

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA

Escuela de Ciencias de la Ingeniería y Tecnología

Unidad Valle de las Palmas



**Metodología para la Fabricación de Andamios Porosos de Hidroxiapatita y Fluorapatita
mediante Lixiviación de Sales**

Tesis que para obtener el título de:

BIOINGENIERIO

Presenta:

Vareska Lucero Zárate Córdova

Director de tesis:

Dr. Luis Jesús Villarreal Gómez

Tijuana, B. C. 13 de Abril del 2016

Dedicatoria

Este trabajo está dedicado a mis abuelos, Máximo y Natalia, por el enorme apoyo y amor incondicional que me han transmitido desde pequeña. Porque ni la distancia ni los años han evitado que me acompañen en cada uno de los sucesos más importantes de mi vida. Porque han sido para mí un ejemplo de lucha y sacrificio.

A mis padres, Robert y Marcela, por todo el esfuerzo que realizaron y por el cariño que me han demostrado. Porque a pesar de todo siempre han dado lo mejor de sí.

A mi tía Vilma, por quererme como a una hija, por alentarme y apoyarme durante toda mi etapa universitaria.

Agradecimientos

Quiero expresar un profundo y sincero agradecimiento a todas aquellas personas que me han brindado su soporte técnico y humano durante la realización del presente trabajo de investigación.

En primer lugar quiero agradecer a las instituciones que han hecho posible la realización del trabajo. Al Centro de Investigación y Desarrollo Tecnológico en Electroquímica (CIDETEQ) por la ayuda y confianza brindada al facilitar el acceso a sus laboratorios para el análisis de las muestras. Y a la Universidad Autónoma de Baja California, mi alma mater, por el apoyo recibido durante estos años que me han permitido desarrollar mi espíritu investigativo.

Un especial agradecimiento al Dr. Luis Jesús Villarreal Gómez, director de esta investigación, por la confianza que depositó en mí, su constante apoyo, sus indicaciones y orientaciones indispensables en el desarrollo de este trabajo. Pero sobre todo por la motivación, el respaldo y amistad recibida a lo largo de estos años.

Un agradecimiento al Dr. Eduardo Alberto López Maldonado y la Dra. Mercedes Teresita Oropeza Guzmán, miembros del cuerpo de investigación en CIDETEQ, por el interés mostrado en mi trabajo y las sugerencias recibidas. Y a mis sinodales, Dra. Ana Leticia Iglesias y al Mtro. Juan Antonio Paz González por el apoyo y las orientaciones que me han dado.

A Ayla Carolina Vea Barragán, alumna de doctorado en la Facultad de Ciencias Química e Ingeniería de la UABC, y al Dr. Jose Manuel Cornejo Bravo investigador por el invaluable apoyo con la prensa hidráulica.

A Dr. Ricardo Valdez Castro y Erick Barrios, estudiantes de CIDETEQ, por incondicional apoyo y el tiempo proporcionado en el manejo del SEM.

A Maria Magdalena Reyes Fernandez, estudiante de bioingeniería de ECITEC, por su valiosa colaboración durante la fabricación de las pastillas.

Un agradecimiento muy especial a mi familia y amigos por la comprensión y el ánimo recibidos.

A todos ellos, muchas gracias.

Contenido

Resumen.....	9
Introducción.....	10
Objetivo General	16
Objetivos específicos	16
Capítulo 1 Antecedentes y estado del arte	17
Capítulo 2 Fundamento Teórico	22
2.1 Los huesos.....	22
2.1.1 Composición química y propiedades físicas	22
2.1.2 Tipos de tejido óseo.....	22
2.1.3 Mecanismos de regeneración ósea	23
2.2 Injerto óseo	24
2.2.1 Tipos de injerto óseo	24
2.3 Técnicas de fabricación de andamios porosos.....	28
2.3.1 Lixiviación de sales.....	28
2.3.2 Gel-casting	29
2.3.3 Liofilización.....	29
Capítulo 3 Materiales y Método	30
3.1 Síntesis hidroxiapatita (HA) y fluorapatita (FA).....	31
3.2 Microscopía electrónica de difracción de rayos X (DRX)	33
3.3 Análisis del efecto de la sal en la porosidad de los andamios de HA.....	33
3.3.1 Selección de sales.....	33
3.3.2 Mezcla Sal/HA	35
3.3.3 Prensado y tratamiento térmico de los andamios de HA.....	36

3.3.4	Proceso de lixiviación de sales	36
3.3.5	Análisis de concentración de lixiviado mediante microscopía de emisión atómica ...	37
3.3.6	Microscopia electrónica de barrido (SEM).....	39
3.4	Análisis del efecto de la temperatura en la porosidad de los andamios de HA y FA	40
Capítulo 4 Resultados y discusión de resultados.....		41
4.1	Síntesis de HA y FA mediante método de precipitación por vía húmeda.....	41
4.2	Microscopía electrónica de difracción de rayos X (DRX)	45
4.3	Análisis del efecto de la sal en la porosidad de los andamios de HA.....	48
4.4	Análisis del efecto de la temperatura en la porosidad de los andamio de HA y FA.....	53
Conclusiones.....		66
Bibliografía		67
Anexos		75

Índice de figuras

Figura 1. Hueso esponjoso. Representación de las principales células óseas.	11
Figura 2. Micrografía Electrónica de Barrido de la hidroxiapatita.	14
Figura 3. Efecto de la sinterización en los granos de HA.	15
Figura 4. Diagrama de flujo de la metodología	30
Figura 5. Agitación Magnética de la HA y FA	31
Figura 6. Centrifugación de la HA y FA.	31
Figura 7. Filtración de la solución de HA y FA	32
Figura 8. Proceso de sinterización del polvo de HA y FA en la mufla	32
Figura 9. Mortero. Homogenización de las sales con la HA.	35
Figura 10. Mezcla de la HA y FA con las sales luego de la homogenización	35
Figura 11. A) Prensa hidráulica Carver. B) Proceso de sinterización en la mufla. C) Pastillas de sal/HA	36
Figura 12. Esquema del dispositivo de lixiviación por goteo.	37
Figura 13. Diagrama de flujo del proceso de lixiviación de los andamios de HA.	37
Figura 14. A) Rotor y tubos del sistema de acondicionamiento. B) Sistema de reacción microondas.	38
Figura 15. A) Preparación de la curva de calibración. B) Muestras acondicionadas. C) Detector, nebulizador y cámara ciclónica del MP-AES	39
Figura 16. Microscopio electrónico de barrido.	40
Figura 17. Hidroxiapatita en polvo	42
Figura 18. Fluorapatita en polvo	44
Figura 19. Espectro de Rayos X del polvo de Hidroxiapatita	46
Figura 20. Espectro de Rayos X del polvo de Fluorapatita	46
Figura 21. Patrón de difracción de rayos X para (a). fluorapatita, (b) hidroxiapatita y (c) clorapatita calculado con los parámetro estructurales de Hughes et al (Fleet, 2014).	47
Figura 22. Andamios de KCl con HA sinterizados a 160 °C.	50
Figura 23. Andamios de KCl con HA sinterizados a 1050 °C.	50
Figura 24. Micrografías SEM de las pastillas A y B	51

Figura 25. A) Conteo de poros con la herramienta threshold del programa ImageJ del andamio A2. B) Medición del diámetro de dos poros de la pastilla A2	52
Figura 26. Andamios de cloruro de potasio con hidroxiapatita.....	53
Figura 27. Micrografías de la muestra A con tratamiento térmico de 1050 °C	55
Figura 28. Comparación de micrografías SEI y BEI del andamio A a 160 °C.....	55
Figura 29. Micrografías de los andamios A.....	56
Figura 30. Micrografías de los andamios B.....	57
Figura 31. Micrografías de los andamios C	57
Figura 32 Micrografías de los andamios D	58
Figura 33. Micrografías de los andamios con mayor porosidad.	61
Figura 34. Gráficas de los andamios A. A) Porcentaje de porosidad en función de la temperatura. B) Diámetro de poro promedio en función de la temperatura.....	62
Figura 35. Gráficas de los andamios B. A) Porcentaje de porosidad en función de la temperatura. B) Diámetro de poro promedio en función de la temperatura.....	63
Figura 36. Gráficas de los andamios C. A) Porcentaje de porosidad en función de la temperatura. B) Diámetro de poro promedio en función de la temperatura.....	63
Figura 37. Gráficas de los andamios D. A) Porcentaje de porosidad en función de la temperatura. B) Diámetro de poro promedio en función de la temperatura.....	64

Índice de tablas

Tabla 1. Principales materiales para reconstrucción ósea y algunas de sus desventajas.....	13
Tabla 2. Algunos huesos sintéticos comerciales.....	19
Tabla 3. Parámetros evaluados en la selección de sales. *Sales seleccionadas.....	34
Tabla 4. Diferencia de costos entre una HA comercial y la HA sintetizada por precipitación vía húmeda.....	45
Tabla 5. Andamios de sal/HA y sus respectivas características de fabricación	49
Tabla 6. Diámetro promedio de poros y el porcentaje de porosidad de los andamios de HA.....	52
Tabla 7. Condiciones de fabricación de andamios porosos de HA, FA, HAS y FAS.....	54
Tabla 9. Porcentaje de porosidad y diámetro de poro promedio de los andamios A, B, C y D...58	
Tabla 10. Resumen del porcentaje de porosidad y diámetro de poro promedio de los andamios A, B, C y D.	60

Resumen

En la actualidad el injerto de hueso autólogo sigue siendo el tratamiento estándar al daño o lesión ósea. Sin embargo, este procedimiento presenta algunas dificultades como el riesgo de desarrollar dolores crónicos, disponibilidad limitada, la necesidad de una segunda cirugía, tamaño y forma inadecuada y la morbilidad de la zona donante. Una alternativa para solucionar este problema es el desarrollo de implantes óseos. La respuesta del organismo a estos implantes depende de factores como el material del injerto y su porcentaje de porosidad. La hidroxiapatita (HA) y fluorapatita (FA) son biocerámicos ampliamente usados en aplicaciones biomédicas debido a sus propiedades como biocompatibilidad, no toxicidad, estabilidad química y bioactividad. Por otro lado, la lixiviación de sales es considerada un método barato (17.69 pesos/gr aproximadamente, dependiendo de las variaciones del mercado) de fabricación de andamios porosos que se caracteriza por su simplicidad de equipos y operación. El objetivo de este trabajo es la estandarización de una metodología para la fabricación de andamios porosos de HA y FA para aplicaciones de regeneración de tejido óseo. Para preparar los andamios, primero fueron sintetizadas la HA y FA mediante el método de precipitación por vía húmeda. Los polvos de HA y FA fueron evaluados mediante microscopía electrónica de difracción de rayos X (DRX). Los andamios porosos de HA y FA fueron fabricados mediante la técnica de lixiviación de sales y el producto final fue caracterizado mediante microscopía electrónica de barrido (SEM). La cuantificación de porosidad y diámetro de poro promedio de la superficie de todas las pastillas fueron calculados con el software ImageJ. En conclusión, durante el proceso de lixiviación de sales, se encontraron una porosidad y tamaño de poro significativos (57% - 100 μm) utilizando cloruro de potasio (KCl), 10 ml de agua y un tratamiento térmico de ~ 840 °C y ~ 1093 °C para las muestras de HA y FA, respectivamente. Una caracterización mecánica y análisis de citocompatibilidad son necesarios para evaluar, en un futuro, diferentes formulaciones con grafeno y otros biopolímeros que permitan mejorar las propiedades mecánicas y la osteoconductibilidad de los andamios.

Introducción

“El hueso es un tejido conectivo altamente especializado y dinámico que presenta extraordinarias propiedades mecánicas y capacidad regenerativa” (Serra, Fradique, Vallejo, Correia, Correia, & Miguel, 2015). Su objetivo es desempeñar dos funciones fundamentales: mecánica o de sostén y protección para las estructuras internas, y bioquímicas, es decir, de regularización homeostática y de mantenimiento del equilibrio ácido-básico, en sinergia con los mecanismos respiratorios y renales (Di Stefano y Cazzaniga, 2013).

La matriz extracelular ósea se encuentra calcificada y presenta constituyentes orgánicos e inorgánicos. El componente orgánico, que constituye cerca de 35% del peso seco del hueso consiste en fibras que son casi exclusivamente de colágeno de tipo I que se encuentran en forma de haces entre 50 a 70nm de diámetro. Se encuentran también glucosaminoglucanos sulfatados, diversas glucoproteínas como osteocalcinas, osteopontinas y sialoproteínas. La porción inorgánica del hueso, que constituye cerca del 65% de su peso seco, está compuesta principalmente por calcio y fósforo, junto con otros componentes como bicarbonato, citrato, magnesio, sodio y potasio. El calcio y el fósforo existen primordialmente en forma de cristales de hidroxiapatita, $[Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2]$. Los cristales de hidroxiapatita (40 nm de longitud por 25 nm de ancho y 1.5 a 3 nm de espesor) están distribuidos de manera ordenada a lo largo de las fibras de colágeno del tipo I. Los iones superficiales de los cristales atraen agua y forman una cubierta de hidratación, que permite el intercambio de iones con el líquido extracelular. La dureza y su resistencia del hueso dependen de la relación entre los cristales de hidroxiapatita y el colágeno (Gartner, 2015).

El crecimiento, adaptación a las necesidades mecánicas del organismo y reparación de los huesos dependen de los fenómenos de demolición y reconstrucción, que se producen en él, y lo mantienen en un proceso de continua renovación. La remodelación ósea es llevada a cabo por células especializadas como las células osteogénicas, los osteoclastos y los osteoblastos (Fig. 1). Las células osteogénicas son células madre no especializadas derivadas de la mesénquima de las cuales se originan los osteoblastos. Los osteoblastos se encuentran en la superficie de los huesos y se encargan de sintetizar y excretar la matriz orgánica del hueso al tiempo que desempeñan un importante papel en su mineralización. En cambio, los osteoclastos digieren los componentes proteicos y minerales del hueso mediante la liberación de enzimas lisosómicas, es decir, se encarga de la destrucción el tejido viejo (Garzón et al., 2003).

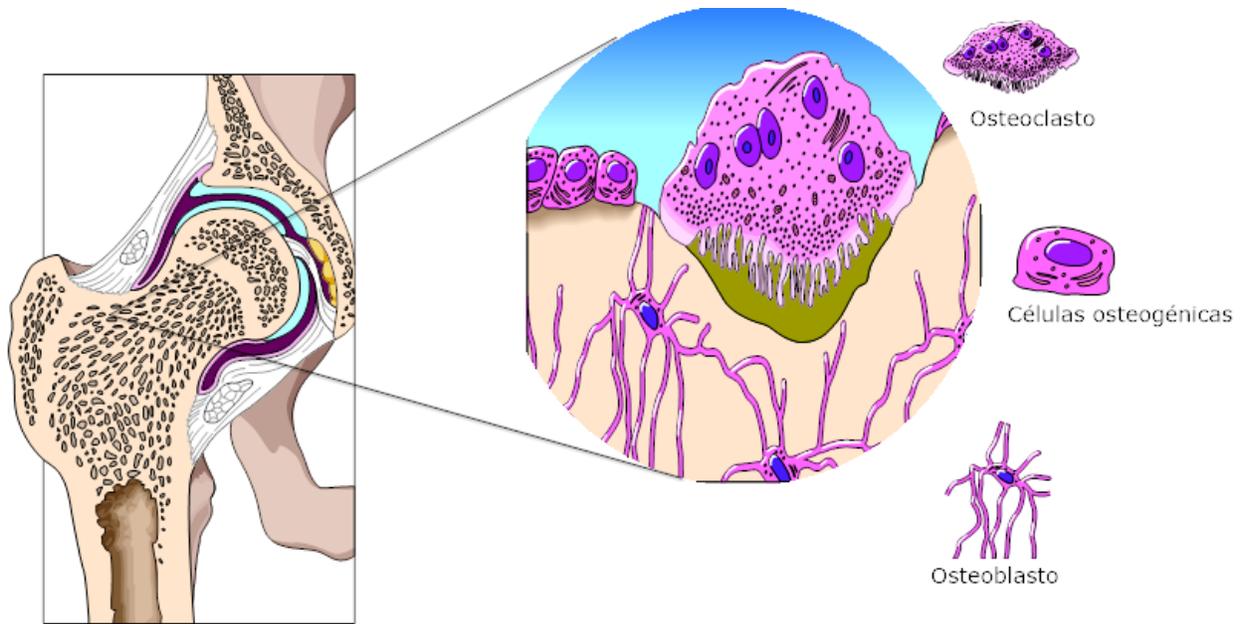


Figura 1. Hueso esponjoso del fémur. Representación de las principales células óseas.

Con el paso de los años, la remodelación ósea sufre un desequilibrio que provoca una pérdida ósea debido al predominio de la resorción sobre la formación, es decir aumento de actividad de los osteoclastos con una disminución de los osteoblastos (Marcus et al., 2013) lo que provoca el debilitamiento de los huesos y por tanto el incremento de la posibilidad de sufrir una fractura.

Una fractura es una pérdida de continuidad en la sustancia de un hueso que es provocado por un impacto o fuerza deformante (McRae, 2010). La osteoporosis es uno de los problemas degenerativos que comúnmente se relacionan con la fractura ósea. Sin embargo, existen otros trastornos óseos causados por el desarrollo esquelético anormal, desordenes bioquímicos, infecciones, traumas, y tumores que también pueden dar lugar a una fractura. Se estima que, en el mundo, 100 millones de personas son susceptibles de presentar fractura por osteoporosis y que 27.5 millones de personas son afectadas por algunos de estos trastornos en la Unión Europea (Serra et al., 2015).

Según la *National Osteoporosis Foundation*, en los EEUU, ocurren 700 000 fracturas vertebrales, 300 000 de muñeca y 250 000 de cadera al año. Uno de los principales problemas que afronta la población con fragilidad ósea es el costo del tratamiento. El costo anual solo para fracturas de cadera en los EEUU es de 7,035 millones de dólares (USD) y de 1,565 millones USD para cuidados de enfermería. La invalidez temporal o permanente después de la fractura,

que puede durar entre 6 a 12 meses, es otro de los problemas que enfrenta un paciente con lesión ósea (Cruz et al., 2002). Esto evidencia la gran demanda y la necesidad de desarrollar nuevas alternativas de tratamiento que permitan la reconstrucción, sustitución y aceleración de la regeneración ósea y por tanto mejoren la calidad de vida del paciente.

En cirugía reconstructiva, los casos de pérdida ósea o defectos requieren de la adición de injertos o sustitutos óseos para ayudar a restituir la pérdida de hueso alrededor de la prótesis, para la reparación de fracturas, pseudoartrosis o para ayudar la fijación de implantes. Actualmente dentro de los injertos; el autoinjerto o injerto de hueso autólogo es el tratamiento estándar al daño o lesión ósea debido a su incorporación rápida y completa entre 6 y 12 meses. Sin embargo, este procedimiento presenta algunas dificultades como la resorción incontrolada (Jaramillo et al., 2009), el tamaño y la forma inadecuada, el riesgo de desarrollar dolores crónicos, disponibilidad limitada, la necesidad de una segunda cirugía, y la morbilidad de la zona donante (Yang, et al., 2015; Ma et al., 2000; Santos, et al., 2011).

Además de los injertos autólogos, existen otros tipos de sustitutos óseos como los aloinjertos, materiales metálicos, poliméricos, biocerámicos y vítreos activados. No obstante, también presentan un gran número de desventajas como se muestra en la tabla 1. (Puska et al., 2011). La ingeniería de tejidos, en su afán de desarrollar nuevas alternativas que permitan solucionar estos inconvenientes, está desarrollando nuevos biomateriales que actúan como soportes temporales en el proceso de reparación de defectos óseos. Estos biomateriales funcionan como plataformas que proveen la base para el crecimiento del nuevo tejido óseo, por ello deben poseer suficiente porosidad y una resistencia mecánica que permita la adhesión, migración, crecimiento y proliferación celular para una buena integración con el tejido circundante. Otras de las características que deben presentar son la biocompatibilidad, biodegradabilidad y bioactividad; asegurar la osteointegración, la osteoinducción y presentar un tamaño de poro adecuado (Navarro, 2005).

Tabla 1. Principales materiales para reconstrucción ósea y algunas de sus desventajas (Puska et al., 2011).

Material	Desventajas
Aloinjerto	Riesgo de infección Difícil gestión del banco de huesos Costoso
Autoinjerto	Disponibilidad limitada Daño al tejido óseo sano La necesidad de una segunda cirugía
Materiales metálicos	Interface mecánico hueso-metal Riesgo de desajuste Osteopenia Módulo de elasticidad alto no óptimo para huesos Liberación de nanopartículas
Polímeros	Monómeros residuales tóxicos Riesgo de efectos exotérmicos, hipotonía o complicaciones cardíacas y pulmonares Partículas procedentes de desgaste
Biocerámicos y vidrios bioactivos	Frágil Osteopenia Módulo de elasticidad alto
Otros como xenoinjertos	Riesgo de infección Baja resistencia

Algunos de los biomateriales más utilizados para el desarrollo de estructuras tridimensionales óseas son la hidroxiapatita, los poli(α -hidroxiácidos), y algunos polímeros de origen natural como el colágeno o la quitina (Ma, Zhang, Xiao, & Franceschi, 2000). La hidroxiapatita (HA), $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, es un biocerámico cuya configuración de sus cristales se encuentra en forma hexagonal dipiramidal (Fig. 2). Ha sido ampliamente usada en aplicaciones biomédicas debido a sus propiedades como bioestabilidad, biocompatibilidad y bioactividad. Desafortunadamente presenta propiedades mecánicas bajas (baja resistencia a la compresión y tensión) por lo que es más utilizada como relleno, en cirugía maxilofacial y reconstrucción de oído medio, que como implante que requiera permanecer un largo tiempo y soportar alta carga (Gonzalez et al., 2014; Wang, et al., 2008).

