

ESTUDIO DE LA BIOACTIVIDAD DEL HUESO CORTICAL PARTICULADO LIOFILIZADO Y DESMINERALIZADO

DANIELA OROZCO ZULUAGA

Trabajo de grado para optar al título de ingeniera biomédica

PhD. Marta Elena Londoño López

Docente e Investigadora



**UNIVERSIDAD EIA-UNIVERSIDAD CES
INGENIERIA BIOMEDICA
ENVIGADO
2017**

AGRADECIMIENTOS

Realizar un proyecto de investigación permite abrir tus puertas a los nuevos conocimientos, a nuevas personas y a otra concepción de las cosas, de la vida misma, por eso en primer lugar agradezco a la vida, que conspiró a mi favor, y me permitió culminar mis estudios, agradezco a Dios por iluminar mi camino, y darme la sabiduría necesaria para sobrellevar las dificultades que hayan podido presentarse.

Agradezco a mi familia, especialmente a mis padres, por hacer de mí la persona que soy ahora, y por día a día brindarme la fuerza, el apoyo y la comprensión necesaria para cumplir mis metas y mis sueños.

Gracias también a mi Directora Marta Londoño, porque con sus conocimientos y experiencia me guió y acompañó en todo el desarrollo de este trabajo, gracias también al profesor Pedronel Araque, que nos asesoró en durante este proceso, las gracias son también Aura Lopera que con su ayuda desinteresada me brindo conocimientos relevantes para el desarrollo de este proyecto.

A mis amigos y todas las personas que de una u otra manera estuvieron implicados en la realización de este proyecto, que más que un proyecto es una meta cumplida, por fin puedo decir que dentro de contados días seré la Ingeniera Biomédica que siempre quise ser.

CONTENIDO

	pág.
INTRODUCCIÓN.....	11
1. PRELIMINARES.....	13
1.1 Planteamiento del problema	13
1.2 Objetivos del proyecto.	14
1.2.1 Objetivo General.....	14
1.2.2 Objetivos Específicos	14
1.3 Marco de referencia.....	15
1.3.1 Antecedentes	15
1.3.2 Marco Teórico	18
2. METODOLOGÍA.....	28
2.1 Materiales y Equipos	28
2.1.1 Encapsular el HCPLD en una matriz polimérica	28
2.1.2 Determinación de la bioactividad	29
2.1.3 Determinación de las propiedades físico-químicas y evaluación de los compuestos formados al contacto de la matriz con el medio simulado	30
2.1.4 Evaluación de la toxicidad de la matriz encapsulada	31
2.1.5 Ensayo de Degradación	31
3. PRESENTACIÓN Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....	33
3.1 Caracterización del sistema encapsulado (PU + PMMA + HCLPD)	33
3.2 Ensayo bioactividad.....	35
3.3 Ensayo de degradación	39

La información presentada en este documento es de exclusiva responsabilidad de los autores y no compromete a la EIA.

3.4	CARACTERIZACIÓN (FTIR)	43
3.5	Ensayo de toxicidad (MTT)	47
4.	CONCLUSIONES	50
5.	CONSIDERACIONES FINALES	51
6.	REFERENCIAS	52

La información presentada en este documento es de exclusiva responsabilidad de los autores y no compromete a la EIA.

LISTA DE TABLAS

	pág.
Tabla 4. Relación Ca/P.....	37
Tabla 5. Variaciones de pH.....	39
Tabla 6. Comparaciones de bandas características en FTIR.....	46

LISTA DE FIGURAS

	pág.
Figura 1. Concentraciones del SBF en relación al plasma sanguíneo humano (Tadashi & Takadama, 2006).....	21
Figura 2. Métodos de encapsulación (LÓPEZ CÓRDOBA, 2012).....	22
Figura 3. Estructura Alginato (LÓPEZ CÓRDOBA, 2012).....	23
Figura 4. Estructura química del Quitosano (Lárez, 2003).	23
Figura 5. Estructura de la Gelatina (Cádiz, 2016)	24
Figura 6. Esquema de adición de polímeros (Ocampo, 2012).....	24
Figura 7. Composición PMMA (Koleva, n.d.)	25
Figura 8. Esquema equipo SEM (Clavijo, 2013)	27
Figura 9. Replicas Sumergidas en SBF para los 7, 14 y 21 días.....	29
Figura 10. Procedimiento Bioactividad.....	30
Figura 11. Procedimiento Degradación.....	32
Figura 12. Aspecto físico de las muestras	33
Figura 13. Sistema Encapsulado Microscopia Electrónica de barrido (SEM)	33
Figura 14. Muestra Control Sección Transversal vista en SEM.....	34
Figura 15. Microscopia electrónica de barrido luego de estar sumergidas en SBF	36
Figura 16. SEM Sección Transversal.....	36
Figura 17. EDS muestra de la matriz PMMA, PU y HCPLD	38
Figura 18. Promedio Degradación	40
Figura 19. Promedio Absorción.....	42
Figura 20. FTIR del hueso cortical particulado liofilizado y desmineralizado	43

La información presentada en este documento es de exclusiva responsabilidad de los autores y no compromete a la EIA.

Figura 21. FTIR Muestra de referencia (PU+PMMA+HCPLD)	44
Figura 22. Espectro FTIR - Productos de degradación por cada semana	45
Figura 23. Curva de calibración MTT	48
Figura 24. Resultado MTT	48

LISTA DE ANEXOS

	pág.
ANEXO 1 <i>ENSAYO DE BIOACTIVIDAD DEL SISTEMA ENCAPSULADO DEL HUESO CORTICAL PARTICULADO LIOFILIZADO Y DESMINERALIZADO CON PU, EN UN FLUIDO BIOLÓGICO SIMULADO: OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN</i>	60
ANEXO 2 <i>PROTOCOLO PARA REALIZAR LA MATRIZ DE POLIURETANO, POLIMETILMETACRILATO Y HCPLD</i>	64
ANEXO 3 <i>REVISIÓN DE DEGRADACION Y PRODUCTOS DE DEGRADACIÓN DE LA VEHICULIZACIÓN DE HCPLD EN UN HIDROGEL</i>	66
ANEXO 4 <i>PONENCIA CONGRESO INTERNACIONAL DE MATERIALES – BARRANQUILLA COLOMBIA</i>	69

RESUMEN

Existe gran variedad de biomateriales que pueden ser usados como implantes óseos en el cuerpo humano, donde se combinan diferentes materiales con la finalidad de obtener un comportamiento biológico y propiedades mecánicas más cercanas al tejido óseo a sustituir; estos materiales deben cumplir con características como osteoinducción, osteoconducción, osteointegración, biocompatibilidad, bioactividad, y degradación.

Los sustitutos óseos sintéticos no proporcionan los elementos necesarios para la osteoconducción, por tanto, se considera de gran utilidad la implementación de la matriz ósea desmineralizada encapsulada en un biomaterial.

El objetivo de este estudio fue evaluar la bioactividad, la degradación y productos de degradación del sistema hueso cortical particulado liofilizado y desmineralizado (HCPLD) encapsulado en una matriz polimérica, formada por poliuretano (PU) y polimetilmetacrilato (PMMA).

Se llevaron a cabo estudios de manera *in vitro* para determinar la bioactividad y la degradación del sistema planteado, la bioactividad fue determinada mediante la inmersión de la matriz en fluido corporal simulado (SBF) para probar su capacidad de formación de apatita, mientras que para la degradación se implementó la solución tampón fosfato (PBS) y se analizaba su pérdida de peso y su capacidad de absorción de líquidos. Finalmente, se implementó un análisis de microscopía electrónica de barrido (SEM) y Espectroscopia de difracción de rayos X (EDS) donde se observó una capa de apatita (fosfatos y calcio) en la superficie en tiempos representativos de 7, 14 y 21 días en el SBF, además, durante las pruebas de degradación, todas las muestras presentaron pérdida de peso en un promedio del 15% y una promedio de absorción de líquidos de 36%.

Estas pruebas fueron complementadas con una prueba de citotoxicidad, por el método de tinción de bromuro MTT, donde se identificó, que el sistema PU, PMMA y HCPLD es moderadamente tóxico, pues presenta una viabilidad celular de 62% sin someterlo a lavados, mientras que al tener dos lavados presenta una viabilidad celular de 72% y 74% tres lavados, lo que indica que el sistema sometido a los lavados es levemente tóxico.

Esta matriz polimérica, posee alta adsorción de agua, buena respuesta bioactiva, moderada degradación y sus productos de degradación no son nocivos para la aplicación en regeneración de tejido óseo por lo cual, se puede concluir que el HCPLD encapsulado en la matriz polimérica es un material prometedor para dicho campo.

Palabras clave: *Bioactividad, biodegradación, biomateriales, osteoconducción*

ABSTRACT

There are a great variety of biomaterials that can be used as bone implants in the human body, where different materials are combined in order to obtain a biological behavior and mechanical properties closer to the tissue and substitute; these materials must meet such characteristics as osteoinduction, osteoconduction, osteointegration, biocompatibility, bioactivity, bioabsorption and biodegradation. Substitutes are synthetic don't provide the necessary elements for osteoconduction, therefore, the implementation of the matrix and demineralized encapsulated in a biomaterial are considered very useful. The aim of this study was to evaluate the bioactivity, biodegradation and degradation products of the demineralized matrix (DM) encapsulated in a polymer scaffold.

In vitro studies of bioactivity and degradation by immersion of materials in simulated body fluid (SBF) and phosphate buffer (PBS) have been carried out to test their apatite formation capacity and show their degradation process, respectively, in addition were measured pH and weight loss to observe the bioactivity and degradation processes. Finally, an analysis of scanning electron microcopy (SEM) and X-ray diffraction spectroscopy (EDS) was carried out where an apatite layer (phosphates and calcium) was observed on the surface at representative times of 7 and 14 days in the SBF, in addition, during the degradation tests, all the samples presented the weight loss in an average of 15%.

These tests were complemented with a cytotoxicity test, by the MTT bromide staining method, where it was identified that the PU, PMMA and HCPLD system is moderately toxic, since it presents a 62% cellular viability without subjecting it to wash, while when having two washes, it has a cell viability of 72% and 74% three washes, which indicates that the system subjected to the washes is slightly toxic.

This polymeric scaffold, can have high water absorption, good bioactive response, moderate degradation for application in tissue re-generation, by which, it can conclude that the DM encapsulated in the polymer matrix is a promising material for said field

Keywords: Bioactivity, biodegradation, biomaterials, osteoconduction.

INTRODUCCIÓN

Las enfermedades óseas (Fracturas, osteoporosis, artritis, entre otros) afectan de manera directa la calidad de vida de una persona, especialmente cuando se encuentra en edad adulta. En las últimas décadas las técnicas clínicas, para la atención de dichas alteraciones fisiológicas del tejido óseo y/o fracturas, han evolucionado considerablemente, existen tratamientos como la medicina intensiva, la técnica quirúrgica y los implantes ortopédicos en los cuales se incluyen, las articulaciones protésicas, los implantes espinales, los dispositivos de fijación de fracturas (clavos, tornillos y placas), los clavos intramedulares y los materiales biocompatibles para relleno óseo, que han mejorado la atención y recuperación de los pacientes (Stengel D, Bauwens K, Sehoul J, Ekkernkamp A, 2001).

En el caso de los rellenos óseos, estos tienen una función mecánica y biológica ya que ellos inducen la formación ósea, promoviendo una modificación del ambiente celular de los alrededores del tejido, pues cuando se realiza la implantación de un injerto óseo, los efectos de esta matriz es inducir la formación ósea. Existen diferentes tipos de injertos óseos: injertos autólogos (obtenidos del mismo paciente), injertos homólogos (de la misma especie pero diferente genéticamente), injertos heterólogos o xenoinjertos (de origen natural o de otra especie). Para este último tipo, se cuenta con injertos provenientes de bovinos y derivados del coral como: Ostrix, osteogen, Biooss, entre otros, que se encuentran comercializados (Tortolini & Rubio, 2012).

El injerto óseo es ampliamente utilizado en cirugía ortopédica para reparar tejidos óseos lesionados, envejecidos o enfermos. Cada año, aproximadamente 2,2 millones de intervenciones en las que se implantan injertos óseos son realizadas en todo el mundo, cifra que estará aumentando con el tiempo debido al envejecimiento de la población (Giannoudis, Dinopoulos, & Tsiridis, 2005). El injerto óseo autólogo es un procedimiento efectivo, pero implica muchos requerimientos pues este es limitado en la cantidad que puede ser obtenida del paciente y el proceso de obtención puede inducir morbilidad, dolor y complicaciones para el paciente, por el contrario, el aloinjerto es un tipo de injerto óseo, el cual el hueso se recupera de otro individuo de la misma especie, y este garantiza propiedades osteoconductoras. Se han implementado diferentes tipos de rellenos óseos, algunos con presencia de hidroxiapatita o matriz ósea desmineralizada (DM) (aloinjerto) la cual tiene una composición y estructura similar a los minerales presentes en el hueso (Alexis & Ozols, 2012). La DM o el hueso cortical particulado liofilizado y desmineralizado (HCPLD) es preparado mediante su exposición a agentes químicos los cuales permiten la remoción del calcio, conservando el colágeno, las proteínas y factores de crecimiento para facilitar la regeneración ósea (Tissue Bank, 2013). Sin embargo, el procedimiento llevado a cabo solamente con DM o HCPLD, puede ocasionar mucha migración de partículas y poca efectividad en el tratamiento, por tanto, actualmente se implementa el uso de dichos aloinjertos encapsulados en biomateriales, como las cerámicas y biopolímeros, que permitan la interacción implante-tejido, con propiedades biocompatibles y fuerza mecánica (Aldridge & Urbaniak, 2004; Stanovici et al., 2016).

La información presentada en este documento es de exclusiva responsabilidad de los autores y no compromete a la EIA.

Este estudio, pretende evaluar las propiedades biológicas (bioactividad, degradación, absorción de líquidos y toxicidad *in vitro*) del hueso cortical particulado liofilizado y desmineralizado (HCPLD) encapsulado en un polímero.

En este trabajo, inicialmente presenta una descripción del estado del arte sobre las técnicas y materiales que han sido empleadas en regeneración ósea, luego se da contextualización del tema, como el marco teórico que permite comprender las herramientas y técnicas que fueron llevadas a cabo para cumplir con el objetivo del trabajo, seguida de la metodología implementada para la elaboración de la matriz polimérica y la caracterización, luego de esto, se exponen los resultados obtenidos y la discusión, donde se muestra los logros obtenidos y permite conocer los aspectos a tener en cuenta para investigaciones futuras.

1. PRELIMINARES

1.1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Diferentes patologías (quísticas, tumorales o traumáticas) pueden originar cambios estructurales y morfológicos en el tejido óseo, estas alteraciones, conocidas como defectos óseos, afectan la funcionalidad del sitio lesionado y aumenta la probabilidad de sufrir una fractura patológica, a nivel de columna, extremidades (inferiores o superiores) y maxilar (Alexis & Ozols, 2012).

“Actualmente hay más de 325 millones de personas mayores de 65 años en el planeta, cifra que, según se estima, incrementará a unos 1500 millones para el 2050” (Mosquera, Maurel, Pavón, Arregui, & Moreno, 1998), a causa de estas cifras de envejecimiento aumenta la incidencia exponencial en relación a la edad con la posibilidad de fracturas o lesiones ortopédicas.

En el año 2008 se produjeron 5236 y 2104 fracturas de cadera en mujeres y hombres mayores de 45 años; los efectos estimados para el 2050 muestran un aumento significativo en dichas cifras, tanto para mujeres como para hombres, superior al 20%; por otro lado, en México se evalúa la cantidad anual de fracturas de cadera, siendo de aproximadamente 29732 en 2005 y para el 2050 esta incrementará un 18%. Si la incidencia específica relacionada con la edad de las fracturas de cadera continúa en aumento, la cantidad de fracturas de cadera aumentaría en un 46% adicional” (Zanchetta & MacDonald, 2012) and (Bouxsein & Genant, 2010).

Específicamente en Colombia, “se estima que ocurren entre 8000 y 10000 fracturas de cadera por año, y además actualmente 2.609.858 y 1.423.559 mujeres viven con osteopenia y osteoporosis, Cifras que para el 2050 podrían incrementarse a 3.852.000 y 2.101.000, respectivamente” (Zanchetta & MacDonald, 2012) (Bouxsein & Genant, 2010).

En los últimos tiempos, las técnicas de ayuda para las alteraciones fisiologías y/o fracturas han evolucionado considerablemente reportando varios cambios en la atención del paciente, como la medicina intensiva, la técnica quirúrgica y los implantes ortopédicos, en este último se incluyen, articulaciones protésicas, implantes espinales, dispositivos de fijación de fracturas, clavos, tornillos y placas, así como clavos intramedulares y materiales biocompatibles (Stengel D, Bauwens K, Sehouli J, Ekkernkamp A, 2001).

Un método comúnmente aplicado es el injerto óseo, se cuenta con diferentes tipos de injertos, los cuales se clasifican según su origen. Pueden distinguirse los extraídos del propio paciente (autólogos); los provenientes de otro individuo de la misma especie, pero

La información presentada en este documento es de exclusiva responsabilidad de los autores y no compromete a la EIA.

de diferente genotipo (aloinjertos) los de origen animal como el hueso de bovino y los sintéticos (Alexis & Ozols, 2012).

En el área de la medicina ortopédica y la odontología, se realiza frecuentemente, resecciones de tejido óseo; esto ha hecho que surja la utilización de materiales inertes como substitutos óseos, debido a la habilidad que tienen en la regeneración del hueso, por tanto, analizar la bioactividad de Hueso Cortical Particulado Liofilizado y Desmineralizado, permitiría la optimización del tratamiento de fracturas por el envejecimiento, patologías y/o accidentes de tránsito, garantizando un mejor funcionamiento del tejido usado.

En Colombia, en la ciudad de Medellín se cuenta con un banco de tejidos, Tissue Bank, encargado de producir el hueso cortical particulado liofilizado y desmineralizado con aplicación en áreas como: ortopedia, odontología y neurología, pero a causa del gran número de intervenciones y aplicaciones de este hueso, se requiere un estudio de la bioactividad del hueso encapsulado para aportar información del sistema determinando si él genera la formación de nuevo tejido óseo.

Este estudio de bioactividad, permitiría hacer del proceso de regeneración de tejidos óseos, garantizable y seguro, que les ofrecerá a las pacientes con diferentes patologías, un tratamiento biocompatible, que tiene como finalidad restablecer la integridad anatómica y funcional del hueso.

Este estudio favorece también, en gran medida a la empresa Tissue Bank, pues esta ofrece en su catálogo comercial el HCPLD, al cual no se le ha realizado un estudio de bioactividad, para determinar y garantizar si este si favorece a la generación del tejido óseo, de manera similar se ven favorecidas las instituciones prestadoras de servicios de salud, ya que les permitiría garantizar el producto que están ofreciendo a sus usuarios (médicos-pacientes), y por último, también se ven favorecidas la Universidad EIA y la Universidad CES para contribuir a línea de investigación en los estudios que se han llevado a cabo implementando el HCPLD.

Así, las probabilidades de éxito del tratamiento serán notorias y disminuirán considerablemente los posibles riesgos y complicaciones durante el implante del injerto.

1.2 OBJETIVOS DEL PROYECTO.

1.2.1 Objetivo General

Evaluar la bioactividad del sistema hueso cortical particulado liofilizado y desmineralizado (HCPLD) encapsulado en una matriz.

