



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

LICENCIATURA EN CIENCIA DE MATERIALES
SUSTENTABLES

ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS SUPERIORES
UNIDAD MORELIA

SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE PREFORMAS
POROSAS PARA LA ELABORACIÓN DE ESPUMAS
SÓLIDAS

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

LICENCIADA EN CIENCIA DE MATERIALES
SUSTENTABLES

PRESENTA:

ANA BRENDA CALIHUA PANZO

DIRECTOR DE TESIS:

DR. ISMELI ALFONSO LÓPEZ

CO DIRECTORA DE TESIS:

DRA. CRISEIDA RUÍZ AGUILAR

Morelia, Michoacán

Agosto 2023



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

LICENCIATURA EN CIENCIA DE MATERIALES
SUSTENTABLES

ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS SUPERIORES
UNIDAD MORELIA

SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE PREFORMAS
POROSAS PARA LA ELABORACIÓN DE ESPUMAS
SÓLIDAS

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

LICENCIADA EN CIENCIA DE MATERIALES
SUSTENTABLES

PRESENTA:

ANA BRENDA CALIHUA PANZO

DIRECTOR DE TESIS:

DR. ISMELI ALFONSO LÓPEZ

CO DIRECTORA DE TESIS:

DRA. CRISEIDA RUÍZ AGUILAR

Morelia, Michoacán

Agosto 2023

Agradecimientos Institucionales

Un gran agradecimiento a la UNAM y a su sede la ENES Morelia. Agradezco también a la licenciatura en Ciencia de Materiales Sustentables y los proyectos UNAM-DGAPA-PAPIME: "PE100521" y del Programa UNAM-PAPIIT, proyecto "IN102719", programa al cual también agradezco la beca que se me otorgó para la conclusión de mis estudios. También agradezco el apoyo del Doctor Orlando Hernández Cristóbal para el uso del Microscopio Electrónico de Barrido de la ENES, Unidad Morelia.

Agradezco a los miembros del Jurado de Examen, constituido por el Dr. Orlando Hernández Cristobal, la Dra. Criseida Ruíz Aguilar, la Dra. Bertha Oliva Aguilar Reyes, la Dra. Alejandra Castro Carranza y el Dr. José Núñez Gonzáles por la atención brindada a este trabajo

A mis asesores la Doctora Criseida Aguilar y el Doctor Ismeli Alfonso López por ser tan pacientes conmigo, por darme la oportunidad de trabajar con ellos y aprender de ellos, por apoyarme y resolver mis dudas. Por no perderme de vista durante el proceso de desarrollo de tesis que parecía infinita.

Al Lic. Alejandro Rebollar Villagómez, a la Méd. Mónica Cortés y al Lic. Agustín Martínez Morales del Departamento de Servicios Escolares por guiarme y brindarme toda la información necesaria para hacer posible este trabajo de titulación.

Agradecimientos personales

A mi madre y a mi hermana que han sido mi mayor apoyo.

A Chucho que fue parte importante en la conclusión de este trabajo, por su apoyo incondicional y por creer en mi.

Así mismo, quiero agradecerle a la Doctora Yesenia y a la Doctora Claudia Briones por no dejarme rendir durante la carrera, por su apoyo en mi crecimiento emocional y académico, también agradezco a cada uno de mis profesores de la carrera, cada uno de ellos fue esencial en mi crecimiento, no sólo por el conocimiento académico compartido, sino, por sus valores, la preocupación que tienen por el medio ambiente, sus recursos y por su compromiso con la sociedad.

A la Doctora Karina Suárez que intervino en mi auxilio para poder comenzar y seguir adelante con la carrera.

Al Doctor Francisco Estrada que fue uno de los mejores profesores que tuve, gracias a sus palabras sentí que más que un profesor era un amigo.

A mis amigos más cercanos: Ricardo, Bananas, Misra, Aimee, Vianey, Ale, Rita, Naye y Ethel, por acompañarme en el camino de la "vida universitaria" y por ser mi familia en Morelia.

A los estudiantes del IIM, Unidad Morelia: Roger, Carlos, Berthita, Centli, Dianita, Alejandro Onchi y Brenda, por enseñarme tanto, y brindarme su amistad, sin lugar a dudas fueron parte importante en el desarrollo de éste trabajo.

A Chiki, Miguel y Cesar que siempre han sido mis ejemplos a seguir, que con sus locuras y su apoyo me han animado a no rendirme.

Contenido

1	INTRODUCCIÓN-GENERALIDADES	4
2	OBJETIVOS	7
2.1	OBJETIVO GENERAL	7
2.2	OBJETIVOS PARTICULARES	7
3	MARCO TEÓRICO	8
3.1	HUESOS	8
3.2	REMODELACIÓN ÓSEA	10
3.3	REGENERACIÓN ÓSEA	11
3.4	BIOMATERIAL	13
3.5	BIOCERÁMICAS	16
3.6	APATITAS	17
3.7	FOSFATOS DE CALCIO	18
3.7.1	Solubilidad de los fosfatos de calcio	18
3.7.2	Fosfatos de calcio: Propiedades físicas y químicas	20

3.8	IONÓMERO DE VIDRIO	21
3.9	HIDROXIAPATITA	22
3.10	PREFORMAS POROSAS	23
3.10.1	Técnicas de fabricación de andamios	24
3.10.2	Propiedades de los andamios de acuerdo con sus dimensiones	26
4	DESARROLLO EXPERIMENTAL	27
4.1	MATERIALES Y MÉTODOS	27
4.2	CARACTERÍSTICAS DE LAS DIFERENTES TÉCNICAS DE CAR- ACTERIZACIÓN	28
4.3	SÍNTESIS DE FOSFATOS DE CALCIO	28
4.4	PRUEBAS IN VITRO DE FOSFATOS DE CALCIO	33
4.5	FORMACIÓN DE ANDAMIOS POROSOS DE FOSFATOS DE CALCIO	34
4.6	FABRICACIÓN DE ANDAMIOS PARA APLICACIONES EN RE- GENERACIÓN ÓSEA	36
5	RESULTADOS	38
5.1	SÍNTESIS DE FOSFATOS DE CALCIO	38
5.2	CARACTERIZACIÓN DE LOS POLVOS DE FOSFATOS DE CAL- CIO	38
5.2.1	Microscopía electrónica de barrido	39
5.2.2	Difracción de Rayos X (DRX).	48

5.3	PRUEBAS <i>IN VITRO</i> DE LAS ESPUMAS DE FOSFATOS DE CALCIO	50
5.4	PRUEBAS <i>IN VITRO</i> DE FOSFATOS DE CALCIO CON IONÓMERO	54
5.5	FABRICACIÓN DE ANDAMIOS PARA APLICACIONES EN RE-GENERACIÓN ÓSEA	57
6	Discusión	59
7	Conclusiones	60
8	TRABAJO FUTURO	61
8.1	Uso de estructuras 3D de PLA (Ácido poliláctico)	61

Nomenclatura

PLA Ácido poliláctico

HA Hidroxiapatita

TCP Fosfato tricálcico

(HPO₄)²⁻ Fosfato mono ácido

H₂PO₄⁻ Dihidrogeno fosfato

H₃PO₄ Ácido fosfórico

OH⁻ Hidróxido

P Fósforo

H₂ Dihidrógeno

Na⁺ Sodio (catión)

Zn²⁺ Zinc (catión)

Mg²⁺ Magnesio (catión)

K⁺ Potasio (catión)

Si²⁺ Silicio (catión)

Ba²⁺ Bario (catión)

F⁻ Flúor (anión)

Ca²⁺ Calcio (catión)

(PO₄)³⁻ Fosfato (anión)

(CO₃)²⁻ Carbonato (anión)

Sr²⁺ Estroncio (catión)

Al³⁺ Aluminio (catión)

Cl⁻ Cloro (anión)

(SO₄)²⁻ Sulfato (anión)

CO₂ Dióxido de carbono (anión)

TGF- β Factor de crecimiento transformante β

PDGF Factor de crecimiento derivado de las plaquetas

IGF Factor análogo a la insulina

BMPs Proteínas morfogenéticas óseas

Al₂O₃ Alúmina

ZrO₂ Zirconia

Ca₁₀(PO₄)₆(X)₂ Apatitas (formula de las apatitas)

rpm Revoluciones por minuto

SBF Fluido corporal simulado

PLA Ácido poliláctico

PVA Acetato de polivinilo

MEB Microscopía Electrónica de Barrido

DRX Difracción de Rayos X

BSE Electrones Retrodispersados

EDS Espectroscopía de Dispersión de rayos X

LV-SEC Electrones secundarios a bajo vacío

M1 Muestra 1 con molaridad de 2.03M de H₃PO₄

M2 Muestra 2 con una molaridad de 2.0M de H₃PO₄

M3 Muestra 3 con una molaridad de 1.7M de H₃PO₄

M4 Muestra 4 con una molaridad de 1.4M de H₃PO₄

M5 Muestra 5 con una molaridad de 1.1M de H₃PO₄

M1i M1 con ionómero de vidrio

M2i M2 con ionómero de vidrio

M3i M3 con ionómero de vidrio

M4i M4 con ionómero de vidrio

M5i M5 con ionómero de vidrio

Lista de Figuras

3.1	Estructura del hueso vista desde el nivel macroscópico hasta su estructura molecular [14].	9
3.2	Señales bioeléctricas son producidas por las proteínas de un canal iónico a nivel de células individuales [24].	15
3.3	Recursos biológicos precursores de fosfatos de calcio	22
4.1	Procedimiento experimental	27
4.2	Proceso de almacenamiento de cascarones de huevo.	29
4.3	Cascarones de huevo triturados	29
4.4	Limpieza de polvos mediante agitación magnética	30
4.5	Horno Thermo Electron Corporation	31
4.6	Óxido de calcio formado después del proceso de calentamiento. . . .	31
4.7	Polvos de fosfatos de calcio en cajas de Petri para completar la reacción química.	32
4.8	Fosfatos de calcio	33
4.9	a) Prensa manual (Pellet Press), b) Patillas prensadas de fosfatos de calcio, c) Pastillas dentro de la incubadora con saliva artificial	34

4.10	Andamios de fosfatos y ionómero en aros de polímero	35
4.11	Andamios dentro de un horno para su secado.	36
4.12	Andamios fabricados con tinta de ionómero, biovidrio base fosfato y fosfatos de calcio.	37
5.1	M1	40
5.2	M2	40
5.3	M3	41
5.4	M4	41
5.5	M5	42
5.6	Análisis EDS de la muestra M1 de fosfatos	43
5.7	Análisis EDS de la muestra M2 de fosfatos	43
5.8	Análisis EDS de la muestra M3 de fosfatos	44
5.9	Análisis EDS de la muestra M4 de fosfatos	44
5.10	Análisis EDS de la muestra M5 de fosfatos	45
5.11	Morfología de las partículas de la muestra M1	46
5.12	Morfología de las partículas de la muestra M2	46
5.13	Morfología de las partículas de la muestra M3	47
5.14	Morfología de las partículas de la muestra M4	47
5.15	Morfología de las partículas de la muestra M5	48

5.16	Se muestran los resultados de DRX obtenidos de las cinco diferentes composiciones de fosfatos de calcio sintetizados, señalándose los distintos picos característicos de la hidroxiapatita y el β -fosfato tricálcico.	49
5.17	Disolución de M1 en 1, 3 y 7 días.	51
5.18	Disolución de M2 en 1, 2 y 7 días.	52
5.19	Disolución de M3 en 1, 3 y 7 días.	52
5.20	Disolución de M4 en 1, 3 y 7 días.	53
5.21	Disolución de M5 en 1 y 3 días.	53
5.22	Disolución de M1i en 1, 3 y 7 días.	55
5.23	Disolución de M2i en 1, 3 y 7 días.	55
5.24	Disolución de M3i en 1, 3 y 7 días.	56
5.25	Disolución de M4i en 1, 3 y 7 días.	56
5.26	Disolución de M5i en 1, 3 y 7 días.	57
5.27	Andamios sinterizados	58
8.1	Estructuras de ácido poliláctico y acetato de polivinilo	62

Lista de Tablas

3.1	Constantes del producto de solubilidad de sales de ortofosfato a 25°C y 37°	19
3.2	Propiedades físicas y químicas de los fosfatos de calcio [9, 36-39] . . .	20
4.1	Se muestran las cantidades de ácido fosfórico necesario para prepararlo a diferentes molaridades.	32
5.1	Cantidades utilizadas para la síntesis de fosfatos de calcio.	38
5.2	Promedios de disolución de las 5 muestras.	51
5.3	Promedios de disolución de las 5 muestras de fosfatos de calcio con ionómero de vidrio	54

Resumen

En el presente trabajo se reporta la síntesis y la caracterización fisicoquímica e *in vitro*, de la síntesis de fosfatos de calcio y la fabricación de espumas para su posible uso como andamios porosos en la regeneración ósea.

En este trabajo de investigación, se usó una nueva composición química aplicada en la síntesis química de fosfatos de calcio a partir de cáscaras de huevo y ácido fosfórico a diferentes molaridades. Por otro lado, se analizó con difracción de rayos X y Microscopía electrónica de barrido la composición química del biomaterial difásico obtenido por el método de síntesis química, cuyas fases cristalinas fueron las del β -fosfato tricálcico y la de la hidroxiapatita. En comparación, los resultados de las pruebas *in vitro* en saliva artificial a diferentes tiempos mostraron resultados prometedores con respecto al tiempo de disolución del biomaterial.

Así mismo, el método de síntesis química usado en el biomaterial en este trabajo es un método sencillo, que permitió ser un aspecto que se tiene que resaltar al igual que debido a que se usó cáscaras de huevo como precursor para la formación del fosfato difásico el proceso fue aún más sustentable, sin dejar de lado los resultados de la biocompatibilidad del biomaterial, reduciendo la posibilidad de riesgo de que el implante sea rechazado o tenga efectos negativos en el paciente.

La fabricación de los andamios formados a partir del fosfato difásico obtenido previamente, se manufacturó con la ayuda de la tinta a base de fosfatos de calcio previamente sintetizados, mezclados con ionómero de vidrio y biovidrio base fosfato, además se usaron preformas porosas hechas de ácido poliláctico los cuales fueron rellenos con los polvos de fosfato de calcio y posteriormente se llevaron a cabo tratamientos térmicos tanto para la pirolización del polímero como para la sinterización de los fosfatos de calcio.

Abstract

The present work reports the synthesis, physicochemical and *in vitro* characterization of calcium phosphates and the manufacture of porous scaffolds for their possible use as porous scaffolds in bone regeneration.

In this research work, a new applied chemical composition was used in the chemical synthesis of calcium phosphates from eggshells and phosphoric acid at different molarities.

Also, the chemical composition of the diphasic biomaterial obtained by chemical synthesis method was analyzed with X-ray diffraction and scanning electron microscopy, which crystalline phases were those of beta tricalcium phosphate and hydroxyapatite. In comparison the results of *in vitro* tests on artificial saliva at different times showed encouraging results with respect to the dissolution time of the biomaterial.

The chemical synthesis method used for the biomaterial in this work is a simple method, which allowed to be an aspect that has to be highlighted as well as because eggshells were used as a precursor for the formation of diphasic phosphate the process was even more sustainable, without neglecting the results of the biocompatibility of the biomaterial, reducing the possibility of the risk of the implant being rejected or having negative effects on the patient.

The scaffolds manufacture formed from the diphasic phosphate previously obtained, was made with the help of ink based on previously synthesized calcium phosphates, mixed with glass ionomer and phosphate-based bioglass, moreover, porous preforms made of polylactic acid were used which were filled with the calcium phosphate powders and subsequently thermal treatments were carried out both for the polymer pyrolysis and for the sintering of the calcium phosphates.

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN-GENERALIDADES

Los materiales han tenido un amplio desarrollo a través del tiempo. El hombre descubrió, desarrolló y perfeccionó las técnicas que permiten producir materiales con propiedades diferentes a las que tienen de manera individual, propiciando así el uso de materiales en diferentes áreas de estudio. El desarrollo de la ciencia de materiales a través de la historia fue muy lenta, debido al desconocimiento sobre los materiales, pero gracias al descubrimiento de los rayos X y a su aplicación, así como al descubrimiento de la tabla periódica de los elementos, y el conocimiento de la estructura cristalina de los materiales fue que esta ciencia se fue desarrollando. Cuando los científicos se dieron cuenta de la relación directa que hay entre las estructuras de los materiales y sus propiedades físicas, permitieron un rápido avance en el conocimiento de los materiales.

La ciencia de materiales tiene diversas áreas de estudio, el presente trabajo se enfoca en el área de biomateriales, que son materiales que tienen una contribución directa en los seres vivos. Los biomateriales pueden ser de origen natural o sintetizados en un laboratorio, utilizando componentes metálicos, poliméricos, cerámicos o materiales compuestos. Un biomaterial se define como una sustancia farmacológica inerte, que es usada en aplicaciones médicas para ser implantada o incorporada en los sistemas biológicos, para apoyar, evaluar, tratar, mejorar o reemplazar tejidos, órganos o funciones del cuerpo [1, 2, 3].

Las patologías de los huesos, representan un porcentaje importante en las causas de incapacidad física, sin importar la condición de las personas, es decir edad, estatura, peso, sexo, etc. Existen diversos factores que pueden causar enfermedades óseas: alteraciones genéticas, déficits nutricionales, trastornos hormonales, uso de medicamentos y otras sustancias, así como enfermedades que afectan a los tejidos duros

como la osteoporosis, la enfermedad de Paget, tumores óseos, osteogénesis imperfecta entre otras. En la cirugía de tejidos óseos como la ortopedia, maxilofacial y áreas dentales; la médula ósea autóloga recién cosechada es considerada un modelo para el injerto óseo, debido a su rápida integración ósea. Sin embargo, el injerto de hueso autólogo es limitado debido a la morbilidad del sitio donante y a su disponibilidad limitada, por lo tanto, se han tenido que investigar materiales que puedan utilizarse para ser empleados en la regeneración de hueso; de ahí que, las cerámicas sintéticas sean cada vez más utilizadas como materiales sustitutos de hueso. Los sustitutos óseos deben ser biocompatibles y deben ser integrados por los objetos circundantes. Al mismo tiempo, dada la estructura de los huesos, los implantes tienen que ser desarrollados con estructuras similares, ya sean como estructuras sólidas o como cementos inyectables, estos implantes pueden ser de materiales poliméricos, cerámicos, metálicos o compuestos, siempre y cuando logren una interacción adecuada en el cuerpo en el que sean implantados [4]. Es importante mencionar que los implantes óseos son muy caros debido a los materiales con los que son fabricados [5], es por ello la importancia de desarrollar implantes óseos que sean más accesibles. Las cerámicas de fosfato cálcico como la hidroxiapatita (HA) y el fosfato tricálcico (TCP) son buenos candidatos para los sustitutos del esqueleto debido a su similitud química con los minerales de la espina dorsal [6]. Por otra parte, los fosfatos de calcio son sustancias que permiten mantener huesos y dientes sanos. Así mismo, los fosfatos de calcio son de especial interés en la biología y la medicina puesto que su formación ocurre dentro de tejidos esqueléticos normales (esmalte dental y hueso) y en calcificaciones patológicas (depósitos ateroscleróticos, urinarios y cálculo dental). Al principio, los fosfatos de calcio fueron utilizados por F. Albee para el mantenimiento de hueso, y hasta 1980 se emplearon por Brown y Chow como material cementante para la osteorregeneración, donde la morfología del material cambió, de estar en forma de bloques y de gránulos paso a un estado viscoso, con el fin de facilitar la implantación del material a las formas heterogéneas de las lesiones [7]. Por otro lado, la cáscara de huevo está formada en su mayoría por carbonato de calcio, entre su composición también se encuentra en pequeñas cantidades el fosfato tricálcico y el carbonato de magnesio [8], es por esto que es considerado una excelente

fuelle de calcio. Además, el huevo es un alimento que se consume en gran cantidad, ya que pertenece a los alimentos de la canasta básica de la población mundial y esto lo hace aún más viable para la síntesis de fosfatos de calcio. Fosfatos de calcio como la hidroxiapatita (HA) y el fosfato tricálcico (TCP) sinterizados a partir de cáscaras de huevo mostraron una respuesta favorable osteointegrativa. El TCP es muy utilizado como sustituto de tejidos duros por ser reabsorbible, esta cualidad ayuda al desarrollo del hueso mientras reabsorbe, dejando atrás solo hueso nuevo [9].

