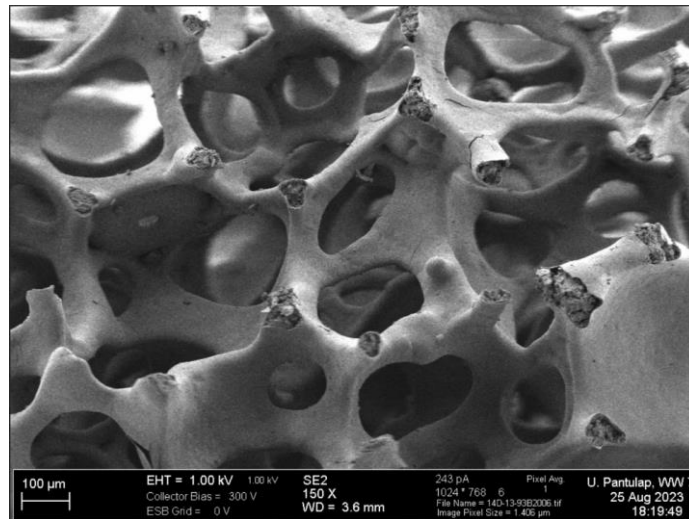


UNMDP-Facultad de Ingeniería- Departamento de Ingeniería en Materiales

FAU-Technische Fakultät- Instituto de Biomateriales

Síntesis, caracterización y funcionabilidad de andamios de vidrio bioactivo dopado con Zn, Cu y aceites esenciales para regeneración ósea.



Proyecto final para optar al grado de Ingeniero en Materiales

Autor: Villavicencio Kseiri Mateo.

DNI: 42254996. Nro. de Legajo: 14227. Mail: mateoviks@gmail.com

Dirección en UNMDP: Dra. Josefina Ballarre

Dirección en FAU, Alemania: Prof. Aldo Roberto Boccaccini, Dra. Usanee
Pantulap

Mar del Plata, diciembre 2025.

Dedicatoria

A mi Abuela Dosinda Sanjurjo. Ser tu nieto vale más que cualquier título universitario.

A mi Abuelo Antonio Kseiri. Hace ya más de diez años que te fuiste. Espero que me recuerdes estés donde estés.

Agradecimientos

En primer lugar, me gustaría agradecer al Prof. Aldo Boccaccini, por darme la oportunidad de realizar mi trabajo final en el prestigioso Instituto de Biomateriales de la FAU y por su constante apoyo y excelente predisposición durante mi estadía en Alemania.

También quiero agradecer a mis directores, la Dra. Josefina Ballarre por dedicar largas horas y paciencia a ayudarme en este proyecto.

A la Dra. Usanee Pantulap por guiarme en las tareas de laboratorio en Alemania.

A los jurados, el Dr. Carlos Díaz, el Dr. Gustavo Abraham, y la Dra. Silvia Ceré, por tomarse el tiempo para la lectura y evaluación de este trabajo.

A los organizadores del proyecto IDEAR, Dr. Lisandro Escalada, a la Dra. María Andrea Camerucci, al Dr. Flavio Soldera y a la Dra. Silvia Simison por permitirme realizar esta grandiosa experiencia en Alemania y por haber sostenido el proyecto a pesar de los inconvenientes previos al viaje.

A Florencia y Rocío por ayudarme a completar los experimentos en Argentina.

A mis padres Pablo y Romina y a mi hermano Pedro por saber escucharme en momentos de angustia y alegría y por el inmenso apoyo que me dieron siempre.

A mis tíos Omar y Carolina por haberme acompañado durante toda mi vida.

A mis amigos del colegio y de la facultad Tomas, Mikel, Guido, Valentin y Pablo por las experiencias y risas compartidas.

A Ezequiel, Iván, Lautaro y Joaquín por su amistad y compañía durante la estadía en Alemania.

A Mica; aunque nos conocemos hace poco, me alegra que formes parte de esto con tu compañía y tus mensajes de aliento.

A mis amigos de la facultad Joaquín, Santiago, Juan Martín, Gonzalo, Iván, Martín, Nico Nadini y Nico Santanna.

A los amigos que hice en Alemania Karim, Susy, Erick, Paulina, Arturo, Andrea, Jimena, Lupe, Martin y Gabriela por acompañarme y hacer más llevadero el tiempo allá.

índice

1. Resumen.....	8
2. Abstract.....	9
3. Introducción.....	11
3.1 Ingeniería de tejidos.....	11
3.2. El tejido óseo. Estructura y funciones	12
3.3 Ingeniería de tejidos para la regeneración ósea	13
3.4 Materiales para la ingeniería de tejidos	14
3.4.1 Vidrio bioactivo	15
3.5 Fabricación de andamios.....	16
3.5.1 Replicado por espuma.....	17
3.5.2 Calidad de andamios fabricados por replicado por espuma	18
3.6 Características adicionales de los andamios de biovidrio	18
3.6.1 Recubrimientos en los andamios: gelatina de origen animal.....	19
3.6.2 Aceites esenciales: clavo de olor.....	19
3.6.3 Dopado de la formulación de vidrios bioactivos.....	20
4.Objetivos	22
4.1. Objetivos generales	22
4.2. Objetivos específicos	22
4.2.1 DISEÑO:.....	22
4.2.2 EVALUACIÓN:.....	22
5. Materiales y métodos	23
5.1 Materiales para la fabricación de andamios y recubrimientos.....	23
5.2 Acondicionamiento de los polvos de biovidrio.....	23
5.2 Obtención de los andamios.....	25
5.2.1 Ciclo de calentamiento 13-93	26

5.2.2	Ciclo de calentamiento 13-93 B2	26
5.2.3	Ciclo de calentamiento para andamios de 13-93 B2 dopados con Cu-Zn	27
5.3	Recubrimiento de Andamios	27
5.4	Caracterización de Andamios	28
5.4.1	Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR)	28
5.4.2	Morfología de los andamios (SEM).....	28
5.4.3	Microscopía óptica y procesamiento de imágenes	28
5.4.4	Ensayos Mecánicos	30
5.5	Test de bioactividad in vitro.....	32
5.5.1	Preparación de solución fisiológica simulada (SBF)	32
5.5.2	Ensayo de inmersión y pérdida de peso	34
5.6	Actividad antibacteriana	34
5.7	Citotoxicidad de Células MC3T3-E1	35
6.	Resultados y discusión.....	36
6.1	Obtención de Andamios por el método de réplica	36
6.2	Caracterización composicional y morfológica	37
6.2.1	Espectroscopía infrarroja	37
6.2.2	Porosidad y espesor de trabéculas.....	38
6.3	Bioactividad <i>in vitro</i>	40
6.3.1	Cambio de peso.....	40
6.3.2	Caracterización Morfológica (SEM)	42
6.3.3	Caracterización Composicional (FTIR)	49
6.4	Obtención de los andamios con recubrimientos	52
6.5	Evaluación de Propiedades Mecánicas	53
6.6	Evaluación Biológica (Actividad Antibacteriana y Citotoxicidad)	56
6.6.1	Actividad Antibacteriana	56
6.6.2	Citotoxicidad	58

7. Conclusiones.....	60
8. Trabajo a futuro	61
9. Bibliografía	62
Anexo.....	68

1. Resumen

Ante la creciente demanda de soluciones eficaces para la reparación de defectos óseos que superen las limitaciones de los tratamientos convencionales, la ingeniería de tejidos se ha centrado en el desarrollo de biomateriales avanzados capaces de promover la regeneración natural. En este marco, el presente proyecto final de grado aborda, por un lado, la fabricación y evaluación de andamios tridimensionales porosos de vidrio bioactivo, fabricados mediante la técnica de replicado de espuma polimérica utilizando tres formulaciones distintas: un biovidrio base de silicato (conocido como 13-93), una variante modificada con borato (13-93 B2) y una tercera modificada con boro de nuevo y dopada con cobre y zinc (13-93 B2 Cu-Zn). Por otro lado, con el objetivo de optimizar las propiedades mecánicas y biológicas, se aplicaron recubrimientos de gelatina y una mezcla híbrida de gelatina con aceite esencial de clavo sobre los andamios dopados con Cobre y zinc. Se caracterizaron las muestras sin recubrir mediante espectroscopía infrarroja, antes y después de la inmersión en fluido corporal simulado (SBF) También se estudió por medio de procesamiento de imágenes la porosidad y el tamaño de trabéculas de los andamios generados. Se analizaron la morfología resultante de los andamios, así como la bioactividad y formación de hidroxiapatita mediante microscopía electrónica de barrido (SEM) luego de la inmersión. Se evaluaron las propiedades mecánicas mediante ensayos de compresión de los andamios recubiertos y de los no recubiertos de la formulación 13-93 B2 dopados con cobre y zinc. Luego se comprobó su actividad antibacteriana frente a *Staphylococcus aureus* y se evaluó su citotoxicidad en células MC3T3-E1. Los resultados evidenciaron que la incorporación de boro, cobre y zinc acelera la degradación del vidrio y favorece la formación de hidroxiapatita, mientras que mecánicamente se evidenció un efecto sinérgico en el recubrimiento con aceite de clavo, el cual aumentó la resistencia a la compresión la rigidez, lo que podría deberse a la interacción del eugenol (principio activo presente en el extracto de clavo) con la matriz proteica (gelatina); biológicamente, este sistema compuesto demostró la mayor eficacia antibacteriana y una adecuada citocompatibilidad en concentraciones controladas. Se concluye, entonces, que los andamios dopados con recubrimiento funcionalizado representan una estrategia prometedora que equilibra soporte estructural, bioactividad y prevención de infecciones.

Palabras clave: Ingeniería de tejidos, vidrio bioactivo, andamios, replicado de espuma, bioactividad, gelatina, aceite esencial de clavo.

2. Abstract

Given the increasing demand for effective solutions for bone defect repair that overcome the limitations of conventional treatments, tissue engineering has focused on the development of advanced biomaterials capable of promoting natural regeneration. Within this framework, this undergraduate final project addresses, on the one hand, the fabrication and evaluation of porous three-dimensional bioactive glass scaffolds, produced via the polymer foam replication technique using three distinct formulations: a base 13-93 silicate bioglass, a borate-modified variant (13-93 B2), and a third version further modified with boron and doped with copper and zinc (13-93 B2 Cu-Zn). On the other hand, with the aim of optimizing mechanical and biological properties, coatings of gelatin and a hybrid mixture of gelatin with clove essential oil were applied to the copper and zinc-doped scaffolds with the aim of improving their antibacterial properties, but above all, the mechanical compressive strength of the generated scaffolds. The uncoated samples were characterized by Fourier transform infrared spectroscopy, after and before immersion in simulated body fluid (SBF) their bioactivity was evaluated in simulated body fluid (SBF). The porosity and strut size of the generated scaffolds were also studied using image processing. The resulting morphology of the scaffolds was analyzed, as well as the bioactivity and formation of hydroxyapatite using scanning electron microscopy (SEM) after immersion. Mechanical properties were evaluated through compression tests on the coated scaffolds and the uncoated scaffolds of the 13-93 B2 formulation doped with copper and zinc. Subsequently, their antibacterial activity against *Staphylococcus aureus* was verified, and their cytotoxicity on MC3T3-E1 cells was evaluated. The results evidenced that the incorporation of boron, copper, and zinc accelerates glass degradation and promotes hydroxyapatite formation, while mechanically, a synergistic effect was observed in the clove oil coating, which increased compressive strength and stiffness. This behavior could be attributed to the interaction of eugenol (the active compound in clove extract) with the protein matrix (gelatin); biologically, this composite system demonstrated the highest antibacterial efficacy and adequate cytocompatibility at controlled concentrations, concluding that the doped scaffolds with functionalized

coating represent a promising strategy that balances structural support, bioactivity, and infection prevention.

Keywords: Tissue engineering, bioactive glass, scaffolds, foam replication, bioactivity, gelatin clove essential oil.

3. Introducción

3.1 Ingeniería de tejidos

La Ingeniería de Tejidos (TE por sus siglas en inglés) es el pilar fundamental en el avance de la medicina regenerativa y la sustitución de funciones corporales mediante piezas faltantes, dañadas o patológicas. Es un campo interdisciplinario que combina principios de ingeniería y ciencias exactas y de la vida para diseñar y fabricar sustitutos biológicos capaces de restaurar, conservar o mejorar la función de tejidos y órganos. Este enfoque no solo busca replicar estructuras anatómicas, sino también devolver la funcionalidad perdida, integrándose armónicamente con el organismo (J. B. Park & Lakes, 2007).

Uno de los pilares de esta área es el desarrollo de andamios o estructuras tridimensionales (3D) que sirven de soporte temporal para el crecimiento celular y la formación de nuevo tejido. Estos andamios deben cumplir con una serie de características esenciales, tales como porosidad, biocompatibilidad, biodegradabilidad, y la capacidad de promover la migración celular, lo que los convierte en un componente esencial en los esfuerzos por regenerar tejidos dañados (Sabino et al., 2017).

La biocompatibilidad es la habilidad de un material para comportarse con una respuesta satisfactoria en una situación específica. Sin temer que esa respuesta sea adversa al huésped. Este comportamiento obviamente varía según la aplicación (Oldani et al., n.d.). Además, como los andamios no están destinados a ser implantes permanentes, deben ser biodegradables para permitir que las células produzcan su propia matriz extracelular. Los subproductos de esta degradación también deben ser no tóxicos y capaces de salir del cuerpo sin interferir con otros órganos. Para permitir que la degradación ocurra de manera simultánea con la formación del tejido, se requiere una respuesta inflamatoria combinada con una migración controlada de células como los macrófagos. Por otro lado, la porosidad desempeña un papel fundamental en la regeneración ósea, como lo demostraron Karageorgiou & Kaplan (2005). en un modelo ectópico en ratas. En su estudio, el uso de partículas sólidas y porosas de hidroxiapatita para la liberación de BMP-2 evidenció que solo en los andamios porosos se produjo osteogénesis directa, mientras que en las partículas sólidas no se formó nuevo tejido óseo (Karageorgiou & Kaplan, 2005).

3.2. El tejido óseo. Estructura y funciones

El hueso es un tejido conjuntivo mineralizado que cumple múltiples funciones en el organismo: proteger los órganos vitales como el cerebro, corazón, médula espinal, pulmones; permitir la locomoción rápida; almacenar calcio y fósforo; albergar la médula ósea y ser un actor de cierta relevancia en el sistema endócrino (Levasseur, 2019). Desde un punto de vista composicional, el hueso es un material compuesto natural constituido por una fase orgánica, una fase inorgánica y agua. La fase orgánica está formada principalmente por colágeno tipo I, el cual otorga flexibilidad y resistencia a la tensión y trazas de otros tipos como el colágeno tipo V. La fase inorgánica o mineral está compuesta mayoritariamente por cristales de hidroxiapatita de calcio $[Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2]$, responsables de la rigidez y resistencia a la compresión. Cabe destacar que la cristalinidad y composición varían con la edad del tejido; por ejemplo, en el hueso inmaduro o en formación, el mineral suele presentarse como hidroxiapatita carbonatada, similar a la fase mineral que se busca mimetizar con los vidrios bioactivos (Pawlina, 2016).

A diferencia del cartílago, el hueso está altamente vascularizado con una alta densidad celular; esta alta celularidad le permite adaptarse a las demandas mecánicas cambiantes y regenerarse tras una lesión. Macroscópicamente, el hueso vivo es blanco. Su textura puede ser densa como el marfil (hueso compacto) o estar perforada por grandes cavidades (hueso trabecular, canceloso o esponjoso), donde el elemento óseo se reduce a una estructura en forma de malla de barras y placas conocida colectivamente como trabéculas. El hueso compacto suele estar limitado a la capa externa o corteza de los huesos maduros, donde desempeña un papel importante en la determinación de su resistencia y en la provisión de superficies articulares rígidas. El grosor cortical y su arquitectura varían entre diferentes huesos y dentro de un mismo hueso, y generalmente disminuyen con la edad en adultos. El hueso trabecular proporciona soporte a la corteza mientras minimiza el peso. La presencia de un gran canal medular central en los huesos largos también ayuda a reducir su peso. Los espacios dentro de los huesos proporcionan ubicaciones convenientes y seguras para el almacenamiento de tejidos hematopoyéticos y grasa.

El hueso también actúa como una reserva de calcio metabólico (el 99 % del calcio corporal se encuentra en el esqueleto óseo) y de fosfato, cuya regulación está bajo control hormonal y de citocinas. Las proporciones de hueso compacto y hueso

trabecular varían entre diferentes huesos y dentro de un mismo hueso. Generalmente, se requiere una corteza gruesa para proporcionar resistencia a la flexión, por ejemplo, en la mitad de la diáfisis de un hueso largo (Levasseur, 2019).

