

TRABAJO FIN DE MÁSTER  
MÁSTER UNIVERSITARIO EN BIOTECNOLOGÍA Y BIOINGENIERÍA  
CURSO 2020-21  
UNIVERSIDAD MIGUEL HERNÁNDEZ DE ELCHE

---

# SÍNTESIS, CARACTERIZACIÓN Y BIOACTIVIDAD DE ANDAMIOS CERÁMICOS POROSOS DE 3ª GENERACIÓN

---

Autor: María Ferrandis Montesinos  
Tutor académico: Prof. Dra Piedad Nieves de Aza Moya  
Co-tutor: Dra. Patricia Mazón Canales

**Dña. P.N. De Aza Moya y P. Mazón Canales**, Doctoras y Profesoras Catedrática de Universidad y Contratada Doctor respectivamente, del Área de Ciencia de Materiales e Ingeniería Metalúrgica del Departamento de Ciencia de Materiales, Óptica y Tecnología Electrónica de la Universidad Miguel Hernández de Elche.

CERTIFICA

Que el presente trabajo titulado:

“SÍNTESIS, CARACTERIZACIÓN Y BIOACTIVIDAD DE ANDAMIOS CERÁMICOS POROSOS DE 3ª GENERACIÓN”

y que constituye la Memoria del Trabajo Fin de Máster en Biotecnología y Bioingeniería, que presenta:

**Dña. MARÍA FERRANDIS MONTESINOS**

ha sido realizado bajo su supervisión en el Instituto de Bioingeniería, cumpliendo todos los requisitos necesarios.

Y para que así conste, se expide y firma el presente certificado en Elche a 16/06/2021

Fdo.: Piedad N. De Aza Moya

Fdo. Patricia Mazón Canales



## Resumen

Desde siempre, el objetivo de los seres humanos ha sido la supervivencia mediante la adaptación al medio. Esto ha llevado a un aumento en la esperanza de vida y un consecuente declive en la calidad de vida media de la población debido a un aumento de problemas de salud relacionados con la edad. Así, la comunidad científica se ha centrado en la ingeniería de tejidos para solucionar algunos de estos problemas. Por ejemplo, para la regeneración de tejido óseo se utilizan matrices cerámicas que imitan la microestructura ósea y que estimulan el crecimiento de las células y la regeneración del tejido, reabsorbiéndose al finalizar el proceso.

Con el objetivo de obtener estas matrices porosas, se preparó la fase R, cerámica compuesta por un 69% de silicato dicálcico ( $C_2S$ ) y un 31% de fosfato tricálcico (TCP), preparada mediante una reacción en estado sólido de acuerdo al diagrama de fases del sistema  $Ca_3(PO_4)_2-Ca_2SiO_4$ . A continuación se utilizó el método de réplica de esponjas poliméricas para preparar andamios porosos compuestos de fase R a partir de plantillas de poliuretano, y se procedió a su caracterización. Finalmente, se analizó la bioactividad de estas matrices porosas mediante estudios *in vitro* realizando inmersiones en suero fisiológico artificial (SFA), que posteriormente fue analizado por espectroscopía óptica de emisión de plasma acoplado inductivamente (EOE-PAI).

Los resultados demuestran que la cristalinidad y la estructura de las matrices se mantienen constantes, con una microestructura de puentes y poros interconectados que presenta una jerarquía similar a la observada en la microestructura ósea. La precipitación de hidroxiapatita en los andamios porosos sumergidos en SFA comienza a apreciarse a partir de 1 hora, y va aumentando hasta cubrir por completo la superficie al día de haber sido sumergidos. Esto demuestra que los andamios presentan bioactividad, aunque se precisan futuras investigaciones para que estos andamios cerámicos porosos puedan ser considerados seguros para su uso como prótesis en la ingeniería de tejidos.

*Palabras clave: biomateriales, biocerámicas, silicato dicálcico, fosfato tricálcico, fase R, estudios de bioactividad*

## Abstract

The main goal of human beings has always been survival through adaptation to the environment. This has caused an increase in life expectancy and a consequent decline in the average quality of life of the population due to a higher incidence of age-related health problems. Thus, the scientific community has focused on tissue engineering to solve some of these problems. For instance, porous ceramic scaffolds are commonly used in bone tissue regeneration. These scaffolds mimic the interconnected pore structure of bones and stimulate cell growth and tissue regeneration, being reabsorbed by the end of the process.

In order to obtain these porous scaffolds, the R phase was prepared by a solid-state reaction within the phase diagram  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2\text{-Ca}_2\text{SiO}_4$  with a composition of 69% dicalcium silicate ( $\text{C}_2\text{S}$ ) and 31% tricalcium phosphate (TCP). Next, the polymeric sponge replication method was used to prepare ceramic porous scaffolds composed of phase R and their characterization was carried out. Finally, the bioactivity of these porous scaffolds was analyzed through in vitro studies performing immersions in simulated body fluid (SBF), which was subsequently analyzed by inductively coupled plasma emission optical spectroscopy (ICP-EOS).

The results show that the crystallinity and the structure of the scaffolds remain constant, with a microstructure of struts and interconnected pores distributed in a hierarchy similarly observed in bone microstructure. The precipitation of hydroxyapatite in the porous scaffolds immersed in SBF begins to be appreciated after 1 hour and increases until it completely covers the surface one day after being soaked. This shows that the scaffolds display bioactivity, although future research is required so that these porous ceramic scaffolds can be considered safe to use as prostheses in tissue engineering.

*Keywords: biomaterials, bioceramics, dicalcium silicate, tricalcium phosphate, R phase, bioactivity studies*

## Índice de contenidos

<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	<b>7</b>
1.1 BIOMATERIALES: HISTORIA Y GENERALIDADES	7
1.1.1 Clasificación de los biomateriales	9
1.1.2 Anatomía ósea	11
1.1.3 Sistema $Ca_3(PO_4)_2-Ca_2SiO_4$	13
1.2 ESTUDIO <i>IN VITRO</i> DE LA BIOACTIVIDAD CON SUERO FISIOLÓGICO ARTIFICIAL	15
1.3 MÉTODOS PARA LA PRODUCCIÓN DE MATRICES POROSAS	16
<b>2. OBJETIVOS</b>	<b>18</b>
<b>3. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>19</b>
3.1 TÉCNICAS DE SÍNTESIS Y PROCESAMIENTO	19
3.1.1 Preparación y homogeneización de la fase R	19
3.1.2 Prensado isostático	19
3.1.3 Tratamiento térmico	20
3.1.4 Molido	21
3.1.5 Método de réplica de esponjas poliméricas	22
3.1.6 Homogeneización por ultrasonidos	22
3.2 TÉCNICAS DE CARACTERIZACIÓN	23
3.2.1 Difracción de Rayos X	23
3.2.2 Detección del tamaño de partícula	25
3.2.3 Microscopía electrónica de barrido (MEB) y Microanálisis de energía dispersiva de rayos X (MED-RX)	26
3.2.4 Porosimetría de mercurio	28
3.2.5 Espectroscopía óptica de emisión de plasma acoplado inductivamente (EOE-PAI)	29
3.2.6 Espectroscopía de infrarrojos por transformada de Fourier (FTIR-ATR)	30
3.3 ENSAYOS DE BIOACTIVIDAD <i>IN VITRO</i> CON SUERO FISIOLÓGICO ARTIFICIAL (SFA)	31
<b>4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	<b>32</b>
4.1 PREPARACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LA FASE R	32

4.2	PREPARACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LOS ANDAMIOS CERÁMICOS .....	35
4.3	ESTUDIO <i>IN VITRO</i> DE LA BIOACTIVIDAD CON SFA .....	42
<b>5.</b>	<b>CONCLUSIONES .....</b>	<b>48</b>
<b>6.</b>	<b>BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>49</b>

# 1. Introducción

## 1.1 Biomateriales: historia y generalidades

Desde el nacimiento de la humanidad hasta la época actual, el objetivo del ser humano ha sido la supervivencia, y como consecuencia el aumento de la esperanza de vida de la población. A medida que la población ha ido envejeciendo, la calidad de vida media ha ido disminuyendo, y se ha observado una incidencia mayor en problemas de salud que están relacionados con la edad, como son la osteoporosis y las consecuentes fracturas óseas [1].

Para solucionar estos problemas y poder mejorar la calidad de vida de la población surgieron los biomateriales, que en su origen estaban limitados a los materiales que se podían encontrar en la naturaleza y sus propiedades. Se ha descubierto que civilizaciones tan antiguas como la griega o la romana ya utilizaban diferentes materiales en aplicaciones dentales, como son las fibras metálicas de hierro para unir dientes y el uso del oro en implantes dentales [2].

Sin embargo, muchos de los biomateriales desarrollados en esas primeras épocas tuvieron un éxito más bien escaso, ya que entonces no se comprendían conceptos básicos sobre la relación entre los biomateriales y el cuerpo humano, como son la infección y la reacción del organismo al material introducido. No fue hasta la Segunda Guerra Mundial que se desarrollaron los primeros implantes funcionales, cuando se descubrió el uso del polimetilmetacrilato en implantes oculares para tratar las cataratas [3]. En la misma época también se desarrollaron el implante de cadera [4], el primer injerto vascular [5], el primer riñón artificial y su proceso de diálisis [6] y la primera válvula cardíaca [7], entre otros. Estos primeros descubrimientos abrieron la puerta a un nuevo mundo de posibilidades que, hasta la fecha, ha salvado millones de vidas y mejorado la calidad de otras tantas, y continuarán haciéndolo en el futuro.

A lo largo de su historia, los biomateriales han tenido muchas definiciones, pero la comunidad científica ha llegado a una definición consensuada por la cual un biomaterial es “una sustancia que ha sido diseñada para tomar una forma que, sola o como parte de un sistema complejo, se usa para dirigir, mediante el control de interacciones con componentes de sistemas vivos, el curso de cualquier procedimiento terapéutico o de diagnóstico” [8].

Los biomateriales son principalmente utilizados en el área de la medicina, donde se utilizan para analizar, tratar, reparar o reemplazar tejidos u órganos dañados, como implantes ortopédicos, implantes dentales o válvulas cardíacas artificiales [9]. Además, también se pueden utilizar biomateriales viables combinados con células, como los scaffolds, matrices porosas tridimensionales utilizadas para la regeneración tisular.

Cuando los biomateriales entran en contacto con sistemas biológicos, el organismo puede responder de una determinada forma, que puede ser dañina para el organismo. Así, los biomateriales deben ser biocompatibles, es decir, deben ser capaces de coexistir en contacto con los tejidos biológicos sin causar efectos dañinos que puedan comprometer la salud y la funcionalidad de dichos tejidos. Sin embargo, este término no tiene en cuenta el efecto que puede provocar el sistema biológico en el biomaterial, que puede ser corroído o incluso degradado, por lo que esto también se tiene que tener en cuenta en el diseño de los biomateriales [2].

En la actualidad, con el envejecimiento progresivo de la población ha surgido la necesidad de desarrollar nuevos biomateriales que utilizar en el campo de la medicina, como implantes dentales o prótesis óseas [10]. Como consecuencia, se ha buscado reproducir la estructura porosa característica de los huesos, y desde los años 70, esta búsqueda se ha centrado en el desarrollo de biocerámicas a base de alúmina ( $\text{Al}_2\text{O}_3$ ) enlazada a fosfatos y en materiales porosos a base de  $\text{Al}_2\text{O}_3\text{-CaO}$ ,  $\text{TiO}_2\text{-CaO}$  y  $\text{ZrO}_2\text{-CaO}$ , materiales que presentan una buena compatibilidad, además de estudiar el efecto del tamaño del poro del material sobre el crecimiento y la penetración del hueso [11], [12].

Por otro lado, desde los años 20 se han utilizado biocerámicas fosfatadas como el fosfato tricálcico (TCP) o la hidroxiapatita (HAp) para desarrollar prótesis óseas y dentales. Estos biomateriales despiertan un gran interés a la hora de desarrollar estas prótesis, ya que la HAp es el componente mineral principal de los huesos y al usarse en prótesis óseas se ha comprobado que produce osteogénesis, capacidad para generar tejido óseo. Al igual que la HAp, el TCP es una biocerámica fosfatada que cuando se utiliza para generar andamios

porosos que imitan la estructura ósea, se ha observado que es un biomaterial bioactivo y biocompatible, es decir, que al entrar en contacto con el organismo provocan una respuesta adecuada. Por ello, es un biomaterial ideal para su uso en el desarrollo de prótesis óseas, ya que promueve la generación de osteocitos [13].

#### 1.1.1 Clasificación de los biomateriales

A lo largo de su historia, los biomateriales han sido clasificados atendiendo a diferentes criterios: ya sea según la evolución que han sufrido, según la respuesta que provocan en el organismo o según su naturaleza [2].

Los biomateriales se pueden clasificar según su evolución y la respuesta que provocan al entrar en contacto con el organismo:

- **Materiales de 1ª generación:** estos materiales son bioinertes, no provocan respuesta alguna en el organismo, y entre ellos se encuentran materiales con buena disponibilidad industrial pero que no han sido desarrollados específicamente para el campo de la biomedicina, tales como algunas aleaciones metálicas y cerámicas con buena resistencia al desgaste.
- **Materiales de 2ª generación:** estos materiales son bioactivos, al entrar en contacto con el organismo, interactúan de manera que se genera una interfaz entre el material y el tejido. Entre ellos se encuentran los fosfatos de calcio y el biovidrio.
- **Materiales de 3ª generación:** en esta generación los biomateriales tienen como principal objetivo la estimulación regenerativa de los diferentes tejidos, mediante la ingeniería de tejidos y el uso de *scaffolds*, andamios reabsorbibles que se utilizan para la regeneración tisular por sus propiedades de adhesión y proliferación celular.

Los biomateriales también se han clasificado de acuerdo con su naturaleza en: metales, como acero inoxidable o aleaciones de distintos metales que se utilizan para reemplazar o fijar huesos y como implantes dentales; cerámicas, biomateriales con unas características que las hacen ideales para su uso como implantes óseos y dentales, y como válvulas artificiales;

polímeros, macromoléculas utilizadas en la sustitución de tejidos blandos, en aplicaciones médicas temporales como suturas reabsorbibles, y también como *scaffolds*; y materiales compuestos, constituidos por diferentes materiales cuyas estructuras determinan las características del material. Se pueden utilizar como implantes dentales, cemento óseo o implantes ortopédicos [2], [10].