En el presente trabajo se tuvo como objetivo principal obtener espumas hechas de fosfatos de calcio, que ayuden a regenerar tejido óseo, haciendo uso de cáscaras de huevo como fuente de calcio para obtener los fosfatos de calcio.

Se realizaron variaciones en porcentaje en peso de ácido fosfórico y óxido de calcio sintetizado a partir de cascarones de huevo. Posteriormente se caracterizaron de manera física, química e *in vitro* los fosfatos de calcio obtenidos. Por último se fabricaron las espumas a partir de los fosfatos de calcio obtenidos previamente para aplicaciones en la regeneración de tejidos óseos.

CAPÍTULO 2

OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GENERAL

Sintetizar fosfatos de calcio a partir de cáscaras de huevo y ácido fosfórico para la fabricación de espumas sólidas con aplicaciones en la regeneración del tejido óseo.

2.2 OBJETIVOS PARTICULARES

- Sintetizar fosfatos de calcio variando el porcentaje en peso de ácido fosfórico y óxido de calcio obtenido a partir la de cáscaras de huevo.
- Caracterizar los polvos de fosfato de calcio físicamente, químicamente e *in vitro*.
- Fabricar y caracterizar las espumas.

CAPÍTULO 3

MARCO TEÓRICO

Los seres vivos tienen una estructura rígida llamada esqueleto, este a su vez está conformado por huesos de diferentes tamaños. El tejido óseo se clasifica en dos tipos de estructuras, hueso cortical (compacto) y hueso trabecular (esponjoso). Los huesos cumplen con funciones muy importantes para los seres vivos (vertebrados), que dependen de las propiedades mecánicas de los materiales que los constituyen. Cuando se ve afectado alguno de los huesos, el cuerpo trata inmediatamente de resolver dicho problema; y aunque el cuerpo por si solo hace el proceso de reparación, en algunas ocasiones el defecto óseo es tan grave que llega a superar su potencial y es necesario encontrar otras formas para resolver dichos problemas y es precisamente por esto que se recurre a la ingeniería de tejidos.

3.1 HUESOS

El esqueleto humano está compuesto por 206 huesos [10, 11], el hueso es un tejido óseo altamente dinámico y cuenta con un metabolismo muy activo debido a su excelente abastecimiento vascular [12, 13], tiene una gran estabilidad ante la tracción y la tensión interna del hueso; además es muy resistente ante el requerimiento de torsión, también es importante mencionar que después del esmalte dental el hueso es la sustancia más dura del cuerpo [12], su composición está formada por hidroxapatita y por proteína de colágeno [14]. En la **Figura 3.1** se muestra la estructura del hueso desde la escala macroscópica, hasta la escala molecular, describiendo así los componentes del tejido óseo entre estas escalas [14]. A escala macroscópica se puede diferenciar entre el hueso cortical (compacto) y el hueso trabecular (esponjoso), al rededor de $\sim 100\mu\text{m}$ se puede reconocer que el hueso cortical está compuesto por

sistemas de Havers y el hueso trabecular se encuentra compuesto por trabéculas, en el rango de entre $50\mu\text{m}$ y $5\mu\text{m}$ se pueden distinguir los patrones de fibras que ayudan a distinguir entre el hueso cortical y el trabecular, en el hueso cortical los conductos de Havers están recubiertos de fibras que se encuentran en un arreglo concéntrico donde se encuentran los osteocitos, en cambio al hueso trabecular lo conforman fibras en forma de red que delimitan cavidades circulares donde se ubica la médula ósea [15], a escala nano se pueden apreciar los componentes básicos del hueso; es decir proteínas, agua, moléculas de colágeno y minerales [16].

Los huesos están en constante formación y reabsorción, estos procesos son los que permiten el mantenimiento del volumen óseo en el esqueleto, que hacen posible la reparación de daños tisulares y la homeostasis del metabolismo fosfocálcico.

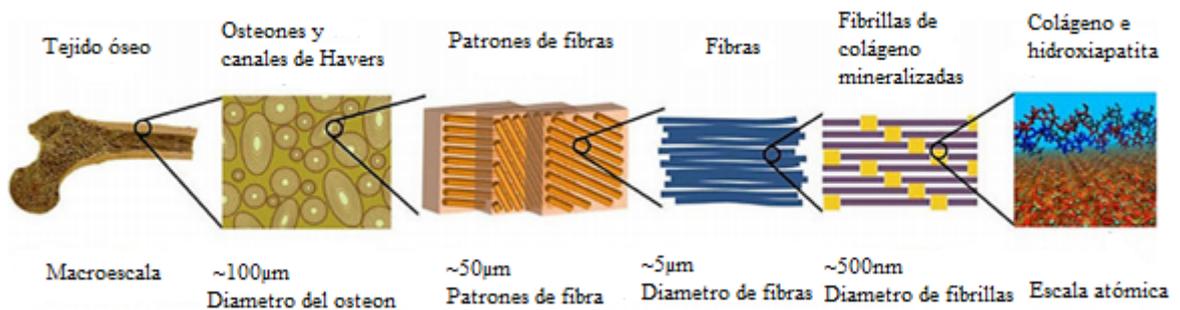


Figura 3.1: Estructura del hueso vista desde el nivel macroscópico hasta su estructura molecular [14].

Los huesos tienen funciones fisiológicas muy importantes. Dichas funciones dependen esencialmente de la resistencia del hueso y de su rigidez mecánica. Algunas de las funciones más importantes de los huesos son las siguientes [10, 11, 17]:

- Protección: Los huesos protegen órganos y sistemas.
- Soporte de cargas.
- Tiene funciones dinámicas: Los huesos actúan como palancas en donde se insertan músculos y tendones.
- Funcionan como depósitos de sales minerales: El 80% de fósforo y el 90% de calcio que están en el cuerpo humano se encuentran en los huesos.

-
- Función hematopoyética: Así se le llama a la capacidad de formar células sanguíneas (esto pasa al interior del hueso, en la médula ósea).
 - Regulan la respuesta inmune.
 - Almacenes de energía: La composición de la médula ósea amarilla (compuesta principalmente por células adiposas), permite utilizarse como un acervo energético.

Las células óseas (células mesenquimales pluripotenciales indiferenciadas) se encuentran en el tejido óseo y en el estroma conjuntivo de la médula ósea, las células óseas reaccionan a distintas señales moleculares que dan inicio a la activación de diferentes genes y son capaces de dar origen a cinco linajes celulares distintos: los fibroblastos, osteoblastos, condroblastos, adipositos y mioblastos [18].

3.2 REMODELACIÓN ÓSEA

El proceso de remodelado consiste en la renovación de 5% de hueso cortical y 20% de hueso trabecular al año en condiciones normales [15, 19, 20]. El proceso de remodelado óseo se lleva a cabo durante toda la vida de un ser vivo, debido a la actividad de las células periostales y endostales, dichas células proveen tanto el proceso del crecimiento de los huesos como el de remodelación de los mismos [21]; en el caso de los humanos solo hasta la tercera década el balance de remodelado óseo es positivo. El remodelado óseo consiste en la reabsorción de una parte de hueso, que es llevada a cabo por los osteoclastos, así como la creación de la matriz osteoide formada por los osteoblastos y su posterior mineralización. Dicho proceso se lleva a cabo en pequeñas áreas corticales o de la superficie trabecular, llamadas unidades básicas multicelulares. En el esqueleto humano existen 35 millones de unidades básicas multicelulares y cada año se activan de 3 a 4 millones de estas, por lo que el esqueleto es renovado totalmente cada 10 años. En las unidades básicas multicelulares, los osteoclastos reabsorben una cantidad de hueso y los osteoblastos

forman la matriz osteoide y la mineralizan para rellenar la cavidad previamente creada por los osteoclastos [19].

3.3 REGENERACIÓN ÓSEA

Se llama osteogénesis u osificación al proceso de formación de hueso nuevo. La regeneración ósea produce una respuesta que implica a los vasos sanguíneos, las células y la matriz extracelular [15]. Aunque es sabido que la matriz ósea y las células del tejido óseo son los dos elementos más cruciales involucrados en la formación ósea, los vasos sanguíneos juegan un papel muy importante en la regeneración. Cuando se llega a producir un trauma en el hueso hay una respuesta inflamatoria por parte del cuerpo humano y un hematoma inicial, con plaquetas, hematíes y fibrina, entonces las células del coágulo liberan interleuquinas y factores de crecimiento, causando la migración de linfocitos, macrófagos, precursores de osteoclastos y células mesenquimales pluripotenciales. Dichas señales moleculares inician la diferenciación hacia células endoteliales, fibroblastos, condroblastos y osteoblastos, originando así un nuevo tejido fibrovascular, que tomará el lugar del coágulo inicial [18].

Las etapas de la osteogénesis que se pueden distinguir por su morfología involucran la proliferación de células osteoprogenitoras, preostoblastos, con una morfología de fibroblastos (tienen una alta actividad alcalina) [21] y por su formación en osteoblastos al último, los osteoblastos se transforman en osteocitos incrustados en la matriz ósea calcificada [18]. Todos estos procesos son llevados a cabo por complejas interacciones entre factores de crecimiento, citoquinas y hormonas [15].

La formación ósea se puede desarrollar por dos métodos:

- La osificación membranosa endoconectiva o directa: En este proceso el tejido óseo se origina directamente de una lámina de mesénquima. En el centro de las láminas de mesénquima aparecen un conjunto de células mesenquimales que son inducidas hacia osteoblastos y a través de su acción de manera concéntrica se osifican. Hay pocos huesos que se forman de esta manera, por ejemplo los huesos de la bóveda craneal, el hueso maxilar y la clavícula, aunque en estos

dos últimos su formación se da de una manera mixta, es decir, existe una osificación membranosa y endocondral.

- La osificación endocondral: Por este método se desarrolla una plaqueta primitiva de tejido embrionario, esta no se desarrolla directamente del hueso, sino que aparece una fase intermedia cartilaginosa. O sea, se forma una lámina de cartílago, puesto que las células mesenquimales se diferencian a condroblastos a partir de la lámina de cartílago. En los huesos largos cerca de los extremos, se forman dos centros cartilaginosos de osificación, estos centros cartilaginosos también son formados gradualmente hacia las áreas centrales del hueso. En los centros cartilaginosos aparecen osteoblastos que empiezan a osificarla. El resto de los huesos siguen este proceso de osificación.

Los tipos de osificación dependen esencialmente de la producción de tejido óseo por parte de los osteoblastos y su remodelación posterior por parte de los osteoclastos [22] .

Las fases de remodelado óseo son las siguientes [23]:

- Fase quiescente: El hueso se encuentra en reposo (los factores que inician en proceso de remodelado aún no son conocidos).
- Fase de activación: Primero se da la activación de la superficie ósea, mediante la retracción de las células limitantes (osteoblastos maduros elongados que existen en la superficie endóstica) y la digestión de la membrana endóstica por acción de las colagenasas. Al quedar expuesta la superficie mineralizada se produce la atracción de osteoclastos circundantes procedentes de los vasos próximos.
- Fase de reabsorción: Los osteoclastos comienzan a disolver la matriz mineral y a descomponer la matriz osteoide. Este proceso es finalizado por macrófagos y permite la liberación de los factores de crecimiento contenidos en la matriz,

principalmente TGF- β (factor de crecimiento transformante β), PDGF (factor de crecimiento derivado de las plaquetas), IGF-I y II (factor análogo a la insulina I y II).

- Fase de formación: A la par en las zonas reabsorbidas se produce el fenómeno de agrupamiento de preostoblastos, atraídos por los factores de crecimiento que se liberaron de la matriz que actúan como quimiotácticos y además estimulan su proliferación. Los preostoblastos sintetizan una sustancia cementante sobre la que se va a adherir el tejido nuevo y expresan BMPs (proteínas morfogenéticas óseas) responsables de la diferenciación. A los pocos días los osteoblastos ya diferenciados van a sintetizar la sustancia osteoide que rellena las zonas horadadas.
- Fase de mineralización: A los 30 días del depósito de osteoide comienza la mineralización que finalizará a los 130 días en el hueso cortical y a los 90 días en el trabecular.

3.4 BIOMATERIAL

Un biomaterial se define como aquel material utilizado para fabricar dispositivos que se puedan usar para reemplazar una parte o una función de una manera segura, confiable, económica y fisiológicamente aceptable, los biomateriales permanecen en contacto de manera permanente o intermitente con los fluidos del cuerpo. Se comprenden desde los biomateriales empleados en cualquier tipo de implantes hasta la fabricación de instrumentos médicos y quirúrgicos. En ocasiones los materiales de origen biológico como la madera, la miel y los huesos también son clasificados como biomateriales naturales [3]. Los biomateriales tienen composiciones diversas, que pueden ser en forma de polímeros, cerámicos, metálicos o compuestos; cada uno de ellos puede reemplazar órganos y tejidos diferentes; todo dependerá de la función, la estructura, las propiedades físicas, químicas y mecánicas del tejido a reparar [4].

Los biomateriales han tenido un gran desarrollo a lo largo de la historia; en la actualidad se conocen tres generaciones de biomateriales y se están desarrollando los de cuarta generación. La primera generación se desarrolló entre los años 1960 y 1970, donde los biomateriales consistían en imitar el tejido perdido y era preferible que los materiales fueran inertes y no interactuaran con la biología del organismo huésped, es decir, que fueran “pasivos”. Mientras más se han comprendido los mecanismos biológicos, mayores progresos en el área de biomateriales se han desarrollado que han permitido tener mejores interacciones biológicas. Para la segunda generación de biomateriales, en los años 70 con la revolución de la biología molecular, los biomateriales pasaron de comportarse como materiales “pasivos” a ser materiales bioactivos, es decir, que pueden interactuar activamente e integrarse con el entorno biológico. Por otro lado, avances en la genómica y proteómica entre los años 1990 y 2000 tuvieron un gran impacto en el desarrollo de biomateriales. Desde inicios del año 2000 se desarrollaron los biomateriales de tercera generación combinando los materiales bioactivos y los materiales reabsorbibles con los cuales se pudieron activar genes y estimular la regeneración de tejido a nivel molecular. Los biomateriales de tercera generación implican la adaptación molecular de microambientes para lograr respuestas celulares específicas y han demostrado ser muy prometedores. En cuanto a los biomateriales de cuarta generación se encuentran en desarrollo de la aplicación de nuevas tecnologías, una propuesta es la impresión 3D de órganos y tejidos, así como el diseño de materiales que puedan manipular y monitorear señales bioeléctricas celulares (con uso de sensores), y una tercera opción son los materiales híbridos (capaces de imitar el microambiente).

Con el fin de llegar al desarrollo de materiales de cuarta generación se ha estudiado el comportamiento electrofisiológico de las células y tejidos. Esto ha inspirado al desarrollo de estos nuevos materiales para ayudar al proceso de regeneración de tejidos. Zhou Lei y colaboradores [24], encontraron que las señales eléctricas de la fuerza fisiológica parecen tener un efecto guía, sobre la migración celular en las moléculas de curación de heridas en la córnea y la piel. Es decir; existen señales bioeléctricas endógenas que se originan en la actividad de los canales iónicos y las

bandas en las membranas celulares (**Figura 3.2**). Es decir; cada célula del cuerpo está rodeada por una membrana plasmática que contiene proteínas que bombean iones para generar potenciales de voltaje transmembrana; por lo tanto, todas las células y tejidos, no solo las neuronas y músculos excitables generan y reciben señales bioeléctricas en estado estable.

En este sentido, las señales bioeléctricas forman una ruta epigenética que podría ser utilizada como una red para comprender y controlar el comportamiento de una sola célula. Las señales bioeléctricas que se originan en la actividad de los canales iónicos y las bombas se encuentran como reguladores clave del comportamiento celular y para controlar el número de células (proliferación y apoptosis), las posiciones (migración y orientación) y las identidades (trayectorias de diferenciación) [25].

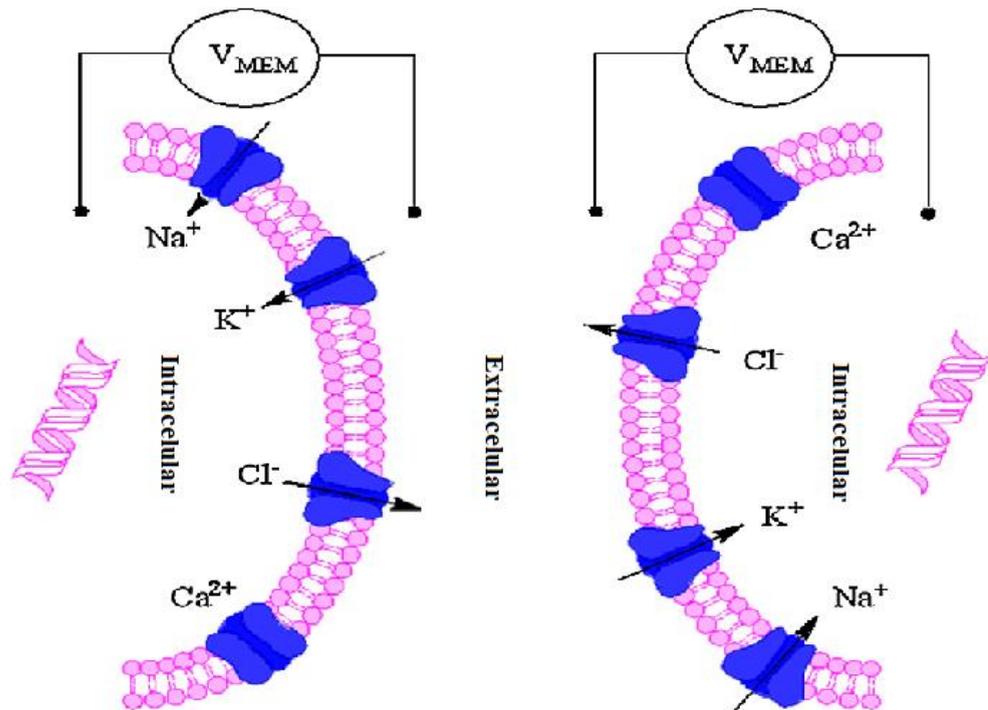


Figura 3.2: Señales bioeléctricas son producidas por las proteínas de un canal iónico a nivel de células individuales [24].

El objetivo del uso biomateriales siempre ha sido mejorar la salud humana mediante la restauración de la función de los tejidos y órganos vivos naturales del cuerpo; es

por eso que es esencial comprender las relaciones entre las propiedades, funciones y estructuras de los materiales biológicos.

Algunos investigadores como Ikada [26], Meyer [27] y Barrere [28], hacen una descripción de las propiedades que deben tener los biomateriales:

Biodegradabilidad: Se requiere degradación (mediante hidrólisis) a velocidades cercanas a las requeridas para la formación (regeneración) de hueso nuevo.

Radiolucidez: Requieren que haya una diferenciación radiográficamente con respecto al tejido donde se implantó.

Resistencia y compatibilidad mecánica: Necesita resistir cargas mecánicas (módulo de elasticidad, resistencia a la tracción, a la fractura, a la fatiga, porcentaje de elongación entre otros) según sea la posición del tejido óseo que va a reemplazar.