El hueso trabecular proporciona resistencia a la compresión, por lo que es abundante en las epífisis de los huesos largos y en los cuerpos vertebrales de la columna. En los huesos planos, como las costillas, el interior es uniformemente trabecular, mientras que el hueso compacto o cortical forma la superficie. Las cavidades internas suelen estar llenas de médula ósea, ya sea roja (hematopoyética) o amarilla (adiposa), dependiendo de la edad y la ubicación. (Standing et al., 2021).

3.3 Ingeniería de tejidos para la regeneración ósea

La pérdida de un órgano o tejido debido a un trauma (como una fractura ósea) o una enfermedad grave (como el cáncer) no solo provoca la ausencia de su función fisiológica normal, sino que también genera trastornos psicológicos con altos costos y efectos sociales significativos. En estos casos, la terapia farmacológica convencional no es efectiva, por lo que la ingeniería biomédica ha desarrollado órganos y tejidos artificiales como la mejor solución para restaurar los originales.

La ingeniería de tejidos óseos se ha consolidado como una alternativa terapéutica eficaz mediante el desarrollo de andamios tridimensionales que actúan como soportes temporales, permitiendo la agregación y diferenciación celular necesaria para la deposición de matriz extracelular que no es posible lograr con células aisladas *in vitro*. Para que estas estructuras promuevan una regeneración exitosa, es imperativo que combinen una biocompatibilidad estricta, exenta de citotoxicidad, con una biodegradabilidad controlada que garantice el soporte estructural hasta la formación del nuevo tejido. Asimismo, el diseño debe contemplar una arquitectura porosa interconectada con un tamaño de poro mínimo de 100-150 μm , umbral crítico para facilitar la vascularización y la osteogénesis evitando procesos de hipoxia, a la vez que se aseguran propiedades mecánicas equiparables a las del hueso nativo para soportar las cargas fisiológicas. Finalmente, la funcionalidad del andamio se completa con su capacidad osteoconductiva y osteoinductiva, junto con una estructura anisotrópica que permita una adecuada adaptación anatómica al defecto óseo (Moreno et al., 2016).

3.4 Materiales para la ingeniería de tejidos

Un biomaterial es cualquier material, ya sea natural o sintético, que forma parte total o parcial de una estructura viva o de un dispositivo biomédico, con el propósito de desempeñar, mejorar o sustituir una función natural (Tathe et al., n.d.). Desde los años 60 y 70, se desarrollaron biomateriales específicamente para su uso en el cuerpo humano, sentando las bases de la ingeniería de biomateriales. Inicialmente, los implantes eran bioinertes para minimizar la respuesta del huésped, pero con el tiempo se reconoció la necesidad de desarrollar biomateriales bioactivos y biodegradables que imitaran mejor las propiedades del tejido óseo. Posteriormente, se reconoció la necesidad de desarrollar materiales que imitaran mejor al hueso. En este contexto, Bill Bonfield (Hench & Thompson, 2010) fue uno de los primeros en identificar la importancia de ajustar las propiedades mecánicas, desarrollando biocompuestos de fases poliméricas y cerámicas para reducir la reabsorción ósea. En los 80, surgió el concepto de bioactividad con la introducción de materiales como el Hapex (Hench & Thompson, 2010), un biocompuesto de polietileno con partículas de hidroxiapatita. En la actualidad, los biomateriales de tercera generación buscan activar respuestas celulares específicas mediante la liberación controlada de señales bioquímicas para inducir la regeneración de tejidos. La ingeniería de tejidos y la regeneración *in situ* representan estrategias prometedoras, donde los andamios porosos, combinados con células progenitoras o biomoléculas bioactivas, facilitan la reparación ósea y la integración con el tejido huésped, ofreciendo soluciones más duraderas y adaptativas para la medicina regenerativa (Hench & Thompson, 2010).

Los biocerámicos inertes, ya sean de origen natural o sintético, son una clase de materiales cerámicos inorgánicos y no metálicos diseñados para ser químicamente estables y no interactuar con el tejido, que forma una cápsula fibrosa a su alrededor sin degradarse (Hench, 1991). Se utilizan en la reparación y regeneración de partes dañadas del sistema musculoesquelético y anomalías periodontales (Pina et al., n.d.). Estos materiales han sido desarrollados para aplicaciones ortopédicas en recubrimientos de carga (como en copas acetabulares de cadera), injertos óseos, cementos e implantes dentales. Se caracterizan por su excelente biocompatibilidad, osteoconductividad, resistencia a la corrosión y una superficie dura y quebradiza.

Sin embargo, presentan la limitación de no poder degradarse. Esta debilidad junto con otras como su baja tenacidad a la fractura, fragilidad, elasticidad

extremadamente baja y una rigidez muy elevada ha restringido su aplicación en ingeniería de tejidos (TE), lo que ha impulsado la búsqueda de soluciones para mejorar su desempeño en contextos clínicos (Pina et al., n.d.). Los biocerámicos bioactivos y degradables son una alternativa efectiva. Ejemplos de estos son los vidrios bioactivos y diversos cerámicos que contienen fosfatos de calcio (por ejemplo, el β -fosfato tricálcico), que tienen la capacidad de unirse químicamente al hueso vivo y degradarse progresivamente en el organismo (Hench, 1991).

3.4.1 Vidrio bioactivo

Los vidrios bioactivos se introdujeron por Larry L. Hench. en 1971 en una publicación del *Journal of Biomedical Materials Research* ante la necesidad de desarrollar materiales que no fueran rechazados por el cuerpo humano. Este desafío inspiró a Hench a explorar nuevos caminos en la ciencia de los materiales, con el objetivo de descubrir un material que no solo evitara la formación de tejido cicatricial en la interfaz con el organismo, sino que además estableciera un vínculo vivo con los tejidos del huésped. Como resultado de esta búsqueda, nació el biovidrio (**Bioglass®**), un avance revolucionario en la ingeniería de biomateriales (Hench, 2006). Este material, debido a su bioactividad y biocompatibilidad ha sido utilizado asiduamente en la fabricación andamios para regeneración ósea (Ribas et al., 2019).

La formulación original buscaba la generación de una capa superficial de hidroxiapatita para impedir el rechazo del implante por el cuerpo. Contenía 45% SiO₂-24.5% Na₂O-24.5% CaO-6% P₂O₅ y se denominó 45S5 Bioglass (Hench, 2006). A partir de entonces se diseñaron diferentes formulaciones para remediar los inconvenientes que traía la 45S5. En particular, el sinterizado de partículas de 45S5 BG en andamios porosos presenta desafíos debido a la cristalización que ocurre en el rango de 600–700°C, lo que dificulta la obtención de una estructura amorfa con propiedades mecánicas óptimas. Para mitigar esta tendencia a la cristalización de 45S5, se ha explorado el efecto de álcalis mixtos mediante la incorporación simultánea de óxidos alcalinos y alcalinotérreos en la composición del vidrio. Este enfoque ha sido exitoso en el desarrollo del vidrio bioactivo 13-93 BG, cuya composición (en % peso) es 53 SiO₂ - 6 Na₂O - 12 K₂O - 5 MgO - 20 CaO - 4 P₂O₅ (Schuhladen et al., 2021).

Una propiedad clave de los BGs, incluyendo 13-93 y 45S5, es su capacidad para formar una capa superficial amorfa de fosfato de calcio o hidroxiapatita durante

su degradación. Dado que el contenido de óxidos formadores de red en estos vidrios es menor en comparación con los vidrios convencionales (como el de cal sodada), presentan una estructura de red más abierta, lo que facilita la interacción con moléculas de agua. El proceso de disolución del biovidrio inicia con un intercambio iónico entre $\text{Ca}^{2+}/\text{Na}^+$ y H^+ en la interfaz del medio de disolución y el vidrio. Esto provoca un aumento en la alcalinidad local y la formación de una capa rica en sílice en la superficie del vidrio, lo que, a su vez, incrementa el pH del medio. Posteriormente, los iones calcio y fosfato migran a través de esta capa rica en sílice y reaccionan con iones de la solución para formar una capa amorfa de fosfato de calcio, que luego cristaliza en hidroxiapatita. Sin embargo, la formación inicial de la capa de sílice en los BGs de 13-93 y 45S5 puede ralentizar o incluso limitar su conversión completa en hidroxiapatita (Hench, 1991).

Para mejorar la conversión a hidroxiapatita, particularmente en la composición silicatada 13-93, se han desarrollado vidrios bioactivos boratos (BBGs), en los cuales la red vítrea está basada en trióxido de boro en lugar de sílice. Estos BBGs presentan una tasa de degradación más rápida y una conversión completa a hidroxiapatita, sin la formación inicial de una capa de sílice. Además, mediante la sustitución parcial de SiO_2 por B_2O_3 , se han desarrollado vidrios bioactivos borosilicatos con base en la composición 13-93, permitiendo ajustar la tasa de disolución y la formación de hidroxiapatita al modificar el contenido relativo de B_2O_3 (Schuhladen et al., 2021).

3.5 Fabricación de andamios

Existen diversas técnicas para la producción de andamios, dando lugar a estructuras tridimensionales (3D) con distintas propiedades estructurales. Estas estructuras porosas son fundamentales en la ingeniería de tejidos, ya que sirven de soporte para células madre y factores de crecimiento, ambos esenciales para la formación de tejidos. Las técnicas convencionales para la preparación de andamios porosos son: espumado con gas, liofilización y evaporación de solventes con lixiviación de partículas, entre otras (Moreno et al., 2016).

Para producir andamios con poros interconectados, porosidad adecuada y un tamaño de poro que favorezca el crecimiento tisular, la técnica de replicación de espuma de polímero es una opción económica. Este método consiste en infiltrar una espuma de polímero con una suspensión coloidal de partículas. Luego, tras el secado,

la espuma se descompone y el sistema se sinteriza, formando una red sólida densa. La estructura final del andamio depende directamente de la arquitectura de la espuma utilizada (H. Fu et al., 2009).

3.5.1 Replicado por espuma

El método de réplica de espuma fue desarrollado por Schwartzwalder y Somers en 1963 para la fabricación de espumas cerámicas. Sin embargo, no fue hasta 2006 cuando Chen et al. y Y.-S. Park et al. introdujeron esta técnica en la ingeniería de tejidos óseos (BTE por sus siglas en inglés) para la obtención de andamios de vidrio bioactivo. Desde entonces, numerosos grupos de investigación han empleado esta metodología para desarrollar estructuras porosas de vidrio destinadas a aplicaciones en regeneración ósea (Fiume et al., 2021).

Esta técnica se basa en la replicación de la estructura porosa de una plantilla sacrificable para obtener una réplica positiva compuesta por partículas de vidrio o vitrocerámica. En el proceso típico, la espuma se impregna en una suspensión de polvos vítreos dispersos en una solución aglutinante, asegurando un recubrimiento uniforme sobre los filamentos de la plantilla. Las propiedades finales del andamio, como su resistencia mecánica, permeabilidad y porosidad, pueden ajustarse seleccionando plantillas con arquitecturas específicas y modificando los parámetros del proceso. Por ejemplo, el espesor del recubrimiento se puede controlar mediante el número de inmersiones sucesivas, mientras que la temperatura de sinterización o la concentración de sólidos en la suspensión pueden optimizarse para mejorar la cohesión entre partículas y reducir la presencia de vacíos interparticulares (Chen, 2011).

Tras la impregnación, el exceso de suspensión se elimina por compresión y las espumas son secadas, formando los llamados "cuerpos verdes". Posteriormente, la plantilla es eliminada mediante un tratamiento térmico a temperaturas entre 300 y 600 °C para minimizar el daño estructural del recubrimiento de vidrio poroso. Finalmente, el sinterizado del material se lleva a cabo a temperaturas entre 600 y 1000 °C, dependiendo de la composición y el tamaño de partícula del vidrio. En algunos casos, la eliminación de la espuma y el sinterizado del vidrio se combinan en un solo tratamiento, en el que se emplea una tasa de calentamiento controlada para evitar daños en la estructura, seguida de una etapa de mantenimiento a la temperatura óptima para densificar los filamentos de vidrio (Fiume et al., 2021).

3.5.2 Calidad de andamios fabricados por replicado por espuma

La réplica de espuma presenta varias ventajas, entre ellas la posibilidad de alcanzar altos niveles de porosidad (hasta un 90 % en volumen) en estructuras trabeculares que imitan de cerca el hueso esponjoso. Sin embargo, los andamios obtenidos mediante esta técnica a menudo presentan propiedades mecánicas insuficientes para su implantación en tejido óseo. A pesar de sus numerosas ventajas, el método de réplica de espuma enfrenta una de las limitaciones más críticas en aplicaciones biomédicas: la falta de reproducibilidad en los resultados y el control limitado sobre la arquitectura macroporosa. Esta problemática se atenúa únicamente en muestras pequeñas y de geometría sencilla, pero a medida que aumenta la complejidad y el tamaño de las estructuras, así como la cantidad de muestras en un mismo lote, pueden surgir fenómenos no deseados y difíciles de controlar. Entre estos, se encuentra la formación de gradientes en la suspensión, lo que puede provocar la oclusión de poros en ciertas zonas y generar variabilidad en la porosidad entre diferentes muestras (Baino et al., 2019).

Además, el fuerte impacto del factor humano en el proceso dificulta su estandarización, lo que limita su transición hacia aplicaciones clínicas más concretas. A diferencia de las tecnologías avanzadas de manufactura aditiva, este método no permite personalizar la arquitectura y la porosidad del andamio según las necesidades específicas de cada paciente. En su lugar, la optimización de la estructura final requiere una cuidadosa selección previa del material base, las características de la plantilla y las condiciones de sinterizado. No obstante, en lo que respecta a la reproducción fiel de la compleja arquitectura tridimensional del hueso esponjoso, la réplica de espuma sigue siendo una de las técnicas más prometedoras, debido a su simplicidad y factibilidad de realización. Esto justifica la necesidad de continuar con la optimización del proceso para mejorar su aplicabilidad en el campo de la ingeniería de tejidos óseos (Fiume et al., 2021).

3.6 Características adicionales de los andamios de biovidrio

Uno de los principales desafíos en el desarrollo de andamios óseos es encontrar un equilibrio entre la porosidad requerida y las propiedades mecánicas adecuadas. Es fundamental que los andamios posean suficiente resistencia mecánica y tenacidad a la fractura para soportar las condiciones del sitio de implantación y el manejo previo

a su aplicación (Metze et al., 2013a). Todo tipo de estructuras de biomateriales intracorpóreos es requerido que evite la adhesión de bacterias en su superficie para prevenir infecciones. También se busca que este tipo de andamios sea osteoconductor y osteoinductor (Vitale-Brovarone et al., 2008). Múltiples modificaciones se introdujeron en el diseño y fabricación de los andamios con el fin de mejorar sus propiedades; desde la aplicación de gelatina como recubrimiento para incrementar la resistencia y tenacidad (Metze et al., 2013a), el agregado de sustancias con propiedades antibacteriales como los aceites esenciales (Unalan et al., 2021) o incluso con iones con propiedades específicas en la formulación del biovidrio (Bejarano et al., 2020).

3.6.1 Recubrimientos en los andamios: gelatina de origen animal

La gelatina es un biopolímero proteico derivado del colágeno, la proteína estructural más abundante en el tejido conectivo animal. A diferencia de las proteínas globulares simples, la gelatina no existe como tal en la naturaleza, sino que es el resultado de la desnaturalización irreversible de la estructura fibrosa del colágeno insoluble (Liu et al., 2015).

La gelatina se puede obtener de diferentes seres vivos: mamíferos, peces, invertebrados, etc. Se ha reportado que las variaciones en la composición no son significativas al modificar el tejido que se use (piel, hueso, etc) (Metze et al., 2013b). Sin embargo, hay ciertas variaciones entre distintas especies que hay que tener en cuenta. Por ejemplo, el uso de tejidos bovinos para la producción de gelatina se evita en ciertas regiones, debido al contagio de la Encefalopatía Espongiforme Bovina (o BSE por sus siglas en inglés) (Rastilantie et al., 2005).

La capacidad de la gelatina para formar recubrimientos cohesivos es particularmente valiosa para reforzar materiales inorgánicos. En este contexto, se ha reportado el uso de gelatina para recubrir andamios de biovidrio (como el 45S5), logrando no solo una mayor biocompatibilidad, sino también una mejora significativa en sus propiedades mecánicas (Metze et al., 2013b).

3.6.2 Aceites esenciales: clavo de olor

Los aceites esenciales son metabolitos secundarios volátiles sintetizados por las plantas, que se almacenan en diversos órganos como botones florales, hojas, semillas, tallos y raíces. Debido a su reconocida capacidad para inhibir el crecimiento

de bacterias, levaduras y mohos, los aceites esenciales han despertado un gran interés científico e industrial como fuentes potenciales de agentes antimicrobianos naturales, seguros y no tóxicos (Sharma et al., 2014).

El aceite esencial de clavo (*clove essential oil* o CEO), obtenido de los botones florales secos de la planta (*Syzygium aromaticum* o *Eugenia caryophyllata*), es un compuesto natural ampliamente reconocido por sus aplicaciones en la industria alimentaria y farmacéutica. Se ha reportado que el componente principal del aceite de clavo es el eugenol; en un 79,2%, acompañado en menor medida por otros compuestos como el cariofileno y el humuleno (Sharma et al., 2014).