Un biomaterial ideal debería cumplir las siguientes características:

- Biocompatibilidad y bioactividad
- Estabilidad química y biológica
- Propiedades mecánicas adecuadas
- Peso y densidad adecuados
- Coste bajo, de fácil producción y reproducibilidad

En general, las ventajas que presentan los biomateriales justifican su utilización en diferentes aplicaciones en el campo de la biomedicina. Sin embargo, los biomateriales también presentan desventajas. Principalmente, los biomateriales están limitados por no poder repararse a sí mismos y por no poder autorregenerarse, capacidad con la que sí cuentan los tejidos en los que se implantan. Además, no se puede controlar la respuesta mecánica de los materiales frente a las necesidades puntuales del organismo, capacidad que sí presentan los implantes basados en autoinjertos [2].

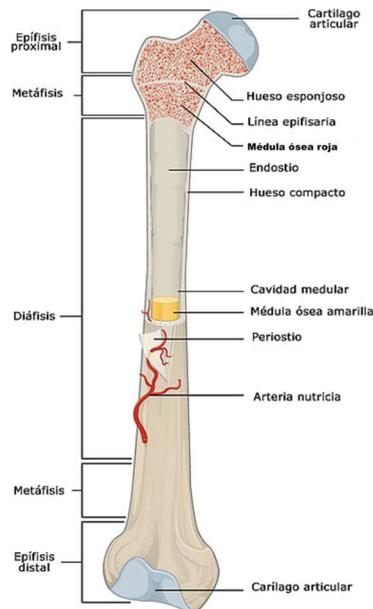
Así, es importante conocer la estructura anatómica del hueso para entender la importancia de la porosidad de estos tejidos y así poder trasladarla correctamente a los biomateriales que serán utilizados como prótesis o implantes óseos, particularmente a las biocerámicas basadas en fosfatos cálcicos, que presentan un tratamiento ante fracturas menos invasivo, ya que el material se reabsorbe a medida que el hueso crece, por lo que se necesitan menos intervenciones quirúrgicas [14].

### 1.1.2 Anatomía ósea

El esqueleto humano constituye alrededor del 18% del peso total del organismo, y desempeña varias funciones esenciales: brinda soporte a los demás tejidos, protege los órganos internos, permite el movimiento de los músculos esqueléticos, sirve como almacenamiento de minerales y contiene la médula ósea roja, que produce glóbulos rojos, y la médula ósea amarilla, que almacena triglicéridos.

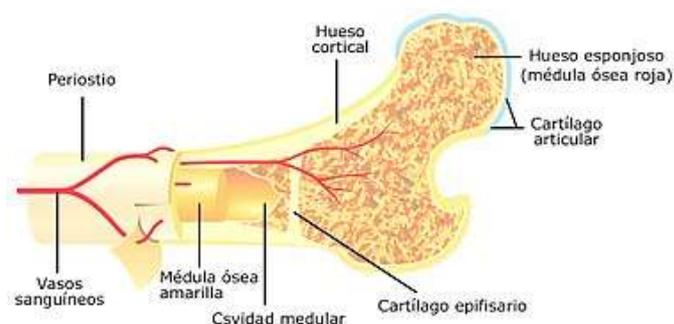
La estructura general de los tejidos óseos a nivel macroscópico está compuesta por las siguientes partes (Figura 1):

- La **diáfisis**, el cuerpo del hueso.
- Las **epífisis**, terminaciones proximal y distal del hueso
- Las **metáfisis**, regiones de hueso maduro donde se unen las dos partes anteriores.
- El **cartílago articular**, capa fina de cartílago que envuelve el lugar donde un hueso se une con otro.
- El **periostio**, vaina dura de tejido conectivo denso que cubre la superficie ósea en las zonas no envueltas en cartílago. Se encarga de proteger al hueso, ayudándolo en la reparación de fracturas y en la nutrición de los tejidos óseos, además de servir como punto de inserción a los diferentes ligamentos y tendones.
- La **cavidad medular**, espacio dentro de la diáfisis que alberga la médula ósea.
- El **endostio**, fina membrana que rodea y aísla la cavidad medular.



**Figura 1.** Anatomía de un fémur.

Sin embargo, la estructura interna del hueso es muy diferente a su estructura externa (Figura 2). Por dentro, los huesos presentan una red de poros pequeños que permiten la irrigación sanguínea de todo el tejido óseo. Alrededor del 80% del tejido óseo está constituido por hueso compacto o cortical, que presenta pocos espacios abiertos y proporciona la solidez característica del esqueleto humano. Por otro lado, el tejido óseo esponjoso o hueso trabecular constituye el 20% del esqueleto y como consecuencia, la red de poros que lo constituye le hace ser más ligero que el tejido compacto [14].

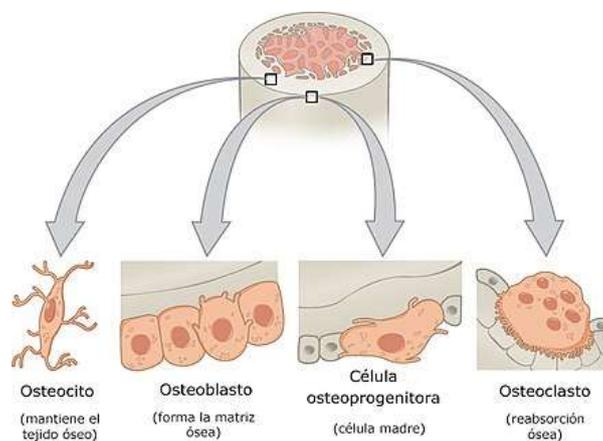


**Figura 2.** Corte transversal de un fémur.

Es importante recalcar que a medida que pasa el tiempo, el tejido óseo envejece y se desgasta, pierde masa a medida que pierde minerales, y se vuelve frágil debido a una síntesis proteica reducida, aumentando su susceptibilidad a las fracturas.

Por otro lado, la estructura microscópica del tejido óseo está compuesta por una serie de células diferentes aisladas las unas de las otras por una abundante matriz extracelular (Figura 3). El tejido óseo presenta 4 tipos de células diferentes:

- Células osteogénicas, células madre mesenquimales.
- Osteoblastos, células que se encargan de generar nuevo tejido óseo.
- Osteocitos, células principales del hueso encargadas de mantener su nutrición diaria.
- Osteoclastos, se encargan de la descomposición de la matriz osteoide o resorción, parte normal del crecimiento, mantenimiento y reparación del tejido óseo.



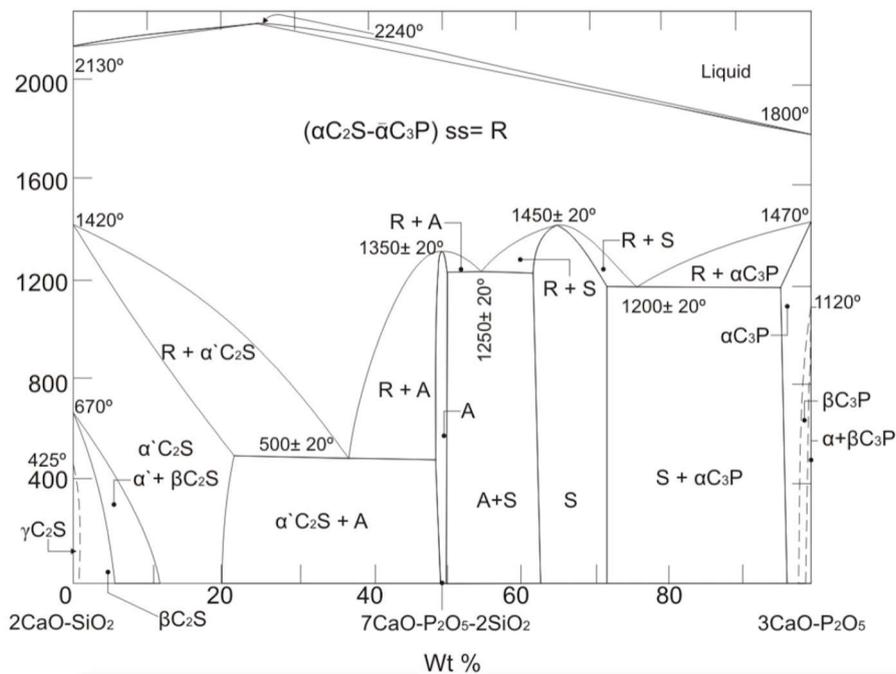
**Figura 3.** Tipos celulares en el tejido óseo.

Así, la matriz extracelular o matriz osteoide se compone principalmente de agua y sales minerales cristalizadas, como el TCP ( $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ) y el hidróxido de calcio ( $\text{Ca}(\text{OH})_2$ ), que al combinarse producen cristales de HAp, componente mineral principal del tejido óseo [14].

### 1.1.3 Sistema $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ – $\text{Ca}_2\text{SiO}_4$

A la hora de diseñar una biocerámica se ha de tener en consideración su composición, sus fases y su microestructura, información que puede ser obtenida a partir de los diagramas de equilibrio de fases de los materiales. Estos diagramas son representaciones gráficas de las condiciones termodinámicas de equilibrio de un sistema y permiten conocer el

comportamiento, las fases en equilibrio y la estructura del material según su composición y la temperatura a la que esté el sistema.



**Figura 4.** Diagrama de fases del sistema  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2\text{-Ca}_2\text{SiO}_4$  corregido por *Fix y col.*

El sistema  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2\text{-Ca}_2\text{SiO}_4$  es un sistema binario isobárico cuyos primeros estudios fueron publicados en el año 1959 por *Nurse y col.* [15]. Posteriormente, en 1969 fue corregido por *Fix y col.* [16] (Figura 4), donde se definieron por primera vez dos compuestos intermedios que funden congruentemente: la fase A con formulación  $7\text{CaO-P}_2\text{O}_5\text{-2SiO}_2$  y la silicocarnotita con formulación  $5\text{CaO-SiO}_2\text{-P}_2\text{O}_5$ . En este estudio también se definieron tres puntos eutéctoides, que posteriormente han sido modificados por nuestro grupo de investigación del Instituto de Bioingeniería de la Universidad Miguel Hernández: el primero, a una temperatura de  $518\text{ °C} \pm 6\text{ °C}$  y una composición del 31% de TCP y un 69% de silicato dicálcico ( $\text{C}_2\text{S}$ ) [17], el segundo, a una temperatura de  $1158\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$  y una composición del 83% de TCP y 17%  $\text{C}_2\text{S}$  [18], y el tercero, a una temperatura de  $1366\text{ °C} \pm 8\text{ °C}$  y una composición del 59,5% de TCP y 40,5%  $\text{C}_2\text{S}$  [19].

Dentro de este sistema también podemos encontrar la fase R, una solución sólida formada por  $\alpha\text{C}_2\text{S}$  y  $\alpha'\text{TCP}$  que se puede encontrar a lo largo de todo el diagrama. Esta fase se pretende estudiar y caracterizar utilizando la composición que se corresponde con el punto eutéctico

de más baja temperatura, 31% de TCP y 69% C<sub>2</sub>S. Este punto eutectoide se encuentra a una temperatura de 518 °C ± 6 °C, por debajo de la cual la fase R se transforma en α'C<sub>2</sub>S y fase A.

## 1.2 Estudio *in vitro* de la bioactividad con suero fisiológico artificial

El suero fisiológico artificial (SFA) o *simulated body fluid* (SBF) en inglés, fue introducido por primera vez en 1990 por Kobuko y col., cuando se demostró que una solución con una fuerza iónica similar a la del plasma humano reproducía alteraciones superficiales *in vivo* en estudios *in vitro* con vitrocerámicas [20]. En la superficie de estas cerámicas se acumulaba HAp, principal componente mineral óseo que permitía la unión *in vivo* de estas cerámicas al hueso. Así, se determinó que una manera de estudiar la bioactividad ósea *in vivo* de un material era la capacidad de formar apatita *in vitro* en presencia de SFA.

Ión	Concentración iónica (mM)	
	Plasma sanguíneo	SFA
Na <sup>+</sup>	142,0	142,0
K <sup>+</sup>	5,0	5,0
Mg <sup>2+</sup>	1,5	1,5
Ca <sup>2+</sup>	2,5	2,5
Cl <sup>-</sup>	103,0	147,8
HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	27,0	4,2
HPO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	1,0	1,0
SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	0,5	0,5
pH	7,2-7,4	7,40

**Tabla 1.** Concentración iónica plasma sanguíneo frente a SFA.

El SFA está compuesto de una serie de iones que simulan la concentración encontrada en el plasma sanguíneo (Tabla 1). Estos iones se obtienen a partir de sales, como NaCl, KCl o CaCl<sub>2</sub>, que pueden estar hidratadas o no. Además, en su preparación se utiliza ácido clorhídrico (HCl) y tampón Tris (HOCH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>CNH<sub>2</sub> para realizar un ajuste del pH y que sea lo más parecido al pH

fisiológico, que varía de 7,2 a 7,4. El proceso de preparación del fluido se realiza a temperatura corporal ( $36,5 \pm 0,5$  °C) [21].

Por otro lado, se ha demostrado que existe una relación directa entre la cantidad de apatita que se forma en la superficie del material en contacto con el SFA y la capacidad de unión del material al hueso *in vivo*. En concreto, se ha visto que el TCP presenta una capa de apatita *in vitro* y es capaz de unirse a la materia ósea *in vivo*, de manera que a medida que pasa el tiempo aumenta la cantidad de apatita precipitada sobre su superficie y, por lo tanto, su bioactividad ósea *in vivo* [22].

Este método permite realizar análisis *in vitro* que predicen la capacidad del material de unirse a la materia ósea *in vivo*, lo que conlleva una serie de ventajas: el coste de los experimentos *in vitro* es más reducido que los experimentos *in vivo*, y no es necesario utilizar animales en el estudio. Por lo tanto, se pretende utilizar este ensayo *in vitro* para determinar la bioactividad de la fase R preparada.

### **1.3 Métodos para la producción de matrices porosas**

La ingeniería de tejidos es una disciplina capaz de producir tejidos viables para la implantación en el organismo, donde se puede recuperar la funcionalidad del tejido u órgano dañado. Sin embargo, esta disciplina aún tiene bastantes retos que superar, como el tratamiento de lesiones óseas. Para su tratamiento se utilizan matrices tridimensionales porosas o *scaffolds*, que sirven como andamiaje para las células y además promueven su regeneración. Estas matrices deben presentar una serie de características para poder ser utilizadas en el tratamiento de lesiones óseas [23]:

- Osteogénesis: capacidad de generar tejido óseo.
- Osteoconducción: capacidad del biomaterial para promover el crecimiento del tejido desde los márgenes del defecto, que reabsorbe progresivamente la matriz implantada a medida que va creciendo.