Biocompatibilidad: Deben integrarse al organismo hospedero sin que haya efectos citotóxicos, genotóxicos o respuesta inmune.

Osteoconductividad: Deben actuar como soporte estructural en la formación y el crecimiento de hueso nuevo.

Osteoinductividad: Estos materiales deben promover la fijación de la formación de células específicas del tejido óseo. Esto se logra al reclutar células madre mesenquimales y osteoprogenitoras para que posteriormente proliferen y se diferencien hasta la línea osteogénica.

3.5 BIOCERÁMICAS

Las biocerámicas son aquellos materiales cerámicos que son aplicados como biomateriales, este tipo de cerámicas pueden ser naturales o sintéticas. Dichas cerámicas se pueden clasificar en función de su entorno biológico: casi bioinerte, bioactiva y reabsorbible. Las biocerámicas, se caracterizan por tener una composición química similar al componente mineral del hueso, propiedades mecánicas y propiedades bioactivas exhibidas por los huesos. Por otra parte, el carácter rígido y quebradizo de las biocerámicas limita su empleo como soporte de cargas, permitiendo, usarlas como

relleno de defectos óseos, en la cirugía bucal, la ortopedia, en la cirugía del oído medio, en el recubrimiento de implantes dentales y articulaciones metálicas.

La alumina (Al_2O_3), la zirconia (ZrO_2), son las cerámicas bioinertes más utilizadas, puesto que se consideran como sustancias estables en el entorno fisiológico [29]. Por otro lado, fosfatos de calcio, como lo son: sulfato de calcio, hidroxiapatita y fosfatos tricalcicos (pueden ser α o β) [30]. La composición química de estos materiales es lo que describe su comportamiento en el entorno *in vitro* e *in vivo*, es decir en el fluido biológico, células y tejidos. Las formas en las que se pueden encontrar este tipo de materiales es en andamios porosos, como rellenos óseos, en rodamientos de prótesis articulares, recubrimientos y agentes anticancerígenos, entre otros [30].

En cuanto a los biomateriales cerámicos usados para regeneración ósea, se caracterizan por tener una composición química semejante al componente mineral del hueso, propiedades mecánicas y propiedades bioactivas exhibidas por los huesos. La hidroxiapatita (HA) es el material cerámico más usado, la HA es un fosfato de calcio cristalino que está contemplado como el principal componente mineral de los huesos en los mamíferos ya que entre el 60% y el 70% del peso del tejido óseo seco es este compuesto [31].

3.6 APATITAS

Las apatitas son minerales que se pueden encontrar naturalmente en la tierra en forma de rocas o bien se pueden sintetizar como fosfatos de calcio. Dichos minerales tienen una composición química definida y dependiendo la composición de está, sus propiedades químicas y físicas varían. Se reconoce que las apatitas están descritas con la estructura $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{X})_2$ donde X puede ser F^- , OH^- o Cl^- [32]. En las apatitas sintéticas se pueden sustituir las posiciones del Ca^{2+} , $(\text{PO}_4)^{3-}$ y OH^- . Al hacer esto se generan distintos defectos cristalinos y con ello distintos compuestos. Los defectos cristalinos, así como la estructura y el tamaño de los cristales es diferente dependiendo del método de síntesis.

La apatita mineral es la principal fuente de fósforo que tiene el cuerpo humano y

por ello es de gran importancia en distintos campos de investigación y la industria. El fósforo elemental (P) no es encontrado en estado libre en la naturaleza, por su facilidad de oxidarse.

3.7 FOSFATOS DE CALCIO

Los fosfatos de calcio se consideran importantes para su uso como biomateriales por su alta bioactividad, es decir, es la capacidad que tienen para formar enlaces químicos con los tejidos circundantes. Los fosfatos de calcio son sales inorgánicas y ternarias, éstas varían con respecto a la relación de Calcio/Fósforo (Ca/P), también con el grado de hidratación y pH. La estabilidad de las sales de fosfatos de calcio depende en gran medida de la relación entre el calcio y el fósforo. Los fosfatos de calcio pueden sintetizarse, haciendo el intercambio de aniones que acompañan al calcio ($(\text{PO}_4)^{3-}$, $(\text{HPO}_4)^{2-}$, H_2PO_4^- , OH^-). Los fosfatos pueden cristalizar en las sales mono, di, tri y tetracálcicos, también en forma de hidroxiapatita y β -whitlockita. Los fosfatos de calcio han sido utilizados para la fabricación de diferentes materiales para implantes ya sea, porosos o sólidos dependiendo del lugar de implantación, otros de los usos son como materiales de ingeniería química, aplicandolas como adsorbente, catalizadores, soportes de catálisis o refuerzos mecánicos. El tamaño y forma de partícula es indispensable para el uso que se le quiera dar a las sales de fosfatos de calcio, dichas características son dependientes del método de síntesis [33]. Por otra parte las sales de fosfatos de calcio como la HA y el β -TCP son biocompatibles y osteoconductoras facilitando el desarrollo de nuevo tejido óseo por las células óseas.

3.7.1 Solubilidad de los fosfatos de calcio

La solubilidad de una sal de fosfato de calcio es importante dado que de esto depende su estabilidad *in situ*. Existen tres sales de fosfato de calcio, las sales de ortofosfato,

las sales de metafosfatos y las de pirofosfatos. Debido a que las sales de ortofosfato no se hidrolizan en los fluidos corporales, son las que se investigan para el desarrollo de biomateriales [34]. Cuando los iones de los pirofosfatos y los metafosfatos se hidrolizan en el cuerpo, pueden dejar altas concentraciones de estos iones que como consecuencia forman calcificaciones extraóseas [35]. En la **Tabla 3.1** se pueden apreciar las distintas sales de ortofosfato y sus constantes del producto de solubilidad.

Tabla 3.1: Constantes del producto de solubilidad de sales de ortofosfato a 25°C y 37°.

Ca/P	Compuesto	Fórmula	$-\log(K_{sp})$ a 25°C	$-\log(K_{sp})$ a 37°C
0.5	Fosfato monocalcico monohidratado (MCPM)	$\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2\text{H}_2\text{O}$	Muy soluble	-
0.5	Fosfato monocalcico anhidro (MCPA)	$\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$	Muy soluble	-
1	Fosfato dicalcico dihidratado (DCPD)	$\text{CaHPO}_4\cdot 2\text{H}_2\text{O}$	6.59	6.63
1	Fosfato dicalcico anhidro (DCP)	CaHPO_4	6.90	7.02
1.33	Fosfato octocalcico (OCP)	$\text{Ca}_8(\text{HPO}_4)_2(\text{PO}_4)_4\cdot 5\text{H}_2\text{O}$	96.6	95.9
1.5	(α -TCP) α -Fosfato tricálcico	$\alpha - \text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	25.5	25.5
1.5	(β -TCP) β -Fosfato tricálcico	$\beta - \text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	28.9	29.5
1.67	(HAp) Hidroxiapatita	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$	58.4	58.6
2.0	(T-TCP) Fosfato tetracalcico	$\text{Ca}_4(\text{PO}_4)_2$	38-44	42.4

3.7.2 Fosfatos de calcio: Propiedades físicas y químicas

Las propiedades físicas y químicas de los fosfatos de calcio son imprescindibles para su uso. Existen varios métodos para hacer la síntesis de fosfatos de calcio, como lo son: sol-gel, precipitación química húmeda, tratamiento hidrotérmico, método sonocímico, por reacción de metátesis, reacción en estado sólido o por emulsión [36], [37].

Tabla 3.2: Propiedades físicas y químicas de los fosfatos de calcio [9, 36-39]

Abreviación	Nombre del fosfato	Composición química	Ca/P	pH	T(°C) de estabilidad
MCPM	Fosfato monocalcico monohidratado	$Ca(H_2PO_4)_2 \cdot H_2O$	0.5	0.1-2	25
MCPA	Fosfato monocalcico anhidro	$Ca(H_2PO_4)_2$	0.5	0.1-2	>80
DCPD	Fosfato dicalcico dihidratado	$CaHPO_4 \cdot 2H_2O$	1	2-5.5	25
DCPA	Fosfato dicalcico anhidrido	$CaHPO_4$	1	2-5.5	>80
OCP	Fosfato octocalcico	$Ca_8(HPO_4)_2(PO_4)_4 \cdot 5H_2O$	1.33	5.5-7	25-37
CDA	Apatita deficiente de calcio	$Ca_{10-x} []_x (HPO_4)_x (PO_4)_{6-x} (OH)_{2-x} []_x$ ($0 < x < 2$)	1.33-1.66	6.5-9.5	25-37
ACP	Fosfato de calcio amorfo	$Ca_x (HPO_4)_y (PO_4)_z n(H_2O)$ $n=3.0-4.5; 15-20 \text{ wt\% } H_2O$	1.2-2.2	5-12	4-37
β -TCP	β – Fosfato tricálcico	$\beta - Ca_3(PO_4)_2$	1.5	>7	b
α -TCP	α – Fosfato tricálcico	$\alpha - Ca_3(PO_4)_2$	1.5	>7	b
BCP	Fosfato de calcio bifásico	$\beta - Ca_3(PO_4)_2 + Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$	1.55-1.65	>7	b
HA	Hidroxiapatita	$Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$	1.67	9.5-12	>80
FA	Flouroapatita	$Ca_{10}(PO_4)_6F_2$	1.67	7-12	>80
T-TCP	Fosfato tetracalcico	$Ca_4(PO_4)_2$	2	-	b

3.8 IONÓMERO DE VIDRIO

Los ionómeros de vidrio fueron desarrollados en los 70's, mezclando cemento de silicato con ácido poliacrílico. Los ionómeros de vidrio pueden estar en manera líquida o en polvo. Es importante mencionar que los ionómeros de vidrio no tienen buenas propiedades físicas (fuerza, fragilidad, sensibilidad a la desecación, resistencia a la compresión, límite elástico, resistencia a la tracción) [38], además son hidrófilos y por lo tanto soportan una humedad mínima [39]. Estos se han utilizado en el campo de la odontología restauradora durante mucho tiempo, debido a su biocompatibilidad, bioactividad, liberación de fluoruro a largo plazo, su capacidad a adherirse al esmalte húmedo y a la dentina sin necesidad de un agente intermedio [40].

Los cementos ionómeros de vidrio son una mezcla de vidrio y un ácido orgánico, estos materiales son conocidos como cementos ácido-base, se basan en el producto de la reacción entre ácidos poliméricos débiles con vidrios en polvo de carácter básico, es decir, dichos polvos tienen que ser capaces de reaccionar con un ácido para formar una sal. Usualmente es polvo de vidrio de silicato y ácido polialquenoico puede ser poli (ácido acrílico), homopolímero o copolímero 2:1 de ácido acrílico y ácido maleico, dichos cementos son usados en tratamientos dentales, por su adhesión a la estructura dentaria (incluso la adhesión a la estructura dental húmeda y los metales básicos) y su validez para la prevención de caries debido a la liberación de flúor. Se utilizan como agentes cementantes, sellador de surcos y fisuras, recubrimientos, reconstrucción de muñones y restauraciones inmediatas. Además, su compatibilidad térmica con el esmalte dental debido a los bajos coeficientes de expansión térmica similares a los de la estructura dental, biocompatibilidad, bioactividad y baja citotoxicidad los hacen ideales para dichas aplicaciones. Por la liberación de flúor y la bioactividad de los cementos ionómeros de vidrio, progresivamente se desarrolla una capa de intercambio iónico interfacial fuerte y duradera en la interfaz con el diente, que es responsable de su adhesión [41, 42].

3.9 HIDROXIAPATITA

La hidroxiapatita se puede considerar el compuesto de calcio más importante, pues se encuentra en el tejido duro natural como refuerzo y en la fase mineral del cuerpo. Además, ayuda a darle rigidez de los huesos, la dentina y el esmalte [3].

La relación ideal de calcio y fósforo de la hidroxiapatita es de 10/6. Cuando ocurre la sustitución de OH^- con P hay una mayor estabilidad química dado que la coordinación es más estrecha entre el fósforo ya que tiene una forma simétrica, y en cambio el hidroxilo no es simétrico porque el calcio está más cerca. Por esto es que existe una mejor resistencia a la caries después de la fluoración [3].

La HA obtenida a partir de recursos naturales (**Figura 3.3**) tiene iones traza (Na^+ , Zn^{2+} , Mg^{2+} , K^+ , Si^{2+} , Ba^{2+} , F^- , $(\text{CO}_3)^{2-}$) valiosos para la regeneración y formación ósea, además de otras características que hacen que los biomateriales formados con este tipo de precursores sean mejores, estos tipos de precursores pueden ser: cáscaras de huevo, conchas de mar, huesos de animales, algas, madera y algunas plantas [43]. La HA a partir de las cenizas de huesos de animales, cáscaras de huevo o cáscaras de ostiones muestra mejores propiedades, debido a la presencia de cationes como: Na^+ , K^+ , Mg^{2+} , Sr^{2+} , Zn^{2+} y Al^{3+} o aniones como el F^- , Cl^- , $(\text{SO}_4)^{2-}$ y $(\text{CO}_3)^{2-}$.

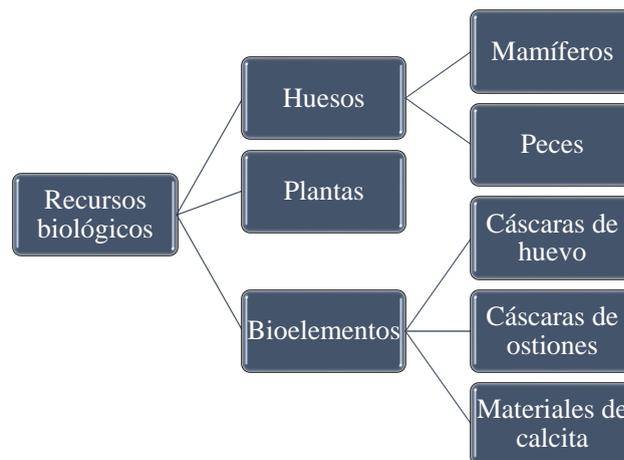


Figura 3.3: Recursos biológicos precursores de fosfatos de calcio

3.10 PREFORMAS POROSAS

Las preformas porosas o andamios son estructuras sólidas, porosas y tridimensionales que se utilizan como base en la ingeniería de tejidos. Muchos de los biomateriales que se consideran biocompatibles pueden ser usados para la fabricación de andamios. Los andamios actúan como sustitutos temporales de las matrices extracelulares para el desarrollo de tejido nuevo. Estos brindan un soporte tridimensional adecuado y soporte mecánico para las células trasplantadas, hasta que el tejido regenerado adquiere propiedades estructurales adecuadas para reemplazar al tejido anterior [44].

Los andamios sirven como plantilla para la regeneración de los defectos óseos, al mismo tiempo que fomentan la unión celular, la proliferación, la producción de una matriz extracelular, así como la restauración de vasos, nervios, músculos, huesos, entre otros [45].

Los biomateriales utilizados para la fabricación de andamios pueden ser metales, cerámicas, vitrocerámicas, polímeros naturales o sintéticos y compuestos, degradables dependiendo de la aplicación a regenerar. Las propiedades mecánicas de un andamio pueden ser afectadas por la porosidad dentro de su estructura, síntesis, peso molecular, cristalinidad del material del cual este hecho y la forma del andamio. Recientemente, se ha dado gran importancia al desarrollo de andamios con biomateriales biodegradables que no necesiten ser retirados del organismo [45].

Para la fabricación de andamios se requiere controlar su arquitectura externa e interna, para lograr exitosamente la regeneración del tejido. La forma externa se diseña de acuerdo con el lugar donde se va a implantar y la porosidad que se requiera. Si se tiene gran porosidad y gran interconectividad existe una mayor proliferación y migración celular, además de un mayor transporte de nutrientes [4].

3.10.1 Técnicas de fabricación de andamios

Algunas de las principales técnicas de fabricación de andamios son las siguientes [44]:

1. Unión de fibras (Fiber Bonding): Se obtienen andamios en formas de fibra con gran área y porosidad.
2. Gel casting: Se hace una disolución del polímero a utilizar, después se remueve el disolvente y así se forma el andamio. Usualmente se utilizan porógenos como el cloruro de sodio. Con esta técnica se pueden obtener andamios con forma de membrana o película, con poros interconectados y porosidades superiores al 93% .
3. Liofilización (Freeze drying): Se obtienen andamios con porosidades y tamaños de poro variable. Esta técnica hace una emulsión con el disolvente utilizado y el polímero, y posteriormente se realiza una liofilización de la emulsión realizada para separar el disolvente del polímero.
4. Separación de fases (Phase Separation): Primero se disuelve el polímero en el disolvente a baja temperatura, después se enfría controladamente la disolución para separar las fases líquido-líquido. Una vez separados se enfría para crear un sólido bifásico. A continuación, el disolvente solidificado es eliminado mediante un proceso de sublimación. Con esto el espacio que ocupaba el disolvente en un principio se convierte en poros.
5. Laminación de membranas (Membrane lamination): Inicialmente se producirán membranas con la forma que se requiera para realizar dicho andamio. Una vez obtenidas varias de estas membranas son unidas hasta tener la forma y tamaño deseado. -Con esta técnica se obtienen andamios muy porosos con formas determinadas-.
6. Moldeado por fusión (Melt molding): Primero se introduce un porógeno (gelatina usualmente), en un molde de teflón. Después se vierte el polímero en forma

-
- de polvo o granza en este molde. Una vez solidificada la mezcla, se separa del molde y se introduce en un medio donde el porógeno se disuelva.
7. Extrusión: El parámetro principal que define este método es la temperatura de extrusión necesaria. Cuanto mayor sea la temperatura, menor será la presión para realizar la extrusión.
 8. Impresión en 3D (3D printing): Primero se depositará un aglutinante mediante impresión. Después se introduce el polímero en forma de polvo en un cilindro, y se espolvorea sobre el aglutinante. El proceso se repetirá hasta que el andamio esté acabado.
 9. Saturación con gas (Gas foaming): Esta técnica fabrica andamios porosos sin necesidad de usar disolventes orgánicos. Se utiliza saturación con gas, se comprime inicialmente el polímero que se utilizará y posteriormente se expone a dióxido de carbono (CO_2) a alta presión, con esto se forman poros.
 10. Espumas compuestas de materiales poliméricos-cerámicos (Polymer/ceramic composite foams): Para esta técnica se añaden elementos cerámicos al polímero, con el fin de mejorar las propiedades del andamio. Posteriormente se introducen fibras del material compuesto con un porógeno en una disolución hecha con polímero.
 11. Polimerización *in situ*: Para realizar esta técnica se inyecta el polímero en forma de líquido o cemento en el miembro que se requiere restaurar.
 12. Electrohilado (Electrospinning): Esta técnica implica aplicar un campo eléctrico con alto voltaje, que va de 1 a 10 kV entre el capilar metálico que contiene la solución polímero y electrodo colector. Esta técnica permite obtener diferentes porosidades y tamaños de andamios.

3.10.2 Propiedades de los andamios de acuerdo con sus dimensiones

Para las propiedades y características de los andamios, la arquitectura y las dimensiones de los andamios son muy importantes.

Existen tres escalas básicas:

1. Macroescala-mesoescala: Su geometría está en mm. Entre sus características está la forma externa del andamio según el sitio donde será colocado, las propiedades mecánicas, la densidad y la porosidad como porcentaje de volumen del andamio que es vacío.
2. Microescala: Su geometría está en μm ; se caracteriza por el tamaño de poro, interconexión de poros y su degradabilidad.
3. Nanoescala: Su geometría está en nm: trata factores como la topología de la superficie de los poros y la fisicoquímica superficial.