Diversas investigaciones han documentado la eficacia del aceite de clavo y del eugenol aislado como potentes agentes antimicrobianos frente a una amplia gama de patógenos transmitidos por alimentos y bacterias de importancia clínica. Se ha demostrado su actividad bactericida contra cepas Gram-positivas, como *Staphylococcus aureus* y *Listeria monocytogenes*, y Gram-negativas, como *Escherichia coli* y *Salmonella enterica* (Friedman et al., 2002).

3.6.3 Dopado de la formulación de vidrios bioactivos

La modificación de la composición vítrea mediante el dopaje iónico se ha consolidado como una estrategia fundamental para potenciar la bioactividad de los materiales de ingeniería de tejidos. Entre las opciones más comunes para el dopaje se encuentran iones de elementos como fluor (F), plata (Ag) o magnesio (Mg), pero se ha reportado el uso de elementos menos frecuentes como el europio (Eu) y terbio (Tb) para propiedades de luminiscencia, o metales de transición como el tantalio (Ta) y tungsteno (W) para mejorar la radiopacidad y el blindaje contra radiación (Pantulap et al., 2022).

Dentro de las opciones de dopaje, la selección de cobre (Cu) y zinc (Zn) para este trabajo se fundamenta en su capacidad sinérgica para abordar los desafíos críticos de la regeneración ósea. El cobre desempeña un rol dual indispensable: estructuralmente actúa como un modificador de la red que aumenta la estabilidad química en sistemas de borosilicatos (Schuhladen et al., 2018), mientras que biológicamente es reconocido por su potente capacidad angiogénica y osteogénica. Esta combinación permite no solo estimular la formación de nuevos vasos sanguíneos necesarios para la integración del injerto, sino también proporcionar una actividad

antibacteriana esencial para prevenir infecciones asociadas al implante (Bejarano et al., 2017)

Por su parte, el zinc es un elemento traza que refuerza la respuesta biológica mediante sus comprobados efectos osteogénicos y antiinflamatorios (Neščáková et al., 2021).

4. Objetivos

4.1. Objetivos generales

Se espera el diseñar, optimizar y probar y comparar la performance bioactiva, citocompatibilidad y poder antibacterial de sistemas de andamios generados con vidrio bioactivo con boro y dopado con Cu y Zn, y el efecto de un recubrimiento de gelatina con aceite esencial de clavo.

4.2. Objetivos específicos

El proyecto se divide en dos grandes objetivos específicos: diseñar primero, y evaluar después.

4.2.1 DISEÑO:

- Definir los parámetros morfológicos, químicos y físicos para generar andamios a partir de partículas de vidrio 13-93 con diferentes variaciones en la composición. Generarlos.
- Estudiar el procedimiento, optimizar parámetros y realizar el recubrimiento de andamios, con una de las composiciones seleccionadas, con gelatina y aceite de clavo. Seleccionar la composición adecuada.

4.2.2 EVALUACIÓN:

- Caracterizar la integridad, morfología y estructura de los andamios de composición 13-93, 13-93B2, 13-93B2 dopado con cobre y zinc.
- Caracterizar la integridad, morfología y estructura de los andamios de composición 13-93B2 dopado con cobre y zinc tras la adición de gelatina con y sin aceite de clavo.
- Caracterizar las propiedades mecánicas macroscópicas de los andamios generados.
- Estudiar la respuesta *in vitro* inorgánica de los recubrimientos mediante inmersión en solución fisiológica simulada (SBF), por técnicas ópticas, de microscopía electrónica, espectroscópicas y de difracción.
- Evaluar la performance antibacteriana de los andamios logrados y la citotoxicidad de los mismos.

5. Materiales y métodos

5.1 Materiales para la fabricación de andamios y recubrimientos

Para la producción de los andamios se utilizaron las siguientes formulaciones de vidrios bioactivos (todos los porcentajes en moles):

- 13-93 (53 SiO₂ - 6 Na₂O - 12 K₂O - 5 MgO - 20 CaO - 4 P₂O₅)
- 13-93 B2 (21 SiO₂ — 34 B₂O₃ — 22 CaO — 6 Na₂O — 8 K₂O — 7 MgO — 2 P₂O₅)
- 13-93 B2 con Cu-Zn (22 SiO₂ — 34 B₂O₃ — 17 CaO — 6 Na₂O — 8 K₂O - 7 MgO -2 P₂O₅ — 1 ZnO — 3 CuO)

Estos sistemas se fabricaron por un convenio de FAU con la Universidad de Finlandia, mediante el método de fusión y enfriamiento rápido utilizando reactivos de grado analítico (Sigma-Aldrich) y arena de cuarzo belga. Los precursores empleados incluyeron carbonato de sodio (Na₂CO₃), carbonato de potasio (K₂CO₃), óxido de magnesio (MgO), carbonato de calcio (CaCO₃), ácido bórico (H₃BO₃), hidrogenofosfato de calcio deshidratado (CaHPO₄.2H₂O), nitrato de zinc (Zn(NO₃)₂) y nitrato de cobre hidratado (Cu(NO₃)₂ . 2.5H₂O) , según corresponda en las formulaciones. La fusión se llevó a cabo en crisoles de platino diferenciando las temperaturas según la composición, donde los vidrios de borosilicato se procesaron a 1100 °C durante 3 horas y el vidrio 13-93 a 1360 °C durante 3 horas. Tras la fusión, las composiciones fueron coladas y sometidas a un recocido a 520 °C seguido de una trituración; para asegurar la homogeneidad, todos los vidrios se fundieron dos veces antes de ser finalmente triturados.

Para los recubrimientos se utilizó gelatina procedente de piel de cerdo (Sigma-Aldrich, Alemania), genipina (C₁₁H₁₄O₅) como agente entrecruzante (Glenthams, Reino Unido) y aceite de clavo de densidad 1.06 g/ml (Sigma Aldrich, Darmstadt Germany).

5.2 Acondicionamiento de los polvos de biovidrio

El proceso de acondicionamiento del material de partida comenzó con la molienda de los polvos de vidrio mediante molienda planetaria (Figura 1) (Retsch GmbH,

Alemania). En primer lugar, se procedió a la limpieza del contenedor de molienda utilizando isopropanol. El proceso se llevó a cabo en dos etapas. La primera, de molienda gruesa, con bolas de alúmina siguiendo una relación en peso bolas/polvo de 10:1, con una duración de 2 horas a 300 rpm y una etapa de molienda gruesa con bolas de zirconia siguiendo también una relación en peso de 10:1 bolas/polvo con una duración de 1 hora a 350 rpm. Se introdujeron alrededor de 20 gramos del polvo por ciclo en el contenedor junto con las bolas de molienda previamente lavadas y se interrumpió el proceso cada 30 minutos con el fin de revolver el recipiente y evitar aglomerados.



Figura 1. molienda planetaria.

Finalizada la etapa de molienda, se llevó a cabo el tamizado del material mediante un tamiz analítico (Retsch GmbH, Germany) con el objetivo de obtener un tamaño de partícula inferior o igual a 37 micrómetros. Para ello, se construyó una columna apilando los tamices de manera que las mallas de mayor apertura quedaran en la parte superior y las de menor apertura debajo, colocando una placa recolectora en la base de la columna Figura 2. El material remanente en los tamices intermedios fue sometido a una nueva etapa de molienda y tamizado hasta alcanzar el tamaño requerido. Finalmente, la limpieza de los tamices se efectuó mediante un baño ultrasónico para garantizar la eliminación de residuos.



Figura 2. Tamiz analítico.

5.2 Obtención de los andamios

La obtención de andamios de vidrio bioactivo de silicato, borato y borosilicato se llevó a cabo mediante la técnica de réplica utilizando espumas de poliuretano (45 ppi, Eurofoam Deutschland GmbH Schaumstoffe). El proceso comenzó con la conformación de las muestras utilizando un troquel cilíndrico metálico. Al golpear esta herramienta con un martillo dos o tres veces, se cortan cilindros de 6 mm de altura.

La preparación de la suspensión se adaptó según la composición química del vidrio para garantizar su estabilidad. Para los andamios de la formulación 13-93, se preparó una solución disolviendo un 0.6% en peso de alcohol polivinílico (PVA) (VWR, Darmstadt, Germany) en agua destilada a 80°C; tras enfriarse, se añadió el polvo de vidrio en una relación de peso 1:1 y se agitó durante una hora. Para los andamios de la formulación 13-93-B2 y 13-93 B2 dopado con Cu y Zn, se sustituyó el agua por etanol (Sigma-Aldrich, Steinheim Germany) y el PVA por un 0.6% en peso de etilcelulosa (Sigma-Aldrich, Steinheim Germany) debido a la baja resistencia del boro a la disolución en medio acuoso. La proporción utilizada para la suspensión fue de 5 gr de biovidrio cada 8 ml de solución de etanol y etil celulosa. Nuevamente se agitaron las suspensiones durante una hora.

Una vez lista la suspensión, se procedió a la etapa de impregnación colocando un agitador magnético en el vaso de precipitados para homogeneizar la mezcla e introduciendo tres o cuatro cilindros de espuma en su interior. Las espumas se mantuvieron sumergidas durante un minuto y, al retirarlas, se drenó el exceso de fluido y se frotaron cuidadosamente las tres caras cilíndricas con papel absorbente para liberar los poros. Posteriormente, las muestras se secaron en un horno eléctrico en atmósfera de aire a 60°C durante una hora. Este ciclo de inmersión y limpieza se repitió una segunda vez, añadiendo más suspensión si resultaba necesario, pero dejando secar las espumas en el horno durante un día completo antes de enviarlas al proceso de sinterizado.

5.2.1 Ciclo de calentamiento 13-93

El proceso de sinterizado para los andamios de 13-93 se realiza en un horno eléctrico (Figura 3), con una rampa de calentamiento que comienza a temperatura ambiente (25 °C) hasta 400 °C con una rampa de calentamiento de 0,5 °C/min. Al llegar a dicha temperatura, la misma se mantiene constante por una hora

Posteriormente, procede a una segunda rampa de calentamiento desde los 400 °C hasta los 700 °C manteniendo la misma velocidad de calentamiento. Una vez alcanzados los 700 °C, se mantiene esta temperatura durante dos horas para completar el sinterizado. Finalmente, se procede a apagar el horno para permitir que la muestra se enfríe hasta regresar a temperatura ambiente.

5.2.2 Ciclo de calentamiento 13-93 B2

El proceso de sinterizado para los andamios de 13-93 B2 comienza a temperatura ambiente (25 °C) y se ejecuta mediante una rampa de calentamiento controlada con una velocidad constante de 0,5 °C/min. En una primera instancia, la temperatura asciende hasta los 400 °C, al alcanzar este punto, la muestra permanece en una meseta isoterma durante una hora, al igual que para los vidrios de 13-93.

Finalizada esta etapa, se realiza una segunda etapa de calentamiento desde los 400 °C hasta 600 °C manteniendo la misma velocidad. Una vez logrados los 600 °C, se mantiene dicha temperatura durante dos horas para completar el sinterizado. Finalmente se apaga el horno para dejar que la muestra se enfríe hasta volver a temperatura ambiente.



Figura 3. Horno eléctrico con las muestras en enfriamiento.

5.2.3 Ciclo de calentamiento para andamios de 13-93 B2 dopados con Cu-Zn

Para el proceso de sinterizado de los vidrios de 13-93 B2 con la sustitución de parte de sus iones por Cu y Zn, se utiliza el mismo procedimiento que para los vidrios anteriores, utilizando la misma velocidad de calentamiento ($0,5\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$), pero la segunda etapa del sinterizado se hace mediante un calentamiento hasta los $580\text{ }^{\circ}\text{C}$. Una vez alcanzados los $580\text{ }^{\circ}\text{C}$, se sostiene dicha temperatura durante dos horas para efectuar el sinterizado. Finalmente, se apaga el horno para permitir que la muestra se enfríe hasta regresar a temperatura ambiente.

5.3 Recubrimiento de Andamios

Se buscó evaluar el efecto sobre las propiedades mecánicas de un recubrimiento de gelatina y de gelatina junto con aceite esencial de clavo. Se eligió gelatina proveniente de la piel de cerdo y como agente entrecruzante se utilizó genipina. El protocolo para el recubrimiento simple de gelatina se inició con la preparación de las soluciones base requeridas según bibliografía (Unalan et al., 2021): Se prepara una solución de gelatina al 5% p/v (es decir, 0,5 g de gelatina cada 10 ml de solvente) y una solución de genipina al 1% p/v (20 mg de genipina cada 2 ml de solvente). En ambos casos se utilizó como solvente una solución de etanol al 5% en agua destilada.

Se procedió a la mezcla de los componentes asegurando una relación de entrecruzamiento del 1% en peso de genipina respecto a la gelatina. Para ello, se adicionaron 0,5 ml de la solución de genipina cada 10 ml de la solución de gelatina, homogeneizando la mezcla mediante agitación magnética a 50 °C.

Por otro lado, para el recubrimiento de gelatina y aceite de clavo se preparó una solución de gelatina y genipina siguiendo el procedimiento anterior y se agregó el aceite de clavo manteniendo una proporción de 2,5 % p/p. La suspensión se mezcló por homogeneización (T 18 digital ULTRA-TURRAX®, IKA®-Werke GmbH & Co.KG) durante 3 minutos.

Finalmente, el tratamiento del andamio consistió en sumergirlo en la mezcla resultante durante un minuto, tras lo cual se retiró para dejarlo secar durante 24 horas a temperatura ambiente. Este ciclo de inmersión y secado se repitió una segunda vez bajo las mismas condiciones para completar el proceso.

5.4 Caracterización de Andamios

5.4.1 Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR)

Se realizó espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR) utilizando un espectrofotómetro (IRAffinity-1S, SHIMADZU, Japón) en modo de transmitancia, con un rango de número de onda de 400 a 4000 cm^{-1} .

5.4.2 Morfología de los andamios (SEM)

El análisis de morfología se realizó mediante microscopía electrónica de barrido (SEM) (Zeiss Auriga 4750) a diferentes aumentos.

5.4.3 Microscopía óptica y procesamiento de imágenes

El registro fotográfico de las muestras se llevó a cabo utilizando un microscopio óptico digital portátil de fabricación genérica. Este dispositivo, equipado con iluminación LED integrada ajustable, se acopló mediante interfaz USB a una computadora que sirvió como unidad de visualización y almacenamiento. Las imágenes fueron capturadas directamente en formato digital utilizando el software predeterminado del dispositivo de visualización. Mediante herramientas de procesamiento digital de imágenes, se pudo estimar el tamaño promedio de poros de cada sistema, así como el promedio del espesor de las trabéculas de los andamios generados.

La segmentación de las trabéculas es el primer paso en el análisis estructural. La segmentación de las trabéculas se realizó utilizando una adaptación del algoritmo propuesto por Pastore, Moler, & Meschino (2005) y Pastore, Moler, & Ballarin (2005). Este algoritmo consiste en aplicar Filtros Secuenciales Alternados (ASF) por reconstrucción para obtener una nueva imagen en la que las trabéculas se homogenizan, seguido de un criterio de etiquetado de regiones basado en la distancia geodésica, el cual puede evolucionar para adaptarse a la topología de los objetos en la imagen (Pastore et al., 2006; Pastore, Moler, & Ballarin, 2005) .

Después de la segmentación de las trabéculas, es posible cuantificar el área ocupada por los poros y el ancho promedio de las trabéculas. A partir de la imagen binaria resultante (con valores binarios 0 para las trabéculas y 1 para los poros), se determina el área de cobertura dividiendo el número de 1 por el tamaño total del área seleccionada.

Finalmente, para completar el análisis estructural, se calcula el ancho promedio de las trabéculas. Para ello, es necesario definir una medida que cuantifique con precisión este parámetro, manteniendo su aplicabilidad general. En este estudio, definimos el ancho promedio de las trabéculas como la media del conjunto de diámetros de las bolas máximas a lo largo del esqueleto topológico (Figura 4).

El esqueleto topológico de una forma es una versión delgada de esa forma que permanece equidistante de sus fronteras. El esqueleto generalmente enfatiza las propiedades geométricas y topológicas de la forma, tales como su conectividad, topología, longitud, dirección y ancho. Esta construcción resulta en una estructura de un píxel de ancho que captura la forma esencial del objeto (Figura 5).

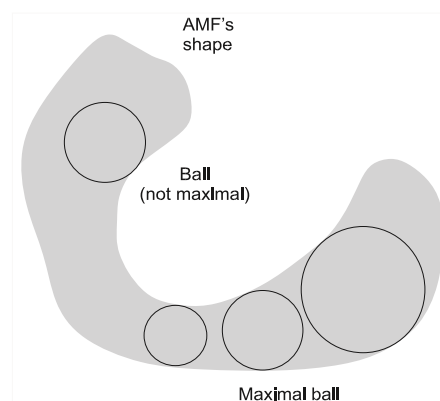


Figura 4. Diagrama conceptual de bolas máximas.