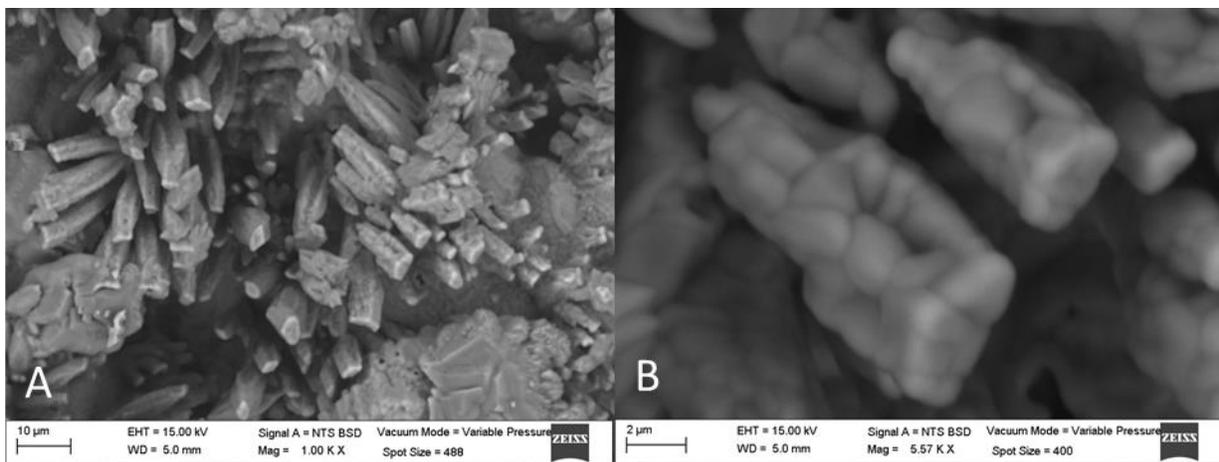


Figura 2. Micrografía Electrónica de Barrido de la hidroxiapatita. A) Amplificación de 1.00 KX. B) Amplificación de 5.57 KX

El comportamiento mecánico y la bioactividad de la HA depende del tamaño de los cristales, la distribución del tamaño de partícula, la porosidad y la cristalinidad de la HA. Uno de los métodos para mejorar las propiedades mecánicas de la HA es el proceso de sinterización que consiste básicamente en la exposición del biocerámico a altas temperaturas por debajo de su punto de fusión que generalmente causa la disminución de la porosidad y del área superficial específica de las muestras; y el incremento de su densidad. Esto se debe a que durante el proceso de sinterización los poros del cerámico se cierran (Fig. 3) (Wang et al., 2008).

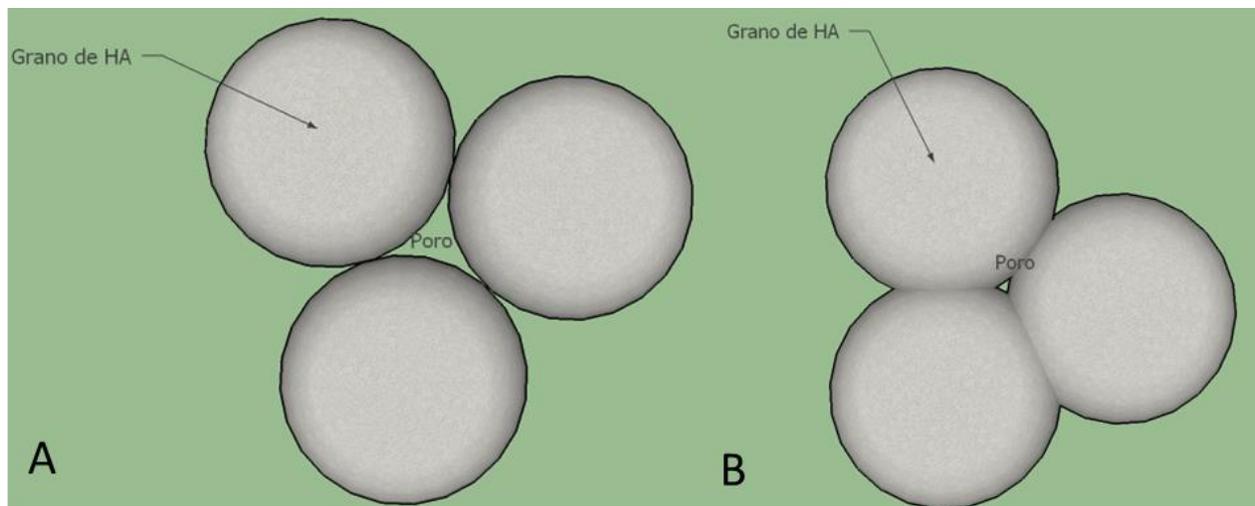


Figura 3. Efecto de la sinterización en los granos de HA. A) Antes de la sinterización B) Después de la sinterización

Cuando el hidroxilo (OH^-) de la HA es sustituido por flúor (F^-), se obtiene la fluorapatita (FA). La FA es otro biocerámico cuya configuración de sus cristales se encuentra en forma hexagonal dipiramidal, al igual que la HA. Usualmente se encuentra en el esmalte dental y normalmente es usado en aplicaciones dentales por tener una mayor estabilidad a ambientes ácidos que la HA debido a que el F^- es un elemento con mayor electronegatividad que el OH^- (Wei et al., 2003).

Los métodos de fabricación de andamios óseos buscan controlar la arquitectura de los mismos a diferentes niveles. La forma externa como la estructura interna de los andamios son parámetros de diseño de ingeniería necesarios para lograr la regeneración de tejido adecuada. Existen muchas técnicas de fabricación que hacen posible transformar materiales sólidos en andamios. Se dividen en dos grupos: convencionales y modernos. Las técnicas convencionales incluyen el método en espuma con gas, separación de fase, fundición de disolvente y lixiviación de partículas, y moldeo por fundición. Entre las técnicas modernas se encuentran: impresiones 3D, electrohilado, fused deposition modelling (FDM), selective laser sintering (SLS) e inversión de fase. Se ha demostrado que con el método de fundición de disolvente y lixiviación de partículas es posible obtener andamios con alta porosidad (arriba de 72 %) y diámetros de poro alrededor de 500 μm . Este método consiste en mezclar la solución polimérica con partículas de sal de un diámetro específico. Cuando se evapora el solvente deja la matriz polimérica con la sal que luego es sumergida en agua donde las partículas de sal se lixivian para fabricar la estructura porosa (Wosek, 2015).

Uno de los parámetros más importante en el diseño de andamios óseos es el tamaño de poro. El crecimiento del hueso es directamente afectado si hay una interconexión a través de ventanas con tamaños mayores de 50 μm (Gonzalez et al., 2014). Se ha reportado que el tamaño de poro más adecuado varía entre 100-500 μm (Sequeda et al.,2012; Velasco y Garzón, 2010). El porcentaje de porosidad con valores superiores al 10 % de porosidad en los materiales cerámicos indica interconectividad, por lo tanto entre más alta sea la porosidad mayor será la probabilidad de interconexión entre los poros. Los valores de porosidad presentes en el hueso trabecular varían entre el 30 y 90 % con una porosidad interconectada entre el 50 y 90 % (Gonzalez et al., 2014). A mayor porosidad e interconectividad mayor facilidad de proliferación y migración celular, además de mayor transporte de nutrientes.

Objetivo General

Estandarizar una metodología para la fabricación de andamios porosos de hidroxiapatita y fluorapatita mediante el método de lixiviación de partículas de sal para aplicaciones de regeneración de tejido óseo.

Objetivos específicos

- Sintetizar y evaluar mediante microscopía electrónica de difracción de rayos X (DRX) hidroxiapatita y fluorapatita en polvo.
- Elegir una sal entre: biftalato de potasio, cloruro de calcio, cloruro de potasio e hidróxido de potasio para la fabricación de andamios porosos de hidroxiapatita y fluorapatita mediante el método de lixiviación de sales.
- Evaluar el efecto de cuatro temperaturas: 160, 470, 840 y 1093 $^{\circ}\text{C}$ en el porcentaje de porosidad y tamaño de poro de los andamios porosos de hidroxiapatita y fluorapatita.
- Caracterizar la superficie de los andamios porosos resultantes con microscopía electrónica de barrido.
- Cuantificar el porcentaje de porosidad y diámetro de poro promedio de la superficie de todas las pastillas con el software ImageJ

Capítulo 1 Antecedentes y estado del arte

El crecimiento de la expectativa de vida de nuestra era implica la preocupación de mantener una buena calidad de vida a la población pese a que el cuerpo humano no se encuentra mecánicamente preparado para soportar mayores tiempos de uso. Es por ello, que el desarrollo de prótesis, implantes y aparatos médicos cada vez más eficientes se ha convertido en uno de los desafíos de la medicina moderna. Uno de los principales problemas relacionados con la vejez y la longevidad masiva es la reconstrucción de secuelas óseas que son provocadas por accidentes o enfermedades (Oldani, 2014).

La hidroxiapatita (HA) porosa sintética es un material que se utiliza comúnmente como un sustituto de defectos óseos debido a sus propiedades como biocompatibilidad, no toxicidad y bioactividad , sin embargo no hace mucho se pensaba que la HA era un material no biodegradable, es decir que permanecía cuando era implantada. Después de un largo seguimiento, algunos autores informaron que el excedente de bloques o gránulos de HA implantada era absorbido, lo que sugirió que la HA era biodegradable. Goto et al. (2001) implantaron gránulos sintéticos de HA a un paciente con un defecto óseo de ilion. Después de la recolección del hueso, se observó que los gránulos fueron absorbidos y reemplazados por hueso recién formado. Se llegó a la conclusión de que la HA era biodegradable y que además la temperatura de sinterización, la porosidad y el diámetro de los poros influyen en su capacidad de biodegradación (Goto et al., 2001).

La importancia de la microporosidad de la HA fue evaluada en el trabajo de Hing et al. (2005). Ellos evaluaron la relación de la microporosidad de la HA con la osteointegración temprana del implante. En este estudio, cuatro pares de formulaciones fueron evaluadas, dos (HA70-1 y HA70-2) con una porosidad nominal total de 70% y dos (HA80-1 y HA80-2) con un total de porosidad de 80%. Especímenes cilíndricos de 4.5 mm de diámetro x 6.5 mm de largo fueron implantados en el femoral cóndilo de conejos blancos "New Zealand" de 6 meses y recuperados para los análisis histológico, histomorfométrico y mecánico en 1, 3, 12 y 24 semanas. Estos resultados indicaron que la manipulación de los niveles de microporosidad puede ser usada para acelerar la oseointegración y elevar el volumen de equilibrio del hueso.

Otro estudio reveló la relación de las propiedades cristaloquímicas de la HA con la temperatura utilizada en el tratamiento térmico. En una investigación, las muestras de HA se sometieron a una solución fisiológica de Ringer durante periodos de 5 y 30 días. La medición de la conductividad y el análisis de las muestras permitieron revelar la gran dependencia de la cristalinidad con el tratamiento térmico. La muestra más cristalina se obtuvo a una temperatura

de 1050 °C. La mayor solubilidad se presentó en las muestras más cristalinas; además, se evidenció la presencia de dos mecanismos que compiten cuando las muestras se someten a solución Ringer: la disolución y la precipitación (Londoño et al., 2006).

Otro estudio donde se muestra la influencia de la temperatura en las características de la HA es el realizado por Díaz y Martínez (2007). En su trabajo, compactaron una HA comercial a 200 MPa y la sinterizaron a temperaturas de 1000 a 1450 °C con un tiempo de permanencia de 2 horas. Determinaron que la temperatura óptima de sinterización fue de 1250 °C donde el material obtenido fue hidroxiapatita pura. La descomposición de la HA ocurrió en 1400 °C con la formación de la fase de trifosfato de calcio.

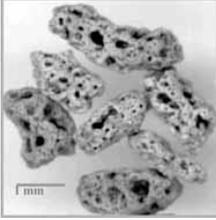
Asimismo, los efectos de la sinterización en la porosidad y morfología de microesferas de HA obtenidas por el método de secado por atomización fueron mostrados en el 2008. En este estudio las muestras de hidroxiapatita fueron sinterizadas en un horno convencional a una temperatura entre 500-100 °C. Se observó un gran cambio en la superficie de las microesferas de HA durante la sinterización. La superficie de las muestras sinterizadas en una temperatura entre 500 y 600 °C no mostraron cambios evidentes, mientras que a una temperatura de sinterización de 800 °C, un incremento el área de superficie específica y el volumen de poro fue observado (Wang et al., 2008).

Ese mismo año, en la Escuela de Ingeniería de Antioquía, utilizaron el método de precipitación para sintetizar HA a partir de fosfato de amonio $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ y nitrato de calcio $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$. La macroporosidad de las muestras fue inducido por el agente natural Zea Mays y la microporosidad con celulosa obteniéndose poros entre 300 μm y 500 μm en promedio con porosidades entre 35.85% y 45.61%. Sin embargo las matrices sintetizadas presentaron resistencia a módulos de elasticidad muy bajos con respecto al hueso esponjoso (Rincón et al., 2007).

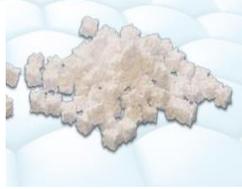
Según lo reportado en la literatura, el tamaño de poro es importante para la osteointegración. Los poros menores de 10 μm evitan el ingreso de células, mientras que poros entre 10 y 50 μm permiten la penetración del tejido fibrovascular; los poros entre 50 y 150 μm , la penetración ósea; y los poros mayores de 150 μm , la penetración y la formación ósea. Además, se ha encontrado que la penetración de tejido óseo sólo es posible si los poros se encuentran interconectados (González et al., 2008).

La HA sintética se puede encontrar comercialmente en sus formas absorbibles o no reabsorbible siendo su uso dependiente de las características deseadas para la implantación (Tabla 2). En el año 2008, en la Universidad de Antioquía, se hizo una comparación entre la HA sintetizada mediante la técnica de coprecipitación, adicionando un agente porogénico y una temperatura de calcinación de 75° y 850 C con el producto comercial Osteogen®. Los resultados indicaron que el producto de HA obtenido y el producto comercial presentaron características similares en estructura cristalina, composición química y absorción de especies. No se observó cambios significativos en la forma de las partículas del producto de HA calcinado a 750 y 850 °C pero si una superficie rugosa en las muestras calcinadas a 750 °C, característica importante para aumentar la adhesión celular (Marín et al. , 2008).

Tabla 2. Algunos huesos sintéticos comerciales (Ozols, s.f.)

Nombre		Características
Actifuse (Baxter Healthcare Corporation, 2016)		<ul style="list-style-type: none"> ✓ Relleno osteoconductor sintético. ✓ Fosfato de Calcio Sustituido en 20% con Si ✓ Promueve la formación rápida del hueso e incrementa su volumen ✓ La macroporosidad y microporosidad permite la formación de hueso nuevo y capilares sanguíneos.
Bi-Ostetic (Berkeley Advanced Biomaterials Inc., 2014)		<ul style="list-style-type: none"> ✓ Relleno óseo de absorción lenta ✓ Compuesto por 40% de fosfato tricálcico TCP y 60% de hidroxiapatita HA. ✓ Osteoconductividad ósea ✓ 100% reabsorbible ✓ Utilizado en aplicaciones de reconstrucción de articulaciones, fracturas y cirugías.
Conduit TCP granules (Bio-Medicine, 2012)		<ul style="list-style-type: none"> ✓ Compuesto por 30% TCP y 70% de HA. ✓ No genera reacciones inflamatorias o rechazo ✓ Porosidad interconectados con un tamaño de poro de 1-600 µm ✓ Reabsorción ms rápida que los implantes de HA ✓ Oseointegrable

OsSatura
(Integra
LifeSciences
Corporation, 2008)



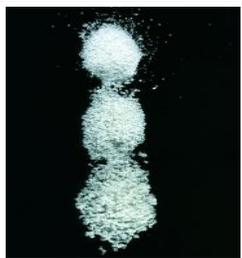
- ✓ Compuesto por 20% de beta-TCP (β -TCP) y 80% HA
- ✓ Posee macroporosidad e interconectabilidad adecuada para la infiltración vascular, el transporte nutricional y colonización celular
- ✓ Porosidad media de 70%
- ✓ Degradación lenta de la HA porosa provee un soporte de largo plazo para concentrar a las proteínas de crecimiento que convierten las células madres en formadoras de hueso a medida que el β -TCP se disuelve y precipita.

Pro Osteon 200 R
(Biomet Inc., 2016)



- ✓ Formado por una matriz de carbonato de calcio e hidroxiapatita
- ✓ Porosidad interconectada de 200 micrones
- ✓ Reabsorción lenta del orden de 6 meses
- ✓ Tiene granos de .5 y 1 mm
- ✓ Arquitectura y composición química similar al hueso bicortical

Macrobone
(ETK, 2016)



- ✓ Compuesto por fosfato tricálcico b puro
- ✓ Totalmente y rápidamente reabsorbible
- ✓ Hueso neoformado entre 6-7 meses
- ✓ Porosidad del 90%
- ✓ Usado en el relleno de defectos óseos en cirugía dental y maxilofacial
- ✓ Tamaño de grano entre 150-500 μ m para periodoncia, 500-1000 μ m para relleno de los alveolos o relleno de defectos óseos de tamaño medio, y entre 1000-2000 μ m para elevación de seno.

Otro estudio comparativo entre la HA sintetizadas por el método de precipitación acuosa con la HA comercial Osteogen, fue evaluado en el 2009. En este estudio se evaluaron las propiedades osteoconductoras y osteointegradoras de ambas y se demostró que presentaron características

similares en cuanto a estructura cristalina y composición química pero con diferencias morfológicas con respecto a la forma de la partícula. Se concluyó que la HA comercial Osteogen y la sintetizada tuvieron los mismos resultados en la evaluación osteoconductiva y osteointegradora (Jaramillo et al., 2009).

Investigadores estudiaron los efectos del sinterizado, el tiempo de agitación y la concentración, en el porcentaje de porosidad, la resistencia a la compresión y la cristalinidad de cuerpos porosos de HA sintetizada por el método de esponja polimérica. Se encontró que existe una relación directa entre la velocidad de agitación y la densidad; y entre la fuerza de compresión y la cristalinidad. Donde a una mayor velocidad de agitación y fuerza de compresión, mayor densidad y cristalinidad es obtenida (Sopyan y Kaur, 2009).

Además del método de esponja polimérica, el método de gel-casting con la lixiviación de partículas y extrusión fue utilizado en otro estudio para producir una alta interconectabilidad de los poros en los andamios de HA. Se utilizó quitina para dispersar las partículas de HA y esferas de cera como agente pirogénico. Los cuerpos preparados con diferentes tamaños de esferas de cera, presentaron poros interconectados con porosidad volumétrica aproximada del 86%, mientras que la resistencia a la compresión disminuyó a medida que el tamaño de poro aumentó (Zhao et al., 2011).

Andamios macroporosos de HA mediante el método de esponja polimérica fueron evaluados fisicoquímica y biológicamente por Tripathi y Basu (2012). En este estudio se obtuvieron andamios con poros ovales de 100-300 μm capaces de permitir la proliferación y migración de osteoblastos humanos hacia el interior de los cuerpos porosos de hidroxiapatita sintetizadas.

Capítulo 2 Fundamento Teórico

2.1 Los huesos

El tejido óseo es un tejido conectivo especializado que cumple funciones de sostén y protección. Está compuesto por células típicas que se encuentran dentro de cavidades pequeñas o lagunas óseas dispuestas en la matriz ósea calcificada. La nutrición de este tejido está garantizada por una abundante vascularización y su desarrollo depende de los fenómenos de demolición y reconstrucción, que se producen en él, que lo mantienen en un proceso de continua renovación. (Garzón et al., 2003).

2.1.1 Composición química y propiedades físicas

En la composición química de los huesos el agua representa 20 % del peso total, proporción relativamente baja en comparación con otros tejidos; y los sólidos constituyen 80 % restante. El componente orgánico, que constituye cerca de 35% del peso seco, está constituido fundamentalmente por fibras osteocólagenas (proteínas), unidas por la sustancia intercelular amorfa, sobre todo de cemento; y los componentes inorgánicos que constituye cerca de 35% del peso seco, son sales minerales, en su mayoría de fosfato de calcio, que se depositan en la sustancia intercelular amorfa de cemento (Gartner, 2015).

Las propiedades físicas del hueso dependen de su composición química. La materia orgánica (fibras colágenas) le confiere al hueso su elasticidad. Sin embargo, la materia inorgánica (sales minerales) le proporciona al hueso su dureza, rigidez y fragilidad. La descalcificación y la calcinación permiten demostrar la composición química y las propiedades físicas del tejido óseo. En la descalcificación se somete al hueso a la acción de una solución ácida (ácido clorhídrico) lo que provoca la disolución de las sales de calcio y queda solamente la sustancia orgánica que le permite al hueso conservar su forma, pero su consistencia se hace más blanda y elástica. En la calcinación se somete al hueso a alta temperatura, se quema la sustancia orgánica y queda solo la sustancia inorgánica; el hueso mantiene su forma y además su dureza, pero se hace más rígido y frágil (Rosell et al., 2001).

2.1.2 Tipos de tejido óseo

2.1.2.1 Trabecular

“Está constituido por trabéculas o espículas óseas, en ellas, las laminillas óseas forman estructuras laminares que se disponen de manera tridimensional constituyendo una especie de red de aspecto esponjoso” (Pasos, 2010).

2.1.2.2 Cortical

Este tipo de hueso no posee cavidades vasculares, sino que presenta laminillas óseas que se disponen de manera paralela (hueso compacto laminar) o de manera concéntrica alrededor de un canal denominado Havers, ocupado por escasa cantidad de tejido conjuntivo, células osteógenas y por donde discurren pequeños vasos sanguíneos (Layfield, 2002; Pasos, 2010).