- Osteoinducción: capacidad de un material para estimular la transformación fenotípica de células indiferenciadas en osteoblastos.
- Osteopromoción: capacidad de promover los procesos naturales que intervienen en la reparación de la lesión ósea.

Se han desarrollado varios métodos para la producción de matrices tridimensionales porosas, como el *fiber-bonding* [24], el colado de sólidos en combinación con el lixiviado de partículas [25], el *foaming* gaseoso [26], la separación de fases [27], la liofilización [28], la impresión 3D [29] y el uso de porógenos [30], entre otros.

Sin embargo, la técnica más utilizada en la fabricación de materiales cerámicos porosos es el método de la esponja polimérica. Este método fue patentado por primera vez por Schwartzwalder en 1963 [31]. Según este método, una esponja polimérica, por ejemplo, de poliuretano (PU), con estructura porosa sirve como andamiaje para una suspensión cerámica, que reproduce su estructura. Se ha visto que con este método se pueden obtener cerámicas porosas con un tamaño de poro controlable y diferentes formas adaptadas a las aplicaciones deseadas [32], por lo que es un buen método para diseñar biomateriales cerámicos que promuevan la osteogénesis.

Este método se ha utilizado para desarrollar esponjas porosas de materiales cerámicos como hidroxapatita [33], la alúmina ( $\text{Al}_2\text{O}_3$ ) [34], TCP [35], nanotubos de plata y wollastonita [36], o de titanio [37] entre otros.

## 2. Objetivos

El objetivo principal de este estudio es el análisis, la síntesis y la caracterización de andamios cerámicos bioactivos monofásicos preparados a partir de una composición eutectoide predeterminada de TCP y C<sub>2</sub>S a alta temperatura.

Para cumplir este objetivo general, se plantean los siguientes objetivos específicos:

- Obtención y caracterización de la cerámica compuesta por fase R.
- Estudio de la fase R mediante técnicas de caracterización: difracción de rayos X (DRX), microscopía electrónica de barrido (MEB), microanálisis de energía dispersiva de rayos X (MED-RX) y detección del tamaño de partícula.
- Preparación de los andamios porosos de fase R mediante el método de réplica de esponja polimérica.
- Estudio de las matrices porosas de fase R mediante técnicas de caracterización: DRX, MEB, MED-RX, porosimetría de mercurio y espectroscopía de infrarrojos por transformada de Fourier.
- Determinación de la bioactividad ósea de los andamios porosos preparados con fase R, mediante estudios *in vitro* con SFA y el posterior análisis del suero mediante espectroscopía óptica de emisión de plasma acoplado inductivamente (EOE-PAI).

### **3. Materiales y Métodos**

#### **3.1 Técnicas de síntesis y procesamiento**

##### **3.1.1 Preparación y homogeneización de la fase R**

Para preparar la fase R, primero se han mezclado diferentes cantidades de  $\text{CaCO}_3$ ,  $\text{CaHPO}_4$  y  $\text{SiO}_2$  para así obtener una composición del 31% de TCP y un 69% de  $\text{C}_2\text{S}$  mediante una reacción en estado sólido. Las cantidades necesarias para obtener esta composición se han obtenido mediante una mezcla estequiométrica de los reactivos comerciales anteriormente mencionados.

Esta preparación se ha mezclado con acetona para facilitar su homogeneización, y luego se ha evaporado la acetona en un proceso de secado en estufa a una temperatura de 60 °C hasta la completa evaporación del disolvente. Este proceso se ha repetido tres veces para una homogeneización óptima.

##### **3.1.2 Prensado isostático**

El material homogeneizado se ha introducido en el interior de un tubo flexible de goma de látex, de manera que ha quedado un tubo compacto sellado por ambos lados con hilo, que luego se ha introducido en una prensa. En la prensa, una bomba manual ha aumentado la presión isostática que se ha aplicado al material para así compactarlo. Este prensado isostático viene definido por el teorema de Pascal [38], por el cual se consigue compactar el material aplicando una presión uniforme sobre toda la superficie del material. Las muestras se han prensado a una presión de 140 MPa durante 20 minutos.

La prensa utilizada está formada por un cierre superior, una válvula de presión, una bomba de diafragma, un tanque de almacenamiento de fluido y un elevador neumático (Figura 5). La prensa empleada es de la empresa ASTUR SINTER S. L., con una bomba manual de la empresa ENERPAC, modelo 11-400 A 1204 C. E.



**Figura 5.** Prensa isostática ENERPAC, modelo 11-400 A 1204 C. E.

### 3.1.3 Tratamiento térmico

Se han realizado 3 tratamientos térmicos diferentes, que difieren en el tiempo, en el objetivo y en la temperatura del tratamiento.



**Figura 6.** Horno ENTECH utilizado en los tratamientos térmicos.

Los diferentes tratamientos térmicos se han realizado en un horno de alta temperatura ENTECH Jumo Imago 500 (Figura 6) con plataforma elevadora y carcasa externa de acero laminar y tubular. La cámara del horno está formada por un doble muro con hueco de aire para reforzar su circulación entre las dobles paredes y puede alcanzar una temperatura máxima de 1650 °C. Además, el horno posee un sistema electrónico de programación para la regulación automática de la temperatura.

### 3.1.4 Molido

El material se ha molido primero de forma manual en un mortero de ágata y en un molino vibratorio Retsch MM 301 (Figura 7), que utiliza bolas de zirconio de 20 mm de diámetro para moler el material en suspensión de isopropanol en dos cubetas de 25 ml de capacidad.

El material se ha molido gracias a una serie de vibraciones radiales que se producen en el plano horizontal y que provocan colisiones entre las bolas de zirconio, el material y las paredes de las cubetas. El molino se ha programado para moler el material durante 3 minutos a una frecuencia de 15 Hz.



**Figura 7.** Molino mezclador de bolas Retsch MM 301.

Se ha utilizado también el molino planetario Retsch PM 100 (Figura 8) para moler el material durante un determinado periodo de tiempo, de modo que el rango de tamaño de las partículas resultante sea homogéneo y del menor tamaño posible. Este molino cuenta con una cubeta de 50 ml de capacidad en la que se introduce el material suspendido en isopropanol y 3 bolas de zirconio de 20 mm de diámetro para su molienda.



**Figura 8.** Molino planetario Retsch PM 100.

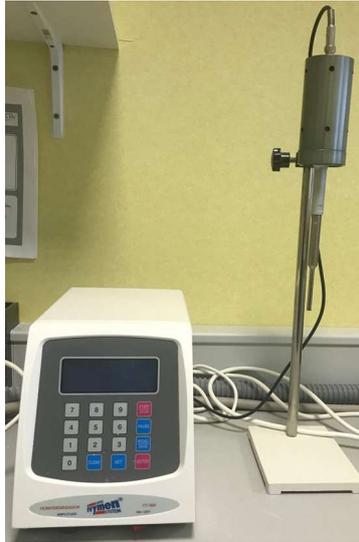
### 3.1.5 Método de réplica de esponjas poliméricas

Este método se ha utilizado para preparar los andamios cerámicos objeto del estudio. Así, se sumerge la matriz polimérica de PU en una suspensión de la cerámica previamente preparada. A continuación, se desecha el exceso de suspensión, en nuestro caso, con el uso de aire comprimido, y se deja secar. Posteriormente, se somete a la esponja impregnada ya seca, a un tratamiento térmico con el objetivo de eliminar el polímero y sinterizar el material cerámico, que tendrá la estructura porosa del polímero esponjoso previamente eliminado.

Durante este proceso es de vital importancia controlar la reología de la suspensión cerámica a impregnar, por lo que se utilizan determinados aditivos como son los dispersantes o defloculantes (como silicato de sodio, en nuestro caso Dolapix CE64) y los aglutinantes o floculantes, principalmente compuestos orgánicos como la carboximetil celulosa de sodio (CMC) y en nuestro caso Optapix PAF35, polímero soluble en agua que agrupa las partículas de la cerámica, aumentando la viscosidad de la suspensión y la resistencia mecánica de la estructura.

### 3.1.6 Homogeneización por ultrasonidos

La homogeneización por ultrasonidos se ha empleado con el objetivo de desagrupar y dispersar las partículas sólidas presentes en la suspensión cerámica utilizada en el método de la esponja polimérica. Se ha utilizado un homogeneizador por ultrasonidos modelo CY-500 de COMECTA SA (Figura 9), compuesto por generador de ultrasonidos y un transductor de señales acoplado.



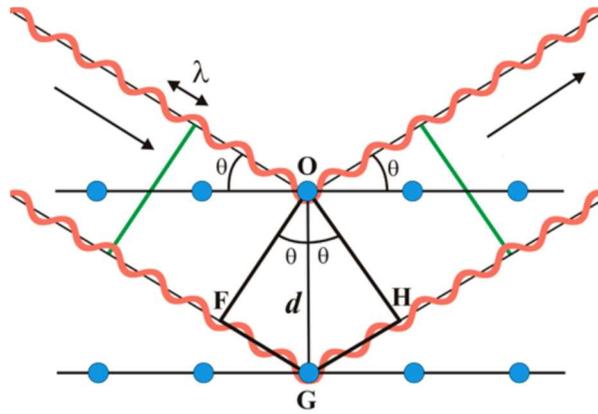
**Figura 9.** Homogeneizador por ultrasonidos modelo CY-500 de COMECTA SA.

El generador de ultrasonidos transforma la corriente eléctrica de 220V/50 Hz en energía ultrasónica de 20 KHz, para alimentar al transductor ultrasónico, que provoca una deformación elástica que se traduce en una vibración mecánica longitudinal. Esta vibración a su vez produce un efecto de cavitación en la sonda inmersa en la solución. La cavitación genera burbujas que al implosionar liberan gran cantidad de energía capaz de romper los aglomerados de partículas de la suspensión [39]. En concreto, el homogeneizador se ha programado para que emitiera pulsos intermitentes de ultrasonidos de 2 segundos, con 2 segundos de descanso entre pulsos, con una homogeneización de 10 pulsos.

### **3.2 Técnicas de caracterización**

#### **3.2.1 Difracción de Rayos X**

Los rayos X son un tipo de radiación electromagnética muy energética y de longitud de onda corta. Al incidir sobre un material sólido, parte del haz de rayos X se dispersa en todas direcciones al colisionar con los electrones de los átomos del material (Figura 10).

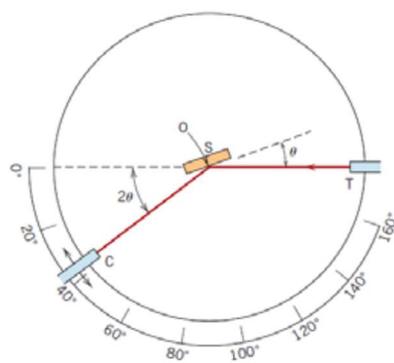


**Figura 10.** DRX sobre dos planos atómicos.

Cuando dos planos paralelos de átomos separados por una distancia  $d_{hkl}$  con los mismos índices de Miller  $h$ ,  $k$  y  $l$  son irradiados con un haz de rayos X con longitud de onda  $\lambda$  se producen dos haces dispersados con un ángulo de difracción  $\theta$ , que será el mismo para ambos haces siempre que la diferencia de recorrido entre los haces equivalga a un número entero  $n$  de longitud de onda  $\lambda$  [40]. Para que se produzca este fenómeno de difracción, se tiene que cumplir la ley de Bragg, que viene descrita por la ecuación 1:

$$n\lambda = 2d_{hkl} \cdot \text{sen}\theta \quad (1)$$

Esta técnica se utiliza para caracterizar estructuras cristalinas, que primero se pulverizan para luego ser expuestas a la radiación. Los ángulos de difracción se determinan mediante un difractómetro, que recoge el ángulo que describe el haz de rayos X difractado al incidir sobre una muestra colocada sobre una lámina plana que gira sobre un eje (Figura 11, izquierda).



**Figura 11.** Principio de funcionamiento de un difractómetro (izquierda) y difractómetro de rayos X D8 ADVANCE, BRUKER AXS (derecha).

Los rayos X se generan en el punto T y al difractarse se detectan con el contador C. La muestra y el contador están acoplados mecánicamente de acuerdo con la geometría focalizadora de Bragg-Brentano, de manera que cuando la muestra rote  $\theta$  ángulos, el contador registre una rotación de  $2\theta$  [41]. Para llevar a cabo esta técnica, en esta investigación se ha utilizado el difractómetro D8 ADVANCE de BRUKER AXS (Figura 11, derecha).

### 3.2.2 Detección del tamaño de partícula

Esta técnica se ha utilizado para medir el tamaño y la distribución de frecuencia de las partículas del material cerámico sintetizado, para así poder determinar qué tiempo de molienda nos proporciona un rango de tamaño de partículas homogéneo y lo más pequeño posible, ya que la granulometría de la fase R puede influir sobre sus propiedades físicas.

Para llevar a cabo esta técnica, se utilizó un difractómetro láser MASTERSIZER 2000 modelo APA2000 de MALVERN INSTRUMENTS (LTD) (Figura 12), equipo que utiliza la difracción de la luz de un láser para analizar la distribución y el tamaño de las partículas de la muestra sintetizada. Cuando el haz del láser incide sobre las partículas, se genera una dispersión de luz con un ángulo determinado que depende del diámetro de dichas partículas. Por tanto, diferentes tamaños de partículas producen diferentes patrones de luz, que quedan registrados por sensores fotosensibles que traducen este patrón de luz a su tamaño de partícula correspondiente.



**Figura 12.** Difractómetro láser MASTERIZER 2000 modelo APA2000 de MALVERN INSTRUMENTS (LTD).

Este equipo dispone de una fuente de luz azul LED de 0,3 mW y un láser de He-Ne de 4mW, que permite determinar tamaños de partículas entre 0,02 y 2000  $\mu\text{m}$  en periodos de tiempo muy cortos y con buena reproducibilidad y precisión. La muestra ha sido analizada tres veces para luego calcular la media aritmética y así reducir el error que pueda haber a la hora de medir.

### 3.2.3 Microscopía electrónica de barrido (MEB) y Microanálisis de energía dispersiva de rayos X (MED-RX)

Para poder observar cualquier muestra mediante MEB, se requiere que la superficie de esta sea conductora. Así, para que los andamios porosos preparados anteriormente presenten una superficie conductora, es necesario recubrirlos de un metal, en nuestro caso, estos andamios porosos han sido recubiertos de paladio (Pd).



