

# MATRIZ TRIDIMENSIONAL CON POTENCIAL PARA REGENERACIÓN ÓSEA

**JULIANA ANDREA RIAÑO VÉLEZ**



**ESCUELA DE INGENIERÍA DE ANTIOQUIA  
UNIVERSIDAD CES  
INGENIERÍA BIOMÉDICA  
ENVIGADO  
2012-2**

# MATRIZ TRIDIMENSIONAL CON POTENCIAL PARA REGENERACIÓN ÓSEA

**JULIANA ANDREA RIAÑO VÉLEZ**

**Trabajo de grado para optar al título de Ingeniera Biomédica**

**Claudia Elena Echeverri Cuartas**  
**Ingeniera biomédica. Máster en química aplicada y materiales**  
**poliméricos**



**ESCUELA DE INGENIERÍA DE ANTIOQUIA**  
**UNIVERSIDAD CES**  
**INGENIERÍA BIOMÉDICA**  
**ENVIGADO**  
**2012-2**

## **AGRADECIMIENTOS**

Quiero agradecer a todas las personas que participaron en el desarrollo de este trabajo porque sus aportes permitieron alcanzar los objetivos propuestos. En especial, quiero agradecer a mi familia por su apoyo constante e incondicional, por acompañarme y comprenderme en todo el transcurso de mi carrera y de este proyecto.

También quiero agradecer a la directora de este trabajo Claudia Elena Echeverri y al profesor Yesid Montoya por su acompañamiento y disponibilidad, además, del aporte de sus conocimientos que permitieron orientar el trabajo de forma adecuada.

De igual manera, agradezco al Instituto Colombiano de Medicina Tropical del CES Sabaneta por permitirme el uso de algunos de sus equipos, al Laboratorio de Biomateriales por brindar las herramientas y los materiales necesarios, y a Darling Perea de la SIU de la Universidad de Antioquia por su disponibilidad y por prestar los servicios de microscopía electrónica de barrido que fue una parte vital del trabajo.

# CONTENIDO

INTRODUCCIÓN.....	10
1. PRELIMINARES .....	11
1.1. Problema .....	11
1.1.1. Contexto y caracterización del problema .....	11
1.1.2. Formulación del problema.....	12
1.2. Antecedentes.....	12
1.3. Justificación .....	13
1.4. Objetivos del proyecto .....	14
1.4.1. Objetivo General.....	14
1.4.2. Objetivos Específicos .....	14
2. MARCO DE REFERENCIA .....	15
2.1. Polímeros sintéticos biodegradables.....	15
2.1.1. Poliésteres.....	16
2.1.2. Poli- $\alpha$ -hidroxi ésteres.....	16
2.1.3. Ácido Láctico .....	18
2.1.4. Ácido poliláctico (PLA) .....	19
Propiedades físicas.....	19
Propiedades mecánicas .....	20
Degradación .....	21
2.2. Requerimientos de las matrices poliméricas.....	23
2.2.1. Biocompatibilidad .....	24
2.2.2. Biodegradabilidad .....	24
2.2.3. Propiedades mecánicas .....	26
2.2.4. Estructura de la matriz.....	26
2.2.5. Tecnología de manufactura .....	29
2.3. Ingeniería de tejidos .....	30
2.3.1. Ingeniería del tejido óseo .....	31
Generalidades del tejido óseo .....	32
Mecánica del hueso .....	34
3. METODOLOGÍA .....	37
4. DESARROLLO DEL PROYECTO.....	39
4.1. Definición de requerimientos.....	39
4.2. Definición de alternativa de solución.....	39

4.3.	Diseño de experimentos.....	40
4.4.	Obtención de cristales de sal y Análisis ANOVA .....	41
4.4.1.	Obtención cristales de sal .....	41
4.4.2.	Análisis de datos (ANOVA).....	41
4.5.	Obtención de las matrices poliméricas de PLA. ....	42
4.6.	Caracterización de las matrices.....	42
4.6.1.	Caracterización mecánica .....	42
4.6.2.	Caracterización morfológica .....	43
	Microscopia óptica.....	43
	Microscopia SEM .....	43
	ATR-FTIR: Espectroscopia infrarroja por transformada rápida de Fourier .....	44
	Hinchamiento.....	44
	Pérdida de peso (degradación).....	45
	Porosidad .....	45
5.	DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....	46
5.1.	Obtención de cristales de sal y Análisis ANOVA.....	46
5.1.1.	Obtención de cristales .....	46
5.1.2.	Análisis de datos .....	47
5.2.	Obtención de las matrices poliméricas de PLLA.....	49
5.3.	Caracterización de las matrices.....	50
5.3.1.	Caracterización mecánica .....	50
5.3.2.	Caracterización morfológica .....	51
	Microscopia óptica.....	51
	Microscopia SEM .....	54
	ATR-FTIR: Espectroscopia infrarroja por transformada rápida de Fourier .....	58
	Hinchamiento.....	60
	Porosidad .....	62
	Pérdida de peso .....	63
6.	CONCLUSIONES Y CONSIDERACIONES FINALES.....	65
	BIBLIOGRAFÍA.....	67
	ANEXOS.....	71

## LISTA DE TABLAS

Tabla 1 Propiedades de los polímeros de ácido láctico (Lasprilla et al., 2012) .....	20
Tabla 2 Propiedades mecánicas PLLA .....	21
Tabla 3 Paralelo propiedades mecánicas del hueso cortical y trabecular .....	35
Tabla 4 Comparación de métodos asociados a factores de selección.....	39
Tabla 5 Tratamientos .....	40
Tabla 6 Tamaño de grano bicarbonato de amonio (1: sin tamiz, 2: con tamiz) .....	47
Tabla 7 Prueba de Kruskal-Wallis para Tamaño de poro.....	48
Tabla 8 Prueba de múltiples rangos para tamaño de poro .....	48
Tabla 9 Muestras pruebas de compresión (sal macerada   concentración 5:1) .....	50
Tabla 10 Resultados porosidad.....	63
Tabla 11 Resultados pérdida de peso (sal sin macerar   concentración 10:1).....	63
Tabla 12 pH soluciones pruebas de hinchamiento .....	64

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Grupo funcional éster .....	16
Figura 2 Estructura química de los polímeros biodegradables (Atala et al., 2011) .....	17
Figura 3 Molécula de ácido láctico (Henton, Gruber, Lunt, & Randall, 2005) .....	18
Figura 4 Enfoque celular de ingeniería de tejidos (Drosse et al., 2008) .....	30
Figura 5 Hueso cortical/hueso esponjoso (Seal et al., 2001).....	34
Figura 6 Paso a paso del gas foaming/salt leaching method (Chung & Park, 2007).....	40
Figura 7 Diagrama de bloques procedimiento de obtención de matrices PLLA.....	42
Figura 8 Muestras hinchamiento .....	44
Figura 9 Microscopia óptica, Sal tamizada (106-250 $\mu\text{m}$ ).....	46
Figura 10 Microscopia óptica, Sal sin tamizar.....	46
Figura 11 Análisis de normalidad.....	47
Figura 12 Dispersión por código de nivel.....	48
Figura 13 Caja y bigotes .....	49
Figura 14 Grafico de medianas .....	49
Figura 15 Muestras tratamiento 4-6 (1) 20% PLLA macerada (2) 40% PLLA macerada (3) 80% PLLA macerada (4) 20% PLLA-HA .....	49
Figura 16 20% PLLA tamizada .....	51
Figura 17 40% PLLA tamizado .....	52
Figura 18 80% PLLA tamizado .....	52
Figura 19 Matrices con capa polimérica superficial .....	53
Figura 20 Muestra-tratamiento 7 .....	54
Figura 21 SEM matrices PLLA sin tamizar .....	55
Figura 22 SEM tratamientos 4-6 .....	56
Figura 23 Topografía de la superficie.....	56
Figura 24 Capa polimérica no deseada .....	57
Figura 25 SEM PLLA-HA.....	57
Figura 26 EDS PLLA-HA.....	58
Figura 27 FTIR PLLA .....	58
Figura 28 FTIR bicarbonato de amonio .....	59
Figura 29 FTIR matrices PLLA .....	60
Figura 30 Muestras hinchamiento PLLA (sal sin macerar   concentración 10:1) .....	61
Figura 31 Porcentaje de hinchamiento en el tiempo .....	61
Figura 32 Muestras hinchamiento (55 días) .....	64

## RESUMEN

Las matrices poliméricas han recibido gran atención en los últimos años, ya que proporcionan un entorno temporal para el crecimiento y la interacción celular, además de la formación de la matriz extracelular, dando soporte a la formación de un nuevo tejido al actuar como un material prostético para regenerar tejido *in vivo* o como sustrato adhesivo celular para formar tejidos *in vitro*. El siguiente trabajo presenta la obtención de matrices tridimensionales de PLLA (ácido poliláctico) por medio del método *salt leaching/gas foaming* y la caracterización morfológica y mecánica de las mismas, mediante técnicas que incluyen hinchamiento, microscopia SEM, microscopia óptica y ensayos mecánicos de compresión.

En el proceso, el tamaño de poro y la porosidad se controlaron con el uso de rangos de tamaño de grano de sal específico y concentraciones variables de ácido cítrico. Los resultados establecen una relación directa entre la porosidad, el tamaño de poro, la absorción de agua y las propiedades mecánicas y muestran que las matrices obtenidas satisfacen los requerimientos básicos establecidos para este tipo de biomateriales, entre ellos: biodegradabilidad, propiedades mecánicas suficientes y una arquitectura porosa e interconectada.



## ABSTRACT

Biodegradable polymeric scaffolds for tissue engineering have received much attention in recent years since they provide a temporal and spatial environment for cellular growth and interactions besides the formation of the extracellular matrix, supporting the formation of new tissue. A pre-fabricated scaffold can either act as a supportive prosthetic material to regenerate tissue *in vivo*, or as a cell adhesive substratum to form engineered tissue *in vitro*. The following work presents the synthesis of three-dimensional PLLA (polylactic acid) scaffolds produced by a salt leaching/gas foaming method and their respective morphological and mechanical characterization by techniques such as: swelling, SEM microscopy, optical microscopy and compression assays.

In the process, the pore size and porosity were controlled by the use of specific salt grain size ranges and variable concentrations of citric acid. The results established a direct relationship between the porosity, the pore size, the water absorption and the mechanical properties, and showed that the obtained scaffolds satisfy basic requirements for this type of biomaterial including: biodegradability, sufficient mechanical properties and an interconnected porous architecture.

# INTRODUCCIÓN

Los huesos, son órganos que cumplen críticos roles en la fisiología humana, estos intervienen en la protección, movimiento y soporte de órganos vitales, además, tienen funciones específicas y de suma importancia en la producción de sangre, en el almacenamiento mineral, la homeostasis, la regulación del pH sanguíneo, almacenamiento de varios tipos de células progenitoras, entre otras actividades; la importancia de los mismos se evidencia con mayor claridad en situaciones de enfermedad como la osteogénesis imperfecta, osteoartritis, osteomielitis y osteoporosis en las que los huesos no funcionan adecuadamente, y que de manera conjunta con las heridas traumáticas, cirugía ortopédica y resección de tumores, generan o inducen defectos y carencias ósea (Porter, Ruckh, & Popat, 2009), que pese a la capacidad del hueso de regenerarse, remodelarse y repararse permanecen, haciendo necesario para el tratamiento el uso de implantes o injertos que promuevan la formación de hueso nuevo con características similares al preexistente (O'Brien, 2011)

Para dichos tratamientos se disponen de diversas estrategias basadas en la utilización de biomateriales artificiales o naturales y proteínas que aporten las señales estimuladoras que desencadenen los acontecimientos necesarios para la proliferación, diferenciación y migración celular del tejido óseo (Lee & Shin, 2007).

Sin embargo, dada la complejidad y sensibilidad biológica del cuerpo humano, los requerimientos que presentan dichas estrategias son bastante desafiantes. Se requiere la armonía de cuatro consideraciones para que un biomaterial que induzca efectos sinérgicos para la reparación del tejido con éxito biocompatibilidad, propiedades mecánicas, morfología porosa e interconectada y biodegradabilidad (Atala, Lanza, Thomson, & Nerem, 2011).

Típicamente se usan tres clases de biomateriales para la regeneración ósea: biocerámicas, polímeros naturales y polímeros sintéticos (Rezwan, Chen, Blaker, & Boccaccini, 2006); estos últimos son ampliamente utilizados pues poseen propiedades químicas y mecánicas que no poseen los polímeros naturales y poseen menor riesgo de generar una respuesta inmune o transmitir determinadas patologías (Lee & Shin, 2007), además, pueden ser producidos bajo condiciones específicas, controlando la presencia de impurezas en el material y mostrando características generales predecibles y reproducibles como el módulo elástico, la fuerza tensil y la tasa de degradación (Rezwan et al., 2006).

Dentro del grupo de polímeros sintéticos los más utilizados en forma de matriz tridimensional para regeneración ósea son los poli- $\alpha$ -hidroxi ésteres como el PGA, PLA y sus copolímeros, con los cuales se han realizado múltiples estudios de biocompatibilidad *in vivo* e *in vitro* con resultados significativamente satisfactorios (Atala et al., 2011). Por ellos, en el presente trabajo se muestra la obtención de matrices tridimensionales de PLLA con un método de *salt leaching/gas foaming* y la respectiva caracterización mecánica y morfológica de las mismas, por medio de diversas técnicas que incluyen: ensayos por compresión, hinchamiento, microscopía óptica y SEM, reconstrucción tridimensional, entre otras.

## 1. PRELIMINARES

### 1.1. Problema

#### 1.1.1. Contexto y caracterización del problema

Pese a la capacidad innata de regeneración del hueso, muchos traumas óseos debidos a fracturas, debilitamiento, desgaste, enfermedades degenerativas, tumores e infecciones, resultan en carencias óseas significativas, que comprometen la calidad de vida del paciente y que representan un creciente y importante problema socio-económico en la población mundial; solamente en Latinoamérica, las patologías del sistema óseo han aumentado en un 400% desde los años 90 (Navarro, 2009); sumado a ello, de los millones de fracturas que se presentan y que se estiman serán 6 veces más incidentes en 2050 en comparación con 1990, 5-10% resultan en una sanación tardía o en una no unión del hueso (Dawson & Oreffo, 2008), aun mas, con el aumento de la esperanza de vida y por lo tanto de la población más vieja, se hace cada vez más constante la presencia de problemas de este tipo (Lee & Shin, 2007).

Por estas razones, la demanda de tratamientos implantológicos ha aumentado, sin embargo y pese a los avances biomédicos y la cantidad innumerable de implantes que se usan hoy en día para el tratamiento de carencias óseas, los procedimientos comunes para tratar traumas de este tipo son insatisfactorios y siguen estando directamente relacionados con el uso de elementos de soporte (por ejemplo: tornillos, platinas, entre otros) y prótesis de materiales artificiales (acero, titanio, colágeno, PVA) que no son biodegradables y que sólo cumplen una función de soporte, sin permitir o favorecer las complejas cascadas de procesos biológicos implicadas en la regeneración de hueso y cartílago, las cuales involucran una gran cantidad de citoquinas y factores de crecimiento que controlan señales en el sitio de la herida permitiendo a las células inflamatorias y progenitoras migrar y desencadenar la regeneración ósea (Lee & Shin, 2007).

Otros tratamientos típicos como el uso de autoinjertos (procedente del receptor), que representa el procedimiento más aceptado debido a su inmunocompatibilidad, tiene varias limitaciones como la necesidad de una segunda intervención, la morbilidad y la cantidad restringida de tejido; por otra parte, tratamientos opcionales como los aloinjertos (procedente de la misma especie) y xenoinjertos (procedente de otra especie) presentan problemas inherentes de transmisión de patógenos, respuesta inmunológica y mayor riesgo de infección (Lee & Shin, 2007).

Conjuntamente con las limitaciones de las opciones mencionadas, es importante considerar la presencia de problemas posteriores a la primera intervención en algunos de los pacientes que poseen prótesis o implantes, pues estos elementos desgastan zonas de hueso adyacente cuando no son posicionados correctamente o se encuentran en zonas articuladas, haciendo necesario una intervención para adaptar una prótesis de mayor tamaño que rellene el espacio y cure los daños que la anterior causó; además, las personas en proceso de crecimiento que requieran estos elementos deben someterse a varias cirugías

para adecuar una prótesis acorde a los constantes cambios que el esqueleto del paciente sufre (Navarro, 2009).

### **1.1.2. Formulación del problema**

Cuando los hueso permanecen sin estímulo por mucho tiempo o el daño es grave e implica grandes defectos y carencias, la curación y regeneración del mismo representa un desafío terapéutico. Los tratamientos disponibles en el mercado para este tipo de problemas, diferentes tipos de injertos y materiales de soporte, traen consigo grandes limitaciones y complicaciones, pues no promueven el crecimiento de soporte óseo natural, pueden implicar problemas de morbilidad e inmunocompatibilidad y en ocasiones requieren segundas intervenciones; por lo que hay un creciente interés y necesidad de diseñar implantes con materiales que contrario a lo mencionado, sean biocompatibles y biodegradables, es decir, que promuevan la proliferación y diferenciación celular, evitando problemas de rechazo y desgaste, y que sean funcionales solo durante el tiempo necesario para eventualmente degradarse y ser reabsorbido o excretado evadiendo intervenciones suplementarias y creando en su lugar una estructura que imite las propiedades mecánicas y morfológicas propias del tejido óseo.

## **1.2. Antecedentes**

En las últimas décadas se ha prestado gran y particular atención al uso de materiales poliméricos como biomateriales para la regeneración de tejidos, debido a su fácil manejo, buena biocompatibilidad e interesantes propiedades mecánicas; algunos de estos polímeros son biodegradables y activos en los procesos del hueso, permitiendo regeneración ósea sin la necesidad de segundas intervenciones (Bertoldi, Zaffe, & Consolo, 2008). La familia de polímeros de ácido poliláctico, ácido glicólico y sus copolímeros son los más populares, estos han sido estudiados por más de 40 años; se reporta que cerca de 1960, Kulkarni y sus colegas describieron el uso de PLA (ácido poliláctico) como pernos y sutura biodegradable para reparar fracturas de mandíbulas en perros (Athanasίου, Agrawal, Barber, & Burkhart, 1998).

Históricamente se evidencia el amplio uso de PLA, PGA y PLGA en aplicaciones para cirugía ortopédica, estos han sido empleados para la elaboración de pernos de fijación y tornillos biodegradables como: tornillos y suturas de anclaje de L-PLA, anclas de tejido blando de PGA-TMC, tornillos de interferencia de L-PLA para la reconstrucción de ligamento cruzado anterior o suturas de anclaje de (DL-PLA)-PGA para la inserción de ligamento en el hombro (Athanasίου et al., 1998); no obstante, no fue hasta 1993 que Langer et. al utilizaron de manera pionera esta familia de polímeros en forma de matrices porosas para ingeniería de tejidos (Atala et al., 2011); por otra parte, estos poli- $\alpha$ -hidroxi ésteres han sido utilizados como vehículos sólidos o semisólidos para el suministro de factores de crecimiento, proteínas morfogenéticas y otras moléculas bioactivas, desde que Urist sugirió la función dinámica de la matriz ósea extracelular como un reservorio de moléculas señalizadores inductivos cuando demostró que una

matriz desmineralizada era capaz de inducir formación de nuevo hueso al ser trasplantado in vivo (Dawson & Oreffo, 2008).

Hasta hoy, el ácido glicólico y láctico son los poliésteres más ampliamente utilizados para implantes biodegradables por su superior biodegradabilidad, controlables tasas de degradación y extensiva historia de aprobación por parte de la FDA (Food and Drugs Administration) y el EMA (European Medicine Agency) en varios dispositivos de liberación controlada de medicamentos y especialmente en tornillos disponibles en el mercado para el tratamiento en humanos; estos últimos están ganando uso clínico generalizado, particularmente en los casos en donde no se requiere gran rigidez o fuerza mecánica; no obstante es importante considerar que las áreas pertinentes para este tipo de tratamientos y dispositivos solo incluyen la rodilla, el hombro, el pie y tobillo, la mano, la muñeca, la pelvis y el hueso cigomático (Athanasίου et al., 1998), aunque las aplicaciones para esta última zona son escasas en comparación con las demás; se conoce que Hooley and Golden implementaron unos dispositivos derivados de PLA para prevenir la osteítis alveolar o alveolitis seca con resultados discordantes; Meadows et al realizaron estudios clínicos sobre el tratamiento de defectos periodontales intraóseos con el uso de PLA e injertos óseos descalcificados y liofilizados, mostrando una regeneración limitada de tejido y la persistencia de partículas de PLA rodeadas de tejido blando. Por otra parte, PLGA en forma de esponjas, geles y polvos, fue estudiado en animales para su uso en el aumento del seno del maxilar, aumento y preservación de la cresta alveolar y tratamiento de defectos intraóseos profundos, obteniéndose contrastantes resultados (Bertoldi et al., 2008).

Otros estudios, como el realizado por Bertoldi et al, en donde se evalúa clínica, histológica y radiológicamente la curación de defectos óseos en la mandíbula humana al llenarlos con PLGA o PRP (plasma rico en plaquetas, por sus siglas en inglés), concluyen que el PLGA mejora la actividad del hueso después de 6 meses de cirugía, evidenciándose nuevas formaciones laminares (Bertoldi et al., 2008).

Algunos pocos estudios demuestran los efectos *in situ* de la morfología de la matriz tridimensional al evaluar el proceso de sanación en el alvéolo dental, insertando réplicas de PLGA sólidas o porosas de la raíz dental antes del tratamiento con implantes metálicos, demostrando que pese a que ambas réplicas son biodegradables y bien tolerados, el material sólido causa una descalcificación inicial del hueso que lo rodea a diferencia de la réplica porosa con la cual no se evidencian estas consecuencias (Nair & Schug, 2004).

### **1.3. Justificación**

Las matrices tridimensionales de polímeros derivados de ácido láctico, proporcionan características de biocompatibilidad y biodegradabilidad para la regeneración ósea, disminuyendo la generación de respuesta inmune y el riesgo de infección, reduciendo la necesidad de soportes y elementos de fijación permanentes y en muchos casos eliminando la necesidad de segundas intervenciones; además, pueden ser producidas bajo condiciones controladas exhibiendo características morfológicas y mecánicas predecibles y reproducibles y la ventaja de controlar las impurezas propias del material que puedan

generar alguna reacción tóxica. Sin embargo, en Colombia, el uso de estas matrices tridimensionales para la regeneración ósea está limitado al alto costo de producción e importación de las mismas, por lo que la síntesis de estas mediante metodologías sencillas y a nivel local, puede llegar a representar bajos costos y por lo tanto un incremento en el uso de este tipo de elementos que generan una mejor recuperación de la estructura ósea del paciente, es por esto que este trabajo en el que se pretende sintetizar y caracterizar una matriz derivada de PLGA y/o PLA, contribuye de manera efectiva como un potencial biomaterial para una regeneración ósea activa, ya que las condiciones morfológicas de porosidad interconectada de esta, proporcionarían la posibilidad de que las células se adhieran, migren y progresivamente proliferen y formen una estructura con los componentes y la morfología natural del hueso.

## **1.4. Objetivos del proyecto**

### **1.4.1. Objetivo General**

Caracterizar una matriz tridimensional biodegradable y biocompatible con potencial para la regeneración ósea.

### **1.4.2. Objetivos Específicos**

- Determinar el método de síntesis con el que pueda obtenerse una matriz tridimensional con características mecánicas y morfológicas similares a la estructura ósea a partir de polímeros derivados de ácido láctico (PLGA y/o PLA).
- Identificar las propiedades mecánicas de la matriz tridimensional sintetizada por medio de ensayos de compresión.
- Evaluar la interconectividad y porosidad de la matriz tridimensional sintetizada por medio de técnicas microscópicas (Microscopía óptica, AFM y SEM).

## 2. MARCO DE REFERENCIA

### 2.1. Polímeros sintéticos biodegradables

Los polímeros sintéticos biodegradables ofrecen grandes ventajas en comparación con los materiales no degradables en aplicaciones de regeneración de tejidos (Atala et al., 2011). Más explícitamente, materiales como los biopolímeros naturales que a pesar de favorecer la adhesión y la bioquímica celular, presentan algunas preocupaciones en lo que respecta a antigenicidad, inmunogenicidad, potencial transmisión de enfermedades, fuente de obtención, pobres propiedades mecánicas y falta de biodegradabilidad controlada. Otros como los biocerámicos, aunque son bioactivos favoreciendo la unión del tejido con el implante para soportar cargas de cizalla, carecen de propiedades mecánicas, elásticas y exhiben una alta fragilidad que no favorece su comportamiento después del implante (Zhou, Lawrence, & Bhaduri, 2012), además, las placas o implantes metálicos erosionan el hueso y en ocasiones requieren segundas intervenciones (Lasprilla, Martinez, Lunelli, Jardini, & Filho, 2012).

Por su parte los biopolímeros sintéticos biodegradables como todos los polímeros sintéticos, pueden ser moldeados en diferentes formas con el volumen y las propiedades de superficie deseadas, además, pueden ser sintetizados bajo condiciones controladas con características de calidad y pureza reproducibles (Atala et al., 2011), haciendo el riego de toxicidad, inmunogenicidad y de infección menor para polímeros sintéticos puros, constituidos por unidades monoméricas que tienen una estructura simple y bien definida (Rezwan et al., 2006). Algunas de las ventajas particulares de dichos materiales incluyen la habilidad de configurar sus propiedades mecánicas, físicas y químicas y controlar la cinética de degradación para cumplir con las especificaciones de diferentes aplicaciones (Atala et al., 2011).

El último aspecto, la biodegradación, se debe a la acción enzimática y degradación química asociada con organismos vivientes. Este evento ocurre en dos pasos, el primero de ellos es la fragmentación del polímero en especies de menor masa molecular ya sea mediante reacciones abióticas (oxidación, fotodegradación o hidrólisis) o bióticas (degradación por microorganismos); esto es seguido de una bioasimilación<sup>1</sup> de los fragmentos poliméricos y su mineralización. Es importante considerar que este proceso no depende solo del origen del polímero sino también de sus estructura química y las condiciones del medio en el que se encuentre (Vroman & Tighzert, 2009).