CAPÍTULO 4

DESARROLLO EXPERIMENTAL

Este capítulo describe el método experimental desarrollado durante el trabajo de investigación para lograr los objetivos del mismo. El desarrollo experimental (**Figura 4.1**) consistió en la síntesis de fosfatos de calcio usando precursores naturales a partir de cáscara de huevo, y diferentes relaciones molares de ácido fosfórico (H_3PO_4) para la obtención de fosfatos de calcio con diferentes relaciones de Ca/P. Los fosfatos de calcio ayudaron a la fabricación de espumas con el uso de ionómero de vidrio tipo I.

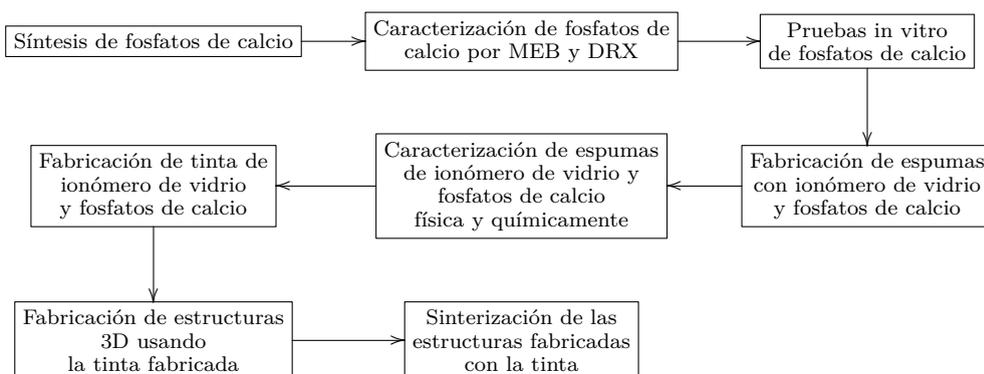


Figura 4.1: Procedimiento experimental

4.1 MATERIALES Y MÉTODOS

Los precursores usados para la síntesis de fosfatos de calcio fueron cáscaras de huevo como fuente de calcio, por su composición mineral, su disponibilidad y su fácil adquisición. La cáscara de huevo tiene una composición del 94% de carbonato de calcio, en menor cantidad se encuentran el fosfato tricálcico y el carbonato de magnesio [8]. Además se usó ácido fosfórico obtenido de Sigma-Aldrich (H_3PO_4 , 85%) y ionómero de vidrio tipo I (MEDENTAL).

4.2 CARACTERÍSTICAS DE LAS DIFERENTES TÉCNICAS DE CARACTERIZACIÓN

La morfología de la superficie se analizó usando un microscopio electrónico de barrido marca JEOL JSM IT300. Para obtener las imágenes se usaron detectores de electrones secundarios y electrones retrodispersados a diferentes aumentos, con voltajes de aceleración de 7.0-20 kV. Así bien, la distribución elemental se hizo por EDS con detectores de rayos X de 20 mm marca Oxford.

Por otro lado, las fases del material sintetizado a partir de cáscaras de huevo se analizaron en un difractómetro de rayos X Briker AXS D2 PHASER con una fuente de cobre ($\lambda=1.5405 \text{ \AA}$). Los análisis se realizaron de 20° - 60° en 2θ con un tamaño de paso de 0.016° .

4.3 SÍNTESIS DE FOSFATOS DE CALCIO

Para la síntesis de fosfatos de calcio se siguieron los procesos reportados por Lee [46, 47]. Sin embargo, es importante indicar que en el presente trabajo se propusieron nuevas relaciones de molaridades de ácido fosfórico y óxido de calcio.

Para llevar a cabo la síntesis de los fosfatos de calcio, se llevó a cabo el procedimiento descrito a continuación:

Recolección de cáscaras de huevo: Estos fueron recolectados del consumo diario, se dejaron secar a temperatura ambiente y posteriormente fueron almacenados en contenedores herméticos (**Figura 4.2**).



Figura 4.2: Proceso de almacenamiento de cascarones de huevo.

Trituración de cáscaras de huevo: Para llevar a cabo este proceso, primero se revisó que los cascarones no tuviesen rastros de materia orgánica, y en caso de que la tuvieran se les retiró. Posteriormente, teniendo las cáscaras de huevo secas y sin rastro de materia orgánica, se usó un mortero y un pistilo de porcelana, donde se trituraron hasta obtener un tamaño de partícula ≤ 1 mm (**Figura 4.3**).



Figura 4.3: Cascarones de huevo triturados

Limpieza de polvos: Una vez triturados los cascarones, en un vaso de precipitados de 1L se colocaron 150 g de polvos y se agregaron 800 mL de agua en agitación manual. Esto con la finalidad de eliminar los residuos orgánicos (membrana) y/o cualquier otro residuo que estuviera implícito. Se retiró el agua sucia, este procedimiento se

repitió varias veces hasta obtener agua completamente transparente.

El siguiente paso fue similar al anterior, pero con ayuda de una placa de calentamiento y un agitador magnético. Los polvos fueron agitados durante 20 minutos a una velocidad de 800 rpm, este proceso fue repetido dos veces. (**Figura 4.4**).

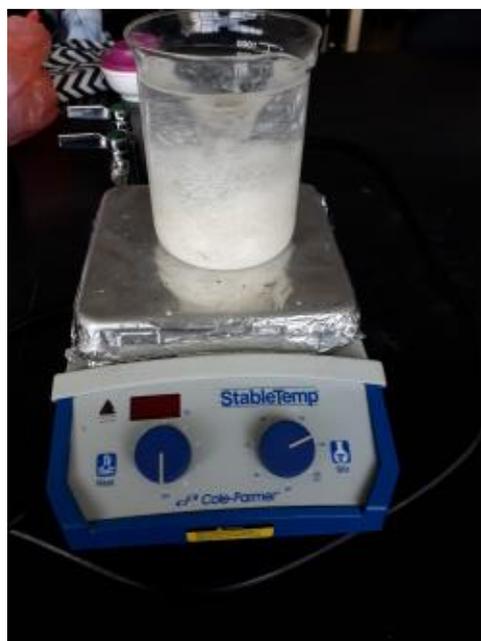


Figura 4.4: Limpieza de polvos mediante agitación magnética

Por último, se agregó temperatura al proceso de limpieza de los cascarones: Se incrementó la temperatura del agua con los polvos a 100°C e igualmente hubo una agitación de 800 rpm durante 12 minutos. Una vez lavados los polvos, se dejaron secar dentro de un horno Thermo Electron Corporation durante 48 h a una temperatura de 100°C (**Figura 4.5**).



Figura 4.5: Horno Thermo Electron Corporation

Obtenidos los polvos limpios y secos se llevó a cabo la etapa de calcinación, donde los polvos se colocaron en pequeños crisoles de porcelana para llevar a cabo la calcinación completa en un horno Barnstead Thermolyne 1300, a una temperatura de 900°C durante dos horas, con una velocidad de calentamiento de $10^{\circ}\text{C}/\text{min}$ (**Figura 4.6**). Posteriormente el óxido de calcio se saca de la mufla, y se vuelve a triturar para así obtener un tamaño de partícula de $60\ \mu\text{m}$.



Figura 4.6: Óxido de calcio formado después del proceso de calentamiento.

Por otro lado, para la formación de fosfatos de calcio, se empleó ácido fosfórico a diferentes molaridades (2.03, 2.0, 1.7, 1.4 y 1.1 M), siendo 2.03 M la molaridad del ácido fosfórico de la muestra nombrada como M1, 2.0 M la molaridad del H_3PO_4 de la muestra M2, 1.7 M de la muestra M3, 1.4 M de la muestra M4 y 1.1 M de la muestra M5 (**Tabla 4.1**).

Tabla 4.1: Se muestran las cantidades de ácido fosfórico necesario para prepararlo a diferentes molaridades.

Muestra	Molaridad (M)	H_3PO_4 (ml)
1	2.03	6.2
2	2.0	6.1
3	1.7	5.2
4	1.4	4.3
5	1.1	3.4

Se mezclaron 5 g de óxido de calcio y 37 ml de ácido fosfórico a diferentes molaridades para cada muestra.

Es importante mencionar que, todas las muestras se mantuvieron en agitación magnética durante 10 minutos y se les midió el pH. Después de 90 h los polvos se colocan en cajas de Petri para asegurar que se complete la reacción química por un tiempo de 24 h (**Figura 4.7**).



Figura 4.7: Polvos de fosfatos de calcio en cajas de Petri para completar la reacción química.

Posteriormente, los polvos se vuelven a triturar en un mortero y se pasan a un crisol de porcelana. Después se continúa con el tratamiento térmico para asegurar la formación de las fases cristalinas que se requieren en los fosfatos de calcio, llevando a cabo el tratamiento térmico en un horno a 900°C con una velocidad de calentamiento de $10^{\circ}\text{C}/\text{min}$ por un tiempo de permanencia de 1 h (**Figura 4.8**).



Figura 4.8: Fosfatos de calcio

4.4 PRUEBAS IN VITRO DE FOSFATOS DE CALCIO

Estás pruebas se hicieron en el laboratorio de protogenómica del Instituto de Neurobiología de la UNAM Campus Juriquilla, con ayuda de una incubadora a una temperatura de 37°C y humedad ambiental.

Se fabricaron pastillas haciendo uso de una prensa manual (Pellet Press). Cada pastilla fue prensada con 0.1 g de óxido de calcio. Luego, se colocaron las pastillas en viales cónicos para centrífuga y a cada vial se les agregó 1 ml saliva artificial. Posteriormente, se colocaron todas las muestras en una incubadora a 37°C a diferentes tiempos: 1, 3 y 7 días, con el fin de analizar la evolución de la formación de hidroxiapatita en la superficie, así como la pérdida de peso de las pastillas.

Para analizar la pérdida de peso fue necesario comparar el peso inicial de las pastillas en seco y una vez pasados los tiempos establecidos *in vitro*, las muestras se sacaron de los viales, recuperando las muestras, que luego fueron secadas en una mufla durante 60 h a 120°C. Después se volvieron a pesar para analizar la pérdida de peso del material (**Figura 4.9**).



Figura 4.9: a) Prensa manual (Pellet Press), b) Patillas prensadas de fosfatos de calcio, c) Pastillas dentro de la incubadora con saliva artificial

4.5 FORMACIÓN DE ANDAMIOS POROSOS DE FOSFATOS DE CALCIO

La síntesis de los andamios consistió en usar los fosfatos de calcio previamente sintetizados, y mezclarlos con ionómero de vidrio.

Para sintetizar las espumas se utilizaron 2 g de fosfatos de calcio con 30 gotas (± 10 gotas) de cemento ionómero de vidrio tipo I, la cantidad de ionómero de vidrio varió respecto a la muestra de fosfatos con los que se prepararon las espumas. Para la formación de las espumas, se pesaron 2 g de fosfatos de calcio en una báscula analítica a los que se les fue agregando gota a gota el ionómero de vidrio tipo I, buscando las mejores condiciones para la formación de las espumas. Se obtuvo una pasta con una viscosidad adecuada para usarla en la fabricación de los andamios, la pasta se colocó en dispositivos cilíndricos de polímero (1 cm de diámetro por 1 cm de grosor) y se dejaron secar 18 h (**Figura 4.10**). Transcurrido este tiempo, los andamios fueron retiradas del polímero, se cortaron y lijaron de modo que cada espuma tuviera 1 cm de grosor.

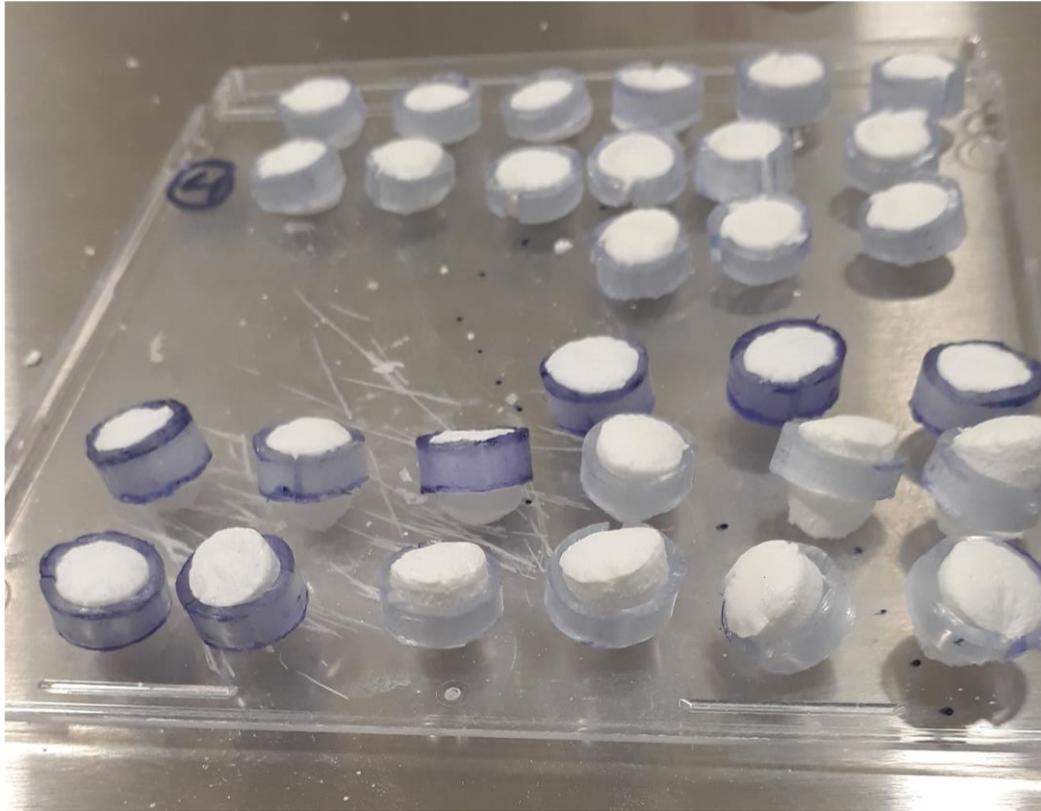


Figura 4.10: Andamios de fosfatos y ionómero en aros de polímero

Los andamios fabricados con ionómero, se colocaron en viales con 1.5 ml de saliva artificial y se almacenaron en una incubadora a una temperatura de 37°C a diferentes tiempos 1, 3 y 7 días.

Para analizar la pérdida de peso fue necesario conocer el peso inicial de los andamios en seco y una vez pasados los tiempos establecidos *in vitro*, las muestras se sacaron de los viales y posteriormente fueron secadas en una mufla durante 24 h a 120°C (**Figura 4.11**). Posteriormente se pesaron los andamios, para analizar la pérdida de peso de las muestras.



Figura 4.11: Andamios dentro de un horno para su secado.

4.6 FABRICACIÓN DE ANDAMIOS PARA APLICACIONES EN REGENERACIÓN ÓSEA

Uno de los métodos para la síntesis de andamios que se utilizó fue la fabricación de una tinta con la que se pudieron hacer preformas que posteriormente se sinterizaron para la formación de un andamio. Para la fabricación de la tinta se utilizó 1g de los fosfatos de calcio previamente sintetizados, ionómero de vidrio y 1g de biovidrio base fosfato. Como se mencionó anteriormente las proporciones de ionómero fue variando dependiendo de la muestra de fosfatos de calcio, sin embargo, para sintetizar la tinta se usó aún más ionómero de vidrio dado que se requería que la pasta formada fuera menos espesa. Una vez obtenida la tinta se extruyeron estructuras 3D, usando una jeringa de 10 ml sin aguja, una espátula de metal, hojas de aluminio de 5x5 cm² y un horno Thermo Electron Corporation, con esto fue posible la fabricación de las estructuras (**Figura 4.12**).

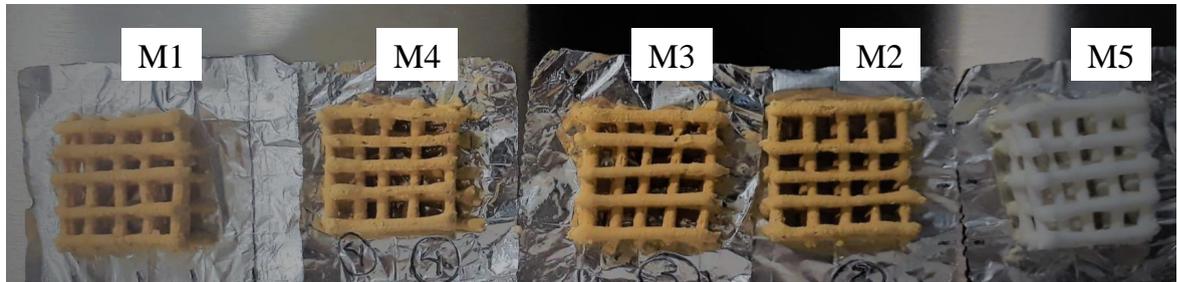


Figura 4.12: Andamios fabricados con tinta de ionómero, biovidrio base fosfato y fosfatos de calcio.

CAPÍTULO 5

RESULTADOS

En este capítulo se presentan los resultados obtenidos de la síntesis de fosfatos de calcio usando como precursores, cáscaras de huevo y ácido fosfórico en diferentes molaridades y las espumas fabricadas usando los fosfatos de calcio sintetizados previamente.

5.1 SÍNTESIS DE FOSFATOS DE CALCIO

Para el cálculo de las cantidades utilizadas para los precursores de la síntesis del biomaterial se tomó en cuenta la pureza y la densidad de estos. Las cantidades que se usaron para la síntesis de fosfatos de calcio se resumen en la **Tabla 5.1** [46, 47].

Tabla 5.1: Cantidades utilizadas para la síntesis de fosfatos de calcio.

Cantidades	Valor
Óxido de calcio (CaO)	5 g
Ácido fosfórico (H ₃ PO ₄)	37 ml
Molaridades de H ₃ PO ₄	(2.03, 2.0, 1.7, 1.4 y 1.1)M
Temperatura de reacción	900° C
Velocidad de calentamiento	10 ° C/min
Tiempo de reacción	114 h

5.2 CARACTERIZACIÓN DE LOS POLVOS DE FOSFATOS DE CALCIO

La composición y la morfología de los fosfatos de calcio antes de ser inmersos en saliva artificial fueron analizados y caracterizados por Microscopía Electrónica de

Barrido (MEB, JEOL JSM IT300) y difracción de Rayos X (DRX, Briker AXS D2 PHASER). En relación con MEB, se realizó espectroscopia de rayos X de energía dispersiva (EDS) para analizar la relación de los elementos presentes en el material. También se usó el programa ImageJ para llevar a cabo el análisis del tamaño de partículas.

5.2.1 Microscopía electrónica de barrido

Se tomaron distintas imágenes usando microscopía electrónica de barrido con la finalidad de evaluar la composición y la morfología de los polvos de fosfato de calcio sintetizados a 900° C (**Figuras 5.1-5.5**).

En las micrografías se observa que en las cinco composiciones de polvos de fosfatos de calcio sintetizados se formaron partículas de placas interpenetrantes con forma y tamaño irregular, así como un alto grado de interconectividad entre ellas.

En la muestra **M1** (**Figura 5.1**) y la muestra **M2** (**Figura 5.2**) es evidente la formación de cúmulos de partículas irregulares con tamaños de 102.344 μm correspondiente a la muestra **M1** y 119.722 μm correspondiente a la muestra **M2**, que se componen por un conjunto de cristales con longitudes variantes. Por otro lado, en la muestra **M2** el tamaño de los cristales formados es menor que los cristales formados en la muestra **M1**.

