hexagonal) y en esta estructura, se encuentran columnas formadas por los iones de calcio tipo I (ver figura 2.7), las cuales se encuentran alineadas paralelas al eje “c” de la estructura cristalina de la HAp, y dichas columnas le aportan resistencia mecánica. Si las fibras se hacen crecer de modo que su longitud sea paralela al eje “c” de la estructura cristalina, las fibras de HAp tendrán una alta resistencia mecánica a la compresión [cita tu segundo artículo y el libro de biomateriales]. Estas fibras se utilizaron para elaborar el material compuesto.

Finalmente es importante mencionar que esta morfología de fibra, no se encontraba en la literatura con esta calidad cristalina y con el arreglo de nanofibras dentro de microfibras. También, es importante observar que a través del método hidrotermal asistido por microondas y utilizando ácido glutámico, se obtienen principalmente fibras. Lo anteriormente es evidencia del control que se puede tener en el crecimiento cristalino, durante la síntesis de compuestos inorgánicos, utilizando el mencionado método.

4.6. Microscopía Electrónica de Transmisión de Alta Resolución (HRTEM)

A través de las observaciones en el microscopio electrónico de transmisión, se obtuvieron imágenes muy reveladoras sobre la estructura de la HAp. Al preparar la muestra e introducirla al microscopio, las microfibras de HAp se rompen y con ello, se liberan las nanofibras que la formaban. En la micrografía que aparece en la figura 4.11 se pueden ver varias nanofibras, las cuales tienen un espesor homogéneo, un diámetro promedio de 85 nm y también muestran un perfil hexagonal como las microfibras. Algunas de estas nanofibras terminan en punta y otras más en una superficie plana.

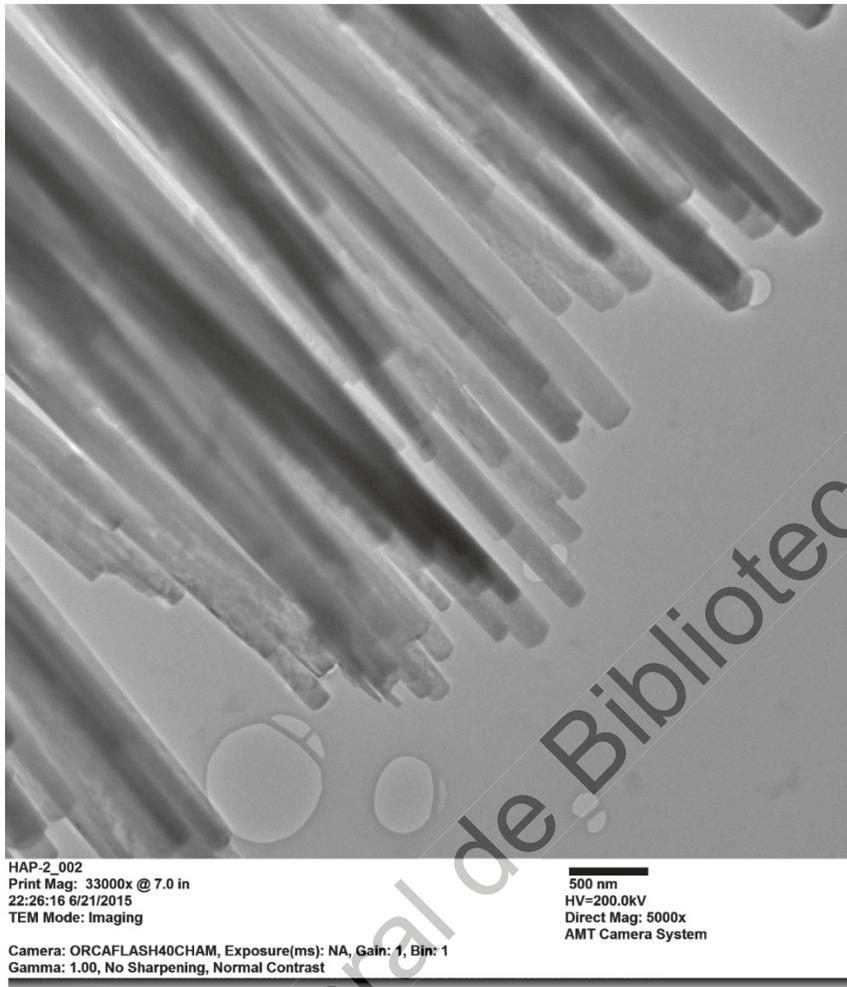


Figura 4.11 Micrografía de la HAp sintetizada en donde se observa su espesor homogéneo y su diámetro.

Al utilizar mayores ampliificaciones y lograr la obtención de imágenes de alta resolución, se pudieron observar detalles más finos de la estructura de las nanofibras. En estas imágenes se aprecia un ordenamiento espacial periódico, el cual está formado por un arreglo de líneas y puntos que se relacionan con la estructura cristalina de la HAp. Este arreglo espacial fue analizado por medio del software Digital Micrograph® diseñado y distribuido por Gatan. Se determinaron las distancias de separación entre las líneas o puntos en la imagen, que corresponden a las distancias interplanares de la estructura de la HAp.

En las figuras 4.12 y 4.13 se muestran los resultados de dicho análisis. Podemos ver en la figura 4.12 que las líneas que van de izquierda a derecha (con

cierto ángulo de inclinación) tiene una separación de 0.235 nm de distancia interplanar, esta distancia corresponde a los planos (220) de la estructura cristalina de la HAp, y las líneas que van de arriba hacia abajo (también con cierta inclinación), tienen un espaciado interplanar de 0.271 nm y corresponden a los planos (300).

Asimismo, por medio del programa Digital Micrograph, se aplicó una transformada rápida de Fourier (FFT) a la región de la imagen contenida en el rectángulo blanco, la cual produjo el patrón de puntos mostrado en el recuadro de la parte superior derecha de la figura. Este patrón muestra un arreglo ordenado de puntos con simetría dos que está relacionado con la estructura cristalina de la HAp. Los puntos más intensos corresponden a los (300), lo cual es evidencia de su abundancia en la estructura cristalina, y el resto de menor intensidad están relacionados con los (220), lo anterior se determinó utilizando el mencionado programa de computo, evaluando la distancia existente entre los puntos de interés en el patrón y el punto central (haz transmitido). Posteriormente, estas distancias se confrontaron con aquellas registradas en el PDF 09-432, que corresponden a las distancias interplanares de la estructura cristalina de la HAp, y con ello, se identificaron los planos cristalinos que contribuyeron a la formación del patrón de puntos. Hay que recordar que, el patrón de puntos es una proyección en un plano del espacio de Fourier de la estructura cristalina de la HAp, y por ello, una distancia grande en la estructura cristalina corresponderá a una distancia pequeña en el espacio de Fourier y viceversa. Cabe mencionar que el patrón de puntos generado por la FFT, está bien definido, lo que es indicativo de una buena calidad cristalina.

También, por medio del programa Digital se llevó a cabo un filtrado a la imagen aplicando una máscara que bloqueó a los puntos más intensos del patrón, y con los puntos restantes, se formó una nueva imagen, la cual aparece en la parte inferior derecha de la figura 4.12; por lo tanto, dicha imagen solo contiene el arreglo de líneas correspondiente a los planos (220) y con ello, podemos ver su ubicación en la muestra.

En cuanto a la figura 4.13, se puede observar un espaciado entre las líneas que van de arriba hacia abajo que es de 0.81 nm y que corresponde a los

(100), y las líneas en la dirección de izquierda a derecha tienen un espaciamiento de 0.35 nm, las cuales se relacionan con los (002). Nuevamente, se aplicó una FFT a la región de la imagen contenida dentro del recuadro blanco y se obtuvo el patrón de puntos que se muestra en el recuadro superior derecho de la figura. El patrón de puntos está aún más definido que el observado en la figura anterior, está ordenado y simétrico, presentando nuevamente una simetría dos, lo cual indica que, como se están observando las caras laterales de la nanofibra, estas coinciden con las facetas laterales de la estructura cristalina hexagonal de la HAp, que tienen una forma rectangular. Lo anterior permite corroborar con mayor claridad, que la nanofibra de HAp tiene una alta calidad cristalina. Los puntos del patrón fueron indexados utilizando el PDF 09-432 y se identificaron como se muestra en la figura. Al relacionar la micrografía y el patrón de puntos que aparecen en la figura 4.13, es posible ver que los planos (002) están apilados a lo largo de la longitud de la fibra, y por ello podemos afirmar que dicha dimensión de la nanofibra es paralela al eje "c" de la estructura cristalina de la HAp y consecuentemente, se puede concluir que las nanofibras crecieron a lo largo de la dirección [001]. Este hallazgo es muy relevante para las propiedades mecánicas de las nanofibras, ya que como se mencionó anteriormente, un crecimiento de las fibras a lo largo del eje "c" de la estructura cristalina de la HAp producirá una alta resistencia mecánica a la compresión.

Tal como se hizo para la figura 4.12, a la imagen de la figura 4.13 se le hizo un filtrado aplicando una máscara para bloquear aquellos puntos correspondientes a la contribución de los planos (002) en la FFT, y con los puntos restantes se construyó la imagen que aparece en el recuadro inferior derecho de la figura; por ello, esta última imagen solo está formada por las líneas generadas por los planos (100) y sus planos paralelos (300). Estos planos son los más abundantes y que fueron encontrados tanto en las imágenes de HRTEM como en sus correspondientes FFT's. También fueron registrados por medio de la difracción de rayos X, lo cual confirma que la estructura cristalina de las nanofibras tiene una orientación cristalina preferencial en la dirección [300].