1.2.2 Objetivos Específicos

1.2.2.1 Encapsular en una matriz el HCPLD procesado por Tissue Bank.

La información presentada en este documento es de exclusiva responsabilidad de los autores y no compromete a la EIA.

1.2.2.2 Determinar las propiedades físico-químicas (morfológicas y grupos funcionales) de HCPLD y el sistema encapsulado.

1.2.2.3 Evaluar, de manera in vitro, los compuestos que se forman al contacto el HCPLD encapsulado con un medio fisiológico simulado.

1.3 MARCO DE REFERENCIA

1.3.1 Antecedentes

En la literatura se han encontrado estudios en los cuales se ha reportado la bioactividad de diferentes materiales donde determinan la capacidad de los implantes de desarrollar apatita en la superficie, ya que este facilita la unión de los implantes con el tejido óseo.

Según Arenas y colaboradores en un *“Estudio comparativo de la bioactividad de diferentes materiales cerámicos sumergidos en fluido simulado del cuerpo”* donde se trabajó con hidroxiapatita (HA) porosa, se identificó que la HA permite un contacto mayor entre los fluidos que rodean el implante, debido a la gran área superficial que le confieren los poros. La investigación se llevó a cabo sumergiendo muestras de materiales estudiados en un fluido biológico simulado (SBF), la caracterización se realizó por Microscopía Electrónica de Barrido con análisis lineal por EDX para determinar los perfiles composicionales de la superficie de la muestra, las muestras reaccionaron con el SBF mostrándose una capa rica en calcio (Ca) y P en la superficie, identificada como apatita (CaP), dicha reacción que indica la bioactividad de estos materiales (Arenas, Vásquez, Spadavecchia, Camero, & González, 2006).

En el 2013, según el estudio *“Recubrimientos de hidroxiapatita nanocrystalina, preparación, caracterización y evaluación de la bioactividad”*, que plantea la optimización de los parámetros del proceso llevado a cabo para realizar recubrimientos de hidroxiapatita HA sobre la aleación Ti-6Al-4V. Se implementaron métodos de caracterización mediante las técnicas de DRX y MEB/EDX, donde se evaluaba la adherencia, comportamiento frente a la corrosión y bioactividad en un fluido biológico simulado, a partir de ahí llegaron a la conclusión de que los recubrimientos pueden ser una ventaja para permitir la circulación de medicamentos y fluido fisiológico (Peón et al., 2013).

En la investigación llevada a cabo por Fernández y colaboradores, se pretendía evaluar la bioactividad de capas de alginato de sodio en discos de hidroxiapatita, una vez obtenidos dichos discos mediante prensado y sinterización, se sumergieron en un fluido biológico simulado (SBF) para evaluar la interacción del biomaterial con el fluido, es decir para evaluar la bioactividad, dicho fluido fue elaborado tal como lo plantea Kokubo y colaboradores; la determinación de la bioactividad se llevó a cabo en microscopio electrónico de barrido SEM, donde se identificaron cambios morfológicos del biomaterial además observaron cómo desaparecieron los poros de los discos de HAp, la inmersión fue llevada a cabo por 27 días, y entre el día 6 y el día 12 se identificaban cambios en el tamaño de dichos aglomerados. Además dicho análisis se corroboró con los ensayos de

La información presentada en este documento es de exclusiva responsabilidad de los autores y no compromete a la EIA.

EDX, que reportaba la presencia de fosfatos (P) y calcio (Ca) (Fernández Abreu, Alves Junior, González Ruíz, Valin Fernández, & Valin Riverai, 2014).

De manera similar, otro estudio habla de la bioactividad *in vitro* de los materiales compuestos de nitrato de silicio-hidroxiapatita, el recubrimiento con hidroxiapatita fue preparado por vía sol-gel, que proporciona el producto puro, estable y nano-cristalino, se concluyó que el recubrimiento de HA sobre los sustratos de cerámica a base de nitrato de silicio es biocompatible y se logró inducir la nucleación y crecimiento de apatita similar al hueso en sus superficies mediante la simulación en un fluido biológico, también se realizó una prueba de MTT que confirmó la no citotoxicidad del nitrato de silicio-hidroxiapatita como materiales compuestos a la línea celular probado (Precnerová et al., 2015).

Para el 2015, el estudio "*In Vitro Evaluation of Bioactivity of Chemically Deposited Hydroxyapatite on Polyether Ether Ketone*", fue llevado a cabo un método para recubrir el material PEEK con hidroxiapatita donde se estudió la proliferación celular de células madre mesenquimales y la formación de apatita en pruebas con fluido corporal simulado (SBF) para investigar el efecto de este método en la mejora de la bioactividad de PEEK. Y se realizó la comparación entre el material cubierto por HA y el material sin recubrimiento y aunque los resultados fueron buenos se concluyó que el método para la deposición de HA en la superficie se necesita corroborar con análisis *in vivo* en directo contacto con el cuerpo humano (Almasi et al., 2015)

El vidrio bioactivo 45S5 (también conocido por su nombre comercial Bioglass®) fue sumergido con éxito por un biopolímero derivado natural, aumentando su capacidad de formación de apatita. Se mostró que el biopolímero aceleraba las primeras etapas de bioactividad, induciendo una transición rápida a la formación de la capa amorfa Fosfato de calcio, en el mecanismo de capacidad formadora de apatita. La precipitación más rápida de los cristales de Ca/P en las muestras recubiertas dio como resultado la formación de un fosfato de octacalcio amorfo intermedio, que se transforma después en una capa de apatita con alto espesor. El efecto del espesor del revestimiento se estudió también en muestras revestidas con suspensiones de polímero de diferentes concentraciones (0,15% y 1,5%, p/v), lo que revela que la cinética de formación de la capa final de apatita hidroxycarbonatada aumenta con el espesor del recubrimiento. También se investigó el mecanismo mediante el cual esta capacidad de formación de apatita se aceleró, revelando que ciertos grupos funcionales presentes en la estructura del polímero le permiten actuar como una matriz orgánica y un sitio de nucleación preferencial para el crecimiento del hidrocarbonato (Araújo et al., 2015).

Otro estudio, crea una propuesta innovadora para la síntesis de micro-esferas de material compuesto biogelizado de gelatina/sílice, utilizando una emulsión acoplada con separación de fase inducida térmicamente (TIPS); se usó una mezcla del disolvente (agua) y no disolvente (etanol) para inducir una separación de fases única de mezclas de gelatina/sílice (es decir, fases ricas en híbridos de gelatina/sílice y fases líquidas). Todas las micro-esferas compuestas sintetizadas con contenido de sílice de 10% en peso, 15% en peso, y 20% en peso, Además, estaban compuestas por paredes de nanofibras del material compuesto de gelatina/sílice. La bioactividad *in vitro* formadora de apatita de la gelatina nanofibrosa / Sílice, se caracterizó utilizando el fluido corporal simulado (SBF), en

La información presentada en este documento es de exclusiva responsabilidad de los autores y no compromete a la EIA.

el cual se sumergieron las micro-esferas, a una temperatura controlada de 37°C durante 3 días, la formación de capas de apatita sobre las micro-esferas compuestas fue examinada por SEM y EDS; luego de los 3 días del ensayo, se encontró que, las micro-esferas de gelatina mostraron una superficie relativamente lisa pero cuando se utilizó un contenido de silicio del 10% en peso, los cristales de apatita comenzaron a precipitar sobre las superficies de la micro-esfera, lo que concluye que la capacidad de formación de apatita se mejoró notablemente con un aumento en el contenido de silicio (Noh, An, Jo, Koh, & Kim, 2015).

En el 2016 se realizó una evaluación de bioactividad de nuevos andamios nanocompuestos de tejido óseo, consistió en preparar estructuras a base de celulosa con un injerto de poli(acrilamida) compuesto de diferentes contenidos de nano-hidroxiapatita (n-HAP), implementando la polimerización por radicales libres, los elementos de caracterización de estos andamios fueron llevados a cabo por métodos como: espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FTIR) espectroscopia, microscopía electrónica de barrido (SEM) y de difracción de rayos X (XRD) y estudios mecánicos hechos a tracción. A partir de los análisis se mostró, el contenido de n-HAp en la estructura de andamio aumentó la porosidad, módulo de elasticidad y se incrementaron resistencia a la compresión; se concluyó que la morfología de la superficie de la muestra con la cantidad más alta de nHAp mostró una apariencia más densa con la apatita de tamaño pequeño precipitado. Los resultados sugieren que sintetizados los andamios de nanocompuestos de polímero son factibles y bioactivos, por tanto se pueden implementar como portadores para la entrega de medicamentos y otros (Saber-samandari, Saber-samandari, Ghonjizade-samani, Aghazadeh, & Sadeghi, 2016).

En este mismo año, se realizó un estudio comparativo de la bioactividad entre compuestos que contienen hidroxiapatita sintética no sustituida y sustituida con carbonato, donde se compararon los compuestos de HA y carbonato de hidroxiapatita (CHAP), la bioactividad de los compuestos se evaluó *in vitro* por inmersión en un fluido corporal simulado (SBF), los resultados mostraron el aumento de peso para ambos materiales después del tratamiento SBF, este análisis indicó pérdida de iones calcio de fósforo durante el experimento. Todos estos resultados indican la formación de apatita y la capacidad de ambos biomateriales sugieren propiedades bioactivas comparables de material compuesto que contiene hidroxiapatita pura y un carbonato-sustituido (Borkowski, Sroka-bartnicka, Ptak, Zi, & Anna, 2016)

En el estudio ***“Bioactivity and biocompatibility of hydroxyapatite-based bioceramic coatings on zirconium by plasma electrolytic oxidation”***, los recubrimientos del óxido electrolítico de plasma (PEO) fueron realizados a base de hidroxiapatita (HAP) sobre zirconio a diferentes densidades en una solución que contenía acetato de calcio y glicerofosfato de β -calcio, la superficie morfológica, los grupos funcionales, el grosor y la rugosidad de los revestimientos se caracterizaron mediante difracción de rayos X (XRD), microscopía electrónica de barrido (SEM), espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (ATR-FTIR), el método de corriente de Foucault y la superficie perfilómetro. Las fases de zirconia cúbica, zirconato de calcio y HAP fueron detectados por XRD. La cantidad de HAP y zirconato de calcio aumentó con el aumento de la densidad. Se presentó muy porosa y rugosa. La bioactividad Y la biocompatibilidad de los

La información presentada en este documento es de exclusiva responsabilidad de los autores y no compromete a la EIA.

recubrimientos se analizaron mediante la inmersión *in vitro* en un fluido biológico simulado (SBF) y MTT (bromuro de 3- (4,5 - dimetiltiazol - 2 - il) - 2,5 - difeniltetrazolio), ensayo de hemólisis y formación de bacterias. La capacidad de formación de apatita de los recubrimientos fue evaluada después de inmersión en SBF hasta 28 días. Se concluyó que la superficie a base de óxido la bioactividad de la superficie PEO sobre zirconio fue significativamente mejorada en las condiciones SBF; las superficies basadas en HAP fueron mejoradas por PEO. La unión celular y la proliferación de la PEO, además, los recubrimientos fueron mejores que los de zirconio sin revestir de acuerdo con los resultados del ensayo MTT (Aktuğ, Durdu, Yalçın, Çavuşoğlu, & Usta, 2016).

Otro estudio, acerca de la potencial aplicación de poli-succinato de butileno (PBSu) como un nuevo biomaterial, y el cual no es ampliamente utilizado debido a su insuficiente bioactividad, para esto, se realizó su implementación mediante la incorporación de vidrios bioactivos, con esto se podría favorecer el crecimiento óseo; los compuestos de PBSu que contenían 2,5% de micro-Bioglass (mBG), nano-hidroxiapatita (nHA) o mBG-nHA que se prepararon de manera *in situ*, y se estudiaron sus propiedades fisicoquímicas y biológicas, se logró identificar que dicha combinación favoreció la biodegradabilidad de PBSu, mejora de la formación de apatita en contacto con el medio simulado para su estudio de manera *in vitro* (Nerantzaki et al., 2016).

1.3.2 Marco Teórico

1.3.2.1 Histología del tejido óseo

El hueso, contiene una matriz extra celular denominada matriz osteoide, la cual está constituida por 15% de agua, 30% de fibras colágenas y 55% de sales minerales cristalizadas, el fosfato de calcio y el hidróxido de calcio son las sales minerales más abundantes en el hueso, lo que permite que la interacciones de estas con otros iones endurezcan el tejido (Tortora & Derrickson, 2013).

El tejido óseo presenta cuatro tipos de células: (Tortora & Derrickson, 2013)

Células osteogénicas: son células madre no especializadas derivadas del mesénquima, además son las únicas células óseas que presentan división celular, y cuyas células hijas son osteoblastos (Tortora & Derrickson, 2013).

Osteoblastos: son células generadoras de hueso las cuales sintetizan y secretan fibras de colágeno y componentes orgánicos necesarios para construir la matriz osteoide (Tortora & Derrickson, 2013).

Osteocitos: son células óseas maduras, con un papel fundamental pues estas mantienen el metabolismo mediante el intercambio de nutrientes y productos metabólicos con la sangre (Tortora & Derrickson, 2013).

Osteoclastos: Células de gran tamaño, permite la liberación de enzimas lisosómicas y ácidos que digieren los componentes minerales de la matriz osteoide subyacente; esta

La información presentada en este documento es de exclusiva responsabilidad de los autores y no compromete a la EIA.

descomposición de la matriz osteoide es parte de la formación, mantenimiento y reparación normales del hueso (Tortora & Derrickson, 2013).

1.3.2.2 Hueso Particulado

El hueso particulado es ampliamente utilizado en ortopedia y odontología como injertos, el cual consiste en múltiples partículas de diferentes tamaños de hueso cortical, esponjoso o ambos (Adrian et al., 2010).

Este hueso puede ser obtenido como: autógeno, homogéneo, heterogéneo o aloplástico, dependiendo del volumen y del defecto o fisura tratada para cubrir con dicho material (Adrian et al., 2010).

El hueso particulado es llevado hacia el receptor en el tratamiento de un defecto óseo, siendo gradualmente reabsorbido y promoviendo la neo formación ósea, además a medida que el tamaño de la partícula es mayor más tiempo le tomará para ser reabsorbida, en contraste si la partícula es de menor, mayor será el número de células osteogénicas en el área (Adrian et al., 2010).

1.3.2.2.1 Descripción Hueso cortical particulado

Según la empresa Tissue Bank (2013) “el hueso cortical es un tipo compacto de tejido óseo, el cual facilita las funciones principales del hueso en el cuerpo, tales como apoyar y proteger los órganos vitales, proporcionando palancas para los movimientos y el almacenamiento de minerales, especialmente calcio” (Tissue Bank, 2013).

“Se encuentra en el exterior de los huesos y tiene una densidad mucho mayor, por lo tanto, es ampliamente utilizado para reparar fracturas de huesos” (Tissue Bank, 2013).

El HPDL es preparado en base a la exposición de agentes químicos al tejido óseo, el cual permite la remoción del calcio, conservando el colágeno y las proteínas, incluyendo factores de crecimiento facilitando así la regeneración ósea (Tissue Bank, 2013).

1.3.2.2.2 Características

Capacidad osteoinductiva (formación de nuevo tejido óseo por sí mismo).

Capacidad osteoconductiva (crecimiento del hueso dañado -osteoblastos-, penetrando en la cavidad o la superficie del material inerte) (Tissue Bank, 2013).

1.3.2.2.3 Aplicaciones (Tissue Bank, 2013).

- Elevación del seno maxilar
- Tratamiento de fracturas
- Aporte óseo en pseudoartrosis
- Cirugía odontológica
- Cirugía ortopédica
- Traumatología general

La información presentada en este documento es de exclusiva responsabilidad de los autores y no compromete a la EIA.

1.3.2.3 Proceso de Osificación y Osteogénesis

El hueso tiene gran capacidad para la reparación y la regeneración, las cuales se dan en una secuencia de etapas de formación de hueso, una cascada celular puede ser iniciada mediante la implantación de una matriz ósea desmineralizada, los efectos de esta matriz inductora de formación ósea se han visto iniciados por la inmigración transitoria de leucocitos polimorfonucleares en el primer día, den el tercer día se ve una migración y adhesión de células óseas mesenquimales a la matriz ósea; dichas células progenitoras proliferan y se diferencian en condroblastos y condrocitos para el sexto y séptimo día. Para el día noveno ya se puede empezar a observar la vascularización del tejido y el cartílago es reabsorbido y reemplazado por hueso nuevo entre los días diez y doce (Fernández, 2014).

Los osteoblastos inician la formación ósea a través de secreción de la matriz osteoide, una matriz ósea no mineralizada. Más tarde, continúan su aporte mediante vesículas especiales llamadas vesículas de matriz, aportando minerales de apatita y fosfatasa alcalina (Fernández, 2014).

1.3.2.4 Bioactividad

La bioactividad hace referencia a la capacidad de un material de unirse fuertemente al hueso sin intervención externa, de acuerdo con la definición der SF Hulbert y colaboradores, “un material bioactivo es aquel que induce una respuesta biológica específica en la interfaz del material que conduce a la formación de uniones entre el tejido y el material” (Hulbert SF, Hench LL, Forbers D, 19822), (Matesanz S., 2015). Es importante conocer que los materiales bioactivos no provocan la formación de una cápsula fibrosa alrededor, ni respuesta inflamatoria o toxicidad (Matesanz S., 2015).

La identificación de la capa de HAp sobre la superficie de un biomaterial de manera in vitro se puede realizar mediante la implementación de un fluido biológico simulado, además de simular un ambiente similar al organismo humanos, Kokubo y colaboradores propusieron la formulación del fluido corporal (SBF) con una concentración de iones casi igual a la del plasma corporal humano tal (Figura 1) (Tadashi & Takadama, 2006).

El mecanismo propuesto es que los materiales bioactivos muestran una carga superficial negativa en SBF, debido a desprotonación de grupos tipo -COOH u -OH a pH fisiológico. Esta carga negativa atrae iones de calcio creando una capa rica en Ca²⁺ con potencial de superficie positivo, que atrae a iones negativos en soluciones tipo fosfato, llevando a la deposición de una capa pobre en Ca²⁺ (Oliveira, Mano, & Reis, 2003; Rodríguez Celhay, 2014)

Table 1
Ion concentrations of SBFs and human blood plasma

	Ion concentration (mM)							
	Na ⁺	K ⁺	Mg ²⁺	Ca ²⁺	Cl ⁻	HCO ₃ ⁻	HPO ₄ ²⁻	SO ₄ ²⁻
Human blood plasma [15]	142.0	5.0	1.5	2.5	103.0	27.0	1.0	0.5
Original SBF	142.0	5.0	1.5	2.5	148.8	4.2	1.0	0
Corrected SBF (c-SBF)	142.0	5.0	1.5	2.5	147.8	4.2	1.0	0.5
Revised SBF (r-SBF)	142.0	5.0	1.5	2.5	103.0	27.0	1.0	0.5
Newly improved SBF (n-SBF)	142.0	5.0	1.5	2.5	103.0	4.2	1.0	0.5

Figura 1. Concentraciones del SBF en relación al plasma sanguíneo humano (Tadashi & Takadama, 2006).