**Figura 13.** Recubridor Polarion (modelo SC7640, Quorum Technologies).

En este estudio se ha utilizado el recubridor Polarion modelo SC7640, de Quorum Technologies (Figura 13). De este modo, los andamios a recubrir se han colocado en un portamuestras metálico mediante una cinta adhesiva de carbono. Este portamuestras se ha colocado en el recubridor de Pd, donde se ha creado una atmósfera inerte con gas argón (Ar). En el recubridor, se ha bombardeado la muestra con paladio mediante un sistema de “*Sputtering*” de plasma.

Para determinar la microestructura y la composición química de los andamios cerámicos preparados, se han utilizado las técnicas de MEB y la espectroscopía de dispersión de rayos X.

La MEB utiliza un haz de electrones acelerados que recorre la superficie de la muestra para así crear una imagen. Esta técnica tiene una gran profundidad de campo, por lo que puede enfocar gran parte de la muestra a la vez, y genera imágenes de alta resolución. La técnica se realiza en vacío para evitar efectos de apantallamiento electrónico.

El haz de electrones se encuentra acelerado generalmente entre los 20 kV y los 40 kV de voltaje, y su resolución entre los 20 y 50 Å. Cuando este haz de electrones acelerado incide sobre la muestra se producen varios haces de electrones diferentes: haz de electrones secundarios y haz de electrones retrodispersados. Los electrones secundarios se forman debido a la ionización atómica causada por el haz electrónico primario, mientras que los electrones retrodispersados se forman cuando el haz primario rebota sobre la superficie de la muestra. Esta emisión de electrones se recoge mediante detectores muy sensibles que traducen la información en una imagen topográfica de la superficie de la muestra [42].

Por otro lado, el detector de rayos X acoplado a este sistema también permite analizar la muestra por espectroscopía de dispersión de rayos X, técnica que permite analizar la composición química de la muestra. En este método, un haz de rayos X incide sobre la superficie de la muestra, y hace que un electrón de capa interna se desprenda de su sitio. Al quedar este sitio vacío, otro electrón de una capa más externa se mueve para llenarlo y la diferencia energética del proceso provoca la emisión de un rayo X que queda registrado por un detector. Cada elemento químico presenta una estructura atómica característica, por lo que mediante las emisiones de rayos X característicos podemos conocer la composición química del material analizado [43].



**Figura 14.** MEB SEM-HITACHI S-3500N y MED-RX OXFORD LINK ANALITICAL.

En este estudio se ha utilizado el MEB modelo S-3500 de HITACHI para la caracterización de los andamios cerámicos preparados, con un poder de resolución de 30 Å y un detector de rayos X OXFORD LINK ANALYTICAL acoplado (Figura 14).

#### 3.2.4 Porosimetría de mercurio

La porosimetría de mercurio (Hg) es una técnica utilizada para la determinación de diferentes aspectos cuantificables de un material poroso, como son el diámetro de poro, el volumen total de poro, el área de superficie y las densidades aparente y absoluta. Este método utiliza un líquido no humectante, en este caso Hg, que es introducido a alta presión en un material poroso mediante un porosímetro.

El tamaño del poro se puede determinar según la presión externa que se necesita para introducir el mercurio en un poro frente a la fuerza contraria que ejerce la tensión superficial del líquido, y está descrito por la ecuación de Washburn (Ecuación 2), por la que  $d$  es el diámetro del poro,  $\gamma$  es la tensión superficial del mercurio,  $\theta$  es el ángulo de contacto entre el mercurio y el material y  $P$  es la presión aplicada al introducir el mercurio en el poro.

$$d = \frac{4\gamma \cdot \cos\theta}{P} \quad (2)$$

La porosimetría de mercurio se ha llevado a cabo en un equipo POREMASTER-60 de Quantachrome Instruments (Figura 15), el cual dispone de dos estaciones en baja presión y dos en alta presión hasta un máximo de 60.000 psi [44].



**Figura 15.** Poremaster-60 GT de Quantachrome Instruments

### 3.2.5 Espectroscopía óptica de emisión de plasma acoplado inductivamente (EOE-PAI)

Esta técnica permite determinar de forma cuantitativa y con una alta sensibilidad la concentración de cualquier elemento químico presente en una disolución acuosa. Esta disolución acuosa es transportada mediante una bomba peristáltica hasta un sistema nebulizador, donde es vaporizada por acción del gas argón. La muestra ya vaporizada se ioniza mediante un plasma generado al someter un flujo de gas argón a la acción de un campo magnético oscilante inducido por una corriente de alta frecuencia, que puede alcanzar temperaturas de hasta 10.000 K. Así, los átomos de la muestra se ionizan, y al volver a su estado inicial, emiten radiaciones de una longitud de onda propia de cada elemento.

La radiación emitida se registra y se separa en función de la longitud de onda de cada emisión, comparándola con patrones de referencia e identificando los elementos químicos presentes en la disolución inicial. Por último, un detector analiza la intensidad de cada espectro y la relaciona con la concentración de cada elemento presente en la muestra [45]. En este caso se utilizó el espectrómetro serie iCAP™ 7000 Plus de Thermo Scientific (Figura 16).



**Figura 16.** Espectrómetro serie iCAP™ 7000 Plus de Thermo Scientific.

### 3.2.6 Espectroscopía de infrarrojos por transformada de Fourier (FTIR-ATR)

La espectroscopía de radiación infrarroja es una técnica que se basa en las interacciones existentes entre la radiación electromagnética infrarroja y la materia, ya sea por emisión, absorción o reflexión. Esta técnica se utiliza para analizar e identificar químicamente sustancias líquidas, sólidas y gaseosas. Estas sustancias se irradian con radiación infrarroja y, en consecuencia, emiten una vibración que es característica de su estructura química y de su geometría molecular. Además, la intensidad de las bandas de absorción está relacionada con la concentración del elemento químico presente en la muestra.

Cuando la muestra se irradia con rayos infrarrojos, absorbe energía y pasa a un estado energético mayor, en el que las moléculas vibran y rotan de manera característica. Las moléculas pueden vibrar de modo que produzcan oscilaciones que entren en resonancia con el haz de infrarrojos, como el modo de tensión, caracterizado por diferencias en la distancia entre átomos, o el modo de deformación, caracterizado por cambios en los ángulos de los enlaces. Así, el tipo de enlace entre átomos, el entorno químico y la concentración de dichos

enlaces influyen en el espectro de absorción producido, que es característico de cada molécula. Una vez registrados los espectros de absorción, se pueden comparar con patrones referencia previamente registrados para así identificar la estructura química de nuestra muestra.



**Figura 17.** Espectrómetro Thermo Scientific Nicolet iS5.

Para obtener el espectro infrarrojo fue empleado un espectrómetro Thermo Scientific Nicolet iS5 (Figura 17), equipado con un accesorio ATR iD5, con una resolución de  $4\text{cm}^{-1}$  e intervalo espectral de medición de  $4000\text{-}500\text{ cm}^{-1}$  [46]

### **3.3 Ensayos de bioactividad *in vitro* con suero fisiológico artificial (SFA)**

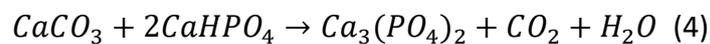
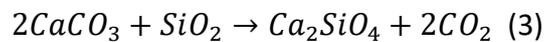
Para determinar la bioactividad de los andamios porosos preparados se ha utilizado SFA en un estudio *in vitro* en el que se ha analizado la precipitación de HAp, principal componente mineral óseo, sobre la superficie de la matriz cerámica, que ha sido sumergida en un suero que reproduce las concentraciones iónicas del plasma sanguíneo.

En este estudio se ha preparado SFA de acuerdo con el protocolo descrito por *Kokubo y col.* en 2006 [21]. El proceso se realiza por completo a temperatura corporal ( $36,5 \pm 0,5\text{ °C}$ ). Una vez preparado el SFA, se sumerge el material cerámico poroso en tubos Falcon de 50 ml durante un determinado periodo de tiempo, en una cuba con agitación ultrasónica a  $37\text{ °C}$ . Al acabar este periodo de tiempo, se deja secar el material y se prepara para la observación en el MEB.

## 4. Resultados y discusión

### 4.1 Preparación y caracterización de la Fase R

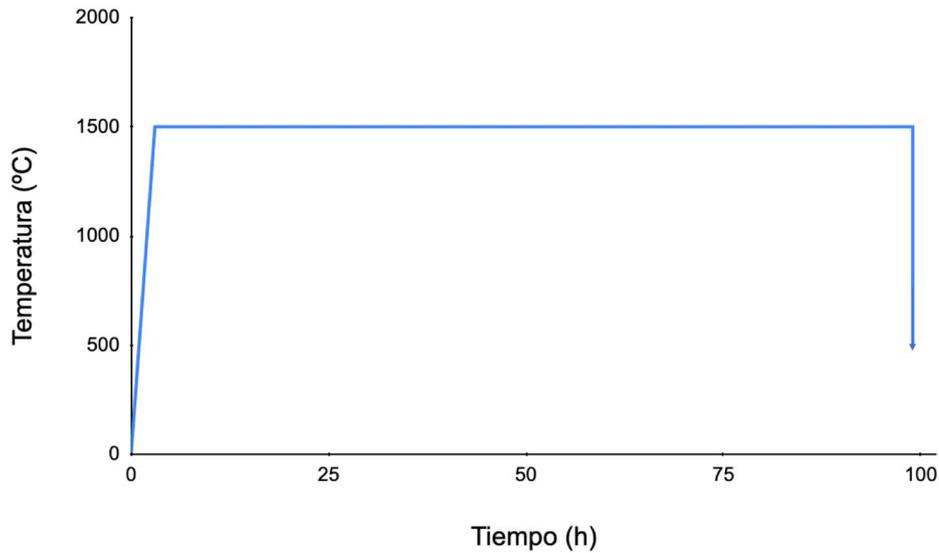
La síntesis de la fase R (solución sólida de  $\alpha\text{C}_2\text{S}-\alpha'\text{TCP}$ ) se ha llevado a cabo por reacción en estado sólido a partir de los siguientes reactivos comerciales: hidrógeno fosfato de calcio ( $\text{CaHPO}_4$ , *Acros*), carbonato de calcio ( $\text{CaCO}_3$ , *PanReac*) y dióxido de silicio ( $\text{SiO}_2$ , *Strem Chem*). A partir del diagrama de equilibrio de fases del sistema  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2\text{-Ca}_2\text{SiO}_4$ , podemos observar que la fase R se puede obtener con una concentración del 31% en peso de TCP y un 69% en peso de  $\text{C}_2\text{S}$ . Para ello se cuenta con una serie de relaciones estequiométricas descritas por las ecuaciones 3-5:



Una vez pesadas las cantidades correspondientes de los reactivos, se ha homogenizado la mezcla con acetona en una cápsula de porcelana. Una vez seco, el material se ha introducido en gomas de látex y se ha compactado mediante un prensado isostático a una presión de 140 MPa durante 20 minutos.

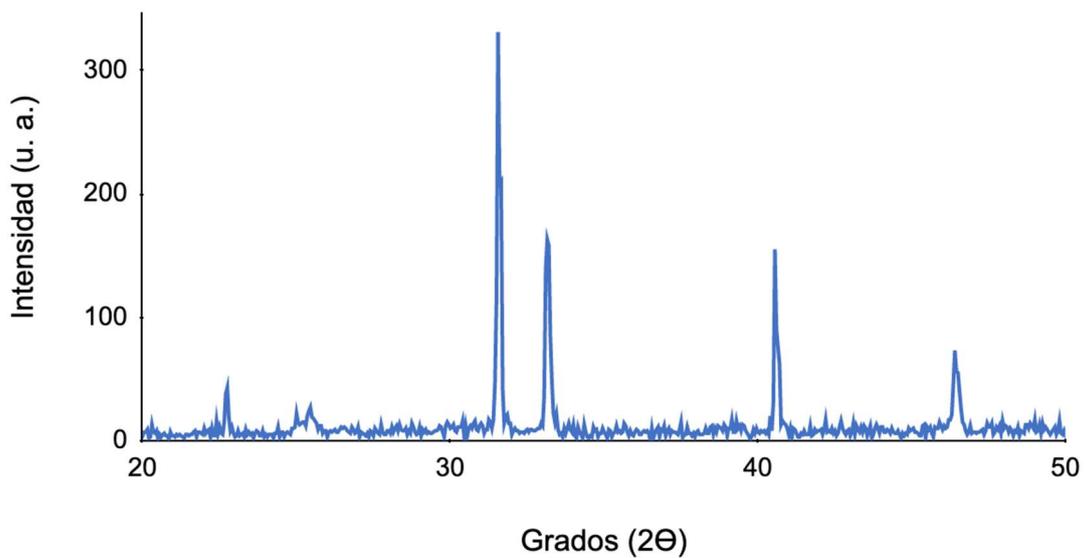
A continuación, se ha introducido el material compactado en un crisol de platino y se ha sometido al tratamiento térmico de homogeneización. Primero, se ha elevado la temperatura a 1500 °C durante 3 horas y luego se ha mantenido otras 3 horas a dicha temperatura. Al acabar, se ha realizado un enfriamiento rápido o *quenching* en nitrógeno líquido, que se encuentra a una temperatura de alrededor de -196 °C.

Una vez enfriado, se ha molido el material manualmente en un molino de ágata seguido de una molienda automática en un molino de agitación mecánica a 15 Hz durante 3 minutos suspendido con isopropanol. Una vez se ha homogeneizado el material, este se vuelve a prensar isostáticamente en gomas de látex, se introduce en un crisol de platino y se somete al tratamiento térmico descrito en la figura 18.