2.1.3 Mecanismos de regeneración ósea

2.1.3.1 Osteoinducción

La osteoinducción es el proceso a través del cual las células madre se diferencian en las células osteogénicas, condroblastos y osteoblastos, que forman el tejido óseo. La diferenciación y el reclutamiento son modulados por factores de crecimiento derivados de la matriz del injerto, cuya actividad es estimulada al extraer el mineral óseo. Entre los factores de crecimiento se encuentran las proteínas morfogenéticas óseas 2, 4 y 7, factor de crecimiento derivado de las plaquetas, interleucinas, factor de crecimiento fibroblástico, factores de crecimiento pseudoinsulínico, factores estimuladores de las colonias de granulocitos y factores estimuladores de las colonias granulocitos macrófagos. También se liberan factores angiogénicos, como el factor de crecimiento vascular derivado del endotelio y la angiogenina (Zárate-Kalfópulos y Alejandro-Sánchez, 2006).

2.1.3.2 Osteogénesis

Hace referencia a la formación de nuevo hueso sin indicación del origen celular a partir de células derivadas del injerto o del huésped. Requiere células capaces de generar hueso. La osteogenicidad de un injerto puede alterarse y mejorarse gracias a diversos compuestos y biomateriales como el fosfato octacálcico (Chan, 2014).

2.1.3.3 Osteoconducción

Es una propiedad pasiva de un material o tejido de recibir y guiar el crecimiento óseo, por medio de la invasión vascular y celular proveniente del tejido óseo vivo del receptor (Sanzana, 2004). Es considerado como el proceso tridimensional de crecimiento de brotes vasculares, tejido perivascular y células osteoprogenitoras desde el lecho del receptor al interior del injerto, es decir que consiste en la formación de hueso sobre la superficie del implante. La osteoconducción puede ocurrir por una neoformación ósea activa por osteoinducción o puede suceder pasivamente sin la participación de propio injerto. La osteoconducción sigue un patrón espacial ordenado y predecible determinado por la estructura del injerto, el aporte vascular

desde los tejidos colindantes, el ambiente mecánico y la presencia de otros biomateriales (Chan, 2014).

2.1.3.4 Osteointegración

La oseointegración es la aceptación y adaptación funcional de un implante insertado en el hueso. La conexión firme, estable y duradera entre el implante y el tejido óseo formado a su alrededor es una característica deseable en todo implante óseo. Esta formación de hueso está sujeta a los fenómenos de migración, proliferación y diferenciación celular que suceden en la denominada interfase hueso-implante (Vanegas et al., 2009).

2.2 Injerto óseo

2.2.1 Tipos de injerto óseo

2.2.1.1 Injerto óseo autólogo

En el injerto de hueso autólogo, autoinjerto o autógenos, el hueso usado como injerto proviene del propio paciente. Se obtienen de sitios intraorales (mentón, tuberosidad del maxilar, rama ascendente) que se usan para pequeños defectos o extraorales (cresta ilíaca, tibia o calota) cuando se requiere mayor cantidad. La elección de cada abordaje dependerá del tipo, tamaño y forma de la cavidad ósea, la experiencia clínica y preferencia del profesional. El hueso autógeno esponjoso es el que tiene mayor capacidad osteogénica y los injertos corticales son los que proporcionan mayor estabilidad (Tortolini y Rubio, 2012).

Es considerado como el material “gold standard”, elegido clásicamente por cirujanos ortopédicos, para el tratamiento de defectos óseo (Calvo et al., 2011).

2.2.1.2 Aloinjerto óseo

Se caracteriza porque el hueso utilizado en el injerto procede de individuos de la misma especie; pero genéticamente diferentes. Estos injertos se consideran biocompatibles y osteoconductores. Las ventajas de los aloinjertos incluyen su disponibilidad en cantidades importantes y diferentes formas y tamaños, no se sacrifican estructuras del huésped y no hay morbilidad del sitio donante. Las desventajas se relacionan con la calidad del tejido óseo regenerado, que no siempre es previsible. Necesitan un procesado para eliminar su capacidad antigénica (Tortolini y Rubio, 2012).

Se pueden clasificar según su procesamiento en:

- Aloinjertos congelados.
- Aloinjerto liofilizado (secado en frío).
- Aloinjerto liofilizado y desmineralizado.
- Hueso irradiado.

2.2.1.3 Isoinjerto o injerto singénico

Trasplante de órganos o injertos efectuados entre individuos isogénicos (genéticamente idénticos) como es el caso de los gemelos monocigóticos idénticos o los ratones de la misma cepa endogámica. Al no existir disparidad antigénica entre donante y receptor, no se pone en marcha la reacción de rechazo y, por tanto, no precisan medicación inmunosupresora para tolerar el injerto (Clínica Universidad de Navarra, 2015).

2.2.1.4 Xenoinjerto o heteroinjerto

Son aquellos injertos que provienen de individuos de una especie diferente. Puede ser necesario hacer xenoinjertos cuando una persona sufre quemaduras graves y no se dispone de suficiente tejido del propio paciente o del banco de tejidos. Son materiales osteogénicos. Algunos xenoinjertos comerciales como el Bio-Oss demuestran que su matriz mineral combinada con una membrana de colágeno puede aumentar su capacidad osteogénica (Giamberardino et al., s. f.).

2.2.1.5 Injertos aloplásticos o sintéticos

Provenientes de materiales fabricados sintéticamente. Se encuentran en variadas formas, tamaños y texturas. Las respuestas biológicas óseas dependerán de las técnicas de fabricación, la cristalinidad, porosidad y grado de reabsorción. La respuesta inmune que despierta un material aloplástico puede variar desde ninguna a moderada. Su principal ventaja es que obvian la necesidad de una zona donante del propio sujeto. Se usan básicamente para proporcionar una matriz para el crecimiento óseo en su interior, por lo que su efecto es tan sólo osteoconductor y débilmente osteoinductor. El material aloplástico tradicional ha sido la hidroxiapatita, pero posteriormente se han ido introduciendo otros en la clínica que la han relegado a un segundo plano (Infante-Cossío et al., 2007).

Los materiales osteoconductivos deben tener una porosidad que permita la vascularización y provea un área de adherencia a las células osteogénicas. El tamaño del poro óptimo para que esto ocurra es entre 100 y 500 nm con un volumen total de poros de 75/80, además; los compuestos deben ser no inmunogénicos y el hueso debe tener una capacidad alta de adherencia a los mismos (Tortolini y Rubio, 2012).

2.2.1.5.1 Cerámicos

Debido a que los cerámicos corresponden a óxidos metálicos, no presentan oxidación ni corrosión en el medio biológico. Se caracterizan por su dureza que le proporciona una gran resistencia a la fricción y el desgaste, sin embargo; es un material quebradizo y rígido. Presenta una buena compatibilidad y capacidad osteointegradora pero en general se considera que carecen de propiedades osteoinductivas por sí mismas.

Los cerámicos más utilizados como sustituto de material óseo son la hidroxiapatita y el fosfato tricálcico. Diversas investigaciones realizadas en modelos animales han demostrado que estos materiales establecen una unión directa con el hueso. Esta característica se ha demostrado en trabajos donde se ha observado por la imposibilidad de separar el implante del hueso circundante, sin romper uno o ambos (Zárate-Kalfópulos y Alejandro-Sánchez, 2006).

Teniendo en cuenta las características de la respuesta que generan en el tejido circundante, los biomateriales cerámicos se pueden clasificar en tres grandes grupos.

2.2.1.5.1.1 Cerámicas bioinertes

Poseen una elevada estabilidad in vivo, gran resistencia mecánica y óptima biocompatibilidad. Tienen una influencia nula o muy pequeña en el tejido óseo adyacente y su principal representante es la alúmina.

2.2.1.5.1.2 Cerámicas bioactivas

Tienen propiedades osteoconductoras y enlazan directamente con el hueso vivo. Sin embargo, sus propiedades mecánicas son inferiores a las de las cerámicas bioinertes. A este grupo pertenecen los vidrios bioactivos y las cerámicas de fosfatos de calcio.

2.2.1.5.1.2.1 Hidroxiapatita

La hidroxiapatita ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) es el componente principal de la fase mineral del tejido óseo, es un material osteoconductor, presenta propiedades biomecánicas pobres ya que su capacidad de soportar los esfuerzos en flexión y compresión es muy baja lo que provoca que se fracture con facilidad. La densidad del compuesto y su capacidad para ser revascularizado influirán en su tasa de biorreabsorción que por lo general es prolongada. Se ha reportado que el injerto autólogo esponjoso y el cristal de hidroxiapatita tienen un desempeño clínico similar cuando son utilizados para rellenar defectos óseos metafisarios que provocan hundimiento de superficies articulares en las fracturas de platillo tibial.

La formación de hidroxiapatita, en la síntesis por precipitación vía húmeda, incluye los siguientes pasos:



Dónde:

$\text{Ca}_8\text{H}_2(\text{PO}_4)_6 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ = Fosfato octacálcico,

$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2 \cdot x\text{H}_2\text{O}$ = Calcio fosfato amorfo,

$\text{Ca}_{10-z}(\text{HPO}_4)_z(\text{PO}_4)_{6-z}(\text{OH})_{2-z} \cdot n\text{H}_2\text{O}$ = Hidroxiapatita deficiente en calcio

Por tanto, la síntesis de la hidroxiapatita se produce como indica la ecuación 1.



2.2.1.5.1.2.2 Fosfato tricálcico

El fosfato tricálcico ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$) es una cerámica porosa que se convierte de manera parcial en hidroxiapatita una vez implantada en el cuerpo. El fosfato tricálcico es más poroso y se reabsorbe más rápido que la hidroxiapatita, lo que le da ventaja para favorecer la remodelación ósea, sin embargo; lo hace biomecánicamente más débil a las fuerzas de compresión.

2.2.1.5.1.3 Cerámicas biorreabsorbibles

Luego de su implantación son progresivamente reemplazadas por tejido óseo neoformado. Para ello debe existir una adecuada correlación (Sanzana, 2004).

2.2.1.5.2 Polímeros sintéticos bioabsorbibles

Los polímeros sintéticos bioabsorbibles son macromoléculas compuestas por monómeros. Son materiales biocompatibles que presentan flexibilidad de diseño, similitud con diversos componentes de los tejidos orgánicos como el colágeno y tiene la propiedad de degradarse un cierto tiempo después de la implantación en productos no tóxicos que son eliminados del organismo o metabolizados en su interior. Son especialmente usados en aquellas cirugías en las que se necesita la presencia del implante después de producirse la curación debido a su característica de degradación biológica progresiva y de esta forma evitar la realización de una segunda intervención para su retirada.

Cuando se usan como implantes sustitutos óseos, los biopolímeros actúan como un molde tridimensional sobre el cual se deposita matriz ósea extracelular donde proliferan los osteoblastos mientras el polímero es degradado paulatinamente. Los polímeros que se utilizan con mayor frecuencia son los poli(alfa-hidroxiésteres), los poli(dioxanonas), los poli(propilénfumaratos), los poli(etilenglicol), los poli(ortoésteres), los poli(anhídridos) y los poli(uretanos). Dentro de los poli(alfa-hidroxiésteres) destacan el ácido poli(láctico) y el ácido poli(glicólico) (Sanzana, 2004; Castillo et al., 2003).

2.2.1.5.3 Vidrio bioactivos

Estos biomateriales son capaces de establecer reacciones químicas con el ambiente fisiológico donde son implantados y de este modo formar un enlace fuerte y duradero con el tejido vivo. Presenta excelente biodegradabilidad sin efectos citotóxicos, genotóxicos o respuesta inmune para el organismo y capacidad de reabsorción gradual. Este grupo de materiales está representado por los vidrios de base silicio, que generan la formación de una capa apatítica activa en la interfaz entre el material y el hueso, y los de base fosfato.

Cuando estos materiales son usados como andamios óseos, sus características superficiales y de humectabilidad favorecen la adhesión, crecimiento, diferenciación de células osteoblásticas y el reclutamiento de células madre mesenquimales y osteoprogenitoras para que proliferen y se diferencien hacia la línea osteogénica. Debido a estas características, se les ha dado aplicaciones clínicas como la reparación de defectos óseos periodontales, reconstrucción maxilofacial, tratamientos terapéuticos de zonas afectadas por tumores, ortopedia y otorrinolaringología, entre otros (Sanzana, 2004; Aguiar et al., 2012).

2.3 Técnicas de fabricación de andamios porosos

2.3.1 Lixiviación de sales

Una amplia variedad de técnicas puede ser usada para diseñar y fabricar andamios porosos. Una de las técnicas utilizadas con este propósito es la lixiviación de sales que consiste básicamente en colocar los cristales de sal, como el cloruro de sodio y un polímero en un molde para compactarlos y luego remover la sal disolviéndola en un solvente (como agua o alcohol). Tras la eliminación de los cristales de sal todo lo que queda es el polímero endurecido con agujeros o poros, donde alguna vez estuvo la sal. (Ratner et al., 2004). A continuación (ecuación 2) se detalla el balance total de materia en un proceso de lixiviación de sales en andamios porosos.

Balance Total de Materia (BTM)

$$M_v = M_e - M_s + M_g - M_c \dots \dots \dots (\text{Ec. 2})$$

M_v = Variación de materia en el sistema

M_e = Entrada de materia a través de las fronteras del sistema

M_s = Salida de materia a través de las fronteras del sistema

M_g = Generación de materia dentro del sistema

M_c = Consumo de materia dentro del sistema

Para el proceso de lixiviación de sales por goteo donde no existe generación ni consumo de material se muestra en la ecuación 3.

$$A + D = Z + L \dots \dots \dots (\text{Ec. 3})$$

Dónde:

A = Andamio

D = Disolvente

Z = Andamio poroso

L = Lixiviado

2.3.2 Gel-casting

Esta técnica se basa en la generación de una espuma a partir de una suspensión acuosa de polvos cerámicos seguidos de la estabilización de la estructura por la polimerización in situ de monómeros orgánicos. La ventaja más resaltante de esta técnica es la fabricación de piezas complejas y de alta precisión dimensional (Gonzalez et al., 2014)

2.3.3 Liofilización

El proceso consiste en el vaciado de una suspensión del material a moldes con la forma que se desee obtener. Posteriormente, un proceso de congelamiento y sublimación del solvente presente es aplicado, dando como resultado la formación de una estructura laminar, con poros orientados paralelamente y alineados en la dirección de movimiento del frente de congelamiento (Gonzalez et al., 2014).

Capítulo 3 Materiales y Método

En este capítulo se recogen las condiciones experimentales de los pasos llevados a cabo durante la realización de este trabajo y se describen las técnicas empleadas para la síntesis y caracterización de los productos obtenidos. En la figura 4 se muestra un resumen de la metodología seguida.

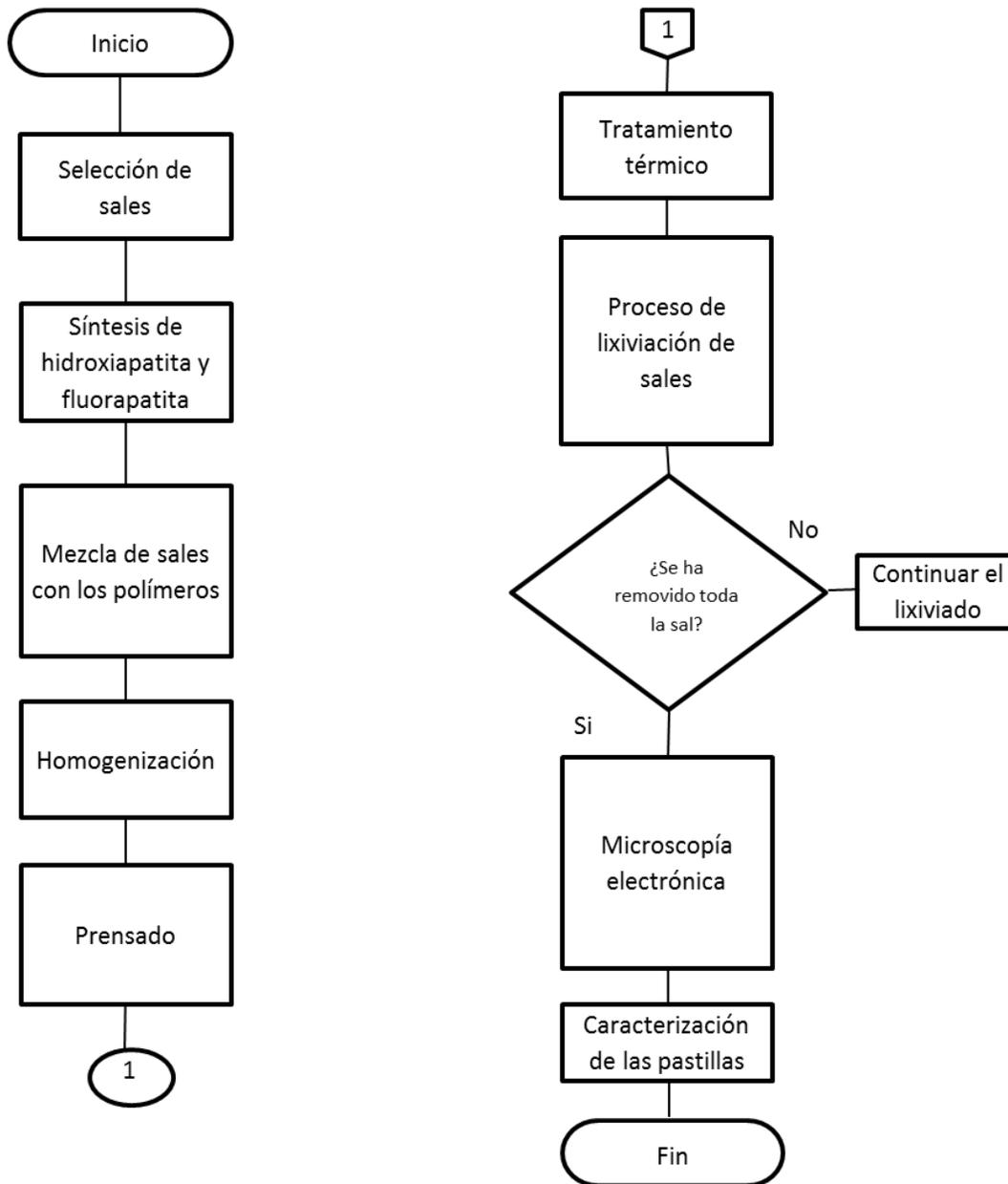


Figura 4. Diagrama de flujo de la metodología

3.1 Síntesis hidroxiapatita (HA) y fluorapatita (FA)

Para la síntesis de la HA y FA, se utilizó un procedimiento denominado precipitación vía húmeda (Xian, 2010). Este método fue seleccionado porque la obtención de HA presenta alto rendimiento, simplicidad y bajo costo a diferencia de otros métodos (Sequeda et al., 2012).

Para la síntesis de la HA, una reacción de 250 ml de 0.6 M de H_3PO_4 (80%, Fermont, México) con 18.56 gr de $Ca(OH)_2$ (Fermont, México) fue preparada y luego agitada a temperatura ambiente durante 7 días manteniendo el pH por encima de 11 mediante la adición de NaOH (Fermont, México). En nuestro procedimiento no fue necesaria la adición de NaOH porque nuestra solución mantuvo un pH por encima de 11 durante los 7 días (Fig.5).



Figura 5. Agitación Magnética. A) Hidroxiapatita. B) Fluorapatita

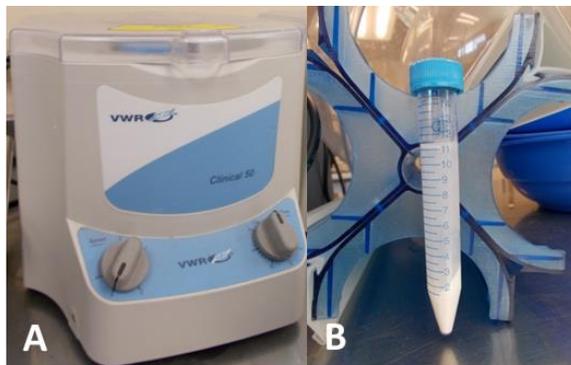


Figura 6. Centrifugación de la HA y FA. A) Centrifuga. B) Mezcla centrifugada de HA

Pasado los 7 días, la mezcla fue centrifugada tres veces a 3000 rpm durante 5 minutos (Fig. 6). Posteriormente, un sistema de filtración fue montado y la mezcla fue vertida en el embudo

Buchner para su separación (Fig. 7). Finalmente, el producto húmedo obtenido fue incubado en un horno seco a una temperatura de 80 °C durante 5 días.

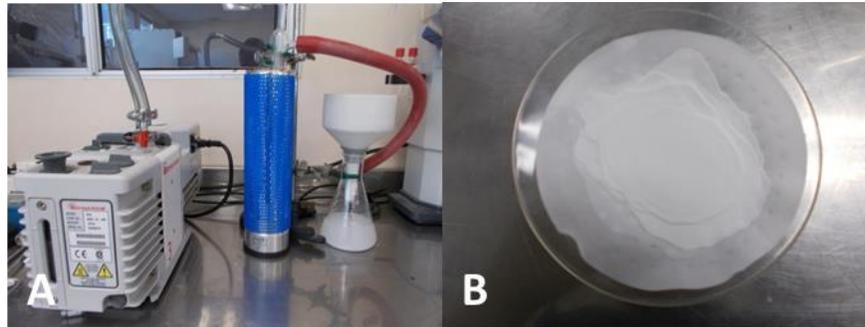


Figura 7. Filtración de la solución de HA y FA. A) Sistema de Filtración. B) Producto húmedo de la HA luego de la filtración

El procedimiento para la síntesis de la FA fue el mismo que el utilizado en la síntesis de la HA. La única diferencia fue la incorporación de 1.87 gr de NH_4F (Fermont, México) en la etapa de agitación magnética.

Parte de la HA y FA obtenida durante el proceso de síntesis fue sinterizada a 1050 °C (Fig. 8) durante dos horas con el objetivo de evaluar el efecto de la sinterización en la formación de porosidad de la HA y FA durante el proceso de lixiviación de sales.



