

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tesisenxarxa.net) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tesisenred.net) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tesisenxarxa.net) service has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized neither its spreading and availability from a site foreign to the TDX service. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service is not authorized (framing). This rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author

TESIS DOCTORAL

Espumas inyectables de hidroxiapatita obtenidas por el método de espumado de la fase líquida de un cemento de fosfato tricálcico alfa.

Universidad Politécnica de Cataluña

Departamento de Ciencia de Materiales e Ingeniería Metalúrgica

Doctorado en Ingeniería Biomédica

Tesis presentada por:

Edgar Benjamín Montufar Jiménez

Dirigida por la Prof. Dra.:

Maria Pau Ginebra Molins

Instituciones donde se realizó la tesis.

Universidad Politécnica de Cataluña, España.



Departamento de ciencia de los materiales e ingeniería metalúrgica.

Grupo de biomateriales, biomecánica e ingeniería de tejidos (BIBITE).



Universidad de Bolonia, Italia.



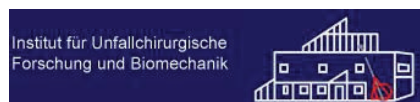
Instituto de ortopedia Rizzoli.



Universidad de Ulm, Alemania.



Instituto de investigación ortopédica y biomecánica.



Instituciones que soportaron la investigación.

Smart CaP Project, Unión Europea (NMP3-CT-2005-013912).



Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, México (Beca doctoral 177892).



UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE CATALUNYA

Doctorado en Ingeniería Biomédica

ETSEIB

Departament de Ciència dels Materials i Enginyeria Metal·lúrgica

Espumas inyectables de hidroxiapatita obtenidas por el método de espumado de la fase líquida de un cemento de fosfato tricálcico alfa.

Tesis para obtener el título de doctor por la
Universitat Politècnica de Catalunya

Memoria presentada por:

Edgar Benjamín Montufar Jiménez

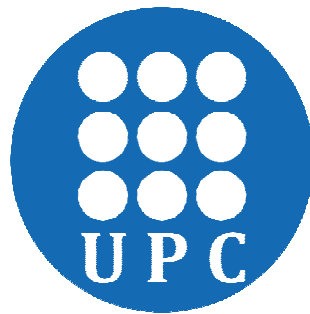
Dirigida por la Prof. Dra.:

Maria Pau Ginebra Molins

Barcelona, España

Julio de 2010

Universidad Politécnica de Cataluña



Julio de 2010

Summary.

Nowadays, there are great number of injuries and illnesses that affect bone tissue. The origin of these diseases is diverse and their treatment is also different in each case. A great problem is bone loss, which can be caused by bone resorption, fractures or bone tumor extirpation; in these cases, a bone filler material will be required. It is expected that the filling material should be able to promote bone healing; materials that meet this properties are known as bone grafts. Other applications of bone grafting materials are the bone mass augmentation to correct deformations or to fix dental and orthopedic implants. It is estimated that in Europe bone substitutes are used in one million surgical procedures annually. The worldwide market of these materials is an estimated of five billion Euros with annual growth rate of 8-15%.

One of the most successful materials used in the development of synthetic bone grafting materials is hydroxyapatite, which correspond to the mineral phase of bone and teeth. The bioactivity and the osteoconductivity properties of hydroxyapatite are the reasons of its success. Nevertheless, hydroxyapatite is relatively stable; therefore, solid blocks are not resorbed in the long term. In order to increase the hydroxyapatite resorption, and allow new bone ingrowth, open macropores are incorporated to the material, improving also implant osteointegration. One method to do this is by foaming calcium phosphate cements; this approach has the advantage that the resulting hydroxyapatite after cement setting is more similar to the biological apatite than sintered hydroxyapatite. In addition, since bone cements are injectable when they are a paste, it is possible to develop an injectable, macroporous, and self-setting bone graft.

The objective of this thesis was to develop solid hydroxyapatite foams through the liquid phase foaming of a calcium phosphate bone cement. It is expected that the developed foams can be applied as injectable, self-setting, synthetic bone grafts under physiological conditions. Along with this thesis, two types of foaming agent were studied. In first place, non ionic surfactant Tween 80 was tested as syntactic foaming agent; and second, gelatin, sodium alginate and soy extract were tested as natural foaming agents. These biopolymers are proposed as foaming agents with the objective of obtaining composite foams that mimic the composition and structure of the natural nanocomposite that is bone tissue.

The results showed that is possible to obtain injectable hydroxyapatite foams using Tween 80 amounts below the maximum dosage recommended for parenteral administration. Also, it was validated that gelatin and soy extract allow obtaining injectable, *in situ* self-setting foams. In contrast, sodium alginate did not show a good foaming capacity. Comparing the two types of studied foaming agents (synthetic and natural) it can be concluded that the synthetic foaming agent Tween 80 is more efficient than the natural foaming agents; however, gelatin and soy extract improved the injectability and/or the cohesion of the foams, both essential properties to use these materials as injectable and self-setting grafts.

The *in vitro* and *in vivo* studies showed that the hydroxyapatite foams obtained were not toxic, they could be prepared under sterile conditions in the operating room without special staff, and the selected foams maintained their cohesion to set *in situ* under physiological conditions, adapting and filling perfectly the shape of the defect when implanted through injection.

Resumen.

Actualmente existe un gran número de lesiones y enfermedades que afectan el tejido óseo. El origen de estos problemas es diverso y su tratamiento también es diferente en cada caso. Uno de los principales problemas es la pérdida de masa ósea, que puede ser causada por la reabsorción de hueso, fracturas o extirpación de tumores; en estos casos el tratamiento requiere de un material de relleno óseo. Se espera que este material de relleno sea capaz de promover la regeneración de hueso; los materiales que cumplen con este requisito se les denomina injertos óseos. Otras aplicaciones de los injertos óseos son el aumento de hueso para corregir deformaciones o para fijar implantes dentales u ortopédicos. Se estima que en Europa los sustitutos óseos se utilizan en un millón de cirugías anualmente. El mercado mundial de estos materiales se estima en cinco billones de Euros con una tasa de crecimiento anual de 8-15 %.

La hidroxiapatita, que corresponde a la fase mineral de hueso y dientes, es uno de los mejores materiales utilizados en el desarrollo de injertos óseos sintéticos. La bioactividad y osteoconductividad de la hidroxiapatita son la razón de su éxito. Sin embargo, la hidroxiapatita es relativamente estable, por ello, los bloques sólidos no son reabsorbidos a largo plazo. Para incrementar la reabsorción de la hidroxiapatita, y permitir la formación de nuevo hueso hacia su interior, se incorporan macroporos abiertos en el material, mejorando también la osteointegración del implante. Un método para conseguir lo anterior es el espumado de los cementos de fosfatos de calcio; este enfoque tiene la ventaja de que la hidroxiapatita obtenida después del fraguado del cemento es más similar a la hidroxiapatita biológica que las hidroxiapatitas sinterizadas. Además, debido a que los cementos son inyectables cuando son una pasta, es posible obtener injertos óseos inyectables, macroporosos y autoconsolidables.

El objetivo de la presente tesis es desarrollar espumas sólidas de hidroxiapatita a través del método de espumado de la fase líquida de un cemento de fosfato de calcio. Se espera que las espumas obtenidas puedan ser utilizadas como injertos óseos inyectables y autoconsolidables bajo condiciones fisiológicas. A lo largo de la tesis se estudian dos tipos de agentes espumantes. En primer lugar, el surfactante no iónico Tween 80 se estudia como agente espumante sintético, en segundo lugar, la gelatina, el alginato de sodio y el extracto de soja se estudian como agentes espumantes naturales. Estos polímeros se proponen como agentes espumantes con la intención de obtener espumas compuestas que imiten la composición y la estructura del nanocompuesto natural que es el tejido óseo.

Los resultados mostraron que es posible obtener espumas inyectables de hidroxiapatita empleando contenidos de Tween 80 por debajo de la dosis máxima recomendada en administración parenteral. También se comprobó que la gelatina y el extracto de soja permiten obtener espumas inyectables y autofraguables *in situ*. Por el contrario, el alginato de sodio no mostró ser un buen agente espumante. Al comparar los dos tipos de agentes espumantes estudiados (sintético y natural) se puede concluir que el espumante sintético Tween 80 es más eficiente que los espumantes naturales; no obstante, la gelatina y el extracto de soja mejoran la Inyectabilidad y/o la cohesión de las espumas, ambas propiedades indispensables para utilizar estos materiales como injertos óseos inyectables y autoconsolidables.

Los estudios *in vitro* e *in vivo* mostraron que las espumas obtenidas de hidroxiapatita no son tóxicas, que pueden ser preparadas bajo condiciones estériles dentro del quirófano sin equipos especiales, y que las espumas seleccionadas tienen cohesión para endurecer *in situ* bajo condiciones fisiológicas, adaptando la forma y rellenando perfectamente el defecto cuando son implantadas por inyección.

Agradecimientos.

En estos momentos me vienen a la mente muchas personas a las cuales expresarles mi gratificación, sin embargo, me parece lo más justo mencionar primero a aquella persona que ha hecho más sacrificios, incluso más que yo, que me ha acompañado en todo momento y que ha vivido prácticamente en primera persona toda la experiencia, me refiero a mi esposa, Estela Ramírez... con todo mi amor... Muchas gracias.

En siguiente lugar quiero agradecer a mi tutora, Maria Pau Ginebra, por la oportunidad que me brindó para formar parte de su grupo de trabajo, por la confianza que me ha mostrado y la crítica constructiva hacia mi trabajo, que junto con sus consejos han formado en mí un verdadero rigor científico.

Quiero darle las gracias a mis compañeros de laboratorio con los que he trabajado y convivido en los últimos años, que de forma directa o indirecta han colaborado en la realización de esta tesis, ellos son Tania Traykova, Román Pérez, Gemma Mestres, Miguel Villagómez, Montserrat Español, Sergio del Valle, Cristina Gil, Aitor Aguirre, Pablo Sevilla, Johan Gustavsson, Luis Delgado, Noelia Aparicio, Rafael Bermúdez, entre muchos más. Aprovecho también estas líneas para agradecer el asesoramiento que me brindaron Rosabel Salazar, Magali Arreola y Omar Rosas durante la redacción de esta memoria.

Además, quiero brindar un agradecimiento a las personas involucradas en el proyecto Smart CaP Josep A. Planell, Anita Ignatius, Luigi Ambrosio, Roberto de Santis, Etienne Schacht, Matteo Santin, Nicola Baldini, Gabriela Ciapetti, Damien Lacroix, y en especial a aquellas con las que tuve la oportunidad de trabajar directamente, Melanie Göckelmann, Francesca Perut y Silvia Bubenikova. Nunca olvidare sus atenciones.

No hay que olvidar el apoyo de la gente que se deja en el país de origen, que sin ellos no hubiera sido posible llegar con éxito a la meta. Por lo que agradezco el apoyo incondicional y la preocupación por mi bienestar que me muestran mis padres en todo momento, ellos son Humbertina Jiménez y Vicente Montufar.

La financiación económica también fue importante, por lo que agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), México, por la beca que me concedió para realizar estudios de doctorado en el extranjero (177892). Y a la Unión Europea por la financiación del proyecto Smart CaP (NMP3-CT-2005-013912).

Por último quiero agradecer a todos aquellos que se tomen su tiempo para leer esta memoria, espero la encuentren interesante y de utilidad. Quedo satisfecho porque di lo mejor de mí para elaborar cada una de las partes que la componen.

Sinceramente,

Edgar Montufar

Índice.

Summary.

.....i

Resumen.

.....ii

Agradecimientos.

.....iii

Índice.

.....iv

Chapter 1: Introduction and objectives.

1.1 Thesis motivation	1
1.2 Objectives.....	5
1.2.1 General objective	5
1.2.2 Partial objectives	6
1.3 Thesis in the context of the European project Smart CaP	7
1.4 Thesis structure	9
1.5 References.....	11

Capítulo 2: Marco teórico.

2.1 El hueso	15
2.1.1 Anatomía y fisiología ósea.....	15
2.1.2 Histología ósea	16
2.1.3 Mecanismos de formación del hueso	20
2.1.4 Consolidación de fracturas y angiogénesis	21
2.1.5 Patologías óseas	22
2.1.6 Biomecánica del hueso.....	23
2.2 Cerámicas de fosfatos de calcio	24
2.2.1 Ortofosfatos de calcio	24
2.2.2 Procesado de los ortofosfatos de calcio	26
2.3 Cementos hidráulicos de fosfatos de calcio	28
2.3.1 Propiedades de los cementos de fosfatos de calcio	28
2.3.1.1 La reacción de fraguado y endurecimiento.....	29
2.3.1.2 Moldeabilidad de los CPC.....	29
2.3.1.3 Aditivos incorporados a los CPC.....	31
2.3.1.4 Propiedades mecánicas y porosidad.....	32
2.3.1.5 Reabsorción y remodelación “in vivo” de los CPC	33
2.3.2 Métodos de obtención de cementos macroporosos	34
2.3.3 Cemento óseo en base a fosfato tricálcico alfa	39
2.4 Materiales poliméricos para la regeneración ósea	40
2.4.1 La gelatina	40
2.4.1.1 Obtención y refinado	41
2.4.1.2 Composición de la gelatina	42
2.4.1.3 Estructura de la gelatina	42
2.4.1.4 Propiedades fisicoquímicas.....	43
2.4.1.5 Diferencias entre la gelatina de origen bovino y porcino (legislación).....	44
2.4.1.6 La gelatina en medicina regenerativa e ingeniería de tejidos	45
2.4.2 El alginato de sodio	46
2.4.2.1 Obtención y extracción	46
2.4.2.2 Estructura química	47
2.4.2.3 Propiedades fisicoquímicas.....	48
2.4.2.4 Estabilidad química y degradación.....	49

2.4.2.5 Propiedades biológicas.....	49
2.4.3 El extracto de soja	51
2.4.3.1 Composición de la semilla de soja	51
2.4.3.2 Proceso de extracción	51
2.4.3.3 Propiedades del extracto de soja	52
2.4.3.4 Las isoflavonas en la regeneración ósea	52
2.5 Medicina regenerativa e ingeniería de tejidos.....	53
2.5.1 Importancia de la porosidad en ingeniería de tejido óseo	55
2.5.2 Porosidad, permeabilidad y tortuosidad.....	56
2.5.3 Compuestos orgánico/inorgánico para ingeniería de tejido óseo.....	59
2.6 Técnicas de estudio de sistemas porosos	59
2.6.1 Porosimetría de intrusión de mercurio (MIP)	62
2.7 Espumas, agentes tensoactivos y teoría de surfactantes	66
2.7.1 Definición de espuma.....	66
2.7.2 Estabilidad de una espuma	67
2.7.3 Caracterización de una espuma	68
2.7.4 Surfactantes y micelas.....	68
2.7.5 Surfactantes no iónicos: Tween 80	71
2.7.6 Proteínas y carbohidratos como surfactantes	72
2.8 Referencias.....	72

Capítulo 3: Obtención de espumas de hidroxiapatita: uso de un surfactante sintético como agente espumante de la fase líquida.

3.1 Introducción	87
3.2 Objetivos	88
3.3 Materiales y métodos	89
3.3.1 Preparación del cemento	89
3.3.1.1 Síntesis del α -TCP	89
3.3.1.2 Molienda del α -TCP	89
3.3.1.3 Obtención del cemento H	90
3.3.2 Solución de surfactante y proceso de espumado de la fase líquida	90
3.3.2.1 Condiciones de espumado de la fase líquida	90
3.3.2.2 Adaptación de un agitador de mano para obtener espumas líquidas	90
3.3.3 Fabricación de los cementos espumados	91
3.3.4 Diseño experimental	92
3.3.4.1 Espumabilidad y estabilidad de las espumas de Tween 80	92
3.3.4.2 Variables del proceso de espumado y respuestas analizadas	93
3.3.4.3 Efecto del tipo de moldeo sobre la porosidad	93
3.3.4.4 Efecto del aceite desmoldeante sobre la macroporosidad abierta en la superficie	94
3.3.4.5 Estudio cinético de la reacción de fraguado	94
3.3.4.6 Sinterización de las espumas de hidroxiapatita	94
3.3.5 Técnicas de caracterización	95
3.3.5.1 El tiempo de cohesión	95
3.3.5.2 El tiempo inicial y final de fraguado	95
3.3.5.3 Inyectabilidad de las pastas espumadas	95
3.3.5.4 La micro y macroestructura	96
3.3.5.5 La porosidad	96
3.3.5.6 Picnometría de helio	97
3.3.5.7 Resistencia a la compresión	97
3.3.5.8 Difracción de rayos X y cálculo del porcentaje de reacción	98
3.3.5.9 Superficie específica	98
3.3.6 Análisis estadístico de los resultados	98
3.4 Resultados y discusión	99
3.4.1 Caracterización de la fase sólida del cemento	99
3.4.2 Espumabilidad y estabilidad de las espumas de Tween 80	101

3.4.3 Mezcla del polvo de cemento con la espuma	103
3.4.4 Efecto de las variables del proceso de espumado sobre las propiedades de las espumas de hidroxiapatita	103
3.4.4.1 Tiempo de cohesión.	103
3.4.4.2 Tiempos de fraguado.	105
3.4.4.3 Porosidad total y macroporosidad	106
3.4.4.4 Micro y macroestructura.....	109
3.4.4.5 Distribución de la porosidad en cementos espumados y no espumados.....	111
3.4.4.6 Resistencia a la compresión	114
3.4.5 Inyectabilidad de las pastas espumadas	117
3.4.6 Fases cristalinas presentes y estudio cinético de la reacción de fraguado.....	119
3.4.7 Sinterización de las espumas de hidroxiapatita	123
3.4.7.1 Composición de las espumas después de la sinterización	123
3.4.7.2 Densidad esquelética y microestructura de las espumas sinterizadas	124
3.4.7.3 Distribución de la porosidad en las espumas sinterizadas.....	126
3.4.7.4 Resistencia a la compresión de las espumas sinterizadas	129
3.4.7.5 Trabajo futuro empleando las espumas sólidas fraguadas y sinterizadas.....	129
3.5 Conclusiones.....	130
3.6 Referencias	132

Capítulo 4: Cementos óseos compuestos con biopolímeros.

4.1 Introducción	135
4.2 Objetivos	136
4.3 Materiales y métodos	136
4.3.1 Diseño experimental	136
4.3.1.1 Nomenclatura de los cementos compuestos con biopolímeros.....	137
4.3.1.2 Tiempo de cohesión, tiempos de fraguado, y resistencia a la compresión de los cementos compuestos	137
4.3.1.3 Caracterización de las propiedades fisicoquímicas y texturales de los cementos compuestos	139
4.3.1.4 Comportamiento a flexión de los cementos compuestos	140
4.3.2 Fase sólida del cemento	140
4.3.3 Fase líquida del cemento	140
4.3.3.1 Disoluciones de gelatina.....	140
4.3.3.2 Disoluciones de alginato de sodio y alginato de sodio sulfatado	141
4.3.3.3 Disoluciones de extracto de soja.....	141
4.3.4 Preparación y caracterización de los cementos compuestos	141
4.3.4.1 Fabricación de las probetas.....	141
4.3.4.2 Medios de fraguado	141
4.3.4.3 Técnicas de caracterización.....	142
4.3.5 Análisis estadístico de los resultados	143
4.4 Resultados y discusión	143
4.4.1 Disoluciones de biopolímeros como fase líquida de los cementos	143
4.4.2 Contenido de biopolímero en los cementos compuestos	144
4.4.3 Tiempo de cohesión, tiempos de fraguado y resistencia a la compresión	146
4.4.3.1 Cementos compuestos con gelatina	146
4.4.3.2 Cementos compuestos con alginato de sodio	148
4.4.3.3 Cementos compuestos con extracto de soja	152
4.4.4 Propiedades fisicoquímicas y texturales de los cementos compuestos	154
4.4.4.1 Cementos compuestos con gelatina tipo A y B.....	154
4.4.4.2 Cementos compuestos con alginato de sodio sin sulfatar y sulfatado	159
4.4.4.3 Cementos compuestos con extracto de soja	164
4.4.5 Comportamiento mecánico de los cementos compuestos.....	167
4.4.5.1 Ensayo de compresión: curvas esfuerzo-deformación	167
4.4.5.2 Ensayo de flexión: módulo de elasticidad de los compuestos.....	168

4.4.6 Inyectabilidad y cohesión de los cementos compuestos	170
4.4.6.1 Porcentaje de inyectabilidad.....	170
4.4.6.2 Curvas fuerza-desplazamiento del émbolo.....	172
4.4.6.3 Cohesión de las pastas inyectadas	174
4.5 Conclusiones.....	178
4.6 Referencias.....	180

Capítulo 5: Desarrollo y caracterización de espumas sólidas compuestas: empleo de polímeros naturales como agentes espumantes de la fase líquida.

5.1 Introducción	183
5.2 Objetivos	184
5.3 Materiales y métodos	184
5.3.1 Agentes espumantes de origen natural y polvo de cemento	184
5.3.1.1 Biopolímeros empleados.....	184
5.3.1.2 Preparación de la fase líquida del cemento	185
5.3.1.3 Fase sólida del cemento	185
5.3.2 Estudio de espumabilidad y estabilidad de las espumas preparadas con las disoluciones biopoliméricas	186
5.3.2.1 Determinación de la espumabilidad y de la estabilidad de las disoluciones	186
5.3.3 Desarrollo y caracterización de espumas compuestas autofraguables y prefraguadas	187
5.3.3.1 Método de espumado	187
5.3.3.2 Formulaciones de cemento estudiadas	188
5.3.3.3 Nomenclatura de las espumas de HA compuestas con biopolímeros	191
5.3.3.4 Ensayo de cohesión para los cementos macroporosos compuestos.....	192
5.3.3.5 Caracterización de las espumas sólidas obtenidas	193
5.3.3.6 Criterios de selección	193
5.3.3.7 Caracterización de la porosidad abierta	194
5.3.4 Estudio cinético de la reacción de endurecimiento	194
5.3.4.1 Diseño experimental	194
5.3.4.2 Preparación de las muestras	195
5.3.4.3 Métodos de caracterización.....	195
5.3.5 Análisis estadístico de los resultados	196
5.4 Resultados y discusión	196
5.4.1 Espumabilidad y estabilidad de las disoluciones de biopolímeros	196
5.4.2 Cohesión en medio líquido de las pastas de cemento compuesto.....	198
5.4.2.1 Cohesión de las diversas formulaciones de cementos compuestos.....	200
5.4.2.2 Biopolímeros como promotores de la cohesión	204
5.4.3 Caracterización de las espumas sólidas compuestas	206
5.4.3.1 Espumas compuestas con gelatina bovina.....	206

5.4.3.2 Espumas compuestas con alginato de sodio sin sulfatar	209
5.4.3.3 Espumas compuestas con alginato de sodio sulfatado.....	213
5.4.3.4 Espumas compuestas con extracto de soja	215
5.4.3.5 Relación entre espumabilidad, estabilidad y macroporosidad	217
5.4.3.6 Modificación de la macroporosidad por el proceso de moldeo	218
5.4.4 Selección de formulaciones.....	218
5.4.4.1 Formulaciones de espumas autofraguables <i>in situ</i>	218
5.4.4.2 Formulaciones de espumas prefraguadas	220
5.4.5 Porosidad abierta en las espumas seleccionadas	221
5.4.5.1 Porosidad abierta de las espumas autofraguables <i>in situ</i>	221
5.4.5.2 Porosidad abierta de las espumas prefraguadas	223
5.4.5.3 Espumas autofraguables <i>in situ</i> vs. espumas prefraguadas.....	226
5.4.5.4 Morfología de la macroporosidad y conectividad entre macroporos	228
5.4.6 Estudio cinético de la reacción de endurecimiento	230
5.4.6.1 Evolución del porcentaje de reacción	230
5.4.6.2 Evolución de la superficie específica.....	233
5.4.6.3 Evolución de la microestructura	234
5.4.6.4 Espectroscopia de infrarrojos:	237
5.4.6.5 Evolución de las propiedades mecánicas.....	240
5.4.7 Fraguado de las espumas en medio de cultivo	243
5.4.8 Formulaciones de cemento con gelatina porcina	244
5.5 Conclusiones.....	246
5.6 Agradecimientos	247
5.7 Referencias.....	247

Capítulo 6: Caracterización preclínica de las espumas de hidroxiapatita autofraguables *in situ*.

6.1 Introducción	251
6.2 Marco teórico	252
6.2.1 Métodos de esterilización	252
6.2.2 Evaluación <i>in vitro</i> a través de cultivos celulares	254
6.2.2.1 Ensayos de adhesión, proliferación y diferenciación celular	255
6.2.2.2 Diferentes líneas celulares: células osteoblásticas Saos-2	255
6.2.3 Modelos animales para la evaluación de la biocompatibilidad y la osteointegración	256
6.2.3.1 Anatomía del conejo: el esqueleto	257
6.3 Objetivos	258
6.4 Materiales y métodos	258
6.4.1 Composición de las espumas de hidroxiapatita empleadas	258
6.4.1.1 Polvo del cemento	259
6.4.1.2 Fase líquida de los cementos	259
6.4.1.3 Obtención de espumas sólidas compuestas estériles	260
6.4.2 Primer cultivo celular sobre las espumas sólidas compuestas	261
6.4.2.1 Preparación de muestras	261
6.4.2.2 Cultivo celular	261
6.4.2.3 Métodos de caracterización	262
6.4.3 Segundo cultivo celular sobre la espuma de hidroxiapatita obtenida únicamente con Tween 80	262
6.4.3.1 Preparación de muestras	262
6.4.3.2 Cultivo celular	263
6.4.3.3 Protocolos de caracterización del cultivo celular	264
6.4.4 Implantación de los materiales en modelo animal	266
6.4.4.1 Protocolo experimental	266
6.4.4.2 Implantación de las espumas por inyección	267
6.4.4.3 Implantación subcutánea de discos prefraguados	267
6.4.4.4 Evaluaciones realizadas	268
6.4.4.5 Preparación de las espumas para implantar	268
6.4.5 Análisis estadístico de los resultados	269
6.5 Resultados y discusión	270
6.5.1 Preparación de espumas bajo condiciones de esterilidad	270

6.5.2 Primer cultivo celular: adhesión de osteoblastos sobre las espumas de hidroxiapatita compuestas	271
6.5.2.1 Adhesión de osteoblastos Saos-2.....	271
6.5.2.2 Cambio del pH y de la concentración de calcio.....	273
6.5.2.3 Sugerencias para el segundo cultivo celular	274
6.5.3 Segundo cultivo celular: adhesión, proliferación y diferenciación	275
6.5.3.1 Adhesión y proliferación	275
6.5.3.2 Cambio del pH y de la concentración de calcio.....	277
6.5.3.3 Indicadores de diferenciación	280
6.5.3.4 Comparación de los resultados con la bibliografía	282
6.5.4 Implantación de las espumas en modelo animal.....	283
6.5.4.1 Observación macroscópica	284
6.5.4.2 Observación por μ -CT.....	286
6.5.4.3 Conversión de las espumas implantadas a hidroxiapatita	288
6.5.4.4 Observación histológica	288
6.6 Conclusiones.....	292
6.7 Agradecimientos	293
6.8 Referencias.....	293

Chapter 7: Conclusions.

.....	299
-------	-----

Capítulo 8: Trabajos publicados y perspectivas futuras.

8.1 Trabajos publicados.....	301
8.1.1 Revistas científicas indexadas.....	301
8.1.2 Comunicaciones en congresos.....	301
8.2 Perspectivas futuras.....	303

Anexos.

A.1 Lista de abreviaturas.....	305
A.2 Análisis estadísticos	306
A2.1 Propagación de errores.....	306
A2.2 Representación de los errores experimentales	307
A2.3 Pruebas estadísticas.....	307
A.3 Protocolo de espumado para obtener espumas de hidroxiapatita.....	308
A3.1 Condiciones de espumado de la fase líquida.....	308
A3.2 Mezcla de la fase sólida con la líquida	308
A3.3 Moldeo y fraguado.....	308
A3.4 Preparación de las muestras para cultivo celular	308
A3.5 Preparación de las espumas de hidroxiapatita para implantar mediante inyección	309
A.4 Notas y fe de erratas.....	310

Chapter 1: Introduction and objectives.

1.1 Thesis motivation

The motivation for this thesis is the great importance for the skeleton functions and the high rate of events and illness that can damage the tissue, which requires rapid and effective treatments for recovering the function in the shortest possible time.

The bones are complex and hierarchical organs consisting of mineralized organic tissue. The human skeleton is designed to protect vital organs of the body and to allow the movement of the skeletal/muscle system. Bones are also an essential mineral reserve for metabolism, such as calcium and phosphorus, which play an important role in the regulation of ionic concentrations in the extracellular fluids. Mesenchymal stem cells (MSC) are found in the bone marrow, which are pluripotent, able to differentiate into bone, cartilage, tendon, dermis, or fatty tissue; in addition, there are hematopoietic cells that can differentiate into red and white blood cells, which are responsible for oxygen transport and the immune system of the human body [1].

In spite of their evolution, bones are exposed to injuries and illnesses that generate the loss of the bone function with consistent human morbidity. With the aim to overturn bone damage, each year in the United States there are 558200 total hip replacement surgeries, 27500 bone grafts transplantations, 480000 fracture internal fixations and 30000 maxillofacial reconstruction surgeries [2]. The annual cost of treatment of hip and spine surgeries in the United States is 10 billion dollars, while in the United Kingdom 50000 annual total hip replacements have a cost of 250 million pounds; in the coming years it is expected that between 20 and 50 % of these interventions will require a surgical review and an increase in bone mass [3]. Furthermore, the lesions on bones are increased by the aging of the population, which append to injuries caused by trauma, injuries generated by metabolic degenerative processes (such as osteoporosis, Paget syndrome or bone tumors), inflammatory diseases (such as arthritis) [4], and genetic problems, such as imperfect ontogenesis [1].

In any of the above mentioned cases, bone should be regenerated to recover its function. The natural process of bone healing, in addition with the mechanical fixation, constitutes a successful method to treat most fractures caused by trauma; however, metabolic disorders or the presence of critical size defects prevent regeneration and cause the local loss of bone function. Some clinical applications which require a bone filling material for tissue regeneration are total joint replacement, vertebral disc fixation, maxillofacial surgery, the fixation of orthopedic and dental implants, and bone cavities filling caused by tumor removal [1]. It is estimated that in Europe bone substitutes are annually used in 1 million surgical procedures. The worldwide market of these materials is estimated to be 5 billion Euros, with annual growth rate of 8-15%.

Bone grafts are the best materials for filling bone defects [1,5,6]. The success of the grafts is related to keeping its structural integrity and morphogenetic proteins when they are transplanted [6]. The autografts contain living osteocytes and do not show immune rejection; therefore, they are the most osteogenic material available [5]; nevertheless, they have the disadvantage of the limited amount of bone that can be removed without loss of the bone function. As an example of the former statement, it is known that autografts removed from iliac bone makes more difficult the patient healing and may also develop infections, fractures, pain, paresthesia, or even damage of nearby nerves in 10 % of the cases [1]. Another commonly used bone filler material is allograft from corpses; however, the possible immune rejection or the possible transmission of diseases are two of its main disadvantages when failure follows proper transplantation protocols. In addition, allografts extracted from living donors have the additional disadvantage of temporary inability of the donor [5]. The use of xenografts or grafts from other animal species (ivory, coral or bovine bone), is questionable due to the possible transmission of diseases or immune rejection [5] regardless of its effectiveness and availability. Although the immune rejection of the allografts and xenografts can be prevented by treatments that inactivate the antigens, such as freeze drying or lyophilization, these treatments can also cause the loss of osteoinductive capacity of the graft, due to the sacrifice of the cells, growth factors and blood vessels of the tissue [5,6].

To solve the disadvantages of synthetic bone grafts, a new generation of materials has been developed through the techniques of tissue engineering. In this approach, third generation biomaterials able to act as support for bone regeneration [7] are created. In the last years it has been established that these materials, also known as scaffolds, must meet the following requirements [8-10]:

1. **Biocompatibility:** The material must not lead to a chronic inflammatory response, or exhibit immunogenicity, or toxicity.
2. **Biodegradable:** The material should be reabsorbed at a similar rate as the new tissue growth, in order to prevent gaps between the implant and the surrounding tissue or a regeneration delay due to material blocking.
3. **Biomimetic:** The material must reproduce the morphology, the structure and the function of the tissue to regenerate.
4. **Porosity:** For new bone ingrowth it is necessary open porosity in the material, which will allow osteoblast and MSC migration and proliferation, as well as vascularization. In addition, the larger area of the porous material provides more space to hold a greater number of cells, and improve the osteointegration of the implant.
5. **Mechanical resistance:** The material must be resistant enough to not collapse when it is manipulated, before, during or after implantation, or in the daily activities of the patient. Preferably, it should have similar mechanical properties to bone to prevent the stress shielding effect.

6. **Vehicle capacity:** Additionally, the material can act as a vehicle for the controlled release of drugs, growth factors and/or cells that promote tissue regeneration.
7. **Easy to sterilize:** The material will be in contact with organic tissues, therefore must be sterilized without the loss of the above mentioned properties.

Another requirement appears due to the current advances in surgery, that developed new surgical techniques which reduce the damage caused to the patient, called minimally invasive surgery [11]. This new approach reduces risk and cost of intervention, but requires injectable bone grafting materials able to remain in the implantation site (cohesion) in order to act as scaffold. Due to this, the injectability and cohesion are new requirements for the next generation of biomaterials for bone regeneration.

Currently, the biomaterials used for bone regeneration are polymeric or ceramic, from natural or synthetic source, and the combination of them to form composite materials that combines the polymer resorption capacity and the ceramic bioactivity [8,10,12]. Examples of applied natural polymeric materials are proteins such as collagen or gelatin, polysaccharides such as alginate, cellulose, hyaluronic acid or chitosan, and synthetic polymers such as polylactic acid or polyglycolic acid, among others [8,10,12]. On the other hand, ceramics examples are bioceramics based on calcium phosphates and bioactive glasses traditionally synthesized at high temperatures [8,12,13]. These materials act as osteoconductive scaffolds because they support new bone growth on its surface; however, the incorporation of morphogenetic bone proteins and bone growth factors, makes the material osteoinductive, *i.e.*, capable of stimuli bone formation [14]. To incorporate macropores in these materials, which promote bone ingrowth, different methods are applied such as leaching of particles, fibers or meshes; foaming through gas generation; phase separation; directional freeze drying; particle pyrolysis; solid free fabrication techniques; pressure change methods or positive and negative replica methods [9,10].

Hydroxyapatite (HA) and beta tricalcium phosphate (β -TCP), are the most clinically used calcium phosphates ceramics for bone regeneration. The main feature is the compositional similarity with natural bone mineral [15]. These ceramics are bioactive and osteoconductive, although, its degradation is too slow, which delays the bone healing. An alternative to the ceramics consolidated at high temperature are the calcium phosphate cements (CPC). These materials are also biocompatible and osteoconductive [16,17]. The cement advantage is that its consolidation is due to a room temperature setting reaction, consequently resulting in low crystalline structures which increases the material resorption and allows the incorporation of molecules to increase biological material recognition [18].

Despite the fact that CPC are intrinsic porous materials, the porosity is in a nano/micrometer range and is not accessible for the cells involved in bone remodeling [19]; for this reason, traditional CPC do not meet the open porosity requirement for bone tissue engineering. To make the cements accessible for bone cells, increase the *in vivo* resorption and promote blood vessels formation, the incorporation of macroporosity in the structure of the CPC is proposed [20].

Different approaches have been proposed to obtain macroporous CPC [20-24], nevertheless, they present the following disadvantages:

- Porosity should be generated *in vitro*, which eliminates the option of implementing the cements using minimally invasive surgery.
- In the case of having a cement that can be implanted as a paste, the porosity is not generated until the porogen agent has been dissolved in the physiological medium, which can delay the bone healing process [25].

As a solution to the former issues shown above, in the present thesis the liquid phase foaming method to obtain macroporous cements, also called solid foams, is proposed. This method consists in the fabrication of a foam with the liquid phase of the cement and the solid phase is then added to the liquid foam. The solid will be incorporated into the liquid phase of the foam, producing a cement paste that keeps the air bubbles after setting, therefore, the liquid foam acts as a template for the macroporosity. The advantages of this new technique are:

- The obtained foams can be self-setting under physiological conditions.
- The foams can be applied as bone fillers in non invasive surgeries, since the cement pastes can be injected.
- The open macroporosity is available since the implantation time, consequently the cell colonization and bone regeneration, can start immediately.

1.2 Objectives

1.2.1 General objective

The general objective of this thesis is to obtain solid hydroxyapatite (HA) foams through foaming the liquid phase of a bone cement based on alpha tricalcium phosphate (α -TCP).

The characteristics that the developed HA foams should meet to be used as bone grafting materials are listed below:

- Must be able to set at room or physiological temperature.
- Must have different levels of open porosity.
- Must be injectable and keep the porosity after injection.
- Must be bioactive, and biodegradable.
- Should not be toxic or carcinogenic.
- Must be, at molecular level, compositional and structurally similar to bone tissue.
- Must be easy to sterilize and store, without altering their properties.

A key issue in this development is the selection of the foaming agent of the liquid phase. The foaming agent must be soluble in water (since the liquid phase of the CPC is an aqueous solution), it should be biocompatible and it should not affect the setting reaction of the cement. The synthetic surfactants approved for parenteral administration, some proteins and polysaccharides, are potential candidates since they have foaming and stabilizing properties of colloidal systems [26-29].

On the basis of these two options, in the first part of the thesis the non ionic surfactant Tween 80 (Polysorbate 80) was tested as synthetic foaming agent. This surfactant was selected due to its high water solubility and because it has been approved as excipient of drugs and vaccines for parenteral administration in dosages lower than 0.4 % w/v [30-33]. In the second part of the thesis; gelatin, sodium alginate, and soy extract were tested as natural foaming agents. These biopolymers were selected because they contain functional groups that can promote some biological processes related to bone regeneration [27,34-39]. It should be mentioned that mixtures of CPC with gelatin and sodium alginate have been already studied [40-46]. In contrast, the incorporation of soy extract is a very new approach.

It is expected that the obtained HA foams have their main applications in the field of bone regenerative medicine as: 1) injectable material for filling bone defects through minimally invasive surgery, 2) preset macroporous bone filler material used in traditional surgery, and 3) macroporous scaffold for the development of artificial bone tissue. Figure 1.1 shows graphically these applications.

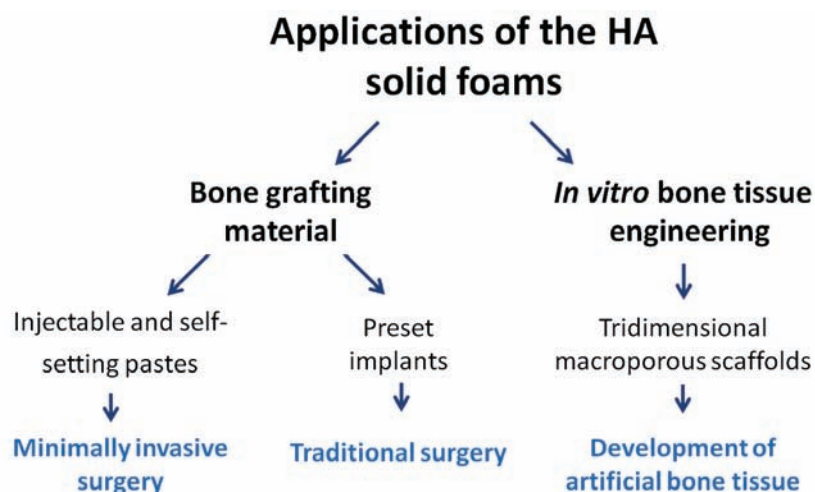


Figure 1.1: Expected applications for the solid hydroxyapatite foams developed in this thesis.

1.2.2 Partial objectives

To achieve the general objectives mentioned above, the following partial objectives were proposed:

First part (synthetic foaming agent):

1. Determine the efficacy of the foaming method applied to a cement based on α -TCP, using the surfactant Tween 80 as synthetic foaming agent.
2. Determine the effect of the foaming and molding processes parameters on the porosity and the mechanical behavior of the HA foams.
3. Perform a kinetic study of the setting reaction under simulated physiological conditions, in order to determinate the effect of the Tween 80 incorporation.
4. Improve the mechanical properties of the foams by sintering.

Second part (natural foaming agents):

5. Determine the effect of the incorporation of gelatin, sodium alginate and soy extract (biopolymers) on the physicochemical and mechanical properties of the cement (obtaining of biopolymer/CPC composites).
6. Determine the factors that improve the injectability of the composite cements to determine its applicability in minimally invasive surgery or its processing by injection.
7. Assess the biopolymers as natural foaming agents and get solid composite foams through the liquid phase foaming method.
8. Select for each biopolymer, one optimal foam formulation to be used as injectable bone graft and as a preset scaffold, based on the injectability, the porosity and the cohesion of the foamed pastes.

9. Adapt the foaming process to work under sterile conditions, an important requirement needed for *in vitro* cell culture and *in vivo* implantation.
10. Characterize the HA foams selected as implantable bone grafts (injectable and *in situ* self-setting), which means:
 - a. Perform a kinetic study of the setting reaction under simulated physiological conditions.
 - b. Develop protocols for the preparation of samples for 2D cell culture.
 - c. Test the adhesion, proliferation and differentiation of osteoblast like cells on the HA foams.
 - d. Develop protocols for the implantation of the HA foams by injection.
 - e. Study the efficacy of the HA foams to regenerate critical size bone defects in an animal model.

With the above explanation the general and specific objectives of this work are defined; however with the intention of placing this thesis in an international and multicentral research project, the next section explains the story of its development.

1.3 Thesis in the context of the European project Smart CaP

In 2005 the European Commission approved a research project entitled "*Injectable macroporous biomaterial based on calcium phosphate cement for bone regeneration*" whose acronym is Smart CaP (EC project: NMP3-CT-2005-013912). The draft main objective was to develop an injectable, *in vivo* self-setting synthetic bone graft material, starting from a CPC. The clinical use of the graft should be feasible in the short term and should help to generate innovations in the long term.

The entities involved in the Smart CaP project were the Technical University of Catalonia, which led the coordination of the project; the Institute of Composite and Biomedical Materials of Naples and the Rizzoli Orthopedic Institute in Bologna, both in Italy; the Brighton University in the United Kingdom; the Trinity College of Dublin in Ireland; the Ghent University in Belgium and the Ulm University in Germany.

The project was raised for a period of three years, distributing activities between the involved research centers. The distribution of the activities is summarized in the work packages (WP) listed below, where one or more institutions were involved.

WP1: Material design, fabrication and characterization.

WP2: Functionalization for improved osteogenesis and angiogenesis.

WP3: Biological molecules loading and delivery assays.

WP4: Isolation and culture of primary cells on biomaterials.

WP5: *In vitro* effect of mechanical stimuli on biomaterials biological performance.

WP6: Computer simulations of bone regeneration.

WP7: *In vivo* study of bone regeneration.

WP 8: Project management: exploitation and dissemination.

In order to cover some activities of the Smart CaP project this thesis was started in 2005 at the Biomaterials, Biomechanics and Tissue Engineering Group of the Technical University of Catalonia. The activities of the WP1 were performed during the following two years, this thesis largely consists on this work; however, the need to carry out studies *in vitro* and *in vivo* in different centers, allowed for this thesis to incorporate tasks beyond the WP1. Thus, at the end of the second year and during the third year of experimentation, aspects such as the cell culture and the foam implantation *in vivo* were covered. These tasks were performed at the Rizzoli Orthopedic Institute and the Ulm University respectively. At the same time, the functionalized foams, that should be tested in the WP 5 and 6, were optimized and produced.

A constant feedback between the involved centers allowed brain storms, the use of special analysis techniques and the opportunity to be part of an interdisciplinary working group, achieving results beyond the idea and reaching the application in a short period of time. In this way, the present thesis represents one of the central parts in the development of the Smart CaP project, almost covering the WP1 and taking some aspects of the WP 4, 5 and 7.

Currently, the Smart CaP project has been successfully concluded. Some of the major achieved milestones, based on the obtained solid HA foams are listed below:

- The release of the polymers used as foaming agents was characterized.
- The composite foams were tested as release vehicle of bone morphogenetic protein (BMP-2), vascular endothelial growth factor (VEGF) and anti-inflammatory drugs.
- Various cytotoxicity tests were performed on different foam formulations, concluding that the foams are not toxic.
- Using the finite element method, computer simulations were performed to predict the load distribution in the foam structure, in order to identify the effect of the mechanical stimuli on the MSC differentiation.
- Cells were seeded on preset HA foams within bioreactor system, under two types of stimuli compression and perfusion flow. The results of finite elements were validated with these studies, getting a good correlation.
- The HA foams were implanted *in vivo* as injectable bone grafting material. The model used was a critical size bone defect induced in femoral condyle of New Zealand rabbits.
- The biopolymers were functionalized with peptides to increase cell adhesion, and functionalized HA foams were obtained using these modified biopolymers.
- The effect of different contents of functionalized biopolymers on the MSC adhesion was evaluated.
- An automatic foam injection device has been developed to facilitate the implantation of the material.

This project has inspired some scientific articles published in indexed journals [19,38,47-51], some participation in international conferences [52-54] and one European patent has been presented (EP09382046.2). Furthermore, abundant information has been created yet to be published, because of recent patent publishing, as well as the recent project end date. It is expected that the data will be published and the information released to the public knowledge.

1.4 Thesis structure

The thesis consists of 8 chapters and one annex, organized in the following way: the introduction, a general theoretical chapter, 4 experimental chapters, the conclusions and the future perspectives. Each experimental chapter contains a brief introduction; the objectives of the chapter; the materials and applied methods; the results and discussion; the conclusions and finally the bibliography. With this distribution it is expected that the reader can understand each chapter independently without having to read the thesis on its entire extent since it meant to be a reference material; however, the order of the chapters and this description will be helpful to understand the work in a comprehensive manner.

It has to be mentioned that chapters 2-6 and 8 are written in Spanish, while chapters 1 and 7 (respectively objectives and conclusion) were written in English in order to apply to the European doctoral mention.

Chapter 1: *Introduction and objectives.* This chapter covers the reasons that motivated this work. It also raises the objectives of the thesis, placing it within the framework of a more extensive research project.

Chapter 2: *Theoretical framework.* This chapter describes the concepts followed in the thesis, helps understanding the rationale behind the employed materials and methodologies. Also, references similar works, their advantages and disadvantages. Finally, the chapter describes the main used characterization techniques.

Chapter 3: *Obtaining of hydroxyapatite foams: using a synthetic surfactant as foaming agent of the liquid phase.* In this chapter a non ionic surfactant, Tween 80, is used as a synthetic foaming agent of the liquid phase. This surfactant is proposed as a model foaming agent for the fabrication of HA foams, which aims to understand the effect of the process parameters such as the L/P ratio, the foaming agent concentration, the method and time of molding on the foam properties such as porosity, micro and macrostructure, specific surface area and the mechanical behavior. Finally, the sintering of the foams is studied as a method to increase the mechanical strength.

Chapter 4: *Composite bone cements with biopolymers.* This chapter reviews the effect of the incorporation of biopolymers in the CPC. Cement properties such as cohesion time, setting times, mechanical strength (compressive and flexural strength), porosity, specific surface area and composition after setting in different media (immersed in liquid or moisture saturated atmosphere) are tested. As well, the maximum amount of biopolymer that can be introduced into the cement and the optimal quantities to enhance the injectability and the cohesion are determined. This characterization is important because these composite cements will form the continuous phase of the developed HA foams.

Chapter 5: Development and characterization of composite solid foams: use of natural polymers as foaming agents of the liquid phase. In the first part of this chapter the biopolymers are evaluated as possible foaming agents. Subsequently, based on these results, and the results obtained in chapters 3 and 4, potential formulations for composite foams are proposed. These materials are characterized in terms of composition, porosity, mechanical strength and cohesion. At this stage two types of HA foams can be distinguished: the first, are foams formulations for bone grafting by injection and, the second are preset formulations for tissue engineering or bone grafting through conventional techniques. The criteria selection is based on the cohesion of the paste in liquid. In addition, one foam formulation for each biopolymer and application type is selected, based on the total induced porosity, and later the distribution of porosity is determined by mercury intrusion porosimetry. Finally, the evolution of the microstructure, mechanical strength and composition of selected composite foams is studied; furthermore, the biopolymers release in the setting media is characterized, as function of the reaction time under simulated physiological conditions.

Chapter 6: Preclinical characterization of the *in situ* self-setting hydroxyapatite foams. This is the last experimental chapter of the thesis. In this chapter the adhesion, proliferation and differentiation of osteoblastic like cells directly cultured on the HA foams selected as *in-situ* self-setting grafts is evaluate. Finally, an *in vivo* study is performed in an animal model (rabbit), to demonstrate the possibility of implanting the HA foams by injection.

Chapter 7: Conclusions. This chapter indicates which HA foam formulations can be implanted by injection and satisfy the requirements to regenerate critical sized bone defects. It also describes briefly the contributions made in the fields of bone tissue engineering, materials science, medicine and biomedical engineering.

Chapter 8: Published work and future prospects. This chapter summarizes the published work from the thesis and briefly describes the possible approaches for the further characterization and performance of the injectable self-setting HA foams.

Annex. The annex collects statistical information, the abbreviations used, and summarize the liquid phase foaming protocol for sample preparation. It also has a space for those who want to make notes and comments.

1.5 References

1. Mistry A.S., Mikos A.G. Tissue Engineering Strategies for Bone Regeneration. *Adv Biochem Engin/Biotechnol* 2005; **94**: 1-22.
2. Langer R., Vacanti J.P. Tissue Engineering. *Science* 1993; **260**: 920-926.
3. Green D., Walsh D., Mann S., Oreffo R.O.C. The potential of biomimesis in bone tissue engineering: Lessons from the design and synthesis of invertebrate skeletons. *Bone* 2002; **30**: 810-815.
4. Rodan G.A., Martin T.J. Therapeutic Approaches to Bone Diseases. *Science* 2000; **289**: 1508-1514.
5. Truumees E., Herkowitz, H.N. Alternatives to Autologous Bone Harvest in Spine Surgery. *U.P.O.J.* 1999; **12**: 77-88.
6. TenHuisen K.S., Martin R.I., Klimkiewicz M., Brown P.W. Formation and properties of a synthetic bone composite: Hydroxyapatite-Collagen. *Journal of Biomedical Materials Research* 1995; **29**: 803-810.
7. Hench L.L., Polak J.M. Third-generation biomedical materials. *Science* 2002; **295**: 1014-1017.
8. Santin M. *Strategies in Regenerative Medicine: Integrating Biology with Materials Design*. USA: Springer, 2009.
9. Karageorgiou V., Kaplan D. Porosity of 3D biomaterial scaffolds and osteogenesis. *Biomaterials* 2005; **26**: 5474-5491.
10. Rezwani K., Chen Q.Z., Blaker J.J., Boccaccini A.R. Biodegradable and bioactive porous polymer/inorganic composite scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials* 2006; **27**: 3413-3431.
11. Assaker R. Minimal access spinal technologies: state-of-the-art, indications, and techniques. *Joint Bone Spine* 2004; **71**: 459-469.
12. Giannoudis P.V., Dinopoulos H., Tsiridis E. Bone substitutes: An update. *Injury* 2005; **36**: S20-S27.
13. Kim H.M. Ceramic bioactivity and related biomimetic strategy. *Current Opinion in Solid State and Materials Science* 2003; **7**: 289-299.
14. Furth M.E., Atala A., Van Dyke M.E. Smart biomaterials design for tissue engineering and regenerative medicine. *Biomaterials* 2007; **28**: 5068-5073.
15. Dorozhkin S.V. Calcium orthophosphates. *J.Mater.Sci.* 2007; **42**: 1061-1095.
16. Dorozhkin S.V. Calcium orthophosphate cements for biomedical applications. *J.Mater.Sci.* 2008; **43**: 3028-3057.
17. Bohner M. Calcium orthophosphates in medicine: from ceramics to calcium phosphate cements. *Injury* 2000; **31**: D37-D47.

18. Ginebra M.P., Traykova T., Planell J.A. Calcium phosphate cements: Competitive drug carriers for the musculoskeletal system? *Biomaterials* 2006; **27**: 2171-2177.
19. Espanol M., Perez R.A., Montufar E.B., Marichal C., Sacco A., Ginebra M.P. Intrinsic porosity of calcium phosphate cements and its significance for drug delivery and tissue engineering applications. *Acta Biomaterialia* 2009; **5**: 2752-2762.
20. Ginebra M.P., Delgado J.A., Harr I., Almirall A., Del Valle S, Planell J.A. Factors affecting the structure and properties of an injectable self-setting calcium phosphate foam. *Journal of Biomedical Materials Research* 2007; **80A**, 351-361.
21. Almirall A., Larrecq G., Delgado J.A., Martinez S., Planell J.A., Ginebra M.P. Fabrication of low temperature macroporous hydroxyapatite scaffolds by foaming and hydrolysis of an α -TCP paste. *Biomaterials* 2004; **25**: 3671-3680.
22. Xu H.H.K., Carey L.E., Simon Jr.C.G. Premixed macroporous calcium phosphate cement scaffold. *Journal of Materials Science-Materials in Medicine* 2007; **18**: 1345-1353.
23. Bohner M. Calcium phosphate emulsions. *Key Eng Mater* 2001; **765-768**: 192-195.
24. Gbureck U., Hölzel T., Doillon, Müller F.A., Barralet J.E. Direct printing of bioceramic implants with spatially localized angiogenic factors. *Adv Mater* 2007; **19**: 795-800.
25. Link D.P., van den Dolder J., van den Beucken J.J., Wolke J.G., Mikos A.G., Jansen J.A. Bone response and mechanical strength of rabbit femoral defects filled with injectable CaP cements containing TGF- β 1 loaded gelatin microparticles. *Biomaterials* 2008; **29**: 675-682.
26. Djagny K.B., Wang Z., Xu S. Gelatin: a valuable protein for food and pharmaceutical industries: review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 2001; **41**: 481-492.
27. Gombotz W.R., Wee S.F. Protein release from alginate matrices. *Advanced Drug Delivery Reviews* 1998; **31**: 267-285.
28. Cancela M.A., Álvarez E., Maceiras R. Polymers in alimentary industry: properties of the sodium alginate. *Electronic Journal of Environmental, Agricultural and Food Chemistry* 2003; **2**: 1-8.
29. Nakamura A, Maeda H, Corredig M. Competitive adsorption of soy soluble polysaccharides in oil-in-water emulsions. *Food Research International* 2004; **37**: 823-831.
30. Akers M.J. Excipient-drug interactions in parenteral formulations. *J Pharm Sci* 2002; **91**: 2283-2300.
31. Floyd A.G. Top ten considerations in the development of parenteral emulsions. *Pharm.Sci.Tech.Today* 1999; **4**: 134-143.
32. Rowe R.C., Sheskey P.J., Weller P.J. Handbook of pharmaceutical excipients. London: Pharmaceutical Press, 2003.
33. Ash M., Ash I. Handbook of pharmaceutical additives. Aldershot: Gower Publishing, 1995.
34. Tabata Y. Tissue Regeneration Based on Growth Factor Release. *Tissue Engineering* 2003; **9**: S5-S15.

35. Chollet C., Chanseau C., Remy M. et al. The effect of RGD density on osteoblast and endothelial cell behavior on RGD-grafted polyethylene terephthalate surfaces. *Biomaterials* 2009; **30**: 711-720.
36. Barbosa M.A., Granja P.L., Barrias C.C., Amaral I.F. Polysaccharides as scaffolds for bone regeneration. *ITBM-RBM* 2005; **26**: 212-217.
37. Xu H.H.K., Weir M.D., Simon C.G. Injectable and strong nano-apatite scaffolds for cell/growth factor delivery and bone regeneration. *Dental Materials* 2008; **24**: 1212-1222.
38. Morris C., Thorpe J., Ambrosio L., Santin M. The soybean isoflavone genistein induces differentiation of MG63 human osteosarcoma osteoblasts. *Journal of Nutrition* 2006; **136**: 1166-1170.
39. Santin M., Morris C., Standen G., Nicolais L., Ambrosio L. A new class of bioactive and biodegradable soybean-based bone fillers. *Biomacromolecules* 2007; **8**: 2706-2711.
40. Fujishiro Y., Takahashi K., Sato T. Preparation and compressive strength of α -tricalcium phosphate/gelatine gel composite cement. *Journal of Biomedical Materials Research* 2001; **54**: 525-530.
41. Bigi A., Bracci B., Panzavolta S. Effect of added gelatin on the properties of calcium phosphate cement. *Biomaterials* 2004; **25**: 2893-2899.
42. Bigi A., Cantelli S., Panzavolta S., Rubini K. α -Tricalcium phosphate-gelatin composite cements. *Journal of Applied Biomaterials and Biomechanics* 2004; **2**: 81-87.
43. Shie M.Y., Chen D.C.H., Wang C.Y., Chiang T.Y., Ding S.J. Immersion behavior of gelatin-containing calcium phosphate cement. *Acta Biomaterialia* 2008; **4**: 646-655.
44. Ishikawa K., Miyamoto Y., Kon M., Nagayama M., Asaoka K. Non-decay type fast-setting calcium phosphate cement: composite with sodium alginate. *Biomaterials* 1995; **16**: 527-532.
45. Miyamoto Y., Ishikawa K., Takechi M. et al. Non-decay type fast-setting calcium phosphate cement: setting behavior in calf serum and its tissue response. *Biomaterials* 1996; **17**: 1429-1435.
46. Ishikawa K., Miyamoto Y., Takechi M. et al. Non-decay type fast-setting calcium phosphate cement: Hydroxyapatite putty containing an increased amount of sodium. *Journal of Biomedical Materials Research* 1997; **36**: 393-399.
47. Montufar E.B., Gil C., Traykova T., Ginebra M.P., and Planell J. Foamed beta-Tricalcium Phosphate Scaffolds. *Key Engineering Materials* 2008; **361-363**: 323-326.
48. Montufar E.B., Traykova T., Gil C. et al. Foamed surfactant solution as a template for self-setting injectable hydroxyapatite scaffolds for bone regeneration. *Acta Biomaterialia* 2010; **6**: 876-885.
49. Montufar E.B., Traykova T., Schacht E. et al. Self-hardening calcium deficient hydroxyapatite/gelatine foams for bone regeneration. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 2010; **21**: 863-869.

50. Sandino C., Planell J.A., Lacroix D. A finite element study of mechanical stimuli in scaffolds for bone tissue engineering. *Journal of Biomechanics* 2008; **41**: 1005-1014.
51. Sandino C., Checa S., Prendergast P.J., Lacroix D. Simulation of angiogenesis and cell differentiation in a CaP scaffold subjected to compressive strains using a lattice modeling approach. *Biomaterials* 2010; **31**: 2446-2452.
52. Montufar E.B., Aguirre A., Gil C. et al. Macroporous Scaffolds for Bone Tissue Engineering Based on Foamed Calcium Phosphate Cements. 8th World Biomaterials Congress 2008; Amsterdam-Nederland, May 28 - June 1.
53. Montufar E.B., Traykova T., Schacht E. et al. Self-hardening calcium deficient hydroxyapatite/gelatine foams for bone regeneration. 22nd European Conference on Biomaterials 2009; Lausanne-Switzerland, September 7-11.
54. Montufar E.B., Traykova T., Schacht E. et al. Injectable hydroxyapatite foams for bone regeneration applications: comparison of synthetic and natural foaming agents. Biofoams congress 2009; Niagara Falls-Canada, October 26-28.

Capítulo 2: Marco teórico.

2.1 El hueso

El conocimiento de la estructura, los mecanismos de formación y de regeneración ósea son esenciales para la medicina regenerativa y la ingeniería de tejido óseo. Por tal razón, a continuación se resume la biología del hueso bajo condiciones fisiológicas normales y bajo condiciones patológicas.

2.1.1 Anatomía y fisiología ósea

El sistema óseo es un tejido conectivo que representa, junto con los dientes, el único tejido duro del cuerpo humano. Entre sus funciones se encuentra el soporte mecánico del cuerpo, la protección de órganos como el cerebro, el corazón y los pulmones, también proporciona puntos de anclaje para los músculos responsables de la locomoción, conformando un sistema de palancas que se encarga del movimiento corporal. Además, los huesos desempeñan funciones biológicas, son la principal reserva de calcio y fósforo del organismo, actúan como un regulador de la concentración iónica en el torrente sanguíneo, manteniendo un equilibrio en diversos procesos metabólicos y hormonales. Por último, en la médula ósea se generan los glóbulos rojos, encargados de transportar oxígeno a todos los órganos y tejidos del cuerpo, y los glóbulos blancos, principales componentes del sistema inmunológico [1].

El esqueleto de un embrión humano se conforma por 350 huesos cartilagosos. Conforme el individuo crece, la mayoría de estos huesos se fusionan para alcanzar la madurez del esqueleto alrededor de los 25 años de edad, cuando el esqueleto adulto consta de 206 huesos [2]. El esqueleto humano adulto está compuesto por 80 % en peso de hueso cortical o compacto, y el 20 % restante corresponde a hueso trabecular o esponjoso (ver figura 2.1). El hueso cortical se encuentra principalmente en las paredes interna y externa de las diáfisis de los huesos largos y en la capa externa del resto de los huesos. Este tipo de hueso contiene tan sólo 10 % de porosidad, contiene pocas células y algunos vasos sanguíneos que irrigan la estructura a través de una red de cavidades denominados canales de Havers. La estructura básica del hueso cortical es la osteona, la cual posee una estructura cilíndrica compuesta de capas concéntricas de tejido óseo llamadas lamelas. Las osteonas se alinean longitudinalmente en los huesos largos y en el centro de cada una de ellas se localizan los canales de Havers (ver figura 2.1) [1].

El hueso trabecular se localiza al interior de las costillas, las vertebrae y en los extremos de los huesos largos cerca de las articulaciones (ver figura 2.1 y tabla 2.1). Este tipo de hueso consiste en una red interconectada de tejido óseo llamada trabécula. La red trabecular está orientada preferentemente en el sentido de soporte de esfuerzos y posee una porosidad entre 50 y 90 %. Los poros contienen vasos sanguíneos y médula ósea, por lo que su resistencia es menor que la del hueso cortical. La resistencia y el módulo de elasticidad del hueso trabecular varían en función de la densidad [1].

Las diferencias entre ambos tipos de hueso no sólo son estructurales, sino que también son funcionales. El hueso cortical tiene una mayor función mecánica de soporte y de protección, mientras que el hueso trabecular tiene una mayor función metabólica, manteniendo la homeostasis iónica de los fluidos corporales [3].

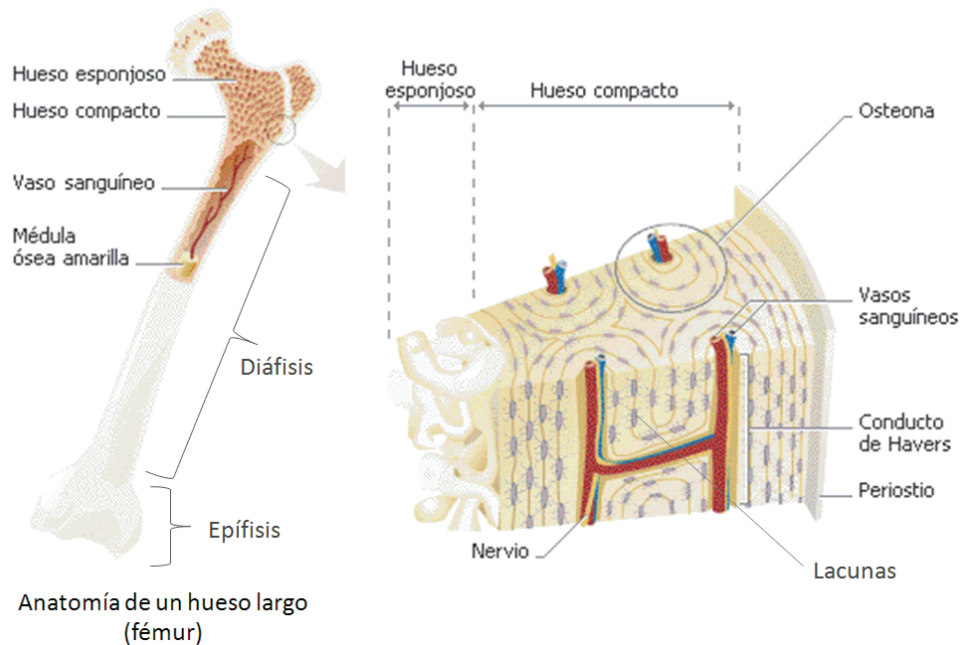


Figura 2.1: Anatomía del hueso cortical y esponjoso.

Tanto el hueso cortical como el trabecular están compuestos por 60 % en peso de mineral inorgánico, 30 % en peso de material orgánico y 10 % en peso de agua. La fase inorgánica consiste en nanocristales (2-3 nm de espesor por 25-50 nm de largo o ancho) de fosfatos de calcio, principalmente de hidroxapatita (HA) [1,4]. La fase orgánica consta principalmente de colágeno tipo I (95 %), proteoglicanos y proteínas no colagénicas [3]. La fase mineral proporciona rigidez a la estructura ósea, mientras que la fase orgánica le confiere cierta elasticidad y capacidad para amortiguar cargas mecánicas.

Tabla 2.1: Contenido de hueso trabecular en diversas zonas del esqueleto humano [3].

Nombre anatómico del hueso	% de hueso trabecular
Vértebra	66-90
Cresta intertrocantérea femoral	50
Cuello de la cabeza femoral	25
Radio distal	25
Radio medio	1
Diáfisis femoral	5

2.1.2 Histología ósea

El tejido óseo se conforma por 4 tipos de células (ver figura 2.2): los osteoblastos, los osteoclastos y las células de recubrimiento se localizan sobre la superficie del tejido, mientras que los osteocitos se localizan al interior de la estructura mineralizada [3].

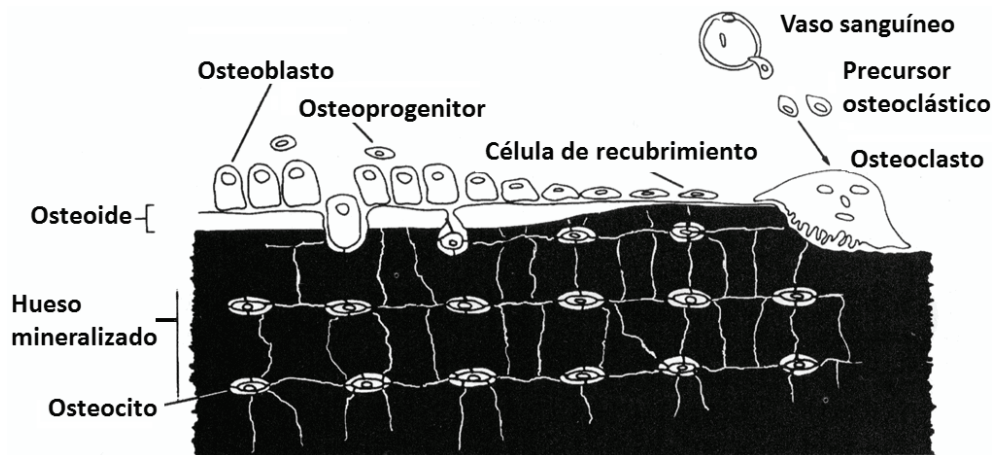


Figura 2.2: Distribución de las células óseas [3].

Los osteoblastos, los osteocitos y las células de recubrimiento se diferencian a partir de células madre mesenquimales (MSC) localizadas en la médula ósea (ver figura 2.3), mientras que los osteoclastos se originan por la fusión de las células mononucleares procedentes de los tejidos hematopoyéticos (ver figura 2.2) [3].

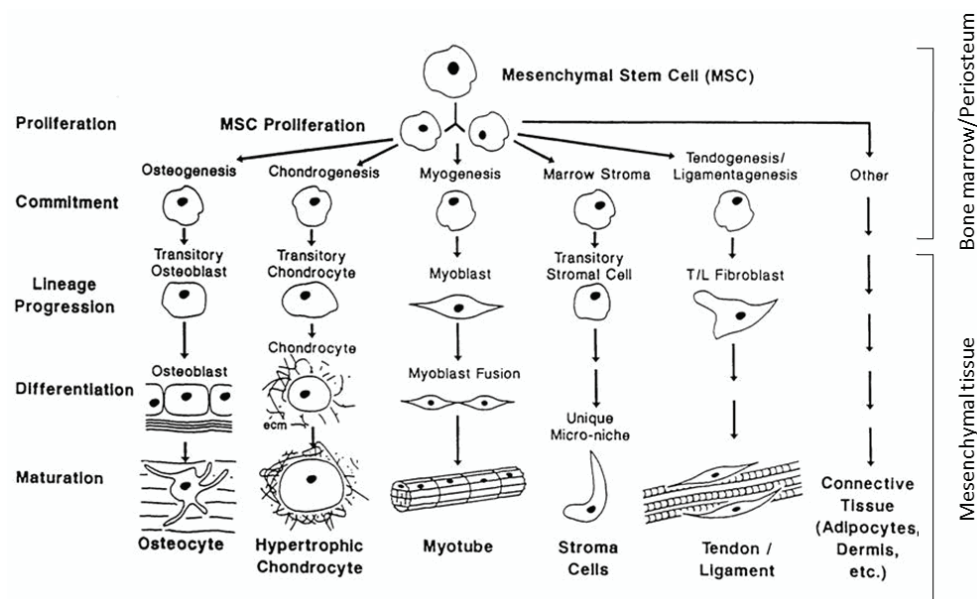


Figura 2.3: Esquema que ilustra las posibilidades de diferenciación de las células mesenquimales (MSC) [5].

Durante la mineralización ósea, los cristales de HA precipitan sobre las fibras de colágeno en un proceso controlado por la actividad celular. Los osteoblastos secretan las proteínas (colagénicas y no colagénicas) que conforman la matriz orgánica del hueso, llamada osteoide [3]. Los osteoblastos son células completamente diferenciadas con un aparato de Golgi muy desarrollado para poder producir gran cantidad de proteínas [1]. Los osteoblastos también controlan la mineralización del osteoide [3]. El proceso de mineralización seguido *in vitro* ha permitido distinguir 3 etapas durante la diferenciación osteoblástica [6]. La primera etapa corresponde a la proliferación (que dura hasta 10 o 12 días), donde se expresan genes asociados con la formación de osteoide (colágeno tipo I, fibronectina y factor transformante β (β GFB)). Paulatinamente, la producción de estas proteínas disminuye para dar paso a la etapa

de maduración del osteoide, también denominado matriz extracelular (ECM). Durante esta etapa se detecta la presencia de proteínas asociadas al fenotipo osteoblástico, tales como la fosfatasa alcalina (ALP). Durante este periodo (12 a 18 días) la ECM sufre modificaciones en composición y estructura que la hacen apta para la mineralización. Conforme el cultivo avanza hacia la tercera etapa, correspondiente a la mineralización, la expresión de ALP alcanza su valor máximo. Durante la mineralización se expresan otros genes, por ejemplo, sialoproteína ósea, osteoproteína y osteocalcina. La concentración de todas estas proteínas se incrementa en paralelo a la acumulación de mineral sobre la ECM (16 a 20 días de cultivo). En este proceso, se considera que las proteínas producidas al inicio de las etapas de maduración y mineralización de la ECM inhiben y regulan, respectivamente, las etapas de proliferación y maduración. Mientras que la expresión de osteocalcina es señal de que la madurez osteoblástica se ha alcanzado (ver figura 2.4) [6].

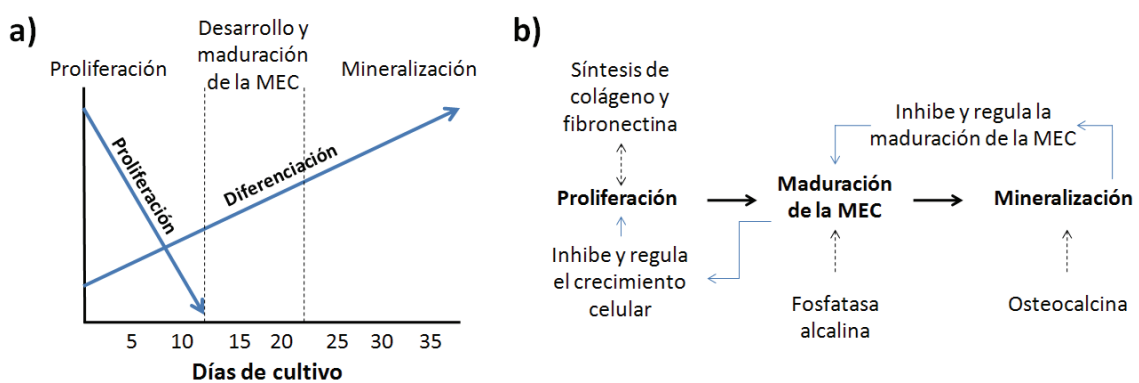


Figura 2.4: Expresión génica durante la proliferación y la diferenciación osteoblástica in vitro. a) Las flechas indican la evolución de las señales bioquímicas durante las tres etapas de la diferenciación (proliferación, desarrollo y maduración de la MEC y mineralización). b) Señales bioquímicas expresadas en cada etapa del proceso [6].

In vivo los osteoblastos rodeados por el osteoide dejan de producir ECM y se diferencian en osteocitos (ver figuras 2.2 y 2.3) [1]. Puesto que el hueso mineralizado es impermeable, para garantizar su funcionamiento metabólico los osteocitos forman antes de la mineralización una serie de conexiones citoplasmáticas que se extienden a lo largo del tejido óseo y que también se conecta con las células de recubrimiento (ver figura 2.2). Los osteocitos, confinados en un espacio reducido nombrado lacuna, son responsables de la transmisión de estímulos mecánicos a través de sus conexiones con los osteocitos vecinos [3].

Las células de recubrimiento son planas, extendidas e inactivas. Como su nombre indica, su función es recubrir la superficie del tejido óseo (periostio). Debido a que estas células son inactivas tienen pocos organelos citoplasmáticos. Se sabe poco de su metabolismo, sin embargo, se cree que pueden ser precursoras de osteoblastos durante el proceso de recuperación de lesiones óseas [3].

Los osteoclastos son células gigantes multinucleares que secretan ácidos y enzimas proteolíticas que lixivian los minerales y fagocitan la matriz orgánica del hueso. Los osteoclastos activos presentan una polaridad característica, es decir, los núcleos de la célula se localizan en la zona más alejada de la superficie ósea. Se caracterizan también por poseer gran número de sacos de Golgi, alta densidad mitocondrial y vesículas lisosómicas abundantes [3].

Los osteoblastos y los osteoclastos actúan de una forma intermitente, pero balanceada, de tal forma que el tejido óseo es constantemente modelado o remodelado en respuesta a estímulos químicos, biológicos y/o mecánicos [1]. Si la reabsorción y formación de hueso se lleva a cabo en diferentes zonas entonces la morfología ósea se modifica, a lo cual se denomina modelado óseo. En cambio, en equilibrio homeostático ambos procesos están balanceados, en cuyo caso el tejido viejo es sólo remplazado por tejido nuevo, lo cual garantiza la integridad estructural del hueso, pero, sin cambios globales en la morfología. A este proceso se le denomina remodelado óseo [7]. Debido a que la estructura del hueso está directamente relacionada con su función (ley de Wolff) se cree que la componente mecánica es muy importante para él (re)modelado óseo. Se plantea la hipótesis de que si las deformaciones locales exceden cierto nivel, entonces se formará tejido óseo nuevo; mientras que si las deformaciones son menores a dicho nivel, el tejido será reabsorbido. En este proceso la red formada por los osteocitos y las células de recubrimiento (ver figura 2.2), conforma un sistema para la transducción de los estímulos mecánicos (mecanotransducción) [7].