**Figura 18.** Tratamiento térmico de 4 días de la fase R.

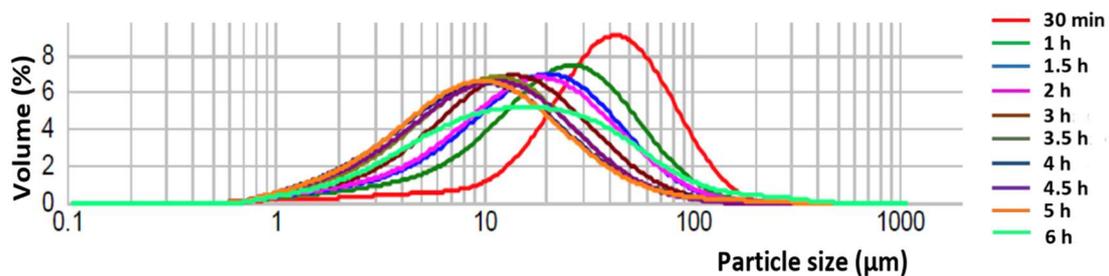
El material se ha sometido a una temperatura que ha ido aumentando hasta 1500 °C durante 3 horas, que luego se ha mantenido durante 4 días. A continuación, el material se ha enfriado rápidamente en nitrógeno líquido. En la figura 19 podemos observar la caracterización del material obtenido tras el tratamiento térmico mediante DRX, donde se observan 3 picos intensos. Estos picos se corresponden con las difracciones producidas por los componentes  $\alpha\text{C}_2\text{S}$  (Ficha JCPDS nº 01-087-1260) y  $\alpha'\text{TCP}$  (Ficha JCPDS nº 01-089-8960) presentes en la fase R, que al tratarse de una solución sólida, se encuentran desplazados ligeramente.



**Figura 19.** DRX del tratamiento térmico de 4 días realizado para preparar la fase R.

Con el objetivo de intentar aumentar la cristalinidad del material se ha realizado un tratamiento más largo a 6 días, obteniéndose resultados similares al tratamiento a 4 días, por lo que se decidió continuar realizando el tratamiento de 4 días para ahorrar tiempo.

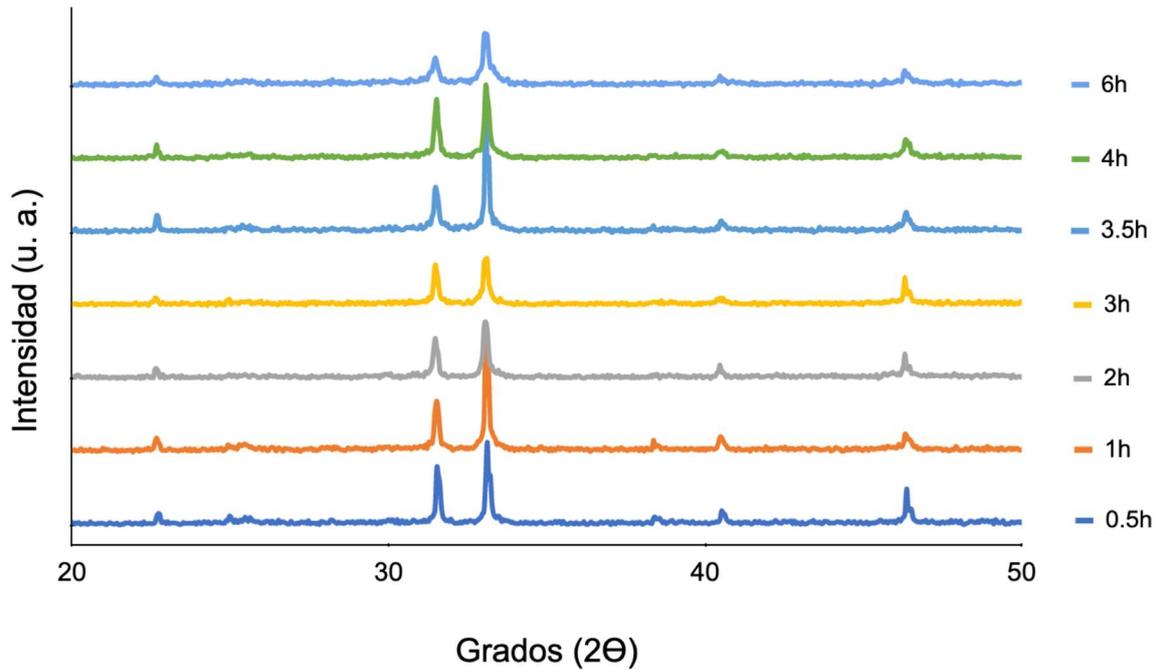
Para poder preparar los andamios cerámicos porosos mediante el método de réplica de esponja polimérica es necesario contar con un rango de tamaño de partícula homogéneo y lo más pequeño posible. Para determinar el tiempo de molienda por el cual se obtiene el tamaño de partícula deseado, se ha llevado a cabo una molienda del material de diferentes tiempos de duración en un molino planetario, a una velocidad de molienda de 300 rpm (Figura 20).



**Figura 20.** Tamaño de las partículas de la fase R durante diferentes periodos de tiempo de molienda.

En la Figura 20 podemos observar el rango de tamaño de partículas obtenido al moler la fase R durante diferentes periodos de tiempo. De este modo, se ha observado que a medida que se aumenta el tiempo de molienda el tamaño de partícula se va reduciendo y homogeneizando, siendo el primer periodo de tiempo de 30 minutos el que produce un rango de tamaño más homogéneo, pero de un tamaño mayor, de 88,41 μm. Por otro lado, el periodo de tiempo de 6 horas es el que produce un rango de partículas más heterogéneo, con un tamaño medio de 61,34 μm. Así, se ha obtenido que el rango donde el tamaño de partículas es más homogéneo y del menor tamaño posible resulta de un tiempo de molienda de 3,5h, en el que el tamaño de partícula medio es de 10,66 μm.

Además, se ha realizado un análisis por DRX de los diferentes tiempos de molienda, donde no se observan cambios significativos que puedan indicar una amorfización de la estructura cristalina de la fase R (Figura 21) [47].



**Figura 21.** DRX de los diferentes tiempos de molienda de la fase R.

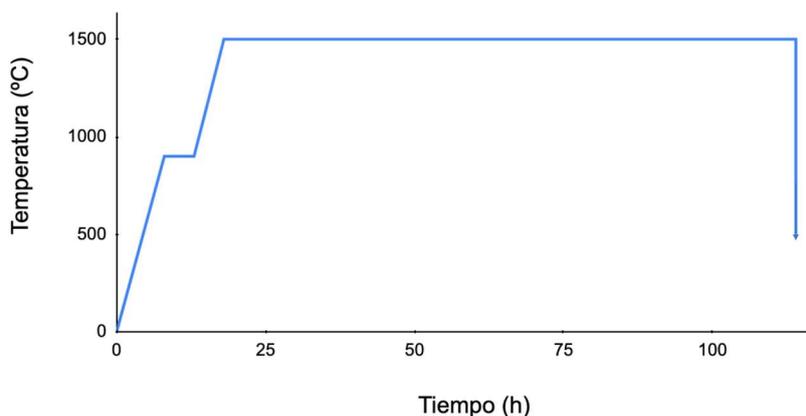
#### 4.2 Preparación y caracterización de los andamios cerámicos

A continuación, se ha procedido a la preparación de las cerámicas porosas mediante el método de réplica de esponjas poliméricas, partiendo de plantillas de PU cilíndricas de aproximadamente 7 mm de altura y 7 mm de diámetro.

Se ha preparado la suspensión cerámica de fase R en agua destilada, que se ha homogeneizado por ultrasonidos durante 10 pulsos de 2 segundos de duración, con 2 segundos entre pulsos. Seguidamente, se ha añadido varias gotas de dispersante Dolapix CE64 y varias gotas de aglutinante Optapix PAF35 para concentrar las partículas de la muestra. Por último, se ha homogeneizado el material por ultrasonidos, con el objetivo de optimizar la homogeneización de las partículas de la suspensión cerámica.

Las plantillas de PU se han sumergido en la suspensión cerámica de fase R y se ha eliminado el exceso con un compresor de aire de manera que han sido cubiertas completamente por la solución cerámica, con los poros de la esponja abiertos por el aire. Este proceso se ha repetido 4 veces y se han sumergido 20 plantillas de PU. En total, se han recubierto 4 lotes de 20 plantillas de PU.

Las matrices porosas se han dejado secar a temperatura ambiente durante 24 h, y se han sometido a un tratamiento térmico para eliminar el PU y sinterizar el material cerámico (Figura 22).

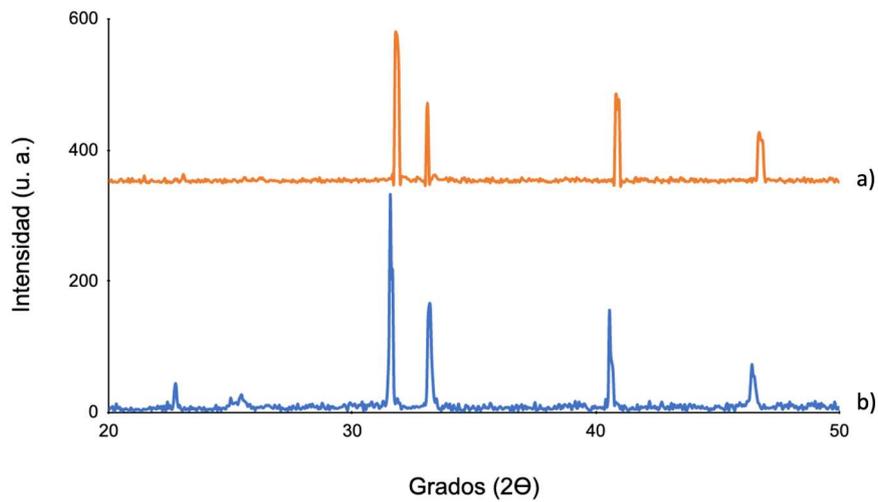


**Figura 22.** Tratamiento térmico andamios fase R.

El tratamiento que se ha llevado a cabo es similar al anterior, pero se le ha añadido una etapa adicional por la cual se ha elevado la temperatura a 900 °C durante 8 horas y luego se ha mantenido 5 horas a dicha temperatura, paso añadido para la eliminación completa del poliuretano.

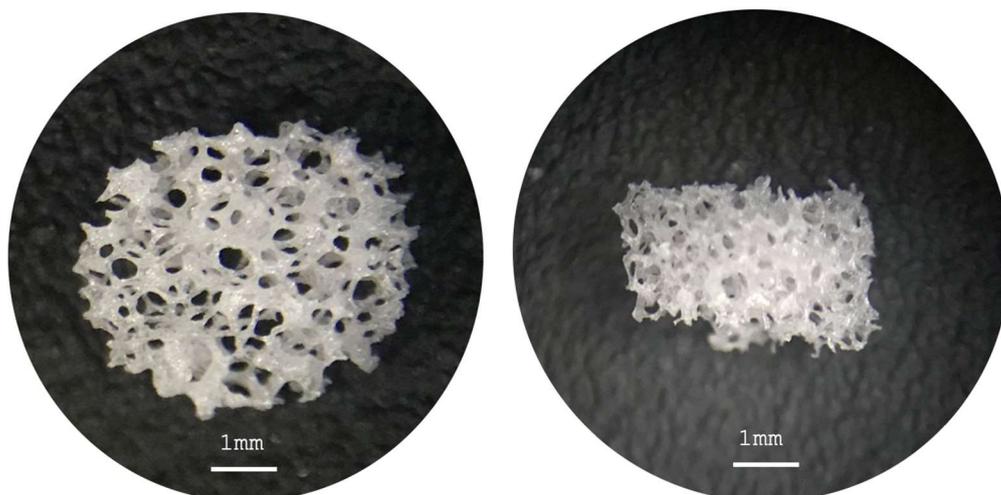
Tras cada tratamiento térmico se han tomado medidas del diámetro y la altura de cada matriz porosa para poder controlar la contracción o el *shrinkage* provocada por el tratamiento térmico, comparando estas medidas con las medidas tomadas antes del tratamiento. Hemos obtenido que en un total de 50 muestras la contracción media tras someterse al tratamiento térmico es del 42%.

Adicionalmente, se ha comparado por DRX la estructura cristalina de las matrices porosas con la de la fase R (Figura 23), comprobándose que no ha habido cambios en la composición mineralógica del material. La Figura incluye los DRX de los andamios cerámicos y del material de partida de la fase R para una mejor comparación.



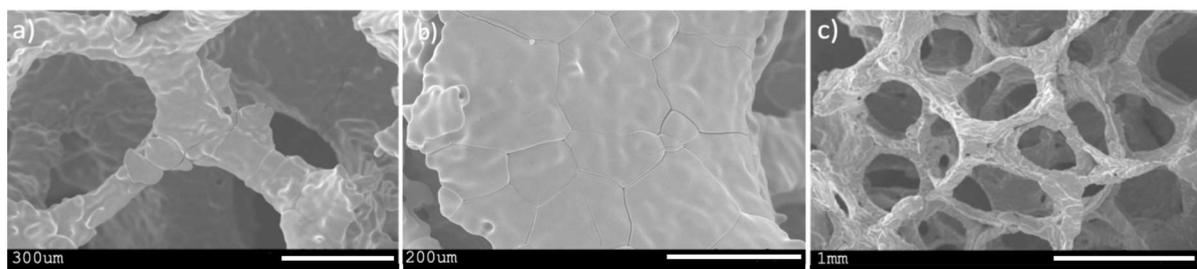
**Figura 23.** Comparación DRX entre a) andamios cerámicos de fase R y b) fase R.

En la Figura 24 podemos observar la estructura porosa característica de nuestros andamios cerámicos, estructura que se corresponde con las plantillas de PU utilizadas en el estudio.



**Figura 24.** Microestructura de los andamios porosos vista bajo la lupa.

Esta estructura también ha sido observada mediante MEB. Previamente, los andamios han sido recubiertos con Pd para tener una superficie conductora visible bajo el MEB. En la Figura 25 podemos observar la microestructura de nuestras matrices porosas, formada por puentes y poros abiertos interconectados uniformemente, estructura necesaria para el transporte de nutrientes y la generación de osteocitos.



**Figura 25.** Microestructura de los andamios cerámicos de fase R mostrando el detalle de a) los puentes b) los límites de grano y c) la microestructura porosa.

Concretamente, en la Figura 25a podemos observar la microestructura característica de los puentes distribuidos a lo largo del andamio poroso, mientras que en la Figura 25b se pueden observar varios límites de grano formados durante la sinterización del material. En la Figura 25c se observa una imagen representativa de la porosidad abierta interconectada presente en el andamio cerámico.

Se han tomado medidas en varias muestras del ancho de los puentes y del diámetro de los poros presentes en la microestructura de los andamios porosos, que aparecen representados en la Tabla 2.