1.3.2.4.1 Biomineralización de la apatita

La apatita es la fase del mineral más importante de la que se compone el tejido duro como el hueso en el cuerpo humano. La biomineralización de la apatita, es un proceso de auto-remodelación guiado por células óseas y proteínas, este proceso también ocurre en superficies de biomateriales como cerámicas, titanios amorfos, y fosfatos de calcio sintético, estos materiales reciben la calificación de bioactivos, y utilizan la apatita mineralizada en sus superficies para interactuar e integrarse al tejido humano. Se considera que la biomineralización de la apatita en una cerámica bioactiva es una consecuencia de una reacción superficial de cerámica con plasma sanguíneo intersticial, de la cual la cascada del núcleo parece inorgánica. Específicamente *in vitro*, un fluido corporal simulado acelular (SBF) con concentraciones iónicas casi iguales a las del plasma sanguíneo podría reproducir la formación de apatita en cerámicas bioactivas *in vivo* (Kim, Himeno, Kawashita, Kokubo, & Nakamura, 2004).

Resumiendo, La biomineralización se describe como un fenómeno donde un mineral se integra como parte funcional y a menudo estructural de un organismo vivo, en contacto directo y cercano con una matriz, formando proteína o estructura de carbohidratos. Las magníficas propiedades y la complejidad de las estructuras mineralizadas son un resultado de las interacciones entre moléculas orgánicas/matrices y el propio mineral.

El mineral de apatita ósea es claramente diferente del mineral geológico de apatita. En primer lugar, el mineral óseo consiste en aglomerados de tamaño nanométrico con aspecto vidrioso, incorporado dentro de fibrillas de colágeno, el mineral óseo contiene una serie de sustituciones iónicas tales como, CO₃²⁻, OH⁻ y PO₄³⁻ también de Na⁺, Mg²⁺ y Ca²⁺, la apatita es conocida por su capacidad para someterse a intercambio iónico con iones metálicos en soluciones acuosas, lo que explica la alta variabilidad en la composición mineral ósea (Kim et al., 2004).

La información presentada en este documento es de exclusiva responsabilidad de los autores y no compromete a la EIA.

1.3.2.5 Encapsulación

La encapsulación es definida como la tecnología mediante la cual se logra confinar compuestos activos dentro de una matriz polimérica. Esta técnica crea un microambiente en la cápsula capaz de controlar las interacciones entre el interior y el exterior (Borgogna, M., Bellich, B., Zorzín, L., Lapasin, R., y Cesàro, 2010).

La encapsulación es comúnmente utilizada con fines como:

- Proteger el compuesto activo de las alteraciones que pueden ser producidas por el ambiente exterior (LÓPEZ CÓRDOBA, 2012).
- Liberación controlada del compuesto activo bajo condiciones específicas (LÓPEZ CÓRDOBA, 2012).
- Modificar las características físicas del material original y hacer más fácil su manipulación (LÓPEZ CÓRDOBA, 2012).

1.3.2.5.1 Técnicas de encapsulación

Existen diversos métodos para la producción de encapsulados los cuales pueden ser clasificados en dos grupos: métodos físicos y físico-químicos como se puede ver en la figura 3 (LÓPEZ CÓRDOBA, 2012).

Métodos Físicos	Métodos Físico-químicos
Secado en spray	Liposomas
Enfriamiento por spray	Coacervación
Recubrimiento por lecho fluidizado	Gelación iónica
Extrusión	Complejos de inclusión
Co-cristalización	

Figura 2. Métodos de encapsulación (LÓPEZ CÓRDOBA, 2012)

1.3.2.5.2 Polímeros usados en el proceso de encapsulación

Alginato: Este es un polímero natural, constituidos por ácidos D-manurónico y L-glurónico unidos de manera lineal; cuando el contenido de glurónico es mayor, se tienden a formar geles más rígidos y de mayor porosidad (Mokarram, R. R., Mortazavi, S. A., Najafi, M. B. H., Shahidi, 2009) (García, A., López, 2012).

Está formado por homopolímeros en bloques de dos tipos de monosacáridos, el ácido manurónico (M) y el ácido gulurónico (Figura 4) (LÓPEZ CÓRDOBA, 2012)

La información presentada en este documento es de exclusiva responsabilidad de los autores y no compromete a la EIA.

Este biopolímero es el más utilizado en el encapsulamiento de matrices, debido a su compatibilidad, fácil manejo, seguridad y bajo costo (Sohail, A., Turner, M. S., Coombes, A., Bostrom, T., Bhandari, 2011) (García, A., López, 2012).

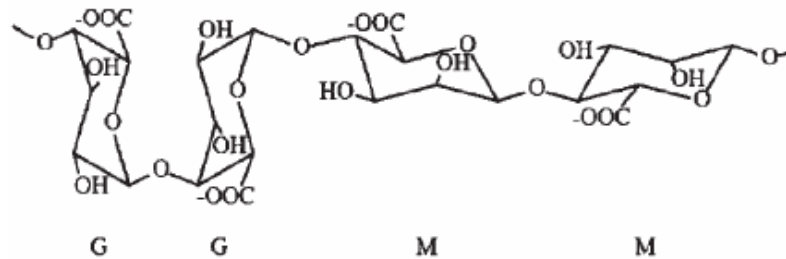


Figura 3. Estructura Alginato (LÓPEZ CÓRDOBA, 2012)

Quitosano: Polisacárido natural de alto peso molecular, encontrado en el exoesqueleto de los crustáceos y las paredes celulares de algunos hongos, es obtenido por la desacetilización de la quitina, es bicompatible, biodegradable, no tóxico, insoluble en agua pero soluble en soluciones ácidas (García, A., López, 2012; Gebelin, C. G., Carraher, 1994).

Este compuesto está formado por dos polisacáridos distribuidos aleatoriamente, D-glucosamina y N-acetil-D-glucosamina (Figura 5); Debido a la presencia de grupos de amino e hidroxilo, exhibe muy buenas propiedades como ligando y formación de películas, andamios y geles, siendo favorable para la fabricación de matrices que permitan el crecimiento celular (Valencia, Martel, Vargas, Rodríguez, & Olivas, 2016)

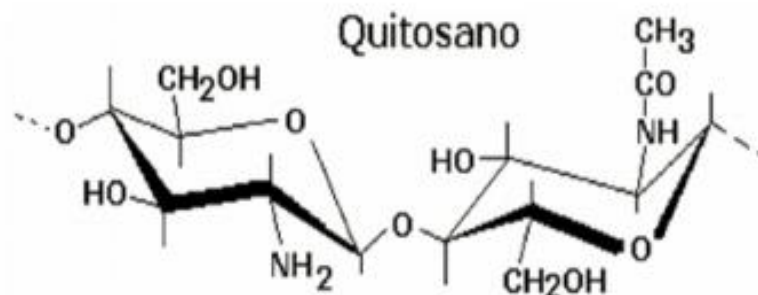


Figura 4. Estructura química del Quitosano (Lárez, 2003).

Gelatina: esta es una proteína extraída del colágeno de los animales. La gelatina tiene diferentes propiedades, es el único hidrocoloide que es proteína, y se funde por debajo de

La información presentada en este documento es de exclusiva responsabilidad de los autores y no compromete a la EIA.

la temperatura corporal además es muy utilizada para la encapsulación de medicamentos, en la figura 6 se puede observar como es la estructura química de la gelatina (García, A., López, 2012).

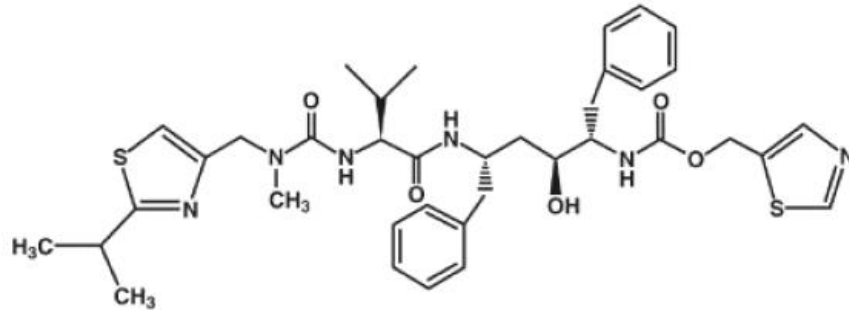


Figura 5. Estructura de la Gelatina (Cádiz, 2016)

Almidón: es un polisacárido, con gran número de unidades de glucosa unidas por enlaces glucosídicos, sus dos componentes principales son la amilosa y la amilopectina. Es ampliamente utilizado debido a su disponibilidad, no toxicidad, biodegradabilidad y bajo costo; además, ha sido utilizado tanto como polímero encapsulante y como material de relleno inerte (LÓPEZ CÓRDOBA, 2012).

Poliuretano: es un polímero formado a través de una reacción exotérmica entre una molécula de isocianato con dos o más grupos funcionales y un polioli. La versatilidad de dicho material está determinada por la variabilidad de polioles y mezclas que pueden ser usadas; El PU es un material sólido que puede ser poroso dependiendo de la densidad del mismo, La porosidad se genera por la presencia de gas debido a la reacción de agentes soplantes químicos como el agua, que reacciona con los grupos isocianato generando ácido carbámico, que de forma espontánea libera CO₂ o cuando se adiciona un agente físico que se evapora (Ocampo, 2012).

Los poliuretanos son polímeros de adición por pasos, que han sido sintetizados, siguiendo el siguiente esquema (Figura 7):

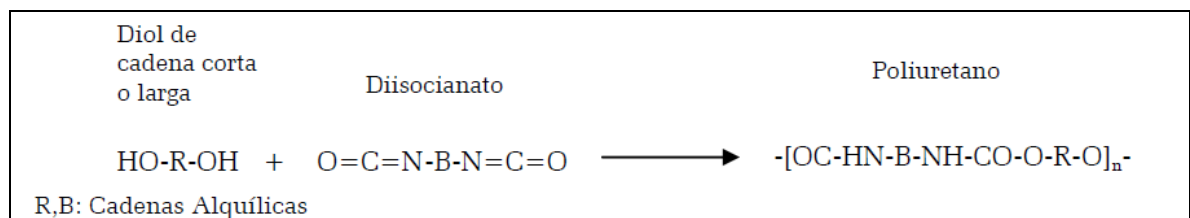


Figura 6. Esquema de adición de polímeros (Ocampo, 2012)

La información presentada en este documento es de exclusiva responsabilidad de los autores y no compromete a la EIA.

Al utilizar un poliuretano como biomaterial se deben tener en cuenta los siguientes aspectos (Bárbara Susana Gregorí et al., 2007; Bárbara Susana Gregorí et al., 2007; Jiménez et al., 2007):

- No provoque ningún proceso tóxico o inflamatorio
- Garantice propiedades mecánicas que soporten la aplicación hasta que el tejido esté cicatrizado
- Sea metabolizado en el organismo después de cumplir su función
- Sea fácilmente procesable para obtener la forma del producto final
- Demuestre durabilidad aceptable
- Sea fácil de esterilizar

Polimetilmetacrilato (PMMA): es un polímero transparente e incoloro que se produce mediante la polimerización por radicales libres, según la siguiente figura (Figura 8); el PMMA es un polímero termoplástico de estructura lineal con alta resistencia mecánica, alto módulo de Young, presenta baja humedad y poca absorción de agua (Koleva, n.d.).

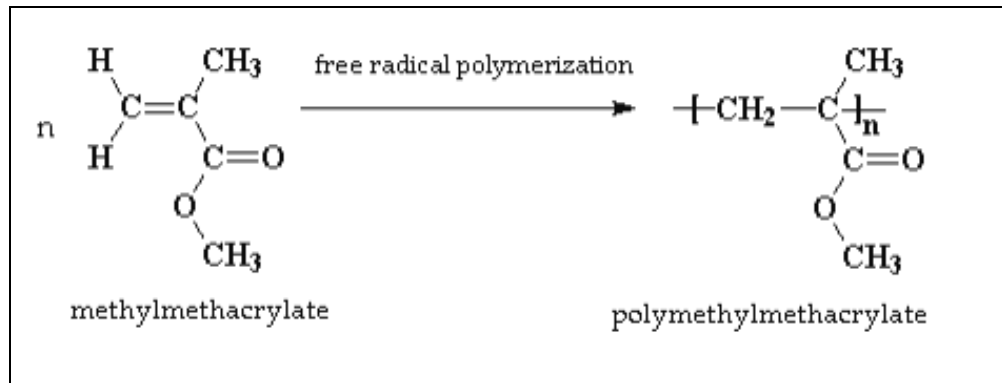


Figura 7. Composición PMMA (Koleva, n.d.)

1.3.2.6 Células CHO

Es una línea celular estandarizada obtenida a partir de un explante de tejido de ovario de hámster chino, se caracteriza por ser aneuploides con un número modal cromosómico entre 20-21; como material de laboratorio es de fácil manejo pues permite ser cultivada de diversas formas, además posee propiedades que la hacen idónea para estudios de daño genético a nivel cromosómico y de gen (Sánchez, 1999).

1.3.2.7 Ensayo MTT

Es un estudio de citotoxicidad *in vitro* sobre una línea celular, para la evaluación de la citotoxicidad se emplean diferentes métodos de tinción celular con el fin de estimar de manera indirecta el número de células viables presentes después de un tiempo sometidas a un tratamiento; el método más empleado es la reducción metabólica de MTT, basado en la reducción de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolio bromuro (Escobar M., Rivera,

La información presentada en este documento es de exclusiva responsabilidad de los autores y no compromete a la EIA.

& Aristizábal G., 2010), El MTT es un indicador de la función mitocondrial, permitiendo la evaluación de la actividad mitocondrial (Escobar M. et al., 2010).

El MTT es una sal de color amarillo que permite identificar la viabilidad por la ruptura causada por la reducción del anillo de la sal del tetrazolio MTT por acción de las enzimas deshidrogenasas mitocondriales para formar unos cristales azules de formazan insolubles en agua, pero solubles en dimetil sulfóxido (DMSO), así la viabilidad celular es proporcional a la absorbancia que presentan los cristales de formazan en la solución y puede medirse espectrofotométricamente leyendo la absorbancia entre 540-570nm (Diaz, 2006; Mosmann, 1983).

1.3.2.8 Técnicas de caracterización

La caracterización tiene como finalidad conocer cómo está constituido el material de interés a ser estudiado, para obtener información sobre:

- Composición química y estructura.
- Textura
- Propiedades mecánicas.

1.3.2.8.1 Difracción de rayos X (DRX)

Los rayos X son una radiación electromagnética de longitud de onda corta producida por el frenado de electrones de elevada energía o por transiciones de electrones que se encuentran en los orbitales internos de los átomos (Tuesta & Vásquez, 2012).

La técnica consiste en hacer incidir un haz de rayos X sobre el sólido sujeto a estudio. La interacción entre el vector eléctrico de la radiación X y los electrones de la materia que atraviesa dan lugar a una dispersión. Al producirse la dispersión tienen lugar interferencias (tanto constructivas como destructivas) entre los rayos dispersados, ya que las distancias entre los centros de dispersión son del mismo orden de magnitud que la longitud de onda de la radiación (Tuesta & Vásquez, 2012).

1.3.2.8.2 Microscopía electrónica de barrido (SEM)

La microscopia electrónica de barrido es una técnica de análisis topográfico, estructural y composicional, “un equipo de SEM es capaz de tomar una “imagen” de la muestra aunque realmente lo que se detecta es la respuesta del material al impacto de un haz de electrones (electrones llamados primarios), en vez de registrar fotones propiamente dichos (como en la microscopía óptica)” (Clavijo, 2013).

El microscopio electrónico de barrido permite analizar la morfología de muestras orgánicas e inorgánicas y biológicas, mediante imágenes de alta y baja resolución, además permite realizar un micro análisis químico elemental semicuantitativo por medio de un detector de energía dispersiva de rayos x (EDX) (Sede de Investigación Universitaria SIU, n.d.).

La información presentada en este documento es de exclusiva responsabilidad de los autores y no compromete a la EIA.

El SEM puede actuar bajo dos modos; el modo de alto vacío, para caracterización de materiales de alta resolución en aplicaciones como evaluación micro y nanoestructural, análisis de falla y determinación de tamaño. El otro modo es el de bajo vacío, permite la observación y el análisis de muestras no conductoras sin necesidad de un recubrimiento metálico (Sede de Investigación Universitaria SIU, n.d.).

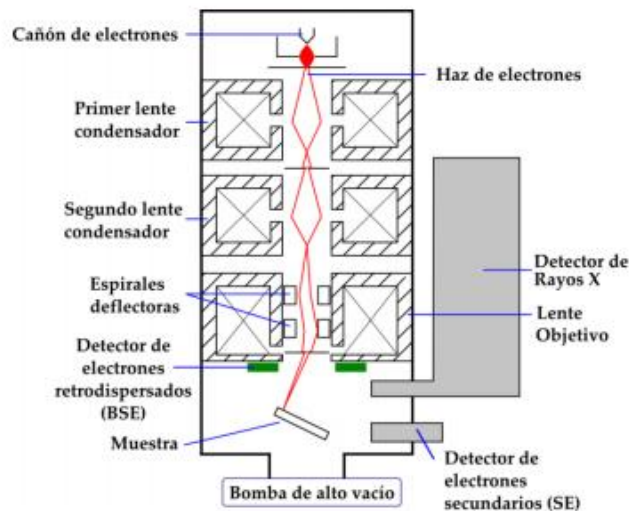


Figura 8. Esquema equipo SEM (*Clavijo, 2013*)

1.3.2.8.3 Espectrometría Infrarroja con Transformada de Fourier (FTIR)

Es un método de obtención de los espectros de infrarrojos mediante la recopilación de primero un interferograma de una señal de muestra usando un interferómetro, y luego realizar una transformada de Fourier (FT) en el interferograma para obtener el espectro, además “es de gran ayuda para la caracterización de grupos funcionales y de estructuras de materiales, así como para el estudio de superficies sólidas, superficies pulidas, estudio de películas depositadas sobre una gran variedad de superficies, líquidos, sólidos en polvo, y otros” (Universidad Autónoma de Madrid, n.d.).

2. METODOLOGÍA

2.1 MATERIALES Y EQUIPOS

Para la matriz de poliuretano (PU), Polimetilmetacrilato (PMMA) y HCPLD, se utilizaron reactivos provistos por el laboratorio de biomateriales de la universidad, como: 1,4 Butanodiol (Merk), Hexamethylene diisocyanate (Merk), Acrílico líquido autopolimizable (Veracril), óxido de dioctil estaño (Comercial), Polimetilmetacrilato (Veracril) y el HCPLD de la empresa Tissue Bank.

En la preparación del fluido biológico simulado (SBF) se necesitaron los siguientes reactivos: Cloruro de Sodio (NaCl-Chemi), Bicarbonato de Sodio (NaHCO_3 Comercial), Cloruro de Potasio (KCl-Merck), Hidrogeno fosfato di-potasio tri-hidratado ($\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ -Sigma), cloruro de magnesio hexahidratado ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ -Comercial), Ácido clorhídrico (HCl-Sigma), Cloruro de Calcio (CaCl_2 -Comercial), Sulfato de sodio (Na_2SO_4 -Sigma), el protocolo completo se puede ver en el Anexo 1.

En la evaluación de la toxicidad realizada con la línea celular CHO k1, se usó un medio de cultivo RPMI 1640 (Sigma-Aldrich) y el método de tinción de MTT-2128 (Sigma).