Se distinguen 5 fases durante el proceso de remodelación ósea: reposo, activación, reabsorción, reversión y formación (ver figura 2.5) [1,8]. La etapa de reposo, en la que las células de recubrimiento protegen la superficie del hueso, representa normalmente más del 80 % de la superficie ósea. El proceso se inicia con la etapa de activación, cuando señales físicas y bioquímicas atraen monocitos y macrófagos al sitio a remodelar. En ese lugar se lleva a cabo la diferenciación hacia osteoclastos. La reabsorción consiste en la actividad osteoclástica que digiere los componentes orgánicos e inorgánicos del tejido óseo para formar una cavidad. Durante la reversión, los osteoclastos mueren por apoptosis permitiendo que las células macrófagas liberen los factores de crecimiento contenidos en la matriz ósea. Estos factores atraen a los osteoblastos. Durante la formación, los osteoblastos rellenan la cavidad con matriz ósea, que posteriormente mineralizaran para formar nuevas osteonas. Cuando esta fase culmina la superficie ósea regresa al estado de reposo.

Por este proceso entre el 2 y el 5 % del hueso cortical se renueva cada año. En cambio, la remodelación del hueso trabecular es 10 veces mayor, ya que la remodelación del hueso cortical es un fenómeno puramente superficial, por la mayor relación área/volumen.

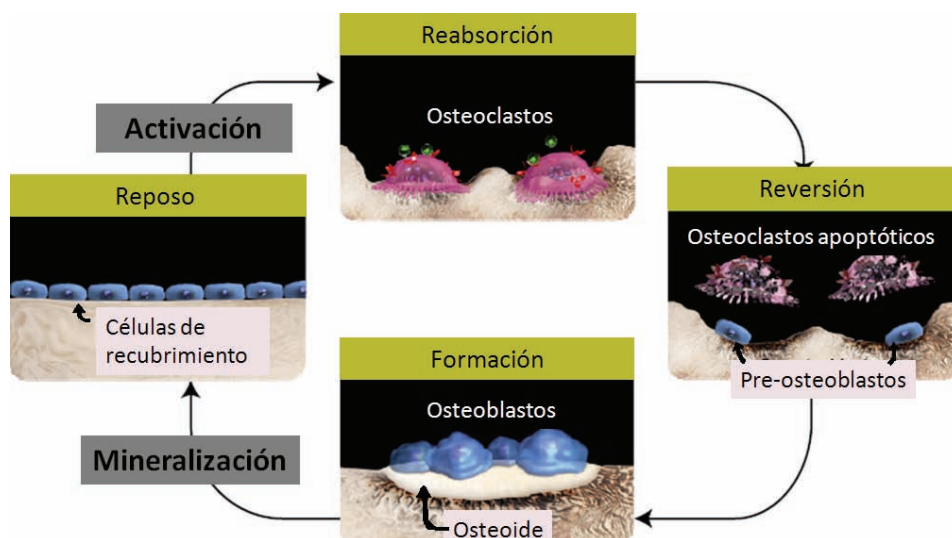


Figura 2.5: Etapas del proceso de remodelación ósea [9].

2.1.3 Mecanismos de formación del hueso

Existen 3 mecanismos principales de creación de hueso, las cuales tienen lugar durante el desarrollo embrionario, el crecimiento y el mantenimiento de los huesos [1,3,8].

1) Osificación endocondral (indirecta): Este proceso es responsable de la formación de los huesos largos y cortos durante el desarrollo embrionario. También causa la formación de hueso durante la consolidación de fracturas o durante la incorporación de un injerto óseo. El proceso se inicia cuando las MSC se diferencian hacia condrocitos, es decir, en células formadoras de cartílago (ver figura 2.3). Conforme proliferan y maduran, estas células forman una matriz cartilaginosa en la posición y con la geometría del hueso a formar. Una vez maduros los condrocitos producen proteínas que inducen la diferenciación de las MSC hacia osteoblastos y finalmente pierden la capacidad de proliferar. En la siguiente etapa, las MSC originan el periostio (capa de tejido que rodea los huesos largos), migran y crecen al interior de la matriz de cartílago que actúa como sustrato para el desarrollo del hueso. Posteriormente, las MSC que ocupan el cartílago se diferencian hacia osteoblastos en vez de condrocitos. Los osteoblastos mineralizan el cartílago y en paralelo forman una red de canales para la vascularización. Este tejido óseo inmaduro con fibras de colágeno orientadas aleatoriamente se conoce con el nombre de hueso fibrilar. La posterior remodelación del hueso fibrilar genera un hueso maduro con las fibras de colágeno orientadas en una dirección preferencial, lo cual le brinda mayor resistencia mecánica y se le denomina hueso laminar. Un esquema de este proceso se muestra en la figura 2.6.

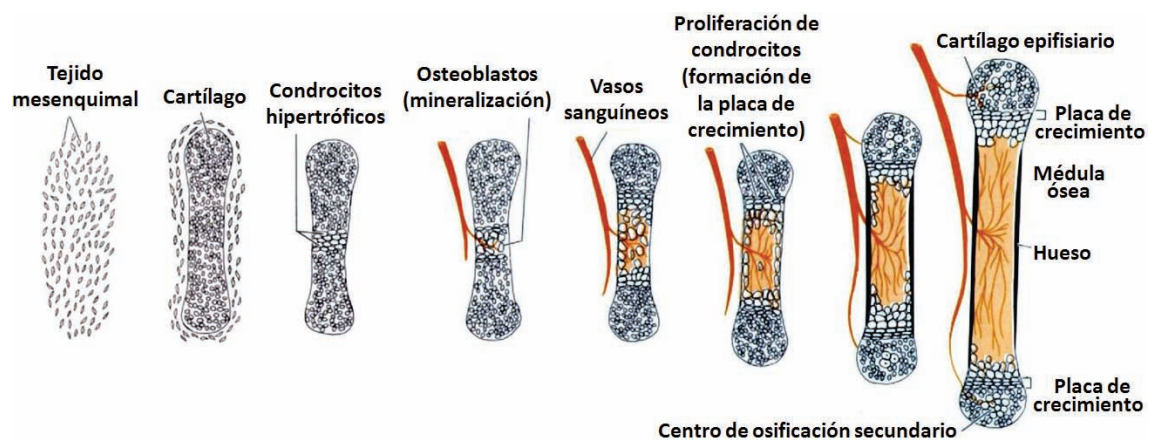


Figura 2.6: Proceso de osificación endocondral [3].

2) Osificación intermembranosa (directa): Este proceso describe la formación de huesos planos, como los del cráneo. Es un proceso similar a la osificación endocondral, con la excepción de que el hueso se forma directamente del tejido mesenquimal, sin la etapa intermedia de creación de un sustrato cartilaginoso. En este proceso los huesos crecen radialmente desde centros primarios de osificación. Cuando dos o más centros en crecimiento se juntan forman suturas compuestas por periostio con células capaces de diferenciarse hacia osteoblastos, que permiten que continúe el crecimiento. Cuando el crecimiento finaliza, las suturas se mantienen como tejido fibroso conectivo o desaparecen dependiendo de la zona y el hueso formado.

3) Crecimiento oposicional: Este proceso se lleva a cabo capa a capa debido a que los osteoblastos generan películas de matriz ósea sobre el hueso ya existente, lo cual permite un aumento general del tejido óseo y por consiguiente un incremento en la resistencia mecánica. Este tipo de formación ósea se lleva a cabo durante el crecimiento del individuo hasta alcanzar la madurez.

2.1.4 Consolidación de fracturas y angiogénesis

Consolidación de fracturas: En el caso particular de la consolidación de una fractura se originan eventos que inducen algunas de las etapas de la osificación endocondral. La primera etapa en la consolidación de una fractura es la inflamación, producida por la formación de un hematoma en el sitio de los vasos sanguíneos dañados. Por este mecanismo llegan al sitio de la lesión macrófagos y neutrófilos que fagocitan los desechos acelulares de la necrosis y secretan factores de crecimiento y citoquinas. Estas señales bioquímicas inducen la migración y la diferenciación de las MSC localizadas en los tejidos circundantes, la médula ósea o el periostio. El crecimiento de capilares, en conjunto con la actividad fibroblástica, genera un tejido granulado fibrovascular en la zona de la lesión. Conforme las MSC se acumulan y se diferencian hacia osteoblastos se crea un tejido denominado blastema de reparación. La relativamente corta etapa de inflamación es seguida por la etapa de reparación. Esta segunda etapa se inicia con la actividad osteoblástica para depositar osteoide en el sitio de la lesión, que desde ese momento se denomina callo de fractura. La tercera etapa consiste en la completa mineralización del callo de fractura para formar hueso fibrilar. Finalmente, la cuarta etapa es la remodelación, donde gradualmente las fibras de colágeno se reorganizan para formar hueso laminar. Esta etapa puede durar hasta un año para recuperar la estructura ósea que existía antes de la fractura (ver figura 2.7) [3,10].



Figura 2.7: Proceso de consolidación de una fractura en la diáfisis de un hueso largo [10].

Importancia de la angiogénesis en la formación y reparación ósea: La angiogénesis se define como el crecimiento de nuevos vasos sanguíneos a partir de vasos previamente existentes. La angiogénesis de la placa de crecimiento y del callo de fractura óseo ha demostrado ser un punto clave para la osificación endocondral. La etapa intermedia de la osificación endocondral es la apoptosis de los condrocitos y la subsecuente mineralización osteoblástica. La apoptosis es inducida por factores liberados desde los componentes hematopoyéticos o vasculares durante la angiogénesis, por tanto, la apoptosis de los condrocitos y la diferenciación osteoblástica suceden después de que las células vasculares endoteliales llegan a la zona de formación ósea. La importancia de la vascularización se ha comprobado también a través de estudios en los que la incorporación del factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF)

acelera la consolidación de la fractura, en tanto que, la incorporación de inhibidores de la angiogénesis detienen la consolidación de la fractura, la formación del callo de fractura y la formación del periosteo [10,11].

2.1.5 Patologías óseas

Como ya se mencionó, en los adultos jóvenes los huesos están en constante remodelación, manteniendo un equilibrio entre la reabsorción y la formación de tejido, por lo que la masa ósea se mantiene constante. Sin embargo, existe gran variedad de enfermedades que generan el desequilibrio de este proceso [12,13].

Osteoporosis: Sobre los 40 años de edad la reabsorción ósea puede ser superior a la formación, generando una pérdida, local o sistémica, de hueso denominada osteoporosis. Este desequilibrio se presenta principalmente en las mujeres (posterior al climaterio) como respuesta a la falta de estrógenos. La disminución del tejido óseo conlleva el incremento de la fragilidad de los huesos y los hace susceptibles a las fracturas.

Enfermedad de Paget: Otra enfermedad ósea que incrementa la susceptibilidad de los huesos a fracturarse es la enfermedad de Paget. Esta enfermedad se caracteriza por un incremento en la actividad osteoclástica, con la subsecuente etapa de reversión donde los osteoblastos generan hueso fibrilar, el cual es más frágil que el hueso laminar remodelado.

Tumores óseos: Los tumores óseos pueden ser benignos o malignos, en cuyo caso se denominan cáncer. Los tumores benignos pueden consistir desde pequeñas lesiones esféricas (del tipo osteomas craneales) hasta tumores de gran tamaño que pueden causar lesiones por compresión a los tejidos circundantes. Otro ejemplo de tumor benigno es el osteocondroma (crecimiento anormal del cartílago y del hueso). Los tumores malignos pueden generarse a partir de las propias células óseas (o de la médula ósea) debido a una proliferación incontrolada, o bien, pueden originarse por metástasis (migración de un tumor desde otra zona del cuerpo), las más comunes proceden de la tiroides, las glándulas mamarias, los pulmones, los ovarios, los riñones o la próstata. Las metástasis pueden ser formadoras (osteogénicas) o destructoras (osteolíticas) de hueso. Las características morfológicas de los tumores malignos son la irregularidad y la deformación ósea. Ejemplos de tumores malignos son la neoplasia (carcinoma), el meningiosarcoma (osteolítico), el osteosarcoma (osteogénico; es el más frecuente) y el melinoma (alteración sanguínea por el aumento de inmunoglobulinas).

Enfermedades articulares: Las enfermedades reumáticas son lesiones sistémicas que afectan el cartílago articular. Son una enfermedad crónica de origen inmunológico que genera la inmovilidad de las articulaciones por el dolor, y pueden provocar la fusión de los huesos de la articulación. Por el contrario, la artritis o la degradación articular, es una alteración local relacionada directamente con la actividad cotidiana. La elevada actividad de una articulación, ya sea por el exceso de carga o por tratarse de una persona de edad avanzada, da como resultado la degradación del cartílago, que genera la fricción de los huesos en la articulación. El dolor producido por la fricción impide el movimiento de la articulación y puede culminar con la fusión del par articular.

Lesiones por trauma: Los traumatismos son impactos directos o indirectos, accidentales o provocados, que conllevan a la fractura ósea (pérdida de la continuidad normal del hueso). A pesar de que cualquier zona del esqueleto puede fracturarse, los traumatismos son más comunes en los huesos largos como los de los brazos o piernas.

Enfermedades bucodentales: La inflamación periodontal es una de las lesiones óseas más comunes, donde las bacterias que conforman la placa dentobacteriana se acumulan provocando la destrucción de los componentes celulares y estructurales del tejido periodontal (encía), lo cual causa el aflojamiento y pérdida de las piezas dentales.

2.1.6 Biomecánica del hueso

El hueso es un tejido dinámico cuya función estructural es brindar soporte mecánico al sistema muscular y proteger a órganos y tejidos blandos. Como consecuencia los huesos y el tejido óseo mantienen un equilibrio entre la estructura y la función que desempeñan. Este principio de adaptación funcional de la estructura ósea se conoce como ley de Wolff [3,14].

El comportamiento mecánico de los huesos puede ser estudiado a dos niveles. Por un lado, a nivel material o tejido (propiedades del material) las propiedades del hueso son evaluadas a través de pruebas mecánicas estandarizadas sobre muestras de tejido uniformes. Por otro lado, el estudio de las propiedades mecánicas del hueso sobre unidades anatómicas completas proporciona información de la contribución estructural del tejido (propiedades de la estructura), no obstante, estos ensayos mecánicos son más complejos y requieren de equipos especiales. Dependiendo del dispositivo experimental, los resultados de los ensayos a nivel tejido pueden o no coincidir con el comportamiento de la estructura ósea [3].

El comportamiento mecánico del hueso es anisotrópico y viscoelástico. Comúnmente la resistencia y la rigidez de los huesos son mayores en la dirección anatómica de soporte de cargas, porque las osteonas están orientadas en la dirección longitudinal definida por el estado de esfuerzos. La resistencia a la tracción del hueso cortical en la dirección paralela a las osteonas varía entre 79 y 151 MPa, mientras que la resistencia a la compresión toma valores entre 131 y 224 MPa. Bajo esfuerzos cortantes la resistencia a la torsión varían entre 53 y 70 MPa. En cuanto el módulo de elasticidad, en la dirección longitudinal varía de 17 a 20 GPa (tanto a tracción como a compresión), en tanto que transversalmente el módulo oscila entre 6 y 13 GPa. Finalmente, el módulo de corte del hueso cortical es aproximadamente de 3 GPa [1,15].

El hueso trabecular es menos rígido que el hueso cortical debido a la porosidad. Sin embargo, el hueso trabecular puede soportar mayores deformaciones sin fracturarse alcanzando hasta el 7 % de deformación. El hueso cortical tan sólo se deforma un 2 % antes de la fractura. La resistencia a la compresión del hueso trabecular es proporcional al cuadrado de la densidad aparente (la densidad del hueso trabecular humano puede variar entre 0.1 y 1 g/ml, en tanto que el hueso compacto tiene una densidad de 1.8 g/ml). Por tanto, la disminución de la masa ósea causada por enfermedades metabólicas es causa de la pérdida de resistencia, principalmente de los huesos con mayor componente trabecular (ver tabla 2.1). Para el hueso trabecular los valores de resistencia y de módulo elástico son similares a tracción y a compresión, los valores medios de resistencia oscilan entre 5 y 10 MPa y para el módulo entre 50 y 100 MPa [1].

2.2 Cerámicas de fosfatos de calcio

Existen dos razones para describir en este trabajo a las cerámicas de fosfatos de calcio: 1) de estas cerámicas está compuesta la fase mineral de los huesos y 2) debido a la similitud con la fase inorgánica del hueso son empleadas como material para la regeneración de lesiones óseas. Cabe mencionar que existen otras cerámicas que se emplean también para la regeneración de hueso o en la fabricación de prótesis, sin embargo, no serán descritas en este apartado [16-20].

2.2.1 Ortofosfatos de calcio

El término fosfatos de calcio hace alusión a una familia de ortofosfatos, pirofosfatos o dipolifosfatos y polifosfatos de calcio. Los ortofosfatos de calcio son sales del ácido fosfórico a diferentes niveles de disociación: H_2PO_4^- , HPO_4^{2-} y/o PO_4^{3-} . Mientras que los pirofosfatos ($\text{P}_2\text{O}_7^{4-}$) y los polifosfatos ($(\text{PO}_3)_n^{n-}$) se distinguen de los ortofosfatos por la mayor extensión de los enlaces -P-O-P- que contienen, de tal forma que generan cadenas lineales o ramificadas. En particular, los ortofosfatos son de gran importancia para la medicina porque constituyen la fracción inorgánica de la mayoría de los tejidos duros del cuerpo humano, normales (huesos y dientes) y patológicos (cálculos renales o urinarios, sarro dental, etc.) [4,21-23].

El ortofosfato de calcio que más se asemeja en composición y estructura al mineral de los huesos y dientes es la hidroxiapatita, $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, (HA). Sin embargo, en términos estrictos una mejor aproximación es la hidroxiapatita carbonatada no estequiométrica de baja cristalinidad, denominada apatita biológica. Como se acaba de mencionar, el mineral de los tejidos duros está formado básicamente por HA, no obstante, se propone que contiene más ortofosfatos, tales como el fosfato dicálcico dihidratado (DCPD), el fosfato octacálcico (OCP) y el fosfato de calcio amorfo (ACP). No es de extrañar que por su posible presencia en el hueso, estos cuatro ortofosfatos sean altamente empleados como material bioactivo y/o reabsorbible para reparar y sustituir los tejidos duros. Otros fosfatos de calcio que no se encuentran en el tejido óseo, pero que también han sido empleados como material reabsorbible son el fosfato tricálcico (TCP) y el fosfato tetracálcico (TTCP). La principal característica de estos fosfatos es la capacidad de hidrolizarse y precipitar en forma de un ortofosfato más estable [4,16,21,22,24-26]. La tabla 2.2 recoge los ortofosfatos más usados en cirugía ortopédica.

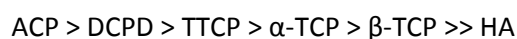
La apatita puede definirse como una estructura cristalográfica del sistema hexagonal que corresponde al grupo espacial $\text{P6}_3/\text{m}$. La fórmula química general de las apatitas es $[\text{A}(1)]_4[\text{A}(2)]_6(\text{BO}_4)_6\text{X}_2$, donde, A corresponde generalmente a cationes bivalentes situados en dos posiciones cristalográficas diferentes (posiciones 1 y 2 de la fórmula química); BO_4 y X son, respectivamente, aniones trivalentes y monovalentes [21,23,27,28]. Una característica de las apatitas es la capacidad para soportar gran variedad de sustituciones iónicas en la celda cristalina, lo cual le brinda gran adaptabilidad para llevar a cabo varias funciones biológicas y una gran flexibilidad en términos de cristalinidad, solubilidad y estabilidad térmica. Los iones que acepta la estructura de la apatita son: A = Ca, Sr, Ba, Cd, Pb, Mg, Na, K y sitios vacantes hasta un 20 %; B = P, CO_3 , V, As, S, Si, Ge y Cr; y X = OH, CO_3 , O, BO_2 , F, Cl y sitios vacantes hasta un 2 %. Naturalmente, cuando la apatita incorpora iones con cargas diferentes, como el carbonato, la estructura compensa el equilibrio eléctrico dejando sitios vacantes.

Existen diversas variedades de las apatitas biológicas, como la fluoroapatita, la podolita, la francolita y la dahllita, que en pequeñas cantidades tienen efectos estructurales importantes. Por ejemplo, la fluoroapatita se localiza en el esmalte dental brindándole una mayor dureza la cual evita el desgaste de los dientes [4].

Tabla 2.2: Relación molar calcio/fosforo (Ca/P), fórmula química y producto de solubilidad (K_{sp}) de los ortofosfatos de calcio más utilizados en medicina [4,23,24].

Relación Ca/P	Composición	Abrev.	Fórmula química	$-\log(K_{sp})$ a 25°C
0.5	Fosfato monocálcico monohidratado	MCPM	$\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$	1.14
0.5	Fosfato monocálcico anhídrido	MCPA	$\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$	1.14
1.00	Fosfato dicálcico dihidratado, "Brushita"	DCPD	$\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	6.59
1.00	Fosfato dicálcico anhídrido, "Monetita"	DCP	CaHPO_4	6.90
1.33	Fosfato octacálcico	OCP	$\text{Ca}_8(\text{HPO}_4)_2(\text{PO}_4)_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	96,6
1.50	Fosfato tricálcico alfa	α -TCP	$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	25.5
1.50	Fosfato tricálcico beta	β -TCP	$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	28.9
1.5-1.67	Hidroxiapatita deficiente en calcio	CDHA	$\text{Ca}_{10-x}(\text{HPO}_4)_x(\text{PO}_4)_{6-x} \cdot (\text{OH})_{2-x}$ ($1 < x < 0$)	~85.1
1.67	Hidroxiapatita estequiométrica	HA	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$	116.8
2.00	Fosfato tetracálcico, "Hilgenstocita"	TTCP	$\text{Ca}_4\text{O}(\text{PO}_4)_2$	38-44
1.2-2.2	Fosfato de calcio amorfo	ACP	$\text{Ca}_x(\text{PO}_4)_y \cdot n\text{H}_2\text{O}$	—

La rapidez de reabsorción de un material bajo condiciones fisiológicas está directamente relacionada con la rapidez de disolución en medio líquido. Pese a que la disolución está también influenciada por la cristalinidad y la geometría, la constante de solubilidad resulta ser un buen indicador del comportamiento *in vivo* de los ortofosfatos. Por tal razón en la tabla 2.3 se incluye el logaritmo del producto de solubilidad de algunos de ellos [4,29]. De acuerdo con estos datos el orden descendente de solubilidad de los ortofosfatos de calcio es el siguiente:



En equilibrio, la estabilidad de los ortofosfatos varía en función del pH de la disolución. No obstante, sólo dos ortofosfatos son estables a temperatura fisiológica; por debajo de 4.2 unidades de pH el DCPD es el más estable, mientras que por arriba de este valor la HA es la más estable. Los fluidos fisiológicos se encuentran a un pH de 7.4, por lo cual no es de sorprender que la HA sea el componente mineral mayoritario de los tejidos duros [4,22,23].

La solubilidad es un factor importante en aquellos materiales empleados como injerto óseo. Se espera que el material se disuelva (reabsorba) con la misma rapidez con la que el hueso nuevo crece. No obstante, la excesiva solubilidad *in vivo* del ACP, el DCP, el TTCP y el TCP trae como consecuencia la pérdida de la resistencia y de la estabilidad mecánica del defecto tratado. Por otro lado, la alta estabilidad de la HA evita la reabsorción del implante impidiendo el crecimiento de tejido nuevo. La cinética de reabsorción de la HA y los ortofosfatos puede ser modulada por parámetros texturales tales como [23,30,31]:

- El área superficial disponible; orden descendente de reactividad: polvo > sólido poroso > sólido compacto.
- El tamaño de los cristales que conforman el material; menor tamaño mayor reactividad.
- El grado de cristalinidad; menos cristalino más reactivo.
- El contenido de imperfecciones de la celda cristalina; mayor número de imperfecciones y vacantes más reactivo.

Por tanto la rapidez de reabsorción de la HA se puede incrementar reduciendo la cristalinidad y el tamaño cristalino, e introduciendo sustituciones iónicas y vacantes.

La principal propiedad de la HA como material para la regeneración de lesiones óseas no es probablemente su similitud composicional con la fase mineral ósea, ni su susceptibilidad de ser reabsorbida por el organismo. Su característica más importante es la bioactividad [32]. La bioactividad se define como la capacidad de un material para unirse a través de un enlace directo con el tejido óseo que lo rodea. Por lo tanto, un material bioactivo crea un microambiente compatible con la osteogénesis [33,34]. *In vitro* la bioactividad se determina por la formación de una capa o película apatítica sobre la superficie del material cuando es sumergido en fluido fisiológico simulado (SBF) [35]. El mecanismo de formación de esta capa aún no está completamente identificado, no obstante, se cree que está dominado por la teoría clásica de nucleación, de tal forma que tanto el incremento de la concentración iónica local, como la disminución de la energía superficial de la HA, producirán un mayor número de núcleos que espontáneamente crecerán sobre la superficie. Se espera también que al ser más reactiva la HA no estequiométrica sea más bioactiva que la HA estequiométrica.

2.2.2 Procesado de los ortofosfatos de calcio

Las geometrías empleadas para la regeneración o sustitución de tejido óseo son los bloques compactos o porosos, los gránulos y los recubrimientos. Por un lado, los gránulos y los bloques porosos son empleados en zonas que no están sometidas a esfuerzos como material de relleno o como material para aumentar la masa ósea. Por otro lado, debido a la elevada fragilidad, las cerámicas compactas tienen su principal aplicación como remplazo de secciones óseas que están sometidas a bajos esfuerzos mecánicos. Una alternativa para superar la fragilidad de las

cerámicas es el empleo de recubrimientos. Los recubrimientos de ortofosfatos de calcio sobre sustratos casi inertes le confieren al implante un carácter bioactivo y lo protegen contra la corrosión, mientras que el sustrato, en la mayoría de los casos metálico, actúa de soporte mecánico. Ejemplos de estos dispositivos son las prótesis articulares en la zona de fijación con el hueso, que a pesar de no ser capaces de regenerar la lesión, actualmente representan una mejor calidad de vida para el paciente [4,16,24].

El procesado de los ortofosfatos de calcio se puede llevar a cabo a través de los métodos cerámicos tradicionales a alta temperatura (sinterizado) o por métodos biomiméticos a temperatura ambiente, como la precipitación o el sol-gel [4,16,22].

Procesos de alta temperatura: Estos métodos son comúnmente empleados para obtener piezas densas o porosas y recubrimientos sobre sustratos metálicos. Debido a que el interés de este trabajo es obtener materiales porosos, no se describirán los procesos para obtener recubrimientos.

Existen dos estrategias para obtener piezas cerámicas con una forma determinada: 1) compactando el polvo cerámico dentro de un molde, o 2) por colado del polvo cerámico en suspensión líquida dentro de un molde. En ambos casos se obtiene una pieza en verde que requiere de un tratamiento térmico de sinterización (artesanalmente nombrado cocido) para consolidar el material e incrementar la resistencia mecánica. Por estas técnicas pueden obtenerse cerámicas densas o porosas. En el primer caso, la sinterización además de consolidar el material reduce también la porosidad, en función de factores como, la densidad de la pieza en verde, el tiempo y temperatura de sinterización [36]. En el segundo caso, la porosidad es intencionalmente incorporada en el material por medio de agentes creadores de poros (porogénicos o porógenos), tales como partículas o redes de naftalina, parafina, poliuretano, entre otros. Estos agentes son incorporados durante el moldeo para que durante el sinterizado sean eliminados por pirolisis dando lugar a la porosidad [37].

El ortofosfato de calcio empleado por excelencia para la regeneración ósea es la HA, o el β -TCP cuando se requiere de una mayor rapidez de reabsorción del material. No obstante, ambas fases puede ser mezcladas para controlar la cinética de reabsorción, en cuyo caso se denominan fosfatos de calcio bifásicos (BCP) [38]. La HA es sinterizada a temperaturas entre 1000 y 1200 °C, mientras que el β -TCP se sinteriza entre 700 y 1100 °C. Piezas densas más compactas pueden ser obtenidas aplicando presión al mismo tiempo que se calienta el material, por medio de procesos como el prensado isostático en caliente. Debido a las altas temperaturas, este tipo de procesos tiene la característica de producir ortofosfatos altamente cristalinos, con cristales de gran tamaño, de baja superficie específica y baja rugosidad [4,22].

Procesos de baja temperatura: El procesado a baja temperatura involucra la precipitación del ortofosfato en medio acuoso, para lo cual hay dos aplicaciones: 1) los cementos de fosfatos de calcio (CPC) y 2) los recubrimientos biomiméticos. Los CPC se describen a continuación.

2.3 Cementos hidráulicos de fosfatos de calcio

En términos generales los CPC son mezclas de uno o más de los siguientes componentes: TCP, DCPD, DCP, MCPM, OCP o TTCP, en agua o en una disolución acuosa de fosfatos y/o sales de calcio. Por tanto, los CPC consisten en una fase sólida y una fase líquida que al mezclarse producen una pasta, que como consecuencia de una reacción química, que se lleva a cabo a temperatura ambiente o fisiológica, fragua y endurece para formar un cuerpo sólido microporoso [26,39]. La consolidación de la pieza no es por sinterizado sino por el fraguado, más específicamente por el entrecruzamiento de cristales generados por un proceso de disolución/precipitación. Este tipo de procesado representa varias ventajas para el material [4,39,40]:

- 1) El proceso de disolución/precipitación, a baja temperatura, imita de alguna forma el proceso de mineralización ósea, por tanto, el producto final es un fosfato de calcio cuya composición y estructura son más similares a la apatita biológica.
- 2) Debido también a la consolidación a baja temperatura, pueden incorporar moléculas bioactivas, factores de crecimiento y/o fármacos.
- 3) Los cementos tienen una superficie específica mayor que la de las cerámicas sinterizadas, por tanto su reabsorción es más rápida.
- 4) Las pastas pueden ser inyectadas a través de cánulas antes del fraguado, haciendo posible su implantación por técnicas de mínima invasión quirúrgica.
- 5) El fácil moldeo de la pasta asegura un íntimo contacto del cemento con el hueso, lo que se traduce en una mejor fijación mecánica y una más rápida regeneración.
- 6) Las formulaciones de cemento pueden ser fácilmente modificadas para controlar y potenciar las propiedades fisicoquímicas, mecánicas y biológicas del material.

Todas estas características hacen de los cementos materiales más atractivos para el relleno de defectos óseos en comparación con las cerámicas consolidadas a alta temperatura, las cuales son más difíciles de adaptar al tamaño y geometría del defecto óseo, o incluso más atractivos que los gránulos los cuales son difíciles de mantener en el sitio de la implantación. Sin embargo, la desventaja de los CPC es la baja resistencia mecánica que limita su empleo a zonas que no estén sometidas a carga, o a zonas de carga si se emplean en conjunto con dispositivos de soporte [26].

Desde el punto de vista clínico/biológico los CPC han demostrado ser competitivos, puesto que son biocompatibles, osteoconductivos y pueden ser osteointegrados *in vivo* por el mecanismo normal de remodelación ósea. Por estas razones, los CPC son usados en diferentes especialidades médicas como la cirugía ortopédica, la odontología, la cirugía maxilofacial y la cirugía reconstructiva. Finalmente, mencionar que los CPC se clasifican de acuerdo al producto final de la reacción de fraguado, principalmente brushita (cementos de brushita) o apatita (cementos apatíticos) [22,26,39,41].

2.3.1 Propiedades de los cementos de fosfatos de calcio

Las propiedades fisicoquímicas de los CPC como el tiempo de fraguado, la inyectabilidad, la porosidad y la resistencia mecánica, dependen de factores como la formulación del cemento, la incorporación de aditivos, el tamaño de partícula de la fase sólida, el origen de las materias primas y las condiciones de reacción (temperatura y pH) [42-48].

Los cementos son mezclas de ortofosfatos (amorfos o cristalinos) con una disolución acuosa, la cual puede ser agua destilada, disolución tampón de fosfato (PBS), disolución de fosfato de sodio (~ 0.25 M), ácido ortofosfórico, ácido cítrico (~ 0.5 M), SBF, entre otras. La proporción sólido/líquido (polvo/líquido; P/L) o líquido/sólido (líquido/polvo; L/P) de mezclado es un factor determinante, puesto que define la inyectabilidad, la cohesión, la resistencia mecánica y la degradabilidad del material [26,49]. En este trabajo se hace referencia a la proporción L/P, debido a que resulta más preciso ajustar la masa de polvo requerida por cada mililitro de líquido, que ajustar el volumen de líquido por cada gramo de polvo.

2.3.1.1 La reacción de fraguado y endurecimiento

La preparación del cemento se inicia con la mezcla de ambas fases (líquida y sólida). Inmediatamente comienza la reacción de fraguado, donde los ortofosfatos que componen el polvo se disuelven produciendo un microambiente sobresaturado de iones calcio y fosfato, los cuales interactúan químicamente y precipitan en forma de fases intermedias (ACP u OCP) o como cristales (con forma de placas o agujas) del producto final (CDHA o DCPD). La fuerza motriz de este proceso es la solubilidad relativa de los ortofosfatos que componen el polvo del cemento [26,39,41].

El fraguado de los cementos es un proceso continuo de disolución/precipitación. Durante la precipitación los nuevos núcleos cristalinos crecen sobre las partículas iniciales de reactivo (polvo de cemento) y forman una red entrecruzada de cristales, la cual proporciona rigidez y dureza al material. En otras palabras, el entrecruzamiento de los nuevos cristales es la causa del fraguado. El crecimiento de estos cristales, o en el caso que existan fases intermedias la transición sol-gel de las mismas hacia el producto final, son los mecanismos de endurecimiento posterior al fraguado del cemento [26,41].

Las reacciones químicas específicas que se llevan a cabo durante el fraguado de los CPC dependen de la composición química del cemento, no obstante, puede decirse que existen dos tipos de reacciones de fraguado. El primer tipo se basa en las leyes de la interacción ácido/base, donde un ortofosfato relativamente ácido reacciona con otro de relativa basicidad y forman un nuevo fosfato de carácter neutro. El segundo tipo de reacción de fraguado puede definirse como la hidrólisis de un ortofosfato de calcio metaestable en medio líquido. Como consecuencia, tanto el reactivo como el producto tienen la misma proporción Ca/P. En este caso, debido a que el polvo está compuesto por un sólo ortofosfato, se denomina cemento de un único componente [22,26].

2.3.1.2 Moldeabilidad de los CPC

En principio los CPC deberían fraguar lentamente para que el cirujano cuente con el tiempo suficiente para implantar el material, y a la vez, lo suficientemente rápido para evitar retrasar la operación y el tiempo de anestesia del paciente. Además, idealmente el cemento debe endurecer lo más rápidamente posible. Existen dos métodos principales para medir el fraguado de un cemento, las agujas de Gillmore y la aguja de Vicat. El fundamento básico de ambos métodos es examinar visualmente al cemento para determinar cuándo la indentación de la aguja no deja marca visible sobre la superficie. No obstante, existen otros métodos para monitorizar el fraguado y el endurecimiento en tiempo real, como el ultrasonido, la calorimetría diferencial de barrido, la espectroscopia de impedancia de corriente alterna, la

espectroscopia de infrarrojos por transformada de Fourier, o mediante difracción de rayos X. Además, las reacciones ácido-base pueden ser monitorizadas por el cambio de pH [39,50-53].

El método de las agujas de Gillmore es empleado extensamente para determinar los tiempos de fraguado inicial (FI) y final (FF) de los CPC. Una aguja gruesa y ligera se usa para determinar el FI, mientras que otra aguja delgada y pesada se usa para medir el FF. De acuerdo con Driessens [41], el significado clínico de estos valores es que el cemento debe ser implantado antes del FI y el acceso quirúrgico debe ser cerrado después del FF (ver figura 2.8). Además, la pasta de cemento no debe ser deformada entre el FI y el FF porque se inducen fracturas en el material. Clínicamente se espera que el FI tenga lugar entre 3 y 8 minutos desde la mezcla del cemento y el FF antes de 15 minutos [39,41,44].

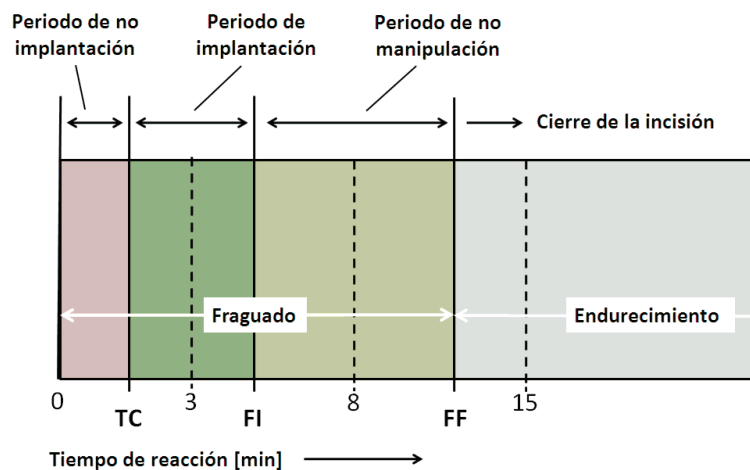


Figura 2.8: Diagrama de los parámetros de fraguado de un CPC. TC: tiempo de cohesión; FI tiempo de fraguado inicial; FF tiempo de fraguado final [41].

Otro requisito importante de los cementos es la cohesión de la pasta en medio líquido, la cual suele ser función del avance de la reacción de fraguado y de la consistencia de la pasta (proporción L/P). La forma más sencilla de determinar el tiempo de cohesión (TC) es sumergiendo la pasta de cemento en agua a 37 °C y determinar visualmente el tiempo mínimo requerido desde la mezcla para que no se desintegre. Se espera que el TC sea menor al tiempo de FI para que el cirujano pueda moldear la pasta en el defecto sin que sufra fracturas y sin que se disgregue al estar en contacto con la sangre. Mientras menor sea el TC mayor tiempo tendrá el cirujano para moldear el cemento antes del FI. TC de 2 a 3 minutos desde la mezcla del cemento son considerados como adecuados para aplicaciones médicas [26,41].

Existen dos métodos para implantar las pastas de CPC. El primero es por moldeo con los dedos de la mano o con una espátula. En este caso se requiere de formulaciones de cemento muy viscosas que puedan ser implantadas como una masa. El segundo método de implantación es por inyección con una jeringa en el sitio de la lesión. En este caso se requiere de pastas de cemento con baja viscosidad que puedan ser extruidas a través de agujas largas y delgadas (10 cm de largo por 2 cm de diámetro interno aproximadamente). A esta propiedad se le denomina inyectabilidad. La inyectabilidad se cuantifica como el porcentaje en peso de cemento que puede ser inyectado a través de una jeringa estándar, aplicando la fuerza de la mano humana o bien una fuerza máxima de hasta 100 N [54,55]. Normalmente, la inyectabilidad de los cementos mantiene una relación inversa con la viscosidad de la pasta y el

tiempo transcurrido desde la preparación de la pasta, mientras que es directamente proporcional a la proporción L/P [26,49]. La inyectabilidad de los CPC puede ser mejorada mediante dos estrategias. La primera de ellas consiste en modificar el equipo de inyección, como por ejemplo, fabricar cánulas más cortas y gruesas, disminuir la velocidad de inyección, o aumentar la fuerza con la que se inyecta la pasta. La segunda estrategia se basa en la adaptación del cemento, por ejemplo, reducir el tamaño de partícula del polvo inicial, incrementar la proporción L/P de mezclado, o incorporar aditivos que fomenten la inyectabilidad. Por un lado, el incremento de la proporción L/P disminuye las propiedades mecánicas del material, incrementa los tiempos de fraguado y puede causar la pérdida de la cohesión en medio líquido. Por otro lado, la disminución del tamaño de partícula del polvo requiere también incrementar ligeramente la proporción L/P. Por estas razones la incorporación de aditivos es una de las mejores alternativas. Por ejemplo, la cantidad de agua necesaria para obtener una pasta de baja viscosidad puede ser reducida por la modificación iónica de la fase líquida del cemento, incorporando sales no tóxicas de sodio o ácido cítrico [26,49,54-57].

Existe un fenómeno denominado separación de fases que puede producirse durante la extrusión o inyección de las pastas de cemento. Consiste en que durante la aplicación de presión se inyecta preferentemente el líquido mientras que el polvo permanece al interior de la jeringa. Por tanto, la proporción L/P de la pasta inyectada es mayor a la de la formulación nominal. Como consecuencia las propiedades finales como los tiempos de fraguado y la resistencia mecánica, pueden ser clínicamente inaceptables. Para evitar este fenómeno se requiere de una buena cohesión de la pasta cementante la cual puede ser conseguida incrementando la viscosidad de la pasta o incorporando al cemento aditivos promotores de la cohesión, como el alginato de sodio [26,49,58].

2.3.1.3 Aditivos incorporados a los CPC

Se han incorporado diversos tipos de aditivos a los CPC con varios objetivos: fluidificantes, porógenos, agentes para generar gases, agentes para mejorar la moldeabilidad, agentes para el control del fraguado, fibras de refuerzo y agentes radio-opacos. A continuación se describen algunos de estos aditivos.

- El objetivo principal de un fluidificante es reducir el tiempo de mezclado del cemento. El ejemplo típico de este tipo de aditivos es el ácido cítrico, el cual retarda la reacción de disolución/precipitación, disminuyendo la resistencia de la pasta durante el fraguado, pero permitiendo el incremento de resistencia durante el endurecimiento [57].
- Los agentes para generar gases y los porógenos se emplean para introducir macroporos en los CPC [59]. Estos aditivos se describen más adelante, en el apartado correspondiente a los métodos para obtener CPC macroporosos.

- Es común incorporar al polvo del cemento polímeros solubles en agua para mejorar la moldeabilidad de la pasta. Los polisacáridos, la gelatina y el ácido poliacrílico son de gran relevancia debido a su biocompatibilidad y propiedades reológicas. Por ejemplo, una pequeña cantidad de gelatina es necesaria para incrementar significativamente la viscosidad de la pasta, y además, la cohesión se incrementa pudiendo entrar en contacto con líquidos inmediatamente después del mezclado [60]. También se ha observado que la incorporación de gelatina puede incrementar hasta en un 50 % la resistencia a la compresión, hecho que se relaciona con la reducción del tamaño de los cristales precipitados [61,62]. En otros casos la incorporación de agentes gelificantes puede retardar el fraguado del cemento, lo cual puede evitarse incorporando ortofosfatos de sodio en la fase líquida. Por otro lado, las disoluciones de polisacáridos como el alginato de sodio son trixotrópicas, es decir, la viscosidad de la disolución se reduce cuando se incrementan los esfuerzos cortantes, por lo que pueden incrementar también la moldeabilidad de los cementos [26,58].
- Los aditivos para el control del fraguado pueden ser tanto acelerantes como retardantes del fraguado. Se sabe que las disoluciones de las sales sódicas de ortofosfatos, como el Na_2HPO_4 , son acelerantes de la reacción de fraguado en concentraciones tan bajas como 2.5 % [63]. El mecanismo acelerante está asociado al efecto del ion común, fosfato, descrito por Driessens [64].

2.3.1.4 Propiedades mecánicas y porosidad

Después del endurecimiento los CPC deberían alcanzar la resistencia mecánica de las cerámicas sinterizadas, pero en realidad la resistencia es menor. Los CPC son materiales frágiles con baja resistencia al impacto y a la tracción (1-10 MPa), mientras que a compresión suelen ser más resistentes (10-100 MPa). El comportamiento mecánico de los CPC depende de diversos factores, lo cual hace difícil comparar diferentes formulaciones, sin embargo, los cementos de brushita son menos resistentes que los cementos de apatita. A modo de ejemplo, un trabajo reporta que un cemento de brushita tienen una resistencia a la tracción de 10 MPa y una resistencia a la compresión de 60 MPa, mientras que un cemento de apatita resiste a tracción 16 MPa y a compresión 83 MPa [26].

En la mayoría de las aplicaciones clínicas los CPC son implantados en zonas de hueso trabecular, no obstante, están sometidos a cargas tridireccionales que originan diferentes estados de esfuerzo (flexión, torsión, tracción, compresión o combinaciones de ellos). La baja resistencia mecánica de los CPC limita su aplicación a zonas que no estén sometidas a esfuerzos, o bien, a zonas bajo esfuerzos en conjunto con dispositivos externos que soporten las cargas, mientras el cemento es remodelado para convertirse en hueso nuevo funcional [26].

La porosidad es uno de los factores que más influye en el comportamiento mecánico de los CPC. Se ha observado que la resistencia disminuye exponencialmente en función del contenido de porosidad [31]. La mayoría de los CPC llegan a tener, después del fraguado, porosidades entre el 40 y el 50 %, con tamaños de poro que varían desde nanómetros hasta unas cuantas micras [65]. Por tanto, los CPC son materiales intrínsecamente porosos a un nivel nano/micrométrico. El origen de los poros en el cemento es la fase líquida de mezclado, por lo

que reduciendo la proporción L/P se puede incrementar la resistencia. Desafortunadamente, el contenido de agua también define las propiedades reológicas de la pasta, por lo que la disminución de la cantidad de líquido puede causar la pérdida de la moldeabilidad [49]. Para disminuir la porosidad también se puede modificar el método de mezclado, por ejemplo, puede mezclarse la pasta bajo presión y/o al vacío. Otros métodos para controlar la porosidad final de los CPC son: 1) disminuir el tamaño inicial de partícula del polvo, y 2) el empleo de agentes de relleno en forma de partículas o fibras de refuerzo [26].

Finalmente, cabe mencionar que la resistencia de los CPC varía en función del tiempo de implantación. Los estudios en animales señalan que la resistencia de los cementos apatíticos aumenta rápidamente durante el fraguado y posteriormente sigue incrementándose lentamente por la formación de hueso nuevo. Por otro lado, en los cementos de brushita la resistencia disminuye inicialmente debido a la rápida reabsorción del implante y posteriormente se incrementa con la formación de hueso nuevo [26].

2.3.1.5 Reabsorción y remodelación “in vivo” de los CPC

Diferentes estudios reportan que los CPC son rodeados y paulatinamente reabsorbidos y sustituidos por nuevo hueso fibrilar [41]. Es universalmente aceptado que el mecanismo de remplazo es la osteoconducción. Sin embargo, otros estudios proponen que en algunos casos los CPC pueden ser osteoinductivos, pero han sido incapaces de confirmar esta hipótesis [26,66]. La elevada reabsorción del DCPD y de la CDHA es considerada la principal razón por la que los CPC son remodelados y sustituidos por hueso nuevo. No obstante, la completa sustitución depende del tamaño del defecto, el estado de salud, la edad y la especie del receptor [26,41].

Se distinguen dos mecanismos por los que los ortofosfatos de calcio pueden ser reabsorbidos. El primero es la reabsorción activa, la cual se realiza mediante la actividad de células como los macrófagos, osteoclastos y otras células fagocíticas. El segundo mecanismo es la reabsorción pasiva debida a la disolución o a la hidrólisis química del material en los fluidos fisiológicos. No obstante, ambos mecanismos pueden actuar en paralelo si se trata de un cemento compuesto por dos ortofosfatos, donde la rapidez de reabsorción se relaciona con la solubilidad de ambas fases. Los factores que influyen en la rapidez de reabsorción de los ortofosfatos de calcio son la composición química, las características geométricas y las propiedades cristalográficas. Adicionalmente, la reabsorción puede verse modificada por factores externos como el lugar de implantación, la especie animal y la edad del receptor [26].

Los estudios *in vivo* demuestran que los macrófagos reabsorben rápidamente los cementos de brushita, en tanto que los cementos apatíticos son reabsorbidos lentamente (tardando desde meses hasta años) por la actividad osteoclástica. Los macrófagos actúan por un mecanismo fagocítico, mientras que los osteoclastos degradan al cemento mediante un mecanismo ácido (secretan sustancias ácidas que reducen localmente el pH) [26].

Las etapas que tienen lugar durante la osteointegración de un CPC pueden describirse empleando el mecanismo propuesto para los vidrios bioactivos [16]. Las primeras etapas de este proceso suceden en la superficie del material, y presentan variaciones químicas considerables debido a las diferencias composicionales entre los CPC y los vidrios bioactivos. Sin embargo, las últimas etapas, relacionadas con la interacción biológica con el entorno, son

comunes para ambos materiales, las cuales implican la colonización del material por osteoblastos, seguida de la proliferación y diferenciación para formar hueso nuevo osteointegrado con el material [67]. Cabe mencionar que los osteoblastos no se adhieren directamente sobre la superficie de los ortofosfatos de calcio, sino que se ubican sobre una película proteica que terminan convirtiendo en osteoide [26,68].

En resumen, a corto plazo los CPC son capaces de actuar como un sustituto óseo que con el paso del tiempo termina siendo remplazado para formar hueso nuevo. La formación de hueso depende de factores como la edad, el sexo, el sitio de la implantación y factores metabólicos como la salud del receptor. También depende de factores del cemento como la composición química (DCPD o CDHA), la cristalinidad y la proporción L/P de mezclado (porosidad). Considerado todos estos factores la reabsorción y sustitución total de los cementos puede tomar entre 3 y 36 meses [26].

2.3.2 Métodos de obtención de cementos macroporosos

Actualmente se emplean diversos métodos en la fabricación de cerámicas macroporosas para una gran variedad de aplicaciones, entre las que destacan la obtención de filtros para metales líquidos, refractaros intercambiadores de calor, electrodos de pilas de combustible, andamios para ingeniería de tejidos, circuitos electrónicos, cerámicas para el enfriamiento de gases, entre otros [37].

Las mismas técnicas empleadas para obtener cerámicas porosas pueden emplearse en la fabricación de CPC macroporosos. Estas técnicas pueden clasificarse como la réplica de plantillas (positivas o negativas), el sacrificio de agentes porogénicos (partículas solubles), el espumado directo y el diseño e impresión tridimensional controlados por computadora [37,59]. En cualquier caso debe tenerse en cuenta que para la obtención de andamios para ingeniería de tejidos no solo la cerámica porosa debe ser biocompatible, sino que también deben serlo los materiales empleados en su obtención, o bien deben ser eliminados por completo durante la fabricación.

En la tabla 2.3 se presentan algunas propiedades correspondientes a los CPC macroporosos obtenidos mediante diferentes métodos de fabricación [59].

Tabla 2.3. Composición y propiedades de algunos cementos macroporosos obtenidos mediante diferentes métodos de fabricación.

Método	Componentes de la fase sólida	Agente porógenos/método	Porosidad [%]		Diámetro de poro [µm]	Resistencia a la compresión [MPa]	Ref.
			Total	Macro			
Partículas solubles	TTCP + DCPA	Partículas de manitol, sacarosa, carbonato de sodio o fosfato de sodio	50-69	19-50	125-250	0.4-10**	[30,69]
Partículas solubles	TTCP + DCPA	Disoluciones congeladas de fosfato de sodio	53-62	29-41	1000	0.6-37	[70]
Partículas solubles	α-TCP + pHA	Partículas de sulfato de calcio				10-45	[71]
Partículas solubles	β-TCP + MCPM	Cristales de manitol				17-32	[72]
Partículas solubles	TTCP + DCPA	Fibras de poliglactin 910 (Vicril®)				2-7*	[73]
Partículas solubles	TTCP + DCPA	Fibras de aramida, carbón, E-glass, o poliglactin				13-62**	[74,75]
Partículas solubles	α-TCP + DCPA + CaCO3 + pHA	Fibras de poli (ε-policaprolactona) o poli (L-acido láctico)	55-70	5-30	180-210	3.5-7**	[76]
Partículas solubles	TTCP + DCPA	Mallas de poliglactin 910 (Vicril®)				5**	[77,78]
Partículas solubles	TTCP + DCPA	Cristales de manitol con quitosano	52-80	17-65	165-271	0.3-8*	[79]
Partículas solubles	TTCP + DCPA	Cristales de manitol con fibras de poliglactin 910 (Vicril®)	71-82	19-49	100-600	1-3*	[80]
Partículas solubles	TTCP + DCPA	Cristales de manitol con quitosano y fibras de poliglactin 910 (Vicril®)	35-85		300-500	0-25**	[81]
Partículas solubles	α-TCP + DCPA + CaCO3 + pHA	Microesferas de poli(DL-ácido láctico-co-glicólico) (PLGA)				4-12	[82]
Partículas solubles	α-TCP + DCPA + CaCO3 + pHA	Microesferas de gelatina				18	[83,84]
Espumado mediante generación de gases	α-TCP + DCPA + CaCO3 + pHA	Descomposición de NaHCO3 por la adición de disoluciones de NaH2PO4	52-60	13-20	~100	1.3-2.1	[85]
Espumado mediante generación de gases	α-TCP + pHA	Descomposición térmica de H2O2	51-66	11-36	200	1.4-8.8	[86]
Espumado mediante generación de gases	TTCP + DCPA	Descomposición de NaHCO3 por la adición de ácido cítrico	56	20	170	5	[87]
Espumado de la fase líquida	α-TCP + pHA	Empleo del albumen como agente espumante	55-77	12-56	~25****	0.6-8	[31]

* Resistencia a la flexión; ** Resistencia a la compresión radial; *** Diámetro de la microesferas hidratada; **** Diámetro de entrada de poro.

Tabla 2.3. (Continuación).

Método	Componentes de la fase sólida	Agente porógeno/método	Porosidad [%]		Diámetro de poro [µm]	Resistencia a la compresión [MPa]	Ref.
			Total	Macro			
Agentes estabilizadores de burbujas	α-TCP + pHA	Dodecil sulfato de sodio (SDS)	40-50	5-17	20-80	8-23	[88]
Emulsiones	α-TCP + pHA	Parafinas de alta viscosidad en conjunto con monooleato de sorbitan como agente dispersante	75	52-64	100-900		[89,90]
Congelación/sublimación	Fosfatos de calcio semicristalinos + DCPA	Disoluciones acuosas de alginato	71-89		100-200	0.07-1.47	[91]
Congelación/sublimación	α-TCP	Disoluciones acuosas de gelatina			180-380	0.1-0.4	[92]
Réplica directa	TTCP + DCPA	Plantillas de poliuretano	70		1000		[93]
Réplica directa	α-TCP	Plantillas de poliuretano			700	~1	[94]
Réplica indirecta	DCP + CaCO ₃	Negativo termoplástico	44	22	1000	12	[95]
Réplica indirecta	TTCP + DCPA	Negativo de resina epóxica	55		300-500	5.8	[96]
Réplica indirecta	TTCP + DCPA	Negativo de resina			300-800		[97]
Réplica indirecta	TTCP + DCPA	Resina negativa de fenol formaldehído porosa	62-71	30-50	400-500	1-6	[98]
Réplica y espumado mediante generación de gases	TTCP + DCPA	Plantilla de poliuretano y descomposición térmica de H ₂ O ₂	59-63		200-600	1.5-5.8	[99,100]
Diseño por computadora	α-TCP + β-TCP	Impresión 3D	41-53		12-27	0.9-22.3	[101]
Diseño por computadora	TCP o TTCP	Impresión 3D	29-60		13-27	5.8-22.3	[102]

* Resistencia a la flexión; ** Resistencia a la compresión radial; *** Diámetro de la microesfera hidratada; **** Diámetro de entrada de poro.

La gran ventaja que tiene el empleo de un cemento frente al empleo de pastas no autofraguables es que la consolidación de la estructura está a cargo de la reacción de fraguado del cemento a temperatura ambiente o fisiológica, evitando la sinterización de la pieza, lo cual conlleva la obtención de andamios con composición y estructura de mayor similitud a las del tejido óseo [40]. No obstante, es importante señalar que no todos los métodos que emplean cementos como material de partida aprovechan la capacidad de fraguado para consolidar la estructura macroporosa final, sino que algunos se benefician del fraguado sólo como paso intermedio antes de sinterizar la estructura.

Otra ventaja es que se pueden diseñar formulaciones específicas de cemento para cada tipo de lesión, y en algunos casos estos cementos pueden ser implantados mediante moldeo o inyección de la pasta, reduciendo en mayor medida el trauma generado. Por el contrario, cuando se emplean andamios consolidados por sinterización, el cirujano debe adaptar la cavidad del defecto a las dimensiones del andamio, lo que genera mayor trauma en el paciente y en la mayoría de los casos una mayor pérdida de masa ósea [103]. A continuación se describen brevemente algunos de los métodos para obtener CPC macroporosos.

Se pueden distinguir dos tendencias en la obtención de cementos macroporosos. La primera consiste en obtener la porosidad después del fraguado del cemento y la segunda antes del fraguado, cuando el cemento aún tiene la consistencia de una pasta.

Se pueden introducir macroporos en los cementos mediante el sacrificio de agentes porogénicos en forma de partículas, fibras o mallas. El tamaño y distribución de la porosidad corresponde al tamaño y posición iniciales del porógeno [59]. La eliminación del agente porogéno puede realizarse en un medio líquido *in vitro* o bajo condiciones fisiológicas *in vivo*. En el primer caso, al igual que en las piezas sinterizadas, se tiene la desventaja de que el material posee una forma definida y por tanto el cirujano debe adaptar el defecto al implante. En el segundo caso, la desventaja radica en que la porosidad no es accesible inmediatamente a las células y por tanto la colonización del material no se inicia hasta que la porosidad se haya generado. Adicionalmente, ambas técnicas comparten la desventaja que deben incorporar gran cantidad del agente porogénico para lograr alcanzar un aceptable nivel de conectividad entre poros, lo cual puede llegar a comprometer la biocompatibilidad del cemento [59].

La réplica es otro método de obtención de cementos macroporosos. Esta técnica a su vez puede ser directa o indirecta. En el método directo la pasta de cemento se embebe en una plantilla con la estructura a reproducir y después de fraguar se elimina, generalmente por temperatura lo cual disminuye la similitud estructural con el tejido óseo. A diferencia, en el método indirecto la plantilla es el negativo de la pieza que se quiere obtener, de tal forma que la pasta de cemento se introduce y una vez fragua se elimina el negativo para obtener la estructura porosa deseada. En este caso la plantilla puede eliminarse por inmersión en agua o en algún solvente orgánico no tóxico conservando la similitud con el tejido óseo. No obstante, ambos métodos tienen la desventaja de que el cemento no puede ser moldeado y que el material usado para hacer la plantilla debe ser seleccionado cuidadosamente o en su defecto eliminado por completo para evitar posibles efectos tóxicos [59].

También se pueden obtener cementos macroporosos mediante la emulsión de gotas de aceite (fase hidrófoba) en la pasta de cemento (fase hidrófila), de tal forma que las gotas de aceite actúan de agente porógeno en estado líquido [89]. Mediante este método es importante la selección del aceite porque si su eliminación no es completa podría ser causa de la mala biocompatibilidad del material.

El diseño de piezas mediante computadora y su posterior impresión tridimensional con equipos especiales es otro proceso para obtener cementos macroporosos. Estas técnicas tienen la ventaja de que el control y la reproducción de las muestras es elevada. Sin embargo, estos materiales tampoco son moldeables o inyectables. Lo mismo sucede con los cementos macroporosos obtenidos por congelación/sublimación de suspensiones cementantes, en los que la ventaja es que el agente porógeno es la misma agua empleada en la preparación de la pasta, por tanto no se compromete la biocompatibilidad del material. Una ventaja adicional es que la porosidad obtenida se controla mediante las condiciones de enfriamiento [59].

Un ejemplo claro para obtener cementos macroporosos antes del fraguado es el espumado directo de la pastas por la generación de gases. En este caso los macroporos se crean por la formación de burbujas generadas por la descomposición de aditivos incorporados en el cemento. Una posibilidad es el empleo de Na_2CO_3 en estado sólido dentro del polvo del cemento. El polvo es mezclado con dos líquidos; el primero es una disolución básica para formar la pasta, y el segundo es una disolución ácida para generar burbujas de CO_2 [104]. También se pueden generar burbujas de CO_2 mezclando ácido cítrico monohidratado con CaCO_3 o NaHCO_3 [105]. La descomposición térmica del peróxido de hidrógeno es también un método para generar gases dentro de la pasta [86]. Sin embargo, debido a que en este método existe el riesgo de que las burbujas de gas generadas se incorporen en el torrente sanguíneo, lo cual puede llegar a causa embolismo, el método solo es válido para obtener andamios prefraguados y no pastas implantables [59].

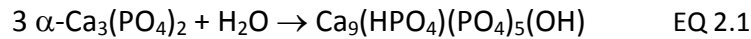
Otra método de espumado directo para generar macroporos antes del fraguado del cemento es el empleo de agentes espumantes o tensoactivos para obtener pastas de cemento espumadas, que a través de la reacción de fraguado endurezcan manteniendo la porosidad. Ginebra propone tres metodologías diferentes para llevar a cabo el espumado de CPC empleando agentes espumantes no tóxicos y biocompatibles, estas son [106]:

- i. El espumado directo de la pasta cementante.
- ii. El espumado de un líquido A, el cual será mezclado posteriormente con la pasta cementante preparada con un líquido B [31].
- iii. El espumado de la fase líquida del cemento y la posterior incorporación del polvo para formar una pasta espumada.

Cualquiera de las tres opciones tiene la ventaja de que la porosidad va incorporada en la pasta desde el momento de la implantación, por lo cual la colonización celular puede iniciar inmediatamente. Por otro lado, puesto que la espuma sólida se consolida después de la reacción de fraguado y las pastas de cemento son inyectables, las espumas pueden ser implantadas mediante técnicas de mínima invasión quirúrgica.

2.3.3 Cemento óseo en base a fosfato tricálcico alfa

Uno de los CPC más simples es el cemento de un componente en base a α -TCP. La reacción de fraguado del α -TCP se lleva a cabo por la hidrólisis de este componente, en un proceso que involucra de forma paralela reacciones de disolución y precipitación, resultando como producto de la reacción de fraguado la CDHA con una proporción Ca/P de 1.5 [52,53,63,86,107-115], de acuerdo a la ecuación 2.1.



El mecanismo de fraguado del cemento se esquematiza con detalle en la figura 2.9. En una primera etapa la disolución de la partícula de α -TCP en la fase líquida del cemento genera la saturación local de iones alrededor de las partículas de reactivo, que como consecuencia origina la precipitación de la fase más estable sobre la partícula, en este caso la apatita. La precipitación es la segunda etapa durante el fraguado, e involucra una reacción química con los grupos hidroxilo e hidronio del agua, por lo que la fase líquida no es solo un método de generar una pasta, sino que interviene directamente en la reacción de fraguado de acuerdo a la ecuación global 2.1.

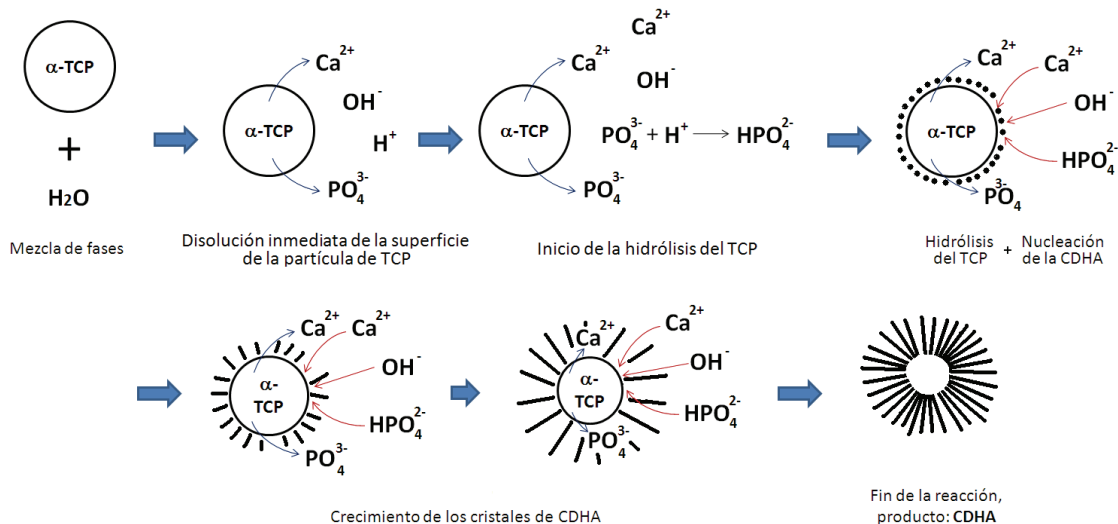


Figura 2.9: Esquema que muestra con detalle las etapas y procesos que ocurren durante la reacción de fraguado y endurecimiento de un cemento en base a α -TCP. Las tres etapas posteriores al mezclado toman desde pocos segundos hasta varios minutos. Mientras que el final de la reacción puede tomar desde horas hasta días.

Inicialmente el mecanismo de reacción está controlado por la cinética de hidrólisis del α -TCP y la precipitación de la CDHA. Conforme la reacción avanza, se forma una capa de CDHA sobre la partícula de α -TCP. Cuando esta capa es lo suficientemente gruesa, el mecanismo controlante de reacción cambia a la difusión de iones a través de la capa de producto [52,53,63,107-115].

Por tanto, el proceso de disolución y precipitación está controlado por mecanismos de transporte como la difusión de los iones en la pasta del cemento o factores termodinámicos como la saturación local de iones, por lo que la proporción L/P de mezclado, el medio de fraguado y diferentes componentes tanto en la fase líquida como en la sólida, pueden modificar la cinética de la reacción, originando diferentes morfologías de los cristales precipitados y por tanto diferentes propiedades del material.

2.4 Materiales poliméricos para la regeneración ósea

Existen dos tipos de polímeros biodegradables utilizados en medicina, 1) los polímeros en base a materiales naturales (polímeros naturales o biopolímeros), como los polisacáridos (almidón, alginato, quitina/quitosán, o ácido hialurónico), o las proteínas (colágeno, gelatina, soja, o fibrina), y 2) los polímeros sintéticos como el ácido poliláctico (PLA), el ácido poliglicólico (PGA) y la policaprolactona (PCL) [11,116].

Polímeros sintéticos: La ventaja de los polímeros sintéticos es que son producidos bajo condiciones controladas, y por ello pueden ajustarse sus propiedades fisicoquímicas, como la resistencia mecánica o la rapidez de degradación, para cumplir con diferentes aplicaciones. Además, son materiales altamente reproducibles que pueden ser producidos a gran escala. Los polímeros sintéticos más empleados en ingeniería de tejidos (IT) óseo son el PLA y el PGA. Ambos son poliésteres biocompatibles y biodegradables aprobados por la FDA (Food and Drug Administration) para uso en el tratamiento de lesiones músculo/esqueléticas [11,116].

Las desventajas de estos polímeros sintéticos para la regeneración ósea son: 1) la hidrólisis autocatalítica de los poliésteres, la cual además de degradar el material antes del crecimiento del nuevo tejido, genera la caída local de PH y consecuentemente el advertimiento de reacciones histológicas indeseadas, y 2) La ausencia de sitios de reconocimiento biológico en las moléculas, lo cual impide o limita el carácter bioactivo del material como por ejemplo la adhesión celular [11,116].

Biopolímeros: Algunos polímeros naturales son biocompatibles y biodegradables. Además, algunos biopolímeros poseen grupos funcionales que son reconocidos por las células, convirtiéndolos en materiales bioactivos naturales. La desventaja que pudiera llegar a presentar los biopolímeros es que pueden llegar a transmitir enfermedades o provocar el rechazo inmunológico. Además, sus propiedades fisicoquímicas y mecánicas son variables y dependen del origen del material. Por último, muchos polímeros naturales no son producidos industrialmente, por lo que actualmente no cumplen los requisitos económicos de la IT [11,116]. Cabe mencionar que no todos los biopolímeros presentan estos inconvenientes.

Algunos biopolímeros de gran relevancia para la regeneración ósea son la gelatina, el alginato de sodio y el extracto de soja. Estos materiales tienen la ventaja económica de que pueden ser procesados industrialmente a costos rentables. Son extensamente usados en la industria alimentaria y farmacéutica, por lo cual también existen rigurosos controles sanitarios que aseguran la calidad del material y la ausencia de agentes infecciosos o patológicos. Adicionalmente, se pueden controlar sus propiedades fisicoquímicas durante el proceso de extracción. Debido a que estos tres biopolímeros fueron propuestos como agentes espumantes multifuncionales para la obtención de espumas sólidas de HA, a continuación se describe su origen, el proceso de extracción y sus propiedades más relevantes.

2.4.1 La gelatina

La gelatina es una proteína derivada del colágeno. Las propiedades fisicoquímicas y mecánicas de la gelatina varían entre el origen de la materia prima y el método de extracción. La gelatina se emplea en la industria alimentaria como clarificante, estabilizador y como recubrimiento protector. En farmacia se usa como recubrimiento de tabletas, para la fabricación de capsulas,

cosméticos, pomadas y como emulsificante. La gelatina también es usada en la industria fotográfica y en gran variedad de aplicaciones específicas [117-120].

2.4.1.1 Obtención y refinado

La gelatina se extrae con agua a más de 40 °C de gran variedad de tejidos que contienen colágeno. La naturaleza y la cantidad de la gelatina varía significativamente entre diferentes tejidos (piel, hueso o tendón) y de las diferentes especies animales de donde se obtiene (bovino, porcino y pescado). A causa de esta variedad, el proceso de extracción es comúnmente modificado para obtener la calidad de gelatina deseada (temperaturas, reactivos, tiempos, y secuencia de la extracción), no obstante, el principio de extracción es el mismo [117].

Durante la extracción (proceso esquematizado en la figura 2.10), la materia prima es pretratada con una disolución ácida de HCl o cal (proceso usado con piel de cerdo o pescado y en algunos casos con huesos), o una disolución alcalina de NaOH (usada principalmente en materias primas de origen bovino y en materias primas procedentes de animales relativamente viejos). Posteriormente, la gelatina es extraída por calentamiento realizando incrementos paulatinos de temperatura. Para purificar el producto la suspensión obtenida es procesada mediante diferentes técnicas (sedimentado, filtrado, centrifugado, evaporación al vacío, etc.). Finalmente, la disolución concentrada de gelatina es secada y molida para ser empaquetada y esterilizada. La gelatina extraída en medio ácido se le denomina gelatina tipo A, mientras que a la extraída en medio alcalino se denomina tipo B [117,119,120].

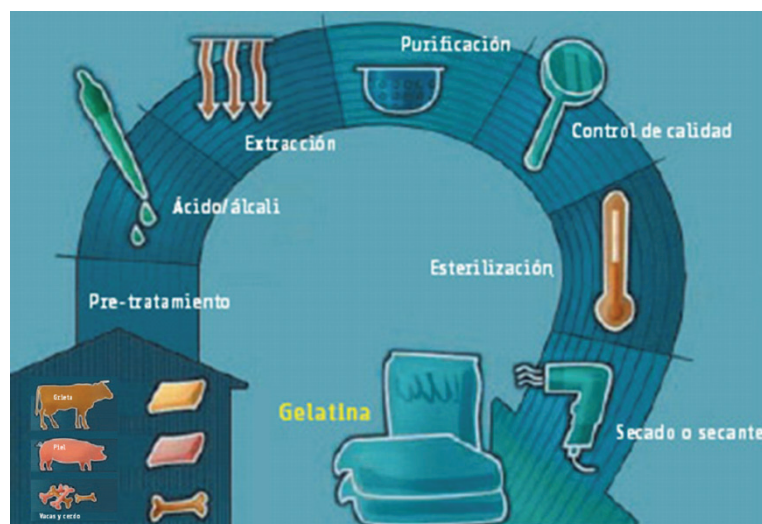


Figura 2.10: Materias primas y proceso de extracción de la gelatina [119].

La claridad, transparencia y pureza de la gelatina son propiedades importantes para aplicaciones alimentarias y farmacéuticas. Estas propiedades dependen del método de extracción (ácido o alcalino), el origen y la historia de las materias primas, las condiciones de calentamiento durante la extracción, los cuidados durante la purificación y el uso de aditivos [117].

2.4.1.2 Composición de la gelatina

La gelatina contiene alrededor de 18 aminoácidos unidos de manera relativamente ordenada, no obstante, la glicina, la prolina y hidroxiprolina son los predominantes en la molécula. La glicina y la alanina representan en conjunto entre una tercera parte y la mitad de los aminoácidos. Cabe mencionar que la glicina es el residuo N-terminal predominante en la gelatina tipo B, mientras que la alanina tiende a ser más abundante en la gelatina tipo A. La prolina y la hidroxiprolina pueden llegar a representar una cuarta parte de los aminoácidos en la gelatina, mientras que la cuarta parte restante pueden ser aminoácidos de carácter ácido o básico. La cantidad exacta de aminoácidos en la gelatina depende del origen y del tipo de extracción, un ejemplo típico es el siguiente: glicina 21 %, prolina 12 %, hidroxiprolina 12 %, ácido glutámico 10 %, alanina 9 %, arginina 8 %, ácido aspártico 6 %, lisina 4 %, serina 4 %, leucina 3 %, valina 2 %, fenilalanina 2 %, treonina 2 %, isoleucina 1 %, hidroxilisina 1 %, metionina e histina <1 % y tirosina < 0.5 %. Sin embargo, la gelatina no contiene el aminoácido esencial triptófano [117,120].

Se ha demostrado que existen pocas diferencias composicionales entre la gelatina de origen bovino y porcino (gelatinas terrestres), pero la gelatina de pescado (gelatina acuática) posee grandes cantidades de serina y treonina [117].

La gelatina contiene alrededor de 1 % de azúcares (glucosa, galactosa, manosa, lactosa y xilosa). Se cree que los azúcares forman una sustancia cementante llamada mucopolisacáridos que se presentan en forma de amino-azúcares, los cuales son importantes en el proceso de gelificación de la gelatina [117].

2.4.1.3 Estructura de la gelatina

El modelo estructural básico de la gelatina es la secuencia peptídica -Glicina-X-Y-, donde X e Y pueden ser cualquier aminoácido, pero la prolina tiene preferencia por la posición X, mientras que la hidroxiprolina prefiere la posición Y. El modelo estructural multicadena del colágeno, que describe el colágeno como tres cadenas polipeptídicas enlazadas entre sí por varias uniones, propone que el colágeno se transforma en gelatina a través de la ruptura de las uniones entre cadenas, formando tres cadenas simples de gelatina (ver figura 2.11). Sin embargo, la degradación térmica de la gelatina sugiere un segundo modelo, donde las cadenas de gelatina disminuyen de peso molecular por la ruptura de los enlaces peptídicos [117,120].

En cualquier caso, se acepta que la gelatina es una cadena lineal poco ramificada. Cada cadena es químicamente heterogénea con propiedades dinámicas que dependen de la ruptura de los enlaces peptídicos, la ruptura o desorganización de los enlaces laterales entre cadenas y las modificaciones en la configuración estructural [117].

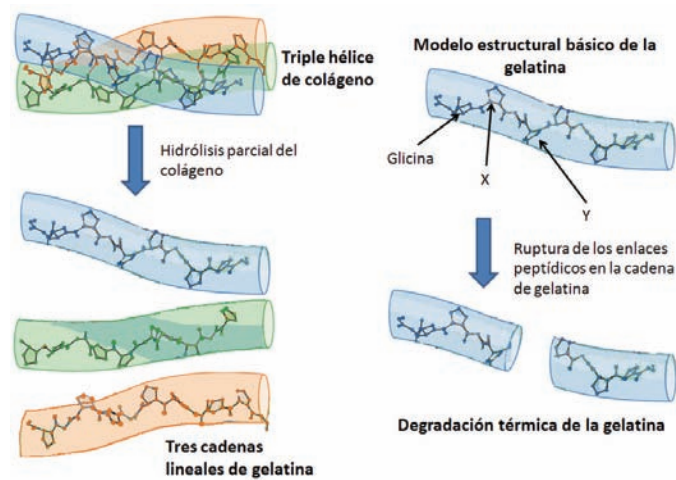


Figura 2.11: Hidrólisis parcial del colágeno y modelo estructural básico de la gelatina. Figura original adaptada de [121].

2.4.1.4 Propiedades fisicoquímicas

La gelatina pura y seca es un sólido incoloro e inodoro, transparente, frágil, de apariencia vítrea. El color puede variar desde ligeramente amarillo hasta color ámbar. El peso molecular de la gelatina comercial oscila entre 40 y 90 KDa [117].

Los grupos ionizables de la gelatina son: 1) los grupos carboxilo del ácido aspártico y de los ácidos carboxílicos, 2) los grupos amino- ϵ de la lisina, 3) el grupo guanidino de la arginina, 4) el grupo imidazol de la histidina, y 5) los grupos terminales α -carboxilo y α -amino [117].