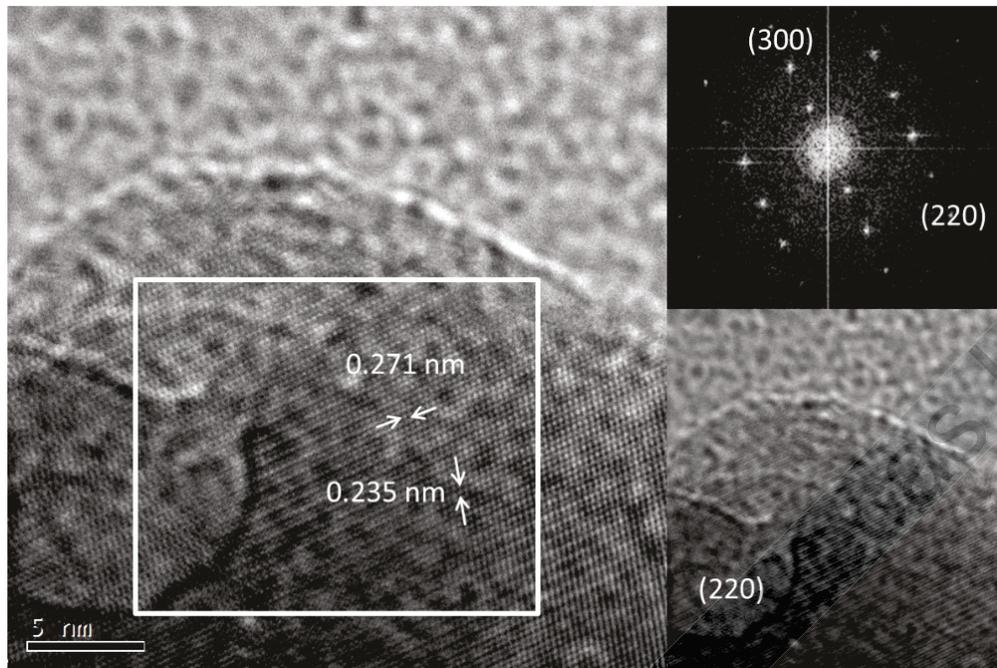


Figura 4.12 Micrografía de HRTEM de una nanofibra de HAp en donde se muestra el ordenamiento cristalino. El recuadro superior derecho es una FFT de la región de la imagen dentro del recuadro y la imagen inferior derecha, es el resultado de la aplicación de un filtrado a la imagen.

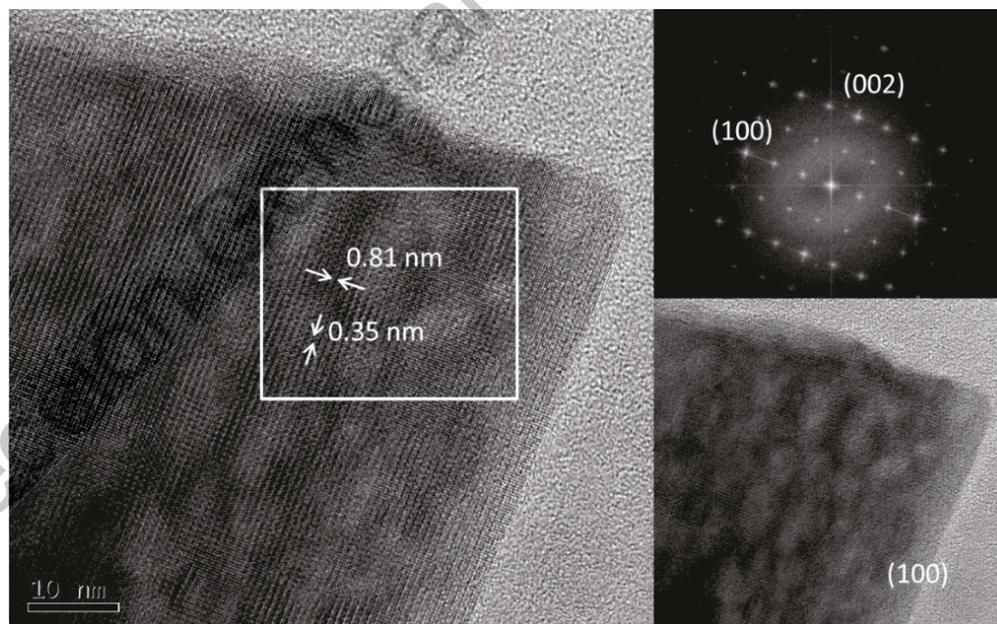


Figura 4.13 Micrografía de HRTEM de una nanofibra de HAp mostrando su ordenamiento cristalino. En el recuadro superior derecho se presenta la FFT y por debajo, la imagen generada después del filtrado, en donde se observan los planos de la familia {100}.

4.7. Propiedades mecánicas

Para el análisis de la resistencia mecánica, se realizaron pruebas de compresión a los materiales compuestos. Los resultados de la prueba de compresión mostraron curvas de esfuerzo deformación con características indicativas de materiales celulares elastoméricos.

Una gráfica típica de esfuerzo-deformación en donde se observa la respuesta de un material celular ante la aplicación de una fuerza externa, se puede ver en la figura 4.14 (Ashby y Hunkin, 2006). En el área "A" de la gráfica de la figura, el material celular soporta el esfuerzo aplicado y en respuesta sufre una deformación elástica. Cuando se alcanza el área B, se produce una deformación plástica, requiriendo de un menor esfuerzo para producir una mayor deformación. El punto C es el esfuerzo máximo que puede soportar el material compuesto y en ese punto, se inicia el colapso de las células de mayor tamaño; posteriormente, el colapso se reduce y se provoca la densificación del material, como se muestra en la región D. Después de esto, se produce al colapso de células de menor tamaño en el material, requiriendo para ello de un mayor esfuerzo, densificando cada vez más al material hasta su ruptura.

El material compuesto inorgánico-orgánico sintetizado en este trabajo está pensado para funcionar como un andamiaje que permita el flujo de las sustancias y las células necesarias para llevar a cabo la regeneración del tejido óseo, dando al mismo tiempo, el soporte mecánico al tejido dañado para favorecer su recuperación. En este material, se espera que tenga porosidad tanto en la escala macro como meso. El comportamiento mecánico de un material celular con estas dos escalas de porosidad se puede describir en dos etapas. En la primera, la energía de deformación se disipa por medio de la deformación de las células macroporosas hasta que se alcanza el primer valor máximo de esfuerzo en la compresión, de modo que estas macrocélulas se colapsan e inician la densificación del material como se explicó anteriormente. En la segunda etapa, la energía de deformación se disipa por la deformación de las células mesoporosas, alcanzando un nuevo valor de

compresión máxima, seguido por el colapso de las mesocélulas y finalmente por la correspondiente densificación. (Alonso *et al.*, 2017) (Maskery *et al.*, 2016)

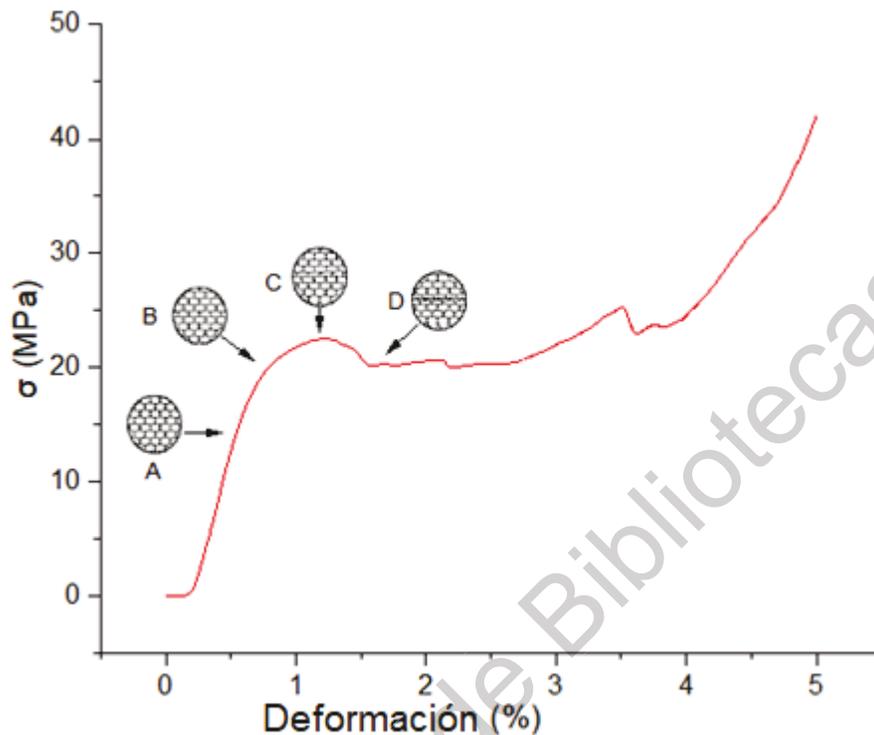


Figura 4.14 Gráfica típica de esfuerzo vs deformación para un material celular bajo compresión.

Las propiedades mecánicas de un material de implante óseo deben ser semejantes a aquellas que tienen los huesos receptores, y así transferir adecuadamente la carga y evitar la acumulación de esfuerzos que puedan provocar rupturas. Estas propiedades varían dependiendo del tipo de hueso. El esfuerzo máximo a la compresión varía entre 100 y 200 MPa para el hueso compacto y entre 2 y 20 MPa para el hueso trabecular. (Fu *et al.*, 2011)

Las pruebas mecánicas se realizaron con los materiales compuestos que tenía las fibras de HAp como materia prima. Las probetas tenían una forma cúbica con una dimensión de 5 cm de lado y una relación volumétrica de HAp:PMMA de 1:2 y se utilizaron dos concentraciones de grenetina, de 14.9% en peso y otro de 19.5% en peso.

Para las muestras con una concentración de grenetina de 14.9% en peso, el peso total de cada probeta en promedio fue de 0.15 gramos y contenían un 47% de fase orgánica en promedio. Mientras que para las muestras que tenían una concentración de grenetina de 19.5% en peso, el peso total de cada probeta en promedio fue de 0.17 gramos y en promedio las muestras contenían un 51% de fase orgánica.

Como es posible observar, las gráficas de esfuerzo versus deformación de todos los materiales ensayados mostraron un comportamiento de material celular similar al descrito en la figura 4.14, y por ello, podemos afirmar que el material compuesto que se obtuvo en este trabajo es de este tipo. La resistencia mecánica en compresión aumenta cuando el contenido de la fase orgánica se incrementa. Las figuras 4.15 y 4.16 muestran que los esfuerzos máximos promedio fueron de 22.06 MPa y 24.63 MPa para los materiales compuestos que tenían una concentración de grenetina de 14.9% y 19.5% en peso, respectivamente. Mientras que los módulos de Young promedio fueron de 43.26 y 55.2 respectivamente.