	<b>Intervalos</b>	<b>Valor medio</b>
<b>Puentes</b>	65-172 $\mu\text{m}$	118 $\mu\text{m}$
<b>Poros</b>	200-500 $\mu\text{m}$	405 $\mu\text{m}$
	500-750 $\mu\text{m}$	609 $\mu\text{m}$
	750-1250 $\mu\text{m}$	836 $\mu\text{m}$

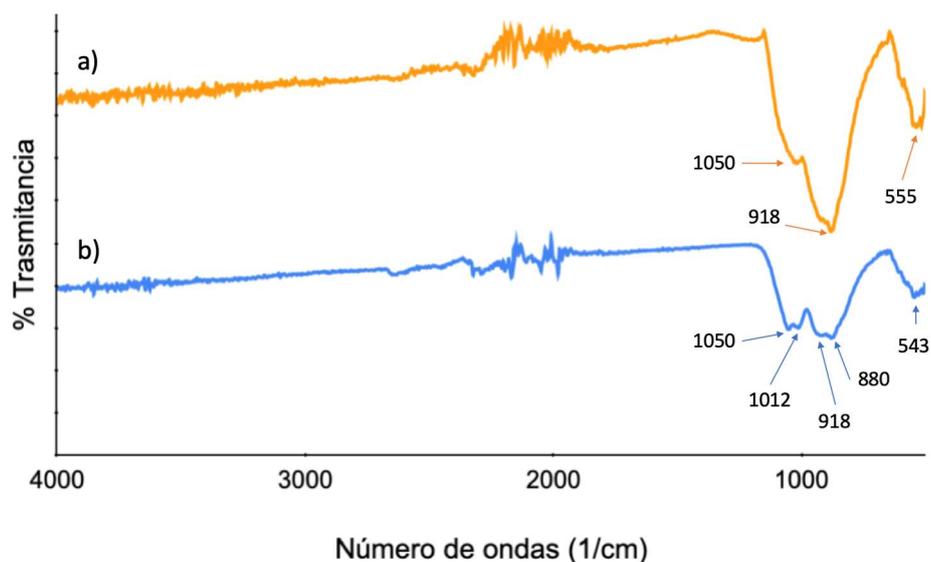
**Tabla 2.** Intervalos y valores medios de los poros y puentes de las matrices porosas de fase R.

Realizando una búsqueda bibliográfica se ha encontrado que los poros con un diámetro comprendido entre 100-500  $\mu\text{m}$  promueven la regeneración ósea al permitir el paso de sangre para favorecer la osteoconducción [48]–[50]. Sin embargo, también se ha observado que un tamaño de poro de alrededor de 500  $\mu\text{m}$  favorece una reabsorción de la cerámica por parte del organismo que provoca que la regeneración ósea disminuya [51], lo que no ocurre con tamaños de poro más pequeños o más grandes. También se ha descrito que a medida que

aumenta el tamaño de los poros de las matrices, la osteoconducción aumenta, por lo que se requieren más estudios para determinar hasta qué tamaño de poro se puede llegar para maximizar la osteoconducción sin que las propiedades mecánicas de la matriz se vean comprometidas [52]. Además, se ha visto que un rango amplio de tamaños de poro indica que los poros presentan una estructura jerarquizada que también se puede observar en la microestructura ósea [53].

La composición elemental de las superficies cerámicas se ha determinado por EDX, donde se han seleccionado puntos aleatorios de la superficie de las matrices porosas. Se ha obtenido una composición elemental media de 20,07% de Si, un 12,68% de P y un 67,25% de Ca que se corresponde con la composición de la fase R.

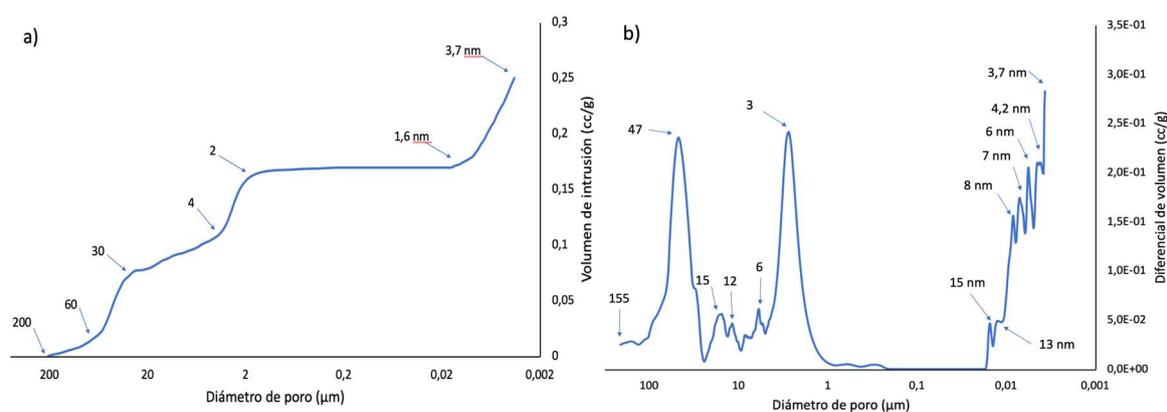
Se ha realizado un análisis de espectroscopía infrarroja con el objetivo de completar la caracterización química de las matrices porosas (Figura 26), en el que se han obtenido unas intensas bandas entre 1050-540  $\text{cm}^{-1}$ . Los picos de 1050  $\text{cm}^{-1}$  y 1012  $\text{cm}^{-1}$  indican que se produce el solapamiento de las bandas de los grupos silicatos con las vibraciones producidas por los grupos fosfatos. Los picos de 918  $\text{cm}^{-1}$  y 880  $\text{cm}^{-1}$  indican bandas características debidas a la tensión simétrica de los grupos silicatos. Los picos de alrededor de 543  $\text{cm}^{-1}$  indican bandas características de las flexiones simétricas de los grupos O-P-O [54].



**Figura 26.** Espectro FTIR-ATR de a) los andamios de la fase R monofásica de alta temperatura y b) la composición bifásica equivalente de baja temperatura.

Además, se ha comparado el espectro de la estructura monofásica de los andamios de la fase R con el espectro de la estructura bifásica equivalente. Como podemos observar, el espectro de la fase R es similar al espectro de la estructura bifásica equivalente de baja temperatura, dado que ambas presentan una estructura de silicatos y fosfatos cálcicos.

Por último, se ha realizado un estudio de la microporosidad de las matrices cerámicas porosas mediante la técnica de porosimetría de mercurio (Figura 27) para obtener información de la distribución de la porosidad en función del tamaño aparente de acceso a los poros presente en nuestra microestructura.



**Figura 27.** Curvas de intrusión de mercurio: a) diámetro de poro frente a volumen de intrusión de Hg. b) diámetro de poro frente al volumen diferencial de intrusión.

En la gráfica de volumen de intrusión de Hg podemos observar varias absorciones. La primera comprende diámetros de poro de entre 200 y 30  $\mu\text{m}$ , rango que se corresponde con el pico intenso centrado alrededor de 47  $\mu\text{m}$  observado en la gráfica de diferencial de volumen. La segunda absorción comprende diámetros de poro de entre 30 y 2  $\mu\text{m}$ , rango que se corresponde con el pico intenso centrado en los 3  $\mu\text{m}$ . Las primeras absorciones pueden relacionarse con el relleno de espacios interparticulares mientras que las posteriores pueden asociarse con el relleno de espacios intraparticulares. Cabe destacar que se han detectado absorciones intensas relacionadas con un tamaño en el rango de los nanómetros, asociadas con diámetros de poro de hasta 3 nm. La presencia de absorciones asociadas a un rango de

tamaño de poro tan heterogéneo indica la estructura jerarquizada que siguen estos poros, característica también presente en la microestructura de los huesos [53].

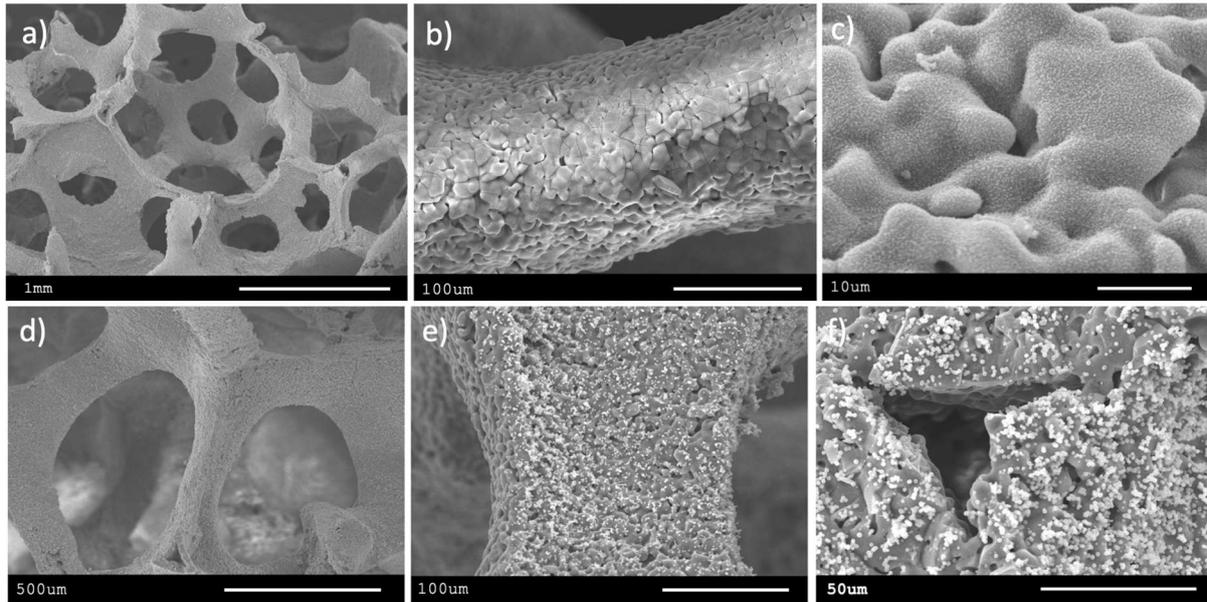
Se ha visto que los poros con un diámetro inferior a 10  $\mu\text{m}$  tienen un área más grande que contribuye a una mejor interacción entre el hueso y la prótesis cerámica, con una mayor adsorción de proteínas, intercambio iónico y formación de HAp [55], mientras que un diámetro de poro de alrededor de 100  $\mu\text{m}$  favorece la adhesión inicial de los osteoblastos. [56]–[58]. Sin embargo, un tamaño de poro mayor que 300  $\mu\text{m}$  es necesario para la inducción de la osteogénesis [59], por lo que un rango de tamaños de poro heterogéneo en el que se pueda encontrar tanto macroporos como microporos es deseable a la hora de preparar matrices cerámicas porosas para el desarrollo de implantes óseos.

### **4.3 Estudio *in vitro* de la bioactividad con SFA**

Se ha analizado la bioactividad de los andamios cerámicos mediante un estudio *in vitro* que determina si ha habido precipitación de HAp cuando se ha sumergido la matriz porosa en SFA durante un determinado periodo de tiempo. Se ha preparado el SFA con los reactivos y el orden descrito por Kokubo en 2006 [21], de manera que se ha obtenido 1L de SFA que reproduce las condiciones fisiológicas del organismo.

Los andamios cerámicos se han colocado en un tubo Falcon que ha sido llenado con 50 ml de SFA, y han sido sumergidos durante 1, 3, 5 y 7 días en un baño con una temperatura constante de 37 °C y agitación mecánica. Una vez ha pasado cada periodo de tiempo, se ha reservado el SFA para su posterior análisis mediante EOE-PAI. Los andamios porosos se han dejado secar durante 24 horas para posteriormente observar su superficie en el MEB.

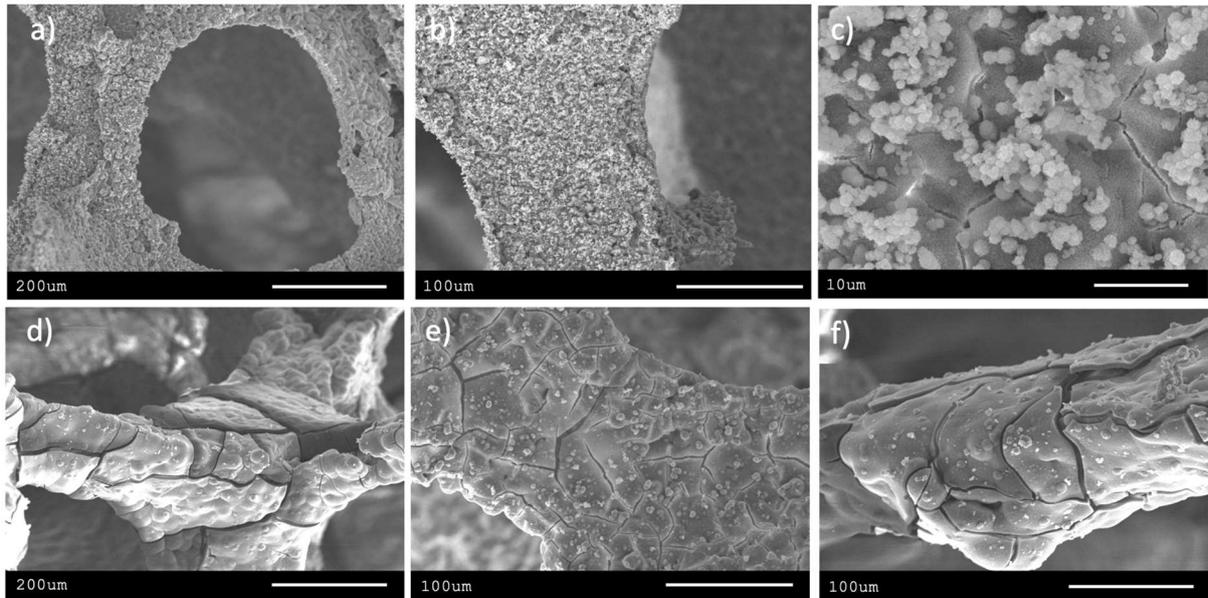
En la Figura 28 podemos observar varias micrográficas de un andamio poroso que ha sido sumergido durante 1 y 3 días en SFA, respectivamente. Las Figuras 28a y 28d demuestran que la microestructura porosa está presente en los andamios al ser sumergidos durante 1 y 3 días en SFA. Por otro lado, las Figuras 28b y 28e muestran imágenes que detallan la microestructura de los puentes encontrados en los andamios cerámicos sumergidos durante ambos periodos de tiempo, donde se puede observar un precipitado blanquecino correspondiente a la HAp. La Figura 28c ofrece una vista detallada de la superficie del andamio sumergido durante 1 día en SFA, que también se encuentra cubierto de HAp y la Figura 28f ofrece una vista del defecto triangular característico del método de réplica de esponja polimérica.