A diferencia del colágeno, la gelatina es soluble en agua. Sin embargo, para incrementar la homogeneidad de la disolución, la gelatina seca puede prehidratarse con agua fría para finalmente agitar y calentar hasta alcanzar una temperatura de al menos 35 °C [117,118,120]. El entrecruzamiento de la gelatina con aldehídos, principalmente glutaraldehído, es empleado para mejorar la resistencia térmica, disminuir la solubilidad en agua y mejorar las propiedades mecánicas de los geles de gelatina [120].

Las disoluciones acuosas de gelatina forman geles termorreversibles que presentan temperaturas de transición (sol/gel y *viceversa*) cercanas a la temperatura del cuerpo humano (37 °C), lo cual le confiere propiedades especiales de liberación de sabores, olores y/o fármacos [120]. El proceso de gelificación de la gelatina involucra varios mecanismos. Se cree que algunas secciones de ciertas moléculas de la cadena se unen para formar cristales, generando una estructura tridimensional ramificada que es capaz de retener el agua en su interior. Las uniones entre cadenas pueden ser desde puentes de hidrógeno y uniones de van der Waals, hasta la formación de enlaces peptídicos [117]. Las propiedades del gel de gelatina dependen de la rapidez de enfriamiento, la cantidad de sólidos en suspensión y el pH de la disolución. Un enfriamiento lento propicia la orientación de las moléculas de gelatina incrementando la rigidez del gel (ver figura 2.12), mientras que la acidez retarda la gelificación y disminuye la temperatura de transición. La temperatura de transición del gel puede variar desde 28 hasta 37 °C [117,118]. El Bloom es una prueba física que determina la dureza de un gel, y se expresa como el número de gramos necesarios para que un cilindro de 12.7 mm de diámetro penetre 4 mm dentro del gel. Dependiendo del tipo de gelatina el valor Bloom toma valores desde 50 hasta 250 [118,120].

La aplicación específica de la gelatina depende del nivel de homogeneidad y del poder de gelificación, que a su vez dependen del punto isoeléctrico (PIE). La gelatina tipo A presenta un PIE entre 6 y 9.5, mientras que la gelatina tipo B lo tiene entre 4.5 y 5.6 [117,120].

La viscosidad de las disoluciones de gelatina depende del tipo de extracción, la concentración, la temperatura y el tiempo de almacenado de la disolución. En general, la gelatina tipo A tiene viscosidades ligeramente mayores a las de la B, sin embargo, no presentan diferencias en el punto de fusión del gel [117,118,120].

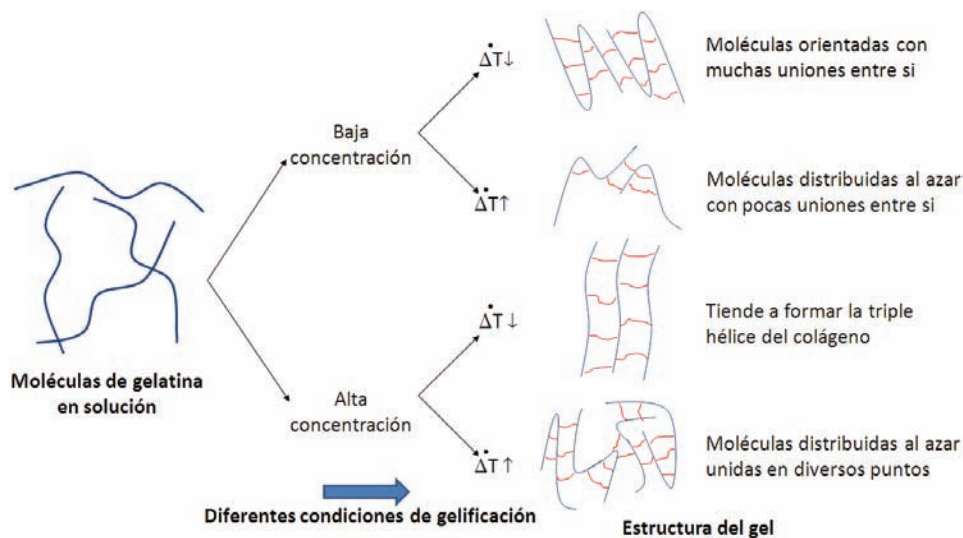


Figura 2.12: Efecto de la concentración y de la rapidez de enfriamiento sobre la estructura del gel de gelatina. ΔT : rapidez de enfriamiento.

La gelatina es una proteína conocida por sus propiedades espumantes [117,120]. Los soles de gelatina enfriados a 10 °C tienen la consistencia del albumen y pueden ser espumados para formar espumas del doble del volumen inicial [117]. La gelatina también puede incrementar la viscosidad de la fase continua de una emulsión retardando la floculación y la coalescencia. Por tanto, puede estabilizar las emulsiones de aceite en agua [117,118]. Las concentraciones de gelatina empleadas como agente emulsificador, espumante o estabilizador de sistemas coloidales varían entre 5 y 20 % en peso [120,122-126].

Otra propiedad especial de la gelatina es la formación de películas que pueden ser empleadas como impermeables, hidratantes, barreras o recubrimientos. También posee propiedades adhesivas [117,118,120].

2.4.1.5 Diferencias entre la gelatina de origen bovino y porcino (legislación)

Química y estructuralmente no existen grandes diferencias entre la gelatina de origen bovino y porcino. Además, ambas pueden obtenerse con características idénticas controlando los parámetros del proceso de extracción. Sin embargo, debido a la encefalopatía esponjiforme bovina los controles de calidad que ordenan las legislaciones europea, asiática y americana son más rigurosos y extensos sobre la gelatina de origen bovino, pese a que existen trabajos en los que se reporta que el tratamiento durante 2 horas con NaOH en una concentración de 0.3 M es suficiente para eliminar el agente causante de la enfermedad [127]. Cabe mencionar que este hecho hace menos probable que la gelatina de bovino tipo B sea transmisora de la enfermedad.

Las leyes que rigen el empleo de la gelatina como producto biomédico se establecen en la farmacopea de cada país o región. En la farmacopea estadounidense (USA) la gelatina se define como el producto de la hidrólisis parcial del colágeno [128]. En ella la gelatina extraída por medios ácidos se denomina gelatina tipo A, mientras que la extraída en medio básico se denomina tipo B. La farmacopea también señala los contenidos máximos permitidos de metales pesados y los límites microbiológicos permitidos (menos de 1000 cfu/g y pruebas negativas de salmonella y E-coli). Las condiciones adicionales que debe cumplir la gelatina de origen bovino en la legislación estadounidense se regulan por la FDA a través del departamento de salud y servicios humanos [129]. Por otro lado, la farmacopea europea define a la gelatina como la proteína purificada extraída por la hidrólisis ácida parcial (tipo A), la hidrólisis alcalina parcial (tipo B) o la hidrólisis enzimática de colágeno de origen animal, pudiendo ser la mezcla de diferentes tipos [130]. Los requisitos que establece la ley europea sobre metales y microorganismos en la gelatina son similares a los planteados por la farmacopea estadounidense, sin embargo, las especificaciones adicionales que requiere la gelatina de origen bovino se establecen por la Dirección Europea Para la Calidad de los Medicamentos (EDQM), en conjunto con la Agencia Europea de Evaluación de Productos Médicos (EMA) por medio de la directiva 2001/83/EC. En términos generales los requisitos adicionales se basan en el control de las materias primas (certificación sanitaria del ganado).

Finalmente cabe mencionar que los productores mundiales de gelatina siguen las normativas establecidas para la obtención de gelatina de bovino manteniéndose al día en las nuevas especificaciones [119].

2.4.1.6 La gelatina en medicina regenerativa e ingeniería de tejidos

De acuerdo a las legislaciones vigentes, la gelatina (incluida la de origen bovino) está permitida para el consumo humano [120,128,130,131], por tanto, se encuentra en el mercado en gran variedad de purezas incluyendo el grado farmacéutico [119,132]. La gelatina conserva los grupos laterales del colágeno que la identifican como una proteína presente en la matriz extracelular de la piel, los huesos y los tendones. En particular contiene la secuencia péptida RGD (arginina-glisina-ácido aspártico) que es considerada una cadena que incrementa la adhesión de gran variedad de células [133-135].

Las películas de gelatina se emplean como piel artificial para el tratamiento de quemaduras [11]. Por otro lado, los hidrogeles de gelatina son termorreversibles, no producen antigenicidad, son biocompatibles y biodegradables [117,118,134,136]. Por estas razones la gelatina se emplea en la fabricación de sustratos para IT, y la encapsulación y liberación de fármacos [117,118,134,137,138].

Al ser la gelatina un producto derivado del colágeno, principal componente orgánico del tejido óseo, se emplea por sí sola o en conjunto con la HA para fabricar materiales de uso en regeneración de lesiones óseas, que imiten la estructura compuesta del hueso [62,133,139,139-144]. Algunos trabajos introducen la gelatina en los CPC para incrementar la resistencia mecánica o la cohesión [60-62].

2.4.2 El alginato de sodio

El alginato es un polisacárido extraído de las algas de mar de color marrón (Kelp). El alginato se usa desde hace tiempo en la industria alimentaria como gelificante y estabilizador de sistema coloidales. Además, posee características que le permiten ser empleado como matriz para la encapsulación y/o liberación de proteínas, fármacos y células [145-149].

2.4.2.1 Obtención y extracción

El alginato comercial se extrae principalmente de tres especies de algas Kelp: *Laminaria hyperborea*, *Ascophyllum nodosum* y *Macrocystis pyrifera*. No obstante, también se puede extraer de la *Laminaria japónica*, la *Eclonia máxima*, la *Lesonia megrezens* y la *Sargassum species*. En todas estas algas el alginato es el componente principal, llegando a representar el 40 % del peso total en seco. El alginato se encuentra en la matriz intracelular en forma de sales de los diferentes cationes del agua de mar: Mg^{2+} , Ca^{2+} , Sr^{2+} , Ba^{2+} y Na^{1+} , siendo la sal de calcio la más común [145,147,148,150].

El alginato de sodio en polvo puede obtenerse por dos procesos diferentes, el proceso de calcificación y el proceso ácido (ver figura 2.13).

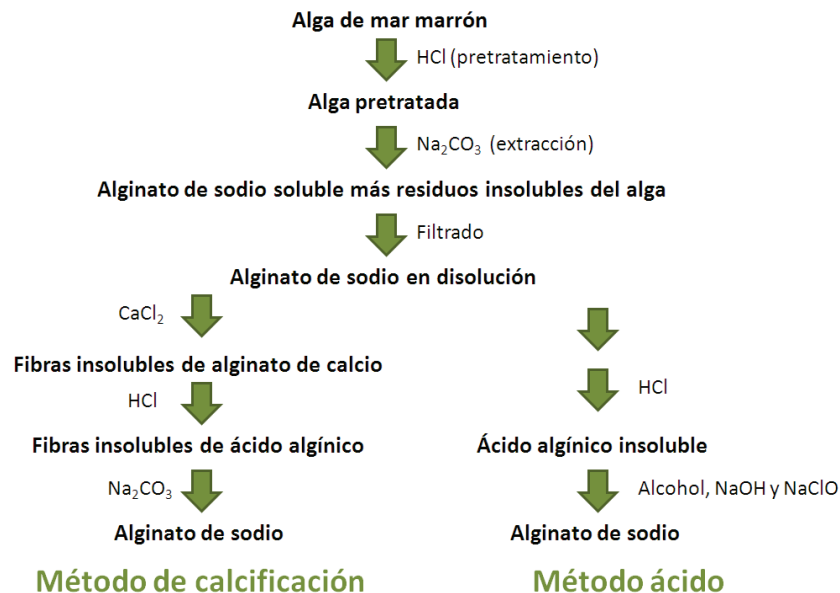


Figura 2.13: Métodos de extracción del alginato de sodio [148].

El proceso ácido parece ser el de mayor simplicidad ya que tiene una etapa menos. Sin embargo, presenta ciertas desventajas en detalles de operación. En primer lugar, se forma una masa gelatinosa que resulta sumamente difícil de separar, pudiendo producirse una considerable pérdida del producto. En segundo lugar, el gel retiene en la estructura una elevada proporción de líquido, lo que dificulta los procesos de secado y deshidratación, haciéndose necesario el uso de alcohol como solvente para la conversión a alginato sódico. Esto usualmente encarece el proceso, a menos que se logre un buen grado de recuperación del solvente, lo cual no suele resultar fácil. En cambio el proceso de calcificación tiene la desventaja de requerir un proceso extra de blanqueado, aunque la manipulación del producto es más sencilla y no requiere de solventes volátiles [148].

Debido al origen natural el alginato puede contener varias impurezas, tales como metales pesados, endotoxinas, pretnas u otros carbohidratos y polifenoles. Estas impurezas en bajas concentraciones no suponen un problema para aplicaciones alimenticias, sin embargo, para aplicación farmacéutica, especialmente para aplicación parenteral, estas impurezas deben ser removidas. Afortunadamente, el alginato de grado farmacéutico puede ser adquirido en varios grados de pureza [145,147,148].

2.4.2.2 Estructura química

Los alginatos son una familia de polisacáridos lineales no ramificados que alternan diversas proporciones de dos monosacáridos: β -D-ácido manurónico (M) y α -L-ácido gulurónico (G), unidos mediante enlaces glucosídicos 1,4 (ver figura 2.14). La secuencia de estos elementos es aleatoria, sin embargo, ha sido demostrado que la cadena polimérica que constituye el ácido algínico y sus sales se compone de tres tipos de regiones o bloques. Los bloques G contienen sólo unidades del ácido L-gulurónico (GG), los bloques M se basan únicamente en ácido D-manurónico (MM) y las regiones MG o GM consisten en unidades alternadas de ambos ácidos (ver figura 2.14). La variabilidad molecular depende del tipo del alga de donde es extraído el alginato. Por ejemplo, los alginatos obtenidos de *L. hyperborea* añeja contienen mayor número de bloques G, mientras que los alginatos extraídos de *A. nodosum* y *L. japónica* poseen menos cantidad de estos bloques. La proporción entre los bloques M/G también varía con la temporada y la zona geográfica de extracción del alga. La composición, la extensión de los bloques y el peso molecular (PM) de la cadena definen las propiedades del material [145,146,148].

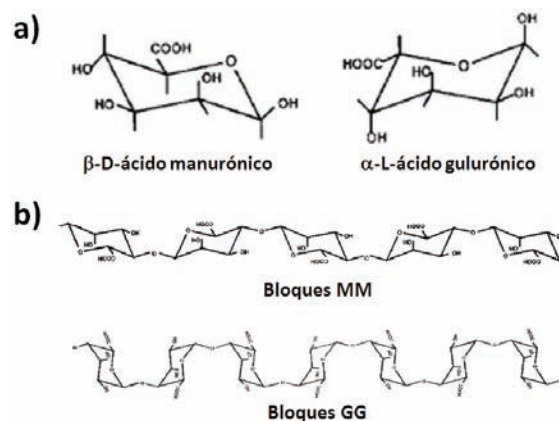


Figura 2.14: a) Fórmula química del β -D-ácido manurónico (M) y del α -L-ácido gulurónico (G). b) Estructura de los bloques MM y GG en el alginato de sodio.

Estructuralmente las regiones de bloques M corresponden a cadenas lineales, mientras que los bloques G presentan una estructura en forma de bucle (ver figura 2.14). Cuando dos cadenas de bloques G se alinean, se crea un hueco en forma de diamante, el cual tiene la dimensión ideal para acomodar un ión calcio en su interior (ver figura 2.15).

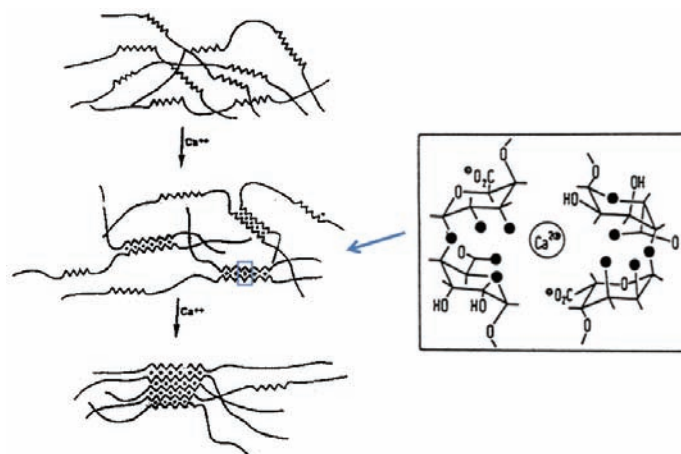


Figura 2.15: Mecanismo de formación del gel de alginato en contacto con cationes bivalentes como el calcio [145,148].

2.4.2.3 Propiedades fisicoquímicas

Las sales de alginato con cationes monovalentes, amoníaco y aminas de bajo peso molecular son solubles en agua fría y caliente, también son solubles en solventes miscibles en agua como los alcoholes y las cetona. Sin embargo, son poco solubles en agua dura debido al alto contenido de calcio. Por otro lado, las sales de cationes polivalentes son insolubles [148].

Las disoluciones de alginato son rápidamente degradadas al aire por microorganismos, debido a que contienen gran cantidad de materia orgánica y nitrógeno. Las disoluciones estériles de alginato son estables a temperatura ambiente entre 5.5 y 10 unidades de pH. Bajo estas condiciones las disoluciones pueden ser almacenadas por periodos largos de tiempo sin que pierdan viscosidad. Los alginatos son poco estables al calor, el oxígeno y los iones metálicos. Los alginatos de alto PM se degradan más rápidamente que los de bajo o medio PM [148].

La viscosidad de las disoluciones de alginato depende principalmente del PM. A mayor PM, mayor concentración y menor temperatura, mayor viscosidad de la disolución [151]. Existen indicios de que el PM del alginato varía entre 80 y 290 KDa en función del origen [145]. La viscosidad de las disoluciones de alginato también disminuye con el incremento de los esfuerzos cortantes aplicados, en otras palabras, son tixotrópicas [148].

Las disoluciones de alginato pueden formar geles al contacto con disoluciones que contengan cationes divalentes como Ca^{2+} , Sr^{2+} y Ba^{2+} , los dos últimos generan geles más fuertes que el calcio, mientras que los cationes monovalentes y el Mg^{2+} no inducen la gelificación. Otros cationes divalentes como el Pb^{2+} , Cu^{2+} , Cd^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} , Zn^{2+} y Mn^{2+} también entrecruzan al alginato, no obstante, su uso está limitado por la toxicidad [145,148].

El entrecruzamiento y la gelificación del alginato de sodio se originan por la unión entre grupos GG a través de la sustitución de los iones sodio por cationes divalentes, para formar una estructura de tipo “caja de huevo” (Ver figura 2.15). Los cationes divalentes se unen a los bloques GG de forma cooperativa, llegando a involucrarse más de 20 monómeros en cada unión. En este proceso cada cadena de alginato puede formar uniones con muchas otras más, dando como resultado una red capaz de retener el agua en su interior (hidrogel), en vez de un precipitado. El gel de alginato puede ser obtenido en agua fría o caliente dentro del intervalo 0-100 °C, pero, la rigidez del gel disminuye con el aumento de la temperatura [145,148].

La rigidez de los geles de alginato con más de 240 KDa es independiente del PM. No obstante, para alginatos de bajo PM existe un valor por debajo del cual la capacidad de formar el gel disminuye. La flexibilidad del gel de alginato decrece de acuerdo con el siguiente orden de presencia de los bloques: $MG > MM > GG$. Por lo que los geles de alginato con alto contenido de bloques GG son rígidos, mientras que los de bajo número de bloques GG producen geles más elásticos. Los geles con menor contracción dimensional, mejor resistencia mecánica, mayor porosidad y mejor estabilidad se obtienen con alginatos con más del 70 % de bloques GG, de longitud mayor a 15 unidades. A los alginatos de estas características se les denomina alginatos de alto G [145].

A pesar de que el microambiente en el interior del gel de alginato es relativamente inerte para las proteínas, los fármacos o las células, una molécula con carga positiva puede llegar a competir con los iones calcio por los sitios carboxílicos del alginato, lo cual puede alterar la movilidad del componente si se trata de un sistema controlado de liberación [145].

Finalmente, el alginato posee una propiedad bioadhesiva, definida como la adhesión de dos superficies siendo al menos una de ellas un sustrato biológico. Esta propiedad se aplica en la liberación de fármacos en tejido mucoso [145].

2.4.2.4 Estabilidad química y degradación

La degradación del gel de alginato entrecruzado con calcio puede llevarse a cabo mediante la remoción del catión por medio de la incorporación de bis-etilenglicol, lactato, citrato, solución de fosfato, o disoluciones con altos contenidos de cationes sodio o magnesio. Si el calcio fue usado para entrecruzar y posteriormente se emplea una disolución de fosfato para destruir el gel, entonces se formará un precipitado de fosfato de calcio. Este fenómeno es más evidente cuando se trata de un alginato con alto contenido de bloques G. También se ha demostrado que el gel de alginato se degrada mediante un proceso autocatalítico, el cual depende del tiempo, el pH y la temperatura [145].

2.4.2.5 Propiedades biológicas

La principal diferencia entre el alginato industrial y el alginato farmacéutico es la presencia de impurezas mitogénicas, las cuales son causa de la producción de citoquinas y de la respuesta inflamatoria producida por el alginato. Se ha probado también que el alginato rico en bloques M estimula la formación de citoquinas. Por el contrario, las películas de alginato con alto contenido de bloques G han demostrado ser completamente biodegradables, sin producir reacciones inflamatorias severas. Por lo tanto, para evitar la inflamación se recomienda el empleo de alginato ultra puro con bajo contenido de bloques M y alto número de bloques G [145].

Las células de los mamíferos son incapaces de interactuar de forma específica con el alginato, tanto directamente como a través de proteínas sanguíneas, puesto que los geles de alginato adsorben de forma limitada las proteínas y no poseen grupos para la interacción [152]. No obstante, los geles de alginato se usan en el transporte de células mesenquimales para la regeneración de cartílago y otras aplicaciones de IT [145,146,153-156]. Las principales ventajas del gel de alginato son que es fácil de inyectar, tiene cohesión y es biocompatible. Sin embargo, por sí solo no tiene propiedades osteoconductoras. Algunos trabajos han demostrado que el alginato combinado con fosfatos de calcio incrementan la adhesión de

células óseas [146,157] y que en combinación con proteínas morfogenéticas óseas es capaz de estimular la formación y penetración de nuevo hueso [158].

Por otro lado, una de las características principales de algunos polisacáridos procedentes de las algas (característica que no es propia de los polisacáridos de plantas terrestres) es que al igual que la heparina contienen grupos O-sulfato en la molécula, sin embargo, difieren de los de la heparina en que no contienen grupos N-sulfato [150]. Los polisacáridos sulfatados al igual que la heparina presentan *in vitro* e *in vivo* propiedades anticoagulantes y antitrombógenas [159,160]. No obstante, los polisacáridos sulfatados naturales son mezclas complejas de macromoléculas con propiedades muy diferentes, lo cual dificulta el desarrollo de nuevos fármacos [161,162]. Cabe mencionar que se ha demostrado que la heparina es capaz de acelerar la angiogénesis [163], que como ya se ha mencionado es un proceso primordial para la formación y subsistencia del hueso nuevo [10]. Se sabe también que la heparina por sí sola no inicia la angiogénesis, pero sí la inicia combinada con cobre, mientras que en conjunto con cortisona inhibe la angiogénesis [163]. Finalmente, el consumo prolongado de heparina se considera un factor que puede desarrollar osteoporosis [3,164].

La modificación química de los polisacáridos, como la sulfatación del alginato (el alginato no posee naturalmente grupos sulfato), abre la posibilidad de obtener nuevos agentes de aplicación terapéutica [149,165,166]. Las propiedades biológicas de estos polisacáridos sulfatados pseudosintéticos (anticoagulantes, antitrombóticas, antiinflamatorias, entre otras) dependen del nivel de sulfatación, el peso molecular y el nivel de entrecruzamiento entre sus cadenas [161,167,168].

Al sulfatar el alginato de sodio se espera que de forma similar a la heparina, las interacciones entre los grupos sulfato y las células madre endoteliales aceleren la angiogénesis, pero con un menor riesgo de osteoporosis [165]. Adicionalmente, los grupos sulfato también pueden mejorar la adhesión celular.

El alginato de sodio puede ser sulfatado mediante el método conocido como la oxidación Parikh-Doering, en la cual algunos de los grupos hidroxilo ($-OH$) de los bloques M o G son sustituidos por grupos sulfato ($-O-SO_3^-$). Esto se logra por la incorporación del complejo $SO_3 \cdot Py$ (sulfuro trióxido de piridina) en presencia de DMSO (dimetilsulfóxido), ver figura 2.16 [169]. El nivel o grado de sulfatación se define como la proporción entre los grupos hidroxilos sustituidos y los remanentes.

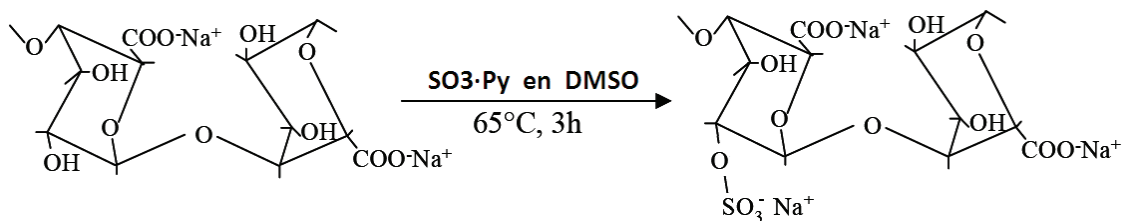


Figura 2.16: Reacción química de sulfatación del alginato de sodio.

2.4.3 El extracto de soja

La planta de soja es una subespecie del género de las glicinas, el subgénero de la soja incluye la semilla cultivada expandida a varias regiones del mundo (*G. max* (L) Merrill), y la semilla salvaje endémica del este de Asia (*G. soja* Sieb y Zucc), ambas de temporada anual. La planta se ha empleado en China desde hace 5000 años como alimento y componente de medicamentos. La soja contiene gran número de aminoácidos esenciales por lo que es un buen complemento alimenticio [170].

2.4.3.1 Composición de la semilla de soja

La semilla de soja es una leguminosa compuesta por proteínas vegetales (~40 %), carbohidratos (~38 %), aceites naturales (~18 %) y minerales (~4 %) (ver figura 2.17) [171]. Las proteínas de la soja son las denominadas isoflavonas [171,172], las cuales son estables al calor y requieren de cocción para poder ser digeridas. Los carbohidratos solubles de la soja son la sacarosa (2.5-8.2 %), la rafinosa (0.1-1 %) la cual consiste en la unión de una molécula de sacarosa con una molécula de galactosa, y la estachiosa (1.4-4.1 %) formada por una molécula de sacarosa unida a dos moléculas de galactosa.

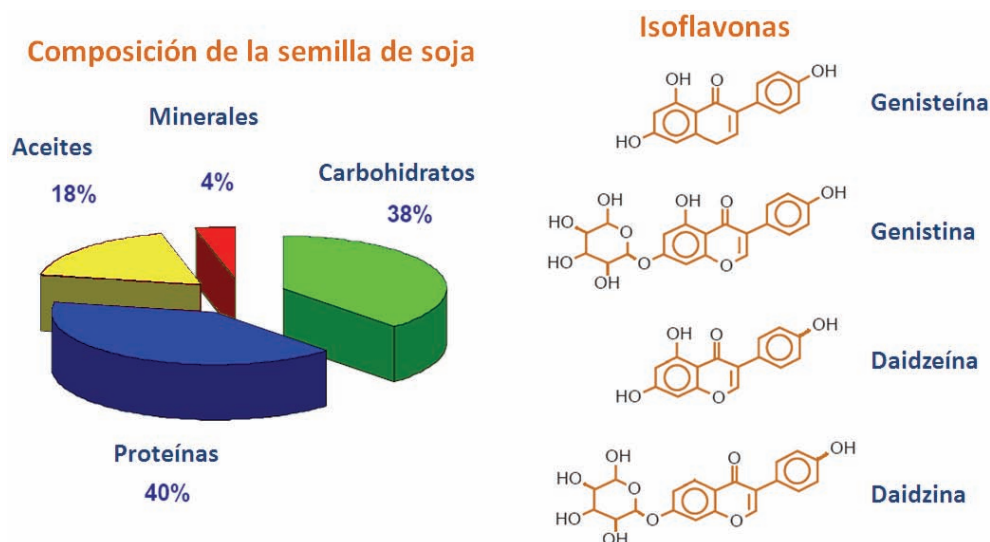


Figura 2.17: Composición de la semilla de soja y estructura química de las isoflavonas [171,172].

2.4.3.2 Proceso de extracción

La finalidad de la extracción de la soja es recuperar la proteína de la semilla en la máxima concentración posible, manteniendo sus propiedades. Para ello, generalmente se emplean solventes en vez de tostar la semilla. La harina de soja es un producto intermedio entre la semilla nativa y el extracto de soja.

Existen varios métodos para eliminar los aceites contenidos en la semilla de soja [171,173,174]. Uno de ellos consiste en las dos etapas siguientes [171]. En la primera etapa la harina de soja es secada mediante sublimación/condensación, para posteriormente ser suspendida en hexano bajo agitación a 30 °C. Después, la mezcla es removida del agitador, se deja enfriar y espesar durante 20 minutos a temperatura ambiente. La fracción sólida es lavada tres veces con hexano fresco, para lo cual el sólido es resuspendido y separado entre cada operación. En esta etapa, la extracción de lípidos se analiza gravimétricamente.

En la segunda etapa de extracción, la harina desengrasada es suspendida en un solvente (en una proporción 1:10), el cual puede ser metanol, etanol, acetonitrilo, acetona, agua desionizada, HCl 0.05 N o una mezcla de los anteriores. La suspensión puede ser agitada a diferentes temperaturas (entre 30 y 50 °C) durante diferentes tiempos (de 2 a 4 horas) para finalizar la extracción. Posteriormente la mezcla es enfriada y asentada durante 30 minutos. El sobrenadante es recogido y centrifugado durante 10 minutos a 2500 rpm a temperatura ambiente. Finalmente, la fracción sólida es flotada, el solvente es evaporado en atmósfera de nitrógeno y el extracto es deshidratado para obtenerlo en estado sólido.

2.4.3.3 Propiedades del extracto de soja

Las proteínas del extracto de soja (isoflavonas) son más resistentes a la temperatura que otras proteínas contenidas en plantas y animales. El extracto de soja puede formar hidrogeles de diferente densidad en agua o en disoluciones entrecruzantes (disoluciones acuosas de CaCl₂ o MgCl₂ 0.1 M, o dialdehído) [171].

Algunos derivados de la soja son estabilizadores de sistemas coloidales en alimentos [175], por lo que podrían ser empleados para producir espumas líquidas estables.

2.4.3.4 Las isoflavonas en la regeneración ósea

El estudio de las isoflavonas y su efecto en el metabolismo óseo es un tema de interés reciente. Son consideradas fitoestrógenos, es decir moléculas de estructura similar a los estrógenos. Los últimos estudios indican que las isoflavonas pueden prevenir o contrarrestar la osteoporosis o los síntomas del climaterio en mujeres. Otras propiedades médicas de las isoflavonas son: 1) prevenir el cáncer a través de detener la proliferación de células mutadas, 2) por la similitud con los estrógenos evitar la descalcificación ósea, y 3) por la capacidad de reducir el colesterol en el organismo pueden prevenir infartos [171,172,176-179].

Las isoflavonas contenidas en el extracto de soja son la genisteína, la genistina, la daidzeína y la daidzina (ver figura 2.17) [172]. Se ha comprobado que la genisteína y la daidzeína inhiben la actividad y la diferenciación osteoclástica y de las células macrófagas. Además, *in vitro* la genisteína ha mostrado inducir la diferenciación osteoblástica a través de incrementar la expresión de fosfatasa alcalina, promoviendo la formación de nódulos de mineralización [180].

Por otro lado, algunos trabajos han mostrado las ventajas de emplear proteínas vegetales como la soja en la fabricación de sustratos para IT [181,182], entre las que destacan, 1) mantener la alta solubilidad en agua, la buena adhesión a superficies y las propiedades superficiales brindadas por otras proteínas como la gelatina o el colágeno, 2) reducir la degradación térmica, lo que incrementa las opciones de procesado, y 3) reducir la degradación del material implantado, lo que garantiza un soporte temporal de mayor estabilidad.

Adicionalmente, el extracto de soja abre un nuevo campo en el desarrollo de materiales compuestos polímero/cerámica para la regeneración de hueso, ya que hasta el momento no existen estudios sobre este tipo de materiales.

2.5 Medicina regenerativa e ingeniería de tejidos

La medicina es una disciplina que ha explotado los desarrollos ideológicos y tecnológicos de la historia. Por ejemplo, con la aparición de la anestesia y la asepsia los médicos pudieron realizar intervenciones quirúrgicas más complicadas, haciendo posible reparar daños en lugar de amputar miembros dañados. Sin embargo, los problemas médicos a los que se enfrenta la humanidad son cada día más complejos. Actualmente la medicina busca nuevas alternativas para prolongar la vida activa de las personas, prueba de ello es que tan sólo en los Estados Unidos se realizan, cada año, 8 millones de cirugías para restaurar la pérdida de un órgano o el daño irreversible del mismo [183].

La medicina regenerativa surge de las necesidades clínicas actuales. Esta ciencia emplea los materiales y las tecnologías más avanzadas con el objetivo de restaurar, mejorar o mantener las funciones de los órganos y los tejidos dañados a causa de defectos congénitos, lesiones o enfermedades [11,184]. El fundamento básico de la medicina regenerativa es el hecho de que, bajo condiciones normales, los tejidos vivos son capaces de sanar por sí mismos, por tanto, trata de imitar y mejorar las condiciones *in vivo* para recuperar las funciones del órgano dañado. Las estrategias adoptadas por la medicina regenerativa son las siguientes [184]:

1. La sustitución de una parte del cuerpo por otra similar (injertos).
2. La reparación del cuerpo humano con materiales naturales o sintéticos.
3. El trasplante de órganos y tejidos procedentes de otros individuos o especies.
4. El empleo de un equipo biomédico externo que facilite o sustituya la función del tejido dañado.
5. El empleo de células vivas para mantener, recuperar o mejorar las funciones del órgano, lo cual se le conoce como ingeniería de tejidos (IT).

No obstante, existen algunas limitaciones para estas metodologías, por ejemplo, la disponibilidad de órganos a trasplantar, ya que existen menos de 3000 donantes anuales para aproximadamente 30000 pacientes que requieren de un trasplante de hígado. Además, la cantidad de donantes disminuye mientras que el número de pacientes se incrementa con el aumento de las enfermedades degenerativas [183].

Otra de las limitaciones es que los equipos biomédicos aún no son capaces de llevar a cabo todas las funciones de un órgano vivo, además, no pueden evitar la degradación progresiva del tejido, por lo que actualmente tan sólo representan una solución temporal del problema. Por el contrario, la IT se presenta como una solución eficiente a largo plazo, que elimina el empleo de equipos biomédicos y el trasplante de órganos [183]. La aportación de la IT hacia la medicina regenerativa se basa en producir de forma continua tejidos y órganos que puedan integrarse en el cuerpo humano, para tratar problemas como malformaciones genéticas, lesiones musculo/esqueléticas, enfermedades degenerativas (Alzheimer y Parkinson), diabetes, lesiones de corazón, fallos renales o hepáticos, entre otras.

De este modo, la IT se define como la obtención de órganos y/o tejidos vivos, a partir de procesos (ya sea dentro del cuerpo humano o en un bioreactor) que involucren células, señales bioquímicas y una matriz extracelular [5,184]. Cada uno de estos factores y sus interacciones representan un campo específico de investigación, que son abordados desde diferentes puntos

de vista, convirtiendo a la IT en una ciencia interdisciplinaria [11]. La regeneración de órganos y tejidos a través de la actividad celular se basa en los siguientes hechos [5,183]:

1. Los tejidos vivos están en constante remodelación por las células que los conforman.
2. Bajo las condiciones adecuadas las células aisladas *in vitro* tienden a reorganizarse para formar la estructura del tejido del cual fueron extraídas.

Dado al impacto social y económico que representa obtener órganos en el laboratorio, en el año 1999 la IT se denominó como la ciencia del siglo XX. En el 2000 la revista *Times* reconoció a la IT como uno de los 10 mejores empleos del futuro y en el 2001 investigadores del Instituto Tecnológico de Massachusetts (MIT) afirmaron que con la IT remplazar una válvula cardiaca sería tan fácil como cambiar una pieza del automóvil [185]. No obstante, la IT es un reto ingenieril, en el que deben ser construidos tejidos completamente diferenciados y vascularizados, que al mismo tiempo cumplan con los requisitos de eficacia, costo accesible, regulación legal y aceptación social [5,184]. Lograr todas estas exigencias a un coste rentable no es sencillo, lo que generó que en el año 2004 disminuyera el auge de la IT, y sólo algunas firmas comerciales permanecieron en el mercado con algunos productos en etapas de investigación clínica [11,185]. A pesar de estas dificultades, hoy en día existen éxitos importantes de la IT, tales como la piel artificial, el empleo de materiales acelulares de soporte, o el trasplante de células madre a órganos dañados como el corazón [5,184,186].

Las investigaciones actuales en IT se llevan a cabo principalmente por universidades e institutos de investigación, donde la metodología a seguir varía dependiendo del tejido a desarrollar. No obstante, se distinguen tres grandes modalidades:

1. *Sustitutos celulares o aislamiento celular*: En esta metodología se extraen células del paciente a tratar, o de un donante, para ser multiplicadas *in vitro*. Posteriormente, se separan las células capaces de reparar el daño y se implantan en el sitio de la lesión. Comúnmente estas células son implantadas por inyección empleando un hidrogel biocompatible como vehículo, resultando en una técnica de mínima invasión quirúrgica que reduce las complicaciones. La principal desventaja de este método es la posible pérdida de la función celular y el rechazo inmunológico de células extraídas de donantes [5,183].
2. *Sustancias inductoras de tejidos*: Esta técnica se basa en que las células responden a las señales bioquímicas de su entorno para formar su propia matriz, por lo que el éxito depende de la purificación a gran escala de moléculas capaces de estimular a las células que conforman al tejido para que ellas mismas reparen el daño [5,183].
3. *Matrices extracelulares sintéticas*: En este enfoque, materiales macroporosos tridimensionales son empleados como medio para el trasplante o estimulación celular, actuando como guía en la restauración del tejido [187]. Para cumplir el objetivo, la matriz ideal debe permitir la vascularización para suplir de nutrientes la estructura, puesto que las células localizadas a más de 150 μm de un vaso sanguíneo no sobreviven por falta de oxígeno [188]. Además, la matriz debe ser biodegradable para permitir el crecimiento del nuevo tejido y desaparecer una vez se haya regenerado.

Por último, es factible diseñar matrices capaces de liberar moléculas que estimulen la actividad celular [184,186].

Se distinguen dos variedades dentro de la IT con matrices extracelulares sintéticas, también llamadas materiales bioactivos y biodegradables:

- La fabricación de órganos y/o tejidos *in vitro* listos para ser trasplantados al cuerpo humano. Para ello se cultivan células sobre el material dentro de un bioreactor, el cual, proveerá de un microambiente fisicoquímico adecuado para la diferenciación celular y la conjunción del tejido tridimensional [5,189].
- La implantación directa de materiales acelulares que promuevan la colonización del implante por las células localizadas en la vecindad de la lesión a tratar. En este caso, para lograr la restauración del tejido, el material debe estimular la migración celular, la vascularización y el remodelado del implante, mientras que el cuerpo humano suministra las células y las condiciones necesarias [190,191].

Dentro de este contexto, el factor clave para el éxito de la IT es el diseño, o la adaptación, de biomateriales en los que las células puedan diferenciarse y producir nueva matriz extracelular [192,193].

2.5.1 Importancia de la porosidad en ingeniería de tejido óseo

Las células son sensibles a las características de su entorno inmediato, de forma que las propiedades del medio en que se desenvuelven influyen en el metabolismo celular y en el caso del tejido óseo al proceso osteogénico. El entorno celular natural brinda una variedad de estímulos químicos, topográficos y mecánicos que regulan el comportamiento celular, la interacción de las células con otras células y la interacción de las células con la matriz extracelular [194]. De forma similar, las interacciones celulares con un biomaterial están determinadas por factores químicos, topográficos y mecánicos. Por ejemplo, la arquitectura del material define las condiciones de suministro de nutrientes y la organización espacial de las células que se encuentran en el seno del mismo [116,187,195].

Es importante remarcar que la regeneración del tejido debe realizarse en tres dimensiones, por lo que los materiales que actúan como sustrato deben contener células al interior y no sólo superficialmente. Una forma de lograr este requisito es introduciendo poros en los biomateriales ya existentes. A los biomateriales que actúan de sustrato tridimensional durante el desarrollo de un tejido se les denomina andamios. La eficiencia de los andamios depende de la porosidad y del tamaño de poros en el material. La mayor área superficial disponible por la incorporación de porosidad favorece la adhesión y la proliferación celular, y la presencia de mayor cantidad de células dentro del andamio, lo que incrementa la rapidez de regeneración del tejido. Además, la porosidad favorece la difusión de nutrientes y desechos celulares, y permite la vascularización del andamio [116].

Se sabe que bajo condiciones *in vivo*, una mayor porosidad facilita la penetración de nuevo tejido óseo, mientras que bajas porosidades impiden la osteogénesis [116]. Sin embargo, una elevada porosidad no es suficiente para el éxito del andamio. Además, la porosidad debe ser interconectada. Sin conexiones la migración celular y la vascularización se detienen, aún en andamios altamente macroporosos [195].

El tamaño de poro debe ser al menos unas cuantas veces mayor al tamaño de las células para brindar espacio suficiente para la colonización. Además, el tamaño de poro también debe ser adecuado para permitir el crecimiento de vasos sanguíneos, puesto que son el sistema de suplemento de nutrientes para las células, sin vasos las células al interior del sustrato carecerían de oxígeno y otros factores, lo que causaría la muerte celular y por tanto el fracaso del implante [195].

No existe un tamaño o intervalo de tamaños de poro común para regenerar los diversos tejidos, sino que depende del tamaño de las células involucradas en el proceso específico de regeneración [196]. Además, el tamaño de poro también influye en la diferenciación celular y por tanto el tipo de tejido que forman las células dentro del andamio. En general se reportan las siguientes tendencias [193,195]:

- Poros menores a 40 μm favorecen el crecimiento de fibroblastos.
- Poros entre 40 y 100 μm estimulan el crecimiento de osteoide (matriz ósea).
- Poros entre 100 y 500 μm permiten la formación directa de hueso mineralizado.

De acuerdo a estos datos algunos trabajos proponen gradientes de porosidad para regular el crecimiento de múltiples tejidos dentro de un mismo andamio [197]. La diferencia entre formar osteoide o tejido mineralizado en función del tamaño de poro se atribuye a que en los poros pequeños predomina una condición de hipoxia (baja concentración de oxígeno) que favorece la formación osteocondral, mientras que en los poros de mayor tamaño la difusión, la permeabilidad y la vascularización son mayores lo cual favorece la osteogénesis de forma directa [116].

En general se considera que el contenido mínimo de porosidad que favorece el crecimiento óseo es cercano al 60 %, mientras que el mínimo de tamaño de poro donde se ha formado hueso nuevo se sitúa entre 90 y 100 μm . No obstante, se recomienda que el tamaño de poro sea mayor a 300 μm para estimular simultáneamente el crecimiento de hueso y la formación de vasos sanguíneos [116,193,195,198].

2.5.2 Porosidad, permeabilidad y tortuosidad

Porosidad: Como se mencionó, la porosidad es un factor clave para permitir la penetración celular y el crecimiento de hueso nuevo [116]. La porosidad de un material se define como la fracción o el porcentaje de espacios vacíos respecto al volumen total del mismo [196,199]. Los poros en un material se caracterizan por parámetros como:

- La geometría del poro: esféricos, cilíndricos, planos, etc.
- El tamaño del poro: microporoso, mesoporoso o macroporoso, etc.
- La continuidad o nivel de conexión entre poros: porosidad abierta o porosidad cerrada.
- La geometría de las conexiones: fisuras, conductos, cuellos de botella, etc.

El valor absoluto de porosidad permite clasificar a los materiales. Por ejemplo, en geología se denominan rocas poco porosas a aquellas con porosidades menores al 5 % (como el mármol o el granito), las rocas con porosidades entre 5 y 20 % se denominan de porosidad intermedia (las calizas o las dolomitas) y las rocas con porosidades mayores al 20 % se denominan muy porosas (rocas calcaneas) [199].

Los poros pueden ser considerados como nodos en los que convergen varios conductos, lo que se refleja en la capacidad de retener o almacenar un fluido (líquido o gas) en el interior del material [199]. Los conductos o canales controlan la dinámica de transporte de fluidos en la estructura. Durante la regeneración de tejidos los transportes involucrados son la colonización celular, la penetración de oxígeno y nutrientes celulares, la secreción de desechos metabólicos, y el transporte de proteínas producidas por las células. Estos fenómenos dependen del tamaño, la geometría, la orientación, la conectividad, y las propiedades superficiales de los poros y conductos [196,198]. En el caso que existan poros, pero no haya conductos que los comuniquen entre sí y/o con el exterior, esta porosidad no contribuirá a la permeabilidad o al transporte de fluidos, pero sí afectará el comportamiento mecánico del material. Por tanto, se puede definir la porosidad abierta o conectada como el volumen de poros que presentan un cierto nivel de interconexiones, de forma que un fluido pueda ser transportado a través de ellos. A diferencia, la porosidad cerrada o no comunicada corresponde al volumen de poros del material que no presenta ningún tipo de comunicación con los poros vecinos [199].

Desde un punto de vista estructural, el transporte de fluidos en el interior del material poroso interconectado depende del tamaño de poro, la tortuosidad y la permeabilidad.

Los materiales no suelen tener un único tamaño de poro, sino que presentan una distribución de tamaños (en volumen o en porcentaje) denominada espectro de porosidad. Existen diversas clasificaciones que agrupan a los materiales de acuerdo al tamaño de poro. El origen de dichas clasificaciones es el límite específico de la técnica de análisis o las propiedades fisicoquímicas del material [199].

En mineralogía se distingue entre materiales [199]:

- Megaporosos: radio mayor a 4 mm.
- Mesoporosos: radio entre 4 mm y 60 μm .
- Microporosos: radio menor a 60 μm .

La clasificación de la IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry) empleada en estudios de adsorción y catálisis química establece los siguientes límites [31,199]:

- Macroporosos: radio mayor a 50 nm.
- Mesoporosos: radio entre 50 nm y 2 nm.
- Microporosos: radio menor a 2 nm.

Basándose en los límites establecidos por la observación de sistemas porosos mediante microscopía óptica se establece la siguiente clasificación [199]:

- Macroporoso: radio mayor a 2.5 μm .
- Microporoso: radio menor 2.5 μm .

Otra clasificación basada en los datos obtenidos por porosimetría de intrusión de mercurio (MIP) establece el límite entre macroporoso y microporoso en 7.5 μm [199].

En el presente trabajo se clasifica la porosidad abierta de acuerdo a la microestructura de los CPC [65] y a los resultados de MIP. En el primer caso, debido a las características morfológicas de la porosidad intrínseca de los cementos, esta será considerada como nano/microporosidad, en tanto que los poros introducidos por el proceso de espumado serán considerados como macroporosidad. En el segundo caso, y debido a que en la distribución de la porosidad existe una clara diferencia entre la nano/microporosidad y la macroporosidad introducida (ver capítulos 3 y 5), se tomara como nano/microporosidad a los poros unidos por conexiones menores a 5 μm , mientras que los que presenten conexiones mayores serán considerados como macroporosidad.

La geometría y el tipo de poro pueden llegar a ser complejos. La clasificación más simple considera cuatro elementos [199]:

- Tipo básico de porosidad (abierta o cerrada).
- Origen de la porosidad:
 - Natural o intrínseca
 - De fábrica: por ejemplo procesos de espumado.
 - Posterior a la fabricación: por ejemplo fracturas.
- Tamaño y forma del poro (esféricos, cilíndricos, planos, etc.).
- Abundancia (distribución de la porosidad).

Permeabilidad: Los términos porosidad y permeabilidad representan características diferentes. Por un lado, la porosidad indica la cantidad de espacio vacío en la estructura, y por otro lado, la permeabilidad es una medida de la facilidad con la cual un fluido puede fluir a través de la porosidad. Existe gran variedad de relaciones empíricas entre la porosidad y la permeabilidad, que emplean modelos capilares para representar la estructura porosa. Por ejemplo, según el modelo de capilaridad simple (ecuación 2.2) que considera capilares rectos en paralelo [196].

$$k = \frac{\Pi^3}{\tau^2 S^2} \quad \text{EQ 2.2}$$

Donde: k es la constante de permeabilidad; Π es la porosidad; τ es la tortuosidad; y S es la superficie específica del material.

Tortuosidad: La tortuosidad es un parámetro que refleja la arquitectura interna del material poroso. Contempla el camino sinuoso y zigzagueante que sigue el fluido a través de los poros para cruzar de un extremo a otro de la pieza (L_{real}), normalizado por la longitud lineal entre un extremo y otro ($L_{aparente}$) [196] (ver figura 2.18 y ecuación 2.3).

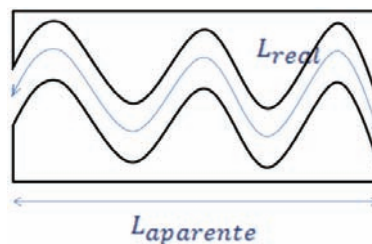


Figura 2.18: Esquema que representa la longitud real que debe recorrer un fluido para cruzar un material poroso de cierta longitud lineal externa.

$$\tau = \frac{L_{real}}{L_{aparente}} \quad \text{EQ 2.3}$$

En estructuras porosas altamente interconectadas el incremento de la porosidad se refleja en un aumento de la permeabilidad. La permeabilidad también afecta la interacción fluido/material, que a su vez influye en la respuesta viscoelástica del material. La porosidad y la permeabilidad están también relacionadas con las propiedades fisicoquímicas y mecánicas del material, llegando a incrementar la rapidez de degradación *in vivo* [196].

2.5.3 Compuestos orgánico/inorgánico para ingeniería de tejido óseo

La incorporación de macroporosidad en las cerámicas de fosfato de calcio incrementa la reabsorción, pero también disminuye la resistencia mecánica de la estructura [59]. Una opción para incrementar en mayor medida la reabsorción y mejorar la resistencia mecánica es la incorporación de polímeros para formar materiales compuestos (también denominados materiales híbridos). Estos materiales combinan la bioactividad de las cerámicas con la degradabilidad de los polímeros y forman estructuras biomecánicamente más similares al tejido óseo. Además, la incorporación de los polímeros compensa la fragilidad de las cerámicas y en algunos casos incrementa la moldeabilidad de cerámicas como los cementos de fosfatos de calcio (CPC) [187,200]. Existen dos posibilidades en este enfoque, la incorporación de cerámicas al polímero (compuestos en base polímero) o la adición de polímeros a las cerámicas (compuestos en base cerámicas).

Por otro lado, debido a que el tejido óseo es una estructura natural compuesta por colágeno e HA, los materiales orgánico/inorgánico son una aproximación razonable para imitarla [187,201]. Los polímeros empleados pueden ser desde materiales sintéticos diseñados específicamente para la regeneración de hueso, hasta polímeros en base a proteínas como el colágeno o la gelatina, los cuales se emplean con la finalidad de imitar la estructura normal del tejido óseo. También pueden usarse polímeros de origen natural como la quitina, el quitosano, el alginato, el ácido hialurónico, o la celulosa [11,187,200,202].

2.6 Técnicas de estudio de sistemas porosos

La caracterización de la porosidad es un punto importante durante el desarrollo de materiales para medicina regenerativa e IT. Existen técnicas directas e indirectas para caracterizar los sistemas porosos.

Técnicas directas: Las metodologías directas son aquellas que permiten observar los poros. Son básicamente técnicas de microscopía.

- a) La microscopía óptica permite analizar el sistema poroso en una sección bidimensional. El empleo de resinas de color o fluorescentes permite mejorar la observación de los espacios vacíos. El uso de técnicas de análisis digital de imágenes permite una cuantificación más exacta de forma, tamaño y distribución de los poros. La desventaja de este método es la resolución, que impide cuantificar poros menores a 2.5 μm [199].

- b) La microscopía electrónica de barrido (MEB) es una de las técnicas de mayor resolución para el estudio de sistemas porosos, especialmente para aquellos con un elevado contenido de microporosidad. Esta metodología permite obtener información tridimensional de la forma, el tamaño y la distribución, realizando una extrapolación de los resultados en dos dimensiones mediante el análisis digital de la imagen [116,196,199].

El análisis digital se basa en que una imagen digitalizada en píxeles permite discriminar entre los píxeles correspondientes a los poros y los correspondientes al material, generando una imagen binaria (blanco/negro). Mediante el análisis planimétrico, por medio de una computadora, se cuantifica el área de cada poro (cantidad de píxeles) y se puede deducir el factor de forma del mismo, para finalmente obtener distribuciones de frecuencia para cada forma y tamaño. El factor limitante de esta técnica es el elevado número de medidas que se deben realizar para obtener resultados estadísticamente significativos. Se suelen medir entre 10 a 100 poros por muestra [116,199].

Técnicas indirectas: Estas técnicas permiten el análisis de sistemas porosos mediante la interacción fisicoquímica de un fluido o una radiación con el material. En este caso, para extraer la información de los datos obtenidos es necesario aplicar modelos que explican el tipo de interacción llevada a cabo durante el ensayo.

- a) Métodos de succión: El agua es retenida en los materiales porosos por fenómenos de adsorción y tensión superficial. La succión representa la presión negativa por la cual el agua es atrapada en las paredes de un poro de dimensiones determinadas (ver ecuación 2.4, válida para sistemas no saturados) [199].

$$\Psi = - \frac{P}{\rho \cdot g} \quad \text{EQ 2.4}$$

Donde: Ψ es la succión, P es la presión de retención (se considera negativa porque generalmente actúa en dirección contraria a la gravedad); ρ es la densidad del agua; y g es la aceleración de la gravedad.

Si la presión atmosférica disminuye hasta alcanzar el valor P , entonces el agua retenida tiende a salir del material. Los poros más grandes se vacían con valores bajos de succión, mientras que los más estrechos se vacían con succiones más altas. Por tanto, cuantificar la presión de succión permite determinar el tamaño de poro del material.

- b) Adsorción de nitrógeno (BET): La adsorción de nitrógeno es típicamente usada para determinar la superficie específica de un material. Sin embargo, aplicando los modelos adecuados puede describir también la distribución de poros. La cantidad de gas o vapor adsorbido por un sólido poroso en función de la presión, a temperatura constante, es denominada isoterma de adsorción. Existen dos métodos para obtener una isoterma de adsorción por gravimetría y por volumetría. El primero consiste en evaluar la masa del fluido adsorbido por medio de una balanza electromagnética. El segundo determina la adsorción del gas a través de diferencias de presión. Aplicar el modelo BET (Brunnauer–Emmet–Teller) a este resultado permite, entre otras cosas, determinar el volumen de poros en el intervalo entre 2 nm y 50 nm, correspondiente a

los materiales mesoporosos (según la clasificación de la IUPAC). Cabe mencionar que el límite superior de detección del BET (0.05 μm) se superpone al límite inferior de la técnica MIP, por lo que son técnicas complementarias en el estudio de sistemas porosos. Finalmente, el límite inferior del BET se relaciona con el tamaño mínimo de poro necesario para poder adsorber una monocapa de nitrógeno. La ecuación de Kelvin (ecuación 2.5) que relaciona el volumen de gas adsorbido con el radio de poro es el fundamento del modelo BET [199,203].

$$RT \ln \frac{P}{P_0} = \frac{2V\gamma \cos\varphi}{r} \quad \text{EQ 2.5}$$

Donde: R es la constante de los gases; T es la temperatura absoluta; φ es el ángulo de contacto; γ es la tensión superficial (sólido/fluido); V es el volumen de gas adsorbido; P/P_0 es la variación de presión; y r es el radio del poro.

- c) Picnometría de mercurio o inmersión en mercurio: Este método consiste en determinar el volumen aparente del material poroso, también nombrado volumen envolvente o de cuerpo (volumen del material más el volumen de los poros) por inmersión en mercurio. El mercurio es un líquido que no moja y por ello no penetra en los poros del material. Por tanto, de acuerdo con el principio de Arquímedes, el desplazamiento de volumen de mercurio al sumergir la pieza es equivalente al volumen de la pieza [196,199]. Además, si se conoce el peso del material se puede determinar su densidad aparente. Y por tanto se puede calcular el porcentaje de porosidad total aplicando la ecuación 2.6. Cabe mencionar que bajo este método, la porosidad total corresponde a la suma de la porosidad abierta y cerrada del material. Finalmente, la inmersión en mercurio no proporciona información sobre el tamaño de los poros.

$$\Pi = \left(1 - \frac{V_{\text{esquelético}}}{V_{\text{aparente}}} \right) \times 100 \quad \text{EQ 2.6}$$

Donde: V_{aparente} es el volumen aparente de la muestra y $V_{\text{esquelético}}$ es el volumen esquelético (volumen del material sin considerar el volumen de los poros) determinado por métodos como la picnometría de helio.

- d) Saturación de agua en vacío: Este método es uno de los más simples que permite determinar la porosidad abierta de una muestra (Π_A), pero no da información del tamaño ni la distribución de poros [116,199]. La ecuación 2.7 describe el cálculo de la porosidad.

$$\Pi_A = \frac{M_S - M_H}{M_S - M_0} \quad \text{EQ 2.7}$$

Donde: M_0 es la masa de la muestra en seco; M_S es la masa de la muestra saturada de agua; y M_H es la masa hidrostática de la muestra (masa de la muestra sumergida en el líquido).

- e) Porosimetría de intrusión de mercurio (MIP): Esta técnica arroja información sobre la porosidad abierta y la distribución de tamaños de poro. Debido a que es una de las más usadas en este trabajo, más adelante se explicará el fundamento básico, las ventajas y las limitaciones de este método.
- f) Microtomografía computerizada: La microtomografía computerizada (μ -CT) es otro método para determinar la porosidad, la forma de la porosidad y la distribución de tamaño de poro de los materiales. El método consiste en adquirir datos de una sección del material y crear con ellos una imagen en dos dimensiones. Al superponer, con el uso de una computadora, varias imágenes bidimensionales tomadas a diferentes secciones se puede compilar una imagen tridimensional con la información morfológica del material [116]. Esta técnica tiene ventaja de no ser destructiva. Sin embargo, las desventajas son la baja resolución de adquisición de los datos (entre 4 y 14 μm en función del equipo empleado) y la pérdida de resolución durante la compilación de la imagen en 3D. Además, los archivos de gran resolución suelen ser muy grandes, lo cual dificulta el procesado. Para minimizar esta última desventaja se toman segmentos del material en vez del volumen completo [198,204].

Cabe mencionar que generalmente es necesario emplear de forma combinada las diferentes técnicas de análisis para estudiar y caracterizar adecuadamente un material poroso, ya que la mayoría de ellas son complementarias y ninguna es universal.

2.6.1 Porosimetría de intrusión de mercurio (MIP)

Esta técnica mide la porosidad abierta y la distribución de la porosidad en función del tamaño de entrada de poro. El principio físico se basa en que el mercurio líquido no moja a la gran mayoría de los materiales, en otras palabras, presenta un ángulo de contacto mayor a 90° . Pero si el mercurio en contacto con un material poroso es sometido a presión este será forzado a introducirse en los espacios vacíos. Mientras mayor sea la presión aplicada el mercurio entrara en los poros de menor tamaño de acuerdo a la ecuación de Washburn (ecuación 2.8) [116,196,199,203,205,206].

$$P = 2 \gamma \cos \frac{\varphi}{r_E} \quad \text{EQ 2.8}$$

Donde: P es la presión aplicada; γ es la tensión superficial del mercurio; φ es el ángulo de contacto; y r_E es el radio de la conexión del poro (radio de entrada).

Durante el ensayo, el material poroso es colocado en un portamuestras hermético y el mercurio es introducido en el material incrementando paulatinamente la presión. El cambio de presión (ΔP) es la variable de control del ensayo y el incremento puede o no ser constante durante el barrido. La porosidad abierta accesible al mercurio (Π_A) para cada valor de presión (P) viene dada por la ecuación 2.9.

$$\Pi_A = \frac{V_{\text{introducido}}(P)}{V_{\text{aparente}}} \quad \text{EQ 2.9}$$

Donde: $V_{\text{introducido}}(P)$ es el volumen de mercurio introducido a la presión P ; y V_{aparente} es el volumen aparente de la muestra determinado también durante el ensayo a una presión relativa negativa ($0.035 \text{ atm} = 3.5 \text{ KPa}$). Este valor es equivalente al valor de V_{aparente} obtenido mediante picnometría de mercurio.

Por tanto, el valor de la porosidad abierta es función de la presión aplicada, o bien, del radio de entrada del poro.

Un factor limitante de este método es la aproximación de Washburn, porque supone que todos los poros de la muestra son cilindros, lo cual no es verdad para la mayoría de los sistemas porosos. Sin embargo, para fines prácticos la ecuación 2.8 es ampliamente aceptada [199,203,205].

Los límites superior e inferior de detección de la porosimetría son respectivamente $360 \mu\text{m}$ (fijado por el ángulo de contacto del mercurio) y de 0.001 a $0.006 \mu\text{m}$ (fijado por la presión que puede llegar a ser aplicada por los equipos disponibles).

En esta técnica debe considerarse que la porosidad total de un material (Π_{Total}) es la suma de la porosidad abierta detectada por MIP ($\Pi_{\text{Abierta}}^{\text{MIP}}$), más la porosidad abierta no detectada por MIP por tener tamaños fuera del intervalo de detección ($\Pi_{\text{Abierta}}^{\text{No detectada}}$), más la porosidad cerrada no accesible al mercurio (Π_{Cerrada}) (ecuación 2.10). Por esta razón los valores de porosidad total obtenidos por MIP son sistemáticamente menores a los obtenidos por saturación de agua en vacío o por picnometría de mercurio (aproximadamente 10 a 15 % menores) [199,205].

$$\Pi_{\text{Total}} = \Pi_{\text{Abierta}}^{\text{MIP}} + \Pi_{\text{Abierta}}^{\text{No detectada}} + \Pi_{\text{Cerrada}} \quad \text{EQ 2.10}$$

Un porosímetro de intrusión de mercurio es un equipo que permite los siguientes procesos para realizar el ensayo [199,203,206]:

1. Puede realizar vacío para eliminar del material cualquier fluido que pudiera interferir en la penetración del mercurio.
2. Cuenta con un sistema controlado para ejercer presión sobre el mercurio de tal forma que éste penetre en el material.
3. Está provisto de un sistema para medir el volumen de mercurio introducido a cada valor de presión aplicado.

Dependiendo del equipo empleado las presiones aplicadas durante la MIP varían desde 3.5 KPa (0.035 atm) hasta 410000 KPa (4083 atm). Por lo que hay que tener en cuenta que algunos materiales a alta presión pueden comprimirse o bien colapsarse. En el primer caso, para analizar los resultados se deben aplicar criterios de corrección de la compresión, mientras que en el segundo caso los materiales deben ser estudiados únicamente a baja presión [116].

Actualmente el porosímetro de mercurio es un equipo automatizado. El resultado básico del ensayo es una tabla con la presión aplicada y el volumen de mercurio introducido a cada presión, de los cuales se pueden obtener las características del sistema poroso. Por ejemplo, la porosidad abierta total ($\Pi_{\text{Abierta}}^{\text{MIP}}$) puede calcularse mediante la ecuación 2.9 sustituyendo el

volumen máximo de mercurio introducido. Por otro lado, el volumen aparente de la muestra ($V_{aparente}$ en la ecuación 2.9) también se puede determinar durante el ensayo de MIP justo después de llenar con mercurio el portamuestras y antes de aplicar presión para forzar la penetración del mercurio. La diferencia entre el volumen de mercurio necesario para llenar el portamuestras vacío y el volumen requerido para cubrir la muestra, corresponde al volumen envolvente de la muestra, valor medido generalmente a una presión de 3.5 KPa (0.035 atm) [196,203,206].

Debido a que la porosidad determinada por MIP es un valor acumulativo, la cantidad de porosidad abierta para un intervalo de tamaño de poro, o de presión, puede calcularse también mediante la ecuación 2.9, sustituyendo el volumen de mercurio introducido en el intervalo de tamaño deseado. Si el intervalo deseado es intermedio basta con restar la porosidad acumulada por arriba y por debajo del intervalo de tamaño requerido.

La curva de volumen de mercurio acumulado en función del tamaño de entrada de poro contiene información sobre la arquitectura de los poros y las conexiones, siempre que se cuente con la curva de intrusión y extrusión de mercurio (al disminuirse la presión el mercurio introducido tiende a salir de los poros, no obstante, ambos procesos muestran un ciclo de histéresis). La figura 2.19 resume los diferentes tipos de porosidad determinados a partir de los ciclos de histéresis [203,205].

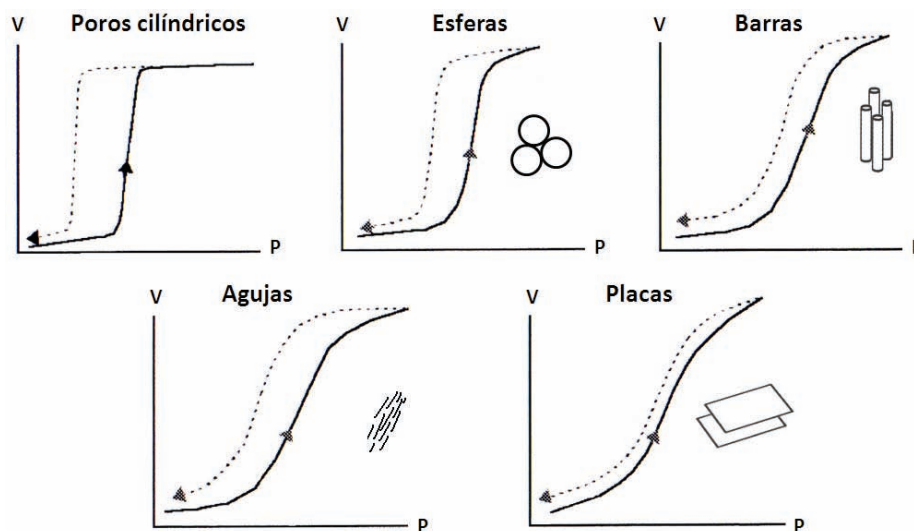


Figura 2.19: Ciclos de histéresis característicos para poros cilíndricos y poros formados por diferentes tipos de agregados. Modificado de [203].

La derivada de la curva de volumen de mercurio introducido con respecto al diámetro de entrada de poro proporciona información acerca de la distribución de la porosidad. La derivada puede tomarse con respecto al diámetro de entrada (ecuación 2.11) o con respecto al logaritmo del diámetro de entrada (ecuación 2.12), ver figura 2.20 [203,206].

$$\frac{\Delta V}{\Delta D} = \frac{V_{i+1} - V_i}{D_{i+1} - D_i} \quad \text{EQ 2.11}$$

$$\frac{\Delta V}{\Delta \log D} = \frac{V_{i+1} - V_i}{\log D_{i+1} - \log D_i} \quad \text{EQ 2.12}$$

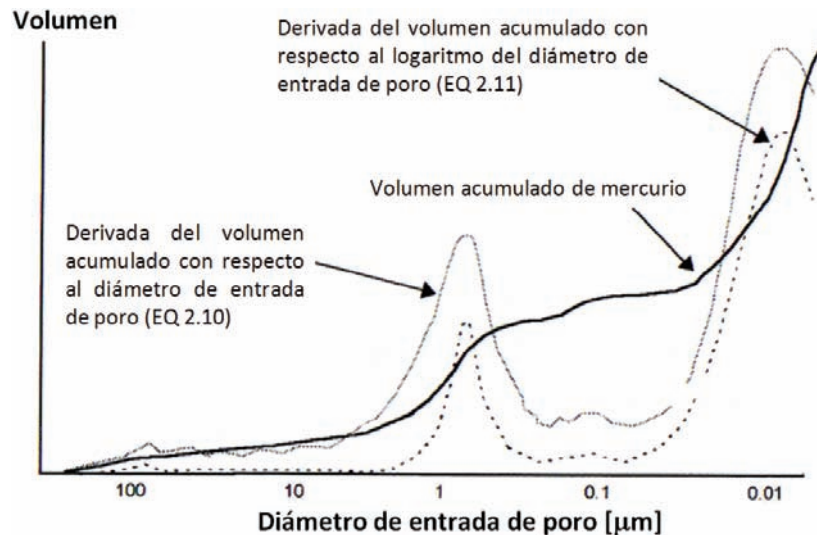


Figura 2.20: Representación gráfica de las curvas de volumen de mercurio introducido y sus primeras derivadas, en función del diámetro de entrada de poro en escala logarítmica [203].

Otros parámetros que se pueden obtener de los resultados de porosimetría, empleando los modelos fenomenológicos correspondientes, son el área acumulada de la porosidad, la permeabilidad y la constante de permeabilidad, la tortuosidad y la dimensión fractal [203,205,206].

Algunas de las consideraciones que se deben de tener en cuenta para emplear esta técnica y para analizar los resultados son [199,203,205]:

1. El modelo de Washburn se basa en poros conectados mediante canales cilíndricos.
2. El ángulo de contacto del mercurio puede variar entre diferentes materiales, generalmente entre 130 y 140° .
3. El ángulo de contacto del mercurio también varía en función de la presión aplicada y de la temperatura.
4. La porosidad cerrada no es cuantificada.
5. Los equipos no son capaces de introducir el mercurio en los poros menores a 0.001 o $0.006 \mu\text{m}$ (dependiendo del equipo empleado).
6. La presión mínima con la que puede operar el equipo limita el tamaño máximo de poro que se puede detectar ($360 \mu\text{m}$).
7. La técnica no determina realmente el tamaño de los poros, sino el tamaño o diámetro de las conexiones entre poros (tamaño de entrada de poro).
8. Los poros accesibles sólo a través de otros poros de menor tamaño, no son detectados hasta que los poros pequeños son llenados (ver figura 2.21).
9. La aplicación de presiones elevadas puede deformar materiales blandos o colapsar materiales pocos resistentes. Sin embargo, puesto que el mercurio es un fluido incompresible una vez llena la muestra con mercurio esta puede ser capaz de soportar la presión.

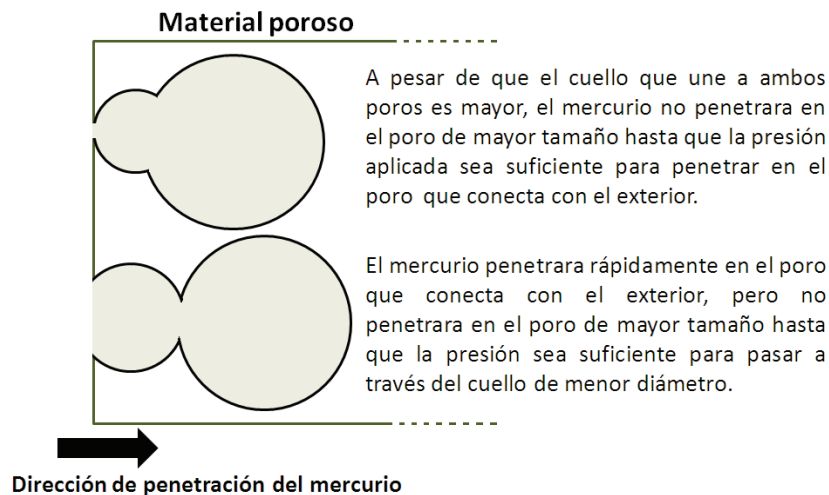


Figura 2.21: Poros grandes accesibles al mercurio únicamente después de llenar los poros pequeños.

Por último, se requiere que las muestras empleadas en MIP estén libres de agua, ya que puede llenar los espacios vacíos e impedir la penetración del mercurio. Las muestras pueden ser deshidratadas al aire, dentro de una estufa, por congelación/sublimación, o mediante técnicas de punto crítico. Si las muestras son sensibles al calor es preferible emplear el método de congelación/sublimación, especialmente cuando se tienen altos contenidos de humedad [203,205].

2.7 Espumas, agentes tensoactivos y teoría de surfactantes

2.7.1 Definición de espuma

Antes de entrar al mundo de las espumas es importante definir el estado coloidal, en el cual un grupo de partículas, gotas o burbujas de una primera fase, con un tamaño entre 1 y 1000 nm, se encuentran dispersas en una segunda fase. A la fase dispersa se le denomina fase interna, mientras que a la fase continua se le denomina fase externa. Los sistemas coloidales simples, compuestos solo por dos fases, se presentan en la tabla 2.4 [207].

Tabla 2.4: Dispersiones coloidales simples [207].

Nombre	Fase dispersa	Medio de dispersión
Aerosol líquido	Líquido	Gas
Aerosol sólido	Sólido	Gas
Espuma	Gas	Líquido
Emulsión	Líquido	Líquido
Suspensión	Sólido	Líquido
Espuma sólida	Gas	Sólido
Emulsión sólida	Líquido	Sólido
Suspensión sólida	Sólido	Sólido

Bajo esta definición una espuma es una dispersión coloidal en la que un gas en forma de burbujas está disperso en un líquido o un sólido continuo. En las espumas líquidas las burbujas tienden a una geometría poliédrica, sin embargo, al referirse al tamaño de las mismas se hace referencia al diámetro de la burbuja como si fuera esférica. Las burbujas en una espuma líquida superan las dimensiones límite de la fase dispersa señaladas anteriormente. Por lo general las burbujas en una espuma son mayores a $10\ \mu\text{m}$ y pueden llegar a ser mayores a $1000\ \mu\text{m}$ [207].

2.7.2 Estabilidad de una espuma

Los sistemas coloidales no son sistemas termodinámicamente estables [207]. Durante la vida de una espuma líquida se distinguen tres etapas que son [208]: 1) la formación, que puede producirse por la desequilibrio de un gas disuelto en el líquido, o por un efecto mecánico externo que introduzca burbujas en el líquido; 2) la maduración de la espuma a través de la actuación conjunta de los mecanismos de destrucción de sistemas coloidales (sedimentación, agregación y coalescencia); y 3) el colapso de la espuma causado por el fin de la maduración.

Algunos de los principales métodos industriales de espumado de líquidos son [207]:

- El burbujeo de un gas dentro de un líquido.
- Dirigir un flujo líquido hacia un líquido estable para que la turbulencia genere burbujas de aire en el interior de ambos líquidos.
- Reducir la presión o incrementar la temperatura de una disolución líquida de gas, generando la rápida nucleación y crecimiento de burbujas dentro de la solución.
- Agitar turbulentamente un líquido para propiciar la incorporación de aire, con la ayuda de una pala, una propela, un ciclón, un mezclador, etc.
- La inyección conjunta de un líquido y un gas dentro de un dispositivo que a través de patrones de flujo genere la incorporación del gas en el líquido en forma de burbujas dispersas.

Inmediatamente después de que se forma una espuma, el líquido drena impulsado por la fuerza de gravedad a través de la fase continua. El drenaje genera espesores de la fase continua cada vez más finos y finalmente cuando dos o más burbujas se tocan la coalescencia es tan inmediata que no se aprecia a simple vista. Además, el drenaje genera el movimiento de la espuma que provoca que las burbujas se segreguen del líquido concentrándose en la superficie de acuerdo con la ley de Stokes [207,209].

La estabilidad de la espuma no necesariamente depende del tamaño de las burbujas contenidas en ella, pero sí existe un tamaño óptimo de burbuja para cada espuma. Además, las espumas no poseen un tamaño único de burbuja, sino que poseen una distribución de tamaños, de acuerdo a las características de cada una de ellas [207].

Por otro lado, cuando existe una distribución de tamaños de burbuja en la espuma líquida, se origina un gradiente de presión entre las burbujas de diferentes tamaños, lo que genera que las burbujas más grandes crezcan a expensas de la desaparición de las más pequeñas. Este mecanismo de coalescencia denominado maduración de Ostwald actúa en paralelo al drenado de líquido [207].

Se sabe que en general los líquidos puros no forman espumas estables. En la mayoría de los casos espumas líquidas “estables” pueden obtenerse con la incorporación de surfactantes en la disolución. Los surfactantes se adsorben en la interfaz líquido/gas reduciendo la energía interfacial y por tanto facilitan la creación y el mantenimiento de áreas superficiales extensas, asociadas con la dispersión de burbujas en el líquido [207].