Figura 8. Proceso de sinterización del polvo de HA y FA en la mufla

3.2 Microscopía electrónica de difracción de rayos X (DRX)

Este método se aplica fundamentalmente a muestras sólidas. Se usa principalmente para determinar las estructuras químicas de muestras sólidas en polvo mediante la obtención de un diagrama de difracción, un conjunto de reflexiones de variada intensidad, generado en función del ángulo 2θ que depende de la distribución de los planos que contienen los átomos del material. La imperfección cristalina natural de los materiales muestran diversos patrones de difracción de rayos X, que se representan en forma de bandas o líneas que al ser medidas con exactitud dan información acerca de los defectos estructurales. La intensidad de los picos depende de la homogeneidad de la muestra, del tamaño de grano y de la orientación preferencial de las partículas. Una de sus principales ventajas del DRX es requerir poca cantidad de material para el análisis y de ser una técnica no destructiva (Pandian, 2014).

El DRX fue usado para analizar los polvos de HA y FA obtenidos. La muestra fue colocada en el portamuestra y luego situada en el goniómetro del aparato. El estudio se efectuó usando un difractómetro Bruker D8 Advance operado a 30 kV y 30 mA.

3.3 Análisis del efecto de la sal en la porosidad de los andamios de HA

En esta sección se hizo una evaluación del efecto de las sales en la porosidad de la HA durante el proceso de lixiviación de partículas de sal para poder determinar la más adecuada.

3.3.1 Selección de sales

La selección de sales fue mediante la evaluación de tres parámetros: el peso molecular, la solubilidad en el agua y la toxicidad. En la tabla 3 se observa la relación de algunas sales que se encuentran en el laboratorio de química general de la Escuela de Ciencias de la Ingeniería y Tecnología de la Universidad Autónoma de Baja California y sus respectivos parámetros evaluados.

El peso molecular es una propiedad física que, según Andersson, está relacionado con la velocidad de transferencia de masa, lixiviación y microestructura de películas de etilcelulosa/hidroxipropilcelulosa (Andersson et al, 2013). El tamaño de poro de polímeros sintetizados por lixiviación de sales está relacionado con el tamaño de grano de la sal (Xian, 2010). Además si se sabe que la solubilidad de una sustancia aumenta al disminuir el tamaño de la partícula, debido al aumento de la superficie de contacto entre el disolvente y el soluto (Vega et al., 2003), se puede inferir que el tamaño de poro es proporcional a la solubilidad de la sal utilizada. Por ello, la solubilidad en el agua fue otro de los parámetros considerados. Otra de

los parámetros evaluados fue la toxicidad de la sal. Si bien es cierto que teóricamente se espera la completa eliminación de la sal dentro de la pastilla sal/polímero, en la práctica existe la probabilidad que una insignificante cantidad de la sal permanezca en la pastilla. Por ello y de manera preventiva se ha considerado la evaluación de este parámetro.

Tabla 3. Parámetros evaluados en la selección de sales. *Sales seleccionadas

Sal	Peso molecular g/mol	Solubilidad en Agua g/l 20 °C	Toxicidad DL50 (oral, ratas) mg/kg	Referencias
* Biftalato de Potasio ACS (C₈H₅KO₄)	204.22	80	>3200	(Beran, 2010) (Favela Pro)
* Cloruro de calcio anhidro (CaCl₂)	110.98	740	1000	(CRT Scientific), (Merck Chemical and Life Science, 2014), (Santa Cruz Biotechnology, Inc, 2015)
* Cloruro de Potasio (KCl)	74.56	340	2600	(CTR Scientific) (Pontificia Universidad Javeriana)
Hidróxido de Sodio QP (NaOH)	40.00	1 111	4090	(Arana, 2011)
Permanganato de potasio (KMnO₄)	158.3	65	1090	(Grupo Transmerquim, 2014), (Cosmos)

* Hidróxido de potasio (KOH)	101.1	1 120	273	(CTR Scientific), (Weatherford, 2010)
Nitrato de Potasio ACS (KNO₃)	287.6	320	3750	(Favela Pro), (Navarro & Navarro, 2014)
Sulfato de Zinc ACS (ZnSO₄)	204.22	965	2249	(Hoja de Datos de Seguridad de Materiales. Sulfato de Zinc, 2013), (Fertisquiza)

3.3.2 Mezcla Sal/HA

Las sales seleccionadas: $C_8H_5KO_4$, $CaCl_2$, KCl y el KOH (Fermont, México) fueron mezcladas con la HA en polvo. La proporción de la mezcla fue de 1.3 gr de sal con 0.7 gr de HA. Las mezclas sal/HA fueron homogenizadas mediante trituración en un mortero de porcelana (Fig. 9). Las mezclas fueron preparadas por duplicado.



Figura 9. Mortero. Homogenización de las sales con la HA



Figura 10. Mezcla de la HA y FA con las sales luego de la homogenización

3.3.3 Prensado y tratamiento térmico de los andamios de HA

Se pesaron 0.5 gr de las mezclas sal/HA y luego fueron prensadas con una fuerza de 5000 lbs por 2 min en una prensa hidráulica Carver (Fig. 11). Luego de haber obtenido los andamios de sal/HA, se les aplicó un tratamiento térmico de 160 y 1050 °C por 15 min.

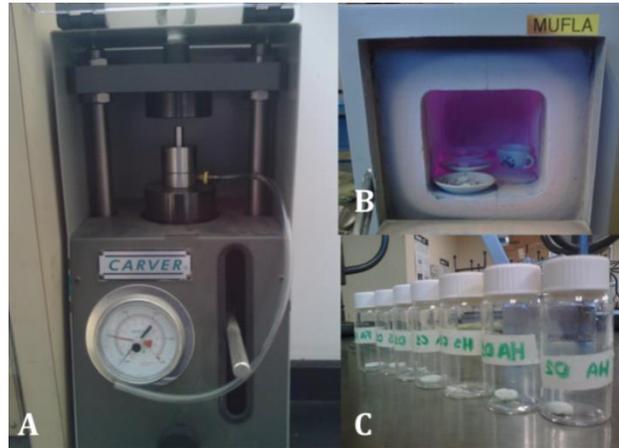


Figura 11. A) Prensa hidráulica Carver. B) Proceso de sinterización en la mufla. C) Pastillas de sal/HA

3.3.4 Proceso de lixiviación de sales

La lixiviación es un proceso físico de transferencia de materia que consiste en la extracción de uno o varios solutos de un sólido, mediante la utilización de un disolvente líquido. La separación del soluto de interés se origina por el contacto íntimo entre el soluto y el disolvente que provoca su difusión desde el sólido a la fase líquida (Artinaid, s. f.).

Para aplicar el proceso de lixiviación de sales a las pastillas sal/HA, un dispositivo de lixiviación por goteo fue montado como se muestra en la Fig. 12. Los volúmenes de disolvente líquido usado en el proceso de lixiviación fueron de 5, 10 y 20 ml de agua destilada. Estos volúmenes fueron vertidos lentamente, 1 gota por segundo aproximadamente, sobre la superficie de las pastillas sal/HA colocadas previamente en el sistema. El volumen de agua vertido se infiltró dentro del andamio hasta atravesarla por completo. La sal contenida en las pastillas fue disolviéndose paulatinamente. Finalmente el lixiviado obtenido fue almacenado en el sistema de drenaje del sistema de lixiviación. En la figura 13 se presenta el diagrama de flujo del proceso de lixiviación por goteo realizado a los andamios de HA.

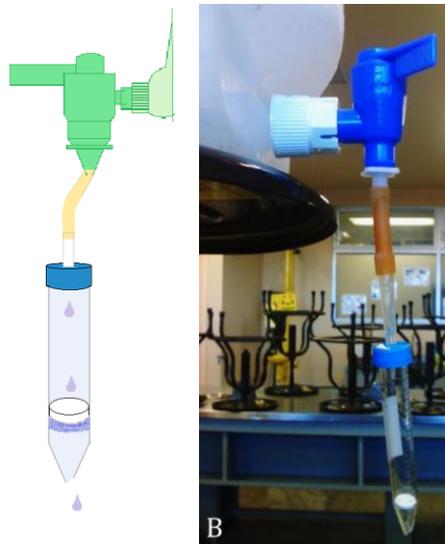


Figura 12. A) Esquema del dispositivo de lixiviación por goteo. B) Dispositivo de lixiviación montado en el laboratorio

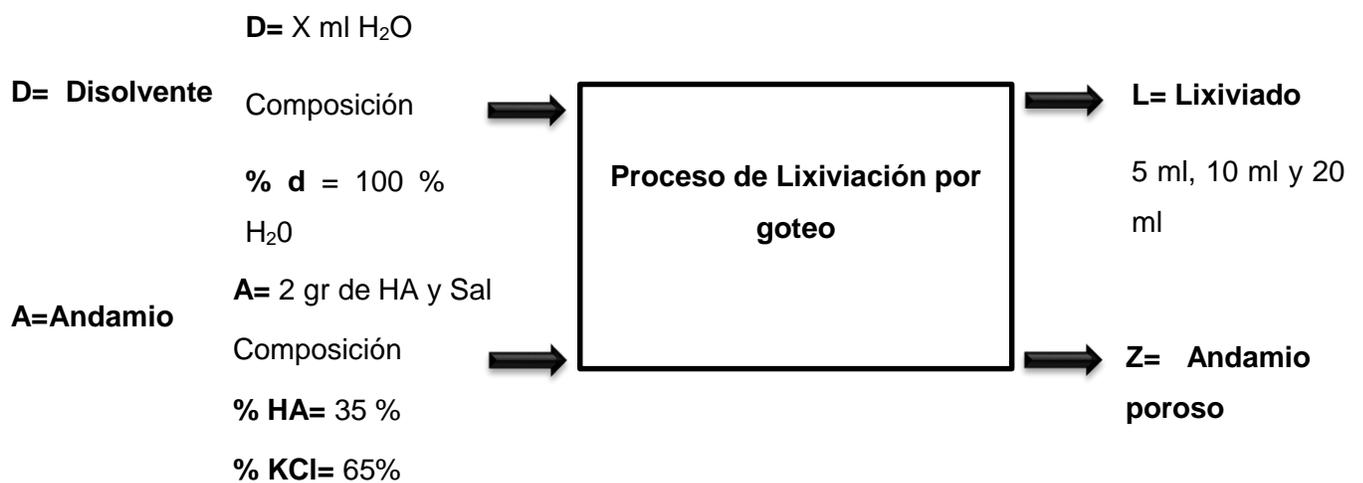


Figura 13. Diagrama de flujo del proceso de lixiviación por goteo realizado a los andamios de HA

3.3.5 Análisis de concentración de lixiviado mediante microscopía de emisión atómica

La concentración de los lixiviados de los andamios sal/HA fueron analizados con el método de microscopía de emisión atómica. El análisis se realizó en función a la concentración del potasio

(K) detectado en el lixiviado de las sales. Este método consistió en dos partes: La digestión de muestras por horno de microondas y; la curva de calibración y creación del método de medición en el software.

3.3.5.1 Digestión de muestras por horno de microondas

La digestión y desintegración de las muestras fueron realizadas mediante el método de digestión por horno microondas – Modelo Multiwave Pro AntonPaar. Para este proceso, el recipiente elegido fue el Rotor HF100. El patrón del orden de vasos ingresados para el análisis fue de 8 posiciones (Fig. 14).

Los lixiviados de las pastillas de sal/HA fueron aforadas a 45 ml con agua desionizada. Las demás posiciones fueron ocupadas por el blanco, la muestra de agua residual, el duplicado de la muestra de agua residual, la muestra fortificada, el blanco fortificado y agua desionizada. Las muestras fueron introducidas al rotor dentro de los tubos previamente pesados. Se añadió a cada muestra 4 ml de HNO_3 y 1 ml de HCl concentrado. El horno microondas fue configurado con una potencia y temperatura de 800 W y 240°C respectivamente. El método analítico EPA 3015A fue seleccionado dentro de la configuración. El tiempo de digestión en el microondas fue de 45 minutos.

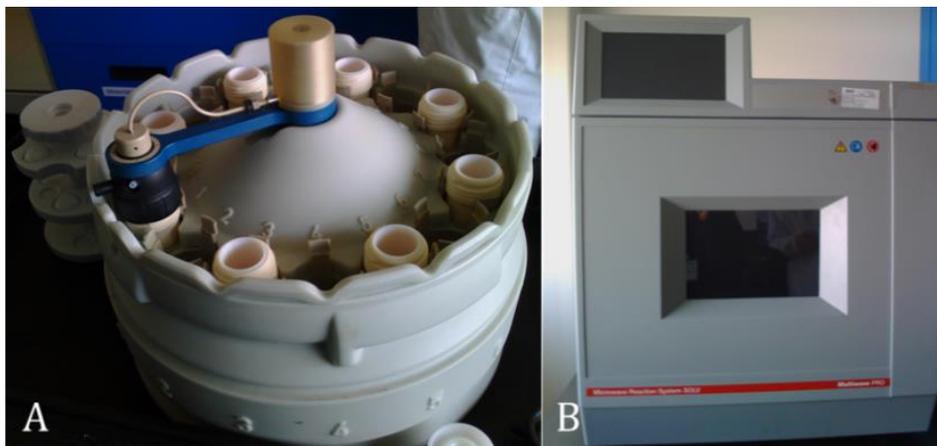


Figura 14. A) Rotor y tubos del sistema de acondicionamiento. B) Sistema de reacción microondas

3.3.5.2 Curva de calibración y creación del método de medición con el software

Se aforaron 0.5 mg, 2.5 mg, 4 mg, 6 mg y 10 mg de solución estándar de Agilent Technologies # parte 6610030000 en matraces de aforación de 25ml con HNO_3 al 2% (Fig.15). Cada punto de

calibración fue analizado en el espectrómetro de emisión atómica con plasma inducido por microondas (MP-AES). Un programa de método de medición fue generado en el software del MP-AES y se obtuvo la curva de calibración requerida. Las muestras fueron analizadas en el MP AES utilizando el método de medición diseñado en el software.

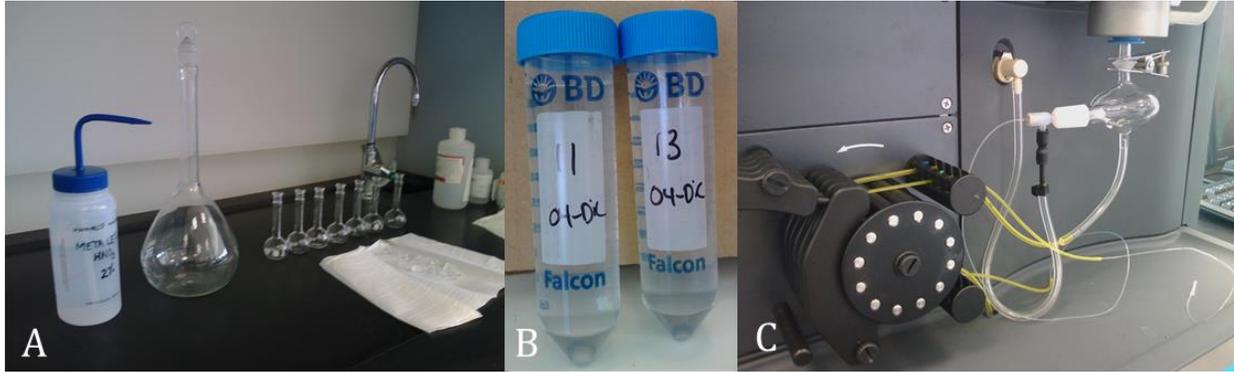


Figura 15. A) Preparación de la curva de calibración. B) Muestras acondicionadas. C) Detector, nebulizador y cámara ciclónica del MP-AES

3.3.6 Microscopía electrónica de barrido (SEM)

El microscopio electrónico de barrido o SEM (Scanning Electron Microscopy), es un instrumento que genera una imagen ampliada de la superficie del objeto analizado a través del uso de haces de electrones en lugar de haces de luz. Esto permite la observación y caracterización superficial de una gran variedad de sólidos.

En el análisis realizado a las pastillas sal/biocerámico dos tipos de detectores fueron utilizados: El detector de electrones secundario, para obtener imágenes de alta resolución SEI (Secondary Electron Image) y el detector de electrones retrodispersados, que permite la obtención de imágenes de composición y topografía de la superficie BEI (Backscattered Electron Image) (CIMAV).

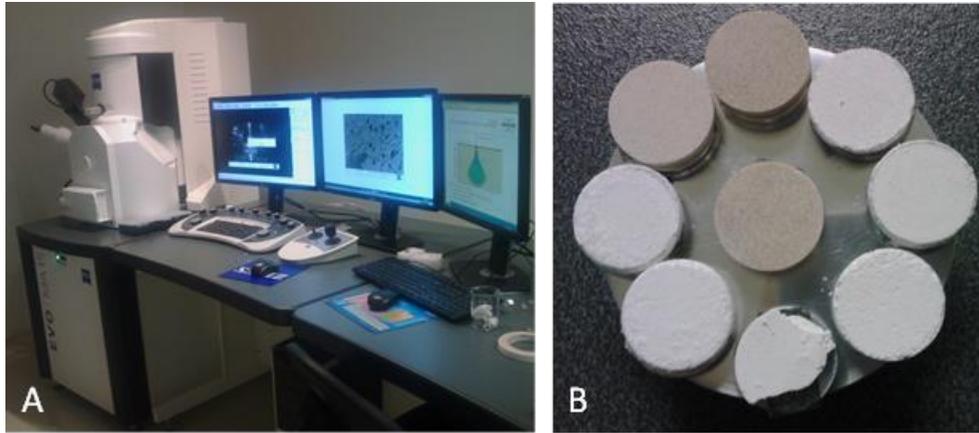


Figura 16. A) Microscopio electrónico de barrido. B) Andamios sal/polímero montadas en el porta muestra (stub)

La preparación de las muestras fue relativamente sencilla. El único requerimiento fue que las muestras fueran sólidas y conductoras.

3.4 Análisis del efecto de la temperatura en la porosidad de los andamios de HA y FA

En esta sección se hizo una evaluación del efecto del tratamiento térmico en la porosidad de los andamios de HA para poder determinar la temperatura más adecuada.

Se siguió el mismo procedimiento descrito para el análisis del efecto de la sal con algunas modificaciones. La sal usada en este análisis el cloruro de potasio (KCl). La sal fue mezclada con los biocerámico, es decir con la hidroxiapatita sin sinterizar (HA) y con la hidroxiapatita sinterizada a 1050°C (HAS), lo mismo con la fluorapatita sin sinterizar (FA) y con la sinterizada a 1050°C (FAS). La proporción de la mezcla fue de 0.325 gr de sal por 0.175 gr de HA/FA. Las mezclas sal/biocerámicos fueron triturados en un mortero de porcelana y luego fueron homogenizados mediante tamización utilizando un tamiz de 0.3 mm. Las muestras fueron preparadas por triplicado.

Las mezclas sal/biocerámico fueron prensadas con una fuerza de 5000 lbs por 5 min. Un tratamiento térmico de 160, 470, 780 y 1093 °C por 2 horas fueron aplicadas a los andamios sal/biocerámico obtenidos. Posteriormente, todos los andamios fueron puestos al sistema de lixiviación por goteo. El volumen de disolvente líquido usado en el proceso de lixiviación fue de 10 ml de agua destilada para todas las muestras. Todas las muestras fueron analizadas en el SEM y la cuantificación del porcentaje de porosidad y el diámetro de poro promedio de las mismas, fueron evaluadas mediante el software Fiji de ImageJ.

Capítulo 4 Resultados y discusión de resultados

4.1 Síntesis de HA y FA mediante método de precipitación por vía húmeda

El hidróxido de calcio y el ácido (orto) fosfóricos fueron usados como precursores para la síntesis de HA como se muestran a continuación.

Hidroxiapatita



La formación de HA incluyó los siguientes pasos:



$\text{Ca}_8\text{H}_2(\text{PO}_4)_6 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ = Fosfato octacálcico,

$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2 \cdot x\text{H}_2\text{O}$ = Calcio fosfato amorfo,

$\text{Ca}_{10-z}(\text{HPO}_4)_z(\text{PO}_4)_{6-z}(\text{OH})_{2-2z} \cdot n\text{H}_2\text{O}$ = Hidroxiapatita deficiente en calcio,

La formación de fosfato octacálcico y la conversión de fosfato octacálcico a calcio fosfato amorfo se produce muy rápidamente pero la cinética para el resto de la reacción es relativamente lenta.

El rendimiento porcentual de la HA se obtuvo de la siguiente manera:

Los gramos de los reactivos fueron convertidos a moles.

$$18.5595 \text{ gr de } \text{Ca}(\text{OH})_2 \left(\frac{1 \text{ mol } \text{Ca}(\text{OH})_2}{74.093 \text{ gr de } \text{Ca}(\text{OH})_2} \right) = 0.2504 \text{ moles de } \text{Ca}(\text{OH})_2$$

$$250 \text{ ml } \left(\frac{1.6 \text{ gr}}{1 \text{ ml}} \right) \left(\frac{1 \text{ mol de } \text{H}_3\text{PO}_4}{98 \text{ gr de } \text{H}_3\text{PO}_4} \right) = 4.0816 \text{ moles de } \text{H}_3\text{PO}_4$$

La proporción estequiométrica entre los reactivos y el producto fue evaluada.

$$\left(\frac{1 \text{ mol de HA}}{10 \text{ moles de } \text{Ca}(\text{OH})_2} \right)$$

$$\left(\frac{1 \text{ mol de HA}}{6 \text{ moles de } H_3PO_4} \right)$$

El número de moles del producto que se obtendría si cada reactivo se consumiera en su totalidad fue calculado.

$$0.2504 \text{ moles de } Ca(OH)_2 \frac{1 \text{ moles de HA}}{10 \text{ moles de } Ca(OH)_2} = 0.02504 \text{ moles de HA}$$

$$4.0816 \text{ moles de } H_3PO_4 \frac{1 \text{ mol de HA}}{6 \text{ moles de } H_3PO_4} = 0.6802 \text{ moles de HA}$$

El reactivo limitante fue el $Ca(OH)_2$. El máximo producto que se puede obtener es 0.02504 gr de HA.

$$0.02504 \text{ moles de HA} \left(\frac{1004.6229 \text{ gr de HA}}{1 \text{ mol de HA}} \right) = 25.1557 \text{ gr de HA}$$

El rendimiento porcentual o porcentaje de rendimiento fue calculado.

$$\% \text{ de rendimiento de HA} = \frac{20.6066}{25.1557} \times 100$$

$$\% \text{ de rendimiento de HA} = 82\%$$

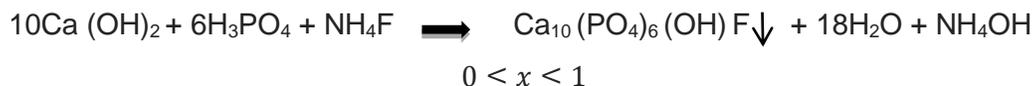
La HA en polvo obtenida con el método de precipitación vía húmeda se muestra en la figura 17.



