



Desarrollo de compuestos hidroxiapatita carbonatada tipo-B/quitosano como sustituto óseo con liberación de antibióticos

Hamilton Copete López

Tesis doctoral presentada para optar al título de Doctor en Ingeniería de Materiales

Directora

Esperanza López Gómez, Doctor (PhD) en Ciencia y Tecnología de Materiales

Codirectora

Carmen Baudín de la Lastra, Doctor (PhD) en Ciencias Físicas

Universidad de Antioquia

Facultad de Ingeniería

Doctorado en Ingeniería de Materiales

Medellín, Antioquia, Colombia

2024

Cita	Copete López [1]
Referencia	[1] H. Copete López, “Desarrollo de compuestos hidroxiapatita carbonatada tipo-B/kitosano como sustituto óseo con liberación de antibióticos”, Tesis doctoral, Doctorado en Ingeniería de Materiales, Universidad de Antioquia, Medellín, Antioquia, Colombia, 2024.
Estilo IEEE (2020)	



Doctorado en Ingeniería de Materiales, Cohorte XI.

Grupo de Investigación Investigaciones Pirometalúrgicas y de Materiales (GIPIMME).

Centro de Investigación Ambientales y de Ingeniería (CIA).



Centro de Documentación de Ingeniería (CENDOI)

Repositorio Institucional: <http://bibliotecadigital.udea.edu.co>

Universidad de Antioquia - www.udea.edu.co

El contenido de esta obra corresponde al derecho de expresión de los autores y no compromete el pensamiento institucional de la Universidad de Antioquia ni desata su responsabilidad frente a terceros. Los autores asumen la responsabilidad por los derechos de autor y conexos.

Desarrollo de compuestos hidroxiapatita carbonatada tipo-B/quitosano
como sustituto óseo con liberación de antibióticos

Hamilton Copete López

Tesis presentada como requisito parcial para optar al título de:

Doctor en Ingeniería de Materiales

Directoras:

María Esperanza López Gómez, PhD

Carmen Baudín de la Lastra, PhD

Asesores:

Fabio Vargas Galvis, PhD

Sara María Robledo, PhD

Grupo de Investigación:

Investigaciones Pirometalúrgicas y de Materiales - GIPIMME

Universidad de Antioquia

Facultad de Ingeniería, Doctorado en Ingeniería de Materiales

Medellín, Colombia

2023

Tabla de contenido

	Pág.
Resumen	viii
Financiación.....	xi
Agradecimientos	xii
Introducción	xiv
1. Marco teórico y estado del arte	16
1.1. Hidroxiapatita	16
1.2. Hidroxiapatita Carbonatada	18
1.2.1. Hidroxiapatita Carbonatada Tipo A	18
1.2.2. Hidroxiapatita Carbonatada Tipo B	18
1.2.3. Propiedades Físicoquímicas.....	20
1.2.4. Estructuras porosas.....	22
1.3. Materiales compuestos como plataformas de crecimiento celular	23
1.3.1. Quitosano	23
1.3.2. Liberación de antibióticos	24
1.4. Referencias Introducción y Marco teórico	28
2. Objetivos	36
3. Efecto del contenido de carbonato en las propiedades mecánicas y comportamiento <i>in vitro</i> de la hidroxiapatita carbonatada tipo-B.....	37
3.1. Materiales y Métodos	37
3.1.1. Síntesis y caracterización de polvos de hidroxiapatita e hidroxiapatita carbonatada tipo-B. 37	37
3.1.2. Conformado y sinterización de piezas.....	39
3.1.3. Caracterización físicoquímica de piezas sinterizadas	40
3.1.4. Evaluación mecánica de piezas sinterizadas.....	40
3.1.5. Estudios de degradación <i>in vitro</i>	40
3.2. Resultados y discusión	41
3.2.1. Polvos de hidroxiapatita obtenidos.....	41
3.2.2. Caracterización físicoquímica y mecánica de piezas sinterizadas	45

3.2.3.	Evaluación <i>in vitro</i> de piezas sinterizadas.....	49
3.3.	Conclusiones.....	51
3.4.	Referencias.....	53
4.	Elaboración de compuestos de hidroxiapatita carbonatada tipo B/quitosano como plataformas de crecimiento celular	55
4.1.	Materiales y métodos	55
4.1.1.	Interacción hidroxiapatita carbonatada/NaCl	55
4.1.2.	Obtención de estructuras porosas	55
4.1.3.	Caracterización fisicoquímica, mecánica y estabilidad química de estructuras porosas	56
4.1.4.	Infiltración de quitosano en estructuras porosas cerámicas.....	56
4.1.5.	Evaluación de plataformas de crecimiento celular hidroxiapatita carbonatada/quitosano.....	57
4.2.	Resultados y discusión	57
4.2.1.	Interacción hidroxiapatita carbonatada/NaCl	57
4.2.2.	Caracterización de estructuras porosas	59
4.2.3.	Infiltración de quitosano en plataformas de crecimiento celular.....	61
4.3.	Conclusiones.....	63
4.4.	Referencias.....	64
5.	Evaluación de la interacción celular y liberación de antibióticos de plataformas de crecimiento celular de hidroxiapatita carbonatada tipo B/quitosano	65
5.1.	Materiales y métodos	65
5.1.1.	Evaluación de la interacción celular de las plataformas de crecimiento celular	65
5.1.1.1.	Ensayo MTT para la cuantificación de la citotoxicidad <i>in vitro</i>	67
5.1.1.2.	Ensayo Alamar Blue™. Análisis de la adhesión y proliferación celular sobre la superficie de los materiales.....	67
5.1.1.3.	Análisis de los cultivos establecidos sobre la superficie de los materiales con microscopía electrónica de barrido.....	68
5.1.2.	Liberación de antibióticos	69
5.1.3.	Ensayos de inhibición bacteriana	69
5.2.	Resultados y discusión	70
5.2.1.	Interacción Celular	70
5.2.1.1.	Resultados de citotoxicidad <i>in vitro</i>	70
5.2.1.2.	Resultados proliferación celular	71
5.2.1.3.	Resultados adhesión celular.....	72
5.2.2.	Liberación de antibióticos	74
5.2.3.	Inhibición bacteriana.....	75

5.3. Conclusiones.....	76
5.4. Referencias.....	77
6. Conclusiones Generales.....	78
7. Trabajos futuros	79
8. Productos	80
9. Anexo 1. Optimización de procesamiento de plataformas de crecimiento celular	81
A1. Procesamiento inicial de los materiales densos e identificación de defectos.	81
A2. Optimización de la distribución de tamaño de partícula	82
A3. Curvas de prensado	84
A4. Referencias.....	86

Lista de Tablas

Tabla 1-1. Solubilidad y tiempo de reabsorción en condiciones fisiológicas de fosfatos de calcio de interés en aplicaciones biomédicas [16,24].....	17
Tabla 1-2. Propiedades mecánicas del hueso y la hidroxiapatita [44,45].	20
Tabla 3-1. Parámetros de formulación de síntesis de los polvos.....	38
Tabla 3-2. Características físicas de las piezas en verde	40
Tabla 3-3. Temperatura de sinterización de piezas consolidadas para caracterización fisicoquímica y mecánica.	40
Tabla 3-4. Composición química de los polvos sintetizados.....	41
Tabla 3-5. Números de onda (cm^{-1}) de modos de vibración ν_2 y ν_3 del grupo CO_3^{2-} para apatitas biológicas y sintéticas.	42
Tabla 3-6. Índices de confiabilidad obtenidos del refinamiento Rietveld para los polvos sintetizados	43
Tabla 3-7. Parámetros de red (A) del refinamiento Rietveld de los polvos sintetizados	44
Tabla 3-8. Temperatura de sinterización, porosidad abierta y contenido de carbonato de piezas sinterizadas.....	46
Tabla 3-9. Índices de confiabilidad obtenidos del refinamiento Rietveld para los materiales sinterizados	47
Tabla 3-10. Parámetros de red (A) del refinamiento Rietveld de los materiales sinterizados.....	47
Tabla 4-1. Estabilidad mecánica de estructuras porosas.....	60
Tabla 5-1. Materiales evaluados en ensayos de interacción celular	65
Tabla 5-2. Imágenes de microscopía electrónica de barrido de osteoblastos fetales humanos en la superficie del control TMX y los materiales evaluados (HA-T, C4-T, C4-30 y C4-Q).	72
Tabla 5-3. Efecto de muestras de Hidroxiapatita infiltrada con quitosano y gentamicina en el crecimiento de <i>S. aureus</i>	76
Tabla A-1. Distribución de tamaño de partícula de polvos sintetizados.....	83
Tabla A-2. Distribución de tamaño de partícula después de molienda	84

Lista de Figuras

Figura 1-1. Celda unitaria hidroxiapatita, Ca (●), P (●) O (●), H (○) modificado de [14].	16
Figura 1-2. Estructura química del quitosano [11].	24
Figura 1-3. Regiones en cinética de liberación [80].	26
Figura 3-1. Esquema de síntesis mediante el método inverso	38
Figura 3-2. Espectro FTIR de los polvos sintetizados C4 y HA.	42
Figura 3-3. Espectros de difracción de rayos X de los polvos sintetizados	43
Figura 3-4. Imágenes de MET de polvos de hidroxiapatita sin sustituir (a. HA) y con alto contenido de carbonato (b).	44
Figura 3-5. Comportamiento térmico de los polvos sintetizados.	45
Figura 3-6. Espectros de difracción de rayos X de las piezas sinterizadas.	46
Figura 3-7. Espectro FTIR de los materiales sinterizados C4-T y HA-T.	48
Figura 3-8. Características microestructurales de la superficie de fractura de las piezas sinterizadas: a) HA-T, b) C2-T, c) C3-T y d) C4-T.	49
Figura 3-9. Degradación acelerada en materiales sinterizados (n=3). Pérdida de peso en medio ácido durante 8 h, los grupos identificados con el mismo símbolo no son estadísticamente diferentes (p>0.05).	50
Figura 3-10. Degradación <i>in vitro</i> en Tris-HCl para los materiales sinterizados (n=3). Pérdida de peso después de 7 semanas en ambiente fisiológico, los grupos identificados con el mismo símbolo no son estadísticamente diferentes (p>0.05).	51
Figura 4-1. Proceso de infiltración de quitosano.	57
Figura 4-2. Superficie de fractura de mezclas C4-T/NaCl para formación de líquido. Imágenes adquiridas a, a) 300 aumentos, b) 2000 aumentos	58
Figura 4-3. Espectro de difracción de rayos X de mezcla C4/NaCl	58
Figura 4-4. Espectro de difracción de rayos X de C4-30 luego de la lixiviación.	59
Figura 4-5. Morfología de las estructuras porosas después de la lixiviación, Imágenes adquiridas a, a) 100 aumentos y b) 300 aumentos.	60
Figura 4-6. Ensayos de degradación de plataformas de crecimiento celular C4-T (hidroxiapatita carbonatada sinterizada), C4-30 (hidroxiapatita carbonatada porosa sinterizada), a) Degradación acelerada (n=3), b) Degradación <i>in vitro</i> en Tris-HCl (n=3).	61
Figura 4-7. Espectro FTIR del quitosano comercial	62
Figura 4-8. Ensayos de degradación de plataformas de crecimiento celular C4-T (hidroxiapatita carbonatada sinterizada), C4-30 (hidroxiapatita carbonatada porosa sinterizada) y C4 30-Q (hidroxiapatita carbonatada porosa e infiltrada con quitosano), a) Degradación acelerada (n=3), b) Degradación <i>in vitro</i> en Tris-HCl (n=3)	63
Figura 5-1. Osteoblastos humanos en cultivo (subcultivo 4) transcurridas 48 h desde su siembra, observados con microscopio invertido de contraste de fases (Nikon ECLIPSE TS100; 200X).	66

Figura 5-2. Resultados del ensayo MTT para los cultivos de osteoblastos humanos mantenidos con los lixiviados de 1, 2 y 7 días obtenidos para las muestras del control TMX y las formulaciones experimentales. Se representa el valor medio de la viabilidad celular relativa \pm intervalo de confianza al 95% (n=16), y el nivel de significación obtenido en el Test HSD de Tuckey del ANOVA efectuado para detectar diferencias significativas en la viabilidad celular de cada muestra experimental frente a la obtenida para TMX en cada tiempo (***: p<0.001; **: p<0.01; *: p<0.05).....	70
Figura 5-3. Resultados del ensayo Alamar Blue™ para los cultivos de osteoblastos humanos sembrados sobre el control TMX y las formulaciones estudiadas. Se representa la media \pm intervalo de confianza al 95% (n=4) y el nivel de significación obtenido en el Test HSD de Tuckey del ANOVA efectuado para detectar diferencias significativas en la actividad celular de cada muestra experimental frente a la obtenida para TMX en cada tiempo (***: p<0.001; **: p<0.01; *: p<0.05).	71
Figura 5-4. Perfil de liberación <i>in vitro</i> de sulfato de gentamicina luego de 180h en PBS (n=3)	74
Figura 5-5. Micrografías de FE-SEM de la superficie de las plataformas de crecimiento celular después del ensayo de liberación de antibióticos	75
Figura 5-6. Halos de inhibición bacteriana de <i>S.aureus</i> en Agar.....	75
Figura A-1. Defectos de piezas sinterizadas en ensayos de compresión.....	81
Figura A-2. Superficies de fractura de pruebas mecánicas preliminares, a) Aglomerados a 120x, b) laminaciones a 500x.	82
Figura A-3. Distribución de tamaño de partícula de los polvos sintetizados	83
Figura A-4. Distribución de tamaño de partícula después de molienda.....	84
Figura A-5. Curva de prensado para polvos de C4.....	85

Resumen

El enfoque actual en la ingeniería de tejido óseo requiere biomateriales reabsorbibles que promuevan la formación de hueso y conserven al mismo tiempo estabilidad mecánica. Inicialmente, se analizó la influencia de tres niveles de sustitución Tipo B con carbonato en la red de cristalina de la hidroxiapatita, evaluando la resistencia mecánica y la tasa de degradación. Se ha escogido el método de síntesis por vía acuosa inversa para tres polvos con contenidos de carbonato entre 4 y 6% en peso y uno sin sustituir. Se empleó fluorescencia de rayos X (FRX), análisis (C-S), infrarrojo TF, difracción de rayos X, TGA-DTA y MET para investigar la composición química, el tipo de sustitución, el comportamiento térmico y la morfología de los polvos. Se conformaron piezas en forma de disco mediante prensado uniaxial y fueron sinterizadas en flujo de Argón/CO₂. Las temperaturas máximas de tratamiento térmico (750, 780 y 850 °C) fueron seleccionadas para obtener niveles de porosidad similares en las diferentes composiciones. El material con mayor sustitución de carbonato (C4-T, 5.3% en peso) presentó mayor resistencia a la compresión y velocidad de disolución que los otros materiales, lo que demuestra el efecto beneficioso de la sustitución de tipo B en materiales para la reparación ósea.

En segundo lugar, se fabricaron plataformas de crecimiento celular porosas mezclando polvos de C4 con un 30% en peso de NaCl como agente porogénico. Después de la sinterización es retirado mediante lixiviación en agua, encontrando estructuras con tamaños de poro entre 200-400 μm. Las estructuras porosas disminuyeron su resistencia mecánica aún presentan valores que permitirían tener estabilidad mientras se llevan a cabo los procesos de reabsorción y colonización por células osteoblásticas, propios de un material para injertos óseos. Posteriormente se realizó la infiltración de una solución ácida al 3% peso/volumen de quitosano, un biopolímero que se plantea como una estrategia para que las plataformas puedan ser cargadas con antibiótico y posteriormente liberarlo con el fin de prevenir la adhesión de bacterias. El antibiótico empleado fue sulfato de gentamicina, el cual tiene un efecto de amplio espectro sobre bacterias, la relación empleada fue 1 a 3 (antibiótico/quitosano), encontrando que las plataformas de crecimiento celular cargadas con sulfato de gentamicina liberan durante las primeras 24 h gran parte del antibiótico, lo cual es adecuado para la prevención de adhesión de bacterias y posterior aparición de infecciones postoperatorias.

Finalmente, se realizó la evaluación de interacción con células osteoblásticas de las plataformas de crecimiento celular mediante ensayos de citotoxicidad, proliferación y adhesión celular encontrando que la combinación de ion carbonato y estructuras porosas es una excelente alternativa, ya que no generan productos tóxicos, promueven la actividad celular y se convierten en una superficie sobre la cual las células pueden adherirse. De acuerdo, con las características y resultados obtenidos para las plataformas de crecimiento celular de hidroxiapatita tipo B (C4-T)/quitosano cargadas con sulfato de gentamicina, estas pueden convertirse en una gran alternativa para la regeneración ósea con prevención de infecciones postoperatorias comunes como la osteomielitis.

Palabras clave: Plataformas de crecimiento celular, Hidroxiapatita carbonatada, Degradación in vitro, Propiedades mecánicas, Quitosano, Liberación de antibióticos.

Abstract

The current approach in bone tissue engineering requires resorbable biomaterials that enhance bone formation while maintaining sufficient mechanical stability. First, the influence of three levels of B-type carbonate substitution in hydroxyapatite lattice on mechanical strength and degradation rate is analyzed. The inverse aqueous route has been selected as a synthesis method of three powders with carbonate substitution between 4 and 6 wt.% and other one unsubstituted. X-ray fluorescence (XRF), (C-S)-Analysis, FT-Infrared, X-ray diffraction, DTA-TG and TEM were used to investigate chemical composition, type of substitution, thermal behavior, and morphology of the powders. Disc shaped specimens were processed by uniaxial pressing and sintering in argon/CO₂ flow. Maximum temperatures of thermal treatment of 750, 780 and 850° C were selected to obtain similar porosity levels for the different compositions. The highest carbonate substituted material (C4-T, 5.3 wt.%) presented higher compressive strength and dissolution rate than the other materials showing the beneficial effect of B-type substitution in materials for bone repair.

Secondly, porous cell growth platforms were fabricated using C4 powders with 30% wt. NaCl as a porogen agent. After sintering, the NaCl was leached in water, resulting in structures with pore sizes ranging from 200 to 400 μm. Despite a reduction in mechanical resistance, these platforms exhibited values conducive to stability during the processes of resorption and colonization by osteoblastic cells, characteristics typical of materials for bone grafts.

Subsequently, an acid solution of chitosan (3% wt./vol) was infiltrated—a biopolymer proposed as a strategy for loading the platforms with antibiotics, specifically gentamicin sulfate, to prevent bacterial adhesion. The antibiotic/chitosan ratio employed was 1:3, and it was observed that the cell growth platforms loaded with gentamicin sulfate released a significant amount of the antibiotic within the initial 24 hours. This release profile is advantageous for preventing bacterial adhesion and the subsequent onset of postoperative infections.

In conclusion, the interaction assessment with osteoblastic cells was performed for the cell growth platforms through cytotoxicity, proliferation, and cell adhesion assays. The findings indicate that the combination of carbonate ions and porous structures serves as an excellent alternative, as they do not generate toxic by-products, promote cellular activity, and provide a surface for cell adhesion. According to the characteristics and results obtained for the hydroxyapatite type B (C4-T)/chitosan cell growth platforms loaded with gentamicin sulfate; these platforms could emerge as a promising alternative for bone regeneration with the prevention of common postoperative infections such as osteomyelitis.

Keywords: *Scaffolds, Carbonated hydroxyapatite, in vitro degradation, Mechanical properties, Chitosan, Antibiotic release.*

Financiación

Este trabajo de tesis se ha realizado en el marco de los siguientes proyectos:

Colombia

Proyecto 111574557862 “Desarrollo de biomateriales compuestos de matriz cerámica para plataformas de crecimiento celular con liberación controlada de antibióticos, para aplicaciones como implantes óseos” de la convocatoria 745/2016 del Ministerio de Ciencia, Tecnología e Innovación.

España

“Fabricación de andamiajes cerámicos para regeneración ósea con propiedades mecánicas mejoradas” CSIC PIE 201660E097.

“Desarrollo de andamios de hidroxiapatita carbonatada tipo-b para regeneración ósea. Integridad estructural y colonización por osteoblastos” CSIC I-COOP+ 2018: COOPA20289

Agradecimientos

A la profesora María Esperanza López por tantos años de acompañamiento, desde el año 2009 trabajando en diferentes etapas de mi vida profesional, monitoria, trabajo de pregrado, joven investigador Colciencias, trabajo de maestría y este trabajo doctoral. Son muchos los aprendizajes y valores enseñados por su parte que me han convertido en un mejor investigador y ante todo una mejor persona.

A la doctora Carmen Baudín de la Lastra por su acompañamiento en esta etapa doctoral, con su dedicación y meticulosidad científica ha permitido sacar adelante una investigación seria y con resultados relevantes. Además, por su gestión para poder realizar dos pasantías en el Instituto de Cerámica y Vidrio que permitieron direccionar de manera efectiva del trabajo de grado y generó una experiencia a nivel personal muy importante para explorar diferentes culturas.

A mis asesores Fabio Vargas y Sara Robledo que desde mi trabajo de maestría han realizados aportes muy importantes para el estudio de materiales cerámicos y ensayos *in vitro*.

Al proyecto 111574557862 “Desarrollo de biomateriales compuestos de matriz cerámica para plataformas de crecimiento celular con liberación controlada de antibióticos, para aplicaciones como implantes óseos” de la convocatoria 745/2016 por los recursos para la ejecución de este trabajo de grado. Este proyecto pudo ejecutarse y cumplir sus objetivos gracias al trabajo mancomunado con los doctores Daniel Moreno y Oscar Rojas, así como a los jóvenes investigadores María Isabel Ochoa y Camilo Bermúdez.

Al Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC-España) con el programa de cooperación i-COOP+2018, proyecto COOPA20289, por su financiación para dos estancias de investigación de 4 y 3 meses (2019 y 2021) en el Instituto de Cerámica y Vidrio, y parte del gasto fungible asociado a la investigación realizada.

Al Consejo Superior de Investigaciones Científicas por la financiación recibida a través del proyecto **CSIC PIE 201660E097**. Ambos proyectos fueron una herramienta fundamental para alcanzar los objetivos planteados en esta tesis doctoral.

A los integrantes de los grupos GIPIMME y GIMACYR de la Universidad de Antioquia, quienes desde hace más de 10 años han aportado de una u otra manera a los diferentes proyectos investigativos, profesionales y personales, siendo un apoyo fundamental en alcanzar mis metas.

Al personal del Instituto de Cerámica de y Vidrio por su colaboración y acogimiento durante las dos pasantías realizadas, que para mí significaron un reto muy importante que sin su apoyo no hubiera sido posible sacara adelante.

Finalmente quiero agradecer a mi familia, los cuales siempre han sido mi brújula en los momentos difíciles y generadores de mis mayores alegrías. A mi esposa Leidy Ocampo y a Juanjo quienes cada día me aportan esa felicidad y seguridad para alcanzar cualquier objetivo. A mis padres, hermanos y sobrinas que durante toda mi vida han sido el apoyo más importante para salir adelante.

Introducción

Las enfermedades asociadas a los huesos debidas al envejecimiento, traumatismos, defectos congénitos o extirpación quirúrgica de tumores son uno de los problemas de salud pública más importantes en la actualidad. El tejido óseo posee una capacidad regenerativa natural que es suficiente para la curación de pequeños defectos, como algunos tipos de fracturas; sin embargo, los defectos que exceden un tamaño crítico (típicamente >2 cm, dependiendo del sitio anatómico) no pueden sanar sin ayuda. Generalmente se necesita una intervención clínica específica para la restauración funcional y la curación completa de defectos grandes [1].

En la mayoría de los casos, se utilizan injertos óseos extraídos del propio paciente (autoinjertos). También se utilizan aloinjertos derivados de animales (xenoinjertos) y humanos. Los biomateriales sintéticos podrían evitar los riesgos inmunológicos y de enfermedades asociados a los injertos biológicos. Además, se pueden producir en grandes cantidades con costos aceptables y se pueden certificar con relativa facilidad para aplicaciones clínicas. Por tanto, uno de los principales temas de la ciencia de materiales es la investigación de materiales artificiales para terapias de tejido óseo [2]. En el campo de los materiales para regeneración ósea, se ha propuesto el uso de estructuras diseñadas que combinan andamios reabsorbibles, células y/o agentes reactivos como factores de crecimiento o antibióticos: construcciones de ingeniería de tejidos (TEC).

Los fosfatos de calcio y, en particular, la hidroxiapatita, son los materiales cerámicos con mayor potencial como componentes de los TEC, debido a su composición química similar a la fase mineral del hueso presenta características importantes como biocompatibilidad, biofuncionalidad [3]. Adicionalmente, de acuerdo con su morfología pueden interactuar con células óseas, propiciando la unión y proliferación de osteoblastos (Osteoconducción) y/o estimulando la regeneración de hueso (Osteoinducción) [4]. Sin embargo, la hidroxiapatita presenta velocidades de reabsorción inferiores a otros materiales, por lo que se han empleado diferentes sustituciones iónicas en su estructura cristalina que promuevan la reabsorción y brinden estabilidad mecánica mientras se lleva a cabo la reabsorción [5].

El carbonato es uno de los iones que puede emplearse para mejorar la reabsorción de la hidroxiapatita, el cual de acuerdo con su posición en la red cristalina puede clasificarse en Tipo A o Tipo B, en esta última el ion sustituido es el fosfato tal y como se presenta de manera preferencial en los huesos de la mayoría de las especies[6]. La sustitución también puede lograrse durante el proceso de síntesis de hidroxiapatita, permitiendo obtener diferentes niveles de carbonato en el material que podrían modificar el desempeño del material en condiciones fisiológicas.

La morfología de los materiales también juega un papel importante en la regeneración ósea, por el ejemplo, una estructura porosa permite una mayor área de contacto con los fluidos fisiológicos, acelerando la cinética de reabsorción en comparación con materiales densos. Por otro lado, una red porosa con tamaño e interconexión adecuada posibilita la colonización por parte de las células óseas

de todo el material, jugando un papel importante en vascularización y osteoinducción, claves para la formación de tejido [7].

Uno de los principales desafíos que se plantea actualmente en los TEC es la prevención de infecciones postquirúrgicas causantes de enfermedades que requieren tratamientos prolongados [8]. La adhesión de bacterias sobre la superficie de los implantes es la principal causa de las infecciones y para prevenir esto, la administración localizada de antibióticos surge como alternativa a los tratamientos por vía intravenosa (4-6 semanas) o dosificación oral (8-10 semanas) que disminuyen la calidad de vida de las personas [9]. En cuanto a capacidad de albergar y liberar antibióticos, la hidroxiapatita presenta algunas limitantes desde el punto de vista de enlaces químicos, razón por la cual es posible utilizar materiales poliméricos biocompatibles en la liberación localizada de antibióticos.

El quitosano es un biomaterial con diferentes grupos funcionales activos que le permiten interactuar con una gran cantidad de sustancias químicas dentro de las cuales se encuentran antibióticos como el sulfato de gentamicina, capaz de atacar gran cantidad de bacterias (amplio espectro) [10]. Adicionalmente presenta gran versatilidad en cuanto a conformado haciendo posible infiltrarse en estructuras porosas y posteriormente mediante procesos de difusión, hinchamiento y erosión, liberar el antibiótico para prevenir la adhesión de bacterias de manera temprana y evitar la aparición de infecciones postoperatorias que generan riesgos en los pacientes que requieren regeneración ósea.

El propósito de esta investigación es determinar si posible desarrollar un biomaterial compuesto de hidroxiapatita carbonatada tipo B/quitosano como plataforma de crecimiento celular con liberación de antibióticos para aplicaciones de regeneración ósea. Es así como el capítulo 3 contiene la ruta de síntesis apropiada para la obtención de hidroxiapatita carbonatada tipo B con diferentes niveles de carbonato y se presenta la evaluación de la influencia del ion en la estabilidad mecánica e interacción *in vitro* con fluidos fisiológicos simulados. Posteriormente, en el capítulo 4 se fabricaron estructuras porosas con morfologías que propicien la colonización por células osteoblásticas y de igual forma permitieran la infiltración de quitosano cargado con antibióticos, desarrollando así una plataforma de crecimiento celular para regeneración ósea. Finalmente, el capítulo 5 contiene los análisis de toxicidad, proliferación y adhesión de células osteoblásticas, carácter bactericida y capacidad de ser un sistema de liberación de antibióticos [10].

1. Marco teórico y estado del arte

En este capítulo se expondrán los conceptos teóricos y el estado del arte de la literatura existente en cuanto a hidroxiapatita y sustitución iónica con el ion carbonato, fabricación de estructuras porosas, uso de quitosano en ingeniería de tejidos y la importancia de la liberación de antibióticos en las plataformas de crecimiento celular.

1.1. Hidroxiapatita

La HA es un fosfato de calcio de composición estequiométrica $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, que corresponde a una relación molar calcio/ fósforo (Ca/P) de 1.67 [11]. El interés de este compuesto es que tiene una composición similar a la de los constituyentes inorgánicos del hueso. Si bien existen registros que datan del siglo XVIII, desde la década de 1950 se encuentra amplia literatura acerca de sus métodos de obtención (naturales y sintéticos), propiedades y aplicaciones en implantes dentales y óseos, liberación de antibióticos e ingeniería de tejidos [12]. El interés en este material se debe a sus propiedades biomiméticas que consisten en su capacidad de osteointegración, fenómeno en el cual las células óseas (osteoblastos) se adhieren sobre su superficie y absorben la HA para producir un tejido nuevo [13].

La hidroxiapatita estequiométrica es un material cerámico que contiene iones fosfato, calcio e hidroxilo con porcentajes en peso de 56.77, 39.84 y 3.39 % respectivamente. La HA cristaliza en el sistema hexagonal compacto con parámetros de red $a=9.4225 \text{ \AA}$ y $c=6.8850 \text{ \AA}$ [14] y una distribución de la celda unitaria como se representa en la Figura 1-1, en la cual los iones hidroxilo se encuentran en las esquinas del plano basal proyectado y se organizan a intervalos equidistantes [la mitad de la celda (3.44 \AA)] a lo largo del eje perpendicular al plano basal y paralelo al eje c . Seis de los diez iones Ca^{2+} en la celda unidad están asociados con los hidroxilos en estas columnas en particular. Un grupo de tres iones Ca^{2+} que describe un triángulo, que rodea el grupo OH, se encuentra en $z = 0.25$ y el otro de tres se encuentra en $z = 3/4$. El fosfato de seis $(\text{PO}_4)^{3-}$ tetraedros se encuentran en una disposición helicoidal de los niveles $z = 1/4$ a $3/4$. La red de grupos $(\text{PO}_4)^{3-}$ proporciona el esqueleto que le brinda a la estructura de apatita su estabilidad [15,16].