Además, la incorporación del surfactante también puede incrementar la viscosidad de la película líquida, lo que evita el drenado e incrementa la estabilidad de la espuma [207].

2.7.3 Caracterización de una espuma

La caracterización básica de una espuma incluye determinar la espumabilidad del líquido y la estabilidad de la espuma formada. Una caracterización más profunda puede incluir determinar la forma de la espuma a través del tamaño y la forma de las burbujas contenidas, medir los espesores de las paredes que forman la fase continua (ya sea líquida o sólida) y/o determinar la presencia de terceras fases en la fase continua de la espuma, tales como aceites o partículas sólidas [207].

Existen varios métodos para determinar la espumabilidad de un líquido [207,210,211]. Todos ellos se basan en cuantificar el incremento de volumen del líquido al ser espumado. La cuantificación puede realizarse por el método dinámico, que consiste en medir el volumen alcanzado por la espuma durante el espumado bajo condiciones estables (por ejemplo durante el insuflado de aire dentro del líquido a una velocidad constante), o por el método estático, que consiste en medir el volumen de la espuma recién producida por cualquier método de espumado.

Para determinar experimentalmente la estabilidad de las espumas líquidas existen dos métodos generales [207,211]:

- Medir la vida de una sola burbuja.
- Medir la cinética de colapso de una espuma recién obtenida mediante cualquier método de espumado.

2.7.4 Surfactantes y micelas

Los surfactantes son moléculas en forma de cadena que contienen una zona con afinidad por medios no polares (hidrófoba) y una zona que tiene afinidad por medios polares (hidrófila). Este carácter anfifílico les brinda la propiedad de que en disolución las moléculas surfactantes se sitúan preferentemente en la superficie del líquido, de tal forma que cada extremo de la cadena se orienta hacia el lugar de mayor afinidad [209].

Las moléculas surfactantes pueden tener pesos moleculares de pocos cientos hasta varios miles de g/mol. Los surfactantes se clasifican de acuerdo a la naturaleza de su parte hidrófila y pueden ser aniónicos, catiónicos o no iónicos. En particular los surfactantes no iónicos tienen la ventaja de mantener sus propiedades constantes en disoluciones salinas a diferentes pH, pero su eficiencia espumante no es tan alta como la de los surfactantes iónicos. Probablemente los surfactantes iónicos son mejores espumantes porque su extremo iónico incrementa la estabilidad de la espuma, a través de repulsiones electrostáticas entre los dos extremos de la película que conforma la pared de cada burbuja. También se sabe de forma

general que la espumabilidad se incrementa con el incremento de tamaño de la zona hidrófoba de la molécula y que disminuye cuando ésta es más ramificada [207,209].

Existen tres aspectos clave en el estudio de surfactantes: 1) la solubilidad, 2) la adsorción del surfactante en una superficie y 3) la formación de micelas en el seno de la disolución.

Algunas sustancias químicas producen espumas, pero no son consideradas surfactantes. La característica básica de un surfactante es que su concentración en disolución es mayor en la superficie que en el seno del líquido. Este fenómeno se denomina adsorción y ocurre en las interfases líquido/líquido, líquido/aire y líquido/sólido. La adsorción del surfactante en la superficie depende de la concentración y se representa en la figura 2.22 [209]. En la figura la molécula de surfactante se representa como una cadena hidrófoba con un pequeño círculo hidrófilo.

A bajas concentraciones (fig. 2.22 a y b) no hay orientaciones preferenciales de las moléculas surfactantes en la superficie y permanecen en una posición horizontal. Conforme la concentración se incrementa (fig. 2.22c) el número de moléculas surfactantes en la superficie también se incrementa y no hay más espacio para que permanezcan en posición horizontal, por lo cual comienzan a orientarse de acuerdo al carácter de sus extremos. Por otro lado, al alcanzarse la concentración ilustrada en la figura 2.22d, el número de moléculas disponibles es tal que forman una monocapa en la superficie del líquido. Esta concentración se conoce como concentración micelar crítica (CMC). Por encima de la CMC (fig. 2.22e) no hay un cambio notable en la adsorción de moléculas sobre las superficies hidrófobas, mientras que en superficies hidrófilas puede formarse más de una capa de surfactante en la superficie. Además, cuanto mayor es la concentración de la disolución, con respecto a la CMC, las moléculas en solución pueden formar en el seno del líquido estructuras organizadas llamadas micelas, las cuales pueden llegar a contener entre 20 a 100 moléculas/micela [209].

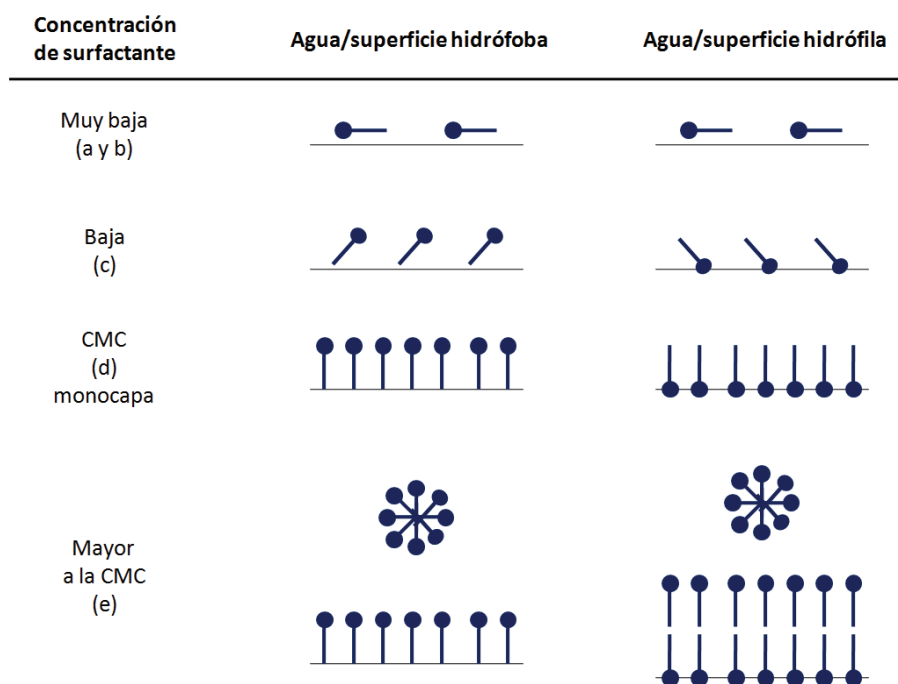


Figura 2.22: Adsorción de surfactante en superficies hidrófobas e hidrófilas en función de la concentración [209].

Se ha observado que durante el drenaje de líquido en las espumas, las burbujas no se tocan y por tanto no hay cambios en área interfacial ni en la distribución del surfactante. Por el contrario, durante la coalescencia la película de líquido se rompe de tal forma que las burbujas se unen para formar una sola burbuja de mayor tamaño, y por tanto se produce un cambio en el área superficial de la espuma, causando la redistribución del surfactante [207].

Por otro lado, la descripción termodinámica del proceso de formación de micelas en disoluciones acuosas se explica por el efecto hidrófobo, que permite la asociación de las zonas hidrófobas de las moléculas surfactantes [209]. La CMC depende del tipo de surfactante, el disolvente empleado, la temperatura, la presión y el uso de diversos aditivos. A modo de ejemplo en la tabla 2.5 se detalla el intervalo típico de CMC para los surfactantes aniónicos y no iónicos.

Tabla 2.5: Valores típicos de CMC para diferentes tipos de surfactantes a 25 °C [207].

Tipo de surfactante	CMC [M]
No iónico	$10^{-5} - 10^{-4}$
Aniónico	$10^{-3} - 10^{-2}$

Los valores exactos de CMC son importantes debido a que por encima de esta concentración las propiedades de las disoluciones de surfactante son consideradas constantes, ya que el efecto surfactante es máximo a partir de ese valor [207,209]. Por ello en muchas aplicaciones prácticas, donde se requiere el uso de espumas, la concentración de surfactantes es superior a la CMC. Además, se utilizan otros medios para incrementar la estabilidad de las espumas líquidas, entre los cuales cabe destacar los siguientes:

- Incrementar la viscosidad del líquido para disminuir el drenado dentro de la fase continua de la espuma.
- Agregar segundas fases líquidas o sólidas, lo cual puede mejorar o perjudicar el efecto tensoactivo porque propicia la redistribución de las moléculas surfactantes en la nueva superficie. En general para que partículas sólidas incrementen la estabilidad de la espuma, éstas deben ser partículas muy finas e hidrófilas con una elevada mojabilidad. Las partículas sólidas incrementan la estabilidad de la espuma porque incrementan la rigidez de las paredes líquidas, lo que evita el colapso de las mismas. [207,209].

Finalmente, se sabe de forma empírica que [209]:

- No hay relación directa entre la capacidad de formar una espuma y la capacidad de estabilizarla.
- El volumen de espuma formada se incrementa con el incremento de la concentración de surfactante hasta alcanzar la CMC. Por encima de la CMC el volumen de la espuma producida permanece constante. Sin embargo, no existe una regla similar para la estabilidad de la espuma.

2.7.5 Surfactantes no iónicos: Tween 80

Los surfactantes no iónicos son moléculas que no poseen un grupo con carga definida, sino que la zona hidrófila se define por la solubilidad del grupo en agua [209]. Los grupos hidrófilos más usados en el desarrollo de surfactantes no iónicos se presentan en la tabla 2.6.

Tabla 2.6: Grupos solubles en agua [209].

Nombre del grupo	Nomenclatura	Características
Enlace triple	-C≡C-	Propiedades hidrófilas muy pobres
Éster	-COO-R	Propiedades hidrófilas muy pobres
Amida	-COHN-R	Propiedades hidrófilas muy pobres
Hidroxilo	-C-OH	Propiedades hidrófilas pobres
Éter	-C-O-C	Propiedades hidrófilas pobres
Oxi amida	≡N-O	Propiedades hidrófilas excelentes
Oxi fosfina	≡P=O	Propiedades hidrófilas excelentes
Sulfóxido	=S=O	Propiedades hidrófilas excelentes

Una clase especial y típica de surfactantes no iónicos son los derivados del sorbitan, de los cuales se emplean principalmente dos variedades: 1) las grasas ésteres ácidas de sorbitan y 2) sus derivados etoxilados. Los ésteres se denominan comercialmente *Spam* mientras que los etoxilados se denomina *Tween* y el número que sigue al nombre hace referencia a la longitud de la cadena hidrófoba [209].

El Tween 80 es un líquido amarillento viscoso con una densidad específica a 25 °C de 1.07. La CMC del Tween 80 en agua es de 13 – 15 mg/l [212] ($1.3 - 1.5 \times 10^{-3}$ % w/w; $1 - 1.3 \times 10^{-5}$ M [213]). El Tween 80 es soluble en agua, miscible en alcohol, aceite de semilla de algodón, aceite de maíz, acetato de etilo, metanol y tolueno, pero es insoluble en aceites minerales. El pH de una disolución acuosa de Tween 80 al 1 % es de entre 5.5 a 7.2 unidades. Las disoluciones de Tween 80 al igual que el líquido puro se oxidan al aire, a pesar de ello son relativamente estables a temperaturas entre 2 y 8 °C. Para almacenamiento prolongado se sugiere mantener en atmósfera inerte de argón o nitrógeno [212].

El Tween 80 está disponible comercialmente en una gran variedad de grados, en los que se sitúa el grado médico. Pese a ello el Tween disponible no es estéril. Para aplicaciones donde la esterilidad es un requisito primordial no se recomienda la esterilización del líquido por autoclave, siendo la esterilización por filtración a través de una membrana de 22 µm la mejor opción de esterilización [212].

Otros nombres con los que se identifica al Tween 80 son polisorbonato 80, PEG (80), sorbitan mono oleato, o polioxietilen 20 sorbitan mono oleato [212]. Cabe mencionar que la designación Tween 80 es una marca registrada por lo cual se debe tener precaución para no infringir derechos de autor.

Las principales aplicaciones del Tween 80 son en la industria alimentaria, farmacéutica, minera, entre otras. Se emplea como emulsificador y dispersor de sustancias en productos médicos y alimenticios. El Tween 80 está aprobado por la FDA para su uso como excipiente de medicamentos y vacunas de administración parenteral [214-217]. La concentración máxima de Tween 80 considerada como segura para el organismo es de 0.4 % w/w [215].

2.7.6 Proteínas y carbohidratos como surfactantes

Las moléculas surfactantes no están limitadas a moléculas ambifílicas sintéticas como el Tween 80. Las proteínas y los carbohidratos son polímeros naturales que, debido al gran número de grupos funcionales laterales que poseen, pueden actuar como surfactantes [123-125,209]. Un desarrollo más detallado de los mecanismos por los que las proteínas y los carbohidratos actúan como surfactantes puede encontrarse en el trabajo de Rodríguez-Patino [218].

Por otro lado, el agente espumante de la fase líquida de un cemento no necesariamente debe cumplir con la definición estricta de surfactante [209]. Dependiendo de la espumabilidad y estabilidad de las disoluciones acuosas de proteínas o carbohidratos, estas serán más o menos eficaces para preparar cementos macroporosos.

2.8 Referencias

1. Mistry A.S., Mikos A.G. Tissue engineering strategies for bone regeneration. *Adv Biochem Engin/Biotechnol* 2005; **94**: 1-22.
2. Amit B., Sheldon B., Weichang X., Susmita B. Calcium phosphate-based resorbable ceramics: influence of MgO, ZnO, and SiO₂ dopants. *J Am Ceram Soc* 2006; **89**: 2675-2688.
3. Bilezikian J.P., Raisz L.G., Rodan G.A. Principles of bone biology. San Diego: Academic Press, 2001.
4. Dorozhkin S.V. Calcium orthophosphates. *J.Mater.Sci.* 2007; **42**: 1061-1095.
5. Lanza R.P., Langer R., Vacanti J. Principles of tissue engineering. San Diego: Academic Press, 2000.
6. Stein G.S., Lian J.B. Molecular mechanisms mediating proliferation/differentiation interrelationships during progressive development of the osteoblast phenotype. *Endocr Rev* 1993; **14**: 424-442.
7. Ruimerman R. Modeling and remodeling in bone tissue. Technische Universiteit Eindhoven, 2005.
8. Davison K.S., Siminoski K., Adachi J.D. et al. Bone strength: the whole is greater than the sum of its parts. *Seminars in Arthritis and Rheumatism* 2006; **36**: 22-31.
9. Raisz L.G. Pathogenesis of osteoporosis: concepts, conflicts, and prospects. *J Clin Invest* 2005; **115**: 3318-3325.
10. Carano R.A.D., Filvaroff E.H. Angiogenesis and bone repair. *Drug Discovery Today* 2003; **8**: 980-989.
11. Santin M. Strategies in regenerative medicine: integrating biology with materials design. USA: Springer, 2009.
12. Rodan G.A., Martin T.J. Therapeutic approaches to bone diseases. *Science* 2000; **289**: 1508-1514.
13. Isidro A., Malgosa A. Esquelets malalts. Museo egpci de Barcelona, 2009.

14. Proubasta I., Gil F.J., Planell J.A. Fundamentos de biomecánica y biomateriales. Madrid: Ergon, 1997.
15. Ginebra M. P. Desarrollo y caracterización de un cemento óseo basado en fosfato tricálcico alfa para aplicaciones quirúrgicas. Universitat Politècnica de Catalunya, 1996.
16. Hench L.L. Bioceramics: from concept to clinic. Journal of the American Ceramic Society 1991; **74**: 1487-1510.
17. Hench L.L. Bioceramics. Journal of the American Ceramic Society 1998; **81**: 1705-1728.
18. Pannhorst W. Glass ceramics: state-of-the-art. J.Non-Crystalline Solids 1997; **219**: 198-204.
19. de Aza P.N., de Aza A.H., de Aza S. Bioactive glasses and glass-ceramics. Bol.Soc.Esp.Ceram.V. 2007; **46**: 45-55.
20. Marti A. Inert bioceramics (Al_2O_3 , ZrO_2) for medical applications. Injury 2000; **31**: S-D33-S-D36.
21. Elliott J.C. Structure and Chemistry of the Apatites and Other Calcium Orthophosphates. Amsterdam: Elsevier, 1994.
22. Bohner M. Calcium orthophosphates in medicine: from ceramics to calcium phosphate cements. Injury 2000; **31**: D37-D47.
23. Vallet-Regi M., González-Calbet J.M. Calcium phosphates as substitution of bone tissues. Progress in Solid State Chem. 2004; **32**: 1-31.
24. LeGeros R.Z., LeGeros J.P. Calcium phosphate bioceramics: past, present and future. Key Eng Mater 2003; **240-242**: 3-10.
25. Giannoudis P.V., Dinopoulos H., Tsiridis E. Bone substitutes: an update. Injury 2005; **36**: S20-S27.
26. Dorozhkin S.V. Calcium orthophosphate cements for biomedical applications. J.Mater.Sci. 2008; **43**: 3028-3057.
27. Orlovskii V.P., Komlev V.S., Barinov S.M. Hydroxyapatite and hydroxyapatite-based ceramics. Inorganic Materials 2002; **38**: 973-984.
28. Rey C., Combes C., Drouet, Sfihi H. Chemical diversity of apatites. Advances in Science and Technology 2006; **4**: 27-36.
29. Chow L.C. Development of self-setting calcium phosphates cements. Journal of the Ceramic Society of Japan. International Edition 1991; **99**: 927-936.
30. Takagi S., Chow L.C. Formation of macropores in calcium phosphate cement implants. Journal of Materials Science-Materials in Medicine 2001; **12**: 135-139.
31. Ginebra M.P., Delgado J.A., Harr I., Almirall A., del Valle S., Planell J.A. Factors affecting the structure and properties of an injectable self-setting calcium phosphate foam. Journal of Biomedical Materials Research 2007; **80A**: 351-361.
32. Kim H.M. Ceramic bioactivity and related biomimetic strategy. Current Opinion in Solid State and Materials Science 2003; **7**: 289-299.

33. Hench L.L., Splinter R.J., Allen W.C., Greenlee T.K. Bonding mechanisms at the interface of ceramic prosthetic materials. *Journal of Biomedical Materials Research* 1972; **2**: 117-141.
34. Cao W., Hench L.L. Bioactive materials. *Ceramics International* 1996; **22**: 493-507.
35. Kokubo T., Takadama H. How useful is SBF in predicting in vivo bone bioactivity? *Biomaterials* 2006; **27**: 2907-2915.
36. Callister W.D. *Materials science and engineering: an Introduction*. USA: Wiley, 2003.
37. Studart A.R, Gonzenbach U.T., Tervoort E, Gauckler L.J. Processing routes to macroporous ceramics: a review. *Journal of the American Ceramic Society* 2006; **89**: 1771-1789.
38. Daculsi G. Biphasic calcium phosphate concept applied to artificial bone, implant coating and injectable bone substitute. *Biomaterials* 1998; **19**: 1473-1478.
39. Ginebra M. P., Driessens F. C. M., Fernández E., Khairoun I., Gil F. J., Planell J. A. Hydraulic calcium phosphate cements for biomedical applications. *Proceedings Interregionales Europäisches Keramikkolloquium. Advanced Ceramics and Composites* 2000; 59-65.
40. Ginebra M.P., Traykova T., Planell J.A. Calcium phosphate cements: competitive drug carriers for the musculoskeletal system? *Biomaterials* 2006; **27**: 2171-2177.
41. Driessens F.C.M., Planell J.A., Boltong M.G., Khairoun I., Ginebra M.P. Osteotransductive bone cements. *Proceedings of the Institution of Mechanical Engineers Part H-Journal of Engineering in Medicine* 1998; **212**: 427-435.
42. Ginebra M.P., Boltong M.G., Fernandez E., Planell J.A., Driessens F.C.M. Effect of various additives and temperature on some properties of an apatitic calcium-phosphate cement. *Journal of Materials Science-Materials in Medicine* 1995; **6**: 612-616.
43. Ginebra M.P., Driessens F.C.M., Planell J.A. Effect of the particle size on the micro and nanostructural features of a calcium phosphate cement: a kinetic analysis. *Biomaterials* 2004; **25**: 3453-3462.
44. Khairoun I., Driessens F.C.M., Boltong M.G., Planell J.A., Wenz R. Addition of cohesion promoters to calcium phosphate cements. *Biomaterials* 1999; **20**: 393-398.
45. Ginebra M.P., Fernández E., Driessens F.C.M., Boltong M.G., Planell J.A. Influence of the particle size of the powder phase in the setting and hardening behavior of a calcium phosphate cement. *Bioceramics* 1997; **10**: 481-484.
46. Khairoun I., Boltong M.G., Driessens F.C.M., Planell J.A. Effect of calcium carbonate on clinical compliance of apatitic calcium phosphate bone cement. *J.Biomed.Mater.Res.* 1997; **38**: 356-360.
47. Camirq C.L., Gbureck U., Hirsiger W., Bohner M. Correlating crystallinity and reactivity in an α -tricalcium phosphate. *Biomaterials* 2005; **26**: 2787-2794.
48. Barralet J.E., Hofmann M., Grover L.M., Gbureck U. High-strength apatitic cement by modification with-hydroxy acid salts. *Adv Mater* 2003; **15**: 2091.

49. Bohner M., Baroud G. Injectability of calcium phosphate pastes. *Biomaterials* 2005; **26**: 1553-1563.
50. Carlson J., Nilsson M., Fernandez E., Planell J.A. An ultrasonic pulse-echo technique for monitoring the setting of CaSO₄-based bone cement. *Biomaterials* 2003; **24**: 71-77.
51. Nilsson M., Carlson J., Fernández E., Planell J.A. Monitoring the setting of calcium-based bone cements using pulse-echo ultrasound. *Journal of Materials Science-Materials in Medicine* 2002; **13**: 1135-1141.
52. Fernández E., Ginebra M.P., Boltong M.G. et al. Kinetic study of the setting reaction of a calcium phosphate bone cement. *Journal of Biomedical Materials Research* 1996; **32**: 367-374.
53. Ginebra M.P., Fernández E., DeMaeyer E.A.P. et al. Setting reaction and hardening of an apatitic calcium phosphate cement. *Journal of Dental Research* 1997; **76**: 905-912.
54. Ginebra M.P., Rilliard A., Fernandez E., Elvira C., San Roman J., Planell J.A. Mechanical and rheological improvement of a calcium phosphate cement by the addition of a polymeric drug. *Journal of Biomedical Materials Research* 2001; **57**: 113-118.
55. Khairoun I., Boltong M.G., Driessens F.C.M., Planell J.A. Some factors controlling the injectability of calcium phosphate bone cements. *Journal of Materials Science-Materials in Medicine* 1998; **9**: 425-428.
56. Friberg J., Fernandez E., Sarda S. et al. An experimental approach to the study of the rheology behavior of synthetic bone calcium phosphate cements. *Key Eng Mater* 2001; **192-195**: 777-780.
57. Sarda S., Fernández E., Nilsson M., Balcells M., Planell J.A. Kinetic study of citric acid influence on calcium phosphate bone cements as water-reducing agent. *Journal of Biomedical Materials Research* 2002; **61**: 653-659.
58. Ishikawa K., Miyamoto Y., Kon M., Nagayama M., Asaoka K. Non-decay type fast-setting calcium phosphate cement: composite with sodium alginate. *Biomaterials* 1995; **16**: 527-532.
59. Ginebra M.P., Espanol M., Montufar E.B., Perez R.A., Mestres G. New processing approaches in calcium phosphate cements and their applications in regenerative medicine. *Acta Biomaterialia* 2010; **6**: 2863-2873.
60. Fujishiro Y., Takahashi K., Sato T. Preparation and compressive strength of α -tricalcium phosphate/gelatine gel composite cement. *Journal of Biomedical Materials Research* 2001; **54**: 525-530.
61. Bigi A., Bracci B., Panzavolta S. Effect of added gelatin on the properties of calcium phosphate cement. *Biomaterials* 2004; **25**: 2893-2899.
62. Bigi A., Cantelli S., Panzavolta S., Rubini K. α -Tricalcium phosphate-gelatine composite cements. *Journal of Applied Biomaterials and Biomechanics* 2004; **2**: 81-87.
63. Ginebra M.P., Fernández E., Driessens F.C.M., Planell J.A. The effect of Na₂HPO₄ addition on the setting reaction kinetics of an α -TCP cement. *Bioceramics* 1998; **11**: 243-246.

64. Fernández E., Boltong M.G., Ginebra M.P., Bermúdez O., Driessens F.C.M., Planell J.A. Common ion effect on some calcium phosphate cements. *Clin.Mater.* 1994; **16**: 99-103.
65. Espanol M., Perez R.A., Montufar E.B., Marichal C., Sacco A., Ginebra M.P. Intrinsic porosity of calcium phosphate cements and its significance for drug delivery and tissue engineering applications. *Acta Biomaterialia* 2009; **5**: 2752-2762.
66. Bodde E.W.H., Cammaert C.T.R., Wolke J.G.C., Spauwen P.H.M., Jansen J.A. Investigation as to the osteoinductivity of macroporous calcium phosphate cement in goats. *J Biomed Mater Res B: Appl Biomater* 2007; **83B**: 161-168.
67. Sun L., Berndt C.C., Gross K.A., Kucuk A. Material fundamentals and clinical performance of plasma-sprayed hydroxyapatite coatings: A review. *Journal of Biomedical Materials Research* 2001; **58**: 570-592.
68. Anselme K. Osteoblast adhesion on biomaterials. *Biomaterials* 2000; **21**: 667-681.
69. Markovic M., Takagi S., Chow L.C. Formation of macropores in calcium phosphate cement through the use of mannitol crystals. *Key Eng Mater* 2000; **773-776**: 192-195.
70. Barralet J.E., Grover L., Gaunt T., Wright A.J., Gibson I.R. Preparation of macroporous calcium phosphate cement tissue engineering scaffold. *Biomaterials* 2002; **23**: 3063-3072.
71. Fernández E., Vlad M.D., Gel M.M. et al. Modulation of porosity in apatitic cements by the use of α -tricalcium phosphate-calcium sulphate dihydrate mixtures. *Biomaterials* 2005; **26**: 3395-3404.
72. Cama G., Barberis F., Botter R. et al. Preparation and properties of macroporous brushite bone cements. *Acta Biomaterialia* 2009; **5**: 2161-2168.
73. Xu H.H.K., Quinn J.B. Calcium phosphate cement containing resorbable fibers for short-term reinforcement and macroporosity. *Biomaterials* 2002; **23**: 193-202.
74. Xu H.H.K., Eichmiller F.C., Giuseppetti A.A. Reinforcement of a self-setting calcium phosphate cement with different fibers. *Journal of Biomedical Materials Research* 2000; **52A**: 107-114.
75. Xu H.H.K., Eichmiller F.C., Barndt F.C. Effects of fiber length and volume fraction on the reinforcement of calcium phosphate cement. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 2001; **12**: 57-65.
76. Zuo Y., Yang F., Wolke J.G.C., Li Y., Jansen J.A. Incorporation of biodegradable electrospun fibers into calcium phosphate cement for bone regeneration. *Acta Biomaterialia* 2010; **6**: 1238-1247.
77. Xu H.H.K., Quinn J.B., Takagi S., Chow L.C. Synergistic reinforcement of in situ hardening calcium phosphate composite scaffold for bone tissue engineering. *Biomaterials* 2004; **25**: 1029-1037.
78. Xu H.H.K., Carl S.G. Self-hardening calcium phosphate cement-mesh composite: Reinforcement, macropores, and cell response. *Journal of Biomedical Materials Research* 2004; **69A**: 267-278.

79. Xu H.H.K., Simon C.G. Fast setting calcium phosphate-chitosan scaffold: mechanical properties and biocompatibility. *Biomaterials* 2005; **26**: 1337-1348.
80. Xu H.H.K., Weir M.D., Burguera E.F., Fraser A.M. Injectable and macroporous calcium phosphate cement scaffold. *Biomaterials* 2006; **27**: 4279-4287.
81. Xu H.H.K., Weir M.D., Simon C.G. Injectable and strong nano-apatite scaffolds for cell/growth factor delivery and bone regeneration. *Dental Materials* 2008; **24**: 1212-1222.
82. Habraken W.J.E.M., Wolke J.G.C., Mikos A.G., Jansen J.A. Injectable PLGA microsphere/calcium phosphate cements: physical properties and degradation characteristics. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition* 2006; **17**: 1057-1074.
83. Habraken W.J.E.M., Wolke J.G.C., Mikos A.G., Jansen J.A. Porcine gelatin microsphere/calcium phosphate cement composites: An in vitro degradation study. *Journal of Biomedical Materials Research: Applied Biomaterials* 2009; **91B**: 555-5561.
84. Link D.P., van den Dolder J., van den Beucken J.J. et al. Evaluation of an orthotopically implanted calcium phosphate cement containing gelatin microparticles. *Journal of Biomedical Materials Research* 2009; **90A**: 372-379.
85. del Real R.P., Ooms E., Wolke J.G., Vallet-Regi M., Jansen J.A. In vivo bone response to porous calcium phosphate cement. *J Biomed Mater Res* 2003; **65A**: 30-36.
86. Almirall A., Larrecq G., Delgado J.A., Martinez S., Planell J.A., Ginebra M.P. Fabrication of low temperature macroporous hydroxyapatite scaffolds by foaming and hydrolysis of an α -TCP paste. *Biomaterials* 2004; **25**: 3671-3680.
87. Hesaraki S., Sharifi D. Investigation of an effervescent additive as porogenic agent for bone cement macroporosity. *Bio-Medical Materials and Engineering* 2007; **17**: 29-38.
88. Sarda S., Fernández E., Nilsson M., Planell J.A. Influence of air-entraining agent on bone cement macroporosity. *Key Eng Mater* 2002; **218-220**: 335-338.
89. Bohner M. Calcium phosphate emulsions. *Key Eng Mater* 2001; **765-768**: 192-195.
90. Bohner M., van Lenthe G.H., Grünenfelder S., Hirsiger W., Evison R., Müller R. Synthesis and characterization of porous β -tricalcium phosphate blocks. *Biomaterials* 2005; **26**: 6099-6105.
91. Qi X., Ye J., Wang Y. Alginate/poly (lactic-co-glycolic acid)/calcium phosphate cement scaffold with oriented pore structure for bone tissue engineering. *Journal of Biomedical Materials Research* 2009; **89A**: 980-987.
92. Panzavolta S., Fini M., Nicoletti A. et al. Porous composite scaffolds based on gelatin and partially hydrolyzed α -tricalcium phosphate. *Acta Biomaterialia* 2009; **5**: 636-643.
93. Miao X., Hu Y., Liu J., Wong A.P. Porous calcium phosphate ceramics prepared by coating polyurethane foams with calcium phosphate cements. *Materials Letters* 2004; **58**: 397-402.
94. Miao X., Lim W.K., Huang X., Chen Y. Preparation and characterization of interpenetrating phased TCP/HA/PLGA composites. *Materials Letters* 2005; **59**: 4000-4005.

95. Charriere E., Lemaitre J., Zysset P. Hydroxyapatite cement scaffolds with controlled macroporosity: fabrication protocol and mechanical properties. *Biomaterials* 2003; **24**: 809-817.
96. Li X., Li D., Lu B., Tang Y., Wang L. Design and fabrication of CAP scaffolds by indirect solid free form fabrication. *Rapid Prototyping Journal* 2005; **11**: 312-318.
97. Li X., Li D., Lu B., Wang L., Wang Z. Fabrication and evaluation of calcium phosphate cement scaffold with controlled internal channel architecture and complex shape. *Proc Inst Mech Eng H* 2007; **221**: 951-958.
98. Guo D., Xu K., Han Y. The in situ synthesis of biphasic calcium phosphate scaffolds with controllable compositions, structures, and adjustable properties. *Journal of Biomedical Materials Research* 2009; **88A**: 43-52.
99. Miao X., Tan L.P., Tan L.S., Huang X. Porous calcium phosphate ceramics modified with PLGA-bioactive glass. *Materials Science and Engineering* 2007; **27C**: 274-279.
100. Huang X., Miao X. Novel porous hydroxyapatite prepared by combining H₂O₂ foaming with PU sponge and modified with PLGA and bioactive glass. *Journal of Biomaterial Applications* 2007; **21**: 351-374.
101. Gbureck U., Hölzel T., Klammert U., Würzler K., Müller F.A., Barralet J.E. Resorbable dicalcium phosphate bone substitutes prepared by 3D powder printing. *Advanced functional materials* 2009; **17**: 3940-3945.
102. Habibovic P., Gbureck U., Doillon C.J., Bassett D.C., Van Blitterswijk C.A., Barralet J.E. Osteoconduction and osteoinduction of low-temperature 3D printed bioceramic implants. *Biomaterials* 2008; **29**: 944-953.
103. Xu H.H.K., Carey L.E., Simon Jr.C.G. Premixed macroporous calcium phosphate cement scaffold. *Journal of Materials Science-Materials in Medicine* 2007; **18**: 1345-1353.
104. del Real R.P., Wolke J.G.C., Vallet-Regi M., Jansen J.A. A new method to produce macropores in calcium phosphate cements. *Biomaterials* 2002; **23**: 3673-3680.
105. Edwards B., Higham P., Zitelli J. Porous calcium phosphate cements. USA patent 09/699662, 2003.
106. Ginebra M.P., Planell J.A., Gil, F. J. Injectable, self-setting calcium phosphate foam. European patent EP20050782615, 2007.
107. Bohner M. Physical and chemical aspects of calcium phosphates used in spinal surgery. *European Spine Journal* 2001; **10**: S114-S121.
108. Bohner M., Gbureck U., Barralet J.E. Technological issues for the development of more efficient calcium phosphate bone cements: a critical assessment. *Biomaterials* 2005; **26**: 6423-6429.
109. Fernandez E., Gil F.J., Ginebra M.P., Driessens F.C.M., Planell J.A., Best S.M. Calcium phosphate bone cements for clinical applications-Part II: Precipitate formation during setting reactions. *Journal of Materials Science-Materials in Medicine* 1999; **10**: 177-183.

110. Fernandez E., Gil F.J., Ginebra M.P., Driessens F.C.M., Planell J.A., Best S.M. Calcium phosphate bone cements for clinical applications-Part I: Solution chemistry. *Journal of Materials Science-Materials in Medicine* 1999; **10**: 169-176.
111. Ginebra M.P., Fernandez E., Driessens F.C.M. et al. The effects of temperature on the behaviour of an apatitic calcium phosphate cement. *Journal of Materials Science-Materials in Medicine* 1995; **6**: 857-860.
112. Ginebra M.P., Fernandez E., Driessens F.C.M., Planell J.A. Modeling of the hydrolysis of α -tricalcium phosphate. *Journal of the American Ceramic Society* 1999; **82**: 2808-2812.
113. Durucan C., Brown P.W. α -Tricalcium phosphate hydrolysis to hydroxyapatite at and near physiological temperature. *Journal of Materials Science-Materials in Medicine* 2000; **11**: 365-371.
114. Durucan C., Brown P.W. Kinetic model for α -tricalcium phosphate hydrolysis. *Journal of the American Ceramic Society* 2002; **85**: 2013-2018.
115. Durucan C., Brown P.W. Reactivity of α -tricalcium phosphate. *Journal of Materials Science* 2002; **37**: 963-969.
116. Karageorgiou V., Kaplan D. Porosity of 3D biomaterial scaffolds and osteogenesis. *Biomaterials* 2005; **26**: 5474-5491.
117. Djagny K.B., Wang Z., Xu S. Gelatin: a valuable protein for food and pharmaceutical industries: review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 2001; **41**: 481-492.
118. Foix J. Aplicaciones de la gelatina. *Separata de la Revista Química* 1960; **85**: 11.
119. Gelatine Manufacturers of Europe. <http://www.gelatine.org/es/index.html>. 2008.
120. Cole B. Gelatine. <http://www.gelatin.co.za/>. 2009.
121. Petsko G.A., Ringe D. Protein structure and function. USA: New Science Press Ltd, 2004.
122. Freedman H.H. Crosslinked gelatine foams. USA patent 664664, 1985.
123. Dickinson E., Izgi E. Foam stabilization by protein-polysaccharide complexes. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 1996; **113**: 191-201.
124. Dickinson E. Hydrocolloids as emulsifiers and emulsion stabilizers. *Food Hydrocolloids* 2009; **23**: 1473-1482.
125. Dickinson E. Towards more natural emulsifiers. *Trends in Food Science & Technology* 1993; **4**: 330-334.
126. Neumann P. Gelatin-based compositions and a method for the generation of stabilized foams therefrom. USA Patent 697258, 1978.
127. Taylor D.M. Inactivation of TSE agents: safety of blood and blood-derived products. *Transfusion Clinique et Biologique* 2003; **10**: 23-25.
128. United States Pharmacopeia. US 2006.

129. Department of health and human services. Use of materials derived from cattle in medical products intended for use in humans and drugs intended for use in ruminants. Food and Drug Administration. 21 CFR Parts 211, 226, 300, 500, 530, 600, 895, and 1271. 2007.
130. The European Pharmacopoeia. The European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare, 2007.
131. Food Chemicals Codex. Maryland: The United States Pharmacopeia, 2008.
132. Rousselot Gelatine: Regulatory Matters. <http://www.rousselot.com/regulatory-matters.html>. 2008.
133. Huang Y., Onyeri S., Siewe M., Moshfeghian A., Madihally S.V. In vitro characterization of chitosan-gelatin scaffolds for tissue engineering. *Biomaterials* 2005; **26**: 7616-7627.
134. Kim H.W., Kim H.E., Salih V. Stimulation of osteoblast responses to biomimetic nanocomposites of gelatin-hydroxyapatite for tissue engineering scaffolds. *Biomaterials* 2005; **26**: 5221-5230.
135. Hersel U., Dahmen C., Kessler H. RGD modified polymers: biomaterials for stimulated cell adhesion and beyond. *Biomaterials* 2003; **24**: 4385-4415.
136. Tabata Y. Tissue regeneration based on growth factor release. *Tissue Engineering* 2003; **9**: S5-S15.
137. Tabata Y., Takahashi Y., Yamamoto M. Osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells in biodegradable sponges composed of gelatin and β -tricalcium phosphate. *Biomaterials* 2005; **26**: 3587-3596.
138. Lee S.B., Kim Y.H., Chong M.S., Hong S.H., Lee Y.M. Study of gelatin-containing artificial skin V: fabrication of gelatin scaffolds using a salt-leaching method. *Biomaterials* 2005; **26**: 1961-1968.
139. Kevor S., TenHuisen, Brown P.W. The formation of hydroxyapatite-gelatin composites at 38°C. *Journal of Biomedical Materials Research* 1994; **28**: 27-33.
140. Zhang S.M., Cui F.Z., Liao S.S., Zhu Y., Han L. Synthesis and biocompatibility of porous nano-hydroxyapatite/collagen/alginate composite. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 2003; **14**: 641-645.
141. Rosseeva E.V., Buder J., Simon P., Schwarz U., Frank-Kamenetskaya O.V., Kniep R. Synthesis, characterization, and morphogenesis of carbonated fluorapatite-gelatin nanocomposites: A complex biomimetic approach toward the mineralization of hard tissues. *Chem.Mater.* 2008; **20**: 6003-6013.
142. Lee C.H., Singla A., Lee Y. Biomedical applications of collagen. *International Journal of Pharmaceutics* 2001; **221**: 1-22.
143. Tampieri A., Celotti G., Montevicchi M. et al. Porous phosphate-gelatin composite as bone graft with drug delivery function. *J.Mater.Sci.Mater.Med.* 2003; **14**: 623-627.
144. Landi E., Valentini F., Tampieri A. Porous hydroxyapatite/gelatin scaffolds with ice-designed channel-like porosity for biomedical applications. *Acta Biomaterialia* 2008; **4**: 1620-1626.

145. Gombotz W.R., Wee S.F. Protein release from alginate matrices. *Advanced Drug Delivery Reviews* 1998; **31**: 267-285.
146. Barbosa M.A., Granja P.L., Barrias C.C., Amaral I.F. Polysaccharides as scaffolds for bone regeneration. *ITBM-RBM* 2005; **26**: 212-217.
147. Cruz-Suárez L.E., Ricque-Marie D., Tapia-Salazar M., Guajardo-Barbosa C. Uso de harina de kelp (*Macrocystis pyrifera*) en alimentos para camarón. en Cruz-Suárez L.E., Ricque-Marie D., Tapia-Salazar M., Olvera-Novoa M.A, Civera-Cerecedo R. *Memorias del V Simposium Internacional de Nutrición Acuícola*, 2000.
148. Chaoyuan W. Training manual on gracilaria culture and seaweed processing in china. Zhanjiang, China: Department of Aquatic Products - Ministry of Agriculture, 1990.
149. Rowley J.A., Madlambayan G., Mooney D.J. Alginate hydrogels as synthetic extracellular matrix materials. *Biomaterials* 1999; **20**: 45-53.
150. Freile-Pelegrín Y. Algas en la "botica". *Avance y Perspectiva* 2001; **20**: 283-292.
151. Cancela M.A., Álvarez E., Maceiras R. Polymers in alimentary industry: properties of the sodium alginate. *Electronic Journal of Environmental, Agricultural and Food Chemistry* 2003; **2**.
152. Smetana Jr K. Cell biology of hydrogels. *Biomaterials* 1993; **14**: 1046-1050.
153. Khotimchenko Y.S., Kovalev V.V., Ziganshina O.A. Physical–chemical properties, physiological activity, and usage of alginates, the polysaccharides of brown algae. *Marine Pharmacol* 2001; **27**: 53-64.
154. Parks W.M., Guo Y.B. A casting based process to fabricate 3D alginate scaffolds and to investigate the influence of heat transfer on pore architecture during fabrication. *Materials Science and Engineering* 2008; **28C**: 1435-1440.
155. Balakrishnan B., Jayakrishnan A. Self-cross-linking biopolymers as injectable in situ forming biodegradable scaffolds. *Biomaterials* 2005; **26**: 3941-3951.
156. Zmora S., Glicklis R., Cohen S. Tailoring the pore architecture in 3-D alginate scaffolds by controlling the freezing regime during fabrication. *Biomaterials* 2002; **23**: 4087-4094.
157. Tampieri A., Sandri M., Landi E. et al. HA/alginate hybrid composites prepared through bio-inspired nucleation. *Acta Biomaterialia* 2005; **1**: 343-351.
158. Sotome S., Uemura T., Kikuchi M. et al. Synthesis and in vivo evaluation of a novel hydroxyapatite/collagen-alginate as a bone filler and a drug delivery carrier of bone morphogenetic protein. *Materials Science and Engineering* 2004; **24C**: 341-347.
159. Cimino P., Bifulco G., Casapullo A., Bruno I., Gomez-Paloma L., Riccio R. Isolation and NMR characterization of rosacelose, a novel sulfated polysaccharide from the sponge *Mixylla rosacea*. *Carbohydrate Research* 2001; **334**: 39-47.
160. Melo M.R.S., Feitosa J.P.A., Freitas A.L.P., de Paula R.C.M. Isolation and characterization of soluble sulfated polysaccharide from the red seaweed *Gracilaria cornea*. *Carbohydrate Polymers* 2002; **49**: 491-498.

161. Alban S., Schauerte A., Franz G. Anticoagulant sulfated polysaccharides: Part I. Synthesis and structure-activity relationships of new pullulan sulfates. *Carbohydrate Polymers* 2002; **47**: 267-276.
162. Kasbauer C.W., Paper D.H., Franz G. Sulfated β -(1-4)-galacto-oligosaccharides and their effect on angiogenesis. *Carbohydrate Research* 2001; **330**: 427-430.
163. Folkman J. Regulation of angiogenesis: A new function of heparin. *Biochemical Pharmacology* 1985; **34**: 905-909.
164. Menchén L., Ripoll C., Bretón I. et al. Osteoporosis y enfermedad inflamatoria intestinal. *Nutrición Hospitalaria* 2005; **20**: 26-37.
165. Franz G., Alban S. Structure-activity relationship of antithrombotic polysaccharide derivatives. *International Journal of Biological Macromolecules* 1995; **17**: 311-314.
166. Han F., Yao W., Yang X., Liu X., Gao X. Experimental study on anticoagulant and antiplatelet aggregation activity of a chemically sulfated marine polysaccharide YCP. *International Journal of Biological Macromolecules* 2005; **36**: 201-207.
167. Barbucci R., Lamponi S., Magnani A., Renier D. The influence of molecular weight on the biological activity of heparin like sulphated hyaluronic acids. *Biomaterials* 1998; **19**: 801-806.
168. Mulloy B., Mourpo P.A.S., Gray E. Structure/function studies of anticoagulant sulphated polysaccharides using NMR. *Journal of Biotechnology* 2000; **77**: 123-135.
169. Ovchinnikova T.V., Shipova E.V., Sablina M.A. et al. Synthesis of monosulfated saccharides in the spacers form. *Mendeleev Communications* 2002; **12**: 213-215.
170. Anderson J., Garner S.C. The effects of phytoestrogens on bone. *Nutrition Research* 1997; **17**: 1617-1632.
171. Santin M., Morris C., Standen G., Nicolais L., Ambrosio L. A new class of bioactive and biodegradable soybean-based bone fillers. *Biomacromolecules* 2007; **8**: 2706-2711.
172. Warren M.P., Shortle B., Dominguez J.E. Use of alternative therapies in menopause. *Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology* 2002; **16**: 411-448.
173. Donida C.O., Degrani I.H., De Moraes R., Magdalena N., Kreisner S. Powdered soybean extract. USA patent 256080, 1990.
174. Rao P.R., Kumar K.G., Narayanan M.C. A new method of isolation of isoflavones from glycine max (soya beans) by complexation technique. *Asian Journal of Scientific Research* 2008; **1**: 176-179.
175. Nakamura A., Maeda H., Corredig M. Competitive adsorption of soy soluble polysaccharides in oil-in-water emulsions. *Food Research International* 2004; **37**: 823-831.
176. Ricketts M.L., Moore D.D., Banz W.J., Mezei O., Shay N.F. Molecular mechanisms of action of the soy isoflavones includes activation of promiscuous nuclear receptors. A review. *The Journal of Nutritional Biochemistry* 2005; **16**: 321-330.

177. Watanabe S., Uesugi S., Kikuchi Y. Isoflavones for prevention of cancer, cardiovascular diseases, gynecological problems and possible immune potentiation. *Biomed Pharmacother* 2002; **56**: 302-312.
178. Rostagno M.A., Palma M., Barroso C.G. Short-term stability of soy isoflavones extracts: Sample conservation aspects. *Food Chemistry* 2005; **95**: 557-564.
179. Suh S.K., Koh G., Park Y.C. et al. Soybean isoflavones inhibit tumor necrosis factor α -induced apoptosis and the production of interleukin-6 and prostaglandin E2 in osteoblastic cells. *Phytochemistry* 2003; **63**: 209-215.
180. Morris C., Thorpe J., Ambrosio L., Santin M. The soybean isoflavone genistein induces differentiation of MG63 human osteosarcoma osteoblasts. *Journal of Nutrition* 2006; **136**: 1166-1170.
181. Vaz C.M., de Graaf L.A., Reis R.L., Cunha A.M. In vitro degradation behaviour of biodegradable soy plastics: effects of crosslinking with glyoxal and thermal treatment. *Polymer Degradation and Stability* 2003; **81**: 65-74.
182. Vaz C.M., Fossen M., van Tuil R.F., de Graaf L.A., Reis R.L., Cunha A.M. Casein and soyabean protein-based thermoplastics and composites as alternative biodegradable polymers for biomedical applications. *Journal of Biomedical Materials Research* 2003; **65A**: 60-70.
183. Langer R., Vacanti J.P. *Tissue Engineering*. Science 1993; **260**: 920-926.
184. Sipe J.D. *Tissue engineering and reparative medicine*. *Reparative Medicine: Growing Tissues and Organs* 2002; **961**: 1-9.
185. Lysaght M.J., Hazlehurst A.L. *Tissue engineering: The end of the beginning*. *Tissue Engineering* 2004; **10**: 309-320.
186. Takezawa T. A strategy for the development of tissue engineering scaffolds that regulate cell behavior. *Biomaterials* 2003; **24**: 2267-2275.
187. Rezwani K., Chen Q.Z., Blaker J.J., Boccaccini A.R. Biodegradable and bioactive porous polymer/inorganic composite scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials* 2006; **27**: 3413-3431.
188. Griffith L.G., Naughton G. *Tissue engineering-current challenges and expanding opportunities*. *Science* 2002; **295**: 1009-1014.
189. Ikada Y. *Tissue engineering fundamentals and applications*. Amsterdam: Academic Press, 2006.
190. Brochhausen C., Zehbe R., Gross U., Schubert H., Kirkpatrick C.J. Perspectives for the tissue engineering of cartilage from a biological and biomaterial point of view. *Journal of Applied Biomaterials and Biomechanics* 2007; **5**: 70-81.
191. Service R.F. *Tissue engineering technique uses body as 'bioreactor' to grow new bone*. *Science* 2005; **309**: 683-603.
192. Furth M.E., Atala A., Van Dyke M.E. *Smart biomaterials design for tissue engineering and regenerative medicine*. *Biomaterials* 2007; **28**: 5068-5073.

193. Green D., Walsh D., Mann S., Oreffo R.O.C. The potential of biomimesis in bone tissue engineering: Lessons from the design and synthesis of invertebrate skeletons. *Bone* 2002; **30**: 810-815.
194. Draghi L., Cigada A. Nanostructured surfaces for biomedical applications. Part I: nanotopography. *Journal of Applied Biomaterials and Biomechanics* 2007; **5**: 61-69.
195. Yang S., Leong K., Du Z., Chua C. The design of scaffolds for use in tissue engineering. Part I. Traditional factors. *Tissue Engineering* 2001; **7**: 679-689.
196. Shyam T. Effect of scaffold architecture on diffusion of oxygen in tissue engineering constructs. The University of Texas, 2007.
197. Hsu Y.H., Turner I.G., Miles A.W. Fabrication of porous bioceramics with porosity gradients similar to the bimodal structure of cortical and cancellous bone. *Journal of Materials Science-Materials in Medicine* 2007; **18**: 2251-2256.
198. Otsuki B., Takemoto M., Fujibayashi S., Neo M., Kokubo T., Nakamura T. Pore throat size and connectivity determine bone and tissue ingrowth into porous implants: Three-dimensional micro-CT based structural analyses of porous bioactive titanium implants. *Biomaterials* 2006; **27**: 5892-5900.
199. Rodríguez-Navarro C., Sebastián E. Técnicas de análisis del sistema poroso de materiales pétreos ornamentales: usos y limitaciones. *Ingeniería Civil* 1995; **96**: 130-142.
200. Habraken W.J.E.M., Wolke J.G.C., Jansen J.A. Ceramic composites as matrices and scaffolds for drug delivery in tissue engineering. *Advanced Drug Delivery Reviews* 2007; **59**: 234-248.
201. Vallet-Regi M., Balas F., Colilla M., Manzano M. Bone-regenerative bioceramic implants with drug and controlled delivery capability. *Progress in Solid State Chem* 2008; **36**: 163-191.
202. Burg K.J.L., Porter S., Kellam J.F. Biomaterial developments for bone tissue engineering. *Biomaterials* 2000; **21**: 2347-2359.
203. Webb P.A., Orr C. Analytical methods in fine particle technology. USA: Micromeritics Instrument Corporation, 1997.
204. Lacroix D., Chateau A., Ginebra M.P., Planell J.A. Micro-finite element models of bone tissue-engineering scaffolds. *Biomaterials* 2006; **27**: 5326-5334.
205. Romero E., Simms P.H. Microstructure investigation in unsaturated soils: A Review with special attention to contribution of mercury intrusion porosimetry and environmental scanning electron microscopy. *Geotechnical and Geological Engineering* 2008; **26**: 705-727.
206. Romero E. Characterisation and thermo-hydro-mechanical behaviour of unsaturated boom clay: an experimental study. Universidad Politécnica de Cataluña, 1999.
207. Schramm L.L. Emulsions, foams and suspensions. Weinheim: Wiley-VCH, 2005.
208. Salager J.L., Anderéz J.M., Forgiarini A. Cuaderno FIRP 263-A: Modulo de enseñanza en fenomenos interfaciales. Mérida-Venezuela: Facultad de Ingeniería, 2003.
209. Porter M.R. Handbook of surfactants. Great Britain: 1994.

210. Bezelgues J.B., Serieye S., Crosset-Perrotin L., Leser M.E. Interfacial and foaming properties of some food grade low molecular weight surfactants. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 2008; **331**: 56-62.
211. ASTM D 1173-53, Standard test method for foaming properties of surface-active agents. 2006.
212. Sigma. Tween 80: Product information. [P 5188]. 2008.
213. Hillgren A., Lindgren J., Aldqn M. Protection mechanism of Tween 80 during freeze-thawing of a model protein, LDH. *International Journal of Pharmaceutics* 2002; **237**: 57-69.
214. Akers M.J. Excipient-drug interactions in parenteral formulations. *J Pharm Sci* 2002; **99**: 2283.
215. Floyd A.G. Top ten considerations in the development of parenteral emulsions. *Pharm Sci Tech Today* 1999; **4**: 134-143.
216. Rowe R.C., Sheskey P.J., Weller P.J. *Handbook of pharmaceutical excipients*. London: Pharmaceutical Press, 2003.
217. Ash M., Ash I. *Handbook of pharmaceutical additives*. Aldershot: Gower Publishing, 1995.
218. Rodriguez-Patino J.M., Naranjo-Delgado M.D., Linares-Fernandez J. Stability and mechanical strength of aqueous foams containing food proteins. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 1995; **99**: 65-78.

Capítulo 3: Obtención de espumas de hidroxiapatita: uso de un surfactante sintético como agente espumante de la fase líquida.

3.1 Introducción

En los últimos años se han conseguido avances significativos en el desarrollo de materiales capaces de promover la regeneración de hueso. Las cerámicas de fosfatos de calcio osteoconductoras y bioactivas, como por ejemplo la hidroxiapatita (HA), representan los materiales más empleados como injerto óseo sintético, siendo la similitud composicional con la fase inorgánica del hueso la razón principal de su empleo. Además, se ha determinado que para promover la regeneración ósea, los materiales usados como injerto deben ser macroporosos (tamaño de poro mayor a 100 μm) para facilitar la penetración de nuevo hueso hacia el interior del material.

Diversas metodologías han sido propuestas para incorporar macroporos en las cerámicas en base a fosfatos de calcio, obteniendo por lo general bloques porosos. A pesar de que estos materiales son eficaces en el tratamiento de lesiones óseas, la técnica de implantación está limitada al método tradicional, en el que la geometría del defecto se debe adaptar al tamaño del implante, lo cual en la mayoría de los casos genera una mayor pérdida de masa ósea.

Por otro lado, una de las tendencias en medicina es el desarrollo de nuevas técnicas de intervención quirúrgica menos invasivas, evitando operaciones a cuerpo abierto y por tanto reduciendo el coste de la intervención y el tiempo de recuperación del paciente. Estas técnicas laparoscópicas se aplican en diversos campos de la medicina, sin embargo, la carencia de un injerto óseo sintético inyectable ha limitado su aplicación en ortopedia y cirugía maxilofacial. Los cementos de fosfatos de calcio (CPC), los cuales pueden ser inyectados, son una posible alternativa. No obstante, y a pesar de que los CPC son materiales intrínsecamente porosos, la porosidad que poseen no es del tamaño adecuado para que el hueso penetre y crezca en su interior.

Por esta razón diversos trabajos de investigación se han enfocado en producir CPC macroporosos (ver capítulo 2, sección 2.3.2). No obstante, no todas las estrategias desarrolladas permiten inyectar el cemento cuando se encuentra aún en forma de pasta, y por tanto, dan origen tan sólo a injertos óseos con similitud composicional y también microestructural a la fase inorgánica del hueso. En el caso de cementos macroporosos inyectables, la cantidad de agente porógeno incorporado, para lograr una macroporosidad abierta aceptable, representa una limitante que puede comprometer la biocompatibilidad del cemento [1].

Como alternativa, en este trabajo se propone la obtención de espumas inyectables de HA a partir del espumado de la fase líquida de un cemento en base a fosfato tricálcico alfa (α -TCP). La hipótesis de esta metodología se basa en que una vez que el polvo del cemento se mezcla con la espuma, ésta actuará como plantilla para la porosidad, de tal forma que cuando el cemento endurezca por efecto de la reacción de fraguado, retendrá las burbujas de la espuma como macroporos. Además, se espera que mientras la espuma tiene la consistencia de una pasta, ésta pueda ser inyectada para que se adapte a la geometría de la cavidad a rellenar.

Para obtener una espuma líquida estable, que soporte los esfuerzos producidos durante el mezclado con el polvo de cemento, se propone incorporar en la fase líquida un agente espumante. Puesto que se pretende inyectar la pasta en el cuerpo humano, el espumante debe ser biocompatible. Por tal motivo, una alternativa para esta aplicación son los surfactantes que han sido aprobados como excipientes en formulaciones de fármacos para aplicaciones parenterales. Este hecho restringe considerablemente las posibilidades, ya que sólo algunos surfactantes no iónicos cumplen con los requisitos señalados. Dentro de las posibilidades se seleccionó como agente espumante de la fase líquida el polioxietileno 20 sorbitano mono oleato, también conocido como Polisorbato 80 o bajo su nombre comercial Tween 80. Este surfactante es altamente soluble en agua, y es empleado en la fabricación de medicamentos y vacunas de administración por vía parenteral [2-5]. Una revisión más extensa de los surfactantes y las espumas líquidas se presenta en el capítulo 2, sección 2.7.

3.2 Objetivos

Los objetivos del presente capítulo son:

1. Obtener espumas inyectables y autoconsolidables de HA con características adecuadas para promover la regeneración del tejido óseo, a partir del espumado de la fase líquida de un cemento en base a α -TCP, empleando como agente espumante el surfactante sintético Tween 80.
2. Analizar y entender los parámetros de procesado que controlan las propiedades de las espumas de HA, para en el futuro poder aplicar el proceso de espumado con agentes espumantes naturales como la gelatina, el alginato de sodio y/o el extracto de soja.
3. Mejorar las propiedades mecánicas de las espumas sólidas obtenidas a través de la sinterización. Se pretende estudiar los cambios composicionales y estructurales producidos.

3.3 Materiales y métodos

3.3.1 Preparación del cemento

3.3.1.1 Síntesis del α -TCP

Se sinterizaron lotes de 150 g de α -TCP a alta temperatura mezclando cantidades estequiométricas de CaHPO_4 (monetita; Sigma, Ref. C7263) y CaCO_3 (carbonato de calcio; Sigma, Ref. C4830), de acuerdo con la ecuación 3.1. Para asegurar la homogeneidad de la mezcla, ambos polvos fueron mezclados en seco durante 15 minutos a 1425 rpm (mezclador Whip Mix). Finalmente, la mezcla fue colocada en un crisol de platino/rodio que se introdujo en el horno para realizar el tratamiento térmico (Obersal CNR-58).



La tabla 3.1 muestra las diferentes etapas en el tratamiento térmico seguido durante la síntesis. El tratamiento cuenta con 3 rampas de calentamiento y una de enfriamiento. Además, cuenta con 3 zonas de temperatura constante, cada una con un propósito distinto descrito en la misma tabla. Por último, la etapa 7 consiste en un temple al aire para evitar la reversión de fase alfa a beta durante el enfriamiento.

Tabla 3.1: Etapas de la síntesis del α -TCP por reacción en estado sólido.

Etapa	T_0 [°C]	T_f [°C]	Rapidez [°C/min]	tiempo [min]	Objetivo
1	25	300	2.5	120	
2	300	300	-	120	Descomposición de la monetita en pirofosfato de cálcico y agua. $2\text{CaHPO}_4 \rightarrow \text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7 + \text{H}_2\text{O}$
3	300	1100	2.5	320	Descomposición del carbonato a óxido de calcio. $\text{CaCO}_3 \rightarrow \text{CaO} + \text{CO}_2$
4	1100	1100	-	120	Reacción en estado sólido para obtener β -TCP. $\text{CaO} + \text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7 \rightarrow \beta - \text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$
5	1100	1400	2.5	120	
6	1400	1400	-	120	Obtención de la fase α del TCP. $\beta - \text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2 \rightarrow \alpha - \text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$
7	1400	25	1375	1	Retención de la fase α a baja temperatura.

3.3.1.2 Molienda del α -TCP

Posterior a la síntesis, el α -TCP fue sometido a molienda en un molino de tipo planetario (Fritsch Pulverisette 6) para obtener un polvo con el cual fabricar el cemento. El protocolo de molienda empleado fue el denominado 15:450. Consiste en moler 145 g de α -TCP durante 15 minutos a 450 rpm, en un recipiente de ágata que contiene 10 bolas de ágata de 3 cm de diámetro. Es importante señalar que el α -TCP debe ser colocado en el recipiente sobre las bolas para optimizar la molienda. Una imagen del molino empleado se presenta en la figura 3.1.



Figura 3.1: Molino empleado en la molienda del α -TCP bajo el protocolo 15:450. Para una buena eficiencia las partículas de α -TCP deben ser colocadas sobre las bolas de ágata.

La distribución de tamaños de partícula obtenida después de la molienda fue determinada por difracción laser del polvo suspendido por ultrasonidos en etanol durante 5 minutos (LS 13 320 Beckman Coulter, USA). Además, la composición del polvo fue corroborada por difracción de rayos X (DRX; Simens D-500).

3.3.1.3 Obtención del cemento H

El cemento empleado en esta investigación fue el denominado cemento H [6]. Consiste en la mezcla de α -TCP al 98 % en peso con 2 % en peso de HA precipitada (pHA; Alco, ref. 1.02143.1000). La mezcla de polvos se realizó en seco durante 15 minutos a 1425 rpm (mezclador Whip Mix). Finalmente, el cemento obtenido fue almacenado a temperatura ambiente en un lugar limpio y seco dentro de recipientes herméticos de plástico hasta su uso.

3.3.2 Solución de surfactante y proceso de espumado de la fase líquida

La fase líquida del cemento consistió en la disolución acuosa al 2.5 % en peso/volumen (w/v) de Na_2HPO_4 (Merck, ref. 06586.0500), usado como acelerante de la reacción de fraguado [7], y Tween 80 (Sigma, ref. P4780) empleado como agente espumante; en concentraciones de: 0, 0.5, 1, 2.5, 5, 10 y 20 % en w/v. Todas las disoluciones se prepararon con agua destilada (millipore).

3.3.2.1 Condiciones de espumado de la fase líquida

Las condiciones de espumado de la fase líquida fueron mantenidas constantes a lo largo de la investigación y se describen a continuación: 2 ml de disolución de surfactante fueron espumados durante un minuto a temperatura ambiente (25 °C), a una velocidad de agitación de 11000 rpm, dentro de recipientes de polipropileno de 3 cm de diámetro y 7 cm de alto (Eurotubo – Deltalab). La mezcla de la espuma con el polvo se realizó en el mismo recipiente del espumado cuidando de no romper la espuma formada.

3.3.2.2 Adaptación de un agitador de mano para obtener espumas líquidas

El agitador empleado para formar la espuma líquida fue desarrollado como parte de esta tesis. Consistió en la adaptación de un batidor domestico comercial a base de baterías (Ikea 301.000.41). Dicho equipo es alimentado por dos baterías AA que suministran un voltaje de 1.5 V a un motor eléctrico. El motor transmite la torsión a una punta de acero inoxidable en forma de anillo recubierto por un espiral. Este diseño permite obtener espumas líquidas en un periodo de un minuto. Además, el batidor es fácilmente manipulable debido a sus dimensiones reducidas (1.5 cm de ancho, 3 cm de grosor y 20 cm de largo), lo que le da gran versatilidad de uso.

La adaptación del batidor consistió en eliminar la dependencia del uso de baterías, conectando el motor directamente a un transformador de corriente (220 v --- 1.5 v). Otro cambio importante fue el poder emplear puntas intercambiables (aspa de espumado), con lo que se espera poder espumar en condiciones de esterilidad (ver capítulo 6 de esta tesis).

En términos prácticos y económicos resultaba más rentable adaptar un modelo de batidora comercial que construir un prototipo similar. Antes de las modificaciones, la potencia del agitador dependía de la calidad y carga de las baterías, produciendo frecuentemente variaciones en la velocidad de espumado. Con la alimentación por medio del transformador de corriente la potencia del equipo se mantuvo constante, por lo que se eliminaron variaciones en la obtención de espumas líquidas.

La figura 3.2 muestra una imagen del batidor donde se listan sus componentes más representativos.

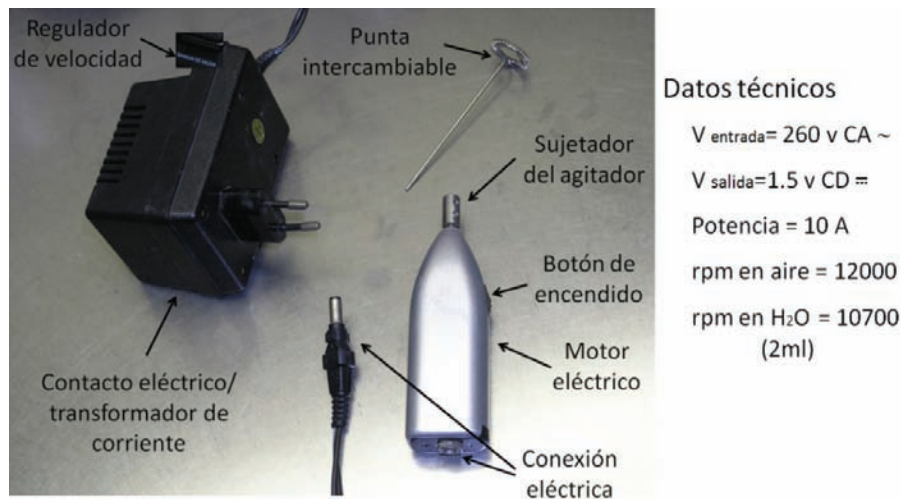


Figura 3.2: Imagen de las piezas que conforman el batidor eléctrico de mano, modificado para producir espumas reproducibles con la fase líquida del cemento.

3.3.3 Fabricación de los cementos espumados

Para la fabricación de los cementos se formó una espuma por agitación mecánica con la fase líquida del cemento (ver sección anterior). A la espuma obtenida se le agregó la fase sólida, para posteriormente mezclar ambas fases por medio de una espátula hasta obtener una pasta homogénea. Diversos métodos de mezclado fueron probados para determinar cuál de ellos conservaba de la mejor manera a la espuma (agregar lentamente el polvo mientras se mezclaba, agregar el polvo súbitamente y después mezclar a diferentes velocidades, etc.). Las proporciones líquido/polvo (L/P) de mezclado empleadas en este estudio fueron 0.32, 0.38, 0.40, 0.45, 0.50, 0.55 y 0.65 ml/g, donde el volumen corresponde al volumen del líquido antes de espumar. Finalmente, la pasta fue moldeada, con espátula o por inyección, dentro de moldes de teflón para obtener probetas cilíndricas de 6 mm de diámetro por 12 mm de altura. Para completar la reacción de fraguado, las muestras que tuvieron cohesión fueron sumergidas inmediatamente y durante 7 días en solución de Ringer (0.9 % de NaCl) a 37 °C. Las muestras sin cohesión fueron envueltas en papel de aluminio, para evitar la evaporación de agua, durante 24 h (a 37 °C) antes de ser sumergidas en solución de Ringer a 37 °C. El esquema del proceso de espumado puede observarse en la figura 3.3.

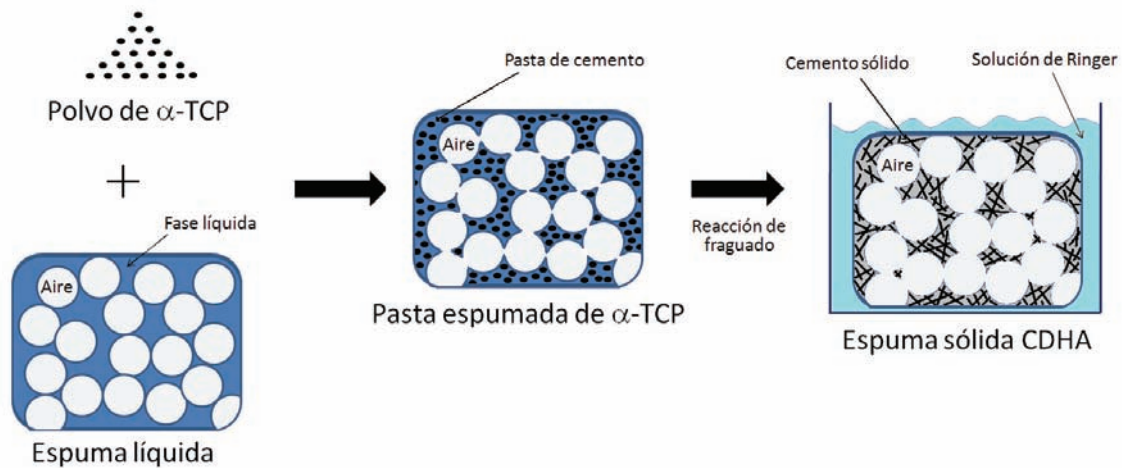


Figura 3.3: Esquema de las etapas del proceso de obtención de espumas de HA deficiente en calcio (CDHA) por medio del espumado de la fase líquida.

3.3.4 Diseño experimental

El desarrollo experimental de esta investigación se dividió en cuatro etapas. La primera de ellas consistió en determinar la espumabilidad de las disoluciones de Tween 80 y la estabilidad de sus espumas, para correlacionar estos parámetros con la macroporosidad inducida en los cementos.

La segunda etapa, y tal vez la más importante, fue determinar el efecto de las variables del proceso de fabricación sobre la respuesta del material. En esta etapa se analizó por separado el efecto de las variables del proceso de espumado y las variables del proceso de moldeo.

La tercera etapa consistió en un estudio cinético de la reacción de fraguado del cemento para determinar los efectos del Tween 80 sobre la reacción de hidrólisis del α-TCP.

Por último, la cuarta etapa consistió en la sinterización de los andamios macroporosos como método para obtener espumas de β-TCP.

3.3.4.1 Espumabilidad y estabilidad de las espumas de Tween 80

La espumabilidad de las disoluciones se definió como el incremento porcentual en volumen del líquido al ser espumado mediante las condiciones descritas anteriormente. 10 ml de espuma fueron colocados dentro de una probeta graduada donde se esperó a que la espuma colapsara. Cuando la espuma desapareció se midió el volumen de líquido contenido en los 10 ml de espuma. Finalmente, la espumabilidad se calculó de acuerdo a la ecuación 3.2 [8].

$$\%E = \frac{V_E - V_L}{V_L} * 100 \quad \text{EQ 3.2}$$

Donde: %E es el porcentaje de espumabilidad, V_E es el volumen de la espuma introducida en la probeta = 10 ml y V_L es el volumen de líquido contenido en la espuma.

Por otro lado, la estabilidad de la espuma se definió como el tiempo de vida media de la espuma obtenida. Experimentalmente fueron introducidos 10 ml de espuma en una probeta graduada. Inmediatamente se registró en función del tiempo el volumen del líquido formado en el fondo de la probeta hasta el colapso completo de la espuma, para *a posteriori*

determinar a qué tiempo se había producido la aparición del 50 % del líquido total contenido en los 10 ml de espuma iniciales [8]. Un mínimo de 3 replicas fueron realizadas a temperatura ambiente en cada experimento.

Las concentraciones de Tween 80 estudiadas fueron 0, 0.5, 1, 2.5, 5, 10 y 20 % en w/v, todas ellas con un 2.5 % w/v de Na₂HPO₄ empleado como acelerante de la reacción de fraguado.

Finalmente, para caracterizar la morfología de las espumas líquidas se tomaron imágenes con una cámara digital Olympus C-5060, adaptada a un estereoscopio Olympus SZ51, con sistema de luz Olympus KL 1500 LCD.

3.3.4.2 Variables del proceso de espumado y respuestas analizadas

El diseño experimental en el que se centra este capítulo consistió en determinar el efecto de los parámetros del proceso de espumado, tales como la concentración de surfactante en la fase líquida, la proporción L/P de mezclado y el empleo del acelerante de la reacción de fraguado, sobre las respuestas del cemento listadas en la figura 3.4. La misma figura indica los límites asignados a cada variable independiente.

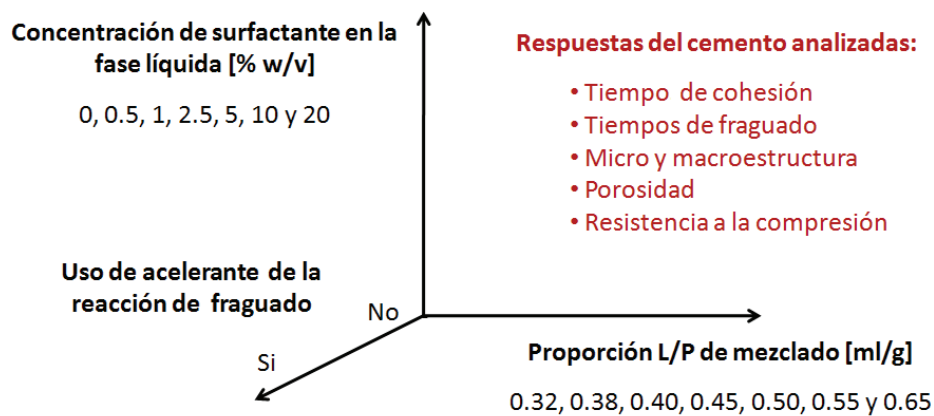


Figura 3.4: Representación de las variables independientes analizadas y listado de las respuestas cuantificadas en el desarrollo de espumas sólidas de HA.

Las respuestas del material se determinaron de acuerdo a las condiciones descritas en la sección correspondiente a las técnicas de caracterización. En particular, la estructura, la porosidad y la resistencia a la compresión fueron determinadas después de 7 días de fraguado por inmersión en disolución de Ringer a 37 °C.

En algunos casos cementos no espumados fabricados bajo las mismas condiciones que las espumas sólidas fueron empleados como material de referencia.

3.3.4.3 Efecto del tipo de moldeo sobre la porosidad

Como parte del efecto de las variables de fabricación, se estudió también el efecto del tipo de moldeo, i) con espátula o ii) por inyección a dos diferentes tiempos, sobre la inyectabilidad de las pastas espumadas, la resistencia a la compresión, la porosidad y la estructura de las espumas fraguadas durante 7 días por inmersión en disolución de Ringer a 37 °C. Los tiempos a los cuales se inyectó la pasta fueron 2.5 y 5 minutos desde el contacto de la fase sólida con la

fase líquida (composición del líquido: 2.5 % acelerante y 5 % Tween 80). En este estudio fueron analizadas dos proporciones L/P, 0.50 y 0.65 ml/g.

3.3.4.4 Efecto del aceite desmoldeante sobre la macroporosidad abierta en la superficie

Adicionalmente se investigó el efecto sobre la macroporosidad abierta en la superficie de las espumas que tuvo la aplicación de un aceite desmoldeante en el interior de los moldes.

Para ello, se prepararon espumas de HA en moldes previamente impregnados con el aceite (Desmold 420 Solypplast) y se compararon visualmente con espumas fabricadas bajo las mismas condiciones en moldes sin la impregnación del aceite.

Se tomaron imágenes de la superficie de las espumas fraguadas con una cámara digital Olympus C-5060, adaptada a un estereoscopio Olympus SZ51, con sistema de luz Olympus KL 1500 LCD.

3.3.4.5 Estudio cinético de la reacción de fraguado

Con el objetivo de determinar el efecto del Tween 80 sobre la reacción de fraguado del cemento se llevó a cabo un estudio cinético. Se determinó el porcentaje de reacción mediante DRX y la resistencia a la compresión del cemento con y sin Tween 80 a diferentes tiempos de reacción (0, 2, 8, 24, 72 y 168 horas). El fraguado se realizó sumergiendo las muestras en disolución de Ringer a 37 °C. El estudio se realizó con cementos espumados y sin espumar, con una proporción L/P de 0.65 ml/g y un contenido de Tween 80 en la fase líquida del 5 %. Ambos materiales contenían 2.5 % de acelerante.