Dadas sus propiedades, las aplicaciones clínicas de los polímeros biodegradables son múltiples, entre las formas más tradicionales se encuentran suturas reabsorbibles, sistemas de liberación de medicamentos y sistemas de fijación ortopédica como: pasadores, barras y tornillos. Recientemente, estos materiales son utilizados como matrices artificiales para aplicaciones de ingeniería de tejidos, en donde las propiedades mecánicas del material deben imitar las del tejido a regenerar y en las que se espera que el material se degrade al tiempo que las células invaden, se adhieren, proliferan y finalmente establecen la

---

<sup>1</sup> Bioasimilación: metabolización (eliminación) de los fragmentos, termino aplicable para cualquier organismo vivo, animales o microorganismos

matriz extracelular, formando un tejido, que idealmente, es funcional, histológica y mecánicamente indistinguible del tejido que lo rodea (Atala et al., 2011).

### 2.1.1. Poliésteres

Los poliésteres fueron históricamente la primera familia de polímeros sintéticos y de condensación investigados como parte de los estudios pioneros de Carother sobre la polimerización en la década de 1930. Estos se definen como una familia de polímeros que presentan grupos funcionales ésteres en la cadena principal (Figura 1). La química de las unidades estructurales que conectan los grupos éster puede variar en un intervalo muy amplio, haciendo de los poliésteres un grupo diverso y versátil, que abarca desde matrices biomédicas lábiles a cristales líquidos, fibras y materiales resistentes a la temperatura (Edlund & Albertsson, 2003).

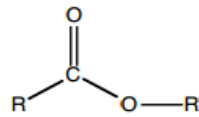


Figura 1 Grupo funcional éster

Los poliésteres son, en teoría, degradables en presencia de agua, la cual causa la escisión de los enlaces éster de la cadena principal, pues la esterificación<sup>2</sup> es una reacción reversible termodinámicamente, sin embargo, en la práctica, la hidrofobicidad de la cadena principal excluye efectivamente el agua de las proximidades de enlaces lábiles y sólo los poliésteres alifáticos con segmentos de metileno razonablemente cortos entre los enlaces éster se degradan con la escala de tiempo de observación (Edlund & Albertsson, 2003).

Estos poliésteres alifáticos han sido atractivos para aplicaciones biomédicas debido a la anteriormente mencionada facilidad de degradación por de-esterificación, es decir, la hidrólisis no enzimática de los enlaces éster a lo largo de la cadena principal. Adicionalmente, los productos de degradación, pueden ser reabsorbidos a través de las vías metabólicas en la mayoría de los casos y existe la posibilidad de adaptar la estructura para alterar o variar las tasas de degradación. Estudios sobre la biocompatibilidad de estos materiales, los perfilan para aplicaciones en liberación de medicamentos, implantes ortopédicos y más recientemente, matrices de ingeniería de tejidos, en particular para aplicaciones ortopédicas (Atala et al., 2011).

### 2.1.2. Poli- $\alpha$ -hidroxi ésteres

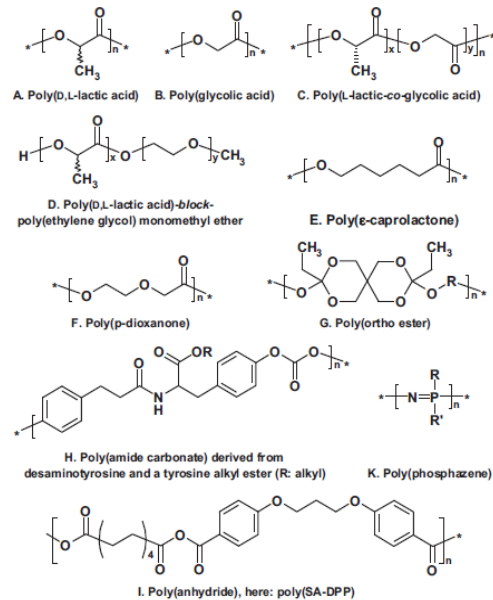
Los poli- $\alpha$ -hidroxi ésteres son poliésteres elastómeros termoplásticos lineales, con versatilidad química y fácil maleabilidad (Yu, Schindeler, Little, & Ruys, 2010). Estos polímeros se caracterizan pues cada monómero tiene dos grupos funcionales, un ácido carboxílico y un grupo hidroxilo, localizado en el

---

<sup>2</sup> La síntesis de un éster se puede lograr en una de varias maneras. La esterificación se produce cuando un alcohol y un ácido carboxílico se hacen reaccionar en presencia de un catalizador ácido mineral.



átomo de carbono al lado del ácido carboxílico (posición  $-\alpha$ ), que forma el enlace éster. Esta familia polimérica puede ser fácilmente procesada y su tasa de degradación, propiedades físicas y mecánicas son ajustables dentro de un amplio rango al cambiar el peso molecular o la proporción copolimérica (Puppi, Chiellini, Piras, & Chiellini, 2010). Las estructuras químicas de algunos poli- $\alpha$ -hidroxi ésteres se puede observar en la Figura 2.



**Figura 2** Estructura química de los polímeros biodegradables (Atala et al., 2011)

Los Poli- $\alpha$ -hidroxi ésteres se sintetizan generalmente por polimerización por apertura de anillo de dímeros cíclicos de los bloques de construcción (Atala et al., 2011) o por policondensación de monómeros difuncionales tipo AB o una combinación de tipos AA y BB (Edlund & Albertsson, 2003). La preferencia del método de síntesis usado, depende del peso molecular del polímero, de manera que la policondensación es frecuentemente utilizada para bajos pesos moleculares, mientras la polimerización por apertura de anillo es deseada para polímeros de alto peso molecular. Es importante resaltar que los poli- $\alpha$ -hidroxi ésteres son casi los únicos compuestos biodegradables de alto peso molecular (Vroman & Tighzert, 2009).

Dentro de la familia de Poli- $\alpha$ -hidroxi ésteres, los polímeros más representativos incluyen el ácido poliláctico (PLA), el ácido poliglicólico (PGA) y sus copolímeros. Durante su síntesis los dímeros cíclicos polimerizados son la lactida y la glicolida, por ello, estos polímeros son comúnmente conocidos como polilactidas o poliglicolidas (Atala et al., 2011). Dichos polímeros han sido estudiados desde finales de los años 60, seguido del exitoso desarrollo de la primera sutura sintética bioabsorbible basada en glicolidas y aprobada por la FDA (Food and Drug Administration); posteriormente se desarrollaron métodos de liberación de medicamentos y proteínas, además, de dispositivos de fijación ortopédica haciendo uso de estos materiales; en la actualidad, se busca sintetizar matrices tridimensionales para regeneración de tejidos (Yu et al., 2010).

Los múltiples estudios *in vivo* e *in vitro* que se han realizado para mostrar la biocompatibilidad de los poli- $\alpha$ -hidroxi ésteres, han revelado resultados satisfactorios y consecuentemente son unos de los pocos polímeros biodegradables y bioabsorbibles aprobados por la FDA para el uso clínico en humanos, no obstante, existen preocupaciones relacionadas con la acumulación de los productos ácidos de la degradación, los cuales pueden tener efectos perjudiciales sobre medicamentos encapsulados o pueden causar una reacción inflamatoria no infecciosa cuando son liberados de manera repentina después de la ruptura de la estructura. Esta reacción adversa puede presentarse semanas e incluso meses después del implante y en ocasiones requiere de una operación de drenaje (Atala et al., 2011).

### 2.1.3. Ácido Láctico

El ácido láctico (ácido 2-hidroxiopropanoico) es una simple molécula quiral de tres carbonos que existe como dos enantiómeros, L y D-láctico, que difieren en su efecto sobre la luz polarizada. Esta molécula es considerada el monómero con más potencial para conversiones químicas, ya que posee un grupo carboxilo y un hidroxilo (Lasprilla et al., 2012).

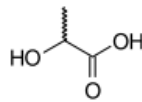


Figura 3 Molécula de ácido láctico (Henton, Gruber, Lunt, & Randall, 2005)

El ácido láctico puede influir sobre la función termometabólica de la célula en diversas formas pues este sirve como una fuente de energía y dado su carácter neutro y pequeño tamaño, puede penetrar la membrana lipídica. El lactato<sup>3</sup> es también capaz de penetrar la célula a través de la proteína transportadora de monocarboxilato, una vez dentro de la célula el lactato es convertido en glucosa, sirviendo como una fuente de energía en el ciclo de Cori. Adicionalmente, el ácido láctico ha mostrado propiedades antioxidantes que pueden servir para la protección celular frente al daño por la presencia de radicales libres producidos a través del propio ciclo celular (Lasprilla et al., 2012).

La producción de ácido láctico tiene una gran demanda debido a sus versátiles aplicaciones en la industria farmacéutica, textil, química y de alimentos, además es usado como monómero para la producción de PLA. El ácido láctico puede ser generado mediante fermentación o síntesis química siendo la primera de ellas, la forma en la cual se produce un 90% del ácido láctico en el mundo. La fermentación para la obtención de ácido láctico es un proceso atractivo en términos de su impacto ambiental, bajo costo de producción cuando se hace uso caña de azúcar, baja emisión de CO<sub>2</sub>, una disminución en el uso de combustibles fósiles como materias primas, uso de catalizadores y adicionalmente se da la producción de L- o D- ácido láctico ópticamente puros, por lo que es de gran interés en la actualidad (Lasprilla et al., 2012).

---

<sup>3</sup> Lactato: forma ionizada del ácido láctico

#### **2.1.4. Ácido poliláctico (PLA)**

El ácido poliláctico es un polímero sintético termoplástico, biodegradable y biocompatible con una alta resistencia y módulo de Young, que puede ser obtenido a partir de recursos renovables (Zhou et al., 2012). Este fue descubierto por Carothers en 1932, quien produjo el producto al calentar ácido láctico en el vacío (Lasprilla et al., 2012).

El ácido poliláctico es hidrofóbico, debido a la presencia de grupos  $-CH_3$  (Vroman & Tighzert, 2009) y se sintetiza a partir de ácido láctico. Debido a la naturaleza quiral de dicho monómero (ácido láctico), que se presenta en las formas isoméricas L y D, el término ácido poliláctico se refiere en realidad a una familia de polímeros: ácido poli-L-láctico puro (PLLA), ácido poli-D-láctico puro (PDLA) y ácido poli-D, L-láctico (PDLLA) (Lasprilla et al., 2012).

El L- isómero es un metabolito biológico que constituye la mayor fracción de PLA derivado de recursos renovables (Lasprilla et al., 2012). Esta forma enantiomérica es semicristalina, con un 37% de cristalinidad (Atala et al., 2011) y presenta una tasa de degradación lenta, además, tiene buena fuerza tensil y un alto módulo de Young, convirtiéndolo en un candidato para aplicaciones en las que se requiera soporte de cargas como fijaciones ortopédicas (Yu et al., 2010). Por otra parte las formas D- y -D, L son amorfas, presentan una tasa de degradación más rápida y menor fuerza tensil en comparación con el PLLA, convirtiéndolos en materiales más idóneos para liberación de medicamentos (Yu et al., 2010).

#### **Propiedades físicas**

Las propiedades físicas de los polímeros incluyen, peso molecular, viscosidad, cristalinidad y temperaturas de fusión y transición vítrea. El peso molecular del polímero afecta su propiedades mecánicas y la cinética de degradación, por ello es un factor crítico a evaluar y, por tanto, es importante considerar que los procedimientos de fabricación pueden cambiar esta propiedad y a su vez la viscosidad intrínseca, que se correlaciona con el peso molecular, siendo una medida de la resistencia al flujo del polímero y un indicador del tamaño promedio de las cadena polimérica (Athanasίου et al., 1998).

Por otra parte, la organización de las cadenas poliméricas define la cristalinidad, la cual depende de factores como la estructura y la química molecular, la temperatura y la tasa de enfriamiento durante la solidificación, lo cual afecta la flexibilidad y la movilidad de las cadenas moleculares (Athanasίου et al., 1998).

Para el caso particular del ácido poliláctico la estereoquímica y la historia térmica tienen una directa influencia en la cristalinidad y otras propiedades (Lasprilla et al., 2012). No obstante, la mayoría de las propiedades físicas, entre ellas la densidad, la capacidad calorífica, las características mecánicas y

reológicas, dependen de las temperaturas de transición (Henton et al., 2005). Para el PLA amorfo, la temperatura de transición vítrea ( $T_g$ ) determina el límite superior de temperatura para la mayoría de aplicaciones comerciales (Henton et al., 2005), esto se debe a que al alcanzar o superar dicha temperatura, se presentan cambios drásticos en la movilidad de la cadena polimérica (Lasprilla et al., 2012), así, a temperaturas por encima de la  $T_g$ , se convierte en un polímero gomoso que se comporta como un fluido viscoso. Para el PLA semicristalino tanto la temperatura de transición vítrea ( $T_g$ ) como la temperatura de fusión ( $T_m$ ) son importantes para determinar el rango de temperaturas de uso para múltiples aplicaciones. Es importante considerar que tanto la temperatura de transición vítrea como la temperatura de fusión dependen de la composición óptica, la estructura primaria y el peso molecular (Henton et al., 2005).

Más específicamente, se ha reportado que el PLA en su forma enantiomérica pura tiene una entalpía de fusión<sup>4</sup> ( $\Delta H^{\circ m}$ ) de 93 J/g, este valor se encuentra de manera frecuente en la literatura, sin embargo, también se han reportado valores hasta 148 J/g. La densidad del PLLA ha sido reportada como 1,36 g cm<sup>-3</sup>, 1,33 g cm<sup>-3</sup> para el PDLLA y 1,25 g cm<sup>-3</sup> para el PDLA (Lasprilla et al., 2012). Otras propiedades relevantes del ácido poliláctico se pueden observar en la Tabla 1.

<i>Polímeros de ácido láctico</i>	<i>Temperatura de transición vítrea-<math>T_g</math> (°C)</i>	<i>Temperatura de fusión-<math>T_m</math> (°C)</i>
PLLA	55-80	173-178
PDLA	40-50	120-150
PDLLA	43-53	120-170

**Tabla 1 Propiedades de los polímeros de ácido láctico** (Lasprilla et al., 2012)

En general, el PLA es soluble en dioxano, acetonitrilo, cloroformo, cloruro de metilo, 1,1,2-tricloroetano y ácido dicloroacético. El etil benceno, tolueno, acetona y tetrahidrofurano sólo permiten disolver parcialmente polilactidas en frío, no obstante, son fácilmente solubles en estos disolventes cuando se calientan a temperaturas de ebullición. Los polímeros basados en ácido láctico no son solubles en agua, alcoholes o hidrocarburos no sustitutos (Lasprilla et al., 2012).

### **Propiedades mecánicas**

Para describir las propiedades mecánicas de materiales usados en implantes biodegradables que pueden estar sujetos a cargas significativas, generalmente se habla de la ductilidad, el módulo elástico y la resistencia mecánica. El módulo de elasticidad mide la rigidez del polímero y depende principalmente de la cristalinidad del mismo. La ductilidad mide la deformación plástica que el polímero puede resistir antes de fracturarse y se expresa como porcentaje de elongación; este último parámetro es crítico, pues durante condiciones extremas de cargas se pueden prevenir fallas (Athanasίου et al., 1998).

<sup>4</sup> Entalpía de fusión: Energía necesaria para pasar de estado sólido a líquido

Es importante considerar, que para los polímeros derivados de ácido láctico, las propiedades mecánicas pueden variar en un rango de materiales plásticos elásticos hasta rígidos y de alta resistencia. Dentro de estos polímeros, el PLLA (cristalino) es preferible cuando se requieren altas propiedades mecánicas (Södergård & Stolt, 2002), sin embargo, se ha establecido que para aplicaciones de soporte de carga, como implantes ortopédicos, se debe ser usar un peso molecular de al menos 100 kDa (Athanasiou et al., 1998). En la Tabla 2 se muestran algunas propiedades del PLLA.

<i>Propiedad mecánica</i>		
Porcentaje de elongación (ductilidad)	85-105%	(Vroman & Tighzert, 2009)
	2-6%	(Dee, Puleo, & Bizios, 2002)
Resistencia a la tracción	45-70 MPa	(Vroman & Tighzert, 2009)
	11,4-82,7 MPa	(Athanasiou et al., 1998)
	50-70 MPa	(Södergård & Stolt, 2002)
	20-50 MPa	(Dee, Puleo, & Bizios, 2002)
Resistencia a la compresión	2,7 MPa	(Lee & Shin, 2007)
Resistencia a la flexión	45-145 MPa	(Athanasiou et al., 1998)
	100 MPa	(Södergård & Stolt, 2002)
Módulo	4,8 GPa	(Yu et al., 2010)
	1,2-3,0 GPa	(Rezwan et al., 2006)
	3 GPa	(Södergård & Stolt, 2002)
	2-4 GPa	(Bueno & Glowacki, 2009)
	1,2-3 GPa	(Dee, Puleo, & Bizios, 2002)

**Tabla 2** Propiedades mecánicas PLLA

Para aplicaciones en las que se requiera mejorar significativamente la resistencia a la tracción y a la flexión, es necesario reforzar el polímero con fibras de otros materiales.

## Degradación

La cinética de degradación se encuentra relacionada con un gran número de factores que incluyen el tamaño del implante, la composición y la estructura química, la fase del material (cristalino o amorfo), la historia de procesamiento, el peso molecular, el índice de polidispersidad, las condiciones ambientales, la morfología (porosidad), la distribución de los compuestos químicamente reactivos en la matriz, la presencia de aditivos y la hidrofobicidad (Puppi, Chiellini, Piras, & Chiellini, 2010).

La degradación del PLA genera monómeros de ácido láctico, un producto presente en la contracción muscular (Athanasiou et al., 1998), que es posteriormente transformado en subproductos no tóxicos que se eliminan a través de la actividad celular normal o la orina (Lasprilla et al., 2012). Más específicamente, el ácido láctico entra al ciclo del ácido tricarbóxico y es excretado en forma de agua y dióxido de carbono (Athanasiou et al., 1998).

Como se mencionó previamente, los poli- $\alpha$ -hidroxi ésteres, entre ellos el PLA, se degradan a través de la hidrólisis química de los enlaces éster de la cadena principal. El rompimiento de la cadena da como resultado la formación de grupos carboxilos terminales, que debido a su naturaleza ácida aumentan la tasa de hidrólisis. Este mecanismo de autocatálisis hace que las matrices poliméricas presenten erosión en masa u homogénea (Edlund & Albertsson, 2003).

La degradación o erosión en masa, se presenta en dos etapas: durante la fase inicial no se evidencia un cambio significativo en la masa de la matriz, pero sí una alteración del peso molecular del polímero, esto es debido a que la ruptura de la cadena comienza cuando se está en contacto con el agua, pero los productos de degradación iniciales son muy grandes para difundirse libremente a través del material, sólo después de un periodo de tiempo estos fragmentos se reducen en tamaño por hidrólisis y durante la segunda fase, se difunden como oligómeros dando como resultado una pérdida de masa significativa. La pérdida de masa como función del tiempo durante este proceso de degradación típicamente sigue una forma de S (Athanasίου et al., 1998).

Las muestras gruesas de ácido poliláctico suelen presentar una degradación heterogénea, debido a la inhabilidad de los productos de degradación de gran tamaño de difundirse a través del material, lo que genera un fenómeno en el que la superficie y el interior se degradan a diferentes tasas, siendo más rápido en el centro de la muestra (Rezwan et al., 2006). Inicialmente la degradación ocurre más rápido en la superficie, debido a la mayor disponibilidad de agua, sin embargo, los productos de degradación que se forman son disueltos en el fluido subyacente, por lo cual no se genera una autocatálisis. Mientras que en el interior y, como ya se ha mencionado, los productos de degradación toman más tiempo en difundirse, de manera que la concentración de grupos terminales carboxilo incrementa creando un entorno ácido que acelera el rompimiento de los éster por hidrólisis (Athanasίου et al., 1998). Este último fenómeno es una de las principales preocupaciones, pues la liberación súbita de estos monómeros ácidos de degradación, puede causar una reacción inflamatoria no infecciosa (Atala et al., 2011), al saturar la habilidad del cuerpo de eliminar dichos productos y generar una disminución en el pH.

## 2.2. Requerimientos de las matrices poliméricas

Las matrices poliméricas han recibido gran atención en los últimos años, ya que proporcionan un entorno temporal para el crecimiento y la interacción celular, además de la formación de la matriz extracelular, dando soporte a un nuevo tejido; estos pueden actuar tanto como un material prostético para regenerar tejido *in vivo* o como sustrato adhesivo celular para formar tejidos *in vitro* (Chung & Park, 2007).

La hipótesis original de que las células sobre una matriz polimérica podían dar lugar a un tejido organizado surgió de varias observaciones biológicas: (1) todos los tejidos experimentan una remodelación constante, (2) las células maduras pueden reorganizarse en estructuras histológicas nativas cuando se colocan bajo condiciones apropiadas de cultivo, (3) la capacidad de reorganización expuesta en el numeral anterior es limitada cuando las células se encuentran en suspensión debido a la ausencia de un arreglo que guíe la reestructuración, (4) el volumen de tejido que puede ser implantado está restringido por los requerimientos de difusión de gases y el intercambio de nutrientes (Vacanti, Langer, Upton, & Marler, 1998)

Sin embargo, dada la complejidad biológica y sensitiva del cuerpo humano, los requerimientos para una matriz tridimensional son múltiples y desafiantes (Rezwan et al., 2006); hasta ahora, se han identificado los parámetros que han de considerarse para el diseño de una matriz polimérica, independientemente del tipo de tejido que se desea regenerar (O'Brien, 2011).

Dentro de los requerimientos para una matriz polimérica ideal existen factores estructurales y químicos (Chung & Park, 2007). En primer lugar, el material debe ser biocompatible, es decir que no debe generar una respuesta inflamatoria, inmunogénica o citotóxica. Adicionalmente, las propiedades mecánicas de la matriz deben ser suficientes, de tal manera, que la estructura no colapse durante su manipulación (Rezwan et al., 2006) ni durante el proceso de crecimiento y remodelación *in vitro* o *in vivo* (Hutmacher, 2000).

En lo que respecta a la arquitectura, las matrices poliméricas deben contar, con una estructura porosa interconectada que permita la vascularización, el crecimiento, la migración, la diferenciación celular, la integración del tejido (Chung & Park, 2007) y la difusión de nutrientes y productos de desecho metabólicos (Zippel, Schulze, & Tobiasch, 2010). Además la rugosidad de la superficie, debe permitir la fijación óptima de la matriz al tejido subyacente al favorecer el crecimiento de tejido (Bueno & Glowacki, 2009). Es importante resaltar, que las propiedades macro y micro estructurales (porosidad, rugosidad, proporción área superficial-volumen y química de la superficie) afectan no solamente la supervivencia, crecimiento, señalización, migración y reorganización celular, sino que también tiene un papel vital en determinar el fenotipo celular y la expresión de genes (Puppi, Chiellini, Piras, & Chiellini, 2010).

Otro de los requerimientos para el diseño de las matrices es el uso de materiales biodegradables, que permiten evitar procedimientos quirúrgicos adicionales para remover el implante. Idealmente, la

degradación y cinética de reabsorción deben darse de forma controlada y paralela a la formación de nuevo tejido (Zippel et al., 2010).

Finalmente, se desea que las propiedades de las matrices no se afecten en proceso de esterilización (Bueno & Glowacki, 2009) y que el proceso de fabricación sea escalable con el fin que resulten rentables a nivel de producción industrial (Rezwan et al., 2006).

### **2.2.1. Biocompatibilidad**

La biocompatibilidad es usualmente definida como la habilidad de un material o dispositivo médico de funcionar con una adecuada respuesta del tejido huésped en una aplicación específica (Atala et al., 2011), en otras palabras es la capacidad de evadir una mayor o una prolongada respuesta inflamatoria, inmunogénica o citotóxica (Yu et al., 2010). La valoración de este parámetro es considerada la medida de la magnitud y la duración de las alteraciones adversas de los mecanismos homeostáticos que determinan la respuesta del tejido huésped; desde un punto de vista práctico, es la evaluación de la respuesta biológica con el fin de determinar si se presenta algún riesgo significativo para el paciente (Atala et al., 2011).

Generalmente, la implantación de una matriz polimérica genera una respuesta temprana asociada con la herida la cual depende de múltiples factores como la extensión de esta, la pérdida de estructuras de la membrana basal, la interacción sangre-material y el grado de necrosis celular (Atala et al., 2011), sin embargo, todo el proceso está asociado principalmente a tres fases diferentes de respuesta del tejido: (1) un periodo de inflamación leve de aproximadamente una a dos semanas, (2) granulación del tejido debido a la fibrosis y la reacción ante agentes extraños y (3) degradación de la matriz (Yu et al., 2010).

Debe entenderse que cada material requiere de un conjunto de experimentos únicos para determinar la biocompatibilidad, dentro de ellos debe considerarse tres procesos fundamentales: la inflamación, la cicatrización de la herida y la reacción inmunológica (Atala et al., 2011), generalmente se ha investigado de manera *in vitro* la biocompatibilidad de los polímeros haciendo uso de cultivos celulares y ensayos citotóxicos (Athanasίου et al., 1998).

### **2.2.2. Biodegradabilidad**

Aunque existen biomateriales no degradables que han tenido éxito en muchos dispositivos médicos, se han reportado múltiples complicaciones debido a la respuesta crónica ante un cuerpo extraño. Por esta razón, el andamio (matriz) ideal es aquel que eventualmente es reemplazado por el tejido nativo (Atala et al., 2011), es decir, un material que es capaz de proveer un ambiente biomimético con las características fisicoquímicas (Porter et al., 2009) que permite que las células produzcan una nueva matriz extracelular (O'Brien, 2011) a medida que el material se degrada y el tejido se integra (Porter et al., 2009).



En este punto es importante establecer la diferencia entre varios de los conceptos que se relacionan directamente con la biodegradabilidad, pero que se utilizan a menudo de manera errónea en la literatura. De acuerdo con Vert es importante diferenciar cuatro conceptos: biodegradable, bioreabsorbible, bioabsorbible y bioerosionable.