**Figura 28.** Micrografías de un andamio poroso sumergido en SFA durante 1 día (superior) y 3 días (inferior).

En la Figura 29 podemos observar varias micrografías de un andamio poroso que ha sido sumergido durante 5 y 7 días en SFA, respectivamente. Como podemos observar, el nivel de precipitación de HAp en la superficie de la matriz crece a medida que se aumenta el tiempo que pasa la matriz porosa sumergida en el SFA.

En estas micrografías se muestra un aumento considerable de acumulación de HAp en la superficie del andamio sumergido durante 7 días en comparación con el andamio sumergido durante 5 días. En las Figuras 29a y 29b podemos observar la microestructura de un poro y de un puente cubiertos de precipitado, mientras que en la Figura 29c se puede observar la superficie de la microestructura, también cubierta por HAp. Aquí se puede observar un gran nivel de precipitado que, sin embargo, es superado por el andamio sumergido durante 7 días. En las Figuras 29d y 29e podemos comprobar que los elementos estructurales de este andamio, como son los puentes, se encuentran recubiertos de HAp. De hecho, en la Figura 29f se puede observar que la HAp se ha acumulado tanto en la superficie de la muestra que ha formado una capa adicional de precipitado de alrededor de 5 µm de grosor, sobre la cual sigue precipitando.

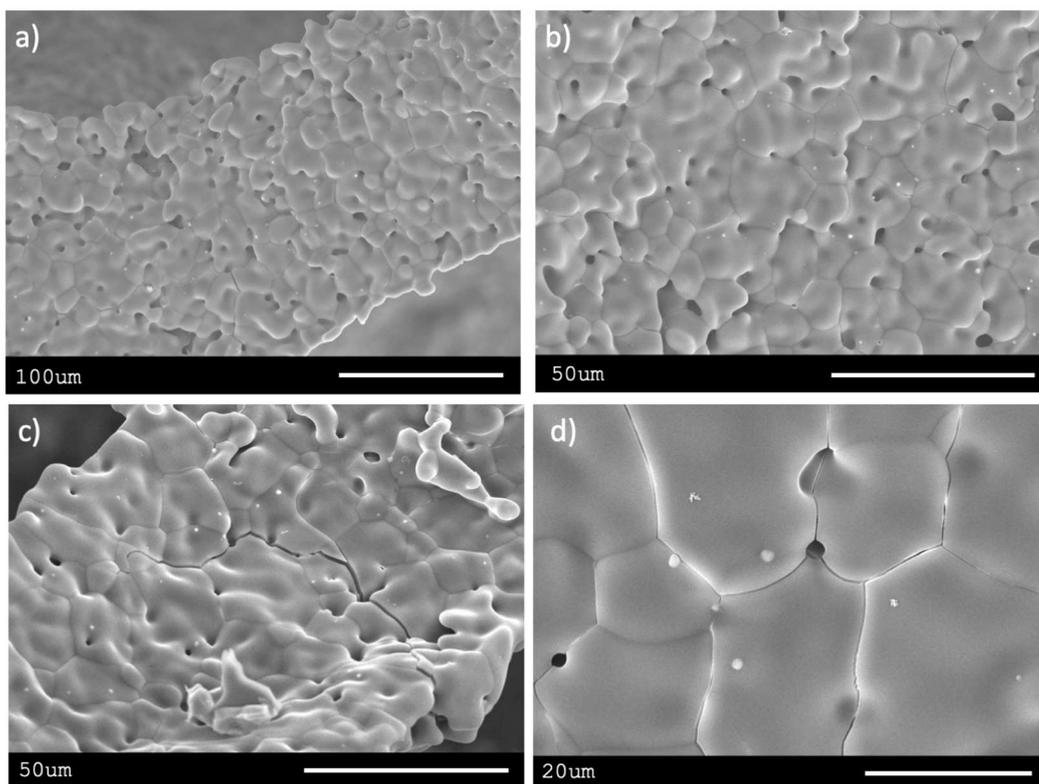


**Figura 29.** Micrografías de un andamio poroso sumergido en SFA durante 5 días (superior) y 7 días (inferior).

Adicionalmente, un MED-RX de varios puntos aleatorios de cada muestra ha revelado que la superficie de los andamios sumergidos en SFA está compuesta por Si, P y Ca, siendo que los niveles de Si disminuyen de un 20,1% presente en la fase R original a un 8,1% presente en los andamios sumergidos durante 5 días a medida que aumenta el tiempo de inmersión de los andamios y aumenta el nivel de HAp precipitado sobre la superficie. Sin embargo, no se ha podido analizar la composición elemental de la superficie de la muestra sumergida durante 7 días debido al craqueo producido sobre la capa de precipitado al realizar el vacío.

También se han pesado las muestras antes y después de ser sumergidas en SFA, y se ha comprobado que después de haber sido sumergidas, las muestras han perdido entre un 14,7 y un 4,4% de su peso, lo que puede deberse a una disolución del material en el SFA o a una pérdida del material durante el manejo de la muestra.

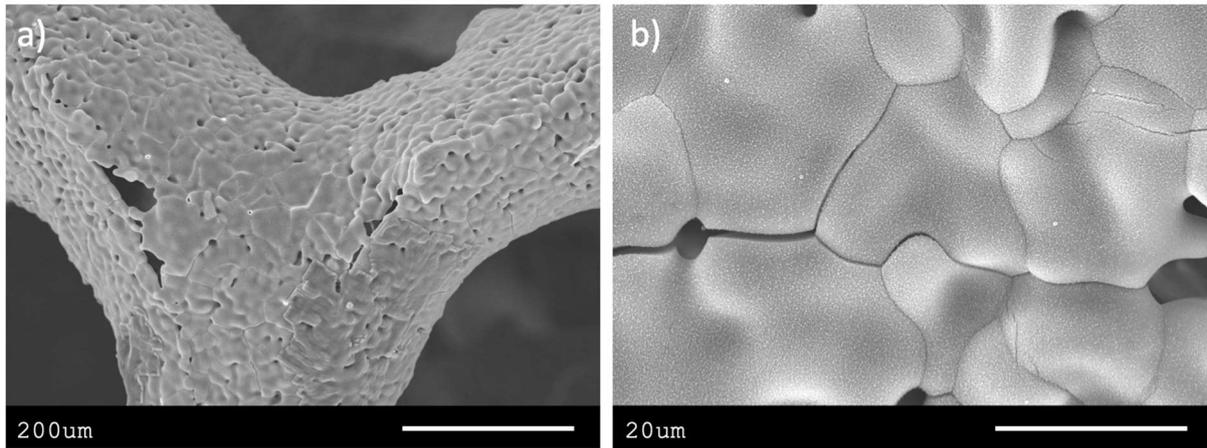
Para discernir el punto en el que empieza a precipitar la HAp se han analizado matrices porosas que han sido sumergidas en SFA durante 1, 3 y 6 horas. En la Figura 30 podemos observar varias micrografías de un andamio poroso que ha sido sumergido durante 1 y 3 horas en SFA, respectivamente, mientras que en la Figura 31 podemos observar varias micrografías de un andamio poroso sumergido en SFA durante 6 horas.



**Figura 30.** Micrografías de un andamio poroso sumergido en SFA durante 1 hora (superior) y 3 horas (inferior).

En las Figuras 30a y 30c se aprecia la microestructura de dos puentes de los andamios sumergidos durante 1 y 3 horas, mientras que en las Figuras 30b y 30d se observa la superficie de la muestra de ambos andamios. A lo largo de estas estructuras se puede apreciar una pequeña cantidad de HAp que ha precipitado sobre las superficies de las matrices en forma de esferas aisladas dispersas en la superficie.

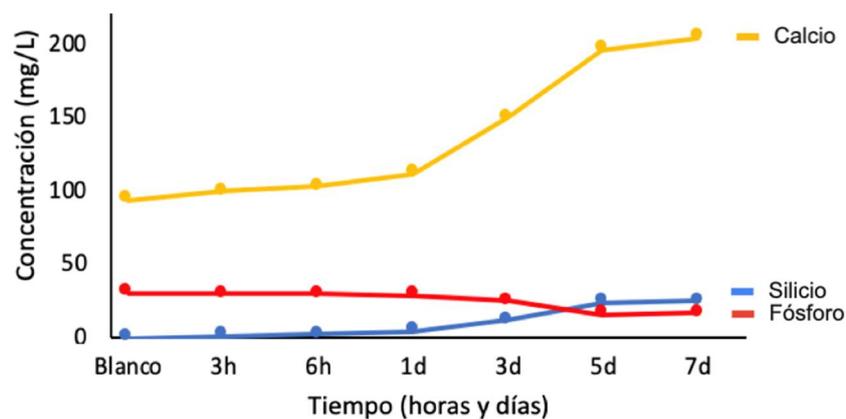
En la Figura 31 se puede observar un aumento considerable de la precipitación de HAp sobre la superficie de la muestra cerámica sumergida durante 6 horas, por lo que se puede decir que la HAp comienza a precipitar de manera significativa a partir de este momento.



**Figura 31.** Micrografías de un andamio poroso sumergido durante 6 horas en SFA.

Por último, se ha analizado el suero por EOE-PAI para determinar la concentración iónica del SFA tras haber sido utilizado en el ensayo de bioactividad anterior.

En la Figura 32 se puede observar una representación gráfica de las variaciones que han sufrido las concentraciones de calcio, silicio y fósforo presentes en el SFA a medida que se ha aumentado el tiempo que han pasado los andamios cerámicos sumergidos en el SFA.



**Figura 32.** Concentraciones de calcio, silicio y fósforo presentes en el SFA en los diferentes tiempos de inmersión de los andamios cerámicos.

Como podemos observar, la concentración de los elementos se mantiene constante hasta llegar a un punto situado alrededor de las 24 horas, a partir del cual se aprecian variaciones significativas. La concentración de calcio crece a medida que el tiempo aumenta, lo que también pasa con la concentración de silicio, aunque el aumento es menos pronunciado. Por

otro lado, la concentración de fósforo disminuye ligeramente con el tiempo. Estas variaciones en las concentraciones de los diferentes elementos indican la disolución parcial de una de las fases del material, concretamente la fase  $\alpha\text{C}_2\text{S}$ , que tiene calcio y silicio. Esto se corresponde con los resultados observados en las micrografías obtenidas por MEB, y es debido a que el fósforo presente en el medio empieza a precipitar en la superficie de los andamios en forma de HAp, mientras que los niveles del calcio y el silicio en el SFA aumentan a medida que pasa el tiempo por una disolución parcial de las matrices.

## 5. Conclusiones

Los resultados obtenidos en este estudio ponen de manifiesto que:

- Se ha obtenido y caracterizado el polvo cerámico compuesto por fase R.
- No se han detectado cambios en la cristalinidad del material, y se ha obtenido un rango de tamaño de partículas homogéneo y lo más pequeño posible con un tiempo de molienda de la muestra de 3,5 horas.
- Se ha obtenido andamios porosos cerámicos de fase R con la misma composición química mediante el método de réplica de esponja polimérica.
- Se ha determinado la estructura porosa de los andamios cerámicos y la composición de su superficie, y se ha determinado la presencia de poros distribuidos en una estructura jerarquizada a lo largo de la superficie de la muestra, que llega hasta tamaños del rango de los nanómetros.
- El estudio de la bioactividad ha demostrado que los andamios porosos previamente preparados presentan interacciones con el medio al ser sumergidos en SFA, lo que se manifiesta como una precipitación constante de HAp en la superficie del material, hecho comprobado mediante un análisis del SFA por EOE-PAI. Se ha concluido que la HAp se comienza a apreciar en la superficie de la muestra cuando el andamio lleva 1 hora sumergido en SFA en forma de esferas aisladas, que se distribuyen por toda la superficie cuando está sumergida en SFA durante 6 horas. La superficie se encuentra prácticamente cubierta de precipitado a partir de las 24 horas.

Los resultados presentados en este estudio demuestran que los andamios cerámicos porosos preparados a partir de fase R son unos buenos candidatos para el desarrollo de prótesis óseas, ya que su estructura porosa bioactiva es ideal para el crecimiento y la nutrición de nuevos osteocitos.

Sin embargo, se precisan futuras investigaciones para que estos andamios cerámicos porosos puedan ser considerados seguros para su uso como prótesis en la ingeniería de tejidos. Concretamente, se precisan varios estudios que determinen las propiedades mecánicas de las matrices porosas y estudios *in vivo* que demuestren la eficacia y la seguridad de estos andamios a la hora de ser utilizados en animales y posteriormente, en seres humanos.

## 6. Bibliografía

- [1] M. de Martinis, M. M. Sirufo, and L. Ginaldi, "Osteoporosis: Current and Emerging Therapies Targeted to Immunological Checkpoints," *Current Medicinal Chemistry*, vol. 27, no. 37, pp. 6356–6372, 2019, doi: 10.2174/0929867326666190730113123.
- [2] V. Migonney, *Biomaterials*, 1ª Edición. Wiley, 2014.
- [3] B. Jay, D. J. Apple, and J. Sims, "Remembrances of things past: Harold Ridley and the Invention of the Intraocular Lens," *Survey of Ophthalmology*, vol. 40, no. 4, pp. 279–292, 1996.
- [4] J. Charnley, "Arthroplasty of the hip: A new operation," *The Lancet*, pp. 1129–1132, 1967.
- [5] A. Blakemore and A. Voorhes, "The use of tubes constructed from vinyon 'N' cloth in bridging arterial defects-Experimental and Clinical," *Annals of Surgery*, vol. 140, no. 3, pp. 324–34, 1954.
- [6] W. J. Kolff, "First Clinical Experience With the Artificial Kidney.," *Annals of internal medicine*, vol. 62, pp. 608–619, 1965, doi: 10.7326/0003-4819-62-3-608.
- [7] C. P. Bailey and J. Zimmerman, "The surgical correction of aortic regurgitation. Bicuspid conversion," *The American Journal of Cardiology*, vol. 3, no. 1, pp. 6–21, 1959, doi: 10.1016/0002-9149(59)90390-X.
- [8] D. F. Williams, "On the nature of biomaterials," *Biomaterials*, vol. 30, no. 30, pp. 5897–5909, 2009, doi: 10.1016/j.biomaterials.2009.07.027.
- [9] D. F. Williams and J. Black, "Tissue Interfaces Advances in Biomaterials," *PJ Doherty in Biomaterials*, vol. 10, 1992.
- [10] K. D. Jandt, "Evolutions, revolutions and trends in biomaterials science -A perspective," *Advanced Engineering Materials*, vol. 9, no. 12, pp. 1035–1050, 2007, doi: 10.1002/adem.200700284.
- [11] P. N. de Aza, S. de Aza, and A. H. de Aza, "Crystalline bioceramics materials," *Boletín De La Sociedad Española De Cerámica Y Vidrio*, pp. 135–145, 2005.
- [12] F. Orgaz, J. Rincon, and F. Capel, "Materiales bioceramicos y biovidrios," *Boletín De La Sociedad Española De Cerámica y Vidrio*, vol. 26, no. 1, pp. 13–19, 1987.