3.3.4.6 Sinterización de las espumas de hidroxiapatita

Finalmente, se estudio la sinterización con el objetivo de obtener cerámicas macroporosas de β -TCP, que probablemente tendrán mejores propiedades mecánicas que las espumas de HA. Se estudió la sinterización a 900 y 1100 °C durante 2.5 horas y a 1100 °C durante 10 horas. El tratamiento térmico realizado contaba con dos rampas de calentamiento; la primera de temperatura ambiente a 400 °C a una rapidez de 2.5 °C/min y la segunda de 400 °C a la temperatura de sinterización, a una rapidez de 5 °C/min. Una vez alcanzada la temperatura de tratamiento, ésta se mantuvo constante durante el tiempo indicado. Finalmente, las muestras se enfriaron dentro del horno tipo mufla (Hobersal Mod. 12 PR/300 serie 8B) durante aproximadamente 12 horas para alcanzar la temperatura ambiente y evitar fracturas por choque térmico.

El efecto de tratamiento térmico sobre la resistencia mecánica se determinó realizando ensayos de compresión. La contracción del área transversal fue tomada en cuenta para el cálculo de la resistencia a la compresión. Asimismo, el efecto del tratamiento sobre los diferentes niveles de porosidad de los materiales se determinó mediante ensayos de porosimetría de intrusión de mercurio (MIP). Las fases cristalinas presentes se determinaron por DRX y la densidad esquelética se midió por picnometría de helio. Finalmente, fueron obtenidas en cada caso imágenes de microscopía electrónica de barrido (MEB) a diferentes magnificaciones.

3.3.5 Técnicas de caracterización

La respuesta de los materiales se caracterizó en base a las siguientes propiedades, bajo las condiciones de ensayo que se describen a continuación.

3.3.5.1 El tiempo de cohesión

El tiempo de cohesión se definió como el tiempo mínimo que debe transcurrir desde el contacto inicial de la fase líquida con la fase sólida, para que la pasta sumergida en un medio líquido mantenga su forma y no se desintegre. Para determinar los tiempos de cohesión se prepararon cilindros de cemento de 10 mm de diámetro por 5 mm de alto. Los cilindros se desmoldaron y sumergieron en solución de Ringer a 37 °C, a diferentes tiempos desde su preparación. Visualmente se determinó si la pasta se mantenía íntegra o no, en un período máximo de 24 horas. Se tomaron imágenes de los cementos con una cámara digital Olympus C-5060.

3.3.5.2 El tiempo inicial y final de fraguado

Los tiempos de fraguado en este trabajo se determinaron por el método de las agujas de Gillmore [9]. Este método permite determinar el tiempo inicial y final de fraguado mediante la indentación de una aguja gruesa y ligera para el tiempo inicial, y otra delgada y pesada para el tiempo final.

Para obtener superficies planas para la indentación, las pastas de cemento fueron moldeadas en anillos de latón con diámetro interno de 10 mm y altura de 5 mm. Los anillos con cemento se mantuvieron a temperatura y humedad ambiente durante el ensayo.

3.3.5.3 Inyectabilidad de las pastas espumadas

La inyectabilidad se definió como la cantidad de pasta de cemento que puede ser extruida con una jeringa comercial (cuerpo de 1 cm de diámetro, con capacidad para 5 ml y con apertura de 2 mm de diámetro) aplicando una fuerza hasta un máximo de 100 N [10,11]. El ensayo se realizó en una máquina universal de ensayos mecánicos (MTS Bionix 858) con una velocidad de avance constante de 15 mm/min hasta alcanzar la fuerza máxima de ensayo. La figura 3.5 ilustra el dispositivo experimental. La cantidad de pasta inyectada se cuantificó pesando la jeringa antes y después del ensayo de acuerdo a la ecuación 3.3.

$$Iny = \frac{W_F - W_A}{W_F - W_E} * 100 \quad \text{EQ 3.3}$$

Donde: *Iny* es el porcentaje de inyectabilidad, W_E es el peso de la jeringa vacía, W_F es el peso de la jeringa llena de cemento y W_A es el peso de la jeringa después del ensayo.

Un mínimo de 3 jeringas fueron ensayadas por cada serie analizada.

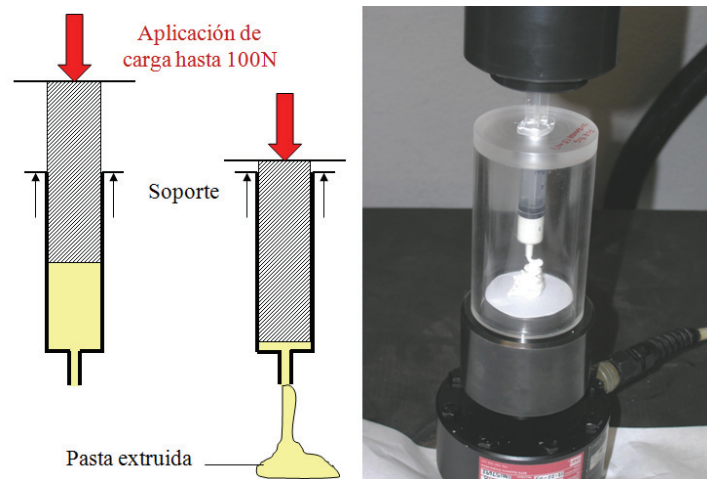


Figura 3.5: Diagrama y vista real del dispositivo experimental empleado durante la prueba de inyectabilidad.

3.3.5.4 La micro y macroestructura

La superficie de fractura transversal de las muestras fraguadas durante 7 días por inmersión en disolución de Ringer y fracturadas a mano fue observada por medio de microscopía electrónica de barrido (MEB) con un equipo Jeol JSM 6400 o Hitachi H-4100FE. Para el primer equipo, la superficie de las muestras fue recubierta con oro, mientras que para el segundo equipo las muestras fueron recubiertas con carbono hasta obtener un tono blanco ligeramente velado (tiempo de exposición menor a un segundo). Las muestras fueron colocadas sobre portamuestras metálicos y adheridas con suspensión de plata para asegurar el contacto eléctrico. El uso de un equipo u otro dependía de la porosidad de las muestras; el equipo Hitachi permite trabajar con voltajes menores (3 a 5 Kv) en comparación del Jeol (15 Kv), lo que retarda la saturación de cargas en la muestra y facilita la toma de imágenes.

3.3.5.5 La porosidad

El porcentaje de porosidad de las espumas fraguadas durante 7 días por inmersión en disolución de Ringer a 37 °C fue determinado mediante dos técnicas: a) Inmersión en mercurio y b) Porosimetría de intrusión de mercurio (MIP).

a) Inmersión en mercurio: La densidad aparente de los materiales se determinó por inmersión en mercurio. La inmersión en mercurio determina el peso de mercurio desplazado (W_{Hg}) al sumergir la muestra de peso W_s conocido dentro de mercurio líquido. Al dividir el peso de mercurio desplazado por la densidad del mercurio ($\rho_{Hg} = 13.57 \text{ g/ml}$) se obtiene el volumen de mercurio desplazado, o lo que es igual, el volumen de la muestra sumergida, según el principio de Arquímedes. Por tanto se puede determinar la densidad aparente de la muestra ($\rho_{aparente}$) mediante la ecuación 3.4.

$$\rho_{aparente} = \frac{W_s}{\frac{W_{Hg}}{\rho_{Hg}}} \quad \text{EQ 3.4}$$

Finalmente, el porcentaje de porosidad total ($\% \Pi_{Tot}$) fue calculado empleando la ecuación 3.5.

$$\% \Pi_{Tot} = \left(1 - \frac{\rho_{aparente}}{\rho_{esquelética}} \right) * 100 \quad \text{EQ 3.5}$$

Donde: $\rho_{esquelética}$ es la densidad esquelética de la muestra determinada por picnometría de helio (ver sección 3.3.5.6). Se ensayaron tres muestras por cada composición.

El porcentaje de macroporosidad total se calculó en base a la densidad aparente de muestras espumadas y no espumadas, determinadas mediante inmersión en mercurio. En este caso la macroporosidad total se definió como la porosidad introducida por el espumado. Para realizar el cálculo se asumió que las muestras sin espumar no poseen macroporos y por tanto la porosidad total de estas corresponde únicamente a la porosidad intrínseca del cemento no espumado [12]. La ecuación 3.6 resume el cálculo realizado.

$$\% \Pi_{Ma,E} = \left(1 - \frac{\rho_{aparente,E}}{\rho_{aparente,R}} \right) \times 100 \quad \text{EQ 3.6}$$

Donde: $\% \Pi_{Ma,E}$ es el porcentaje de macroporosidad en la espuma, $\rho_{aparente,E}$ es la densidad aparente de la espuma y $\rho_{aparente,R}$ es la densidad aparente de la referencia preparada con la misma proporción L/P que la espuma, ambas medidas por inmersión en mercurio.

La diferencia entre el porcentaje de macroporosidad total y la porosidad total fue considerada como el porcentaje de nano/microporosidad (porosidad intrínseca) del cemento espumado.

b) Porosimetría de intrusión de mercurio: La MIP (Micromeritics, AutoPore IV 9500) se usó para determinar el porcentaje de porosidad abierta, así como la distribución de la porosidad en función del tamaño de entrada de poro (ver capítulo 2 sección 2.6.1). La distribución de la porosidad se representó gráficamente en función del tamaño de entrada de poro en escala logarítmica.

Con esta técnica la nano/microporosidad abierta fue considerada como aquella con tamaños de entrada de poro menores a 5 μm , mientras que la macroporosidad abierta se consideró como aquella con interconexiones mayores a 5 μm .

Cabe hacer énfasis en que la macroporosidad abierta es aquella que se determinó mediante MIP, en tanto que la macroporosidad total corresponde a la calculada a partir de los resultados de inmersión en mercurio.

3.3.5.6 Picnometría de helio

La picnometría de helio (Micromeritics, AccuPyc 1330) se empleó para medir la densidad esquelética de los materiales. Fragmentos de las muestras ensayadas a compresión sirvieron como muestra para el ensayo. Los ensayos se realizaron una única vez haciendo 10 purgas y 5 medidas para obtener un promedio de densidad.

3.3.5.7 Resistencia a la compresión

La resistencia a la compresión se determinó mediante una máquina universal de ensayos mecánicos (MTS 858 Bionix) equipada con una celda de carga de 2500 N, a una velocidad de avance del cabezal de 1 mm/min. Para el caso de las muestras con resistencias menores a 90 N el ensayo se realizó en una máquina Adamel Lhomargy (modelo DY 32/34) equipada con una celda de carga de 100 N. Las probetas consistían en cilindros de 6 mm de diámetro por 12 mm de alto. Un mínimo de 6 probetas fueron empleadas en cada caso.

3.3.5.8 Difracción de rayos X y cálculo del porcentaje de reacción

Los estudios de DRX se realizaron sobre las muestras previamente ensayadas a compresión, después de ser pulverizadas a mano en un mortero de ágata. Para detener la reacción de fraguado las muestras se sumergieron en acetona durante una hora y posteriormente se secaron a 37 °C durante una noche. Los ensayos se realizaron en un difractómetro para polvos Simens D-500, equipado con ánodo de cobre (CuK α , 40 mA, 45 Kv) y monocromador del haz. El barrido se realizó de 4 a 100° en la escala 2 θ , con un incremento de paso de 0.017° a una rapidez de 50 s/paso.

El porcentaje de reacción se determinó midiendo la intensidad de los picos principales de difracción del α -TCP (12.10, 14.02, 15.16, 22.20, 24.10 y 30.74 grados en 2 θ) de acuerdo con las ecuaciones 3.7 y 3.8. La intensidad de los picos se determinó empleando el programa WinPLOTR v.dic.2005 (<http://www-llb.cea.fr/fullewb/winplotr/winplotr.htm>).

$$W_t = \frac{I_t M_{CDHA}}{M_{\alpha-TCP} I_0 - I_t (M_{\alpha-TCP} - M_{CDHA})} \quad \text{EQ 3.7}$$

$$R_t = \frac{w_0 - w_t}{w_0} * 100 \quad \text{EQ 3.8}$$

Donde: I_t es la intensidad del pico al tiempo t , I_0 es la intensidad del pico al tiempo cero de reacción, $M_{\alpha-TCP}$ es el coeficiente de adsorción del α -TCP = 86.43 cm²/g, M_{CDHA} es el coeficiente de adsorción de la CDHA = 84.97 cm²/g, w_0 es la fracción inicial de α -TCP en el cemento = 1, w_t es la fracción de α -TCP al tiempo t y R_t es el porcentaje de reacción al tiempo t .

El porcentaje de reacción reportado corresponde al promedio de los valores obtenidos entre todos los picos analizados, para cada tiempo de interés.

3.3.5.9 Superficie específica

La adsorción de nitrógeno a 77 K (método Brunnauer–Emmet–Teller, BET; ASAP2020, Micromeritics) fue empleada para medir la superficie específica de los materiales. Fragmentos de las muestras ensayadas a compresión sirvieron como muestra para el ensayo. Para detener la reacción de fraguado, previo al análisis por BET, las muestras se sumergieron en acetona durante una hora y finalmente se secaron a 37 °C durante una noche.

3.3.6 Análisis estadístico de los resultados

Las pruebas de igualdad de medias se realizaron aplicando la prueba estadística t de Student. El criterio de rechazo o aceptación de la hipótesis nula se fijó en un porcentaje de confiabilidad del 0.05 %.

3.4 Resultados y discusión

3.4.1 Caracterización de la fase sólida del cemento

La figura 3.6 muestra el diagrama de difracción experimental correspondiente al α -TCP sintetizado y molido de acuerdo con la descripción anterior. Los círculos rojos en la figura corresponden a las posiciones, en 2θ , de los picos de difracción del α -TCP reportados en la ficha cristalográfica (JCPDS 09-0348). Se observa como el diagrama experimental concuerda con la ficha cristalográfica, lo que corrobora que el proceso de obtención de α -TCP es adecuado.

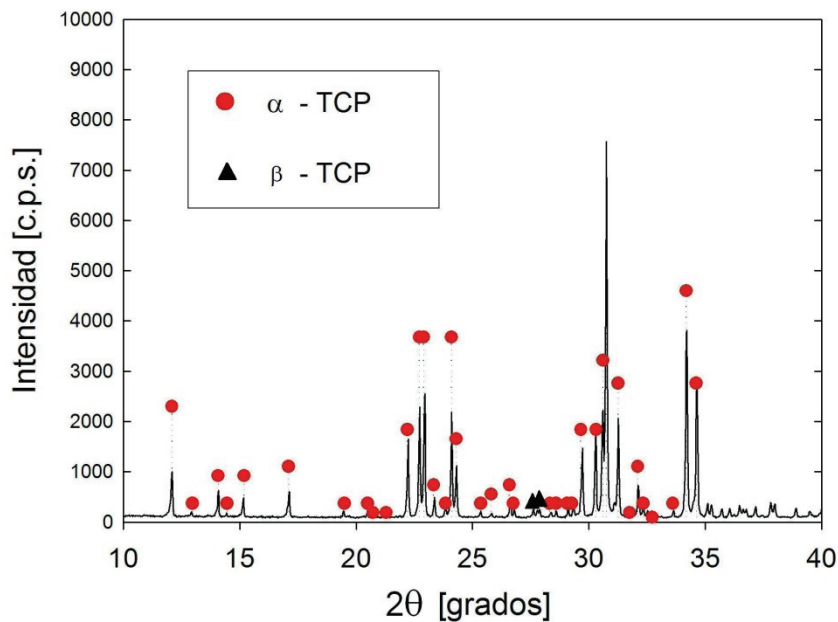


Figura 3.6: Comparación entre el diagrama de difracción experimental del polvo de cemento y la ficha cristalográfica correspondiente al α -TCP (JCPDS 09-0348).

Como excepción, a 27.5 y 27.7 grados en 2θ , existen dos picos de baja intensidad que no concuerdan con la ficha cristalográfica del α -TCP. Ambos picos son constantes en todos los diagramas de α -TCP obtenidos. El pico situado a 27.5 grados podría corresponder a la fase β del TCP, no obstante, el segundo pico no concuerda con dicha fase. La presencia de la fase β es factible, ya que la etapa del temple podría no ser suficiente para abolir completamente la transformación de fases. Además, existen indicios de la presencia en bajas cantidades de β -TCP al emplear métodos de síntesis similares al utilizado en este trabajo [6]. Sin embargo, la presencia en bajas cantidades de la fase β no representa ningún inconveniente para la finalidad de uso del cemento.

La figura 3.7 muestra la distribución de tamaño, la media, la mediana y la moda de las partículas de α -TCP obtenidas con el protocolo de molienda 15:450. Asimismo, se presenta la superficie específica y la densidad esquelética (medida por picnometría de helio) del α -TCP después de la molienda. Estos parámetros son importantes debido a que de ellos dependen las propiedades del cemento de partida [13].

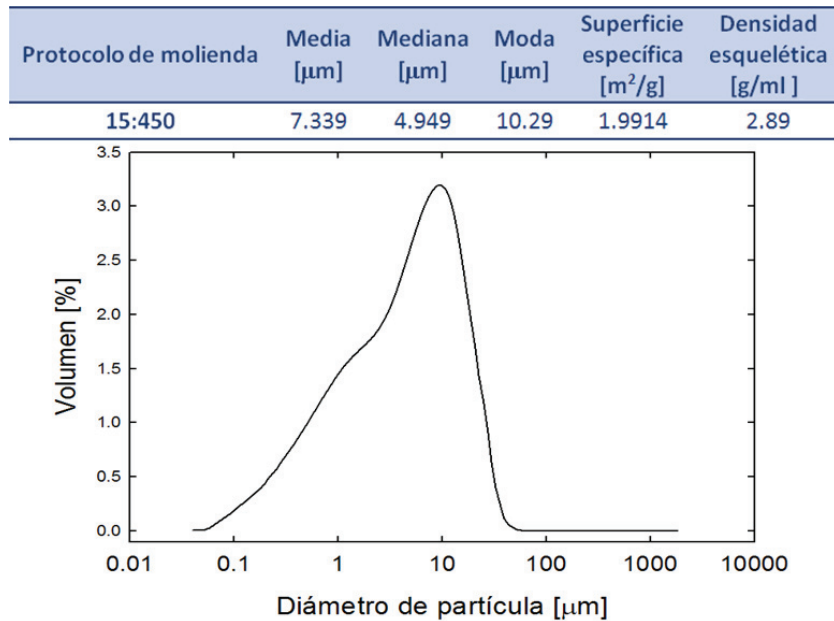


Figura 3.7: Distribución de tamaños de partícula para el α -TCP obtenida con el protocolo de molienda 15:450. La tabla en la figura muestra algunas propiedades texturales del polvo obtenido.

El tamaño medio de partícula obtenido con el protocolo de molienda 15:450 fue de 7.34 μm , con una superficie específica de 1.99 m^2/g , lo cual coincide con otros valores reportados para este mismo proceso de obtención del α -TCP [14]. Por otro lado, la moda indica que el tamaño de partícula más abundante es 10.29 μm . Puesto que este valor es mayor a la media, en la figura se observa una distribución sesgada hacia la derecha. Finalmente, la mediana indica que el 50 % de las partículas es mayor o menor a 4.95 μm .

En particular el cemento obtenido concuerda con las características de un cemento reportado en la literatura considerado como grueso (coarse) [15], para el cual se estableció que fragua formando cristales de HA deficiente en calcio (CDHA) con forma de placas, a diferencia de un cemento con la misma composición pero con una distribución inicial de partículas de menor tamaño considerado como fino, el cual fragua formando cristales en forma de agujas. Es importante señalar que estos trabajos mencionan que en el cemento grueso la proliferación celular se favorece, mientras que en el cemento fino se retrasa la proliferación y se activa más rápidamente la diferenciación celular [15].

Finalmente señalar que la densidad esquelética obtenida para el α -TCP es igual a 2.89 g/ml, un valor prácticamente idéntico a la densidad teórica reportada para la fase α (2.86 g/ml [16]), pero inferior comparado con la densidad teórica reportada para la fase β del TCP (3.07 g/ml [16]). Esta diferencia es normal debido a que las fases de alta temperatura suelen tener densidades inferiores comparadas con las fases de baja temperatura.

3.4.2 Espumabilidad y estabilidad de las espumas de Tween 80

La caracterización de la espuma líquida se realizó con la intención de correlacionar el efecto de la concentración de surfactante sobre la macroporosidad inducida en el cemento. Los resultados correspondientes a la espumabilidad de la disolución y la estabilidad de la espuma se presentan en la figura 3.8.

En primer lugar se observa que la espumabilidad no cambió tan significativamente como la estabilidad. El incremento en la espumabilidad fue sutil y sólo se observaron diferencias ligeramente significativas entre 0.5 y 5 % de Tween 80, mientras que para concentraciones intermedias o mayores la espumabilidad no cambió significativamente.

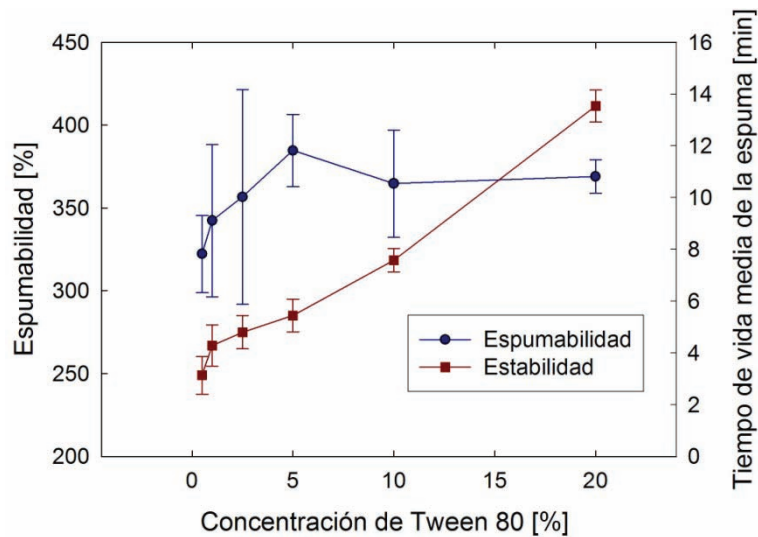


Figura 3.8: Espumabilidad de la fase líquida y estabilidad de la espuma formada en función de la concentración de Tween 80. Datos obtenidos a temperatura ambiente para disoluciones acuosas de Tween 80 con 2.5 % de Na_2HPO_4 .

Es importante mencionar que las concentraciones de Tween 80 empleadas en este estudio son mayores a la concentración micelar crítica (CMC) reportada para este surfactante [17]. Al trabajar con la concentración de Tween 80 por encima de la CMC no se detectó un efecto de esta variable en la espumabilidad de las disoluciones, porque la cantidad de aire que puede ser incorporada en forma de burbujas está limitada por la cantidad de líquido y no por la disponibilidad de surfactante. Sin embargo, el tamaño de las burbujas sí que se vio alterado por la concentración.

La figura 3.9 muestra las espumas obtenidas con 0.5 y 5 % de Tween 80 justo después del espumado. La espuma con 0.5 % de Tween (0.5%T-2.5Ac) está formada por burbujas esféricas con al menos dos tamaños diferentes, mientras que la espuma con 5 % de Tween 80 (5%T-2.5Ac) está formada por burbujas esféricas prácticamente del mismo tamaño. Además, el tamaño de las burbujas pequeñas contenidas en la espuma 0.5%T-2.5Ac es similar a el tamaño de las burbujas contenidas en la espuma 5%T-2.5Ac.

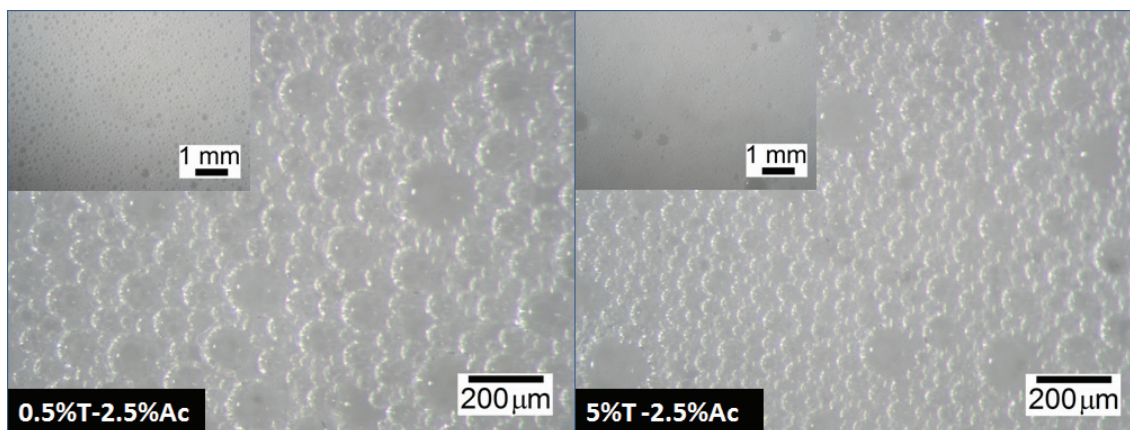


Figura 3.9: Imágenes de las espumas de Tween 80 tomadas inmediatamente después del espumado. Izquierda: concentración de Tween = 0.5 %. Derecha: concentración de Tween = 5 %. Ambas disoluciones contenían 2.5 % de Na_2HPO_4 . Los cuadros insertados corresponden a imágenes de las mismas espumas a menor magnificación.

La diferencia entre los tamaños de burbuja se explica por la cantidad de moléculas surfactantes disponibles para cubrir el área de la interfaz líquido/gas de la espuma. Mientras más alta sea la concentración de surfactante mayor será la disponibilidad de moléculas para cubrir mayor área y por tanto se podrán obtener y mantener mayor número de burbujas de menor tamaño. En cambio, concentraciones bajas producen espumas con burbujas inestables que inmediatamente tienden a crecer, lo que conlleva la formación de burbujas de tamaños distintos. En otras palabras el tamaño de las burbujas depende de la estabilidad de la espuma, que a su vez depende de la concentración de surfactante.

La estabilidad de la espuma se incrementa con el incremento de la concentración de Tween 80 para todo el intervalo analizado, presentando un punto de inflexión a una concentración de 2.5 % (ver figura 3.8). Por debajo del punto de inflexión la estabilidad de la espuma está relacionada sólo con la energía de la interfaz líquido/gas. Por tanto, mientras mayor cantidad de moléculas de Tween 80 estén disponibles para recubrir el área de la interfaz formada, mayor será la estabilidad de la espuma. Sin embargo, este fenómeno no incrementa linealmente la estabilidad, debido a que el efecto tensoactivo del Tween 80 tiene un límite. Este límite se relaciona con la saturación de la interfaz con moléculas tensoactivas, de tal forma que aún en exceso, las moléculas ya no tienen espacio para colocarse en la superficie para seguir disminuyendo la energía interfacial, y tienden a formar micelas en el seno del líquido.

Por otro lado, el incremento de la estabilidad por encima del punto de inflexión se puede relacionar con el drenaje gravitacional del líquido en la fase continua de la espuma [18,19]. La viscosidad de las soluciones de Tween 80 se incrementa con el incremento de la concentración debido a la formación de micelas, reduciendo el drenaje del líquido y por tanto estabilizando la pared de la espuma, lo cual se suma al efecto tensoactivo.

Estos resultados sugieren que el porcentaje de macroporosidad inducido en los cementos sólo podría llegar a presentar diferencias significativas entre aquellos fabricados con 0.5 y 5 % de Tween 80. Sin embargo, se analizó el efecto del Tween 80 sobre la porosidad para todas las concentraciones propuestas, con el objetivo de tener un mejor entendimiento de la interacción de la espuma con el cemento.

3.4.3 Mezcla del polvo de cemento con la espuma

Una vez obtenida la espuma líquida, el polvo del cemento fue agregado a ella en un solo paso. Se observó que la forma de mezclado del polvo con la espuma influye en la macroporosidad final del cemento, así mismo, se encontró que el mejor método de mezclado consta de dos etapas. En la primera, la mezcla con espátula debe realizarse lentamente para que la espuma moje al polvo. Inicialmente se tiene la impresión de que el cemento no forma una pasta moldeable. Sin embargo, 20 ó 30 segundos después se observa un incremento en la fluidez de la pasta. Es en este momento cuando se inicia la segunda etapa del mezclado. En la segunda etapa, la mezcla debe hacerse con más fuerza y velocidad, mediante movimientos circulares para conseguir homogenizar la pasta. Sin embargo, debe tenerse precaución de no exceder la fuerza y romper las burbujas de la espuma. Cuando la pasta es homogénea, puede ser moldeada sin dificultad. De acuerdo a los resultados se recomienda que el tiempo total máximo de mezclado sea de 1.5 minutos.

Debido a que las condiciones de mezclado fueron estandarizadas, la variación en la porosidad no superó el 12 % en el caso más catastrófico y en promedio para todas las series preparadas la desviación fue del 6 % de porosidad. Esta variación podría disminuirse aún más implementando un método automático de mezclado, para eliminar la variación asociada a la componente humana, ya que se requiere de una instrucción y un entrenamiento previo de la persona para que logre alcanzar una buena reproducibilidad.

Finalmente, se puede decir cualitativamente que cuanto menor es la proporción L/P, mayor es el esfuerzo necesario para homogenizar la pasta de cemento, lo cual puede disminuir el número final de burbujas contenidas en la pasta espumada.

3.4.4 Efecto de las variables del proceso de espumado sobre las propiedades de las espumas de hidroxiapatita

A continuación se presentan y analizan algunas propiedades de los cementos macroporosos, o lo que es igual, las espumas de hidroxiapatita fabricadas con acelerante. Los resultados para los cementos fabricados sin acelerante no se reportan porque los tiempos de cohesión y fraguado encontrados resultaron ser inadecuados para aplicaciones médicas.

3.4.4.1 Tiempo de cohesión.

El tiempo de cohesión para las pastas de cemento espumadas con 5 % de Tween 80 y con la incorporación de acelerante se presentan en la figura 3.10.

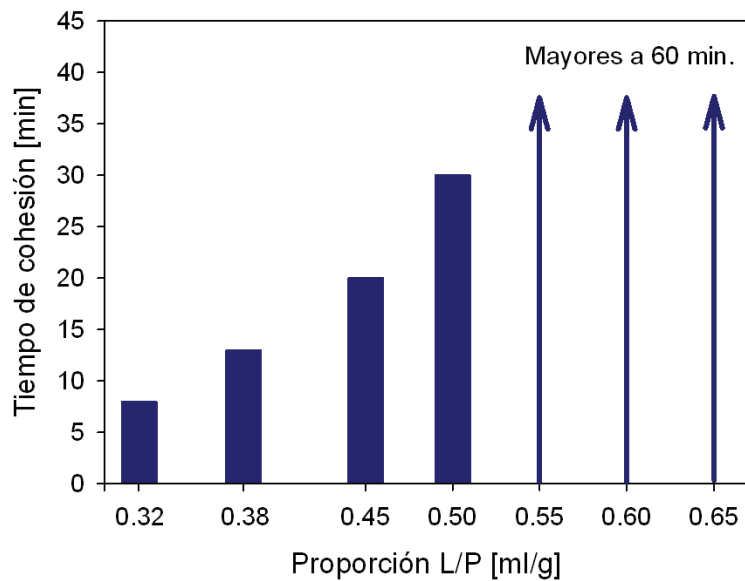


Figura 3.10: Tiempo de cohesión en función de la proporción L/P para las pastas de cemento espumadas con 5 % de Tween 80. Valores obtenidos con el empleo de 2.5 % de acelerante.

En ningún caso los cementos fabricados sin acelerante tuvieron cohesión al ser sumergidos en solución de Ringer. Por el contrario, los cementos espumados con la adición del acelerante tuvieron cohesión sólo con bajas proporciones L/P (0.32 a 0.50 ml/g), mientras que los cementos espumados con altas proporciones L/P (0.55 a 0.65 ml/g), pese a la incorporación del acelerante, no tuvieron cohesión a tiempos menores de 24 horas. Sin embargo, como se verá más adelante, fueron los cementos que presentaron una mayor macroporosidad.

No existe un punto claro en la transición cohesión/no cohesión de los cementos espumados, sino que se detectó un intervalo de L/P en el que la pasta sumergida en Ringer sufre de cambios de comportamiento. Se observó que pastas con proporciones L/P entre 0.32 y 0.40 ml/g tienen cohesión completamente, mientras que pastas con proporciones L/P entre 0.45 y 0.50 ml/g desprenden algunas partículas de cemento de la superficie, pero el resto de la pasta se mantiene intacta y endurece con el paso del tiempo. Por último, las pastas con proporciones L/P que no tienen cohesión pueden desintegrarse inmediatamente (L/P = 0.65 ml/g) ó bien resistir unos minutos antes de desintegrarse (30 minutos aproximadamente; L/P = 0.55 ml/g). La figura 3.11 muestra un ejemplo de cada caso descrito.

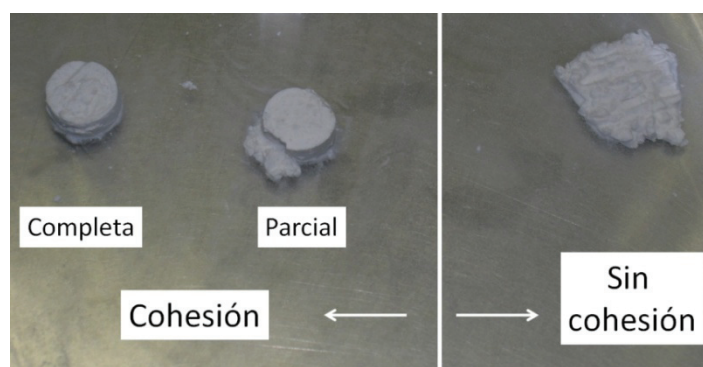


Figura 3.11: Diferentes comportamientos de las pastas de cemento espumadas en contacto con disolución de Ringer a 37 °C.

Además, se encontró que otro factor clave en la cohesión es la porosidad; a mayor porosidad menor cohesión de los cementos. Esto se puede explicar porque la porosidad facilita la entrada de líquido en la pasta provocando la desintegración.

Cabe mencionar que la condición de prueba de cohesión empleada en esta sección es más severa que la condición que se espera *in vivo*, debido a que la sangre es un líquido viscoso que contienen macromoléculas y células, lo que dificulta la penetración del fluido vía osmosis. En cualquier caso, la falta de cohesión de los cementos espumados con Tween 80 significa una limitación para el relleno de defectos óseos, que puede ser superada con el empleo de aditivos promotores de la cohesión como el alginato de sodio o la gelatina, entre otros [20].

Por otro lado, la integridad de la estructura prefraguada es independiente de la cohesión de la pasta en medio líquido, por lo que para el cultivo celular *in vitro* sobre cementos prefraguados, empleando medio de cultivo con viscosidad similar a la del agua, la cohesión de la pasta no es un factor determinante.

A partir de los resultados de cohesión, las aplicaciones médicas de las espumas de HA obtenidas con Tween 80 se pueden separar en dos grupos:

- 1) La cirugía de relleno de defectos óseos con la pasta de cemento autofraguable *in situ*, que requiere que el cemento tenga cohesión y sea fácilmente manipulable, es decir, proporciones L/P menores o iguales a 0.50 ml/g.
- 2) La fabricación *in vitro* de andamios con macroporos altamente interconectados para el cultivo celular *in vitro* o el relleno de defectos óseos con piezas prefraguadas, que no requieren cohesión de la pasta en medio líquido.

3.4.4.2 Tiempos de fraguado.

El método de Gillmore para determinar los tiempos de fraguado de los cementos espumados no resultó ser adecuado. La razón es que la macroporosidad incorporada facilita la cedencia de la pasta ante la penetración de una punta. Por tanto, a pesar de que el cemento fragua, la resistencia de la estructura no es suficiente para impedir la penetración de las agujas de Gillmore [21].

Para los casos de cementos fabricados con proporciones L/P de 0.32 y 0.38 ml/g, los cuales incorporaron poca macroporosidad, se pudo determinar que sin el uso del acelerante el tiempo de fraguado inicial superó los 40 minutos, para 10 y 20 % de Tween 80. A diferencia, con el uso de acelerante, y las mismas concentraciones de Tween 80, el tiempo inicial de fraguado no excedieron los 22 minutos. Estos últimos datos se presentan en la figura 3.12.

Además, en la figura 3.12 se puede observar que el aumento de la proporción L/P incrementa el tiempo de fraguado inicial de los cementos espumados, de forma similar a como incrementa el tiempo de fraguado de los cementos sin espumar [22]. El aumento de la concentración de Tween 80 en la fase líquida incrementa también el tiempo de fraguado inicial de los cementos espumados.

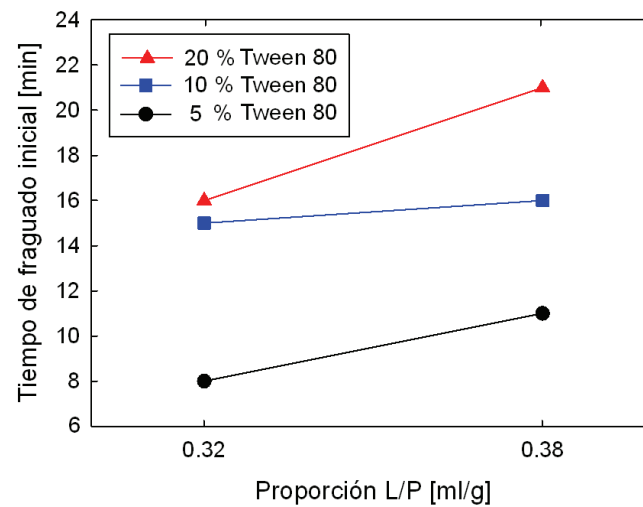


Figura 3.12: Tiempo de fraguado inicial determinado por el método de Gillmore para las pastas de cemento espumadas con 5, 10 ó 20 % de Tween 80 y bajas proporciones L/P (0.32 y 0.38 ml/g). Valores obtenidos con el empleo de 2.5 % de acelerante.

En base en estos resultados, y en los resultados de cohesión, los estudios de porosidad y resistencia a la compresión se realizaron siempre en cementos fabricados con el acelerante de la reacción de fraguado, ya que se obtienen pastas con mejores características para aplicaciones médicas.

3.4.4.3 Porosidad total y macroporosidad

En la Figura 3.13 se presenta la porosidad total y la macroporosidad medidas por inmersión en mercurio en función del contenido de Tween 80 en la fase líquida, para diversas proporciones L/P. En esta figura se observa que el aumento del contenido de Tween 80 disminuye la porosidad de los sustratos, siendo más marcado este efecto en la macroporosidad y para las proporciones L/P más altas.

Retomando los resultados de espumabilidad, se esperaba que concentraciones de Tween 80 superiores a 5 % no introdujeran mayor volumen de porosidad en los cementos espumados. Sin embargo, no se esperaba la caída de porosidad. Es posible que la mezcla del polvo con la espuma sea la causa del descenso y no la espumabilidad en sí. Como se mencionó, las soluciones más concentradas de Tween 80 son más viscosas, por lo que la incorporación del polvo en la pared líquida de la espuma se dificulta, requiriendo de mayor esfuerzo durante el mezclado lo cual puede llegar a romper mayor cantidad de burbujas, reflejándose en una menor macroporosidad final del cemento.

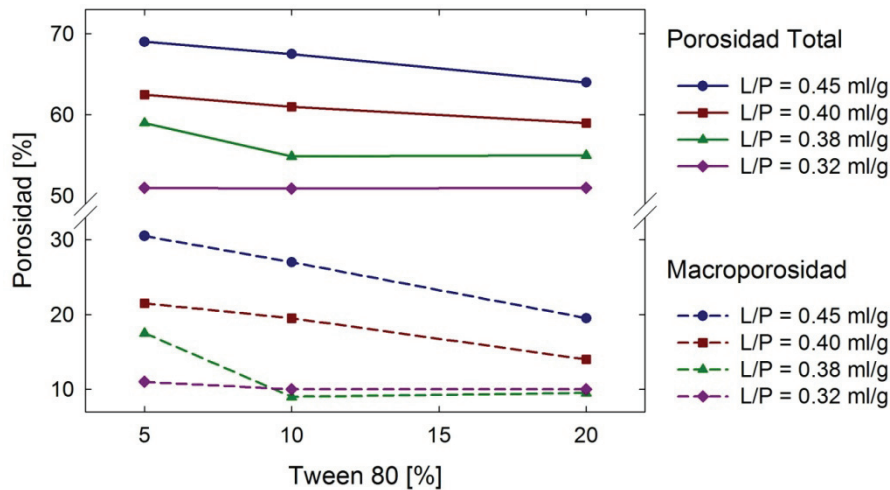


Figura 3.13: Porcentaje de macroporosidad y porosidad total de las espumas de HA, determinados por inmersión en mercurio en función del contenido de Tween 80 en la fase líquida del cemento, para diversas proporciones L/P y 2.5 % de acelerante.

En base a los resultados anteriores, se puede decir que contenidos de Tween 80 mayores a 5 % no son recomendables para obtener espumas de HA, debido a que:

- generan espumas líquidas con burbujas de menor tamaño,
- incrementan el tiempo de fraguado del cemento, y
- disminuyen la macroporosidad introducida.

Aunado a ello, es recomendable mantener la concentración de Tween 80 lo más baja posible para evitar posibles efectos citotóxicos por la incorporación del espumante. Por tal motivo se decidió continuar con la caracterización sólo de los cementos preparados con 0.5 y 5 % de Tween 80 en la fase líquida.

Por otro lado, en la figura 3.13 se observa que independientemente del contenido de Tween 80, la macroporosidad y la porosidad total se incrementan con el incremento de la proporción L/P.

En la figura 3.14 se representa la porosidad total y la macroporosidad de las espumas de HA, medidas por inmersión en mercurio en función de la proporción L/P, para las dos concentraciones de Tween 80 que presentaron diferencias significativas en términos de espumabilidad, 0.5 y 5 %.

Para el intervalo de L/P analizado no hay diferencias significativas en la porosidad total ni tendencias marcadas en la macroporosidad entre ambos contenidos de Tween 80. Por tanto, las diferencias en espumabilidad entre 0.5 y 5 % de Tween 80 no afectan significativamente la porosidad de los cementos espumados, lo cual significa que para la misma proporción L/P ambas concentraciones pueden ser empleadas para obtener espumas de HA con porosidades similares.

De acuerdo a los resultados mostrados en la figura 3.14, para 5 % de Tween 80, la porosidad total se incrementa desde 51 % para L/P = 0.32 ml/g hasta 79 % para L/P = 0.65 ml/g, mientras que la macroporosidad toma valores desde 11 % hasta 44 % para el mismo intervalo de L/P.

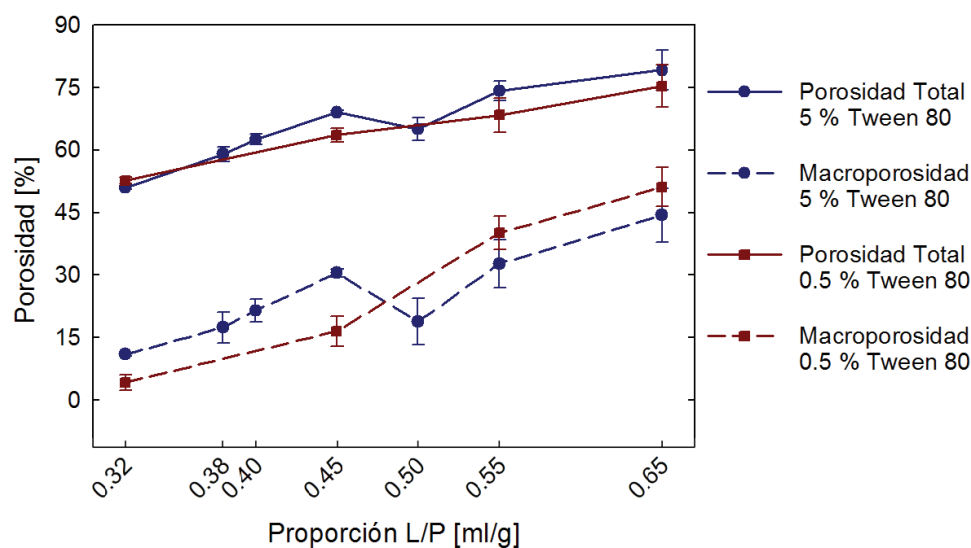


Figura 3.14: Porcentaje de macroporosidad y porosidad total de las espumas de HA determinados por inmersión en mercurio, en función de la proporción L/P, para las dos concentraciones de Tween 80 que mostraron diferencias estadísticamente significativas en espumabilidad.

La tabla 3.2 muestra las propiedades texturales de las espumas de HA más macroporosas obtenidas con 0.5 % de Tween 80 y 2.5 % de acelerante en la fase líquida. Los datos en la tabla indican que la proporción L/P de preparación de la espuma modifica significativamente las propiedades texturales obtenidas.

Tabla 3.2: Propiedades texturales de las espumas de HA más macroporosas obtenidas con 0.5 % de Tween 80 como espumante y 2.5 % de acelerante en la fase líquida.

Contenido de Tween 80 [%]	Proporción L/P [ml/g]	Superficie específica BET [m ² /g]	% de porosidad*		Diámetro del macroporo** [μm]	Diámetro de la conexión* [μm]
			Macro	Total		
0.5	0.55	14.720 ± 0.013	32	66	343 ± 115	60
0.5	0.65	12.626 ± 0.072	49	74	279 ± 108	45

* Valores determinados por MIP; ** valor medido sobre las imágenes de MEB.

En primer lugar, la superficie específica de la espuma disminuye ligeramente con el incremento de la proporción L/P. Puesto que la superficie específica es inversamente proporcional al tamaño de los cristales de CDHA precipitados durante el fraguado, se puede decir que una mayor proporción L/P genera un mayor tamaño de cristal. Es probable que la mayor proporción L/P favorezca el crecimiento del cristal porque genera pastas con menor saturación de iones, lo que disminuye la nucleación, pero aumenta el crecimiento. Mientras que menores proporciones L/P pueden favorecer la nucleación de cristales y no el crecimiento.

En segundo lugar, las tendencias en ambos tipos de porosidad que se pueden observar en la tabla 3.2 son las mismas a las presentadas previamente en la figura 3.14, es decir, que a mayor proporción L/P mayor porosidad.

En cambio, se puede notar que la proporción L/P, entre 0.55 y 0.65 ml/g, tuvo un efecto inverso sobre el diámetro de poro y en el tamaño de sus interconexiones, en otras palabras, a mayor proporción L/P menor diámetro de los macroporos. No está completamente claro el por qué de este fenómeno, pero una posible explicación es que la mayor proporción L/P facilita el mezclado del cemento con la espuma, lo que evita la coalescencia de burbujas, y por tanto se mantiene el tamaño inicial de las burbujas en la espuma líquida. En cambio, la menor proporción L/P requiere de mayor mezclado, lo que conlleva a la coalescencia de burbujas incrementando su tamaño final. Por último, en el caso supuesto de una L/P muy baja, el mezclado no solo causaría la coalescencia, sino que sería tan severo que provocaría la ruptura de las burbujas, generando muy pocos macroporos en la espuma. Finalmente, de acuerdo a la tabla 3.2, la reducción del diámetro de los macroporos causa también el menor tamaño de las interconexiones, probablemente debido a que el área de contacto entre diferentes poros disminuye.

En cuanto a los tamaños de poro reportados en la literatura, para diferentes cementos macroporosos producidos por diversos métodos de espumado, medidos básicamente por análisis de imagen y en algunos casos por reconstrucción mediante microtomografía computacional (μ CT), estos varían entre 50 a 1220 μ m. Sin embargo, típicamente se reportan macroporos con diámetros entre 50 a 500 μ m (ver capítulo 2, tabla 2.3). Comparando estos valores con los resultados aquí obtenidos (tabla 3.2), se puede decir que el método de espumado de la fase líquida permite obtener diámetros de poro similares a los obtenidos mediante otros métodos de espumado, los cuales se consideran como adecuados para aplicaciones de regeneración del tejido óseo [23,24].

3.4.4.4 Micro y macroestructura

Las imágenes de MEB tomadas a bajos aumentos en las espumas de HA obtenidas con 5 % de Tween 80, a diferentes proporciones L/P (ver fig. 3.15), muestran que la morfología de la macroporosidad reproduce la geometría de las burbujas contenidas en la espuma líquida, es decir, que efectivamente la espuma actúa como plantilla para la macroporosidad. Los macroporos generados son esféricos y se incrementan en número y tamaño con el incremento de la proporción L/P. A bajas proporciones L/P los macroporos generados están aislados y no presentan interconexiones por canales macroscópicos (fig. 3.15a). Conforme la proporción L/P se incrementa, se observa una mayor cantidad de macroporos en el cemento y como consecuencia el espesor de las paredes entre poros se reduce (fig. 3.15b). Además, se observa que para elevadas proporciones L/P, es tal la cantidad de macroporos que llegan a tocarse entre sí, generando interconexiones con forma de ventanas circulares. En algunos casos llegando a observarse entre 2 y 3 interconexiones por cada macroporo (fig. 3.15c).

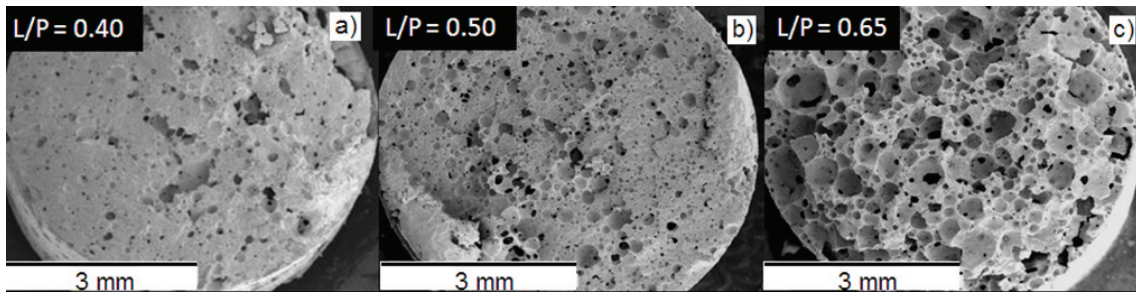


Figura 3.15: Macroestructura de las espumas de HA observadas por MEB, para diferentes proporciones L/P, 2.5 % de acelerante y 5 % de Tween 80 en la fase líquida.

El aumento de la macroporosidad introducida al incrementar la proporción L/P se puede explicar a partir de la cantidad de sólido agregado a un volumen constante de líquido o espuma. Conforme la proporción L/P aumenta, para un volumen constante de líquido, la cantidad de polvo añadido disminuye, facilitando el mezclado de la pasta y evitando el colapso de las burbujas en la espuma, de forma que la menor ruptura de la espuma se refleja como mayor macroporosidad del cemento.

Hasta el momento se ha presentado el efecto de la proporción L/P sobre la macroporosidad inducida en los cementos, pero también tiene un efecto en la nano/microporosidad o porosidad inherente del material, que está íntimamente relacionada con la microestructura de cristales precipitados típica de los CPC.

En todos los casos, las imágenes de MEB a altos aumentos (ver figura 3.16) mostraron la microestructura típica de cristales con forma de placas entrecruzadas producida por el proceso de fraguado, y responsable de la resistencia mecánica del cemento [25,26]. Estos cristales precipitan sobre la partícula inicial de reactivo (α -TCP) al mismo tiempo que se hidroliza, formando un agregado de cristales de CDHA por cada partícula de α -TCP, tal como lo muestra el esquema en la figura 2.17 (ver también el capítulo 2, sección 2.3.3).

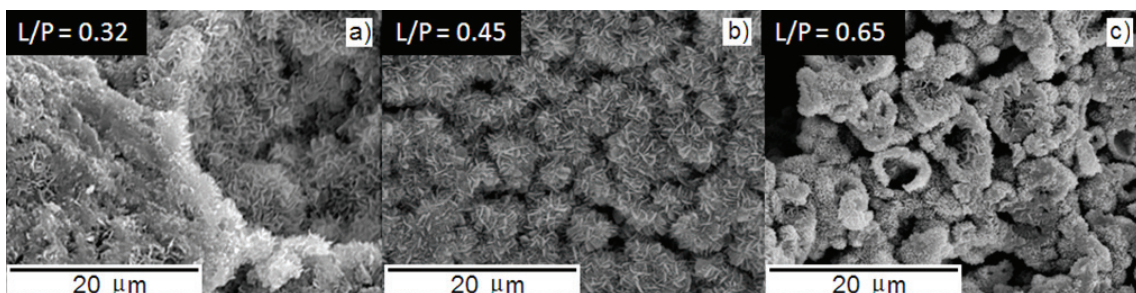


Figura 3.16: Microestructuras de las espumas de HA observadas por MEB, para diferentes proporciones L/P, 2.5 % de acelerante y 5 % de Tween 80 en la fase líquida.

En la figura 3.16a se observa que bajas proporciones L/P (por ejemplo 0.32 ml/g) mantienen íntimamente unidos los cristales provenientes de diferentes partículas de α -TCP, facilitando su entrecruzamiento. Prácticamente en este caso la porosidad inherente del cemento corresponde únicamente a los espacios entre cristales precipitados. Cuando la proporción L/P se incrementa a 0.45 ml/g se observan nuevos poros (zonas más oscuras en la figura 3.16b), que forman una especie de canales entre los agregados de cristales precipitados. Para una proporción L/P de 0.65 ml/g, la porosidad entre agregados aumenta de tamaño y se observan también huecos al interior de cada agregado de cristales (figura 3.16c).

3.4.4.5 Distribución de la porosidad en cementos espumados y no espumados

En la figura 3.17 se presenta la distribución de la porosidad determinada por MIP para cementos no espumados preparados con distintas proporciones L/P, 2.5 % de acelerante y 5 % de Tween 80 en la fase líquida.

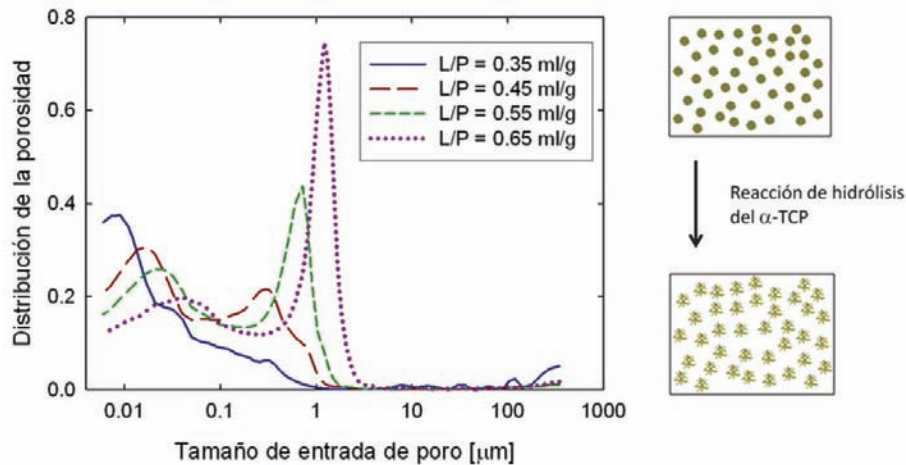


Figura 3.17: Distribución de la porosidad, determinada por MIP, correspondiente a cementos no espumados en función del tamaño de entrada de poro, entre 0.006 y 350 μm . Cementos fabricados con diversas proporciones L/P, 2.5 % de acelerante y 5 % de Tween 80 en la fase líquida. El esquema de la derecha muestra cómo cada partícula de reactivo (α -TCP) forma un agregado de cristales después de reaccionar.

La curva correspondiente a 0.35 ml/g muestra una distribución de la porosidad unimodal, en la que el máximo de porosidad se centra en 0.009 μm . Este pico en la distribución representa a los espacios vacíos entre cristales precipitados durante la reacción de fraguado (ver figura 3.16a). Conforme la proporción L/P se incrementa, la distribución de la nano/microporosidad se torna bimodal y ambos picos de la distribución se desplazan hacia tamaños mayores de entrada de poro. Cabe mencionar que en ningún caso se observan poros con tamaños de entrada mayores a 5 μm (macroporosidad), ya que los cementos no fueron espumados.

El primer pico de izquierda a derecha en la distribución bimodal corresponde a los espacios entre cristales. Además, el desplazamiento hacia tamaños mayores sugiere que la mayor proporción L/P favorece el crecimiento del cristal precipitado. De tal forma que al existir cristales de mayor tamaño los espacios entre ellos también aumentan de tamaño. Este resultado concuerda con el comportamiento de la superficie específica de las espumas sólidas presentado en la tabla 3.2.

El segundo pico de porosidad en la distribución corresponde a los espacios entre agregados de cristales provenientes de cada partícula de α -TCP. Se cree que el origen de esta porosidad está relacionado con la proporción L/P de mezclado. Debido a que bajo una proporción L/P de 0.35 ml/g los cristales provenientes de diferentes partículas de α -TCP se cruzan entre sí, el segundo pico de porosidad no es evidente. En cambio, la separación entre agregados se incrementa desde 0.33 μm para L/P = 0.45 ml/g hasta 1.22 μm para L/P 0.65 ml/g. Esto se puede explicar porque cuando se incrementa la proporción L/P, la cantidad de partículas de reactivo en un volumen determinado de líquido es menor, por lo que la separación entre ellas es mayor.

En el caso de los cementos espumados, la porosidad total del cemento se convierte en la suma de la nano/microporosidad intrínseca más la macroporosidad introducida por el proceso de espumado. La figura 3.18 muestra un ejemplo de la distribución trimodal de la porosidad de las espumas de HA. En la figura se grafica la distribución de la porosidad en función del tamaño de la entrada de poro, y se correlaciona cada pico en la distribución con su origen en la estructura observada por MEB.

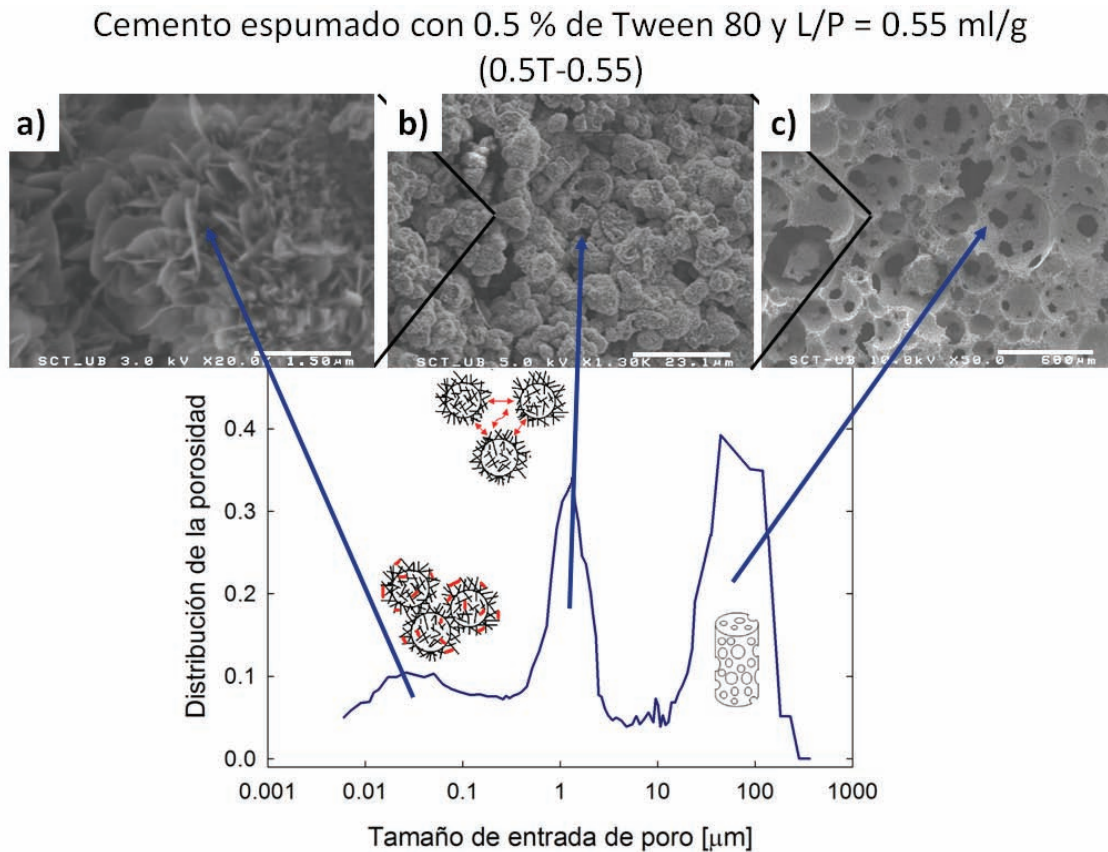


Figura 3.18: Ejemplo de la distribución trimodal de la porosidad en función del tamaño de entrada de poro para una espuma de HA. Las flechas indican la correspondencia de la porosidad con la estructura observada por MEB. a) Cristales entrecruzados originados por la reacción de fraguado, b) aglomerados de cristales formados por la proporción L/P de fabricación de la espuma, y c) macroporos introducidos por el proceso de espumado.

En la zona por debajo de $0.250 \mu\text{m}$ se observa un pico ancho en la distribución que representa a los espacios vacíos entre cristales de CDHA precipitados durante el fraguado. Posteriormente, alrededor de $1.3 \mu\text{m}$ se observa un pico mejor definido, que corresponde a la microporosidad entre agregados de cristales, relacionada con la proporción L/P con la que se preparó el cemento. Por último, para tamaños mayores a $5 \mu\text{m}$, se observa un pico ancho y bien definido que corresponde a la macroporosidad abierta generada por el proceso de espumado. Lo anterior se corroboró comprobando que los tamaños de las interconexiones medidas por MIP coincidieran con las dimensiones de las interconexiones observadas sobre imágenes de MEB a diferentes aumentos, encontrando una buena correlación.

Cabe mencionar que en la figura 3.18a se observa la típica estructura de cristales en forma de placas entrecruzadas de los CPC, responsable de la resistencia mecánica del material.

Además, en la figura 3.18c se puede observar que el diámetro de los macroporos es mayor que el tamaño de las conexiones entre ellos y que al menos existen entre 2 y 3 interconexiones por macroporo. Por lo que se espera que esta arquitectura mejore la penetración de células y el crecimiento de nuevo hueso hacia el interior de la espuma de HA.

Un factor tan importante como la porosidad en los materiales para regeneración ósea es la conectividad entre poros, en otras palabras, el tamaño de la porosidad abierta [14,23,27,28]. Las técnicas más usadas para medir el tamaño de las interconexiones son la MIP y el μ CT. Sin embargo, existen trabajos que de forma simplificada consideran que el tamaño de las conexiones es igual al tamaño de la plantilla usada en la obtención de la macroporosidad [27,29]. Bohner reporta que la cantidad de macroporosidad abierta determinada mediante μ CT en uno de sus estudios esta subestimada por la baja resolución empleada durante la reconstrucción computacional [23], la cual genera una pérdida de información a magnitudes cercanas al límite inferior de detección. Por otro lado, mediante MIP no se reporta ninguna pérdida en la medición de la porosidad abierta, pero está limitada por el intervalo de validez del ensayo y bajo las consideraciones teóricas del mismo [14,28]. Debe tenerse en mente que el μ CT y la MIP son técnicas complementarias en la caracterización de sistemas porosos a diferentes niveles de magnitud.

En este trabajo, empleando sólo a la MIP como técnica de caracterización, se encontró que el diámetro medio de la macroporosidad abierta es de 60 μ m para L/P = 0.55 ml/g y 45 μ m para L/P = 0.65 ml/g. Considerando que las células óseas o mesenquimales miden aproximadamente entre 20 y 30 μ m, la porosidad abierta es apenas suficiente para permitirles la entrada al seno del material. No obstante, la distribución de la porosidad muestra que hay poros abiertos con tamaños de hasta de 360 μ m (fig. 18), lo que incrementa las posibilidades para que las células penetren.

En un caso extremo, se determinó el porcentaje de porosidad abierta con conexiones mayores o iguales a 90 μ m, el cual correspondió a 11.9 ± 2.3 % y 13.0 ± 5.8 % para L/P de 0.55 y 0.65 ml/g, respectivamente. Estos valores podrían considerarse bajos para el objetivo deseado, pero hay que tener en mente factores como los siguientes:

- i. El límite superior de detección de la MIP es de 360 μ m, por lo que podrían existir conexiones de mayor tamaño. Para comprobar la existencia de conexiones de mayor diámetro se sugiere el empleo de μ CT.
- ii. La macroporosidad detectada por MIP es únicamente porosidad abierta, es decir, que es totalmente accesible para las células. En otras palabras, no se está sobreestimando la macroporosidad.
- iii. En las espumas de HA existen macroporos abiertos menores a 5 μ m, que podrían facilitar el mojado del material vía osmosis. Esta característica puede ayudar a la formación de redes de drenado no accesibles a las células, pero si a nutrientes o señales bioquímicas [30].
- iv. La presencia de microporosidad abierta, y como se verá más adelante, la baja cristalinidad y la deficiencia en calcio de la HA que conforma las paredes de los poros, podrían facilitar la reabsorción del material, facilitando el acceso de las células a los macroporos cerrados, cuyos diámetros son mayores a 100 μ m.

Finalmente, se observó que el uso del aceite desmoldeante no solo facilitó la extracción de las espumas de HA, sino que propició la formación de macroporos abiertos en la superficie de las espumas fabricadas. La figura 3.19 compara dos espumas obtenidas con las mismas condiciones con y sin la adición del aceite al molde.

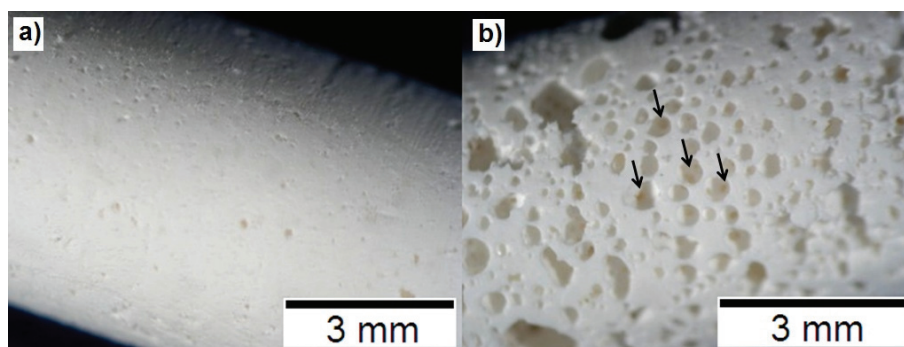


Figura 3.19: Efecto del aceite desmoldeante sobre la macroporosidad abierta en la superficie de las espumas de HA. a) Sin aceite la porosidad abierta es nula, y b) con aceite la porosidad abierta es considerable, y se aprecian conexiones con los poros internos de la estructura (marcadas por las flechas). Las imágenes corresponden a una espuma de HA obtenida con 0.5 % de Tween 80 y L/P = 0.55 ml/g.

Se observa que en la muestra sin aceite (fig. 3.19a) prácticamente no existen macroporos abiertos en la superficie, mientras que en la que sí se impregnó el aceite sí tiene macroporos abiertos y en gran cantidad (fig. 3.19b). Además, si se observa a detalle la figura 3.19b se puede distinguir como los poros en la superficie tienen uniones macroscópicas con los poros internos de la estructura. Por lo que se espera una buena perfusión de células y/o nutrientes celulares hacia el seno de las espumas de HA.

Cabe mencionar que los moldes usados fueron fabricados con teflón con el objetivo de impedir la adhesión del cemento al molde. Sin embargo, debido al carácter fluido de las pastas el cemento recubre la superficie del molde causando la desaparición de la porosidad abierta en superficie. A diferencia, al impregnar el desmoldeante sobre las paredes, la inmiscibilidad del aceite con la pasta impide el cierre de los poros superficiales, los cuales se mantienen una vez el cemento ha endurecido. No obstante, esta característica no tiene aplicaciones en el empleo de las espumas como material de relleno óseo, debido a que en condiciones *in vivo* no es factible la aplicación del aceite dentro del defecto a tratar. Por otro lado, si se quiere fabricar espumas de HA prefraguadas, para su posterior implantación o cultivo celular, el empleo del aceite es altamente recomendable. Además, se comprobó que el desmoldeante remanente puede ser fácilmente eliminado lavando con abundante alcohol y agua destilada.

3.4.4.6 Resistencia a la compresión

La figura 3.20 muestra la resistencia a la compresión de las espumas de HA fraguadas durante 7 días por inmersión en disolución de Ringer, en función de la porosidad total.

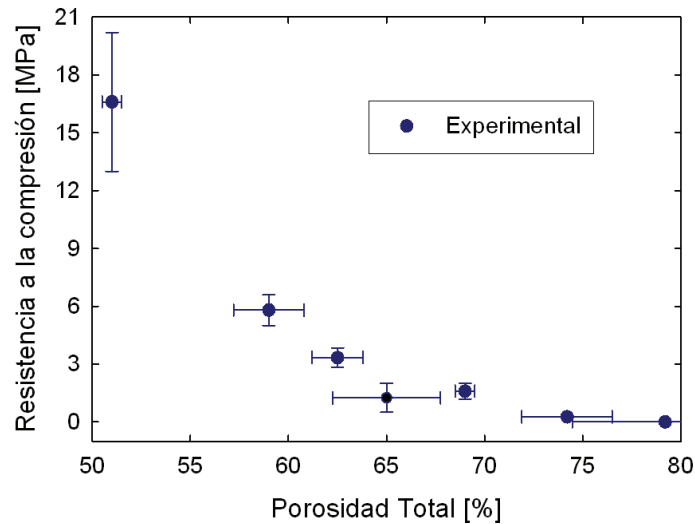


Figura 3.20: Resistencia a la compresión en función de la porosidad total de las espumas de HA fraguadas durante 7 días por inmersión en Ringer. Espumas preparadas con 2.5 % de acelerante y 5 % de Tween 80 en la fase líquida.

En la figura se observa que el incremento de la porosidad disminuye considerablemente la resistencia a la compresión de las espumas de HA. Se observa también que la caída de resistencia a la compresión sigue una tendencia exponencial en función de la porosidad total, predicha mediante un modelo teórico en trabajos como el de Ginebra [14].

Las espumas de HA pierden bruscamente la resistencia debido a la microestructura. Por un lado, los cristales entrecruzados originados durante la reacción de fraguado no están unidos químicamente entre sí, sino que es el entrecruzamiento físico el que genera la resistencia mecánica. Por otro lado, los macroporos, las delgadas paredes nano/microporosas y la presencia de macro conexiones, son factores que desestabilizan la estructura, facilitando el colapso de la misma.

De acuerdo a estos resultados, para que la espuma de HA obtenida con Tween 80 sea capaz de mantener su estructura y pueda ser manipulada sin fracturarse, se propone un límite máximo de porosidad total alrededor del 70 %. Para no superar dicho límite, se recomienda el uso de una proporción L/P menor o igual a 0.65 ml/g. Para otros agentes espumantes, de acuerdo a su espumabilidad y estabilidad, la proporción L/P óptima podrían ser diferente para maximizar la cantidad de macroporosidad introducida y mantener una resistencia mecánica aceptable.

En la figura 3.21 se grafican los valores de resistencia a la compresión reportados en la literatura para varios cementos espumados (ver tabla 2.3 en el capítulo 2 de esta memoria), junto con los resultados experimentales de la figura 3.20 y el modelo teórico propuesto por Ginebra [14]. Se puede observar que los valores de resistencia a la compresión y porosidad total obtenidos por diferentes autores, aplicando diferentes técnicas de espumado, varían entre 0.2 y 23 MPa y entre 40 y 90 % respectivamente. Y al igual que en el presente trabajo, la tendencia general es la disminución de la resistencia a la compresión con el aumento de la porosidad.

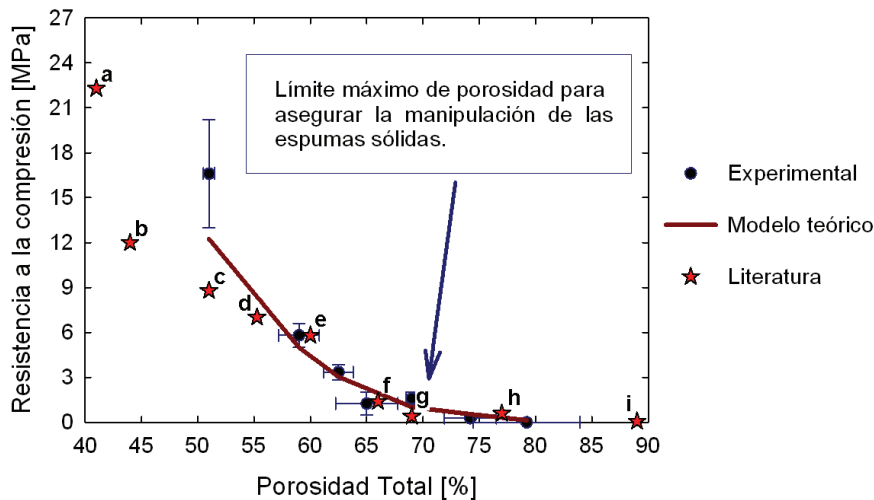


Figura 3.21: Comparación de la resistencia a la compresión entre los resultados experimentales mostrados en la figura 3.20 y los resultados publicados en la literatura [31]^a, [27]^b, [32]^c, [33]^d, [34]^e, [28]^f, [12,35]^g, [14]^h y [36]ⁱ. La línea continua corresponde a un modelo teórico que predice la caída exponencial de la resistencia en función de la micro y macroporosidad. La flecha indica el límite de porosidad en el cual la resistencia de las espumas de HA es aún suficiente para resistir la manipulación sin fracturarlas.

Los cementos más porosos han sido obtenidos empleando el método de la congelación/sublimación [36], sin embargo, la resistencia reportada es muy baja y de acuerdo con la experiencia obtenida durante esta investigación no es suficiente para la manipulación de los sustratos, los cuales pueden fracturarse fácilmente solo con tocarlos. Por otro lado, los cementos macroporosos más resistentes han sido obtenidos por la técnica de impresión tridimensional controlada por computadora [31]. La cual tiene la ventaja extra del control y reproducibilidad de las estructuras obtenidas. No obstante, los cementos que genera no pueden ser implantados en forma de pastas autofraguables y por tanto el método está restringido a la obtención de andamios en el laboratorio.

Por su parte, el método de espumado de la fase líquida, empleando como agente espumante al Tween 80, permite obtener cementos macroporosos que se ubican en la zona de mayor porosidad con respecto a la literatura actual. Además, el método no requiere de la eliminación de un componente soluble y por tanto el cemento puede ser implantado directamente en el defecto a tratar, donde se consolidará por sí mismo a través de la reacción de fraguado. Otra ventaja del método es que la porosidad del cemento va incorporada en la pasta desde la implantación, por lo que la colonización celular puede ser inmediata y por tanto se espera que se acelere la regeneración de la lesión.

La curva correspondiente al modelo teórico presentada en la figura 3.21 se graficó en base a la ecuación 3.9. Al comparar el modelo teórico con los resultados experimentales se observa que este modelo resulta adecuado para predecir el comportamiento de las espumas sólidas obtenidas por el método de espumado de la fase líquida del cemento. Por lo que el ensayo de resistencia a la compresión puede servir para estimar la porosidad total de los sustratos y viceversa. Además, el comportamiento de la resistencia a la compresión de los cementos macroporosos obtenidos por diferentes autores, aplicando diferentes técnicas de espumado,

sigue la misma tendencia exponencial obtenida por el modelo teórico en función del contenido de porosidad total.

$$\sigma_M = \sigma_0 (\Pi_{inherente})^m \exp(-b\Pi_{Macro}) \quad \text{EQ 3.9}$$

Donde: σ_M es la resistencia a la compresión del cemento macroporoso; σ_0 es la resistencia a la compresión teórica del cemento con 0 % de nano/microporosidad y corresponde a 112.36 MPa para el cemento fraguado en base a α -TCP [14,37]; $\Pi_{inherente}$ es la nano/microporosidad inherente del cemento sin espumar, expresada en fracción volumétrica; Π_{Macro} corresponde a la macroporosidad del cemento espumado, expresada también en fracción volumétrica; los valores de m y b son constantes que dependen del material determinadas respectivamente para este cemento como 2.64 y 6.56, [14,37].