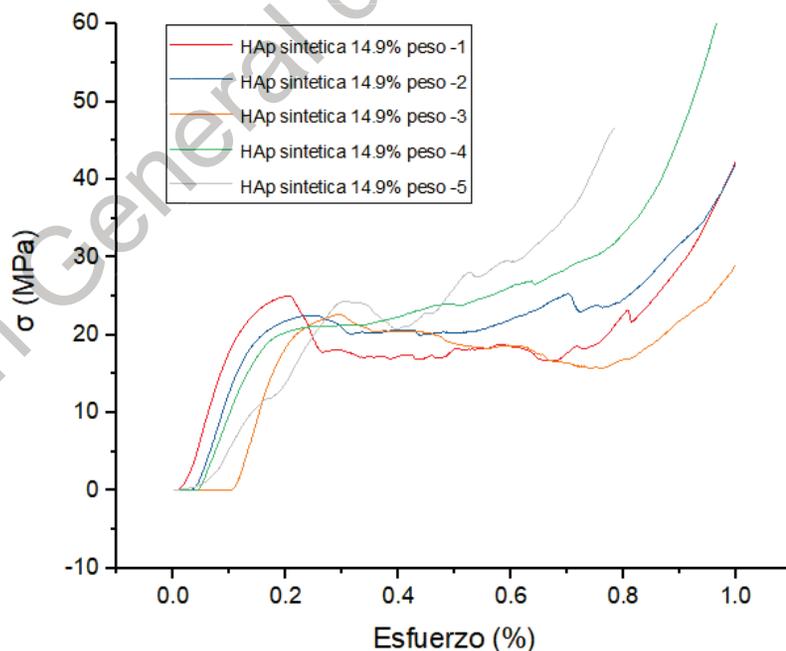


Figura 4.15 Grafica esfuerzo-deformación de los materiales compuestos con concentración de grenetina de 14.9% en peso.

En las gráficas de la figura 4.15, se puede ver claramente que después de alcanzar el esfuerzo máximo en compresión, la resistencia de los materiales cae abruptamente debido al colapso de las macrocélulas en el volumen de los materiales compuestos y posteriormente, hay incrementos pequeños en el esfuerzo seguidos por caídas en la resistencia de los materiales, las cuales se produjeron al ir colapsando la mesoporosidad del material, hasta darse la densificación total y la ruptura de las probetas. Con lo anterior, se ratifica la macroporosidad observada a través del SEM.

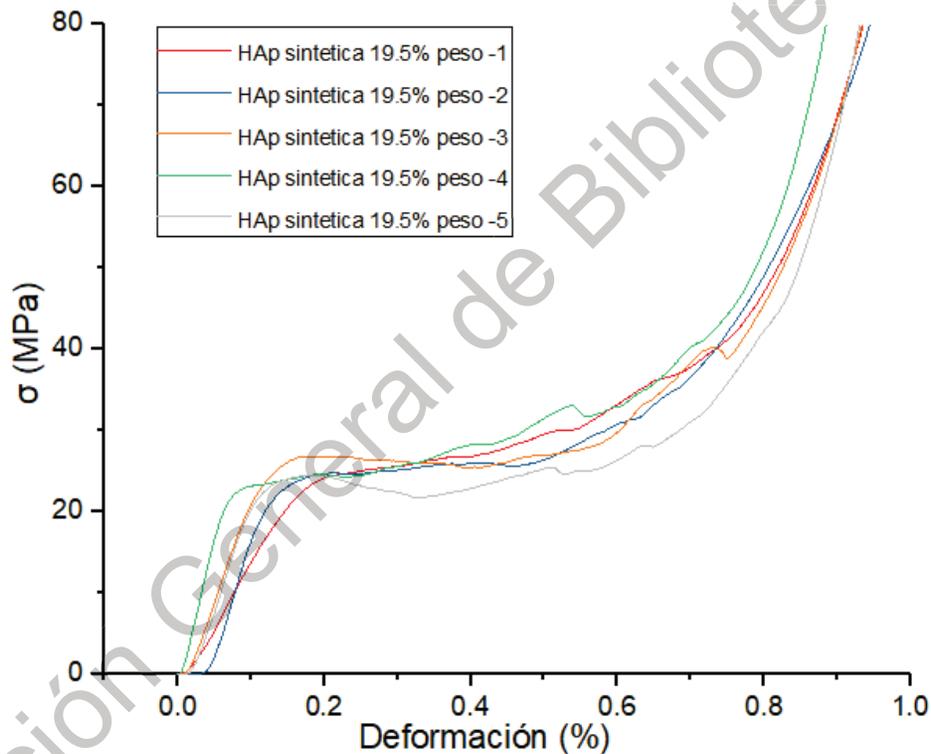


Figura 4.16 Grafica esfuerzo-deformación de los materiales compuestos con concentración de grenetina de 19.5% en peso.

Para el caso de las muestras de material compuesto con 19.5% de grenetina, se puede ver en la figura 4.16 que estos experimentaron un menor descenso en su resistencia en compresión, después de alcanzar su esfuerzo

máximo, y casi no son observables posteriores incrementos y decrementos en su resistencia. Lo anterior da evidencia que estos materiales tienen una macroporosidad de menor tamaño generada así, por el incremento en el contenido de fase orgánica.

Con el fin de proporcionar un panorama más detallado del comportamiento mecánico de los materiales compuestos analizados y de la influencia del contenido de fase orgánica en su resistencia, se muestra la Figura 4.17 en donde se puede ver que los materiales compuestos que utilizan la HAp sintética como materia prima que se representan con colores rojo y amarillo tienen una mayor resistencia a la compresión que los materiales compuestos con HAp comercial presentados con colores verde y azul.

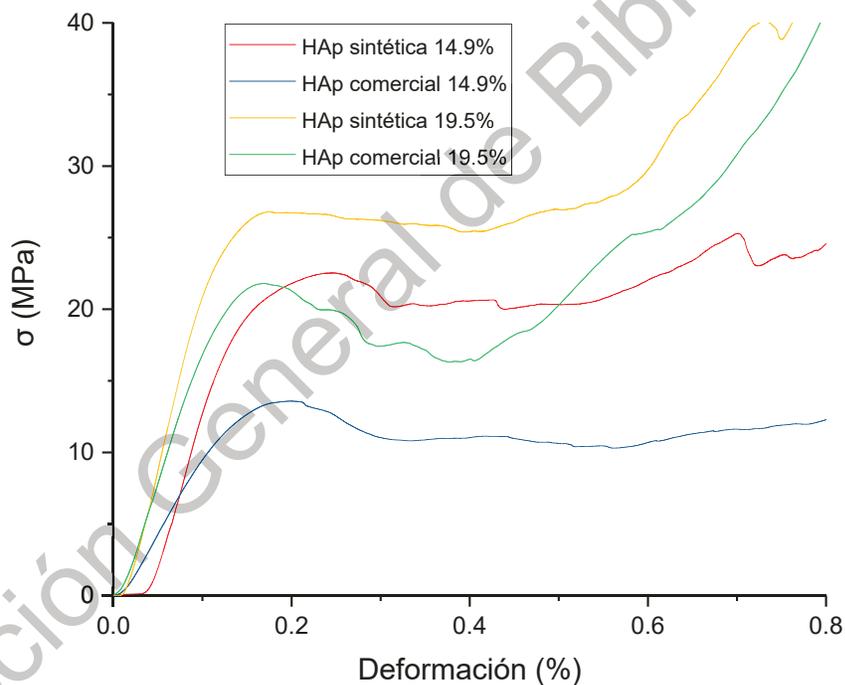


Figura 4.17 Curvas esfuerzo-deformación para los dos tipos de materiales nanocompuestos (sintética y comercial) con 14.9% y 19.5% en peso de solución de grenetina.

Estos mismos valores se analizan numéricamente en la Tabla 4-3 donde se comparan los valores de esfuerzo máximo y de módulo de Young promedios obtenidos de los ensayos en compresión de cinco muestras de cada formulación de

material compuesto, tanto para los materiales hechos con HAp comercial, como para aquellos elaborados utilizando las nanofibras de HAp.

Tabla 4-3 Tabla de los valores de resistencia mecánica de los materiales compuestos.

Material Compuesto	Peso del material compuesto	% de Fase Orgánica	Módulo de Young	Máximo Esfuerzo
HAp Comercial 14.9 %	0.14	47	19.51	13.19
HAp Comercial 19.5 %	0.16	44	30.48	20.43
HAp Sintética 14.9 %	0.15	42	43.26	22.06
HAp Sintética 19.5 %	0.17	44	55.2	24.63

De los datos de la tabla anterior, se puede mencionar que, si bien ambos tipos de materiales compuestos son adecuados para su uso como biomaterial de implante óseo, debido a que su resistencia mecánica es similar a la del hueso trabecular humano, ya que ambos están entre 2 y 20 MPa. Es necesario enfatizar también que, al comparar estos dos tipos de materiales compuestos, podemos concluir que aquellos elaborados con nanofibras de HAp mostraron tener una mayor resistencia mecánica. La morfología de fibra, la alta calidad cristalina y la orientación preferencial de la HAp en estas fibras, aportaron a las propiedades mecánicas del material compuesto de forma significativa. Una diferencia importante entre estos dos tipos de materiales radica en su porosidad, la macroporosidad presente en los materiales compuestos con fibras es mayor y con el tamaño adecuado para permitir el flujo de sustancias y células. También hay que mencionar que, para ambos tipos de materiales compuestos, la interacción química entre ambas fases fue relevante, lo que promovió la integración de las mismas para formar a los materiales compuestos, y ello creó una sinergia que tuvo un impacto en las propiedades mecánicas.

4.8. Microtomografía 3D de Rayos X

Se realizó el análisis de microtomografía 3D de rayos X para estudiar la porosidad y permeabilidad de los materiales compuestos. Como se mencionó anteriormente, se obtuvieron 6000 imágenes de corte para reconstruir la muestra en un objeto digital 3D, lo que permitió visualizar al sólido virtual. Una vez obtenida la imagen tridimensional (figura 4.18), se obtuvo una submuestra cúbica con una longitud de 600 voxeles por lado (cubos de 4.8 mm de lado), esto con el fin de eliminar el ruido existente en los bordes y para homogeneizar los datos (figura 4.19).