- Biodegradable: debe entenderse como el material que se rompe debido a la degradación macromolecular y se dispersa *in vivo* pero no hay prueba de su eliminación en el cuerpo, estos materiales pueden ser atacados por elementos biológicos comprometiendo la integridad del sistema y en algunos casos la estructura macromolecular lo que da como resultado fragmentos o subproductos de degradación, que pueden moverse a través del cuerpo pero no necesariamente ser eliminados de este.
- Bioreabsorbible: son aquellos materiales que exhiben degradación en masa y que posteriormente resorben *in vivo* mediante vías metabólicas naturales a las cuales entran por simple filtración o de la cual hacen parte los subproductos de la degradación.
- Bioerosionable: hace referencia a los materiales que exhiben degradación de superficie (heterogénea) y que posteriormente se resorben *in vivo*.
- Bioabsorbible: son los materiales que pueden disolverse en fluidos biológicos sin ninguna pérdida de masa molecular o rompimiento de la cadena (Hutmacher, 2000).

Dadas estas diferencias, se habla de degradación dado que se encuentra implícito en los cuatro conceptos mencionados anteriormente. La degradación debe ocurrir de manera simultánea a la formación de tejido (O'Brien, 2011), de manera que se asegure la estabilidad mecánica del sistema (Atala et al., 2011) y una respuesta inflamatoria combinada con una infusión controlada de células de procesos inmunológicos (O'Brien, 2011), de esta forma el tiempo que el material debe permanecer en el tejido es específico y acorde al tiempo en el que las células pueblan adecuadamente el andamio hasta formar una matriz extracelular estable (Atala et al., 2011).

Bajo estos parámetros, la tasa de degradación es de vital importancia, pues si un biomaterial se degrada antes que haya una deposición suficiente de matriz extracelular, las células perderán importantes factores fisicoquímicos para la regeneración del tejido y aunque dicha regeneración es posible que ocurra, desencadenará la formación de cicatrices, por otra parte, si el material permanece mucho tiempo en el tejido, la deposición de matriz extracelular y la proliferación celular serán suprimidas, por lo que es importante determinar un balance (Atala et al., 2011). La tasa de degradación de un biomaterial está determinada por las propiedades químicas y estructurales, sin embargo depende de varios factores *in vivo* e *in vitro* como el acceso de la vasculatura, la carga mecánica, el crecimiento del tejido, la actividad enzimática, el pH, la temperatura y la fuerza iónica (Bueno & Glowacki, 2009). No obstante en la práctica la tasa de degradación depende de la micro y nano estructura de la matriz, de la polimerización de diversos y múltiples polímeros y de la presencia de aceleradores o supresores hidrolíticos (Porter et al., 2009).

### 2.2.3. Propiedades mecánicas

Idealmente una matriz debería poseer propiedades mecánicas consistentes con aquellas del sitio anatómico en el cual será implantado (O'Brien, 2011). Sin embargo, desde un punto de vista práctico debe ser lo suficientemente fuerte para permitir su manipulación durante el procedimiento de implantación y mantener su estructura tridimensional desde este momento hasta que el proceso de remodelación haya sido completado (Dawson & Oreffo, 2008). Adicional a estos requerimientos *in vivo*, la matriz debe tener suficiente fuerza mecánica durante los cultivos *in vitro* para mantener los espacios requeridos para el crecimiento celular y la formación de matriz extracelular (Puppi, Chiellini, Piras, & Chiellini, 2010).

Aunque los parámetros expuestos anteriormente son importantes para la regeneración de cualquier tejido, se tienen algunos retos importantes especialmente para aplicaciones ortopédicas (O'Brien, 2011), para las cuales debe considerarse que: matrices muy débiles pueden no sostener el esqueleto, mientras matrices muy rígidas pueden generar un escudo de estrés, en el cual el material de soporte absorbe toda la tensión mecánica dejando al hueso sin estimulación por carga necesaria para la regeneración ósea, bajo este fenómeno la reabsorción ósea continúa y como no se encuentra balanceada con la formación de hueso, se evidencia una lisis alrededor del implante (Bueno & Glowacki, 2009).

Adicionalmente, es necesario establecer un balance entre las propiedades mecánicas y la porosidad, que permita la infiltración de células y la vascularización lo que es clave para el desarrollo de una matriz exitosa. Hasta ahora algunos materiales han demostrado buenas propiedades mecánicas y resultados *in vitro* exitosos, sin embargo, de manera *in vivo* fallan en el proceso de vascularización (O'Brien, 2011). Se debe considerar, que la medida en que puede aumentarse la porosidad y todavía satisfacer los requerimientos mecánicos de un tejido, depende de la composición intrínseca del biomaterial y de las condiciones de procesamiento utilizadas en la fabricación (Atala et al., 2011).

Se debe considerar además, que la tasa de sanación varían con la edad; en individuos jóvenes, las fracturas normalmente sanan hasta el punto de soportar peso en cerca de seis semanas, mostrando completa integridad mecánica, no obstante en personas mayores la tasa de reparación es menor (O'Brien, 2011).

### 2.2.4. Estructura de la matriz

La razón por la que la estructura de las matrices tridimensionales es altamente compleja se debe a que estas deben imitar tejidos compuestos de múltiples tipos de células con diferentes funciones y además, poseen una red de abundantes capilares. La estructura y la función de los tejidos están altamente interrelacionados, de manera que existe una estructura jerárquica en la escala de los nanómetros hasta los milímetros que determinan los requerimientos mecánicos y el transporte de diversos elementos. Entre ellas, las estructuras subcelulares (1-10  $\mu\text{m}$ ) intervienen en el ambiente celular, las estructuras

celulares (10-100  $\mu\text{m}$ ) controlan las interrelaciones células-célula y las estructuras supracelulares (100-1000  $\mu\text{m}$ ) permiten la construcción de estructuras esenciales en esos tejidos, con el fin de mantener y regular la actividad celular (Liu, Xia, & Czernuszka, 2007).

Por esto, la estructura de una matriz para regeneración de tejido es un factor de importancia crítica. Estas deben tener una microestructura porosa, altamente interconectada, que garantice la penetración celular y una adecuada difusión de nutrientes a las células en la estructura y a la matriz extracelular que las mismas forman, además, se requiere una estructura porosa interconectada para permitir la difusión de los productos de desecho y degradación fuera de matriz, los cuales deben ser expulsados del cuerpo sin interferir o afectar otros órganos o tejidos adyacentes (Atala et al., 2011; O'Brien, 2011).

Más específicamente, la interconectividad de los poros, facilita la penetración y distribución uniforme de las células ya que genera un aumento del área superficial interna que provee sitios para la adhesión y el esparcimiento celular, adicionalmente, al permitir la difusión de metabolitos, oxígeno y factores de crecimiento tanto dentro como fuera de la matriz, promueve la viabilidad y proliferación celular y posibilita la deposición de proteínas secretadas por las células. Una estructura interconectada *in vivo* favorece la extensión de los procesos vasculares, que irrigan nutrientes en el desarrollo del nuevo tejido (Atala et al., 2011).

Por otra parte el tamaño del poro también es un factor determinante, este debe ser lo suficientemente grande para permitir que las células migren al interior de la estructura, donde eventualmente se adhieren a los ligandos en la matriz, pero deben ser lo suficientemente pequeños para establecer una superficie altamente específica, dando como resultado una densidad mínima de ligandos para permitir la adhesión de un número crítico de células a la matriz (O'Brien, 2011) .

En este punto es importante aclarar, que las células interactúan principalmente a través de grupos químicos (ligandos) en la superficie del material; estos ligandos se encuentran de manera intrínseca en los materiales naturales en forma de una secuencia de unión de Arg-Gly-Asp, mientras que para las matrices hechas de materiales sintéticos, se requiere la incorporación de ligandos (proteínas, factores de crecimiento, etc.) (O'Brien, 2011).

Generalmente, se considera que poros con un tamaño mayor a 10  $\mu\text{m}$  (diámetro promedio de una célula) permiten la infiltración celular (Atala et al., 2011); sin embargo, ha sido demostrado que un poro de mínimo 35  $\mu\text{m}$  es esencial para la angiogénesis (Zippel et al., 2010), no obstante, para tejidos como el hueso, se ha encontrado que porosidades menores a 100  $\mu\text{m}$  restringen la penetración vascular (Dawson & Oreffo, 2008), por lo cual, se reporta un tamaño de poro de mínimo 100  $\mu\text{m}$  y hasta 500  $\mu\text{m}$  como el óptimo para lograr una histogénesis exitosa (Rezwan et al., 2006; Yoon & Park, 2001; Yu et al., 2010).

Estudios experimentales, muestran que la variación en la arquitectura del poro (tamaño y forma) afecta las interacciones célula-material. Un análisis cuidadoso muestra que dos matrices con propiedades químicas idénticas pero con un tamaño de poro diferente tienen capacidades distintas de proveer

adhesión celular; estas conclusiones son producto del parámetro de interacción característico ( $\phi_c$ ), que relaciona el número de células adheridas ( $N_c$ ) y el área superficial disponible ( $A$ ), que se describe mediante la siguiente ecuación:

$$\phi_c = \frac{N_c}{A}$$

**Ecuación 1 Parámetro de interacción característico**

Bajo este parámetro se entiende, por ejemplo, que una matriz que contiene poros de 300  $\mu\text{m}$  tenga un área superficial interior menor que aquella con poros de 50  $\mu\text{m}$ , y por ello, un número mucho menor de células se encuentra en la matriz, de manera que la formación de tejido es más lenta. Se asume además, bajo el mismo parámetro, que existe un tamaño de poro máximo que permite a las células adherirse y dividirse, mientras que al mismo tiempo se conservan la comunicación intracelular la cual es crucial para la histogénesis (Atala et al., 2011).

A medida que la histogénesis progresa, el impacto de la estructura del poro en la degradación del material y la vascularización del nuevo tejido se vuelve aparente; el tamaño y la distribución de poros en la matriz influyen en gran medida en la tasa de degradación *in vivo*, que como se mencionó, puede inferir en la formación de tejido y en la integridad mecánica de la estructura. En materiales susceptibles a escisión hidrolítica, como los poli- $\alpha$ -hidroxi ésteres, el acceso de las moléculas de agua al interior de la matriz es limitado por la porosidad (Atala et al., 2011).

Los métodos para crear poros o aumentar la porosidad de una biomaterial incluyen “gas foaming”, lixiviación de partículas, liofilización, “electrospinning”, unión de fibras, separación de fases, impresión 3D y más recientemente la inclusión de micropartículas de hidrogel biodegradable (Atala et al., 2011; Cai, Yang, Bei, & Wang, 2002; Liu et al., 2007). Entre todos estos métodos, la lixiviación de partículas es el más simple y comúnmente usado (Atala et al., 2011), además, es una forma conveniente de fabricar matrices en forma de esponja de manera reproducible (Cai et al., 2002). En este método, partículas solubles en agua son utilizadas como porógenos, tales como sal, microesferas de glucosa, gelatina o hielo, los cuales proveen un fácil control en la estructura porosa (tamaño de poro y porosidad) (Cai et al., 2002). Más específicamente, durante el proceso de lixiviación de partículas, se disuelve el polímero en un solvente orgánico, se mezcla con las partículas y se vierte la solución en un molde predefinido, posteriormente el solvente se evapora y el agente porogénico se remueve a través de lavados con agua, obteniéndose una estructura de poros abiertos (Atala et al., 2011; Hutmacher, 2000; Rezwan et al., 2006). La principal ventaja de este proceso es su facilidad y el no requerir equipos especializados, no obstante presenta algunas limitaciones, entre ellas, la forma del poro es dependiente de la forma del agente porogénico y la posibilidad de que una proporción del solvente o el agente porogénico permanezca en la matriz hace que solo se fabrique estructuras delgadas (Hutmacher, 2000; Rezwan et al., 2006), se ha sugerido que cualquier partícula inclusive aquellas con un tamaño menor a 2  $\mu\text{m}$  causan una reacción inflamatoria (Athanasίου et al., 1998); además la presencia de una capa superficial y bajo interconectividad entre los poros, sin embargo los dos últimos problemas mencionados pueden solucionarse al agregar partículas de bicarbonato de amonio, que actúan como un agente de gas-foaming al interactuar con una solución ácida o agua caliente, generando una estructura altamente

interconectada a través de la efervescencia (Atala et al., 2011); esto se evidenció claramente en un estudio en el cual se compararon matrices obtenidas por solvent casting/particle leaching (lixiviación de partículas) y gas-foaming/particle leaching, en el cual se demostró que las últimas exhiben una mayor y mejor formación de tejidos (Puppi, Chiellini, Piras, & Chiellini, 2010).

### **2.2.5. Tecnología de manufactura**

Con el fin que una matriz tridimensional para la regeneración de tejidos sea clínica y comercialmente viable, esta debe ser rentable y su proceso de fabricación debe ser escalable, de manera que no se produzca una matriz a la vez sino lotes de ellas. El cambio de procesos de manufactura escalable a buenas prácticas de manufactura estandarizada es de vital importancia para asegurar una traducción exitosa de la investigación a la aplicación clínica (O'Brien, 2011).

Otro factor importante, es la determinación de cómo la matriz será entregada y puesta a disposición del médico; típicamente estos prefieren un biomaterial que puedan implantar inmediatamente y que no se requieran procedimientos adicionales para obtener células para cultivo *in vitro* semanas previas a la intervención, no obstante, para algunos tejidos esto no es posible y se requiere de cultivo antes de la intervención.

Adicionalmente, la esterilización y el almacenamiento del material, debe realizarse de tal forma que no se altere las propiedades de la matriz (Bueno & Glowacki, 2009). La esterilización no es un proceso sencillo pues los biomateriales son altamente sensibles o susceptibles al calor y la humedad, estos dos factores inducen deformación y frecuentemente degradación del material. Para el caso de los polímeros comúnmente se usa la esterilización por radiación con iones, sin embargo excesos en las dosis de radiación puede romper, entrecruzar y recombinar las cadenas poliméricas generando el deterioro y un cambio en las propiedades del material. Otra forma de esterilizar las matrices, es usar agentes químicos como óxido de etileno, pero los residuos son altamente tóxicos y estos gases pueden debilitar algunas de las propiedades mecánicas (Athanasίου et al., 1998).

Adicionalmente, cuando el material cuenta con factores o proteínas en su interior, el método de esterilización puede afectar la cinética, estructura o actividad de las mismas, por lo que no es recomendable esterilizar una matriz tras la encapsulación de drogas o moléculas (Lee & Shin, 2007). De manera que la selección del método de esterilización debe ser cuidadosa y depender de la aplicación del biomaterial (Athanasίου et al., 1998; Lee & Shin, 2007).

Por otra parte, en lo que respecta al almacenamiento es necesario que se realice en condiciones de baja humedad y que se conserve a temperaturas por debajo de la temperatura de transición vítrea del polímero (Athanasίου et al., 1998).

### 2.3. Ingeniería de tejidos

Ingeniería de tejidos es un término acuñado formalmente en 1987, que ha surgido como un campo científico diferente a las ciencias médicas, pero a menudo paralelo al mismo al proveer nuevas tecnologías con aplicaciones clínicas prácticas (Chen, Liang, & Thouas, 2012). La ingeniería de tejidos, se define como un campo interdisciplinario que integra los principios de la ingeniería y las ciencias de la vida encaminadas a la comprensión de la relación estructura función de los tejidos con el fin de desarrollar sustitutos biológicos o estructuras artificiales que restauren, mantengan o mejoren la función de un tejido (Liu et al., 2007; Rezwan et al., 2006; Sachlos & Czernuszka, 2003; Vacanti et al., 1998; Zippel et al., 2010).

El principal objetivo de la ingeniería de tejidos es superar las limitaciones de los tratamientos convencionales basados en el trasplante de órganos y en el implante de materiales prostéticos, pues tiene el potencial de producir tejidos inmunológicamente tolerables dando una solución permanente al daño de tejidos en la que no se implican terapias complementarias (Sachlos & Czernuszka, 2003), por lo que su mayor meta implica el diseño de terapias celulares, génicas y biomateriales que permitan la contención de células y moléculas de señalización para una futura implantación, que permita la regeneración de tejido funcional (Chen et al., 2012; Porter et al., 2009), estos últimos deben presentar características físicas, químicas, estructurales y biológicas específicas de una aplicación clínica (Zippel et al., 2010)

El concepto fundamental de la ingeniería de tejidos parte del concepto médico que el cuerpo tiene la capacidad inherente de sanarse a si mismo después de una enfermedad o herida y de regenerarse dependiendo del tejido u órgano afectado, sin embargo, esto presenta ciertas limitaciones según el grado de daño, la pérdida de función y el número de tejidos afectados (Chen et al., 2012).

De manera general, las estrategias de la ingeniería de tejidos combinan células con biomateriales, los cuales imitan, como se ha mencionado anteriormente, el ambiente tridimensional de la matriz extracelular. Dentro de estas encontramos dos enfoques principales (Zippel et al., 2010):

- 1) Celular (*in vitro*): se cultivan células aisladas de una pequeña biopsia del paciente en una matriz tridimensional bajo condiciones controladas, posteriormente dicha estructura se implanta en el sitio que se desea tratar (Rezwan et al., 2006), las células presentes en la matriz se unen con el tejido del sitio de implantación y hacen que se infiltre nuevo tejido (Chen et al., 2012).

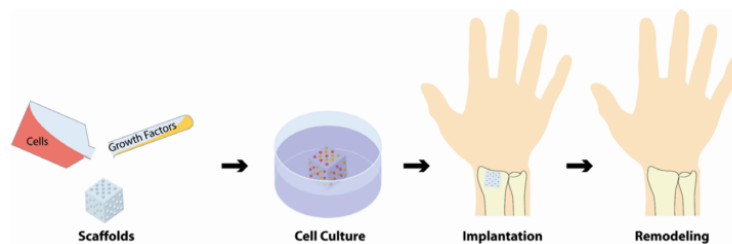


Figura 4 Enfoque celular de ingeniería de tejidos (Drosse et al., 2008)

- 2) Acelular (*in vitro*): la matriz construida a partir de determinado biomaterial es implantada en el sitio que se desea tratar, de manera que se estimule el crecimiento *in situ* de nuevo tejido; este enfoque permite el crecimiento de nuevas fibras nerviosas y vasos sanguíneos (Rezwan et al., 2006).
- 3) También se puede utilizar una combinación de las dos estrategias, en donde una matriz es celularizada y posteriormente decelularizado por un tratamiento enzimático dejando como resultado un nuevo andamio que equivale a la matriz extracelular formada en el proceso (Chen et al., 2012)

### 2.3.1. Ingeniería del tejido óseo

La ingeniería del tejido óseo es una parte de la ingeniería de tejidos, que permite reparar lesiones con matrices con o sin células adheridas en ellas antes de la implantación, estas estructuras son capaces de proporcionar conceptos de la regeneración ósea normal, entre ellos: biocompatibilidad, osteogénesis<sup>5</sup>, osteoconducción<sup>6</sup> y osteoinducción<sup>7</sup> (Bueno & Glowacki, 2009).

La ingeniería de tejido óseo, se convierte en un concepto de gran importancia, pues el hueso es un órgano que cumple una función crítica en la fisiología humana, incluyendo protección, movimiento, soporte de órganos vitales, producción de sangre, almacenamiento mineral, homeostasis, regulación del pH sanguíneo, entre otras (Porter et al., 2009). Pese a la estructura altamente organizada del mismo y su capacidad innata de remodelarse y regenerarse ante la presencia de heridas traumáticas, su habilidad para realizar estos procesos se reduce a medida que el tamaño de la herida o defecto es mayor; en este contexto el uso de matrices con morfologías determinadas y una apropiada respuesta promueve el correcto crecimiento del hueso (Raucci et al., 2010). Adicionalmente los métodos tradicionales para tratar defectos óseos (auto y aloinjertos), tienen asociados problemas de transmisión de enfermedades, morbilidad y la necesidad de varias intervenciones (Seal, Otero, & Panitch, 2001).

Por diversas razones (tales como tamaño de defecto óseo, infecciones, y muchos otros), el hueso lesionado o enfermo puede no ser capaz de repararse a sí mismo por medio de fijación mecánica, lo que resulta en una no-uniión. En casos de no-uniión o de defectos de tamaño crítico, un material sustitutivo debe ser utilizado para rellenar el defecto óseo; el tratamiento convencional actual de los defectos óseos de este tipo es el injerto óseo autógeno, en este se remueve hueso de otro sitio del paciente (típicamente de la cresta ilíaca o de la pelvis) y se utiliza para rellenar el defecto; sin embargo, la tasa de complicaciones con injertos de este tipo es tan alto como el 30%, y puede incluir la morbilidad de la zona donante, dolor, parestesias, hospitalización prolongada y rehabilitación, mayor riesgo de infección profunda, hematoma, inflamación y disponibilidad restringida. Otra opción razonable para los pacientes y los cirujanos es el uso de tejido óseo proveniente de otros seres humanos (por lo general cadáveres)

---

<sup>5</sup> Osteogénesis: también conocido como osificación es el proceso de formación de nuevo hueso

<sup>6</sup> Osteoconducción: crecimiento del hueso sobre un implante o andamio

<sup>7</sup> Osteoinducción: diferenciación de células a líneas del tejido óseo

llamados aloinjertos, estos pueden derivar de fuentes viables (vivos) o esterilizadas no viables. Muchos procedimientos de aloinjertos ortopédicos han sido aprobados por la FDA y utilizados durante años, sin embargo, los aloinjertos ortopédicos conllevan riesgos de infección donante-receptor (tasa de incidencia de hasta un 13%) transmisión de enfermedades y respuesta inmune del huésped. No obstante, el éxito en ambos procedimientos de autoinjerto y aloinjerto se atribuye a la similitud física y biológica entre el tejido donado y el tejido huésped.

Como último recurso, los pacientes que requieren reparación o sustitución ósea también pueden considerar un xenoinjerto, o injerto de tejido proveniente de un no-humano. El éxito temprano en los xenotrasplantes de una variedad de células, tejidos y los órganos logró la aceptación pública y optimismo frente a estos, no obstante, después de más de dos décadas de investigación y ensayos clínicos los xenoinjertos óseos son ahora considerados inadecuados para el trasplante debido al riesgo real y percibido de enfermedad o transmisión de virus, infección, toxicidad asociada con la esterilización, inmunogenicidad y finalmente, rechazo por parte del tejido huésped (Porter et al., 2009).

### Generalidades del tejido óseo

Los huesos son órganos compuestos por diferentes tejidos conectivos, incluido el tejido óseo, el periostio<sup>8</sup>, las medulas óseas roja y amarilla y el endostio<sup>9</sup>; estos constituyen aproximadamente el 18% del peso corporal y desempeñan seis funciones básicas:

- Sostén: soporte a tejidos blandos y puntos de inserción para los tendones de la mayoría de los músculos esqueléticos.
- Protección: estructura para evitar lesiones en los órganos vitales.
- Asistencia en el movimiento: los músculos esqueléticos se fijan a los huesos, cuando se contraen, traccionan de estos para producir movimiento.
- Homeostasis mineral: el tejido óseo almacena diversos minerales, especialmente, calcio y fósforo, lo cual contribuye a la solidez del hueso. Los huesos liberan hacia la sangre dichos minerales para mantener el equilibrio y distribuirlos a otras partes del cuerpo.
- Producción de células sanguíneas: dentro de algunos huesos, la medula ósea roja produce glóbulos rojos, blancos y plaquetas, en un proceso denominado hemopoyesis (hemo-, de *haima*, sangre, y -poiesis, de *poieesis*, formación). La medula ósea roja consta de células sanguíneas en desarrollo, adipocitos, fibroblastos y macrófagos dentro de un tejido sostén formado por fibras reticulares.
- Almacenamiento de triglicéridos: la medula ósea amarilla está constituida principalmente por adipocitos, los cuales almacenan triglicéridos (reserva potencial de energía química)

---

<sup>8</sup> Periostio: vaina dura de tejido conectivo denso e irregular que envuelve la superficie ósea en los lugares que no están cubiertos por cartílago.

<sup>9</sup> Endostio: membrana que reviste la cavidad del interior del hueso donde se aloja la medula ósea amarilla.



El hueso al igual que otros tejidos conectivos tiene una abundante matriz extracelular (matriz osteoide) que rodea las células muy separadas unas de otras. La matriz osteoide está constituida por 25% agua, 25% fibras colágenas y 50% sales minerales cristalizadas, dentro de las últimas la más abundante es el fosfato de calcio el cual se combina con hidróxido de calcio para formar cristales de hidroxiapatita, a medida que estos se van formando se combinan también con otras sales minerales como el carbonato de calcio y iones de magnesio, flúor, potasio y sulfato. Cuando las sales se depositan en las matrices colágenas se cristalizan y el tejido se endurece en un proceso conocido como calcificación.

Adicionalmente el hueso se constituye por cuatro tipos celulares: células osteogénicas, osteoblastos, osteocitos y osteoclastos.

- Células osteogénicas: células madre no especializadas que derivan del mesénquima, tejido del cual proviene todos los tejidos conectivos. Son las únicas células óseas que realizan división celular, las células resultantes se transforman en osteoblastos.
- Osteoblastos: formadoras de hueso, sintetizan y secretan fibras colágenas y otros componentes orgánicos necesarios para construir la matriz osteoide e iniciar la calcificación, que se mencionó anteriormente. A medida que estas células se rodean con matriz osteoide van quedando atrapadas en sus secreciones y se convierten en osteocitos.
- Osteocitos: células óseas maduras responsables de mantener el metabolismo diario a través del intercambio de nutrientes y productos metabólicos con la sangre.
- Osteoclastos: células derivadas de la fusión de muchos monocitos (glóbulos blancos) y se agrupan en el endostio. La membrana plasmática de estas células se pliegan y forman un borde indentado en donde liberan poderosas enzimas lisosómicas y ácidos que digieren los componentes minerales y proteicos de la matriz subyacente, este proceso se denomina resorción, y es parte del desarrollo normal del crecimiento, mantenimiento y reparación del hueso.

Es importante considerar, que el hueso no es completamente sólido ya que tiene pequeños espacios entre sus células y componentes de la matriz osteoide. Algunos espacios constituyen espacios para los vasos sanguíneos que suministran nutrientes a las células óseas, otros espacios sirven como lugares de almacenamiento de la médula ósea roja, no obstante la forma como se distribuyen y el tamaño de estos espacios es variable, por lo que el hueso puede clasificarse en dos: compacto (80%) y esponjoso (20%).