En la muestra **M3** (**Figura 5.3**) a diferencia de las muestras M1 y M2 la distribución de los cristales muestran una dispersión heterogénea, en las muestras **M4** (**Figura 5.4**) y **M5** (**Figura 5.5**), la distribución de los cristales se observan como en M1 y M2, hay formación de cúmulos de partículas como resultado de la nucleación de cristales, sin embargo, el tamaño es más pequeño que las de las muestras **M1** y **M2**.

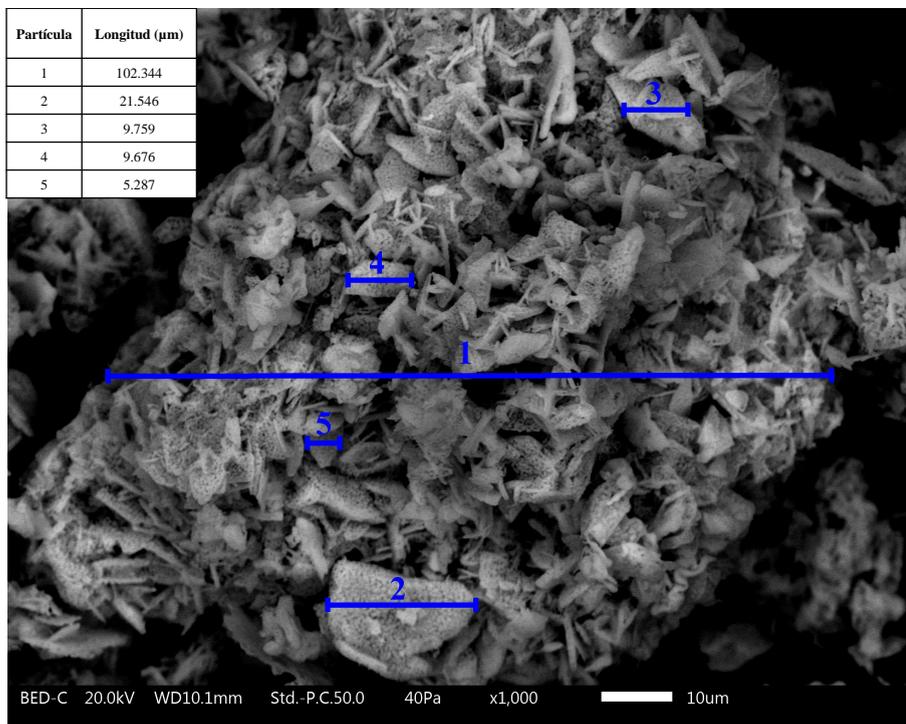


Figura 5.1: M1

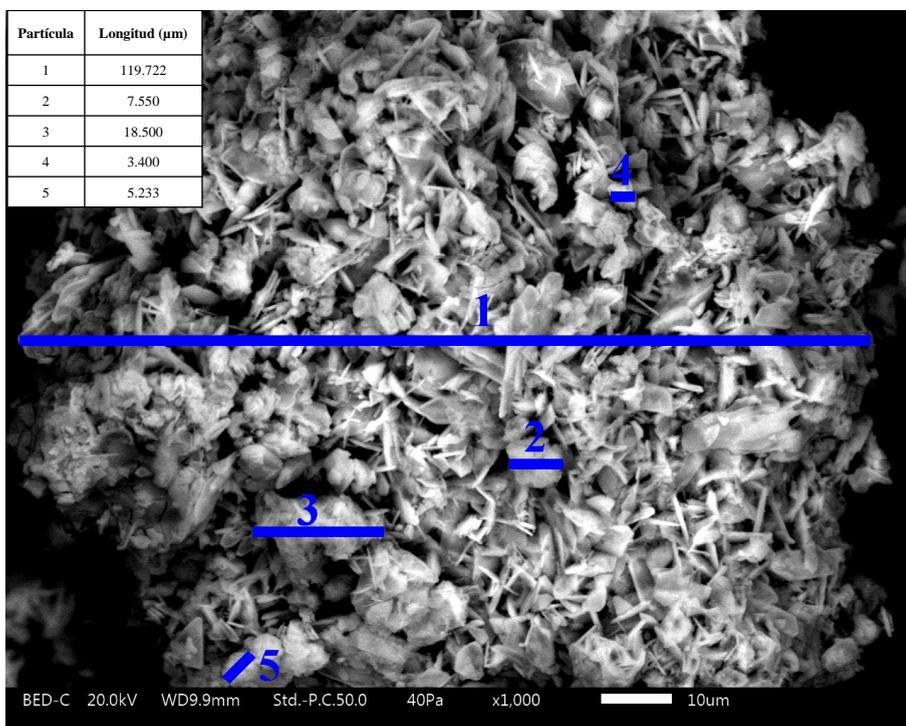


Figura 5.2: M2

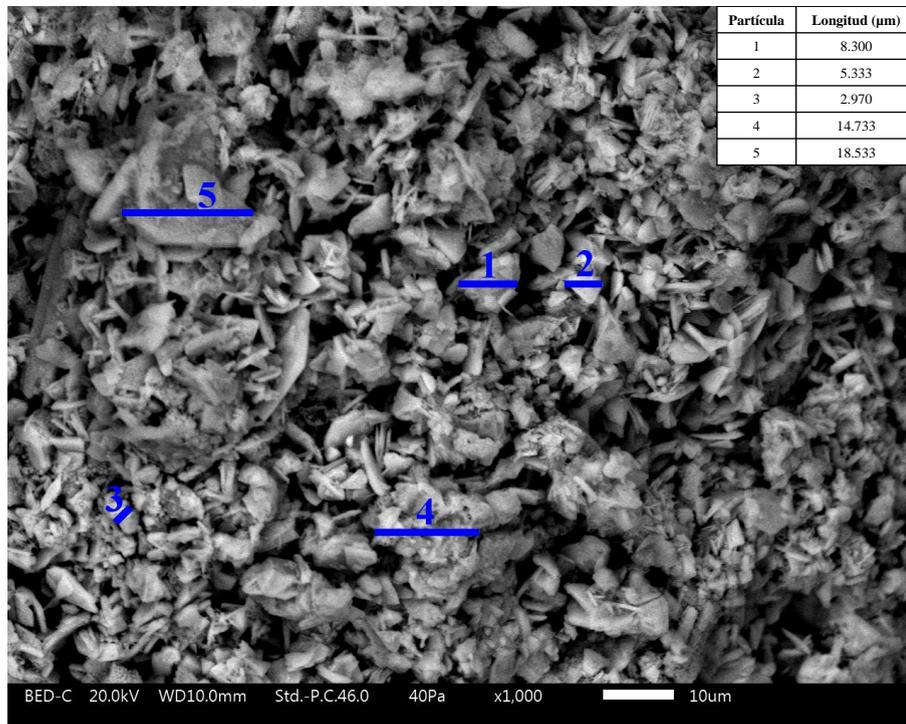


Figura 5.3: M3

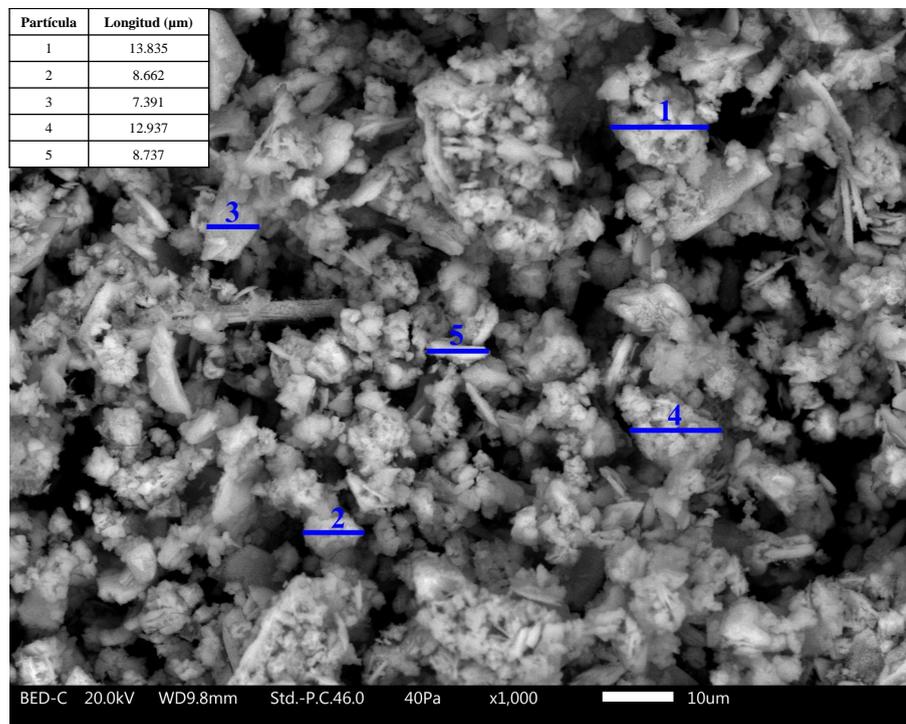


Figura 5.4: M4

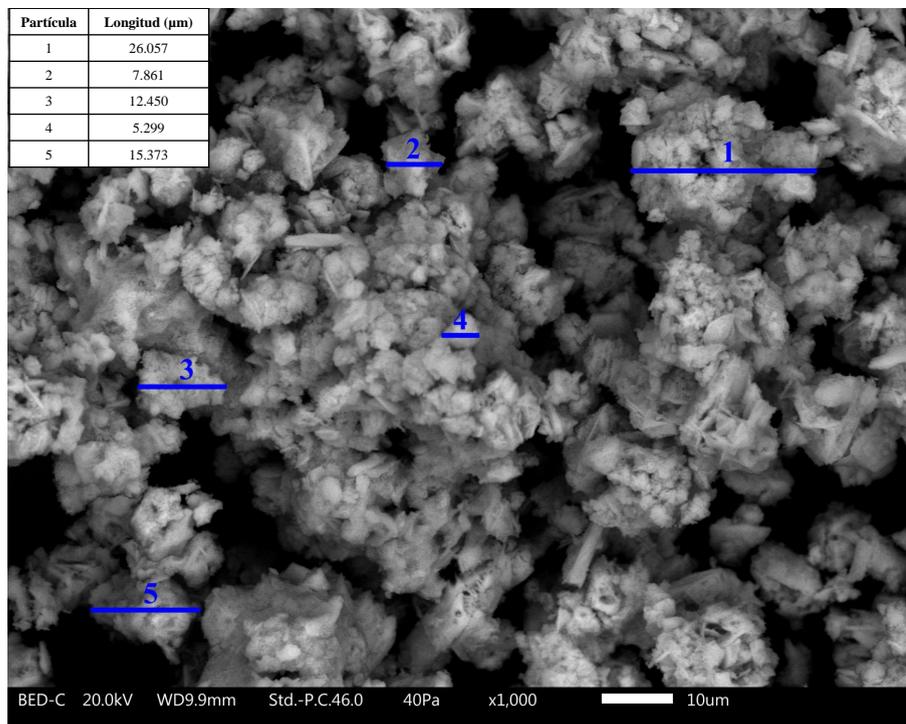


Figura 5.5: M5

Se realizaron análisis usando espectroscopia de dispersión de rayos X (EDS) para evaluar la composición química elemental de las cinco muestras de los fosfatos, los resultados obtenidos se muestran en las **Figuras 5.6-5.10**, en ellas se aprecian los elementos característicos del fosfato tricálcico encontrados en la muestras, la hidroxiapatita y el β -fosfato tricálcico, reportados [30, 31, 43, 48, 49], así como su composición química.

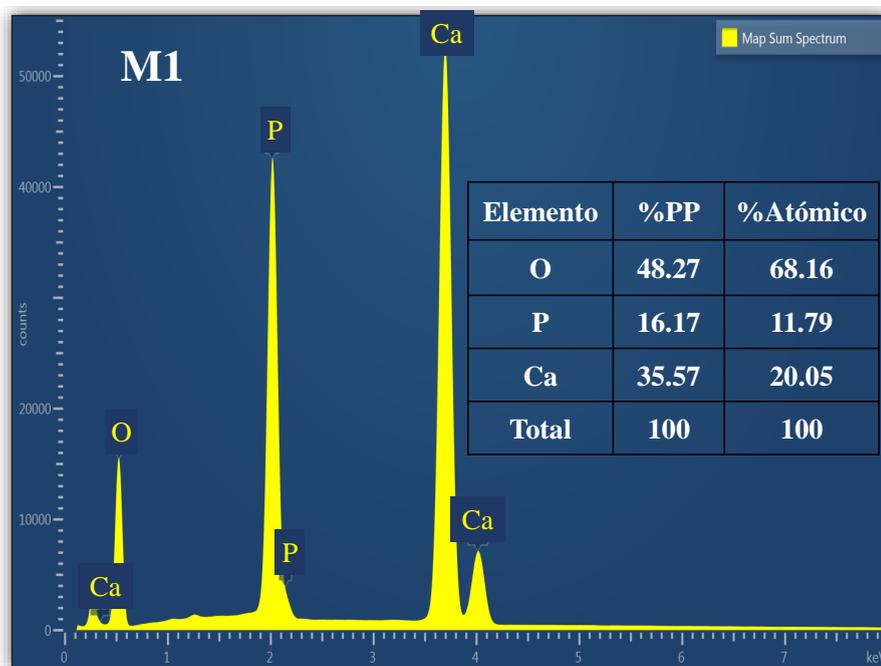


Figura 5.6: Análisis EDS de la muestra M1 de fosfatos

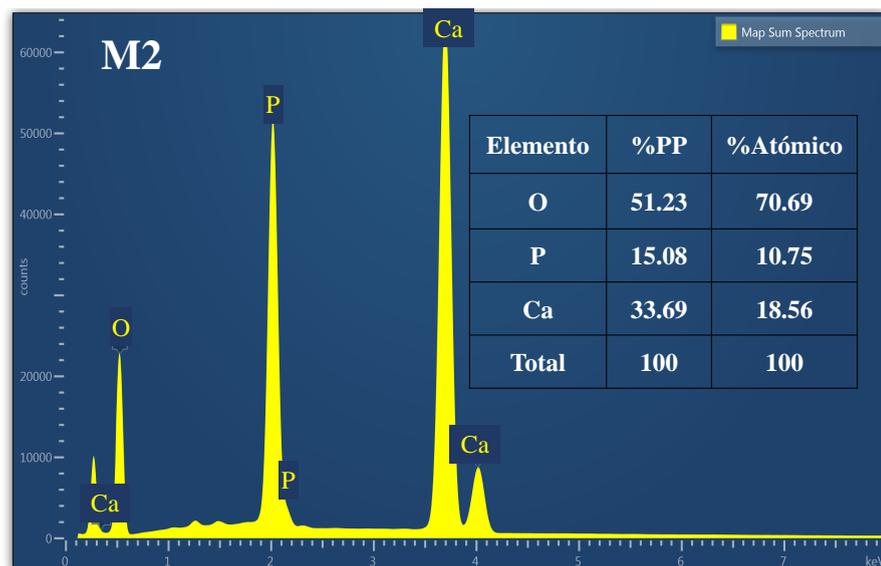


Figura 5.7: Análisis EDS de la muestra M2 de fosfatos

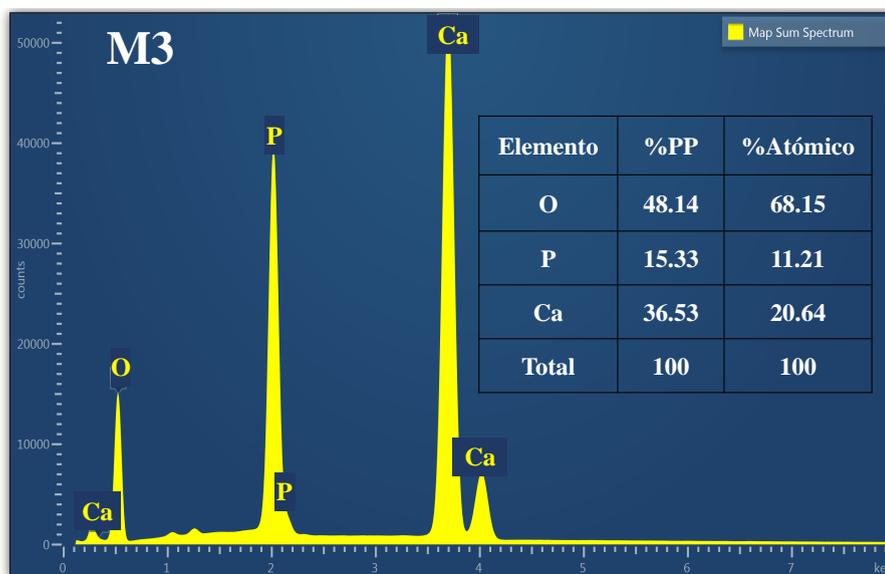


Figura 5.8: Análisis EDS de la muestra M3 de fosfatos

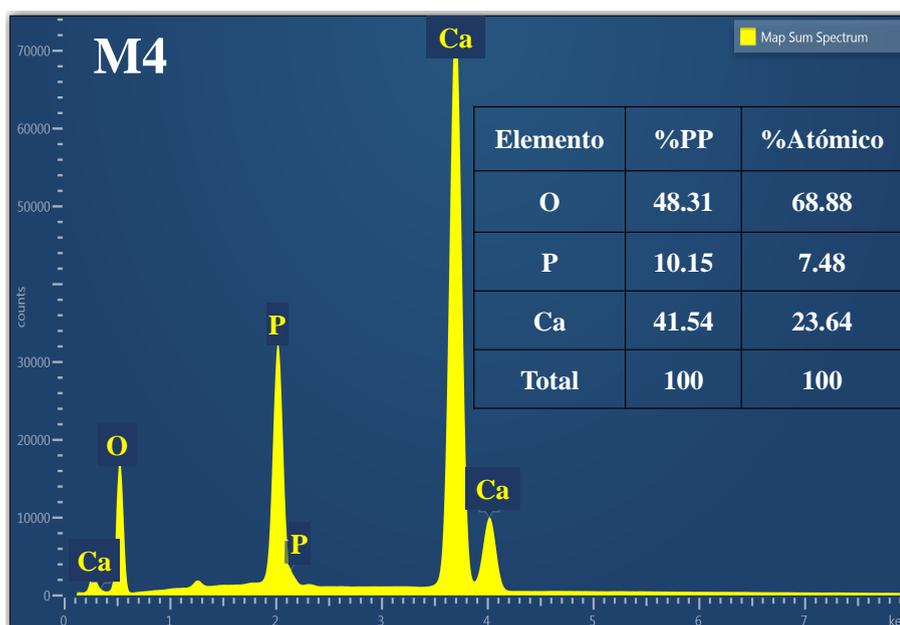


Figura 5.9: Análisis EDS de la muestra M4 de fosfatos

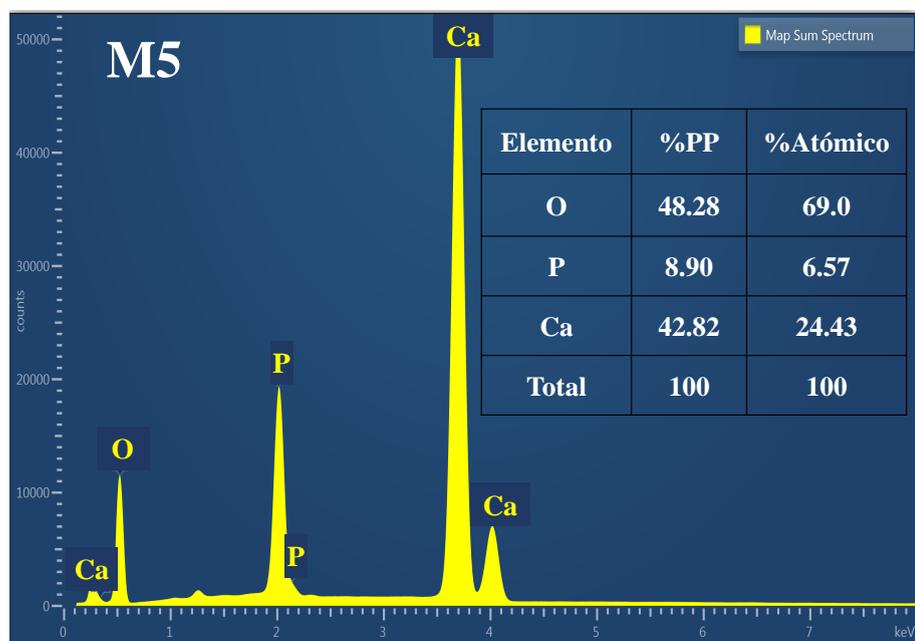


Figura 5.10: Análisis EDS de la muestra M5 de fosfatos

En las **Figuras 5.11-5.15** se muestran las imágenes MEB tomadas con LV-SEC de los polvos de los fosfatos de calcio obtenidos por síntesis química, en ellas se observa la formación de agregados cristalinos con morfología irregular. Las micrografías correspondientes a las muestras **M1** y **M2** muestran mayor aglomeración entre las partículas, mientras que las micrografías correspondientes a la muestra **M3**, **M4** y **M5** muestran una mayor dispersión de las partículas.