3.4.5 Inyectabilidad de las pastas espumadas

Como se mencionó en la sección 3.4.4.1, el factor que limita el empleo de las espumas como relleno óseo inyectable y autofraguable es la cohesión de la pasta. Por esta razón se seleccionó la proporción L/P = 0.50 ml/g para determinar la inyectabilidad del cemento más macroporoso que presentó cohesión en Ringer. Sin embargo, para fines comparativos y en vistas de moldear en el laboratorio de espumas altamente macroporosas, se propuso estudiar también la proporción L/P de 0.65 ml/g. En los dos casos se empleó 5 % de Tween 80 y 2.5 % de acelerante en la fase líquida. Los resultados de inyectabilidad, porosidad total y resistencia a la compresión de estos cementos moldeados a diferentes tiempos se presentan en la tabla 3.3.

Tabla 3.3: Resultados del ensayo de inyectabilidad y características estructurales de las espumas de HA, moldeadas bajo diferentes métodos. Espumas fabricadas con 5 % de Tween 80 y 2.5 % de acelerante en la fase líquida.

L/P [ml/g]	Tipo de moldeo	Inyectabilidad [%]	Porosidad total* [%]	resistencia a la compresión [MPa]
0.50	Espátula	-	60.2 ± 2.72	8.82 ± 1.0
	Iny. 2.5 min	72.27 ± 5.71	60.9 ± 1.93	7.26 ± 1.34
	Iny. 5.0 min	66.86 ± 5.54	61.95 ± 3.48	5.9 ± 1.09
0.65	Espátula	-	75.82 ± 2.9	2.09 ± 0.17
	Iny. 2.5 min	92.41 ± 0.59	74.68 ± 1.51	0.65 ± 0.06
	Iny. 5.0 min	93.5 ± 0.82	72.18 ± 1.48	0.46 ± 0.12

* Valores determinados por inmersión en mercurio.

En lo que concierne a la proporción L/P, los resultados indican que la inyectabilidad aumenta con el incremento del contenido de líquido en el cemento, esto se explica por el hecho de que la pasta se asemeja más a un líquido al contener menos cantidad de polvo [38].

Además, se puede notar que para la proporción L/P = 0.50 ml/g la inyectabilidad de la pasta disminuyó con el tiempo de espera antes de la inyección, mientras que se mantuvo constante para la proporción L/P = 0.65 ml/g. La diferencia se atribuye a la cinética de fraguado. Para una menor proporción L/P el cemento fragua más rápido pudiendo quedar atrapado dentro de la jeringa antes de ser inyectado.

Por otro lado, la figura 3.22 muestra la macroestructura de la espuma moldeada por espátula (fig. 3.22a) y las morfologías de las espumas moldeadas por inyección a diferentes tiempos después de la mezcla del polvo con la espuma líquida (figuras 3.22 b y c). Las imágenes corresponden a espumas de HA obtenidas con 5 % de Tween 80 y 2.5 % de acelerante en la fase líquida, fabricado bajo una proporción L/P de 0.65 ml/g y fraguado durante 7 días.

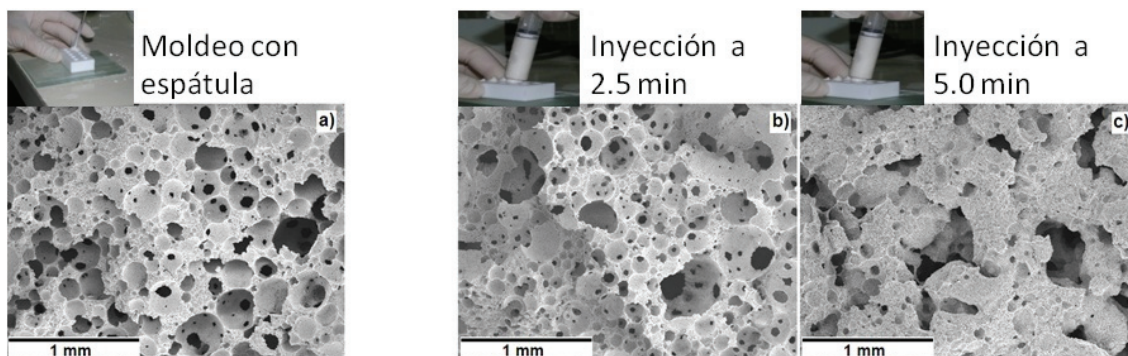


Figura 3.22: Imágenes de MEB de las macroestructuras de las espumas de HA obtenidas mediante diferentes métodos de moldeo. a) moldeo con espátula, b) moldeo por inyección después de 2.5 minutos, y c) moldeo por inyección después de 5 minutos. Tiempo transcurrido desde el contacto de la fase sólida con la espuma líquida. Espumas preparadas con 5 % de Tween 80 y 2.5 % de acelerante en la fase líquida bajo una proporción L/P de 0.65 ml/g.

Comparando la morfología de la muestra inyectada a 2.5 minutos y la morfología de la muestra moldeada con espátula, éstas no presentan diferencias relevantes en tamaño de poro ni en interconectividad. Sin embargo, al comparar ambas estructuras con la estructura de la muestra inyectada después de 5 minutos, se observa que la macroporosidad deja de reproducir la morfología de la espuma líquida y se torna irregular, no obstante mantiene las interconexiones.

La deformación de la porosidad originada por el tiempo transcurrido antes de la inyección se atribuye a la cinética de fraguado. Conforme el tiempo transcurre antes de la inyección, el cemento se acerca al tiempo de fraguado inicial, lo que se refleja como la disminución de la fluidez de la pasta y por tanto se deforma al momento de ser extruída con la jeringa. Es probable que si se retarda aun más la inyección, el cemento alcanzará el tiempo de fraguado final, haciéndose imposible inyectar la pasta. Para minimizar la deformación de la espuma se podrían incorporar aditivos que faciliten la inyección del cemento, tales como citratos o el alginato de sodio.

Por otro lado, los datos en la tabla 3.3 indican que para una misma proporción L/P la porosidad total obtenida no cambia con las diferentes técnicas de moldeo, ni con el tiempo transcurrido antes de la inyección. Sin embargo, si se observa una ligera caída de la resistencia mecánica, a pesar de la porosidad constante. Una posible causa de este comportamiento es la morfología de la macroestructura. La continuidad de la pared de los macroporos es un factor clave en la resistencia junto con la porosidad total, en este sentido la irregularidad de la pared puede considerarse como un defecto que provoca la disminución de resistencia de la estructura.

En base a estos resultados se puede decir que tanto el moldeo por espátula como por inyección son aptos para obtener estructuras porosas autofraguables, siempre y cuando la inyección se realice antes de 2.5 minutos. Por otro lado, durante la fabricación en el laboratorio de andamios macroporosos con geometrías complicadas, es recomendable moldear el cemento con espátula para obtener la mejor replica de la espuma líquida. En cuanto la aplicación del cemento macroporoso como relleno óseo, mediante cirugías mínimamente invasivas, el corto plazo disponible para inyectar el cemento podría llegar a ser una limitante. Sin embargo, si se excediera el tiempo antes de la inyección, la irregularidad de la estructura macroporosa no es contraproducente para la colonización celular ni la formación de nuevos vasos sanguíneos, puesto que el material mantiene las conexiones entre los macroporos.

3.4.6 Fases cristalinas presentes y estudio cinético de la reacción de fraguado

En la figura 3.23 se muestra un diagrama de difracción de rayos X correspondiente al polvo de α -TCP de partida y otro correspondiente a la espuma después de 7 días de fraguado por inmersión en disolución de Ringer a 37 °C. La indexación de los difractogramas coincide con las fichas cristalográficas JCPDS# 09-0348 y JCPDS# 09-0342 correspondientes al α -TCP y a la HA respectivamente. No obstante, estudios anteriores mostraron que en realidad se obtiene después del fraguado una CDHA con la misma proporción Ca/P del α -TCP (Ca/P = 1.5) [25,26,39]. Este hecho explica que la densidad esquelética determinada por picnometría de helio para los cementos fraguados durante 7 días (2.71 ± 0.02 g/ml), sea menor a la densidad teórica de la HA estequiométrica (3.14 g/ml [16]).

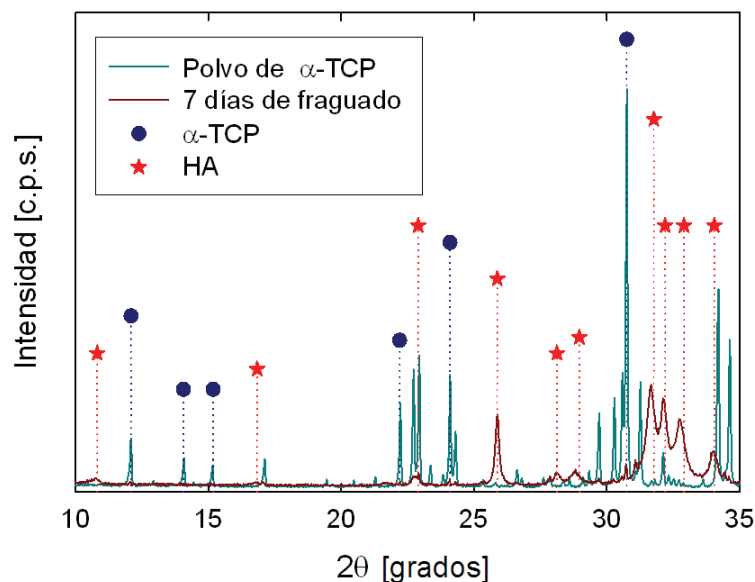


Figura 3.23: Diagramas de DRX correspondientes al polvo de α -TCP de partida y a la espuma después de 7 días de fraguado por inmersión en disolución de Ringer a 37 °C. La indexación de los difractogramas coincide con las fichas cristalográficas JCPDS# 09-0348 y JCPDS# 09-0342 correspondientes al α -TCP y a la HA respectivamente.

La figura 3.24 muestra los diagramas de difracción del cemento a diferentes tiempos de reacción. Se observa como al avanzar el tiempo de reacción los picos correspondientes a la CDHA incrementan su intensidad a expensas de la disminución de los picos del α -TCP. Sin embargo, es más preciso cuantificar la desaparición del α -TCP que la aparición de CDHA debido a la mayor cristalinidad del reactivo. Por lo que el monitoreo del descenso de la intensidad de los principales picos de difracción correspondientes al α -TCP resulta ser una buena metodología para el cálculo del porcentaje de reacción del cemento.

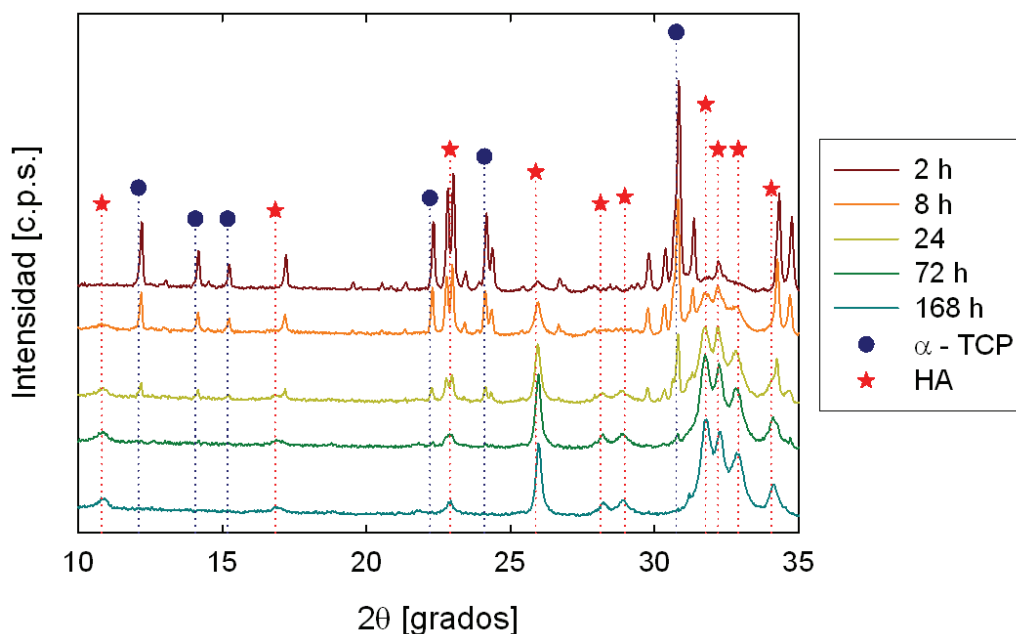


Figura 3.24: Diagramas de DRX correspondientes al polvo de cemento de partida y a espumas sólidas fraguados durante 2, 8, 24, 72 y 168 horas por inmersión en solución de Ringer. Los símbolos marcan a que fase cristalina corresponde cada pico en los diagramas de difracción. Espumas preparadas con acelerante de la reacción, 5 % de Tween 80 y L/P = 0.65 ml/g.

Por otro lado, en la figura 3.25 se representa el porcentaje de reacción en función del tiempo de inmersión en solución de Ringer. Puede observarse como durante las primeras 8 horas la cinética de reacción de fraguado es más rápida, durante este periodo de tiempo se alcanza el 50 % de transformación. Posteriormente la rapidez de la reacción disminuye hasta alcanzar prácticamente el 100 % de transformación al día 7 (168 h) de inmersión.

El análisis estadístico de los resultados mostró que no hay diferencias significativas entre la cinética de reacción del cemento sin espumar (sin Tween 80), el cemento espumado y el cemento sin espumar, ambos con 5 % de Tween 80. Es importante señalar que con la proporción L/P = 0.65 ml/g la cantidad final de Tween 80 incorporada en la espuma de HA es la mayor, puesto que implica una mayor cantidad de disolución acuosa por gramo de polvo. En base a este resultado se puede afirmar que el empleo de 5 % de Tween 80 como agente espumante en la fase líquida no afecta a la reacción de hidrólisis del α -TCP. Por tanto, se puede esperar que concentraciones menores de Tween 80 en el líquido y menores proporciones L/P de mezclado, tampoco afectarán la cinética de la reacción.

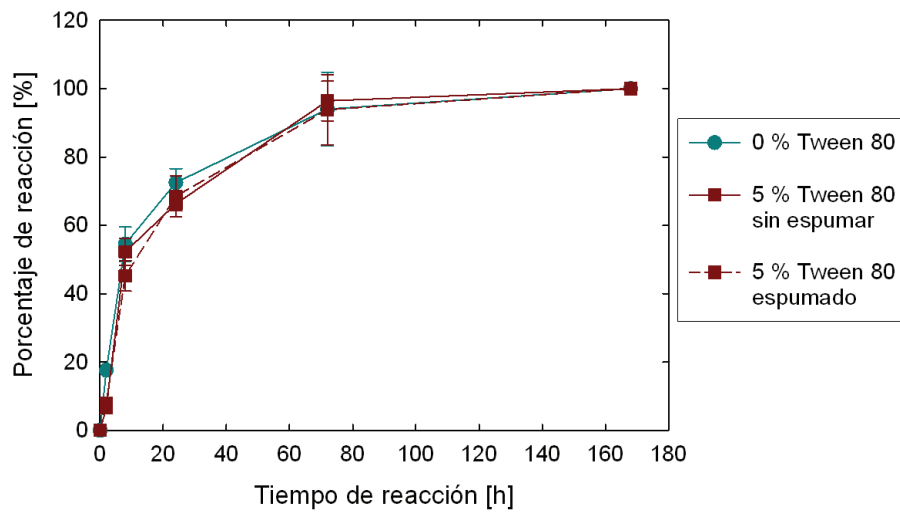


Figura 3.25: Porcentaje de reacción de los cementos con o sin Tween 80, espumado o sin espumar, en función del tiempo de reacción. Cementos preparados con 2.5 % de acelerante de la reacción de fraguado, y $L/P = 0.65$ ml/g.

Además, en la figura 3.25 se observa que el proceso de espumado tampoco afecta la cinética de fraguado del cemento. Lo cual es un resultado esperado, debido a que la técnica de espumado de la fase líquida es un proceso netamente físico, que no introduce ningún cambio químico ni composicional al cemento.

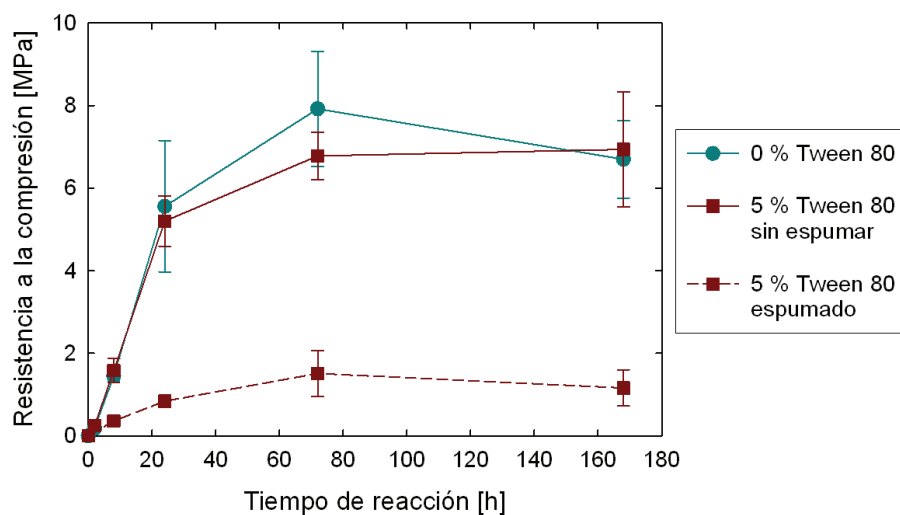


Figura 3.26: Resistencia a la compresión de los cementos con o sin Tween, espumado o sin espumar, en función del tiempo de reacción. Cementos preparados con 2.5 % de acelerante de la reacción de fraguado y $L/P = 0.65$ ml/g.

Por otro lado, el comportamiento mecánico también refleja la cinética de reacción de los CPC. En la figura 3.26 se representa la resistencia a la compresión en función del tiempo de reacción, para: a) el cemento sin espumar (sin Tween 80), b) el cemento con 5 % de Tween 80 sin espumar y c) la espuma de HA con 5 % de Tween 80, todos con una proporción L/P = 0.65 ml/g. La grafica muestra que prácticamente a los 3 días de reacción el máximo de resistencia de los materiales ya se ha alcanzado, lo cual coincide aproximadamente con el 90 % de transformación del cemento a CDHA (ver figura 3.25). La figura 3.26 muestra que no hay diferencias en el comportamiento mecánico entre el cemento sin espumar con y sin Tween 80, mientras que la espuma de HA tiene notablemente menor resistencia debido a la introducción de la macroporosidad. Este resultado confirma que la incorporación 5 % de Tween 80 en la fase líquida del cemento no afecta la cinética de la hidrólisis, y tampoco afecta a las propiedades mecánicas.

En cuanto a la microestructura, las imágenes de MEB mostradas en la figura 3.27 revelan el proceso de disolución/precipitación por el cual fragua el cemento [40]. Las imágenes después de 2 horas de reacción muestran los primeros cristales de CDHA precipitados sobre las partículas de α -TCP. Entre 2 y 24 horas de reacción se observa el crecimiento de los cristales en forma de placas entrecruzadas, mismo que genera el endurecimiento del material. Asimismo, se observa que entre 24 y 72 horas de reacción la microestructura de cristales entrecruzados no cambia notablemente, hecho que explica que la resistencia del material no siga aumentando con la misma rapidez en función del tiempo de reacción. Cabe mencionar que las microestructuras del cemento sin Tween 80 y las muestras con 5 % de Tween 80 no presentaron diferencias entre sí.

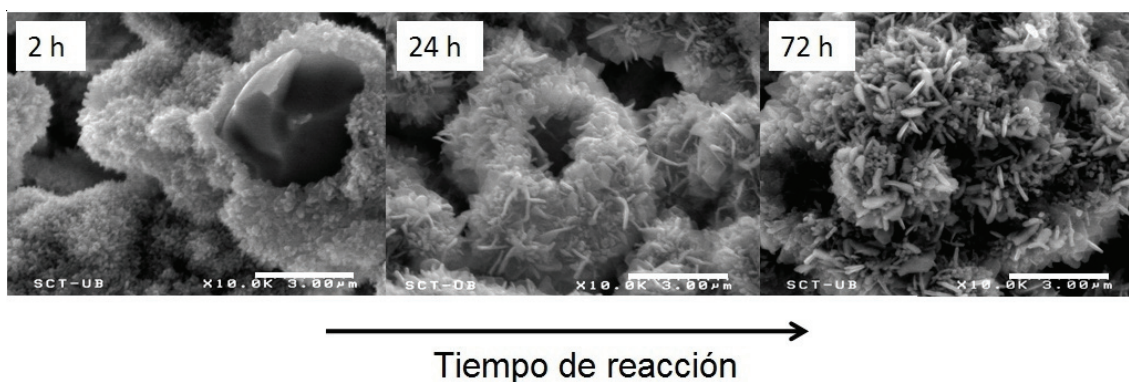


Figura 3.27: Evolución de la microestructura del cemento en función del tiempo de reacción. Imágenes tomadas por MEB para un cemento espumado con 5 % de Tween 80 en la fase líquida, L/P = 0.65 ml/g y con 2.5 % de acelerante de la reacción de fraguado.

En resumen, a partir de los resultados de DRX, de resistencia a la compresión y en las observaciones de MEB, se puede concluir que la incorporación de 5 % de Tween 80 en la fase líquida del cemento no afecta la cinética de reacción de α -TCP a CDHA. Además, se espera que concentraciones menores a 5 % tampoco tengan efecto sobre el fraguado del material.

3.4.7 Sinterización de las espumas de hidroxiapatita

La sinterización de las espumas de HA trajo como resultado la contracción dimensional de las muestras, además de cambios importantes en la composición, la estructura y en los diferentes niveles de porosidad. La tabla 3.4 resume las propiedades de las espumas antes y después de la sinterización.

Tabla 3.4: Composición y propiedades de las espumas de HA antes y después de la sinterización. Espumas obtenidas con 0.5 % de Tween 80 y 2.5 % de acelerante en la fase líquida.

L/P [ml/g]	Tipo de muestra	Temperatura de sinterización [°C]	Composición	Superficie específica [m ² /g]	Densidad esquelética [g/ml]	Porosidad [%]*			Resistencia a la compresión [MPa]
						Macro	Micro	Total	
0.55	Referencia	-	CDHA	14.57 ± 0.01	2.70 ± 0.01	-	52	52	9.67 ± 1.83
	Referencia	900	β-TCP	1.66 ± 0.02	3.11 ± 0.01	-	60	60	6.90 ± 1.39
	Referencia	1100	β-TCP	0.67 ± 0.00	3.10 ± 0.01	-	47	47	15.18 ± 3.59
0.65	Referencia	-	CDHA	13.66 ± 0.02	2.71 ± 0.01	-	55	55	3.82 ± 0.88
	Referencia	900	β-TCP	1.81 ± 0.02	3.11 ± 0.01	-	63	63	3.31 ± 0.73
	Referencia	1100	β-TCP	0.62 ± 0.01	3.11 ± 0.01	-	51	51	8.33 ± 3.0
0.55	Espumada	-	CDHA	14.72 ± 0.01	2.71 ± 0.02	32	34	66	0.28 ± 0.08
	Espumada	900	β-TCP	2.25 ± 0.01	3.11 ± 0.02	38	36	74	0.19 ± 0.01
	Espumada	1100	β-TCP	0.68 ± 0.00	3.10 ± 0.10	41	25	66	0.21 ± 0.08
	Espumada	1100°, 10 h	β-TCP	-	-	42	23	65	0.40 ± 0.04
0.65	Espumada	-	CDHA	12.63 ± 0.07	2.72 ± 0.01	49	25	74	0.15 ± 0.07
	Espumada	900	β-TCP	2.28 ± 0.00	3.10 ± 0.01	53	29	82	0.06 ± 0.02
	Espumada	1100	β-TCP	1.05 ± 0.01	3.10 ± 0.01	46	24	70	0.15 ± 0.04

* Valores determinados por MIP. Para esta técnica la macroporosidad se definió como la porosidad abierta de tamaño mayor a 5 µm, mientras que la microporosidad corresponde a la porosidad abierta con tamaño menor a 5 µm.

3.4.7.1 Composición de las espumas después de la sinterización

El cambio más evidente, además de la contracción dimensional, fue el cambio en fase cristalina. Como la tabla 3.4 y la figura 3.28 muestran, la composición de todas las muestras después de la sinterización correspondió a fosfato tricálcico beta (β-TCP) de alta cristalinidad con trazas de HA, probablemente estequiométrica.

Es sabido que la CDHA se descompone térmicamente por arriba de 900 °C produciendo fosfato tricálcico (TCP) y agua, en la reacción inversa al fraguado del cemento [16]. En este caso la fase final del TCP fue la beta, debido a que la temperatura de sinterización fue menor a la temperatura de formación de la fase alfa, y al enfriamiento lento que permitió la estabilización de la fase de baja temperatura.

La sinterización de las espumas de CDHA se estudió como una estrategia diferente a obtener materiales inyectables y autofraguables para la regeneración de defectos óseos. Como se mencionó, la intención de sinterizar las estructuras macroporosas fue la de incrementar la resistencia mecánica, con el conocimiento previo de que se sacrificaría la similitud morfológica

de la fase cristalina obtenida a temperatura ambiente. Sin embargo, el β -TCP obtenido al final del proceso de sinterización es tan biocompatible y osteoconductor como la CDHA. Además, en la literatura se encuentra gran cantidad de trabajos en los que se obtienen estructuras macroporosas de β -TCP consolidadas por sinterización para su uso en regeneración de lesiones óseas [23,41-43].

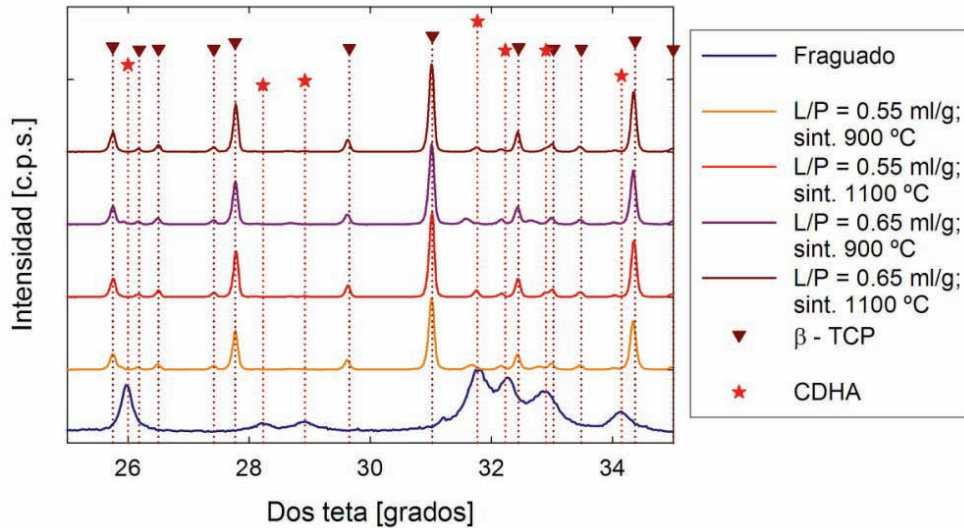


Figura 3.28: Diagramas de DRX para la espuma fraguada y para las espumas fraguadas y sinterizadas. Los símbolos indican las fases a las que corresponden los picos de difracción. El β -TCP se indexó usando la ficha cristalográfica JCPDS# 09-0169. No hubo diferencias entre los cementos espumados y los no espumados.

3.4.7.2 Densidad esquelética y microestructura de las espumas sinterizadas

Después de la sinterización se observó un incremento en la densidad esquelética del material, alcanzando la densidad teórica del β -TCP. Sin embargo, a 1100 °C se observó un comportamiento peculiar en la densidad obtenida, que se ilustra en la figura 3.29.

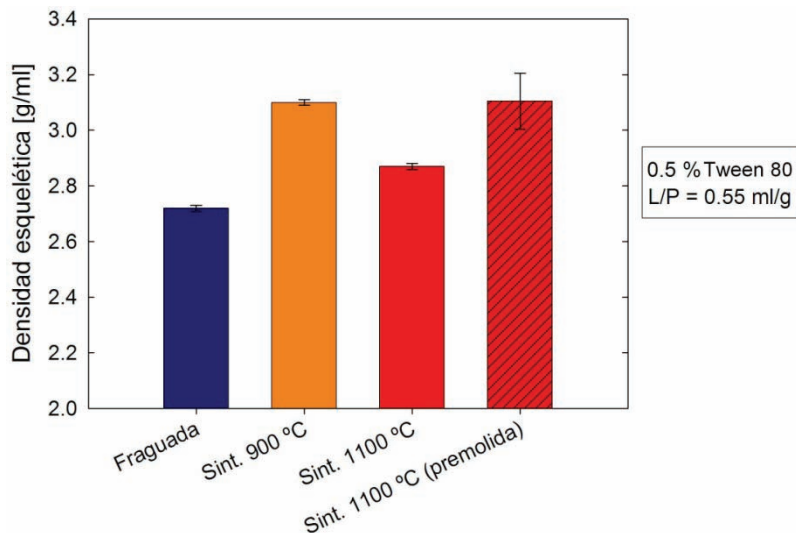


Figura 3.29: Densidades esqueléticas de las espumas para diferentes condiciones de procesado. Nótese como entre la condición de fraguado y la sinterización, la densidad esquelética se incrementa alcanzando el valor teórico de densidad del β -TCP, sin embargo a 1100 °C, si la muestra no es premolida la densidad no alcanza este valor. No existieron diferencias estadísticamente significativas entre cementos espumados y no espumados.

En la figura 3.29 puede observarse que la densidad esquelética de las muestras, entre la condición de fraguado y el sinterizado a 900 °C, se incrementó debido a que la celda cristalina de β -TCP es más compacta que la celda de CDHA. Sin embargo, a 1100 °C la densidad esquelética de las espumas sinterizadas presentó un valor menor al teórico e igual a 2.8 g/ml, cuando los resultados de DRX (figura 3.28) mostraron que la fase cristalina obtenida era la misma que a 900 °C. La razón de esta anomalía se encontró en la microestructura. La figura 3.30 muestra las microestructuras de las espumas sinterizadas a 900 y 1100 °C durante 2.5 horas. En ellas se observa un claro cambio morfológico con respecto a la microestructura de las espumas fraguadas (ver las figuras 3.16, 3.18a y 3.27).

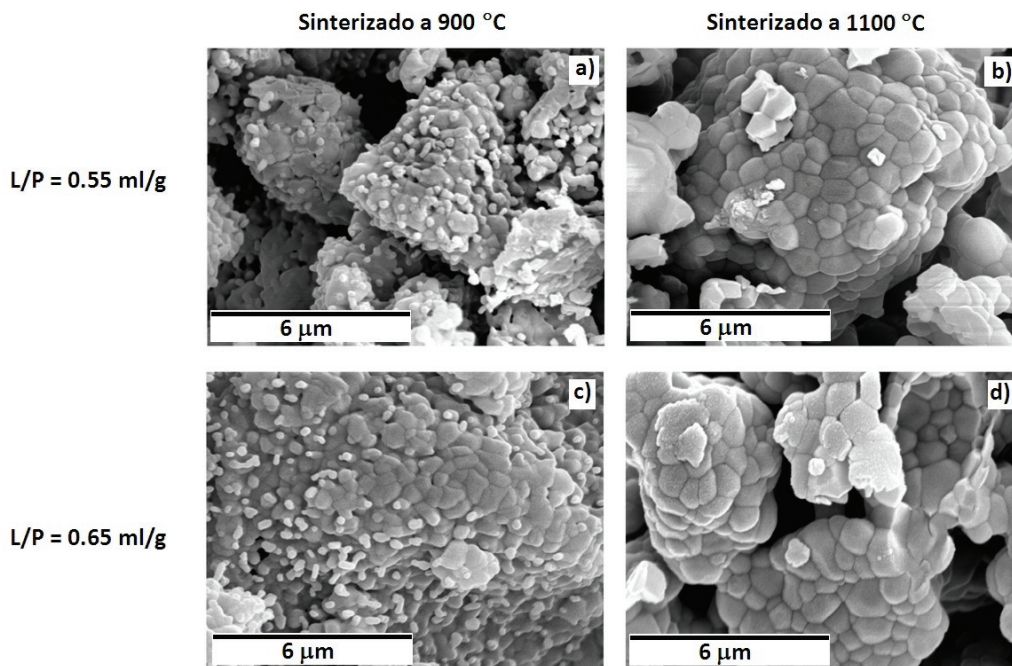


Figura 3.30: Imágenes de MEB de las microestructuras de las espumas preparados con dos diferentes proporciones L/P y sinterizadas a dos diferentes temperaturas, durante 2.5 horas.

La microestructura de agregados de cristales con forma de placas entrecruzadas del cemento fraguado desaparece durante la sinterización, obteniéndose conglomerados de cristales poliédricos, lo que explica la menor superficie específica después de la sinterización (ver tabla 3.4). La ligera diferencia en superficie entre las espumas sinterizadas a 900 y 1100 °C se debe a la mayor rugosidad de la microestructura obtenida a 900 °C (figuras 3.30 a y c).

El mecanismo propuesto para la formación de cristales poliédricos durante la sinterización es la coalescencia de los cristales de CDHA. La figura 3.31 esquematiza como los cristales de un mismo agregado se unen entre sí, conforme se incrementa la temperatura o el tiempo de sinterización, formando conglomerados lisos y compactos.

Observando a detalle las imágenes de MEB correspondientes a 900 °C (figura 3.30 a y c) se pueden encontrar puntos negros que podrían ser conductos hacia el interior de los conglomerados poliédricos, que no pueden observarse en las imágenes de las muestras sinterizadas a 1100 °C (figura 3.30 b y d). Lo que sugiere que la temperatura de 900 °C no es suficiente para cerrar por completo los espacios entre los cristales con forma de placa.

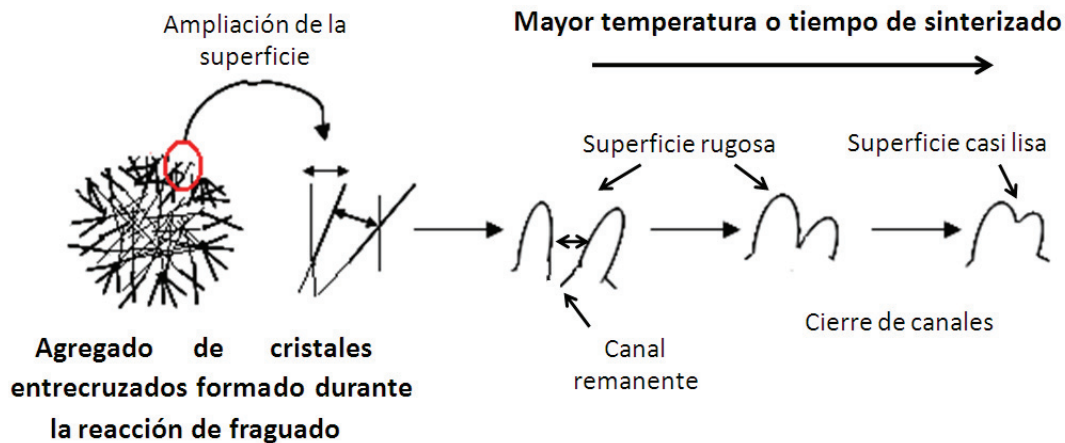


Figura 3.31: Esquema que ilustra como los cristales en forma de placa de cada agregado formado durante el fraguado se unen entre sí durante la sinterización, formando superficies menos rugosas y cristales poliédricos. Nótese que cuando la temperatura y/o el tiempo de sinterización no suministran suficiente energía permanecen espacios abiertos entre cristales, los cuales forman conductos hacia el interior de cada nuevo conglomerado cristalino.

Por otro lado, como se observa en la figura 3.16c, el fraguado de un cemento preparado con una elevada proporción L/P genera agregados de cristales huecos en su interior, asemejando la estructura de una geoda. Cuando el agregado hueco es sinterizado, los cristales que lo forman se unen formando un conglomerado que mantiene el hueco en su interior. Sin embargo, a 900 °C la energía no es suficiente para cerrar todos los espacios entre los cristales, por lo que quedan conductos remanentes hacia el interior. Mientras que a 1100 °C la energía es tal que permite el cierre hermético del conglomerado (ver figura 3.31).

Retomando los valores de densidad esquelética de las muestras sinterizadas a 1100 °C mostrados en la figura 3.29, considerando el mecanismo de sinterización descrito y recordando el fundamento teórico de la picnometría de helio, se puede explicar el porqué de la subestimación del valor de la densidad esquelética. Se sugiere que el helio no puede penetrar en el conglomerado sinterizado a 1100 °C, y que por ello el volumen de material está siendo sobre estimado.

Para confirmar esta hipótesis se decidió triturar las muestras en un mortero de ágata antes de medir la densidad esquelética, con la idea de romper los conglomerados sinterizados herméticamente, de tal forma que el gas pudiera penetrar. Al medir la densidad bajo estas nuevas condiciones se encontró el valor esperado de 3.1 g/ml, correspondiente a la densidad del β -TCP y reportado en la tabla 3.4. Asimismo, se demostró que los conglomerados con morfología poliédrica son huecos en su interior. Cabe mencionar que el mismo resultado fue encontrado en las muestras no espumadas y espumadas.

3.4.7.3 Distribución de la porosidad en las espumas sinterizadas

Los valores de porosidad determinados por MIP presentados en la tabla 3.4 señalan que las muestras de referencia no contienen macroporosidad y que el porcentaje de porosidad total coincide con el porcentaje de microporosidad, debido a que no fueron espumadas.

Se observa cómo a pesar de la compactación global del volumen de la estructura de cemento, el porcentaje de microporosidad abierta se incrementa entre la condición de fraguado y el sinterizado a 900 °C. Este fenómeno puede explicarse porque la compactación de los agregados de cristales genera una mayor separación entre ellos (vacío), que se suma a la separación inicial originada por la proporción L/P de fabricación del cemento, tal como se ilustra en la figura 3.32. Al mismo tiempo, a la microporosidad se le suma el volumen del hueco interior de cada conglomerado, lo que da como resultado una microporosidad mayor en relación a la condición de fraguado.

Por otro lado, entre la condición de fraguado y la de sinterizado a 1100 °C, la microporosidad abierta disminuye. Esta caída en porosidad se relaciona con el sinterizado hermético de los conglomerados, que de forma similar al helio impide la entrada del mercurio, reduciendo el volumen de mercurio introducido (porosidad) en la estructura. En otras palabras, el hueco al interior de cada conglomerada pasa a ser microporosidad cerrada. Es importante señalar que para aplicaciones en ingeniería de tejidos, la porosidad accesible para las células y por tanto la porosidad de interés es la porosidad abierta, es decir aquella que puede ser cuantificada por medio de MIP.

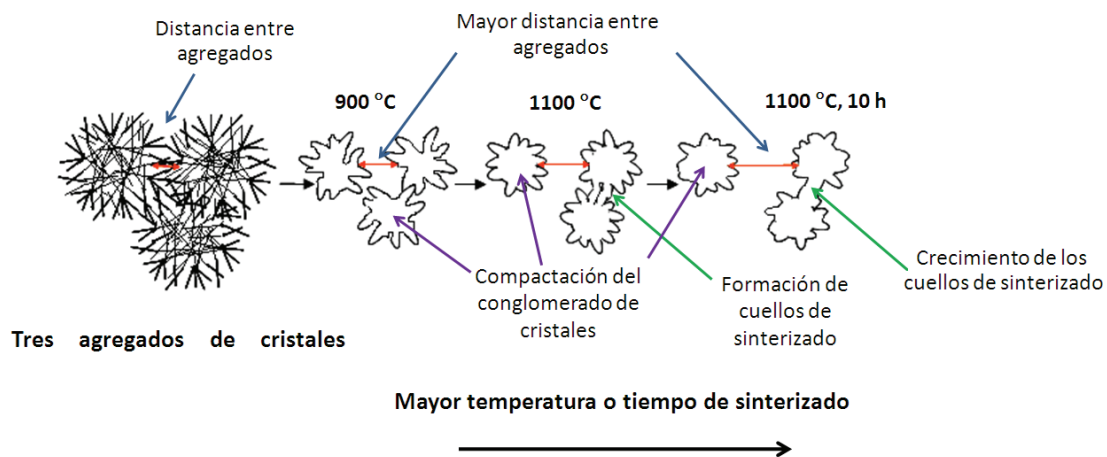


Figura 3.32: Esquema que ilustra la reducción de tamaño de cada agregado de cristales durante la sinterización. La reducción de tamaño y la desaparición de la estructura de cristales con forma de placas entrecruzadas (fig. 3.31) provocan la caída de resistencia mecánica de la pieza. Sin embargo, a mayores tiempos o temperaturas de sinterización la energía introducida propicia la formación de cuellos de sinterización entre algunos conglomerados, lo cual incrementa la resistencia mecánica de la estructura.

En cuanto a la macroporosidad de las muestras espumadas (tabla 3.4), esta parece incrementarse con la temperatura y el tiempo de sinterización para las espumas preparadas con L/P = 0.55 ml/g. Mientras que para las espumas preparadas con L/P = 0.65 ml/g, la macroporosidad se incrementa entre fraguado y sinterizado a 900 °C y disminuye para la condición de sinterizado a 1100 °C. En cualquier caso, las diferencias están dentro de la variabilidad de la macroporosidad debida al proceso de espumado (DE = 5.81 % para L/P = 0.55 ml/g, n = 3; DE = 11.64 % para L/P = 0.65 ml/g, n = 6; donde DE es la desviación estándar). Por lo que se puede decir que el proceso de sinterización no modifica significativamente la macroporosidad.

Por último, la distribución de la porosidad de las espumas sólidas en función del tamaño de entrada de poro, bajo las diferentes condiciones de procesado se presenta en la figura 3.33. La figura muestra la desaparición del pico correspondiente a los espacios entre cristales precipitados cuando los cementos son sinterizados a 1100 °C, mientras que cuando son sinterizados a 900 °C, este pico se agudiza y se centra en 0.15 μm , lo que confirma la existencia de pequeños canales hacia el interior de los conglomerados huecos sinterizados.

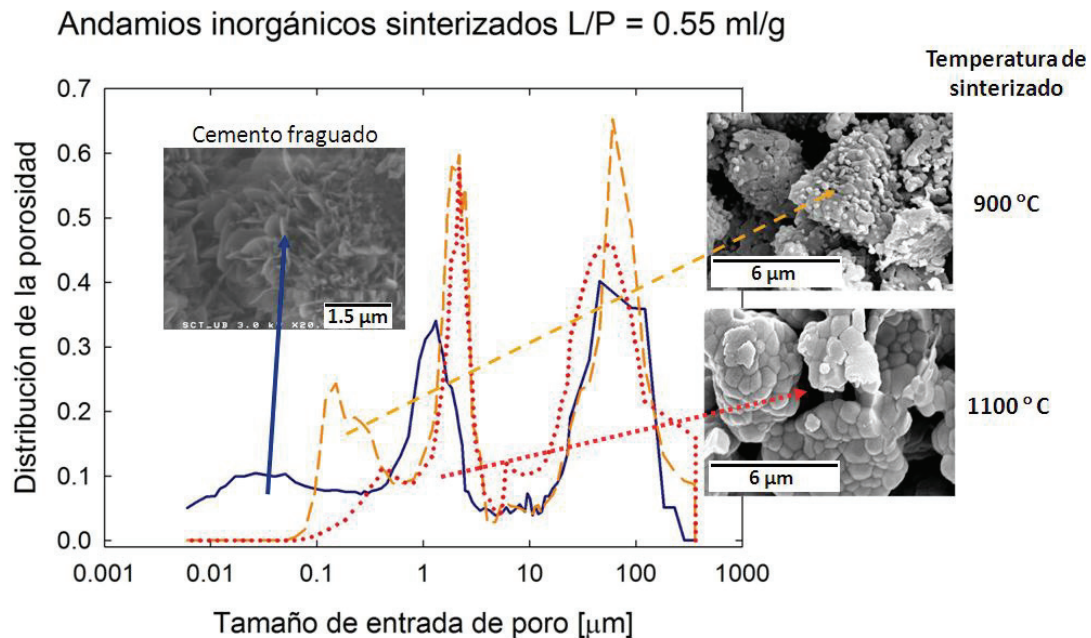


Figura 3.33: Distribución de la porosidad de las espumas sólidas obtenidas con 0.5 % de Tween 80, 2.5 % de acelerante y L/P = 0.55 ml/g. La línea continua representa la espuma fraguada, la línea discontinua representa la espuma sinterizada a 900 °C y la línea punteada representa la espuma sinterizada a 1100 °C. Ambas espumas fueron sinterizadas durante 2.5 horas. Las flechas indican la correspondencia de la distribución de la microporosidad con la microestructura observada por MEB. Nótese que la distribución de la macroporosidad (tamaños mayores a 5 μm) no se ve alterada considerablemente por la sinterización.

Por su parte, el pico correspondiente a los espacios entre agregados de cristales se desplaza con la sinterización 0.76 μm hacia la derecha, independiente de la temperatura de tratamiento. El desplazamiento es reflejo del incremento de la distancia entre conglomerados sinterizados, causado por la compactación de cada conglomerado (ver fig. 3.32). Por otro lado, al incrementar el tiempo de sinterización a 10 horas, el desplazamiento hacia la derecha llega a ser hasta de 1.07 μm , lo que significa una mayor compactación de los conglomerados.

En cuanto al diámetro de las conexiones entre macroporos, la distribución de la porosidad indicó que este no fue modificado por la sinterización. Sin embargo, debido a la contracción volumétrica total, el diámetro de los macroporos tuvo que disminuir para conservar el valor de porosidad constante.

3.4.7.4 Resistencia a la compresión de las espumas sinterizadas

Se observó que la resistencia a la compresión de los cementos de referencia disminuyó entre la condición de fraguado y el sinterizado a 900 °C (tabla 3.4). Sin embargo, se incrementó para la condición de sinterizado a 1100 °C. La disminución de resistencia a la compresión se atribuye al cambio morfológico. Es sabido que la resistencia mecánica del cemento fraguado se debe al entrecruzamiento de cristales con forma de placa. La formación de conglomerados poliédricos a 900 °C elimina el entrecruzamiento de cristales y no proporciona suficiente energía para formar cuellos de sinterización entre diferentes conglomerados, por lo que la resistencia mecánica disminuye (figura 3.32). Por su parte, a 1100 °C la sinterización si proporciona la energía suficiente para formar cuellos de sinterización entre algunos conglomerados, los cuales son más estables que el entrecruzamiento de cristales y por ello se observa el incremento en resistencia a la compresión.

Finalmente, siguiendo un comportamiento similar al de los cementos sin espumar, la resistencia a la compresión de las espumas sólidas fraguadas y sinterizadas a 900 °C disminuyó con respecto a la resistencia de las muestras fraguadas. Sin embargo, a diferencia de las muestras no espumadas, la resistencia a la compresión no se recuperó con la sinterización a 1100 °C durante 2.5 horas. La diferencia puede deberse a que la introducción de la macroporosidad disminuye el número de agregados de cristales adyacentes, por lo que la probabilidad de formar cuellos de sinterización disminuye. La menor formación de cuellos de sinterizado se refleja en un menor incremento de resistencia a la compresión, que no llega a superar la resistencia de la condición de fraguado, pero si tiende a igualarla.

Para verificar si la sinterización puede ser un método eficaz para incrementar la resistencia a la compresión, se prolongó el tiempo de sinterización hasta 10 horas a la temperatura de 1100 °C. Con este cambio se pretendió dar más tiempo a la formación de cuellos entre conglomerados. Como resultado se encontró un incremento del 43 % en la resistencia a la compresión con respecto a la condición de fraguado para la espuma fabricada con 0.5 % de Tween 80 y L/P = 0.55 ml/g (valores reportados en la tabla 3.4).

Por último, un factor importante a considerar durante la fabricación de espumas sólidas sinterizadas es la contracción dimensional. Deben calcularse las dimensiones iniciales del molde para obtener una muestra sinterizada con las dimensiones finales requeridas para rellenar un defecto óseo específico o ser colocada con precisión dentro de un bioreactor.

3.4.7.5 Trabajo futuro empleando las espumas sólidas fraguadas y sinterizadas

Ambos tipos de espumas sólidas (fraguada y sinterizada) varían simultáneamente en composición (CDHA y β -TCP) y estructura (superficie específica, cristalinidad y rugosidad), por lo que no se pueden emplear para determinar el efecto independiente que poseen estos dos parámetros sobre la regeneración ósea.

Sin embargo, gracias al control del tamaño de macroporo durante el espumado, para cada tipo de espuma se puede estudiar el efecto aislado de la macroporosidad sobre la regeneración ósea *in vitro* e *in vivo*. Además, independientemente de la microestructura, es interesante comparar el comportamiento *in vitro* de ambos materiales, debido a que presentan una fisicoquímica muy diferente. Por un lado, la CDHA al ser sumergida en un medio fisiológico

simulado tiende a tomar iones para formar una capa de apatita precipitada sobre su superficie, disminuyendo los contenidos de calcio y fosfato en el medio [15]. Por otro lado, se espera que la espuma de β -TCP, al ser más soluble, libere iones calcio y fosfato al medio. Por tanto es interesante comparar como estos dos comportamientos contrapuestos pueden afectar la adhesión, la proliferación y la diferenciación de células óseas o mesenquimales cultivadas directa o indirectamente sobre estos materiales.

Cabe mencionar que no está contemplado llevar a cabo estos dos estudios dentro de este trabajo, por lo que podrían formar parte de futuras investigaciones derivadas de esta tesis.

3.5 Conclusiones

De forma general se puede concluir que el método de espumado de la fase líquida de los CPC permite obtener espumas de CDHA autofraguables, que conservan la macroporosidad abierta si son inyectadas a tiempos menores a 2.5 minutos.

También se pueden obtener las siguientes conclusiones puntuales:

Espumado de la fase líquida (0 a 20 % w/v de Tween 80):

- La concentración de Tween 80 en el intervalo estudiado no modifica la espumabilidad de la fase líquida del cemento, pero si modifica la morfología de la espuma obtenida.
- Espumas líquidas estables con burbujas de mayor diámetro se obtienen con concentraciones de Tween 80 tan bajas como 0.5 %, lo que permite obtener espumas de HA con contenidos de Tween 80 menores a la dosis máxima permitida para aplicaciones parenterales.

Cohesión de las pasta de cemento espumadas:

- La introducción de la macroporosidad en el cemento disminuye la cohesión de las pastas. No hay un punto exacto en el cambio cohesión/no cohesión, sino que existe un intervalo de proporción L/P en el que el comportamiento de la pasta sufre de transiciones.
- El empleo del acelerante de la reacción de fraguado es necesario para obtener formulaciones de espumas con tiempos de cohesión aptos para relleno de defectos óseos.
- La cohesión de la pasta cementante en medio líquido define el método en que se pueden implantar las espumas de HA:
 - Pastas de cemento con cohesión son aptas como rellenos óseos autofraguables *in situ*.
 - Pastas de cemento sin cohesión sirven para la fabricación de andamios prefraguados *in vitro*.

Reacción de fraguado del cemento espumado con 5 % de Tween 80 y 2.5 % de acelerante:

- El producto de reacción del cemento espumado con Tween 80 es CDHA de baja cristalinidad y elevada superficie específica.
- La incorporación de 5 % de Tween 80 en la fase líquida no modifica la cinética de conversión del α -TCP a CDHA ni la microestructura final del cemento.

Porosidad y resistencia mecánica de las espumas de HA obtenidas con Tween 80 y acelerante:

- La porosidad de las espumas de HA está compuesta por la macroporosidad introducida por el método de espumado, superpuesta a la nano/microporosidad inherente del cemento sin espumar.
- La proporción L/P incrementa de forma paralela a la micro y a la macroporosidad de las espumas de HA.
- Contenidos de Tween 80 de 0.5 y 5 % en la fase líquida generan espumas de HA con macroporosidad equivalente. En cambio contenidos de Tween 80 mayores al 5 %, en la fase líquida, disminuyen ligeramente la macroporosidad alcanzada en las espumas.
- Moldear la pasta con espátula o mediante inyección inmediata reproduce de la mejor manera a la morfología de la espuma líquida y mantiene las interconexiones en la macroporosidad.
- En el caso de espumas prefraguadas *in vitro*, impregnar las paredes de los moldes con un aceite desmoldeante incrementa la cantidad de macroporosidad abierta sobre la superficie de las probetas.
- La resistencia a la compresión disminuye exponencialmente en función de la porosidad total de las espumas de HA. De tal forma que existe un límite en la porosidad que se puede introducir en los cementos. Este límite se define por la resistencia mecánica mínima para manipular sin fracturar la estructura macroporosa.

Sinterización de las espumas de CDHA:

- La sinterización a 1100 °C durante 10 horas incrementa alrededor de un 40 % la resistencia a la compresión de las espumas sólidas.
- Con la sinterización se obtienen espumas de β -TCP no inyectables y no autofraguables, pero que también pueden ser usadas como injerto óseo, porque el β -TCP es biocompatible y biodegradable.
- La sinterización disminuye la superficie específica y la rugosidad de las paredes que conforman los poros de la espuma sólida.
- La distribución de la macroporosidad abierta no se ve alterada significativamente por la sinterización de las espumas sólidas.

3.6 Referencias

1. Ginebra M.P., Espanol M., Montufar E.B., Perez R.A., Mestres G. New processing approaches in calcium phosphate cements and their applications in regenerative medicine. *Acta Biomaterialia* 2010; **6**: 2863-2873.
2. Akers M.J. Excipient-drug interactions in parenteral formulations. *J Pharm Sci* 2002; **99**: 2283.
3. Floyd A.G. Top ten considerations in the development of parenteral emulsions. *Pharm Sci Tec Today* 1999; **4**: 134-143.
4. Rowe R.C., Sheskey P.J., Weller P.J. *Handbook of pharmaceutical excipients*. London: Pharmaceutical Press, 2003.
5. Ash M., Ash I. *Handbook of pharmaceutical additives*. Aldershot: Gower Publishing, 1995.
6. Ginebra M. P. Desarrollo y caracterización de un cemento óseo basado en fosfato tricálcico alfa para aplicaciones quirúrgicas. Universitat Politècnica de Catalunya, 1996.
7. Ginebra M.P., Fernandez E., Driessens F.C.M., Planell J.A. The effect of Na₂HPO₄ addition on the setting reaction kinetics of an α -TCP cement. In LeGeros R.Z., LeGeros J.P. *Bioceramics* 1998; **11**: 243-246.
8. Salager J.L., Anderes J.M., Forgiarini A. Cuaderno FIRP 263-A: Modulo de enseñanza en fenomenos interfaciales. Mérida-Venezuela: Facultad de Ingeniería, 2003.
9. ASTM International C266-99. Standard test method for time of setting of hydraulic-cement paste by Gillmore needles, 2007.
10. Ginebra M.P., Rilliard A., Fernandez E., Elvira C., San Roman J., Planell J.A. Mechanical and rheological improvement of a calcium phosphate cement by the addition of a polymeric drug. *Journal of Biomedical Materials Research* 2001; **57**: 113-118.
11. Barralet J., Gbureck U., Thull R. Improved Calcium Phosphate Bone Cements. USA patent 103419 A1, 2004.
12. Takagi S., Chow L.C. Formation of macropores in calcium phosphate cement implants. *Journal of Materials Science-Materials in Medicine* 2001; **12**: 135-139.
13. Ginebra M.P., Driessens F.C.M., Planell J.A. Effect of the particle size on the micro and nanostructural features of a calcium phosphate cement: a kinetic analysis. *Biomaterials* 2004; **25**: 3453-3462.
14. Ginebra M.P., Delgado J.A., Harr I., Almirall A., del Valle S., Planell J.A. Factors affecting the structure and properties of an injectable self-setting calcium phosphate foam. *Journal of Biomedical Materials Research* 2007; **80A**: 351-361.

15. Engel E., del Valle S., Aparicio C., Altankov G., Asin L., Planell J.A., Ginebra M.P. Discerning the role of topography and ion exchange in cell response of bioactive tissue engineering scaffolds. *Tissue Engineering* 2008; **14A**: 1341-1351.
16. Elliott J.C. Structure and chemistry of the apatites and other calcium orthophosphates. Amsterdam: Elsevier, 1994.
17. Sigma. Tween 80: Product information. [P 5188], 2008.
18. Schramm L.L. Emulsions, foams and suspensions. Weinheim: Wiley-VCH, 2005.
19. Porter M.R. Handbook of surfactants. Great Britain: 1994.
20. Khairoun I., Driessens F.C.M., Boltong M.G., Planell J.A., Wenz R. Addition of cohesion promoters to calcium phosphate cements. *Biomaterials* 1999; **20**: 393-398.
21. del Real R.P., Wolke J.G.C., Vallet-Regi M., Jansen J.A. A new method to produce macropores in calcium phosphate cements. *Biomaterials* 2002; **23**: 3673-3680.
22. Dorozhkin S.V. Calcium orthophosphate cements for biomedical applications. *J.Mater.Sci.* 2008; **43**: 3028-3057.
23. Bohner M., van Lenthe G.H., Grünenfelder S., Hirsiger W., Evison R., Müller R. Synthesis and characterization of porous β -tricalcium phosphate blocks. *Biomaterials* 2005; **26**: 6099-6105.
24. Yang S., Leong K., Du Z., Chua C. The design of scaffolds for use in tissue engineering. Part I. Traditional factors. *Tissue Engineering* 2001; **7**: 679-689.
25. Ginebra M.P., Fernandez E., DeMaeyer E.A.P. et al. Setting reaction and hardening of an apatitic calcium phosphate cement. *Journal of Dental Research* 1997; **76**: 905-912.
26. Fernandez E., Ginebra M.P., Boltong M.G. et al. Kinetic study of the setting reaction of a calcium phosphate bone cement. *Journal of Biomedical Materials Research* 1996; **32**: 367-374.
27. Charriere E., Lemaitre J., Zysset P. Hydroxyapatite cement scaffolds with controlled macroporosity: fabrication protocol and mechanical properties. *Biomaterials* 2003; **24**: 809-817.
28. Almirall A., Larrecq G., Delgado J.A., Martinez S., Planell J.A., Ginebra M.P. Fabrication of low temperature macroporous hydroxyapatite scaffolds by foaming and hydrolysis of an α -TCP paste. *Biomaterials* 2004; **25**: 3671-3680.
29. Xu H.H.K., Carey L.E., Simon Jr.C.G. Premixed macroporous calcium phosphate cement scaffold. *Journal of Materials Science-Materials in Medicine* 2007; **18**: 1345-1353.
30. Ginebra M.P., Traykova T., Planell J.A. Calcium phosphate cements: competitive drug carriers for the musculoskeletal system? *Biomaterials* 2006; **27**: 2171-2177.

31. Gbureck U., Hölzel T., Klammert U., Würzler K., Müller F.A., Barralet J.E. Resorbable dicalcium phosphate bone substitutes prepared by 3D powder printing. *Advanced functional materials* 2009; **17**: 3940-3945.
32. Xu H.H.K., Simon C.G. Fast setting calcium phosphate-chitosan scaffold: mechanical properties and biocompatibility. *Biomaterials* 2005; **26**: 1337-1348.
33. Zuo Y., Yang F., Wolke J.G.C., Li Y., Jansen J.A. Incorporation of biodegradable electrospun fibers into calcium phosphate cement for bone regeneration. *Acta Biomaterialia* 2010; **6**: 1238-1247.
34. Habibovic P., Gbureck U., Doillon C.J., Bassett D.C., Van Blitterswijk C.A., Barralet J.E. Osteoconduction and osteoinduction of low-temperature 3D printed bioceramic implants. *Biomaterials* 2008; **29**: 944-953.
35. Markovic M., Takagi S., Chow L.C. Formation of macropores in calcium phosphate cement through the use of mannitol crystals. *Key Eng Mater* 2000; **773-776**: 192-195.
36. Qi X., Ye J., Wang Y. Alginate/poly (lactic-co-glycolic acid)/calcium phosphate cement scaffold with oriented pore structure for bone tissue engineering. *Journal of Biomedical Materials Research* 2009; **89A**: 980-987.
37. Khairoun I. Optimización de las propiedades de los cementos a base de fosfatos de calcio. Universidad Politécnica de Cataluña, 1998.
38. Bohner M., Baroud G. Injectability of calcium phosphate pastes. *Biomaterials* 2005; **26**: 1553-1563.
39. Ginebra M.P., Fernandez E., Driessens F.C.M., Planell J.A. Modeling of the hydrolysis of alpha-tricalcium phosphate. *Journal of the American Ceramic Society* 1999; **82**: 2808-2812.
40. Durucan C., Brown P.W. Kinetic model for alpha-tricalcium phosphate hydrolysis. *Journal of the American Ceramic Society* 2002; **85**: 2013-2018.
41. Daculsi G., Schmitt M. Physico chemical characterization of two processes of macropores elaboration for biphasic calcium phosphate ceramics. *Key Engineering Materials* 2001; **192-195**: 817-20.
42. Daculsi G., Laboux O., Malard O., Weiss P. Current state of the art of biphasic calcium phosphate bioceramics. *J.Mater.Sci.Mater.Med.* 2003; **14**: 195-200.
43. Gauthier O., Bouler J.M., Aguado E., Pilet P., Daculsi G. Macroporous biphasic calcium phosphate ceramics: influence of macropore diameter and macroporosity percentage on bone ingrowth. *Biomaterials* 1998; **19**: 133-139.

Capítulo 4: Cementos óseos compuestos con biopolímeros.

4.1 Introducción

Como se mencionó en el capítulo uno, el objetivo de esta tesis es obtener espumas de hidroxiapatita (HA), aplicando el método de espumado de la fase líquida a un cemento óseo en base a fosfato tricálcico alfa (α -TCP). En el capítulo anterior ya se obtuvieron espumas inyectables y autofraguables empleando como agente espumante un surfactante no iónico llamado comercialmente Tween 80. La selección de éste espumante se basó en que está aprobado para uso parenteral y por tanto puede ser implantado directamente en el cuerpo humano. No obstante, el método de espumado propuesto no está restringido al empleo de surfactantes como agentes espumantes.

La hipótesis de la tesis plantea que polímeros naturales como la gelatina, el alginato de sodio y/o el extracto de soja, pueden ser usados como agentes espumantes del cemento de fosfato de calcio (CPC). Dicha hipótesis se basa en que estos biopolímeros son usados en la obtención y estabilización de sistemas coloidales en aplicaciones cosméticas y alimentarias (ver capítulo 2 sección 2.4). Además, los polímeros antes mencionados se utilizan también en ingeniería de tejidos como vehículos para liberar células, fármacos o moléculas, capaces de promover el proceso de regeneración ósea (ver capítulo 2 sección 2.4).

Se espera que la incorporación de los biopolímeros en la fase líquida del cemento permita obtener espumas estables para crear espumas sólidas de HA, y que además mejore algunas propiedades del cemento como la cohesión y la inyectabilidad.

Con esta propuesta se intenta también que las paredes de la espuma sólida imiten de alguna manera la composición, la microestructura y el comportamiento mecánico del nanocompuesto natural que es el tejido óseo [1-4], debido a que el material que constituirá las paredes de la espuma será el cemento compuesto con los biopolímeros.

Por lo anterior, el presente capítulo se centra en el desarrollo y la caracterización de los materiales que constituirán las paredes de las espumas de HA que se obtendrán posteriormente (ver capítulo 5).

La incorporación de gelatina y alginato de sodio en los CPC no es novedosa. Por un lado, la gelatina se ha incorporado tanto en la fase líquida como en la sólida de cementos en base a α -TCP, con la intención de mejorar la cohesión de las pastas [5], incrementar la resistencia mecánica [6-8] e incluso como agente porógeno [5,9]. Por otro lado, el alginato de sodio se ha combinado con un cemento en base a fosfato tetracálcico, para mejorar la cohesión de la pasta, a través del gelificado del alginato con los iones calcio aportados por el mismo cemento [10,11].

En cambio, la combinación del cemento con el extracto de soja abre nuevas posibilidades en el desarrollo de materiales híbridos para la regeneración del tejido óseo.

4.2 Objetivos

Los objetivos del presente capítulo son:

1. Desarrollar materiales compuestos biopolímero/CPC para regenerar el tejido óseo. Los biopolímeros estudiados son la gelatina, el alginato de sodio y el extracto de soja, que posteriormente serán empleados como agentes espumantes del cemento.
2. Estudiar el efecto de la incorporación de estos biopolímeros en las propiedades del cemento basado en α -TCP, con la intención de comprender el comportamiento del material, como paso previo a la obtención de espumas inyectables compuestas. Concretamente se analiza la influencia de la adición de cada biopolímero en la fase líquida, la concentración del biopolímero, el empleo de un acelerante de la reacción de fraguado y el medio de fraguado, sobre las propiedades de los cementos compuestos obtenidos.

4.3 Materiales y métodos

4.3.1 Diseño experimental

El desarrollo de los materiales compuestos biopolímero/CPC se basó en la caracterización de las siguientes propiedades del cemento:

1. La cohesión, los tiempos de fraguado y la inyectabilidad de las pastas.
2. La resistencia mecánica, la densidad aparente, la porosidad total y el avance de la reacción de fraguado después de 7 días de reacción.

Para ello se analizó la influencia de diversas variables experimentales, descritas en la tabla 4.1.

Tabla 4.1: Parámetros experimentales estudiados en el desarrollo de materiales compuestos biopolímero/CPC.

Parámetro analizado	Alginato de sodio (An)	Alginato de sodio sulfatado (As)	Gelatina de bovino tipo A y B (Ga y Gb)	Extracto de Soja (S)
Acelerante en la fase líquida	H ₂ O (W) /Solución de Na ₂ HPO ₄ (A)	H ₂ O (W) /Solución de Na ₂ HPO ₄ (A)	H ₂ O (W) /Solución de Na ₂ HPO ₄ (A)	H ₂ O (W) /Solución de Na ₂ HPO ₄ (A)
Concentración de polímero en la fase líquida	1, 2, 4, 6	2, 6	5, 10, 15, 20	20, 56
Condición de fraguado	Inmersión en Ringer/ Envuelto en papel aluminio	Inmersión en Ringer/ Envuelto en papel aluminio	Inmersión en Ringer/ Envuelto en papel aluminio	Inmersión en Ringer/ Envuelto en papel aluminio
Proporción L/P [ml/g]	0.40, 0.80	0.40, 0.80	0.35, 0.40, 0.47, 0.80	0.23, 0.32

Es difícil seguir un único diseño experimental para todos los biopolímeros empleados debido a su diferente naturaleza. Es por ello que se siguieron diseños distintos, ajustando los parámetros a las características de cada componente. Los diseños experimentales se describen a continuación.

4.3.1.1 Nomenclatura de los cementos compuestos con biopolímeros

Para simplificar la representación gráfica de los resultados se emplea una nomenclatura estándar para todos los compuestos ensayados. Dicha nomenclatura es ilustrada por la ecuación 4.1 mostrada a continuación.

$$\# \text{ Letras W ó A} - \text{L/P} \quad \text{EQ 4.1}$$

El primer número (#) corresponde a la concentración del biopolímero en la fase líquida, expresada en w/v para alginato y gelatina y en w/w para soja. Las “Letras” a continuación se refieren a el tipo de biopolímero empleado y pueden ser las siguientes combinaciones, Ga: gelatina tipo A, Gb: gelatina tipo B, An: alginato de sodio (sin sulfatar), As: alginato de sodio sulfatado, y S: extracto de soja. La siguiente letra en la nomenclatura puede corresponder a W ó A y significa el empleo o no del agente acelerante de la reacción de fraguado, en otras palabras, W significa sin acelerante; las disoluciones se prepararon con agua destilada y A significa que las disoluciones se prepararon con disolución de acelerante. Finalmente, el último valor separado por un guion representa la proporción L/P de mezclado, expresada en ml/g.

Los cementos fabricados sin la incorporación de biopolímeros, usados como material de referencia o control, se codificaron con las letras “Ref”, en vez de la concentración y el tipo de biopolímero. Por ejemplo, la nomenclatura RefA-0.40 significa cemento de referencia preparado con acelerante y con proporción L/P = 0.40 ml/g. De tal forma que esta referencia sirve de control para todos los cementos compuestos fabricados con acelerante y L/P = 0.40 ml/g, sin importar con qué tipo de biopolímero se hayan combinado.

4.3.1.2 Tiempo de cohesión, tiempos de fraguado, y resistencia a la compresión de los cementos compuestos

La caracterización de los cementos compuestos con gelatina tipo B se inició determinando el efecto del contenido de gelatina y la proporción líquido/polvo (L/P) de mezclado sobre la cohesión, los tiempos de fraguado y la resistencia a la compresión de los compuestos, fabricados sin acelerante de la reacción de fraguado (Figura 4.1a), para posteriormente estudiar el efecto del acelerante sobre las mismas propiedades manteniendo constante la proporción L/P (Figura 4.1b).

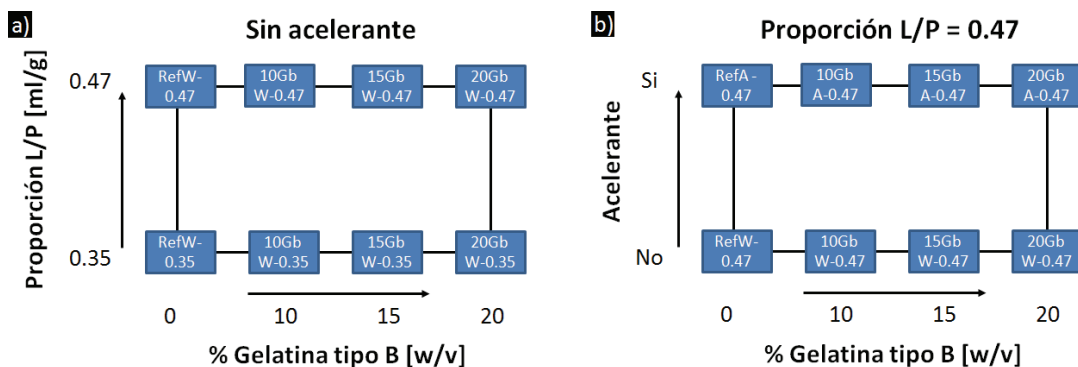


Figura 4.1: Diseño experimental seguido durante la determinación del tiempo de cohesión, los tiempos de fraguado y la resistencia a la compresión de los cementos compuestos con gelatina tipo B. a) Sin el empleo del acelerante se varió la proporción L/P y la concentración de gelatina. b) Manteniendo constante la proporción L/P se estudió el efecto del empleo del acelerante de la reacción de fraguado y de la concentración de gelatina.

En el caso de los compuestos con alginato de sodio, la caracterización se inició estudiando el efecto de la concentración de alginato sin sulfatar y el uso del acelerante de la reacción de fraguado sobre el tiempo de cohesión, los tiempos de fraguado y la resistencia a la compresión de los compuestos (Figura 4.2a). Posteriormente se determinó el efecto del tipo de alginato sobre las mismas propiedades (Figura 4.2b). En ambos casos la proporción L/P se mantuvo constante.

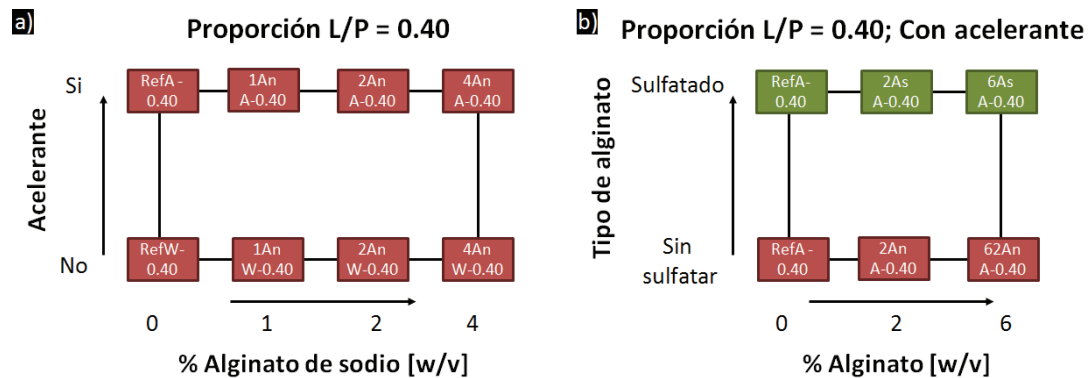


Figura 4.2: Diseño experimental seguido durante la determinación del tiempo de cohesión, los tiempos de fraguado y la resistencia a la compresión de los cementos compuestos con alginato de sodio y alginato de sodio sulfatado. a) Bajo una proporción L/P fija se determinó el efecto del empleo del acelerante de la reacción de fraguado y del contenido de alginato de sodio. b) Para una proporción L/P constante y con el empleo del acelerante, se determinó el efecto del tipo y concentración del alginato.

Esta primera etapa experimental se finalizó estudiando el efecto de la concentración del extracto de soja, el uso de acelerante y la proporción L/P sobre el tiempo de cohesión, los tiempos de fraguado y la resistencia a la compresión de los compuestos obtenidos, de acuerdo al diseño experimental mostrado en las figura 4.3.

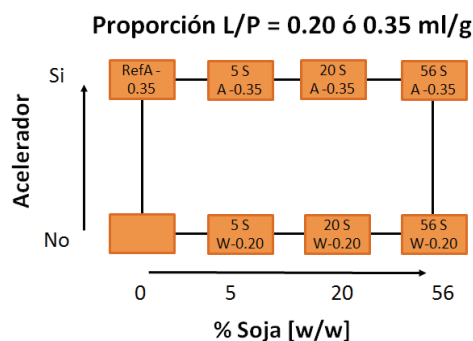


Figura 4.3: Diseño experimental seguido durante la determinación del tiempo de cohesión, los tiempos de fraguado y la resistencia a la compresión de los cementos compuestos con extracto de soja. Cabe destacar que se varió simultáneamente la proporción L/P y la incorporación del acelerante. Finalmente subrayar que la RefW-0.20 no pudo ser moldeada por ser la pasta en extremo seca.

Los ensayos de resistencia a la compresión correspondientes a esta primera etapa se realizaron sobre cementos fraguados durante 7 días sumergidos en solución de Ringer (0.9 % NaCl).

4.3.1.3 Caracterización de las propiedades fisicoquímicas y texturales de los cementos compuestos

El estudio anterior, sobre el tiempo de cohesión y los tiempos de fraguado, se utilizó para acotar las composiciones de cemento más adecuadas. En esta segunda parte se caracterizó con mayor profundidad otras propiedades del cemento: 1) la porosidad, 2) la resistencia a la compresión, 3) la superficie específica y 4) el avance de la reacción de fraguado. Las variables experimentales analizadas fueron la concentración de polímero en la fase líquida del cemento, el tipo de polímero (las cinco variedades listadas en la tabla 4.1) y el medio de fraguado. Los diseños experimentales seguidos para los cementos compuestos con alginato de sodio sin sulfatar y sulfatado o gelatina tipos A y B se presentan en la figura 4.4. Por el contrario, para el cemento compuesto con extracto de soja no se evaluó el efecto del medio de fraguado, ni diferentes subtipos de soja. El diseño experimental de un sólo factor utilizado en este caso se muestra en la figura 4.5.

Finalmente, para determinar la factibilidad de la implantación mediante cirugía mínimamente invasiva se determinó la inyectabilidad de los cementos compuestos con cada biopolímero, en función de la concentración del polímero y la proporción L/P de preparación. En todos los casos la inyección se realizó 2.5 minutos después del contacto de la fase sólida con la líquida. Además, como complemento se determinó visualmente la cohesión de los cementos compuestos después de ser inyectados en agua a 37 °C.