- Compacto: componente más sólido del hueso (5–13% porosidad), posee pocos espacios. Se encuentra por debajo del periostio y forma la mayor parte de la diáfisis<sup>10</sup> de los huesos largos<sup>11</sup>. Proporciona protección, soporte y ofrece resistencia a la tensión causada por el peso y el movimiento. Los vasos sanguíneos, linfáticos y nervios atraviesan el hueso compacto. Los

---

<sup>10</sup> Diáfisis: cuerpo del hueso

<sup>11</sup> Hueso largo: predomina la longitud sobre el ancho, tienen un número de terminaciones variables y están ligeramente curvados para darles resistencia (hueso curvo absorbe el estrés del peso del cuerpo en distintos puntos para que haya una distribución uniforme de carga)

componentes del hueso compacto se organizan en unidades fundamentales denominadas osteonas o sistemas haversianos, las cuales se subdividen en cuatro partes:

- Laminillas: anillos concéntricos de matriz extracelular constituidos por sales minerales que le proporcionan rigidez al hueso y fibras colágenas que le brindan fuerza.
  - Lagunas: pequeños espacios entre las laminillas que contienen células óseas maduras, osteocitos.
  - Canalículos: son redes diminutas que se proyectan desde las lagunas, formando canales que contienen las prolongaciones de los osteocitos, estableciendo así, la vía para que los nutrientes lleguen a los osteocitos y para que estos se desprendan de los residuos metabólicos.
  - Conductos centrales (de Haver): contiene vasos sanguíneos y nervios.
- Esponjoso: (30–90% porosidad) posee láminas dispuestas en una red irregular de columnas delgadas que se denominan trabéculas, las cuales contienen laminillas, osteocitos, lagunas y canalículos. Los espacios entre las trabéculas hacen más liviano a los huesos y pueden llenarse de médula ósea roja, dichas trabéculas, parecen tener una disposición al azar, sin embargo, están orientadas a lo largo de las líneas de tensión, lo que ayuda a los huesos a resistir tensiones y transferir fuerza sin quebrarse. Este tipo de hueso constituye la mayor parte de los huesos cortos, planos e irregulares. El hueso esponjoso tiene localizarse donde los huesos no reciben fuertes tensiones o donde las tensiones se desvían en varias direcciones. Este tipo de hueso exhibe variaciones espaciales en estructura y en sus propiedades mecánicas (Tortora & Derrickson, 2008).

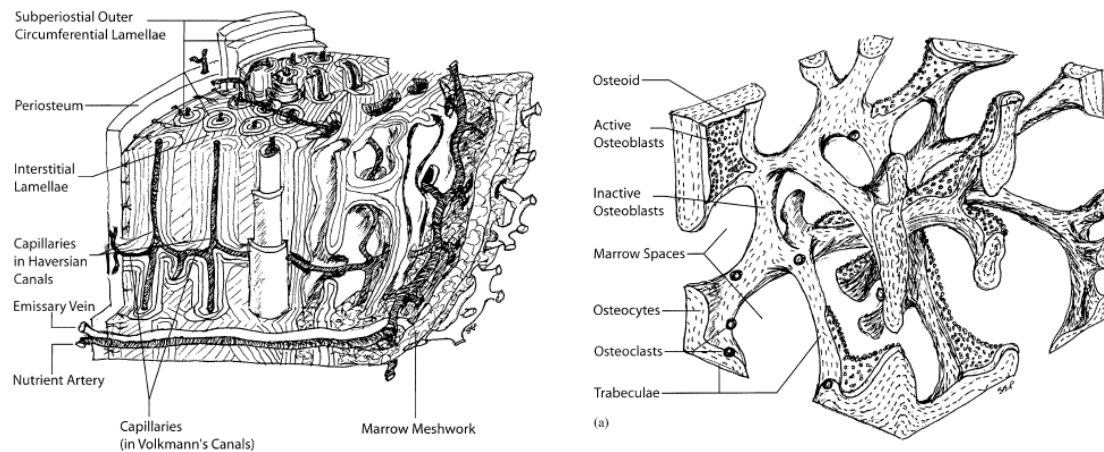


Figura 5 Hueso cortical/hueso esponjoso (Seal et al., 2001)

## Mecánica del hueso

Un regulador importante y comúnmente reportado en la fisiología ósea es la estimulación mecánica y la transducción celular (especialmente en el modelado y remodelado óseo) (Bueno & Glowacki, 2009);

diferentes condiciones de carga influyen en el desarrollo macroscópico de diversas estructuras óseas *in vivo* con formas, propiedades mecánicas y distribuciones espaciales cuidadosamente adaptadas (Stevens, 2008).

Las células óseas están profundamente influenciadas por las cargas que experimentan *in vivo*. Los mecanismos exactos por los que las células óseas responden a la estimulación mecánica se han hecho más evidentes en los últimos años, pero todavía no se entienden completamente. Existen dos modelos sugeridos: (1) cada célula ósea experimenta de manera individual y directa las fuerzas mecánicas y la sensación/respuesta es a nivel celular o (2) determinadas células óseas detectan las fuerzas mecánicas y, posteriormente generan señales bioquímicas para las células vecinas las cuales generan una respuesta, en este caso la estimulación mecánica es a nivel de tejido (Porter et al., 2009).

Debido a las diferencias estructurales entre el hueso trabecular y cortical, se exhiben propiedades mecánicas variables entre ellos como se observa en Tabla 3.

<i>Propiedad mecánica</i>	Hueso cortical	Hueso trabecular (esponjoso)	
Módulo	17 GPa	1 GPa	(Bueno & Glowacki, 2009)
	17-20 GPa Eje longitudinal		(Porter et al., 2009)
	6-13 GPa Eje transversal		(Porter et al., 2009)
		50-100 MPa	(Porter et al., 2009)
	7-30 GPa	0,05-0,5 GPa	(Lee & Shin, 2007)
Resistencia a la compresión	130-180 MPa	4-12 MPa	(Zhou et al., 2012)
	131-224 MPa Eje longitudinal		(Porter et al., 2009)
	106-131 MPa Eje transversal		(Porter et al., 2009)
	130-180 MPa	4-12 MPa	(Rezwan et al., 2006)
	100-230 MPa	2-12 MPa	(Lee & Shin, 2007)
Resistencia a la flexión	135-190 MPa		(Zhou et al., 2012)
Resistencia a la tracción	50-150 MPa	1-6 MPa	(Zhou et al., 2012)
	78-151 MPa Eje longitudinal		(Porter et al., 2009)
	51-66 MPa Eje transversal		(Porter et al., 2009)
	50-151 MPa		(Rezwan et al., 2006)
Módulo de elasticidad	12-18 GPa	0,1-0,5 GPa	(Zhou et al., 2012)
	12-18 GPa	0,1-0,5 GPa	(Rezwan et al., 2006)

**Tabla 3 Paralelo propiedades mecánicas del hueso cortical y trabecular**

Es importante resaltar que las propiedades del hueso esponjoso o trabecular varían ampliamente, y han sido reportadas como función de la densidad/porosidad de las trabéculas. La resistencia y el módulo de este tipo de hueso varía como el cuadrado de la densidad aparente. El hueso esponjoso es altamente visco elástico, lo que quiere decir que sus propiedades mecánicas dependen de la tasa de carga (Porter et al., 2009).

### 3. METODOLOGÍA

La metodología empleada para el desarrollo del proyecto es de tipo experimental y cuenta con varias etapas:

*Etapa 1-Definición de requerimientos:* en esta etapa se seleccionaron los requerimientos de porosidad, interconectividad y resistencia mecánica de las matrices tridimensionales con potencial para regeneración ósea, de manera que fueran similares a los reportados en la literatura y las propiedades del tejido óseo.

*Etapa 2-Definición de alternativas de solución:* en esta etapa se establecieron las alternativas de solución o metodológicas, lo que para este caso, consistió básicamente en la selección de un método de síntesis específico, sin embargo, es importante entender en este punto, que varias de las técnicas conocidas para la fabricación de este tipo de elementos trae consigo serias limitaciones económicas y procedimentales, de manera que se realizó la selección bajo la consideración de que se tratase de un procedimiento sencillo, de pocos pasos, que no implicara instrumentos de tecnología de alta especificidad y en el que no intervinieran reactivos muy concretos o de costos elevados.

*Etapa 3-Diseño de experimentos:* De acuerdo a la definición de alternativas de solución, se realizaron varios diseños de experimentos donde se definieron las variables de entrada y de salida. En este punto se establecieron las proporciones sal-polímero, el solvente orgánico, el rango de tamaño del cristal de sal, la solución encargada de remover la sal y la concentración de la misma, el número de lavados de la matriz, entre otros factores indispensables para definir la morfología de la estructura.

*Etapa 4-Obtención de cristales de sal y Análisis ANOVA:* se realizó un proceso de tamizaje para obtener cristales de sal en el rango de tamaño establecido previamente y se midió el tamaño por medio de microscopía óptica. Una vez obtenidos los resultados se realizó un análisis de datos por medio de ANOVA para establecer si existían diferencias significativas entre el tamaño de la sal tamizada (106-250  $\mu\text{m}$ ) y sin tamizar.

*Etapa 5-Obtención de la matriz tridimensional de PLLA:* las matrices se obtuvieron por medio del método definido en la etapa 3: *gas-foaming /salt-leaching method*, en el cual se hace uso de partículas de sal que actúan como un agente gaseoso formador de espuma y a su vez como un porógeno por lixiviación que permite que dichas matrices sean altamente interconectadas.

*Etapa 6-Characterización de las matrices:* esta etapa se subdivide en dos, entre ellas una caracterización mecánica, en la cual se realizaron ensayos de compresión con la máquina universal que permitieron calcular el módulo de Young y otras propiedades mecánicas de las matrices; y una caracterización morfológica, en la que se realizaron tres tipos de microscopía: (1) óptica, para establecer a grandes rasgos las características del material, (2) SEM para evaluar la interconectividad y porosidad de la matriz y adicionalmente, la estructura en términos de rugosidad y el tamaño del poro en la superficie. Los datos

obtenidos con cada una de ellas deben correlacionarse para determinar de manera específica el tamaño promedio del poro.

*Etapa 7-Degradación* : en esta etapa se dividió una muestra en tres piezas aproximadamente iguales, se pesaron las mismas y se procedió a depositarlas en agua, una semana y posteriormente un mes después se pesó de nuevo y se tomó el pH de las diferentes soluciones, con el fin de determinar la degradación de la matriz con ayuda de gravimetría.

*Etapa 8-Análisis de resultados*: se recolectó toda la información, se discute sobre los resultados y se hace un paralelo entre lo obtenido y lo reportado en la literatura, con el fin de establecer conclusiones de todo el proceso.

## 4. DESARROLLO DEL PROYECTO

### 4.1. Definición de requerimientos

Según los requerimientos establecidos en la literatura se determinaron varios parámetros necesarios para cumplir con los requerimientos de las matrices tridimensionales, especialmente en lo que respecta a la arquitecturas del material, pues como se ha mencionado anteriormente, ya se ha determinado que el PLLA es biocompatible y biodegradable por lo que estos requerimientos se dan por cumplidos.

Se determino que era necesario un tamaño mínimo de poro de 100  $\mu\text{m}$  y no mayor de 500  $\mu\text{m}$  (Rezwan et al., 2006; Yoon & Park, 2001; Yu et al., 2010) que permitiese la infiltración celular y la penetración vascular y con ello una exitosa histogénesis. La literatura también reporta que se requiere una porosidad entre el 70% y 90% (Porter et al., 2009; Rezwan et al., 2006) semejante a la que se evidencia en el hueso esponjoso y por otro lado, un tamaño de muestra pequeño para que no genere las preocupaciones en cuanto a degradación a las que se asocian las muestras gruesas y que fueron anteriormente mencionadas (Degradación).

### 4.2. Definición de alternativa de solución

Como se menciona anteriormente, existen múltiples métodos para crear poros o incrementar la porosidad de un biomaterial, no obstante, muchos de ellos representan altos costos y tecnología de alta especificad como la impresión 3D, el electrospinning, la unión de fibras y el gas foaming<sup>12</sup>; los cuales, considerando los parámetros de la sección anterior y el análisis planteado en la Tabla 4, debieron ser descartados por su falta de viabilidad y se estableció que los métodos que resultaban más simples para su desarrollo eran: lixiviación de partículas, separación de fases y liofilización.

	<i>Altos costos</i>	<i>Alta tecnología</i>	<i>Reactivos</i>
Impresión 3D	X	X	
<i>Electrospinning</i>	X	X	
Unión fibras		X	X
<i>Gas foaming</i>			X
Separación de fases			X
Lixiviación de partículas			

Tabla 4 Comparación de métodos asociados a factores de selección

Sin embargo, estos dos últimos métodos no permiten controlar el tamaño del poro, mientras que en la lixiviación de partículas esta es una de las principales ventajas, por lo que se definió como la metodología más factible; no obstante, como se menciona, esta técnica tradicional posee problemas en lo que respecta a la permanencia de una fracción significativa de porógeno al interior de la matriz,

<sup>12</sup> Gas foaming: Típicamente implica la exposición a dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ) bajo alta presión de un bloque pequeño del polímero hasta saturar el mismo, de manera que con un cambio de presión se produce una inestabilidad termodinámica y con ello una nucleación de poros (Huang & Mooney, 2006).

situación que puede mejorarse haciendo uso de una técnica que asocia la lixiviación de partículas con un procedimiento similar en concepto al gas foaming solo que en este caso no se requiere vacío sino de sales efervescentes que liberan dióxido de carbono y que a su vez actúan como porógeno, el cual es conocido comúnmente como *gas foaming/salt leaching method*, el cual consta de cuatro pasos como se observa en la Figura 6.

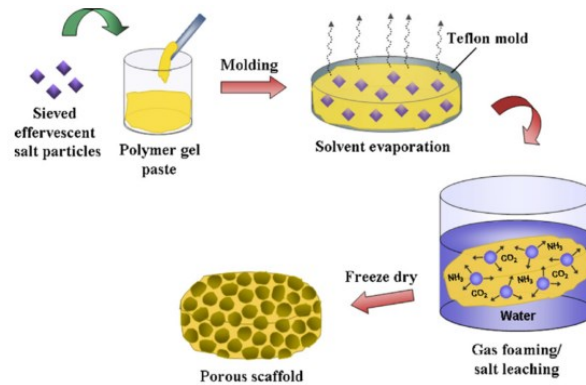


Figura 6 Paso a paso del gas foaming/salt leaching method (Chung & Park, 2007)

### 4.3. Diseño de experimentos

Para el diseño experimental de la obtención de las matrices poliméricas se mantuvo constante la concentración de polímero, la concentración del solvente, la temperatura de secado, el tamaño de la muestra, el tiempo de liofilización, entre otros. Además, se definieron las variables de entrada y de salida de la siguiente forma:

- Variables de entrada: tamaño del cristal de sal, proporción sal-polímero y concentración solución de ácido cítrico.
- Variables de salida: porosidad y tamaño de poro.

De manera que se distinguirán dos tamaños de sal, 106-250  $\mu\text{m}$  y 200-750  $\mu\text{m}$  (sin macerar/tamizar); dos proporciones de sal, 10:1 y 5:1; y tres concentraciones de ácido cítrico, 20%, 40% y 80%; con lo cual se determinaron un total de seis tratamientos:

Nº	Tratamiento	Tamaño del cristal de sal	Proporción de sal	Concentración ácido cítrico
1	20% PLLA sin tamizar	200-750 $\mu\text{m}$	10:1 $(\text{NH}_4)\text{HCO}_3$ :PLLA	20%
2	40% PLLA sin tamizar	200-750 $\mu\text{m}$	10:1 $(\text{NH}_4)\text{HCO}_3$ :PLLA	40%
3	80% PLLA sin tamizar	200-750 $\mu\text{m}$	10:1 $(\text{NH}_4)\text{HCO}_3$ :PLLA	80%
4	20% PLLA tamizado	106-250 $\mu\text{m}$	5:1 $(\text{NH}_4)\text{HCO}_3$ :PLLA	20%
5	40% PLLA tamizado	106-250 $\mu\text{m}$	5:1 $(\text{NH}_4)\text{HCO}_3$ :PLLA	40%
6	80% PLLA tamizado	106-250 $\mu\text{m}$	5:1 $(\text{NH}_4)\text{HCO}_3$ :PLLA	80%
7	20% PLLA-HA	106-250 $\mu\text{m}$	5:1 $(\text{NH}_4)\text{HCO}_3$ :PLLA 1:3 HA: PLLA	20%

Tabla 5 Tratamientos



Se debe resaltar que se obtuvo un total de diez muestras, una por cada uno de los tratamientos 1-3 y dos por cada uno de los tratamiento 4-6, adicionalmente se obtuvo una muestra con el tratamiento número siete, el cual difiere de todos los demás ya que incluye la adición de micropartículas de hidroxiapatita (HA), que es un componente natural del hueso y que al añadirse a la matriz mejora las propiedades mecánicas y actúa como agente osteoconductor (Kothapalli, Shaw, & Wei, 2005).

#### **4.4. Obtención de cristales de sal y Análisis ANOVA**

##### **4.4.1. Obtención cristales de sal**

Para las matrices de los tratamientos 1-3 se uso cristales de bicarbonato de amonio en su presentación comercial, los cuales fueron observados por medio de microscopia óptica (5X) para determinar el tamaño. No obstante, para los tratamientos 4-7 se requirió un tamaño de cristal de sal que cumpliera los requerimientos expuestos en Definición de requerimientos, para lo cual fue necesario macerar la sal al interior de una cámara ambiental Ascent® Max (ESCO, EE.UU) y posteriormente separar los cristales en este rango haciendo uso de dos tamices de latón (aleación cobre-zinc) y acero (SOILTEST INC., EEUU) con un límite superior de apertura de 250  $\mu\text{m}$  y uno inferior de 106  $\mu\text{m}$ .

##### **4.4.2. Análisis de datos (ANOVA)**

Para determinar si existían diferencias significativas entre los tamaños de sal tamizada y sin tamizar previamente obtenida, se tabularon los datos de la microscopia y se uso un análisis de varianza ANOVA con ayuda del software STATGRAPHICS Centurion XV. Para este se establecieron las siguientes condiciones de experimento: se eligió un diseño unifactorial con una sola variable respuesta y una sola variable predictorica (categórica) con dos niveles.

- Variable respuesta Y: tamaño de grano
- Variable predictorica X: uso de determinado tamiz
- Número de muestras por variable predictorica: 10 granos

Una vez definidos los parámetros del experimento, se hizo un análisis de normalidad con el estadístico shapiro-Wilks para determinar si la población de granos de sal se podía evaluar por una distribución paramétrica (normal) o si era necesario hacerlo por una distribución no paramétrica (no normal o libre). Luego, se realizó el análisis de variabilidad para determinar diferencias entre las medias de las poblaciones de granos de sal. El experimento se realizó con un factor de confianza de 0,05, lo que significa, que la confiabilidad del experimento fue del 95% de veracidad.

#### 4.5. Obtención de las matrices poliméricas de PLA.

Para la síntesis de matrices de PLLA se hizo uso de cloroformo, bicarbonato de amonio y ácido cítrico en solución en tres concentraciones diferentes. El cloroformo, triclorometano o tricloruro de metilo ( $\text{CHCl}_3$ ) se escogió dado que es uno de los disolventes de PLLA mas ampliamente reportados en la literatura<sup>13</sup>.

Para el trabajo con los compuestos mencionados, fue necesario considerar su potencial nocivo al ser inhalados, ingeridos o al entrar en contacto con la piel por lo que se uso una cámara ambiental Ascent® Max (ESCO, EE.UU) para el trabajo con las mismas. Durante el proceso de obtención se siguieron los pasos expuestos en el diagrama de la Figura 7, que se describen de forma detallada en el protocolo del ANEXO 1.

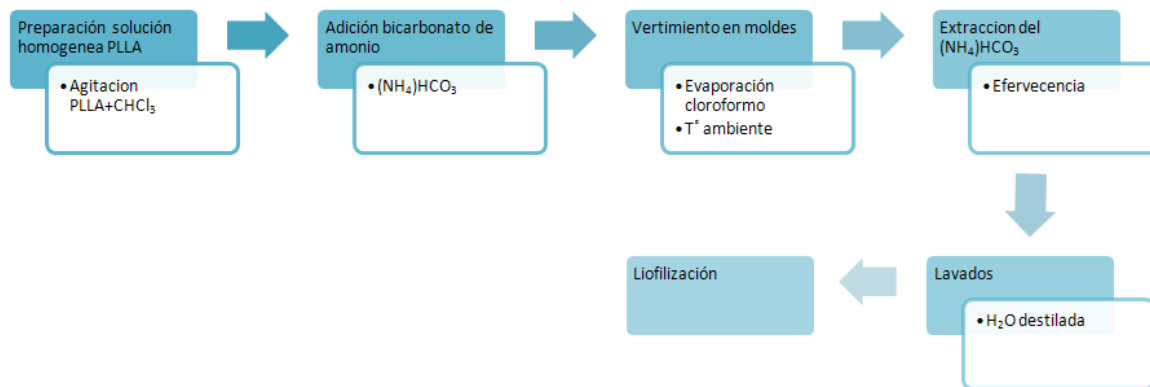


Figura 7 Diagrama de bloques procedimiento de obtención de matrices PLLA

Para el tratamiento siete se realizó el mismo procedimiento que se describe en la Figura 7 con un paso adicional, en el que se añade hidroxiapatita en la proporción 1:3 HA:PLLA; justo después de adicionar la sal y homogenizar, luego se procede a homogenizar de nuevo y se continúa como se menciona. Es importante aclarar que las micropartículas de hidroxiapatita se obtuvieron tras realizar el protocolo expuesto en el ANEXO 2.

#### 4.6. Caracterización de las matrices

##### 4.6.1. Caracterización mecánica

Las muestras empleadas correspondieron a pequeños cilindros de aproximadamente 4 mm de diámetro y 2 mm de altura para los tratamientos 1-6 y cilindros con el mismo diámetro pero una altura de aproximadamente 0,5 mm para el tratamiento 7, estos se obtuvieron con al cortar con un troquel las matrices obtenidas del protocolo de síntesis (ANEXO 1) que tenían un diámetro de 25 mm. Las

<sup>13</sup> Se encontró el uso de cloroformo como solvente del PLLA en los trabajos: (Charles-Harris et al., 2007; Chung & Park, 2007; El-Kady et al., 2010; Nam, Yoon, & Park, 2000; Yoon & Park, 2001; Zhou et al., 2012)

dimensiones precisas de cada una de estas muestras se midieron con un calibrador digital (Mituoyo, Japón).

La caracterización mecánica de las matrices se realizó mediante pruebas de compresión en la máquina universal de ensayos Instron 3345 (INSTRON, EEUU), con un celda de carga de de 10 N  $\pm$  0,01N y se registro la resistencia a la compresión hasta que la muestra fuese desplazada 1 mm a una velocidad de 5 mm/min, no obstante, el ensayo se detiene si la fuerza medida supera la capacidad de la celda de carga antes de lograr el desplazamiento establecido. Para el tratamiento número siete, las muestras solo fueron desplazadas 0,2 mm dado que dichas muestras no tenían una altura mayor a 1mm, los demás parámetros se conservaron iguales.

El modulo de Young se calculo con base en a la grafica esfuerzo vs extensión dado que durante la prueba de compresión se supero la capacidad de la celda, para ello se tiene:

$$E = \frac{Esfuerzo_2 - Esfuerzo_1}{Extensión_2 - Extensión_1}$$

Ecuación 2 Módulo de Young

#### 4.6.2. Caracterización morfológica

##### Microscopia óptica

Las muestras empleadas en la microscopia óptica correspondieron a pequeños cilindros con 25 mm de diámetro y aproximadamente 5 mm de alto, obtenidas luego del proceso de liofilización (secado), a las cuales no se les realizó ninguna modificación física, química o biológica.

Para estos ensayos se empleo un microscopio óptico Eclipse LV100 (Nikon, Japón). Durante los ensayos las muestras se observaron directamente, es decir, sin ningún objeto entre la muestra y los objetivos (5X, 10X, 20X), bajo el modo de luz reflejada.

Adicionalmente se hizo uso de la opción de reconstrucción de superficie del software NIS Elements 3.1D (Nikon, Japón), con el cual se observa a grandes rasgos la morfología de la superficie, en esta es posible diferenciar la presencia de poros en la superficie y las diferentes profundidades de estos, no obstante las microscopias SEM y AFM se realizaron con el fin de obtener mayor detalle de estos parámetros.

##### Microscopia SEM

Con el fin de conocer los detalles de las características morfológicas de las matrices de PLLA, se obtuvieron microfotografías en un microscopio electrónico de barrido SEM JEOL JSM-6490LV (JEOL, Japón), a un voltaje de aceleración de 10 kV. Las muestras usadas en esta caracterización fueron pequeños trozos cuadrados de 4X4 mm que se cortaron de las matrices obtenidas con el protocolo de

síntesis (ANEXO 1), los cuales se recubrieron con una fina capa de oro, en una cámara en atmósfera de argón al vacío Denton vacuum Desk IV (Denton vacuum , EEUU).

Adicionalmente para la muestra correspondiente al tratamiento 7, muestra 20% PLLA-HA, se hizo uso del modo de EDS o EDX, espectrometría de dispersión de energía de rayos X, el cual permite identificar la composición química de una muestra o un área de interés de la misma, en este modo la muestra es expuesta a un haz de electrones que colapsan con otros en la muestra expulsándolos de sus orbitales, las posiciones disponibles son ocupados por electrones de mayor energía que emiten rayos X característicos de cada elemento en el proceso (Dee, Puleo, & Bizios, 2002). Con este modo se analizó si los cristales presentes en la muestra correspondían a hidroxapatita o bicarbonato de amonio. Para seleccionar las áreas de interés y procesar los resultados se hizo uso del software INCA Suite 4.09.

### **ATR-FTIR: Espectroscopia infrarroja por transformada rápida de Fourier**

Se evaluó la composición de las matrices de PLLA (concentración de sal 5:1) obtenidas previamente, según los tratamientos definidos, por medio de un espectrómetro infrarrojo por transformada rápida de Fourier (Perkin Elmer, EEUU), con accesorio ATR (Reflectancia Total Atenuada) con el cual se analizan las vibraciones moleculares inducidas por la radiación al exponer las muestras en un rango de frecuencias de  $4000\text{ cm}^{-1}$  a  $650\text{ cm}^{-1}$ . Adicionalmente y a manera de control, se obtuvieron los espectros del PLLA en pellet y el bicarbonato de amonio.