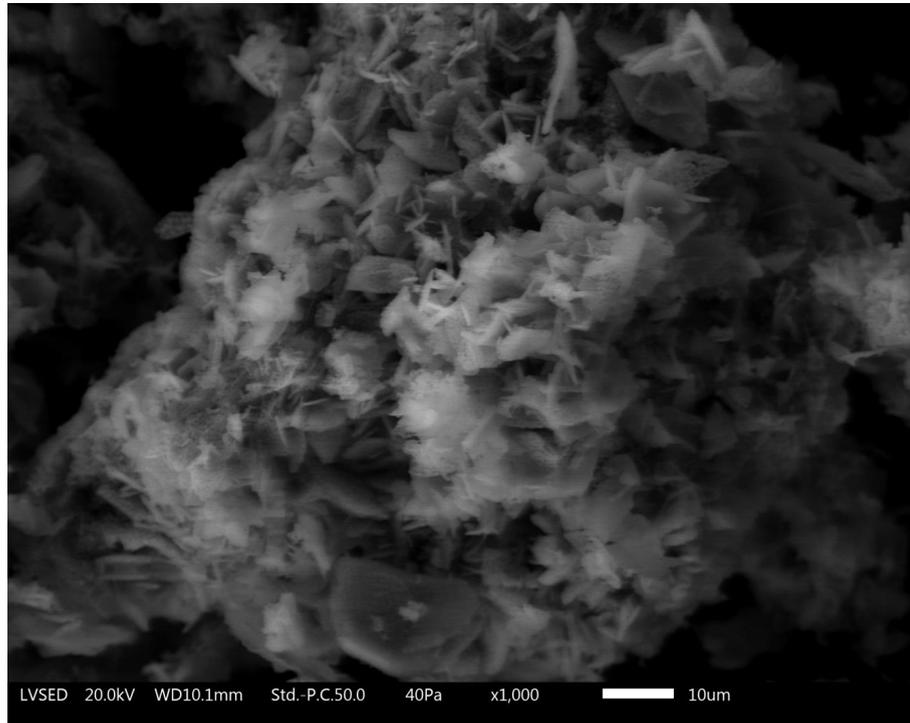


Figura 5.11: Morfología de las partículas de la muestra M1

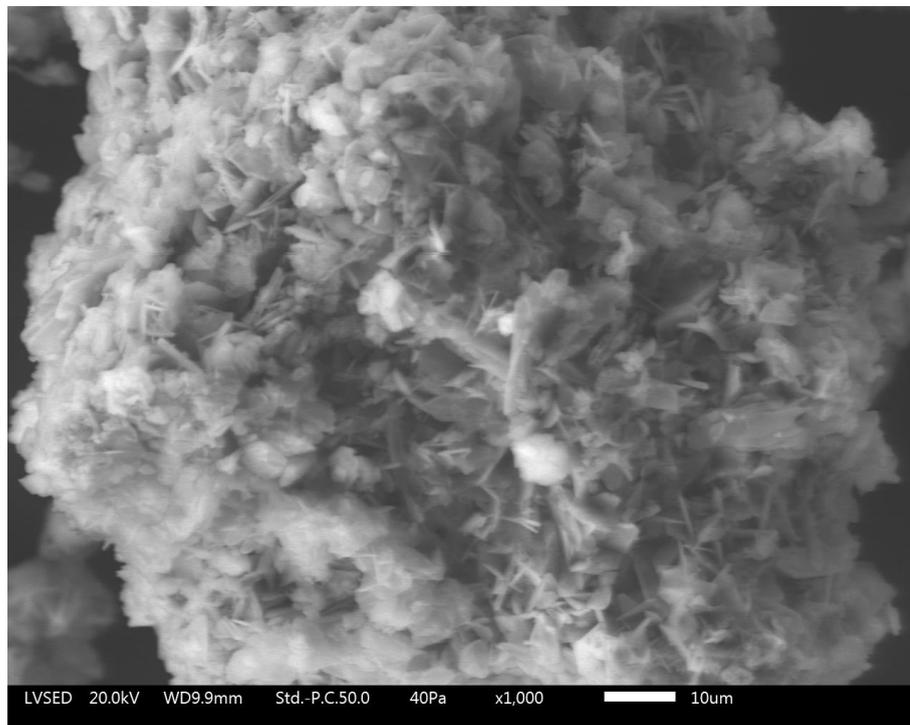


Figura 5.12: Morfología de las partículas de la muestra M2

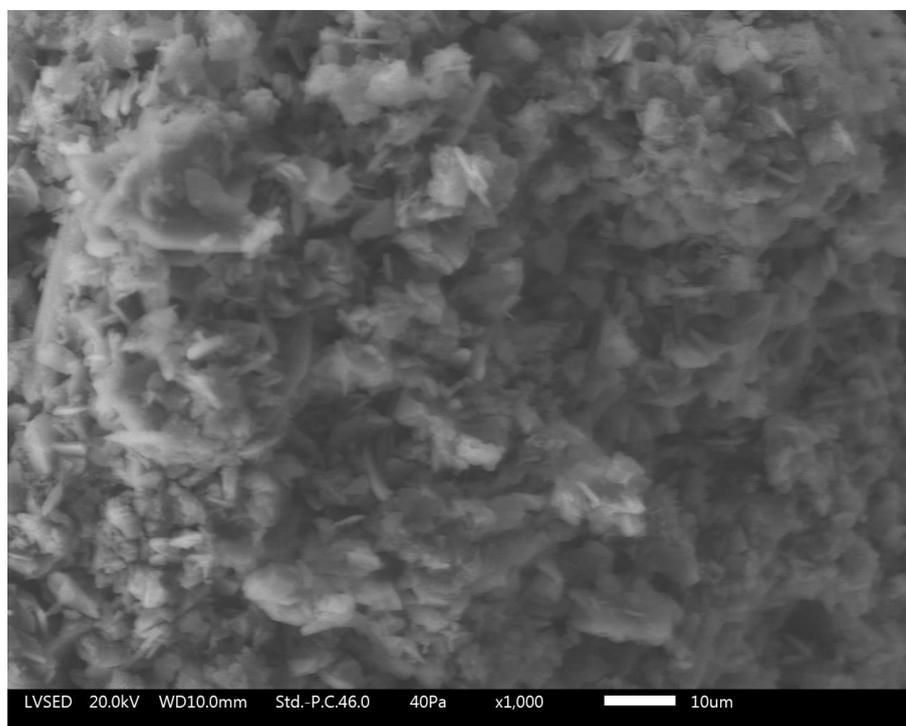


Figura 5.13: Morfología de las partículas de la muestra M3

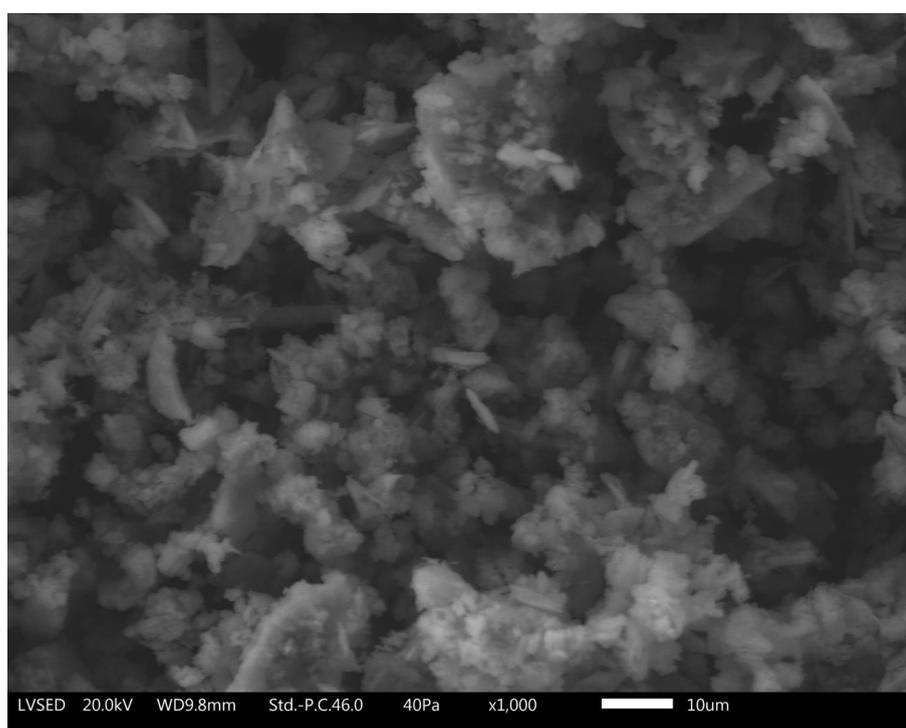


Figura 5.14: Morfología de las partículas de la muestra M4

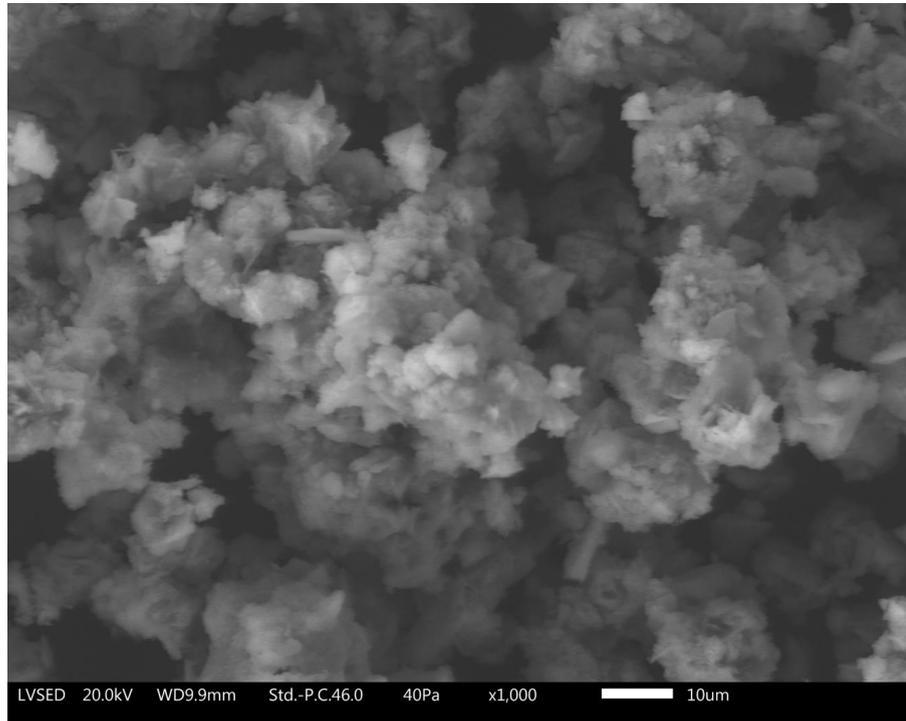


Figura 5.15: Morfología de las partículas de la muestra M5

5.2.2 Difracción de Rayos X (DRX).

Los patrones DRX de los polvos son mostrados en la **Figura 5.16**. En las cinco muestras se encontraron dos fases, las cuales pertenecen a fosfatos difásicos con diferentes relaciones de calcio y fósforo. En los difractogramas de rayos X se señalan las dos fases encontradas, la hidroxiapatita señalada con triángulos y el β -fosfato tricálcico señalado con estrellas. La identificación de las fases se realizó comparando el patrón DRX experimental con los estándares cumplidos por el Centro Internacional de Datos de Difracción (ICDD por sus siglas en inglés) usando la tarjeta 09-432 para la hidroxiapatita y la tarjeta 090169 para el β -fosfato tricálcico.

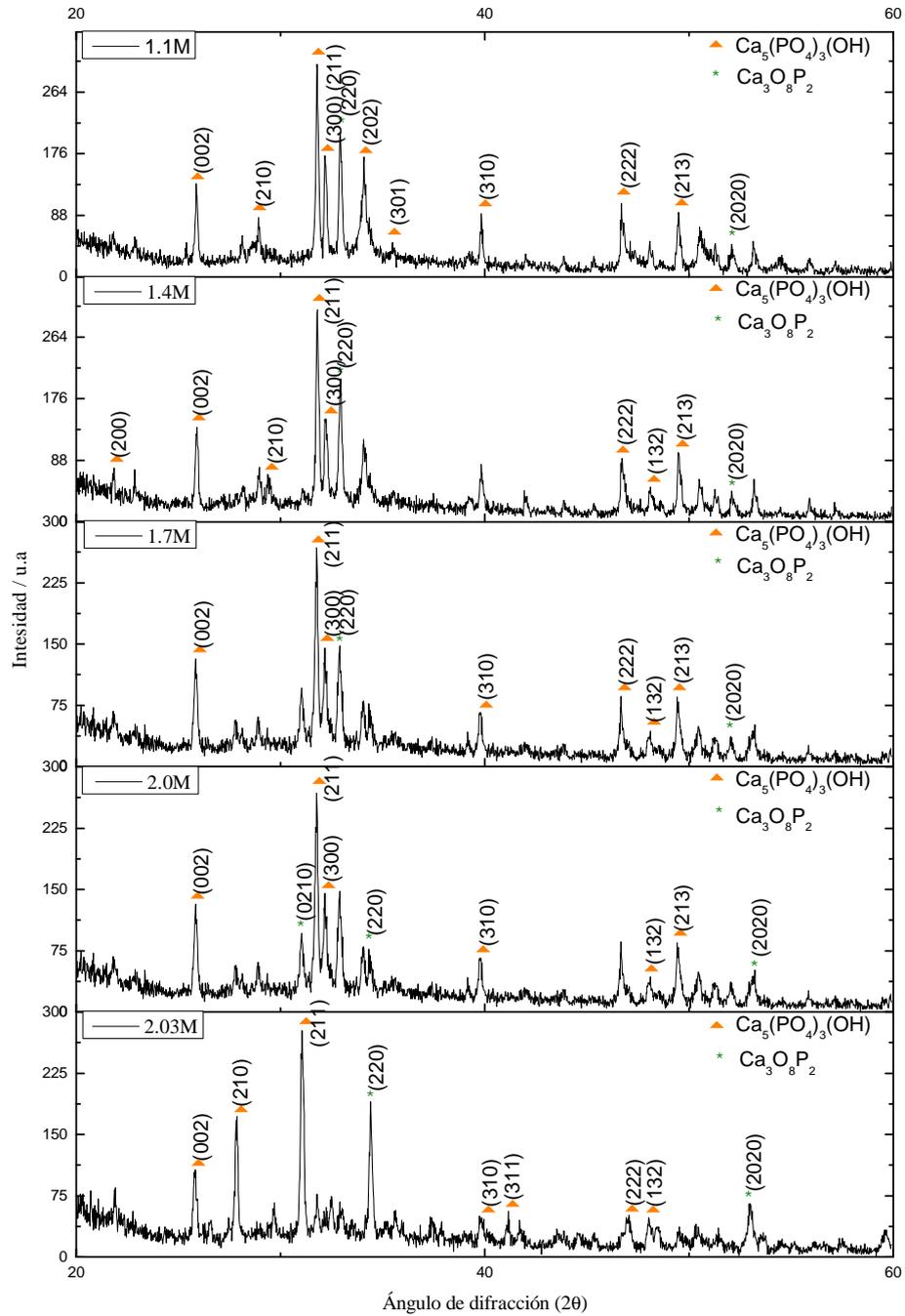


Figura 5.16: Se muestran los resultados de DRX obtenidos de las cinco diferentes composiciones de fosfatos de calcio sintetizados, señalándose los distintos picos característicos de la hidroxiapatita y el β -fosfato tricálcico.

5.3 PRUEBAS *IN VITRO* DE LAS ESPUMAS DE FOSFATOS DE CALCIO

La evaluación de disolución del biomaterial es muy importante en los fosfatos de calcio, ya que de esta manera se puede ver la velocidad en la que el material va a ser reabsorbido por el cuerpo, así como, si el tiempo de reabsorción da pauta para la estimulación de la osteoconducción del hueso y con esto se puede decidir que tan factible es su uso como andamio para la regeneración ósea.

La disolución *in vitro* de los fosfatos de calcio se evaluó a 37 °C, humedad ambiental e inmersos en 1 ml de saliva artificial a tiempos variados (1, 3 y 7 días).

Para reportar la disolución de los fosfatos de calcio *in vitro* se hicieron 3 experimentos por día para cada muestra, después se calculó el promedio del peso inicial y final de cada muestra por día dejando así una forma más practica de analizar los resultados obtenidos (**Figuras 5.17-5.21**). En estas figuras se pueden encontrar algunas gráficas donde el peso final de disolución es mayor que el inicial, esto se debe a que las muestras pudieron no secarse del todo y estar húmedas al momento de pesarse.

Los resultados del promedio de disolución para cada muestra de los fosfatos de calcio se observan en la **Tabla 5.2**, se distingue que M4 y M5 son las muestras que menor pérdida de peso tienen en el tiempo evaluado, puesto que la disolución fue menor cuando estuvieron inmersos en saliva artificial. Esto puede ser favorable ya que, una de las cualidades que se están investigando para los fosfatos de calcio es que la disolución no sea tan rápida.

Tabla 5.2: Promedios de disolución de las 5 muestras.