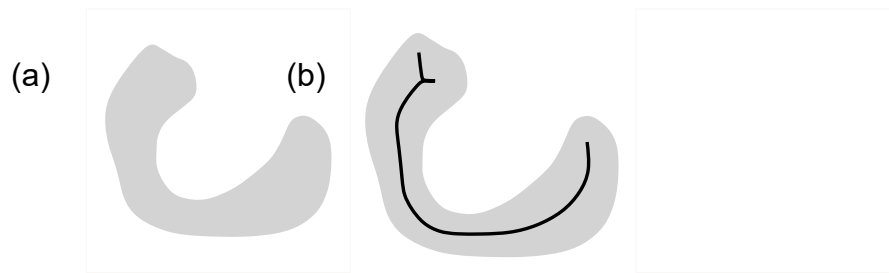


Figura 5. (a) Imagen artificial, (b) Esqueleto de una imagen artificial.

5.4.4 Ensayos Mecánicos

Se realizaron ensayos de compresión controlados a deformación constante utilizando una máquina instron (Emic 23-50, Figura 6), con una velocidad de la travesa de 0,5 mm/min, a 22°C y 70% de humedad. Los ensayos se realizaron por lo menos a 10 muestras, con el objetivo de evaluar la resistencia y elasticidad de los andamios de 13-93 B2 Cu-Zn, con y sin gelatina. La altura de las muestras varió entre los 1,45 y 2 mm.



Figura 6. Máquina Universal para ensayos mecánicos Instron Emic 23-50.

Para la estimación del módulo elástico de los andamios estudiados, se utilizó una aproximación hasta una carga considerada la primera de ruptura. Esta porción lineal permitió estimar la pendiente de la recta, y así el módulo elástico aparente de los diferentes andamios. Se muestra un ejemplo de la aproximación lineal en la Figura 7.

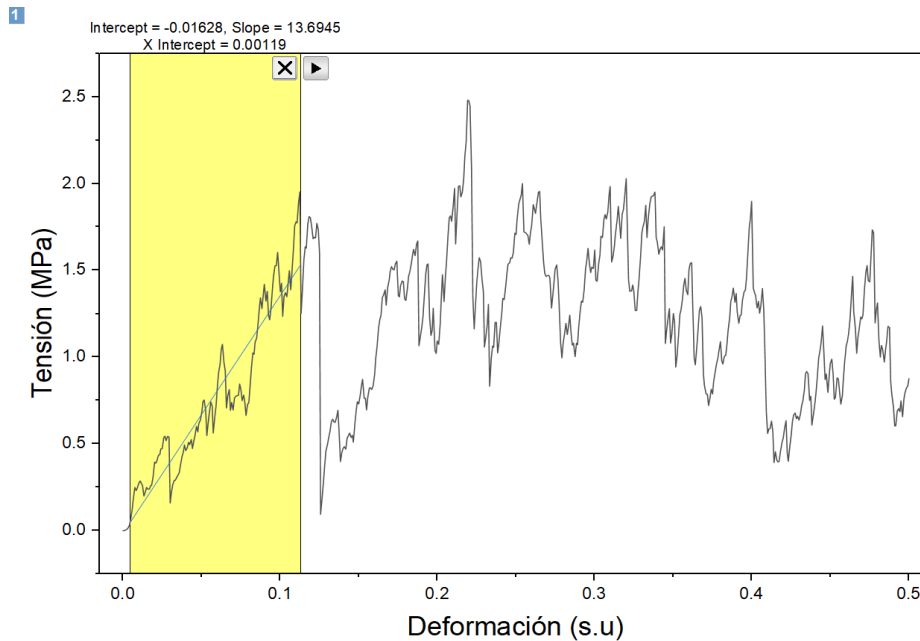


Figura 7. Aproximación lineal en un gráfico de tensión deformación.

5.5 Test de bioactividad *in vitro*

La capacidad de un material para unirse al hueso vivo se evalúa frecuentemente examinando la formación de apatita sobre su superficie en un medio fisiológico controlado, siguiendo la norma ISO 23317:2025 para materiales biocerámicos. Se ha propuesto que el requisito esencial para que un material artificial se una químicamente al hueso es la formación de una capa de apatita biológicamente activa en su superficie al implantarse. Este fenómeno de mineralización *in vivo* puede ser reproducido *in vitro* en el laboratorio utilizando una Solución Fisiológica Simulada (SBF, por sus siglas en inglés), una solución con concentraciones iónicas (Na^+ , K^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} , etc.) casi idénticas a las del plasma sanguíneo humano (Kokubo & Takadama, 2006). Sin embargo, las pruebas *in vitro* suelen ser insuficientes para comprobar la bioactividad de los implantes; deben hacerse luego pruebas *in vivo*.

5.5.1 Preparación de solución fisiológica simulada (SBF)

Los andamios de las tres formulaciones (13-93, 13-93 B2 y 13-93 B2 Cu-Zn) se estudiaron para evaluar su capacidad de formar hidroxiapatita en SBF con concentraciones iónicas aproximadamente iguales a las del plasma sanguíneo humano.

El SBF se preparó siguiendo el método de Kokubo (Kokubo & Takadama, 2006). Los reactivos utilizados y sus cantidades correspondientes se detallan en la tabla 1

Tabla 1. Orden y cantidad de reactivos necesarios para producir 1000 ml de SBF.

nr	Componente	Pureza [%]	Cantidad para preparar 1L de SBF [g]
1	Cloruro de sodio (NaCl)	99.5	8.0756
2	Bicarbonato de sodio (NaHCO ₃)	99.5	0.3532
3	Cloruro de potasio (KCl)	99.5	0.2250
4	Fosfato de hidrógeno de dipotasio trihidratado (K ₂ HPO ₄ ·3H ₂ O)	99.0	0.2310
5	Cloruro de magnesio hexahidratado (MgCl ₂ ·6H ₂ O)	98.0	0.3033
6	1M (mol/l) Ácido clorhídrico, 1M-HCl	-	39 ml
7	Cloruro de calcio (CaCl ₂)	95.0	0.3638
8	Sulfato de sodio (Na ₂ SO ₄)	99.0	0.0716
9	Tris-hidroximetil aminometano: ((HOCH ₂) ₃ CNH ₂) (Tris)	99.0	6.0568
10	1M (mol/l) Ácido clorhídrico, 1M-HCl	-	5 - 10 ml

El SBF es prepara en un recipiente con 700 ml de agua destilada y se calienta mediante baño María. Se introduce una termocupla en el contenedor y un medidor de pH en el recipiente. La solución debe mantenerse bajo agitación continua mediante un mezclador magnético y a $36,5 \pm 1.5^{\circ}\text{C}$. Los componentes se deben introducir en el orden expuesto en la tabla. Al añadir el noveno componente (Tris) debe controlarse

el pH: este debe ser menor a 7.45. Si el valor es mayor se agrega HCl hasta que el pH descienda a 7.4 y luego se añade más Tris. Luego se deben agregar 300 ml extras para completar los 1000 ml. El SBF se puede almacenar a 5-10°C y utilizarla dentro de los 30 días para prevenir la formación de bacterias.

5.5.2 Ensayo de inmersión y pérdida de peso

Para verificar la formación de hidroxiapatita se sumergieron los andamios en el fluido corporal simulado. El volumen de SBF utilizado en cada muestra se determinó mediante la relación 1.5 mg de andamio/ml de SBF. Para el proceso de incubación, se pesó cada andamio se los coloco en tubos Falcon. De acuerdo con el peso se añadió el volumen correspondiente de SBF. Los tubos se colocaron luego en un incubador (IKA KS 3000 I control) y se mantuvieron a una temperatura constante de 37°C. Las muestras se incubaron durante duraciones variables de 3, 7 y 14 y el fluido se renovó cada tres días.

Para estudiar la degradación y/o deposición de compuestos ricos en fosfatos de calcio en los andamios, se procedió a calcular la variación en el peso de los andamios. Tras los intervalos mencionados se retiró el líquido del recipiente, se secó el andamio y se lo pesó. El cálculo de pérdida/diferencia de peso se realizó con la siguiente fórmula.

$$\%P\acute{e}rdida\ de\ peso = \frac{W_i - W_f}{W_i} * 100\%$$

Donde W_i es el peso inicial y W_f el peso final.

5.6 Actividad antibacteriana

Para evaluar las propiedades antibacterianas de los andamios recubiertos con una capa de gelatina con aceite de clavo y compararlos con los andamios sin el compuesto, se realizó un ensayo de proliferación bacteriana *in vitro* utilizando *S. aureus* como cepa. En este ensayo, los andamios de la formulación 13-93 B2 dopados con cobre y zinc, sin recubrimiento, con recubrimiento simple de gelatina y con recubrimiento de gelatina y aceite de clavo fueron puestos en contacto directo con la suspensión bacteriana. Para la preparación de dicha suspensión, la cepa de *S. aureus* fue cultivada en 10 mL de medio de cultivo lisogénico (LB) a 37 °C durante 24 horas.

En paralelo, los distintos tipos de andamios fueron esterilizados mediante irradiación con luz ultravioleta durante 1 hora.

La actividad antibacteriana de los andamios se evaluó cuantitativamente a partir de la absorbancia de la luz generada por la turbidez de la suspensión bacteriana. En primer lugar, la suspensión de bacterias se diluyó con medio LB hasta alcanzar un valor de densidad óptica (DO) de 0,015 a 600 nm (medido con Thermo Scientific™ GENESYS 30™, Alemania), de acuerdo con los métodos estándar de medición de turbidez bacteriana. Luego, los andamios se incubaron con 20 µL de la suspensión bacteriana a 37 °C durante 3, 6, 24 y 48 horas. La suspensión bacteriana sin andamios se utilizó como control en este estudio. En cada punto temporal, se retiraron 100 µL de cada muestra y se transfirieron a una placa de cultivo de 96 pocillos. La DO a 600 nm se midió utilizando un lector de microplacas (PHOmo, Anthos Mikrosysteme GmbH, Alemania). La viabilidad bacteriana relativa se calculó utilizando la siguiente ecuación:

$$\text{Viabilidad bacteriana relativa (\%)} = \frac{OD_{\text{muestra}}}{OD_{\text{control}}} * 100\%$$

5.7 Citotoxicidad de Células MC3T3-E1

La evaluación de citotoxicidad de los andamios de la formulación 13-93 B2 dopados con cobre y zinc, sin recubrimiento, con recubrimiento simple de gelatina y con recubrimiento de gelatina y aceite de clavo, se realizó utilizando el kit de ensayo de proliferación celular WST-8 (Sigma Aldrich, Alemania) mediante el método de contacto indirecto.

Para generar la solución de extracto, se esterilizaron 100 mg de andamios molidos en polvo mediante radiación UV durante 1 hora. Posteriormente, el andamiaje se sumergió en 10 ml de medio α-MEM durante 24 horas a 37 °C para producir una solución extracto con una concentración de 10 mg/ml. Luego de la incubación de 24 horas, la solución extracto de 10 mg/ml se diluyó con medio α-MEM para obtener soluciones extracto con concentraciones de 1 y 0,1 mg/ml.

Para los experimentos de citotoxicidad, se utilizó medio esencial mínimo (α-MEM) suplementado con 10 % (v/v) de suero fetal bovino (FBS, F7524), 1 % (v/v) de penicilina-estreptomicina (PS, que contiene 10.000 unidades/ml de penicilina y 10.000 µg/ml de estreptomicina) y 1 % (v/v) de L-glutamina. La línea celular de osteoblastos

MC3T3-E1 se cultivó en medio α -MEM y se incubó a 37 °C en una atmósfera humidificada con 5 % de CO₂ en aire. Las células se sembraron en placas de 24 pocillos a una densidad de 100.000 células por pocillo y se incubaron durante 24 horas. Tras este período, el medio α -MEM en cada pocillo se reemplazó por 1 ml de solución extracto a distintas concentraciones (10, 1 y 0,1 mg/ml), y se incubó durante 48 horas adicionales.

Luego de la incubación de 48 horas, la viabilidad celular se evaluó utilizando el ensayo de viabilidad celular WST-8 (1 % v/v). Se retiraron los extractos y las células se incubaron con WST-8 durante 3 horas. El grupo control consistió en células MC3T3-E1 tratadas con medio α -MEM, mientras que el grupo de referencia incluyó medio α -MEM con WST-8. Finalmente, se midió la densidad óptica a 450 nm utilizando un lector de microplacas. El porcentaje de viabilidad celular se calculó mediante la siguiente ecuación:

$$Viabilidad\ celular\ (\%) = \frac{Absorción_{muestra} - Absorción_{blanco}}{Absorción_{ref} - Absorción_{blanco}} * 100\%$$

6. Resultados y discusión

6.1 Obtención de Andamios por el método de réplica

Se obtuvieron los andamios de las tres formulaciones mencionadas: 13-93, 13-93 B2 y 13-93 B2 dopados con Cu y Zn. En la figura 6. puede verse la apariencia final a partir de microscopía óptica.

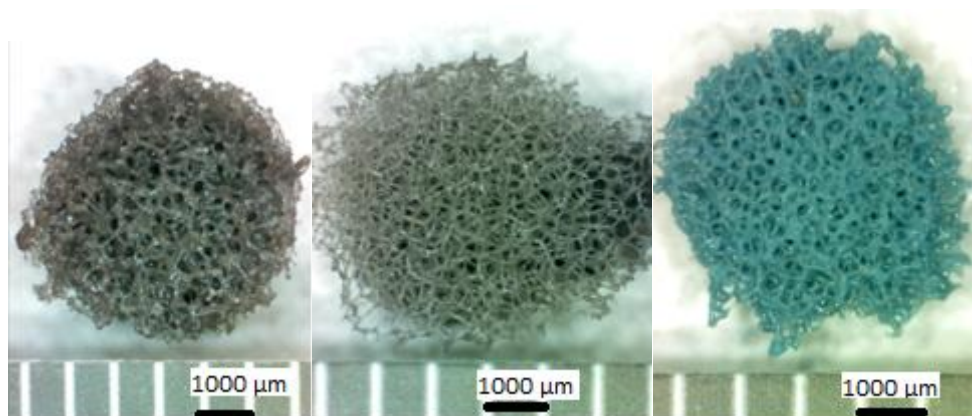


Figura 9. Fotografías realizadas con microscopía óptica de los tres tipos de andamios.

Como puede verse, los tres tipos de andamios muestran la estructura trabecular que imita la estructura de la espuma de poliuretano. La formulación dopada con Cu-Zn tiene una tonalidad azul debido a la presencia del cobre.

6.2 Caracterización composicional y morfológica

6.2.1 Espectroscopía infrarroja

Se realizaron análisis por espectroscopía infrarroja para corroborar la composición de los andamios.

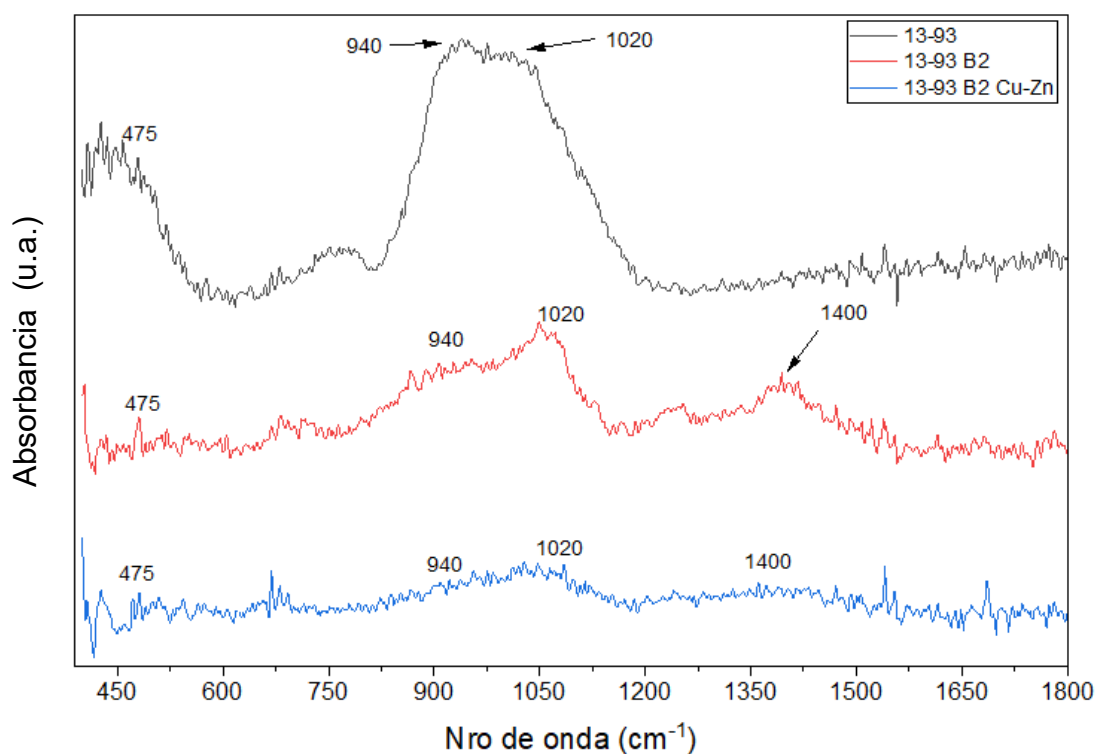


Figura 10. Gráfico de espectroscopía infrarroja de los tres tipos de andamios.