Figura 4.18 Imagen 3D Digitalizada de la muestra del material compuesto de HAp con fibras

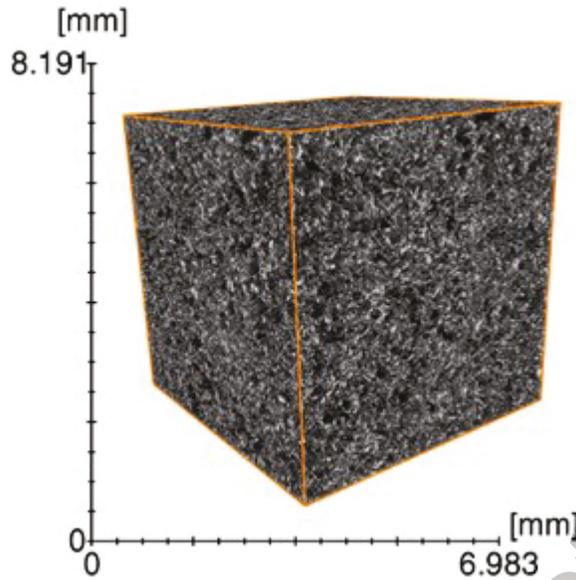


Figura 4.19 Submuestra del material compuesto con 600 voxeles de lado

Una vez que las muestras fueron recortadas, el siguiente paso consistió en eliminar el ruido propio de las muestras y permitir una mejor diferenciación entre fases para su posterior segmentación, todo esto a través del uso de filtros. El primer filtrado consistió en aplicar el módulo “*Anisotropic Diffusion*”, el cual resaltó los bordes entre sólido y poro, posteriormente se usó el módulo “*Non local Means*”, que eliminó el ruido propio del análisis y ayudó a diferenciar fases. Los resultados de la aplicación de estos filtros pueden observarse en la figura 4.20.

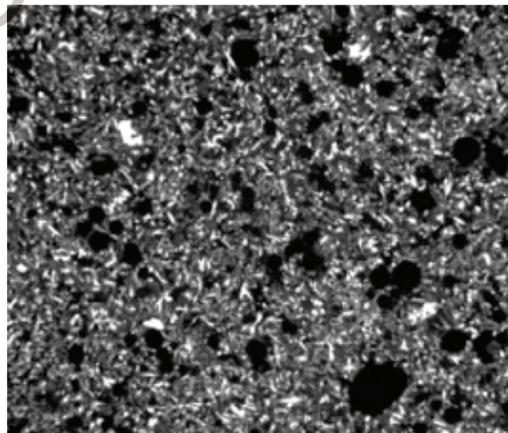


Figura 4.20 Muestra del material compuesto hecho con fibras después de la aplicación de los filtros

Teniendo las muestras filtradas se procedió a la segmentación del medio poroso a través del módulo “*Auto Tresholding*” el cual se basa en el método de (Otsu, 1979) (figura 4.21). Una vez separado el medio poroso en ambas muestras, se determinó la porosidad a través del módulo “*Volume Fraction*”, posteriormente se realizó un análisis de conectividad, exhibiendo porosidad interconectada (figura 4.22).

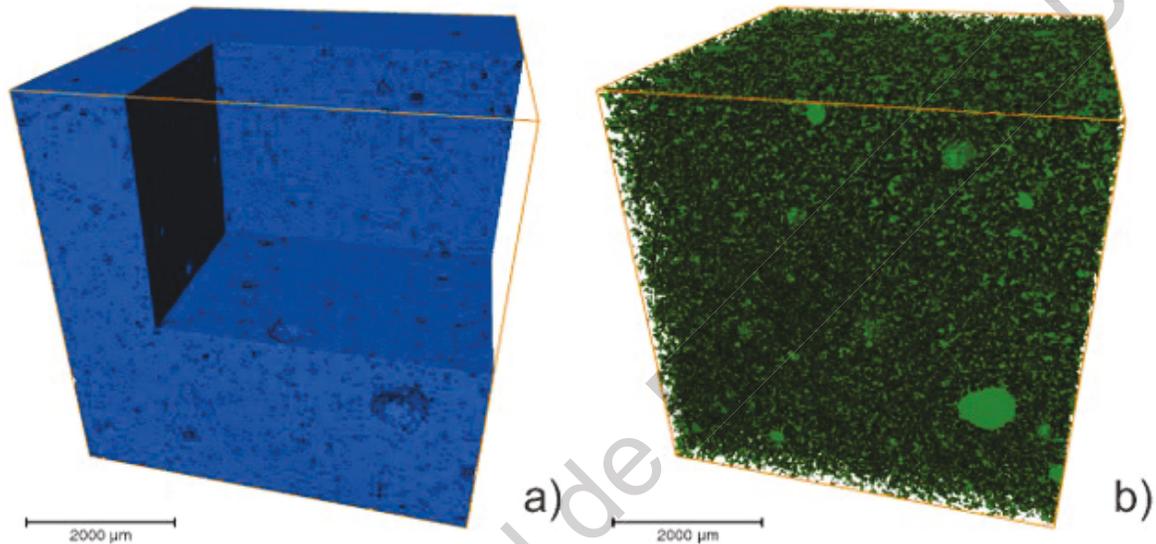


Figura 4.21 (a) Matriz de la muestra de material compuesto hecho con fibras de HAp con visualización de sección interna, (b) medio poroso de la muestra

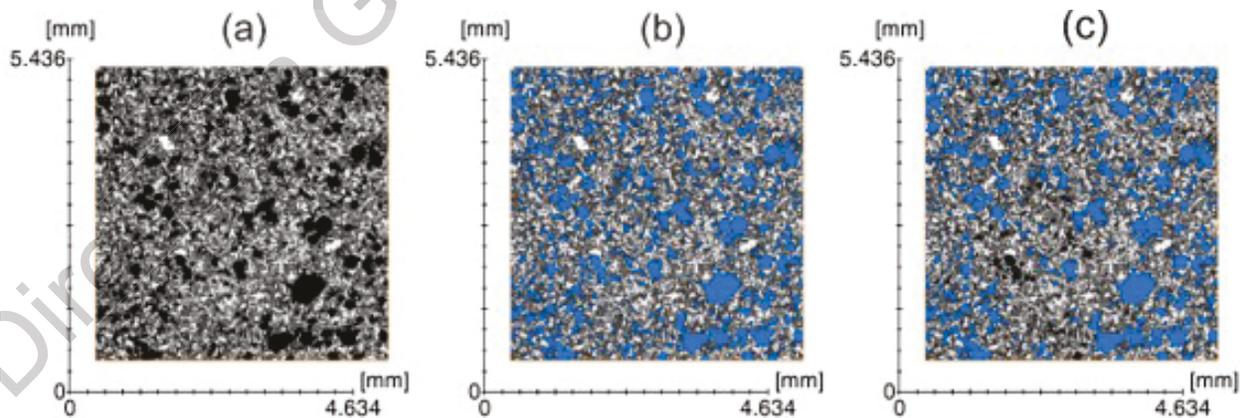


Figura 4.22 (a) muestra filtrada del material compuesto hecho de fibras, (b) poros de la muestra demarcados en azul, (c) porosidad interconectada señalada en el material compuesto.

La simulación de permeabilidad se realizó a lo largo del eje z de la muestra de material compuesto hecho con fibras de HAp, es decir, a lo largo del eje axial. En los parámetros se usó una presión de 130,000 Pa de entrada y 100,000 Pa de salida, así como un criterio de convergencia de $1e-5$, con el cual se empezó a tener un comportamiento asintótico en la gráfica de error, validando el resultado de la simulación. En la figura 4.23 se observan las líneas de flujo que indican la velocidad del fluido dentro del medio poroso.

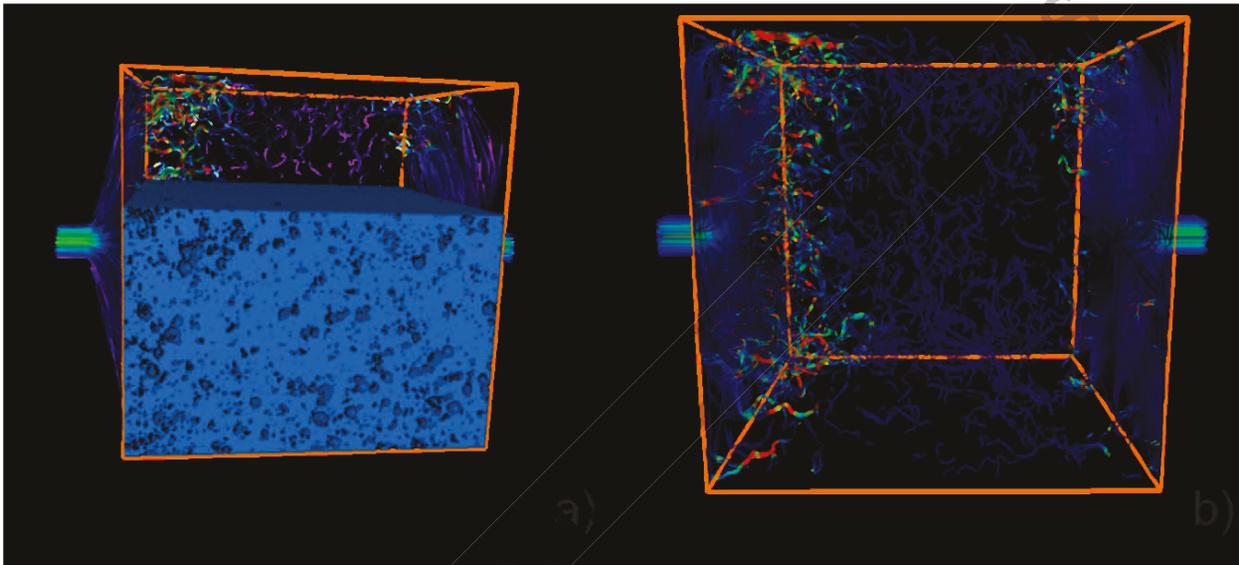


Figura 4.23 a) Líneas de flujo dentro de la muestra de material compuesto hecho con fibras, en azul se observa la matriz sólida, b) líneas de flujo al interior de la muestra.

Una vez identificado y segmentado el medio poroso, se procedió a separar individualmente cada poro, esto con el fin de realizar análisis estadísticos y morfológicos. Para ello se usaron los módulos “*Separate Objects*” y “*Labeling*”, este proceso fue optimizado aplicando un “*resample*” de la muestra, es decir, cada voxel fue dividido en 8 voxeles, mejorando así el contorno de separación existente entre los poros, el resultado de la separación se muestra en la figura 4.24.