Muestra	Promedio de disolución (%)
1	73.58
2	64.34
3	45.24
4	6.37
5	8.55

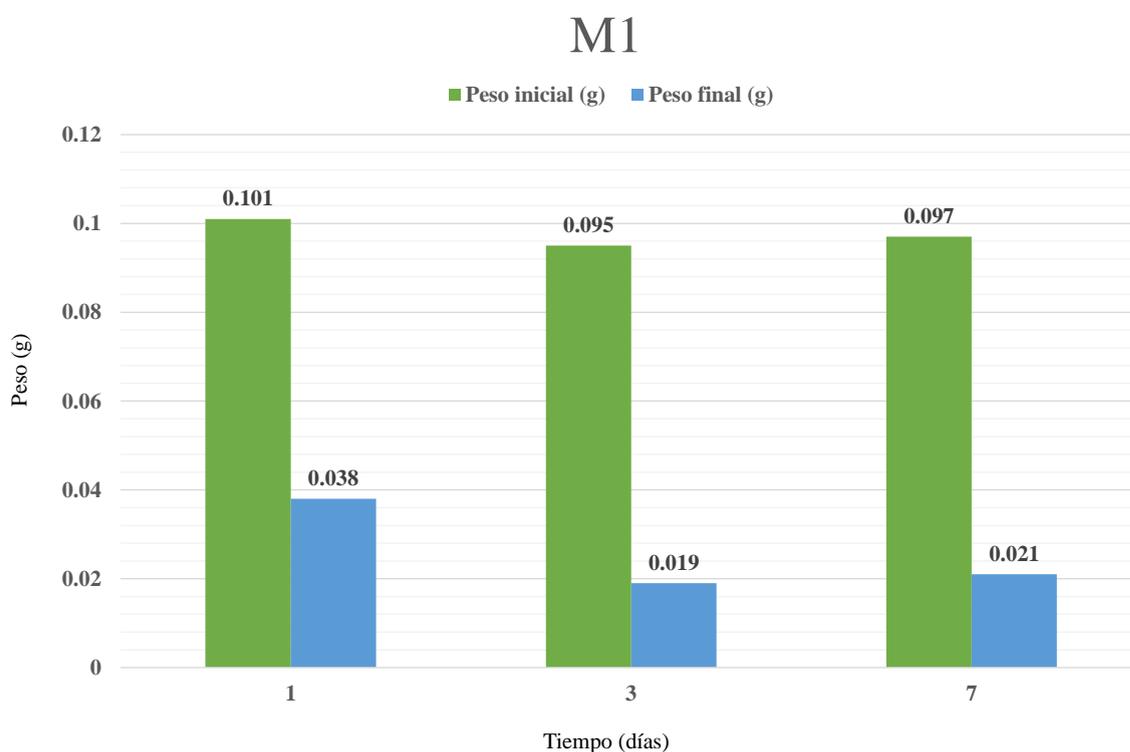


Figura 5.17: Disolución de M1 en 1, 3 y 7 días.

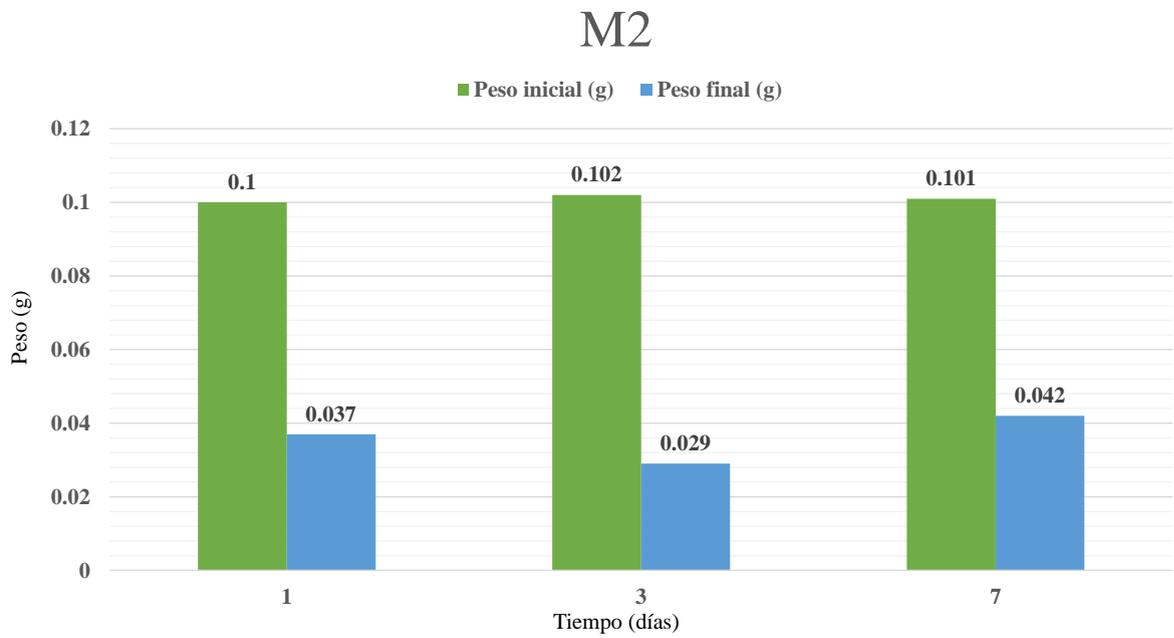


Figura 5.18: Disolución de M2 en 1, 2 y 7 días.

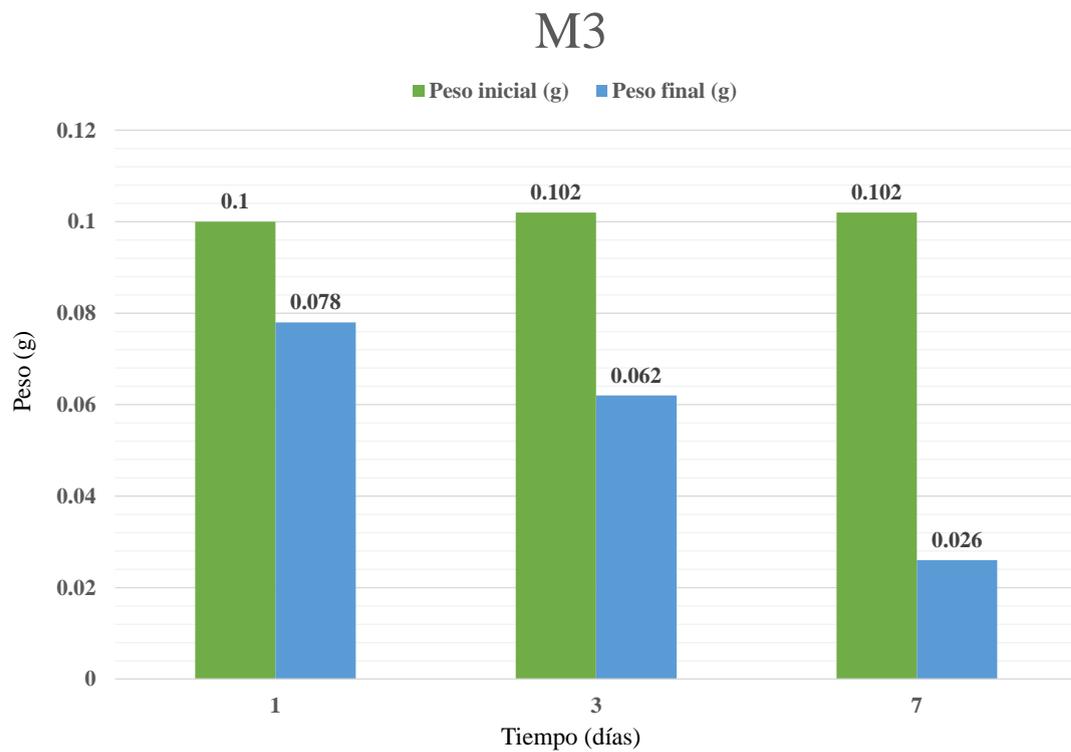


Figura 5.19: Disolución de M3 en 1, 3 y 7 días.

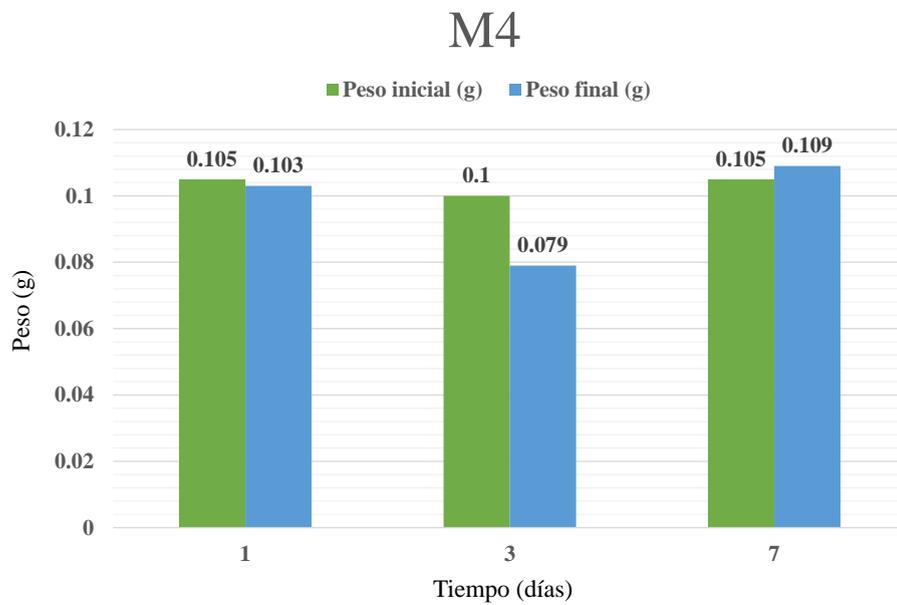


Figura 5.20: Disolución de M4 en 1, 3 y 7 días.

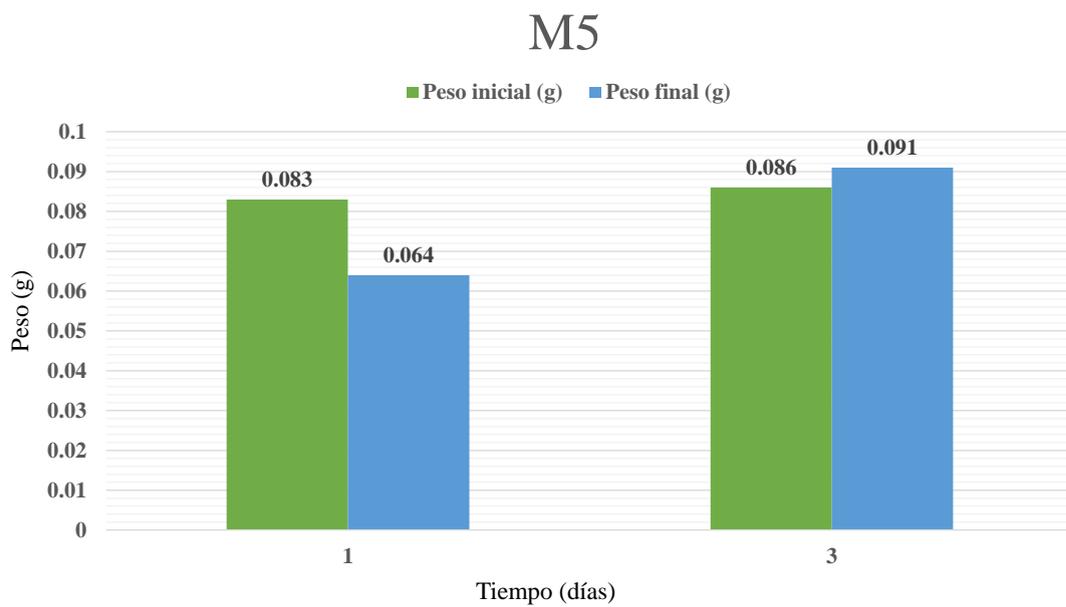


Figura 5.21: Disolución de M5 en 1 y 3 días.

5.4 PRUEBAS *IN VITRO* DE FOSFATOS DE CALCIO CON IONÓMERO

La disolución *in vitro* de los fosfatos de calcio con ionómero, al igual que los fosfatos de calcio sin ionómero, se evaluó a 37 °C, humedad ambiental e inmersos en 1 ml de saliva artificial a tiempos variados (1, 3 y 7 días).

Para reportar la disolución de estas muestras *in vitro* se hicieron 3 experimentos por día para cada muestra, después se calculó el promedio del peso inicial y final para cada muestra por día, dejando así una forma más practica de analizar los resultados obtenidos (**Figuras 5.22-5.26**).

En la **Tabla 5.3** se observa que la muestra **M5i** tuvo una menor disolución que la mayoría de las otras muestras, esto coincide con los resultados de la muestra **M5**, esto quiere decir que los polvos de fosfatos de calcio de M5 pueden ser favorables para su uso en andamios.

Tabla 5.3: Promedios de disolución de las 5 muestras de fosfatos de calcio con ionómero de vidrio

Muestra	Promedio de disolución (%)
1i	61.29
2i	30.14
3i	64.36
4i	38.84
5i	12.74

En las gráficas se pueden observar los cambios en cuanto a peso de las muestras de fosfatos de calcio con ionómero de vidrio a diferentes tiempos.

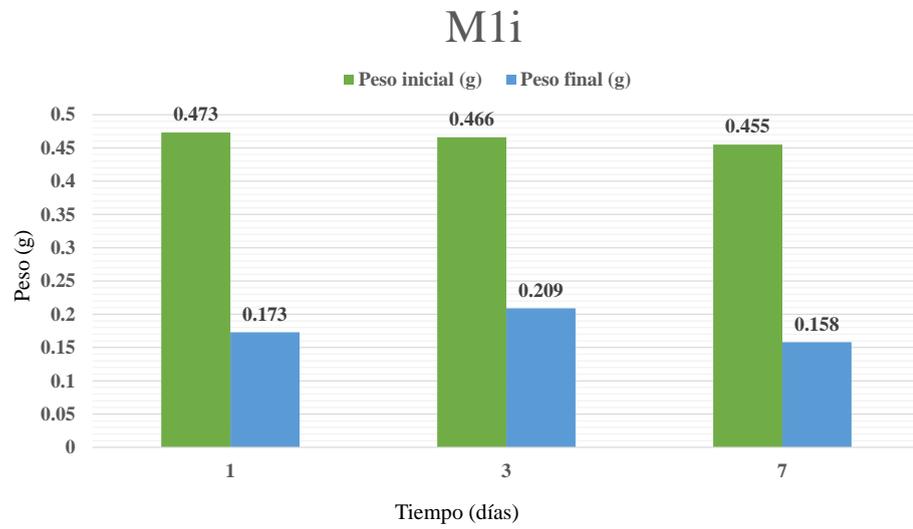


Figura 5.22: Disolución de M1i en 1, 3 y 7 días.

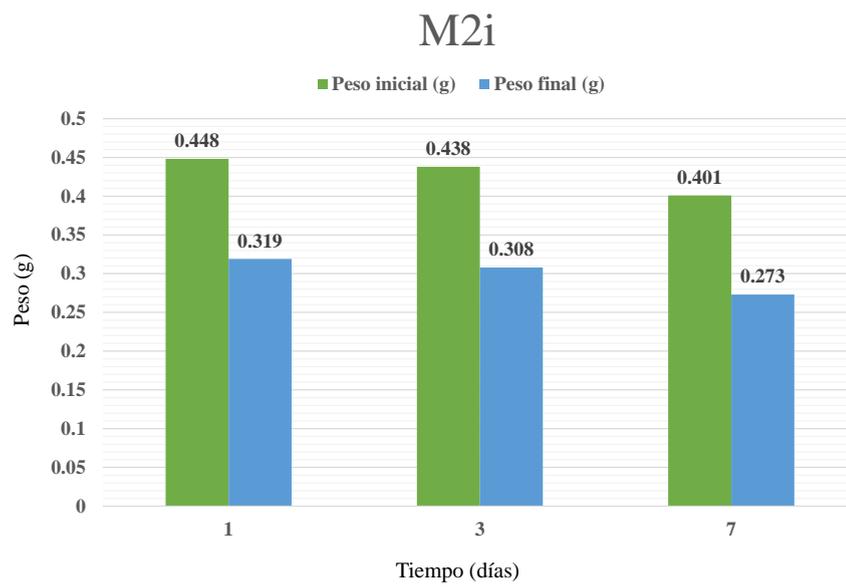


Figura 5.23: Disolución de M2i en 1, 3 y 7 días.

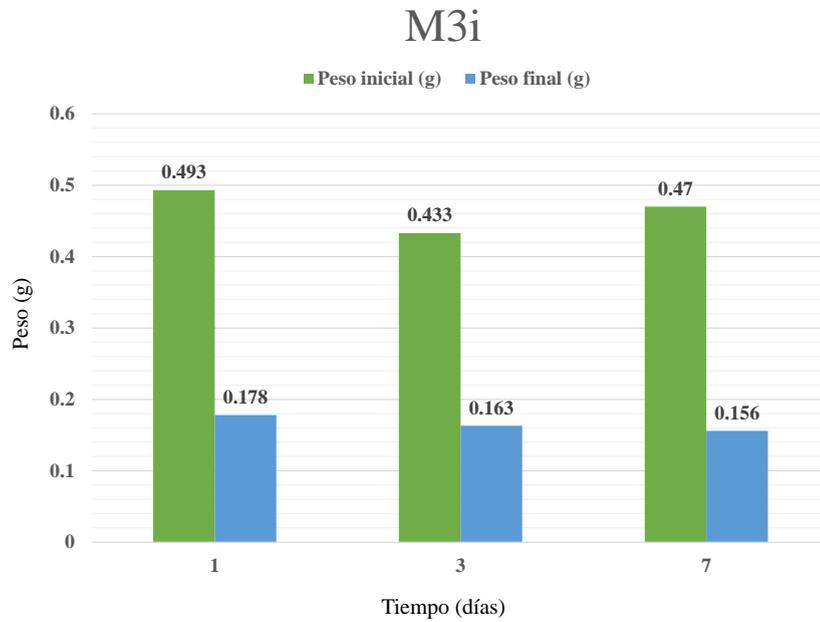


Figura 5.24: Disolución de M3i en 1, 3 y 7 días.

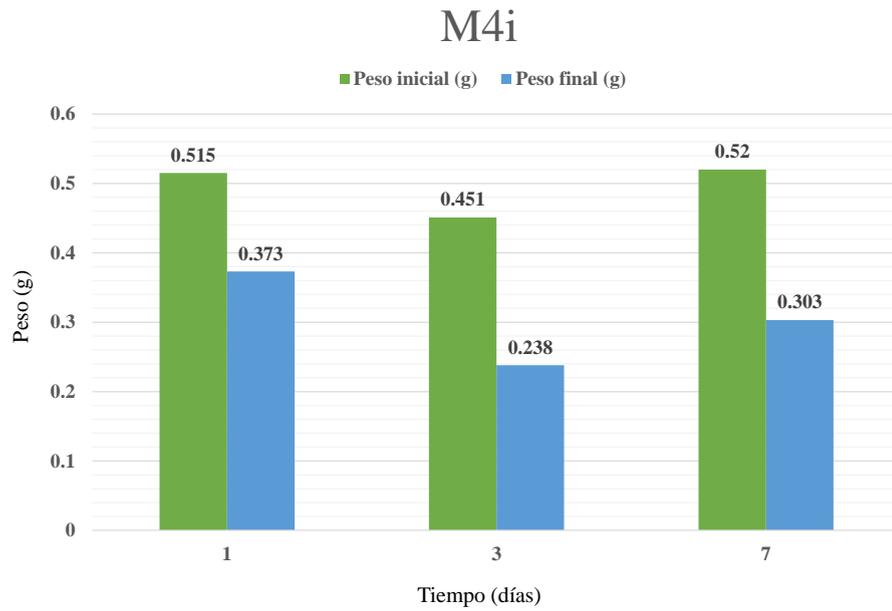


Figura 5.25: Disolución de M4i en 1, 3 y 7 días.

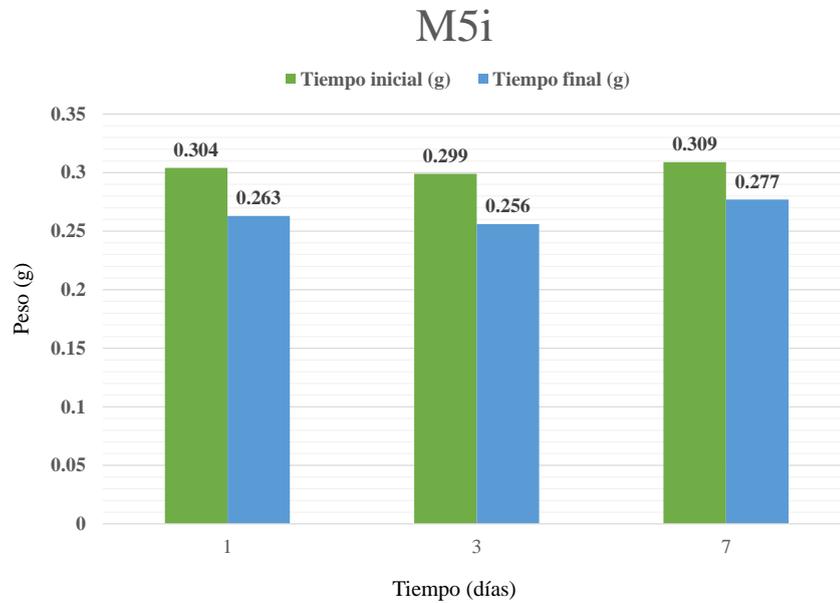


Figura 5.26: Disolución de M5i en 1, 3 y 7 días.