Los picos presentes en el espectro (Figura 10) indican la existencia de modos vibracionales de los enlaces moleculares; de ahí que su presencia permita comprobar la composición química de los andamios (Ismail et al., 1997)

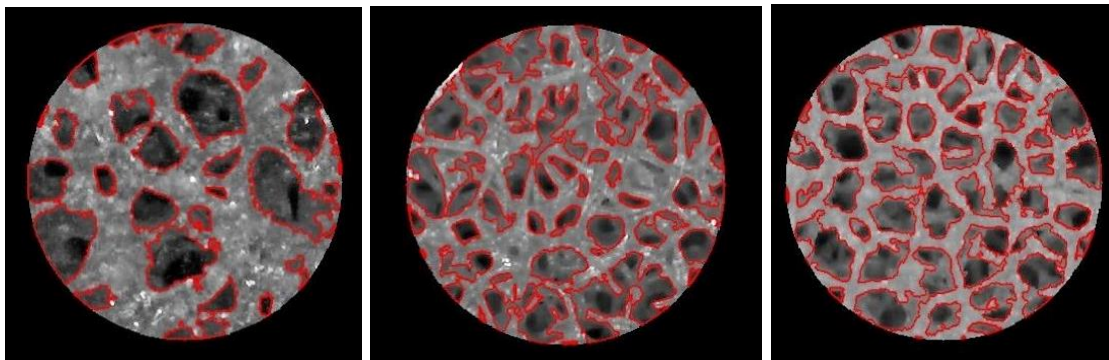
Los espectros FTIR revelan una banda de absorción en la región de 475 cm^{-1} atribuida a la flexión del enlace Si-O-Si, lo cual confirma la presencia de sílice en la estructura más notable en el espectro de la formulación 13-93 que en el de la 13-93 B2 y 13-93 B2 dopada con Cu y Zn debido a la sustitución parcial de la sílice de la red

por boratos. En el rango de mayores frecuencias, el espectro del vidrio base se caracteriza por una resonancia predominante en 940 cm^{-1} y en 1020 cm^{-1} correspondientes a la vibración de estiramiento del Si unido a oxígenos no puentes. En las muestras modificadas se observa un desplazamiento asociado a modos de vibración adicionales de la red Si-O, evidenciando una clara reorganización en la conectividad del silicato (Q. Fu et al., 2007).

En la muestra de la formulación, 13-93 la región alrededor de 1400 cm^{-1} es plana. Al introducir boro en la muestra 13-93 B2 (espectro rojo), el cambio más significativo es la aparición de una nueva banda ancha centrada en $\sim 1400\text{ cm}^{-1}$. Esta banda, ausente en la muestra original, se atribuye a la vibración de tensión de los enlaces B-O en grupos borato (BO_3), confirmando la exitosa incorporación del boro a la red del vidrio (Gautam et al., 2012).

6.2.2 Porosidad y espesor de trabéculas

Mediante técnicas avanzadas de procesamiento de imágenes, fue posible estimar el porcentaje de porosidad de los diferentes andamios generados.



13-93: 37.44 +/- 4.6 % **13-93 B2:** 34 +/- 8.2% **13-93 B2 Cu-Zn:** 49 +/- 4.7%

Figura 11. Procesamiento de imágenes a mismo aumento de los tres andamios base estudiados definiendo el borde de las trabéculas. Bajo cada imagen, el porcentaje de porosidad obtenido.

Puede notarse (datos en la Figura 11) que hay un aumento en la porosidad de los andamios cuando las estructuras son dopadas con Cu-Zn. Esto podría estar relacionado con el sinterizado de los andamios y la capacidad de reorganización de los iones que componen la red vítrea con la presencia de Cu y Zn. También podría deberse a una mayor contracción de la estructura después del sinterizado.

La comparación entre los espesores de trabéculas encontrados en las estructuras de vidrio 13-93, 13-93 B2 y 13-93 B2 Cu-Zn puede verse en la Figura 12. Se observa una disminución en el espesor de trabéculas cuando el vidrio está dopado con boro (250 micrones vs 170 micrones), y este espesor prácticamente no varía si hay sustitución con Cu y Zn en la estructura. Esto podría deberse a la capacidad de ordenamiento de las redes trigonales planas del BO^3 , en relación con los tetraedros de silicatos de los vidrios sin boro, lo que se traduciría en estructuras más compactas luego del sinterizado.

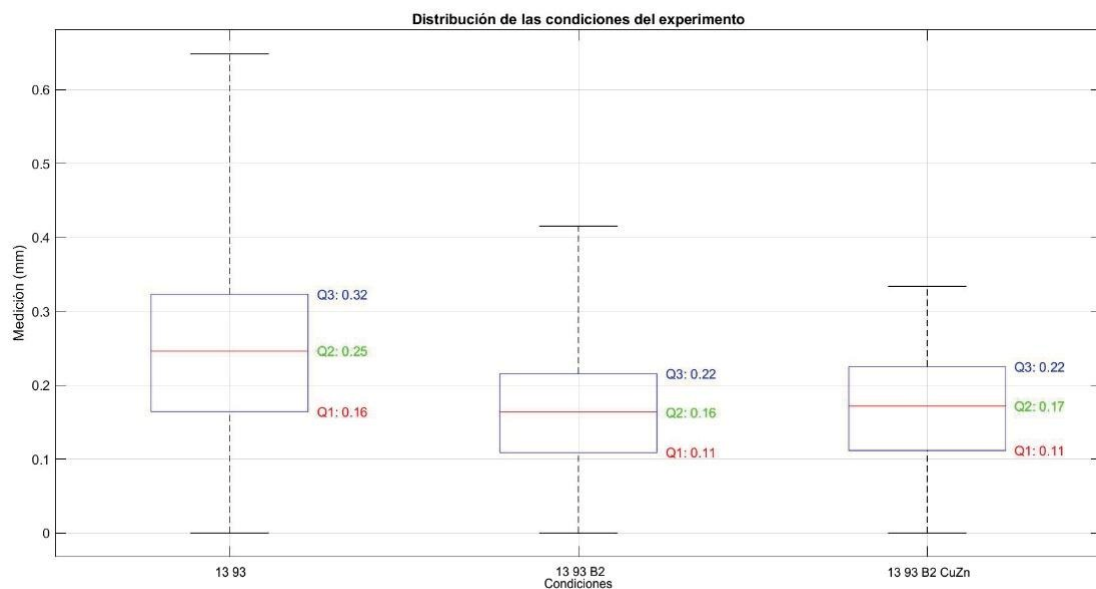


Figura 12. Tamaño medio de espesor de trabéculas y su desviación para las tres composiciones de andamios estudiadas.

Con respecto a las estructuras de 13-93 B2 Cu-Zn, sin y con gelatina, y con el agregado de extracto de clavo, la porosidad de los andamios con Cu-Zn no se modifica demasiado con el agregado de gelatina (45 +/- 6.7%), aunque aumenta levemente cuando se agrega esencia de clavo en el recubrimiento (52.1 +/- 6.5). Esto podría estar relacionado a un mayor entrecruzamiento o “relleno” de la estructura plástica de la gelatina en la superficie del andamio.

Y en relación con el tamaño de las trabéculas, los valores pueden observarse en la Figura 13, y no se observan cambios significativos, lo que está relacionado con una capa muy delgada de gelatina y esencia de clavo, que puede a su vez estar cubriendo fisuras o poros de las estructuras trabeculares. Cabe destacarse que se

lograron estructuras más uniformes (menores dispersiones) con los andamios de 13-93 B2 Cu-Zn con y sin recubrimiento, que con los andamios sistetizados con los vidrios 13-93 y 13-93 B2.

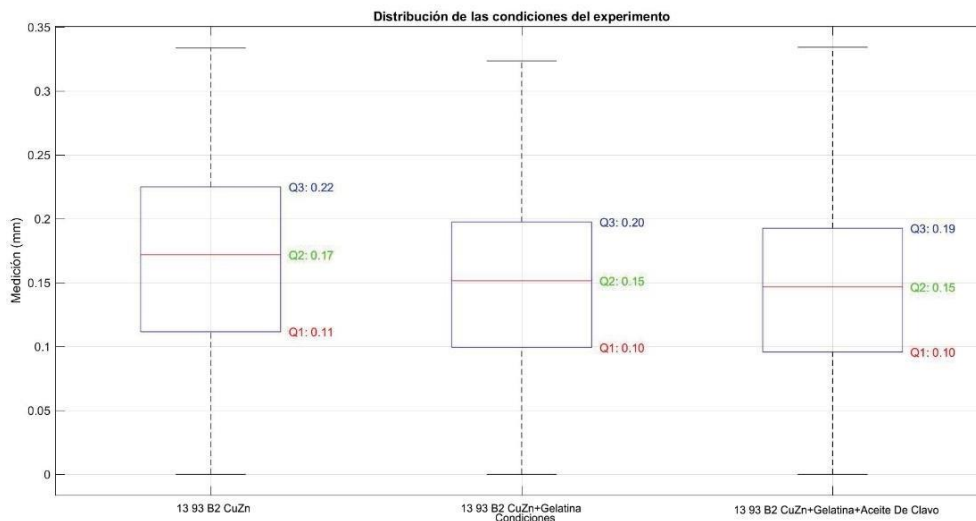


Figura 13. Tamaño medio de espesor de trabéculas y su desviación para los andamios 13-93 B2 Cu-Zn con y sin recubrimiento de gelatina y gelatina/clavo.

6.3 Bioactividad *in vitro*

6.3.1 Cambio de peso

Los tres tipos de muestras de andamios sintetizadas sin el recubrimiento de gelatina se sumergieron en fluido líquido simulado durante 3, 7 y 14 días tras lo cual se calculó el cambio de peso debido a la acción conjunta de la degradación (pérdida de peso) y la formación de hidroxiapatita.

En la Figura 14 puede apreciarse la tendencia esperada. Los andamios 13-93 B2 presentaron una pérdida de peso notablemente mayor, debido a la naturaleza del óxido de boro con una geometría triangular plana en la estructura del vidrio, pues este se coordina solo con tres oxígenos frente al óxido de silicio coordinado con cuatro. La consecuente red vítrea es menos densa en enlaces y por ende más fácil de degradar. Además, la sustitución por boro elimina parcialmente la barrera de sílice (Fu et al., 2009 ; Schuhladden et al., 2021), llevando a una rápida precipitación de hidroxiapatita. Por otro lado, la degradación en los andamios dopados con Cu-Zn resultó ser mayor que en los andamios 13-93 B2 sin dopar. Esto contradice lo encontrado en bibliografía; la presencia de Cu y Zn retrasa la liberación de SiO₂ presente en la

formulación 13-93 B2 parcialmente sustituida (Schuladen, 2018). Por último, de la casi inexistente variación del peso en los andamios 13-93 se concluye que la pérdida de peso por degradación se compensa enteramente por el aumento de peso al formarse la hidroxiapatita. Si bien se esperaba que la reactividad del 13-93 fuese menor que la de las formulaciones con boro (13-93 B2), los resultados de este trabajo difieren de otros reportes. Específicamente reportaron una pérdida de peso cercana al 20% para andamios de 13-93 tras 14 días (Schuhladden, 2021). Esta aparente discrepancia se atribuye a las condiciones experimentales del ensayo. Para las muestras 13-93, que poseían una masa mayor, el volumen de SBF (limitado a 50 ml por la capacidad del recipiente) resultó en una baja relación de fluido/área superficial. Se postula que este volumen de SBF, operando "en defecto", se saturó rápidamente con los iones liberados por el vidrio. Esta rápida saturación iónica habría provocado un doble efecto: habría frenado la disolución neta del vidrio (evitando la pérdida de peso), ya que el medio alcanzó un equilibrio, y al mismo tiempo habría favorecido la precipitación de hidroxiapatita (generando ganancia de peso) al existir una alta concentración local de iones Ca^{2+} , fosfatos y silicatos. Por lo tanto, el cambio de peso neto (casi nulo) observado en este estudio no indica una falta de reactividad, sino que representa el equilibrio entre una disolución lenta y una precipitación acelerada por las condiciones de saturación del medio.

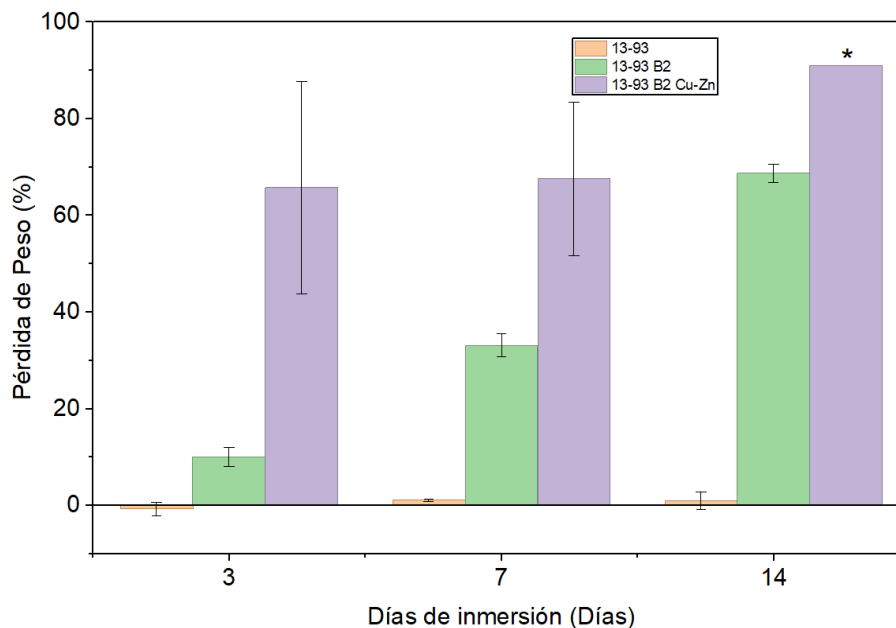


Figura 14. Gráfico de pérdida de peso de los tres tipos de andamios luego de diferentes tiempos de inmersión. (*) Valor obtenido de una sola muestra

Por otro lado, los andamios 13-93 B2 Cu-Zn presentan la pérdida de peso más rápida y significativa. Esto indica que los iones de cobre y zinc aceleran la degradación del vidrio. Esto podría deberse a que los iones de cobre se conectan preferentemente al Si favoreciendo la ruptura de los enlaces de la red (Schuladen, 2018)

6.3.2 Caracterización Morfológica (SEM)

Luego de la inmersión de los andamios en SBF, se buscó comprobar la formación de hidroxiapatita en la superficie de los andamios y sus características morfológicas a través de microscopía electrónica de barrido. Se tomaron muestras para cada tiempo de inmersión y para cada tipo de andamio.

En la Figura 15 se muestra la superficie de los andamios de la formulación 13-93 tras la inmersión en SBF durante 3 días a diferentes aumentos. Puede observarse en las imágenes superiores la formación de una capa de pequeños aglomerados de lo que podría ser hidroxiapatita, debido a la apariencia de coliflor documentada en otros estudios (Li et al., 2014). Sin embargo, se requerirían mayores aumentos para comprobar la estructura en agujas que presentan dichos aglomerados en su superficie.