- [13] M. Vallet-regí, "Biocerámicas: evolución y aplicaciones," *Biocerámicas: evolución y aplicaciones*, vol. 107, no. 1, pp. 28–35, 2011.
- [14] G. J. Tortora and B. Derrickson, *Principios de anatomía y fisiología*. Panamericana, 2006.
- [15] R. W. Nurse, J. H. Welch, and W. Gutt, "High-Temperature Phase Equilibria in the System Dicalcium Silicate–Tricalcium Phosphate," *Journal of the Chemical Society (Resumed)*, vol. 220, no. 0, pp. 1077–1083, 1956.
- [16] W. Fix, H. Heymann, and R. Heinke, "Subsolidus Relations in the System  $2\text{CaO}\cdot\text{SiO}_2\text{-}3\text{CaO}\cdot\text{P}_2\text{O}_5$ ," *Journal of the American Ceramic Society*, vol. 52, no. 6, pp. 346–347, 1969, doi: 10.1111/j.1151-2916.1969.tb11948.x.
- [17] V. Rubio, M. A. de La Casa-Lillo, S. de Aza, and P. N. de Aza, "The system  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2\text{-Ca}_2\text{SiO}_4$ : The sub-system  $\text{Ca}_2\text{SiO}_4\text{-}7\text{CaOP}_2\text{O}_5\text{2SiO}_2$ ," *Journal of the American Ceramic Society*, vol. 94, no. 12, pp. 4459–4462, 2011, doi: 10.1111/j.1551-2916.2011.04716.x.
- [18] P. Ros-Tárraga, P. Mazón, L. Meseguer-Olmo, and P. N. de Aza, "Revising the subsystem Nurse's A-phase-silicocarnotite within the system  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2\text{-Ca}_2\text{SiO}_4$ ," *Materials*, vol. 9, no. 5, 2016, doi: 10.3390/ma9050322.
- [19] I. M. Martínez, P. Velásquez, and P. N. de Aza, "The sub-system  $\alpha\text{-TCPss}$ -silicocarnotite within the binary system  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2\text{-Ca}_2\text{SiO}_4$ ," *Journal of the American Ceramic Society*, vol. 95, no. 3, pp. 1112–1117, 2012, doi: 10.1111/j.1551-2916.2011.05031.x.
- [20] T. Kokubo, H. Kushitani, S. Sakka, T. Kitsugi, and T. Yamamuro, "Solutions able to reproduce in vivo surface-structure changes in bioactive glass-ceramic A-W3," *Journal of Biomedical Materials Research*, vol. 24, no. 6, pp. 721–734, 1990, doi: 10.1002/jbm.820240607.
- [21] T. Kokubo and H. Takadama, "How useful is SBF in predicting in vivo bone bioactivity?," *Biomaterials*, vol. 27, no. 15, pp. 2907–2915, 2006, doi: 10.1016/j.biomaterials.2006.01.017.
- [22] A. A. Zadpoor, "Relationship between in vitro apatite-forming ability measured using simulated body fluid and in vivo bioactivity of biomaterials," *Materials Science and Engineering C*, vol. 35, no. 1, pp. 134–143, 2014, doi: 10.1016/j.msec.2013.10.026.
- [23] J. M. Julián Enríquez and N. de Fuentes Juárez, "Biomateriales en aleaciones metálicas, polímeros y cerámicas," in *Manual de Cirugía Ortopédica y Traumatología*, 2nd ed., Panamericana, 2010, pp. 59–63.

- [24] K. Tuzlakoglu, N. Bolgen, A. J. Salgado, M. E. Gomes, E. Piskin, and R. L. Reis, "Nano- and micro-fiber combined scaffolds: A new architecture for bone tissue engineering," *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, vol. 16, no. 12, pp. 1099–1104, 2005, doi: 10.1007/s10856-005-4713-8.
- [25] S. J. Lee, G. J. Lim, J. W. Lee, A. Atala, and J. J. Yoo, "In vitro evaluation of a poly(lactide-co-glycolide)–collagen composite scaffold for bone regeneration.," *Biomaterials*, pp. 3466-3472., 2006.
- [26] J. J. A. Barry, H. S. Gidda, C. A. Scotchford, and S. M. Howdle, "Porous methacrylate scaffolds: supercritical fluid fabrication and in vitro chondrocyte response.," *Biomaterials*, pp. 3559-3568., 2004.
- [27] Y. S. Nam and T. G. Park, "Porous biodegradable polymeric scaffolds prepared by thermally induced phase separation," *Journal of Biomedical Materials Research*, vol. 47, no. 1, pp. 8–17, 1999, doi: 10.1002/(SICI)1097-4636(199910)47:1<8::AID-JBM2>3.0.CO;2-L.
- [28] C. H. Chang *et al.*, "Tissue engineering-based cartilage repair with allogeneous chondrocytes and gelatin-chondroitin-hyaluronan tri-copolymer scaffold: A porcine model assessed at 18, 24, and 36 weeks," *Biomaterials*, vol. 27, no. 9, pp. 1876–1888, 2006, doi: 10.1016/j.biomaterials.2005.10.014.
- [29] A. V. Do, R. Smith, T. M. Acri, S. M. Geary, and A. K. Salem, "3D printing technologies for 3D scaffold engineering," in *Functional 3D Tissue Engineering Scaffolds: Materials, Technologies, and Applications*, Elsevier, 2018, pp. 203–234.
- [30] P. Mazón and P. N. de Aza, "Porous scaffold prepared from  $\alpha'$ -L-Dicalcium silicate doped with phosphorus for bone grafts," *Ceramics International*, vol. 44, no. 1, pp. 537–545, Jan. 2018, doi: 10.1016/j.ceramint.2017.09.208.
- [31] K. Schwartzwaldner, H. Somers, and A. v. Somers, "Method of making porous ceramic articles," 3,090,094, 1963.
- [32] J. Tian and J. Tian, "Preparation of porous hydroxyapatite," *Journal of Materials Science*, vol. 36, no. 12, pp. 3061–3066, 2001, doi: 10.1023/A:1017935411108.
- [33] I. Sopyan and J. Kaur, "Preparation and characterization of porous hydroxyapatite through polymeric sponge method," *Ceramics International*, vol. 35, no. 8, pp. 3161–3168, 2009, doi: 10.1016/j.ceramint.2009.05.012.

- [34] S. K. Sarkar, M.-S. Kim, Y.-K. Min, H.-M. Yang, H.-Y. Song, and B.-T. Lee, "Fabrication and Characterization of Porous TCP coated Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> Scaffold by Polymeric Sponge Method." *Journal of the Korean Ceramic Society*, 2008, doi: <https://doi.org/10.4191/KCERS.2008.45.1.579>.
- [35] P. N. de Aza, M. A. Rodríguez, S. A. Gehrke, J. E. Maté-Sánchez de Val, and J. L. Calvo-Guirado, "A Si- $\alpha$ TCP scaffold for biomedical applications: An experimental study using the rabbit tibia model," *Applied Sciences (Switzerland)*, vol. 7, no. 7, 2017, doi: 10.3390/app7070706.
- [36] P. Kumar, B. S. Dehiya, A. Sindhu, R. Kumar, C. I. Pruncu, and A. Yadav, "Fabrication and characterization of silver nanorods incorporated calcium silicate scaffold using polymeric sponge replica technique," *Materials and Design*, vol. 195, p. 109026, 2020, doi: 10.1016/j.matdes.2020.109026.
- [37] C. Wang, H. Chen, X. Zhu, Z. Xiao, K. Zhang, and X. Zhang, "An improved polymeric sponge replication method for biomedical porous titanium scaffolds," *Materials Science and Engineering C*, vol. 70, pp. 1192–1199, 2017, doi: 10.1016/j.msec.2016.03.037.
- [38] J. Schuren and K. Mohr, "Pascal's law and the dynamics of compression therapy: A study on healthy volunteers.," vol. 29, 2010.
- [39] COMECTA, "Homogeneizador ultrasónico CY-500." .
- [40] W. D. Callister, *Introducción a la ciencia e ingeniería de los materiales: vol I*. 2012.
- [41] W. Zhou, R. Apkarian, Z. L. Wang, and D. Joy, "Fundamentals of scanning electron microscopy (SEM)," *Scanning Microscopy for Nanotechnology: Techniques and Applications*, pp. 1–40, 2007, doi: 10.1007/978-0-387-39620-0\_1.
- [42] T. Oikawa, "Energy dispersive X-ray spectroscopy," *Japanese Journal of Tribology*, vol. 51, no. 1, pp. 33–38, 2006, doi: 10.1007/978-4-431-66988-3\_4.
- [43] Quantachrome Instruments, "Poremaster - Mercury Intrusion Porosimetry," *Manual de la máquina*, 2018, [Online]. Available: [http://www.quantachrome.com/pdf\\_brochures/07128.pdf](http://www.quantachrome.com/pdf_brochures/07128.pdf).
- [44] V. A. Fassel and R. N. Kniseley, "Inductively Coupled Plasma-Optical Emission Spectroscopy," *Analytical Chemistry*, vol. 46, no. 13, pp. 1110A-1120A, 1974, doi: 10.1021/ac60349a722.

- [45] R. White, *Chromatography/Fourier Transform Infrared Spectroscopy and its Applications*. 1989.
- [46] ThermoScientific, "Espectrómetro FT-IR Nicolet iS5." .
- [47] C. Ruiz-Aguilar, U. Olivares-Pinto, E. A. Aguilar-Reyes, R. López-Juárez, and I. Alfonso, "Characterization of  $\beta$ -tricalcium phosphate powders synthesized by sol-gel and mechanosynthesis," *Boletín de la Sociedad Española de Cerámica y Vidrio*, vol. 57, no. 5, pp. 213–220, Sep. 2018, doi: 10.1016/j.bsecv.2018.04.004.
- [48] Y. Zhang, Y. Yokogawa, X. Feng, Y. Tao, and Y. Li, "Preparation and properties of bimodal porous apatite ceramics through slip casting using different hydroxyapatite powders," *Ceramics International*, vol. 36, no. 1, pp. 107–113, 2010, doi: 10.1016/j.ceramint.2009.07.008.
- [49] T. Iwamoto, Y. Hieda, and Y. Kogai, "Effects of molecular weight on macropore sizes and characterization of porous hydroxyapatite ceramics fabricated using polyethylene glycol: mechanisms to generate macropores and tune their sizes," *Materials Today Chemistry*, vol. 20, p. 100421, 2021, doi: 10.1016/j.mtchem.2021.100421.
- [50] C. Torres-Sanchez, F. R. A. al Mushref, M. Norrito, K. Yendall, Y. Liu, and P. P. Conway, "The effect of pore size and porosity on mechanical properties and biological response of porous titanium scaffolds," *Materials Science and Engineering C*, vol. 77, pp. 219–228, 2017, doi: 10.1016/j.msec.2017.03.249.
- [51] J. Augustin *et al.*, "Comparison of two pore sizes of LAE442 scaffolds and their effect on degradation and osseointegration behavior in the rabbit model," *Journal of Biomedical Materials Research - Part B Applied Biomaterials*, vol. 108, no. 7, pp. 2776–2788, 2020, doi: 10.1002/jbm.b.34607.
- [52] O. Chan *et al.*, "The effects of microporosity on osteoinduction of calcium phosphate bone graft substitute biomaterials," *Acta Biomaterialia*, vol. 8, no. 7, pp. 2788–2794, Jul. 2012, doi: 10.1016/j.actbio.2012.03.038.
- [53] A. Díaz-Arca, P. Velasquez, P. Mazón, and P. N. de Aza, "Mechanism of in vitro reaction of a new scaffold ceramic similar to porous bone," *Journal of the European Ceramic Society*, vol. 40, no. 5, pp. 2200–2206, 2020, doi: 10.1016/j.jeurceramsoc.2020.01.045.

- [54] C. Q. Ning, J. Mehta, and A. El-Ghannam, "Effects of silica on the bioactivity of calcium phosphate composites in vitro," *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, vol. 16, no. 4, pp. 355–360, 2005, doi: 10.1007/s10856-005-0635-8.
- [55] J. Zhang *et al.*, "The size of surface microstructures as an osteogenic factor in calcium phosphate ceramics," *Acta Biomaterialia*, vol. 10, no. 7, pp. 3254–3263, 2014, doi: 10.1016/j.actbio.2014.03.021.
- [56] C. M. Murphy, M. G. Haugh, and F. J. O'Brien, "The effect of mean pore size on cell attachment, proliferation and migration in collagen-glycosaminoglycan scaffolds for bone tissue engineering," *Biomaterials*, vol. 31, no. 3, pp. 461–466, Jan. 2010, doi: 10.1016/j.biomaterials.2009.09.063.
- [57] J. M. Sobral, S. G. Caridade, R. A. Sousa, J. F. Mano, and R. L. Reis, "Three-dimensional plotted scaffolds with controlled pore size gradients: Effect of scaffold geometry on mechanical performance and cell seeding efficiency," *Acta Biomaterialia*, vol. 7, no. 3, pp. 1009–1018, Mar. 2011, doi: 10.1016/j.actbio.2010.11.003.
- [58] L. N. Teixeira, G. E. Crippa, L. P. Lefebvre, P. T. de Oliveira, A. L. Rosa, and M. M. Beloti, "The influence of pore size on osteoblast phenotype expression in cultures grown on porous titanium," *International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, vol. 41, no. 9, pp. 1097–1101, Sep. 2012, doi: 10.1016/j.ijom.2012.02.020.
- [59] V. Karageorgiou and D. Kaplan, "Porosity of 3D biomaterial scaffolds and osteogenesis," *Biomaterials*, vol. 26, no. 27. Elsevier BV, pp. 5474–5491, 2005, doi: 10.1016/j.biomaterials.2005.02.002.