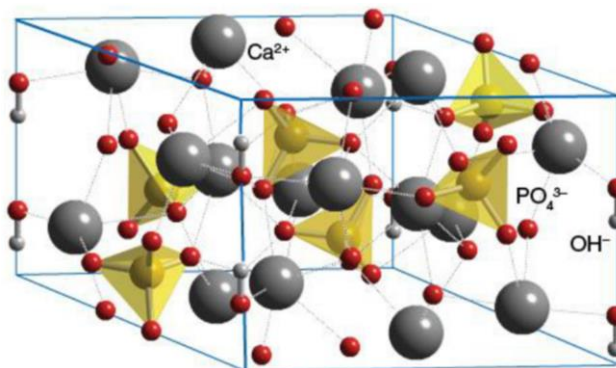


Figura 1-1. Celda unitaria hidroxiapatita, Ca (●), P (●), O (●), H (○) modificado de [14].

La estructura química de la hidroxiapatita biológica presenta una gran cantidad de sustituciones iónicas o impurezas tales como Na^+ , K^+ , Mg^{2+} , Sr^{2+} , HPO_4^{2-} , CO_3^{2-} , Cl^- , F^- , entre otros [17]. Estas sustituciones también pueden obtenerse durante las etapas de síntesis o procesamiento de la HA, modificando la morfología de los cristales, cristalinidad, solubilidad, parámetros de red, estabilidad térmica, estabilidad mecánica y respuesta biológica [18,19].

La interacción biológica de la HA una vez es implantada es controlada por dos macroprocesos, el primero corresponde al intercambio iónico con los fluidos fisiológicos que genera una degradación regulada por la estabilidad química del material y la agresividad del medio [20]. El segundo macroproceso concierne a la interacción celular, que a su vez se divide en la capacidad de generar un ambiente propicio para albergar células óseas (osteoconducción), en la habilidad para proliferar células (osteoinducción) y la posibilidad de diferenciar células madre en células óseas (osteogénesis) [21]. Inicialmente, en 1981 Jarcho determinó que una pequeña disolución de HA permite una mejor interacción con las células osteoblásticas y posteriormente se ha establecido que la osteoconducción es el único proceso inherente a la HA estequiométrica en su interacción biológica, sin embargo, la sustitución iónica se ha convertido en una alternativa para permitir que se lleven a cabo las otras etapas de interacción que facilitan la regeneración de hueso [22,23].

En las aplicaciones de regeneración ósea, no sólo la HA es empleada como sustituto óseo, existen una amplia gama de fosfatos de calcio que de acuerdo con su similitud con la composición química ósea son regularmente empleados, los cuales presentan una mayor solubilidad y menor tiempo de reabsorción en condiciones fisiológicas ($\text{pH} = 7.4$, $T = 37^\circ\text{C}$) que la HA (Tabla 1-1) [24]. Por este motivo, la hidroxiapatita ha limitado su uso en sustitutos óseos y se ha usado ampliamente como recubrimiento sobre prótesis metálicas. En 1993, Fayssinet et. al [15], encontró que la muy baja solubilidad de este material depende de diferentes factores como su composición, debido a que cualquier desviación de la relación estequiometría Ca/P genera una disolución mayor, un efecto similar es causado por la disminución de la cristalinidad y un aumento en la porosidad.

Tabla 1-1. Solubilidad y tiempo de reabsorción en condiciones fisiológicas de fosfatos de calcio de interés en aplicaciones biomédicas [16,24].

Material	Sigla	Formula química	Solubilidad a 37°C ($\log K_s$)	Tiempo de reabsorción (meses)
Hidroxiapatita sinterizada	HA	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$	117.2	>120
Hidroxiapatita deficiente en calcio (cementos)	CDHA	$\text{Ca}_{10-x}(\text{HPO}_4)_x(\text{PO}_4)_{6-x}(\text{OH})_{2-x}$ ($0 < x < 2$)	85.1	6-10
Fosfato de calcio amorfo	ACP	$\text{Ca}_x\text{H}_y(\text{PO}_4)_z \cdot n\text{H}_2\text{O}$ $n = 3-4.5$, 15%–20% H_2O	No especificada	6-12
Fosfato tricálcico β	β -TCP	$\beta\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	29.5	6-18
Fosfato tricálcico α	α -TCP	$\alpha\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	25.5	6-18

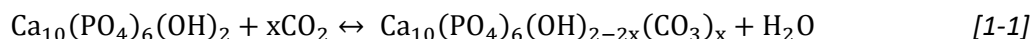
Una de las alternativas para promover la reabsorción de la Hidroxiapatita es la sustitución iónica con el carbonato (CO_3^{2-}), que se encuentra naturalmente en el hueso biológico en porcentajes de 4 a 8% en peso, donde se puede sustituir fácilmente a los iones hidroxilo (OH^-) o fosfato (PO_4^{3-}), dando como resultado una apatita parcialmente sustituida conocida como **hidroxiapatita carbonatada (HAC)** [25].

1.2. Hidroxiapatita Carbonatada

La hidroxiapatita carbonatada (HAC) tiene la posibilidad de tener dos tipos de sustituciones diferentes en el seno de la estructura de la HA llamadas apatita tipo A y apatita tipo B de acuerdo con el ion sustituido. En la primera los iones carbonato encuentran lugar en los sitios ocupados por los OH^- y en la segunda ocupan las posiciones de los iones fosfato. Algunas apatitas pueden también presentar los dos tipos de sustitución simultáneamente, apatita mixta de tipo AB, la sustitución tipo B se encuentra en la fase mineral del tejido óseo [18,26,27].

1.2.1. Hidroxiapatita Carbonatada Tipo A

La síntesis de hidroxiapatita carbonatada tipo A (HAC-A) fue desarrollada por Wallaeyts mediante la reacción de $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ y CaCO_3 a 900°C en atmósfera de dióxido de carbono, la cual necesita una presión de CO_2 superior a la atmosférica para obtener una mayor eficiencia [28]. Bonel describió el proceso de sustitución de los iones hidroxilo por los iones carbonato a lo largo del eje cristalográfico c, de acuerdo con la reacción:



La reacción se inicia a 800°C teniendo en cuenta que el requerimiento más importante es que el dióxido de carbono sea de alta pureza y además debe tener un muy bajo contenido de humedad.

Otro proceso fue descrito por Tonegawa, en el cual se utilizó síntesis hidrotermal, donde se adiciona a una suspensión de $\text{Ca}(\text{OH})_2$ mediante goteo una suspensión de H_3PO_4 , posteriormente el precipitado es secado y calentado a 900°C en una atmósfera de dióxido de carbono [28].

1.2.2. Hidroxiapatita Carbonatada Tipo B

El proceso de elaboración de la HAC-B comienza por la síntesis del polvo, donde el objetivo es adaptar todas las características físicas, químicas y estructurales del biomaterial según la aplicación prevista. Hay diferentes métodos para hacer la síntesis del polvo, ya sea a alta temperatura (hidrotermal y reacción entre CaCO_3 y α -TCP) o por vía acuosa (tipo directo e inverso) [29,30].

La síntesis de la HAC-B, se hace generalmente por vía acuosa ya sea de tipo directo o inverso, ya que es un método sencillo y permite controlar el tamaño de grano, la distribución granulométrica (monomodal), morfología y superficie específica, en esta última normalmente los granos obtienen

una alta superficie específica de aproximadamente 50 m²/g [31], lo que favorece su densificación [32].

La síntesis de tipo directo consiste en agregar una solución que contiene los iones calcio en la solución que contiene los iones fosfato PO₄³⁻ y carbonato CO₃²⁻. Este método genera algunas veces la precipitación de otros compuestos que no se requieren, obteniendo una apatita carbonatada polifásica [33]. Por otro lado, las síntesis vía acuosa de tipo inverso, consiste en agregar la solución que contiene los iones fosfato PO₄³⁻ y carbonato CO₃²⁻ a la solución que contiene los iones calcio, con el fin de evitar formación de elementos extraños o fases secundarias que cambian la composición química del material de partida.

Por lo anteriormente descrito, el método más utilizado para la síntesis de los polvos de HAC-B es la síntesis de tipo inverso, donde es necesario controlar los siguientes parámetros: atmósfera inerte (para evitar carbonatación de las apatitas por el gas carbónico de la atmósfera), temperatura, pH, tiempo de maduración del precipitado formado, la cantidad y concentración de los reactivos (Ca, PO₄³⁻ y CO₃²⁻) [34].

En la reacción que se presenta en la reacción [1-2], la formación de las apatitas carbonatadas tipo B, los iones fosfato son reemplazados por los iones carbonato. La apatita cristaliza en el sistema hexagonal y es isomorfa a al HAP. En la reacción “x” es la cantidad de iones carbonato sustituidos en los iones PO₄³⁻ [35].



Numerosos estudios muestran que la HAC-B es susceptible a descomponerse durante tratamiento térmico en aire por deshidratación (pérdida de agua) y descarbonatación (salida de los iones CO₃²⁻ de los sitios B) [34]. La descarbonatación está acompañada de la formación de una o más fases secundarias (CaO, CaCO₃ o liberación de CO₂). La naturaleza de estas fases secundarias está ligada directamente al valor de la relación molar Ca/P de la apatita inicial, la naturaleza y cantidad de los iones de CO₃²⁻, la temperatura y la atmósfera utilizada durante el tratamiento térmico [36]. Como se desprende de la fórmula química de la apatita tipo B, el valor de Ca/P es superior a 1.67 cualquiera sea el valor de “x”. Para evitar la descomposición de la HAC-B, es necesario realizar el tratamiento térmico en atmósfera controlada de CO₂, ya que permite estabilizar la fase inicial de la HAC-B a altas temperaturas y permite desplazar el equilibrio en el sentido que favorece la formación de la HAC-B (izquierda) [37]. Algunos autores como Lafon et. al [38], indican que la sinterización de este tipo de apatitas carbonatadas depende de la tasa de carbonatación y el control de la atmósfera, donde la presión parcial de CO₂ influye directamente en la temperatura a la cual comienza la descarbonatación de los sitios B. Para la presión de 1 bar, la temperatura de sinterización se encuentra 200° C por encima de la temperatura a la presión de 10⁻³ bar, con lo que se concluye que cuanto más alta sea la presión de CO₂ la temperatura a la cual comienza la descarbonatación en los sitios B es mayor, es decir permite tener un mayor rango de temperaturas de sinterización sin

descomposición [39]. Por otro lado, en cuanto a la tasa de carbonatación, a bajas tasas de carbonatación la temperatura a la cual comienza la descomposición será más elevada [40,41].

1.2.3. Propiedades Físicoquímicas

La HA no puede ser utilizada para aplicaciones en las cuales sea necesario soportar cargas mecánicas como, por ejemplo, prótesis de cadera. Comparado con los dos componentes del hueso, cortical y esponjoso (Tabla 1-2), la HA densa sintética puede alcanzar propiedades similares, las cuales varían de acuerdo con características tales como la porosidad del material, la cual es inversamente proporcional a la tenacidad a la fractura y la resistencia a la tensión. Otras variaciones microestructurales como el tamaño de grano, las impurezas, microporosidad remanente, así como la relación Ca/P determinan el comportamiento mecánico de este biomaterial. Sin embargo, la combinación entre las fases mineral y orgánica del hueso presentan un desempeño biomecánico difícil de lograr sintéticamente [42,43].

Tabla 1-2. Propiedades mecánicas del hueso y la hidroxiapatita [44,45].

Material	Resistencia a la Tracción (MPa)	Esfuerzo de Cedencia (MPa)	Resistencia a la Compresión (MPa)	Módulo Elástico (GPa)	Tenacidad a la Fractura (MPa.m^{1/2})
Hidroxiapatita	38-48	-	500-1000	80-110	1
Hueso Cortical	100-230	30-70	100-230	7-30	2-12
Hueso Esponjoso	10-20	-	2-12	0.05-0.5	-

Los sustitutos óseos empelados en regeneración deben exhibir suficiente resistencia mecánica inicial y rigidez para sustituir la función mecánica del hueso dañado hasta que se regenere [46], por lo tanto, la influencia de la sustitución de carbonatos en el comportamiento mecánico de la hidroxiapatita es uno de los principales aspectos a considerar, ya que permite acelerar los procesos de reabsorción conservando la estabilidad mecánica. Algunos autores han reportado la mejora del comportamiento mecánico con la adición de carbonato, sin embargo, no existe un estudio sistemático en la literatura sobre niveles crecientes de sustitución de carbonato en el comportamiento mecánico de la hidroxiapatita. Los trabajos disponibles reportan resultados de desempeño mecánico de materiales HAC con contenidos específicos de carbonato, Thang et. al [37], realizaron comparaciones entre diferentes cantidades de carbonatación y su influencia en tensión de fractura en compresión diametral y tenacidad a la fractura, sin embargo, estas comparaciones se realizan con niveles diferentes de porosidad entre materiales, la cual influye altamente en el resultado final y la proporción de poros es muy elevada para poder inferir conclusiones la tenacidad a la fractura [47]. De igual manera, Safarzadeh et. al [48], evaluaron la influencia del ion carbonato en la tenacidad a la fractura de materiales con niveles diferentes de porosidad y cantidades de poros elevadas. Bang et al. [41] informaron valores de resistencia a la tracción determinados por la prueba de compresión diametral de especímenes densos. Estos autores encontraron que la resistencia del

material HAC con 11% en peso de sustitución de CO_3 (≈ 11 MPa) era aproximadamente el doble de la del estequiométrico HA (≈ 6 MPa). Al tratar con andamios porosos (45% de porosidad), Landi et al. [41] informaron valores de resistencia a la compresión para HAC con 8.8 % en peso de contenido de carbonato (6.0 ± 0.5 MPa) que eran el doble que los de HA (3.1 ± 0.3 MPa). De la misma manera, Zhu et. al. [49] encontraron que la hidroxiapatita carbonatada tiene una mayor resistencia a la flexión que la HA no sustituida debido a la superficie de fractura densa y uniforme sin grietas evidentes. De lo aquí descrito se desprende que no está claro si la carbonatación de la hidroxiapatita influye en el comportamiento mecánico a través de una limitación de los defectos críticos a través de la mejora de la microestructura -sin defectos y/o grietas- o de la tenacidad del material. Para elucidar este aspecto, sería precisa la comparación entre materiales con microestructuras similares y diferentes niveles de carbonatación.

La capacidad y velocidad de reabsorción, junto con su potencial osteoinductor, son las características biológicas fundamentales de las plataformas de crecimiento celular (*Scaffold* en terminología anglosajona) o injertos óseos. Esta es la razón por la cual las modificaciones iónicas en la HA se han estudiado y entre ellas la inclusión de carbonato ha demostrado acelerar este proceso, por ejemplo, la HAC presenta una tasa de disolución más alta en condiciones ácidas débiles ($\text{pH} = 3.5$) que la de la HA [50–53], lo que explica la diferencia en la reabsorción osteoclástica entre HA y HAC. Al pH fisiológico o $\text{pH} 7.4$, se ha encontrado un comportamiento de disolución similar. En las condiciones ácidas creadas por los osteoclastos, la HAC se reabsorbe fácilmente, por lo que tiene capacidades osteoconductoras y de reabsorción más altas que la HA [54]. En consecuencia, varios autores han demostrado que la bioactividad de HAC es mayor que la de HA en pruebas *in vitro* [55] e *in vivo* [56,57]. Además, se ha sugerido que la cantidad de carbonato podría modular el comportamiento biológico, es decir, las respuestas de osteoclastos y osteoblastos, como lo destacan Ortali et al [58]. En este sentido, Miyamoto et al han demostrado la eficacia del carbonato de apatita en forma de gránulos [59,60] o bloques [56,61] para la regeneración ósea. Los resultados preliminares de la eficacia como sustituto óseo de la apatita de alto contenido en carbonato (12.0% en peso) desarrollada por estos autores en comparación con los de otros dos materiales disponibles comercialmente (con 0.1 y 5.5% en peso de carbonato) sugieren que el contenido de CO_3 puede ser uno de los factores que gobiernan la formación y resorción ósea. Sin embargo, aunque la comparación histológica reportada por estos autores es importante, también hubo diferencias entre los tres productos comerciales analizados además de los contenidos de CO_3 .

Spence et al [62], al comparar diferentes muestras con contenidos de carbonato de 0.1 a 2.35% en peso, concluyeron que la tasa de reabsorción de HAC en presencia de osteoclastos humanos aumentó con el aumento del contenido de carbonato. Murugan et. al [63] estudiaron la reabsorción de HAC en condiciones fisiológicas simuladas, evaluaron la pérdida de peso de gránulos de HAC (2% en peso) en solución salina tamponada con fosfato ($\text{pH} = 7.2$) durante 800 h, encontrando que, después de este período, la HAC presentó una mayor pérdida de peso (95%) que la HA estequiométrica (90%), lo que indica una velocidad de disolución más alta debido a la adición de carbonato. Se ha propuesto que la disminución de la cristalinidad de la red asociada a la presencia

de sustitución de tipo B es responsable del aumento de la solubilidad de HAC tanto en ensayos *in vitro* como *in vivo* [26].

De la discusión anterior se puede concluir que la capacidad de las hidroxiapatitas carbonatadas tipo B para ser reemplazadas por hueso está estrechamente ligada a su reabsorbilidad y que la inclusión de carbonato en la posición B de la estructura cristalina de la hidroxiapatita mejora la resistencia mecánica. Sin embargo, la importancia relativa de los parámetros de composición sobre la degradación y los comportamientos mecánicos aún no está clara. Para desarrollar sustitutos de HAC con propiedades adecuadas, sería necesario establecer el efecto de niveles sistemáticamente variables de sustitución de CO_3^{2-} en los comportamientos biológicos y mecánicos de materiales de hidroxiapatita con características microestructurales similares.

1.2.4. Estructuras porosas

La obtención de estructuras cerámicas porosas ha permitido promover el proceso de osteoinducción de plataformas de crecimiento celular mediante la colonización de células osteoblásticas, cuyo tamaño puede variar entre 100-500 μm , adicionalmente, asegura el transporte de nutrientes y desechos metabólicos, el crecimiento vascular y la osteogénesis directa [64]. Hasta ahora, se han desarrollado mediante diferentes técnicas, tales como copiado de espumas poliméricas, congelación de una suspensión cerámica desde temperatura ambiente hasta temperaturas bajo cero grados centígrados (Freeze casting) y consolidación por compactación de polvos mediante presión uniaxial con posterior tratamiento térmico [65–68]. El copiado de espumas poliméricas permite obtener estructuras porosas interconectadas, sin embargo, la eliminación mediante tratamiento térmico de las preformas puede generar residuos en el material y que podrían ser tóxicos para las células óseas [69,70]. Por otro lado, la técnica de congelación favorece la obtención de estructuras laminares o poros tipo canales, los cuales no alcanzan en muchos casos los tamaños recomendados para promover la integración ósea [71,72].

El conformado utilizando un agente porogénico (Space holder terminología anglosajona) que genere y permita conservar una red de macroporos interconectados es una alternativa promisoriosa en la fabricación de plataformas de crecimiento celular, esto debido a que permite controlar la geometría, cantidad e interconexión de poros [73]. Se han evaluado una gran cantidad de formadores de poros tales como polimetilmetacrilato (PMMA), bicarbonato de amonio (NH_4HCO_3), sacarosa, almidón y cloruro de sodio (NaCl) [74]. Este último, el NaCl, se ha empleado gracias a características como bajo costo, baja toxicidad, amplia disponibilidad en el mercado y alta solubilidad en agua que permite removerlo fácilmente mediante lixiviación, adicionalmente, los residuos de NaCl no afectan el desempeño *in vivo* de las plataformas [75].

El proceso para conformación de piezas mediante Space holder puede dividirse en cuatro etapas principales, la primera consiste en la mezcla de polvos del biomaterial y el agente porogénico, posteriormente se realiza una compactación de la mezcla. Las etapas tres y cuatro, que

corresponden a la lixiviación y tratamiento térmico, pueden realizarse en cualquier orden, principalmente dependiendo de la estabilidad mecánica en verde de las piezas [76,77].

La reabsorción de plataformas de crecimiento celular también se ve favorecida por el uso de estructuras porosas, una mayor porosidad aumenta el área superficial y, por lo tanto, la interacción con fluidos biológicos y células óseas. Diez-Escudero et. al [78], evaluaron el efecto de la porosidad en CDHA con tasas de carbonatación de hasta el 13% en peso en un ambiente ácido con el fin de simular el ambiente que generan las células osteoclasticas al interactuar con un implante, encontrando que la nano, micro y macro porosidad tienen un efecto exponencial en la degradación de este tipo de materiales. Kanhed et. al [79], obtuvieron estructuras porosas entre 6-27% empleando grafito como agente porogénico, encontrando que los materiales con mayor porosidad presentaron una mayor viabilidad celular, promovida por la interacción material-célula generada por la mayor cantidad de sitios de interacción debido a los poros.

Si bien el control de la arquitectura de las plataformas de crecimiento celular es un aspecto importante de acuerdo con lo explicado anteriormente, los recientes desarrollos en materiales para regeneración ósea requieren plataformas con funcionalización terapéutica, es decir, sistemas empleados para la liberación de sustancias que permitan realizar tratamientos locales de enfermedades óseas o patologías postquirúrgicas [80], para esto moléculas como antibióticos son adicionadas en proporciones adecuadas, sin embargo, las plataformas de crecimiento celular fabricadas con fosfatos de calcio tratados térmicamente presentan limitaciones en cuanto a capacidad de albergar y liberar este tipo de sustancias si se compara con los denominados cementos óseos [81]. De tal modo que una de las alternativas para mejorar el desempeño de estos materiales en la liberación localizada de sustancias activas es la incorporación de biopolímeros como el quitosano, aprovechando sus características físicas y químicas [82].

1.3. Materiales compuestos como plataformas de crecimiento celular

1.3.1. Quitosano

Algunos materiales poliméricos poseen propiedades fisicoquímicas similares a la fase orgánica del tejido óseo por lo que son materiales biocompatibles, biodegradables y no tóxicos, características que permiten su aplicación en la ingeniería biomédica [83]. Además, su facilidad de conformación permite fabricar diversas formas y tamaños con diferentes tamaños y cantidades de poros, lo que los hace materiales versátiles. Adicionalmente, pueden ser utilizados como materiales para sistemas de liberación controlada de fármacos. Los polímeros biodegradables más comunes son los poliésteres las poliamidas, los poliuretanos, polímeros naturales como colágeno, gelatina y el quitosano [84].

El quitosano es un polímero natural derivado de la N-desacetilización de la quitina Figura 1-2, el cual se encuentra unido a proteínas por interacciones electrostáticas formando los proteoglicanos los cuales organizan la matriz extracelular de los tejidos humanos [85]. Sus principales propiedades son

la baja toxicidad, solubilidad en ácidos diluidos tales como acético (1-3 % vol.), cítrico (3-4% vol.) y clorhídrico, así como en agua, alta biocompatibilidad y biodegradabilidad [86,87]. A diferencia de la mayoría de los polímeros sintéticos, el quitosano presenta una superficie hidrofílica que promueve la adhesión y proliferación celular, así como la no generación de productos tóxicos [88], debido a esto ha presentado un gran interés en la fabricación de plataformas de crecimiento celular mostrando capacidad de generar matrices mineralizadas de hueso *in vitro* [89] y exhibiendo osteoinductividad *in vivo* en defectos óseos creados quirúrgicamente [90].

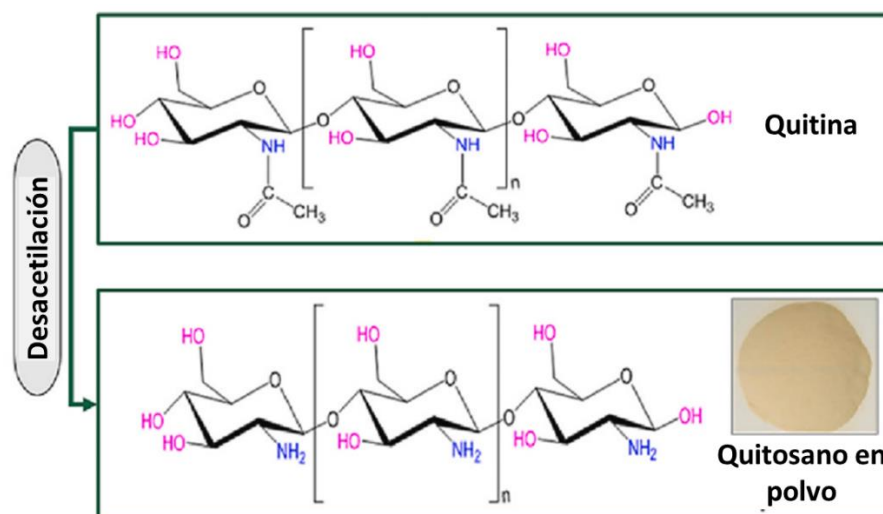


Figura 1-2. Estructura química del quitosano [11].

El quitosano y la hidroxiapatita son los materiales empleados en ingeniería de tejidos que presentan las mayores características promisorias en el desarrollo de componentes óseos y la combinación de estos se investigado ampliamente en diferentes aplicaciones [91]. La fabricación de compuestos HA/quitosano depende de variables como la naturaleza de los reactivos usados como precursores, la relación cerámico/polímero, el pH, la temperatura, la relación Ca/P, las dimensiones de las plataformas y el área de aplicación [11]. Tradicionalmente, se ha empleado el material polimérico como matriz y partículas de HA como refuerzo, utilizando métodos como coprecipitación (Yang et. al [92]), evaporación del solvente (Thein-Han et. al [93]) e impresión 3D (Yousefi et. al [94]).

La otra alternativa es emplear el material cerámico como matriz porosa y posteriormente aprovechar la facilidad del quitosano en solución de infiltrarse en la red de poros, una vez removido el solvente ha mostrado capacidad de brindarle estabilidad mecánica, así como la capacidad de encapsulación y liberación de antibióticos [95].

1.3.2. Liberación de antibióticos

La osteomielitis es una infección ósea que puede ser adquirida durante los procesos quirúrgicos ortopédicos. Cuando no es tratada a tiempo puede generar necrosis de las células óseas y afectar el sistema vascular atacando igualmente el tejido blando circundante [96].

El hueso sano normalmente tiene una alta resistencia a esta infección y esta solo ocurre cuando existe una larga inoculación de microorganismos, traumas con daño de hueso o por la presencia de cuerpos extraños como implantes o injertos. Esta infección es más propensa en pacientes con factores de riesgo como la diabetes, cirugía, trauma y consumo de drogas por vía intravenosa. Existen tres tipos de osteomielitis: hematógena, secundaria de infecciones y a partir de insuficiencia vascular.

La principal bacteria que causa esta enfermedad es el Estafilococo Aureus (*S. Aureus*), la cual posee en su superficie una gran cantidad de patrones patógenos capaces de interactuar en los espacios extra e intracelulares de las células osteoblásticas. Una vez la bacteria entra en contacto con el hueso realiza un proceso de fijación y colonización para finalmente formar una película denominada *biofilm* que facilita la permanencia de la infección. Una de las respuestas a la presencia del *S. Aureus* es la inflamación, que conlleva muerte celular, inhibición de la regeneración de hueso (osteogénesis) e inducción de resorción ósea (osteoclastogénesis), cuya combinación produce la pérdida de volumen del hueso [97].

Uno de los principales desafíos clínicos en el tratamiento de la osteomielitis es la capacidad que tiene el *S. Aureus* de alojarse en el interior de los osteoblastos, esto le permite protegerse de los microorganismos inmunológicos, así como de antibióticos que no pueden penetrar en la célula y atacar la bacteria [98]. Por lo tanto, el uso de sustitutos óseos que liberen antibióticos de forma localizada permitiría la prevención y tratamiento de esta enfermedad.

Los compuestos HA/quitosano han demostrado tener propiedades biológicas apropiadas y la habilidad de liberar medicamentos tales como antibióticos, anticancerígenos, antiinflamatorios y factores de crecimiento [99]. La cinética de liberación depende de múltiples factores tales como porosidad, permeabilidad, superficie específica, degradación de la matriz, solubilidad de la especie y la interacción química, de acuerdo con esto, generalmente se puede dividir en tres etapas que se representan en un gráfico de liberación (Figura 1-3). La región inicial corresponde a una liberación tipo ráfaga en la cual moléculas adsorbidas en la superficie de los poros más grandes, la región intermedia corresponde a una liberación controlada principalmente por la distribución de la porosidad y la tortuosidad del ambiente circundante, por último, en la tercera región se libera el remanente de la sustancia alojada en los poros más profundos y con mayor afinidad química con la plataforma [80].

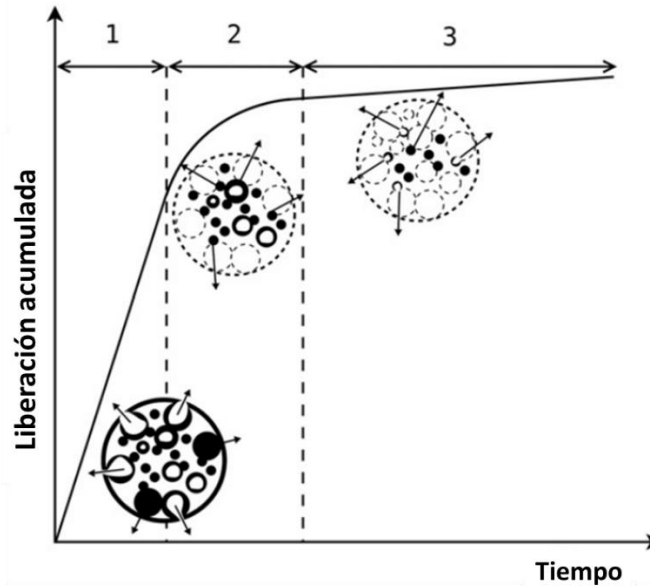


Figura 1-3. Regiones en cinética de liberación [80]

La gentamicina es un antibiótico de amplio espectro empleado en la prevención y tratamiento de infecciones asociadas a implantes, ya que presenta un amplio espectro de actuación, bajo costo y baja de resistencia por parte de agentes patógenos en las etapas tempranas de liberación [100]. Este medicamento se suministra convencionalmente mediante administración oral o intravenosa, sin embargo, presenta una baja efectividad debido a que dificulta su llegada al punto de infección o posible infección en el tejido óseo y una posible intoxicación renal (nefrotoxicidad) debido al suministro sistemático [101]. De tal modo que las recientes investigaciones se han enfocado en el desarrollo de sistemas que permitan la administración local de sistemas basados en gentamicina con el fin de prevenir los posibles efectos adversos y asegurar su efectividad.