Figura 17. Hidroxiapatita en polvo

Fluorapatita

La fácil sustitución de la HA con el flúor para la obtención de FA es una ventaja de la síntesis por precipitación vía húmeda. Esto se aprecia en la siguiente ecuación.



El rendimiento porcentual de la FA también fue evaluado.

Los reactivos de la síntesis de HA son los mismos para la FA excepto el NH_4F , por esto solo los gramos de NH_4F fueron convertidos a moles.

$$1.878 \text{ gr de } \text{NH}_4\text{F} \left(\frac{1 \text{ mol de } \text{NH}_4\text{F}}{35.04 \text{ gr de } \text{NH}_4\text{F}} \right) = 0.0535 \text{ moles de } \text{NH}_4\text{F}$$

La proporción estequiométrica entre los reactivos y el producto fue evaluada.

$$\left(\frac{1 \text{ mol de FA}}{10 \text{ moles de } \text{Ca}(\text{OH})_2} \right)$$

$$\left(\frac{1 \text{ mol de FA}}{6 \text{ moles de } \text{H}_3\text{PO}_4} \right)$$

$$\left(\frac{1 \text{ mol de FA}}{1 \text{ mol de } \text{NH}_4\text{F}} \right)$$

El número de moles del producto que se obtendría si cada reactivo se consumiera en su totalidad fue calculado.

$$0.2504 \text{ moles de } \text{Ca}(\text{OH})_2 \frac{1 \text{ mol de FA}}{10 \text{ moles de } \text{Ca}(\text{OH})_2} = 0.02504 \text{ moles de FA}$$

$$4.0816 \text{ moles de } \text{H}_3\text{PO}_4 \frac{1 \text{ mol de FA}}{6 \text{ moles de } \text{H}_3\text{PO}_4} = 0.6802 \text{ moles de FA}$$

$$0.0535 \text{ moles de } \text{NH}_4\text{F} \frac{1 \text{ mol de FA}}{1 \text{ mol de } \text{NH}_4\text{F}} = 0.0535 \text{ moles de FA}$$

El reactivo limitante fue el $\text{Ca}(\text{OH})_2$. Por tanto, el máximo producto que se puede obtener es 0.02504 gr de FA.

$$0.02504 \text{ moles de FA} \left(\frac{1008.59 \text{ gr de FA}}{1 \text{ mol de FA}} \right) = 25.1301 \text{ gr de FA}$$

El rendimiento porcentual o porcentaje de rendimiento fue calculado.

$$\% \text{ de rendimiento de FA} = \frac{18.524}{25.1557} \times 100$$

$$\% \text{ de rendimiento de FA} = 74\%$$

La fluorapatita en polvo obtenida con el método de precipitación vía húmeda se muestra en la figura 18.



Figura 18. Fluorapatita en polvo

La diferencia de rendimiento entre la hidroxiapatita y fluorapatita se debe básicamente a los productos obtenidos en ambas reacciones. En el caso de la hidroxiapatita, existe un exceso de agua que es eliminada en la etapa de filtración. Y en el caso de la fluorapatita, otro producto que se genera en la reacción, además de agua, es el hidróxido de amonio.

En la tabla se hace referencia al costo de reactivos que fue necesario para producir 100 gr de HA con el método de precipitación vía húmeda. La comparación de costos se hizo con un producto comercial de marca Aldrich y se observó una gran diferencia entre el costo de ambos productos. El costo de reactivo de la HA sinterizada es casi 10 veces menor que la comercial.

Tabla 4. Diferencia de costos entre una HA comercial y la HA sintetizada por precipitación vía húmeda

	Marca	Cantidad gr	Precio Pesos mexicanos
Hidroxiapatita comercial	SIGMA ALDRICH	100	8 015
Hidroxiapatita sintetizada	-	100	5 744.65
		Diferencia	3 270.35

4.2 Microscopía electrónica de difracción de rayos X (DRX)

La pureza y cristalinidad de la HA y FA sintetizadas fueron evaluadas DRX. Un diagrama de difracción fue obtenido gracias a la interacción de los rayos X con los polvos de HA y FA. Debido a que el diagrama de difracción generado es considerado como la huella dactilar de la fase cristalina que lo ha producido, fue posible identificar y determinar si el producto obtenido es realmente lo que esperamos.

Los diagramas de difracción obtenidos fueron graficados en función del ángulo 2θ contra intensidad. En la figura 19 se muestra el espectro de rayos X del polvo de HA. Los cuatro primeros picos de mayor intensidad localizados entre la zona angular $20 < 2\theta < 60$ fueron asignados con un índice de Miller de 002, 211, 112, 300 respectivamente, índices que se le atribuye a la hidroxiapatita.

Los espectros generados fueron comparados con la tarjeta JCPDS 09-432 (patrón DRX). Ambos resultados (Fig. 19 y 20) comprobaron que las muestras obtenidas de HA y FA, por el método de precipitación vía húmeda, representan el patrón típico de dichos biocerámicos.

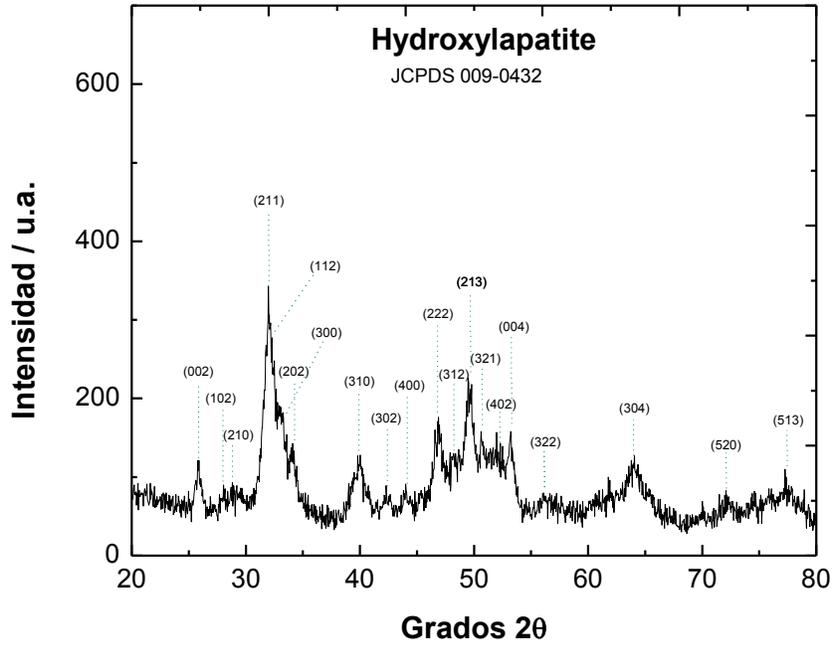


Figura 19. Espectro de Rayos X del polvo de Hidroxiapatita pura sintetizada por el método de precipitación vía húmeda

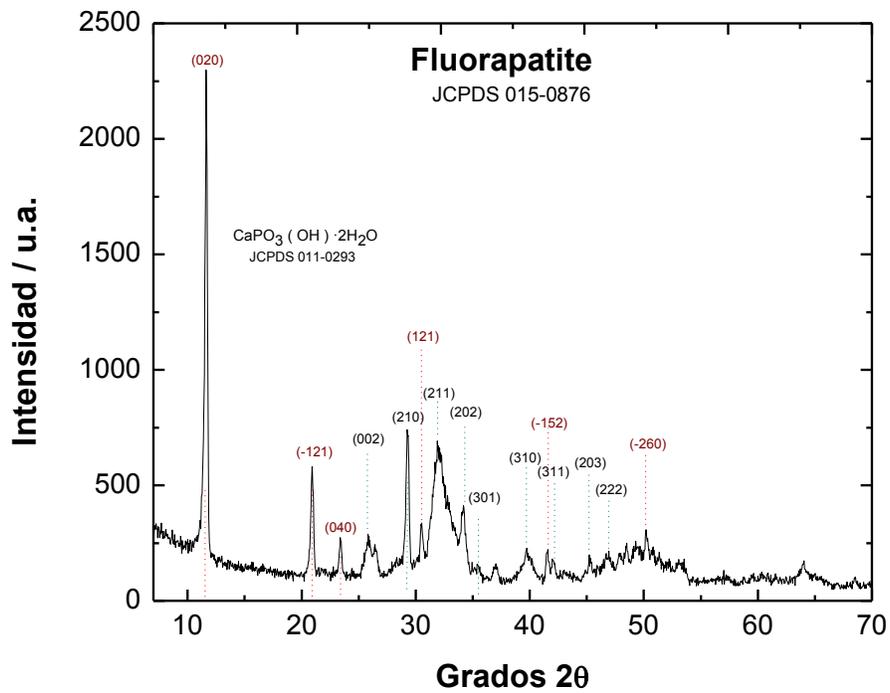


Figura 20. Espectro de Rayos X del polvo de Fluorapatita pura sintetizada por el método de precipitación vía húmeda

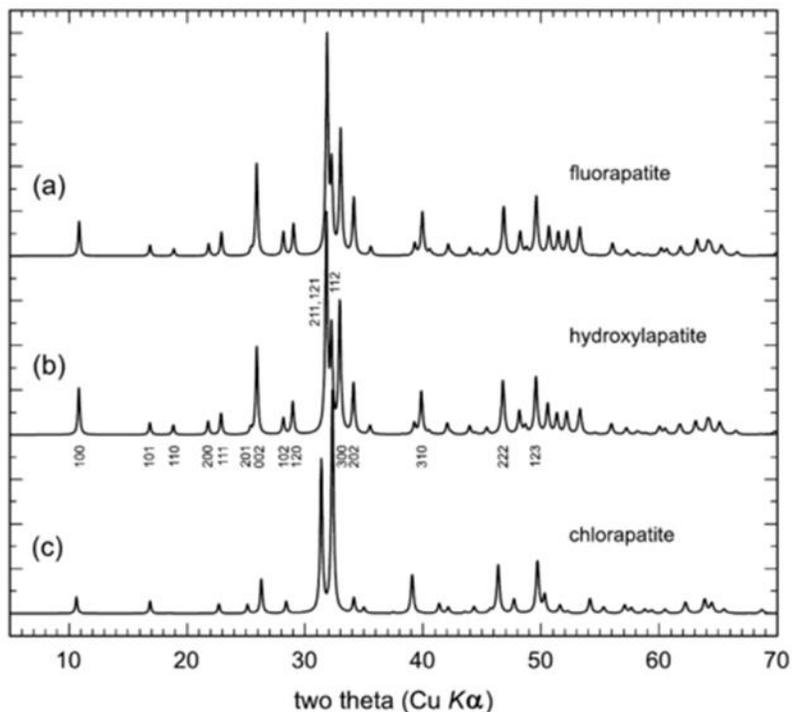


Figura 21. Patrón de difracción de rayos X para (a). fluorapatita, (b) hidroxipatita y (c) clorapatita calculado con los parámetros estructurales de Hughes et al (**Fleet, 2014**)

Análisis DRX de los polvos de HA y FA fabricados mediante precipitación vía húmeda generaron espectros como lo que se muestra en las figuras 19 y 20. Al comparar estos espectros con el patrón de difracción de rayos X de la HA y FA calculados con los parámetros estructurales de Hughes et al. 2014, (figura 21) se observa un comportamiento muy similar a pesar que el patrón de Hughes presenta picos más estrechos y de mayor intensidad. Asimismo, en el caso de los espectros de FA, el espectro generado por el análisis DRX es muy similar, pero el patrón de nuestro espectro se distorsiona ligeramente porque presenta picos mucho más anchos y de mayor intensidad. El reconocimiento de las muestras en polvo de HA y FA fueron comparados, además, con la tarjeta JCPDS 09-432 y ambos resultados comprobaron que las muestras obtenidas fueron HA y FA.

4.3 Análisis del efecto de la sal en la porosidad de los andamios de HA

Inicialmente, las sales seleccionadas para evaluar el efecto del tipo de sal utilizado en la porosidad de los andamios de HA fabricadas por el método de lixiviación de sales, fueron el $C_8H_5KO_4$, $CaCl_2$, KCl y el KOH, debido a las siguientes consideraciones.

El $C_8H_5KO_4$ (PM 204.22 gr) fue seleccionado por presentar el peso molecular más alto entre las sales evaluadas. El peso molecular es una propiedad física que, según Andersson et al (2013), está relacionado con la velocidad de transferencia de masa, lixiviación y microestructura de películas de etilcelulosa/hidroxipropilcelulosa.

El KOH (1120 g/l a 20 °C) fue seleccionado por tener la solubilidad en el agua más alta en comparación con las otras sales. El tamaño de poro de polímeros sintetizados por lixiviación de sales está relacionado con el tamaño de grano de la sal (Xian, 2010). Además si se sabe que la solubilidad de una sustancia aumenta al disminuir el tamaño de la partícula, debido al aumento de la superficie de contacto entre el disolvente y el soluto (Vega et al., 2003), se puede inferir que el tamaño de poro es proporcional a la solubilidad de la sal utilizada, es por eso que se consideró la solubilidad como parámetro para la selección.

El KCl fue seleccionado por ser la segunda sal con menor peso molecular. Fue seleccionada en lugar del NaOH, sal con menor peso molecular, debido a que la presencia del potasio en la sal fue una característica preferente en la selección.

El $CaCl_2$ fue seleccionado porque además de presentar un peso molecular y un valor de solubilidad en el agua promedio en comparación de las otras sales, fue la única sal constituida por moléculas de calcio. Esta característica, pese a no ser esencial dentro de la selección de sales para la lixiviación de partícula, fue considerada por su potencial de ser fuente de iones de calcio en caso que no toda la sal fuera eliminada de la pastilla polimérica.

A pesar de haber seleccionado inicialmente esas sales, en el transcurso de la fabricación de los andamios, dos de las cuatro sales fueron eliminadas. Las sales de $C_8H_5KO_4$ y KOH fueron descartadas al final por retener una gran cantidad de humedad ambiental que impidió su adecuada manipulación. Por esta razón, solo se continuó con el proceso de fabricación de andamios con las sales de $C_8H_5KO_4$ y KCl.

Las sales seleccionadas fueron mezcladas con la HA y prensadas como se describió en la metodología. Andamios de 13.025 mm de diámetro y 2.15 mm de espesor fueron obtenidas y puestas a sinterizar a 160 y 1050 °C. Finalmente fueron lixiviadas con 5, 10 y 20 ml de agua destilada. A continuación se muestra, en el tabla 5, las características de fabricación de los andamios evaluados.

Tabla 5. Andamios de sal/HA y sus respectivas características de fabricación

Muestra	Biocerámico	Sal adicionada	Temperatura de Sinterización °C	Volumen de agua en la lixiviación ml
A1	HA	KCl	160	10
A2	HA	KCl	1050	5
A3	HA	KCl	160	20
B1	HA	C ₈ H ₅ KO ₄	160	20
B2	HA	C ₈ H ₅ KO ₄	1050	10
B3	HA	C ₈ H ₅ KO ₄	1050	5

Los andamios A1, A3 y B1 fueron expuestos a un tratamiento térmico de 160 °C durante 15 minutos; mientras que los andamios A2, B2 y B3, a 1050 °C por el mismo tiempo. Un cambio de color verdoso en algunas partes de las pastillas fue percibido en los controles B2 y B3 a diferencia de las pastillas formadas A1, A2 y A3 que no presentaron cambio de color en ninguna de las dos temperaturas.

El tratamiento térmico provocó que parte de las sales se fusionaran. Esta fusión, a su vez, ocasionó que algunos andamios se fracturaran parcialmente debido a la adhesión sufrida en superficie de los recipientes de porcelana que los contenían en la etapa de tratamiento térmico (Fig. 21 y 22).



Figura 22. Andamios de HA con KCl sinterizados a 160 °C. A) Andamio B3. B) Andamio A1.
Andamio A3



Figura 23. Andamios de HA con KCl sinterizados a 1050 °C. A) Andamio B2. B) Andamio A2

Luego de tratamiento térmico, los andamios fueron montados en el sistema de lixiviación por goteo. Volúmenes de 5, 10 y 20 ml de agua destilada fueron vertidos lentamente, 1 gota por segundo aproximadamente, sobre la superficie de las pastillas. Las gotas infiltraron los andamios y fueron disueltas paulatinamente.

Con la finalidad de calcular la concentración de sales presentes en el lixiviado, un dispositivo MP-AES fue utilizado. El análisis de las concentraciones fue en función a la concentración de potasio (K) presente en cada lixiviado. Las concentraciones obtenidas se tomaron en base a la curva de calibración del K medido a una longitud de onda de 766.491 nm. La concentración de K en cada uno de las muestras fue analizada. Sin embargo, el análisis presentó incongruencias en los resultados obtenidos probablemente por algún error en la configuración del programa de método de medición en el software del MP- AES. Por ese motivo se decidió no mostrar los resultados de este análisis.

El porcentaje de porosidad y diámetro de poro promedio de la superficie de todos los andamios fueron analizados mediante SEM. En las micrografías se observa claramente la formación de porosidad en todas las muestras con una notoria diferencia entre la porosidad y tamaño de poros entre las muestras (Fig. 24).

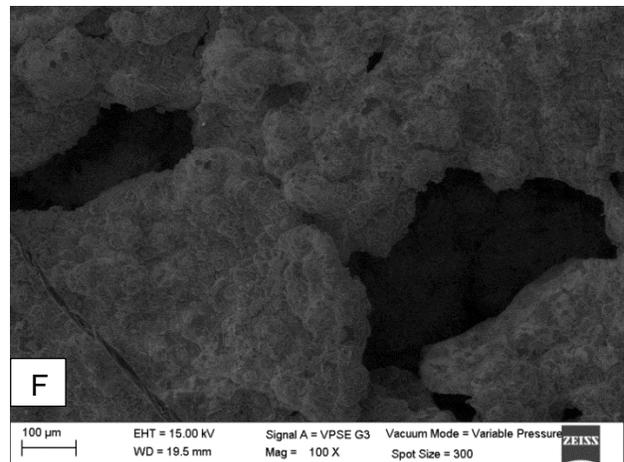
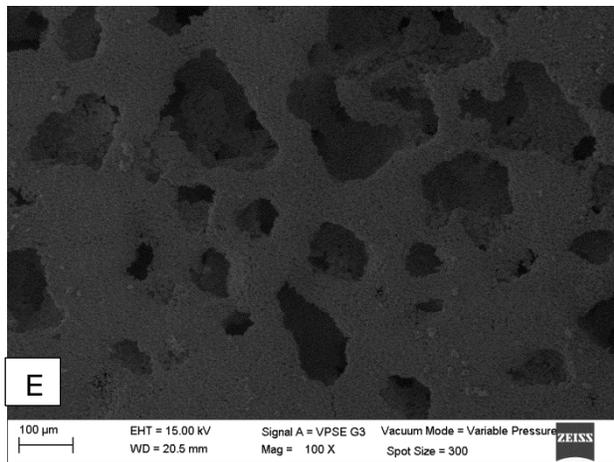
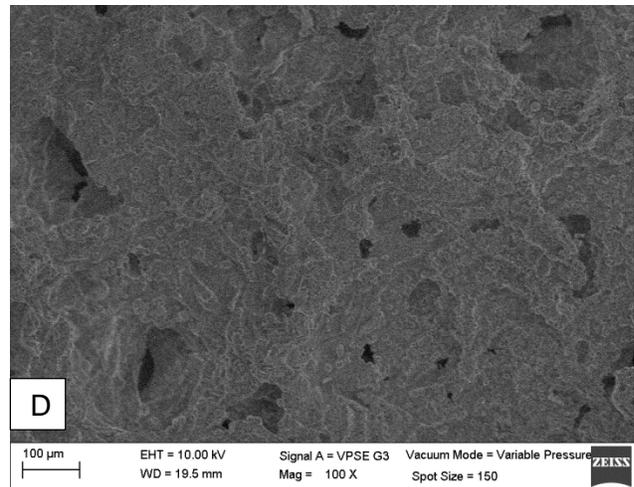
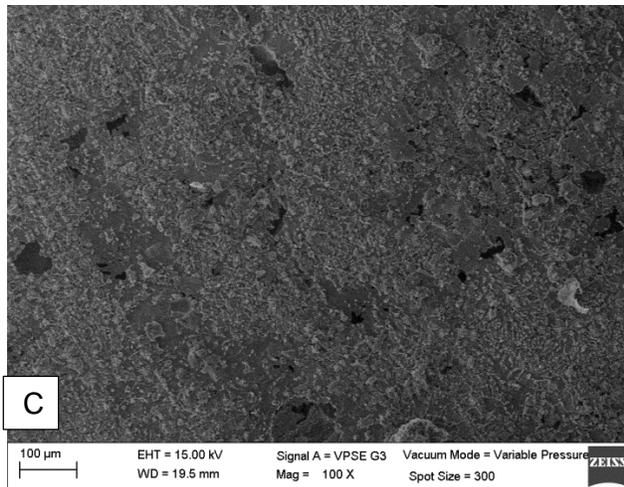
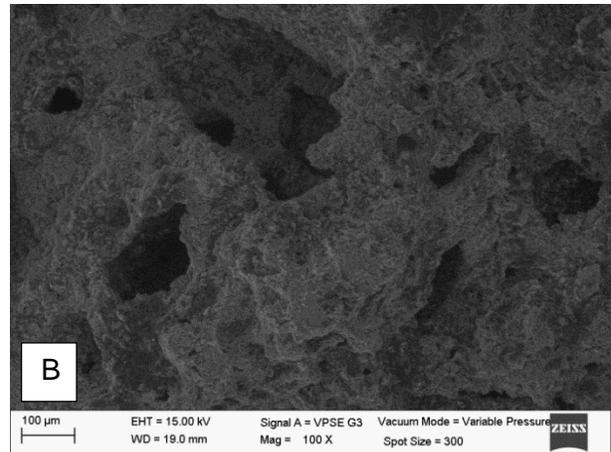
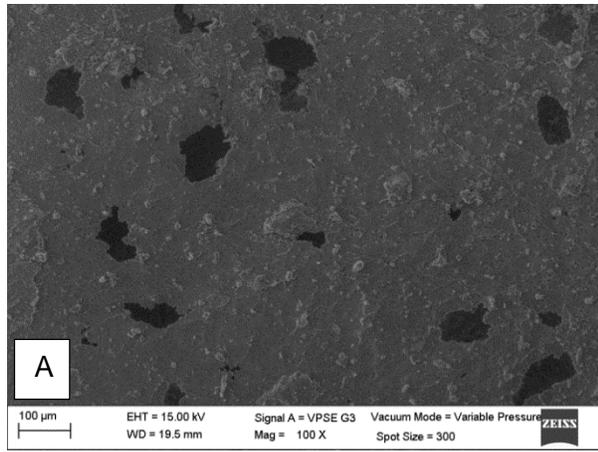


Figura 24. Micrografías SEM de los andamios A y B después de su sinterización y lixiviación. A) A1. B) B1. C) A3. D) B3. E) A2 F) B2. Todas las micrografías están en escala 100µm

La cuantificación del porcentaje de porosidad y el diámetro de poro promedio de la superficie de los andamios A y B fueron analizadas utilizando el software FIJI de ImageJ (Tabla 6). Para el cálculo del porcentaje de porosidad, la herramienta Threshold fue utilizada. Figura 25 A.