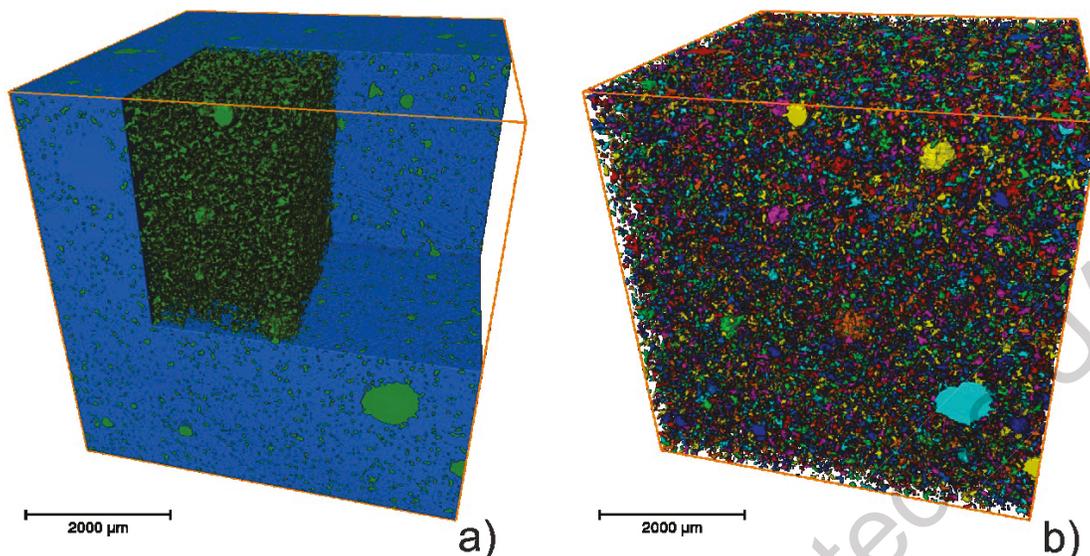


Figura 4.24 Muestra con matriz en azul y poros en verde, b) muestra con los poros separados, para esta muestra de material hecho con fibras, se contabilizaron 276 006 poros

Teniendo los poros separados de manera individual, se hizo un análisis estadístico en el que se obtuvo el diámetro equivalente, longitud, volumen y esfericidad de cada poro y los resultados son presentados en la Tabla 4-4

Tabla 4-4 Información estadística de los poros de la muestra

	Diámetro equivalente (μm)	Volumen de poro (μm^3)	Esfericidad (%)
Promedio	41.33	38740.4	71.16
Máximo	489.62	6.15×10^7	96.85
Mínimo	19.84	63.92	34.07

Finalmente, en la Tabla 4-5 fila 1 se observa que a la resolución de (8.00 $\mu\text{m}/\text{pixel}$) que la porosidad total es de 16.19% y la porosidad interconectada es de 13.44%, en comparación la porosidad total no es mucho mayor por lo que se podría decir que la mayor cantidad de la porosidad en este material es una porosidad interconectada.

Tabla 4-5 Resultados de porosidad y permeabilidad de la muestra

	Porosidad Total (%)	Porosidad efectiva (%)	Permeabilidad (mD)
Material Compuesto con HAp sintética	16.19%	13.44%	306.84
Material Compuesto con HAp comercial	16.72%	15.33%	257.4

Mientras que en la fila 2 se muestra los resultados de porosidad del material compuesto con HAp comercial obtenidos del artículo publicado por Alonso *et al.* en 2017 donde se puede observar que la porosidad de los materiales es en porcentaje similar y en porosidad interconectada es 2 % superior aunque en permeabilidad es superior la de el material compuesto con HAp sintética lo cual es deseable por que si el tejido no es permeable se puede necrosar.

Con estos resultados de porosidad y permeabilidad se comprueba que el proceso de moldeo (Gel Casting Modificado) con la integración de una fase orgánica forma un material compuesto con porosidad interconectada que podría ser capaz de permitir la penetración celular, el crecimiento de tejido óseo interno, incursión vascular y suministro de nutrientes.

4.9. Ensayos de pruebas In Vivo para evaluar la biocompatibilidad en ratas

Para obtener los controles negativos se realizó una sutura con hilo quirúrgico sin colocar material. La figura 4.25 muestra un ejemplo del control negativo del músculo de la rata. En las siguientes figuras 4.26, 4.27, 4.28 y 4.29 se muestran los cortes histológicos del músculo con los diferentes materiales compuestos con HAp sintética implantados.

En las imágenes 4.26 y 4.27 correspondientes a los cortes histológicos realizado a los 45 días de implante del material compuesto, se identifican tejidos

blandos con presencia de infiltrado inflamatorio mononuclear con abundantes histiocitos epitelioides que se agrupan formando células gigantes tipo cuerpo extraño. Dentro de las células gigantes se puede observar un material fagocitado que corresponde a los materiales compuestos implantados.

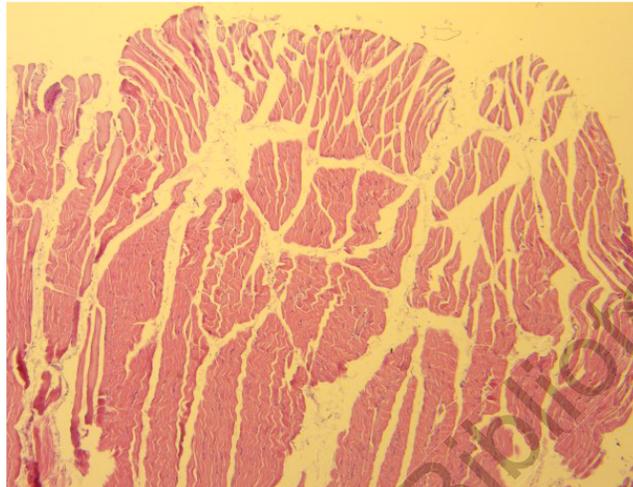


Figura 4.25 Control negativo del músculo

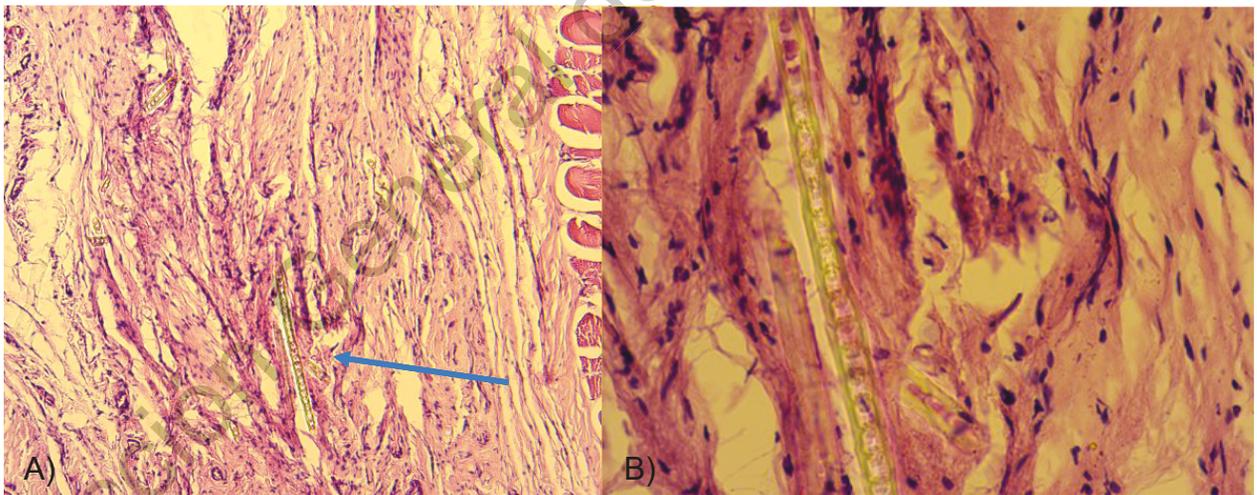


Figura 4.26 a) Corte histológico de músculo con inflamación crónica (45 días) (presencia de células gigante tipo cuerpo extraño) producida por material compuesto con HAp sintética 14.9%. b) Acercamiento de la inflamación en el músculo.

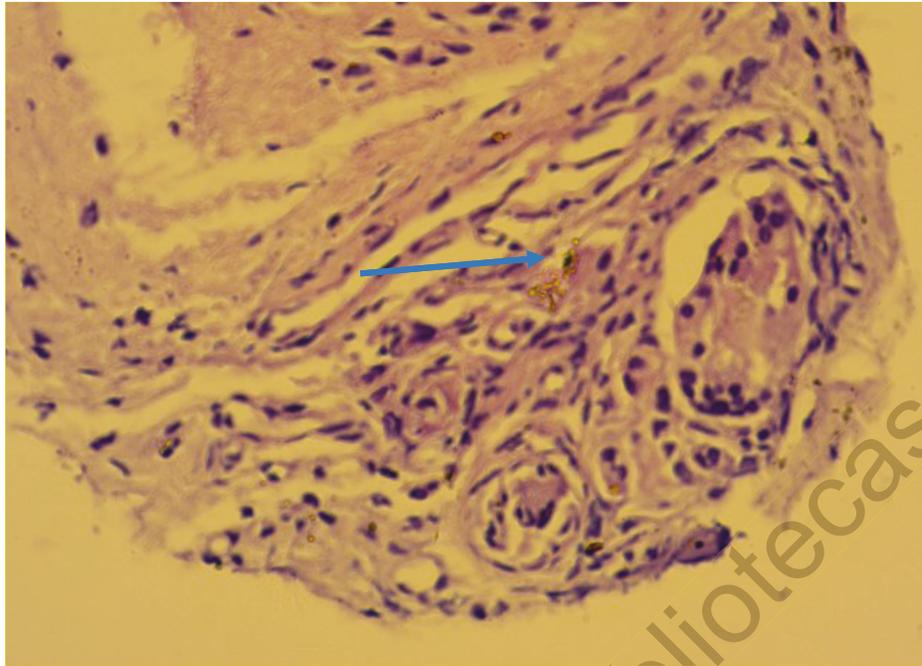


Figura 4.27 Corte histológico de musculo con inflamación crónica con presencia de células gigante tipo cuerpo extraño (45 días), producida por el material compuesto con HAp sintética 19.5%.

Las Figuras 4.28 y 4.29 al igual que las Figuras 4.26 y 4.27 muestran un corte histológico pero estos cortes fueron realizados a los 90 días, en los cuales se podrá observar que solo produjeron reacciones de tipo inflamación crónica (macrófagos, células plasmáticas, cápsulas de neutrófilos y linfocitos) post implante, esto quiere decir que presentaron una menor reacción inflamatoria que la necrosis producida por la gasa. Además, es posible que el material se absorbió por completo tras 90 días de implante.