Los reportes con respecto a los sistemas hidroxiapatita carbonatada/quitosano con capacidad de albergar y liberar antibióticos se han centrado en el uso de microesferas o recubrimientos sobre prótesis metálicas, tales como Guo et al [100], que fabricaron microesferas de HAC, las cuales presentan una mejor eficiencia en cuanto a la liberación de gentamicina comparada con la hidroxiapatita estequiométrica y minimizan la adhesión de bacterias sobre la superficie de los materiales. Rajesh et. al [102], emplearon recubrimientos de HA/quitosano sobre prótesis de Ti6Al4V cargados con gentamicina presentando un carácter antibacterial contra el *S. aureus* luego de 5 días de incubación y excelente osteocompatibilidad. Prasad et. al, cargaron gentamicina y alendronato de sodio en un sistema hidroxiapatita/quitosano proporcionando resistencia contra el *S. Aureus* y el *E. Coli*. Wers et. al [103], evaluaron la influencia de parámetros como la porosidad, superficie específica y tamaño de poros en la cinética de liberación de sulfato de gentamicina en un sistema biovidrio/quitosano, encontrando que un incremento en esos tres parámetros favorece la liberación del antibiótico y mejora las propiedades antimicrobianas.

Las oportunidades de ampliación de conocimiento en el área de plataformas de crecimiento celular permitieron establecer en este trabajo un punto de partida para desarrollar un biomaterial compuesto de hidroxiapatita carbonatada tipo B/quitosano como plataforma de crecimiento celular con liberación de antibióticos. Este trabajo tuvo una metodología experimental que contempló establecer una ruta de síntesis adecuada para la obtención de hidroxiapatita carbonatada tipo B, evaluar la influencia del ion carbonato y el proceso de conformación en el comportamiento fisicoquímico y mecánico de este biomaterial cerámico. Fabricación de estructuras porosas e infiltración de quitosano, que promueva la biocompatibilidad, biodegradabilidad, osteoconducción y osteoinducción convirtiéndose en un sistema adecuado para la liberación controlada de antibióticos, los cuales mejoren la aceptación del sustituto óseo una vez éste sea implantado.

1.4. Referencias Introducción y Marco teórico

- [1] D. Lopes, C. Martins-Cruz, M.B. Oliveira, J.F. Mano, Bone physiology as inspiration for tissue regenerative therapies, *Biomaterials*. 185 (2018) 240–275. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2018.09.028>.
- [2] C. Baudín, P. Pena, Review: Tailored microstructures in the system tricalcium phosphate-wollastonite-diopside for bone regeneration scaffolds, *Open Ceramics*. 16 (2023) 100483. <https://doi.org/10.1016/j.oceram.2023.100483>.
- [3] M. Parent, H. Baradari, E. Champion, C. Damia, M. Viana-Trecant, Design of calcium phosphate ceramics for drug delivery applications in bone diseases: A review of the parameters affecting the loading and release of the therapeutic substance, *Journal of Controlled Release*. 252 (2017) 1–17. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2017.02.012>.
- [4] S. Samavedi, A.R. Whittington, A.S. Goldstein, Calcium phosphate ceramics in bone tissue engineering: a review of properties and their influence on cell behavior., *Acta Biomater*. 9 (2013) 8037–45. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2013.06.014>.
- [5] T. V. Safronova, *Inorganic Materials for Regenerative Medicine*, *Inorganic Materials*. 57 (2021) 443–474. <https://doi.org/10.1134/S002016852105006X>.
- [6] T. Kono, T. Sakae, H. Nakada, T. Kaneda, H. Okada, Confusion between Carbonate Apatite and Biological Apatite (Carbonated Hydroxyapatite) in Bone and Teeth, *Minerals*. 12 (2022) 1–11. <https://doi.org/10.3390/min12020170>.
- [7] D. Xiao, J. Zhang, C. Zhang, D. Barbieri, H. Yuan, L. Moroni, G. Feng, The role of calcium phosphate surface structure in osteogenesis and the mechanisms involved, *Acta Biomater*. 106 (2020) 22–33. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2019.12.034>.
- [8] A.E. Rosenberg, J.S. Khurana, Osteomyelitis and osteonecrosis, *Diagn Histopathol*. 22 (2016) 355–368. <https://doi.org/10.1016/j.mpdhp.2016.09.005>.
- [9] T. Padrão, C.C. Coelho, P. Costa, N. Alegrete, F.J. Monteiro, S.R. Sousa, Combining local antibiotic delivery with heparinized nanohydroxyapatite/collagen bone substitute: A novel strategy for osteomyelitis treatment, *Materials Science and Engineering C*. 119 (2021) 111329. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2020.111329>.
- [10] F. Tao, S. Ma, H. Tao, L. Jin, Y. Luo, J. Zheng, W. Xiang, H. Deng, Chitosan-based drug delivery systems: From synthesis strategy to osteomyelitis treatment – A review, *Carbohydr Polym*. 251 (2021) 117063. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2020.117063>.
- [11] H. Ait Said, H. Mabroum, M. Lahcini, H. Oudadesse, A. Barroug, H. Ben Youcef, H. Noukrati, Manufacturing methods, properties, and potential applications in bone tissue regeneration of hydroxyapatite-chitosan biocomposites: A review, *Int J Biol Macromol*. 243 (2023) 125150. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2023.125150>.
- [12] R. Kumar, S. Mohanty, Hydroxyapatite: A Versatile Bioceramic for Tissue Engineering Application, *J Inorg Organomet Polym Mater*. 32 (2022) 4461–4477. <https://doi.org/10.1007/s10904-022-02454-2>.
- [13] D. Arcos, Calcium Phosphate Bioceramics, in: M. Vallet-Regi (Ed.), *Bioceramics with Clinical Applications*, JohnWiley & Sons, 2014.

- [14] E. Fiume, G. Magnaterra, A. Rahdar, E. Verné, F. Baino, Hydroxyapatite for biomedical applications: A short overview, *Ceramics*. 4 (2021) 542–563. <https://doi.org/10.3390/ceramics4040039>.
- [15] S. Samavedi, A.R. Whittington, A.S. Goldstein, Calcium phosphate ceramics in bone tissue engineering: a review of properties and their influence on cell behavior., *Acta Biomater*. 9 (2013) 8037–45. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2013.06.014>.
- [16] N. Eliaz, N. Metoki, Calcium phosphate bioceramics: A review of their history, structure, properties, coating technologies and biomedical applications, *Materials*. 10 (2017). <https://doi.org/10.3390/ma10040334>.
- [17] Y. Jiang, Z. Yuan, J. Huang, Substituted hydroxyapatite: a recent development, *Materials Technology*. 35 (2020) 785–796. <https://doi.org/10.1080/10667857.2019.1664096>.
- [18] J.T.B. Ratnayake, M. Mucalo, G.J. Dias, Substituted hydroxyapatites for bone regeneration: A review of current trends, *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 105 (2017) 1285–1299. <https://doi.org/10.1002/jbm.b.33651>.
- [19] T. V. Safronova, *Inorganic Materials for Regenerative Medicine*, *Inorganic Materials*. 57 (2021) 443–474. <https://doi.org/10.1134/S002016852105006X>.
- [20] M. Canillas, P. Pena, A.H. De Aza, M.A. Rodríguez, Calcium phosphates for biomedical applications, *Boletín de La Sociedad Española de Cerámica y Vidrio*. 56 (2017) 91–112. <https://doi.org/10.1016/j.bsecv.2017.05.001>.
- [21] Y. Fillingham, J. Jacobs, Bone Grafts and Bone Substitutes, *Bone Joint J*. (2016) 6–9. <https://doi.org/10.1302/0301-620X.98B1.36350>.
- [22] D. Lopes, C. Martins-Cruz, M.B. Oliveira, J.F. Mano, Bone physiology as inspiration for tissue regenerative therapies, *Biomaterials*. 185 (2018) 240–275. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2018.09.028>.
- [23] R.B. Heimann, Structure, properties, and biomedical performance of osteoconductive bioceramic coatings, *Surf Coat Technol*. 233 (2013) 27–38. <https://doi.org/10.1016/j.surfcoat.2012.11.013>.
- [24] J. Ferguson, M. Diefenbeck, M. McNally, Ceramic Biocomposites as Biodegradable Antibiotic Carriers in the Treatment of Bone Infections, *J Bone Jt Infect*. 2 (2017) 38–51. <https://doi.org/10.7150/jbji.17234>.
- [25] K. Benataya, M. Lakrat, L.L. Elansari, E. Mejdoubi, Synthesis of B-type carbonated hydroxyapatite by a new dissolution-precipitation method, *Mater Today Proc*. 31 (2020) S83–S88. <https://doi.org/10.1016/j.matpr.2020.06.100>.
- [26] E. Landi, G. Celotti, G. Logroscino, A. Tampieri, Carbonated hydroxyapatite as bone substitute, *J Eur Ceram Soc*. 23 (2003) 2931–2937. [https://doi.org/10.1016/S0955-2219\(03\)00304-2](https://doi.org/10.1016/S0955-2219(03)00304-2).
- [27] J. Ruiz, D. Moreno, H. Copete, F. Vargas, M.E. López, Calcium phosphate cements improved by addition of carbonated Hydroxyapatite type B, *Boletín de La Sociedad Española de Cerámica y Vidrio*. (2022). <https://doi.org/10.1016/j.bsecv.2022.05.002>.
- [28] M. Fleet, *Carbonated Hydroxyapatite*, CRC Press, 2015.
- [29] R.A. Youness, M.A. Taha, H. Elhaes, M. Ibrahim, Molecular modeling, FTIR spectral characterization and mechanical properties of carbonated-hydroxyapatite prepared by

- mechanochemical synthesis, *Mater Chem Phys.* 190 (2017) 209–218. <https://doi.org/10.1016/j.matchemphys.2017.01.004>.
- [30] C. Xue, Y. Chen, Y. Huang, P. Zhu, Hydrothermal Synthesis and Biocompatibility Study of Highly Crystalline Carbonated Hydroxyapatite Nanorods., *Nanoscale Res Lett.* 10 (2015) 1018. <https://doi.org/10.1186/s11671-015-1018-9>.
- [31] J.-P. Lafon, *SYNTHESE, STABILITE THERMIQUE ET FRITTAGE D'HYDROXYAPATITES CARBONATEES*, Universite de Limoges, 2004.
- [32] A.A. Ruddyard, D.S. Soejoko, Nurlely, Effect of the quantity of carbonate components and sintering parameters on the quality of hydrothermally synthesized carbonate hydroxyapatite, *AIP Conf Proc.* 030070 (2017) 030070. <https://doi.org/10.1063/1.4991174>.
- [33] M. Šupová, Substituted hydroxyapatites for biomedical applications: A review, *Ceram Int.* 41 (2015) 9203–9231. <https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2015.03.316>.
- [34] J.P. Lafon, E. Champion, D. Bernache-Assollant, Processing of AB-type carbonated hydroxyapatite $\text{Ca}_{10-x}(\text{PO}_4)_{6-x}(\text{CO}_3)_x(\text{OH})_{2-x-2y}(\text{CO}_3)_y$ ceramics with controlled composition, *J Eur Ceram Soc.* (2008). <https://doi.org/10.1016/j.jeurceramsoc.2007.06.009>.
- [35] A. Ressler, A. Žužić, I. Ivanišević, N. Kamboj, H. Ivanković, Ionic substituted hydroxyapatite for bone regeneration applications: A review, *Open Ceramics.* 6 (2021). <https://doi.org/10.1016/j.oceram.2021.100122>.
- [36] Z. Zyman, M. Tkachenko, CO₂ gas-activated sintering of carbonated hydroxyapatites, *J Eur Ceram Soc.* 31 (2011) 241–248. <https://doi.org/10.1016/j.jeurceramsoc.2010.09.005>.
- [37] L.H. Thang, L.T. Bang, B.D. Long, N.A. Son, S. Ramesh, Effect of Carbonate Contents on the Thermal Stability and Mechanical Properties of Carbonated Apatite Artificial Bone Substitute, *J Mater Eng Perform.* 32 (2023) 1006–1016. <https://doi.org/10.1007/s11665-022-07169-6>.
- [38] J.P. Lafon, E. Champion, D. Bernache-Assollant, R. Gibert, A.M. Danna, Thermal decomposition of carbonated calcium phosphate apatites, *J Therm Anal Calorim.* 72 (2003) 1127–1134. <https://doi.org/10.1023/A:1025036214044>.
- [39] Q. Liu, J.P. Matinlinna, Z. Chen, C. Ning, G. Ni, H. Pan, B.W. Darvell, Effect of thermal treatment on carbonated hydroxyapatite: Morphology, composition, crystal characteristics and solubility, *Ceram Int.* 41 (2015) 6149–6157. <https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2014.11.062>.
- [40] C.T. Zaman, A. Takeuchi, S. Matsuya, Q.H.M.S. Zaman, K. Ishikawa, Fabrication of B-type carbonate apatite blocks by the phosphorization of free-molding gypsum-calcite composite., *Dent Mater J.* 27 (2008) 710–5. <https://doi.org/10.4012/dmj.27.710>.
- [41] L.T. Bang, B.D. Long, R. Othman, Carbonate hydroxyapatite and silicon-substituted carbonate hydroxyapatite: Synthesis, mechanical properties, and solubility evaluations, *The Scientific World Journal.* 2014 (2014). <https://doi.org/10.1155/2014/969876>.
- [42] M. Sadat-Shojai, M.T. Khorasani, E. Dinpanah-Khoshdargi, A. Jamshidi, Synthesis methods for nanosized hydroxyapatite with diverse structures, *Acta Biomater.* 9 (2013) 7591–7621. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2013.04.012>.
- [43] S. Rollin-martinet, S.R. D, D´eveloppement de nouvelles bioc´eramiques par consolidation `a basse temp´erature d´apatites nanocristallines biomim´etiques To cite this version : Docteur de l´Universit´e de Limoges, Universit´e de Limoges Sp´ecialit´e, 2011.

- [44] T. Kokubo, H.M. Kim, M. Kawashita, Novel bioactive materials with different mechanical properties, *Biomaterials*. 24 (2003) 2161–2175. [https://doi.org/10.1016/S0142-9612\(03\)00044-9](https://doi.org/10.1016/S0142-9612(03)00044-9).
- [45] M. Kutz, *Orthopedic Biomaterials*, in: *Standard Handbook of Biomedical Engineering & Design*, The McGraw-Hill Companies, 2003.
- [46] A. del Valle García, D. Hautcoeur, A. Leriche, F. Cambier, C. Baudín, Microstructural design of ceramics for bone regeneration, *J Eur Ceram Soc*. 40 (2020) 2555–2565. <https://doi.org/10.1016/j.jeurceramsoc.2019.10.039>.
- [47] C. Baudín, T. Benet, P. Pena, Effect of graphene on setting and mechanical behaviour of tricalcium phosphate bioactive cements, *J Mech Behav Biomed Mater*. 89 (2019) 33–47. <https://doi.org/10.1016/j.jmbbm.2018.09.002>.
- [48] M. Safarzadeh, S. Ramesh, C.Y. Tan, H. Chandran, Y.C. Ching, A.F.M. Noor, S. Krishnasamy, W.D. Teng, Sintering behaviour of carbonated hydroxyapatite prepared at different carbonate and phosphate ratios, *Boletín de La Sociedad Española de Cerámica y Vidrio*. (2019) 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.bsecv.2019.08.001>.
- [49] Q.X. Zhu, W.H. Jiang, C. Shao, Y. Bao, Thermophysical and Mechanical Properties of Carbonated Hydroxyapatite, *Key Eng Mater*. 512–515 (2012) 989–993. <https://doi.org/10.4028/www.scientific.net/kem.512-515.989>.
- [50] K. Ishikawa, Carbonate apatite bone replacement: Learn from the bone, *Journal of the Ceramic Society of Japan*. 127 (2019) 595–601. <https://doi.org/10.2109/jcersj2.19042>.
- [51] K. Venkateswarlu, M. Sandhyarani, T.A. Nellaippan, N. Rameshbabu, Estimation of Crystallite Size, Lattice Strain and Dislocation Density of Nanocrystalline Carbonate Substituted Hydroxyapatite by X-ray Peak Variance Analysis, *Procedia Materials Science*. 5 (2014) 212–221. <https://doi.org/10.1016/j.mspro.2014.07.260>.
- [52] T. Shibutani, Y. Iwayama, Y. Moriwaki, Y. Doi, T. Kajimoto, T. Shibutani, Y. Moriwaki, T. Kajimoto, Y. Iwayama, Sintered carbonate apatites as bioresorbable bone substitutes, *J Biomed Mater Res*. 39 (2004) 603–610. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1097-4636\(19980315\)39:4<603::aid-jbm15>3.0.co;2-7](https://doi.org/10.1002/(sici)1097-4636(19980315)39:4<603::aid-jbm15>3.0.co;2-7).
- [53] M. Nakamura, R. Hiratai, T. Hentunen, J. Salonen, K. Yamashita, Hydroxyapatite with High Carbonate Substitutions Promotes Osteoclast Resorption through Osteocyte-like Cells, *ACS Biomater Sci Eng*. 2 (2016) 259–267. <https://doi.org/10.1021/acsbmaterials.5b00509>.
- [54] M.-M.M. Germaini, R. Detsch, A. Grünewald, A. Magnaudeix, F. Lalloue, A.R. Boccaccini, E. Champion, Osteoblast and osteoclast responses to A/B type carbonate-substituted hydroxyapatite ceramics for bone regeneration, *Biomedical Materials (Bristol)*. 12 (2017) 35008. <https://doi.org/10.1088/1748-605X/aa69c3>.
- [55] S. Hiromoto, S. Itoh, N. Noda, T. Yamazaki, H. Katayama, T. Akashi, Osteoclast and osteoblast responsive carbonate apatite coatings for biodegradable magnesium alloys, *Sci Technol Adv Mater*. 21 (2020) 346–358. <https://doi.org/10.1080/14686996.2020.1761237>.
- [56] T. Mano, K. Akita, N. Fukuda, K. Kamada, N. Kurio, K. Ishikawa, Y. Miyamoto, Histological comparison of three apatitic bone substitutes with different carbonate contents in alveolar bone defects in a beagle mandible with simultaneous implant installation, *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 108 (2020) 1450–1459. <https://doi.org/10.1002/jbm.b.34492>.

- [57] J. Barralet, M. Akao, H. Aoki, Dissolution of dense carbonate apatite subcutaneously implanted in Wistar rats, *J Biomed Mater Res.* 49 (2000) 176–182. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4636\(200002\)49:2<176::AID-JBM4>3.0.CO;2-8](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4636(200002)49:2<176::AID-JBM4>3.0.CO;2-8).
- [58] C. Ortali, I. Julien, C. Drouet, E. Champion, Influence of carbonation on the low-temperature consolidation by Spark Plasma Sintering of carbonated calcium phosphate bioceramics, *Ceram Int.* 46 (2020) 5799–5810. <https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2019.11.030>.
- [59] K. Akita, N. Fukuda, K. Kamada, K. Kudoh, N. Kurio, K. Tsuru, K. Ishikawa, Y. Miyamoto, Fabrication of porous carbonate apatite granules using microfiber and its histological evaluations in rabbit calvarial bone defects, *J Biomed Mater Res A.* 108 (2020) 709–721. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.36850>.
- [60] K. Kudoh, N. Fukuda, S. Kasugai, N. Tachikawa, K. Koyano, Y. Matsushita, Y. Ogino, K. Ishikawa, Y. Miyamoto, Maxillary Sinus Floor Augmentation Using Low-Crystalline Carbonate Apatite Granules With Simultaneous Implant Installation: First-in-Human Clinical Trial, *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery.* 77 (2019) 985.e1-985.e11. <https://doi.org/10.1016/j.joms.2018.11.026>.
- [61] K. Ishikawa, T.I. Arifta, K. Hayashi, K. Tsuru, Fabrication and evaluation of interconnected porous carbonate apatite from alpha tricalcium phosphate spheres, *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 107 (2019) 269–277. <https://doi.org/10.1002/jbm.b.34117>.
- [62] G. Spence, N. Patel, R. Brooks, W. Bonfield, N. Rushton, Osteoclastogenesis on hydroxyapatite ceramics: The effect of carbonate substitution, *J Biomed Mater Res A.* 92 (2010) 1292–1300. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.32373>.
- [63] R. Murugan, S. Ramakrishna, K. Panduranga Rao, Nanoporous hydroxy-carbonate apatite scaffold made of natural bone, *Mater Lett.* 60 (2006) 2844–2847. <https://doi.org/10.1016/j.matlet.2006.01.104>.
- [64] D. Xiao, J. Zhang, C. Zhang, D. Barbieri, H. Yuan, L. Moroni, G. Feng, The role of calcium phosphate surface structure in osteogenesis and the mechanisms involved, *Acta Biomater.* 106 (2020) 22–33. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2019.12.034>.
- [65] Y. Tang, M. Mao, R. Xu, K. Zhao, Z. Duan, Fabrication and permeability of HA gradient porous substrates by multiple freeze-tape-casting, *Ceram Int.* (2018) 0–1. <https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2018.04.014>.
- [66] H. Noguchi, M. Sakane, A. Watanabe, T. Tsukanishi, Y. Wadano, M. Yamazaki, A novel unidirectional porous hydroxyapatite in canines, *Bioinspired, Biomimetic and Nanobiomaterials.* 3 (2014) 228–234. <https://doi.org/10.1680/bbn.14.00005>.
- [67] A.R. Studart, U.T. Gonzenbach, E. Tervoort, L.J. Gauckler, Processing routes to macroporous ceramics: A review, *Journal of the American Ceramic Society.* 89 (2006) 1771–1789. <https://doi.org/10.1111/j.1551-2916.2006.01044.x>.
- [68] L. Roseti, V. Parisi, M. Petretta, C. Cavallo, G. Desando, I. Bartolotti, B. Grigolo, Scaffolds for Bone Tissue Engineering: State of the art and new perspectives, *Materials Science and Engineering C.* 78 (2017) 1246–1262. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2017.05.017>.
- [69] H. Yoshikawa, N. Tamai, T. Murase, A. Myoui, Interconnected porous hydroxyapatite ceramics for bone tissue engineering, *J R Soc Interface.* 6 (2009). <https://doi.org/10.1098/rsif.2008.0425.focus>.

- [70] Y. Han, H. Kim, Fabrication of Macroporous Ceramics with Trimodal Pore Structure, *Chemical Engineering*. 23 (2011) 42–46.
- [71] Z.Q. Jia, Z.X. Guo, F. Chen, J.J. Li, L. Zhao, L. Zhang, Microstructure, phase compositions and *in vitro* evaluation of freeze casting hydroxyapatite-silica scaffolds, *Ceram Int.* 44 (2018) 3636–3643. <https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2017.11.114>.
- [72] K.L. Scotti, D.C. Dunand, Freeze casting – A review of processing, microstructure and properties via the open data repository, *FreezeCasting.net*, *Prog Mater Sci.* 94 (2018) 243–305. <https://doi.org/10.1016/j.pmatsci.2018.01.001>.
- [73] S. Sadeghzade, R. Emadi, F. Tavangarian, M. Naderi, Fabrication and evaluation of silica-based ceramic scaffolds for hard tissue engineering applications, *Materials Science & Engineering C.* 71 (2017) 431–438. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2016.10.042>.
- [74] B. Arifvianto, J. Zhou, Fabrication of metallic biomedical scaffolds with the space holder method: A review, *Materials*. 7 (2014) 3588–3622. <https://doi.org/10.3390/ma7053588>.
- [75] M.Y. Zakaria, M.I. Ramli, A.B. Sulong, N. Muhamad, M.H. Ismail, Application of sodium chloride as space holder for powder injection molding of alloy Titanium-Hydroxyapatite composites, *Journal of Materials Research and Technology*. 12 (2021) 478–486. <https://doi.org/10.1016/j.jmrt.2021.02.087>.
- [76] Y. Hou, G. Jia, R. Yue, C. Chen, J. Pei, H. Zhang, H. Huang, M. Xiong, G. Yuan, Synthesis of biodegradable Zn-based scaffolds using NaCl templates: Relationship between porosity, compressive properties and degradation behavior, *Mater Charact.* 137 (2018) 162–169. <https://doi.org/10.1016/j.matchar.2018.01.033>.
- [77] M.Y. Zakaria, A.B. Sulong, M.I. Ramli, B. Ukwueze, W.S.W. Harun, R.L. Mahmud, Fabrication of Porous Titanium-Hydroxyapatite Composite Via Powder Metallurgy With Space Holder Method, *Journal of Advanced Manufacturing Technology (JAMT) Bhd.* 1 (2018) 1–12.
- [78] A. Diez-Escudero, M. Espanol, S. Beats, M.P. Ginebra, In vitro degradation of calcium phosphates: Effect of multiscale porosity, textural properties and composition, *Acta Biomater.* 60 (2017) 81–92. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2017.07.033>.
- [79] S. Kanhed, S. Awasthi, S. Goel, A. Pandey, R. Sharma, A. Upadhyaya, K. Balani, Porosity distribution affecting mechanical and biological behaviour of hydroxyapatite bioceramic composites, *Ceram Int.* 43 (2017) 10442–10449. <https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2017.05.083>.
- [80] M. Parent, H. Baradari, E. Champion, C. Damia, M. Viana-Trecant, Design of calcium phosphate ceramics for drug delivery applications in bone diseases: A review of the parameters affecting the loading and release of the therapeutic substance, *Journal of Controlled Release*. 252 (2017) 1–17. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2017.02.012>.
- [81] S. Panda, C.K. Biswas, S. Paul, A comprehensive review on the preparation and application of calcium hydroxyapatite: A special focus on atomic doping methods for bone tissue engineering, *Ceram Int.* 47 (2021) 28122–28144. <https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2021.07.100>.
- [82] H. Ait Said, H. Noukrati, H. Oudadesse, H. Ben Youcef, B. Lefeuvre, R. Hakkou, M. Lahcini, A. Barroug, Formulation and characterization of hydroxyapatite-based composite with enhanced compressive strength and controlled antibiotic release, *J Biomed Mater Res A.* 109 (2021) 1942–1954. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.37186>.

- [83] J. Zhang, G. Liu, Q. Wu, J. Zuo, Y. Qin, J. Wang, Novel Mesoporous Hydroxyapatite/Chitosan Composite for Bone Repair, *J Bionic Eng.* 9 (2012) 243–251. [https://doi.org/10.1016/S1672-6529\(11\)60117-0](https://doi.org/10.1016/S1672-6529(11)60117-0).
- [84] L. Wang, C. Li, Preparation and physicochemical properties of a novel hydroxyapatite/chitosan-silk fibroin composite, *Carbohydr Polym.* 68 (2007) 740–745. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2006.08.010>.
- [85] J. Venkatesan, S.K. Kim, Chitosan composites for bone tissue engineering - An overview, *Mar Drugs.* 8 (2010) 2252–2266. <https://doi.org/10.3390/md8082252>.
- [86] R. Parhi, *Chitin and Chitosan in Drug Delivery*, 2019.
- [87] Z. Mohammadi, A.S.M. Mesgar, F. Rasouli-Disfani, Reinforcement of freeze-dried chitosan scaffolds with multiphasic calcium phosphate short fibers, *J Mech Behav Biomed Mater.* 61 (2016) 590–599. <https://doi.org/10.1016/j.jmbbm.2016.04.022>.
- [88] S.K.L. Levengood, M. Zhang, Chitosan-based scaffolds for bone tissue engineering, *J Mater Chem B.* 2 (2014) 3161–3184. <https://doi.org/10.1039/c4tb00027g>.
- [89] S. Tang, B. Tian, Y.J. Guo, Z.A. Zhu, Y.P. Guo, Chitosan/carbonated hydroxyapatite composite coatings: Fabrication, structure and biocompatibility, *Surf Coat Technol.* 251 (2014) 210–216. <https://doi.org/10.1016/j.surfcoat.2014.04.028>.
- [90] A. Chitosan-based, *Chitosan Based Nanomaterials*, 2016. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-41926-8>.
- [91] A. Fadli, E. Saputra, Komalasari, Arosyidin, Fabrication of porous hydroxyapatite/chitosan composite bodies through dip-coating method, *IOP Conf Ser Mater Sci Eng.* 543 (2019) 012039. <https://doi.org/10.1088/1757-899X/543/1/012039>.
- [92] R. Ying, H. Wang, R. Sun, K. Chen, Preparation and properties of a highly dispersed nano-hydroxyapatite colloid used as a reinforcing filler for chitosan, *Materials Science and Engineering C.* 110 (2020) 110689. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2020.110689>.
- [93] W.W. Thein-Han, R.D.K. Misra, Biomimetic chitosan-nanohydroxyapatite composite scaffolds for bone tissue engineering, *Acta Biomater.* 5 (2009) 1182–1197. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2008.11.025>.
- [94] S. Yousefiasl, E. Sharifi, E. Salahinejad, P. Makvandi, S. Irani, Bioactive 3D-printed chitosan-based scaffolds for personalized craniofacial bone tissue engineering, *Engineered Regeneration.* 4 (2023) 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.engreg.2022.09.005>.
- [95] Z. Kai-Ping, S. Jing, Y. Song, Z. Jie, W. Hui, W. De-Ping, A Novel Hollow Hydroxyapatite Microspheres/Chitosan Composite Drug Carrier for Controlled Release, *Journal of Inorganic Materials.* 31 (2016) 434. <https://doi.org/10.15541/jim20150488>.
- [96] A.H. Choi, B. Ben-Nissan, R.C. Conway, I.J. Macha, *Advances in Calcium Phosphate Nanocoatings and Nanocomposites*, 2014. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-53980-0>.
- [97] N. Kavanagh, E.J. Ryan, A. Widaa, G. Sexton, J. Fennell, S. O'Rourke, K.C. Cahill, C.J. Kearney, F.J. O'Brien, S.W. Kerrigan, Staphylococcal Osteomyelitis: Disease Progression, Treatment Challenges, and Future Directions, *Clin Microbiol Rev.* 31 (2018) 1–25. <https://doi.org/10.1128/CMR.00084-17>.