Los equipos usados para el desarrollo de las diferentes etapas del proyecto fueron: la balanza electrónica (Denver instrument) y pH-metro (Hach SensION3) se usaron para control de peso y pH en el ensayo de degradación, el Desecador (Neurtek instruments) y Termocupla (Schott) se usaron para control de temperatura y humedad en la prueba de bioactividad, la prueba de degradación y bioactividad fueron llevadas a cabo en un horno de incubación (Lindberg/Blue). Además los equipos usados para la caracterización y lectura de las pruebas fueron, el Microscopio Electrónico de Barrido (SEM) (JEOL-JSM 6490LV) para la caracterización de la matriz antes y después del ensayo de bioactividad, para la lectura del MTT se usó el Espectrofotómetro (BIO-RAD X Mark), y los productos de degradación fueron evaluados con un Espectrofotómetro de transformada de Fourier (PerkinElmer).

PROCEDIMIENTO

Para el desarrollo del material encapsulado, la metodología se divide en varias etapas

2.1.1 Encapsular el HCPLD en una matriz polimérica

Se seleccionaron los polímeros que cumplían con los requerimientos necesarios y solicitados por la empresa Tissue Bank para la construcción de dicha matriz, basada en Poliuretano, Polimetilmetacrilato y HCPLD, es importante resaltar que este proceso se llevó a cabo mediante el estudio bibliográfico del estado del arte.

La información presentada en este documento es de exclusiva responsabilidad de los autores y no compromete a la EIA.

Se realizó una muestra, con los reactivos de poliuretano en presentación líquida, polimetilmetacrilato y el HCPL, las cantidades usadas se pueden ver en protocolo presentado como Anexo 2.

Inicialmente, en un beaker se mezclaron butanodiol, el óxido de dioctil de estaño y agua destilada, mezclándolo homogéneamente, en otro beaker se realizó la preparación del PMMA en el líquido autopolimerizable, una vez se obtuvo un aspecto uniforme, se procedió en este mismo beaker a adicionar HCLPD, y el contenido del primer beaker; por último se adicionó el diisocianato (Hexamethylene diisocyanate), mezclando rápidamente para lograr una estructura homogénea, se puso por 40 segundos a una temperatura entre 60-70 °C. Finalmente se consigue una estructura homogénea y moldeable (En el proceso de mezcla no deben quedar partículas en las paredes del beaker).

2.1.2 Determinación de la bioactividad

Se realizó un ensayo de bioactividad, el cual se inició con la preparación de un fluido biológico simulado (SBF), dicho fluido presenta iones similares al plasma sanguíneo (el protocolo completo se puede ver en los anexos, Anexo 1), luego de tener las muestras encapsuladas de la primera etapa, se tomaron 3 réplicas de estas, cada una de las muestras de aproximadamente 2 mm de espesor, 100 mm de ancho y 200 mm de largo, se sumergieron en 6 ml de SBF (Figura 9), se incubaron a 37 °C, durante 7, 14 y 21 días. Al finalizar los días establecidos en los que debían estar las muestras inmersas en el fluido SBF, se procedió a retirarlas, lavarlas con agua bi-distilada, y dejarlas en un desecador de vacío a -42 mmHg y 37°C por aproximadamente un día. En la figura 10 se ejemplifica la metodología mediante un esquema.

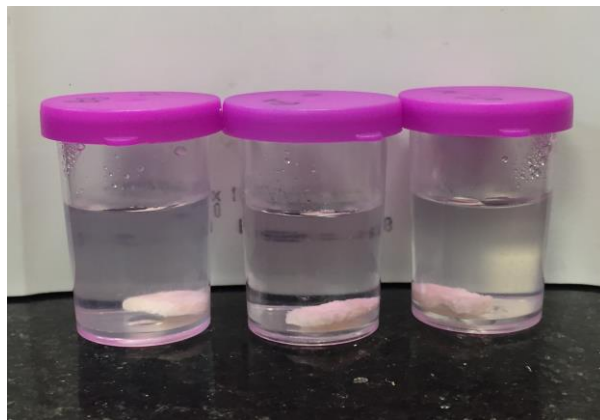


Figura 9. Réplicas Sumergidas en SBF para los 7, 14 y 21 días

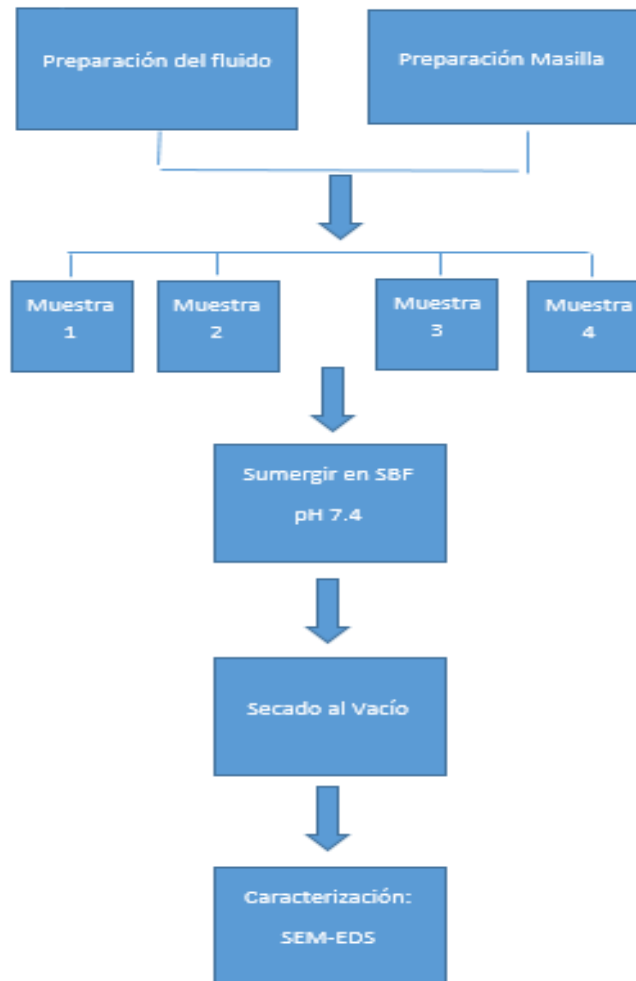


Figura 10. Procedimiento Bioactividad

2.1.3 Determinación de las propiedades físico-químicas y evaluación de los compuestos formados al contacto de la matriz con el medio simulado

Para la determinación de las propiedades de la matriz ósea, se realizó un análisis preliminar en Microscopia electrónica de Barrido (SEM), a un voltaje de 15kv, en el cual se tomaron las imágenes y se identificó una estructura de la muestra control y de las muestras de bioactividad a los 7, 14 y 21 días. A medida que se tomaban las imágenes de SEM, en los lugares donde se observaba un cambio morfológico en relación a la muestra referencia, se utilizó espectrometría de dispersión de energía de rayos x (EDS) para confirmar si ese cambio morfológico se relacionaba con la presencia de una capa de apatita, y si el EDS arrojaba picos característicos de los elementos calcio (Ca) y fósforo (P).

La información presentada en este documento es de exclusiva responsabilidad de los autores y no compromete a la EIA.

Se realizó un análisis de espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier de la muestra control y las muestras de degradación, con el fin de identificar los grupos funcionales presentes en las mismas.

2.1.4 Evaluación de la toxicidad de la matriz encapsulada

Para determinar la toxicidad de la masilla de PU, PMMA y HCPLD se implementó el método de tinción MTT, basado en la reducción de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolio bromuro.

Inicialmente se realizó un cultivo celular para determinar la curva de calibración de la línea celular CHO k1, para esto se varia la concentración celular de cada plato que iba desde 0 hasta 160000 células por pozo, luego se leía la absorbancia correspondiente a cada concentración celular.

Los tratamientos efectuados fueron, la matriz sin lavar, la matriz con dos lavados y la matriz con tres lavados, cada lavado fue realizado por 10 minutos cada uno con la solución PBS, como la prueba fue realizada de manera indirecta, es decir, las macillas no estaban en contacto directo con las células sino que previamente se dejaron las matrices de PU, PMMA y HCPLD en medio de cultivo (RPMI-1640) por 24 horas.

Luego se realizó un cultivo celular con la línea celular CHO K1, en un plato de cultivo de 96 pozos con una densidad celular de 30.000 células/pozo, este cultivo fue realizado en una relación de 50% medio de cultivo fresco y 50% medio de cultivo expuesto al tratamiento. Después de 24 horas se añadió la solución de MTT a una concentración del 10% por pozo, el plato de cultivo se incubó a 37°C y una humedad de 5% de CO₂ durante 4 horas. Como control positivo se realizó un cultivo con Tritón X100 al 1% y el control negativo un cultivo regular de línea celular CHO K1.

La cantidad de cristales de formazan se midió después de las 4 horas, eliminando el sobrenadante y se añadió dimetilsilfóxido (DMSO), los valores de absorbancia se midieron a una longitud de onda de 595 nm en un espectrofotómetro con movimiento orbital.

2.1.5 Ensayo de Degradación

La degradación *in vitro* de la matriz ósea encapsulada en un biomaterial, fue medida en función del porcentaje de pérdida de peso en el transcurso de un mes de estar sumergida en PBS. Se realizaron 4 muestras de esta matriz, las cuales eran sumergidas al menos por 24 horas en el fluido, luego se retiraban y se dejaban 24 horas en secando, ambos procesos en una incubadora a 37 °C durante el tiempo de prueba. Al finalizar cada semana se realizó un registro del pH del fluido (PBS), y se cambiaba la solución nuevamente. En la figura 11 se identifica en un esquema el procedimiento llevado a cabo.

La información presentada en este documento es de exclusiva responsabilidad de los autores y no compromete a la EIA.

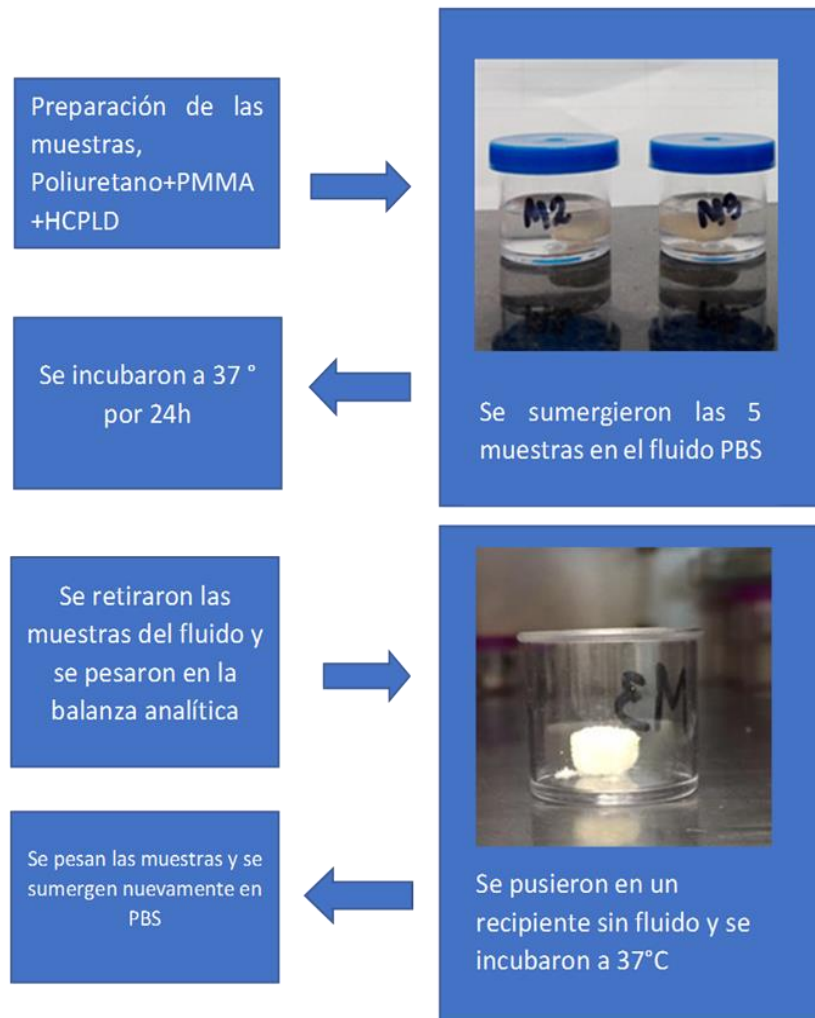


Figura 11. Procedimiento Degradación

3. PRESENTACIÓN Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

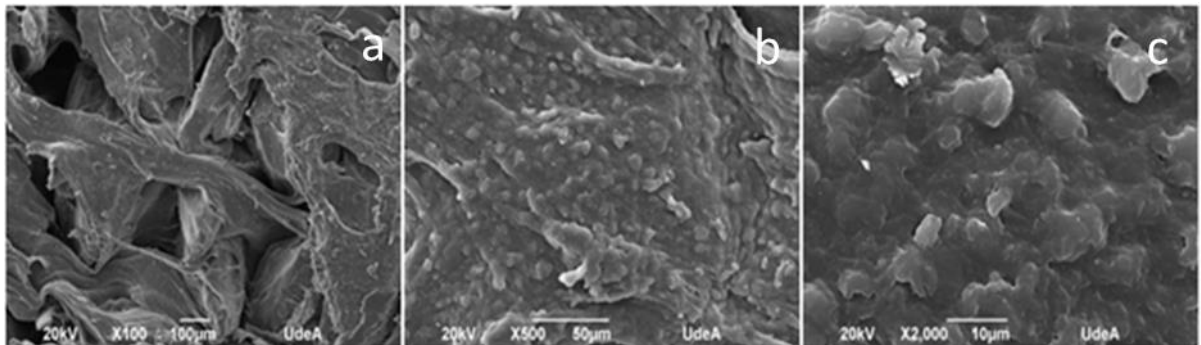
3.1 CARACTERIZACION DEL SISTEMA ENCAPSULADO (PU + PMMA + HCLPD)

En la Figura 12, se puede observar el aspecto final que presentan las muestras, se identifica una estructura compacta, con un aspecto duro y con muy poca desintegración de partículas o residuos.



Figura 12. Aspecto físico de las muestras

Las Figuras 13 y 14, muestran la micrografía electrónica de barrido (SEM) de la matriz polimérica de (PU, HCPLD y PMMA), se observó una estructura porosa, con un tamaño de poro de aproximadamente 100 μm , además, presenta una buena interconectividad entre las partículas de hueso.



a) SEM 100X b) SEM 500 X y c) SEM 2000 X

Figura 13. Sistema Encapsulado Microscopia Electrónica de barrido (SEM)

La información presentada en este documento es de exclusiva responsabilidad de los autores y no compromete a la EIA.

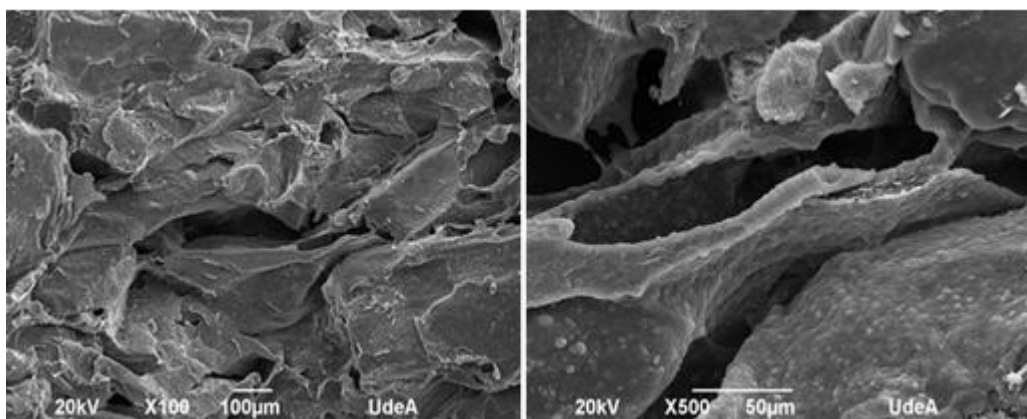


Figura 14. Muestra Control Sección Transversal vista en SEM

Diversos autores reportan la realización de matices poliméricas para la regeneración ósea, donde implementan polímeros como PLGA, PGA, PMMA y PU, dando importancia al tamaño de poro, donde la mayoría de los diámetros de poro están entre el rango de 80-130 μm , dimensión que permite la migración celular, como de las células mesenquimales que poseen un diámetro de aproximadamente 0.1-0.15 μm (Gabriel, Rodrigues, Macedo, Jardini, & Maciel Filho, 2017; Giannitelli et al., 2015; González-García, Téllez Jurado, Jiménez-Gallegos, & Rodríguez-Lorenzo, 2017; Lou et al., 2016; Meskinfam et al., 2018; Schloegl et al., 2012; Shahrousvand et al., 2017). Recum y colaboradores, mencionan la importancia entre la relación de la dimensión del poro y el crecimiento interno del tejido, destaca que para los injertos vasculares, el diámetro de poro efectivo para el crecimiento interno de las células está entre 20 y 60 μm , mientras que para las células óseas se requieren 75-150 μm de diámetro de poro (Recum et al., 1996).

El autor Soodeh Alidadi y colaboradores, realizaron una matriz polimérica compuesta por matriz ósea desmineralizada y PMMA, donde resaltan una muy buena interconectividad entre las cavidades de la matriz (poros) y además, presentan un tamaño de poro entre 100-250 μm , similar el revelado en el presente estudio, lo que indica que la matriz propuesta ofrecería propiedades similares a la de Soodeh, en momento de ser implementada para la regeneración ósea de manera *in vivo* (Alidadi, Oryan, Bigham-Sadegh, & Moshiri, 2017). Giannitelly y Laís P, con sus respectivos co-autores, han reportado la implementación de hueso particulado o nanopartículas de hidroxapatita con PU donde destacan una estructura conformacional dura y altamente porosa, propiedad que ofrece el poliuretano (Gabriel, Rodrigues, et al., 2017; Giannitelli et al., 2015)

La presencia de cavidades bien distribuidas en una andamio polímero, implica que las partículas de hueso desmineralizado se dispersaron correctamente en la mezcla con los materiales, en este caso PMMA y PU, confiriendo a esta matriz características importantes como la porosidad y la interconectividad, estructura que proporciona un buen

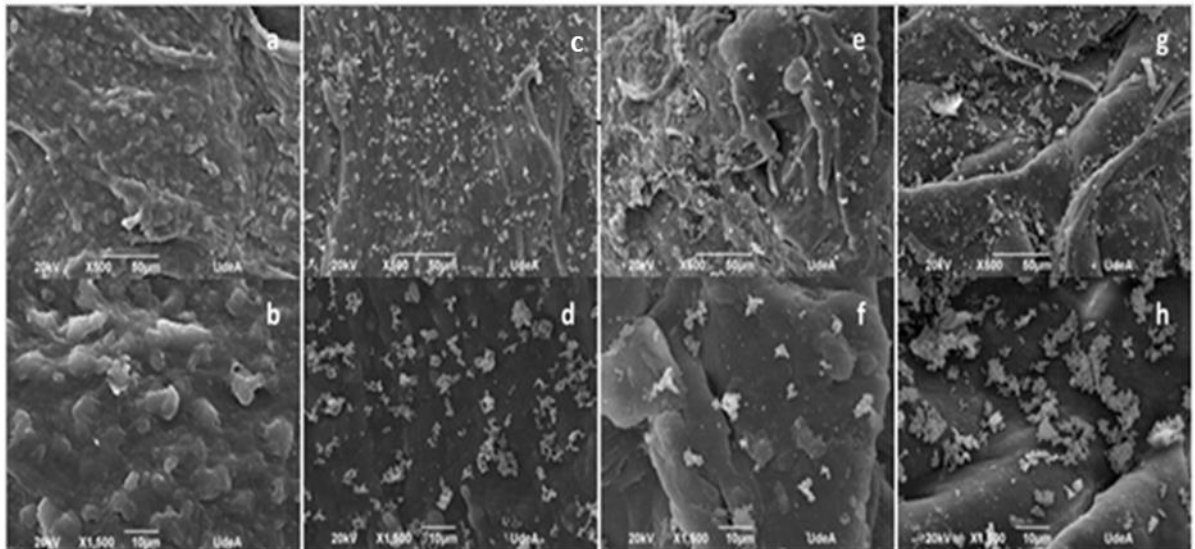
La información presentada en este documento es de exclusiva responsabilidad de los autores y no compromete a la EIA.

microambiente para la adherencia, crecimiento y proliferación celular (Ciobanu, Ilisei, & Luca, 2014).