Haciendo uso de esta técnica se analizó además, la composición del agua destilada en la cual permanecieron las muestras de los ensayos de hinchamiento con el fin de detectar algún rastro de PLLA como muestra del inicio de la degradación; para ello fue necesario tomar trozo de papel (celulosa) y sumergirlos en el agua para posteriormente leerlos, debido a la dificultad de obtener el espectro con muestras líquidas. A manera de control se tomó el espectro de la celulosa sin sumergir y celulosa con agua destilada, con el fin de observar las diferencias y asociarlas al espectro del PLLA de las matrices tridimensionales.

### **Hinchamiento**

El hinchamiento o absorción de agua de las muestras de PLLA fue obtenido por ensayos de gravimetría para los cuales se siguieron los siguientes pasos: las matrices de PLLA (concentración de sal 10:1) fueron preparadas en forma cilíndrica como se mencionó anteriormente, con unas dimensiones de 2.5 cm de diámetro y aproximadamente 0.2 cm de altura, de la mitad de cada una de estas muestras se cortó tres sectores circulares de tamaños similares como se observa en la Figura 8 con el fin de obtener replicados del ensayo.



**Figura 8 Muestras hinchamiento**

Después se pesaron las muestras secas con una balanza analítica (Denver instruments, EEUU), y posteriormente se depositó cada una de ellas en 10 mL de agua destilada, conservando todas a temperatura ambiente. Luego de ciertos intervalos de tiempo las muestras se sacaron del agua, se retiró el exceso de este líquido con un papel filtro y finalmente se pesaron de nuevo. Con esta información se obtiene el peso seco ( $W_0$ ) y el peso húmedo ( $W_t$ ) que permiten calcular el porcentaje de hinchamiento como:

$$\%Hinchamiento = \frac{\text{peso húmedo} - \text{peso seco}}{\text{peso seco}} \times 100 = \frac{W_t - W_0}{W_0} \times 100$$

**Ecuación 3 Porcentaje de hinchamiento (Hsieh, Chang, & Lin, 2007)**

### **Pérdida de peso (degradación)**

El porcentaje de pérdida de peso, el cual es un indicativo de degradación de la matriz, fue obtenido por ensayos de gravimetría, para los cuales se consideraron los datos de peso seco ( $W_0$ ) usados para calcular el porcentaje de hinchamiento. Por otra parte, los valores de los pesos húmedos ( $W_{tp}$ ) en este caso hacen referencia a un peso seco tras someter la muestra a hinchamiento; por lo que para obtener estos datos, se secaron las muestras sometidas a hinchamiento en un horno a 40°C por un periodo de 24 horas, luego se pesaron y se calculó como:

$$\%Perdida\ de\ peso = \frac{\text{peso seco} - \text{peso húmedo}}{\text{peso seco}} \times 100$$

**Ecuación 4 Porcentaje de pérdida de peso (Hsieh, Chang, & Lin, 2007)**

Adicionalmente, se midió el pH del agua en las que permanecieron las muestras de hinchamiento, con pHmetro sensION3 (HACH, EEUU), en busca de cambios como indicativo de degradación.

### **Porosidad**

Para determinar la porosidad de las matrices tridimensionales, la masa (M) fue medida y el volumen ( $V_m$ ) de las muestras preparadas fue calculado. Al dividir M por la densidad del polímero, en este caso 1.36 g/cm<sup>3</sup> ( $\rho$ ), se obtiene el volumen de la matriz. Con esta información es posible calcular la porosidad de la siguiente ecuación:

$$\%Porosidad = \frac{V_m - V_p}{V_m} \times 100 = \frac{V_m - (M/\rho)}{V_m} \times 100$$

**Ecuación 5 Porosidad (Hsieh, Chang, & Lin, 2007)**

Este porcentaje de porosidad fue calculado para las muestras de todos los tratamientos, no obstante, las muestras de los tratamientos 1-3 tienen una forma de segmento circular (Figura 8) y las de los tratamientos 4-7 fueron pequeños cilindros de aproximadamente 4 mm de diámetro y 2 mm de altura.

## 5. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

### 5.1. Obtención de cristales de sal y Análisis ANOVA

#### 5.1.1. Obtención de cristales

De las imágenes microscópicas de los granos de sal (Figura 9 y Figura 10) se observan unos de mayor tamaño para la sal sin tamizar y otros de menor tamaño para la sal tamizada como era de esperarse. Para la sal tamizada se observaron granos en el rango establecido (106-250  $\mu\text{m}$ ) y para la sal sin tamizar se diferencian granos de 212,64  $\mu\text{m}$  hasta de 762,02  $\mu\text{m}$ , por lo que se estableció un rango aproximado de 200-750  $\mu\text{m}$ , de manera que era de esperarse poros en un rango de 106-250  $\mu\text{m}$  para los tratamientos 4-7 y poros de 200-750  $\mu\text{m}$  para las muestras de los tratamiento 1-3. Es importante destacar que la forma de estos cristales no es bien definida y por lo tanto, se espera que la forma del poro tampoco lo sea.

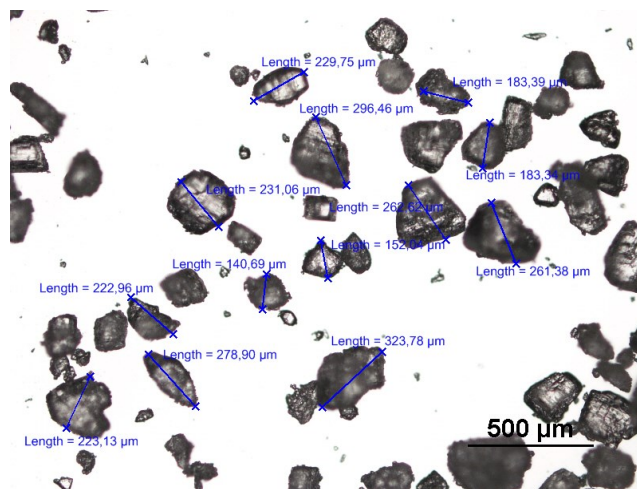


Figura 9 Microscopia óptica, Sal tamizada (106-250  $\mu\text{m}$ )

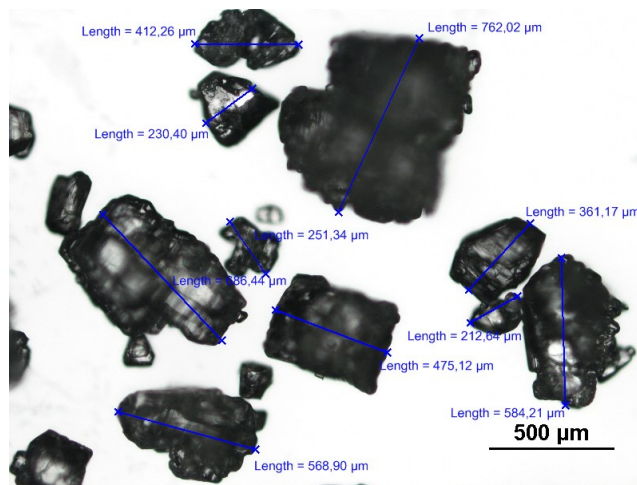


Figura 10 Microscopia óptica, Sal sin tamizar

### 5.1.2. Análisis de datos

Para la siguiente distribución de datos (Tabla 6), se utilizaron las siguientes hipótesis:

$H_0$ : No hay diferencia entre las medianas de los tamaños de granos pasados por el tamiz y sin el tamiz.

$H_1$ : Hay diferencia entre las medianas de los tamaños de granos pasados por el tamiz y sin el tamiz.

	X: tamizaje	Y: tamaño de grano
No tamizada	1	412,26
	1	230,40
	1	762,02
	1	361,17
	1	251,34
	1	584,21
	1	475,12
	1	212,64
	1	686,44
	1	568,90
Con tamiz	2	183,39
	2	183,34
	2	231,06
	2	223,13
	2	222,96
	2	140,69
	2	152,04
	2	231,06
	2	229,75
	2	261,38

Tabla 6 Tamaño de grano bicarbonato de amonio (1: sin tamiz, 2: con tamiz)

Al realizar el análisis de normalidad con el estadístico Shapiro-Wilks (Figura 11) se observó que la mayoría de los puntos se alejan de la línea de tendencia, lo que indica que el conjunto de datos no sigue una distribución normal, esto se ratifica dado que el valor p obtenido para dicho análisis es de 0,0011, el cual es menor que 0,05 (valor de significancia establecido).

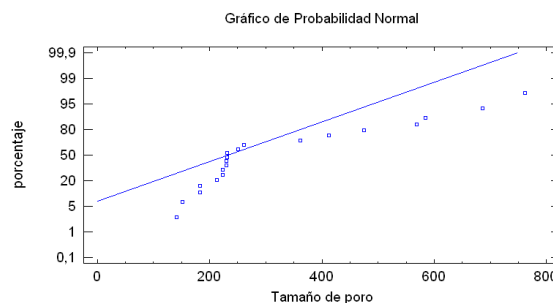


Figura 11 Análisis de normalidad

Con base en estos resultados se decidió trabajar con una distribución no paramétrica con la cual se realizó el análisis de variabilidad, la prueba usada fue la de Kruskal-Wallis con la que se obtuvo un valor p de 0,00248662 el cual es menor que 0,05, por lo tanto se rechaza la hipótesis nula ( $H_0$ ) y se acepta la hipótesis  $H_1$ , que para el experimento indica que las medianas de las poblaciones hay una diferencia, además se encuentra que el tamaño de los granos que no se tamizo era aproximadamente 2,2 veces más grande que el tamaño de los granos tamizados (véase Rango promedio. Tabla 7)

Tamizaje	Tamaño Muestra	Rango Promedio
1	10	14,5
2	10	6,5

Tabla 7 Prueba de Kruskal-Wallis para Tamaño de poro

Adicionalmente se tiene la prueba de múltiples rangos (Tabla 8), con la que se obtiene que las dos poblaciones estudiadas no son grupos homogéneos y mediante la cual se confirma la existencia de una diferencia significativa. Con base en estos datos se verifica además la proporción entre los tamaños medios y se establece que los granos contenidos en el rango de 74,33-337,43  $\mu\text{m}$  presentan una diferencia significativa comparados con el grupo 1 (no tamizada) pero se consideran iguales al grupo 2 (tamizada 106-250  $\mu\text{m}$ ), lo que es un indicativo que si se requirieran matrices con poros controlados en un rango específico pero diferente al ya establecido, debe usarse un nuevo rango que se encuentre fuera del ya mencionado.

En los gráficos de caja y bigotes, medianas y dispersión por código de nivel (Figura 12, Figura 13, Figura 14) se evidencia de manera particular que los grupos estudiados son diferentes, como ya se ha mencionado, en ellos se observa con claridad que los valores de las medianas no se cruzan.

Tamizaje	Casos	Media	Grupos Homogéneos
2	10	205,88	X
1	10	454,45	X

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
1 - 2	*	<b>248,57</b>	131,55

\* indica una diferencia significativa.

Tabla 8 Prueba de múltiples rangos para tamaño de poro

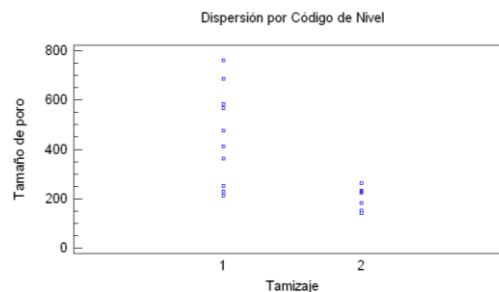


Figura 12 Dispersión por código de nivel



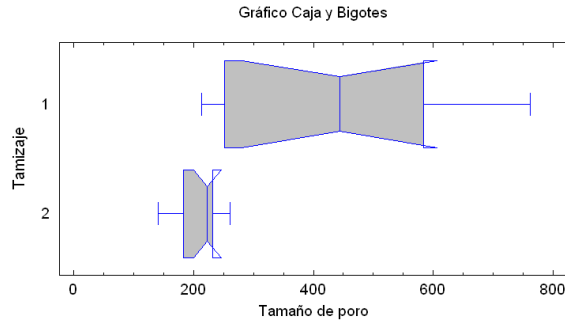


Figura 13 Caja y bigotes

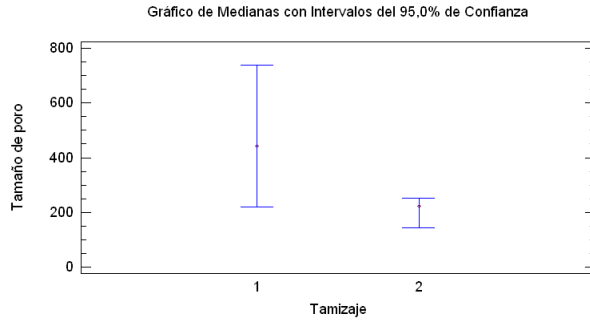


Figura 14 Grafico de medianas

## 5.2. Obtención de las matrices poliméricas de PLLA

Para las matrices que se sintetizaron en un inicio, es decir, PLLA con una proporción 10:1 de sal de bicarbonato de amonio y un tamaño de grano de 200-750  $\mu\text{m}$ , se hizo uso de dos formas de extracción del porógeno (1) ácido cítrico para tres muestras y (2) agua destilada a 90°C para una muestra. Se observó que todo este lote tenía una estructura esponjosa, en el que se percibía una gran cantidad de poros y que su manipulación era altamente delicada, pues estas se desintegraban en trozos más pequeños muy fácilmente, por lo que desde un punto de vista práctico no eran suficientemente fuertes. Adicionalmente, se observó a través de microscopia óptica que la matriz procesada con agua destilada a 90°C, presentaba fisuras en la estructura polimérica, que podrían deberse a un choque térmico y que por ello no presentarían propiedades mecánicas suficientes y se decidió eliminar esta muestra del resto de las caracterizaciones.

De las matrices de PLLA con una proporción 5:1 de sal, se observó una estructura más compacta, que permitía una fácil manipulación y no se desintegraban en trozos más pequeños, por lo que cumplen con el requerimiento básico en lo que respecta a las propiedades mecánicas. Adicionalmente se aprecian con esfuerzo algunos poros muy pequeños. La muestra correspondiente al tratamiento número siete, presenta un color blanco más traslúcido que las demás, debido a que presenta un menor espesor, además se aprecian pequeños puntos blancos en toda correspondientes a las micropartículas de hidroxiapatita, que hacen que la superficie sea áspera. Esta muestra es completamente compacta, se percibe mucho más rígida que los tratamiento 4-6 y por lo tanto que los tratamientos 1-3.

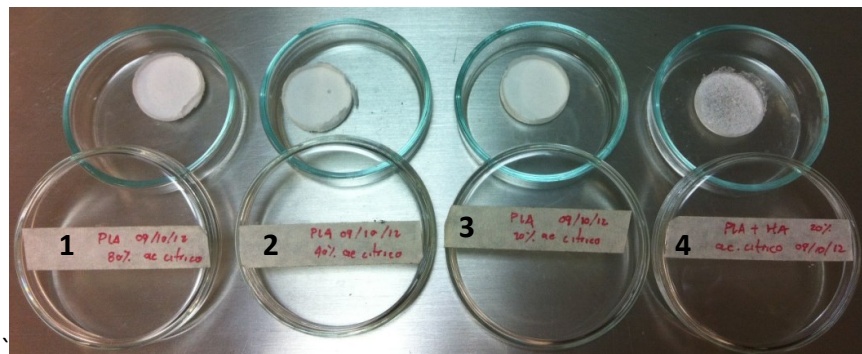


Figura 15 Muestras tratamiento 4-6 (1) 20% PLLA macerada (2) 40% PLLA macerada (3) 80% PLLA macerada (4) 20% PLLA-HA

Todas las muestras presentaron un color blanco pese a que la solución polimérica presenta un color amarillo-cristalino. Es importante destacar que los bordes y la superficie inferior de todas ellas presentaron una topografía diferente, pues estas superficies se adhieren al molde en el proceso de obtención, de manera que son más lisas, uniformes y presentan un color un poco más brillante.

### 5.3. Caracterización de las matrices

#### 5.3.1. Caracterización mecánica

Los resultados de las pruebas de compresión se muestran en la Tabla 9. En ellos se evidencia un aumento en el módulo de Young o módulo de elasticidad a medida que se aumenta la concentración de ácido cítrico usado para extraer los cristales de sal, esto quiere decir, que las matrices son más rígidas cuando la concentración de ácido cítrico es menor. Esto indica también que la rigidez es mayor cuando los porcentajes de porosidad son menores, pues como se evidencia más adelante la porosidad aumenta a medida que se aumenta la concentración de ácido cítrico.

Muestra	Probeta	Tratamiento	Diámetro (mm)	Altura (mm)	Modulo (MPa)	Modulo promedio
1	1	20% PLLA tamizada	4,11	1,57	38	42,967 MPa
	2		3,96	1,63	50,5	
	3		4,44	1,81	40,4	
2	4	40% PLLA tamizada	3,97	1,48	26,6	30,400 MPa
	5		3,8	1,7	26,4	
	7		3,79	1,05	38,2	
3	1	80% PLLA tamizada	3,89	2,19	13,2	13,267 MPa
	2		4,03	1,43	14,7	
	3		3,69	1,74	11,9	
4	17	PLLA-HA	3,73	0,52	Gráfica no válida	100,000 MPa
	18		3,86	0,50	100	
	19		3,76	0,34	Gráfica no válida	

Tabla 9 Muestras pruebas de compresión (sal macerada | concentración 5:1)

Los módulos aquí mostrados dan una idea del comportamiento que tendría una matriz al implantarse y someterse a cargas, con base en ellos se puede decir que la matriz 20% PLLA soportaría cuatro veces más carga que la matriz 80% PLLA y que la matriz 40% PLLA soportaría aproximadamente tres veces más carga que la matriz 80% PLLA.

Es importante en este punto aclarar que aunque las matrices de 40% y 80% PLLA presentan, como se muestra más adelante, una porosidad y un tamaño de poros bastante similares, la distribución de los

mismos puede ser diferente, de manera que la matriz 40% PLLA presentaría una distribución más uniforme pues su módulo es mucho mayor y por lo tanto, la distribución de fuerzas es similar para todos los puntos.

Para el tratamiento número siete se obtuvo un módulo mucho mayor comparado con los demás, pues como era de esperarse la hidroxiapatita mejoraría las propiedades mecánicas al incrementar la rigidez (resistencia a la carga sin deformarse) como aquí se muestra.

### 5.3.2. Caracterización morfológica

#### Microscopia óptica

La microscopia óptica solo permite ver a grandes rasgos la topografía de las matrices, se evidencia la presencia de poros pero no es posible distinguir el tamaño de los mismos, adicionalmente se observa la presencia de rugosidad en la muestras pues se distingue algunos leves cambios de nivel o planos. Como se observa en las Figura 16, Figura 17 y Figura 18 el detalle de la morfología no es evidente y las muestras lucen iguales, no se pueden establecer diferencias entre ellas, por lo que se realizaron las reconstrucciones tridimensionales de estas muestras. En dichas reconstrucciones se observa para todas las muestras la presencia de rugosidad, pero se debe destacar que la cantidad de poros presentes en la muestra de 20% ácido cítrico, es decir, la cantidad de picos y depresiones, es menor comparado con las demás muestras, mientras que las de 40% y 80% ácido cítrico son bastantes similares entre ellas.

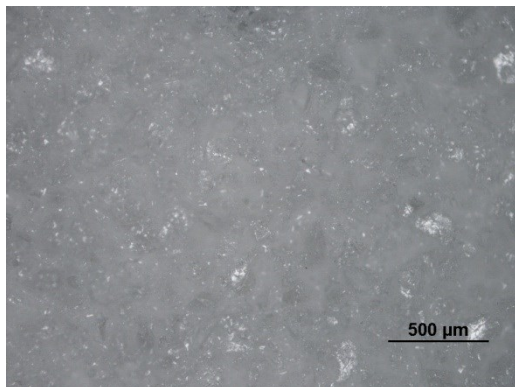
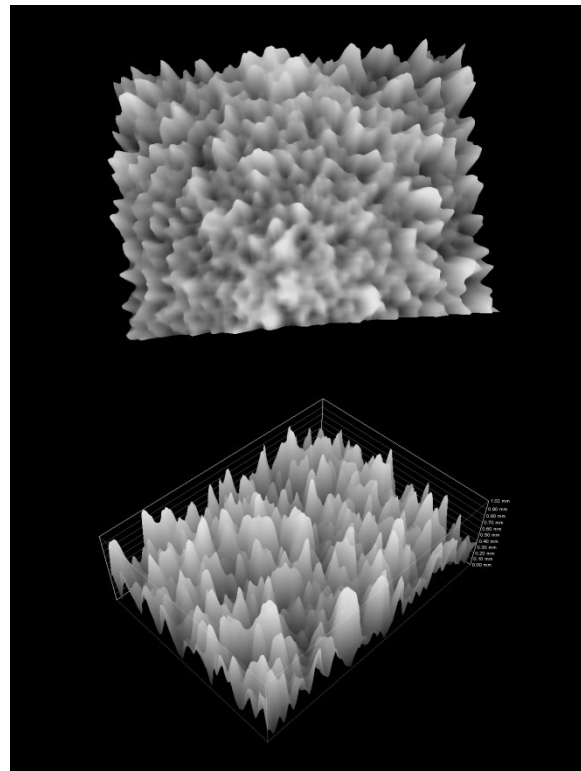
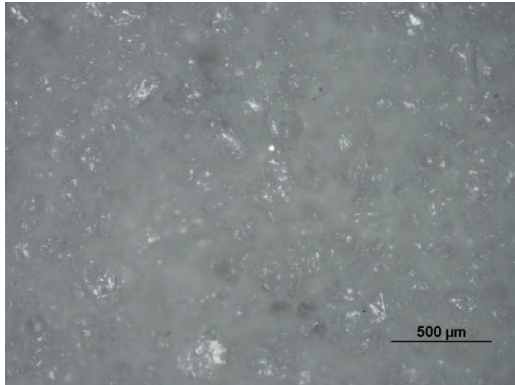
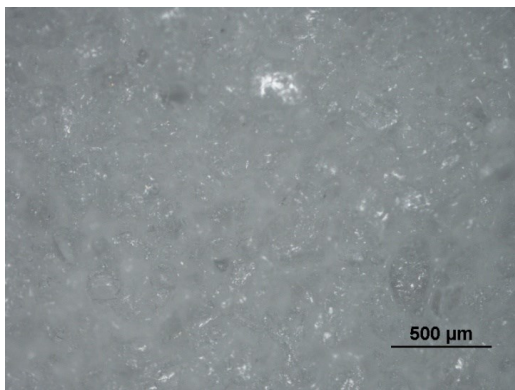
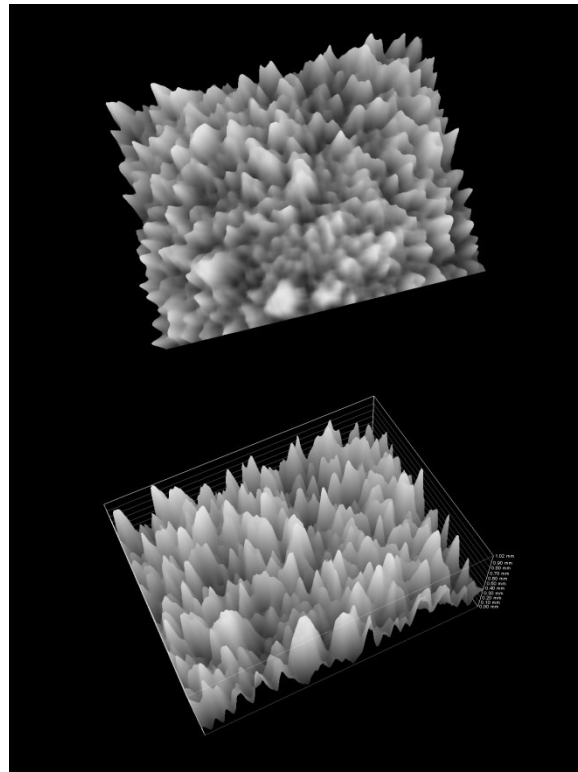


Figura 16 20%PLLA tamizada

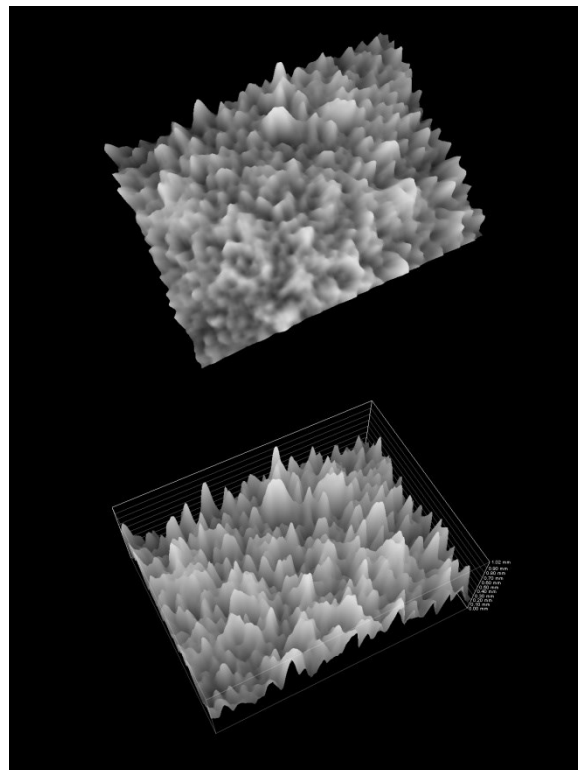




**Figura 17 40% PLLA tamizado**



**Figura 18 80% PLLA tamizado**





La microscopía óptica resultó de gran utilidad para establecer la formación de una capa polimérica superficial no deseada (inhibe la adhesión y proliferación celular) como se evidencia en la Figura 19. En estas imágenes se observa claramente una fina capa de polímero que no tiene agujeros o poros, sino que tiene una abundante cantidad de estructuras semicirculares de diferentes tamaños como si el poro no hubiese abierto, este fenómeno se observó cuando los granos de sal se precipitaron durante el proceso de evaporación del solvente.