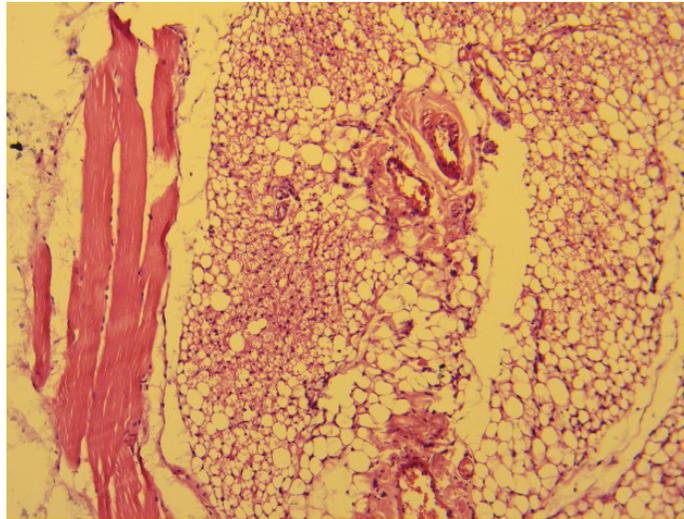


Figura 4.28 Corte histológico de musculo con inflamación crónica producida por el material compuesto con HAp sintética 14.9% pero sin presencia de células (90 días)

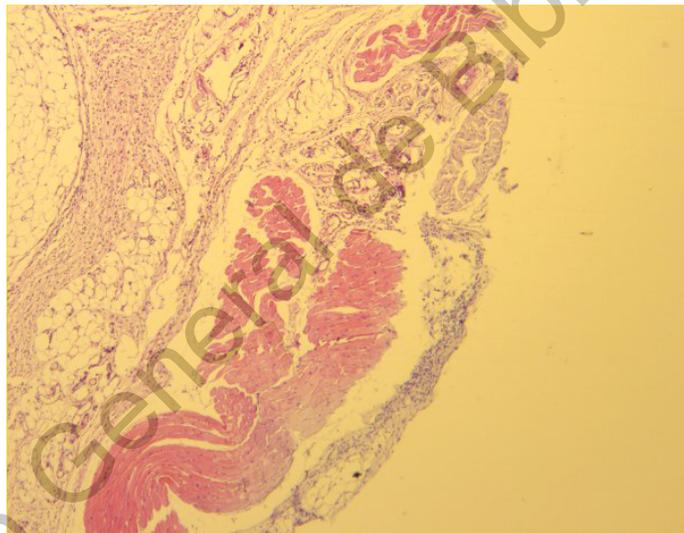


Figura 4.29 Corte histológico de musculo con inflamación crónica producida por el material compuesto con HAp sintética 19.5% pero sin presencia de células (90 días)

Con base en los resultados anteriores, podemos concluir que los materiales compuestos inorgánicos-orgánicos con porosidad controlada produjeron una respuesta inflamatoria poco relevante caracterizada como leve a moderada, sin mostrar necrosis en el tejido muscular de las ratas mostrando tener una buena biocompatibilidad y por ello, tienen una aplicación potencial como materiales de reemplazo de tejido óseo.

4.10. Ensayos de pruebas In Vivo en conejos

Después del tiempo de ensayo de 90 días, en el fémur de control aún se puede observar claramente el defecto óseo, el diámetro y profundidad del orificio tuvo pequeños cambios en sus dimensiones y alrededor de la horadación, se pudo observar un redondeo en los bordes con cierto crecimiento óseo, como se puede ver en la fotografía de la figura 4.30 (a). En la radiografía de este fémur, que aparece en la fotografía de la figura 4.30 (b), es evidente que la horadación aún se conserva. Es posible ver como los bordes en la zona más profunda de esta horadación se redondearon y se manifestó un crecimiento óseo alrededor. Una observación amplificada de la zona del orificio en el tejido óseo, se puede ver en la fotografía de la figura 4.30 (c), en ella es más evidente que se conserva la horadación, la cual aún se ve profunda, como se ve en la radiografía, y es notorio el crecimiento óseo que se presentó en los bordes de la horadación, lo cual es típico en el tejido óseo que no se puede regenerar y trata de formar este crecimiento en los bordes (callo) para tratar de tener más soporte mecánico.

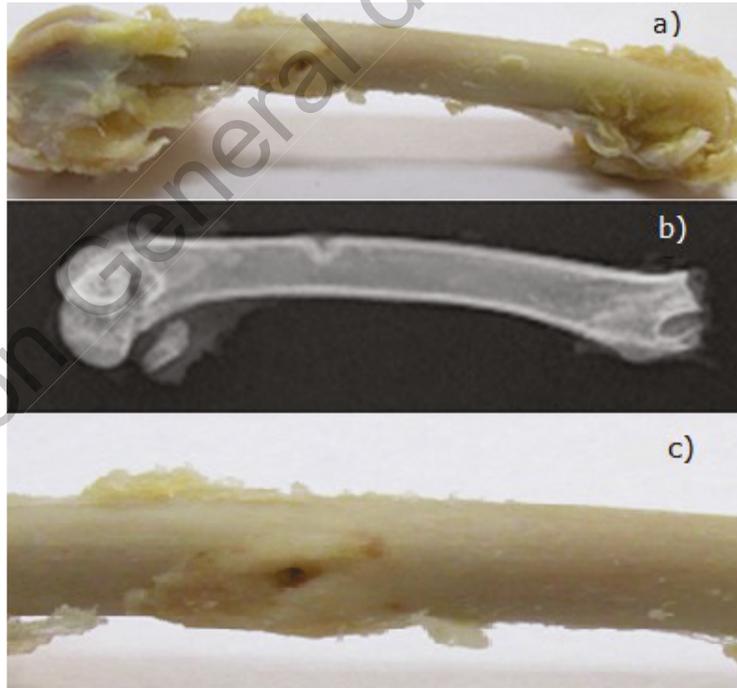


Figura 4.30 a) Fotografía del fémur de control en donde se puede observar la lesión ósea sin implante. b) Radiografía lateral del fémur en donde se observan que los bordes son más redondeados y hay crecimiento óseo alrededor. c) Fotografía amplificada de la lesión del fémur sin implante, en donde se observan que los bordes son más redondeados y hay presente crecimiento óseo alrededor.

Para el caso del fémur en donde se colocó el implante formado por el material compuesto conteniendo HAp comercial y con un contenido de 19.5% de fase orgánica, se puede ver que la recuperación del tejido óseo dañado está muy avanzada. En la fotografía de la figura 4.31 (a) es posible ver un pequeño orificio, de alrededor de 2 mm de diámetro en la superficie del hueso. En la radiografía de este fémur, que se observa en la fotografía de la misma figura (b), se puede apreciar que la lesión aún perdura, siendo ésta muy pequeña y superficial de 1 a 2 mm de profundidad y localizada en el periostio. En los bordes del orificio se observa un redondeo en el tejido óseo producto de la formación de un pequeño callo, pero éste no es tan notorio como el que se formó en el fémur sin material de implante. En la fotografía de la figura 4.31 (c), se ve con más claridad que la lesión en el tejido óseo casi cerró por completo, es muy superficial y de diámetro muy pequeño. El diámetro remanente de la lesión es pequeño, y puede deberse en parte, por el proceso de recuperación del tejido óseo y también, por el crecimiento de tejido alrededor del orificio, lo cual produjo bordes ligeramente redondeados



Figura 4.31 a) Fotografía del fémur en donde se implanto el material compuesto formado de HAp comercial y con 19.5% de fase orgánica. b) Radiografía lateral del fémur los bordes son poco redondeados y hay un ligero crecimiento óseo alrededor. c) Fotografía ampliada de la lesión del fémur, en donde se observa la lesión y sus bordes ligeramente redondeados.

Estos dos factores contribuyeron a que el tamaño de la lesión en la superficie del hueso fuera más pequeño de lo que es en su interior, pero la lesión aún está presente como se puede ver en la radiografía (b). Con lo anterior podemos decir que el material de implante facilitó a la regeneración del tejido óseo.

Finalmente, también se presentan fotografías de uno de los fémures en donde se implantó el material compuesto formado de HAp sintetizada por nuestro grupo de trabajo conteniendo 19.5% de fase orgánica. Se puede observar en la figura 4.32 el grado de recuperación de la lesión en el tejido óseo. En la fotografía a) de la figura 4.32 que la lesión se ha recuperado casi por completo y es notoria su reducción en su diámetro y su profundidad. También se observa que no existe diferencia del tejido óseo en los bordes del orificio, lo cual es indicativo de que el crecimiento óseo ha sido muy homogéneo en esa zona. La radiografía de ese fémur, que aparece en la fotografía b) de la misma figura, muestra que la recuperación del tejido óseo ha sido casi por completo y los rastros de la lesión del hueso son muy superficiales, prácticamente han desaparecido, y no se ven bordes redondeados alrededor del orificio. Hay evidencia de que el crecimiento de tejido óseo nuevo ha sido muy homogéneo.

En un acercamiento a la lesión mostrado por la fotografía c) de la figura 4.32, se puede ver con claridad que el daño remanente en el hueso es más superficial que el observado para el material compuesto hecho de HAp comercial y se aprecia el crecimiento del tejido óseo, desde la pared del orificio hacia el centro del mismo, para tratar de llenar todo el espacio del hueco y no hay presencia de bordes redondeados en torno al orificio de la lesión. Lo anterior es indicativo de que el material de implante está funcionando como un andamiaje o puente que facilita la regeneración del tejido óseo.

Después de llevar a cabo los experimentos de implantación de los materiales compuestos con porosidad controlada, se puede mencionar lo siguiente. Nuestros experimentos han confirmado la biocompatibilidad del material compuesto en el modelo de ratón, ya que en su mayoría los materiales produjeron una respuesta inflamatoria poco relevante, mostrando tener una buena biocompatibilidad. Así

mismo, nuestro grupo de trabajo ha demostrado con estos experimentos in vivo la eficacia del material compuesto para ser utilizado como implante de tejido óseo. Se comprobó que los materiales compuestos son capaces de proporcionar el andamiaje que facilita el crecimiento del tejido óseo en su interior, y por lo tanto funcionan como un biomaterial que permite y promueve la regeneración natural del tejido óseo.

La presencia de la HAp en el material compuesto lo hace biocompatible, la morfología de nanofibra, pureza, calidad cristalina y orientación cristalográfica preferencial en la HAp, aportan a las propiedades mecánicas finales del material compuesto, lo que hace que los esfuerzos mecánicos no se concentren en el tejido óseo dañado. Lo anterior, puede ser un factor adicional que permita la recuperación del tejido óseo en un tiempo más corto.

La porosidad del material compuesto mostró tener una gran relevancia, sin duda esta porosidad en la escala macro, permitió el paso de los nutrientes necesarios y de las células encargadas de llevar a cabo la regeneración del tejido óseo. Al tener la facilidad para moverse de un sitio a otro dentro del volumen del material implantado, el trabajo celular para llevar a cabo la generación de nuevo tejido óseo se facilita.