- [98] J. Josse, F. Velard, S.C. Gangloff, Staphylococcus aureus vs. Osteoblast: Relationship and Consequences in Osteomyelitis, *Front Cell Infect Microbiol.* 5 (2015) 1–17. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2015.00085>.
- [99] S.R. Prasad, A. Jayakrishnan, T.S.S. Kumar, Dual Delivery of Antibiotic and Antiresorptive Drugs by Hydroxyapatite-Chitosan Composite Nanocarrier for the Treatment of Osteomyelitis, in: Springer International Publishing, 2019: pp. 72–85. https://doi.org/10.1007/978-3-030-25135-2_8.
- [100] Y.J. Guo, T. Long, W. Chen, C.Q. Ning, Z.A. Zhu, Y.P. Guo, Bactericidal property and biocompatibility of gentamicin-loaded mesoporous carbonated hydroxyapatite microspheres, *Materials Science and Engineering C.* 33 (2013) 3583–3591. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2013.04.021>.
- [101] M.Y. Memar, K. Adibkia, S. Farajnia, H.S. Kafil, S. Maleki-Diza, R. Ghotaslou, Biocompatibility, cytotoxicity and antimicrobial effects of gentamicin-loaded CaCO₃ as a drug delivery to osteomyelitis, *J Drug Deliv Sci Technol.* 54 (2019) 101307. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2019.101307>.
- [102] K. Rajesh, M.K. Rangaswamy, C. Zhang, S. Haldar, M. Kumarasamy, A. Agarwal, P. Roy, D. Lahiri, Surface Modified Metallic Orthopedic Implant for Sustained Drug Release and Osteocompatibility, *ACS Appl Bio Mater.* 2 (2019) 4181–4192. <https://doi.org/10.1021/acsabm.9b00443>.
- [103] E. Wers, H. Oudadesse, B. Lefeuvre, O. Merdrignac-Conanec, A. Barroug, Evaluation of the kinetic and relaxation time of gentamicin sulfate released from hybrid biomaterial Bioglass-chitosan scaffolds, *Appl Surf Sci.* 353 (2015) 200–208. <https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2015.06.146>.

2. Objetivos

Objetivo General

Desarrollar un biomaterial compuesto de hidroxiapatita carbonatada tipo B/quitosano como plataforma de crecimiento celular con liberación de antibióticos para aplicaciones en regeneración ósea.

Objetivos específicos

- Evaluar el efecto de la concentración de ion carbonato y la proporción de agente porogénico en el desempeño mecánico y fisicoquímico de la hidroxiapatita carbonatada.
- Determinar la influencia de la interacción hidroxiapatita carbonatada tipo B/quitosano en el comportamiento *in vitro* y mecánico de las plataformas de crecimiento celular.
- Analizar el comportamiento bactericida, así como la interacción celular y la cinética de liberación de antibióticos de los compuestos hidroxiapatita carbonatada tipo B/quitosano.

3. Efecto del contenido de carbonato en las propiedades mecánicas y comportamiento *in vitro* de la hidroxiapatita carbonatada tipo-B

El objetivo de este capítulo es determinar cuantitativamente la influencia de diferentes contenidos de carbonato en la resistencia mecánica y degradación *in vitro* de la hidroxiapatita carbonatada tipo-B, para esto se ha escogido el método de síntesis acuoso indirecto debido a que este permite tener control sobre el contenido de carbonato y el tamaño de partícula mediante el ajuste de los parámetros más importantes como atmósfera, temperatura, pH y tiempo de maduración. Se sintetizaron tres polvos con diferentes contenidos de carbonato y un blanco sin sustitución, los cuales fueron caracterizados y conformados mediante prensado uniaxial, posteriormente se diseñaron diferentes ciclos térmicos para cada material con el fin alcanzar valores similares de porosidad abierta, facilitando el análisis de los resultados que pudieran verse enmascarados si las porosidades estuvieran muy alejadas entre sí. La estabilidad química de las plataformas fue determinada mediante ensayos de degradación *in vitro* en dos ambientes que simulan las condiciones a las cuales están sometidos los sustitutos óseos una vez son implantados, el primer ambiente simula el entorno ácido que generan las células osteoclasticas al interactuar con el injerto ($\text{pH} < 3$) y el segundo ambiente simula las condiciones fisiológicas ($\text{pH} = 7.42$ y $T = 37^\circ\text{C}$), lo cual permite evaluar la solubilidad de los materiales durante largo periodos de tiempo.

3.1. Materiales y Métodos

3.1.1. Síntesis y caracterización de polvos de hidroxiapatita e hidroxiapatita carbonatada tipo-B.

Los polvos de hidroxiapatita fueron obtenidos mediante la síntesis acuosa por el método inverso desarrollado por Vignoles y optimizado por Lafon [1], en el cual una solución de nitrato de calcio tetrahidratado $[(\text{Ca}(\text{NO}_3)_2) \cdot 4\text{H}_2\text{O}]$, Merck®, Alemania] es preparada en un reactor hermético con corriente de Argón, calentada a 90°C con un $\text{pH} = 9$ ajustado mediante la adición de hidróxido de amonio $[\text{NH}_4\text{OH}]$ (Merck®, Alemania). En otro recipiente se mezclan hidrógeno fosfato de amonio $[(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4]$, Merck®, Alemania] e hidrógeno carbonato de amonio $[(\text{NH}_4)\text{HCO}_3]$, Alfa Aesar®, Estados Unidos], para ser alimentado al reactor mediante goteo hasta consumir la mezcla y un tiempo de maduración de 30 minutos en los cuales se sostienen las condiciones de temperatura, pH y agitación. En la Figura 3-1 se presenta el montaje empleado para la síntesis de los polvos. Finalmente, la solución es filtrada, lavada con agua desionizada, secada durante 24 h a 80°C , tratada térmicamente a 400°C con el fin de eliminar residuos de nitratos y tamizada a través de un tamiz de $45 \mu\text{m}$.

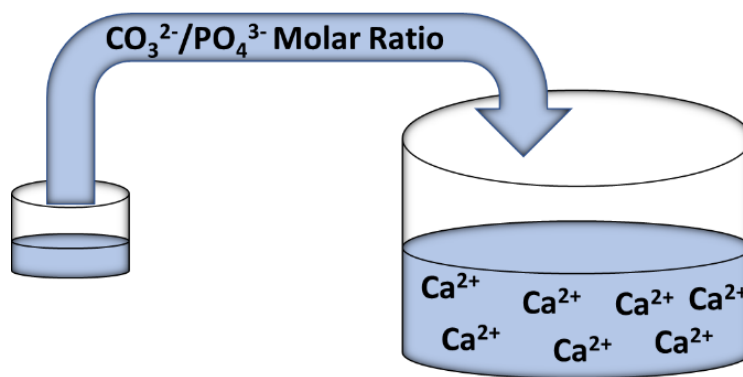


Figura 3-1. Esquema de síntesis mediante el método inverso

El diseño de los polvos se realizó tomando como base la relación molar calcio/fósforo de la hidroxiapatita estequiométrica ($\text{Ca/P}=1.67$) y a partir de esto se formularon tres composiciones controlando la relación molar entre los iones carbonato y fosfato de la solución precursora. En la Tabla 3-1 se presentan los materiales sintetizados.

Tabla 3-1. Parámetros de formulación de síntesis de los polvos

Material	Relación molar Ca/P	Relación molar $\text{CO}_3^{2-}/\text{PO}_4^{3-}$
HA	1.67	0
C2		0.25
C3		0.375
C4		0.5

La composición química elemental de los polvos fue determinada mediante Fluorescencia de rayos X con longitud de onda dispersiva (WD-XRF ARL Optim X ThermoFisher, USA) con el fin de conocer la relación molar Calcio/Fósforo (Ca/P), adicionalmente se estimó el contenido de carbonato a partir del porcentaje de carbono obtenido mediante análisis elemental de carbono en un equipo (C-S test; Leco, USA). El tipo de sustitución realizada por el carbonato en la estructura cristalina de la hidroxiapatita se evaluó con un espectrómetro infrarrojo con transformada de Fourier (FTIR-DRIFT, IR Tracer, Shimadzu, Japan), con el cual se analizaron las bandas características de los fosfatos de calcio y las vibraciones específicas de los enlaces carbono-oxígeno que varían de acuerdo con el tipo de sustitución.

Las fases cristalinas obtenidas en la síntesis de los polvos se determinaron mediante difracción de rayos X usando un equipo Empyrean (PANalytical, B.V., The Netherlands) con una fuente de radiación de $\text{CuK}\alpha$ ($\lambda=1.540598 \text{ \AA}$), un ángulo de barrido 2θ en un rango de $10-60^\circ$ y 0.02° por paso con 50 s. La distorsión causada por la inclusión del ion carbonato en la estructura cristalina se realizó usando como patrón de referencia la carta de la hidroxiapatita estequiométrica ICDD 9-0432 a través del software Xpert Highscore 2.0, (PANalytical, B.V., The Netherlands). A partir de los

espectros se hizo un ajuste mediante el método de refinamiento Rietveld de acuerdo con la metodología descrita por Ezekiel et. Al [2], usando la estructura hexagonal compacta (grupo espacial P63/m) de la hidroxiapatita con parámetros de red $a=b=9.4219 \text{ \AA}$ y $c=6.8822 \text{ \AA}$ [104].

La influencia del contenido de carbonato en la morfología de las partículas sintetizadas se observó con un microscopio electrónico de transmisión (TEM, FEI Tecnai 20 G2 S-Twin 200 kV, FEI, USA), adicionalmente se realizó la determinación de la distribución de tamaño de partícula empleando el método de difracción con un láser de He-Ne con una $\lambda=632,8 \text{ nm}$ (Mastersizer, Malvern, Reino Unido) sobre muestras húmedas dispersas en alcohol isopropílico.

Finalmente, con el fin de evaluar el comportamiento térmico de los polvos sintetizados y establecer las temperaturas de sinterización se realizó un análisis termogravimétrico (ATG) y térmico diferencial (ATD) ((TGA & DTA / DSC thermal analyzer, Setsys Evolution, Setaram, Francia), con una velocidad de calentamiento de $10^{\circ}\text{C}/\text{min}$ hasta 1300°C en atmósfera de aire, el cual sirvió como método de comparación con el ensayo de contenido de carbono en la región entre $400\text{-}850^{\circ}\text{C}$ donde ocurre la descomposición del ion carbonato.

3.1.2. Conformado y sinterización de piezas

El procesamiento para la fabricación de las piezas sinterizadas se realizó en tres etapas: preparación de la materia prima, conformado y tratamiento térmico de consolidación. Inicialmente, los polvos fueron acondicionados con el fin de romper aglomerados propios del proceso de síntesis mediante atrición en un molino vertical con jarro y bolas de zircona durante una 1 h a 1800 rpm en alcohol isopropílico, luego de esto se realizó nuevamente un análisis de distribución de tamaño de partícula con los mismos parámetros empleados para los polvos sintetizados. Por último, la dispersión de polvo en alcohol isopropílico fue secada a 65°C durante 24 h, macerada y tamizada a través de una malla de $100 \mu\text{m}$.

El método seleccionado para el conformado de piezas fue el prensado uniaxial, para lo cual en la segunda etapa se realizaron curvas de prensado con el objetivo de establecer las condiciones de procesamiento que permitieran obtener densidades en verde apropiadas sin generar defectos tales como desconchado o grietas. Las curvas de prensado fueron realizadas en un molde de acero inoxidable con diámetro de 5 mm, empleando aceite de bajo peso molecular como lubricante, 0.5 g de cada material fueron adicionados al molde y sometidos a compresión en una máquina universal, con una celda de carga de 10 kN hasta alcanzar poca variabilidad en la altura de los comprimidos, los resultados de la optimización del procesamiento de los polvos serán presentados en el Anexo 1 del presente trabajo.

Una vez seleccionada la presión de conformado (40 MPa) se fabricaron piezas en verde utilizando una prensa manual (Lordecó, Colombia), las dimensiones de las piezas se determinaron de acuerdo con el tipo de evaluación para el cual iban a ser empleadas tal y como se describe en la Tabla 3-2.

Tabla 3-2. Características físicas de las piezas en verde

Diámetro	Altura	Tipo de Evaluación
6.36 mm	4 mm	Caracterización fisicoquímica y degradación <i>in vitro</i>
	13 mm	Caracterización mecánica

Finalmente, la sinterización de las piezas fabricadas se realizó en un horno tubular eléctrico (Carbolite 3216, Reino Unido), con una velocidad de calentamiento de 5°C/min hasta la máxima temperatura y un sostenimiento de 2 h, posteriormente se empleó la velocidad mencionada anteriormente durante el enfriamiento. La temperatura máxima fue seleccionada específicamente para cada material sintetizado de tal forma que todas las piezas tratadas térmicamente obtuvieran valores de porosidad similares que no enmascarara el desempeño de las piezas sinterizadas. En la Tabla 3-3, se presentan las temperaturas para cada material y la nomenclatura que usará durante todo el documento para las piezas sinterizadas.

Tabla 3-3. Temperatura de sinterización de piezas consolidadas para caracterización fisicoquímica y mecánica.

Material	Temperatura (°C)
HA-T	800
C2-T	780
C3-T	780
C4-T	750

3.1.3. Caracterización fisicoquímica de piezas sinterizadas

La porosidad abierta de las piezas sinterizadas fue determinada siguiendo los parámetros de la norma EN 1389:2003, realizando 5 mediciones por condición y reportando el promedio con desviaciones estándar. Las fases cristalinas, cantidad de carbonato y tipo de sustitución fueron evaluados con el mismo procedimiento descrito para los polvos descrito en el numeral 3.1.1.

3.1.4. Evaluación mecánica de piezas sinterizadas

El efecto de contenido carbonato en la integridad estructural de las piezas sinterizadas fue evaluado mediante compresión uniaxial bajo norma ASTM C1424 en una máquina universal de ensayos Shimadzu AGS-X 50kN, Japón con placas de acero y una velocidad de desplazamiento de 0.5 mm/min.

3.1.5. Estudios de degradación *in vitro*

La degradación de los materiales sinterizados fue determinada por dos métodos que simulan ambientes a los que están sometidos los implantes una vez entran en contacto con los fluidos corporales. El primero de ellos consistió en un ensayo de degradación acelerada propuesto por Diez-

Escudero et. Al [3], el cual simula el ambiente ácido generado por las células osteoclasticas durante las etapas iniciales de implantación, para esto los discos de 6.0 ± 0.02 mm de diámetro y 3.5 ± 0.1 mm de altura fueron sumergidos en una solución ácida de 0.01 M de ácido clorhídrico (HCl, Merck[®], Alemania) y 0.14 M de cloruro de sodio (NaCl, Merck[®]) a 37°C. Antes del ensayo las muestras fueron secadas a 120°C hasta peso constante y sumergidas en 15 mL de solución contenida en recipiente de polipropileno de 50 mL, debido a que la solución no es un tampón las muestras fueron transferidas a otro recipiente con medio fresco. Luego de 8h las muestras fueron retiradas, lavadas con agua destilada y secadas a 120°C hasta alcanzar un peso constante. La pérdida de peso fue determinada mediante el valor promedio de tres muestras por condición (n=3) con desviaciones estándar.

La degradación en ambiente fisiológico simulado (pH=7.42, T=37°C) fue evaluada durante 7 semanas para tres muestras por condición en una solución tampón de Tris-HCl, luego de intervalos de tiempo de 1, 3, 7 días y posteriormente cada semana, los discos fueron retirados, lavados con agua destilada y secados a 120 °C hasta peso constante, la pérdida de peso fue calculada de igual forma que en el ensayo descrito en el párrafo anterior.

3.2. Resultados y discusión

3.2.1. Polvos de hidroxiapatita obtenidos

La composición química de los cuatro polvos sintetizados se presenta en la Tabla 3-4, la relación molar Ca/P determinada a partir FRX se encuentran en el intervalo entre 1.4-2.0, el cual es considerado como apropiado para su uso en aplicaciones biomédicas de acuerdo con su similitud a la apatita biológica que corresponde al 70% de la composición química de los huesos [4]. Adicionalmente, el contenido de carbonato de los polvos C2-C4 presentan valores en el rango de 2-8% en peso del hueso biológico, el cual puede variar con factores como edad, función o enfermedades. Es posible observar una correspondencia entre la cantidad de ion carbonato y la relación molar Ca/P, indicando que puede existir una sustitución causada por la inclusión del carbonato en la estructura cristalina de la hidroxiapatita

Tabla 3-4. Composición química de los polvos sintetizados

Material	Relación molar Ca/P (± 0.003)	Carbonato (% peso)
HA	1.521	-
C2	1.706	4.1 ± 0.2
C3	1.722	4.6 ± 0.2
C4	1.731	5.9 ± 0.3

Los espectros de FTIR presentados en la Figura 3-2 permiten identificar las bandas de los grupos funcionales característicos de los fosfatos de calcio OH (3570 cm^{-1}), PO_4^{3-} ($550\text{-}570\text{ cm}^{-1}$ para ν_4 y $1020\text{-}1120\text{ cm}^{-1}$ para ν_3), comparando el polvo de hidroxiapatita (HA) con el de mayor contenido de carbonato (C4). En este último aparecen las bandas correspondientes a los modos de vibración ν_2 y ν_3 del carbonato, cuyos números de onda determinan si el tipo de sustitución es A o B (Tabla 3-5). En la Figura 3-2 (b y c) no se encontraron bandas correspondientes a la sustitución tipo A, por lo que la única sustitución obtenida es del Tipo B, la cual es similar a la encontrada en la gran mayoría de apatitas biológicas y ha demostrado tener una mayor reabsorción cuando se ha empleado en injertos óseos [6, 7].

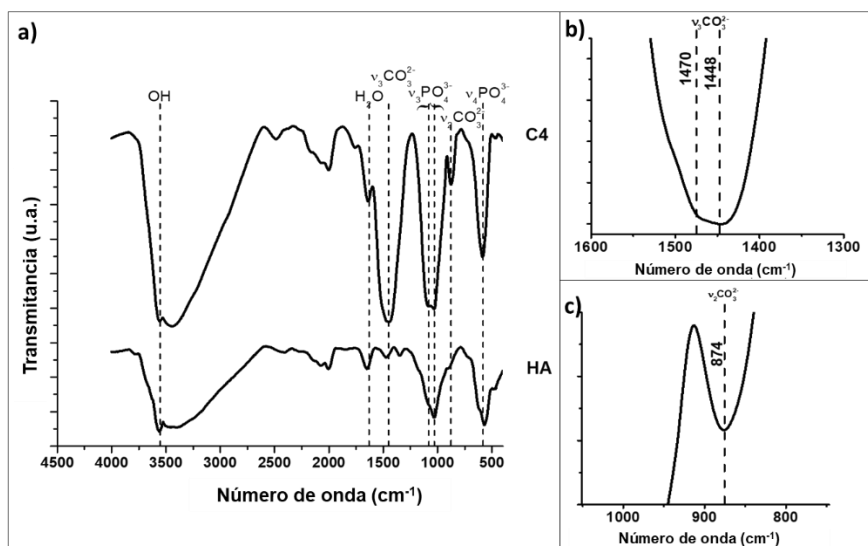


Figura 3-2. Espectro FTIR de los polvos sintetizados C4 y HA

Tabla 3-5. Números de onda (cm^{-1}) de modos de vibración ν_2 y ν_3 del grupo CO_3^{2-} para apatitas biológicas y sintéticas.

	C4	CO_3 Tipo B	CO_3 Tipo A
$\nu_2 \text{ CO}_3$	874	873	878
$\nu_3 \text{ CO}_3$	1448 1470	1445 1470	1542

Los difractogramas de rayos x de los cuatro polvos sintetizados se presentan en la Figura 3-3, encontrando que todos los picos detectados corresponden a la fase hidroxiapatita sin presencia de fases secundarias o remanentes.

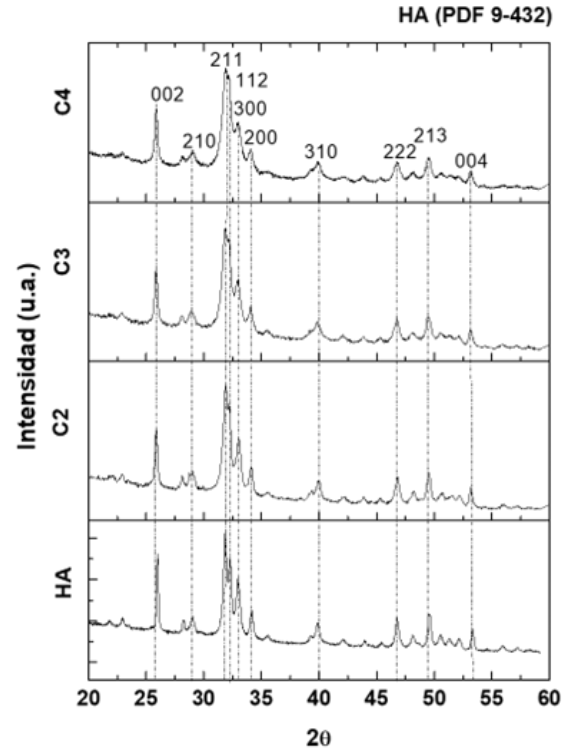


Figura 3-3. Espectros de difracción de rayos X de los polvos sintetizados

La determinación de los parámetros de red de los polvos sintetizados y la influencia del ion carbonato en la red cristalina se realizó mediante el análisis Rietveld encontrando los índices de confiabilidad plasmados en la Tabla 3-6 y los cuales permiten cuantificar la diferencia entre los espectros experimentales y los ajustados. Estos parámetros son la bondad de ajuste (GOF), calculada mediante la relación entre el patrón de residuales ponderado (R_w) y el error esperado (R_{exp}), los cuales deben tener valores de $GOF < 4$, $R_w < 10$ y R_{exp} lo menor posible, para que el ajuste sea válido y los resultados obtenidos sean comparables entre sí [8].

Tabla 3-6. Índices de confiabilidad obtenidos del refinamiento Rietveld para los polvos sintetizados

	R_{exp}	R_{pr}	R_w	GOF
HA	2.92	2.60	3.32	1.14
C2	3.00	2.80	3.58	1.19
C3	2.98	2.54	3.43	1.15
C4	3.00	2.32	3.00	1.00

Los parámetros de red encontrados mediante el refinamiento Rietveld de los polvos sintetizados y la influencia del contenido de carbonato es presentada en la Tabla 3-7. El parámetro a muestra una disminución cuando el contenido de carbonato aumenta y un comportamiento opuesto se puede observar para el parámetro c , el cual aumenta levemente con una mayor cantidad de carbonato, este tipo de distorsión es acorde con la estructura cristalina de la hidroxiapatita carbonatada Tipo

B, en la cual el tamaño inferior del ion carbonato comparado con el ion fosfato provoca una disminución progresiva del parámetro a y un incremento marginal en el parámetro c [9-11]. No obstante, no existe una relación directa entre los valores de los parámetros de red y el contenido de carbonato debido a que los parámetros de red se ven influenciados por el método de síntesis, presencia de sustitución tipo A, otros aniones en la red cristalina o cationes sustitutos de calcio [12, 13].

Tabla 3-7. Parámetros de red (A) del refinamiento Rietveld de los polvos sintetizados

	A	c	c/a
HA	9.4100 (7)	6.8568 (4)	0.7287 (1)
C2	9.3966 (9)	6.8887 (7)	0.7331 (2)
C3	9.3897 (2)	6.8900 (5)	0.7338 (2)
C4	9.3704 (7)	6.9060 (2)	0.7370 (1)

Las imágenes de microscopía electrónica de transmisión del polvo de hidroxiapatita (HA) sin sustitución y la de mayor contenido de carbonato (C4) se presentan en la Figura 3-4, la HA (a) presenta partículas cilíndricas alargadas acordes con la morfología de polvos comerciales [10]. Por otro lado, las partículas de C4 (b) presentan una morfología equiaxial generada por la distorsión en los parámetros de la red cristalina causada por la inclusión del carbonato y el retiro de los iones fosfato [13].

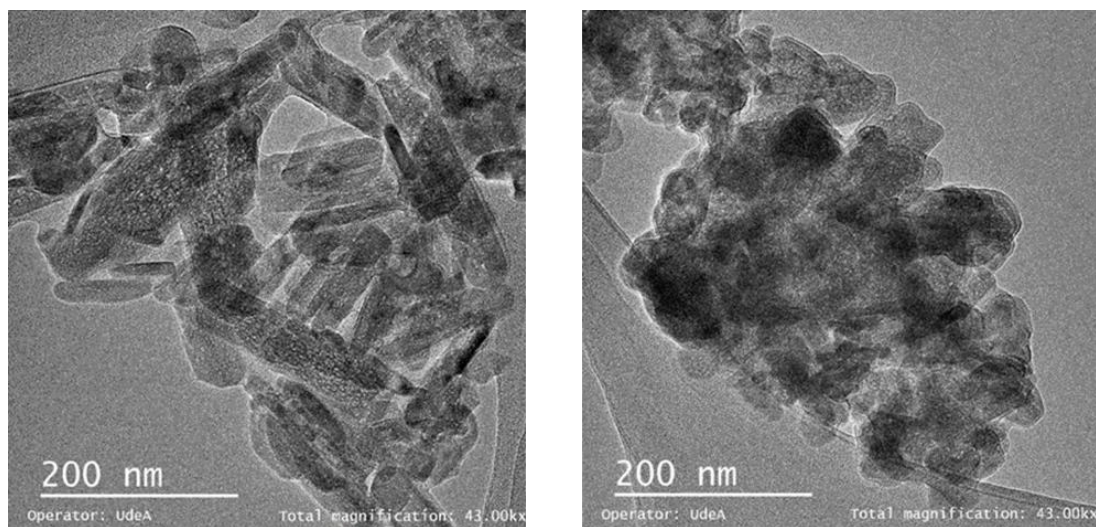


Figura 3-4. Imágenes de MET de polvos de hidroxiapatita sin sustituir (a. HA) y con alto contenido de carbonato (b).

En la Figura 3-5 el comportamiento térmico de los polvos sintetizados puede dividirse en tres etapas en función de los rangos de temperatura. Inicialmente entre temperatura ambiente y 400°C, los polvos muestran una pérdida gradual de masa debido a la evaporación de agua adsorbida y acoplada en la red cristalina [13]. La segunda etapa comprendida entre 400-900°C, establece una pérdida de

peso amplia acompañada con una reacción endotérmica grande observada en el ATD. Esta reacción corresponde a la descomposición del carbonato [14], la cual es observada fuertemente en el polvo C4, cuyo contenido de carbonato es del 5.9%. De hecho, para todos los polvos sintetizados los valores de pérdida de peso en esta etapa se corresponden con los contenidos de carbonato reportados en la Tabla 3-4. Este comportamiento confirma la necesidad de emplear una atmósfera controlada que reduzca la degradación del ion carbonato. Finalmente, la tercera etapa comprendida entre 900-1300°C corresponde a la pérdida de peso causada por liberación del ion hidroxilo [15].

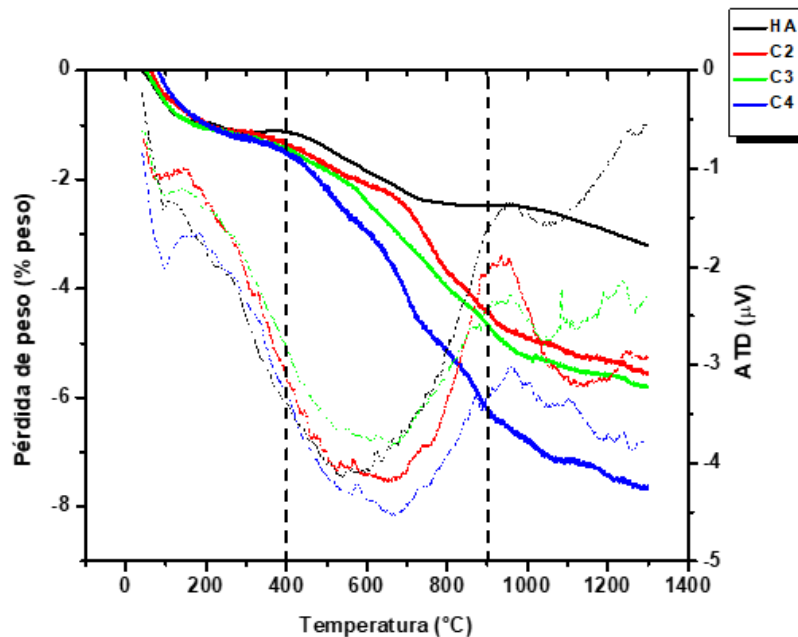


Figura 3-5. Comportamiento térmico de los polvos sintetizados.

3.2.2. Caracterización fisicoquímica y mecánica de piezas sinterizadas

La porosidad determina la resistencia mecánica de los materiales con porosidades elevadas, por lo tanto, para evaluar el efecto del contenido de carbonato en el comportamiento mecánico de la hidroxiapatita se fabricaron materiales con niveles de porosidad similar, para lo cual fue necesario realizar experimentos previos sistemáticos del efecto de la temperatura de sinterización en la porosidad abierta que representó el mayor tipo de porosidad presente en las piezas tratadas térmicamente, encontrando temperaturas de sinterización entre 750-850°C para niveles de porosidad entre 50-60% como se presenta en la Tabla 3-8. De este modo los resultados de resistencia mecánica son afectados principalmente por la composición química. Luego de la sinterización (Tabla 3-8), el contenido de carbonato de las piezas sinterizadas disminuye levemente con respecto a los polvos utilizados para la conformación de las piezas (Tabla 3-4), aunque los valores continúan estando dentro de la desviación estándar de los resultados obtenidos, lo cual indica el efecto de la atmósfera seleccionada para la sinterización en la prevención de la descomposición del ion carbonato.

Tabla 3-8. Temperatura de sinterización, porosidad abierta y contenido de carbonato de piezas sinterizadas

Material	Temperatura °C	Porosidad abierta %	Contenido de carbonato (CO ₃) % en peso	Resistencia a la compresión MPa
HA-T	850	59.9 ± 0.2		4.1 ± 1
C2-T	780	50 ± 1	3.7 ± 0.3	5.2 ± 1
C3-T	780	50.1 ± 0.8	4.3 ± 0.3	9.0 ± 1
C4-T	750	53 ± 1	5.3 ± 0.3	12.5 ± 1

Los espectros DRX de las piezas sinterizadas se muestran en la Figura 3-6. Para todos los materiales, los picos identificados son los mismos que los de los polvos sintetizados (Figura 3-3). Para las muestras sinterizadas, los picos son más esbeltos, lo que podría estar asociado con una mayor cristalinidad debido al tratamiento térmico.