5.5 FABRICACIÓN DE ANDAMIOS PARA APLICACIONES EN REGENERACIÓN ÓSEA

Las muestras que se fabricaron con la tinta de ionómero de vidrio fueron sinterizadas durante dos horas a 900°C con una rampa de calentamiento de 10°C/min (**Figura 5.27**). Estos andamios sinterizados son importantes porque haciendo mejoras en su fabricación pueden ser adaptables a tamaños y formas diferentes que sean aptas para su uso como andamio en la regeneración ósea.

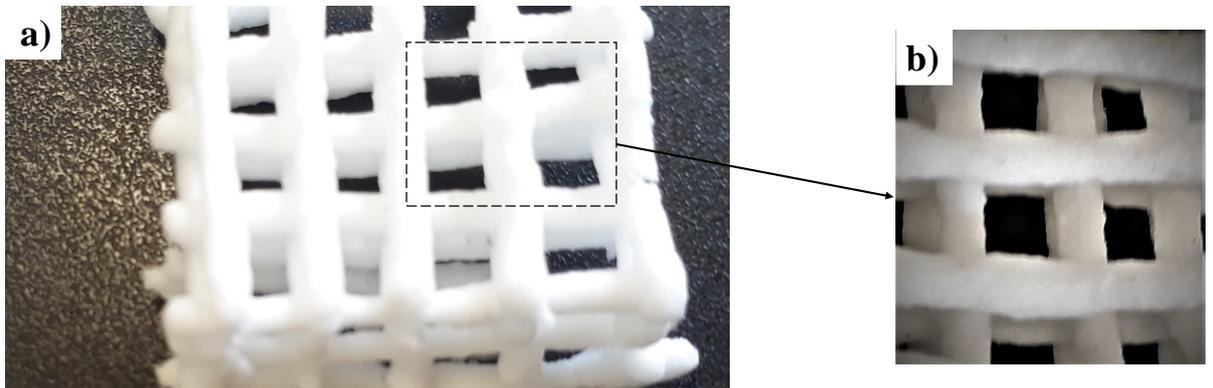


Figura 5.27: Andamios sinterizados

CAPÍTULO 6

DISCUSIÓN

En los análisis de DRX, así como en MEB se pueden observar la formación de dos fases de fosfatos de calcio, la de la hidroxapatita y la del β -fosfato tricálcico lo cual es justificable, ya que dadas las temperaturas y las diferentes molaridades de ácido fosfórico utilizadas para la síntesis de estos, es que dichas fases fueron formadas. El método utilizado para la síntesis de los fosfatos de calcio fue un método poco utilizado pero muy práctico, además de su bajo costo experimental.

Los fosfatos de calcio son precursores de la HA, debido a la precipitación de iones de calcio y fosfato, y aunque, es sabido que los fosfatos de calcio son altamente solubles y que además la formación de HA en soluciones acuosas es rápida y podría representar un inconveniente para su uso como andamio para la reparación ósea, lo que se obtuvo en este trabajo fueron dos fases la HA y el β -fosfato tricálcico, esto es conveniente para que la disolución del biomaterial sea menor permitiendo con ello la reparación ósea.

Se ha demostrado en estudios similares que la tasa de solubilidad entre los fosfatos de calcio en función de su composición va de la siguiente manera $HA > \beta\text{-TCP} > \alpha\text{-TCP}$.

CAPÍTULO 7

CONCLUSIONES

Debido a los resultados obtenidos por MEB y DRX se llegó a la conclusión de que se obtuvo un material difásico ya que se encontraron dos fases cristalinas en las muestras, la perteneciente a la hidroxiapatita y la del β -fosfato tricálcico, esto como resultado de las composiciones de óxido de calcio y ácido fosfórico y a los tratamientos térmicos que se usaron para la síntesis de cada muestra de fosfatos de calcio.

Los biomateriales de fosfatos de calcio que son usados para la reparación ósea lo que forman una vez injertados es HA. El haber obtenido un material difásico es excelente dado que esto ayuda con la disolución del material. Es decir, mientras que la parte del β -fosfato tricálcico estimula a la formación de HA, la HA que esta inmersa en nuestro material ayuda a que este sea más estable y menos soluble mientras la reparación de tejido óseo es llevada a cabo.

Aunado en la composición del biomaterial, los resultados de MEB nos muestran imágenes cuya morfología irregular y distribución de los poros encontrados en el biomaterial indica que su disolución será más rápida que los fosfatos de calcio cuya morfología es regular, por ejemplo en formas de esferas. Este es un punto importante para el desarrollo del biomaterial ya que la disolución juega un papel muy importante para evitar la malformación o calcificación en exceso de la parte a reparar en el paciente. Las dos fases encontradas afecta a la solubilidad del biomaterial y la presencia de ambas puede validar el uso de este, en reparaciones tisulares.

CAPÍTULO 8

TRABAJO FUTURO

8.1 Uso de estructuras 3D de PLA (Ácido poliláctico)

Este método también fue utilizado para controlar el tamaño de poro de los andamios. Para llevarlo a cabo se usaron impresiones 3D de ácido poliláctico y acetato de polivinilo (PLA y PVA por sus siglas en inglés respectivamente), las impresiones se hicieron en el Laboratorio Nacional de Análisis y Síntesis Ecológica (LANASE)(**Figura 8.1**). Las estructuras se sometieron a un proceso de limpieza para retirar el PVA del PLA, ya que sólo se requería esta parte de la estructura. Para la limpieza se usó agua destilada, empezando de manera manual y posteriormente con una parrilla de calentamiento y un agitador magnético para que las piezas quedaran sin rastros de PVA. -Una vez limpias y secas las estructuras de PLA, se hicieron pruebas para averiguar a qué temperatura este material era pirólizado-

Para la fabricación del andamio, una de las estructuras se saturó de polvos de fosfatos de calcio y posteriormente se llevó a cabo el proceso de calentamiento que consistió en dos etapas; la primera etapa sirvió para sinterizar los fosfatos de calcio, esto se hizo a 500 °C con una velocidad de calentamiento de 10 °C/min, mientras que la segunda etapa se hizo para la pirolización del PLA a 900 °C con la misma velocidad de calentamiento.

Este experimento fue fallido ya que los andamios de PLA al tener una estructura donde los espacios que ocupaba el PVA y que posteriormente fueron ocupados por los polvos de fosfatos eran muy pequeños, al llevarse a cabo los procesos de calentamiento, los fosfatos de calcio se fracturaron. Es decir, los fosfatos de calcio se alcanzaron a sinterizar pero la posterior pirolización los fracturó.

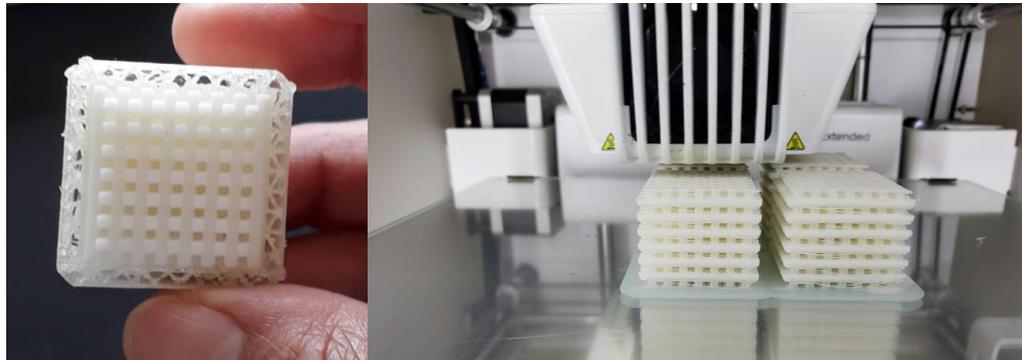


Figura 8.1: Estructuras de ácido poliláctico y acetato de polivinilo

Este método intentó ser mejorado añadiendo ionómero de vidrio a los fosfatos de calcio, pero debido a el tamaño de poro dentro de las impresiones de PVA la sinterización no pudo llevarse exitosamente. Para mejorar este método se necesitan imprimir piezas de PLA con un tamaño de poro más grande y de hecho las impresiones en 3D podrían diseñarse con diversas formas y con esto se podría mejorar el estímulo para la formación del tejido óseo en las áreas específicas donde se necesita llevar a cabo la restauración.

CAPÍTULO 8

BIBLIOGRAPHY

- [1] D. F. D. F. Williams and E. S. for Biomaterials., *Definitions in biomaterials : proceedings of a consensus conference of the European Society for Biomaterials*. England: Elsevier, 1 ed., 1987.
- [2] C. Serrano López, “Biomateriales: Biología y Química en el diseño de tejidos artificiales,” tech. rep., Instituto de Ciencia de Materiales de Madrid (CSIC), mar 2011.
- [3] J. Park and L. R.S, *Biomaterials, An introduction*. third edit ed., 2007.
- [4] M. Velasco and D. A. Garzón Alvarado, “Implantes Scaffolds para regeneración ósea.: Materiales, técnicas y modelado mediante sistemas de reacción-difusión,” *Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas*, vol. 29, 2010.
- [5] “Dental Implant and Bone Graft Markets to Approach \$3.5 Billion in 2010.” <http://www.medicalnewstoday.com/articles/29693.php>.
- [6] E. Velasco Ortega, J. Pato Mourelo, J. J. Segura Egea, O. Pérez Pérez, and R. Medel Soteras, “La utilización del beta-fosfato tricálcico como biomaterial en implantología oral,” *Avances en Periodoncia e Implantología Oral*, vol. 19, no. 3, pp. 2340–3209, 2007.
- [7] M. Hamdan Ali Alkhraisat, *Bioactividad de cementos de fosfatos cálcicos sustituidos con estroncio y su aplicación en regeneración ósea*. PhD thesis, Universidad Complutense de Madrid, oct 2009.
- [8] J. Valdés Figueroa, E. Valdés, and M. A. Valdés, “La cascara del huevo: ¿Desecho o valor agregado para la salud humana y la producción avícola? Una experiencia cubana.,” (La Habana, Cuba), pp. 1–31, 2007.

-
- [9] S. J. M. Duarte Chávez, *Síntesis y caracterización de fosfatos de calcio por el método sol-gel*. Tesis de maestría, Universidad Nacional de Asunción, 2012.
- [10] K. J. Jepsen, “Systems analysis of bone,” jul 2009.
- [11] J. L. Jameson and J. L. De Groot, *Endocrinology - Adult and Pediatric*. Philadelphia: Saunders Elsevier, 6th editio ed., 2010.
- [12] A. Faller and M. Schünke, *Estructura y función del cuerpo humano*. Alemania: Editorial Paidotribo, 13th ed ed., 2006.
- [13] A. Brito Alatorre, *Regeneración ósea guiada previa a la colocación de implantes dentales : reporte de un caso clínico*. PhD thesis, UNAM, 2017.
- [14] A. K. Nair, A. Gautieri, S.-W. Chang, and M. J. Buehler, “Molecular mechanics of mineralized collagen fibrils in bone,” *Nature Communications*, vol. 4, no. 1724, 2013.
- [15] I. Fernandez-Tresguerres Hernandez-Gil, M. A. Alobera Gracia, M. Del Canto Pingarrón, and L. Blanco Jerez, “Physiological bases of bone regeneration I. Histology and physiology of bone tissue,” *Medicina Oral, Patología Oral y Cirugía Bucal*, vol. 11, no. 1, pp. 32–36, 2006.
- [16] C. A. Narváez Tovar, M. A. Velasco Peña, and A. Garzón Alvarado, “Modelos computacionales de diferenciación y adaptación ósea,” *Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas*, vol. 30, no. 1, pp. 1561–3011, 2011.
- [17] E. Gúzman Vega, *Biomateriales con capacidad regenerativa ósea*. PhD thesis, UNAM, 2015.
- [18] A. J. Friedenstein, “Precursor Cells of Mechanocytes,” *International Review of Cytology*, vol. 47, pp. 327–359, jan 1976.
- [19] I. F.-t. Hernández-gil, M. Angel, A. Gracia, C. Pingarrón, L. Blanco, R. J. Carlos, and D. I. F.-t. Hernández-gil, “Bases fisiológicas de la regeneración ósea II . El proceso de remodelado,” pp. 151–157, 2005.

-
- [20] J. E. Davies and M. H. Hosseini, “Histodynamics of Endosseous Wound Healing,” *Bone Engineering*, no. January, pp. 1–14, 2000.
- [21] J. Pritchard, “The osteoblast,” in *The Biochemistry and Physiology of Bone*, pp. 179–212, Elsevier, jan 1956.
- [22] J. Ballester Alfaro, Juan José, Sueiro Fernández, José, Goberna Pseudo, Rocío, Domínguez Bermúdez, Juan Fco, Valero Lanau, “Regeneración ósea. Biomateriales, sustitutos óseos y sustitutos del injerto óseo,” *Biomateriales y sustitutos óseos en traumatología y cirugía ortopédica*, 2011.
- [23] M. E. Navarro, “Desarrollo y Caracterización de Materiales Biodegradables para Regeneración Ósea,” p. 454, 2005.
- [24] M. Zhao, B. Song, J. Pu, T. Wada, B. Reid, G. Tai, F. Wang, A. Guo, P. Walczysko, Y. Gu, T. Sasaki, A. Suzuki, J. V. Forrester, H. R. Bourne, P. N. Devreotes, C. D. McCaig, and J. M. Penninger, “Electrical signals control wound healing through phosphatidylinositol-3-OH kinase-gamma and PTEN.,” *Nature*, vol. 442, pp. 457–60, jul 2006.
- [25] C. Ning, L. Zhou, and G. Tan, “Fourth-generation biomedical materials,” *Materials Today*, vol. 19, no. 1, pp. 2–3, 2016.
- [26] Y. Ikada, “Challenges in tissue engineering,” *Journal of the Royal Society Interface*, vol. 3, pp. 589–601, oct 2006.
- [27] U. Meyer, “The History of Tissue Engineering and Regenerative Medicine in Perspective,” in *Fundamentals of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, pp. 5–12, Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
- [28] F. Barrère, T. A. Mahmood, K. de Groot, and C. A. van Blitterswijk, “Advanced biomaterials for skeletal tissue regeneration: Instructive and smart functions,” feb 2008.
- [29] T. Yamamuro, “Bioceramics,” in *Biomechanics and Biomaterials in Orthopedics* (D. G. Poitout, ed.), ch. 3, pp. 21–32, Springer, 2nd ed., 2004.
-

-
- [30] S. Kargozar, S. Ramakrishna, and M. Mozafari, “Chemistry of Biomaterials: Future Prospects,” *Current Opinion in Biomedical Engineering*, 2019.
- [31] K. K. Gómez Lizárraga, *Manufactura aditiva de andamios de policaprolactona/hidroxiapatita para regeneración ósea*. Tesis doctoral, UNAM, 2017.
- [32] P. Fernigrini, O. Cámara, and F. Oliva, “Síntesis y caracterización de distintas apatitas. Su utilización como biomaterial,” *Asociación Argentina de Materiales*, no. May, 2014.
- [33] A. L. Daltin, S. Beaufils, T. Rouillon, P. Millet, and J. P. Chopart, “Calcium phosphate powder synthesis by out-of-phase pulsed sonoelectrochemistry,” *Ultrasonics Sonochemistry*, vol. 58, nov 2019.
- [34] E. Fernández Aguado, *Obtención y caracterización de nuevos cementos óseos de fosfatos de calcio en el sistema $\text{CaHPO}_4 - \alpha\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$* . Tesis doctoral, Universidad Politécnica de Cataluña, 1996.
- [35] N. S. Mandel, “The structural basis of crystal induced membranolysis,” *Arthritis and Rheumatism*, vol. 19, no. 3, pp. 439–445, 1976.
- [36] N. K. Nga, N. T. Thuy Chau, and P. H. Viet, “Facile synthesis of hydroxyapatite nanoparticles mimicking biological apatite from eggshells for bone-tissue engineering,” *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, vol. 172, no. August, pp. 769–778, 2018.
- [37] W. F. Ho, H. C. Hsu, S. K. Hsu, C. W. Hung, and S. C. Wu, “Calcium phosphate bioceramics synthesized from eggshell powders through a solid state reaction,” *Ceramics International*, vol. 39, pp. 6467–6473, aug 2013.
- [38] R. S. Mathis and J. L. Ferracane, “Properties of a glass-ionomer/resin-composite hybrid material,” *Dental Materials*, vol. 5, no. 5, pp. 355–358, 1989.
- [39] M. H. Wells, “Pit and Fissure Sealants: Scientific and Clinical Rationale,” in *Pediatric Dentistry* (A. J. Nowak, J. R. Christensen, and M. H. Wells, eds.), ch. 33, pp. 461–481.e2, Content Repository Only!, 6 th ed., jan 2019.
-

-
- [40] S. Gurgan, Z. B. Kutuk, F. Yalcin Cakir, and E. Ergin, “A randomized controlled 10 years follow up of a glass ionomer restorative material in class I and class II cavities,” *Journal of Dentistry*, jul 2019.
- [41] S. Sidhu and J. Nicholson, “A Review of Glass-Ionomer Cements for Clinical Dentistry,” *Journal of Functional Biomaterials*, vol. 7, p. 16, jun 2016.
- [42] D. Xie, W. A. Brantley, B. M. Culbertson, and G. Wang, “Mechanical properties and microstructures of glass-ionomer cements,” *Dental Materials*, vol. 16, no. 2, pp. 129–138, 2000.
- [43] M. Akram and R. Ahmed, “Extracting hydroxyapatite and its precursors from natural resources,” *Journal of Materials Science*, vol. 49, no. 4, pp. 1461–1475, 2014.
- [44] I. Sardonis O, *Andamios porosos*. Tesis doctoral, Universidad del País Vasco, 2015.
- [45] M. P. Nikolova and M. S. Chavali, “Recent advances in biomaterials for 3D scaffolds: A review,” *Bioactive Materials*, vol. 4, pp. 271–292, dec 2019.
- [46] S. J. Lee and S. H. Oh, “Fabrication of calcium phosphate bioceramics by using eggshell and phosphoric acid,” *Materials Letters*, vol. 57, no. 29, pp. 4570–4574, 2003.
- [47] S. J. Lee, Y. S. Yoon, M. H. Lee, and N. S. Oh, “Nanosized hydroxyapatite powder synthesized from eggshell and phosphoric acid,” *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, vol. 7, pp. 4061–4064, nov 2007.
- [48] S. Sasikumar and R. Vijayaraghavan, “Low temperature synthesis of nanocrystalline hydroxyapatite from egg shells by combustion method,” *Trends in Biomaterials and Artificial Organs*, vol. 19, no. 2, pp. 70–73, 2006.
- [49] F. C. Driessens, J. W. van Dijk, and J. M. Borggreven, “Biological calcium phosphates and their role in the physiology of bone and dental tissues I. Composition

and solubility of calcium phosphates,” *Calcified Tissue Research*, vol. 26, no. 1, pp. 127–137, 1978.

NOTAS