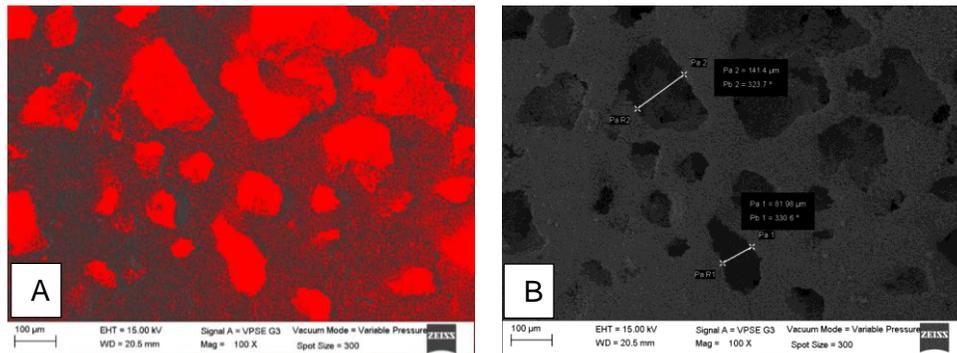


Figura 25. A) Conteo de poros con la herramienta threshold del programa ImageJ del andamio A2. B) Medición del diámetro de dos poros de la pastilla A2

Tabla 6. Datos obtenidos del diámetro promedio de poros y el porcentaje de porosidad del programa ImageJ.

Muestra	Volumen de agua ml	Temp. de sinterización °C	No poros /mm²	Diámetro de poro promedio en µm	Porcentaje de porosidad %
A1	10	160	17	74.77	5.321
A2	5	1050	29	111.59	22.955
A3	20	160	16	46.03	24.610
B1	20	160	6	82.925	37.610
B2	10	1050	17	110.63	10.321
B3	5	1050	5	201.8	21.664

El promedio de poros y el porcentaje de porosidad obtenidos de cada muestra fueron mostrados en la tabla 6. Los tamaños de poros más grandes fueron encontrados en los andamios A2 y B2 ambas expuestas a un tratamiento térmico de 1050 °C. En cambio los tamaño de poro más pequeños fueron encontrados en los andamios A3 y B1 que fueron expuestas a 160 °C de sinterización lo que nos indicaría que el tamaño de poro promedio podría estar ligado a la temperatura de sinterización de las pastillas sal/biocerámico en lugar del volumen de agua usado en el proceso de lixiviación. Esto debido a que los puntos de fusión, de ambas sales, están por debajo de 1050 °C.

El andamio que presentó mayor porcentaje de porosidad fue el B1 (37.61%) y el andamio con mayor diámetro de poro promedio fue el B3 (201 μm). Debido a su porcentaje de porosidad, diámetro de poro promedio y la facilidad de manipulación en la fabricación de andamios porosos de HA, la sal más adecuada fue el biftalato de potasio.

4.4 Análisis del efecto de la temperatura en la porosidad de los andamio de HA y FA

En esta sección se hizo una evaluación del efecto del tratamiento térmico en la porosidad de los andamios de HA para poder determinar la temperatura más adecuada. Para ello, se fabricaron nuevos andamios siguiendo la metodología anterior. El cloruro de potasio (KCl) fue la sal que se usó en estos nuevos andamios El KCl fue mezclada con la HA sin sinterizar (HA) y con la hidroxiapatita sinterizada a 1050 °C (HAS), lo mismo con la fluorapatita sin sinterizar (FA) y con la sinterizada a 1050 °C (FAS). Las mezclas fueron homogenizadas y prensadas. Se obtuvieron andamios de 13.025 mm de diámetro y 2.15 mm de espesor para las mezclas con HA (Fig. 26); y andamios de 13.025 mm de diámetro y 1.54 de espesor, para las de FA.



Figura 26. Andamios de cloruro de potasio con hidroxiapatita

Durante la etapa de lixiviación por goteo, las muestras B, C y D presentaron un comportamiento diferente a la mezcla A (Tabla 7). Con volumen de menos de 5 ml de agua destilada, las muestras B, C y D comenzaron a deshacerse y disolverse por completo. Por ello, la etapa de lixiviación fue aplicada solo a las muestras compuestas por HA. El volumen de agua destilada para todas las muestras A fue de 10 ml. Cuatro temperaturas para el tratamiento térmico fueron evaluadas: 160, 470, 840 y 1090 °C por dos horas en las muestras; y por 24 horas en las muestras B y D. En la siguiente tabla se resume la temperatura y el volumen de agua utilizado para cada muestra.

Tabla 7. Condiciones de fabricación de andamios porosos de HA, FA, HAS y FAS.

Muestra	Andamios biocerámico + KCl	Sinterizada a 1050 °C	Lixiviación 10 ml	Tratamiento térmico por 2 horas	Tratamiento térmico por 24 horas
A	HA		x	x	
B	HAS	x			x
C	FA			x	
D	FAS	x			x

Todas las muestras fueron analizadas en el SEM y la cuantificación del porcentaje de porosidad y el diámetro de poro promedio de las mismas, fueron evaluadas mediante el software Fiji de ImageJ.

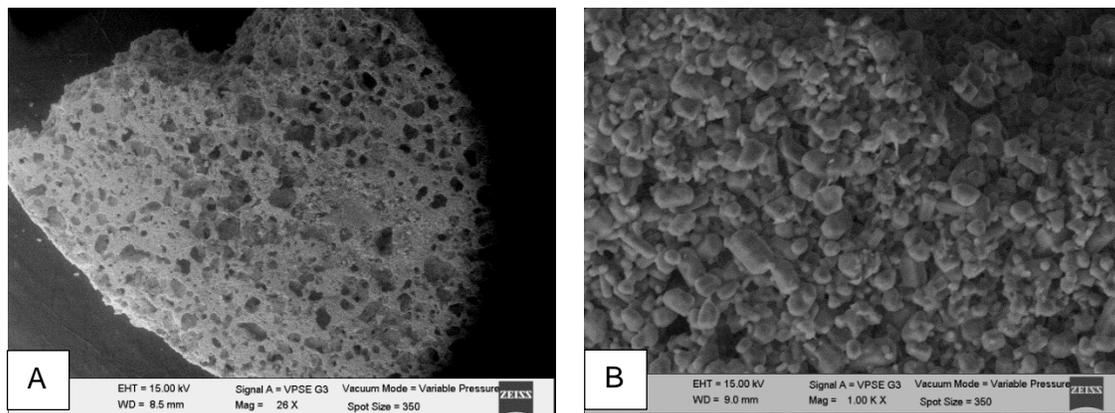


Figura 27. Micrografías de la muestra A con tratamiento térmico de 1050 °C A) Con 20 X de aumento. Escala 200 µm. B) Con 1000 X de aumento, escala 10 µm

La superficie porosa del andamio A con un tratamiento térmico de 1050 °C fue mostrada en la figura 27. En la figura 27B, se aprecia el mismo andamio a 1000 X de aumento.

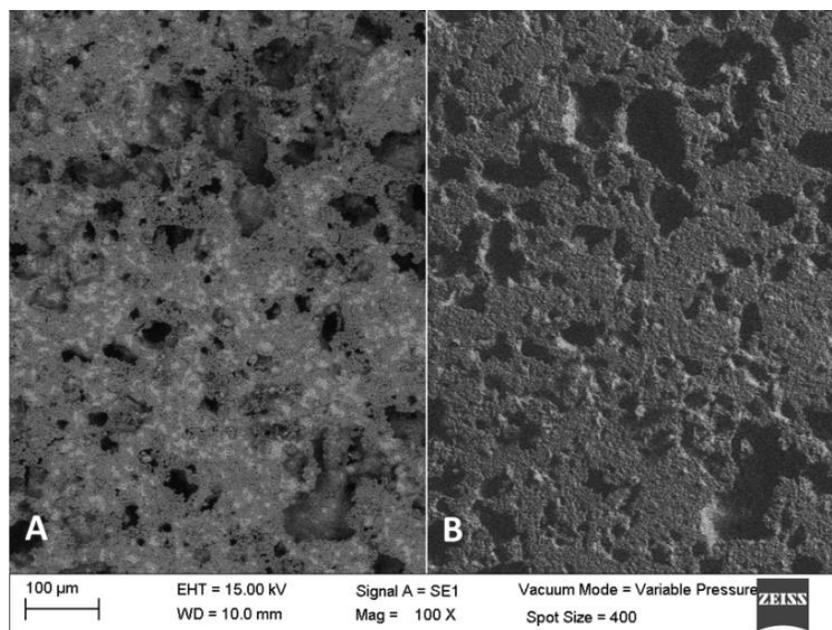


Figura 28. Comparación de micrografías SEI y BEI del andamio A a 160 °C. A) Microscopía con detector SEI. B) Microscopía con detector BEI

El detector de electrones secundario (SEI) y el detector de electrones retrodispersados (BEI) del SEM fueron utilizados en el análisis de la superficie de todas las pastillas. El detector nos permitió obtener imágenes de alta resolución, el cambio el detector BEI, imágenes de la composición y topografía de la superficie analizada. El uso de ambos detectores nos proporcionó una información más completa y detallada de la superficie de las pastillas. En la figura 28 se muestra un ejemplo de la comparación de ambas micrografías, con detector SEI y BEI. El relieve de los andamios fue apreciado claramente en la micrografía con detector BEI.

Todas las muestras fueron analizadas por triplicado excepto los andamios D expuesta a un tratamiento térmico de 1093 °C que solo fue analizada 2 veces. A continuación se muestran las micrografías de los andamios A, B, C y D tratadas a diferentes temperaturas.

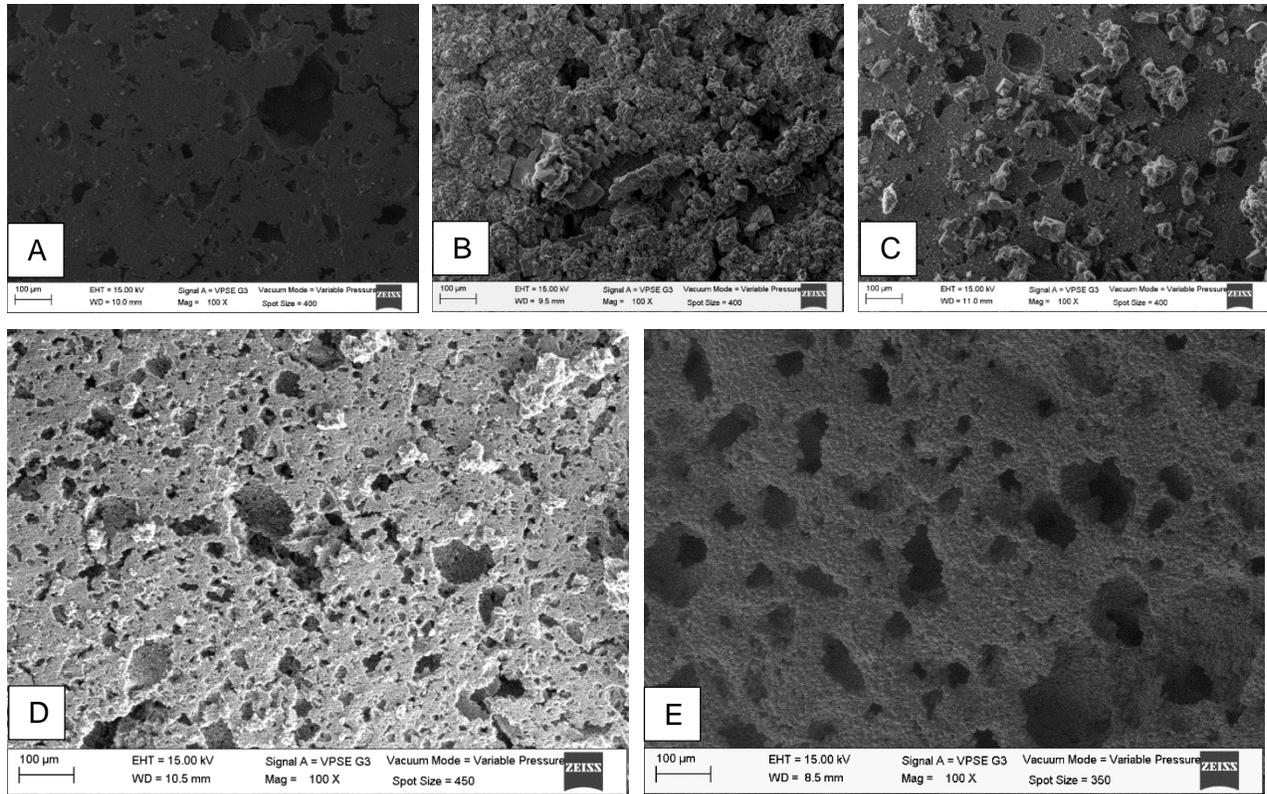


Figura 29. Micrografías de los andamios A. A) Sin tratamiento térmico. B) A 160 °C. C) A 470°C. D) A 840 °C y E) A 1093 °C. Todas las micrografías se encuentran en escala 100µm

En general los andamios A tratados a 160, 470, 840 y 1090 °C mostraron buena consistencia y color uniforme. No obstante, los andamios A tratados a 840 °C presentaron mayor inconsistencia que el resto. El punto de fusión del KCl es de 778 °C, temperatura cuya proximidad con el tratamiento térmico a 840 °C es relativamente grande. Este detalle pudiera explicar la inconsistencia de los andamios A tratados a 840 °C, ya que el estar expuesta a una temperatura por arriba de su punto de fusión, la sal que constituye el andamio inicia su cambio de fase. En este momento, la sal derretida comienza un recorrido a través del andamio, hasta salir de él, que pudiera desestabilizar su estructura interna.

Poros interconectados fueron distinguidos en los andamios. Un ejemplo de esta interconectabilidad es observada en la figura 29D y 29E con mayor nitidez. La interconectabilidad de los poros es una característica deseada en las pastillas ya que aseguran mayor facilidad de proliferación y migración celular, además de mayor transporte de nutrientes durante las pruebas de biocompatibilidad *in vitro*.

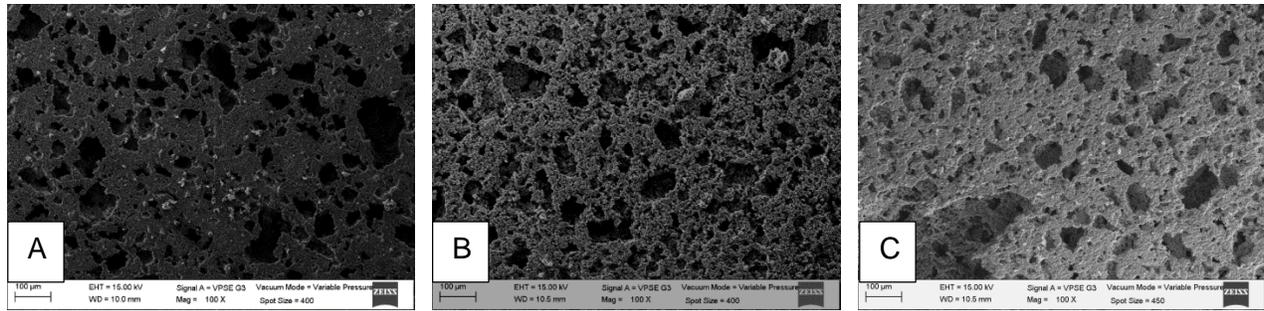


Figura 30. Micrografías de los andamios B. A) Tratada a 160 °C. B) A 840 °C. C) A 1093 °C.
Escala 100 µm

Los andamios B tratadas a 160, 840 y 1093 °C fueron mostradas en la figura 30. Para este control la etapa de lixiviación fue eliminada por lo que solo recibieron el tratamiento térmico. Se puede observar que a pesar de no haber utilizado agua para la eliminación de la sal, una notable porosidad fue obtenida en todas las pastillas incluso en la tratada a 160 °C.

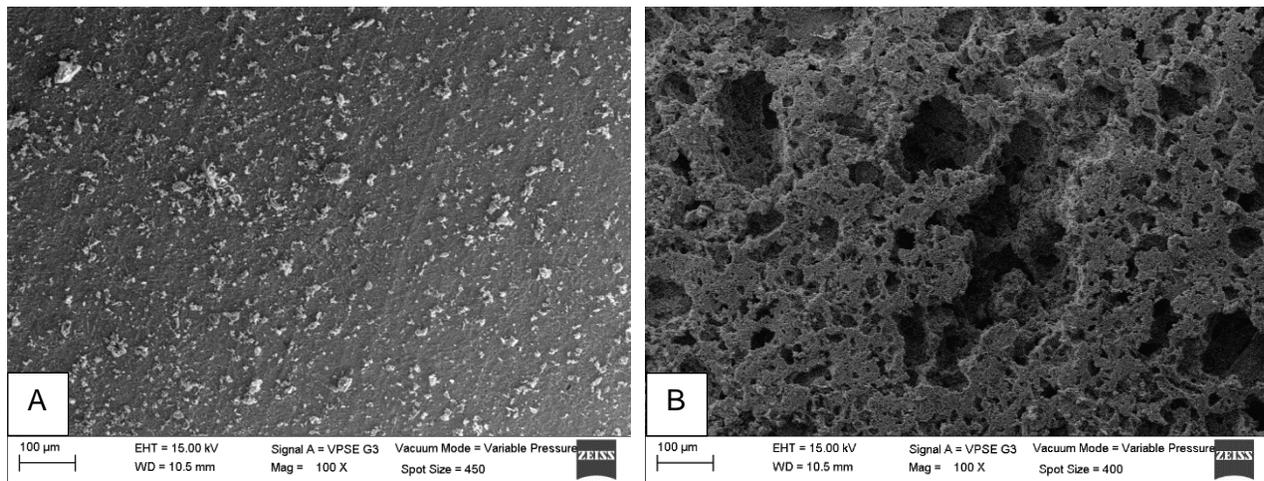


Figura 31. Micrografías de los andamios C. A) Tratados a 160° C. B) Tratados a 1093 °C.
Micrografías en escala 100µm

La formación de porosidad en las pastillas C tratadas a 160 °C fue nula. En cambio en los andamios tratados a 1093 °C, poros relativamente grandes fueron encontrados. Cabe señalar que el proceso de lixiviación por goteo fue suprimido para este control porque el contacto con el agua ocasionaba su desintegración.

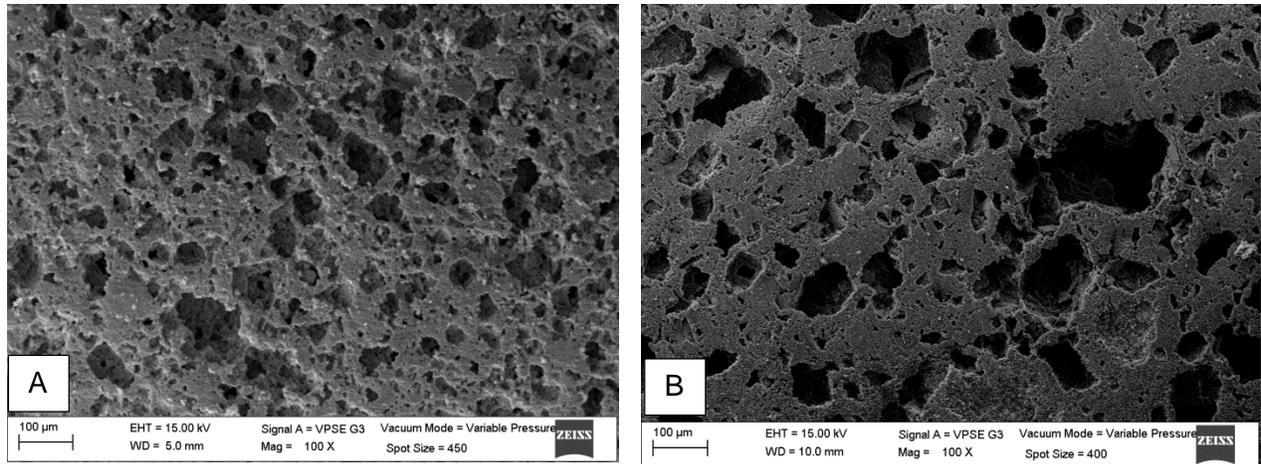


Figura 32 Micrografías de los andamios D. A) Tratados a 840 °C. B) Tratados a 1093 °C.