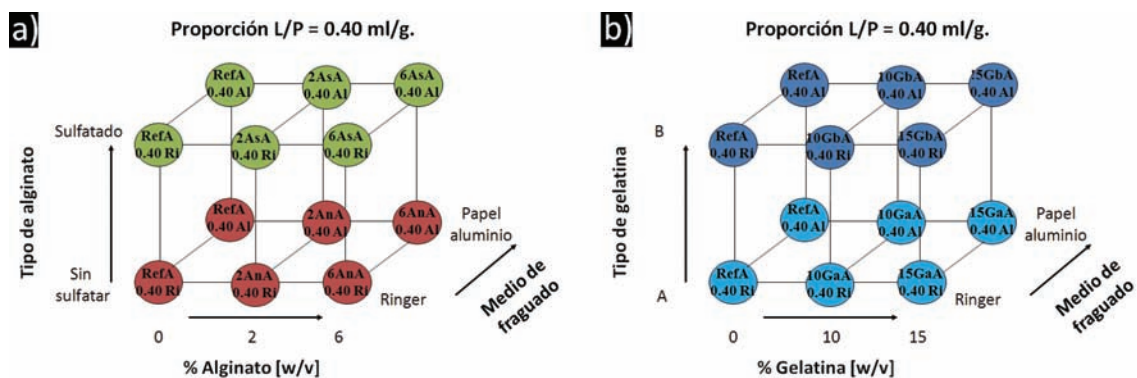


Figura 4.4: Diseño experimental seguido durante la caracterización de los cementos compuestos, en función del medio de fraguado y del tipo de biopolímero empleado. a) Diseño de tres factores seguido para el alginato de sodio. b) Diseño de tres factores seguido para la gelatina.

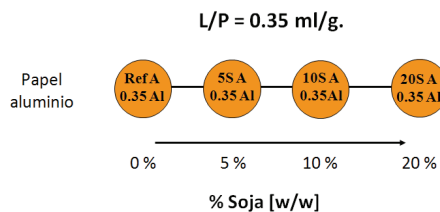


Figura 4.5: Diseño experimental de un factor seguido durante la caracterización de los cementos compuestos con extracto de soja, en función de la concentración del biopolímero.

4.3.1.4 Comportamiento a flexión de los cementos compuestos

En esta última etapa se complementó el estudio de las propiedades mecánicas de los diferentes compuestos. Para ello, además de los ensayos previos de resistencia a la compresión, se determinó la resistencia a la flexión y el módulo de elasticidad a flexión de los cementos compuestos preparados con acelerante y fraguados durante 7 días en papel de aluminio, para evitar la liberación de la fase polimérica. Las concentraciones de biopolímero y la proporción L/P se mantuvieron iguales a las descritas en la sección 4.3.1.3 para poder comparar los resultados.

4.3.2 Fase sólida del cemento

El cemento empleado consistió en una mezcla de 98 % de α -TCP con 2 % de hidroxiapatita precipitada (pHA; Alco, ref. 1.02143.1000), formando lo que se conoce como cemento H [12]. El α -TCP fue sintetizado por reacción a alta temperatura y molido tal como está descrito en la sección 3.3.1 de esta tesis, obteniendo un tamaño medio de partícula de 7.34 μm .

4.3.3 Fase líquida del cemento

Como fase líquida del cemento se probaron disoluciones acuosas de gelatina bovina de tipos A y B, alginato de sodio sin sulfatar y sulfatado, y extracto de soja. Las características de cada biopolímero y el proveedor se detallan a continuación (tabla 4.2):

Tabla 4.2: Tipos y características de los diferentes biopolímeros empleados en la obtención de cementos compuestos.

Biopolímero	Variiedad	Anotaciones		Proveedor
Gelatina de bovino	Tipo A	Bloom = 250	PIE = 6 - 9.5	Rousselot AB - A
	Tipo B	Bloom = 250	PIE = 4.5 - 5.6	Rousselot LB - B
Alginato de sodio	Sin sulfatar	Ultra alto peso molecular	PM = 239500 DS = 0.0 %	Universidad de Ghent - Bélgica
	Sulfatado	Bajo peso molecular	PM = 25000 DS = 27.7 %	Universidad de Ghent - Bélgica
Extracto de soja				Universidad de Brighton - Reino Unido

PIE: punto isoeléctrico, PM: peso molecular [Dalton], DS: grado de sulfatación.

Las concentraciones en la fase líquida fueron seleccionadas con la intención de introducir la mayor cantidad posible de biopolímero en el cemento.

Las disoluciones fueron preparadas en agua destilada (millipore) o en solución líquida de Na_2HPO_4 (Merck, ref. 06586.0500) al 2.5 % en peso - volumen (w/v), para determinar el efecto del Na_2HPO_4 como acelerante de la reacción de fraguado en los cementos compuestos.

4.3.3.1 Disoluciones de gelatina

Las soluciones de gelatina fueron preparadas disolviendo el polvo de gelatina en agua o solución de acelerante, precalentados a 55 °C. Las concentraciones utilizadas en este estudio fueron: 0, 10, 15 y 20 % w/v.

Las soluciones de gelatina obtenidas fueron almacenadas a 4 °C y empleadas antes de 7 días desde su preparación.

4.3.3.2 Disoluciones de alginato de sodio y alginato de sodio sulfatado

Los alginatos fueron disueltos en agua o solución de acelerante a temperatura ambiente con agitación durante una noche. Las concentraciones de alginato de sodio sin sulfatar (An) empleadas fueron: 0, 1, 2, 4 y 6 % w/v. Mientras que las concentraciones de alginato de sodio sulfatado (As) fueron: 0, 2 y 6 % w/v.

Las soluciones de ambos alginatos fueron almacenadas a 4 °C y empleadas antes de 7 días desde su preparación.

4.3.3.3 Disoluciones de extracto de soja

El extracto de soja fue disuelto en agua o disolución de acelerante a temperatura ambiente. Las concentraciones empleadas fueron: 0, 5, 10, 20 y 56 % peso/peso (w/w).

Las soluciones de soja fueron almacenadas a 4 °C y empleadas siempre al día siguiente de su preparación. Los remanentes fueron desechados para evitar la degradación de las isoflavonas.

4.3.4 Preparación y caracterización de los cementos compuestos

4.3.4.1 Fabricación de las probetas

Las pastas de cemento fueron preparadas mezclando la fase líquida con la sólida mediante espátula dentro de morteros de vidrio. Volúmenes múltiples enteros de 1 ml de fase líquida fueron empleados en la preparación, ajustando la cantidad de polvo necesaria para mantener la proporción L/P deseada.

Para preparar los cementos compuestos con gelatina, la fase líquida fue calentada a 55 °C antes de ser mezclada con la fase sólida. Además, en ningún caso la gelatina fue entrecruzada.

Una vez obtenida una pasta homogénea, se procedía a moldear con espátula las probetas necesarias dentro de moldes de teflón de 6 mm de diámetro por 12 mm de altura. Para evitar variaciones en las propiedades debidas a diferentes tiempos de mezclado y moldeo, estos procesos se realizaron cronometrando el tiempo empleado.

4.3.4.2 Medios de fraguado

Durante este estudio se probaron dos condiciones de fraguado:

- i) inmersión en medio líquido salino a 37 °C (inmersión en solución de Ringer) y
- ii) fraguado en aire a 37 °C y humedad (envuelto en papel de aluminio).

En el primer caso los moldes con el cemento fueron sumergidos en solución de Ringer (0.9 % w/v de NaCl) a partir del tiempo en que las pastas tuvieron cohesión. En el segundo caso, los moldes con el cemento fueron envueltos en papel de aluminio para evitar la evaporación del agua contenida en la fase líquida de mezclado, manteniendo así una atmósfera húmeda para que se pudiera llevar a cabo la reacción de fraguado. En ambos casos los moldes se colocaron dentro de una estufa a 37 °C.

4.3.4.3 Técnicas de caracterización

Tiempos de cohesión: El tiempo de cohesión se determinó de acuerdo con el capítulo 3, sección 3.3.5.1.

Complementariamente se determinó visualmente si las pastas de cemento compuesto tenían cohesión al ser inyectadas directamente en agua a 37 °C, durante un periodo máximo de 60 minutos. Se tomaron imágenes con una cámara digital Olympus C-5060.

Tiempos de fraguado: Los tiempos de fraguado se determinaron por el método de las agujas de Gillmore, de acuerdo con el capítulo 3 sección 3.3.5.2.

Comportamiento mecánico: La resistencia a la compresión y el módulo de elasticidad a compresión se determinaron de acuerdo con el capítulo 3, sección 3.3.5.7. Las muestras fueron fraguadas durante 7 días en medio líquido o en papel de aluminio como se explicó anteriormente.

Adicionalmente, se realizaron ensayos de flexión a 4 puntos para determinar la resistencia a la flexión y el módulo de elasticidad a flexión de los cementos. El ensayo se llevó a cabo en la misma máquina de ensayos mecánicos con la que se determinó la resistencia a la compresión. La velocidad de avance del cabezal fue de 0.5 mm/min. Las dimensiones de las muestras fueron largo (l) 50 mm, ancho (w) 3 mm y alto (h) 4 mm. La separación entre los puntos de apoyo (L_A) fue de 4 cm, mientras que la separación entre los puntos de aplicación de carga (L_C) fue de 2.4 cm. El dispositivo experimental empleado se ilustra en la figura 4.6. Un mínimo de 3 muestras fueron ensayadas por cada serie analizada. Finalmente, la resistencia a la flexión (σ_f) fue calculada mediante la ecuación 4.2.

$$\sigma_f = \frac{3F(L_A - L_C)}{2wh^2} \quad \text{EQ.4.2}$$

Donde F es la carga aplicada.

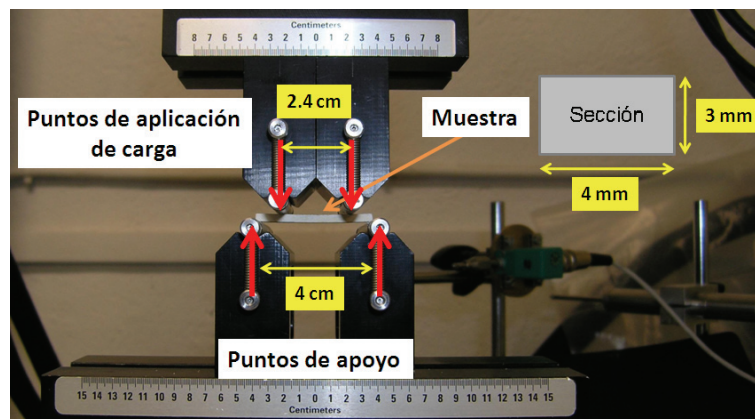


Figura 4.6: Vista general del dispositivo experimental para el ensayo de flexión a 4 puntos.

Caracterización de fases: Las fases cristalinas presentes en los cementos después de 7 días de reacción fueron determinadas mediante difracción de rayos X (DRX) de acuerdo con el capítulo 3, sección 3.3.5.8. Los ensayos de difracción se realizaron sobre las muestras que habían sido ensayadas a compresión. A diferencia del capítulo 3, el porcentaje de avance de la reacción se determinó midiendo solamente el área bajo la curva del pico principal de difracción del α -TCP (α -TCP₁₀₀ – 30.74° en 2 θ).

Superficie específica: Con el objetivo de determinar la influencia de los biopolímeros, la superficie específica de los cementos compuestos se determinó con el método BET, de acuerdo con el capítulo 3 sección 3.3.5.9.

Microestructura: La superficie de fractura de las muestras ensayadas a compresión fue analizada por microscopia electrónica de barrido (MEB; Jeol JSM 6400) de acuerdo con el capítulo 3, sección 3.3.5.4.

Densidad aparente y porosidad de los cementos: El porcentaje de porosidad total de las diferentes formulaciones de cemento se calculó a partir de la densidad aparente determinada por inmersión en mercurio y la densidad esquelética determinada mediante picnometría de helio, de acuerdo con la metodología descrita en el capítulo 3, secciones 3.3.5.5 y 3.3.5.6.

Inyectabilidad: La inyectabilidad de las diferentes formulaciones de cemento se determinó de acuerdo con el capítulo 3, sección 3.3.5.3. En todos los casos la inyección de las pastas de cemento se inició 2.5 minutos después del contacto de la fase sólida con la líquida.

4.3.5 Análisis estadístico de los resultados

Las pruebas de igualdad de medias se realizaron aplicando la prueba estadística t de Student. El criterio de rechazo o aceptación de la hipótesis nula se fijó en un porcentaje de confiabilidad del 0.05 %.

4.4 Resultados y discusión

4.4.1 Disoluciones de biopolímeros como fase líquida de los cementos

La densidad esquelética de los biopolímeros en estado sólido, completamente deshidratados, se determinó mediante picnometría de helio. Como resultado se encontró que no existen diferencias en densidad entre ambos tipos de gelatina y entre ambos alginatos usados. Las densidades obtenidas para cada biopolímero son: para gelatina 1.34 g/ml, para alginato 1.71 g/ml y para soja 1.44 g/ml.

En lo que respecta a las disoluciones de estos biopolímeros, la miscibilidad de los mismos con la fase líquida no se vio afectada por la adición del acelerante de la reacción de fraguado, en el intervalo de concentraciones estudiado.

La viscosidad de las disoluciones de biopolímero limita la cantidad máxima de polímero introducida en el cemento. Soluciones muy concentradas son difíciles de manejar y producen errores al momento de medir el volumen del líquido a mezclar. Dichas concentraciones límite son: 20 % w/v para gelatina, valor sugerido también como concentración máxima en la literatura [13] y 6 % w/v para alginato de sodio sin sulfatar. Por su parte, las disoluciones de extracto de soja con concentraciones superiores a 56 % w/w son difíciles de preparar debido a la saturación del disolvente.

Por otro lado, debido al menor peso molecular del alginato de sodio sulfatado, éste produce disoluciones con viscosidad similar a la del agua, y por tanto es posible preparar disoluciones más concentradas sin perder la precisión en la medida del volumen de la fase líquida. No obstante, la concentración máxima de alginato sulfatado empleada en este estudio fue de 6 %, debido a que concentraciones superiores producen pastas de cemento poco moldeables.

La viscosidad de las disoluciones no fue cuantificada en este trabajo. A pesar de ello se puede decir cualitativamente que la viscosidad de las disoluciones de gelatina cambia con la temperatura y que a temperatura ambiente la disolución gelifica. La temperatura de gelificación tampoco fue determinada, no obstante, en la literatura se reporta que la transición líquido/gel y viceversa es alrededor de 37 °C [14,15]. Asimismo, cuando la disolución de gelatina es precalentada a 55 °C su viscosidad es adecuada para su manipulación y la desnaturalización de la proteína es mínima. Sin embargo, deben evitarse ciclos de calentamiento y enfriamiento para conservar las propiedades de la disolución de gelatina.

Por otro lado, se percibió que las disoluciones de alginato de sodio sin sulfatar son altamente viscosas a pesar de su baja concentración, por tanto el factor crítico para evitar variaciones en viscosidad es controlar la concentración de la disolución. Además, para evitar variaciones en la viscosidad causadas por la temperatura, siempre se trabajó a temperatura ambiente. Como se mencionó otro factor que modifica la viscosidad de las disoluciones de alginato es el peso molecular, de forma que con el alginato sulfatado, de bajo peso molecular, la viscosidad de la disolución era similar a la del agua.

En cuanto al extracto de soja, las disoluciones obtenidas eran de color marrón con un aroma dulce. La viscosidad de las disoluciones es relativamente baja, y se pueden manipular con precisión incluso con concentraciones hasta del 56 % w/w. En cuanto a la influencia de la temperatura en la viscosidad, ésta no fue analizada. Sin embargo, para evitar diferencias en viscosidad se trabajó siempre a temperatura ambiente.

Por último cabe mencionar que las disoluciones de estos biopolímeros son susceptibles a contaminaciones por hongos y bacterias, debido a su naturaleza proteica o de carbohidrato, por lo cual deben prepararse bajo condiciones asépticas y deben ser almacenadas a baja temperatura (4 °C). A pesar de ello, en algunos casos se observó la aparición de hongos en las disoluciones almacenadas por más de una semana, por lo que se decidió emplear el total del líquido lo más próximo a su preparación y se descartaron los sobrantes con más de 7 días de antigüedad.

4.4.2 Contenido de biopolímero en los cementos compuestos

Las concentraciones de biopolímero mencionadas a lo largo de la memoria hacen referencia a la concentración inicial de polímero en la fase líquida de los cementos. Los porcentajes de biopolímero respecto al total del cemento (fase líquida mas fase sólida) pueden ser calculados mediante la ecuación 4.3, presentándose los resultados en la tabla 4.3.

$$\%BioPol_{Cemento} = \frac{L}{P} * [PolLiq] * 100 \quad EQ.4.3$$

Donde: $\%BioPol_{Cemento}$ es la porcentaje en peso de polímero en el cemento, $\frac{L}{P}$ es la proporción L/P de mezclado expresada en ml de fase líquida por g de cemento, y $[PolLiq]$ es la concentración del polímero en la fase líquida expresada en g de polímero por ml de solución.

La cantidad final de biopolímero en el cemento es mayor cuanto más grande es la proporción L/P de mezclado y mayor es la concentración de polímero en la fase líquida.

La tabla 4.3 muestra también que los cementos compuestos con alginato de sodio (sin sulfatar o sulfatado) son los que menos incorporación de polímero reciben, debido a la baja concentración en la solución y una menor proporción L/P. Los compuestos con gelatina incorporan un mayor contenido de polímero, al emplear soluciones más concentradas y proporciones L/P mayores. Por último, los compuestos con soja son los que incorporan mayor cantidad orgánica en comparación con los otros cementos, al usar disoluciones mucho más concentradas.

Tabla 4.3: Contenido de biopolímero en los cementos compuestos, en función de la proporción L/P y de la concentración de la fase líquida.

Biopolímero	Concentración en la fase líquida [% w/v]	Proporción L/P [ml/g]	Contenido de biopolímero en el cemento [% w/w]
Gelatina	0	0.47	0
	10	0.47	4.7
	15	0.47	7.0
	20	0.47	9.4
Alginato de sodio sin sulfatar o sulfatado	0	0.40	0
	1	0.40	0.4
	2	0.40	0.8
	4	0.40	1.6
	6	0.40	2.4
Soja	20 [% w/w]	0.25	5.4*
	20 [% w/w]	0.32	6.9*
	56 [% w/w]	0.25	16.4*

* Valores corregidos multiplicando el valor de la ecuación 4.2 por la densidad de la solución de soja correspondiente ($\rho_{sol-soja\ 20\ \% w/w} = 1.08\ g/ml$; $\rho_{sol-soja\ 56\ \% w/w} = 1.17\ g/ml$).

Cabe mencionar que debido a que la concentración de las soluciones de extracto de soja está expresada en peso/peso (g de soja por g de solución), el resultado de la ecuación 4.2 debe ser multiplicado por la densidad de la solución de soja correspondiente ($\rho_{sol-soja}$), para mantener la congruencia de las unidades.

4.4.3 Tiempo de cohesión, tiempos de fraguado y resistencia a la compresión

4.4.3.1 Cementos compuestos con gelatina

Los tiempos de cohesión y fraguado para los compuestos gelatina tipo B/CPC se presentan en la figura 4.7. Asimismo, los resultados de resistencia a la compresión correspondientes a los cementos compuestos con gelatina tipo B, fraguados en Ringer durante 7 días, para diferentes proporciones L/P, con o sin acelerante, se representan en la figura 4.8.

Como dato sobresaliente, en la figura 4.7 se observa que todas las series, para cualquier proporción L/P, o cantidad de gelatina, con o sin acelerante, tienen cohesión desde el momento de tener preparada la pasta. Sin embargo, estos mismos factores sí afectan otras propiedades del material que se describen a continuación.

Efecto de la gelatina: Para las proporciones L/P analizadas la gelatina no tiene efecto sobre la cohesión del cemento, pero sí afecta los tiempos de fraguado. Mayores contenidos de gelatina disminuyen el tiempo inicial de fraguado, siendo más claro el efecto en aquellas series preparadas sin acelerante y $L/P = 0.47$ ml/g. Una posible causa de la disminución del tiempo inicial de fraguado puede ser la formación del gel de gelatina. Se debe tener presente que la gelatina forma un gel cuando se enfría por debajo de los $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, y que la rigidez de este gel se incrementa con el contenido de gelatina. Una vez preparada la pasta de cemento con disolución de gelatina, ésta se mantuvo a temperatura ambiente durante la medición de los tiempos de fraguado, por tanto al enfriarse la pasta endurece simultáneamente por formar el gel y la reacción de fraguado del cemento.

A diferencia del tiempo inicial, al aumentar el contenido de gelatina los tiempos finales de fraguado se incrementan. Este efecto contrario se puede atribuir a que el gel formado no es lo suficientemente duro para resistir la penetración de la segunda aguja de Gillmore empleada para determinar el tiempo final de fraguado. Además, el gel puede retener el agua de mezclado retardando el final de la reacción de fraguado del cemento y atrasando el endurecimiento final.

Por último, la adición de gelatina produce la disminución de resistencia a la compresión de los compuestos en comparación con las muestras de referencia. La disminución en resistencia a la compresión se puede atribuir a la disolución y a la liberación de la gelatina durante el fraguado en solución de Ringer, lo cual incrementa la porosidad del cemento compuesto. A este respecto cabe mencionar que la gelatina no se entrecruzó, por lo que es soluble y puede liberarse al medio líquido de fraguado.

En cuanto al incremento de la cantidad de gelatina, este no disminuye en mayor medida la resistencia a la compresión, dentro del intervalo analizado. En relación a lo anterior cabe señalar que la muestra 15GbW-0.47 hace que la tendencia de la serie W-0.47 no mantenga relación con la tendencia mostrada por las series W-0.35 y A-0.47. Por lo cual se cree que el resultado obtenido de resistencia a la compresión es un valor anómalo.

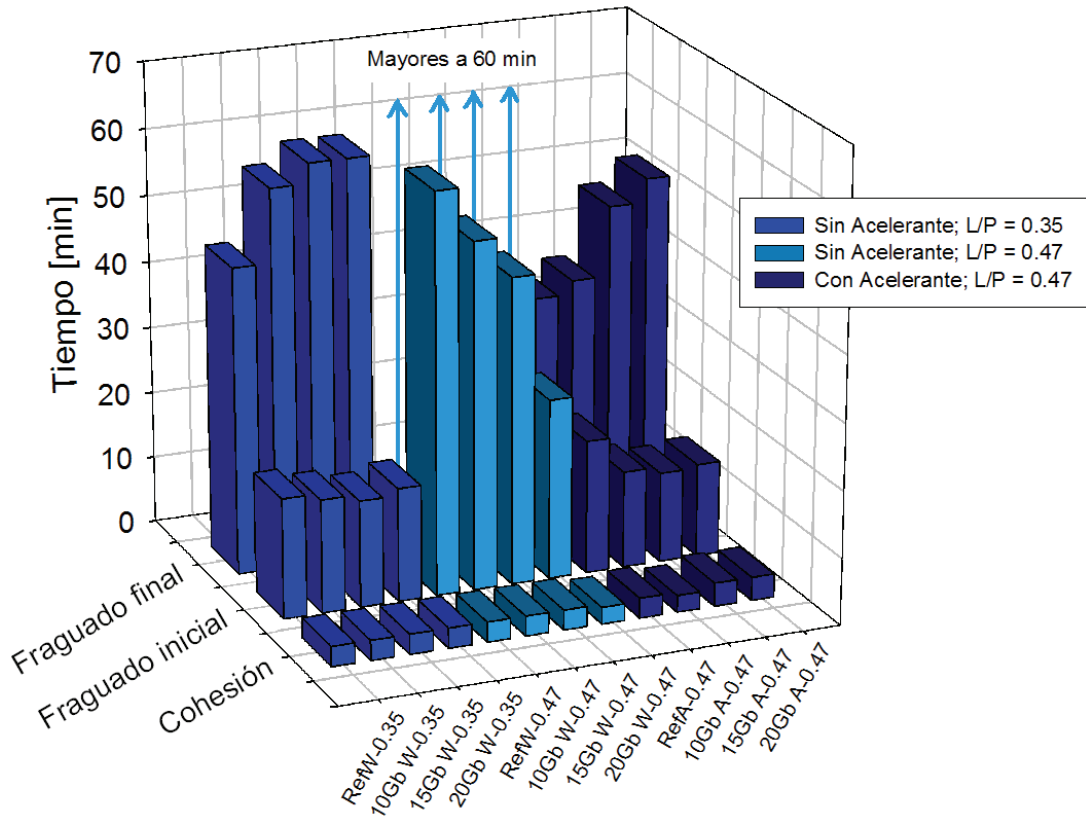


Figura 4.7: Tiempo de cohesión y tiempos de fraguado inicial y final para los compuestos gelatina tipo B/CPC. Las flechas indican tiempo superior a 60 minutos, lo cual significa que el valor exacto no fue determinado porque no es apto para aplicaciones médicas.

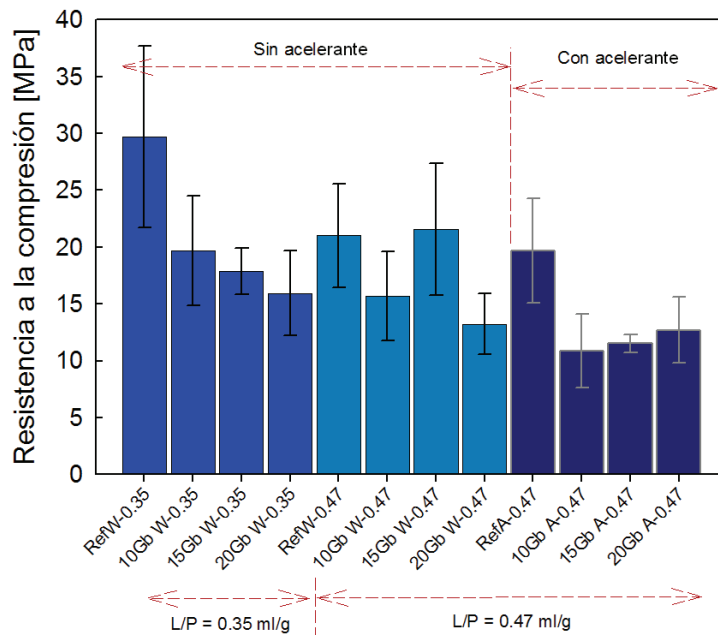


Figura 4.8: Resistencia a la compresión de los compuestos gelatina tipo B/CPC, fraguados durante 7 días por inmersión en solución de Ringer, con o sin agente acelerante de la reacción de fraguado.

Efecto de la proporción L/P: En las muestras preparadas sin acelerante se observa como el tiempo inicial y final de fraguado se incrementa considerablemente con el incremento de la proporción L/P. En el caso de las muestras con proporción L/P = 0.47 ml/g el tiempo final de fraguado supera los 60 minutos.

La resistencia a la compresión de los cementos de referencia sin acelerante (RefW) disminuye con el incremento de la proporción L/P. Esto se debe a la mayor porosidad generada por mezclar menos polvo de cemento en un volumen constante de líquido. El efecto de la proporción L/P se mantiene en las muestras preparadas con gelatina, sin embargo no es estadísticamente significativo.

Como ya se mencionó, hay una excepción correspondiente a la muestra 15GbW para la cual, contrariamente al comportamiento de los CPC, la resistencia a la compresión se incrementa al aumentar la proporción L/P de 0.35 a 0.47 ml/g. Razón extra para creer que se trata de un valor anómalo.

Efecto del acelerante: La adición del acelerante reduce los tiempos de fraguado de las series preparadas con L/P = 0.47 ml/g, e incluso acorta los valores por debajo de los valores obtenidos sin acelerante con proporción L/P = 0.35 ml/g. La disminución de los tiempos de fraguado se atribuye al efecto del ion común (fosfato) descrito por Driessens [16].

Bajo las mismas condiciones, pero sin el empleo del acelerante, Kevor [13] obtuvo tiempos de fraguado inicial y final muy similares a los aquí obtenidos. En este sentido, el empleo de la disolución mixta de acelerante/gelatina como fase líquida es una mejora considerable, en cuanto a disminuir el tiempo de fraguado del cemento compuesto con gelatina.

En lo que a la resistencia a la compresión se refiere, el uso de acelerante mostró disminuir ligeramente pero de forma significativa la resistencia a la compresión del cemento compuesto con 10 % de gelatina (L/P = 0.47 ml/g), pero para la referencia y el compuesto con 20 % de gelatina, el acelerante no modificó significativamente la resistencia a la compresión. Por otra parte, el valor de resistencia a la compresión considerado como anómalo para la muestra 15GbW-0.47 hace que la diferencia de resistencia con respecto a la muestra homónima con acelerante sea significativa.

4.4.3.2 Cementos compuestos con alginato de sodio

Los tiempos de cohesión y fraguado para los compuestos alginato de sodio sin sulfatar/CPC se presentan en la figura 4.9. En estos resultados el efecto más evidente es el del uso del acelerante de la reacción de fraguado, que disminuye considerablemente todos los tiempos analizados.

Sin acelerante, la adición de 1 y 2 % de alginato de sodio incrementa el tiempo de cohesión en 8 y 18 minutos respectivamente con respecto a la referencia. Los tiempos de fraguado se incrementan también con la incorporación del alginato, el tiempo inicial pasa de 12 a 51 minutos, mientras que el final pasa de 48 a 125 minutos cuando el contenido de alginato se incrementa de 0 a 4 %.

El retraso en el fraguado de los cementos sin acelerante puede explicarse por la formación del gel de alginato con los iones calcio aportados por la fase sólida del cemento. La formación del

gel secuestra los iones, evitando la nucleación de la nueva fase, y por tanto retardando el endurecimiento de la pasta.

Por otro lado, en el caso de los compuestos con acelerante, el efecto de la incorporación del alginato de sodio no es significativo en lo que a los tiempos de cohesión y fraguado inicial se refiere. En cambio, y a pesar de que la incorporación del acelerante reduce considerablemente el tiempo final de fraguado, los tiempos de fraguado final continúan aumentando ligeramente sobre el valor que presenta la referencia correspondiente. Además, el incremento detectado es el mismo con la adición de 1, 2 o 4 % de alginato de sodio.

La disminución de los tiempos de fraguado al incorporar el acelerante es debida principalmente al efecto del ion común (fosfatos) [16]. Sin embargo, es probable que la presencia de los iones sodio del acelerante contribuya a detener el retraso del fraguado producido por la formación del gel de alginato. Es probable que los iones sodio ocupen los sitios donde debería colocarse el ion calcio para formar el gel, dejando libre al calcio para llevar a cabo la reacción de fraguado. De acuerdo con estos resultados los compuestos alginato de sodio sin sulfatar/CPC necesitan del acelerante para lograr tiempos adecuados para el uso médico.

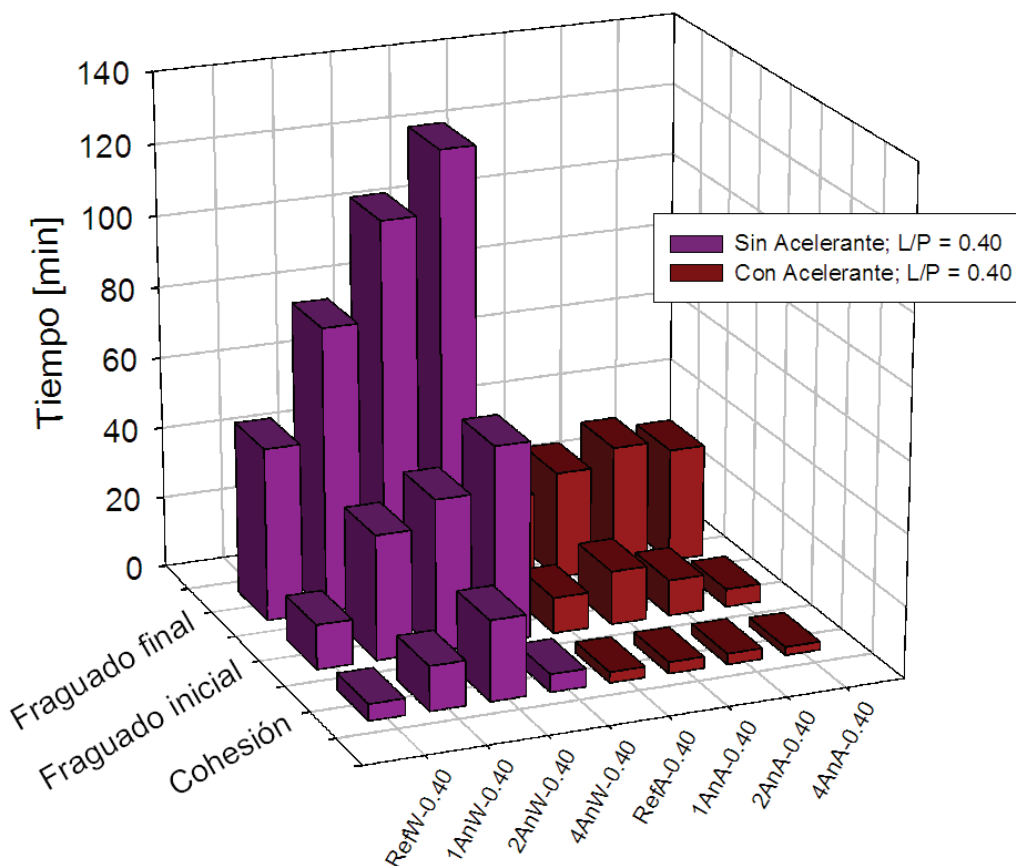


Figura 4.9: Tiempo de cohesión y tiempos de fraguado inicial y final para los compuestos alginato de sodio/CPC.

Ishikawa ha realizado diversos estudios del alginato de sodio como promotor de la cohesión de cementos óseos en base a fosfato tetracálcico [10,11,17]. En estas investigaciones la adición del alginato se realizó en la fase líquida de forma similar a este trabajo. Ishikawa reporta que

0.7 % de alginato es la cantidad mínima requerida para inducir la cohesión del cemento. También muestra que los tiempos de fraguado del cemento sin acelerante se incrementan mientras que con acelerante permanecen constantes, por lo que él también concluye que el uso de un acelerante de la reacción de fraguado es necesario para conseguir un mejor efecto del alginato [10]. Finalmente sugiere que el incremento de la cohesión observado se debe a un rápido fraguado del cemento por el uso del acelerante y al entrecruzamiento del cemento con el alginato [17].

De acuerdo con lo anterior, el estudio de los compuestos con alginato de sodio sulfatado se desarrolló únicamente disolviendo el alginato sulfatado en disolución de acelerante. Los resultados se presentan en la figura 4.10.

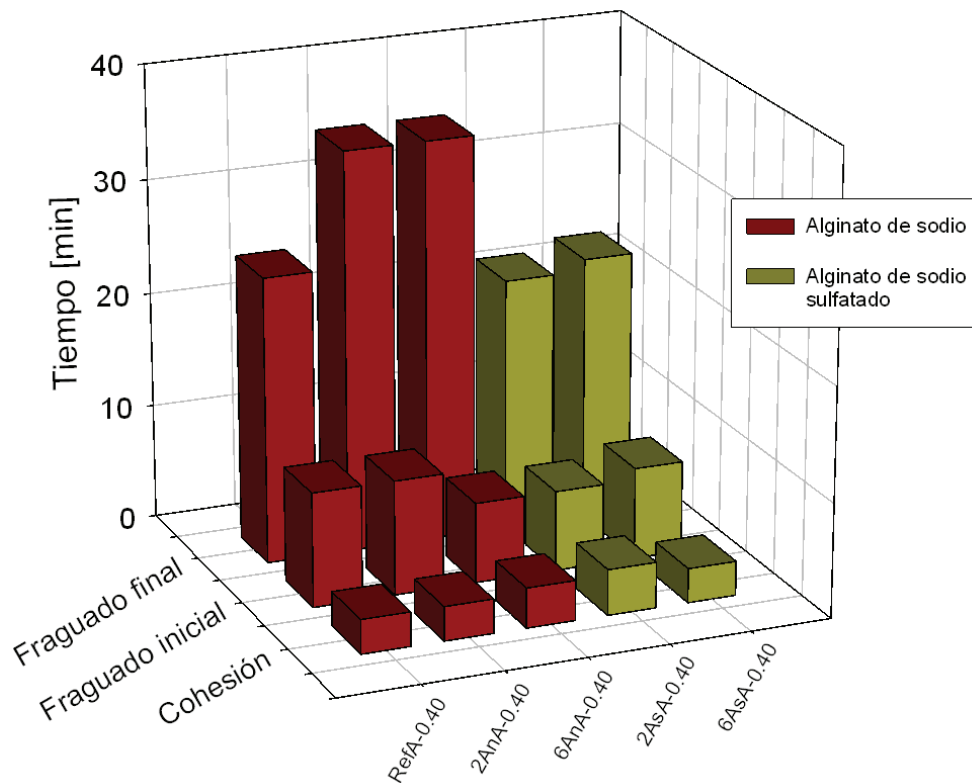


Fig. 4.10: Comparación del tiempo de cohesión y los tiempos de fraguado inicial y final, entre los compuestos con alginato de sodio y alginato de sodio sulfatado. Ambos con la incorporación del acelerante de la reacción de fraguado y $L/P = 0.40$ ml/g.

Una diferencia que se encontró entre ambos alginatos fue que el alginato de sodio sulfatado sí reduce ligeramente el tiempo inicial y final de fraguado de los cementos compuestos, con respecto al cemento de referencia. Tal y como se puede apreciar en la figura 4.10 este efecto es mayor sobre el tiempo final de fraguado. Que los tiempos de fraguado sean menores se puede atribuir al menor peso molecular del alginato de sodio sulfatado. Se sabe que cuanto menor es el peso molecular el gel de alginato es menos rígido, como consecuencia, la movilidad de los iones para que se lleve a cabo la reacción de fraguado no se ve afectada y permite que el efecto del ion común, aportado por el acelerante, sea más evidente. En cualquier caso, los cortos tiempos de fraguado obtenidos con alginato de sodio sulfatado impidieron incorporar a los cementos cantidades mayores al 6 % de este polímero, a pesar de que las disoluciones más concentradas son de baja viscosidad.

Finalmente, los tiempos de cohesión se mantienen en la misma magnitud que el tiempo correspondiente a la referencia, la cual tiene cohesión desde el momento en que la pasta fue obtenida. En este sentido, si se emplea el acelerante, el alginato de sodio sulfatado, al igual que el alginato sin sulfatar, no tienen un efecto negativo en la cohesión de los cementos, dentro del intervalo de concentraciones y para la proporción L/P analizadas.

La figura 4.11 muestra la resistencia a la compresión de los cementos compuestos con alginato de sodio sin sulfatar, con y sin acelerante, y la de los compuestos con alginato de sodio sulfatado con acelerante. Todos fraguados sumergidos en solución de Ringer durante 7 días.

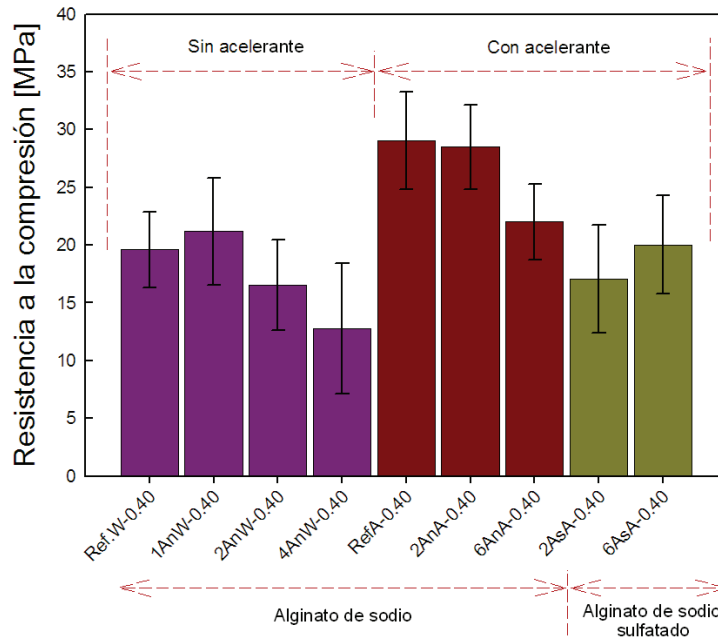


Figura 4.11: Resistencia a la compresión para los cementos compuestos con alginato de sodio sin sulfatar o sulfatado. Fraguados durante 7 días por inmersión en solución de Ringer, con o sin agente acelerante de la reacción de fraguado. L/P = 0.40 ml/g.

La incorporación de 1 o 2 % de alginato de sodio sin sulfatar con y sin acelerante no afecta significativamente la resistencia a la compresión de los cementos compuestos, los cuales presentan resistencias similares a las de sus respectivas referencias. En contraste, la incorporación de un 4 o 6 % si disminuye el valor medio de la resistencia a la compresión con respecto a la referencia correspondiente. Sin embargo, considerando la desviación de los valores el decremento no es estadísticamente significativo cuando no se emplea el acelerante, mientras que cuando si se emplea el acelerante, la disminución de resistencia a la compresión si es significativa. Es de destacar que para los diferentes contenidos de alginato de sodio sin sulfatar los valores de resistencia a la compresión son mayores cuando se usa acelerante.

Ishikawa reporta un comportamiento similar del cemento en base a fosfato tetracálcico con la incorporación de alginato de sodio [10]. El señala que contenidos mayores a 1 % de alginato reducen la resistencia mecánica del cemento, probablemente porque se retrasa la reacción de fraguado del cemento [10,11], lo cual atribuye a la formación de un gel entre el alginato y el cemento.

Por otro lado, la resistencia a la compresión de los compuestos con alginato de sodio sulfatado disminuye significativamente desde la incorporación de un 2 % de alginato, pero el valor disminuye en la misma proporción cuando se emplea un 6 %. En otras palabras, la caída de la resistencia no se incrementa con el incremento en el contenido del biopolímero. Finalmente, cabe mencionar que a pesar que los compuestos con alginato de sodio sulfatado contienen acelerante, la resistencia a la compresión es inferior a la de sus equivalentes con alginato de sodio sin sulfatar.

4.4.3.3 Cementos compuestos con extracto de soja

Los tiempos de cohesión y fraguado para los compuestos soja/CPC se presentan en la figura 4.12. Como resultado más sobresaliente se tuvo que el extracto de soja resulto ser un aditivo que incrementa la fluidez de la pasta de los cementos. Gracias al efecto fluidificante de la soja la proporción L/P se pudo disminuir hasta 0.20 ml/g, valor difícil de alcanzar con el cemento de referencia. Es por ello que en la figura 4.12 únicamente se comparan los tiempos de fraguado de los compuestos, con los valores obtenidos para el cemento de referencia fabricado con el valor mínimo de L/P (RefA-0.35), con el cual se puede obtener una pasta y no un polvo seco imposible de moldear.

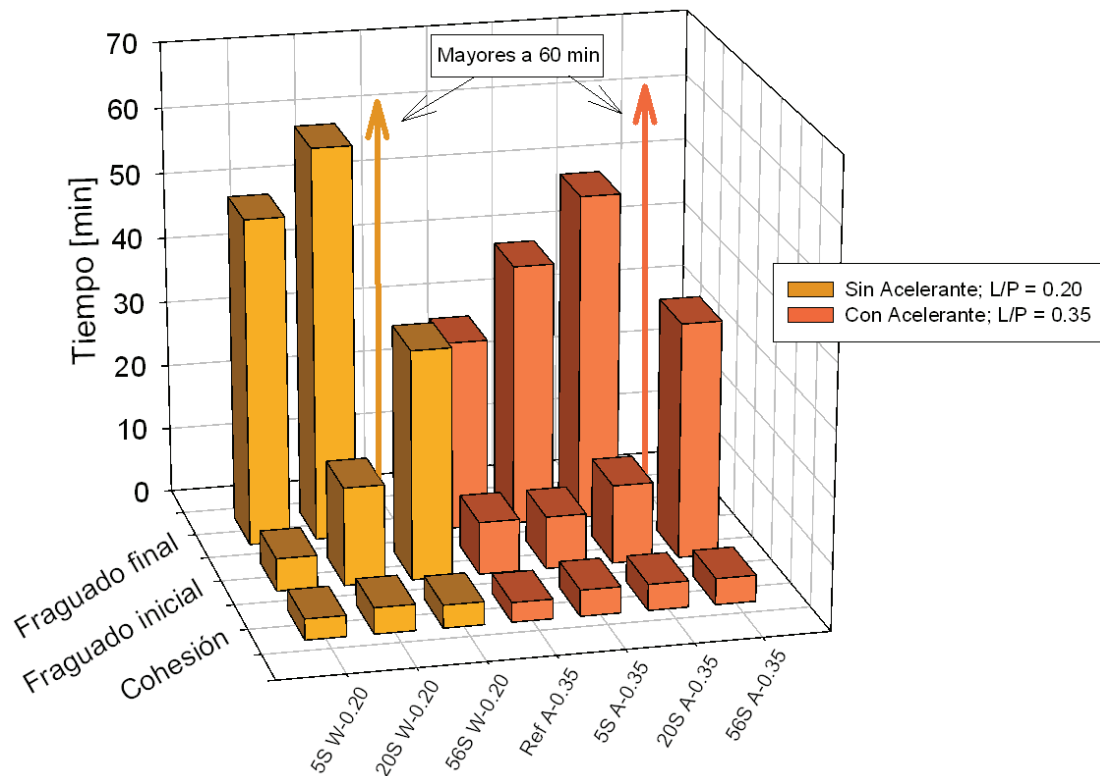


Figura 4.12: Tiempo de cohesión, tiempos de fraguado inicial y final para los compuestos extracto de soja/CPC. Las flechas indican tiempo superior a 60 minutos, lo cual significa que el valor exacto no fue determinado porque no es apto para aplicaciones médicas.

En la figura 4.12 puede observarse que todos los compuestos con soja, con y sin acelerante y para ambas proporciones L/P probadas tienen cohesión desde el momento en que se tuvo preparada la pasta. En particular para las muestras preparadas con acelerante y L/P = 0.35 ml/g el tiempo de cohesión parece ser mayor al del resto de las formulaciones, sin embargo, se puede asegurar que las muestras tuvieron cohesión justo después del moldeo, por lo que el tiempo mayor reportado se debe al mayor tiempo requerido para obtener las probetas.

Los tiempos de fraguado inicial y final se incrementan con la incorporación y con el aumento del contenido de soja. Sin acelerante, y a pesar de la menor proporción L/P empleada para obtener los compuestos, los tiempos de fraguado obtenidos superan a los de las muestras con acelerante y mayor proporción L/P. Este resultado indica que la incorporación del acelerante es más efectiva para reducir los tiempos de fraguado de los cementos compuestos con soja que disminuir la proporción L/P.

Es importante señalar que a pesar de las bajas proporciones L/P empleadas, sin el uso del acelerante los tiempos de fraguado finales de los cementos compuestos con soja son demasiado largos para aplicaciones como relleno de defectos óseos. En cambio, con acelerante y 5 % de soja, el tiempo de fraguado del compuesto con L/P = 0.35 ml/g es aún aceptable. Sin embargo, con 20 ó 56 % de soja el tiempo final de fraguado continua siendo inaceptable.

Estos resultados sugieren que el contenido máximo de soja en la fase líquida del cemento no debe ser mayor a 5 % en peso y que el uso de acelerante es necesario para obtener tiempos de fraguado adecuados para aplicaciones médicas. Es posible que trabajar con proporciones L/P menores a 0.20 ml/g genere tiempos de fraguado final aptos para relleno óseo, incluso para contenidos de soja mayores a el 5 % en peso.

La resistencia a la compresión de los compuestos con soja se presenta en la figura 4.13. Puede observarse que la incorporación de la soja disminuye la resistencia a la compresión de los cementos compuestos y que la caída es más grande cuanto mayor es el contenido de soja. Por otro lado, y a excepción de los compuestos con 56 % de soja, la resistencia a la compresión no se modifica significativamente por el hecho de emplear o no el acelerante. Sin embargo, en dos de los tres casos, los valores medios siempre son más elevados cuando si se emplea el acelerante, a pesar de la mayor proporción L/P de fabricación.

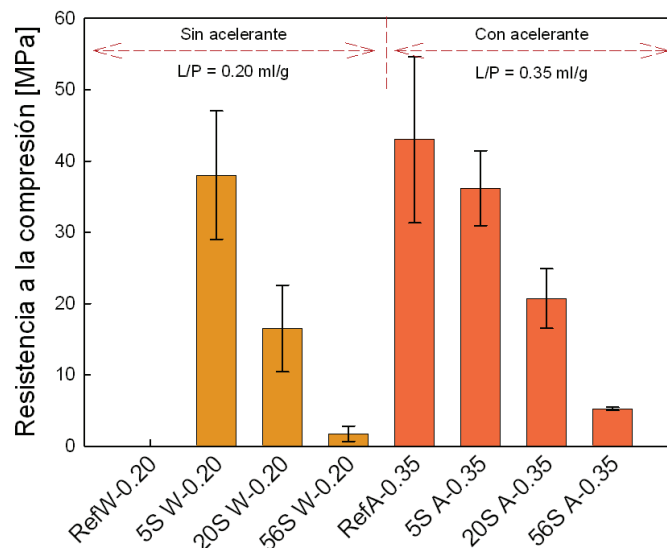


Figura 4.13: Resistencia a la compresión para los compuestos extracto de soja/CPC, fraguados durante 7 días por inmersión en solución de Ringer, con o sin acelerante de la reacción de fraguado.

4.4.4 Propiedades fisicoquímicas y texturales de los cementos compuestos

Hasta el momento se ha revisado el efecto de la incorporación de los biopolímeros en el tiempo de cohesión, los tiempos de fraguado inicial y final de las pastas de cemento compuesto y en la resistencia a la compresión de los cementos fraguados al ser sumergidos en disolución de Ringer. Como resultado se encontró que la incorporación del acelerante de la reacción de fraguado es indispensable para obtener tiempos adecuados para aplicaciones médicas y que en algunos casos el acelerante incrementa la resistencia a la compresión de los cementos compuestos. Sin embargo, existen otras propiedades de los cementos que en su conjunto sirven para entender mejor el material, de tal forma que se puedan proponer los intervalos óptimos de cada variable para lograr las mejores propiedades. Por tanto a continuación se describe el efecto que tiene la incorporación de cada tipo de biopolímero, la concentración del mismo y el medio de fraguado sobre cada cemento compuesto, siempre con el empleo del acelerante.

4.4.4.1 Cementos compuestos con gelatina tipo A y B

Fases cristalinas: Los diagramas de DRX correspondientes a los cementos compuestos con gelatina tipo A y B, fraguados por inmersión en disolución de Ringer o envueltos en papel de aluminio durante 7 días se presentan en la figura 4.14. En la misma figura se reporta el porcentaje de reacción para cada formulación ensayada. La ficha cristalográfica empleada para indexar los diagramas de difracción corresponde a la de la HA (JCPDS 09-0432).

De acuerdo a los resultados de difracción, el cemento de partida corresponde en su totalidad a α -TCP (ver capítulo 3 sección 3.4.1). Después de 7 días de reacción se observa la presencia de los picos correspondientes a la HA (figura 4.14), indicando que la reacción de fraguado del cemento compuesto con gelatina se llevó a cabo. Los resultados señalan que los cementos que contienen cualquiera de las dos gelatinas estudiadas se comportan de forma similar. En general, después de 7 días de reacción las fases presentes en los compuestos corresponden mayoritariamente a HA con trazas de α -TCP. Este resultado concuerda con lo que reportan en estudios independientes Bigi [6,7] y Fujishiro [5]. En los que señalan que la hidrólisis del α -TCP no se detiene por la incorporación de la gelatina, tanto si se agrega como partícula sólida o en disolución.

Al comparar los dos medios de reacción estudiados, se puede ver que la intensidad del pico principal del α -TCP después de 7 días es ligeramente mayor en atmósfera húmeda (papel de aluminio) que en Ringer, lo cual sugiere que en papel de aluminio la conversión del α -TCP a HA es más lenta. Sin embargo, al cuantificar el porcentaje de reacción, y debido a que al tiempo cero de reacción la intensidad inicial del pico principal de α -TCP es considerablemente mayor, las diferencias en transformación entre ambos medios después de 7 días son menores a 3 %, por lo que se puede asumir que la conversión del α -TCP a HA no es significativamente diferente.

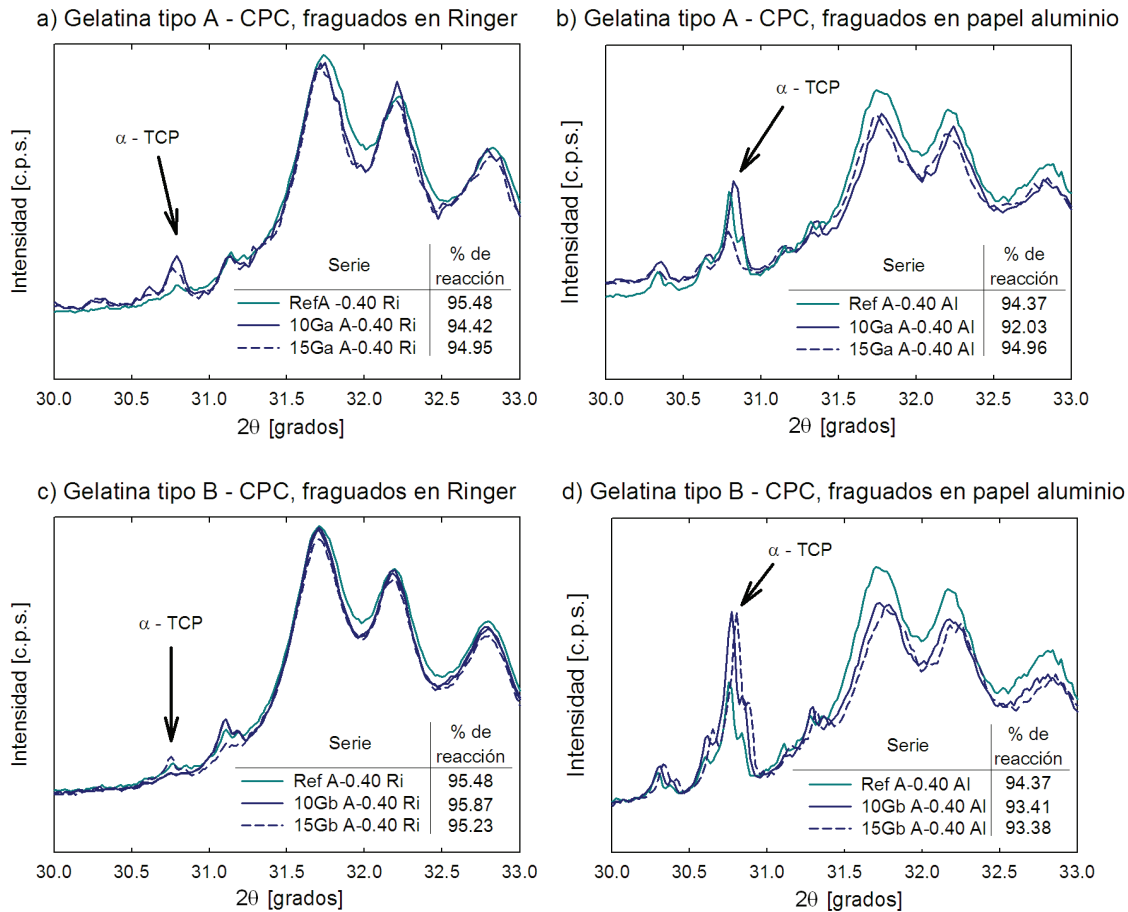


Figura 4.14: Porcentaje de reacción y diagramas de difracción, entre 30 y 33 grados (escala 2θ), obtenidos para los cementos compuestos con gelatina, fraguados durante 7 días. a) Compuestos con gelatina tipo A fraguados por inmersión en Ringer, b) compuestos con gelatina tipo A fraguados envueltos en papel de aluminio, c) compuestos con gelatina tipo B fraguados por inmersión en Ringer y d) compuestos con gelatina tipo B fraguados envueltos en papel de aluminio.

Microestructura y superficie específica: La superficie específica de los cementos compuestos con gelatina tipo A se presenta en la figura 4.15, mientras que la superficie específica y la microestructura de los cementos compuestos con gelatina tipo B se presenta en la figura 4.16.

Tanto la incorporación de la gelatina tipo A como la B causó la disminución de la superficie específica de los cementos compuestos en comparación con el cemento de referencia, indistintamente del medio de fraguado utilizado.

Para los compuestos con gelatina tipo A, el valor de la superficie fue constante para 10 y 15 % y para ambas condiciones de fraguado. Por otro lado, para los compuestos con gelatina tipo B, el incremento del contenido de gelatina redujo en menor medida la superficie específica del material. Asimismo, para los compuestos con gelatina B la superficie específica fue mayor en aquellos fraguados en Ringer que en los fraguados en papel de aluminio.

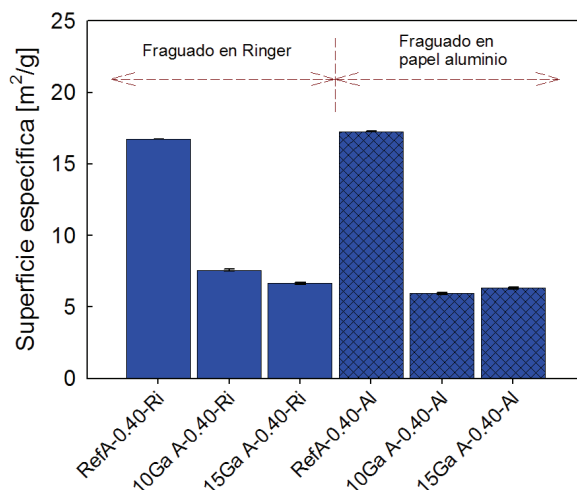
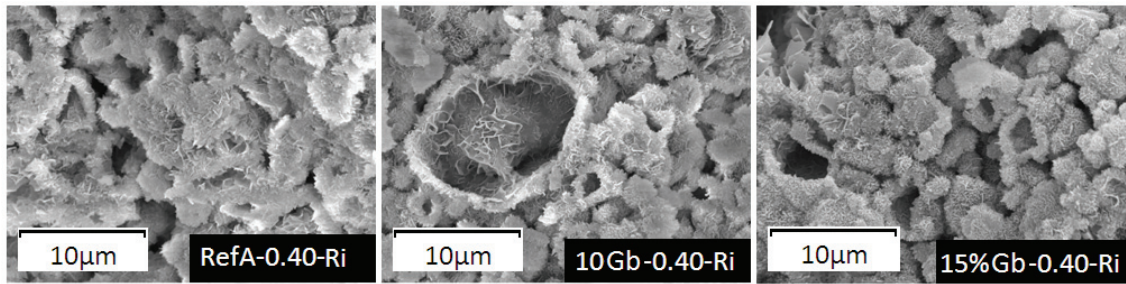


Figura 4.15: Superficie específica de los cementos compuestos con gelatina tipo A, fraguados durante 7 días, por inmersión en Ringer o envueltos en papel de aluminio.

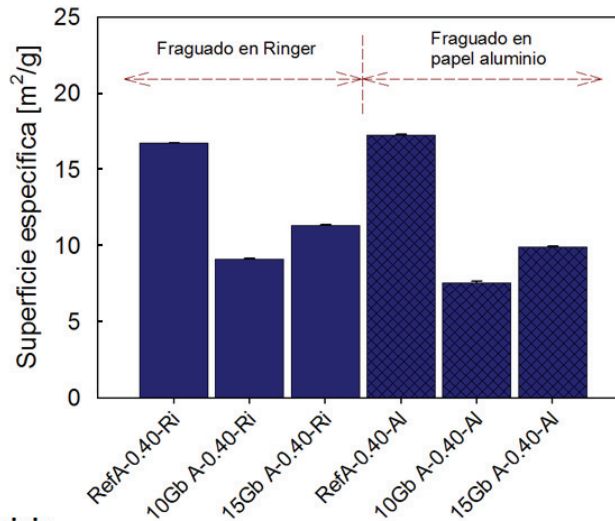
A pesar de que el tamaño de los dominios cristalinos no fue calculado a partir del ancho de los picos de difracción, el ancho a la mitad de la altura del pico sugiere que la cristalinidad de la HA no se modifica por la incorporación de la gelatina (ver figura 4.14). Sin embargo, la disminución de la superficie específica sugiere que los cristales precipitados son de mayor tamaño. Por el contrario, Bigi [6,7] y Kevor [13] observaron una disminución en el tamaño cristalino al introducir gelatina en el cemento de α -TCP, lo cual atribuyen a la adsorción del gel en la superficie del fosfato, que dificulta la difusión de las moléculas de agua a través del gel hasta la partícula de reactivo. Para determinar con exactitud si la incorporación de la gelatina modifica o no el tamaño de los cristales precipitados, se necesita realizar un estudio cristalográfico más profundo y completo, el cual no es el propósito del presente trabajo.

Por su parte, las imágenes de microscopía electrónica de los compuestos con gelatina tipo B fraguados en Ringer (figura 4.16) muestran la microestructura típica de los CPC, basados en α -TCP. De forma similar el cemento de referencia (sin gelatina) fraguado en papel de aluminio muestra la microestructura típica de estos materiales y no presenta diferencias relevantes con respecto a la referencia fraguada por inmersión en Ringer (ver figura 4.16).

Por otro lado, la microestructura de los cementos compuestos con gelatina tipo B fraguados en papel de aluminio muestra una microestructura diferente a la normal. Los cristales en forma de placa están embebidos en algo que podría ser la gelatina, formando microestructuras lisas con algunos cantos de cristales que sobresalen en la superficie. El posible enmascaramiento de la estructura de cristales entrecruzados puede explicar la menor superficie específica con respecto al fraguado en Ringer (figura 4.16). Sin embargo, en el interior de la gelatina existe la red de cristales de HA, puesto que los diagramas de difracción revelaron la presencia de esta fase cristalina, y no se observaron diferencias en el ancho de los picos.



Fraguado en Ringer



Fraguado en papel aluminio

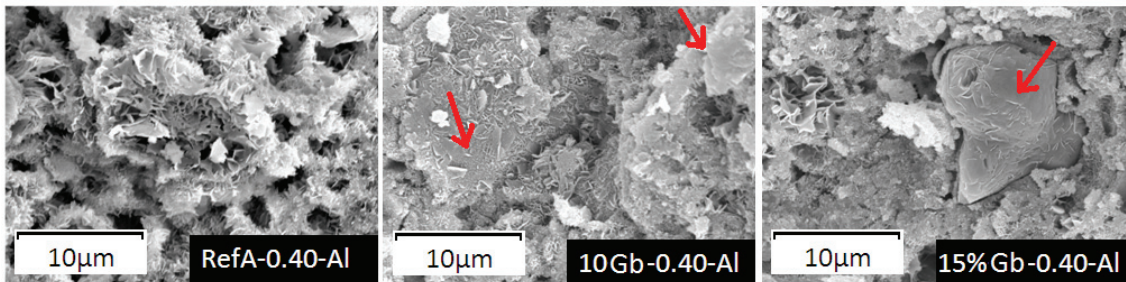


Figura 4.16: Superficie específica e imágenes de MEB de la microestructura de los cementos compuestos con gelatina tipo B, fraguados durante 7 días, por inmersión en Ringer o envueltos en papel de aluminio. Las flechas indican la posible ubicación de la gelatina en la microestructura. Imágenes correspondientes a una superficie de fractura.

La posible presencia de la gelatina en la microestructura del cemento se puede explicar por la solubilidad de la gelatina en medio líquido. La gelatina se convierte en líquido a 37 °C y puesto que la gelatina no fue entrecruzada, se puede liberar parcialmente en el medio de inmersión (Ringer). A diferencia, en papel aluminio la gelatina no tiene un medio en el cual liberarse y por tanto queda embebida entre los cristales de HA.

Porcentaje de porosidad y resistencia a la compresión de los compuestos: La figura 4.17 muestra el porcentaje de porosidad y la resistencia a la compresión de los cementos compuestos con gelatina tipo A y B, fraguados durante 7 días, por inmersión en Ringer o envueltos en papel de aluminio.

Puede observarse que el contenido de porosidad del cemento de referencia fue ligeramente menor cuando éste fue fraguado en aluminio, sin embargo, la diferencia no llega a ser estadísticamente significativa.

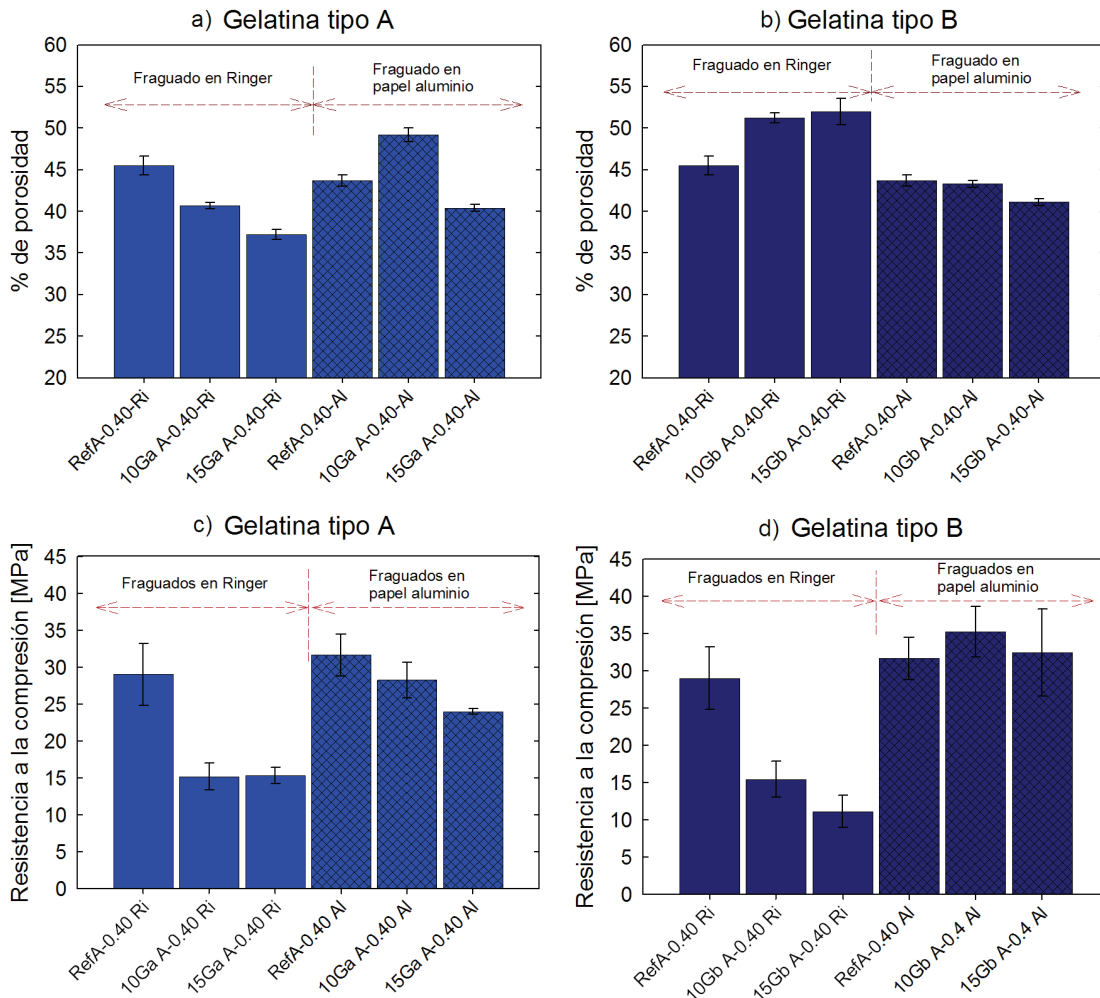


Figura 4.17: a, b) Porcentaje de porosidad determinado mediante inmersión en mercurio para los compuestos con gelatina tipo A o B respectivamente. c, d) resistencia a la compresión de los compuestos con gelatina tipo A o B respectivamente. Cementos fraguados durante 7 días por inmersión en Ringer o envueltos en papel de aluminio.

Entre los compuestos con ambos tipos de gelatina existe un comportamiento contrario en función del medio de fraguado. Con gelatina tipo A la porosidad de los compuestos fue mayor en papel de aluminio. Este resultado es opuesto a lo esperado, ya que en medio líquido (Ringer) es probable que la gelatina, al no estar entrecruzada, se libere hacia el medio, generando mayor porosidad. Por el contrario, en papel aluminio (atmósfera húmeda), la gelatina no tiene la posibilidad de liberarse. Por otro lado, los cementos compuestos con gelatina tipo A más porosos fueron claramente más resistentes que los menos porosos fraguados en Ringer. Este comportamiento es un hecho anómalo, debido a que cuando mayor es la porosidad, menor suele ser la resistencia de los CPC.

El resultado esperado es aquel mostrado por los compuestos con gelatina tipo B. Por un lado, la gelatina tipo B incrementó la porosidad del cemento fraguado en Ringer y esta aumentó con el incremento en la concentración del biopolímero. Hecho que puede explicarse por la

liberación parcial de la gelatina hacia el medio de inmersión, que genera mayor porosidad en el material. En este sentido, estudios previos realizados por Bigi [5] y Shie [6] muestran un comportamiento similar para un cemento fraguado por inmersión en fluido fisiológico simulado, donde en los dos primeros días de fraguado observan un incremento de resistencia y posteriormente una disminución atribuida a la liberación de la gelatina al medio líquido.

Por otro lado, para el cemento que fue fraguado en papel de aluminio, la incorporación de la gelatina tipo B no modificó significativamente la porosidad del cemento. Sin embargo, y a pesar de que las diferencias no son estadísticamente significativas, los compuestos con gelatina tipo B fraguados en aluminio tienden a ser más resistentes que el cemento de referencia. Lo cual podría significar que la gelatina tipo B tiene cierto efecto aglutinante sobre los cristales que conforman la microestructura del cemento.

4.4.4.2 Cementos compuestos con alginato de sodio sin sulfatar y sulfatado

Fases cristalinas: Los diagramas de DRX correspondientes a los cementos compuestos con alginato de sodio sin sulfatar y alginato de sodio sulfatado, fraguados en Ringer o envueltos en papel de aluminio se presentan en la figura 4.18. En la misma figura se representa el porcentaje de reacción calculado para cada formulación estudiada.

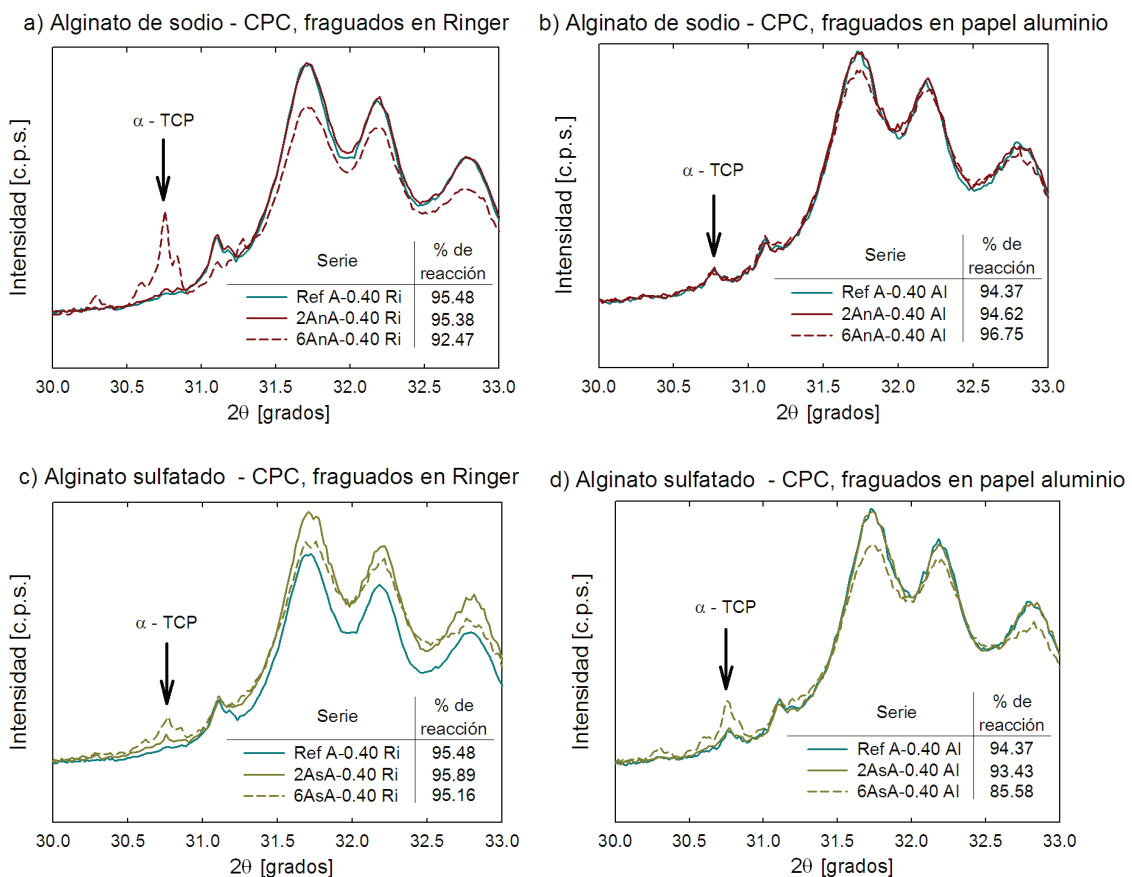


Figura 4.18: Porcentaje de reacción y diagramas de difracción, entre 30 y 33 grados (escala 2θ), obtenidos para los cementos compuestos con alginato de sodio, fraguados durante 7 días. a) Compuestos con alginato de sodio sin sulfatar fraguados por inmersión en Ringer, b) compuestos con alginato de sodio sin sulfatar fraguados envueltos en papel de aluminio, c) compuestos con alginato de sodio sulfatado fraguados por inmersión en Ringer y d) compuestos con alginato de sodio sulfatado fraguados envueltos en papel de aluminio.

El porcentaje de reacción prueba que los cementos compuestos con alginato fueron capaces de fraguar en los dos medios estudiados, y al igual que la gelatina, el alginato de sodio no produce cambios significativos en el diagrama de difracción de la HA, lo cual concuerda con otros trabajos publicados [11,18].

Con alginato de sodio sin sulfatar, y a excepción de la serie con 6 % de alginato de sodio fraguada en Ringer la cual se considera que presentó un comportamiento anómalo, el avance de la reacción fue muy similar entre el fraguado en Ringer y en papel de aluminio, tan similar como el observado entre las referencias. Asimismo, la incorporación del alginato de sodio no alteró el avance de la reacción con respecto al cemento de referencia, para las concentraciones estudiadas.

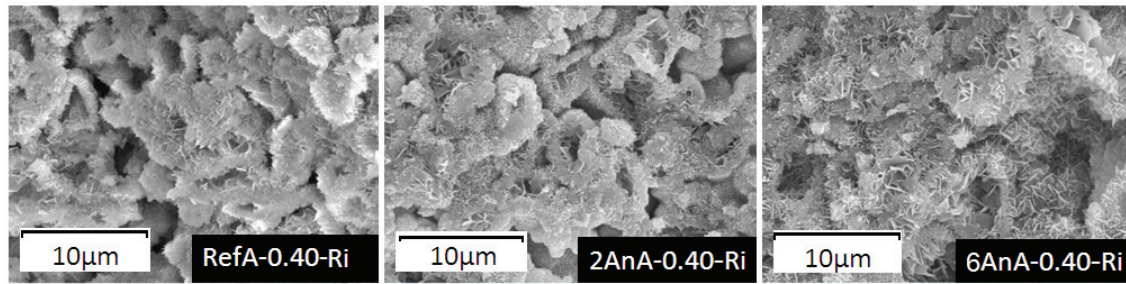
Por otro lado, el avance de la reacción de los cementos compuestos con alginato de sodio sin sulfatar y sulfatado, fraguados en Ringer fue muy similar. Sin embargo, la incorporación de alginato de sodio sulfatado en el cemento fraguado en papel de aluminio provocó un ligero retraso en el avance de la reacción, mismo que aumenta al incrementar la concentración del alginato de sodio sulfatado en la fase líquida.

Microestructura y superficie específica: La superficie específica y la microestructura de los cementos compuestos con alginato de sodio y alginato de sodio sulfatado, fraguados por inmersión en Ringer o envueltos en papel de aluminio se presentan respectivamente en las figuras 4.19 y 4.20.