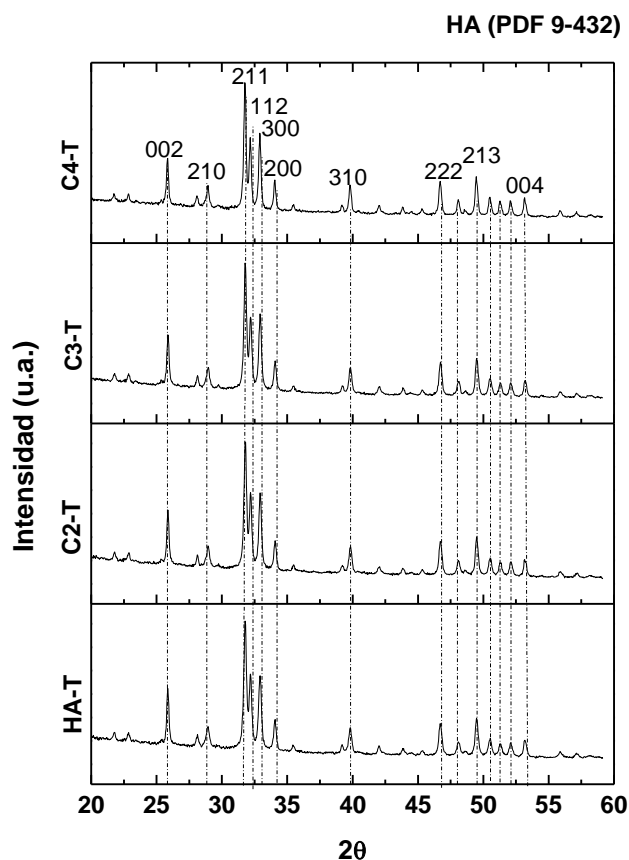


Figura 3-6. Espectros de difracción de rayos X de las piezas sinterizadas.

Los resultados del refinamiento Rietveld de los parámetros de red para los materiales sinterizados se resumen en las Tabla 3-9 y Tabla 3-10. Los parámetros del índice de confiabilidad cumplen con

los requisitos para un buen ajuste, lo que indica que los perfiles calculados permiten la comparación entre los diferentes materiales.

Tabla 3-9. Índices de confiabilidad obtenidos del refinamiento Rietveld para los materiales sinterizados

	R_{exp}	R_{pr}	R_w	GOF
HA-T	3.41	3.05	4.03	1.17
C2-T	3.44	3.49	4.57	1.33
C3-T	3.39	3.03	4.01	1.18
C4-T	3.62	3.51	4.46	1.23

Para cada composición, el valor del parámetro a del material sinterizado (Tabla 3-10) es significativamente mayor que el del polvo correspondiente (Tabla 3-7) mientras que c permanece igual para bajos contenidos de carbonato y disminuye ligeramente para la composición C4-T después del proceso de sinterización. Otros autores han reportado que a medida que aumenta la temperatura del tratamiento térmico, el parámetro a supera el valor teórico de HA, debido a la aparición de la sustitución tipo A [16, 17]. Sin embargo, dicha sustitución no se evidenció en este trabajo, por lo tanto, la distorsión de la red observada debería deberse a otros procesos, como una mayor cristalización que se revela en los espectros DRX más agudos (Figura 3-6), y/o las pequeñas pérdidas de carbonato discutidas anteriormente.

Tabla 3-10. Parámetros de red (A) del refinamiento Rietveld de los materiales sinterizados

	a	c	c/a
HA-T	9.4261(3)	6.8892(5)	0.7308(1)
C2-T	9.4227(4)	6.8877(8)	0.7309(2)
C3-T	9.4000(6)	6.8866(9)	0.7326(1)
C4-T	9.3938(3)	6.8866(6)	0.7330(1)

La Figura 3-7 muestra los espectros FTIR del material de hidroxiapatita sin sustituir sinterizado (HA-T) con la de mayor sustitución de carbonato (C4-T). Las bandas observadas son las mismas que las observadas en los espectros de los polvos correspondientes (Figura 3-2), con la aparición de una pequeña banda a 1415 cm^{-1} , que ha sido reportada por otros autores después del tratamiento térmico [17], lo que revela que solo la presencia de sustitución de tipo B en el material sinterizado C4-T. La ausencia de sustitución de tipo A se ha asegurado mediante la selección de la atmósfera y las temperaturas de sinterización. De hecho, la transición de B a A en la atmósfera de CO_2 se ha observado a temperaturas superiores a 800°C , dependiendo del contenido de carbonato [17].

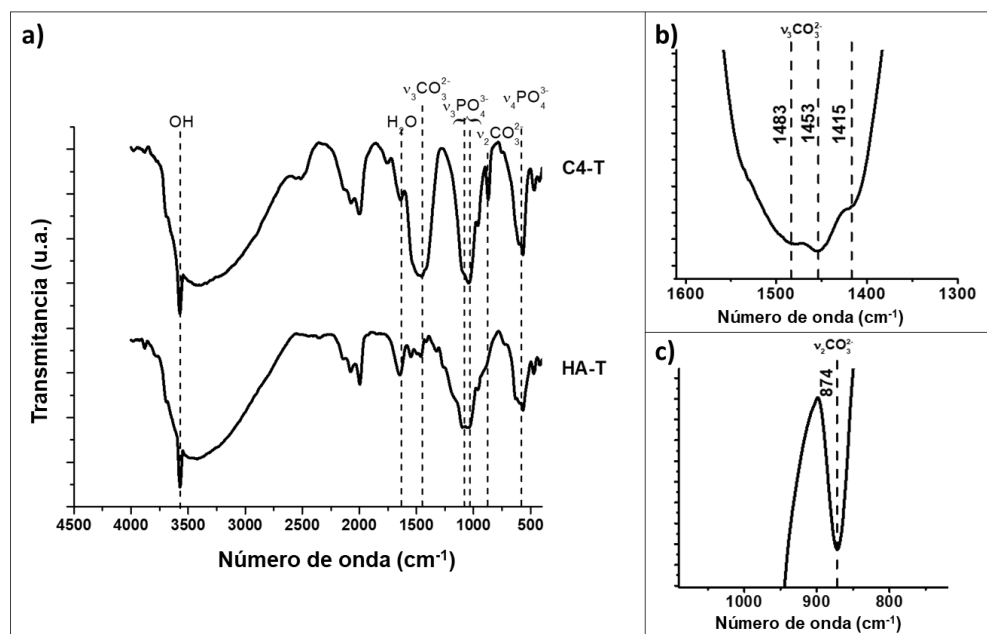


Figura 3-7. Espectro FTIR de los materiales sinterizados C4-T y HA-T

Los valores de resistencia a la compresión se presentan en la Tabla 3-8 junto con las características microestructurales y químicas discutidas anteriormente. No se evidencian diferencias significativas entre los valores de resistencia a la compresión uniaxial del material no sustituido y el de menor contenido en carbonato (HA-T y C2-T). En las superficies de fractura de la Figura 3-8, las partículas de HA (a) están cerca de 200 nm y los materiales con mayor sustitución de carbonato tienen tamaños inferiores a 100 nm. Además, la resistencia de C3-T es significativamente menor que la de C4-T, por lo tanto, el aumento de resistencia observado para los dos materiales con mayor contenido de carbonato (C3-T y C4-T) está relacionado con el efecto intrínseco del carbonato en la estructura cristalina y los enlaces químicos. De acuerdo con las imágenes microestructurales presentadas en la Figura 3-8, no se identifican defectos singulares en la superficie de fractura para ninguno de los cuatro materiales, por lo que la principal responsable del inicio de la fractura es la porosidad abierta. Estos resultados demuestran claramente que cantidades vez mayores de sustitución de carbonato en la red cristalina de HA conducen a valores de resistencia cada vez mayores.

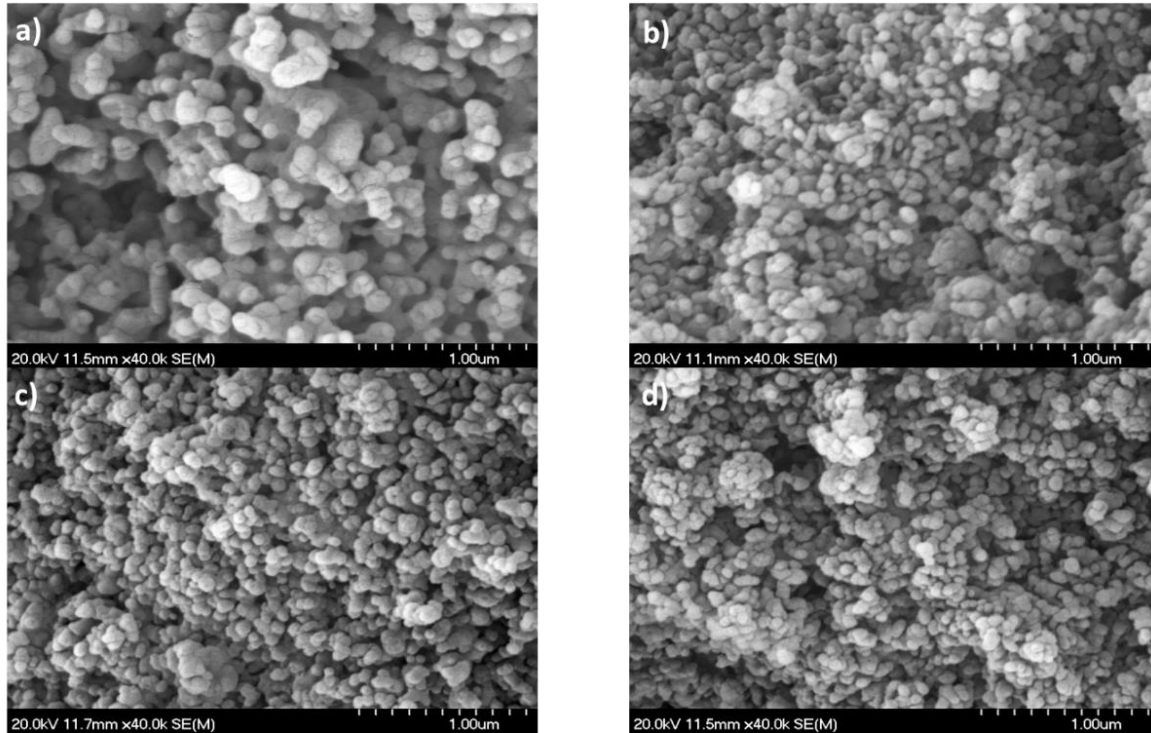


Figura 3-8. Características microestructurales de la superficie de fractura de las piezas sinterizadas: a) HA-T, b) C2-T, c) C3-T y d) C4-T.

3.2.3. Evaluación *in vitro* de piezas sinterizadas

Al igual que en el caso de la resistencia a la compresión uniaxial, las similitudes entre las características de porosidad de los materiales estudiados aseguran que los resultados de degradación no se vean enmascarados por diferencias microestructurales. Los resultados de la degradación acelerada de los materiales sinterizados en condiciones ácidas se presentan en la Figura 3-9. No existen diferencias significativas entre las pérdidas de peso determinadas para el material no sustituido (HA-T) y las correspondientes a los materiales sustituidos con menor contenido de carbonatos (C2-T y C3-T). Por el contrario, la pérdida de peso del material con mayor contenido de carbonato es significativamente mayor (>30%) que la de los otros tres materiales puede estar relacionada con la distorsión que produce el ion carbonato en la red HA, en la que la disminución del parámetro a aumenta la degradación (Figura 3-9b).

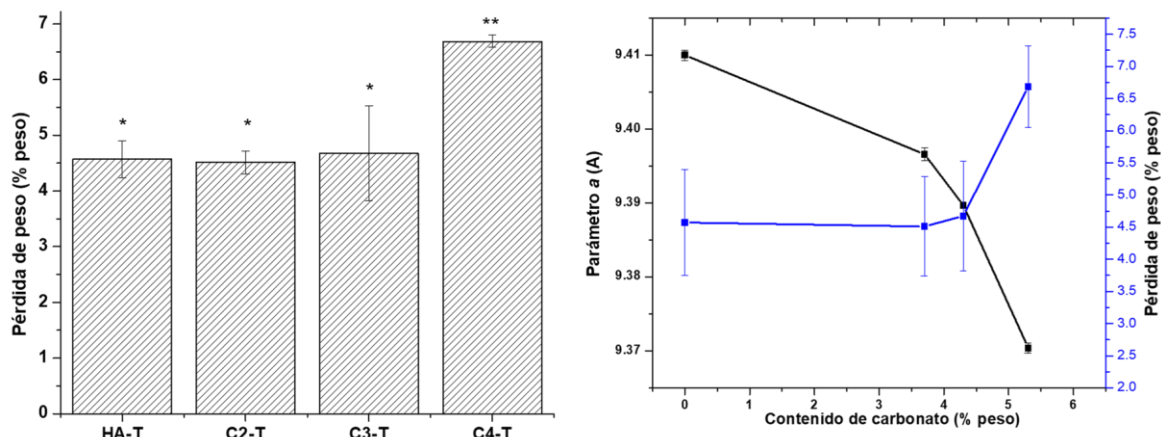
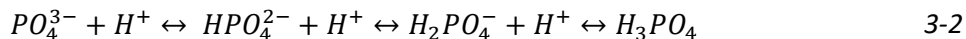
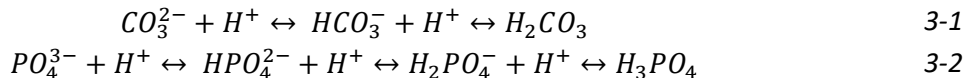


Figura 3-9. Degradación acelerada en materiales sinterizados (n=3). Pérdida de peso en medio ácido durante 8 h, los grupos identificados con el mismo símbolo no son estadísticamente diferentes ($p > 0.05$).

Este resultado indicaría que existe un umbral de contenido de carbonato a partir del cual la degradación acelerada de la hidroxiapatita en condiciones ácidas aumenta significativamente. El proceso de disolución acelerada tiene lugar por protonación del grupo carbonato para formar ácido carbónico y protonación de los grupos fosfato para formar ácido fosfórico como puede observarse en las reacciones 3-1 y 3-2 [18, 19].



La pérdida de peso que experimentan los materiales es la suma de la disolución de grupos fosfato de mayor peso molecular, grupos carbonato e iones de calcio. En principio, la hidroxiapatita carbonatada de bajo contenido y la no sustituida muestran una pérdida de peso similar, lo que puede deberse a la competencia entre un ion de mayor peso molecular y uno que tiene una mayor solubilidad como carbonato, sin embargo, para material de mayor contenido de carbonato la degradación fue mayor debido a que grandes cantidades de carbonato fueron disueltas hacia la solución ácida.

El nivel de pérdida de peso para el material C4-T (6.35 ± 0.63 % en peso) es similar al reportado (5-8% en peso) para un cemento de hidroxiapatita carbonatada con un mayor contenido de carbonato (>11% en peso) y una porosidad abierta cercana al 60%, ensayado bajo las mismas condiciones (solución, tiempo de inmersión y número de muestra) reportadas por Diez-Escudero et al [3]. Este comportamiento muestra la influencia de la inclusión del ion carbonato en la red de hidroxiapatita sinterizada, favoreciendo su degradación y alcanzando valores similares a los obtenidos por injertos óseos convencionales como los cementos CDHAs (hidroxiapatita deficiente en calcio), que han demostrado tener una alta osteointegración [18].

Los resultados de la prueba de degradación a largo plazo Tris-HCl se pueden observar en la Figura 3-10. Contrariamente a los resultados descritos anteriormente sobre la degradación acelerada, las pérdidas de peso de todos los materiales sustituidos son mayores que las del HA-T no sustituido en todos los períodos de tiempo. Además, no existen diferencias claras entre los comportamientos de los tres materiales sustituidos para las etapas iniciales, hasta 30 días de inmersión, sin embargo, para tiempos mayores, las pérdidas de peso del material con mayor contenido de carbonato (C4-T) es significativamente más alta que las de C2-T y C3-T.

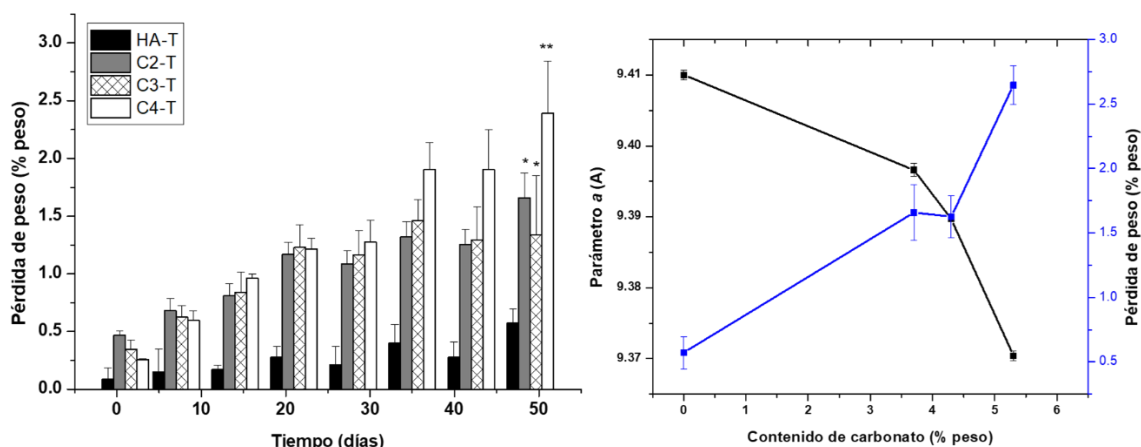


Figura 3-10. Degradación *in vitro* en Tris-HCl para los materiales sinterizados (n=3). Pérdida de peso después de 7 semanas en ambiente fisiológico, los grupos identificados con el mismo símbolo no son estadísticamente diferentes ($p>0.05$).

Lo anterior puede indicar que el contenido de carbonato puede controlar la tasa de degradación y que en cantidades altas del ion (>5 % en peso) permiten una disolución prolongada debido a los gradientes de concentración en las muestras después de largos tiempos de exposición.

La evaluación de la degradación en materiales sinterizados permitió observar la influencia del contenido de carbonato en la solubilidad de la hidroxiapatita, presentando un umbral a partir del cual la degradación en medio ácido aumenta debido a una mayor formación de ácido carbónico y en ambiente fisiológico después de 4 semanas el material con alto contenido de carbonato (>5% en peso) continúa disolviéndose en gran medida hasta las 7 semanas, también relacionado con una disminución del parámetro en la red de hidroxiapatita con inclusión de carbonato (Figura 3-10).

3.3. Conclusiones

- Se sintetizaron polvos de hidroxiapatita carbonatada tipo B mediante síntesis acuosa por el método inverso teniendo como punto de partida la relación molar estequiométrica Calcio/Fósforo y cuyo grado de sustitución fue modulado de acuerdo con la relación molar de los precursores de iones carbonato y fosfato, encontrando que la composición química

de los polvos obtenidos se encuentra en los rangos permitidos para su uso en implantes óseos y contenidos de carbonato similares al hueso biológico.

- La inclusión del ion carbonato genera una distorsión en la red cristalina de la hidroxiapatita, determinando cambios en la morfología y el comportamiento térmico de los mismos de acuerdo con el contenido de carbonato, haciendo necesario el uso de una atmósfera rica en CO_2 que permita la conservación del ion sustituto durante el tratamiento térmico.
- Fue posible evaluar la estabilidad mecánica de piezas sinterizadas con porosidades similares para todos los materiales desarrollados, encontrando que la inclusión del ion carbonato en la estructura cristalina de la hidroxiapatita genera un aumento en la resistencia mecánica estos fosfatos de calcio.
- La estabilidad química en ambientes ácidos y fisiológicos puede ser modulada de acuerdo con el contenido de carbonato mediante los procesos de acidificación y degradación controlada respectivamente, estos mecanismos son acelerados para cantidades elevadas de carbonato superiores al 5% en peso, y podrá favor la osteointegración una vez este tipo de materiales sean utilizados como injertos óseos.

3.4. Referencias

- [1] J.-P. Lafon, Synthèse, stabilité thermique et frittage d'hydroxyapatites carbonatées, (2004).
- [2] I. Ezekiel, S.R. Kasim, Y.M.B. Ismail, A.F.M. Noor, Nanoemulsion synthesis of carbonated hydroxyapatite nanopowders: Effect of variant CO₃²⁻/PO₄³⁻ molar ratios on phase, morphology, and bioactivity, *Ceram Int.* 44 (2018) 13082–13089. <https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2018.04.128>.
- [3] A. Diez-Escudero, M. Espanol, S. Beats, M.P. Ginebra, In vitro degradation of calcium phosphates: Effect of multiscale porosity, textural properties and composition, *Acta Biomater.* 60 (2017) 81–92. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2017.07.033>.
- [4] S. Samavedi, A.R. Whittington, A.S. Goldstein, Calcium phosphate ceramics in bone tissue engineering: a review of properties and their influence on cell behavior., *Acta Biomater.* 9 (2013) 8037–45. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2013.06.014>.
- [5] C. Ortali, I. Julien, M. Vandenhende, C. Drouet, E. Champion, Consolidation of bone-like apatite bioceramics by spark plasma sintering of amorphous carbonated calcium phosphate at very low temperature, *J Eur Ceram Soc.* 38 (2018) 2098–2109. <https://doi.org/10.1016/j.jeurceramsoc.2017.11.051>.
- [6] E.A. Taylor, C.J. Mileti, S. Ganesan, J.H. Kim, E. Donnelly, Measures of Bone Mineral Carbonate Content and Mineral Maturity/Crystallinity for FT-IR and Raman Spectroscopic Imaging Differentially Relate to Physical–Chemical Properties of Carbonate-Substituted Hydroxyapatite, *Calcif Tissue Int.* 109 (2021) 77–91. <https://doi.org/10.1007/s00223-021-00825-4>.
- [7] M. Nakamura, R. Hiratai, T. Hentunen, J. Salonen, K. Yamashita, Hydroxyapatite with High Carbonate Substitutions Promotes Osteoclast Resorption through Osteocyte-like Cells, *ACS Biomater Sci Eng.* 2 (2016) 259–267. <https://doi.org/10.1021/acsbiomaterials.5b00509>.
- [8] A. El Yacoubi, A. Massit, S. El Moutaouikel, A. Rezzouk, B. Chafik El Idrissi, Rietveld Refinement of the Crystal Structure of Hydroxyapatite Using X-ray Powder Diffraction, *American Journal of Materials Science and Engineering.* 5 (2017) 1–5. <https://doi.org/10.12691/ajmse-5-1-1>.
- [9] H. Madupalli, B. Pavan, M.M.J. Tecklenburg, Carbonate substitution in the mineral component of bone: Discriminating the structural changes, simultaneously imposed by carbonate in A and B sites of apatite, *J Solid State Chem.* 255 (2017) 27–35. <https://doi.org/10.1016/j.jssc.2017.07.025>.
- [10] S. Marković, L. Veselinović, M.J. Lukić, L. Karanović, I. Bračko, N. Ignjatović, D. Uskoković, Synthetical bone-like and biological hydroxyapatites: A comparative study of crystal structure and morphology, *Biomedical Materials.* 6 (2011). <https://doi.org/10.1088/1748-6041/6/4/045005>.
- [11] C. Ortali, I. Julien, C. Drouet, E. Champion, Influence of carbonation on the low-temperature consolidation by Spark Plasma Sintering of carbonated calcium phosphate bioceramics, *Ceram Int.* 46 (2020) 5799–5810. <https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2019.11.030>.
- [12] M. Fleet, *Carbonated Hydroxyapatite*, CRC Press, 2015.
- [13] I. Ezekiel, S.R. Kasim, Y.M.B. Ismail, A.F.M. Noor, Nanoemulsion synthesis of carbonated hydroxyapatite nanopowders: Effect of variant CO₃²⁻/PO₄³⁻ molar ratios on phase,

- morphology, and bioactivity, *Ceram Int.* 44 (2018) 13082–13089. <https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2018.04.128>.
- [14] I. Karacan, N. Cox, A. Dowd, R. Vago, B. Milthorpe, S. Cazalbou, B. Ben-Nissan, The synthesis of hydroxyapatite from artificially grown Red Sea hydrozoan coral for antimicrobial drug delivery system applications, *Journal of the Australian Ceramic Society.* 10 (2021). <https://doi.org/10.1007/s41779-020-00554-1>.
- [15] Z.Z. Zyman, D. V. Rokhmistrov, V.I. Glushko, I.G. Ivanov, Thermal impurity reactions and structural changes in slightly carbonated hydroxyapatite, *J Mater Sci Mater Med.* 20 (2009) 1389–1399. <https://doi.org/10.1007/s10856-009-3706-4>.
- [16] E. Champion, Sintering of calcium phosphate bioceramics, *Acta Biomater.* 9 (2013) 5855–5875. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2012.11.029>.
- [17] Z. Zyman, M. Tkachenko, CO₂ gas-activated sintering of carbonated hydroxyapatites, *J Eur Ceram Soc.* 31 (2011) 241–248. <https://doi.org/10.1016/j.jeurceramsoc.2010.09.005>.
- [18] S.C. Wu, H.C. Hsu, S.K. Hsu, F.W. Lin, W.F. Ho, Preparation and characterization of porous calcium-phosphate microspheres, *Ceram Int.* 41 (2015) 7596–7604. <https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2015.02.084>.
- [19] C.R. Hankermeyer, K.L. Ohashi, D.C. Delaney, J. Ross, B.R. Constantz, Dissolution rates of carbonated hydroxyapatite in hydrochloric acid, *Biomaterials.* 23 (2002) 743–750. [https://doi.org/10.1016/S0142-9612\(01\)00179-X](https://doi.org/10.1016/S0142-9612(01)00179-X).

4. Elaboración de compuestos de hidroxiapatita carbonatada tipo B/quitosano como plataformas de crecimiento celular

La finalidad de una plataforma de crecimiento celular es sustituir al hueso mientras facilita la colonización por células osteoblásticas y ser finalmente reabsorbida [1]. La estrategia utilizada para alcanzar dichos objetivos es la generación de plataformas porosas, para lo cual en este capítulo se empleó NaCl como agente porogénico mezclándolo con polvos de hidroxiapatita carbonatada C4, los cuales presentaron los mejores resultados en cuanto a estabilidad mecánica y degradación en ambiente ácido y fisiológico simulado. La mezcla C4/NaCl fue procesada de manera similar a los polvos del capítulo 3 y el agente porogénico fue retirado del material sinterizado mediante lixiviación en agua. Las piezas porosas fueron caracterizadas para determinar el efecto de los poros en el comportamiento mecánico y químico de la hidroxiapatita. Por último, se realizó la infiltración de un polímero como el quitosano mediante capilaridad asistida por vacío con el fin de empearlo como vehículo para una posterior carga y liberación de antibiótico, lo que busca prevenir la aparición de enfermedades postoperatorias como la osteomielitis.

4.1. Materiales y métodos

4.1.1. Interacción hidroxiapatita carbonatada/NaCl

La interacción entre el agente porogénico y la hidroxiapatita carbonatada se evaluó preliminarmente con el fin de establecer la posible formación de líquido durante la sinterización. Los tratamientos térmicos han de tener lugar a temperaturas inferiores a la temperatura de fusión del NaCl (801°C), pero la temperatura de formación de líquido en el sistema multicomponente NaCl-hidroxiapatita tendrá lugar a temperaturas inferiores, debido al aumento de la entropía en el sistema bifásico [2]. Por ello, se realizaron estudios previos de formación de líquido a la temperatura propuesta para la sinterización, 750°C. Para asegurar el contacto íntimo entre el NaCl y el polvo C4 y, con ello, las posibilidades de reacción, se empleó NaCl con tamaño de partícula inferior a 45 µm y se mezcló con los polvos de C4 en proporción 30/70% en peso respectivamente, se prensaron discos y se sinterizaron a la temperatura de tratamiento térmico, posteriormente mediante microscopia electrónica de barrido se analizó la morfología de superficies de fractura y las fases presentes fueron determinadas mediante difracción de rayos X.

4.1.2. Obtención de estructuras porosas

En la fabricación de plataformas de crecimiento celular porosas se empleó como agente porogénico cloruro de sodio comercial (NaCl, Merck®, Alemania), el cual fue clasificado entre 200 y 400 µm serie Tyler, con el fin de generar poros con un tamaño suficiente para interactuar con células osteoblásticas, las cuales pueden llegar a tener tamaños entre 100-500 µm [3].

La mezcla de partículas de NaCl con polvos de hidroxiapatita carbonata (C4) fue realizada en seco, asistida con un macerador cerámico con el fin de generar una mayor cohesión entre los dos materiales, en esta etapa se seleccionó un 30% en peso de NaCl (C4-30), ya que proporciones superiores generaban inestabilidad mecánica de las plataformas y cantidades inferiores no generaban la cantidad suficiente de poros que permitiera una red interconectada. El método de conformado y el tratamiento térmico empleado para fabricación de piezas fue similar al descrito en el numeral 3.1.2 del capítulo 3 para el material C4-T (tratado térmicamente a 750°C).

La etapa final del conformado de estructuras porosas consistió en la eliminación del agente porogénico mediante la lixiviación del NaCl en agua destilada a una temperatura de 80°C durante 4h. Posteriormente, los cuerpos porosos obtenidos fueron secados a 80°C hasta obtener peso constante.

4.1.3. Caracterización fisicoquímica, mecánica y estabilidad química de estructuras porosas

La determinación de las fases cristalinas se realizó mediante difracción de rayos X, con el fin de asegurar la correcta eliminación del agente porogénico durante la lixiviación. Las piezas porosas se caracterizaron en términos de la resistencia mecánica y degradación *in vitro*, todos estos procedimientos fueron llevados a cabo de manera similar y con los equipos descritos en los numerales 3.1.3-3.1.5 del capítulo 3.