Micrografías a escala 100 µm

En el caso de los andamios D (Fig. 32) la existencia de porosidad interconectada fue evidente en ambos tratamientos térmicos (840-1093 °C). Además, se observó una mayor uniformidad de los poros en la superficie de los andamios. Al igual que los andamios B y C, estos no pasaron por la etapa de lixiviación de sales.

La cuantificación del porcentaje de porosidad y el diámetro de poro promedio de los andamios A, B, C y D fueron analizadas con el software Fiji de ImageJ. Los datos obtenidos de este análisis son mostrados en la tabla 9.

Tabla 8. Porcentaje de porosidad y diámetro de poro promedio de los andamios A, B, C y D y sus triplicados. Obtenidos con el programa ImageJ

	% de porosidad	Diámetro de poro promedio µm	Mínimo	Máximo
A – 1	8.17	51 +/-47	17	188
A – 2	7.771	61 +/-28	23	100
A – 3	14.656	88 +/-60	34	310
A 160 – 1	15.634	79 +/-37	27	158
A 160 – 2	9.793	65 +/-41	23	177
A 160 – 3	13.496	65 +/-45	25	172
A 470 – 2	13.673	46 +/-33	11	159
A 470 – 3	17.760	57 +/-17	26	90

A 470 – 1	12.404	45 +/-26	12	129
A 840 – 1	59.89	47 +/-44	10	342
A 840 – 2	56.462	38 +/-33	9	203
A 840 – 3	55.449	45 +/-34	10	199
A 1090 – 1	50.219	101 +/-71	22	352
A 1090 – 2	52.687	124 +/-71	18	306
A 1090 – 3	52.289	74 +/-49	16	267
B 160 – 1	47.983	46 +/-29	6	163
B 160 – 2	52.889	41 +/-23	6	150
B 160 – 3	49.31	54 +/-29	15	177
B 840 – 1	59.89	48 +/-27	12	154
B 840 – 2	56.462	47 +/-24	9	144
B 840 – 3	55.449	53 +/-34	13	155
B 1093 – 1	46.723	44 +/-30	7	147
B 1093 – 2	48.107	59 +/-46	10	260
B 1093 – 3	51.696	42 +/-27	10	150
C 160 – 1	0	0	0	0
C 160 – 2	0	0	0	0
C 160 – 3	0	0	0	0
C 1093 – 1	45.952	51 +/-50	9	345
C 1093 – 2	45.864	53 +/-36	9	212
C 1093 – 3	45.714	72 +/-52	16	268
D 840 – 1	43.852	62 +/-37	16	203
D 840 – 2	44.755	55 +/-34	13	202
D 840 – 3	42.779	64 +/-47	10	314
D 1093 – 1	44.44	49 +/-32	9	158
D 1093 – 2	58.367	53 +/-36	8	161

Para una mejor comparación y visualización de los valores obtenidos, en la tabla 10 se muestra el promedio de los triplicados de cada andamio.

Tabla 9. Resumen del porcentaje de porosidad y diámetro de poro promedio de los andamios A, B, C y D.

Muestra	% de porosidad	Diámetro de poro promedio μm	Mínimo	Máximo
A 0	10	67 +/-45	25	199
A 160	13	70 +/-41	25	169
A 470	15	50 +/-25	16	126
A 840	57	43 +/-37	10	248
A 1090	52	100 +/-64	19	308
B 160	50	47 +/-27	9	163
B 840	57	49 +/-28	11	151
B 1093	49	48 +/-34	9	186
C 160	0	0	-	-
C 1093	46	59 +/-46	11	275
D 840	44	60 +/-39	13	240
D 1093	51	51 +/-34	9	160

Según algunos estudios, a mayor porosidad mayor facilidad de proliferación y migración celular, además de mayor transporte de nutrientes. Además, se sabe que porcentajes de porosidad con valores superiores al 10% en los materiales cerámicos indica interconectividad, es decir; que entre más alta sea la porosidad mayor es la probabilidad de interconexión entre los poros (Gonzalez et al., 2014).

Los andamios que presentaron mayor porcentaje de porosidad fueron los andamios A y B, expuestas a un tratamiento térmico de 840 °C. En general, solo los andamios constituidas por HA, sin previa sinterización, tratadas a una temperatura por debajo de 840 °C mostraron porcentajes de porosidad más bajos a diferencia de aquellos andamios constituidos por HAS que presentaron porcentaje de porosidad por encima del 40%. Asimismo, los andamios constituidos por fluorapatita (C y D) expuestos a un tratamiento térmico de 1093 °C presentaron un porcentaje de porosidad por encima del 45%. Estos valores indican que los andamios A, B, C y D presentan interconectabilidad en su estructura porosa.

El diámetro de poro promedio más grande (100 μm) fue el obtenido en los andamios A expuestas a una temperatura de 1093 °C. La presencia de micro y macroporosidad en todas las

muestras fue percibida. Poros entre 9 y 308 μm fueron encontradas. Este resultado se encuentra dentro del rango de tamaño de poro reportado por Sequeda et al., 2012, quien en su estudio señaló que el tamaño de poro más adecuado para la facilidad de proliferación y migración celular varía entre 100-500 μm (Sequeda et al., 2012; Velasco y Garzón, 2010).

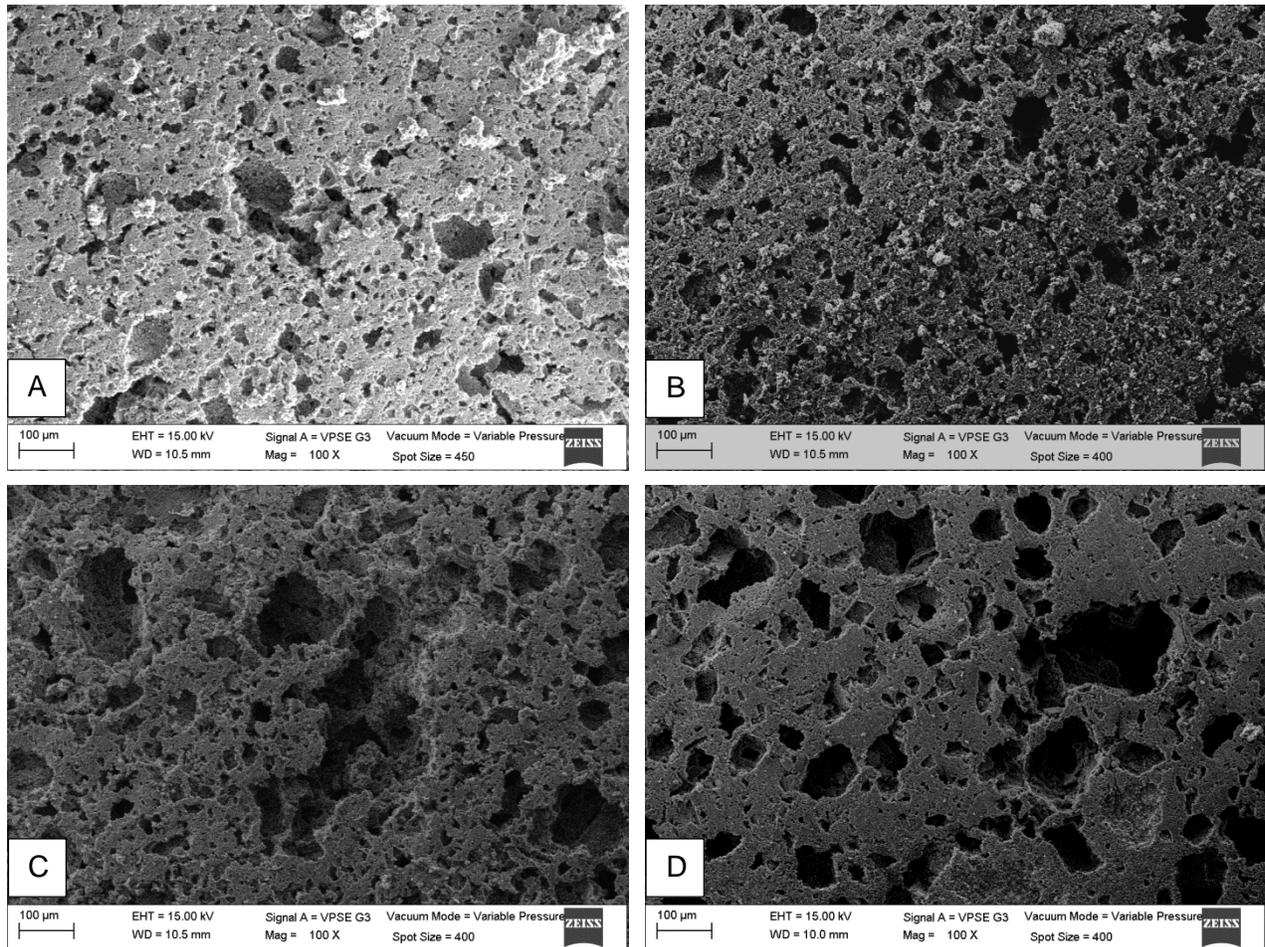


Figura 33. Micrografías de los andamios con mayor porosidad. A) A - 840 $^{\circ}\text{C}$. B) B - 840 $^{\circ}\text{C}$. C) C - 1093 $^{\circ}\text{C}$. D) D - 1093 $^{\circ}\text{C}$. Todas las micrografías están en escala 100 μm

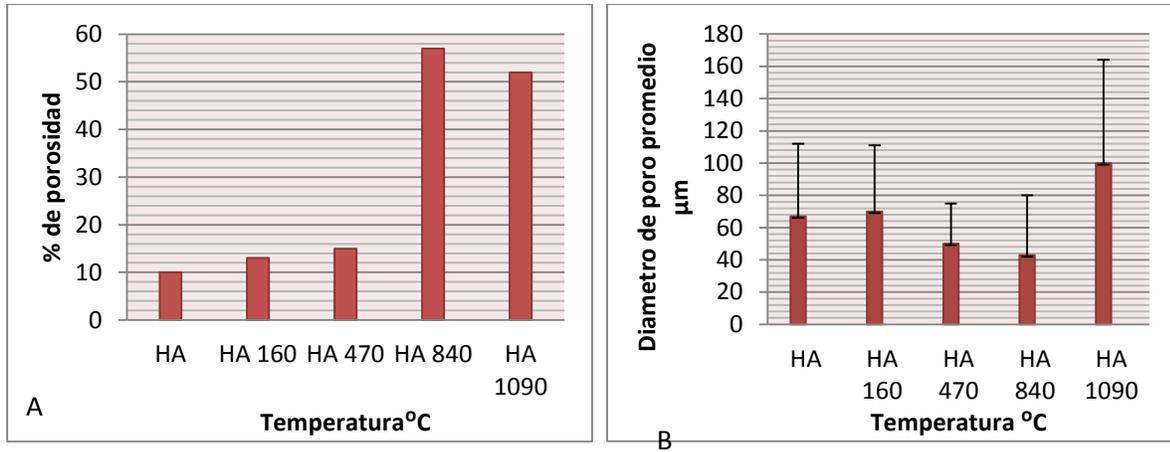


Figura 34. Gráficas de los andamios A. A) Porcentaje de porosidad en función de la temperatura. B) Diámetro de poro promedio en función de la temperatura

Se observa el comportamiento de la porosidad generada en los andamios A (Fig. 34). El porcentaje de porosidad se incrementa a medida que la temperatura aumenta hasta llegar a 840 °C de temperatura, donde se muestra el máximo porcentaje de porosidad alcanzado para los andamios A. Sin embargo al llegar 1093 °C el porcentaje de porosidad disminuye ligeramente. A esa temperatura los poros crecen tanto que llegan a fusionarse entre ellos, es por ello que el porcentaje de porosidad disminuye pero el diámetro de poro promedio aumenta. Por tanto, con un tratamiento térmico de 840 °C se puede lograr un porcentaje de porosidad de 57 % pero con un promedio de diámetro relativamente bajo. La temperatura óptima en el tratamiento de andamios A fue de 1093 °C debido al alto porcentaje de porosidad de 52% con un tamaño de poro promedio de 100µm.

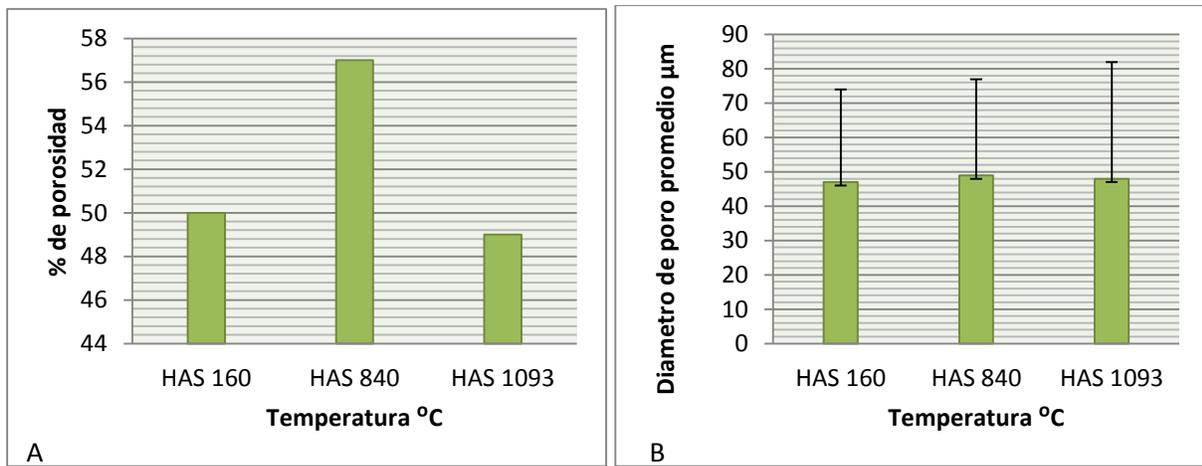


Figura 35. Gráficas de los andamios B. A) Porcentaje de porosidad en función de la temperatura. B) Diámetro de poro promedio en función de la temperatura

Asimismo, en los andamios B, el máximo porcentaje de porosidad encontrado fue en aquellos expuestos a 840 °C (Fig. 35). Se alcanzó un máximo de 57% de porosidad con un diámetro promedio de 49 μm . A diferencia de las A, que presentan un cambio muy drástico en la porosidad entre 160 y 840 °C, la diferencia de porosidad en los andamios B entre esas mismas temperaturas es muy baja. Al igual que los andamios A, al aumentar la temperatura a 1093 °C el porcentaje de porosidad disminuye ligeramente pero el diámetro de poro promedio se mantiene casi constante, en comparación con las otras temperaturas, con una desviación estándar mayor. Por tanto, los mejores resultados para los andamios B fueron obtenidas a 840 °C.

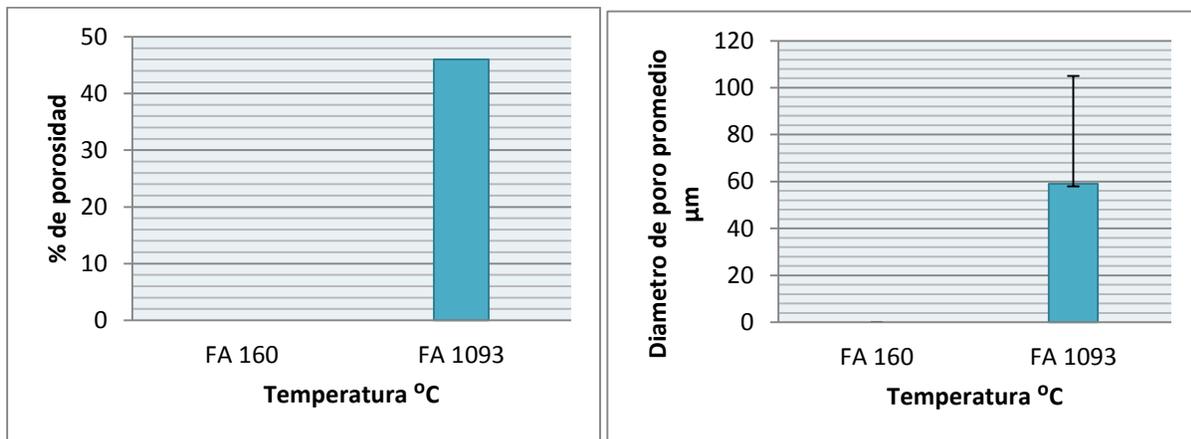


Figura 36. Gráficas de los andamios C. A) Porcentaje de porosidad en función de la temperatura. B) Diámetro de poro promedio en función de la temperatura

En la figura 36 existe una marcada diferencia entre los andamios C tratadas a 160 y 1093 °C debido a la ausencia de porosidad en las de 160 °C. Se encontró que el porcentaje de porosidad obtenido a 1093 °C fue de 46 % de porosidad con un diámetro promedio de 59 μm .

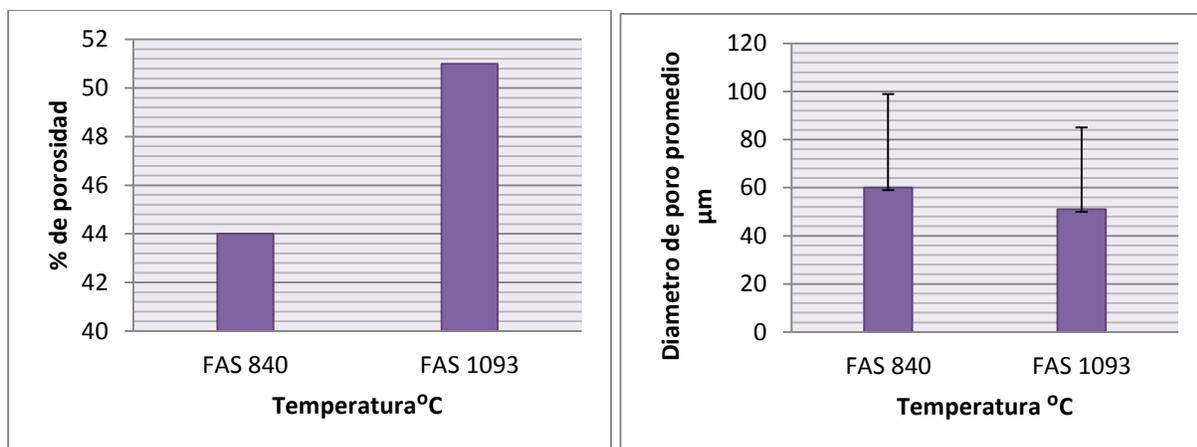


Figura 37. Gráficas de los andamios D. A) Porcentaje de porosidad en función de la temperatura. B) Diámetro de poro promedio en función de la temperatura

La máxima porosidad obtenida en los andamios D fue a una temperatura de 1093 ° (Fig. 37). Se obtuvo 51% de porosidad con 51 µm de tamaño de poro promedio. Una ligera diferencia entre la porosidad en ambas temperaturas fue observada. Un promedio de diámetro mayor fue obtenido en aquellos andamios tratados a 840 °C.

Se ha reportado que con otros métodos de fabricación de andamios porosos como el defundición de disolvente y lixiviación, utilizando dimetil sulfóxido (DMSO) como solvente durante 14 días, es posible obtener andamios con alta porosidad entre 52 y 72%; y diámetros de poro de 500 µm (Wosek, 2015). En este trabajo se ha conseguido obtener pastillas con un máximo de porosidad de 57 % con un tamaño de poro de 100 µm mediante el proceso de lixiviación de sales. Si bien, el porcentaje de porosidad obtenido se encuentra dentro del porcentaje esperado, se observa una evidente diferencia en el tamaño de poro posiblemente atribuido al pequeño volumen de agua utilizado en la lixiviación a diferencia del trabajo de Wosek.

El tamaño de poro promedio obtenido en los andamios porosos a diferentes temperaturas es adecuado para aplicaciones en regeneración ósea debido a que el tamaño promedio sobrepasa los 10 µm, lo que permite una adecuada fibrovascularización y penetración ósea. Según lo reportado en la literatura, el tamaño de poro es importante para la integración del implante con el tejido. Un estudio reveló que los poros menores de 10 µm evitan el ingreso de células, mientras que poros entre 10 y 50 µm permiten la penetración del tejido fibrovascular, los poros entre 50 y 150 µm permiten la penetración ósea y los poros mayores de 150 µm permiten la

penetración y la formación ósea. Además, se ha encontrado que la penetración de tejido óseo sólo es posible si los poros se encuentran interconectados (González et al., 2008).

Los andamios A con un tratamiento térmico a 1093 °C obtuvieron los mejores resultados porque presentaron un porcentaje de porosidad de 52% con un tamaño de poro promedio de 100µm. Los andamios A serían ideales para aplicación de reemplazo de hueso trabecular ya que los valores de porosidad presentes en el hueso trabecular varían entre el 30 y 90% con una porosidad interconectada entre el 50 y 90 % (Gonzalez et al., 2014).

Conclusiones

En este trabajo se estandarizó una metodología para la fabricación de andamios porosos de hidroxiapatita y fluorapatita para aplicaciones de regeneración de tejido óseo. La obtención de la hidroxiapatita y fluorapatita por método de precipitación vía húmeda fue un procedimiento muy conveniente por su costo de reactivos (0.8 pesos/gr), rendimiento (82% y 74%) y simplicidad.

La sal más adecuada para la fabricación de andamios porosos de hidroxiapatita y fluorapatita mediante el método de lixiviación de partículas fue el Biftalato de potasio por presentar el mayor porcentaje de porosidad, diámetro de poro promedio y facilidad de manipulación que las otras sales evaluadas. Para los andamios de hidroxiapatita, el tratamiento térmico de 1093 °C por 2 horas y con un volumen de lixiviación con 10 ml de agua destilada fue el que dio mejores resultado: 52% de porosidad y 100µm en promedio del diámetro de poro. En cambio para los andamios de fluorapatita, los mejores resultados dieron la fluorapatita sinterizada a 1050 °C y un tratamiento térmico de 1093°C por 24 horas sin lixiviación (51% de porosidad 51 µm en promedio del diámetro de poro).