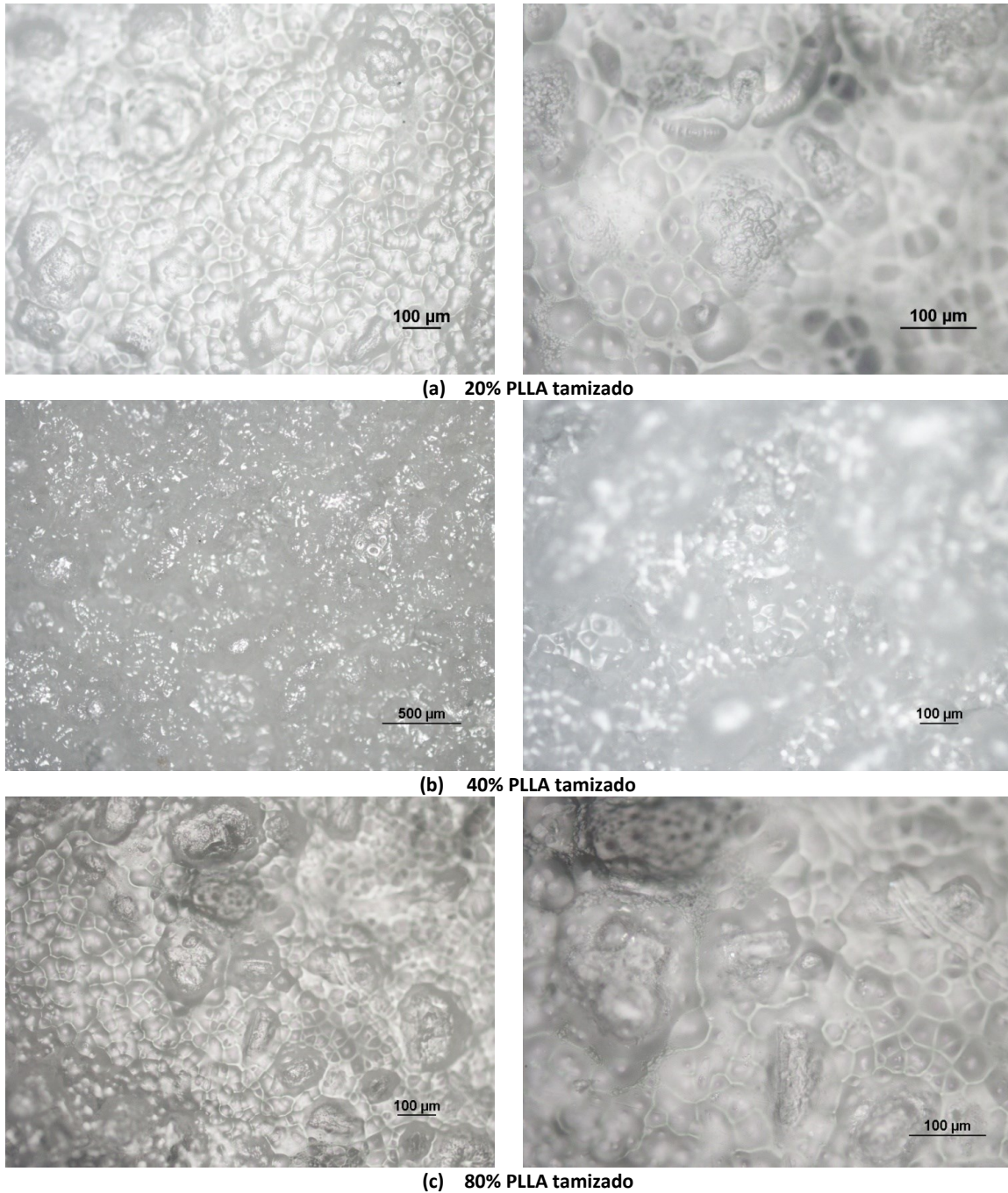


Figura 19 Matrices con capa polimérica superficial

Por otro lado, para el caso particular del tratamiento número siete, la microscopía óptica no permite diferenciar la estructura de la matriz polimérica debido a la presencia de las micropartículas de HA, sin embargo al realizar la reconstrucción se observa claramente la rugosidad y la presencia de poros en la superficie de la mismas (Figura 20).

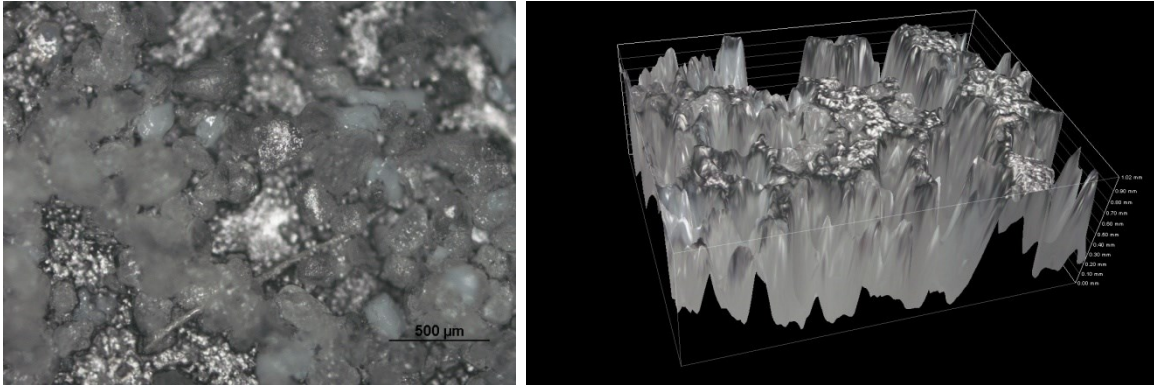
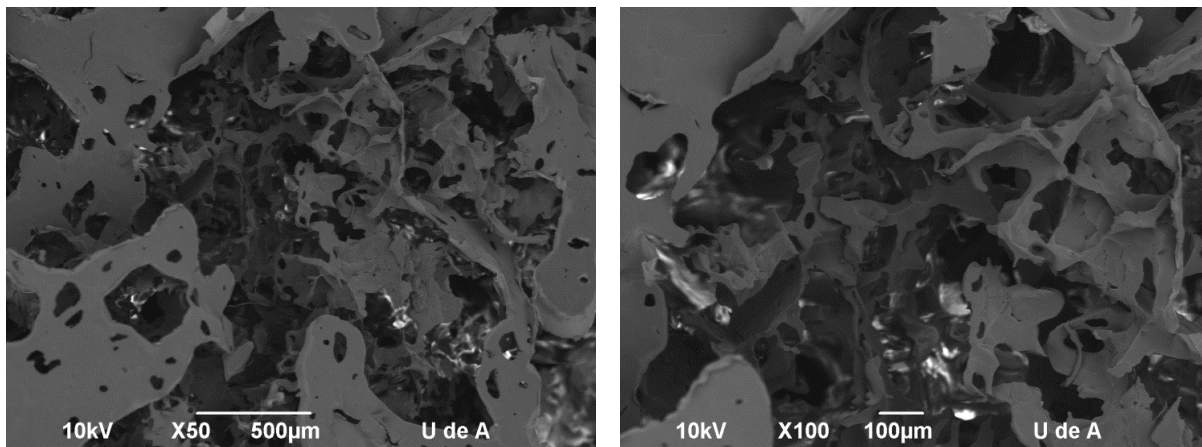


Figura 20 Muestra-tratamiento 7

### Microscopía SEM

Se realizó microscopía electrónica de barrido para todas las muestras y se observó de manera general una distribución no homogénea de los poros, además de la presencia de agujeros más grandes que el tamaño de sal (porógeno) usado, lo cual puede deberse a que varios granos de sal se hayan agregado en un solo punto. Particularmente se evidencia la presencia de una microporosidad en todas las estructuras que podría resultar ser un beneficio si la matriz se implantase, pues la estructura ósea presenta una característica similar.

De manera más específica para los tratamientos 1-3 (Figura 21), no es posible establecer diferencias en lo que respecta a porosidad pues todas presentan una estructura muy similar, en la que logra evidenciarse una alta porosidad y corroborar la presencia de un tamaño de poro entre 200-750 µm. Es importante notar que la distribución de poros es heterogénea.



20% PLLA sin tamizar

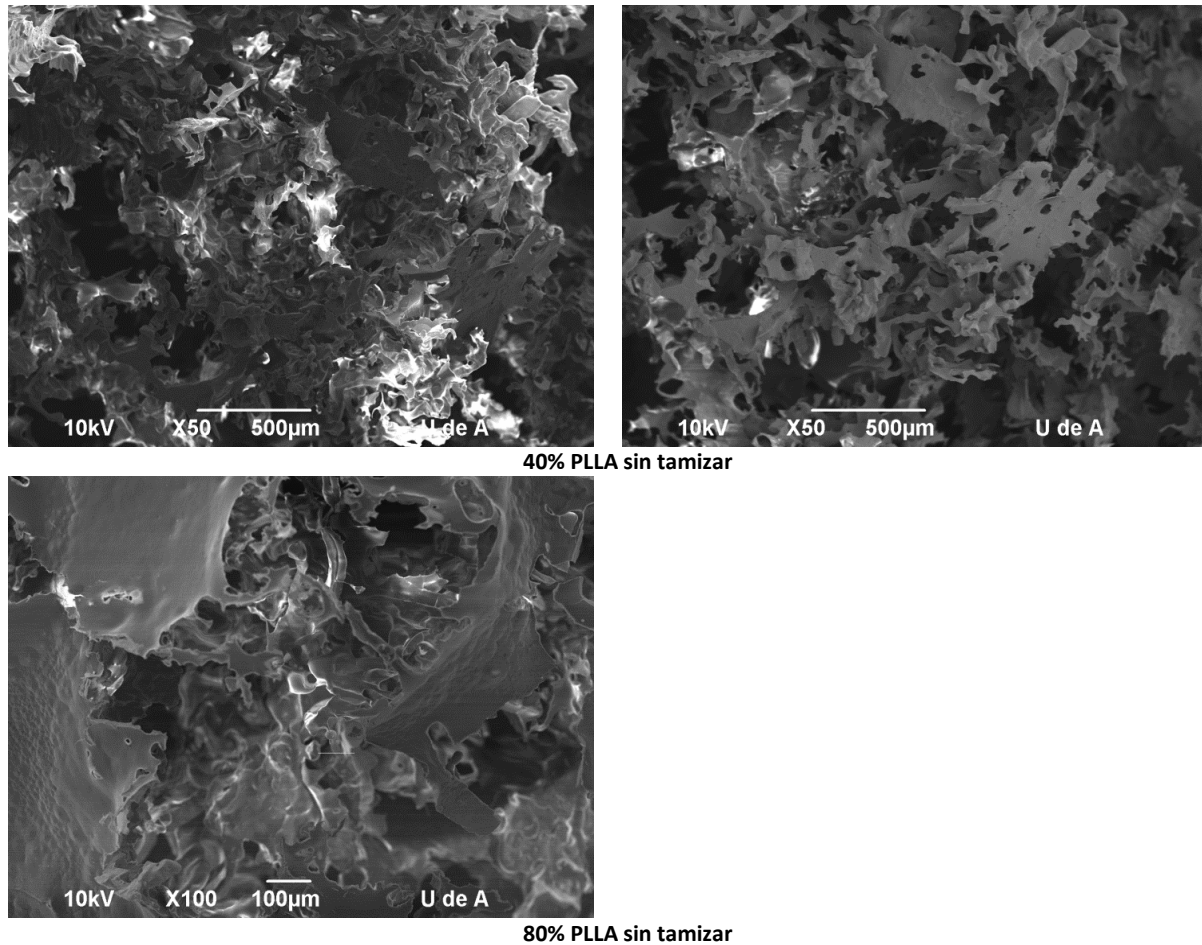


Figura 21 SEM matrices PLLA sin tamizar

Para los tratamientos 4-6 (Figura 22-Columna 1) se puede evidenciar una estructura altamente porosa, con tamaños de poro que se encuentran en el rango establecido (106-250  $\mu\text{m}$ ) y distribuidos de manera heterogénea, aunque más homogénea que los tratamientos expuestos anteriormente (tratamientos 1-3). Además, se observa la presencia de una microporosidad con un tamaño de poro de aproximadamente 10  $\mu\text{m}$  (Figura 22-Columna 2), esta microporosidad podría favorecer la adhesión celular pues el hueso también posee esta característica, sin embargo, las propiedades mecánicas también podrían estar comprometidas. Es importante notar que la microscopía SEM se realizó sobre cortes transversales de las matrices, de manera que es posible observar cómo se muestra en la Figura 22 (Columna 3) una distribución de poros unidos los unos con los otros, conectando la superficie con el interior de las matrices, lo que pauta claramente que dichas matrices poseen poros interconectados (alta interconectividad) de manera que si se implantase, el crecimiento celular, la formación de matriz extracelular, el intercambio de nutrientes y la eliminación de residuos de degradación se presente de manera uniforme.



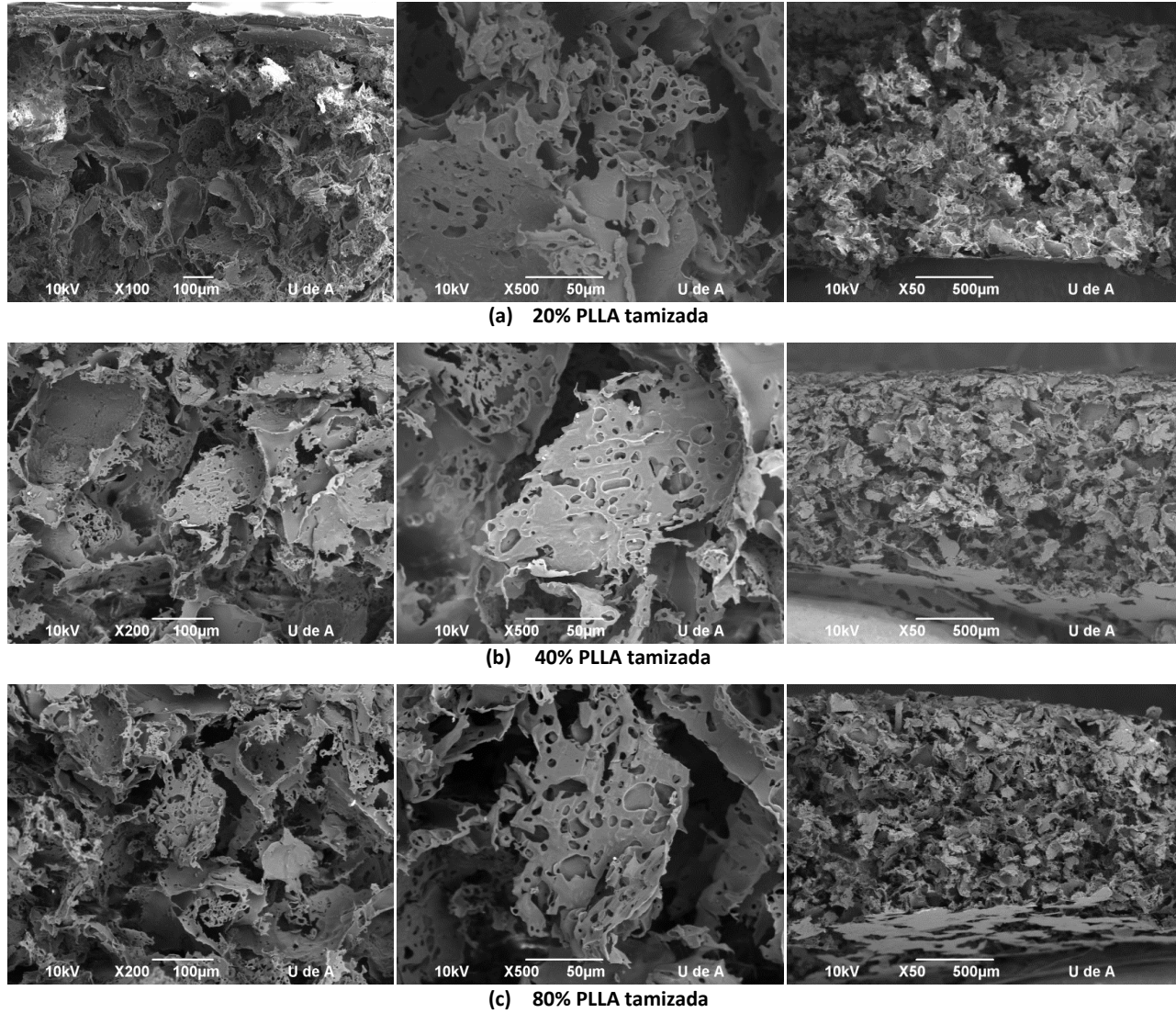


Figura 22 SEM tratamientos 4-6

En la Figura 23 se puede observar la topografía de la superficie de las matrices de los tratamientos 4-6, en ellos se aprecia una evidente rugosidad y la presencia de poros y microporos, sin la formación de capas polimérica como la que se observa en la Figura 24, las cuales aunque son rugosas, no presentan ningún tipo de poro por el cual pudiesen infiltrarse las células en caso que la matriz fuese implantada.

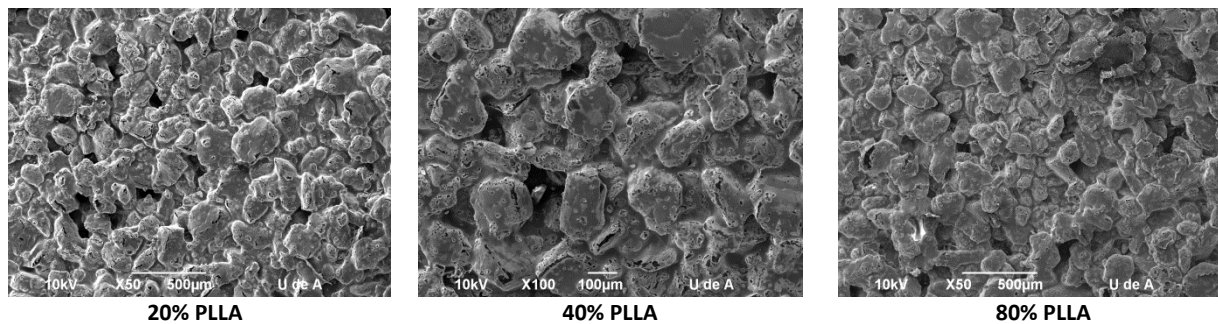


Figura 23 Topografía de la superficie



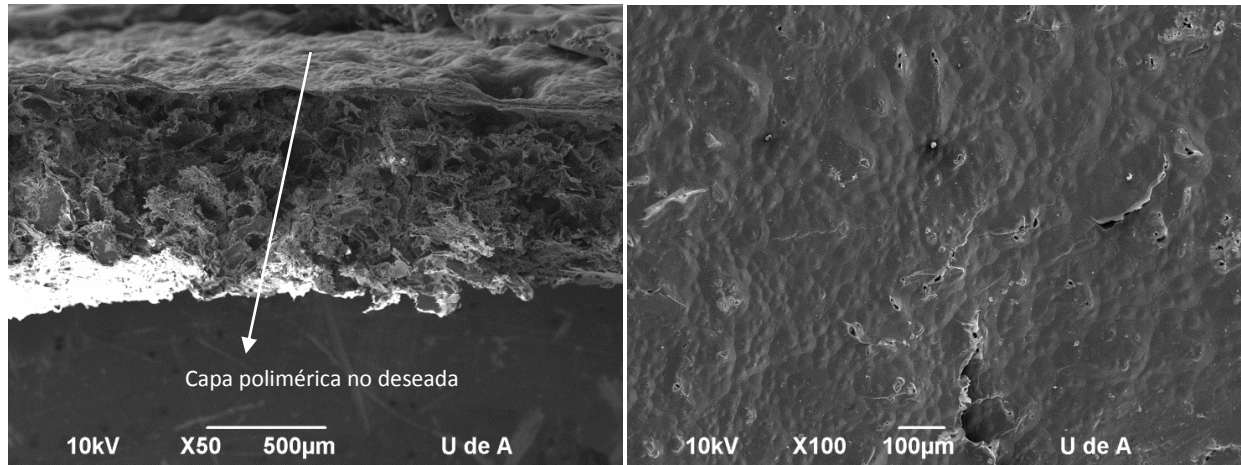


Figura 24 Capa polimérica no deseada

En la Figura 25 , se muestran los resultados del tratamiento número siete y adicionalmente se exponen los espectros de algunas regiones de dicha matriz obtenidos mediante el modo EDX de microscopia SEM, en donde se observa claramente la presencia de calcio (Ca) y fósforo (P), los cuales son los componentes principales de la hidroxiapatita, la cual se ve claramente como pequeñas partículas blancas en la matriz. Es importante resaltar que en estos espectros se observan algunos picos muy pequeños de cloro (Cl), los cuales indican la presencia de algún residuo de solvente (cloroformo).

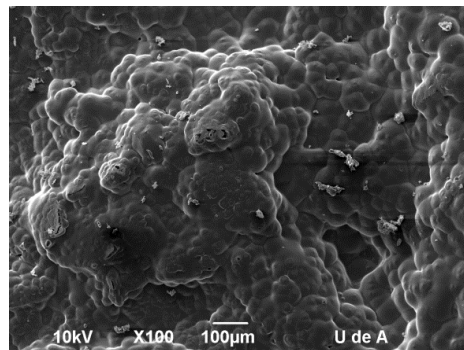
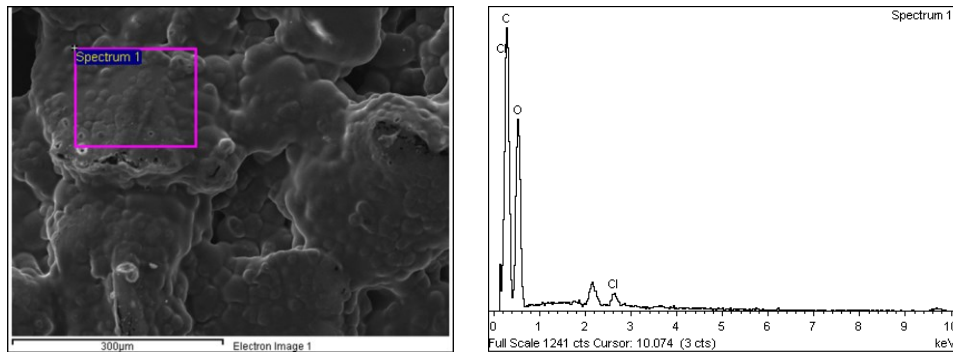


Figura 25 SEM PLLA-HA



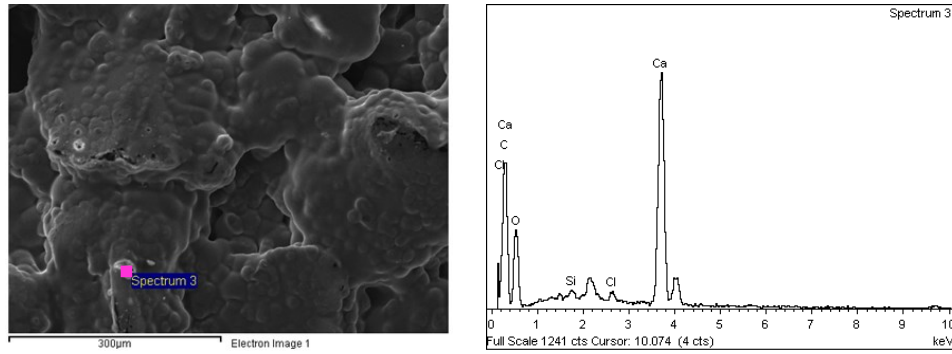


Figura 26 EDS PLLA-HA

### ATR-FTIR: Espectroscopia infrarroja por transformada rápida de Fourier

En la Figura 27 se observa el espectro del PLLA que fue usado a manera de control, en el que es posible diferenciar bandas de absorción características que indican la presencia de determinados grupos funcionales:

- Alrededor de  $3600\text{ cm}^{-1}$  se evidencia la presencia de un sobretono, que verifican los enlaces C-O asociados a una acetona
- $2995\text{ cm}^{-1}$  corresponde a un grupo  $\text{CH}_3$  de tensión
- $1748\text{ cm}^{-1}$  corresponde a un grupo carbonilo (C=O)
- $1453\text{-}1266\text{ cm}^{-1}$  corresponde a bandas del grupo metilo de flexión
- $1190\text{-}1090\text{ cm}^{-1}$  corresponde a esteres

Esas bandas se corroboraron con lo establecido previamente en la literatura (El-Kady, Saad, El-Hady, & Farag, 2010; Orozco, Brostow, Chonkaew, & López, 2009; Pandey, Pandey, & Aswath, 2008).