3.2 ENSAYO BIOACTIVIDAD

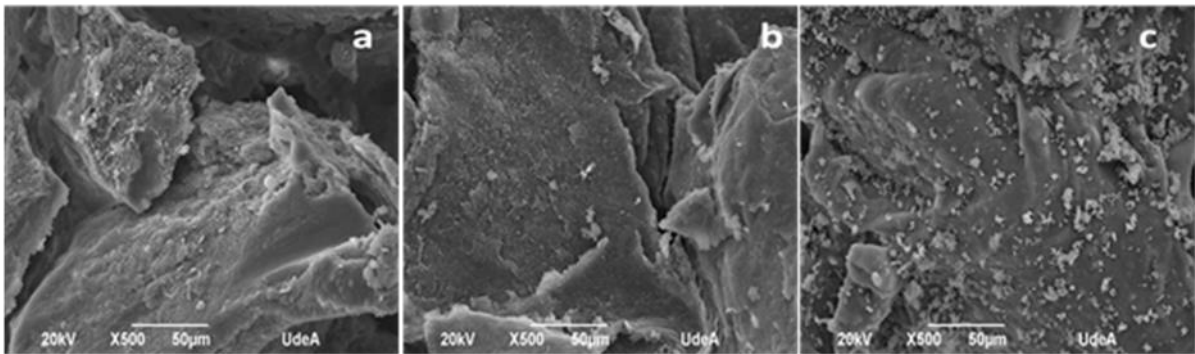
El objetivo de esta prueba consistía en verificar la formación de una capa de apatita en la superficie de la masilla polimérica con HCPLD, identificando la presencia de partículas de calcio y fosfatos, elementos característicos de apatita.

En las figuras 15 se observa un secuencia de imágenes de microscopía electrónica de barrido (SEM) a 500X y 1500X de las muestras que fueron sometidas al ensayo de bioactividad en diversos periodos de tiempo, se observa la formación de pequeñas partículas con una configuración globular, distribuidas en diferentes zonas de la matriz, esta formación globular es característica de la formación de cristales de apatita y hacen referencia a la relación de Ca/P presente en la apatita, la relación Ca/P se evaluó por Espectrometría de dispersión de energía de rayos X (EDS) complementaria al SEM (Figura 17) donde se identifica la presencia de iones de Calcio (Ca) y Fosforo (P). De manera similar, en la figura 16 se observa la secuencia de imágenes para las muestras del ensayo de bioactividad en vista transversal.



Microscopia electrónica de barrido a) Muestra Referencia 500X b) Muestra Referencia 1500X c) Muestra de 7 días de inmersión en SBF a 500X d) Muestra de 7 días de inmersión en SBF a 1500X e) Muestra de 14 días de inmersión en SBF a 500X f) Muestra de 14 días de inmersión en SBF a 1500X g) Muestra de 21 días de inmersión en SBF a 500X y h) Muestra de 21 días de inmersión en SBF a 1500X

Figura 15. Microscopia electrónica de barrido luego de estar sumergidas en SBF



Microscopia electrónica de barrido a) Muestra de 7 días de inmersión en SBF a 500X b) Muestra de 14 días de inmersión en SBF a 500X y c) Muestra de 21 días de inmersión en SBF a 500X

Figura 16. SEM Sección Transversal

En las muestras expuestas al SBF durante 14 días (Figura 15e y 15f), se identifica un incremento en las dimensiones de los aglomerados en comparación con el obtenido a los 7 días de inmersión, de manera similar, en el corte transversal (Figura 16) se identifica mayor presencia de aglomeraciones de apatita a los 14 días (Figura 16c). Para identificar los compuestos que se encontraban en la superficie de la matriz polimérica, se realizó un análisis de EDS, donde se revelaron picos de fosfato (P) y calcio (Ca) como se puede ver en la figura 17, el EDS también reveló la presencia de iones como (Ni, Cl y Mg) que no son propios de los cristales de apatita pero son atribuidos a los iones liberados por el fluido biológico simulado. En la tabla 4 se muestra la relación en porcentaje de peso del Calcio (Ca) y el fósforo (P), tomada de los valores arrojados por el sistema del EDS, se presentan los datos de la semana 2 y 3, pues es en ellas donde se empieza a estabilizar el sistema.

Tabla 1. Relación Ca/P

	% Atómico Ca	% Atómico P	Relación Ca/P	Promedio por Semana
Semana 2	7,24	3,58	2,02	1,81
	7,93	3,9	2,03	
	8,76	5,47	1,60	
	9,46	5,85	1,62	
	5,33	3,02	1,76	
	5,79	3,27	1,77	
semana 3	7,1	3,47	2,05	1,90
	8,71	4,61	1,89	
	8,19	5,6	1,46	

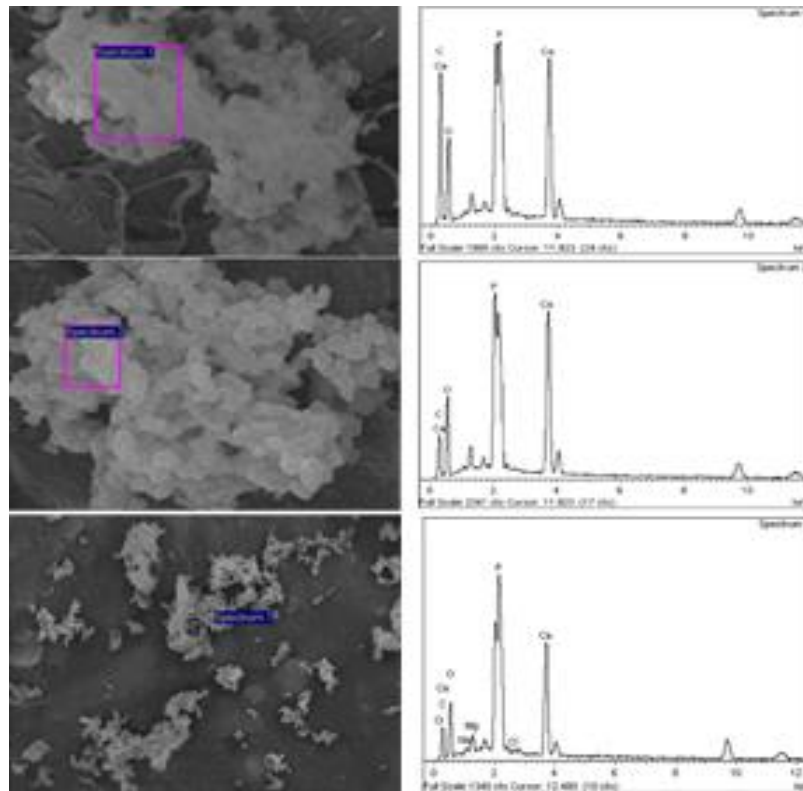


Figura 17. EDS muestra de la matriz PMMA, PU y HCPLD

Los resultados obtenidos en este estudio sobre el HCPLD encapsulado en PU y PMMA, fueron similares a los publicados por autores destacados en el tema como, Kokubo y colaboradores, Gurreros L., y colaboradores, Wang y colaboradores, que han reportado diferentes materiales poliméricos o vidrios bioactivos que presentan resultados aptos para ser utilizados como herramienta para la regeneración de tejido, identificando que una vez los núcleos de apatita se forman, consumiendo iones del fluido circundante, es decir del SBF, pues este es sobresaturado con respecto a la apatita (Guerrero-Lecuona, Canillas, Pena, Rodríguez, & De Aza, 2015; Kokubo, Kim, & Kawashita, 2003; Lou et al., 2016; Tadashi & Takadama, 2006; Wang, Meng, Ding, Chu, & Liu, 2010). La formación de apatita en la superficie del biomaterial demuestra la capacidad de formar enlaces interfaciales con el tejido óseo cuando se implantan in vivo, los resultados de este estudio reveló que la apatita se formó fácilmente en la superficie de la matriz polimérica después de la inmersión en el fluido (Bellucci et al., 2017).

Es evidente que la química molecular ha favorecido considerablemente la creación de nuevos materiales porosos como cerámicos y polímeros, con mayor área superficial y volumen de poros, que permite una respuesta bioactiva en la relación implante-tejido, debido a esto se ha presentado un incremento del uso de andamios poliméricos para la regeneración de tejidos, es por esto que la matriz propuesta en este estudio tiene gran potencial para ser implementada en la medicina ortopédica como biomaterial para la reparación ósea, puesto que estos implantes deben exhibir degradabilidad apropiada,

La información presentada en este documento es de exclusiva responsabilidad de los autores y no compromete a la EIA.

permitiendo la sustitución gradual por tejido óseo nuevo cuando se implantan *in vivo* (Bellucci et al., 2017).

Según los resultados de SEM-EDS, los cristales de apatita depositados en la superficie de la matriz de PU, PMMA y HCPLD, están compuestos principalmente por apatita pues se exhibe una relación Ca/P en promedio de 1.85 a solo 21 días de estar sometida al tratamiento con SBF, de acuerdo con los datos reportados en la literatura, esta relación puede variar significativamente dependiendo de factores como temperatura y tiempo de sumersión en SBF, pues es ahí donde se da el proceso de nuclealización y biomineralización de la apatita, es decir, donde los iones libres del SBF sobresaturado interactúan con los pequeños núcleos de apatita presentes en la superficie de la matriz, además se atribuyen características especiales a esta relación cuando varía entre 1.67 ± 0.2 , debido a que entre mayor sea el valor de esta relación mejor resultado se tendrá en cuanto a la biocompatibilidad del sistema debido a que la apatita no es ajena a el cuerpo y no se reconocería como agente extraño por las células del organismo humano, cabe resaltar que la relación Ca/P obtenida para la matriz propuesta en este trabajo (Tabla 4), tuvo valores muy similares a los presentados en otros estudios, además se podrían obtener relaciones Ca/P mayores aumentando el tiempo de inmersión en el fluido biológico simulado (SBF) (Ciobanu et al., 2014; Lorenzo-Díez, 2013; Xia et al., 2017; H. Zhang & Zhang, 2011).

3.3 ENSAYO DE DEGRADACIÓN

Se realizó una tabla (Tabla 5) de seguimiento de los cambios de pH para cada muestra al finalizar cada semana (N1, N2, N3 y N4 son las réplicas realizadas de la matriz), para determinar cómo varía el pH de la solución tampón fosfato (PBS) de 7.4 con los reactivos, iones y/o partículas liberadas por la matriz polimérica analizada. Se puede observar que el mayor cambio de pH se tuvo en la semana 1, lo que indica que fue el periodo en el que los productos de degradación de dicha matriz impactaron más el fluido.

Tabla 2. Variaciones de pH

Muestra	Semana 1	Semana 2	Semana 3	Semana 4
N1	6.65	6.87	7.42	7.14
N2	6.68	6.81	7.11	7.16
N3	6.53	6.83	7.45	7.01
N4	6.65	6.90	7.33	7.20
Promedio	6.62	6.85	7.33	7.12

La información presentada en este documento es de exclusiva responsabilidad de los autores y no compromete a la EIA.

La medida del pH se realizó, para chequear como varia el ambiente con la presencia del material y sus posibles efectos, pues el plasma sanguíneo tienen un pH de 7.4 ± 0.2 y recorre todo el organismo humano, por ende se hace muy necesario el control del pH, lo recomendable para no tener cambios como los vistos en la semana uno y dos de la Tabla 5, es realizar previamente lavados a las muestras con la misma solución de PBS antes de ser implantada dicha matriz polimérica con HCPLD (Sahu et al., 2017) .

En la Figura 18. Se presenta una gráfica del promedio de degradación para las 4 réplicas de la matriz, la pérdida de peso aumenta con el tiempo de incubación, se obtuvo que el promedio de degradación para las cuatro muestras durante un mes de prueba fue de aproximadamente un 15 ± 8 %.

Los valores de degradación fueron calculados siguiendo la Ecuación 1, donde W_i es el peso inicial de la masilla y W_f peso de la masilla seca después de haber sido sometida al proceso de degradación (Laube et al., 2017; Rueda, Fernandez d'Arlas, Corcuera, & Eceiza, 2014; Sahu et al., 2017).

$$\frac{W_i - W_f}{W_i} * 100$$

Ecuación 1. Cálculo del porcentaje de degradación

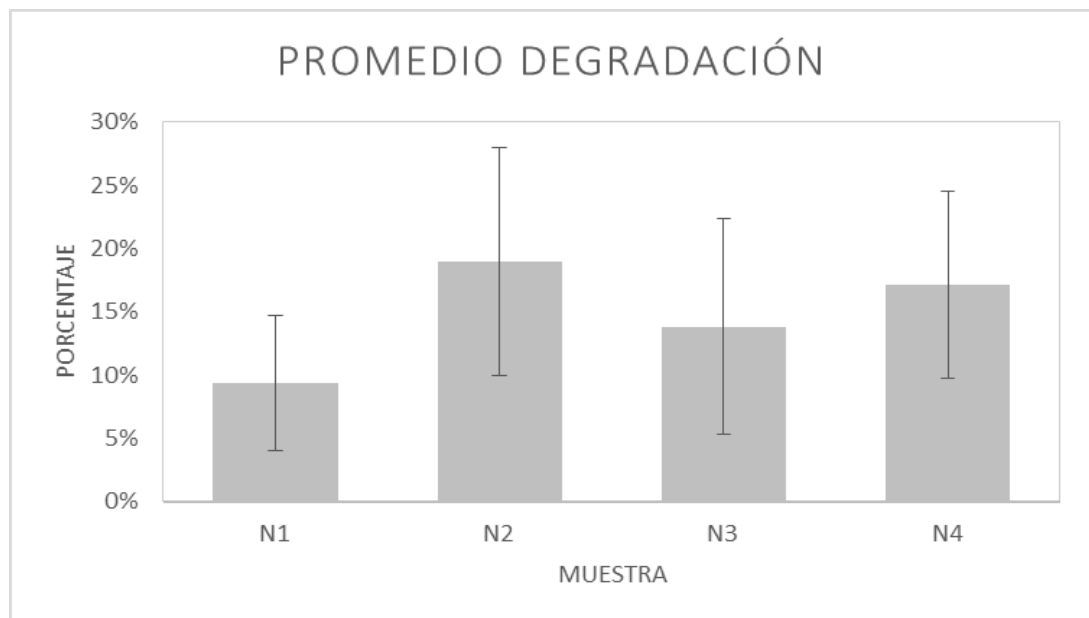


Figura 18. Promedio Degradación

En diversos artículos como el propuesto por Hernández y colaboradores, es visto que el proceso de degradación tiene una gran importancia, pues las diferentes formulaciones de las matrices (poliméricas, cerámicas u otros) estarían asociadas con la formación del nuevo tejido. Esto debería permitir que la matriz mantenga el soporte estructural mientras

La información presentada en este documento es de exclusiva responsabilidad de los autores y no compromete a la EIA.

que se produce el crecimiento del tejido, este promedio de degradación permite suponer que la matriz desarrollada mantendrá su estructura de soporte durante un largo período de tiempo pues presenta una degradación leve (Hernández, Ruiz, Ramos, Estévez, & Sánchez, 2012).

La microestructura del poliuretano juega un papel clave en la estabilidad hidrolítica, es decir, la capacidad de resistir a la descomposición química en presencia de agua, pues los PU están compuestos por grupos uretanos unidos a un hidrogeno (H) y grupos uretanos que no están unidos al ion de hidrogeno (H), el grupo uretano que no presenta un enlace de hidrogeno tiende a ser más susceptibles a la hidrolisis que aquellos que presentan el enlace de hidrógeno, por tanto, algunos segmentos estructurales del PU, presentes en las porosidades de la matriz, pueden continuar su proceso de degradación por pequeñas moléculas de agua que permanezcan en diversas partes de la matriz, principalmente en el interior de esta una vez se haya terminado el análisis de absorción (Rueda et al., 2014).

La figura 19 muestra la proporción de absorción de agua de las 4 réplicas de la matriz polimérica (N1, N2, N3 y N4), el promedio de absorción fue de $36.5 \pm 5\%$, cuando las muestras eran sumergidas por un tiempo de 24 horas en solución de PBS y posteriormente pesadas. Estos resultados indican que la matriz está en capacidad de absorber grandes cantidades de agua comparada con la matriz propuesta por Rueda y colaboradores (Rueda et al., 2014).

Los valores de absorción fueron calculados siguiendo la Ecuación 2, donde W_i es el peso inicial de la masilla y W_f peso de la masilla húmeda después de haber sido sometida al proceso de degradación (Jiang, Jiang, Xiong, & Su, 2016; Rueda et al., 2014; Sahu et al., 2017).

$$\frac{W_f - W_i}{W_i} * 100$$

Ecuación 2. Cálculo del porcentaje de absorción

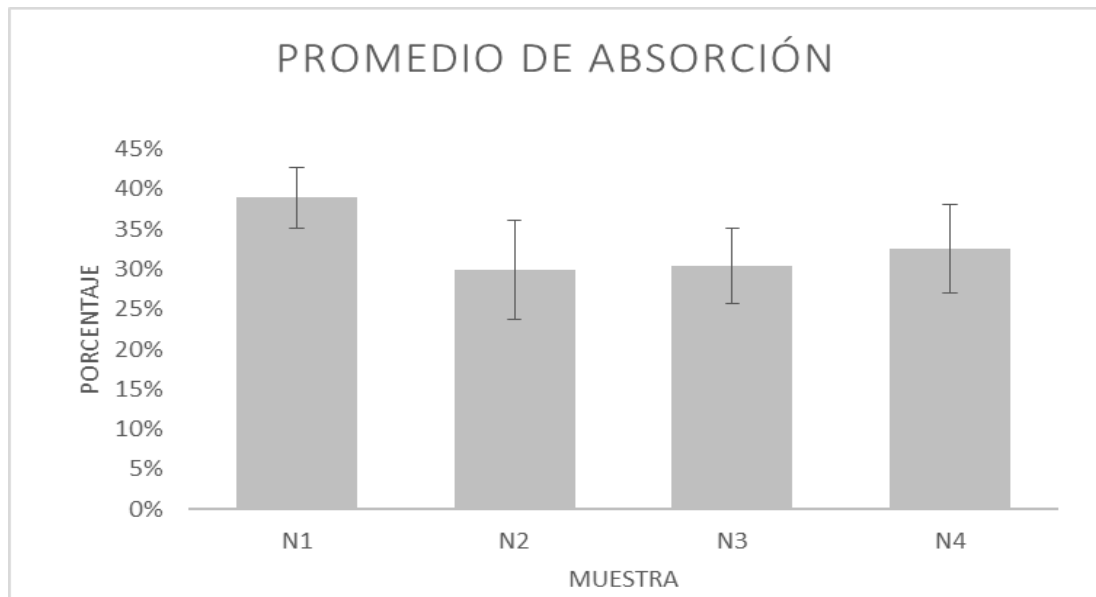


Figura 19. Promedio Absorción

Estos resultados sugieren que esta masilla tiene una alta área superficial y volumen de poro, que hace su absorción más rápida y eficiente, donde no solo podría ser útil para regeneración del tejido óseo sino también como potencial herramienta para la liberación de proteínas o medicamentos, fortaleciendo las condiciones del tratamiento. También indican que absorbería una gran cantidad de líquido sanguíneo y de tejido cuando sea implantada *in vivo*, ayudando a la asociación del biomaterial con nutrientes, factores bioactivos y mejorando las propiedades biológicas de estos implantes, así, esta matriz juega un papel clave como herramienta en la regeneración del tejido óseo (Wu et al., 2014).