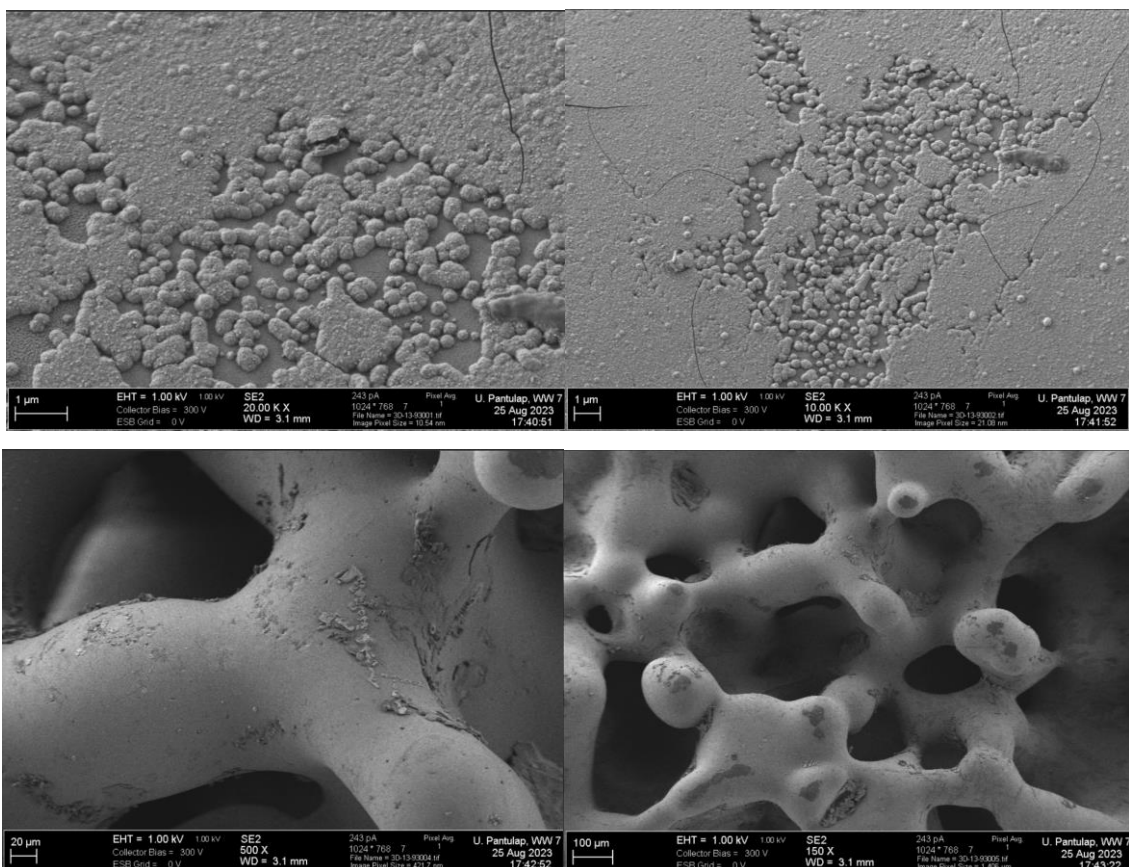


Figura 15. Micrografías SEM a diferentes magnificaciones, de la superficie de un andamio 13-93 a 3 días de inmersión en SBF.

A 7 días de inmersión, ya puede observarse claramente la presencia de HA cristalina en la superficie del andamio. En las imágenes superiores se aprecian las estructuras de coliflor reportadas en bibliografía (Li et al., 2014). Además, en las imágenes inferiores se comprueba la presencia de grietas en las trabéculas del andamio que actuarían como concentradores de tensión ante una sollicitación mecánica; en detrimento de la tenacidad y resistencia de la estructura.

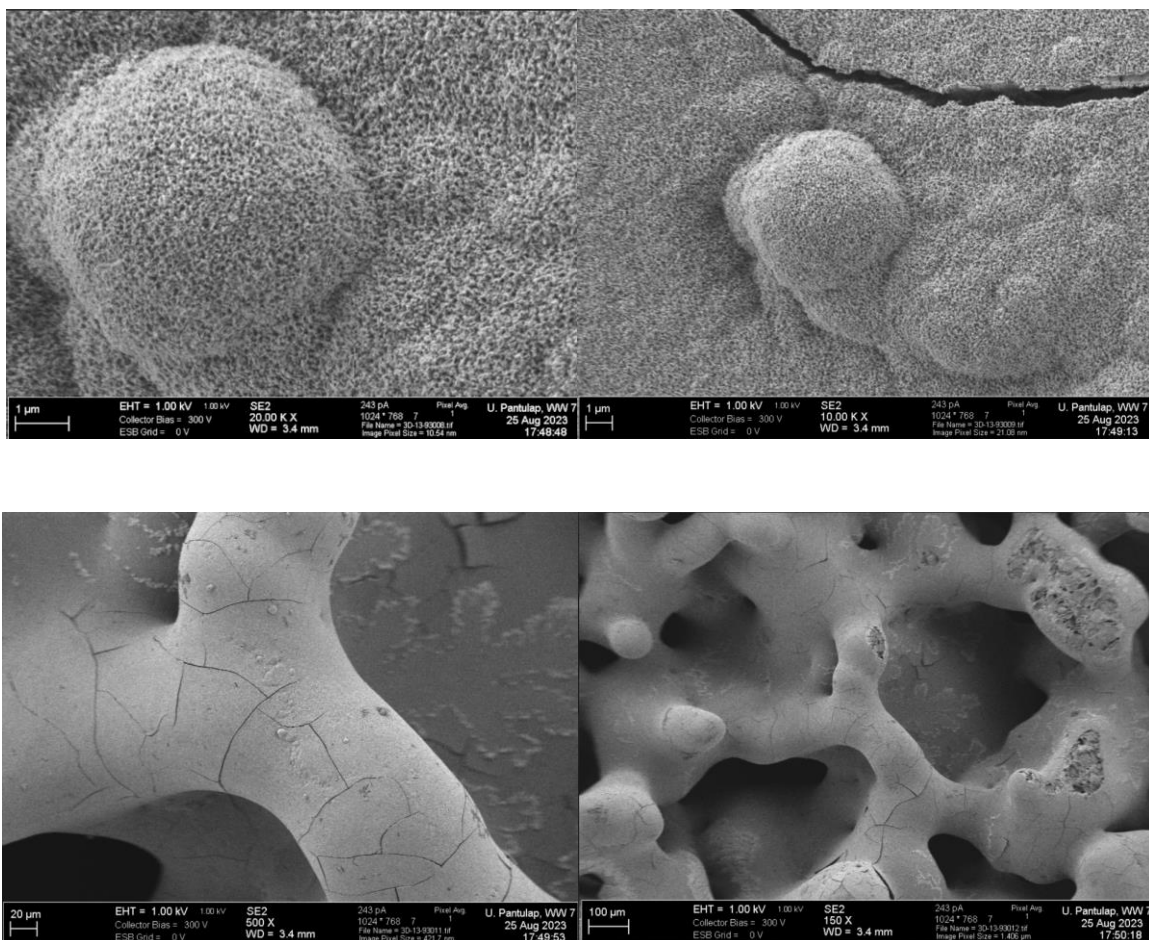


Figura 16. Micrografías SEM a diferentes magnificaciones de la superficie de un andamio 13-93 a 7 días de inmersión en SBF.

La Figura 17 presenta la micrografía SEM de la superficie del andamio de biovidrio 13-93 tras 14 días de inmersión en SBF. Sobre la capa de apatita de fondo

se aprecia la nucleación y crecimiento de una segunda fase con una morfología en bloque, romboédrica, claramente distinta.

Esta segunda fase podría ser Carbonato de Calcio (CaCO_3), probablemente en forma de calcita. Este fenómeno podría explicarse como una precipitación secundaria secuencial, que ocurre una vez que la reacción de formación de apatita ha avanzado. La formación de la capa de hidroxiapatita (HA) se debe al intercambio de iones entre el biovidrio y el medio, que eleva el pH local y sobresatura la solución en calcio y fosfato. Sin embargo, el SBF es una solución compleja diseñada para imitar el plasma humano que contiene una alta concentración de iones bicarbonato (HCO_3^-), por lo que el fenómeno propuesto sería posible.

El trabajo de Cüneyt Tas (2000) respalda esta hipótesis. En su estudio, el autor utilizó una formulación de SBF modificada precisamente para igualar la concentración de bicarbonato del plasma humano, fijándola en 27.0 mM. Este bicarbonato se introduce mediante el reactivo NaHCO_3 . El autor observó que, en sus experimentos de precipitación, se formaba CaCO_3 como fase secundaria con una estructura similar a la de los precipitados ya mencionados. En este artículo, se explica que esta fase se origina por la combinación del exceso de iones Ca^{+2} (disponibles en el medio) con los iones CO_3^{2-} provenientes del bicarbonato del SBF alterado (Cüneyt Tas, 2000).



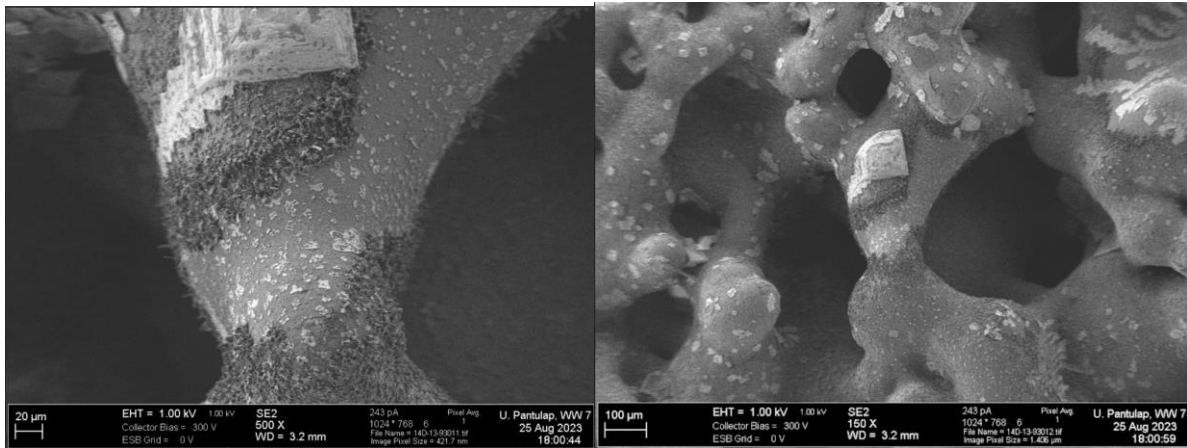
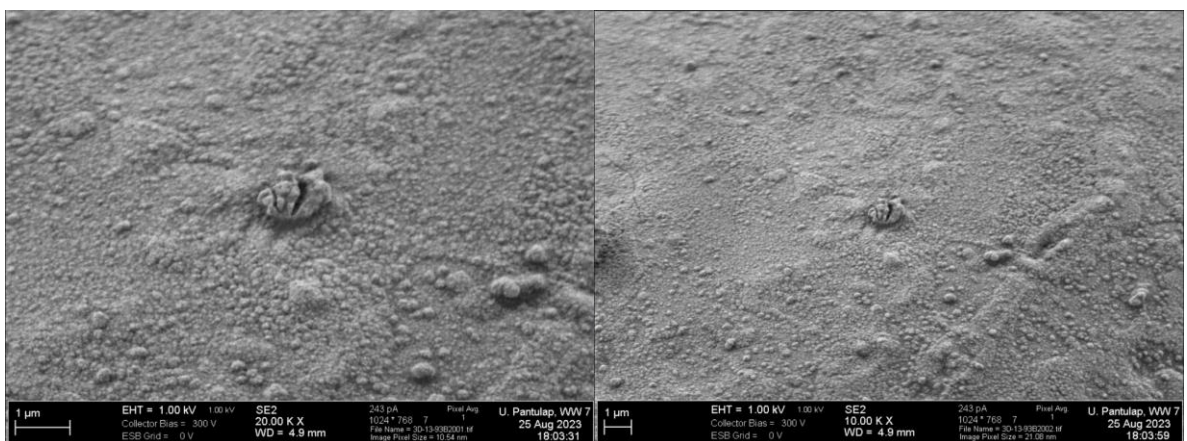


Figura 17. Micrografías SEM a diferentes magnificaciones, de la superficie de un andamio 13-93 a 14 días de inmersión en SBF.

En la Figura 18 se ven las imágenes de microscopía electrónica de barrido SEM para los andamios 13-93 B2. Comparado con la Figura 19, donde están los andamios de 13-93 a 7 días de inmersión, en los de 3 días puede apreciarse una mayor formación de HA en los que contienen boro. Esto se fundamenta en la presencia de óxido de boro en la formulación donde la red de borato es químicamente menos estable y no forma una barrera de gel de sílice en la superficie al disolverse/degradarse. En su lugar, el vidrio se disuelve rápidamente, liberando una gran cantidad de iones de calcio Ca^{2+} y elevando el pH local. Esta alta sobresaturación iónica fuerza la precipitación directa y rápida de la hidroxiapatita sobre la superficie del vidrio (Schuhladen et al., 2021)



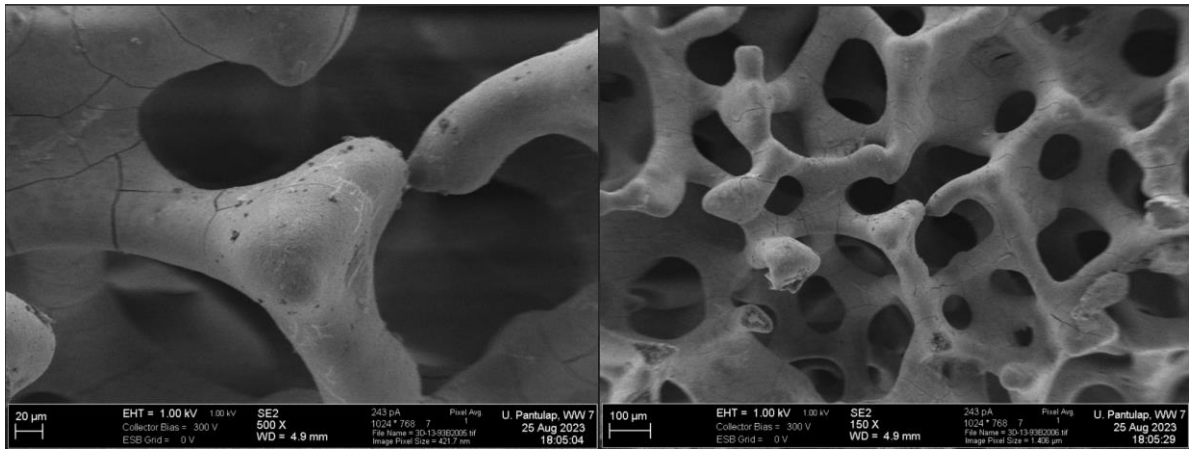


Figura 18. Micrografías SEM a diferentes magnificaciones de la superficie de un andamio 13-93 B2 a 3 días de inmersión.

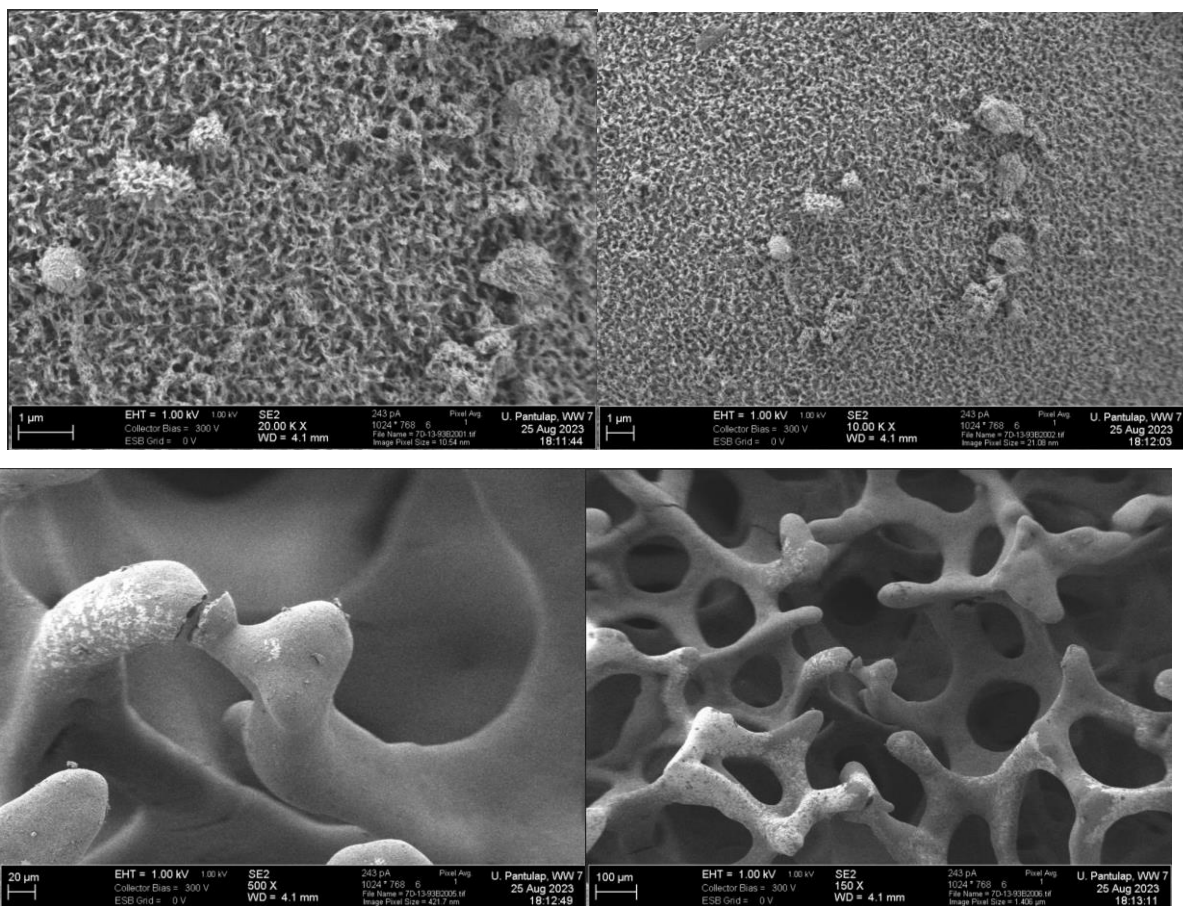


Figura 19. Micrografías SEM a diferentes magnificaciones de la superficie de un andamio 13-93 B2 a 7 días de inmersión en SBF.