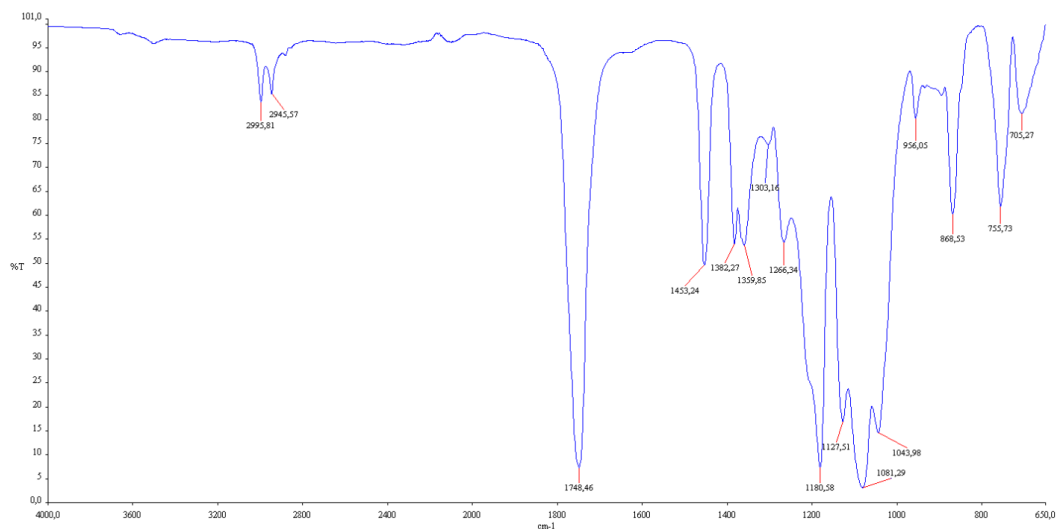


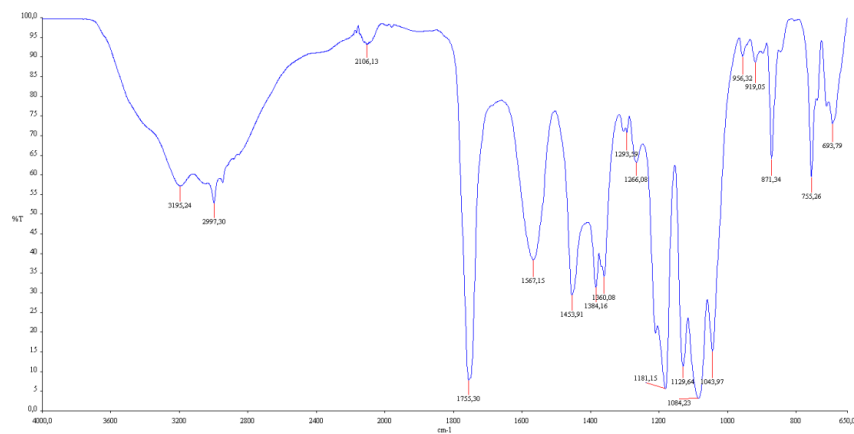
Figura 27 FTIR PLLA

En la Figura 28 se observa el espectro del bicarbonato de amonio y sus respectivas bandas características que corresponden a: aminas secundarias ( $\text{NH}_4$ ) alrededor de  $3000 \text{ cm}^{-1}$ ,  $\text{CO}_2$  cerca de  $1600 \text{ cm}^{-1}$  que para este caso en particular es un pico en  $1589 \text{ cm}^{-1}$  y O-C-O<sub>2</sub> en la región de  $1200\text{-}1450 \text{ cm}^{-1}$  (Meng, 2004).



Figura 28 FTIR bicarbonato de amonio

Con base en estas dos figuras se analizaron los espectros de las matrices 20% PLLA, 40% PLLA y 80% PLLA, en las cuales se identifico de manera general los mismos picos característicos del PLLA (Figura 27) y adicionalmente se identificaron picos alrededor de  $3200 \text{ cm}^{-1}$  y  $1570 \text{ cm}^{-1}$ , correspondientes a las aminas secundarias y al  $\text{CO}_2$  respectivamente, que se encuentran en el espectro del bicarbonato de amonio, lo que es un indicativo de residuos de sal al interior de las matrices. Adicionalmente se identificó un pico en  $920 \text{ cm}^{-1}$  que podría estar asociado a la presencia de ácido cítrico en la matriz. La presencia de los picos de bicarbonato de amonio y la posible asociación de algunos picos con el espectro del ácido cítrico, sugieren la necesidad de un mayor número de lavados.



(a) 20% PLLA

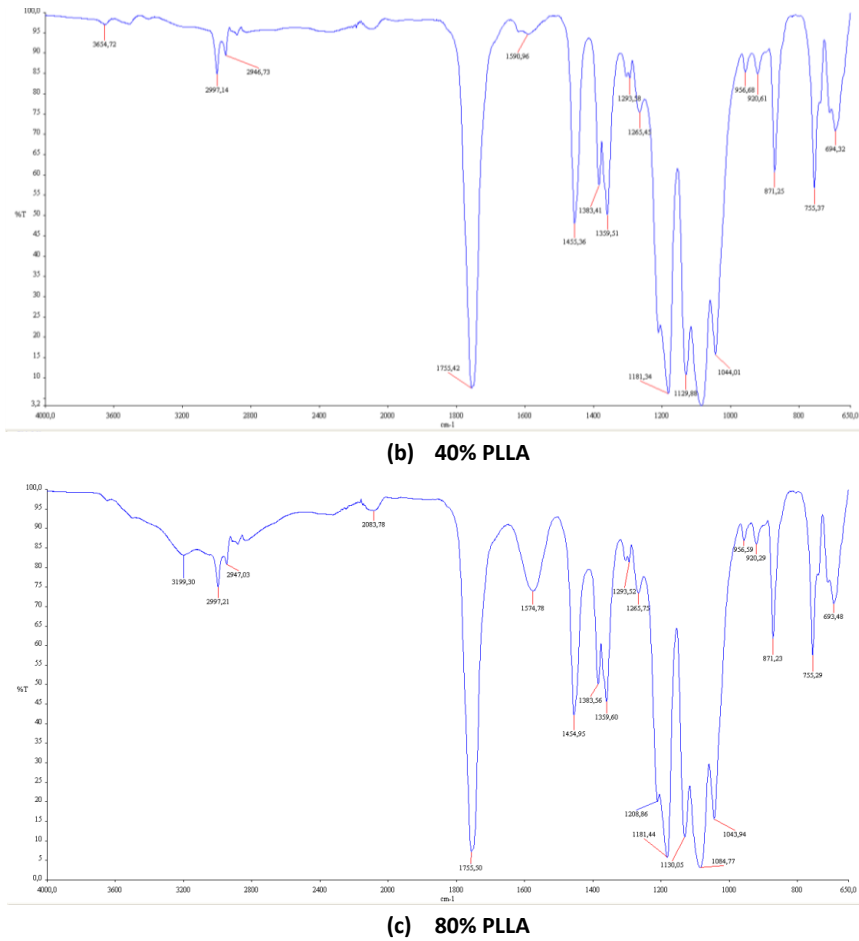


Figura 29 FTIR matrices PLLA

También se compararon los espectros de las soluciones de hinchamiento (agua destilada), sin embargo no se encontró ninguna banda que indicase la presencia de PLLA en las mismas (ANEXO 3), lo que sugiere que la degradación no ha comenzado, que la cantidad de PLLA que se ha degradado no es detectable o como se explica en la próxima sección, pueden haber un cambio en la composición molar del PLLA y las bandas podrían ser diferentes.

### Hinchamiento

Las muestras utilizadas para las pruebas de hinchamiento y por lo tanto para el cálculo de pérdida de peso y porosidad se muestran en la Figura 30.



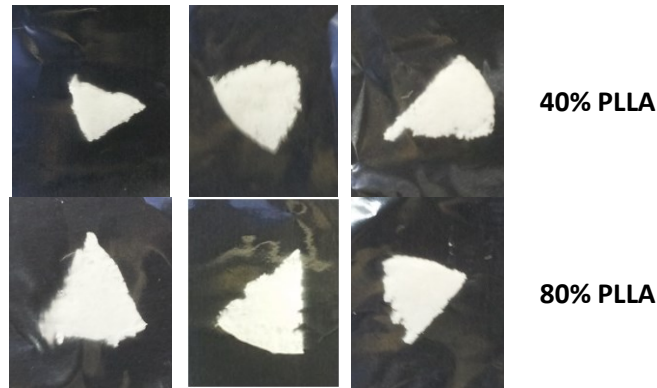
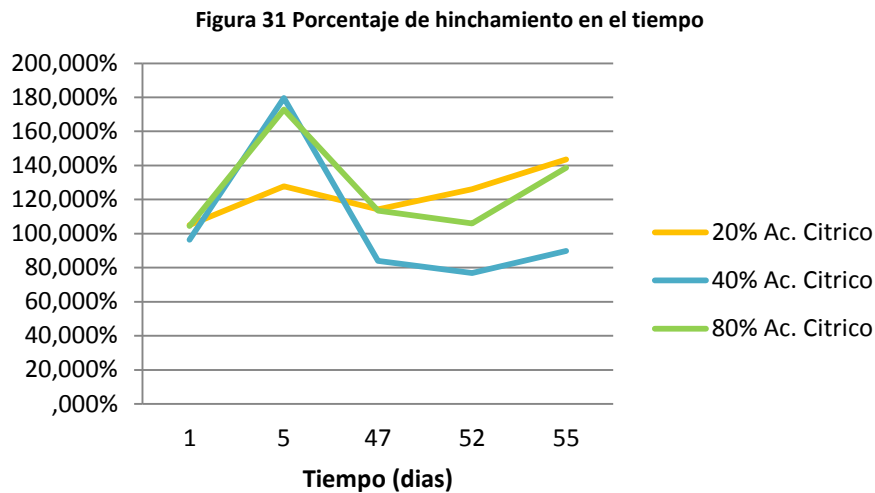


Figura 30 Muestras hinchamiento PLLA (sal sin macerar | concentración 10:1)

Los resultados de la prueba de hinchamiento se recopilan en la Figura 31 en la que se observa para todas las muestras un pico en el día 5, el cual se puede atribuir a una sobresaturación de las membranas debida a hidrofobicidad del material que genera una tensión superficial muy alta o al potencial de membrana que se forma entre los poros, el cual evita la entrada de un mayor volumen de fluido (agua) en el tiempo. Los picos del día 5 decaen luego se observa un aparente aumento, sin embargo, no es posible determinar con exactitud si el hinchamiento ha llegado a un pseudoequilibrio por la falta de datos registrados o si la degradación ha disminuido el tamaño de poro y la porosidad, generando un fenómeno de capilaridad y aumentando de nuevo la absorción de agua como se plantea en la literatura (Hsieh, Chang, & Lin, 2007).



Adicionalmente se puede observar que la tendencia de la gráfica de porcentaje de hinchamiento de las muestras de 40% y 80% PLLA son muy semejantes, lo que corrobora una vez más que la porosidad de las mismas también lo es. Por otra parte la tendencia de la muestra 20% PLLA muestra de manera consecuente que esta matriz presenta menor porosidad con respecto a las demás.

Para analizar de manera más precisa el porcentaje de hinchamiento es importante considerar que las matrices pierden su capacidad de absorber agua cuando se desintegran o fragmentan pero además, los

períodos de latencia de las matrices para la absorción de agua dependen de la composición molar del PLLA y deben corresponder con los periodos de latencia observados para la fragmentación o erosión en masa como se expone en la literatura (Yoon & Park, 2001), por lo que sería necesario realizar un análisis de la composición molar de manera simultánea a los ensayos de hinchamiento.

## Porosidad

Los volúmenes  $V_m$  de la Ecuación 5 son dependientes de la forma geométrica de las muestras por lo que se supuso era igual para las muestras de los tratamientos 1-3 (sector circular) y para aquellas de los tratamientos 4-6. Se obtuvo que:

$$V_m = \pi r^2 \frac{\theta}{360^\circ} \times \text{Altura} = \pi (1,25 \text{ cm})^2 \frac{60^\circ}{360^\circ} \times 0,2 \text{ cm} = 0,8181 \text{ cm}^2 \times 0,2 \text{ cm} = 0,16362 \text{ cm}^3$$

**Ecuación 6 Volumen muestras en forma de sector circular (sin macerar)**

$$V_m = \pi r^2 \times \text{Altura} = \pi \left( \frac{0,370 \text{ cm}}{2} \right)^2 \times 0,172 \text{ cm} = 0,0185 \text{ cm}^3$$

**Ecuación 7 Volumen muestras en forma cilíndrica (macerada)**

Dados estos valores se calculo  $V_p$  y el porcentaje de porosidad para cada uno de las muestras, los resultados se exponen en la Tabla 10. Se evidencia que la porosidad de las muestras que poseen sal sin tamizar es mayor que aquellas que tienen sal tamizada, lo que era de esperarse, pues la proporción de sal y el tamaño de grano usado fueron mayores en las primeras.

El porcentaje de porosidad de las muestras de los tratamientos 1-3 es bastante similar entre ellas, 96%, pero este valor excede los requerimientos establecidos anteriormente y dado que el volumen  $V_m$  es un estimado, se tiene que los resultados usando este método para determinar la porosidad de dichas muestras no es concluyente y se requeriría para las mismas un método más preciso como porosimetría de mercurio para establecer diferencias entre ellas.

Las muestras de los tratamientos 4-6 exhiben un mejor comportamiento pues su porosidad se encuentra entre el rango determinado, que como se expreso anteriormente y expone la literatura debe ser 70-90% (Porter et al., 2009) y muestran claramente el efecto que se quería lograr con el uso de diferentes concentraciones de ácido cítrico: mayor concentración de ácido cítrico implicaría una mayor porosidad. Es importante aclarar que el porcentaje de porosidad corroboró los resultados de las imágenes de reconstrucción tridimensional y microscopia SEM, en las cuales se observó que las muestras 40% PLLA macerada y 80% PLLA macerada tenían una distribución de poros y una micro porosidad similar.

Tratamiento	Masa (M)	$V_p (M/\rho)$	%Porosidad	
20% PLLA sin macerar	0,0075	0,00551	96.63%	96.24%
20% PLLA sin macerar	0,0084	0,00618	96.23%	

20% PLLA sin macerar	0,0092	0,00676	95.87%	
40% PLLA sin macerar	0,0095	0,00699	95.73%	
40% PLLA sin macerar	0,0105	0,00772	95.28%	95.36%
40% PLLA sin macerar	0,0110	0,00809	95.06%	
80% PLLA sin macerar	0,0100	0,00735	95.51%	
80% PLLA sin macerar	0,0102	0,00750	95.42%	95.19%
80% PLLA sin macerar	0,0119	0,00875	94.65%	
20% PLLA macerada	0,0035	0,00257	86.09%	86.09%
40% PLLA macerada	0,0023	0,00169	90.86%	90.86%
80% PLLA macerada	0,0022	0,00162	91.26%	91.26%

Tabla 10 Resultados porosidad

### Pérdida de peso

La pérdida de peso fue calculada tras cincuenta y cinco días de hinchamiento en agua destilada y se obtuvieron los resultados expuestos en la Tabla 11. Se evidencia que las muestras 20% PLLA tienen una menor pérdida de peso, lo que era de esperarse, pues este es un indicativo de degradación y la tasa en la que esto sucede es dependiente de la porosidad de la matriz, de manera que cuando la porosidad es menor la degradación es más lenta. Lo contrario sucede con las muestras 40% y 80% PLLA, las cuales presentan una mayor pérdida de peso que es bastante aproximada entre ellas, lo que corrobora de nuevo la similitud observada entre estas dos muestras en las caracterizaciones con SEM, reconstrucción tridimensional y porcentaje de porosidad.

Trat.	W <sub>0</sub>	W <sub>tp</sub>	%Pérdida de peso	
20% PLLA	0,0075	0,0066	12.00%	7.40%
20% PLLA	0,0084	0,0081	4.76%	
20% PLLA	0,0092	0,0087	5.43%	
40% PLLA	0,0095	0,0086	9.47%	21.34%
40% PLLA	0,0105	0,0084	20.00%	
40% PLLA	0,0110	0,0073	34.55%	
80% PLLA	0,0100	0,0089	12.00%	15.34%
80% PLLA	0,0102	0,0083	20.59%	
80% PLLA	0,0119	0,0103	13.45%	

Tabla 11 Resultados pérdida de peso (sal sin macerar | concentración 10:1)

Como se observa en la Figura 32, las muestras de 40% y 80% PLLA se desintegraron en pequeños trozos, perdiendo su estructura original, mientras que las muestras de 20% PLLA continuaron con una estructura bien definida y apenas comenzaban a desintegrarse.





Figura 32 Muestras hinchamiento (55 días)

Adicionalmente, se muestran los resultados de pH de las soluciones en las que se realizó el hinchamiento, pues como se mencionó anteriormente (véase sección Degradación) la degradación del PLLA se da por medio de hidrólisis de los grupos ésteres que generan la formación de grupos ácidos, de manera que un cambio en el pH también es un indicativo de degradación. Se evidencia de los valores en la Tabla 12, un valor de pH por debajo de siete, es decir, una leve acidez en la solución, por lo tanto se empiezan a observar cambios que podrían ser indicativos de que parte de la pérdida de peso obtenida se debe al proceso de degradación del material, sin embargo, para el caso que aquí se presenta la pérdida de peso debe atribuirse en mayor medida a la poca resistencia de la matriz que causó que esta se partiera en trozos más pequeños

Tratamiento	pH
20% PLLA	6,61
20% PLLA	6,55
20% PLLA	6,98
40% PLLA	6,30
40% PLLA	5,73
40% PLLA	6,37
80% PLLA	6,69
80% PLLA	6,97
80% PLLA	6,94

Tabla 12 pH soluciones pruebas de hinchamiento



## 6. CONCLUSIONES Y CONSIDERACIONES FINALES

La síntesis de matrices de PLLA por medio de un método de *salt leaching/gas foaming*, resulta ser una forma sencilla y de pocos pasos, que además no requiere ningún reactivo o equipo de alta especificidad. Este método tiene grandes ventajas pues permite controlar muchos factores vitales como el tamaño de poro, la interconectividad y la porosidad, de los que dependen las demás propiedades de las matrices tridimensionales; sin embargo y como se muestra en este trabajo, la distribución de los poros obtenida con este método no es totalmente homogénea lo que podría influir en las propiedades mecánicas del material, aunque cabe aclarar que la estructura del hueso no presenta una distribución de poros completamente uniforme; además, en el interior de las matrices permanecen partículas de porógeno que de implantarse el material podrían generar una reacción inflamatoria no infecciosa, no obstante y como se explica a continuación es posible remover estas partículas en su totalidad.

Es importante que en el proceso de obtención de las matrices se homogenice la sal de la mejor manera posible y mantener un proceso de observación continuo para detectar si la sal se precipita, evitando que se genere la capa polimérica no deseada. Adicionalmente, es necesario que se realice un mayor número de lavados a los realizados en este trabajo y que se corrobore que no hay residuos de sal o solvente mediante FTIR o microscopia SEM en modo EDX; si existe evidencia que todavía hay alguna cantidad de estas sustancias en el interior de las matrices se recomienda realizar más lavados.

Las propiedades mecánicas de las matrices tridimensionales de PLLA dependen directamente de la porosidad y del tamaño de poro, de manera que la rigidez es mayor cuando la porosidad es menor, no obstante se debe considerar que esto se puede ver alterado cuando la distribución de los poros no es homogénea o cuando el tamaño de los mismo varía en un amplio intervalo. En las matrices obtenidas en este trabajo se cumple que la rigidez es inversamente proporcional a la porosidad y por lo tanto, inversamente proporcional a la capacidad de absorción de agua (hinchamiento). Adicionalmente, las matrices con sal tamizada satisfacen los requerimientos de fuerza en términos prácticos que permiten manipularla sin destruirla, mientras que aquellas con sal sin tamizar no lo hacen, lo que corrobora que las propiedades mecánicas dependen de la proporción sal polímero y del tamaño de grano del agente porogénico que en última instancia definen el tamaño de poro y la porosidad.

Resulta vital determinar de manera precisa la porosidad, para lo cual se utiliza técnicas como la porosimetría de mercurio, dado que aunque el método aquí utilizado es bastante aproximado solo se expresa la relación volumen vacío-volumen grueso y no se puede definir como está distribuido el volumen vacío en cada uno de los poros, lo que si se pudiese explicar, aclararía y se correlacionaría con los resultados de los ensayos de hinchamiento y de compresión realizados durante la caracterización. Adicionalmente se recomienda realizar un estudio de la composición molar del PLLA de manera simultánea a los ensayos de hinchamiento, que permitan observar la correspondencia entre los cambios en la molécula, la degradación (pérdida de masa) y fragmentación en masa de las matrices (desprendimiento de grandes trozos).

Las matrices tridimensionales de PLLA obtenidas en este trabajo, presentan poros interconectados y porosidades dentro de los parámetros establecidos en la literatura (70-90%). La porosidad obtenida es proporcional a la relación polímero-sal que se usó para su obtención y, a su vez, es proporcional a la concentración de ácido cítrico. Además se tiene que la porosidad en la superficie depende directamente del proceso de homogenización de la sal en la solución polimérica y de la temperatura a la cual se evapora el solvente, de manera que si estos parámetros no son controlados, la sal se precipitará y formará una capa polimérica no deseada que podría inhibir la adhesión y la proliferación celular, además no permitiría un óptimo intercambio de nutrientes o eliminación de los residuos de desechos.

Se recomienda que el solvente sea volátil a temperatura ambiente como el usado en este trabajo, pues de esta manera el proceso de eliminación (evaporación) del solvente se comienza rápidamente, de forma que el tiempo antes que el material comience a solidificarse es menor y no habría posibilidad que la sal se precipitase y formara la capa polimérica no deseada. También se recomienda que el proceso de obtención se realice en ambientes de temperatura controlada evitando que esta sea una variable en el diseño experimental.

Se recomienda de manera adicional, que para cada una de las pruebas se realicen triplicados de la matriz, de esta forma los datos presentaran una mayor confiabilidad y se garantiza reproducibilidad en el experimento; este parámetro no se pudo satisfacer en el presente trabajo por limitaciones en el material (PLLA) disponible y el alto costo que implica adquirir incluso pequeñas cantidades del mismo.

## BIBLIOGRAFÍA

- Atala, A., Lanza, R., Thomson, J. A., & Nerem, R. (2011). *Principles of Regenerative Medicine* (Second edition). Elsevier.
- Athanasiou, K. a, Agrawal, C. M., Barber, F. a, & Burkhart, S. S. (1998). Orthopaedic applications for PLA-PGA biodegradable polymers. *Arthroscopy : The Journal of Arthroscopic & Related Surgery*, *14*(7), 726–37. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9788368>
- Bertoldi, C., Zaffe, D., & Consolo, U. (2008). Polylactide/polyglycolide copolymer in bone defect healing in humans. *Biomaterials*, *29*(12), 1817–23. doi:10.1016/j.biomaterials.2007.12.034
- Bueno, E. M., & Glowacki, J. (2009). Cell-free and cell-based approaches for bone regeneration. *Nature reviews. Rheumatology*, *5*(12), 685–97. doi:10.1038/nrrheum.2009.228
- Cai, Q., Yang, J., Bei, J., & Wang, S. (2002). A novel porous cells scaffold made of polylactide-dextran blend by combining phase-separation and particle-leaching techniques. *Biomaterials*, *23*(23), 4483–92. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12322968>
- Charles-Harris, M., del Valle, S., Hentges, E., Bleuet, P., Lacroix, D., & Planell, J. a. (2007). Mechanical and structural characterisation of completely degradable polylactic acid/calcium phosphate glass scaffolds. *Biomaterials*, *28*(30), 4429–38. doi:10.1016/j.biomaterials.2007.06.029
- Chen, Q., Liang, S., & Thouas, G. a. (2012). Elastomeric biomaterials for tissue engineering. *Progress in Polymer Science*. doi:10.1016/j.progpolymsci.2012.05.003
- Chung, H. J., & Park, T. G. (2007). Surface engineered and drug releasing pre-fabricated scaffolds for tissue engineering. *Advanced drug delivery reviews*, *59*(4-5), 249–62. doi:10.1016/j.addr.2007.03.015
- Dawson, J. I., & Oreffo, R. O. C. (2008). Bridging the regeneration gap: stem cells, biomaterials and clinical translation in bone tissue engineering. *Archives of biochemistry and biophysics*, *473*(2), 124–31. doi:10.1016/j.abb.2008.03.024
- Dee, K. C., Puleo, D. A., & Bizios, R. (2002). *An introduction to tissue-biomaterial interactions*. Hoboken, New Jersey: John Wiley & Sons INC.
- Drosse, I., Volkmer, E., Capanna, R., De Biase, P., Mutschler, W., & Schieker, M. (2008). Tissue engineering for bone defect healing: an update on a multi-component approach. *Injury*, *39 Suppl 2*, S9–20. doi:10.1016/S0020-1383(08)70011-1
- Edlund, U., & Albertsson, a-C. (2003). Polyesters based on diacid monomers. *Advanced drug delivery reviews*, *55*(4), 585–609. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21366288>
- El-Kady, A. M., Saad, E. a., El-Hady, B. M. A., & Farag, M. M. (2010). Synthesis of silicate glass/poly(l-lactide) composite scaffolds by freeze-extraction technique: Characterization and in vitro bioactivity evaluation. *Ceramics International*, *36*(3), 995–1009. doi:10.1016/j.ceramint.2009.11.012

Henton, D. E., Gruber, P., Lunt, J., & Randall, J. (2005). Polylactic Acid Technology. In A. K. Mohanty, M. Misra, & L. T. Drzal (Eds.), *Natural fibers, Biopolymers ans Biocomposites* (pp. 527–578). Taylor & Francis Group.

Huang, Y.-C., & Mooney, D. J. (2006). Gas Foaming to Fabricate Polymer Scaffold in Tissue Engineering. In P. X. . Ma & J. Elisseeff (Eds.), *Scaffolding In Tissue Engineering* (pp. 155–167).

Hutmacher, D. W. (2000). Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage. *Biomaterials*, *21*(24), 2529–43. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11071603>

Hsieh, W.-C., Chang, C.-P., & Lin, S.-M. (2007). Morphology and characterization of 3D micro-porous structured chitosan scaffolds for tissue engineering. *Colloids ans surfaces B*(57), 250-255.