4.1.4. Infiltración de quitosano en estructuras porosas cerámicas

Una vez realizada la selección de la configuración de porosidad, se procedió a diseñar la infiltración del quitosano para esto se utilizó el método empleado por Rajesh et. Al [4], el cual se representa en la Figura 4-1. En el primer paso se emplea como solvente una solución de ácido acético al 1% en volumen/volumen, la cual fue calentada hasta 70°C para adicionar posteriormente el quitosano (Chitosan, medium molecular weight, 448877, Aldrich, Germany), en esta etapa se realizó una disolución de 3% en peso/volumen, la cual tuvo un tiempo de disolución de 4h y se dejó reposar durante toda la noche a temperatura ambiente. En el segundo paso, discos de 6 mm de diámetro y 4 mm de altura fueron sumergidos en 10 ml de la solución viscosa de quitosano para comenzar la infiltración, este proceso inicialmente se produce de manera espontánea mediante el ingreso de la solución en la plataforma porosa por capilaridad hasta extraer el aire atrapado en los poros más grandes y superficiales. Posteriormente, en el tercer paso, se utilizó una cámara de vacío con el fin de llenar los poros más pequeños y alejados de la superficie, la infiltración asistida con vacío se realizó durante 15 min.

Finalmente, la etapa final consistió en un sumergir la plataforma infiltrada en una base fuerte (NaOH 1M) para neutralizar el exceso de solvente, seguido por un lavado con agua desionizada y secado a temperatura ambiente. La plataforma de crecimiento celular infiltrada con quitosano se ha denominado con la nomenclatura C4 30-Q.

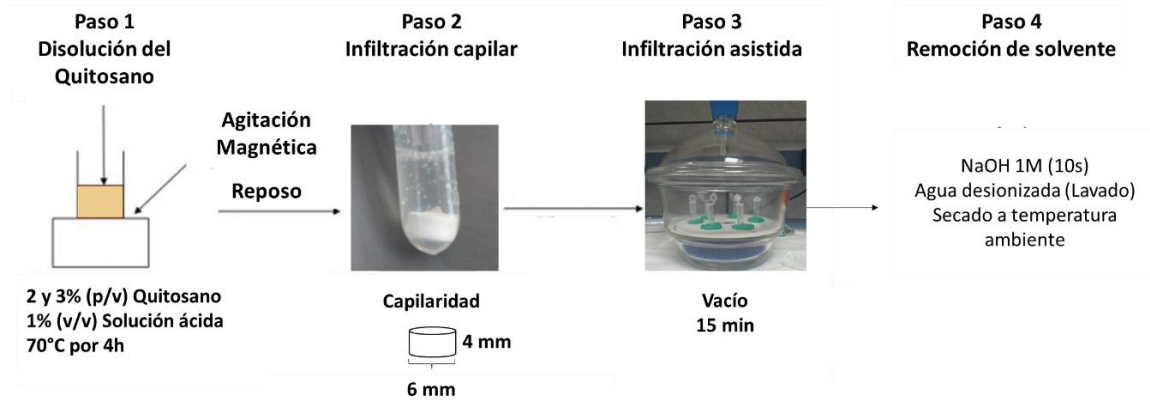


Figura 4-1. Proceso de infiltración de quitosano

4.1.5. Evaluación de plataformas de crecimiento celular hidroxiapatita carbonatada/quitosano

El quitosano empleado para realizar la infiltración fue caracterizado por medio de un espectrómetro infrarrojo con transformada de Fourier (FTIR, IR Tracer, Shimadzu, Japan), con el cual se analizaron las bandas características de este polímero. La estabilidad química de las plataformas infiltradas se realizó con los procedimientos descritos en el numeral 3.1.5 del capítulo 3.

4.2. Resultados y discusión

4.2.1. Interacción hidroxiapatita carbonatada/NaCl

La microestructura de los compactos sinterizados de C4-T/NaCl (<math><45\mu\text{m}</math>) revelada por las superficies de fractura de se presenta en la Figura 4-2. Se observa la distribución de las partículas del NaCl en la matriz de hidroxiapatita carbonatada C4-T (Figura 4-2a), las cuales conservan su morfología, con aristas y ángulos bien definidos. No se observa la formación de una zona de reacción en las fronteras entre la matriz cerámica y las partículas de NaCl (Figura 4-2b). Estos hechos indican que, al menos de forma generalizada, no ha tenido lugar la formación de líquido.

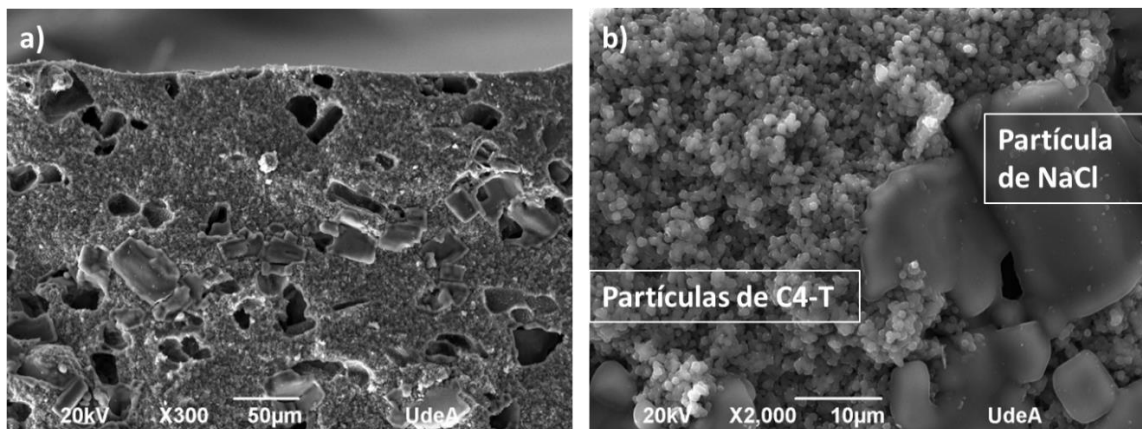


Figura 4-2. Superficie de fractura de mezclas C4-T/NaCl para formación de líquido. Imágenes adquiridas a, a) 300 aumentos, b) 2000 aumentos

Los espectros de difracción de rayos X de la mezcla NaCl (<45 μm) y polvo de C4 sinterizada presentados en la Figura 4-3, muestran la presencia de sólo dos fases correspondientes a la hidroxiapatita (PDF 9-432) y al NaCl (PDF 98-001-8189), los cuales presentan una coincidencia en los picos de mayor intensidad para las dos fases cerca de un ángulo 2θ de 32° , los cuales corresponde a la orientación (211) para la hidroxiapatita y a la orientación (002) para el NaCl, debido a esta coincidencia se realizó una ampliación en el intervalo entre los ángulos de 40° - 60° , en el cual se pueden diferenciar los picos de estas dos fases cristalinas y servirá para establecer la efectividad de la remoción del NaCl luego de la lixiviación.

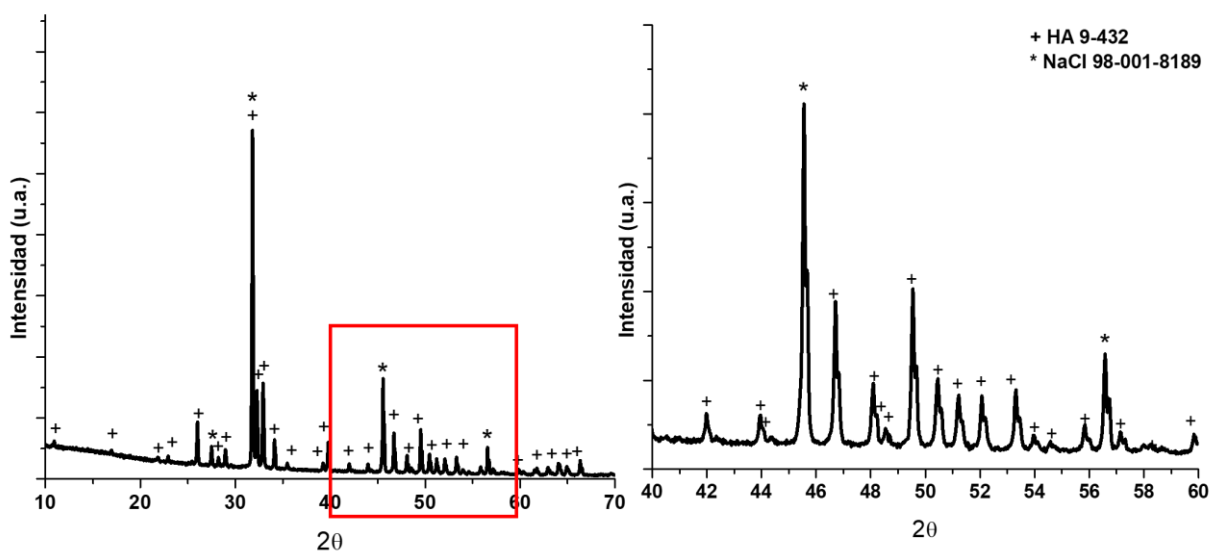


Figura 4-3. Espectro de difracción de rayos X de mezcla C4/NaCl

4.2.2. Caracterización de estructuras porosas

La eficiencia de la eliminación del NaCl durante el proceso de lixiviación fue realizada mediante el análisis de las fases cristalinas presentes en las plataformas de crecimiento fabricadas. En la Figura 4-4 se observa que en el espectro de difracción sólo se identifica la fase de hidroxiapatita y los picos en ángulos 2θ cercanos a 46° y 57° correspondientes al NaCl han desaparecido si se comparan con la ampliación del difractograma de la Figura 4-3.

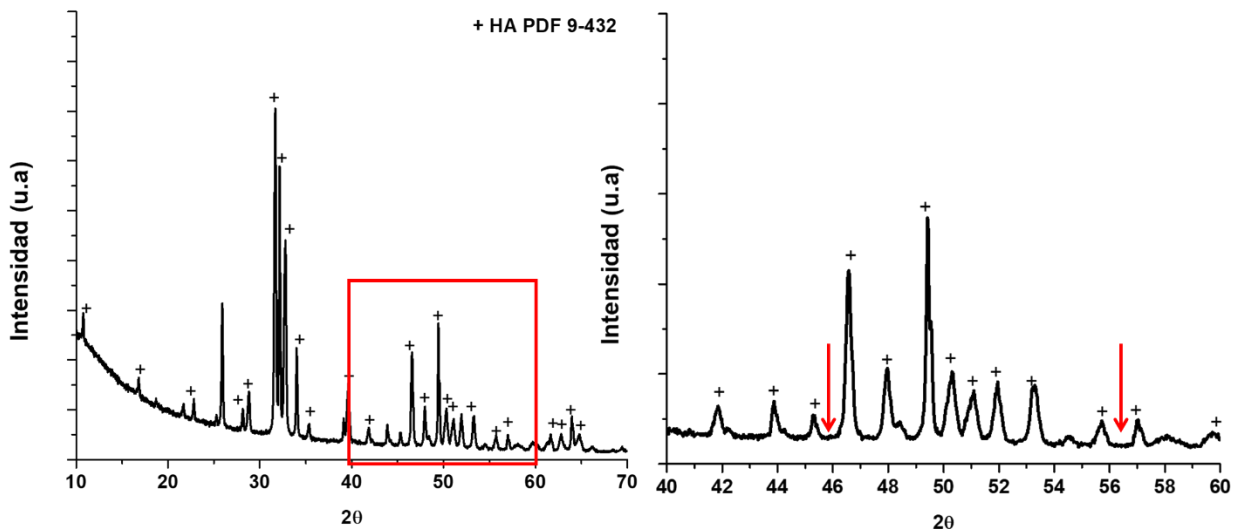


Figura 4-4. Espectro de difracción de rayos X de C4-30 luego de la lixiviación.

La morfología, distribución e interconexión de los poros obtenidos se obtuvo por medio de imágenes de microscopía electrónica de barrido presentadas en la Figura 4-5. Los poros obtenidos conservan la geometría cúbica característica de las partículas de NaCl, además se encuentran parcialmente interconectados, como se señala en la Figura 5a, debido al contacto entre partículas de NaCl durante el proceso de conformación, donde se crean canales por aire atrapado entre partículas de NaCl que nos llenadas por la Hidroxiapatita carbonatada durante el prensado [5]. Las dimensiones de los poros se corresponden con los tamaños de las partículas de NaCl (200-400 μm) empleadas para la mezcla previo al proceso de conformado.

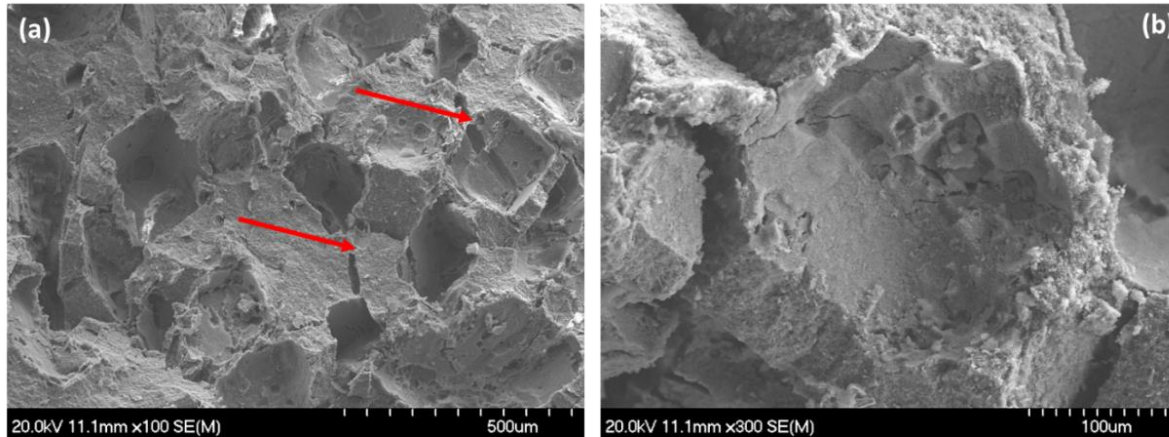


Figura 4-5. Morfología de las estructuras porosas después de la lixiviación, Imágenes adquiridas a, a) 100 aumentos y b) 300 aumentos.

La estabilidad mecánica de las plataformas de crecimiento celular porosas determinada mediante compresión uniaxial presentó una disminución cercana al 72% respecto al material denso, como se presenta en la Tabla 4-1, debido a la presencia de poros en la microestructura de la hidroxiapatita carbonatada, lo cual es un comportamiento típico en el comportamiento mecánico de los materiales debido a la actuación de los poros como defectos críticos. En el caso de la hidroxiapatita, por ejemplo, Indra et al. [6] encontraron una disminución del 50% en la resistencia a la compresión cuando se generaba una porosidad del 30%, usando polimetilmetacrilato (PMMA) como agente porogénico. Los resultados obtenidos para la hidroxiapatita carbonatada con 30% de NaCl como precursor (C4-30), se encuentran dentro de los valores reportados para el componente esponjoso del hueso humano (2-12 MPa [7]), lo cual se espera que permita tener la resistencia suficiente mientras se llevan a cabo los procesos de reabsorción naturales en la regeneración ósea.

Tabla 4-1. Estabilidad mecánica de estructuras porosas

Material	Resistencia a la compresión uniaxial \pm D.E. MPa
C4-T	12 \pm 1
C4-30	3.4 \pm 0.4

Los resultados de degradación obtenidos de los ensayos *in vitro* en ambiente ácido y fisiológico simulado de las plataformas de crecimiento celular se compararon con los obtenidos para la C4-T en el capítulo anterior. En la Figura 4-6 puede observarse un incremento en la pérdida de peso de la hidroxiapatita carbonatada producto de la porosidad generada con el NaCl, la inclusión de los poros conlleva una mayor área expuesta y por lo tanto se facilita el proceso de protonación de los grupos carbonato y fosfato en la degradación acelerada tal y como se demostró mediante las reacciones 3-1 y 3-2 del capítulo 3 [8, 9]. En cuanto a la degradación a largo plazo, el incremento en

la pérdida de peso es notorio desde el primer día de exposición, lo cual promoverá los procesos de disolución/precipitación que benefician la interacción con células osteoblásticas.

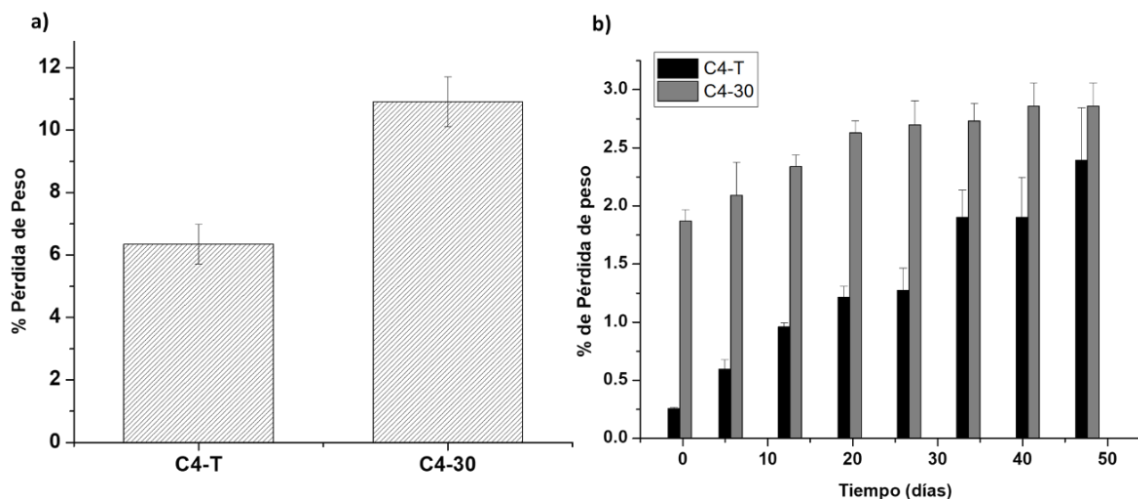


Figura 4-6. Ensayos de degradación de plataformas de crecimiento celular C4-T (hidroxiapatita carbonatada sinterizada), C4-30 (hidroxiapatita carbonatada porosa sinterizada), a) Degradación acelerada (n=3), b) Degradación *in vitro* en Tris-HCl (n=3)

4.2.3. Infiltración de quitosano en plataformas de crecimiento celular

En la Figura 4-7 se presenta la caracterización mediante FTIR del quitosano empleado para la infiltración, se puede observar una banda fuerte en la región $3291-3610\text{ cm}^{-1}$ corresponde al estiramiento de N-H y O-H, así como a los enlaces de hidrógeno intramoleculares. Las bandas de absorción alrededor de 2921 y 2877 cm^{-1} se pueden atribuir al estiramiento simétrico y asimétrico de C-H, respectivamente, estas bandas son características típicas de los polisacáridos. La banda de a 1153 cm^{-1} se puede atribuir al estiramiento asimétrico del puente C-O-C. Las bandas a 1066 y 1028 cm^{-1} corresponden al estiramiento CO [10].

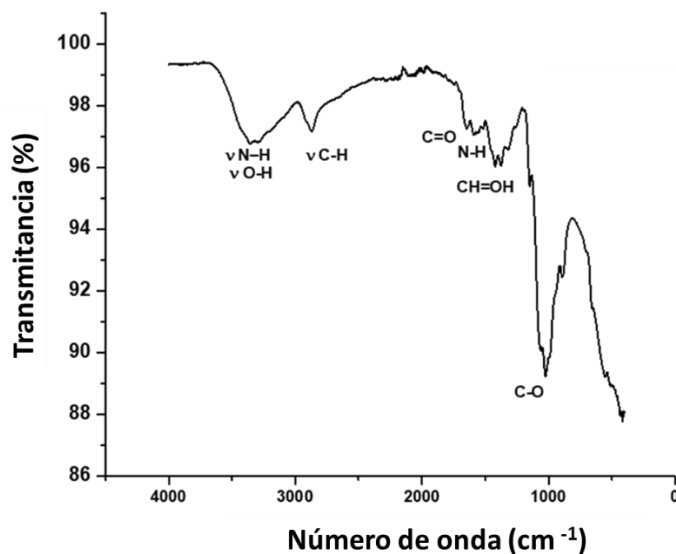


Figura 4-7. Espectro FTIR del quitosano comercial

Los resultados de degradación obtenidos de los ensayos *in vitro* en ambiente acelerado y fisiológico de las plataformas de crecimiento celular se compararon con los obtenidos para la C4-T y C4-30 en la Figura 4-8. En ambos ensayos ocurrió un leve incremento en la pérdida de peso las plataformas infiltradas, debido a que el quitosano también interactúa con los fluidos simulados generando mecanismos de disolución/erosión y por ende pérdida de peso, de acuerdo con lo reportado en la literatura, el primer proceso que se lleva a cabo es la disolución promovido por el hinchamiento que sufre el polímero debido a que su parte hidrofílica es capaz de absorber gran cantidad de fluido, una vez se supera esta capacidad es superada, se comienza a presentar erosión del material [11]. Estos dos procesos son claves en la manera que será liberado el antibiótico una vez sea cargado en las plataformas, los cuales serán analizados en el próximo capítulo con el fin de establecer si las plataformas de crecimiento celular porosas de hidroxiapatita carbonatada infiltradas con quitosano tienen la capacidad de albergar y liberar posteriormente un antibiótico.

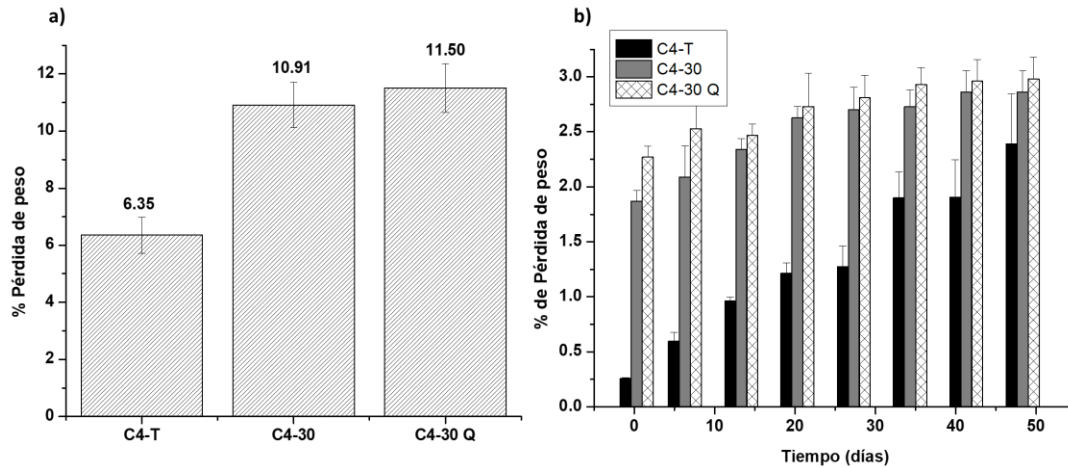


Figura 4-8. Ensayos de degradación de plataformas de crecimiento celular C4-T (hidroxiapatita carbonatada sinterizada), C4-30 (hidroxiapatita carbonatada porosa sinterizada) y C4 30-Q (hidroxiapatita carbonatada porosa e infiltrada con quitosano), a) Degradación acelerada (n=3), b) Degradación *in vitro* en Tris-HCl (n=3)

4.3. Conclusiones

- Se elaboraron estructuras porosas de hidroxiapatita carbonatada con el fin de promover los mecanismos de reabsorción e interacción con células osteoblástica, para esto se empleó NaCl como agente porogénico, el cual generó una red de poros cúbicos interconectados con tamaños entre 200-400 μm . El uso del agente porogénico no generó fases secundarias durante los tratamientos térmicos realizados y fue posible su eliminación completa mediante un proceso de lixiviación, asegurando la fabricación de plataformas de crecimiento de celular de hidroxiapatita carbonatada sin residuos.
- Las plataformas de crecimiento celular de hidroxiapatita carbonatada presentaron una disminución en la resistencia mecánica a la compresión debido a la red de poros generados, sin embargo, siguen presentando valores acordes con los reportados para huesos biológicos, lo que brindaría estabilidad mecánica mientras se llevan a cabo los procesos de reabsorción, los cuales se verán favorecidos por el incremento en la velocidad de degradación de las plataformas en comparación a materiales sin poros.
- Se realizó de forma efectiva la infiltración de quitosano en las plataformas de crecimiento celular, el cual permitirá la posterior carga y liberación de antibióticos que prevengan la formación de enfermedades postoperatorias como la osteomielitis causada por la adhesión de bacterias sobre los sustitutos óseos.

4.4. Referencias

- [1] S. V. Dorozhkin, Calcium Orthophosphate (CaPO₄) Scaffolds for Bone Tissue Engineering Applications, *Journal of Biotechnology and Biomedical Science*. 1 (2018) 25–93. <https://doi.org/10.14302/issn.2576-6694.jbbs-18-2143>.
- [2] T. V. Safronova, V.I. Putlyayev, A. V. Knotko, Y.Y. Filippov, E.S. Klimashina, A.P. Ryzhov, B.M. Saidzhonov, Powder Mixtures Based on Calcium Hydroxyapatite and Sodium Salts, *Inorganic Materials: Applied Research*. 9 (2018) 726–731. <https://doi.org/10.1134/S2075113318040342>.
- [3] S. Tajvar, A. Hadjizadeh, S.S. Samandari, Scaffold degradation in bone tissue engineering: An overview, *Int Biodeterior Biodegradation*. 180 (2023) 105599. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2023.105599>.
- [4] K. Rajesh, M.K. Rangaswamy, C. Zhang, S. Haldar, M. Kumarasamy, A. Agarwal, P. Roy, D. Lahiri, Surface Modified Metallic Orthopedic Implant for Sustained Drug Release and Osteocompatibility, *ACS Appl Bio Mater*. 2 (2019) 4181–4192. <https://doi.org/10.1021/acsabm.9b00443>.
- [5] T. Zhang, K. Li, Y. Zhu, Micro-Channels in Porous Aluminum Fabricated by NaCl Space Holder Method, *Transactions of the Indian Institute of Metals*. 75 (2022) 2061–2068. <https://doi.org/10.1007/s12666-022-02593-7>.
- [6] A. Indra, F. Hadi, I.H. Mulyadi, J. Affi, Gunawarman, A novel fabrication procedure for producing high strength hydroxyapatite ceramic scaffolds with high porosity, *Ceram Int*. 47 (2021) 26991–27001. <https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2021.06.112>.
- [7] B.P. Mahammad, E. Barua, P. Deb, A.B. Deoghare, K.M. Pandey, Investigation of Physico-mechanical Behavior, Permeability and Wall Shear Stress of Porous HA/PMMA Composite Bone Scaffold, *Arab J Sci Eng*. 45 (2020) 5505–5515. <https://doi.org/10.1007/s13369-020-04467-w>.
- [8] S.C. Wu, H.C. Hsu, S.K. Hsu, F.W. Lin, W.F. Ho, Preparation and characterization of porous calcium-phosphate microspheres, *Ceram Int*. 41 (2015) 7596–7604. <https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2015.02.084>.
- [9] C.R. Hankermeyer, K.L. Ohashi, D.C. Delaney, J. Ross, B.R. Constantz, Dissolution rates of carbonated hydroxyapatite in hydrochloric acid, *Biomaterials*. 23 (2002) 743–750. [https://doi.org/10.1016/S0142-9612\(01\)00179-X](https://doi.org/10.1016/S0142-9612(01)00179-X).
- [10] Z. Mohammadi, A.S.M. Mesgar, F. Rasouli-Disfani, Reinforcement of freeze-dried chitosan scaffolds with multiphasic calcium phosphate short fibers, *J Mech Behav Biomed Mater*. 61 (2016) 590–599. <https://doi.org/10.1016/j.jmbbm.2016.04.022>.
- [11] R. Parhi, Chitin and Chitosan in Drug Delivery, 2019.

5. Evaluación de la interacción celular y liberación de antibióticos de plataformas de crecimiento celular de hidroxiapatita carbonatada tipo B/quitosano

El objetivo de este capítulo es evaluar la interacción de las plataformas de hidroxiapatita carbonatada tipo B/quitosano con células osteoblásticas. La evaluación consistió en determinar si las plataformas pueden promover los procesos de reabsorción y regeneración ósea luego de una implantación. Las pruebas empleadas permitieron establecer comportamientos en cuanto a viabilidad (MTT), proliferación (Alamar Blue) y adhesión superficial. Adicionalmente, con el fin de establecer la capacidad de las plataformas de crecimiento celular de albergar y liberar antibióticos, se adicionó sulfato de gentamicina durante el procesamiento de infiltración de quitosano descrito en el capítulo 4. Posteriormente, se determinó la liberación del antibiótico en solución tampón salina con fosfato (PBS) en condiciones fisiológicas. Finalmente, se evaluó la capacidad de inhibir la adhesión de bacterias como el Estafilococo Aureus (*S. aureus*) mediante el halo generado alrededor de las plataformas de crecimiento celular una vez entran en contacto con el cultivo bacteriano.

5.1. Materiales y métodos

5.1.1. Evaluación de la interacción celular de las plataformas de crecimiento celular

En los análisis de interacción celular se emplearon discos de 6 mm de diámetro de diferentes materiales (Tabla 5-1), preparados de acuerdo con los procesos optimizados descritos en los capítulos 3 y 4. El objeto de este estudio fue determinar la influencia del ion carbonato (HA-T y C4-T), los poros (C4-30) y la infiltración de quitosano (C4-Q) en la interacción celular de la hidroxiapatita carbonatada. Como control negativo se emplearon discos Thermanox® (TMX, NUNC). Se define como control negativo un material diseñado para tener 100% de viabilidad celular (0% de toxicidad), buena proliferación y adhesión celular.

Tabla 5-1. Materiales evaluados en ensayos de interacción celular

Material	Descripción	Caracterización
HA-T	Material sin carbonato	Capítulo 3, numeral 3.2.2
C4-T	Material con sustitución tipo B	
C4-30	Material con estructura porosa	Capítulo 4, numerales 4.2.2 y 4.2.3
C4-Q	Material poroso infiltrado con quitosano	

Debido a las aplicaciones propuestas para este tipo de materiales, se ha escogido el cultivo primario de osteoblastos fetales humanos, subcultivo 4 (HOb; Health Protection Agency Culture Collections - HPAC- 406-05f) (Figura 5-1), de acuerdo con los protocolos de la Unidad de Investigación Clínica y Biopatología Experimental. Unidad Asociada al CSIC. Servicio de Anatomía Patológica. Complejo Asistencial de Ávila. SACYL. Jesús del Gran Poder 42.