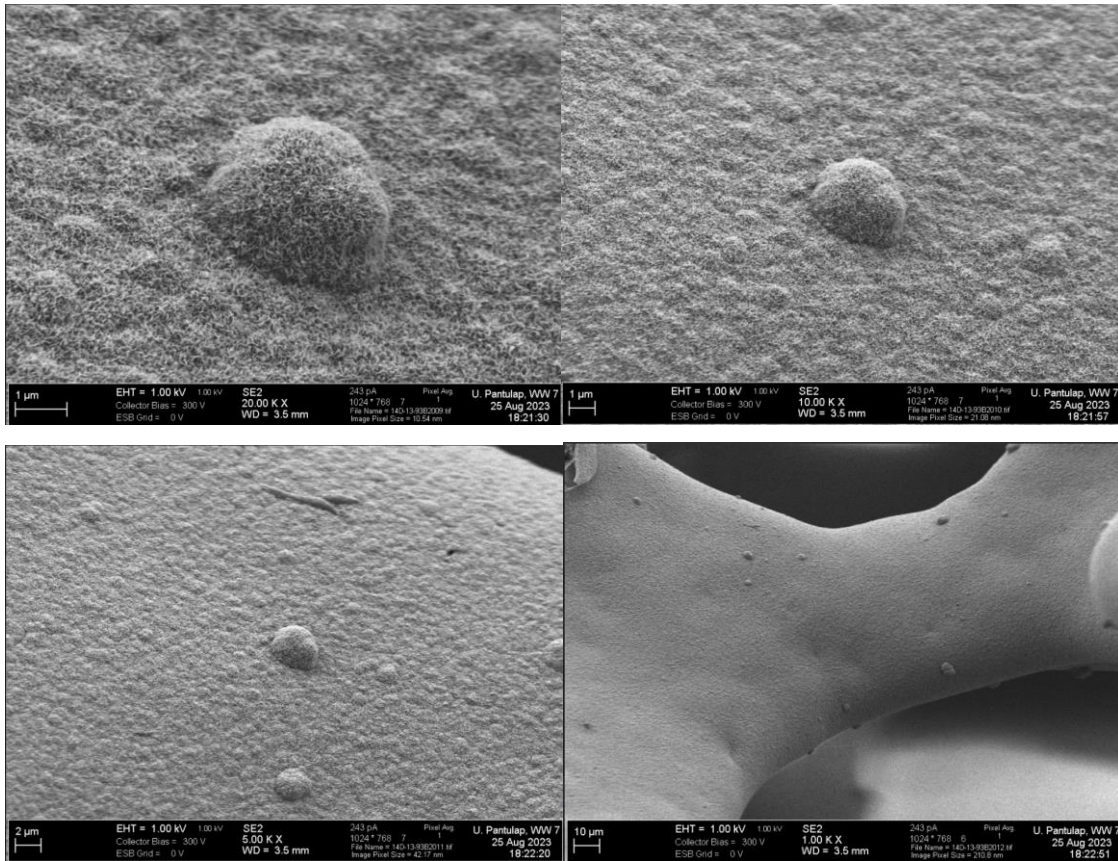


Figura 20. Micrografías SEM a diferentes magnificaciones de la superficie de un andamio 13-93 B2 a 14 días de inmersión en SBF.

Por último, el proceso se repitió con los andamios de la formulación 13-93 B2 dopados con Cu-Zn. En las Figuras 21 a 23 se muestran las imágenes SEM para los tiempos evaluados (3, 7 y 14 días de inmersión en SBF) para estos andamios. La estructura de trabéculas se ve más rugosa en todos los casos, como puede verse en más detalle en la Figura 23. Esto podría atribuirse a imperfecciones en el método de obtención de andamios y en el proceso de sinterizado. Puede observarse la presencia de HA en estructuras de coliflor globulares a 7 y 14 días de inmersión. Esto podría deberse a la gran rugosidad del andamio que brinda múltiples sitios de nucleación aunado con la presencia del Cu unido a los átomos de silicio que facilita la liberación de este último y disminuye el efecto de la capa de hidróxido de silicio retardante en la difusión de iones.

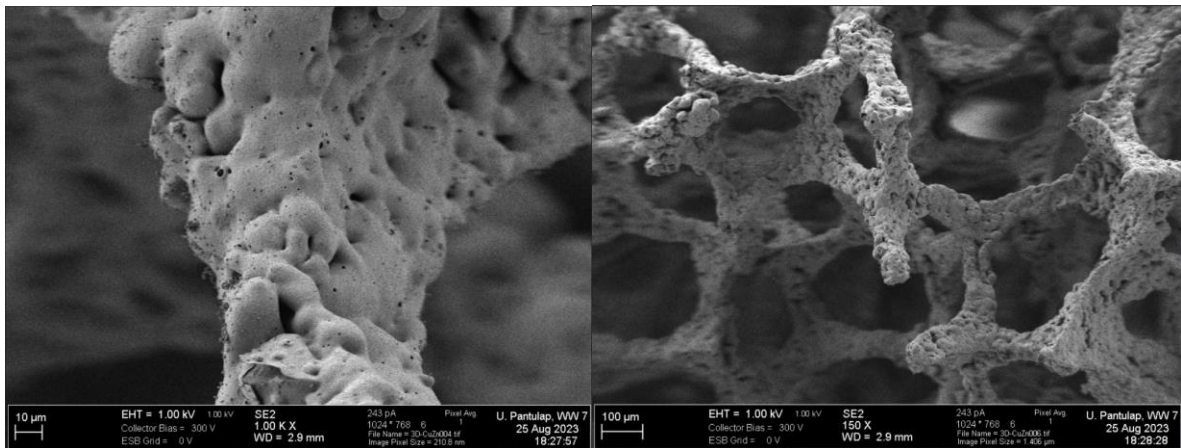
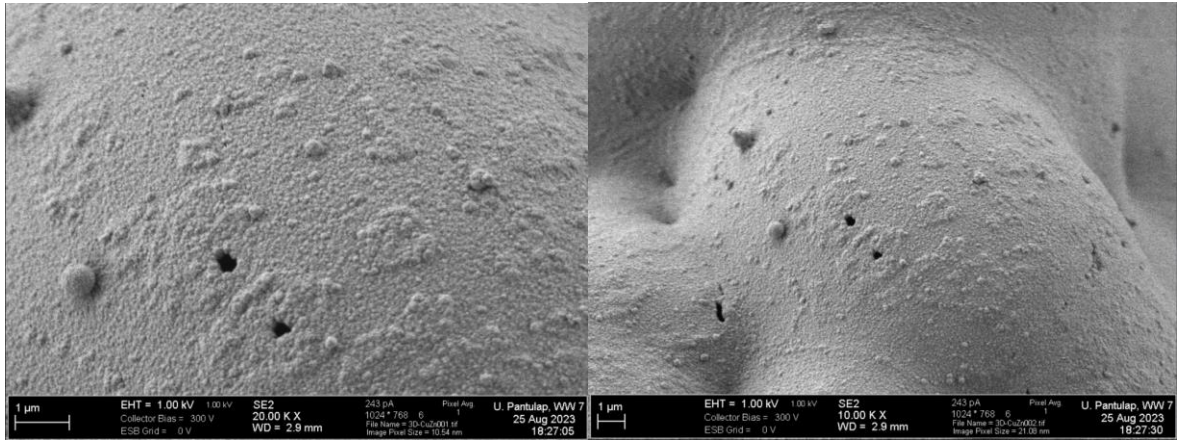
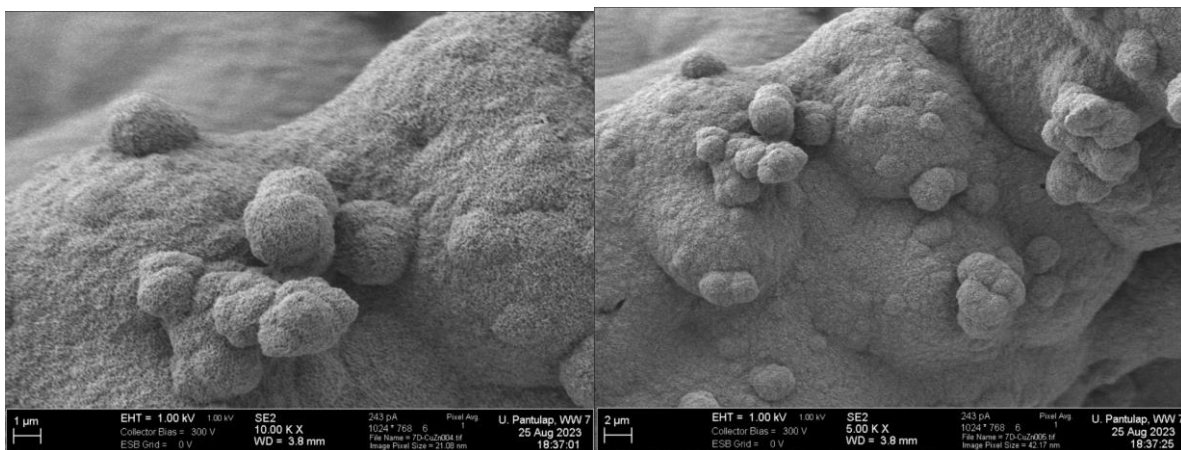


Figura 21. Micrografía SEM a diferentes magnificaciones de la superficie de un andamio 13-93 B2 dopado con Cu-Zn a 3 días de inmersión en SBF.



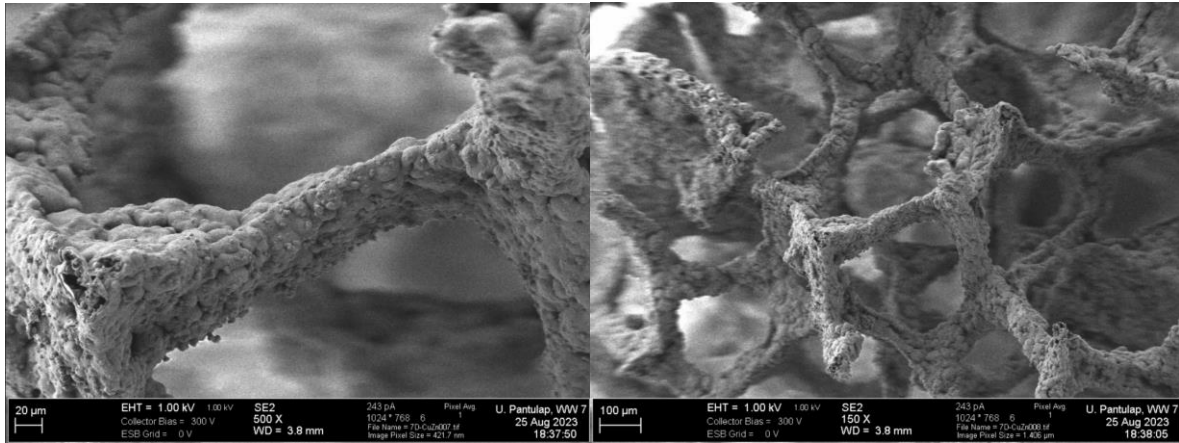


Figura 22. Micrografías SEM a diferentes magnificaciones de la superficie de un andamio 13-93 B2 dopado con Cu-Zn a 7 días de inmersión en SBF.

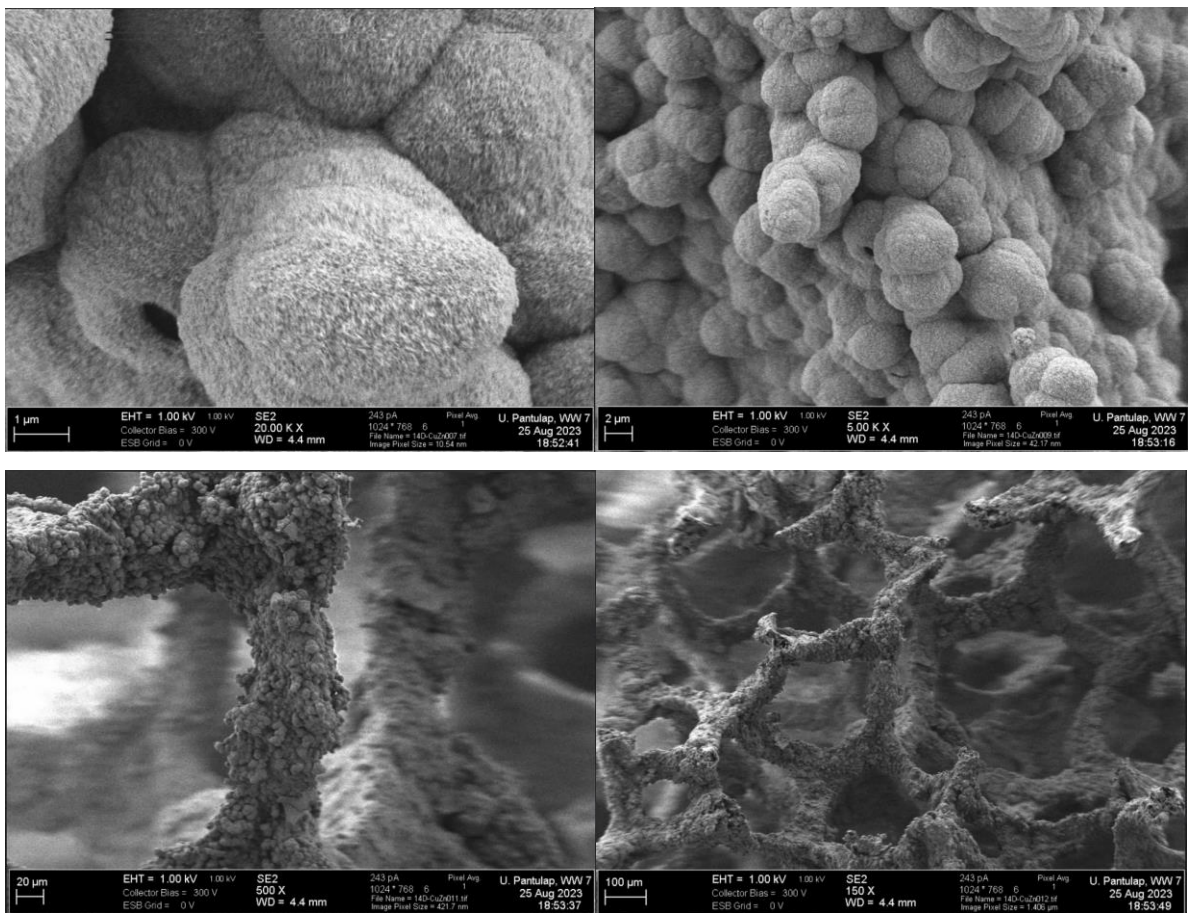


Figura 23. Micrografías SEM de la superficie de un andamio 13-93 B2 dopado con Cu-Zn a 14 días de inmersión en SBF.

6.3.3 Caracterización Composicional (FTIR)

Se realizaron ensayos de espectroscopía infrarroja por Transformada de Fourier (FTIR) sobre las muestras tras la inmersión durante 14 días en SBF, para corroborar

la formación de hidroxiapatita en los andamios producidos con las diferentes formulaciones. En la Figura 24 puede verse el espectro de una muestra de andamios producidos con vidrio 13-93 de 14 días de inmersión, comparada con un andamio sin inmersión en SBF.