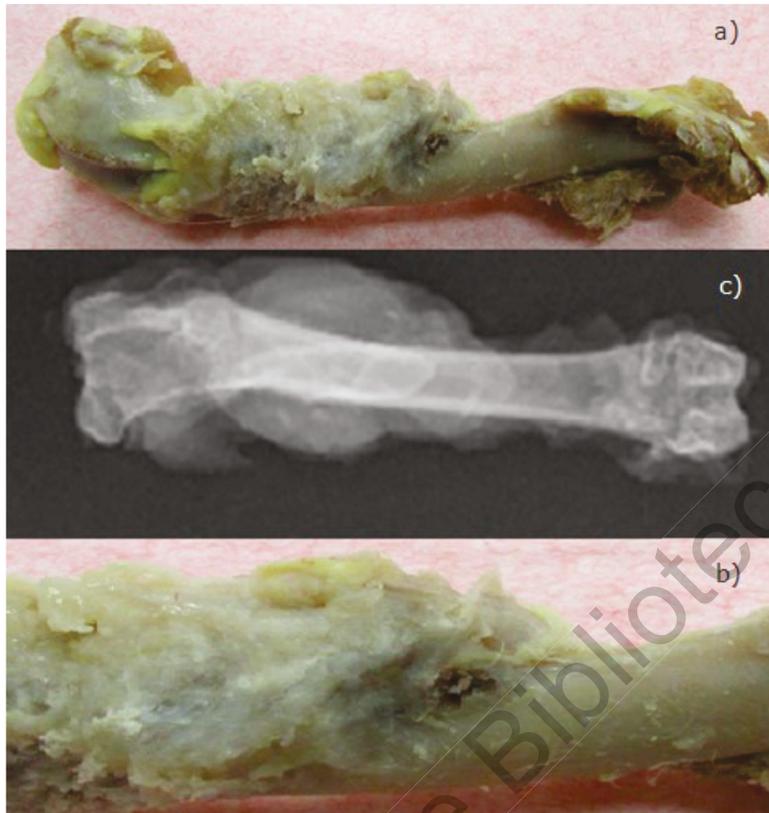


Figura 4.32 a) Fotografía del fémur en donde se implanto el material compuesto con HAp de nanofibras y con un contenido de 19.5% de fase orgánica. b) Radiografía lateral del fémur en donde se observan que no existe diferencia en el tejido óseo en los bordes de la lesión y hay un crecimiento óseo homogéneo. c) Fotografía ampliada de la lesión del fémur con implante, en donde se observa que sus bordes son planos y que se ha presentado un claro crecimiento óseo de las paredes del orificio hacia el centro del mismo.

5. CONCLUSIONES

El presente trabajo tuvo como objetivo central la elaboración de un biomaterial compuesto hecho a base de nanofibras de HAp y grenetina como fase orgánica, para ser utilizado como material de implante en el hueso que permita la regeneración del tejido óseo humano.

El análisis cristalográfico y estructural realizado en este trabajo, hizo evidente la influencia del control en las condiciones de reacción de síntesis (presión, y temperatura) sobre la morfología, la calidad cristalina y la orientación preferencial de la HAp sintetizada. El uso del ácido glutámico fue crucial para guiar el crecimiento cristalino y de esa forma obtener una morfología de fibra y una marcada orientación cristalina preferencial. El método hidrotérmal asistido por microondas demostró ser muy eficiente ahorrando tiempo y energía en las reacciones de síntesis, además de que fue un factor que contribuyó a la obtención de la HAp con las características antes mencionadas.

La morfología de fibra tuvo una influencia en los resultados de DRX, en donde se encontró una orientación cristalina preferencial en la dirección [300], la cual, en parte, es una consecuencia del ordenamiento de las fibras durante los experimentos de DRX. Asimismo, por medio de HRTEM, se encontró que las nanofibras crecieron a lo largo del eje "c" de la estructura cristalina de la HAp, en donde en principio, se tienen las mejores propiedades mecánicas.

La relación Ca/P que es vital para la biocompatibilidad de los materiales compuestos, y se encontró que los materiales compuestos están dentro del rango presente en el sistema óseo humano.

Las nanofibras mantuvieron su forma y dimensiones después del método Gel Casting Modificado y de la adición de la fase orgánica. Esto fue importante para la obtención de buenas propiedades mecánicas en el material compuesto.

El esfuerzo máximo promedio en compresión para los materiales compuestos elaborados con nanofibras de HAp y con contenido de grenetina de

14.9% y 19.5% en peso, fue de 22.06 y 24.63 MPa respectivamente, lo cual indica que estos materiales tienen una resistencia similar al hueso trabecular, y en comparación con los materiales hechos con HAp comercial, se encontró que su resistencia es superior, y se determinó que la morfología de fibra, la alta calidad cristalina y la orientación preferencial en la HAp, tuvieron una contribución relevante en las propiedades mecánicas de los materiales compuestos en compresión.

La porosidad en los materiales compuestos está en las escalas macro y meso, y la mayor parte de estos poros se encuentran interconectados, lo cual son factores relevantes, ya que esto permite el paso de sustancias, nutrientes y células necesarios para favorecer que se lleve a cabo el proceso de regeneración natural del tejido óseo, lo anterior se corrobora con el análisis de permeabilidad realizado.

Las pruebas In vivo demostraron que los materiales compuestos elaborados en este trabajo son totalmente biocompatibles, por lo que se les puede denominar biomateriales; además, se encontró que dichos materiales permitieron la regeneración del tejido óseo en fémures de conejo, en un tiempo de 90 días.

Finalmente es posible decir que, debido a que los materiales compuestos exhibieron una resistencia mecánica similar a la presente en el tejido óseo humano, una porosidad con las dimensiones e interconectividad adecuadas y una buena biocompatibilidad, es posible considerar el uso de este tipo de biomateriales para implante óseo y con ello, facilitar la regeneración del tejido.

6. PERSPECTIVAS

Como perspectivas, se propone trabajar en la síntesis de nanofibras de HAp utilizando otros aminoácidos como orientadores del crecimiento cristalino, y utilizar estas nanoestructuras en la elaboración de nuevos materiales compuestos y evaluar su impacto en las propiedades mecánicas y su biocompatibilidad.

También, se propone continuar trabajando en mejorar el tratamiento térmico posterior al proceso Gel Casting Modificado (temperatura y tiempo) con el propósito de incrementar la resistencia mecánica de las fibras de HAp, y por ende, del material compuesto. Finalmente, ensayar con otras fases orgánicas o combinación de ellas, con el objeto de incrementar las propiedades mecánicas y la biocompatibilidad de los biomateriales.

REFERENCIAS

- Alanis, J.R., Rivera, E.M., Cervantes, J.S., Almanza, H., Nava, R., Cortes, C. y Velázquez-Castillo, R. 2016. Synthesis of Micro and Nano-Sized Hydroxyapatite Fibers Through the Microwave Assisted Hydrothermal Method. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 16(7), pp.7557-7566.
- Alonso, S. 2013. Control de la macroporosidad de un material compuesto orgánico-inorgánico a base de hidroxiapatita: síntesis y caracterización. Tesis de Maestría, Querétaro, Qro.
- Alonso, S., Velázquez, R., Millán, B., Nava, R., Bucio, L., Manzano, A., Cid, H. y Rivera-Muñoz, E.M. 2017. Interconnected porosity analysis by 3D X-ray microtomography and mechanical behavior of biomimetic organic-inorganic composite materials. *Materials Science and Engineering: C*, 80, pp.45-53.
- Ashby, M.F. y Hunkin. 2006. An introduction to microstructures, processing and design, D.R. de Engineering Materials 2. Great Britain, BH.
- Arami, H., Mohajerani, M., Mazloumia, M., Khalifehzadeh, R., Laka, A. y Sadrnezhad, S.K. 2008. Rapid formation of hydroxyapatite nanostrips via microwave irradiation, Iran, *Journal of Alloys and Compounds* 469, 391–394.
- Brundavanam, R.K., Jiang, Z.T., Chapman, P., Le, X.T., Mondinos, N., Fawcett, D. y Poinern, G.E.J., 2011. Effect of dilute gelatine on the ultrasonic thermally assisted synthesis of nano hydroxyapatite. *Ultrasonics sonochemistry*, 18(3), pp.697-703.
- Campa, J., Ulloa, G. S, Bucio, L., Belío, I.A., Velázquez, R. y Rivera, E.M. 2007. Biomateriales. Fundamentos, Técnicas y Aplicaciones., Universidad de Guadalajara, Jalisco, México.
- Chu, P.K. y Liu, X. 2008. Biomaterials Fabrication and Processing. Handbook, CRC Press.
- Chung, S. y Webster, T. J. 2016. Antimicrobial nanostructured polyurethane scaffolds. In *Advances in Polyurethane Biomaterials* (pp. 503-521). Woodhead Publishing.
- Dos Santos, V., Brandalise, R.N. y Savaris, M., 2017. Engineering of Biomaterials.
- Driessens, F. C. M., Boltong, M. G., De Maeyer, E. A. P., Wenz, R., Nies, B. y Planell, J. A. (2002). The Ca/P range of nanoapatitic calcium phosphate cements. *Biomaterials*, 23(19), 4011-4017.
- Ducheyne, P. y Qiu Q. 1999. Bioactive ceramics: The effect of surface reactivity on bone formation and bone cell function. *Biomaterials* 20, 2287-2303.