Figura 5-1. Osteoblastos humanos en cultivo (subcultivo 4) transcurridas 48 h desde su siembra, observados con microscopio invertido de contraste de fases (Nikon ECLIPSE TS100; 200X).

El mantenimiento de esta línea celular se llevó a cabo realizando el subcultivo antes de alcanzar el 80-90% de la confluencia, transcurrido un periodo de entre 4 y 5 días después de realizar la siembra, utilizando una disolución de tripsina (0.5 g/l) y ácido etilendiaminotetracético (EDTA; 0.2 g/l) en una solución salina balanceada de Hank [1], para liberar las uniones intercelulares y las de las células con la superficie de cultivo. En los ensayos de interacción celular se emplearon los siguientes medios de cultivo y otros reactivos:

- Medio de cultivo DMEM/F12 HAM 1:1 + GLUTAMAX™ (GIBCO 31331-028), suplementado con penicilina/estreptomicina (SIGMA P0781) y suero fetal bovino (GIBCO 10270-098).
- Medio de cultivo DMEM/F12 HAM 1:1 sin rojo fenol (GIBCO 11039-021), suplementado con penicilina/estreptomicina (SIGMA P0781).
- Solución salina de Dulbecco tamponada con fosfato (PBS, SIGMA D8537).
- Disolución de tripsina (0.5 g/l) y ácido etilendiaminotetracético (EDTA; 0.2 g/l) en una solución salina balanceada de Hank (Tripsina-EDTA; SIGMA).
- Discos de 15 mm diámetro TMX (Thermanox®, NUNC).
- Triton X-100 (MERCK).
- Bromuro de 3-(4.5-dimetiltiazol-2-il)2-5 difeniltetrazolio (reactivo MTT; SIGMA).
- Dimetil sulfóxido (DMSO; SHARLAU).
- Reactivo Alamar Blue™ (AB, SEROTEC).
- Disolución al 2.5% de glutaraldehído (FLUKA) en tampón sodio cacodilato 0.1 M (SIGMA).

5.1.1.1. Ensayo MTT para la cuantificación de la citotoxicidad *in vitro*.

Con el objetivo de analizar la liberación de productos tóxicos, se ha realizado un ensayo MTT [2], [3]. El ensayo consta de las siguientes fases:

- Obtención de los eluyentes o lixiviados de los materiales en medio de cultivo completo sin suero a 1, 2 y 7 días, tras mantener las muestras a 37 °C y en agitación durante estos tiempos. Se han empleado 5 ml de medio por cada muestra. Las muestras se esterilizan con óxido de etileno.
- Siembra de células, utilizando medio de cultivo completo fresco, a una concentración de 4×10^4 células/ml, sobre placas de 96 pocillos (100 μ l de concentrado de células/pocillo).
- Incubación 24 h a 37 °C y una atmósfera con un 5% de CO₂.
- Intercambiar el medio de cultivo por los lixiviados de los materiales, previamente recogidos a 1, 2 y 7 días (n=16). El tamaño muestral es de 16 (16 pocillos para cada lixiviado a cada tiempo), a pesar de que todos los lixiviados se han obtenido a partir de dos muestras (8 de cada uno de ellos).
- Incubación 24 h a 37 °C y una atmósfera con un 5 % de CO₂.
- Retirar el contenido de los pocillos, añadiendo en su lugar el reactivo MTT.
- Incubación 4 h a 37 °C y una atmósfera con un 5% de CO₂.
- Retirar el contenido de los pocillos y añadir 100 μ l de DMSO/pocillo.
- Lectura, con agitación de 20 s a elevada intensidad, de densidad óptica a 570 nm, con una longitud de onda de referencia de 630 nm.
- A los valores de absorbancia obtenidos se les van a restar los valores medidos para el blanco, y se van a relativizar con respecto a los valores leídos para el control TMX, obteniendo la viabilidad celular relativa (%VR) con respecto a este control, a partir de la siguiente fórmula:

$$\%VR = \frac{DO_S - DO_B}{DO_C - DO_B} \times 100 \quad [5-1]$$

donde, DO_S, DO_B y DO_C son las medidas de densidad óptica de la muestra, el blanco (medio de cultivo introducido en pocillos sin células) y el control, respectivamente.

5.1.1.2. Ensayo Alamar Blue™. Análisis de la adhesión y proliferación celular sobre la superficie de los materiales.

El objetivo de este ensayo es estudiar la evolución temporal de la proliferación celular, durante un periodo de 21 días, en cultivos establecidos directamente sobre la superficie de los materiales

mediante la utilización del reactivo *Alamar Blue* [4], [5]. Este ensayo permite realizar diferentes medidas de actividad celular a lo largo de un periodo de tiempo, debido a que el reactivo utilizado no resulta tóxico para las células cultivadas en contacto con el mismo.

La actividad celular tiene como resultado la reducción del reactivo adicionado que vira de color, hecho que puede medirse colorimétricamente.

En primer lugar, se ha realizado la siembra de células, a una concentración de 4×10^4 células/ml en medio de cultivo completo fresco, sobre muestras esterilizadas con óxido de etileno, en placas de 96 pocillos (200 μ l de concentrado de células/pocillo). Después de incubar estas placas durante 24 h a 37 °C en una atmósfera con un 5% de CO₂ se ha retirado el medio de cultivo, se han lavado las muestras con PBS, y se ha añadido en su lugar una disolución al 10% del reactivo *Alamar Blue* en medio completo libre de rojo fenol (200 μ l/pocillo), que se ha mantenido en contacto con los cultivos durante 4 h a 37 °C en una atmósfera con un 5% de CO₂. Transcurrido este tiempo, se ha trasvasado el contenido de los pocillos a otra placa de 96 pocillos (100 μ l/pocillo; n=4), reponiendo medio completo fresco en las placas inicialmente sembradas (200 μ l/pocillo). Por último, se ha realizado una lectura de densidad óptica en un espectrofotómetro Biotek ELX808IU a 570 nm, con una longitud de onda de referencia de 630 nm, de las muestras, restando los valores de absorbancia medidos para el blanco a los valores obtenidos para las distintas muestras.

5.1.1.3. Análisis de los cultivos establecidos sobre la superficie de los materiales con microscopía electrónica de barrido.

La adhesión de las células sobre la superficie de los materiales fue determinada aplicando el siguiente protocolo:

- Siembra de células (n=1) en medio de cultivo completo fresco (4×10^4 células/ml) sobre las muestras introducidas en placas de 96 pocillos (200 μ l/pocillo).
- Incubación 24 h y 72h a 37 °C en una atmósfera con un 5% de CO₂.
- Extracción del medio de cultivo, adicionando en su lugar 1 ml por pocillo de una disolución al 2.5% de glutaraldehído (Fluka) en tampón sodio cacodilato 0.1 M (Sigma).
- 4 h a temperatura ambiente en oscuridad (posteriormente las muestras se han conservado en oscuridad a 4 °C).
- 2 lavados con agua destilada estéril y secado de las muestras a 37 °C.
- Recubrimiento con oro (película de 10nm) y observación con microscopio electrónico de barrido (Hitachi TM1000 Tabletop).

5.1.2. Liberación de antibióticos

La capacidad de las plataformas de hidroxiapatita carbonatada/quitosano de albergar y liberar antibióticos fue evaluada utilizando como principio activo gentamicina en forma de sulfato comercial (Gentamicin sulfate G1914, Sigma Aldrich®), el cual tiene un amplio espectro de actividad antibiótica tanto para bacterias gram-negativas como gram-positivas [6], en este último grupo se clasifica el *Staphylococcus aureus* [7], cuya su adhesión es necesario evitar en etapas tempranas de implantación para prevenir la aparición de Osteomielitis [8].

La incorporación del antibiótico en el quitosano fue realizada durante su etapa de disolución de acuerdo con lo descrito en el numeral 4.1.4 del capítulo 4 para la infiltración del polímero. Una vez terminado el periodo de reposo del quitosano disuelto en la solución ácida y previo a la infiltración, se disolvió el sulfato de gentamicina mediante agitación magnética, en este caso se realizó una relación de una parte de antibiótico por tres partes de quitosano (1 a 3), esta relación fue seleccionada debido a que experimentalmente se encontró como la mayor cantidad de antibiótico capaz de disolverse por completo en la solución de quitosano. En promedio las discos de 6 mm de diámetro y 4 mm de espesor fueron cargados con 2-3 mg de antibiótico.

La liberación de la gentamicina fue determinada mediante la inmersión de las plataformas de crecimiento celular en 5 mL de una solución tampón salina con fosfato (PBS Tablets, Merck®), luego de periodos de tiempo de 1, 4, 24, 72 y 168h, 1 mL de la solución fue retirada para analizar el contenido de azufre por medio de un Espectrómetro de Emisión con fuente de Plasma de Acoplamiento Inductivo (ICP-OES, Agilent 720, Estados Unidos). En cada intervalo de tiempo se realizó la reposición del volumen retirado con PBS fresco. Luego del ensayo de liberación se observó la superficie de la muestra C4-QG mediante microscopia electrónica de barrido con emisión de campo (FE-SEM Hytachi S-4700 tipo I, Japón), las piezas fueron recubiertas con oro

5.1.3. Ensayos de inhibición bacteriana

Se determinó la actividad de los materiales en la inhibición del crecimiento de *Staphylococcus aureus* (ATCC®29213™). En Agar Luria Bertani (Becton Dickinson) a 37 °C se adicionó una solución con una concentración de 1×10^{-6} bacterias/mL, se homogenizó y se sirvieron en cajas de Petri; seguidamente se colocó el material en el centro de la caja y se dejó en cabina de flujo hasta su gelificación. Se incubó durante 18h a 37 °C. El ensayo fue realizado por triplicado (n=3).

Después de la incubación, se examinó cada placa y se visualizó la presencia de colonias crecidas sobre la superficie del material o la formación de halos de inhibición. La ausencia de unidades formadoras de colonias (UFC) o un recuento bajo de estas crecidas sobre el material indica su acción antibacteriana; la presencia de múltiples UFC sobre el material indica que este no inhibe su crecimiento.

5.2. Resultados y discusión

5.2.1. Interacción Celular

5.2.1.1. Resultados de citotoxicidad *in vitro*

La Figura 5-2 muestra los resultados de viabilidad celular, en los cuales se detectan diferentes niveles de citotoxicidad en los cultivos mantenidos con los lixiviados obtenidos a 1, 2 y 7 días a partir de los materiales estudiados. En todos ellos se observa una tendencia similar conforme los materiales se van lavando: la viabilidad aumenta con el tiempo. La toxicidad de los lixiviados obtenidos tras 24h es superior a la de los obtenidos a las 48h, y la de éstos superior a la medida para los lixiviados de 7 días. Los lixiviados de las formulaciones restantes superan en todos los casos el 80% de la viabilidad celular medida en las muestras del control negativo ya desde el segundo día de extracción, quedándose cerca de ese nivel de viabilidad, en el caso de los cultivos mantenidos con los lixiviados de C4-30 y 30-Q, incluso las muestras del primer intervalo de extracción.

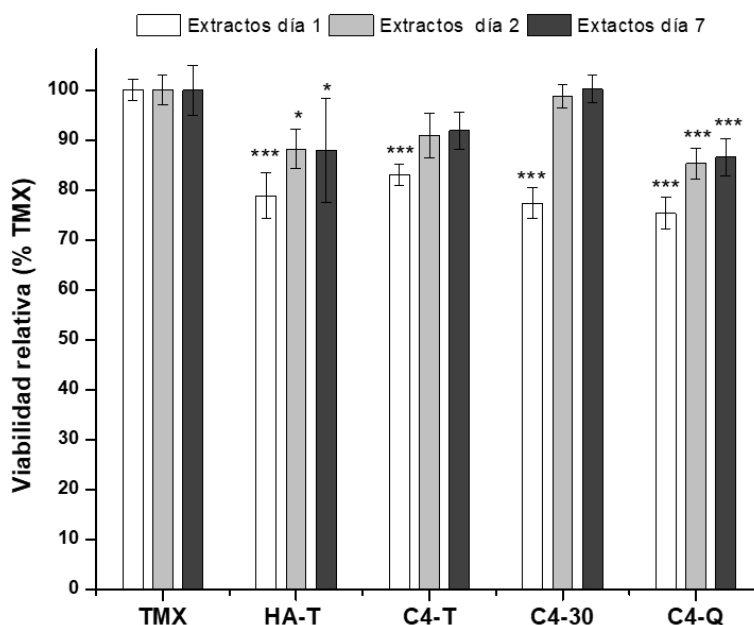


Figura 5-2. Resultados del ensayo MTT para los cultivos de osteoblastos humanos mantenidos con los lixiviados de 1, 2 y 7 días obtenidos para las muestras del control TMX y las formulaciones experimentales. Se representa el valor medio de la viabilidad celular relativa \pm intervalo de confianza al 95% ($n=16$), y el nivel de significación obtenido en el Test HSD de Tuckey del ANOVA efectuado para detectar diferencias significativas en la viabilidad celular de cada muestra experimental frente a la obtenida para TMX en cada tiempo (***: $p<0.001$; **: $p<0.01$; *: $p<0.05$).

5.2.1.2. Resultados proliferación celular

Los resultados obtenidos en este ensayo se muestran en la Figura 5-3. La actividad celular de los cultivos establecidos sobre la totalidad de las formulaciones experimentales es significativamente inferior a la obtenida en los establecidos sobre las muestras del control negativo TMX durante los primeros 7 días de cultivo, momento a partir del cual se pueden diferenciar dos dinámicas claramente diferentes en los cultivos estudiados. Por una parte, los cultivos establecidos sobre las formulaciones C4-30 y C4-Q, que muestran un incremento en la actividad celular medida, y que a final del estudio llega a ser muy similar a la medida para el control negativo (de hecho para las no se obtienen diferencias significativas con respecto al control tras 14 y 21 días de cultivo); y por otra parte, los cultivos sembrados sobre las muestras HA-T y C4-T, para los que se han medido valores de actividad celular notable y significativamente inferiores a los obtenidos para el control negativo a lo largo de los 21 días que ha durado el experimento. La inclusión de carbonato y una red porosa ha favorecido la actividad celular, ya que la muestra C4 presenta una menor actividad y la diferencia con la C4-30 es la red porosa generada por el uso de NaCl como se describió en el capítulo 4.

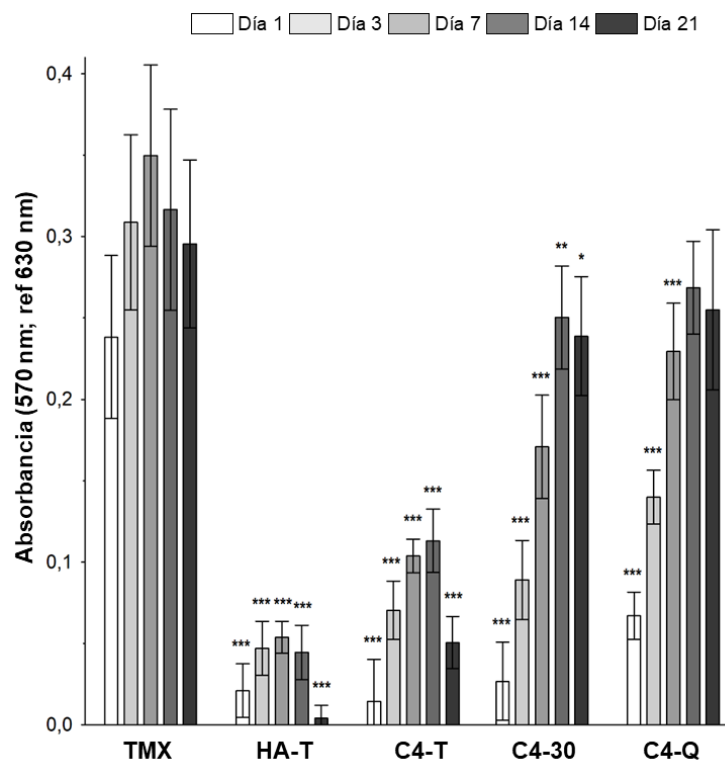
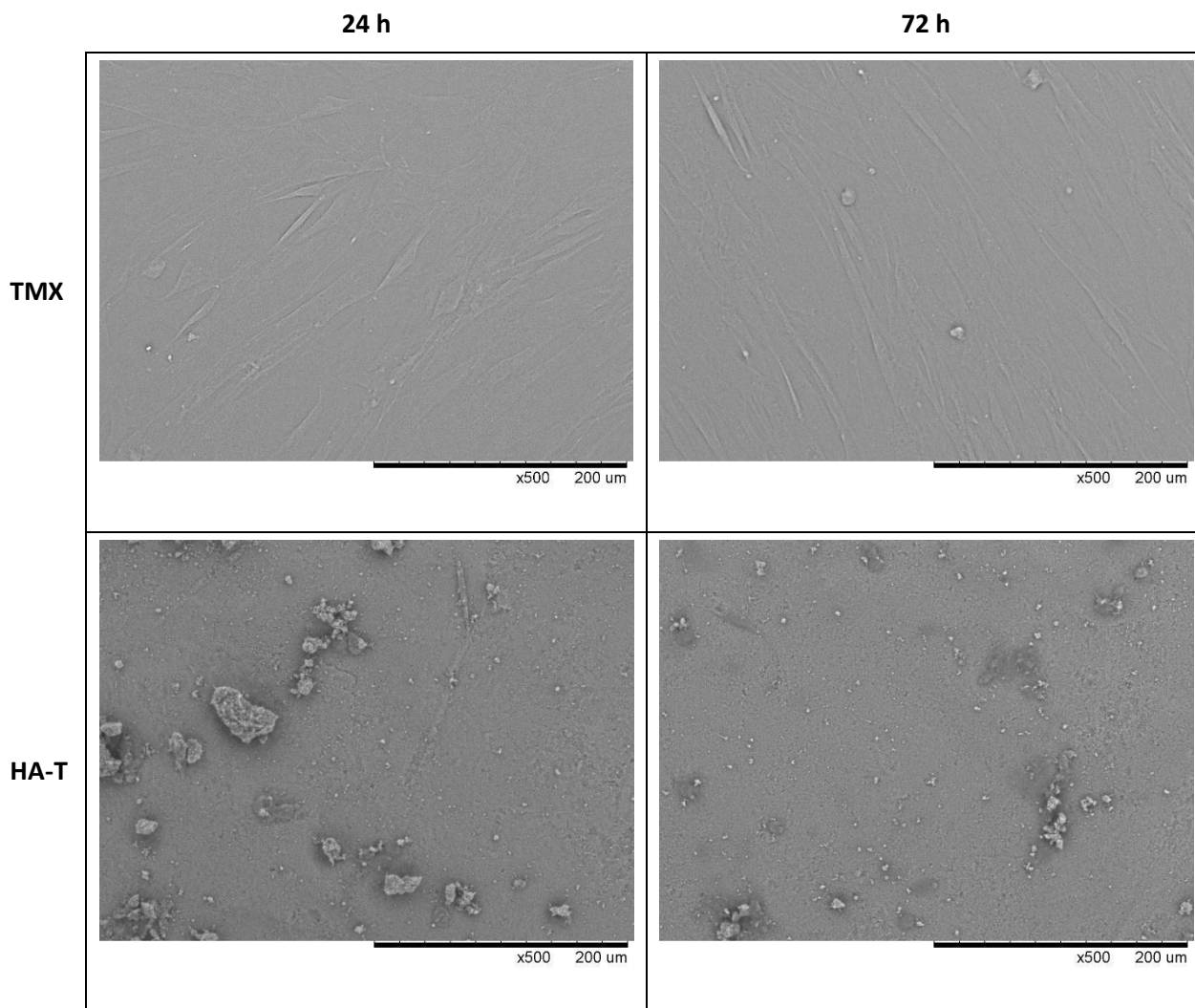


Figura 5-3. Resultados del ensayo Alamar Blue™ para los cultivos de osteoblastos humanos sembrados sobre el control TMX y las formulaciones estudiadas. Se representa la media \pm intervalo de confianza al 95% (n=4) y el nivel de significación obtenido en el Test HSD de Tuckey del ANOVA efectuado para detectar diferencias significativas en la actividad celular de cada muestra experimental frente a la obtenida para TMX en cada tiempo (***: $p < 0.001$; **: $p < 0.01$; *: $p < 0.05$).

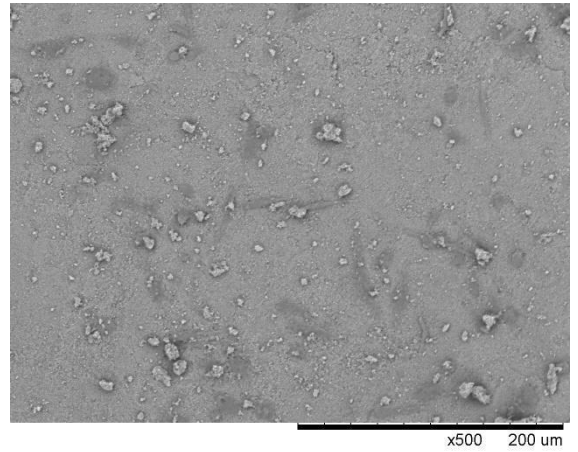
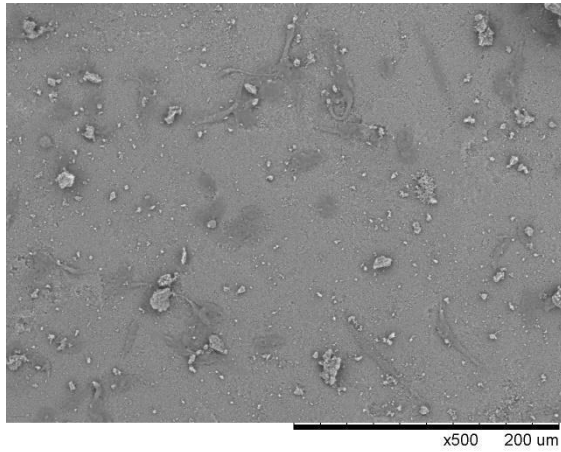
5.2.1.3. Resultados adhesión celular

El análisis microscópico de los cultivos sembrados y mantenidos durante 24 y 72h sobre el control negativo y las formulaciones experimentales muestra unos resultados que, más allá de reflejar en qué medida se ha visto degradada la superficie de algunas de las formulaciones, coinciden con los resultados del ensayo de proliferación. En la Tabla 5-2 puede verse la serie de imágenes de la superficie de los materiales evaluados, sobre las cuales en todos los casos, aparecen osteoblastos adheridos, si bien mientras que para las muestras de HA y C4 no se observa un incremento significativo en la cantidad de células entre las 24 y las 72h de cultivo, para las restantes formulaciones este incremento si es patente, siendo los resultados obtenidos para C4-30 y C4-Q cercanos a los obtenidos en los cultivos sembrados sobre el control negativo.

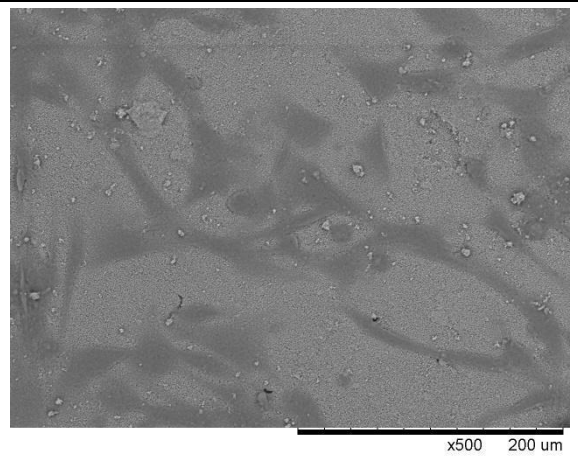
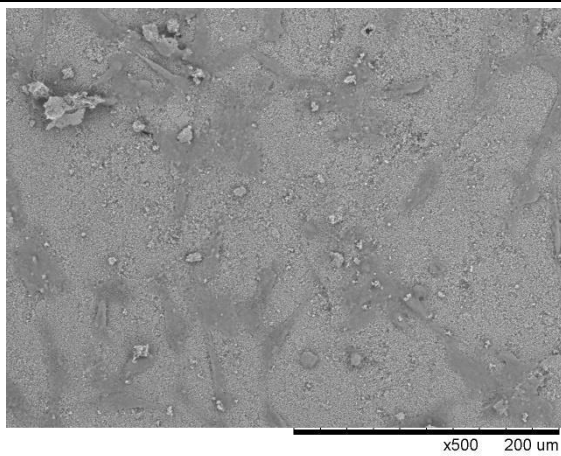
Tabla 5-2. Imágenes de microscopía electrónica de barrido de osteoblastos fetales humanos en la superficie del control TMX y los materiales evaluados (HA-T, C4-T, C4-30 y C4-Q).



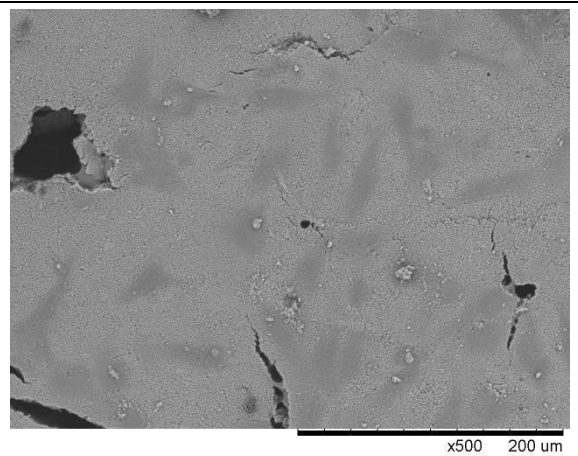
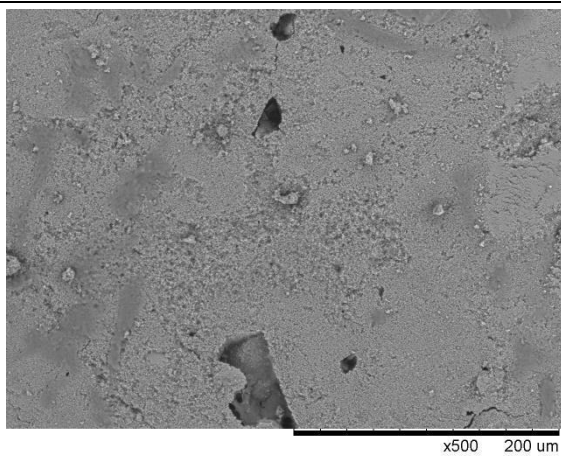
C4-T



C4-30



C4-Q



5.2.2. Liberación de antibióticos

La liberación del antibiótico de las muestras C4-Q cargadas con antibióticos (C4-Q Gentamicina) fue establecida mediante el porcentaje acumulado de sulfato en PBS en función del tiempo (Figura 5-4). El sulfato liberado fue determinado a partir del azufre detectado en los extractos de PBS para cada intervalo de tiempo. La mayor cantidad de antibiótico es liberada durante las primeras 24h, lo cual es recomendable para sistemas de liberación de medicamentos [9], ya que lo que se pretende es prevenir la adhesión inicial de las bacterias que promueven la aparición de una biopelícula promotora de las infecciones [10], [11]. En sistemas que emplean quitosano como vehículo del antibiótico, la liberación es controlada por la biodegradabilidad de este polímero, el cual debido a su carácter hidrofílico experimenta el proceso denominado “hinchamiento”, en el cual las cadenas poliméricas se despliegan absorbiendo gran cantidad de PBS y produciendo la difusión del antibiótico a la solución [12].

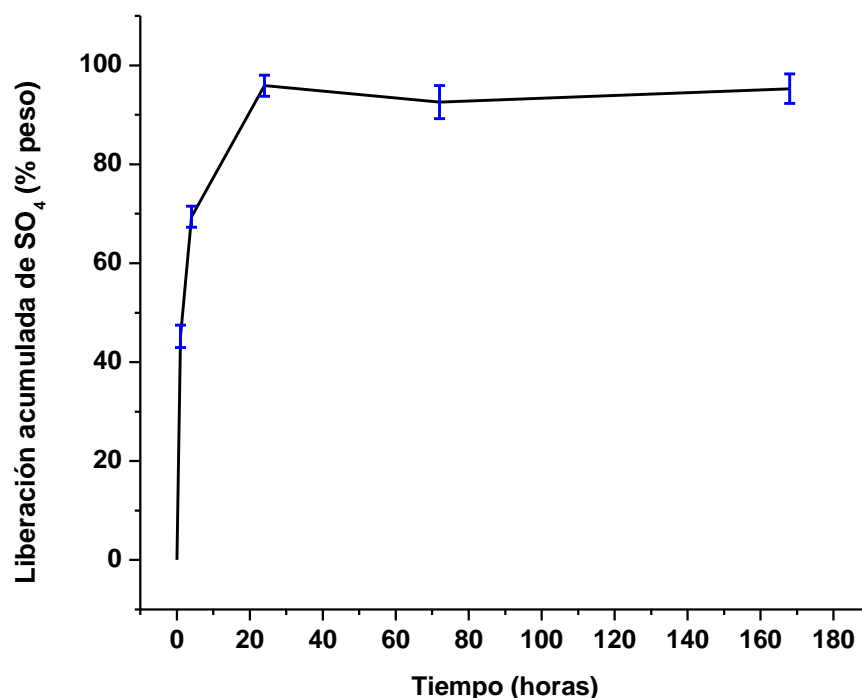


Figura 5-4. Perfil de liberación *in vitro* de sulfato de gentamicina luego de 180h en PBS (n=3)

La superficie de las muestras luego de la liberación fue analizada mediante microscopia electrónica de barrido (Figura 5-5) en la cual puede observarse la hidroxiapatita carbonatada tipo B con un remanente de quitosano, en forma de película a lo largo del material, lo cual podría indicar que luego de las 168h de liberación, puede existir un remanente de gentamicina, lo cual permitiría la reabsorción del material sin adherencias de bacterias por un tiempo prolongado.