Como lo menciona el Autor Hernández y colaboradores, la absorción de agua es un parámetro que debe estar controlado en implantes/cementos óseos, ya que en contacto con el organismo puede absorber agua o fluidos biológicos, liberar monómeros sin reaccionar o catalizadores solubles en agua que generarían alteraciones, Hernández propone que la solubilidad y absorción de agua puede disminuir debido al carácter hidrofóbico del PMMA, la matriz de PU + MMA + HCPLD que se propone en este estudio, tiene aproximadamente un 40% de PMMA, un rango que se podría variar de acuerdo a las características de absorción de agua que se desee tener en futuro (Hernández et al., 2012).

Es importante tener en cuenta que la biodegradación del material no depende exclusivamente de sus propiedades físicas y químicas, sino también de los mecanismos biológicos. Sin embargo, la velocidad del proceso de degradación afecta el comportamiento del material *in vivo*, es decir, si el material tiene un grado apropiado de

solubilidad, tendrá lugar la resorción, las células interaccionan con el material y conducen el proceso de regeneración ósea (Guerrero-Lecuona et al., 2015).

3.4 CARACTERIZACIÓN POR ESPECTROMETRÍA INFRARROJA CON TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR)

En la figura 20 se puede ver la espectrometría por FTIR del HCPLD provisto por la empresa Tissue Bank, luego en la figura 21 se presenta el espectro FTIR de todo el sistema (HCPLD, PMMA y PU) sin ser sometido a ninguna prueba y se utiliza como referencia para los posteriores análisis.

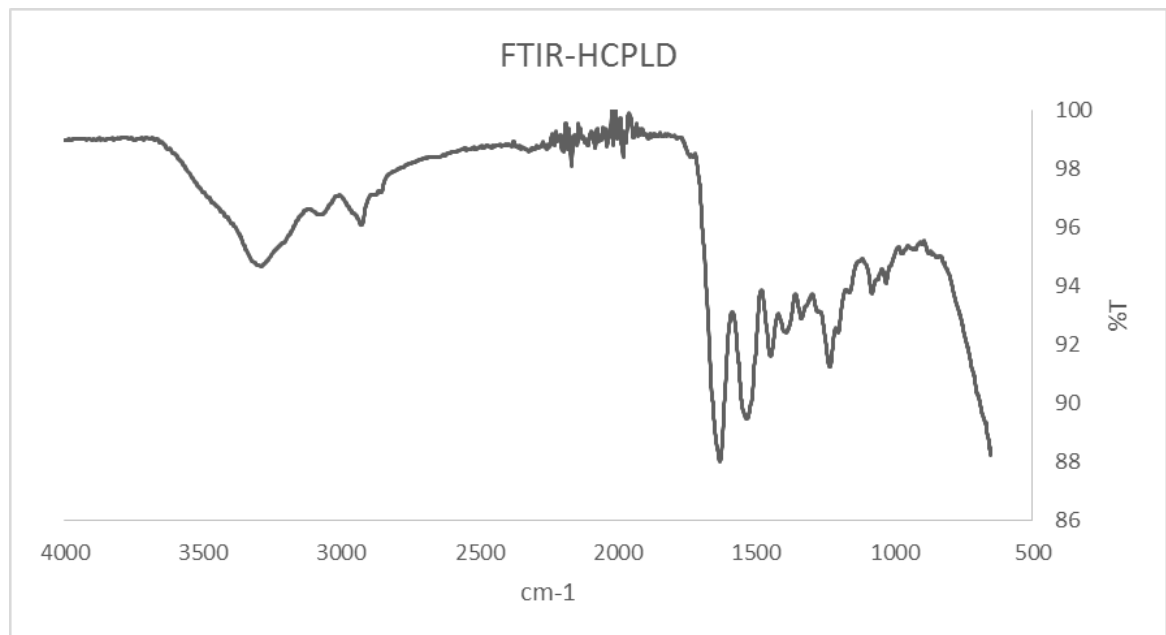


Figura 20. FTIR del hueso cortical particulado liofilizado y desmineralizado

La información presentada en este documento es de exclusiva responsabilidad de los autores y no compromete a la EIA.

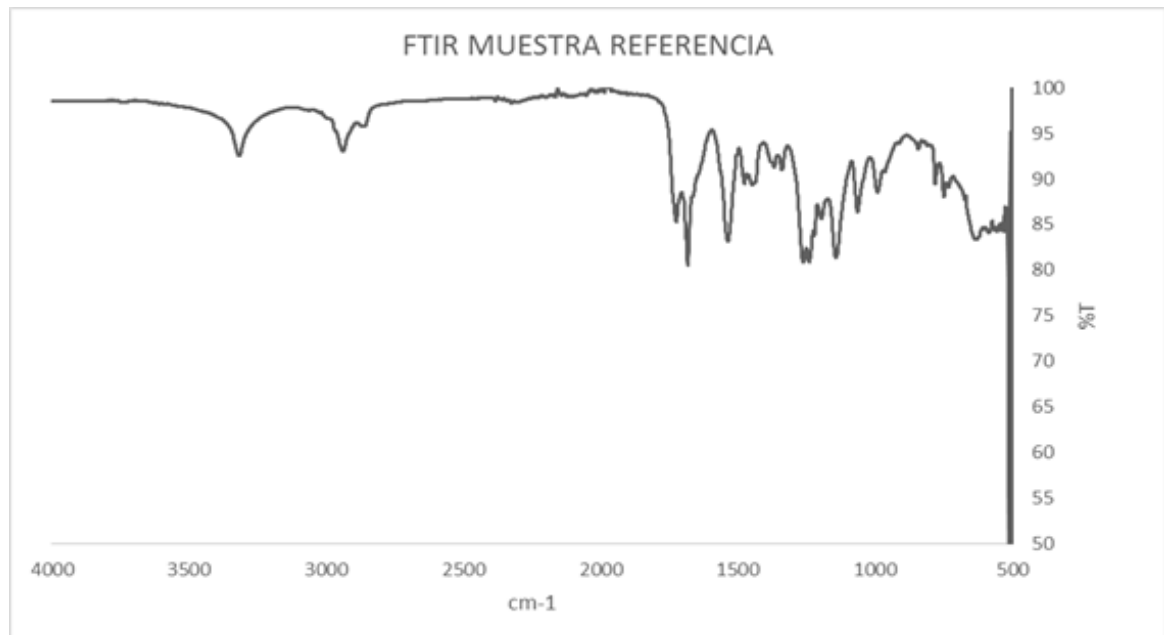


Figura 21. FTIR Muestra de referencia (PU+PMMA+HCPLD)

Los productos de degradación fueron evaluados por Espectrometría infrarroja por Transformada de Fourier (FTIR), para identificar los grupos funcionales presentes en estos productos de degradación, en la Figura 22, se presenta el espectro FTIR de los productos de degradación obtenidos en la prueba de degradación por cada semana.

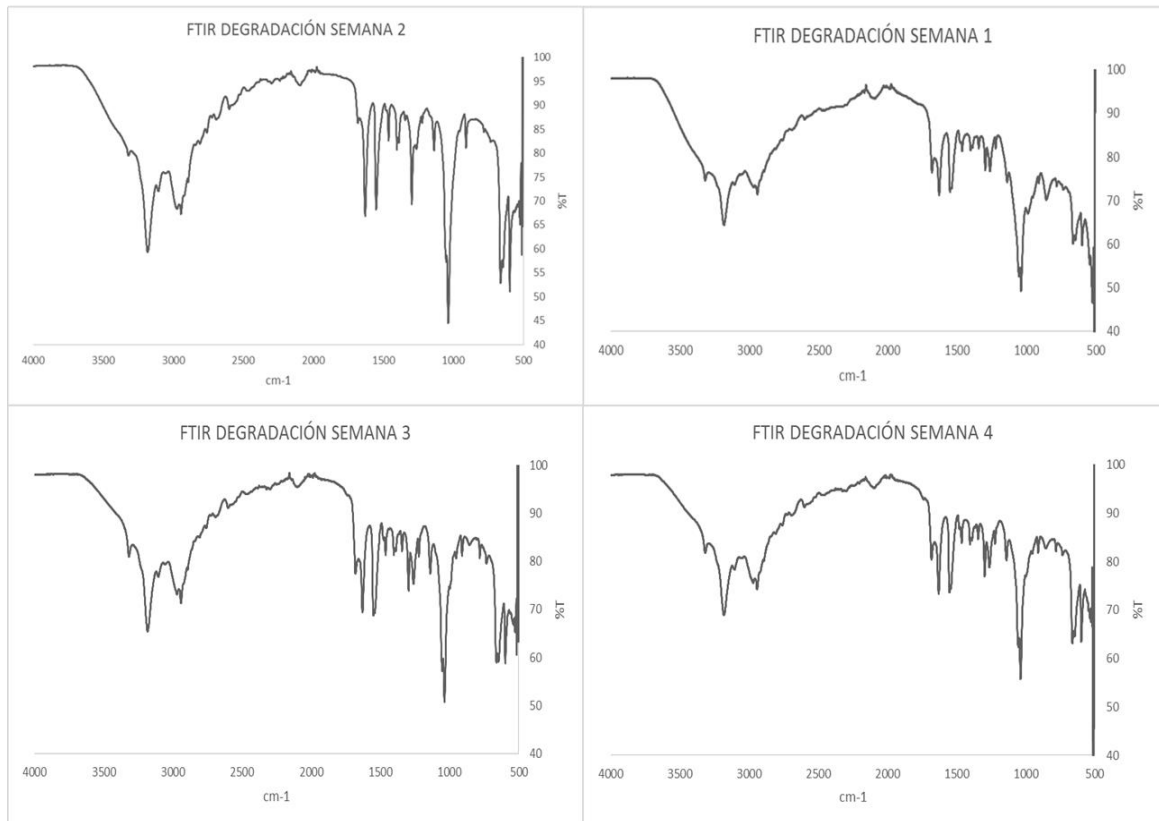


Figura 22. Espectro FTIR - Productos de degradación por cada semana

En la Tabla 6 se enumeran las bandas características de los componentes de la matriz evaluada en este trabajo, PMMA, HCPLD y PU, la tabla fue realizada mediante la recopilación de información presentada por otros autores, y se muestran las bandas más representativas de los grupos funcionales, tanto teóricas como experimentales (A. Balamurugan, S. Kannan, Balamurugan, Kannan, Selvaraj, & Rajeswari, 2004; El-Bassyouni, Guirguis, & Abdel-Fattah, 2013; Gabriel, Santos, et al., 2017; Namouchi et al., 2009; Rueda et al., 2014; Valdés, Guerra, Mieres, & Alba, 2008; Y. Zhang, Maxted, Barber, Lowe, & Smith, 2013).

Tabla 3. Comparaciones de bandas características en FTIR

Material	FTIR Teórico (cm-1)	Grupo Funcional	FTIR Experimental (cm-1)					
			HCPLD	HCPLD + PMMA + PU	Degradación por semana			
					S1	S2	S3	S4
HCPLD	1240	PO ₄ ³⁻	1241	1238	1221	-	-	1254
	1027	HPO ₄	1030	1063	1037	1050	1039	1030
	1660	Amida I	1632	-	-	1683-1628	-	-
	1403	CO ₃ ²⁻	1392	-	1402	1402	-	1401
HACPLD - PU	1457; 2910	CH ₂	1448	2914	1462	1462	1457; 2930	1455; 2936
PU	1600 - 1700	Anillo Aromatico	-	1704	-	-		-
	3500 - 3450	NH (uretanos)	-	3315	3318	3322	3311	3314
	1708	C=O	-	1701	-	-	-	-
PMMA	1260-1000	C-O Ester	-	-	1262	1262	1254	1254
	950-650	C-H	-	-	980	909-661	930-639	930-639
	1440	C-CH ₃	-	1450	1450	-	1457	1457
	1480	C-CH ₂	-	1490	1462	-	1486	1485
PMMA - PU	1720 - 1800	C=O	-	1721	-	-	-	-

La información presentada en este documento es de exclusiva responsabilidad de los autores y no compromete a la EIA.

En la figura 20, se muestran varios picos correspondientes a el espectro característico la matriz ósea desmineralizada o HCPLD, tal como lo evidencia el Autor Pedro Álvarez, donde se tiene una banda en 1241 correspondiente a PO_4^{3-} , dicho espectro, también muestra los tres picos de absorción independientes a la parte orgánica, dos de los cuales son de baja intensidad entre 530-550 cm^{-1} que corresponden a HPO_4^{2-} (Alvarez-Lloret, 2008).

En la figura 21, se pueden ver presentes algunas bandas correspondientes a los componentes del HCPLD mencionadas anteriormente, además se identifica una modificación entre la banda 3000-3600 cm^{-1} , diferente a la presente en la figura 20, esto puede ser causado por la presencia del PU y PMMA. Además se identifica la banda de tensión 3000–3500 cm^{-1} correspondiente al ion NH^+ característica de los poliuretanos, se identifican las bandas correspondientes a los uretanos entre 1200–1724 cm^{-1} ocasionada por los enlaces carbono-oxígeno (C-O) (Jiao, Xiao, Wang, & Sun, 2013; Zhang, Maxted, Barber, Lowe, & Smith, 2013)

Para la figuras 22, donde se presenta los resultados de FTIR de la degradación para cada semana, se puede observar que entre las semanas existe un comportamiento similar, pero a diferencia de la muestra referencia (Figura 20), se presenta un cambio en la banda 2700-3400 cm^{-1} , que puede ser atribuido a la desintegración de moléculas, y a la aparición de polioles, pues coincide con el comportamiento característico de la banda $-\text{OH}$ (Meskinfam et al., 2018).

Los cambios químicos asociados con la degradación de los polímeros se pueden usar como indicadores para predecir el rendimiento de material a lo largo del tiempo, en el artículo de Zhang y colaboradores, atribuyen la degradación a los disocianatos y a que los factores externos (ambientales) como temperatura, ocasionan la ruptura de los enlaces de Uretano (Zhang et al., 2013).

Estas gráficas (Figura 22) también permiten concluir que los productos de degradación son moléculas compactas que interaccionan entre ellas mismas, como lo es en el caso del grupo carbonilo (banda 1681 cm^{-1}), atribuido al uretano, que se presenta en la mayoría de las gráficas de degradación por semana, pero en una intensidad diferente, lo que sugiere que estos productos de degradación no interaccionaría tan fácilmente con elementos moléculas presentes en el cuerpo, pues presenta un enlace carbonilo fuerte, dicho esto, los productos de degradación obtenidos de la matriz analizada no ocasionarían efecto citotóxico relevante en el organismo, esta idea es reconfirmada en el análisis de citotoxicidad presentado en este estudio (Rueda et al., 2014).

3.5 ENSAYO DE TOXICIDAD (MTT)

En la figura 26 se observa la curva de calibración obtenida de la línea celular CHO K1, mediante un cultivo celular a diferentes concentraciones celulares. De esa curva se encontró la ecuación característica, y despejando la x se encontraron los valores de la viabilidad celular.

La información presentada en este documento es de exclusiva responsabilidad de los autores y no compromete a la EIA.

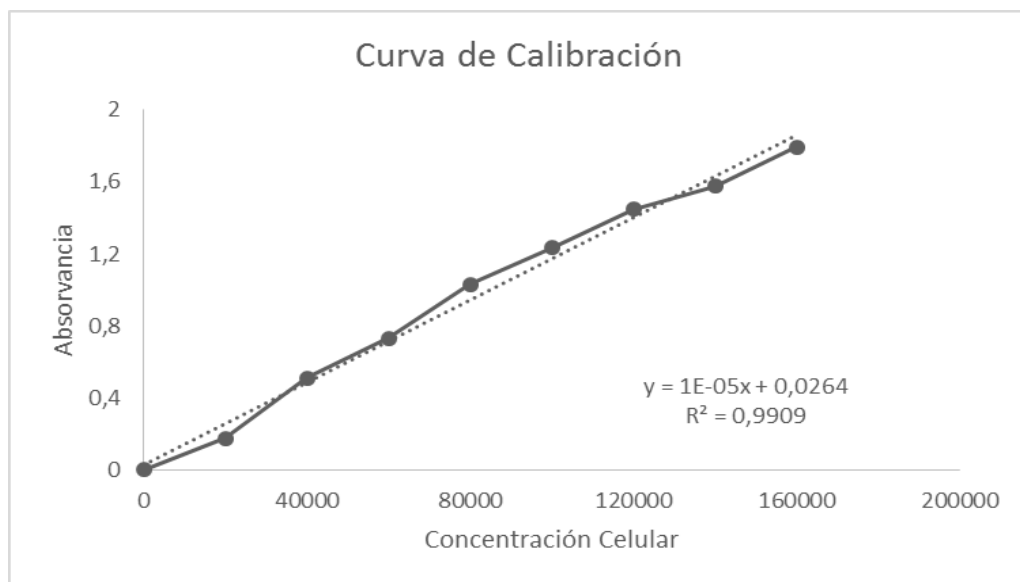


Figura 23. Curva de calibración MTT

En la figura 27, se muestran los resultados del ensayo MTT para los tratamientos implementados, sin lavar (SL), dos lavados (2L) y tres lavados (3L), donde se puede ver el porcentaje de viabilidad para dichos tratamientos, donde el control negativo es la viabilidad máxima que se puede obtener.

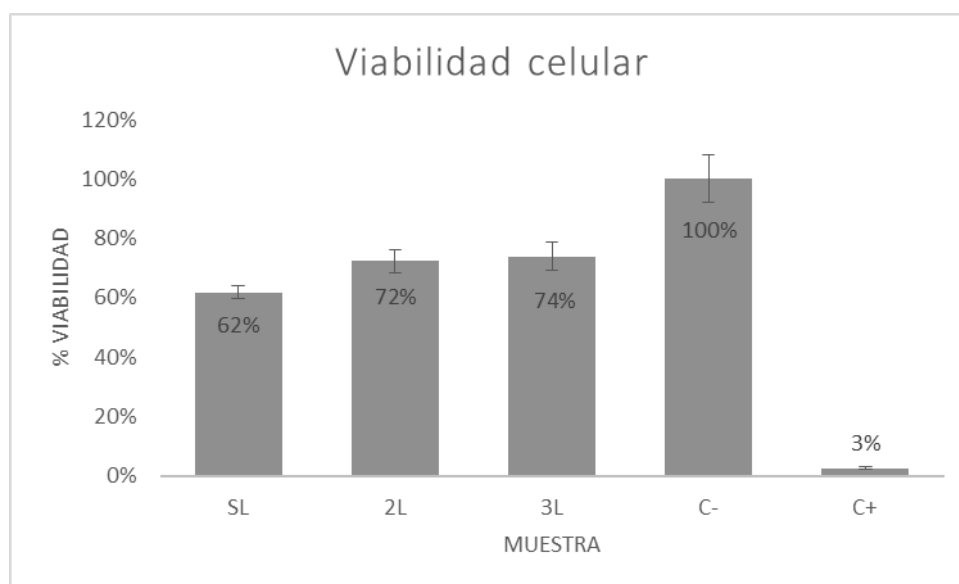


Figura 24. Resultado MTT

La información presentada en este documento es de exclusiva responsabilidad de los autores y no compromete a la EIA.