Todos los andamios de hidroxiapatita y fluorapatita obtuvieron arriba de 30 % de porosidad por lo que serían ideales para aplicaciones de reemplazo de hueso trabecular. Sin embargo, futuras pruebas de citocompatibilidad, bioactividad *in vitro*, caracterización mecánica son necesarias para evaluar diferentes formulaciones con grafeno y otros biopolímeros que permitan mejorar las propiedades mecánicas y la osteoconductibilidad de los andamios.

Bibliografía

1. *Odontocat*. (20 de Agosto de 2001). Recuperado el 24 de Enero de 2016, de Especialidades. Patología dentaria: <http://www.odontocat.com/carfluca.htm>
2. Hoja de Datos de Seguridad de Materiales. Sulfato de Zinc. (31 de Julio de 2013). Lima, Perú.
3. Aguiar, H., Serra, J., & González, P. (2012). Vidrios y vitrocerámicos bioactivos. Nuevos retos hacia la medicina regenerativa. *Netbiblo*, 1-12.
4. Albarova, J. G., Garrido, R., & Albarova, R. G. (2001). Estado actual de los injertos óseos. Biología, función, conservación, riesgo de transmisión de enfermedades, inmunogenicidad e incorporación. *Revista Española de Cirugía Osteoarticular*, 23-32.
5. Andersson, H., Hjærtstam, J., Stading, M., von Corswant, C., & Larsson, A. (2013). Effects of molecular weight on permeability and microstructure of mixed ethyl-hydroxypropyl-cellulose films. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* , 240-248.
6. Arana, M. (2011). Fichas de sustancias químicas. Hidroxido de Sodio.
7. Artinaid. (s.f.). *La lixiviación*. Recuperado el 1 de Marzo de 2016, de Artinaid: <http://www.artinaid.com/2013/04/la-lixiviacion>
8. Baxter Healthcare Corporation. (2016). *Actifuse Bone Graft Substitute*. Recuperado el 1 de Febrero de 2016, de Actifuse Advange: <http://www.actifusebonegraft.com/us/index.html>
9. Beran, J. A. (2010). *Laboratory Manual for Principles of General Chemistry*. John Wiley & Sons.
10. Berkeley Advanced Biomaterials Inc. (2014). *Bi-Ostetic™*. Recuperado el 1 de Febrero de 2016, de Bi-Ostetic: <http://www.ostetic.com/products/bi-ostetic.html>
11. Bio-Medicine. (2012). *Conduit TCP Granules Bones Graft*. Recuperado el 1 de Febrero de 2016, de Bio-Medicine : <http://www.bio-medicine.org/medicine-products/Conduit-TCP-Granules-Bone-Graft-4258-1/>

12. Biomet Inc. (2016). *Pro Osteon® 200R*. Recuperado el 1 de Febrero de 2016, de BIOMET: <http://www.biomet.com/wps/portal/internet/Biomet/Healthcare-Professionals/products/spine/osteobiologics/proosteon>.
13. Calvo, R., Figueroa, D., Díaz-Ledezma, C., Vaisman, A., & Figueroa, F. (2011). Aloinjertos óseos y la función del banco de huesos. *Revista médica de Chile*, 660-666.
14. Castillo, F., Suso, S., & Fernández de Retana, P. (2003). Evaluación del potencial osteogénico de los polímeros bioabsorbibles derivados del ácido láctico utilizados como sustitutivos óseos. *Revista Ortopédica Traumatológica*, 428-433.
15. Chan, E. (2014). Sustitutos de tejido óseo. *Orthotips*, 208-217.
16. Chen, G., Ushida, T., & Tateishi, T. (2002). *Scaffold Design for Tissue Engineering*. WILEY-VCH.
17. CIMAV. (s.f.). *CIMAV S. C.* Recuperado el 12 de Diciembre de 2015, de Centro de Investigación en Materiales Avanzados Web side: <http://mty.cimav.edu.mx/sem/>
18. Clínica Universidad de Navarra. (2015). *Isoinjerto*. Recuperado el 11 de Febrero de 2016, de Ddicionario Médico: <http://www.cun.es/diccionario-medico/terminos/isoinjerto>
19. Cosmos. (s.f.). *Información Técnica y Comercial del Permanganato de Potasio*. Recuperado el 26 de Febrero de 2016, de Cosmos Online: <http://www.cosmos.com.mx/wiki/bd1g/permanganato-de-potasio>
20. CRT Scientific. (s.f.). Hoja de Datos de Seguridad Cloruro de Calcio Anhidro. Monterrey, México.
21. Cruz, I., Cisneros, F., Salazar, R., & Tejeida, A. (2002). Costos institucionales y dificultades en la atención de los pacientes con fracturas por osteoporosis. *Acta Ortopédica Mexicana*.
22. CTR Scientific. (s.f.). Hoja de Datos de Seguridad Cloruro de Potasio. Monterrey, México.
23. CTR Scientific. (s.f.). Hoja de Datos de Seguridad. Hidroxido de sodio. Monterrey, México.

24. Dawidowski, L., Gómez, D., Miyagusuku, M., Polla, G., & Villegas, M. (28 de Mayo de 1996). *Identificación de fuentes de emisión por microscopía electrónica y difracción por rayos x*. Recuperado el 1 de Marzo de 2016, de Centro Atómico Constituyentes: <http://www.bvsde.paho.org/bvsacd/aidis>
25. Dentaïd Expertise. (23 de Enero de 2016). *Toda una revolución en la prevención de la caries*. Recuperado el 06 de Abril de 2016, de DENTAID: <http://www.dentaïdexpertise.com/es/toda-una-revolucion-en-la-prevencion-de-la-caries/374>
26. Di Stefano, D. A., & Cazzaniga, A. (2013). Técnicas de Regeneración y Reconstrucción en Cirugía Implantar. *Amolca*.
27. Diaz, E., & Martinez, D. (2007). *Obtención de hidroxiapatita utilizando el método de sinterización*. Santander: Universidad Industrial de Santander.
28. ETK. (2016). *Macrobone*. Recuperado el 1 de Febrero de 2016, de ETK: <http://www.etk.dental/es/productos/macrobone-biomaterial/>
29. Favela Pro. (s.f.). *Biftalato de Potasio*. Recuperado el 12 de Diciembre de 2015, de Academia: http://www.academia.edu/14651017/BIFTALATO_DE_POTASIO
30. Favela Pro. (s.f.). Nitrato de Potasio. Sinaloa, México.
31. Fertisquiza. (s.f.). *Sulfato de Zinc Soluble*. Recuperado el 26 de Febrero de 2016, de Fertisquiza: http://www.isquiza.com/es/fichas_agro/SULFATO%20DE%20ZINC%20SOLUBLE.pdf
32. Fleet, M. (2014). *Carbonated Hydroxyapatite: Materials, Synthesis, and Applications*. . CRC Press.
33. Gartner, L. (2015). *Histología*. Recuperado el 20 de Enero de 2016, de Issuu: http://issuu.com/drivercom/docs/gartner__leslie_p._-_texto_atlas_de_5917b571c83c09
34. Garzón, D. A., Roa, M. A., & Cortés, C. J. (s.f.). Análisis por elementos finitos del proceso de regeneración osea. *Universidad Nacional de Colombia*.

35. Garzón, D., Roa, M., & Córtes, C. (2003). Análisis por elementos finitos del proceso de regeneración ósea. . En D. Garzón, M. Roa, & C. Córtes, *Bases fisiológicas y anatómicas del tejido óseo* (págs. 1-20). Bogotá: Universidad Nacional de Colombia.
36. Ghasemian, E., Vatanara, A., Najafabadi, A. R., Rouini, M. R., Gilani, K., & Darabi, M. (2013). Preparation, characterization and optimization of sildenafil citrate loaded PLGA nanoparticles by statistical factorial design. *DARU Journal of Pharmaceutical Sciences*.
37. Giamberardino, E., Merciadri, M., Sakugawa, F., & Viotti, M. (s.f.). *Materiales de injerto para tratamiento de defectos óseos periodontales. Fundamentos clínicos y biológicos*. Recuperado el 11 de Febrero de 2016, de Fundación Juan José Carraro: <http://www.fundacioncarraro.org/revista-2004-n19-art7.php>.
38. González, J., Escobar, D. M., & Ossa, C. P. (2008). Producción y caracterización de cuerpos porosos de hidroxiapatita sintética. *Rev Fac Ing.*, 59-66.
39. Gonzalez, J., Escobar, D. M., & Ossa, C. P. (2014). Métodos de fabricación de cuerpos porosos de hidroxiapatita, revisión del estado del arte. *Scielo*, 55-70.
40. Gordon, M. (27 de Abril de 1997). *Virginia Tech Materials Science and Engineering*. Recuperado el 29 de Enero de 2016, de Ceramic Materials and Fracture Design: http://www.eng.vt.edu/eng/materials/classes/MSE2094_NoteBook/97ClassProj/exper/gordon/www/gordon.html
41. Goto, T., Kojima, T., Iijima, T., Yokokura, S., Kawano, H., Yamamoto, A., y otros. (2001). Resorption of synthetic porous hydroxyapatite and replacement by newly formed bone. *Orthopaedic Science*, 444-447.
42. Grupo Transmerquim. (Agosto de 2014). Hoja de Datos de Seguridad. Permanganato de Potasio.
43. Guevara, D. (30 de Junio de 2015). *Tesis Doctoral* . Recuperado el 21 de Octubre de 2015, de Docslide: <http://myslide.es/documents/sustitutivos-oseos-tesis-doctoral.html>
44. Hing, K. A., Annaz, B., Saeed, S., Revell, P. A., & Buckland, T. (2005). Microporosity enhances bioactivity of synthetic bone graft substitutes. . *Journal of Materials science: Materials in Medicine*, 467-475.

45. Hutmacher, D. W. (2000). Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage. *Biomaterials*.
46. Infante-Cossío, P., Gutiérrez-Pérez, J. L., Torres-Lagares, D., García-Perla, A., & González-Padilla, J. D. (2007). Relleno de cavidades óseas en cirugía maxilofacial con materiales autólogos. *Revista Española de Cirugía Oral y Maxilofacia*, 7-19.
47. Integra LifeSciences Corporation. (2008). *OsSatura TCP*. Recuperado el 1 de Febrero de 2016, de Osotis: http://www.lindaremedical.co.uk/f/resources/1345471280OSsatura%20TCP_EN_slsh.pdf
48. Jaramillo, C. D., Rivera, J. A., Echavarría, A., O'byrne, J., Congote, D., & Restrepo, L. F. (2009). Comparación de las propiedades de osteoconducción y osteointegración de una hidroxiapatita reabsorbible comercial con una hidroxiapatita reabsorbible sintetizada. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*, 117-130.
49. Layfield, L. (2002). *Cytopathology of bone and soft tissue tumors*. Salt Lake City: Oxford University Press.
50. Londoño, M. E., Echavarría, A., & De la Calle, F. (2006). Características Cristaloquímicas De La Hidroxiapatita Sintética Tratada A Diferentes Temperaturas. *Revista EIA*, 109-118.
51. Ma, P., Zhang, R., Xiao, G., & Franceschi, R. (2000). Engineering new bone tissue in vitro on highly porous poly(a-hydroxyl acids)/hydroxyapatite composite scaffolds. *Science Direct*.
52. Marcus, R., Feldman, D., Dempster, D., Luckey, M., & Cauley, J. (2013). *Osteoporosis*. Academic Press.
53. Marín, N., Escobar, D. M., Ossa, C. P., & Echavarría, A. (2008). *Síntesis y caracterización de hidroxiapatita microporosa, comparación con un producto comercial*. . Recuperado el 04 de 04 de 2016, de Revista Facultad de Ingeniería Universidad de Antioquia: http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_artt
54. Merck Chemical and Life Science. (02 de Junio de 2014). Ficha de datos de seguridad Calcio cloruro anhidro. Darmstadt, Hesse, Alemania.

55. Navarro, M. (2005). Desarrollo y caracterización de materiales biodegradables para regeneración ósea . *Universidad Politecnica de Catalunya*.
56. Ozols, A. (s.f.). *Injertos óseos sintéticos*. Buenos Aires: Universidad de Buenos Aires.
57. Pandian, M. S. (Marzo de 2014). *X-ray Diffraction Analysis: Principle, Instrument and Applications*. Recuperado el 5 de Abril de 2016, de ResearchGate: https://www.researchgate.net/publication/260659249_Xray_Diffraction_Analysis_Principle_Instrument_and_Applications
58. Pasos, F. (2010). *Departamento de Biología Celular y Tisular*. Recuperado el 6 de Abril de 2016, de Tejido óseo: http://histologiaunam.mx/descargas/ensenanza/portal_recursos_linea/apuntes/tejido_oseo_2010.pdf
59. Pontificia Universidad Javeriana . (s.f.). Ficha ded Datos de Seguridad Cloruro de Potasio. Colombia.
60. Puska, M., Aho, A. J., & Vallittu, P. (2011). Polymer Composites for Bone Reconstruction. *INTECH Open Access Publisher*, 55-73.
61. Ratner, B. D., Hoffman, A. S., Schoen, F. J., & Lemons, J. E. (2004). *Biomaterials Science: An Introduction to Materials in Medicine*. New York: Eds.Elsevier Academic Pres.
62. Rincón, M., Rodríguez, A., Londoño, M. E., & Echavarría, A. (2007). Fabricación y caracterización de una matriz tridimensional de hidroxapatita macroporosa para aplicación en ingeniería de tejidos óseos. *Rev EIA*, 87-95.
63. Rosell, W., Dovale, C., & Álvarez, I. (2001). *Morfología humana I. Generalidades y sistemas somáticos*. Ciudad de la Habana: Editorial Ciencias Médicas.
64. Santa Cruz Biotechnology, Inc. (17 de Junio de 2015). *Calcium chloride anhydrous (CAS 10043-52-4)*. Recuperado el 25 de Febrero de 2016, de Santa Cruz Biotechnolog: <http://www.scbt.com/es/datasheet-207392.html>
65. Santos, C., Rubino, R., Rivas, R., & Fleites, E. (2011). Uso del hueso bovino en la fusión cervical sin instrumentación. *Scielo*.

66. Sanzana, E. (2004). *Estudio comparativo de la utilidad de los cementos y vidrios basados en fosfatos de calcio como sustitutivos óseos en defectos cavitarios experimentales*. Barcelona: Universitat de Barcelona. Departament de Cirurgia i Especialitat.
67. Sequeda, L., Díaz, J., Gutiérrez, S., Perdomo, S., & Gómez, O. (2012). Obtención de hidroxiapatita sintética por tres métodos diferentes y su caracterización para ser utilizada como sustituto óseo. *Revista Colombiana de Ciencias Químico Farmacéuticas*, 50-60.
68. Serra, I., Fradique, R., Vallejo, M., Correia, T., Correia, S., & Miguel, I. (2015). Production and characterization of chitosan/gelatin/ β -TCP scaffolds for improved bone tissue regeneration. *Science Direct*.
69. Sopyan, I., & Kaur, J. (2009). Preparation and characterization of porous hydroxyapatite through polymeric sponge method. *Ceram Int.* , 3161-8.
70. Tortolini, P., & Rubio, S. (2012). Diferentes alternativas de rellenos óseos. *Avances en periodoncia e implantología oral*, 133-138.
71. Tripathi, G., & Basu, B. (2012). A porous hydroxyapatite scaffold for bone tissue engineering: Physico-mechanical and biological evaluations. *Ceram Int.*, 341-9.
72. Vanegas, J. C., Landinez, N. S., & Garzón-Alvarado, D. A. (2009). Generalidades de la interfase hueso-implante dental. *Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas*, 130-146.
73. Vega, E., Verde, R., & Pérez, M. (2003). *La teoría y la práctica en el laboratorio de Química Analítica*. México, D.F.: Universidad Autónoma Metropolitana.
74. Velasco, M., & Garzón, D. (2010). Implantes Scaffolds para regeneración ósea. Materiales, técnicas y modelado mediante sistemas de reacción-difusión. *Scielo*.
75. Wang, A.-J., Lu, Y.-P., Zhu, R.-F., Li, S.-T., Xiao, G.-Y., Zhao, G.-F., y otros. (2008). Effect of sintering on porosity, phase, and surface morphology of spray dried hydroxyapatite microspheres. *J. Biomed. Mater. Res.*, 557–562.
76. Weatherford. (Febrero de 2010). *Hidróxido de Potasio. Alkali de base fuerte prototípica*. Recuperado el 26 de Febrero de 2016, de Weatherford: <http://www.weatherford.com/doc/wft219600>

77. Wei, M., Evans, J. H., Bostrom, T., & Grøndahl, L. (2003). Synthesis and characterization of hydroxyapatite, fluoride-substituted hydroxyapatite and fluorapatite. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 311-320.
78. Weiss, P., Layrolle, P., Clergeau, L. P., Enckel, B., Pilet, P., Amouriq, Y., y otros. (2007). The safety and efficacy of an injectable bone substitute in dental sockets demonstrated in a human clinical trial. *Science Direct*, 3295-3305.
79. Wosek, J. (2015). Fabrication of composite polyurethane/hydroxyapatite scaffolds using solvent-casting salt leaching technique. *De Gruyter Ope*, 14-20.
80. Xian, W. (2010). A laboratory Course in Biomaterials . *CRC Press*.
81. Yang, K., Zhang, J., M. X., Ma, j., Kan, C., Ma, H., y otros. (2015). β -Tricalcium phosphate/poly(glycerol sebacate) scaffolds with robust mechanical property for bone tissue engineering. *Science Direct*.
82. Zárate-Kalfópulos, B., & Alejandro-Sánchez, R. (2006). Injertos óseos en cirugía ortopédica. *Cir Ciruj*, 217-222.
83. Zayed, G. (28 de Febrero de 2014). *Fracturas abiertas*. Recuperado el 8 de Febrero de 2016, de Tratado de Enfermería en Cuidados Críticos: <http://www.aibarra.org/Guias/1-10.htm>
84. Zhao, J., Duan, K., Zhang, J. W., Guo, L. Y., & Weng, J. (2011). Preparation of highly interconnected porous hydroxyapatite scaffolds by chitin gel-casting. *Mater Sci Eng C.*, 697-701.

Anexos

Anexo 1.

Tabla de costo aproximado del estudio de investigación según tipo de reactivos empleados

Reactivo	Número de catálogo VWR internacional	Cantidad de venta	Precio de venta Dólares	Cantidad utilizada	Costo del proyecto
Ácido ortofosfórico	10852-378	1000 ml	21.23	20 ml	0.42
Hidróxido de calcio	89399-874	1000 gr	65.77	38 gr	2.50
Fluoruro de amonio	AAAA16279-22	100 gr	26.10	2 gr	0.52
Biftalato de potasio	AA33351-A1	1000 gr	112.66	10.4 gr	1.17
Cloruro de calcio anhidro	97062-586	1000 gr	94.34	10.4 gr	0.981
Cloruro de potasio	97061-562	1000 gr	46.15	52 gr	2.40
Hidróxido de potasio	97064-988	1000 gr	38.25	10.4 gr	0.40
Ácido nítrico concentrado	EM1.09964.0001	1000 ml	86.54	50 ml	4.32
Ácido clorhídrico concentrado	AA88563-LQ	1000 ml	25.94	1ml	0.026
Agua destilada	10218-886	1000 ml	15.21	876 ml	7.35
Agua desionizada	470300-966	3785 ml	10.35	45 ml	0.12
Solución estándar	RCAK1KN-100	100 ml	32.18	1 ml	0.32

Total en dólares	20.54
Total en pesos	354.77

Anexo 2.

Tabla de costo aproximado del estudio de investigación según tipo de análisis empleados

	Costo	Cantidad	Precio
Difractómetro de rayos X Bruker D8 Advance	2668	1	2668
Espectrofotometría de absorción atómica	2105.4	1	2105
Microscopio electrónico de barrido	580 x 1 290 x 2+	41	12470
		Total	17 243

Anexo 3

Tabla de costo aproximado para la síntesis de hidroxiapatita y fluorapatita según tipo de reactivos en el estudio de investigación

	Cantidad de venta	Precio de venta dólares	Cantidad utilizada	Costo del proyecto
Ácido ortofosfórico	1000 ml	21.23	20 ml	0.42
Hidróxido de calcio	1000 gr	65.77	38 gr	2.5
Fluoruro de amonio	100 gr	26.10	2 gr	0.52
Agua destilada	1000 ml	15.21	393 ml	5.98

Total para producir solo 20.60 gr HA y 18.52 gr FA	9.42
Total en pesos	162.34

Anexo 4

Tabla de costo aproximado del estudio de investigación según tipo de reactivos empleados para 100 pastillas de HA y FA de 0.5 g

	Cantidad de venta	Precio de venta dólares	Cantidad utilizada	Costo del proyecto
Ácido ortofosfórico	1000 ml	21.23	20 ml	0.42
Hidróxido de calcio	1000 gr	65.77	38 gr	2.50
Fluoruro de amonio	100 gr	26.10	2 gr	0.52
Cloruro de potasio	1000 g	46.15	73 gr	3.37
Agua destilada	1000 ml	15.21	2393 ml	36.4
			Total para 100 pastillas de HA y 100 de FA de 0.5 gr cada una	43.21
			Total en pesos	744.65

Anexo 5

Costo horas – hombre (pesos) del proyecto

$$\frac{(10000 \text{ pesos})(6)}{(100 \text{ días})(8 \text{ horas})} = 75 \text{ costo horas} - \text{ hombre}$$

Costo de reactivos/ elemento del proyecto

$$\frac{354.77}{41} = 8.65 \text{ Pesos/elemento (0.5g)}$$

$$\frac{354.77}{20.05} = 17.69 \text{ pesos / gr}$$

Costo de reactivos/ elemento del proyecto sin pérdidas

$$\frac{744.65}{2 \times 50} = 7.44 \text{ pesos/gr}$$

Costo de reactivos y equipos/ elemento del proyecto

$$\frac{17243}{41} = 429.21 \text{ Pesos/elemento (0.5g)}$$

$$\frac{17243}{20.05} = 860/\text{gr}$$