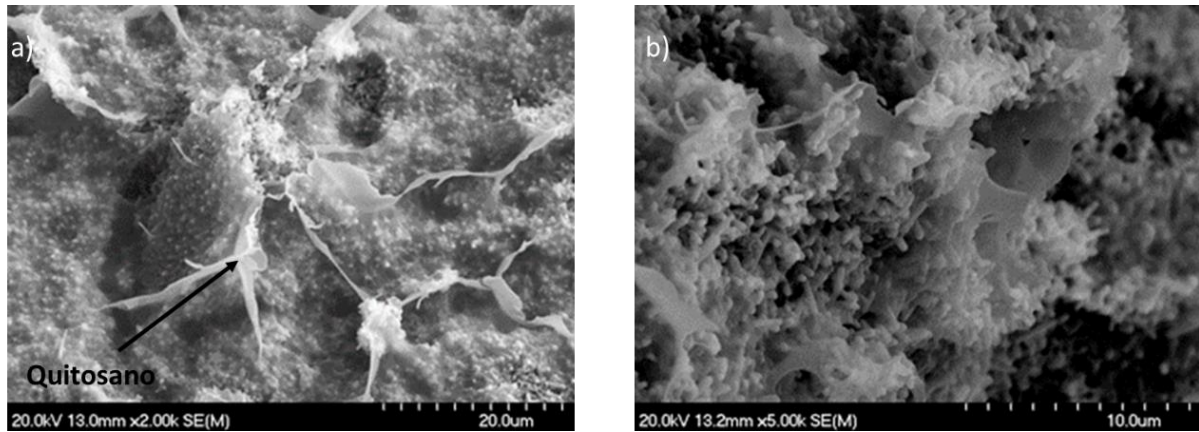


Figura 5-5. Micrografías de FE-SEM de la superficie de las plataformas de crecimiento celular después del ensayo de liberación de antibióticos

5.2.3. Inhibición bacteriana

La actividad de inhibición del crecimiento de *S. aureus* fue detectada sólo en la plataforma de crecimiento celular cargada con gentamicina (Figura 5-6b), con un diámetro similar al encontrado para el control positivo (Figura 5-6d) de sensibilidad de ciprofloxacina. Por su parte, las muestras C4-Q (Figura 5-6a) y C4 (Figura 5-6c) no presentaron actividad en la inhibición de *S. aureus*, debido a la presencia del crecimiento uniforme de esta bacteria alrededor y sobre la superficie de dicha muestra, así como se observa en el control de no inhibición (Figura 5-6e). Los resultados de dimensiones de los halos de inhibición se presentan en la Tabla 5-3, los valores de la muestra cargada con sulfato de gentamicina y el control positivo, indicando la efectividad de la plataforma cargada para albergar y liberar el antibiótico, lo cual permitirá prevenir la adhesión de bacterias sobre la superficie del implante y la aparición de enfermedades como la osteomielitis.

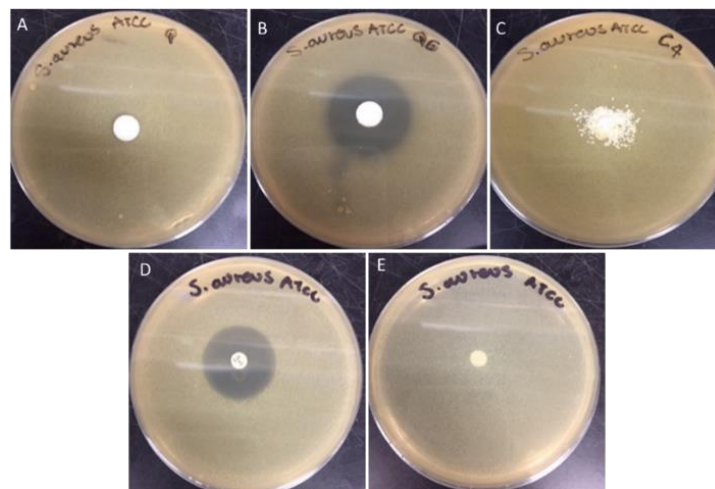


Figura 5-6. Halos de inhibición bacteriana de *S.aureus* en Agar

Tabla 5-3. Efecto de muestras de Hidroxiapatita infiltrada con quitosano y gentamicina en el crecimiento de *S. aureus*.

Muestra	Halos de inhibición (mm)
C4-Q	0
C4-Q Gentamicina	28 ± 1
C4-T	0
Sensidisco ciprofloxacina	30 ± 2
Sensidisco no impregnado	0

5.3. Conclusiones

- Los resultados de citotoxicidad mostraron que todos los materiales formulados presentan una viabilidad celular superior al 75%, lo cual indica que los materiales no generan productos tóxicos para las células osteoblásticas. En mayor medida para las estructuras porosas de hidroxiapatita carbonatada tipo B con niveles cercanos materiales diseñados para esto como el control negativo, esto previene la necrosis de los tejidos cercanos.
- La proliferación de células osteoblásticas en estructuras porosas infiltradas con quitosano presentó luego de 21 días niveles de generación de nuevas células similares al control negativo, lo que puede establecer que el material promueve la generación de nuevas células y potencialmente podría favorecer la regeneración ósea. Las células osteoblásticas muestran una extensión sobre la superficie de los materiales evaluados, aumentando en las estructuras porosas y sin afectaciones por la infiltración de quitosano.
- La liberación del antibiótico mostró la capacidad de las plataformas de hidroxiapatita carbonatada tipo B/quitosano de albergar y dosificar el sulfato de gentamicina para la prevención de adhesión de bacterias en etapas tempranas de implantación, las cuales son cruciales en la prevención de enfermedades comunes como la osteomielitis en implantes óseos.
- Las plataformas de crecimiento celular cargadas con sulfato de gentamicina mostraron la capacidad de albergar y liberar el compuesto activo para prevenir la adhesión de *S.aureus* en proporciones similares a materiales diseñados para este fin. En comparación con las configuraciones de hidroxiapatita carbonatada tipo B/ quitosano que por sus características fisicoquímicas no previenen la adhesión de bacterias infecciosas causantes de enfermedades postquirúrgicas.

5.4. Referencias

- [1] S.J. Ding, C.W. Wang, D.C.H. Chen, H.C. Chang, In vitro degradation behavior of porous calcium phosphates under diametral compression loading, *Ceram Int.* 31 (2005) 691–696. <https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2004.08.007>.
- [2] J. Parra, I.H. García Páez, A.H. De Aza, C. Baudin, M. Rocío Martín, P. Pena, In vitro study of the proliferation and growth of human fetal osteoblasts on Mg and Si co-substituted tricalcium phosphate ceramics, *J Biomed Mater Res A.* 105 (2017) 2266–2275. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.36093>.
- [3] F. Denizot, R. Lang, Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability, *J Immunol Methods.* 89 (1986) 271–277. [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(86\)90368-6](https://doi.org/10.1016/0022-1759(86)90368-6).
- [4] S.L. Voytik-Harbin, A.O. Brightman, B. Waisner, C.H. Lamar, S.F. Badylak, Application and evaluation of the alamarblue assay for cell growth and survival of fibroblasts, *In Vitro Cell Dev Biol Anim.* 34 (1998) 239–246. <https://doi.org/10.1007/s11626-998-0130-x>.
- [5] A.A. El Hadad, E. Peón, F.R. García-Galván, V. Barranco, J. Parra, A. Jiménez-Morales, J.C. Galván, Biocompatibility and corrosion protection behaviour of hydroxyapatite sol-gel-derived coatings on Ti6Al4V alloy, *Materials.* 10 (2017). <https://doi.org/10.3390/ma10020094>.
- [6] Gentamicina sulfate salt meets USP testing specifications, powder | Sigma-Aldrich, (n.d.). <https://www.sigmaaldrich.com/CO/es/product/sial/g1914> (accessed October 2, 2023).
- [7] N. Kavanagh, E.J. Ryan, A. Widaa, G. Sexton, J. Fennell, S. O'Rourke, K.C. Cahill, C.J. Kearney, F.J. O'Brien, S.W. Kerrigan, Staphylococcal Osteomyelitis: Disease Progression, Treatment Challenges, and Future Directions, *Clin Microbiol Rev.* 31 (2018) 1–25. <https://doi.org/10.1128/CMR.00084-17>.
- [8] T. Padrão, C.C. Coelho, P. Costa, N. Alegrete, F.J. Monteiro, S.R. Sousa, Combining local antibiotic delivery with heparinized nanohydroxyapatite/collagen bone substitute: A novel strategy for osteomyelitis treatment, *Materials Science and Engineering C.* 119 (2021) 111329. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2020.111329>.
- [9] R. Manoj Kumar, P. Gupta, S.K. Sharma, A. Mittal, M. Shekhar, V. Kumar, B. V. Manoj Kumar, P. Roy, D. Lahiri, Sustained drug release from surface modified UHMWPE for acetabular cup lining in total hip implant, *Materials Science and Engineering C.* 77 (2017) 649–661. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2017.03.221>.
- [10] J.A. Inzana, E.M. Schwarz, S.L. Kates, H.A. Awad, Biomaterials approaches to treating implant-associated osteomyelitis, *Biomaterials.* 81 (2016) 58–71. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2015.12.012>.
- [11] J. Josse, F. Velard, S.C. Gangloff, Staphylococcus aureus vs. Osteoblast: Relationship and Consequences in Osteomyelitis, *Front Cell Infect Microbiol.* 5 (2015) 1–17. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2015.00085>.
- [12] R. Parhi, Chitin and Chitosan in Drug Delivery, 2019.

6. Conclusiones Generales

- En este trabajo se pudo sintetizar hidroxiapatita con tres proporciones de carbonato (4-6%) y un polvo sin sustituir mediante el método inverso, los cuales se encuentran dentro de los rangos permitidos para implantes óseos y similares al hueso biológico. Esta inclusión de carbonato genera una distorsión en la red cristalina de la hidroxiapatita al posicionarse en la ubicación de los iones fosfato (sustitución tipo B). Una sustitución que conlleva a un incremento en la resistencia mecánica y promueve la degradación *in vitro* en ambiente ácido y condiciones fisiológicas, lo cual favorece los procesos de osteointegración para este tipo de materiales una vez sean empleados como injertos para regeneración ósea, de acuerdo con esto el material C4 (5.3% en peso de carbonato) fue escogido para los análisis posteriores.
- La fabricación de estructuras porosas de hidroxiapatita carbonatada tipo B con mayor contenido de carbonato (5.3% en peso) se logró usando el método de *Space Holder* con un 30 % en peso de NaCl, generando una red de poros con morfología cúbica y tamaños entre 200-400 μm . El agente porogénico se pudo eliminar completamente mediante lixiviación y sin la aparición de fases secundarias que podrían afectar el desempeño mecánico y fisiológico de las plataformas de crecimiento celular. El desempeño mecánico de las estructuras porosas disminuyó la resistencia mecánica en comparación con los materiales densos, sin embargo, se encuentran dentro de los valores reportados para el hueso biológico que le permitirán resistir mecánicamente mientras se llevan a cabo los procesos de reabsorción y colonización por células osteoblásticas.
- Las plataformas de crecimiento celular fueron infiltrados con quitosano mediante una solución ácida (1% volumen de ácido acético) de quitosano (3% peso/volumen), el cual permitió la carga de sulfato de gentamicina (1 parte de gentamicina por 3 de quitosano en peso) y posterior liberación en PBS, el cual presenta un comportamiento adecuado para prevenir la adhesión de bacterias, ya que durante las primeras 24h se libera gran parte del antibiótico, el cual previene la colonización y aparición de infecciones postoperatorias como la osteomielitis.
- La evaluación de interacción celular de las plataformas de crecimiento celular mostró el potencial de este material para aplicaciones de regeneración ósea, debido a que no generan productos tóxicos y presentan niveles de viabilidad celular similares al control negativo. En cuanto a la proliferación se encontraron resultados prometedores para la generación de nuevas células osteoblásticas que indican la capacidad de las plataformas de crecimiento celular de hidroxiapatita carbonatada tipo B(C4)/quitosano en estimular células osteoblásticas, las cuales se adhieren sobre la superficie.
- Las plataformas de crecimiento celular cargadas con gentamicina presentaron un carácter inhibitorio con respecto a la bacteria *S. aureus*, con lo que ha quedado demostrado la capacidad de albergar y liberar antibióticos para prevenir la aparición de infecciones postquirúrgicas comunes en procesos postoperatorios de injertos óseos.

7. Trabajos futuros

De acuerdo con los resultados obtenidos en esta investigación se sugieren algunos estudios complementarios que acerquen a las plataformas de crecimiento celular a su objetivo final de aplicación en regeneración ósea:

- Realizar análisis de la capacidad de osteinducción de las plataformas de crecimiento celular mediante diferenciación de células mesenquimales óseas en células osteoblásticas, teniendo en cuenta que este proceso puede ser promovido por la inclusión de algunos factores crecimiento como las proteínas morfogenéticas óseas, por lo que un estudio con la adición de estos factores a las plataformas sería un complemento sustancial.
- Realizar estudios preliminares *in vivo* en los cuales se evalué el comportamiento histológico de las plataformas de crecimiento celular y poder determinar así de manera directa la interacción ósea y el efecto del carbonato y la estructura porosa en los procesos de regeneración ósea.

8. Productos

Productos en revistas científicas

- Hamilton Copete, Esperanza López, Carmen Baudin. *“Synthesis and characterization of B-type carbonated hydroxyapatite materials. Effect of carbonate content on mechanical strength and in vitro degradation”*. Artículo sometido en Boletín de la Sociedad Española de Cerámica y Vidrio con revisión de pequeños cambios (08-11-2023).
- Jeisson Ruiz, Daniel Moreno, Hamilton Copete, Fabio Vargas, María Esperanza López. *“Calcium phosphate cements improved by addition of carbonated Hydroxyapatite type B”*. *Boletín de La Sociedad Española de Cerámica y Vidrio*. <https://doi.org/10.1016/j.bsecv.2022.05.002>. (2022)

Productos en congresos y simposios

- Hamilton Copete, Esperanza López, Carmen Baudin. *“Physicochemical evaluation of B-type carbonated hydroxyapatite for bone replacement applications”*. Ponencia oral en Young Researchers in Ceramics and Glasses for Medical Applications, Madrid 2019.
- Hamilton Copete, Esperanza López *“Síntesis y evaluación mecánica de hidroxiapatita carbonatada tipo B para aplicaciones en sustitución ósea”*. Ponencia oral, reconocimiento a mejor presentación en Congreso Latinoamericano de Órganos Artificiales y Biomateriales, 2018, Joao Pessoa-Brasil.
- María Isabel Ochoa, Hamilton Copete, Esperanza López. *“Evaluación de la influencia del contenido de carbonato y la porosidad en la resistencia mecánica y cinética de degradación de hidroxiapatita carbonatada tipo B”*. Ponencia póster en X Congreso Internacional de Materiales, Bucaramanga-2019.

Asesorías trabajos de grado

- Asesoría trabajo de grado: *“Evaluación de la influencia del contenido de carbonato en las propiedades mecánicas, degradación e interacción celular in vitro de plataformas de hidroxiapatita carbonatada para su aplicación como implante óseo”*. Persona orientada: María Isabel Ochoa Gómez

9. Anexo 1. Optimización de procesamiento de plataformas de crecimiento celular

El procesamiento de los polvos representó una etapa importante durante la ejecución del este trabajo, debido a esto en el presente anexo se presenta la optimización realizada en la preparación de los polvos y la compactación de los materiales densos obtenidos en el **capítulo 3**. Inicialmente se realizó un diagnóstico de defectos obtenidos en los ensayos preliminares y de acuerdo con esto, mediante estrategias de molienda y curvas de prensado fue posible minimizar las fallas detectadas y obtener materiales sinterizados apropiados para las evaluaciones posteriores.

A1. Procesamiento inicial de los materiales densos e identificación de defectos.

Inicialmente, luego del tratamiento térmico a 400°C realizados a los polvos al final del proceso de síntesis (Numeral 3.1.1 del capítulo 3), se fabricaron piezas mediante prensado uniaxial a 200 MPa de acuerdo con algunas de las referencias que realizaban un proceso de conformado similar [1], [2], [3]. Las piezas fabricadas, de diámetro ≈ 6.4 mm y altura ≈ 13 mm fueron sometidas a la prueba de compresión uniaxial. Durante la ejecución de los ensayos, las piezas presentaron una fractura poco convencional como se presenta en la Figura A-1. Las piezas fallaban por separación de láminas del material a niveles de carga muy variables. Se procedió a emplear microscopía electrónica de barrido para analizar las superficies de fractura con objeto de identificar la causa de este tipo de fractura.



Figura A-1. Defectos de piezas sinterizadas en ensayos de compresión.

En la Figura A-2 se muestran ejemplos de los defectos característicos encontrados. Una parte de estos defectos (Figura A-1) estaba formado por aglomerados de partículas (Figura A-1a), posiblemente originados durante la síntesis o el tratamiento térmico a 400°C, y no desintegrados durante el proceso de tamizado. Por una parte, los aglomerados del polvo pueden propiciar la presencia de aire atrapado, impidiendo la correcta compactación del material en verde [4]. Por otra

parte, los aglomerados presentes en el compacto en verde dan lugar a la sinterización diferencial del material durante el tratamiento térmico.

El segundo defecto que se pudo identificar fue la laminación (Figura A-2b), que comúnmente en piezas cerámicas no muestran ningún signo exterior aún después del sinterizado y sólo son visibles una vez la pieza se fractura. Esta laminación, puede generarse por diferentes causas, sin embargo, en existen cuatro causas que comúnmente se han asociado a este defecto, la forma y distribución de las partículas, métodos de mezclado y grietas por altas presiones [5].

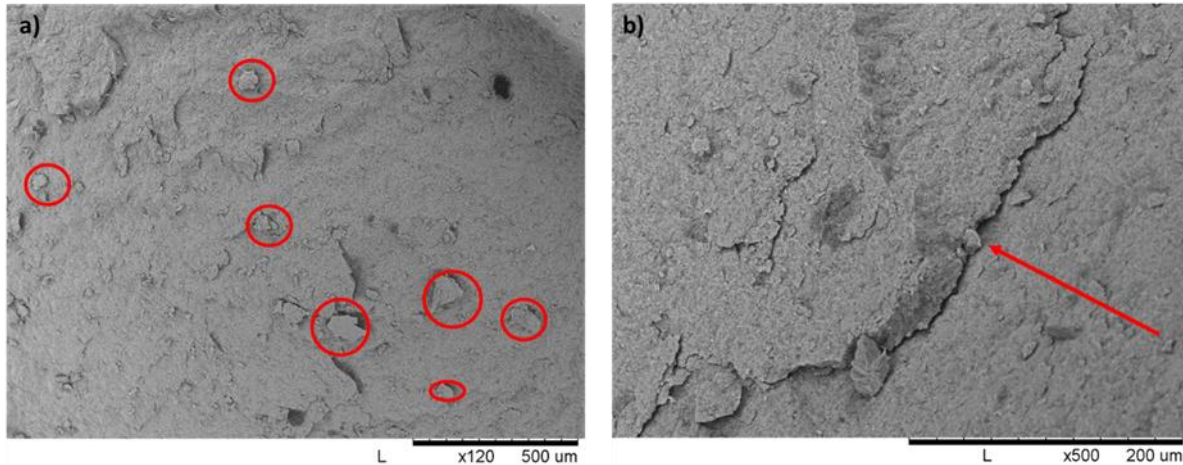


Figura A-2. Superficies de fractura de pruebas mecánicas preliminares, a) Aglomerados a 120x, b) laminaciones a 500x.

Los defectos encontrados en las superficies de fractura propusieron un reto con el fin de optimizar las características microestructurales de las piezas a conformar, este proceso se realizó en dos etapas, la primera de ellas consistió en el beneficiado de la materia prima mediante molienda, con objeto de obtener una distribución óptima de tamaño de partículas, y la segunda en la determinación de la presión adecuada para la compactación de los polvos.

A2. Optimización de la distribución de tamaño de partícula

Los polvos de las cuatro síntesis (HA, C2, C3 y C4) una vez pasados por tamiz de 45 µm fueron caracterizados mediante difracción láser para obtener la distribución de tamaño de partícula usando un equipo Mastersizer S (Malvern, Reino Unido) y un láser de He-Ne con una $\lambda=632,8$ nm. En la Figura A-3 se puede observar que todos los polvos presentan una distribución bimodal, que indica la presencia de aglomerados a los cuales puede atribuirse parte de los defectos descritos en el numeral anterior.

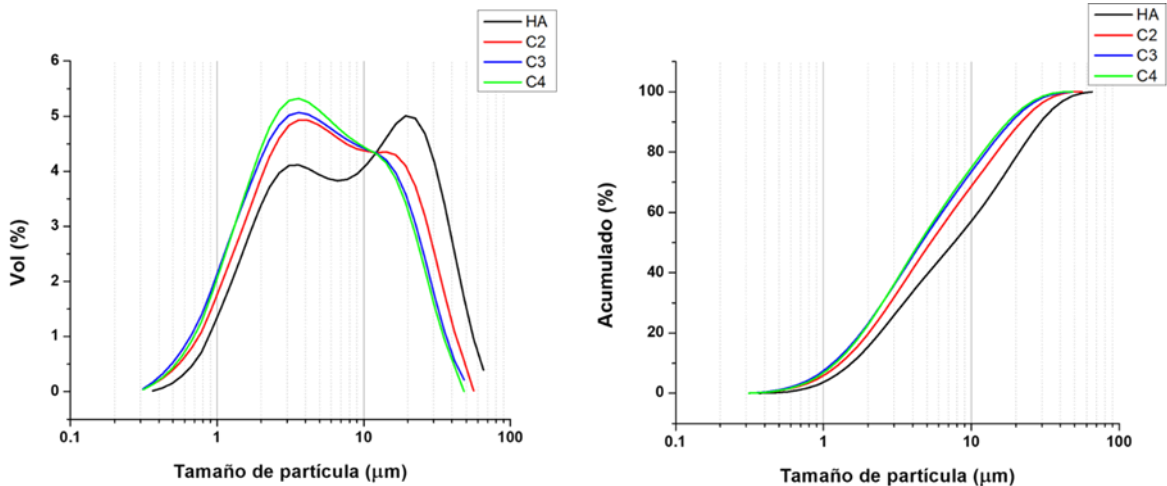


Figura A-3. Distribución de tamaño de partícula de los polvos sintetizados

Los valores de d_{10} , d_{50} y d_{90} se muestran en la Tabla A-1, donde la HA presenta un tamaño levemente superior a los polvos con sustitución de carbonato.

Tabla A-1. Distribución de tamaño de partícula de polvos sintetizados

	Tamaño de partícula (μm)			
	HA	C2	C3	C4
d_{10}	1.5	1.3	1.2	1.2
d_{50}	7.6	5.3	4.6	4.5
d_{90}	29.4	21.7	18.5	17.6

Los resultados de distribución de tamaño de partícula indicaban la necesidad de realizar un proceso de rotura de los aglomerados, con objeto de obtener una distribución monomodal y estrecha. Por lo tanto, se realizó un proceso de molienda en un molino vertical con jarro y bolas de circona durante 60 min a 1800 rpm en alcohol isopropílico con adición de un 1% en peso de polietilenglicol (PEG), este último tiene una función de plastificante, lo que mejora la compactación en el prensado uniaxial [6]. Luego de esto se realizó nuevamente un análisis de distribución de tamaño de partícula con los mismos parámetros empleados para los polvos sintetizados.

El efecto de la molienda en la distribución de tamaño de partícula de los polvos se presenta en la Figura A-4, donde puede observarse un cambio hacia una distribución monomodal para todas las composiciones en comparación a las observadas para los polvos sintetizados (Figura A-3) y las curvas del acumulado se han unificado y no presentan histéresis como se puede ver los polvos sin moler.

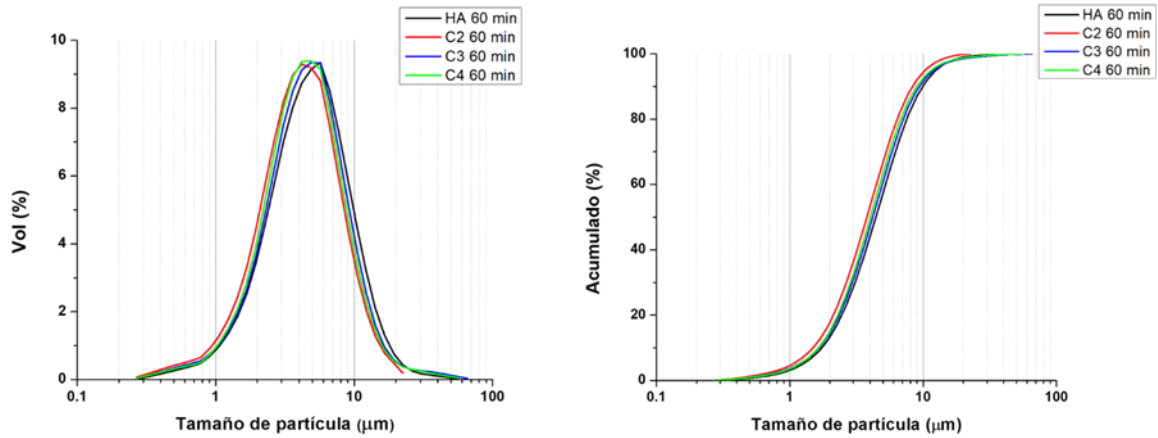


Figura A-4. Distribución de tamaño de partícula después de molienda

Además, como se recoge en la Tabla A-2, se obtuvo un tamaño inferior de partículas para todos los materiales con una distribución similar entre ellos, lo que contribuyó a realizar una comparación efectiva del contenido de carbonato en las pruebas posteriores.

Tabla A-2. Distribución de tamaño de partícula después de molienda

	Tamaño de partícula (µm)			
	HA	C2	C3	C4
d₁₀	1.7	1.5	1.7	1.6
d₅₀	5.4	3.8	4.2	4.0
d₉₀	9.9	8.3	9.3	9.9

A3. Curvas de prensado

La presión empleada en el conformado juega un papel importante en la integridad de las piezas, cuyo efecto en algunos casos sólo es posible detectar luego del tratamiento térmico, ya que al emplear altas presiones las paredes del molde sufren una deformación que se recupera al retirar la carga y causa una compresión radial en la pieza [7]. Debido a esto se realizó una curva de prensado empleando la máquina universal de ensayos (Microtest, España), en la cual se realizó la compactación del polvo en función de la presión.

En la Figura A-5 se muestra una curva característica obtenida durante los ensayos. Se representa la densidad relativa de una pieza compactada en función de la presión de compactación ; puede observarse que la densidad relativa alcanzada por las piezas no llega al 50%, además se analizó la capacidad de compactación con la derivada de la curva de densidad , con la cual pudo encontrarse que al sobrepasar los 40 MPa no ha una variación significativa en la densidad de la pieza, por lo tanto este valor fue seleccionado para la fabricación de todas las piezas que se conformaron en este trabajo.

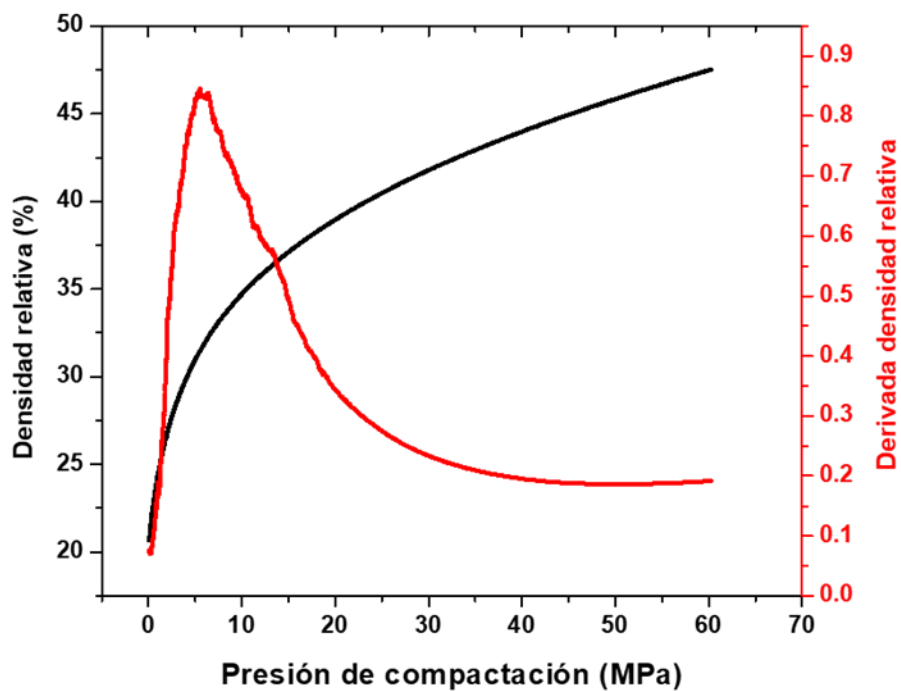


Figura A-5. Curva de prensado para polvos de C4

A4. Referencias

- [1] M. Canillas, P. Pena, A.H. De Aza, M.A. Rodríguez, Calcium phosphates for biomedical applications, *Boletín de La Sociedad Española de Cerámica y Vidrio*. 56 (2017) 91–112. <https://doi.org/10.1016/j.bsecv.2017.05.001>.
- [2] J.C. Merry, I.R. Gibson, S.M. Best, W. Bonfield, Synthesis and characterization of carbonate hydroxyapatite, *J Mater Sci Mater Med*. 9 (1998) 779–783. <https://doi.org/10.1023/A:1008975507498>.
- [3] A. Arifin, A.B. Sulong, L.C. Fun, Gunawan, I. Yani, Porous titanium alloy/hydroxyapatite composite using powder compaction route, *JOURNAL OF MECHANICAL ENGINEERING AND SCIENCES*. 11 (2017) 2679–2692. <https://doi.org/10.15282/jmes.11.2.2017.10.0244>.
- [4] C. Bechteler, H. Kühn, R. Girmscheid, Morphology and structure characterization of ceramic granules, *J Eur Ceram Soc*. 40 (2020) 4232–4242. <https://doi.org/10.1016/j.jeurceramsoc.2020.04.044>.
- [5] R. Riedel, I. Chen, R. Chen, *Ceramics Science and Technology*, Wiley, 2011. <https://doi.org/10.1002/9783527631957>.
- [6] A. Aimable, T. Chartier, Organic additives in ceramic processing, *Encyclopedia of Materials: Technical Ceramics and Glasses*. 1–3 (2021) 103–111. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803581-8.11768-0>.
- [7] K.G. Ewsuk, J.G. Arguello, D.N. Bencoe, D.T. Ellerby, S.J. Glass, D.H. Zeuch, J. Anderson, Characterizing Granulated Ceramic Powders for Dry Pressing and Sintering, in: 2006: pp. 77–88. <https://doi.org/10.1002/9781118371480.ch11>.