Diversos autores han reportado que la citotoxicidad puede clasificarse en función de la viabilidad celular en relación con los controles que se hayan planteado para dicha prueba, si el valor es inferior al 30% se dice que presenta una toxicidad grave o severa, entre 30-60% es citotoxicidad moderada, entre 60-90% es citotoxicidad leve o ligera y superior al 90% se dice que no es tóxico; según los resultados de la toxicidad obtenidos para la matriz de HCPLD, PMMA y PU, se identifica que la viabilidad celular con el tratamiento sin lavar es 62%, presenta una citotoxicidad moderada, y para las muestras con dos (72%) y tres (74%) lavados la citotoxicidad es leve, (Barrioni, De Carvalho, Oréfice, De Oliveira, & Pereira, 2015; Li, Laurencin, Catterson, Tuan, & Ko, 2001; Lönnroth, 2016; Shahrousvand et al., 2017).

Barrioni y colaboradores, tienen una posible explicación para la reducción de la viabilidad celular en las espumas de poliuretano: el segmento duro de PU puede degradarse y los productos de degradación pueden tener efectos relativamente tóxicos en las células de osteoblastos, lo que reduce la viabilidad celular, dicha viabilidad depende las concentraciones y cantidades de diisocianato y polioliol para formar el PU y el tipo de cadena presente en ellos (segmento duro o blando), debido a esto fue necesario determinar los productos de degradación de PU, y determinar qué tan determinante en la citotoxicidad es la dispersión de ellos en los fluidos biológicos (Barrioni et al., 2015; Rueda et al., 2014).

Se pueden realizar procedimientos adicionales para reducir la citotoxicidad de la matriz polimérica, aumentando la cantidad de lavados de la masilla pues comparando entre los resultados sin lavar y con 2 y 3 lavados, se ve un cambio significativo en el porcentaje de viabilidad con un aumento de aproximadamente un 10%.

4. CONCLUSIONES

En este estudio se logró encapsular el HCPLD en una mezcla de los polímeros PMMA y PU, obteniendo una matriz de fácil manipulación, buena consistencia y sin pérdida significativa de partículas de HCPLD, además cumple con las características de porosidad e interconectividad ideales para la adhesión y proliferación celular, apoyando el intercambio de nutrientes y productos metabólicos a las células.

La bioactividad, la degradación, la absorción de líquidos y la viabilidad celular, son características esenciales en el diseño e implementación de biomateriales para aplicaciones en regeneración de tejido óseo, esta matriz polimérica posee características adecuadas para la aplicación como implante óseo, pues la capacidad de absorber fluidos en un promedio de $36.5\% \pm 5\%$, y la pérdida del material no es significativa, pues su promedio de degradación leve de $15\% \pm 8\%$, lo que sugiere que esta matriz polimérica si fuera implementada como cemento óseo, podría mantener su estructura durante buen período de tiempo, el suficiente para que se lleve a cabo la completa regeneración del tejido.

Esta matriz evidencia la formación de estructuras apatíticas en su superficie luego de estar sumergidos en SBF durante 7, 14 y 21 días, lo que revela el potencial de aplicación que tienen las matrices poliméricas con hueso desmineralizado para la regeneración ósea.

5. CONSIDERACIONES FINALES

Para futuras investigaciones, se podría implementar el estudio de la bioactividad mediante la formación de apatita en un cultivo celular, y evaluar la adhesión de estas al sistema, además se propone la evaluación de las matrices luego de ser sometidas al ensayo de degradación en FTIR, para comparar no solo sus productos de degradación, sino también como se vio modificado el sistema al estar sometido a dicha prueba.

6. REFERENCIAS

- A. Balamurugan, S. Kannan, V. S. and S. R., Balamurugan, a, Kannan, S., Selvaraj, V., & Rajeswari, S. (2004). Development and Spectral Characterization of Poly(Methyl Methacrylate) /Hydroxyapatite Composite for Biomedical Applications. *Trends Biomater. Artif. Organs*, 18(1), 41–45.
- Adrian, S., Morales, O., Duque, H., Chaves, D. E. M., Felipe, F., Oliveira, A. D. E., & Mazzonetto, R. (2010). Injertos particulados en reconstrucciones óseas, 196–199.
- Aktuğ, S. L., Durdu, S., Yalçın, E., Çavuşoğlu, K., & Usta, M. (2016). *Bioactivity and biocompatibility of hydroxyapatite-based bioceramic coatings on zirconium by plasma electrolytic oxidation*. *Materials Science & Engineering C*. Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2016.11.012>
- Aldridge, J. M., & Urbaniak, J. R. (2004). Bone grafting for osteonecrosis of the femoral head. *Seminars in Arthroplasty*, 15, 151–160. <https://doi.org/10.1053/j.sart.2004.10.006>
- Alexis, C., & Ozols, A. (2012). Biomateriales utilizados en cirugía ortopédica como sustitutos del tejido óseo, 77, 140–146.
- Alidadi, S., Oryan, A., Bigham-Sadegh, A., & Moshiri, A. (2017). Comparative study on the healing potential of chitosan, polymethylmethacrylate, and demineralized bone matrix in radial bone defects of rat. *Carbohydrate Polymers*, 166, 236–248. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.02.087>
- Almasi, D., Izman, S., Sadeghi, M., Iqbal, N., Roozbahani, F., Krishnamurthy, G., ... Kadir, M. R. A. (2015). In Vitro Evaluation of Bioactivity of Chemically Deposited Hydroxyapatite on Polyether Ether Ketone. *International Journal of Biomaterials*, 2015.
- Araújo, M., Miola, M., Bertone, E., Baldi, G., Perez, J., & Verné, E. (2015). Applied Surface Science On the mechanism of apatite-induced precipitation on 45S5 glass pellets coated with a natural-derived polymer. *Applied Surface Science*, 353, 137–149. <https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2015.06.088>
- Arenas, I. B. De, Vásquez, M., Spadavecchia, U., Camero, S., & González, G. (2006). Estudio comparativo de la bioactividad de diferentes materiales cerámicos sumergidos en fluido simulado del cuerpo. *Revista Latinoamericana de Metalurgia Y Materiales*, 25(1), 23–30.
- Barrioni, B. R., De Carvalho, S. M., Oréfice, R. L., De Oliveira, A. A. R., & Pereira, M. D. M. (2015). Synthesis and characterization of biodegradable polyurethane films based

on HDI with hydrolyzable crosslinked bonds and a homogeneous structure for biomedical applications. *Materials Science and Engineering C*, 52, 22–30. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2015.03.027>

- Bellucci, D., Desogus, L., Montinaro, S., Orr??, R., Cao, G., & Cannillo, V. (2017). Innovative hydroxyapatite/bioactive glass composites processed by spark plasma sintering for bone tissue repair. *Journal of the European Ceramic Society*, 37(4), 1723–1733. <https://doi.org/10.1016/j.jeurceramsoc.2016.11.012>
- Borgogna, M., Bellich, B., Zorzin, L., Lapasin, R., y Cesàro, A. (2010). Food microencapsulation of bioactive compounds: Rheological and thermal characterisation of non-conventional gelling system. *Food Chemistry*, 122(2), 416.
- Borkowski, L., Sroka-bartnicka, A., Ptak, A., Zi, E., & Anna, Ś. (2016). The comparison study of bioactivity between composites containing synthetic non-substituted and carbonate-substituted hydroxyapatite. *Materials Science and Engineering C*, 62, 260–267. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2016.01.056>
- Bouxein, M. L., & Genant, H. K. (2010). Fracturas vertebrales. *International Osteoporosis Foundation*.
- Cádiz, M. (2016). “OPTIMIZACIÓN DE LA PREPARACIÓN DE ANDAMIOS BIONANOCOMPÓSITOS PARA REGENERACIÓN ÓSEA BASADOS EN BIOPOLÍMEROS Y NANOPARTÍCULAS BIOCERÁMICAS. Universidad de Chile, Santiagp de Chile.
- Ciobanu, G., Ilisei, S., & Luca, C. (2014). Hydroxyapatite-silver nanoparticles coatings on porous polyurethane scaffold. *Materials Science and Engineering C*, 35(1), 36–42. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2013.10.024>
- Clavijo, J. (2013). Caracterización de materiales a través de medidas de microscopía electrónica de barrido (SEM).
- Diaz, S. L. C. (2006). Evaluación de la actividad citotóxica de extractos y fracciones de *Isertia laevis* empleando líneas celulares derivadas de tumores humanos. *Pontificia Universidad Javeriana*, 1–104.
- El-Bassyouni, G. T., Guirguis, O. W., & Abdel-Fattah, W. I. (2013). Morphological and macrostructural studies of dog cranial bone demineralized with different acids. *Current Applied Physics*, 13(5), 864–874. <https://doi.org/10.1016/j.cap.2012.12.026>
- Escobar M., L., Rivera, A., & Aristizábal G., F. A. (2010). Estudio comparativo de los métodos de resazurina y MTT en estudios de citotoxicidad en líneas celulares tumorales humanas. *Vitae*, 17(1), 67–74.
- Fernández, L. (2014). *Evaluación de la regeneración ósea in vivo de cerámicas de HAp activadas con PRP y quitosano/rhBMP-2*. Iniversidad Complutense de Madrid.

La información presentada en este documento es de exclusiva responsabilidad de los autores y no compromete a la EIA.

- Fernández Abreu, M. E., Alves Junior, C., González Ruíz, J. E., Valin Fernández, M., & Valin Riverai, J. L. (2014). Determinación de la bioactividad de capas de alginato de sodio en discos de hidroxiapatita. *Revista Cubana de Investigaciones Biomedicas*, 33(1), 34–43.
- Gabriel, L. P., Rodrigues, A. A., Macedo, M., Jardini, A. L., & Maciel Filho, R. (2017). Electrospun polyurethane membranes for Tissue Engineering applications. *Materials Science and Engineering C*, 72, 113–117. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2016.11.057>
- Gabriel, L. P., Santos, M. E. M. dos, Jardini, A. L., Bastos, G. N. T., Dias, C. G. B. T., Webster, T. J., & Maciel Filho, R. (2017). Bio-based polyurethane for tissue engineering applications: How hydroxyapatite nanoparticles influence the structure, thermal and biological behavior of polyurethane composites. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, 13(1), 201–208. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2016.09.008>
- García, A., López, M. A. (2012). Biopolímeros utilizados en la encapsulación.
- Gebelin, C. G., Carraher, C. E. (1994). *biotechnology and bioactive polymers*. (Plenum Press, Ed.) (First edit). Florida.
- Giannitelli, S. M., Basoli, F., Mozetic, P., Piva, P., Bartuli, F. N., Luciani, F., ... Licoccia, S. (2015). Graded porous polyurethane foam: A potential scaffold for oro-maxillary bone regeneration. *Materials Science and Engineering C*, 51, 329–335. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2015.03.002>
- Giannoudis, P. V., Dinopoulos, H., & Tsiridis, E. (2005). Bone substitutes: An update. *Injury*, 36(3), S20–S27. <https://doi.org/10.1016/j.injury.2005.07.029>
- González-García, D. M., Téllez Jurado, L., Jiménez-Gallegos, R., & Rodríguez-Lorenzo, L. M. (2017). Novel non-cytotoxic, bioactive and biodegradable hybrid materials based on polyurethanes/TiO₂ for biomedical applications. *Materials Science and Engineering C*, 75, 375–384. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2017.02.041>
- Gregorí, B. S., Alba, L., Brown, A., Fernández, M., Bodado, J. M., Hoz, Y. de la, & Alvarez, A. (2007). Los poliuretanos biodegradables. Estudio bibliográfico de su síntesis y aplicaciones. *Redalyc*, 41(2), 3–9.
- Gregorí, B. S., Alba, L., Brown, A., Fernández, M., Bordado, J. M., de la Hoz, Y., & Alvarez, A. (2007). Los poliuretanos biodegradables. Estudio bibliográfico de su síntesis y aplicaciones ICIDCA. Sobre los Derivados de la Caña de Azúcar. *Instituto Cubano de Investigaciones de Los Derivados de La Caña de Azúcar*, XLI(2), 3–9.
- Guerrero-Lecuona, M. C., Canillas, M., Pena, P., Rodríguez, M. A., & De Aza, A. H. (2015). Different in vitro behavior of two Ca₃(PO₄)₂ based biomaterials, a glass-ceramic and a ceramic, having the same chemical composition. *Boletín de La Sociedad Española de Cerámica Y Vidrio*, 54(5), 181–188.

<https://doi.org/10.1016/j.bsecv.2015.10.001>

Hernández, M. L., Ruiz, J. E. G., Ramos, A. P., Estévez, G. F., & Sánchez, C. A. T. (2012). PMMA/Ca²⁺ bone cements. Hydrolytic properties and bioactivity. *Polímeros*, 22(4), 390–394. <https://doi.org/10.1590/S0104-14282012005000067>

Hulbert SF, Hench LL, Forbers D, B. L. (19822). History of bioceramics. *Ceramics International*, 8, 131–140.

Jiang, L., Jiang, L., Xiong, C., & Su, S. (2016). Improving the degradation behavior and in vitro biological property of nano-hydroxyapatite surface- grafted with the assist of citric acid. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 146, 228–234. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2016.05.062>

Jiménez, J., González, N., Fernández, M., Elvira, C., López, A., & San Román, J. (2007). Estudio de la biocompatibilidad in vitro de polimeros metacrílicos derivados de pirrolidona/ina. *Biomecánica*, 15(1), 63–71.

Kim, H.-M., Himeno, T., Kawashita, M., Kokubo, T., & Nakamura, T. (2004). The mechanism of biomineralization of bone-like apatite on synthetic hydroxyapatite: an in vitro assessment. *Journal of The Royal Society Interface*, 1(1), 17–22. <https://doi.org/10.1098/rsif.2004.0003>

Kokubo, T., Kim, H. M., & Kawashita, M. (2003). Novel bioactive materials with different mechanical properties. *Biomaterials*, 24(13), 2161–2175. [https://doi.org/10.1016/S0142-9612\(03\)00044-9](https://doi.org/10.1016/S0142-9612(03)00044-9)

Koleva, M. (n.d.). *Poly(methyl methacrylate) (PMMA). CAE DS - Injection Moulding Materials*.

Lárez, C. (2003). Algunos usos del quitosano en sistemas acuosos. *Revista Iberoamericana de Polímeros*, 4(2), 91–109.

Laube, T., Weisser, J., Berger, S., Börner, S., Bischoff, S., Schubert, H., ... Schnabelrauch, M. (2017). In situ foamable, degradable polyurethane as biomaterial for soft tissue repair. *Materials Science and Engineering C*, 78, 163–174. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2017.04.061>

Li, W., Laurencin, C. T., Caterson, E. J., Tuan, R. S., & Ko, F. K. (2001). Electrospun nanofibrous structure : A novel scaffold for tissue engineering.

Lönnroth, E. (2016). Toxicity of Medical Glove Materials : A Pilot Study Toxicity of Medical Glove Materials : A Pilot Study, 3548(March). <https://doi.org/10.1080/10803548.2005.11076642>

LÓPEZ CÓRDOBA, A. F. (2012). *DESARROLLO DE SISTEMAS DE ENCAPSULACIÓN COMPUESTOS PARA LA PROTECCIÓN DE EXTRACTOS ANTIOXIDANTES DE YERBA MATE*. UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA.

La información presentada en este documento es de exclusiva responsabilidad de los autores y no compromete a la EIA.

- Lorenzo-Díez, O. (2013). Técnicas de Light Scattering para la caracterización de nanopartículas y moléculas., 5–13.
- Lou, T., Wang, X., Yan, X., Miao, Y., Long, Y., Yin, H., ... Song, G. (2016). Fabrication and biocompatibility of poly (L -lactic acid) and chitosan composite scaffolds with hierarchical microstructures. *Materials Science & Engineering C*, 64, 341–345. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2016.03.107>
- Matesanz S., M. (2015). *Departamento de Bioquímica y Biología Molecular I ÓXIDO DE GRAFENO: Respuesta celular y aplicación biomédica*. UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID.
- Meskinfam, M., Bertoldi, S., Albanese, N., Cerri, A., Tanzi, M. C., Imani, R., ... Farè, S. (2018). Polyurethane foam/nano hydroxyapatite composite as a suitable scaffold for bone tissue regeneration. *Materials Science and Engineering C*, 82(July 2017), 130–140. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2017.08.064>
- Mokarram, R. R., Mortazavi, S. A., Najafi, M. B. H., Shahidi, F. (2009). The influence of multi stage alginate coating on survivability of potential probiotic bacteria in simulated gastric and intestinal juice. *Food Research International*, 42, 1040–1045.
- Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*, 65(1–2), 55–63. [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(83\)90303-4](https://doi.org/10.1016/0022-1759(83)90303-4)
- Mosquera, M. T., Maurel, D. L., Pavón, S., Arregui, A., & Moreno, C. (1998). Incidencia y factores de riesgo de la fractura de fémur proximal por osteoporosis, 3(4), 211–219.
- Namouchi, F., Smaoui, H., Fourati, N., Zerrouki, C., Guermazi, H., & Bonnet, J. J. (2009). Investigation on electrical properties of thermally aged PMMA by combined use of FTIR and impedance spectroscopies. *Journal of Alloys and Compounds*, 469(1–2), 197–202. <https://doi.org/10.1016/j.jallcom.2008.01.148>
- Nerantzaki, M., Koliakou, I., Kaloyianni, M. G., Koumentakou, I., Siska, E., Diamanti, E., ... Bikiaris, D. N. (2016). A biomimetic approach for enhancing adhesion and osteogenic differentiation of adipose-derived stem cells on poly(butylene succinate) composites with bioactive ceramics. *European Polymer Journal*. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2016.12.014>
- Noh, D., An, Y., Jo, I., Koh, Y., & Kim, H. (2015). Synthesis of nano fibrous gelatin / silica bioglass composite microspheres using emulsion coupled with thermally induced phase separation. *Materials Science & Engineering C*, 62, 678–685. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2016.02.017>
- Ocampo, J. (2012). Criterios de formulación de espumas flexibles de poliuretano MDI basados en la evaluación cualitativa de propiedades finales realizadas a nivel laboratorio. Universidad Nacional De Colombia.