Kothapalli, C. R., Shaw, M. T., & Wei, M. (2005). Biodegradable HA-PLA 3-D porous scaffolds: effect of nano-sized filler content on scaffold properties. *Acta biomaterialia*, *1*(6), 653–62. doi:10.1016/j.actbio.2005.06.005

Lasprilla, A. J. R., Martinez, G. a R., Lunelli, B. H., Jardini, A. L., & Filho, R. M. (2012). Poly-lactic acid synthesis for application in biomedical devices - a review. *Biotechnology advances*, *30*(1), 321–8. doi:10.1016/j.biotechadv.2011.06.019

Lee, S.-H., & Shin, H. (2007). Matrices and scaffolds for delivery of bioactive molecules in bone and cartilage tissue engineering. *Advanced drug delivery reviews*, *59*(4-5), 339–59. doi:10.1016/j.addr.2007.03.016

Liu, C., Xia, Z., & Czernuszka, J. T. (2007). Design and Development of Three-Dimensional Scaffolds for Tissue Engineering. *Chemical Engineering Research and Design*, *85*(7), 1051–1064. doi:10.1205/cherd06196

Meng, L. (2004). *Development of an Analytical Method for Distinguishing Ammonium Bicarbonate from the Products of an Aqueous Ammonia Co2 Scrubber and the Characterization of Ammonium Bicarbonate.*

Nair, P. N. R., & Schug, J. (2004). Observations on healing of human tooth extraction sockets implanted with bioabsorbable polylactic-polyglycolic acids (PLGA) copolymer root replicas: a clinical, radiographic, and histologic follow-up report of 8 cases. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology*, *97*(5), 559–569. doi:10.1016/j.tripleo.2003.10.013

Nam, Y. S., Yoon, J. J., & Park, T. G. (2000). A novel fabrication method of macroporous biodegradable polymer scaffolds using gas foaming salt as a porogen additive. *Journal of biomedical materials research*, *53*(1), 1–7. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10634946>

Navarro, J. C. (Septiembre de 2009). Medico en periodontologia clínica e implantologia odontológica. (J. A. Riano Velez, Entrevistador)

Orozco, V. H., Brostow, W., Chonkaew, W., & López, B. L. (2009). Preparation and Characterization of Poly(Lactic Acid)-g-Maleic Anhydride+Starch Blends. *Macromolecular Symposia*, *277*(1), 69–80. doi:10.1002/masy.200950309

- O'Brien, F. J. (2011). Biomaterials & scaffolds for tissue engineering. *Materials Today*, 14(3), 88–95. doi:10.1016/S1369-7021(11)70058-X
- Pandey, A., Pandey, G. C., & Aswath, P. B. (2008). Synthesis of polylactic acid-polyglycolic acid blends using microwave radiation. *Journal of the mechanical behavior of biomedical materials*, 1, 227–233. doi:10.1016/j.jmbbm.2007.12.001
- Porter, J. R., Ruckh, T. T., & Popat, K. C. (2009). Bone tissue engineering: a review in bone biomimetics and drug delivery strategies. *Biotechnology progress*, 25(6), 1539–60. doi:10.1002/btpr.246
- Puppi, D., Chiellini, F., Piras, A., & Chiellini, E. (2010). Polymeric materials for bone and cartilage repair. *Progress in polymer science*, 35, 403–440.
- Rauci, M. G., D'Antò, V., Guarino, V., Sardella, E., Zeppetelli, S., Favia, P., & Ambrosio, L. (2010). Biomaterialized porous composite scaffolds prepared by chemical synthesis for bone tissue regeneration. *Acta biomaterialia*, 6(10), 4090–9. doi:10.1016/j.actbio.2010.04.018
- Rezwan, K., Chen, Q. Z., Blaker, J. J., & Boccaccini, A. R. (2006). Biodegradable and bioactive porous polymer/inorganic composite scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials*, 27(18), 3413–3431. doi:10.1016/j.biomaterials.2006.01.039
- Sachlos, E., & Czernuszka, J. T. (2003). Making tissue engineering scaffolds work. Review: the application of solid freeform fabrication technology to the production of tissue engineering scaffolds. *European cells & materials*, 5, 29–39; discussion 39–40. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14562270>
- Seal, B. L., Otero, T. C., & Panitch, A. (2001). Polymeric biomaterials for tissue and organ regeneration. *Materials Science and Engineering*, 34, 147–230.
- Stevens, M. M. (2008). Biomaterials for bone tissue engineering. *Materials today*, 11(5), 18–25.
- Södergård, A., & Stolt, M. (2002). Properties of lactic acid based polymers and their correlation with composition. *Progress in Polymer Science*, 27(6), 1123–1163. doi:10.1016/S0079-6700(02)00012-6
- Tortora, G. J., & Derrickson, B. (2008). *Principios de anatomía y fisiología* (11 ed.). Medica Panamericana.
- Vacanti, J., Langer, R., Upton, J., & Marler, J. (1998). Transplantation of cells in matrices for tissue regeneration. *Advanced drug delivery reviews*, 33(1-2), 165–182. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10837658>
- Vroman, I., & Tighzert, L. (2009). Biodegradable Polymers. *Materials*, 2(2), 307–344. doi:10.3390/ma2020307
- Yoon, J. J., & Park, T. G. (2001). Degradation behaviors of biodegradable macroporous scaffolds prepared by gas foaming of effervescent salts. *Journal of biomedical materials research*, 55(3), 401–8. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11255194>

Yu, N. Y. C., Schindeler, A., Little, D. G., & Ruys, A. J. (2010). Biodegradable poly(alpha-hydroxy acid) polymer scaffolds for bone tissue engineering. *Journal of biomedical materials research. Part B, Applied biomaterials*, 93(1), 285–95. doi:10.1002/jbm.b.31588

Zhou, H., Lawrence, J. G., & Bhaduri, S. B. (2012). Fabrication aspects of PLA-CaP/PLGA-CaP composites for orthopedic applications: a review. *Acta biomaterialia*, 8(6), 1999–2016. doi:10.1016/j.actbio.2012.01.031

Zippel, N., Schulze, M., & Tobiasch, E. (2010). Biomaterials and mesenchymal stem cells for regenerative medicine. *Recent patents on biotechnology*, 4(1), 1–22. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20201799>

## ANEXOS

### ANEXO 1

#### Protocolo matrices tridimensionales de PLA

##### Materiales y equipos

Cantidad	Equipo	Cantidad	Equipo
5	Beaker 50 mL	1	Espátula
3	Beaker 10 mL	1	Horno de vacío
1	Plancha térmica con agitación magnética (Schott instruments, Alemania)	1	Micropipeta 10 mL
	Puntas micropipeta 10 mL	1	Congelador -80°C
1	Magneto	3	Cajas de petri
1	Balanza analítica	1	Liofilizador
1	Vortex	1	Cámara ambiental
1	Matiz de 106 µm	1	Matiz de 250 µm

##### Reactivos

Reactivo	Cantidad	Peso molecular	Concentración	Marca
PLA	0.5 g	80000-160000	83.3 mg/mL	Sigma Aldrich
Bicarbonato de amonio	2.5 g   5 g	-	5:1   10:1 (NH <sub>4</sub> HCO <sub>3</sub> :PLA)	Belchem
Cloroformo monohidrato	6 mL	-	-	
Agua destilada	-	-	-	
Ácido cítrico	-	-	20%, 40%, 80%	

##### Cálculos

$$\text{Volumen de cloroformo} = \frac{500 \text{ mg}}{83.3 \text{ mg/mL}} \approx 6 \text{ mL}$$

$$\text{Ácido cítrico (20\%)} = 0.2 \times 20 \text{ mL} = 4 \text{ g}$$

$$\text{Ácido cítrico (40\%)} = 0.4 \times 20 \text{ mL} = 8 \text{ g}$$

$$\text{Ácido cítrico (80\%)} = 0.8 \times 20 \text{ mL} = 16 \text{ g}$$

$$\text{Bicarbonato de amonio} = 5 \times \text{PLLA [g]} = 5 \times 0.5 = 2.5 \text{ g}$$

$$\text{Bicarbonato de amonio} = 10 \times \text{PLLA [g]} = 10 \times 0.5 = 5 \text{ g}$$

##### Lavado del material

1. Lavar todo el material de vidrio antes y después de realizar la síntesis de la matriz con jabón neutro y agua destilada.

2. Dejar secar el material o secar en el horno por aproximadamente 20 minutos a una temperatura de 40 °C.

### Procedimiento

1. Pesarse con una balanza analítica la cantidad de PLLA requerida
2. Medir al interior de una cámara ambiental el volumen de cloroformo necesario
3. Tomar un beaker de 50 mL esteril con una barra magnética
4. Anadir el PLLA y el cloroformo al Beaker
5. Agitar el PLLA-cloroformo a 410 rpm durante 90 minutos, la mezcla debe lucir completamente homogénea
6. Pesarse con una balanza analítica la cantidad de sal requerida  
*Nota:* para obtener el tamaño de grano de sal deseado, el cual corresponde al tamaño de poro deseado, debe macerarse la sal y posteriormente hacer uso de los tamices para separar los cristales según su tamaño.
7. Retirar la barra magnética
8. Anadir el bicarbonato de amonio a la solución polimérica y mezclar con una espátula distribuyendo la sal de manera homogénea
9. Verter la solución PLLA-cloroformo-bicarbonato de amonio en proporciones iguales en tres beakers de 10 ml  
*Nota:* Verter de tal forma que la matriz quede con una altura aproximada de 5 mm, evitar en lo posible la formación de burbujas
10. Dejar secar la matriz a temperatura ambiente por 24 horas, hasta que el cloroformo se haya evaporado
11. Retirar las matrices de los Beaker de 10 mL (molde)
12. Depositar cada una de las matrices en una solución de ácido cítrico con una concentración determinada hasta que pare completamente la efervescencia
13. Lavar la matriz múltiples veces (8) con agua destilada  
*Nota:* los lavados se pueden realizar vertiendo la matriz en un recipiente con agua destilada bajo agitación por 5 minutos y posteriormente cambiar el agua hasta completar el número de lavados requeridos
14. Disponer las muestras en cajas petri
15. Congelar las matrices a -80°C durante mínimo 1 hora  
*Nota:* si las muestras no se van a liofilizar de inmediato conservarlas a -20°C y después retomar a partir del numeral 15
16. Liofilizar las muestras durante 24 horas
17. Conservar las muestras a temperatura ambiente y baja humedad

**Nota:** al finalizar este protocolo se obtienen tres matrices con diferentes tratamientos (1) 20% PLLA (2) 40% PLLA (3) 80% PLLA



## ANEXO 2

### Protocolo obtención hidroxiapatita

#### Materiales y equipos

Cantidad	Equipo
1	Congelador -80°C
1	Liofilizador
1	Centrifuga
	Tubos Falcon 50 mL

#### Reactivos

Reactivo	Cantidad	Peso molecular	Concentración	Marca
Solución de hidroxiapatita	50 mL	-	-	Oseomatrix <sup>14</sup>

#### Procedimiento

1. Tomar un tubo Falcon con 50 mL de solución de hidroxiapatita
2. Centrifugar el tubo por 10 minutos a 3000 rpm
3. Retirar el agua en la parte superior del tubo dejando la especie de gelatina que se forma al fondo del mismo
4. Abrir pequeños agujeros en la tapa del tubo Falcon
5. Congelar a -80 °C por al menos 1 hora
6. Liofilizar la muestra por 24 horas
7. Conservar las muestras a temperatura ambiente y baja humedad

**Nota:** al finalizar este protocolo se obtiene hidroxiapatita en polvo (blanco)

---

<sup>14</sup> Oseomatrix es una marca en proceso de registro de la universidad de Antioquia. La solución de hidroxiapatita fue proporcionada por el laboratorio que desarrollo la misma y es un residuo del proceso de sinterización (proceso de fabricación de materiales metálicos y cerámicos)

### ANEXO 3

#### ATR-FTIR

Espectros del agua destilada de las matrices sometidas a hinchamiento

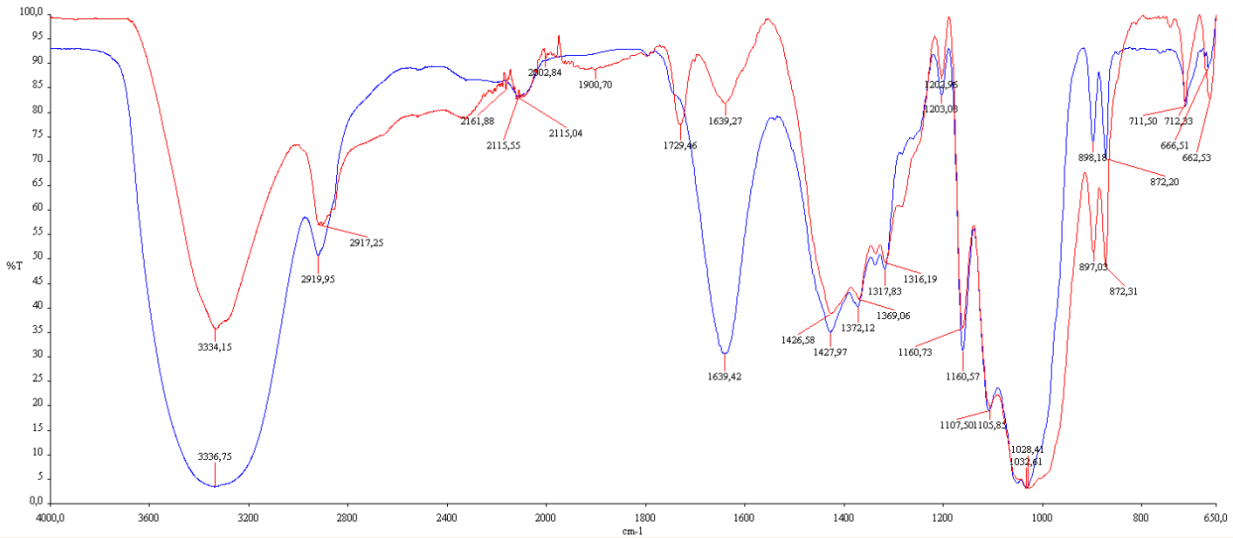


Fig. 1 (roja) celulosa, (azul) agua+celulosa

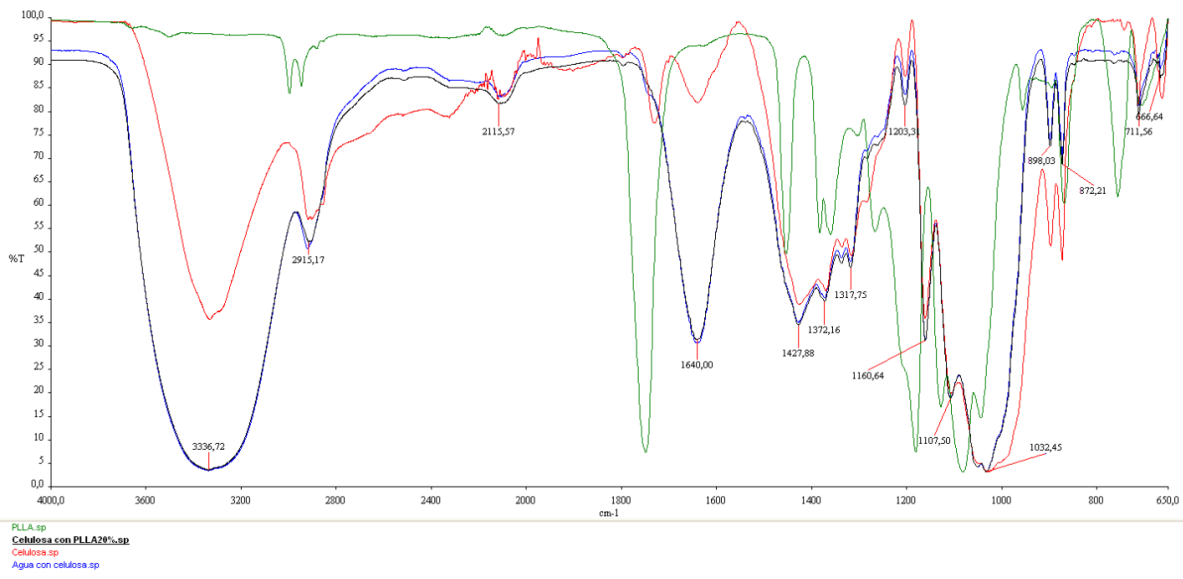


Fig. 2 (verde) PLLA, (negro) celulosa+agua 20% PLLA

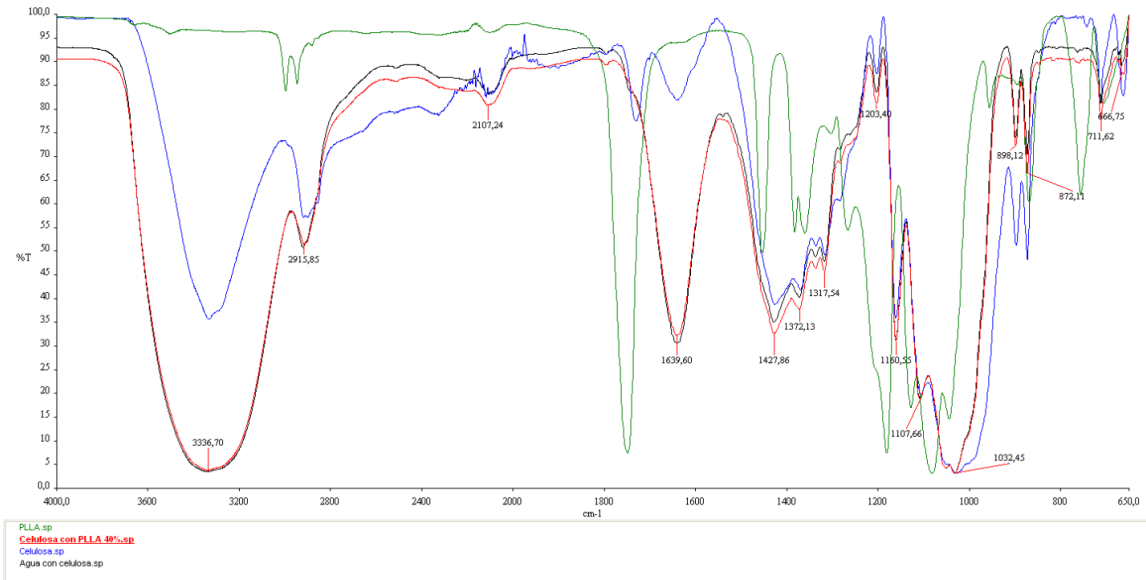


Fig. 3 (rojo) celulosa+agua 40% PLLA



Fig. 4 (rojo) (negro) celulosa+agua 80% PLLA

**ANEXO 4****Ensayos de Hinchamientos**

Se presentan con detalle los datos obtenidos durante los 55 días de hinchamiento.

<b>Trat.</b>	<b><math>W_0</math></b>	<b><math>W_{t-1}</math></b>	<b><math>\%H_1</math></b>	<b><math>W_{t-2}</math></b>	<b><math>\%H_2</math></b>	<b><math>W_{t-3}</math></b>	<b><math>\%H_3</math></b>	<b><math>W_{t-4}</math></b>	<b><math>\%H_4</math></b>	<b><math>W_{t-5}</math></b>	<b><math>\%H_5</math></b>
<b>20% PLLA</b>	0,0075	0,0168	124.00%	0,0157	109,33%	0,0156	108,00%	0,0157	108,67%	0,0165	120,00%
<b>20% PLLA</b>	0,0084	0,0153	82.14%	0,0189	125,00%	0,0169	101,19%	0,0190	125,60%	0,0219	160,71%
<b>20% PLLA</b>	0,0092	0,0192	108.70%	0,0229	148,91%	0,0215	133,70%	0,0225	144,02%	0,0230	150,00%
<b>40% PLLA</b>	0,0095	0,0196	106.32%	0,0217	128,42%	0,0184	93,16%	0,0194	104,21%	0,0204	114,74%
<b>40% PLLA</b>	0,0105	0,0209	99.05%	0,0325	209,52%	0,0194	84,29%	0,0186	77,14%	0,0188	79,05%
<b>40% PLLA</b>	0,0110	0,0202	83.64%	0,0331	200,91%	0,0192	74,55%	0,0164	49,09%	0,0193	75,45%
<b>80% PLLA</b>	0,0100	0,0197	97.00%	0,0227	127,00%	0,0200	99,50%	0,0200	100,00%	0,0229	129,00%
<b>80% PLLA</b>	0,0102	0,0233	128.43%	0,0319	212,75%	0,0237	131,86%	0,0218	113,73%	0,0250	145,10%
<b>80% PLLA</b>	0,0119	0,0224	88.24%	0,0332	178,99%	0,0249	108,82%	0,0243	104,20%	0,0288	142,02%

## ANEXO 5

Ensayos mecánicos, gráficos esfuerzo de compresión (MPa) vs deformación 2 (mm/mm)

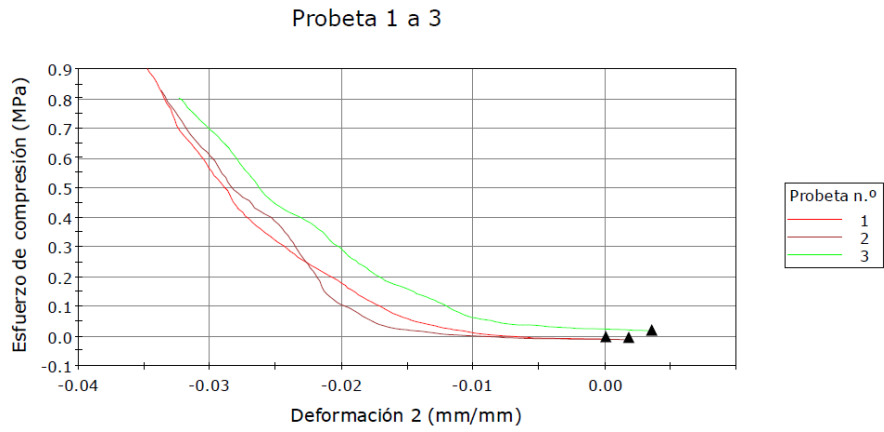


Fig 1 probeta 1-3 20% PLLA tamizada

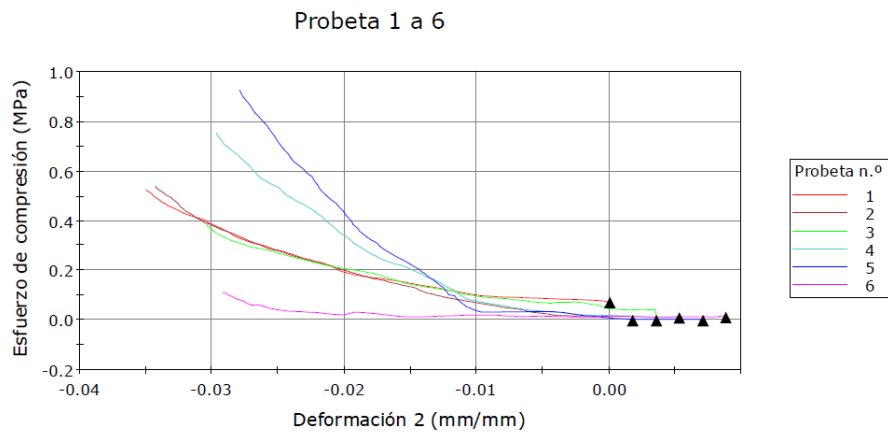


Fig 2 probeta 1-3 80% PLLA tamizada, probeta 4,5 40% PLLA tamizada

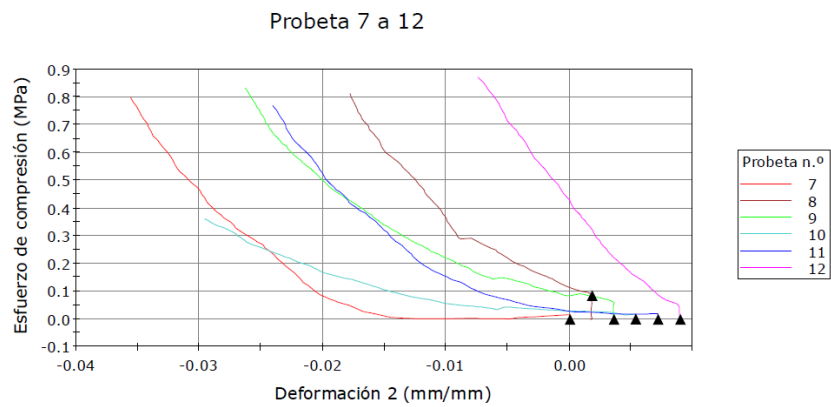


Fig 3 probeta 7 40% PLLA tamizada

Probeta 13 a 18

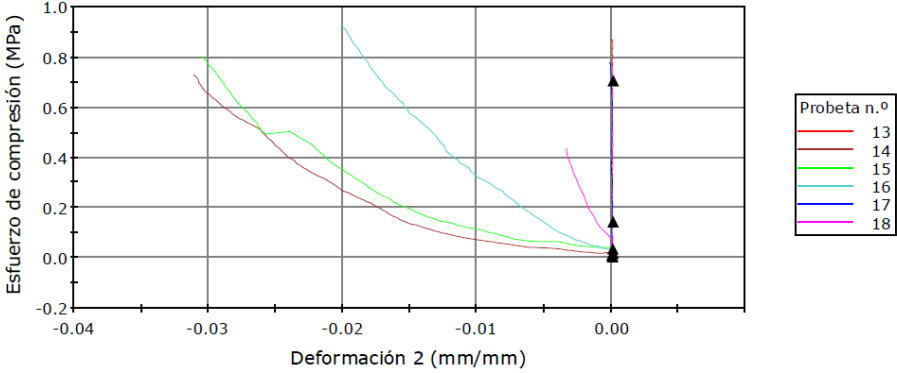


Fig 4 probeta 17-19 PLLA-HA



**ESCUELA DE INGENIERÍA DE ANTIOQUIA**

**ACTA DE EVALUACIÓN FINAL DE TRABAJO DE GRADO**

<b>Fecha: (dd/mm/aa)</b>	22 / 11 / 2012								
<b>Nombre del proyecto:</b>	Matriz tridimensional con potencial para regeneración ósea								
<b>Director del proyecto:</b>	Claudia Elena Echeverri Cuartas								
<table border="1"> <tr> <td>Nombre del estudiante</td> <td>Programa académico</td> </tr> <tr> <td>Juliana Andrea Riaño Vélez</td> <td>Ingeniería Biomédica</td> </tr> <tr> <td> </td> <td> </td> </tr> <tr> <td> </td> <td> </td> </tr> </table>		Nombre del estudiante	Programa académico	Juliana Andrea Riaño Vélez	Ingeniería Biomédica				
Nombre del estudiante	Programa académico								
Juliana Andrea Riaño Vélez	Ingeniería Biomédica								
<b>Nombre del Jurado:</b>									
<b>Evaluación del proyecto: Espacio exclusivo para jurado</b>									
<input type="checkbox"/> No aprobado <input checked="" type="checkbox"/> Aprobado sin mención <input type="checkbox"/> con Mención Pública <input type="checkbox"/> con Mención honorífica <input type="checkbox"/> Trabajo laureado									
<p><b>Justificación del reconocimiento:</b> (Artículo 28 del Acuerdo 11: "El director del Programa presentará el acta final de evaluación al Consejo Académico, donde consta la solicitud de mención especial debidamente justificada y el Consejo determinará si se otorga o no"). <u>La justificación debe tener mínimo 500 palabras.</u></p>									

*[Handwritten Signature]*  
 DIRECTOR DEL PROGRAMA

*[Handwritten Signature]*  
 DIRECTOR DEL TRABAJO DE GRADO

*[Handwritten Signature]*  
 JURADO (Si lo hubo)