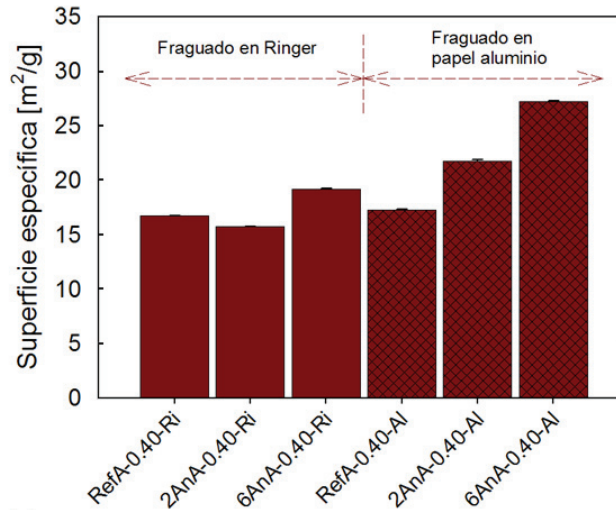
La microestructura de los cementos fraguados tanto en Ringer como en papel de aluminio correspondió a la microestructura típica del cemento empleado, por lo que la incorporación del alginato de sodio sin sulfatar no parece modificar la morfología del material. Además, la presencia del alginato sobre los cristales de HA no se observó mediante MEB bajo ambas condiciones de fraguado. Es probable que el alginato no se observe debido a la baja proporción de este componente con respecto a la masa total de material. Sin embargo, es claro que incluso en dosis bajas tiene un efecto significativo en la superficie específica del material, en especial cuando el fraguado se realiza en papel de aluminio.

En papel de aluminio la superficie específica de los cementos compuestos con alginato de sodio sin sulfatar fue claramente mayor que la superficie de la referencia (figura 4.19). Por el contrario, en Ringer solo el cemento con 6 % de alginato mostró un incremento en superficie con respecto a la referencia. Cabe remarcar que la superficie de los compuestos fue mayor cuando estos fueron fraguados en papel aluminio en comparación con inmersión en Ringer.

Considerando que la superficie específica es un indicador indirecto del tamaño de los cristales precipitados y que a mayor superficie menor tamaño del cristal, se puede decir que el fraguado en papel de aluminio origina cristales de menor tamaño. No obstante, en las imágenes obtenidas por MEB no se aprecia claramente este efecto (ver figura 4.19).



Fraguado en Ringer



Fraguado en papel aluminio

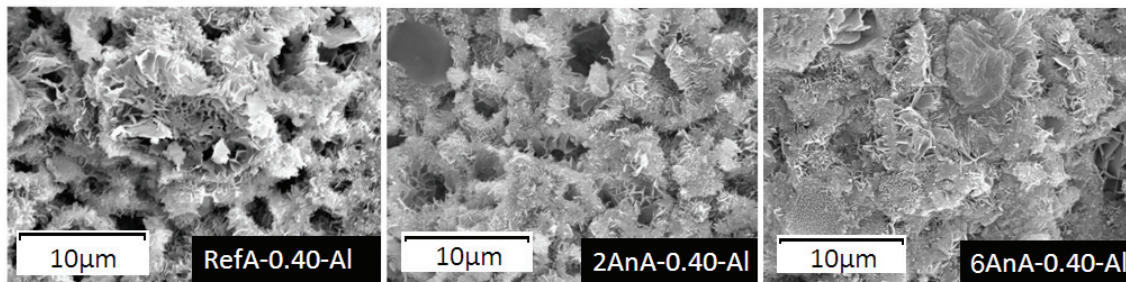
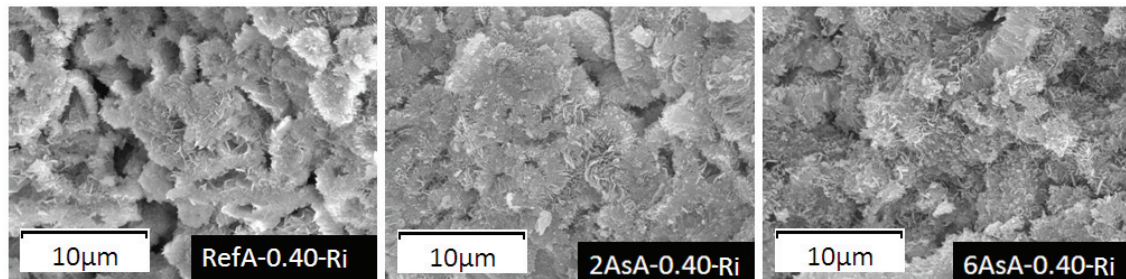


Figura 4.19: Superficie específica e imágenes de MEB de la microestructura de los cementos compuestos con alginato de sodio sin sulfatar, fraguados durante 7 días por inmersión en Ringer o envueltos en papel de aluminio. Imágenes correspondientes a la superficie de fractura.

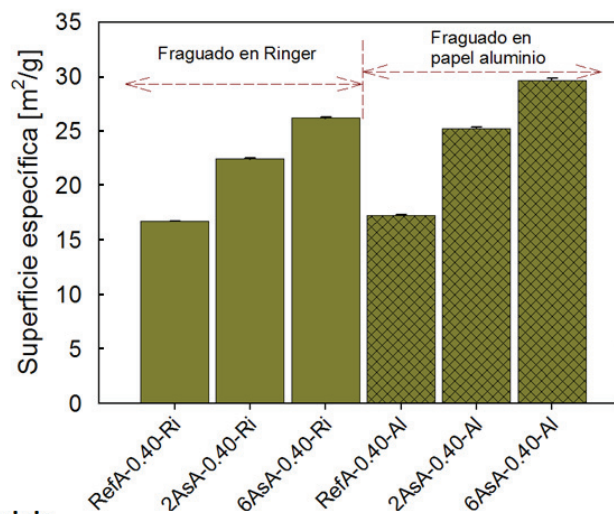
La incorporación del alginato de sodio sulfatado incrementó también la superficie específica del cemento compuesto con respecto al cemento de referencia, pero a diferencia del alginato de sodio sin sulfatar, el incremento fue mayor y se presentó en ambos medios de fraguado estudiados. Además, la superficie específica de los cementos fraguados en papel de aluminio siguió siendo mayor que la de los cementos fraguados en Ringer (ver figura 4.20).

Anteriormente se mencionó que con alginato de sodio sulfatado el fraguado de los cementos era más rápido (ver sección 4.4.3.2 de este capítulo). Es probable que la nucleación de un mayor número de cristales sea la causa de este comportamiento, lo que también podría explicar el menor tamaño de los cristales indicado por la mayor superficie específica. Por otro lado, se sabe que los grupos hidroxilo del alginato pueden formar enlaces débiles con los fosfatos durante la precipitación de la HA [19], dichas interacciones podrían ser la causa de la mayor nucleación y/o del menor crecimiento de los cristales durante el fraguado del cemento.

Si se acepta esta hipótesis, el mecanismo de actuación no es evidente, pero podría estar relacionado con el peso molecular y/o con los grupos negativos que posee el alginato, ya que el alginato de sodio sulfatado, que es de menos peso molecular y contiene mayor cantidad de zonas negativas (grupos sulfato), tiene un efecto mayor sobre los tiempos de fraguado y el tamaño final de los cristales.



Fraguado en Ringer



Fraguado en papel aluminio

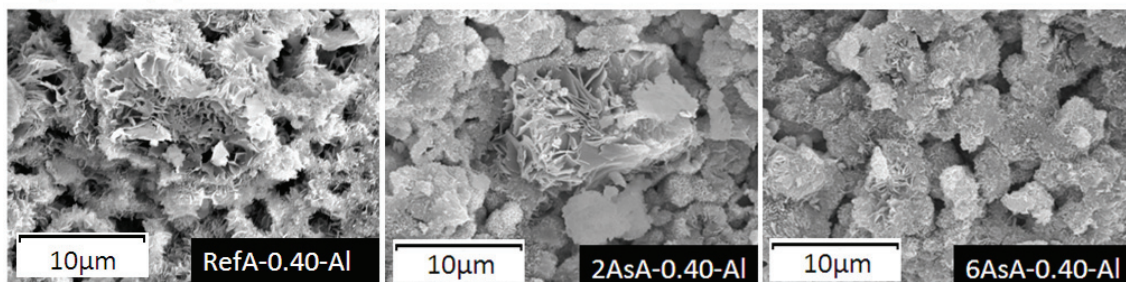


Figura 4.20: Superficie específica e imágenes de MEB de la microestructura de los cementos compuestos con alginato de sodio sulfatado, fraguados durante 7 días, por inmersión en Ringer o envueltos en papel de aluminio. Imágenes correspondientes a la superficie de fractura.

El hecho de que los cristales precipitados sean de menor tamaño cuando el cemento compuesto es fraguado en papel de aluminio podría estar relacionado con la liberación hacia el medio de fraguado del alginato sin sulfatar o sulfatado. Puesto que ambos alginatos son solubles en medio acuoso, como lo es la solución de Ringer, es probable que se liberen al menos parcialmente, viéndose mermado el efecto sobre el tamaño del cristal.

Por su parte, las microestructuras de los compuestos con alginato de sodio sulfatado observadas por MEB, presentaron también la morfología típica del cemento, es decir, cristales entrecruzados en forma de placa (figura 4.20). Sin embargo, a diferencia de las imágenes correspondiente al alginato de sodio sin sulfatar, en estas imágenes si se aprecia visualmente el menor tamaño de los cristales que forman al cemento compuesto. Lo cual confirma los valores más elevados de superficie específica reportados. En estas imágenes tampoco se observa la presencia del alginato de sodio sulfatado.

Porcentaje de porosidad y resistencia a la compresión de los compuestos: En la figura 4.21 se representa la porosidad y la resistencia a la compresión de los cementos compuestos con alginato de sodio sin sulfatar y sulfatado, fraguados durante 7 días en Ringer y en papel de aluminio.

Por un lado, la porosidad de los cementos compuestos con alginato de sodio sin sulfatar fue un poco mayor cuando se fraguaron en Ringer. Una posible causa es la liberación parcial del alginato hacia el medio líquido, hecho que también podría explicar que la porosidad de los compuestos aumentó cuando se incrementó la concentración de alginato de sodio. Sin embargo, las diferencias no llegaron a ser estadísticamente significativas. Por otro lado, con alginato de sodio sulfatado la diferencia en porosidad entre los diferentes medios de fraguado y la concentración fue aún menor. Lo cual sugieren que la liberación del alginato de sodio sulfatado es menor a la del alginato sin sulfatar.

En cuanto a la resistencia a la compresión, ésta no se vio afectada significativamente en función del medio de fraguado o el contenido de alginato de sodio sin sulfatar. El medio de fraguado tampoco afectó la resistencia a la compresión de los cementos compuestos con alginato de sodio sulfatado. Sin embargo, a pesar de la similitud en porosidad con el cemento de referencia, los compuestos con alginato sulfatado fueron considerablemente menos resistentes y no hubo diferencias significativas entre las dos concentraciones probadas. Este resultado parece anómalo si se considera que la porosidad es la misma, más teniendo en cuenta que la caída de resistencia coincide con la disminución del tamaño de los cristales precipitados (incremento en superficie específica, figura 4.20), se puede decir que el menor tamaño de los cristales produce menor resistencia del cemento fraguado.

En base a los resultados anteriores, se puede decir que, a excepción de la resistencia a la compresión, no hay diferencias marcadas en las propiedades de los cementos compuestos con alginato de sodio sin sulfatar o el alginato de sodio sulfatado.

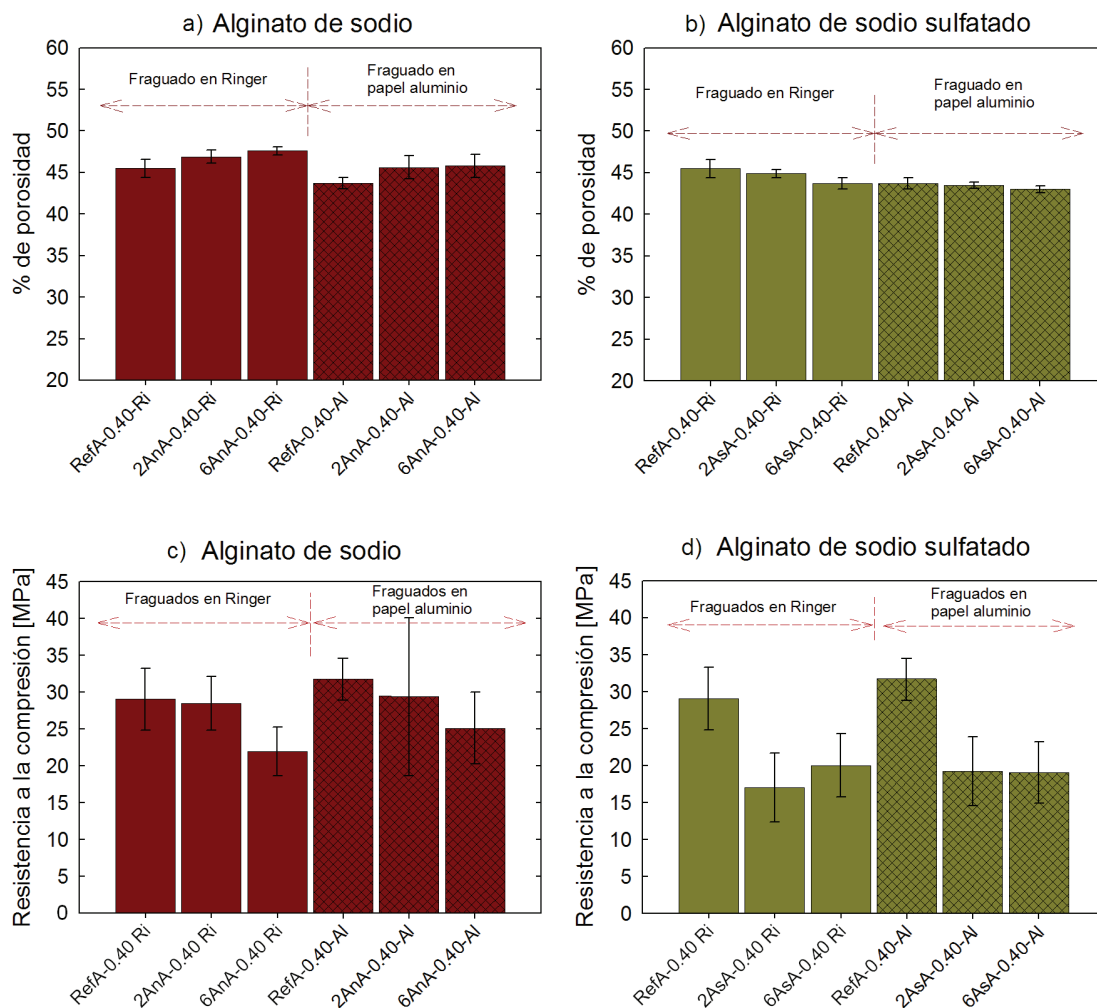


Figura 4.21: a, b) Porcentaje de porosidad determinado por inmersión en mercurio para los compuestos con alginato de sodio sin sulfatar y sulfatado, respectivamente. c, d) resistencia a la compresión de los compuestos con alginato de sodio sin sulfatar y sulfatado, respectivamente. Cementos fraguados durante 7 días por inmersión en Ringer o envueltos en papel de aluminio.

4.4.4.3 Cementos compuestos con extracto de soja

Fases cristalinas: Los diagramas de DRX correspondientes a los cementos compuestos con extracto de soja, fraguados envueltos en papel de aluminio durante 7 días se presentan en la figura 4.22. En la misma figura se representa el porcentaje de reacción para cada formulación.

Con respecto al cemento de referencia, la incorporación de extracto de soja disminuyó el avance de la reacción alrededor de un 10 %, sin mostrar diferencias considerables entre 10 y 20 % de soja. Sin embargo, al incrementar el contenido de soja a 30 % el porcentaje de reacción disminuyó a 56.39 %.

Como se mencionó anteriormente, la soja tiene un efecto fluidificante en la pasta del cemento, en tal grado que permite obtener pastas fácilmente moldeables con proporciones L/P de hasta 0.23 ml/g. Es probable que la pasta obtenida bajo estas características este sobrecargada de componentes (carbohidratos y proteínas procedentes de la soja y iones fosfato y calcio procedentes del cemento), que retardan la reacción de fraguado del cemento, probablemente

debido a que disminuye la movilidad de iones, tal y como sugiere Ishikawa para un sistema similar [11].

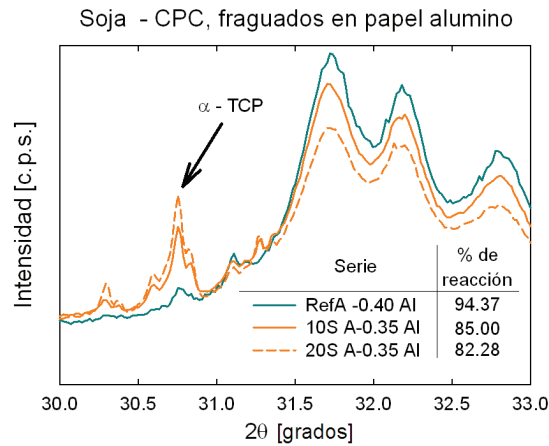
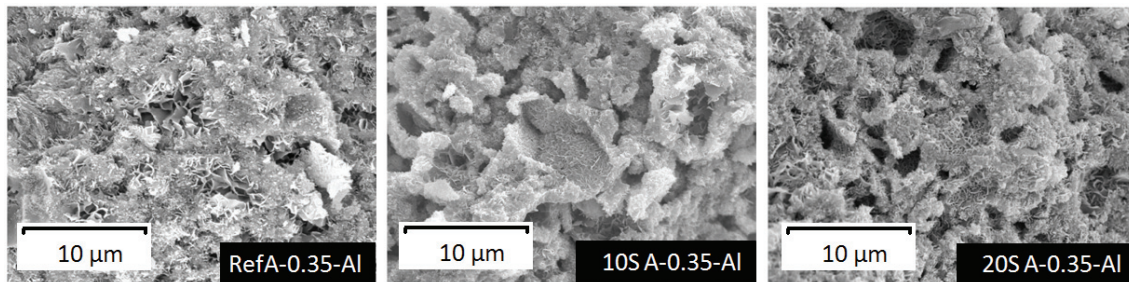


Figura 4.22: Porcentaje de reacción y diagramas de DRX, entre 30 y 33 grados (2θ), obtenidos para los cementos compuestos con extracto de soja, fraguados durante 7 días envueltos en papel de aluminio.

Microestructura y superficie específica: La superficie específica y la microestructura de los cementos compuestos con extracto de soja, fraguados envueltos en papel de aluminio se presentan en la figura 4.23.



Fraguado en papel aluminio

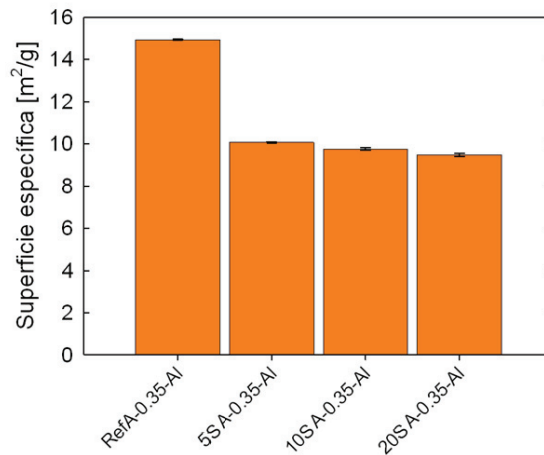


Figura 4.23: Superficie específica e imágenes de microscopia electrónica de la microestructura, correspondientes a los cementos compuestos con extracto de soja, fraguados durante 7 días envueltos en papel de aluminio. Imágenes tomadas en la superficie de fractura.

Por el momento no existen trabajos que se investiguen los compuestos soja/fosfatos de calcio. Los resultados obtenidos en este estudio indican que la soja no altera el producto final de la reacción de fraguado del cemento, ni la estructura en forma de placas.

La microestructura de los cementos compuestos corresponde a la microestructura del cemento después del fraguado. No obstante, el tamaño de los cristales en los compuestos con 10 ó 20 % de soja parece ser menor que los de la referencia. Resultado contradictorio respecto al resultado de superficie específica, la cual disminuyó con la incorporación de la soja y tiende a ser ligeramente menor cuanto más soja contiene el material.

La menor superficie específica se puede atribuir al menor porcentaje de reacción alcanzado por el cemento compuesto. Además, como se mencionó, a pesar de que la diferencia en conversión entre 10 y 20 % de soja no es significativa la tendencia es a ser menor, hecho que concuerda con la ligera disminución en superficie cuando se incrementa el contenido de soja.

Por otra parte, el menor tamaño de los cristales observados por MEB también está relacionado con el menor avance de la reacción de fraguado, generado probablemente por una menor difusión y por tanto menor crecimiento de cristales.

Porcentaje de porosidad y resistencia a la compresión de los compuestos: En la figura 4.24 se grafica la porosidad y la resistencia a la compresión de los cementos compuestos con extracto de soja, fraguados durante 7 días envueltos en papel de aluminio.

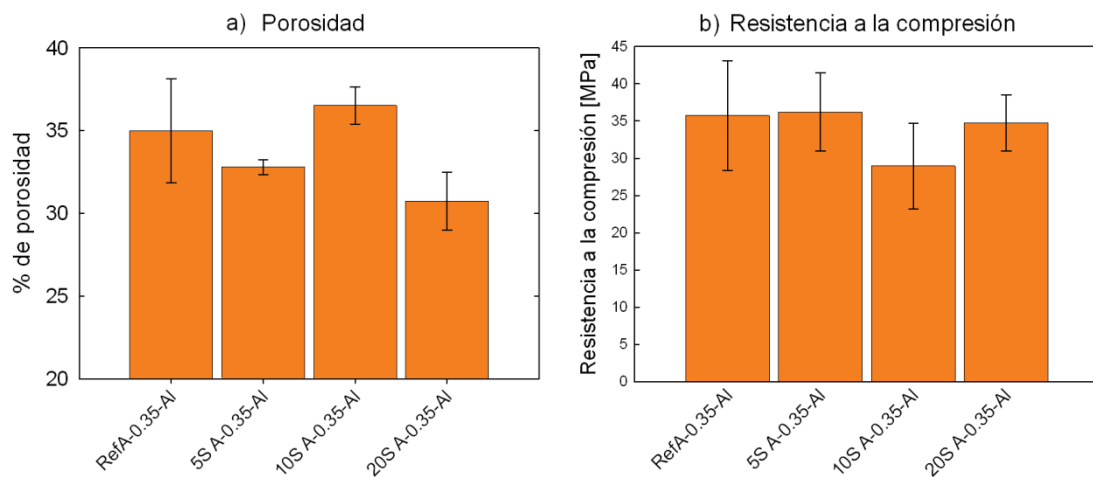


Figura 4.24: a) Porcentaje de porosidad para los compuestos con extracto de soja, y b) resistencia a la compresión de los compuestos con extracto de soja. Cementos fraguados durante 7 días envueltos en papel de aluminio.

Los valores de porosidad y de resistencia a la compresión correspondientes a la RefA-0.35-Al son respectivamente menor y mayor en comparación con la RefA-0.40-Al. La razón es la menor proporción L/P empleada, que disminuye la porosidad del cemento y a la vez la menor porosidad se refleja en una mayor resistencia a la compresión. Por esta misma razón los cementos compuestos con soja son menos porosos y más resistentes que los compuestos con gelatina y alginato de sodio antes analizados.

Los valores de porosidad obtenidos para los cementos compuestos con soja no son estadísticamente diferentes a los del cemento de referencia. Únicamente la porosidad correspondiente a 10 % de soja es significativamente mayor a la de los otros dos compuestos presentados en la figura 4.24 (5 y 20 % de soja).

La resistencia a la compresión de los compuestos no se modificó significativamente con la incorporación y el incremento del contenido de soja en el intervalo estudiado. No obstante, para 10 % de soja el valor de resistencia a la compresión tiende a ser menor, lo cual coincide con la mayor porosidad determinada para este compuesto en particular.

4.4.5 Comportamiento mecánico de los cementos compuestos

En las secciones anteriores se analizó el efecto del tipo de biopolímero, la concentración del mismo, el uso de acelerante y el medio de fraguado sobre los tiempos de fraguado, la porosidad y la resistencia a la compresión de los cementos compuestos. Se encontró que con acelerante los cementos compuestos tienen tiempos de fraguado adecuados para ser utilizados como material de relleno óseo. Además, se propuso que cuando los cementos son fraguados por inmersión en Ringer, al menos una fracción del biopolímero se libera debido a que son solubles en agua. Para centrar el estudio del comportamiento mecánico sólo en los compuestos con características adecuadas para relleno óseo y evitar variaciones debidas a la liberación no controlada del polímero, en esta sección se compara únicamente el comportamiento a compresión y a flexión de los cementos compuestos preparados con acelerante y fraguados en papel de aluminio.

4.4.5.1 Ensayo de compresión: curvas esfuerzo-deformación

El efecto de la incorporación de cada biopolímero sobre la resistencia a la compresión ya se analizó en las secciones anteriores. La presente sección se enfoca en el análisis de las curvas esfuerzo contra deformación a compresión, con el objetivo de determinar el efecto de los biopolímeros sobre el comportamiento elástico de los cementos compuestos. La figura 4.25 muestra curvas representativas para cada cemento compuesto y el módulo de elasticidad promedio obtenido.

Se puede observar que la incorporación de 15 % de gelatina tipo B disminuye significativamente el módulo de elasticidad del cemento. Además, la fractura del compuesto pasa de ser frágil a dúctil y el área bajo la curva, relacionada directamente con la tenacidad del material, se incrementa. Lo cual indica que la gelatina mejora la ductilidad del cemento.

En el intervalo de concentraciones estudiado, los compuestos con alginato de sodio sin sulfatar y sulfatado no presentaron diferencias significativas en el módulo de elasticidad con respecto a el cemento de referencia. En todos los casos estos cementos compuestos presentaron una fractura frágil.

Finalmente, la incorporación de la soja disminuyó el módulo de elasticidad a compresión. No obstante, el área bajo la curva no se incrementó considerablemente y la fractura de estos compuestos fue frágil.

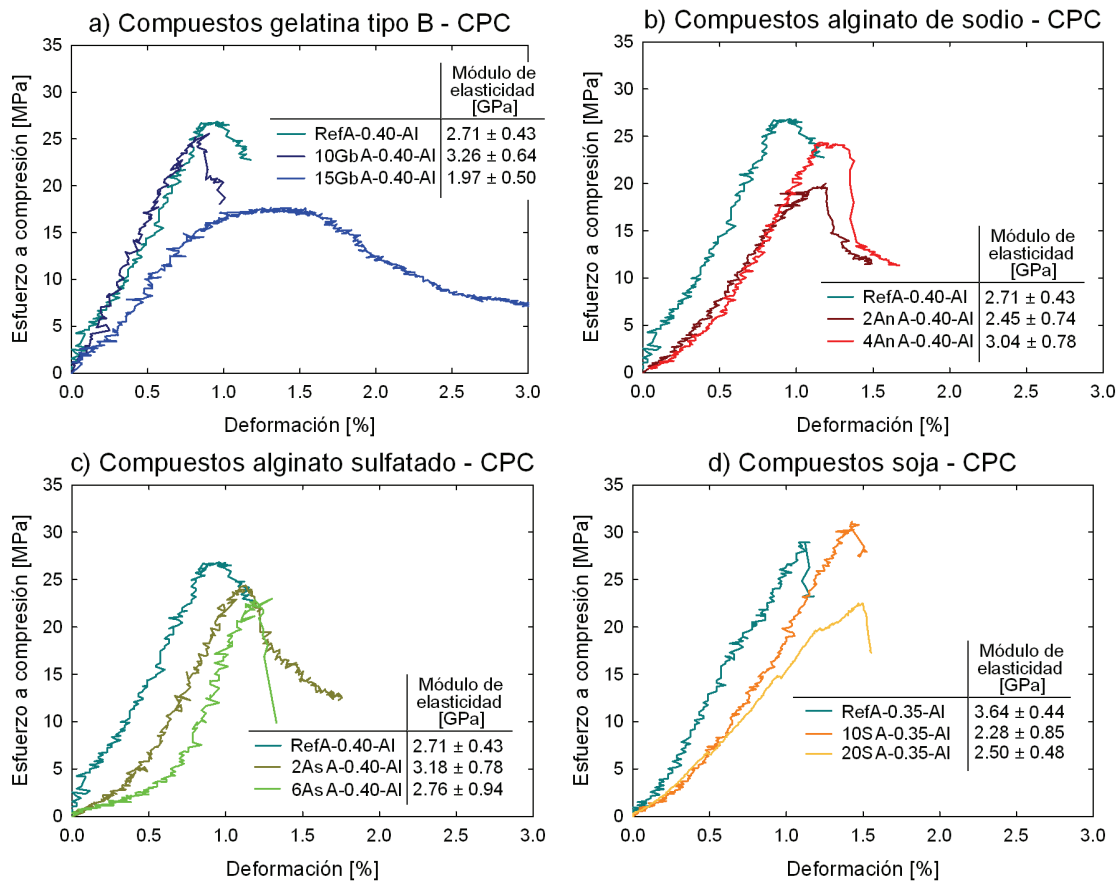


Figura 4.25: Curvas esfuerzo-deformación a compresión para los cementos compuestos fraguados durante 7 días envueltos en papel de aluminio. Las tablas insertadas muestran el módulo de elasticidad para cada formulación de cemento. a) compuestos con gelatina tipo B, b) compuestos con alginato de sodio sin sulfatar, c) compuestos con alginato de sodio sulfatado y d) compuestos con extracto de soja.

4.4.5.2 Ensayo de flexión: módulo de elasticidad de los compuestos

Las cerámicas como la HA son materiales resistentes a la compresión, no obstante, la resistencia a la flexión que poseen es baja. Uno de los mecanismos que el tejido óseo utiliza para incrementar su flexibilidad es incorporar colágeno, para formar desde el punto de vista de los materiales un nanocompuesto. En este sentido uno de los objetivos por el cual se incorporó a los biopolímeros en el cemento fue el de obtener un compuesto con mejor flexibilidad que el cemento base. Para corroborar esta hipótesis se determinó el módulo de elasticidad de los cementos compuestos bajo flexión a cuatro puntos.

Una ventaja sobre el ensayo de flexión a tres puntos, es que en el ensayo de flexión a cuatro puntos la fuerza aplicada se distribuye a lo largo de un área más extensa del material, reduciendo las variaciones debidas a imperfecciones en el acabado de la probeta.

Cabe mencionar que en todos los ensayos de flexión realizados, los cementos compuestos y las referencias mostraron un comportamiento frágil, es decir, que la curva esfuerzo contra deformación fue una línea recta hasta alcanzar el punto de fractura.

Los resultados del ensayo de flexión a cuatro puntos para las formulaciones de cemento compuesto estudiadas se presentan en la figura 4.26.

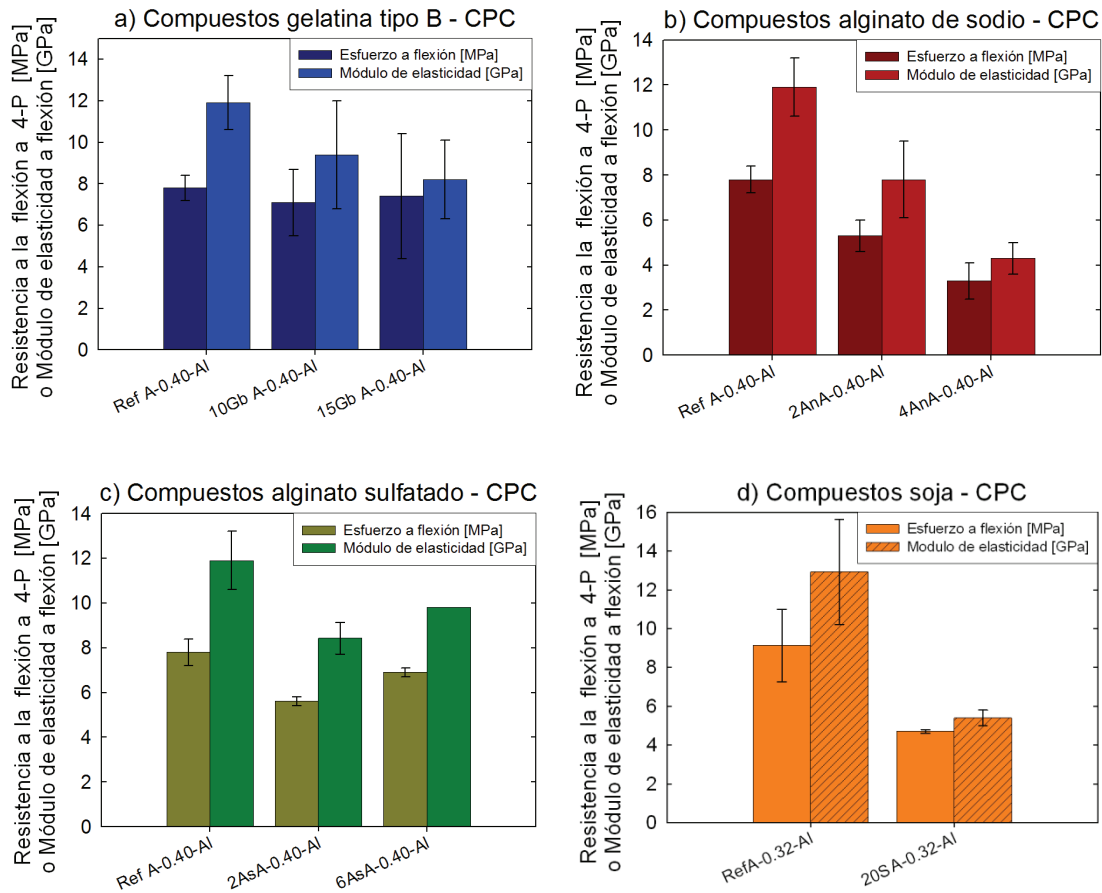


Figura 4.26: Resistencia a la flexión a 4 puntos y módulo de elasticidad a flexión para los cementos compuestos, fraguados durante 7 días envueltos en papel de aluminio.

A pesar de que no hay diferencias estadísticamente significativas, el incremento de la cantidad de gelatina generó un decremento del módulo elástico, manteniendo constante la resistencia a la flexión. Como se mencionó, la gelatina, a diferencia del alginato y la soja, puede llegar a actuar como un aglutinante de los cristales precipitados, lo cual puede ser la causa de que la resistencia del cemento se mantenga constante.

En cambio, la incorporación y el incremento del contenido de alginato de sodio sin sulfatar produjeron una disminución significativa, tanto del módulo como de la resistencia a la flexión. Cabe mencionar que menores cantidades de alginato de sodio reducen en mayor medida el módulo de elasticidad, que elevadas cantidades de gelatina.

Con alginato de sodio sulfatado se mantuvo la tendencia anterior, sin embargo, la resistencia a la flexión y el módulo a flexión no disminuyeron tanto como con alginato de sodio sin sulfatar. Además, el uso de 6% de alginato sulfatado trajo como consecuencia una ligera recuperación de ambas propiedades, pero siempre fueron menores a las de la referencia.

En lo que respecta a la soja, la grafica d) en la figura 4.26 compara únicamente el resultado obtenido para el compuesto con 20 % de soja contra la referencia, puesto que con 56 % el cemento es incapaz de fraguar envuelto en papel de aluminio. En la figura se observa como la incorporación de la soja en el cemento causa una clara disminución del módulo de elasticidad, en otras palabras, también incrementa la flexibilidad del compuesto. Sin embargo, también genera la caída en la carga máxima que puede soportar el material antes de fracturarse.

Cabe mencionar que pese al menor grado de reacción que presentan los compuestos con extracto de soja fraguados en papel de aluminio, la resistencia a la flexión de los mismos se asemeja a la resistencia del resto de compuestos analizados. Hecho que se relaciona con la menor proporción L/P empleada en la preparación.

La caída moderada de la resistencia a la flexión no es una limitante para la aplicación de los cementos compuestos, ya que se busca una mejor aceptación biológica del material en vez de una resistencia mecánica elevada. Sin embargo, la disminución en el módulo de elasticidad si se considera como una ventaja, en el sentido que la incorporación de los biopolímeros permite obtener materiales que imitan de alguna forma el comportamiento mecánico del hueso. Por otro lado, algunas estrategias de cultivo celular *in vitro* (bioreactores) inducen la diferenciación de células cultivadas sobre los materiales en base a estimulación mecánica. En esta situación si el sustrato de cultivo es frágil, se fracturará y no cumple con su función, pero si es capaz de soportar cierto porcentaje de deformación, sin fracturarse o deformarse plásticamente, estará cumpliendo con su cometido. En este contexto, y considerando que los compuestos aquí estudiados conformaran la fase continua de las espumas sólidas a desarrollar, la menor rigidez de los compuestos puede considerarse como una ventaja sobre el cemento de referencia.

4.4.6 Inyectabilidad y cohesión de los cementos compuestos

4.4.6.1 Porcentaje de inyectabilidad

Una de las principales aplicaciones de los cementos es el relleno de defectos óseos a través de cánulas, en lo que se conoce como cirugía mínimamente invasiva [20-22]. Por lo que es deseable que los cementos sean inyectables para facilitar su implantación. Diversos trabajos se han dedicado a determinar los factores que afectan la inyectabilidad de los CPC [21-30]. En estos trabajos se reporta que un menor tamaño de partícula del cemento y una mayor proporción L/P disminuyen la viscosidad de la pasta y facilitan la inyección. También describen el empleo de polímeros como reductores de la viscosidad de la pasta, logrando inyectar hasta el 98 % del material.

En el presente estudio, el tamaño de partícula del cemento se mantiene fijo, sin embargo, es considerado como un tamaño de partícula adecuado para permitir la inyección del cemento [26]. Mientras que la proporción L/P es un parámetro que se puede modificar de acuerdo a las necesidades finales del cemento.

Para determinar la inyectabilidad debe tenerse en cuenta que las pastas de cemento son sistemas dinámicos, que endurecen en función de tiempo, por efecto de la reacción de fraguado. Por esta razón la moldeabilidad e inyectabilidad de las pastas disminuye en función del tiempo desde el contacto de las fases líquida y sólida. Para evitar variaciones en los valores de inyectabilidad, todos los ensayos se realizaron 2.5 minutos después del contacto de ambas fases. Este tiempo es suficiente para obtener una pasta homogénea e introducirla en la jeringa para iniciar el ensayo. Además, en aplicaciones clínicas es preferible no esperar para implantar el material. En la figura 4.27 se representan los resultados de la cuantificación del porcentaje de inyectabilidad.

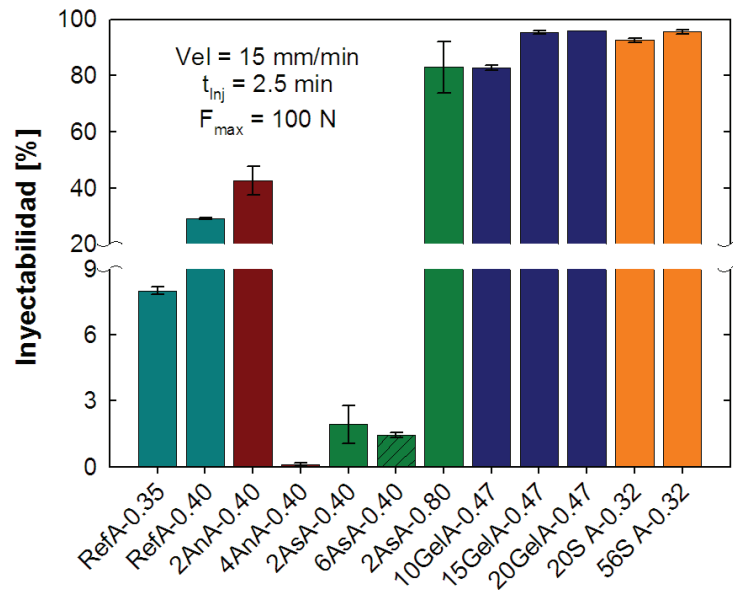


Figura 4.27: Porcentaje de inyectabilidad para diferentes formulaciones de cemento. Nótese el corte de escala entre 9 y 20 % de inyectabilidad.

La inyectabilidad del cemento de referencia se incrementó de 8 a 29 % con el incremento de la proporción L/P entre 0.35 y 0.40 ml/g. Sin embargo, el valor máximo obtenido es ineficiente para aplicaciones prácticas, puesto que más de la mitad del cemento es desperdiciado.

Una de las principales ventajas que se esperaba por incorporar los biopolímeros, es el incremento de la inyectabilidad de las pastas de cemento. La figura 4.27 muestra que la incorporación de la gelatina tipo B sí mejoró las propiedades reológicas del cemento. Pese a que los cementos compuestos con gelatina fueron obtenidos con una proporción L/P no muy alta e igual a 0.47 ml/g, la gelatina incrementó la inyectabilidad hasta 83, 95 y 96 % para 10, 15 y 20 % de gelatina, respectivamente. El incremento en la inyectabilidad entre 10 y 15 % fue estadísticamente significativo, sin embargo, entre 15 y 20 % no lo fue. La razón de no alcanzar valores más altos de inyectabilidad, es que en ningún caso la inyectabilidad determinada con el método usado podrá llegar a ser del 100 %, debido a un pequeño remanente de pasta en la boquilla de la jeringa, por lo que aproximadamente un 96 % de inyectabilidad puede ser considerado como el valor máximo posible.

Por otra parte y como ya se ha mencionado, el extracto de soja es un polímero que genera pastas de cemento con un comportamiento muy fluido, por ello la adición de soja permite reducir considerablemente la proporción L/P mínima con la que se fabrican los cementos. Este efecto fluidificante también se refleja en la inyectabilidad del cemento compuesto con 20 % de soja, la cual fue del 95 % a pesar de la baja proporción L/P de preparación igual a 0.32 ml/g. Para un cemento de referencia obtenido con la misma proporción L/P se espera una inyectabilidad menor al 8 %, valor que corresponde al cemento de referencia preparado bajo una proporción L/P de 0.35 ml/g. El incremento en el contenido de soja también produjo un incremento en la inyectabilidad, no obstante la diferencia entre usar 20 o 56 % de soja es tan solo de tres unidades porcentuales.

Cabe mencionar que tanto la gelatina como la soja evitaron el fenómeno de separación de fases, que se puede generar durante la extrusión de una suspensión de partículas sólidas, como lo es la pasta de cemento [23].

La adición de 2 % de alginato de sodio incrementó la inyectabilidad del cemento casi al doble con respecto al cemento de referencia, preparado con la misma proporción L/P (0.40 ml/g). Sin embargo, la inyectabilidad del compuesto con 4 % de alginato de sodio es prácticamente cero, debido al corto tiempo de fraguado inicial de esta formulación (ver figura 4.10).

De forma similar, el corto tiempo de fraguado de los cementos con alginato sulfatado es el responsable de la baja inyectabilidad de estos compuestos, que es aún menor cuando se incrementa la concentración de alginato sulfatado. Por lo que el alginato de sodio en sus dos variedades probadas no resultó ser un gran promotor de la inyectabilidad de las pasta de cemento. Sin embargo, al incrementar la proporción L/P a 0.80 ml/g se pueden conseguir cementos inyectables hasta el 83 %, lo cual ya es aceptable en términos de eficiencia y por lo que su uso en cirugía no invasiva es factible.

Finalmente, cabe mencionar que con ambos alginatos sí que se llegó a observar la separación de fases, principalmente cuando la proporción L/P fue de 0.40 ml/g.

4.4.6.2 Curvas fuerza-desplazamiento del émbolo

Otro parámetro importante a considerar durante la inyección es la fuerza necesaria para extruir la pasta de cemento. En la figura 4.28 se representa la fuerza aplicada para extruir la pasta en función del desplazamiento porcentual del émbolo de la jeringa.

Es importante considerar que durante la prueba de inyección la fuerza aplicada para desplazar el émbolo corresponde a la fuerza necesaria para inyectar el material más la fuerza de fricción del sistema. Por lo cual la figura 4.28 muestra también la curva fuerza-desplazamiento correspondiente a la jeringa vacía. Se observa que la fricción del sistema es relativamente constante y tiene un valor promedio de 0.5 N. Al final del recorrido del émbolo se observa un incremento abrupto de fuerza, debido a que la carga se aplica en deformar la jeringa vacía.

El cemento de referencia preparado con L/P = 0.40 ml/g requirió de una fuerza de 10 N para iniciar la extrusión de la pasta. Superado este valor la fuerza se incrementó exponencialmente hasta alcanzar el valor máximo definido a priori en la prueba de inyección, el cual corresponde a 100 N.

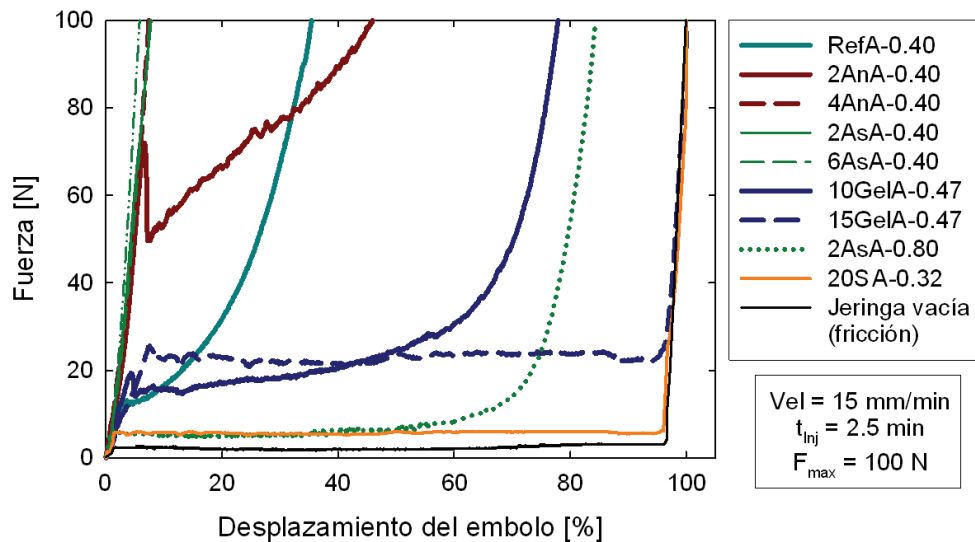


Figura 4.28: Curvas fuerza-desplazamiento porcentual del émbolo, durante la inyección de diferentes formulaciones de cemento compuesto.

El cemento compuesto con 2 % de alginato de sodio sin sulfatar requirió de una fuerza de 70 N para iniciar su extrusión. El hecho de que la fuerza requerida fuera mayor comparada con la necesaria para la extrusión del cemento de referencia se puede atribuir a la interacción del alginato con los iones del cemento, la cual genera un umbral de energía de activación mayor para iniciar la inyección. Una vez superado este umbral, la inyección es más fácil con respecto a la referencia, menor pendiente de la curva fuerza-desplazamiento, probablemente por un efecto plastificante del alginato. Sin embargo, rápidamente se alcanza la fuerza límite de 100 N, y por tanto se detiene la extrusión.

En cuanto a los cementos compuestos con 4 % de alginato de sodio sin sulfatar, o con 2 y 6 % de alginato de sodio sulfatado, la fuerza de activación supera los 100 N, por los que no se logró iniciar la inyección durante el ensayo. El incremento en la fuerza de activación requerida para inyectar estos cementos se puede explicar por el menor tiempo de fraguado de estas formulaciones, en comparación con el cemento de referencia o el cemento compuesto con 2 % de alginato sin sulfatar (ver figura 4.10).

Al igual que para el cemento de referencia, el incremento de la proporción L/P del cemento compuesto con alginato de sodio facilitó la inyección del compuesto. Con el incremento de la proporción L/P a 0.80 ml/g la inyección del cemento compuesto con 2 % de alginato de sodio sulfatado se realizó a una fuerza de 6 N, fuerza considerablemente menor con respecto al cemento de referencia. A pesar de ello, la inyectabilidad de este compuesto no obtuvo el 96 % observado para otras composiciones, y sí que se produjo el fenómeno de separación de fases.

Por su parte, la fuerza requerida para iniciar la inyección de los cementos con gelatina fue ligeramente superior a la necesaria para iniciar la extrusión de la referencia. Pero una vez iniciada la inyección la fuerza aplicada se mantuvo constante hasta que la jeringa quedó vacía. Este comportamiento de inyección a fuerza constante es un claro reflejo del incremento de la inyectabilidad del cemento a causa de la incorporación de la gelatina.

Cabe mencionar que, si se tarda en inyectar la pasta de cemento con gelatina, el cemento se enfría causando la solidificación de la gelatina e impidiendo por completo la inyección del material, por tanto la inyección de estos compuestos debe efectuarse rápidamente.

Por otro lado, la fuerza necesaria para inyectar los cementos compuestos con soja fue de 6 N y se mantuvo constante hasta terminar de inyectar la pasta. La fuerza aplicada es comparable con la necesaria para inyectar un cemento preparado con una elevada proporción L/P, sin embargo, la proporción L/P del cemento compuesto con soja fue de 0.32 ml/g. Por lo que la soja es la mejor alternativa para mejorar la inyectabilidad de los cementos compuestos.

En resumen, empleado la proporción L/P óptima para cada formulación de cemento, la fuerza necesaria para inyectar las pastas es similar o inferior a 20 N, lo que significa un quinto de la fuerza máxima promedio que puede ejercer la mano humana, y se asemeja a lo obtenido para otros cementos altamente inyectables [20]. Por lo que en términos de inyección los compuestos biopolímero/CPC son aptos para aplicaciones medicas no invasivas. Además, la buena inyección de las pastas puede facilitar la fabricación *in vitro* de sustratos para cultivos celulares en tres dimensiones.

4.4.6.3 Cohesión de las pastas inyectadas

La cohesión de las pastas en medio líquido es un factor clave en el campo de rellenos óseos. Anteriormente se mostró que la incorporación de los biopolímeros no incrementa los tiempos de cohesión con respecto al cemento de referencia, siempre que se utilice el acelerante de la reacción de fraguado. La condición de sumergir directamente el cemento en agua o Ringer para determinar la cohesión es muy extrema en comparación a la situación real en el organismo, ya que la sangre es un medio líquido viscoso que contienen macromoléculas, por lo que su penetración en el cemento vía osmosis será menor y por tanto tendera menos a desintegrar la pasta inyectada. La geometría de la pasta cementante es otro factor que influye en la cohesión, y por ello a continuación se presentan imágenes de los cementos compuestos inyectados directamente en agua a 37 °C, justo después de su preparación.

Como se puede ver en la figura 4.29, la geometría obtenida después de inyectar la pasta es la de un cordón de cemento. Puesto que la cohesión es un fenómeno de interacción superficial el empleo de un cordón sumergido en agua es un método estricto de caracterización, ya que la relación superficie/volumen es muy alta.

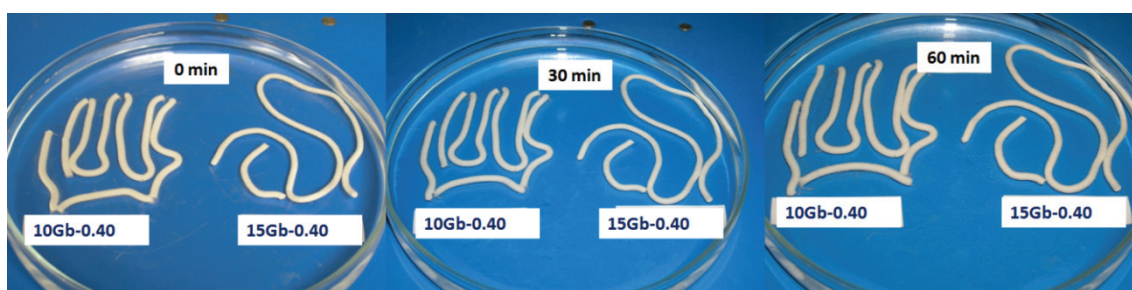


Figura 4.29: Imágenes de las pastas de cementos compuestos con un 10 y un 15 % de gelatina tipo B, preparadas con L/P = 0.40 ml/g, tomadas a diferentes tiempos desde la inmersión en agua a 37 °C.

Cementos con gelatina tipo B: En la figura 4.29 se observa que los compuestos con 10 y 15 % de gelatina tipo B, preparados con una proporción L/P de 0.40 ml/g tienen cohesión inmediatamente después de ser inyectados y que la cohesión se mantiene durante al menos 60 minutos, tiempo suficiente para el fraguado final del material, lo cual coincide con los resultados de los tiempos de cohesión y fraguado mostrados anteriormente.

De igual forma la figura 4.30 muestra que los mismos compuestos con 10 y 15 % de gelatina tipo B tienen cohesión cuando son preparados con una proporción L/P de 0.80 ml/g. Puesto que el cemento de referencia preparado con esta misma proporción L/P no tiene cohesión y se desintegra inmediatamente, queda de manifiesto el efecto cohesivo de la gelatina tipo B sobre el cemento. Resultado que concuerda con estudios previos realizados por Fujishiro, donde a diferencia la gelatina fue incorporada en forma de polvo en la formulación del cemento [5].

Finalmente señalar que no se observó ninguna diferencia en la cohesión de los compuestos con 10 o 15 % de gelatina.

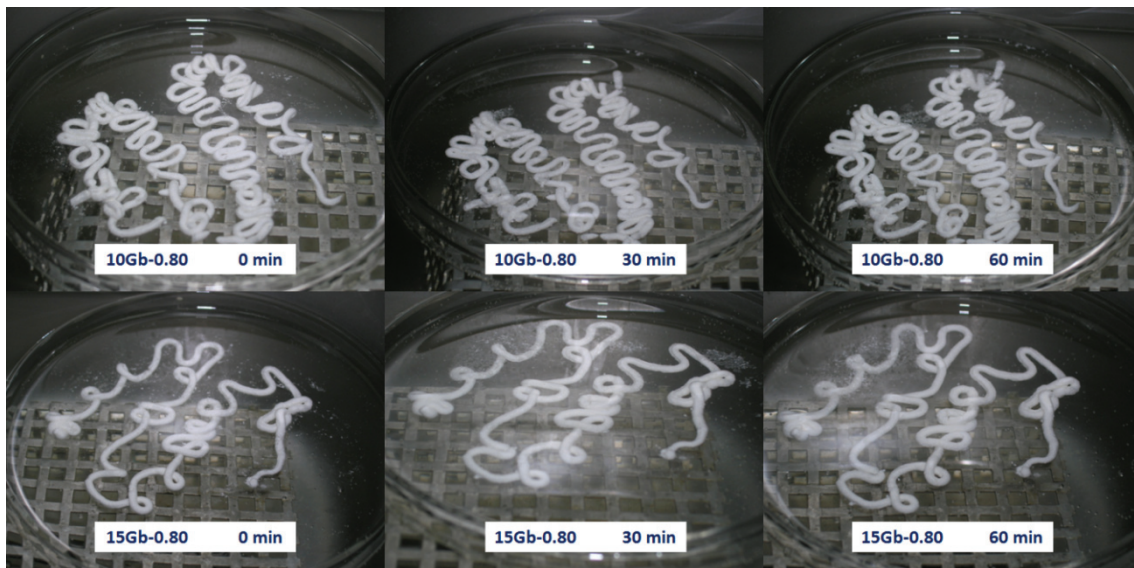


Figura 4.30: Imágenes de las pastas de cementos compuestos con un 10 y un 15 % de gelatina tipo B, preparadas con $L/P = 0.80$ ml/g, tomadas a diferentes tiempos desde la inmersión en agua a 37°C .

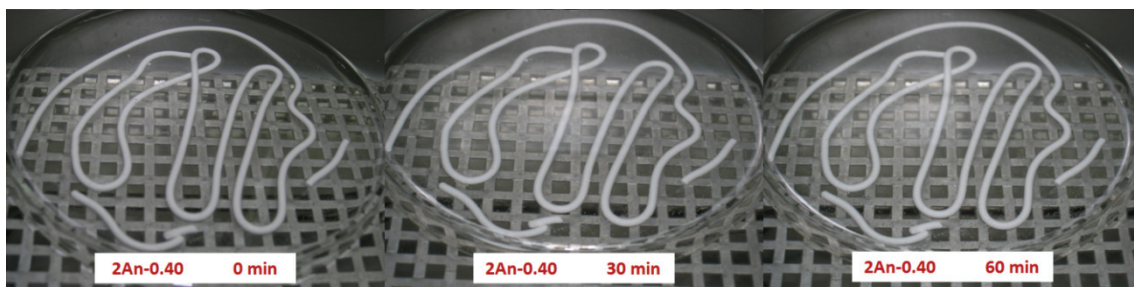


Figura 4.31: Imágenes de las pastas de cementos compuestos con 2 % de alginato de sodio, preparadas con $L/P = 0.40$ ml/g, tomadas a diferentes tiempos desde la inmersión en agua a 37°C .

Cementos con alginato de sodio sin sulfatar y sulfatado: Por su parte los compuestos con alginato de sodio ratificaron lo ya observado, es decir, que tienen cohesión desde el momento de su preparación, incluso en forma de cordón, cuando se fabrican con acelerante de la reacción de fraguado y $L/P = 0.40 \text{ ml/g}$ (ver figura 4.31).

Para probar condiciones aun más severas se incrementó la proporción L/P de los compuestos con alginato de sodio sulfatado. Además, el incremento de la proporción L/P se propuso para incrementar la inyectabilidad del material, ya que como se mostró en la figura 4.27, los cementos compuestos con alginato sulfatado preparados con $L/P = 0.40 \text{ ml/g}$ no son inyectables.

Al incrementar la proporción L/P a 0.50 ml/g se encontró que tanto los cementos compuestos con 2 y 6 % de alginato sulfatado son inyectables y tienen cohesión (ver figura 4.32), por lo menos durante 60 minutos, tiempo suficiente para permitir el fraguado del cemento.

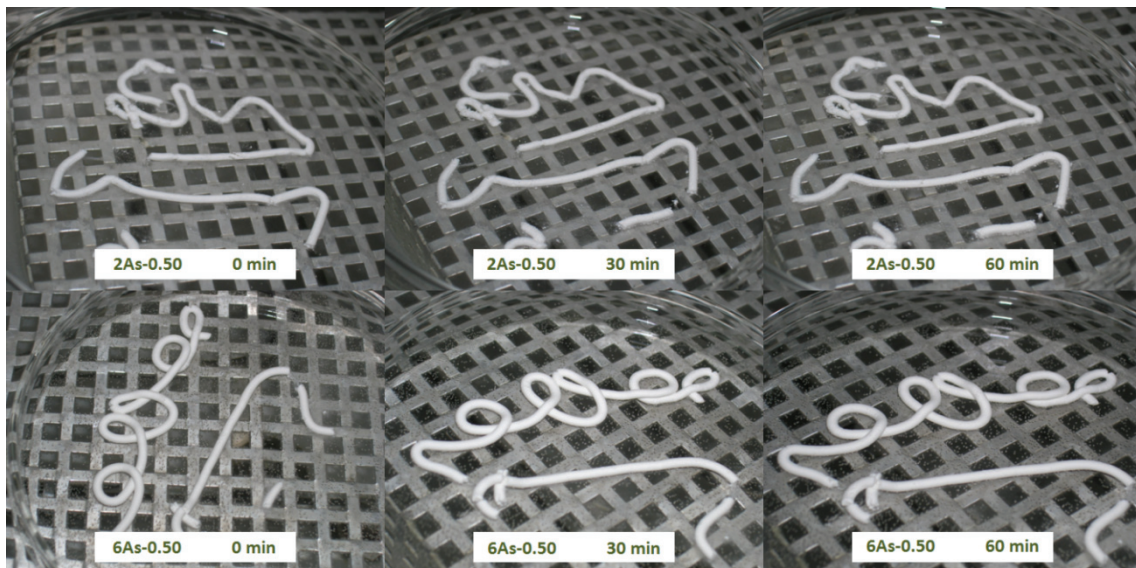


Figura 4.32: Imágenes de las pastas de cementos compuestos con un 2 y un 6 % de alginato de sodio sulfatado, preparadas con $L/P = 0.50 \text{ ml/g}$, tomadas a diferentes tiempos desde la inmersión en agua a $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$.

Sin embargo, al incrementar la proporción L/P a 0.80 ml/g , los cementos compuestos con 2 % de alginato sulfatado no tuvieron cohesión después de ser inyectados y se desintegraron inmediatamente al entrar en contacto con el medio de inmersión (imágenes presentadas en la figura 4.33). Por su parte, los compuestos con 6 % de alginato sulfatado y $L/P = 0.80 \text{ ml/g}$ sí tuvieron cohesión. Estos resultados siguieron que efectivamente la incorporación del alginato sulfatado actúa como promotor de la cohesión y que a mayor contenido mayor es el efecto cohesivo, en el intervalo de concentraciones estudiado.

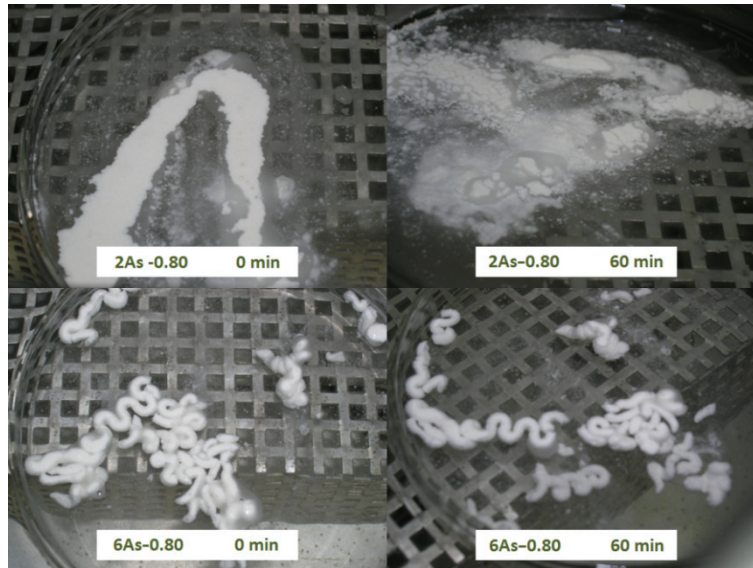


Figura 4.33: Imágenes de las pastas de cementos compuestos con un 2 y un 6 % de alginato de sodio sulfatado, preparadas con $L/P = 0.80$ ml/g, tomadas a diferentes tiempos desde la inmersión en agua a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$.

En resumen para los cementos compuestos con alginato de sodio el uso del acelerante de la reacción de fraguado es el factor clave para obtener compuestos con mejores características. Con acelerante los compuestos tienen cohesión desde el momento de su preparación y los tiempos de fraguado se reducen. Sin embargo, de acuerdo con la opinión de Ishikawa [10,11,17], las ventajas de la incorporación del alginato de sodio no son excesivamente relevantes, pero tampoco es inviable su uso como aditivo del cemento óseo. Aunado a ello la adición de grupos sulfato en el alginato permite potenciar las ventajas de este biopolímero sobre el cemento en base a α -TCP.

Cementos con extracto de soja: Por otra parte los cementos compuestos con extracto de soja no tuvieron cohesión cuando fueron inyectados (ver figura 4.34). Sin embargo, las pastas no se desintegran en el líquido, sino que se funden en él. A pesar de emplear proporciones L/P tan bajas, como 0.28 ó 0.32 ml/g, la pasta con 20 % de soja se mezcla con el medio de inmersión. Al emplear 56 % de soja la cohesión de los cordones parece mejorar pero se siguen mezclando con el medio. Además, en la figura 4.34 se observa la liberación de la soja hacia el medio de inmersión. Para el contenido de soja del 20 % la liberación se aprecia como turbidez en el líquido, y para 56 % además se observa el tono marrón característico del extracto de soja.

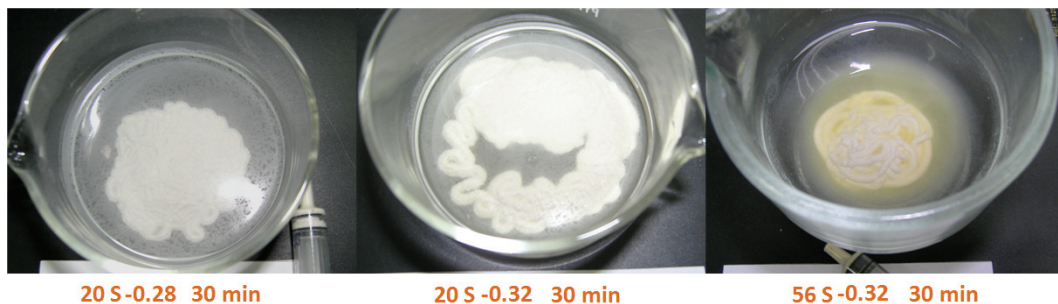


Figura 4.34: Imágenes de las pastas de cementos compuestos con 20 y 56 % de extracto de soja, preparadas con $L/P = 0.28$ ó 0.32 ml/g, tomadas 30 minutos después de la inmersión en agua a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$.

En particular el cemento compuesto con 5 % de soja y $L/P = 0.32$ ml/g resulta ser la mejor formulación estudiada, puesto que tiene tiempos de fraguado adecuados, es completamente inyectable, reacciona de forma similar al cemento de referencia, originando las microestructuras típicas del cemento y tiene una resistencia mecánica aceptable.

No obstante, de acuerdo a los resultados se proponen las siguientes sugerencias para optimizar los compuestos soja/CPC.

- Se puede mejorar la cohesión de los cementos con soja agregando agentes promotores de la cohesión, como la gelatina o el alginato de sodio sulfatado.
- La resistencia mecánica de los cementos se puede incrementar considerablemente disminuyendo el contenido de soja y la proporción L/P de preparación del cemento.
- La soja puede ser empleada como agente fluidificante para mejorar la inyección de cementos o en general de suspensiones de partículas sólidas.

Dado que el objetivo general de esta tesis no fue el obtener cementos altamente resistentes, no se intentó mejorar las propiedades mecánicas de los cementos compuestos con soja, pero si en el capítulo 5 se realiza la caracterización de compuestos soja/CPC con la incorporación de gelatina o alginato de sodio para mejorar la cohesión y mantener la buena inyectabilidad.

Finalmente, cabe señalar que la obtención de sustratos *in vitro* no tiene como requisito primordial la cohesión del cemento en medio líquido a tiempos cortos, por lo que todos los cementos compuestos analizados pueden servir para la fabricación de andamios prefraguados en el laboratorio.

4.5 Conclusiones

Se han obtenido cementos compuestos inyectables y autofraguables que imitan la estructura compuesta del tejido óseo. Los biopolímeros incorporados al cemento en base a α -TCP son la gelatina, el alginato de sodio o el extracto de soja.

De forma específica la incorporación de cada uno de los biopolímeros tiene los siguientes efectos en las propiedades del cemento en base a α -TCP:

Gelatina (0-20 % w/v en la fase líquida):

- En términos generales no hay diferencias relevantes entre el empleo de gelatina tipo A o tipo B.
- La gelatina tipo B brinda cohesión a las pastas de cemento desde la preparación. Sin acelerante la gelatina tipo B incrementa ambos tiempos de fraguado, en cambio con acelerante disminuye el tiempo inicial de fraguado e incrementa ligeramente el tiempo final de fraguado.
- La gelatina no reduce la fuerza necesaria para iniciar la inyección del cemento, pero si incrementa significativamente la inyectabilidad.
- Durante el fraguado en medio líquido la gelatina tipo B se libera, generando mayor porosidad en el cemento, lo cual se refleja en una menor resistencia a la compresión.

- Durante el fraguado en papel de aluminio (atmósfera húmeda), la gelatina no modifica significativamente la resistencia a la compresión o a la flexión. Pero incrementa la deformación a la fractura a compresión y reduce el módulo de elasticidad a flexión.
- A pesar de que los diagramas de difracción muestran diferencias, la incorporación de gelatina, y los dos medios de fraguado estudiados, no afectan considerablemente el porcentaje de reacción del α -TCP.

Alginato de sodio (0-6 % w/v en la fase líquida):

- Sin acelerante de la reacción de fraguado, el alginato de sodio reduce la cohesión del cemento e incrementa el tiempo inicial y final de fraguado. En tanto que con acelerante, mantiene la cohesión del cemento desde la preparación de la pasta, y disminuye los dos tiempos de fraguado.
- El alginato de sodio no mejora la inyectabilidad del cemento.
- El alginato de sodio reduce ligeramente la resistencia a la compresión, pero no modifica significativamente el módulo de elasticidad a compresión o la deformación a la fractura. En cambio, sí reducen la resistencia y el módulo de elasticidad a flexión.
- El alginato de sodio no impide la conversión del α -TCP a HA, pero aumenta ligeramente la superficie específica del material.

Alginato de sodio sulfatado (0-6 % w/v en la fase líquida):

- El alginato de sodio sulfatado con acelerante proporciona cohesión al cemento desde la preparación y disminuye los dos tiempos de fraguado.
- El corto tiempo de fraguado impide la inyección del cemento compuesto con proporción L/P de 0.40 ml/g. El incremento de la proporción L/P a 0.80 ml/g aumenta la inyectabilidad hasta un 80 %.
- El alginato de sodio sulfatado reduce la resistencia a la compresión y a la flexión del cemento, pero no modifica significativamente el módulo de elasticidad a compresión o la deformación a la fractura. En cambio si disminuye el módulo de elasticidad a flexión.
- El alginato de sodio sulfatado no impide la conversión del α -TCP a HA e incrementa la superficie específica del material, probablemente debido a que produce cristales de menor tamaño.

Extracto de soja (0-56 % w/w en la fase líquida):

- El extracto de soja disminuye la cohesión e incrementa los tiempos de fraguado del cemento. El uso de acelerante permite acortar los tiempos de fraguado, logrando valores cercanos a los recomendados para el relleno de defectos óseos.
- El extracto de soja incrementa la fluidez de la pasta, mejorando considerablemente la inyectabilidad del cemento. También reduce considerablemente la fuerza necesaria para inyectar el cemento.
- El extracto de soja reduce la resistencia a la compresión, la resistencia a la flexión y los módulos de elasticidad a compresión y a flexión, pero no incrementa la deformación a la fractura.
- El extracto de soja no altera el producto de la reacción de fraguado del α -TCP, retrasa la conversión a HA y produce superficies específicas menores.

4.6 Referencias

1. Bostrom M., Boskey A., Kaufman J., Einhorn T.A. Form and function of bone. In: Buckwalter JA, Einhorn TA, Simon SR, eds. Orthopaedic basic science, biology and biomechanics of the musculoskeletal system. American Academy of Orthopaedic Surgeons, 2000; 320-369.
2. Bourne G. The biochemistry and physiology of bone. New York: Academic Press, 1972.
3. Cormack D.H. Bone. In: Ham's histology. Philadelphia: Lippincott, 1987; 273-323.
4. Cowin S.C., Van Burskirk W.C., Ashman R.B. Properties of bone. In: Shalak R, Chien S, eds. Handbook of bioengineering. USA: Mc Graw Hill, 1987; 21.
5. Fujishiro Y., Takahashi K., Sato T. Preparation and compressive strength of α -tricalcium phosphate/gelatine gel composite cement. Journal of Biomedical Materials Research 2001; **54**: 525-530.
6. Bigi A., Bracci B., Panzavolta S. Effect of added gelatin on the properties of calcium phosphate cement. Biomaterials 2004; **25**: 2893-2899.
7. Bigi A., Cantelli S., Panzavolta S., Rubini K. α -Tricalcium phosphate-gelatine composite cements. Journal of Applied Biomaterials and Biomechanics 2004; **2**: 81-87.
8. Shie M.Y., Chen D.C.H, Wang C.Y., Chiang T.Y., Ding S.J. Immersion behavior of gelatin-containing calcium phosphate cement. Acta Biomaterialia 2008; **4**: 646-655.
9. Habraken W.J.E.M., de Jonge L.T., Wolke J.G.C., Yubao L., Mikos A.G., Jansen J.A. Introduction of gelatin microspheres into an injectable calcium phosphate cement. J Blomed Mater Res A 2008; **87**: 643-655.
10. Ishikawa K., Miyamoto Y., Kon M., Nagayama M., Asaoka K. Non-decay type fast-setting calcium phosphate cement: composite with sodium alginate. Biomaterials 1995; **16**: 527-532.
11. Ishikawa K., Miyamoto Y., Takechi M. et al. Non-decay type fast-setting calcium phosphate cement: Hydroxyapatite putty containing an increased amount of sodium. Journal of Biomedical Materials Research 1997; **36**: 393-399.
12. Ginebra M. P. Desarrollo y caracterización de un cemento óseo basado en fosfato tricálcico alfa para aplicaciones quirúrgicas. Universidad Politécnica de Cataluña, 1996.
13. Kevor S., Huisen T., Brown P.W. The formation of hydroxyapatite-gelatin composites at 38°C. Journal of Biomedical Materials Research 1994; **28**: 27-33.
14. Djagny K.B., Wang Z., Xu S. Gelatin: a valuable protein for food and pharmaceutical industries: review. Critical Reviews in Food Science and Nutrition 2001; **41**: 481-492.
15. Foix J. Aplicaciones de la gelatina. Separata de la Revista Química 1960; **85**: 11.

16. Fernández E., Boltong M.G., Ginebra M.P., Bermúdez O., Driessens F.C.M., Planell J.A. Common ion effect on some calcium phosphate cements. *Clin Mater* 1994; **16**: 99-103.
17. Miyamoto Y., Ishikawa K., Takechi M. et al. Non-decay type fast-setting calcium phosphate cement: setting behaviour in calf serum and its tissue response. *Biomaterials* 1996; **17**: 1429-1435.
18. Zhang S.M., Cui F.Z., Liao S.S., Zhu Y., Han L. Synthesis and biocompatibility of porous nano-hydroxyapatite/collagen/alginate composite. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 2003; **14**: 641-645.
19. Teng S., Shi J., Peng B., Chen L. The effect of alginate addition on the structure and morphology of hydroxyapatite/gelatin nanocomposites. *Composites Science and Technology* 2006; **66**: 1532-1538.
20. Barralet J., Gbureck U., Thull R. Improved calcium phosphate bone cements. USA patent 103419 A1, 2004.
21. Lewis G. Injectable bone cements for use in vertebroplasty and kyphoplasty: state of the art review. *J Biomed Mater Res B: Appl Biomater.* 2006; **76**: 456-468.
22. Sarda S., Fernandez E., Llorens J., Martinez S., Nilsson M., Planell J.A. Rheological properties of an apatitic bone cement during initial setting. *Journal of Materials Science-Materials in Medicine* 2001; **12**: 905-909.
23. Bohner M., Baroud G. Injectability of calcium phosphate pastes. *Biomaterials* 2005; **26**: 1553-1563.
24. Burguera E.F., Xu H.H., Weir M.D. Injectable and rapid-setting calcium phosphate bone cement with dicalcium phosphate dihydrate. *J Biomed Mater Res B: Appl Biomater* 2006; **77**: 126-134.
25. Fernández E., Gil F.J., Ginebra M.P., Driessens F.C.M., Planell J.A., Best S.M. Production and characterization of new calcium phosphate bone cements in the CaHPO_4 - α - $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ system: pH, workability and setting times. *J Mater Sci Mater Med* 1999; **10**: 223-230.
26. Friberg J., Fernandez E., Sarda S. et al. An experimental approach to the study of the rheology behaviour of synthetic bone calcium phosphate cements. *Key Eng Mater* 2001; **192-195**: 777-780.
27. Ginebra M.P., Rilliard A., Fernández E., Elvira C., San Roman J., Planell J.A. Mechanical and rheological improvement of a calcium phosphate cement by the addition of a polymeric drug. *Journal of Biomedical Materials Research* 2001; **57**: 113-118.
28. Khairoun I., Boltong M.G., Driessens F.C.M., Planell J.A. Some factors controlling the injectability of calcium phosphate bone cements. *Journal of Materials Science-Materials in Medicine* 1998; **9**: 425-428.

29. Sarda S., Fernández E., Nilsson M., Balcells M., Planell J.A. Kinetic study of citric acid influence on calcium phosphate bone cements as water-reducing agent. *Journal of Biomedical Materials Research* 2002; **61**: 653-659.
30. Xu H.H., Weir M.D., Burguera E.F., Fraser A.M. Injectable and macroporous calcium phosphate cement scaffold. *Biomaterials* 2006; **27**: 4279-4287.