- Fabbri, P., Valentini, L., Hum, J., Detsch, R. y Boccaccini, A.R., 2013. 45S5 Bioglass®-derived scaffolds coated with organic–inorganic hybrids containing graphene. *Materials Science and Engineering: C*, 33(7), pp.3592-3600.
- Fihri, A., Len, C., Varma, R.S. y Solhy, A., 2017. Hydroxyapatite: A review of syntheses, structure and applications in heterogeneous catalysis. *Coordination Chemistry Reviews*.
- Fu, Q., Saiz, E., Rahaman, M.N. y Tomsia, A.P. 2011. Bioactive glass scaffolds for bone tissue engineering: state of the art and future perspectives. *Review Materials Science and Engineering C*, vol. 31, pp. 1245-1256.
- García, M.V. y Reyes, J. LA HIDROXIAPATITA, SU IMPORTANCIA EN LOS TEJIDOS MINERALIZADOS Y SU APLICACIÓN BIOMÉDICA *Tip Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas [en línea]* 2006, [Fecha de consulta: 6 de septiembre de 2017] Disponible en:<<http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=43211937005>> ISSN 1405-888X.
- Gartner L.P., Hiatt J.L. y Strum J.M. 2014. *BRS Cell Biology and Histology*. Séptima Edición. Lippincott Williams & Wilkins, Baltimore, 374 pp. ISBN: 1608313212, 978-1608313211.
- Geneser, F. 2000. *Histología. Médica Panamericana*, 3era edición.
- Gorth, D., y Webster, T. J. 2011. Matrices for tissue engineering and regenerative medicine. In *Biomaterials for Artificial Organs* (pp. 270-286). Woodhead Publishing.
- Guo, X. 2011. *Gel Casting of high strength ceramics*. Chalmers University of Technology.
- Hafner, B. 2006. *Energy Dispersive Spectroscopy on the SEM: a primer*. [en línea] http://www.charfac.umn.edu/instruments/eds_on_sem_primer.pdf.
- Hayes, B.L., 2002. *Microwave synthesis: chemistry at the speed of light*. Cem Corporation.
- Hench, L.L. y Wilson, J. 1999. *An Introduction to Bioceramics*. World Scientific Publish, Singapore.
- Hirota, M., Hayakawa, T., Yoshinari, M., Ametani, A., Shima, T., Monden, Y., Ozawa, T., Sato, M., Koyama, C., Tamai, N. y Iwai, T. 2012. Hydroxyapatite coating for titanium fibre mesh scaffold enhances osteoblast activity and bone tissue formation. *International journal of oral and maxillofacial surgery*, 41(10), pp.1304-1309.

- Janney, M.A., Nunn, S.D., Walls, C.A., Omatete, O.O., Ogle, R.B., Kirby, G.H. y McMillan, A.D. Gelcasting, the handbook of ceramic engineering, Mohamed N. Rahaman, Editor, Marcel Dekker, 1998.
- Jansen, J.C., Arafat, A., Barakat, A.K. y Van Bekkum, H. 1992. Synthesis of Microporous Materials, vol. 1, Van Nostrand Reinhold, New York (NY), p. 507.
- Janssens, K. 2003. X-ray fluorescence analysis. Handbook of Spectroscopy, 1, pp.365-420.
- Johansson, H., Clark, P., Carlos, F., Oden, A., McCloskey, E.V. y Kanis, J.A. 2011. Increasing age-and sex-specific rates of hip fracture in Mexico: a survey of the Mexican institute of social security. Osteoporos Int. Aug;22(8):2359-64.
- Khang, G., Kim, M.S., Min, B.H., Lee, I., Rhee, J.M. y Bang, H., 2006. Scaffolds for tissue engineering. Tissue Eng Regen Med, 3(4), p.376.
- Kremsner, J.M. y Stadler, A., 2013. A Chemist's Guide to Microwave Synthesis: Basics, Equipment & Application Examples.
- Lee, L.M., 2013. Lippincott's Pocket Histology. Lippincott Williams & Wilkins.
- Li, P., Poon, Y.F., Li, W., Zhu, H.Y., Yeap, S.H., Cao, Y., Qi, X., Zhou, C., Lamrani, M., Beuerman, R.W. y Kang, E.T., 2011. A polycationic antimicrobial and biocompatible hydrogel with microbe membrane suctioning ability. Nature materials, 10(2), p.149.
- Lin, K., Chang, J., Liu, X., Chen, L. y Zhou, Y. 2011. Synthesis of element-substituted hydroxyapatite with controllable morphology and chemical composition using calcium silicate as precursor. CrystEngComm, 13(15), 4850-4855.
- Liu, Y., Dang, Z., Wang, Y., Huang, J. y Li, H., 2014. Hydroxyapatite/graphene-nanosheet composite coatings deposited by vacuum cold spraying for biomedical applications: inherited nanostructures and enhanced properties. Carbon, 67, pp.250-259.
- Lodish, H., 2008. Molecular cell biology. Macmillan.
- Lü, L.X., Zhang, X.F., Wang, Y.Y., Ortiz, L., Mao, X., Jiang, Z.L., Xiao, Z.D. y Huang, N.P., 2013. Effects of hydroxyapatite-containing composite nanofibers on osteogenesis of mesenchymal stem cells in vitro and bone regeneration in vivo. ACS applied materials & interfaces, 5(2), pp.319-330.
- Ma, G. y Liu, X.Y. 2009. Hydroxyapatite: hexagonal or monoclinic?. Crystal Growth and Design, 9(7), pp.2991-2994.

- Mallick, K.K. y Cox, S.C. 2013. Biomaterial scaffolds for tissue engineering. *Frontiers in bioscience (Elite edition)*, 5, pp.341-360.
- Mallick, K.K. 2009. Development, synthesis and characterization of porous biomaterial scaffolds for tissue engineering. *Advances in biomedical and biomimetic materials*, Ceramic Transactions Book Series 206, 115-128.
- Maskery, I., Aboulkhair, N. T., Aremu, A. O., Tuck, C. J., Ashcroft, I. A., Wildman, R. D., & Hague, R. J. 2016. A mechanical property evaluation of graded density Al-Si10-Mg lattice structures manufactured by selective laser melting. *Materials Science and Engineering: A*, 670, 264-274.
- Méndez, N., Velázquez, R., Rivera, E.M., Bucio, L., Mondragón, G., Manzano, A., Ocampo, M.Á. y Apátiga, L.M. 2017. Crystal growth and structural analysis of hydroxyapatite nanofibers synthesized by the hydrothermal microwave-assisted method. *Ceramics International*, 43(1), pp.451-457.
- Mkhabela V.J. y Sinha S. 2014. Poly(ϵ -caprolactone) nanocomposite scaffolds for tissue engineering: A brief overview. *J. Nanosci. Nanotechnol.* 14, 535.
- Mohanty, A.K., Misra, M. y Drzal, L.T. 2005. *Natural fibers, biopolymers, and biocomposites*. CRC press.
- Mucalo, M. 2015. *Hydroxyapatite (HAp) for biomedical applications*. Elsevier.
- Oh, S.H., Kang, S.G. y Lee, J.H. 2006. Degradation behavior of hydrophilized PLGA scaffolds prepared by melt-molding particulate-leaching method: comparison with control hydrophobic one. *J Mater Sci Mater Med*, 17, pp. 131-137.
- Otsu, N. 1979. A threshold selection method from gray-level histograms. *IEEE Transactions on Systems, Man, and Cybernetics*, 9(1), 62-66. <https://doi.org/10.1109/TSMC.1979.4310076>
- Prakasam, M., Locs, J., Salma-Ancane, K., Loca, D., Largeteau, A. y Berzina-Cimdina, L., 2015. Fabrication, properties and applications of dense hydroxyapatite: a review. *Journal of functional biomaterials*, 6(4), pp.1099-1140.
- Ramachandran, G.N. y Ramakrishnan C. 1976. *Biochemistry of Collagen*. Ramachandran GN and Reddi AH (eds.) Plenum, New York pp. 45-84.
- Rivera, E.M., Velázquez, R., y Cabrera, J.L. 2010 Morphological Analysis de Hydroxyapatite Particles Obtained By Different Methods. *Materials Science Forum Vols. 638-642* pp 681-686.
- Robey, P.G. y Boskey, A.L., 2009. *The composition of bone. Primer on the bone metabolic diseases and disorders of mineral metabolism*. Seventh ed. Official

publication of the American Society for Bone and Mineral Research, pp.32-38.

Rochow, T.G. and Rochow, E.G., 1978. Scanning Electron Microscopy. In An Introduction to Microscopy by Means of Light, Electrons, X-Rays, or Ultrasound (pp. 273-298). Springer US.

Ross, M.H. y Pawlina W. 2013. Histología, Texto y Atlas Color con Biología Celular y Molecular, 6ta Edición, p 218-230.

Stojilovic, N., 2012. Why Can't We See Hydrogen in X-ray Photoelectron Spectroscopy?. Journal of Chemical Education, 89(10), pp.1331-1332.

Tripathi, G. y Basu, B. 2011. A porous hydroxyapatite scaffold for bone tissue engineering: Physico-mechanical and biological evaluations. Ceramics International.

Valeri S. G. y Aleksandra C. 2012. Hydroxyapatite: Synthesis, properties and applications. Chapter 2. Nova Sciences Pub. Pp91-132.

Vallet, M. 2011. Biocerámicas: Evolución y Aplicaciones. *Real Sociedad Española de Química*,.

Velasco, M.A. y Garzón, D.A., 2010. Implantes Scaffolds para regeneración ósea.: Materiales, técnicas y modelado mediante sistemas de reacción-difusión. Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas, 29(1), pp.0-0.

Venkatesan, J. y Kim, S.K., 2014. Nano-hydroxyapatite composite biomaterials for bone tissue engineering—a review. Journal of biomedical nanotechnology, 10(10), pp.3124-3140.

Wang, J. y Liu, C., 2014. Biomimetic collagen/hydroxyapatite composite scaffolds: fabrication and characterizations. Journal of Bionic Engineering, 11(4), pp.600-609.

Williams, D.F. 1999. The Williams dictionary of biomaterials. Liverpool University Press.

Williams, D.F., 2009. On the nature of biomaterials. Biomaterials, 30(30), pp.5897-5909.

Wojak-Cwik, I.M., Hintze, V., Schnabelrauch, M., Moeller, S., Dobrzynski, P., Pamula, E. y Scharnweber, D., 2013. Poly (L-lactide-co-glycolide) scaffolds coated with collagen and glycosaminoglycans: Impact on proliferation and osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. Journal of Biomedical Materials Research Part A, 101(11), pp.3109-3122.

Wu, S., Liu, X., Yeung, K.W., Liu, C. y Yang, X. 2014. Biomimetic porous scaffolds for bone tissue engineering. *Materials Science and Engineering: R: Reports*, 80, pp.1-36.

Zakaria, S.M., Sharif Zein, S.H., Othman, M.R., Yang, F. y Jansen, J.A., 2013. Nanophase hydroxyapatite as a biomaterial in advanced hard tissue engineering: a review. *Tissue Engineering Part B: Reviews*, 19(5), pp.431-441.

Zanchetta, J. y MacDonald, S. 2012. The Latin America regional audit. *Epidemiology, costs & burden of osteoporosis in*.

Zeng, F., Wang, J., Wu, Y., Yu, Y., Tang, W., Yin, M. y Liu, C., 2014. Preparation of pore expanded mesoporous hydroxyapatite via auxiliary solubilizing template method. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 441, pp.737-743.

Zhang, J., Nie, J., Zhang, Q., Li, Y., Wang, Z. and Hu, Q., 2014. Preparation and characterization of bionic bone structure chitosan/hydroxyapatite scaffold for bone tissue engineering. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, 25(1), pp.61-74.

Dirección General de Biotecnología UAQ