- Oliveira, A. L., Mano, J. F., & Reis, R. L. (2003). Nature-inspired calcium phosphate coatings: Present status and novel advances in the science of mimicry. *Current Opinion in Solid State and Materials Science*, 7(4–5), 309–318. <https://doi.org/10.1016/j.cossms.2003.10.009>
- Peón, E., Bastos, I. N., Granjeiro, J. M., El, A., Barranco, V., Sierra, J. C. G., & Soares, G. D. (2013). *Recubrimientos de hidroxiapatita nanocristalina - preparación, caracterización y evaluación de la bioactividad*. Ciudad Habana.
- Precnerová, M., Bodišová, K., Galusková, D., Frajkorová, F., Varchulová, Z., Vojtaššák, J., ... Šajgalík, P. (2015). In vitro bioactivity of silicon nitride – hydroxyapatite composites. *CERAMICS INTERNATIONAL*, 41, 8100–8108. <https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2015.03.011>
- Recum, A. F. V. O. N., Ph, D., Shannon, C. E., Cannon, C. E., Long, K. J., Kooten, T. G. V. A. N., ... Ph, D. (1996). Modifiers of Cellular Adhesion, 2(4), 241–253.
- Rodríguez Celhay, I. (2014). *Preparación y propiedades bioactivas de bionanocompósitos para regeneración ósea basados en biopolímeros y nanopartículas cerámicas*. Santiago de Chile.
- Rueda, L., Fernandez d’Arlas, B., Corcuera, M. A., & Eceiza, A. (2014). Biostability of polyurethanes. Study from the viewpoint of microphase separated structure. *Polymer Degradation and Stability*, 108, 195–200. <https://doi.org/10.1016/j.polymdegradstab.2014.06.015>
- Saber-samandari, S., Saber-samandari, S., Ghonjizade-samani, F., Aghazadeh, J., & Sadeghi, A. (2016). Bioactivity evaluation of novel nanocomposite scaffolds for bone tissue engineering: The impact of hydroxyapatite. *Ceramics International*, 42, 11055–11062. <https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2016.04.002>
- Sahu, P., Kashaw, S. K., Kushwah, V., Sau, S., Jain, S., & Iyer, A. K. (2017). PH responsive biodegradable nanogels for sustained release of bleomycin. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 25(17), 4595–4613. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2017.06.038>
- Sánchez, Á. (1999). Utilización de la línea celular CHO en los ensayos de genotoxicidad. *Revista Cubana de Investigaciones Biomedicas*, 18(1), 19–21.
- Schloegl, W., Marschall, V., Witting, M. Y., Volkmer, E., Drosse, I., Leicht, U., ... Friess, W. (2012). Porosity and mechanically optimized PLGA based in situ hardening systems. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 82(3), 554–562. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2012.08.006>
- Sede de Investigación Universitaria SIU. (n.d.). Microscopio Electronico de Barrido (SEM). Medellín: Universidad de Antioquia.
- Shahrousvand, E., Shahrousvand, M., Ghollasi, M., Seyedjafari, E., Jouibari, I. S., babaei,

La información presentada en este documento es de exclusiva responsabilidad de los autores y no compromete a la EIA.

- A., & Salimi, A. (2017). Preparation and evaluation of polyurethane/cellulose nanowhisker bimodal foam nanocomposites for osteogenic differentiation of hMSCs. *Carbohydrate Polymers*, 171, 281–291. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.05.027>
- Sohail, A., Turner, M. S., Coombes, A., Bostrom, T., Bhandari, B. (2011). Survivability of probiotics encapsulated in alginate gel microbeads using a novel impinging aerosols method. *International Journal of Food Microbiology*, 145, 162.
- Stanovici, J., Le Nail, L. R., Brennan, M. A., Vidal, L., Trichet, V., Rosset, P., & Layrolle, P. (2016). Bone regeneration strategies with bone marrow stromal cells in orthopaedic surgery. *Current Research in Translational Medicine*, 64(2), 83–90. <https://doi.org/10.1016/j.retram.2016.04.006>
- Stengel D, Bauwens K, Sehouli J, Ekkernkamp A, P. F. (2001). Systematic review and meta-analysis of antibiotic therapy for bone and joint infections. *Lancet Infect Dis*, 1.
- Tadashi, K., & Takadama, H. (2006). How useful is SBF in predicting in vivo bone bioactivity? *Biomaterials*, 27, 2907–2915. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2006.01.017>
- Tissue Bank. (2013). FICHA TECNICA HUESO CORTICAL PARTICULADO LIOFILIZADO Y DESMINERALIZADO. Medellin, Colombia.
- Tortolini, P., & Rubio, S. (2012). Diferentes alternativas de rellenos óseos. *Avances En Periodoncia E Implantología Oral*, 24(3), 133–138.
- Tortora, G., & Derrickson, B. (2013). *Principios de Anatomía y Fisiología* (Treceava E). Panamericana.
- Tuesta, E. G., & Vásquez, Y. H. (2012). APLICACIÓN DE LA TÉCNICA DE DIFRACCIÓN DE RAYOS X (DRX).
- Universidad Autonoma de Madrid. (n.d.). Unidad de Espectroscopía Molecular.
- Valdés, B. S. G., Guerra, M., Mieres, G., & Alba, L. (2008). Caracterización estructural de poliuretanos mediante espectroscopía FTIR Y RMN (H y C13). *Revista Iberoamericana de Polímeros Gregorí et Al*, 9(4), 377–388. Retrieved from <http://www.ehu.es/reviberpol/pdf/JUL08/gregori.pdf>
- Valencia, L. E., Martel, S. A., Vargas, C. L., Rodriguez, C. A., & Olivas, I. (2016). Apósitos de polímeros naturales para regeneración de piel. *Revista Mexicana de Ingeniería Biomédica*, 37(3), 235–249.
- Wang, G., Meng, F., Ding, C., Chu, P. K., & Liu, X. (2010). Microstructure, bioactivity and osteoblast behavior of monoclinic zirconia coating with nanostructured surface. *Acta Biomaterialia*, 6(3), 990–1000. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2009.09.021>
- Wu, Z., Tang, T., Guo, H., Tang, S., Niu, Y., Zhang, J., ... Wei, J. (2014). In vitro

La información presentada en este documento es de exclusiva responsabilidad de los autores y no compromete a la EIA.

degradability, bioactivity and cell responses to mesoporous magnesium silicate for the induction of bone regeneration. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 120, 38–46. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2014.04.010>

Xia, K., Pan, H., Yang, H., Tang, X., Niu, J., Xiang, Z., ... Lu, W. (2017). Effect of Ca/P ratio on the structural and corrosion properties of biomimetic Ca-P coatings on ZK60 magnesium alloy. *Materials Science and Engineering C*, 72, 676–681. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2016.11.132>

Zanchetta, J., & MacDonald, S. (2012). AUDITORÍA REGIONAL DE AMÉRICA LATINA. *International Osteoporosis Foundation IOF*.

Zhang, H., & Zhang, M. (2011). Characterization and thermal behavior of calcium deficient hydroxyapatite whiskers with various Ca/P ratios. *Materials Chemistry and Physics*, 126(3), 642–648. <https://doi.org/10.1016/j.matchemphys.2010.12.067>

Zhang, Y., Maxted, J., Barber, A., Lowe, C., & Smith, R. (2013). The durability of clear polyurethane coil coatings studied by FTIR peak fitting. *Polymer Degradation and Stability*, 98(2), 527–534. <https://doi.org/10.1016/j.polymdegradstab.2012.12.003>

ANEXO 1 ENSAYO DE BIOACTIVIDAD DEL SISTEMA ENCAPSULADO DEL HUESO CORTICAL PARTICULADO LIOFILIZADO Y DESMINERALIZADO CON PU, EN UN FLUIDO BIOLÓGICO SIMULADO: OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN.

MATERIALES Y EQUIPOS

N°	EQUIPOS	N°	EQUIPOS
1	Balanza Electrónica	5	Vaso precipitado
1	Agitador Magnético	1	Matraz volumétrico
1	pH-metro	1	Desecador
1	Espectrómetro de difracción de rayos X	1	Termostato
1	Microscopio Electrónico de barrido SEM	1	Termocupla

REACTIVOS

Numero	Reactivo	Cantidad	Peso Molecular U
1	Cloruro de Sodio NaCl	8,035 g	58,443
2	Bicarbonato de Sodio NaHCO₃	0,355 g	84,006
3	Cloruro de Potasio KCl	0,225 g	74,551
4	Hidrogeno fosfato di-potasio trihidratado K₂HPO₄·3H₂O	0,231 g	228,222
5	Hexahidrato de cloruro de magnesio MgCl₂·6H₂O	0,311 g	203,303
6	Ácido clorhídrico HCl 1 mol/l	39 mL	—
7	Cloruro de Calcio CaCl₂	0,292 g	110,984
8	Sulfato de sodio Na₂SO₄	0,072 g	142,042
9	TRIS	6,118 g	121,135
10	Agua destilada	1 L	—

PROCEDIMIENTO

La información presentada en este documento es de exclusiva responsabilidad de los autores y no compromete a la EIA.

Método:

Preparación del fluido biológico simulado

1. Se toman 700 mL de agua destilada, en un vaso de precipitado con un agitador magnético, mantenerlo en agitación a una temperatura de 37 ° C, y cubierto para que no se evapore.
2. Disolver los reactivos de la tabla anterior en el mismo orden en el que se encuentran, cada reactivo debe ser disuelto si y solo si el anterior ha sido mezclado completamente.
3. Insertar el electrodo del medidor de pH en la solución justo antes de disolver el reactivo TRIS, el pH de la solución debe ser $2,0 \pm 1,0$.
4. Controlar la temperatura de la solución a 37°C, además si el volumen de la solución es inferior a 900mL ajustar hasta alcanzar este mismo.
5. Se disuelve en la solución el reactivo TRIS poco a poco, con especial atención en el cambio de pH. Luego espere a que la solución este homogénea y pH constante.
6. Mantener la temperatura de la solución a 37°C, Cuando el pH ha aumentado a $7,45 \pm 0,01$, dejar de disolver el TRIS, luego agregar la solución de HCl hasta que el pH baje a 7.42 con cuidado en que no disminuya a 7,40.
7. Disolver el resto de TRIS poco a poco hasta que el pH se eleve nuevamente a 7,45, si una vez realizado este proceso quedan remanentes de TRIS, agregar el 1M de HCl y TRIS alternativamente, manteniendo el pH dentro del intervalo de 7,42 a 7,45. finalmente ajustarlo a 7,40 exactamente a 36,5 °
8. Retirar el electrodo del medidor de pH de la solución, enjuagar con agua destilada y agregar los lavados a la solución
9. Ajustar la solución con el lavado del pH a 1000mL.
10. Pasar la solución a un matraz, lavar el vaso precipitado y agregar los restantes al matraz. Fijar la barra de agitación para evitar que caiga al matraz volumétrico.
11. Poner una tapa al matraz y cerrar con una película de plástico.
12. Después de mezclar la solución en el matraz, manténgala en el agua para enfriarla a 20 ° C.
13. Después de que la temperatura de la solución haya caído a 20 ° C, añadir agua destilada hasta la línea marcada para un matraz de 1 L.

Proceso de evaluación de bioactividad

1. Medir con alta precisión las dimensiones de la muestra, y calcular el área superficial con una precisión de 2 mm² para una placa delgada.
2. Calcular el volumen necesitado de SBF mediante la ecuación 1.

3. Disponer de un vaso precipitado, verter el volumen calculado en el paso anterior a una temperatura de 36,5 ° C, colocar el espécimen en el SBF de manera que este quede completamente cubierto por el fluido.
4. Después de remojar en el SBF a 36,5 ° C durante 4 semanas, sacar el espécimen del SBF y enjuagar suavemente con agua pura.

NOTA: La muestra se secará en un desecador sin calentamiento. Una muestra, una vez tomada de SBF y Secada, no volverá a remojar.

El SBF preparado debe ser conservado en una botella de plástico con una tapa puesta firmemente y mantenido en un rango de (5 a 10) ° C en un refrigerador. El SBF puede ser utilizado hasta el día 30 de su preparación.

1. Cálculos

Para calcular el volumen de la solución SBF, se utiliza la siguiente ecuación:

$$V = S/10$$

Ecuación 1

Donde,

V: Volumen de SBF en milímetros cúbicos

S: superficie aparente del espécimen en milímetros cuadrados

2. Caracterizaciones a realizar

- Examinar la superficie de una muestra por difracción de rayos X de película delgada, es recomendado realizar la medición TF-XRD en el rango de 3 ° C a 50 ° C en 2 theta (θ), usando $\text{CuK}\alpha$ ($\lambda = 0,154\ 05\ \text{nm}$) como la fuente a una velocidad de 2 ° / min y un ángulo de 1 ° incidente en la superficie de la muestra.
- Una vez el espécimen este completamente seco, se realizará una observación en el microscopio electrónico de barrido (SEM), donde la muestra debe estar cubierta por un metal para inducir la conductividad eléctrica, las fotos en SEM se deben tomar en grandes aumentos (alrededor de $\times 10\ 000$) Y pequeñas ampliaciones (alrededor de $\times 1\ 000$).

3. Referencia

Guerra, Nayrim B, Mónica L Hernández, and Ramón G Santos. 2010. "Cementos Óseos Acrílicos Modificados Con Hidroxiapatita / Acetato de Vinilo .

Caracterización Mecánica , Termoanalítica Y Bioactividad In Vitro Acrylic Bone Cement Modified Whit Hydroxiapatyte / Vinyl Acetate . Mechanical ,” 20: 98–106.

International Standard ISO 23317. 2007. “Implants for Surgery - In Vitro Evaluation for Apatite-Forming Ability of Implant Materials.”

Kokubo, Tadashi. 1991. “Bioactive Glass Ceramics : Properties and Applications.” 12: 155–63.

ANEXO 2 PROTOCOLO PARA REALIZAR LA MATRIZ DE POLIURETANO, POLIMETILMETACRILATO Y HCPLD

MATERIALES Y EQUIPOS

CANTIDAD	EQUIPOS	CANTIDAD	MATERIALES
1	Balanza analítica.	2	Beacker
1	Campana extractora de gases.	2	Espátula de pastico
1	Plancha	1	Gafas
1	Juego de micropipetas	1	Mascara
		10	Puntas desechables

REACTIVOS

REACTIVO	CANTIDAD	DENSIDAD	MASA	MARCA
Hexamethylene diisocianato	0.5 ml	1.05 g/ml	----	Merck
1´4 Butanodiol	0.5 ml	1.017 g/ml	0.407 g	Merck
Autopolimerizable MMA	1.5 ml	0.936 g/ml	1.404 g	
Dilaurato de dibutilestaño	0.02 ml	1.1 g/ml	0.018 g	
Agua destilada	0.04 ml	1 g/ml	...	
PMMA	0.5 g	---	0.5 g	
HCPLD	1.2 g	---	1.2 g	
TOTAL			3.991 g	

La información presentada en este documento es de exclusiva responsabilidad de los autores y no compromete a la EIA.

PROCEDIMIENTO

1. Pesar el HCPLD y PMMA en la cantidad requerida en beaker.
2. Llevar los reactivos a la cabina extractora de gases y utilizar todos implementos de seguridad ya nombrados.
3. En un beaker pequeño adicionar todos los reactivos líquidos y mezclar suavemente hasta la disolución total.
4. En otro beaker pequeño adicionar los reactivos en polvo pesados anteriormente y mezclarlos.
5. Unir ambas mezclas y agitar.
6. Exponer la mezcla calor (50-70°C) durante 40 segundos.
7. Continuar la agitación hasta obtener una masilla consistente y moldeable.

Observaciones: Se debe contar con la protección necesaria para el desarrollo del protocolo ya que los reactivos usados al ser inhalados son tóxicos y nocivos para la salud.

Fecha: Agosto de 2017.

ANEXO 3 REVISIÓN DE DEGRADACION Y PRODUCTOS DE DEGRADACIÓN DE LA VEHICULIZACIÓN DE HCPLD EN UN HIDROGEL

MATERIALES Y EQUIPOS

N°	EQUIPOS	N°	EQUIPOS
1	Balanza Analítica	1	Vaso precipitado
1	Agitador Magnético	1	Beaker
1	pH-metro		

PROCEDIMIENTO

Método:

Luego de tener las muestras de HCPLD vehiculizadas en el hidrogel, el proceso a seguir para el análisis de la degradación es:

1. Pesar las muestras, para tomar su peso inicial
2. Sumergir las muestras en 2ml de solución de PBS
3. Dejarlos durante 24 horas en el horno a una temperatura constante de 37°C
4. Retirarlos de la solución de PBS y pesarlos en la balanza analítica
5. Dejarlos nuevamente en el horno a 37°C en un frasco sin solución de PBS
6. Dejarlos durante 24 horas a 37°C
7. Pesarlos e ingresarlos nuevamente al horno en la solución de PBS a 37°C
8. Los pasos anteriores se repiten alternativamente por 30 días
9. Se debe cambiar la solución de PBS cada 8 días, y el restante almacenarlo en un recipiente individual para cada muestra.

La información presentada en este documento es de exclusiva responsabilidad de los autores y no compromete a la EIA.

NOTA: guardarlos para posteriores estudios tal como el de productos de degradación.

10. Con los pesos tomados se calcula la degradación de acuerdo a la ecuación 1

Productos de degradación:

4. Para realizar el análisis de los productos de degradación, se debe partir desde el numeral 9 anterior, una vez identificados los remanentes de PBS para cada muestra
5. Medir el pH
6. Analizar la turbulencia del líquido

Cálculos

$$D = 100 - (W_0 - W_t) / W_0 * 100$$

Ecuación 1

Donde,

D: Degradación de la muestra

W₀: Es el peso de las muestras secas

W_t: Es el peso de las muestras húmedas

7. Caracterizaciones a realizar

Para estudiar la superficie de las masillas y analizar su degradación se puede realizar un estudio de FTIR.

Referencias

Ebrahimi, M., Botelho, M. G., & Dorozhkin, S. V. (2016). Biphasic calcium phosphates bioceramics (HA / TCP): Concept , physicochemical properties and the impact of standardization of study protocols in biomaterials research. *Materials Science & Engineering C*. <http://doi.org/10.1016/j.msec.2016.11.039>

Lyndin, M., Rawlinson, A., Rehman, I. U., & Lane, B. (2016). In-vitro and in-vivo degradation studies of freeze gelled porous chitosan composite scaffolds for tissue engineering applications. *Polymer Degradation and Stability*. <http://doi.org/10.1016/j.polymdegradstab.2016.11.018>

Ramaji, S. A., Zamanian, A., & Mozafari, M. (2016). Super-paramagnetic responsive silk fibroin/chitosan/magnetite scaffolds with tunable pore structures for bone **tissue**

La información presentada en este documento es de exclusiva responsabilidad de los autores y no compromete a la EIA.

engineering applications. *Materials Science & Engineering C*.
<http://doi.org/10.1016/j.msec.2016.09.039>

Shavandi, A., Bekhit, A. E. A., Sun, Z., & Ali, M. A. (2016). Bio-scaffolds produced from irradiated squid pen and crab chitosan with hydroxyapatite /beta -tricalcium phosphate for bone-tissue engineering. *International Journal of Biological Macromolecules*, 93, 1446–1456. <http://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.04.046>

**ANEXO 4 PONENCIA CONGRESO INTERNACIONAL DE MATERIALES –
BARRANQUILLA COLOMBIA**

**IXCIM
-2017-**

IX CONGRESO INTERNACIONAL DE MATERIALES – CIM 2017
14 al 16 de Noviembre

Barranquilla, 24 de Noviembre 2017

A QUIEN INTERESE

Por medio de la presente se informa que los autores *Daniela Orozco, Aura María Lopera y Marta Elena Londoño* participaron en calidad de ponencia con el trabajo titulado *Evaluación de las propiedades biológicas del hueso cortical particulado encapsulado en un polímero* en el IX CONGRESO INTERNACIONAL DE MATERIALES CIM2017, realizado del 14 al 16 de Noviembre en barranquilla, Colombia.



HUMBERTO GOMEZ
Presidente Comité Organizador
Congreso Internacional de Materiales IXCIM2017

La información presentada en este documento es de exclusiva responsabilidad de los autores y no compromete a la EIA.