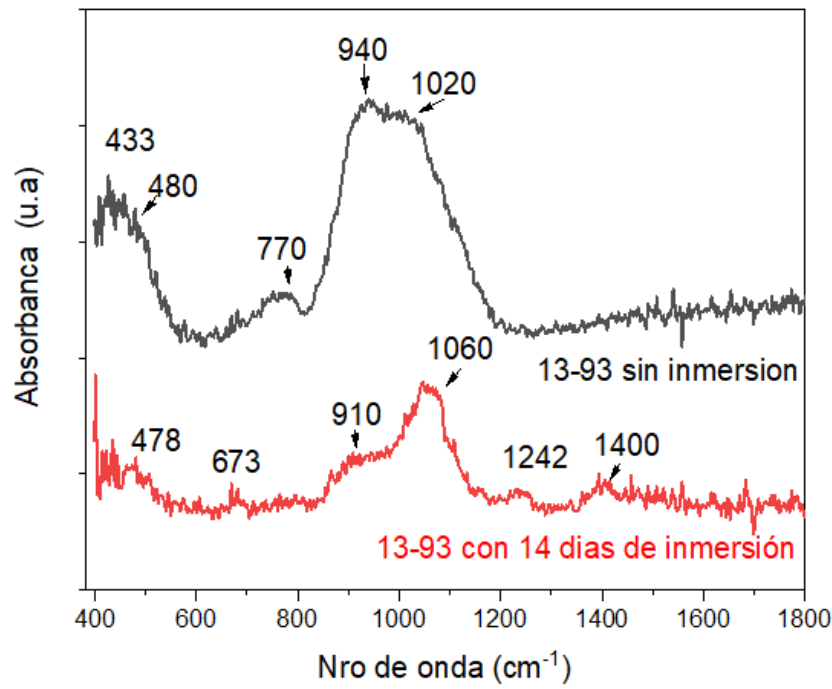


Figura 24. Espectros de FTIR de un andamio 13-93 antes y después de 14 días de inmersión.

La banda ancha de estiramiento del fosfato se forma en la región de 900-1100 cm^{-1} , sobreponiéndose a la señal original del Si-O-Si lo que verifica la presencia de hidroxiapatita. Otro modo de vibración de los fosfatos también se puede encontrar alrededor de los 600 cm^{-1} (Q. Fu et al., 2007). También el pico alrededor de 1060 cm^{-1} está relacionado con los carbonatos, los cuales podrían también estar presentes en la HCA, sustituyendo a los OH⁻. Se puede apreciar a ~1400 cm^{-1} un ligero pico que estaría asociado al ion carbonato (C-O) consistente con la precipitación de la fase secundaria de carbonato de calcio (CaCO₃) (calcita), que se habría observado en las micrografías SEM como inclusiones sobre la capa de apatita. Sin embargo, dada la pequeñez del pico, no se puede garantizar que no sea ruido (Peitl et al., n.d.).

Se realizaron también los espectros de FTIR para los andamios de composición 13-93 B2 y 13-92 B2 Cu-Zn, que se muestran en la Figura 25.

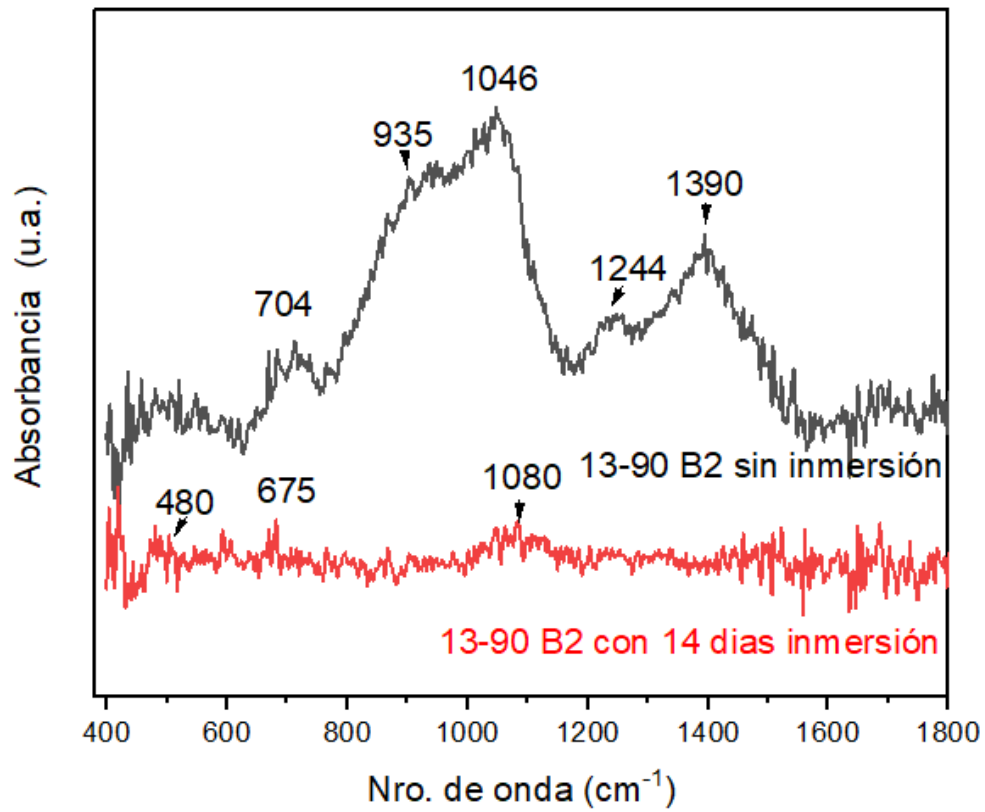


Figura 25. Espectros de FTIR de un andamio 13-93 B2 antes y después de 14 días de inmersión.

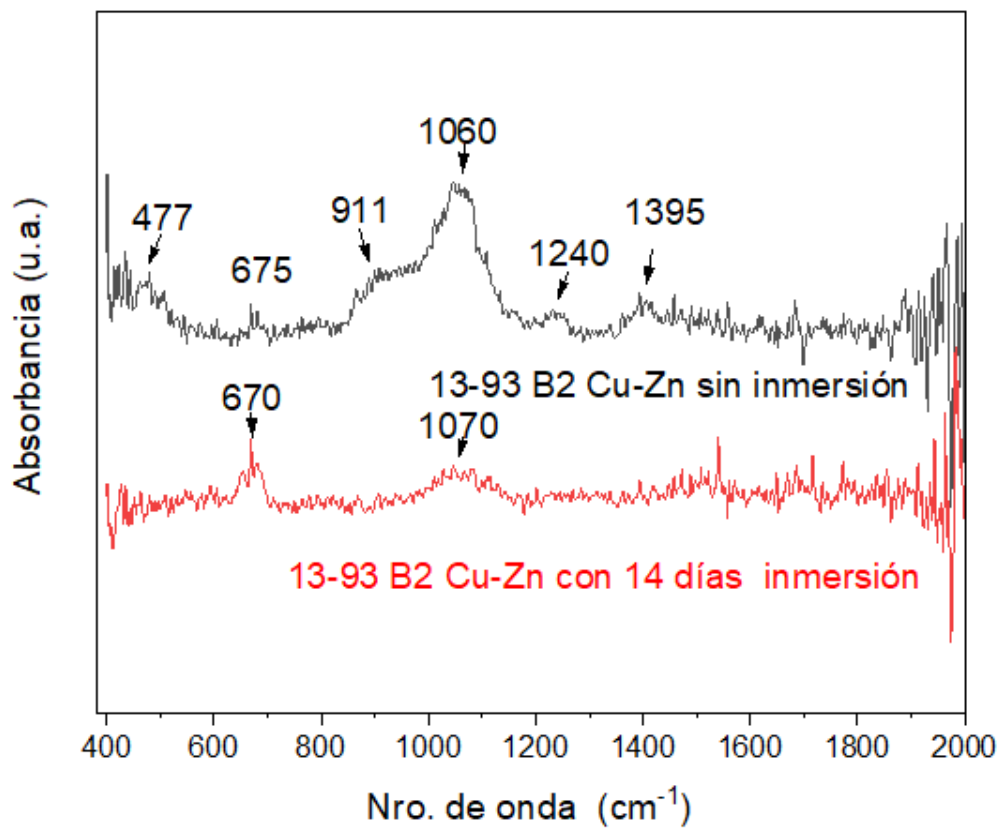


Figura 26. Espectros de FTIR de un andamio 13-93 B2 Cu-Zn antes y después de 14 días de inmersión

En ambos espectros a tiempo cero pueden observarse dos bandas: una centrada en $\sim 1060\text{ cm}^{-1}$ que correspondería a la tensión asimétrica de los oxígenos puente (Si-O-Si) (Hench, 1991) y otra centrada en $\sim 1400\text{ cm}^{-1}$ que se atribuye a la vibración de tensión de los enlaces B-O en grupos borato (BO_3) (Balestriere et al., 2020). Se puede ver que, a catorce días, estos picos disminuyen notablemente evidenciando la degradación del andamio. La banda ancha de estiramiento del fosfato se forma en la región de $1000\text{-}1100\text{ cm}^{-1}$ posiblemente sobreponiéndose a la señal original del Si-O-Si (Peitl et al., n.d.) lo que verificaría la presencia de hidroxiapatita. También se observan los picos de vibraciones de fosfatos en los 675 cm^{-1} , en ambos casos (Q. Fu et al., 2007).

Una vez caracterizados los tres tipos de andamios se optó por recubrir los andamios de la formulación 13-93 B2 dopados con Cu y Zn con gelatina y luego con una combinación gelatina y aceite esencial de clavo, con el objetivo de mejorar sus propiedades mecánicas iniciales.

6.4 Obtención de los andamios con recubrimientos

Se realizaron los recubrimientos con gelatina sin y con clavo a los andamios de la formulación 13-93 B2 dopado con Cu y Zn. En la Figura 27 puede verse el aspecto final a partir de microscopía óptica. Puede notarse que su estructura macroscópica no ha sufrido grandes cambios, lo que también pudo ser corroborado por el porcentaje de porosidad y el espesor de las trabéculas medido.

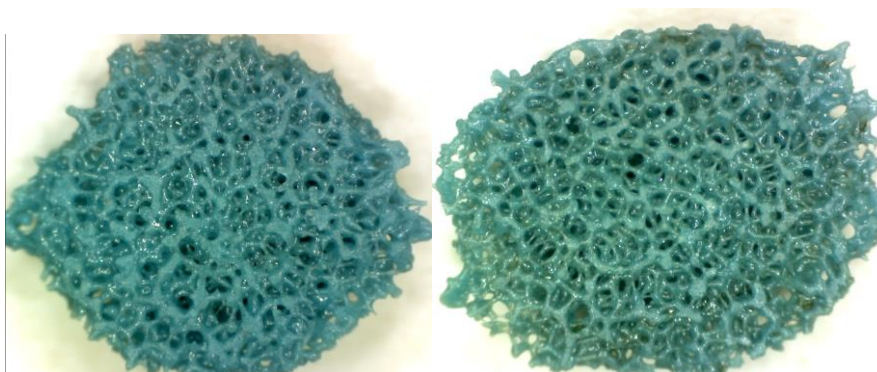


Figura 27. Andamios recubiertos con gelatina (izquierda) y con gelatina y aceite esencial de clavo (derecha).

6.5 Evaluación de Propiedades Mecánicas

La Figura 28 muestra de forma representativa los resultados del ensayo mecánico a compresión de tres andamios de biovidrio; se compara la condición sin recubrimiento de una muestra de la formulación 13-93 B2 dopado con cobre y zinc con otras dos del mismo tipo recubiertas con gelatina y con gelatina y aceite esencial de clavo.

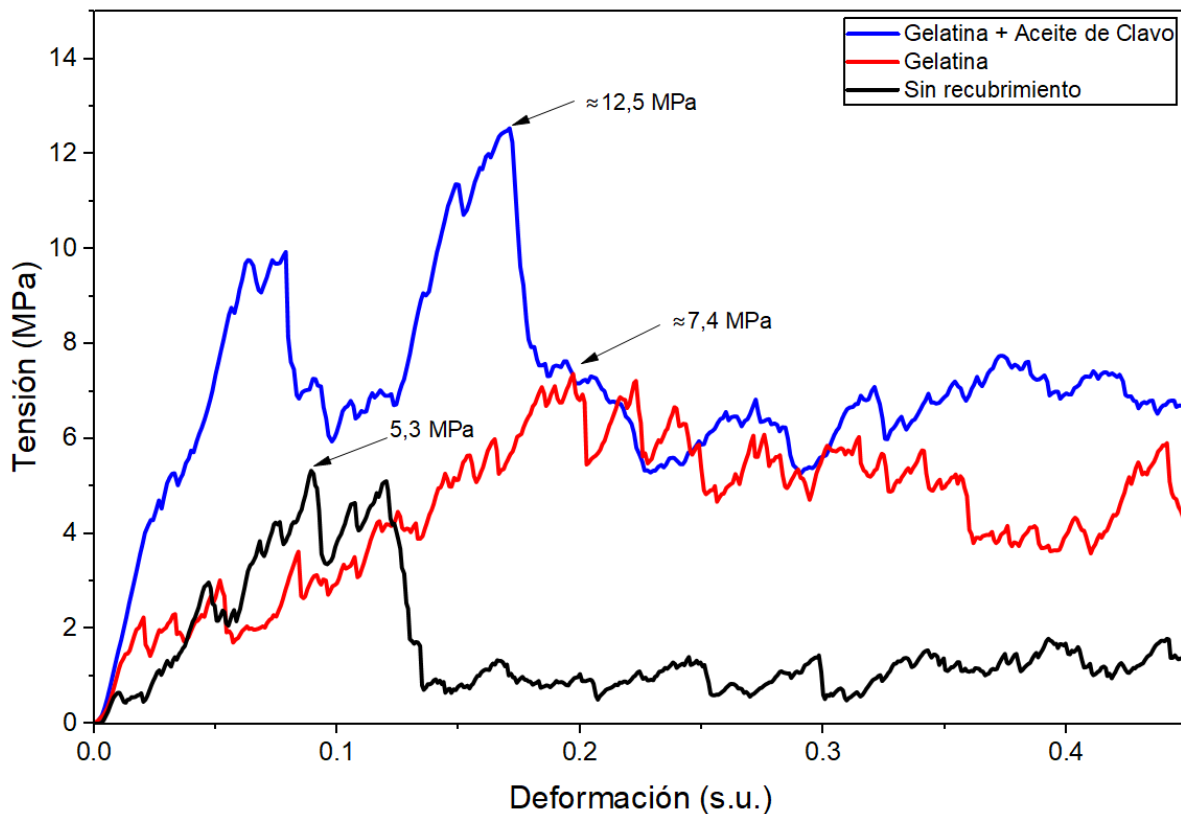


Figura 28. Gráfico comparativo de tensión vs deformación para el ensayo de compresión con las tres condiciones.

Tabla 2. Valores medios de Resistencia para los tres tipos de andamios evaluados

Resistencia	Cu-Zn	Gelatina	Gelatina + clavo
Media (MPa)	5,4	7,97	10,69
Desviación standard (MPa)	1,76	4,2	4,04

El andamio Cu–Zn presenta los valores más bajos de tensión de rotura a la compresión, indicando una menor resistencia mecánica y mayor fragilidad. La incorporación de gelatina mejora notablemente la resistencia, lo que se atribuye a su capacidad de recubrir las trabéculas con una segunda fase más elástica y rellenar las microfisuras presentes en sus superficies. Además, el recubrimiento transforma las trabéculas originales, débiles y frágiles, en estructuras compuestas más fuertes y tenaces en la que la gelatina actúa como fase orgánica que distribuye las cargas y mejora la cohesión estructural del material (Li et al., 2014).

Aunque la incorporación de aceite de clavo se planteó inicialmente con fines antibacteriales, los ensayos mecánicos revelaron un efecto sinérgico inesperado en la resistencia a la compresión. En este caso, el andamio recubierto de gelatina y aceite de clavo alcanzó tensiones máximas superiores comparado con la gelatina pura. Esta tendencia también se refleja en los valores medios como se puede apreciar en la Tabla 2. Esta diferencia era esperada inicialmente, debido a un previsible aumento en el espesor de trabéculas (área resistente), pero éste no fue notorio comparado con las muestras sin recubrimiento.

Este refuerzo mecánico puede atribuirse a la interacción química entre el eugenol (componente mayoritario del aceite) y la matriz de gelatina. Se ha reportado que los compuestos fenólicos pueden inducir un entrecruzamiento físico mediante la formación de puentes de hidrógeno e interacciones hidrofóbicas con las cadenas de aminoácidos de la gelatina, generando una red polimérica más rígida y cohesiva (Zhang et al., 2010). Asimismo, el carácter hidrofóbico del aceite podría limitar la absorción de humedad ambiental en el recubrimiento, reduciendo el efecto plastificante del agua y preservando la rigidez estructural del andamio (Tongnuanchan et al., 2012).

En conjunto, estos resultados indican que el recubrimiento con gelatina mejora significativamente el comportamiento mecánico del andamio de biovidrio, y que la adición de aceite de clavo potencia aún más esta mejora, sin comprometer la estabilidad del material.

Por otro lado, el recubrimiento de gelatina les confiere a los andamios cierto carácter elástico que no se daba antes debido a la fragilidad de los vidrios. Se trató de calcular un módulo aparente de elasticidad para los tres tipos de andamios de 13-93 B2 Cu-Zn estudiados (sin y con recubrimientos) tomando la fase inicial de la deformación y aproximando los puntos a una recta tensión vs deformación. El módulo

aparente de elasticidad es la pendiente de la recta. Los datos presentan una dispersión notable, debido a la fuerte dependencia de los cálculos con el intervalo elegido.

La Tabla 3 resume los resultados obtenidos. Al comparar los valores medios se evidencia un claro aumento del valor de módulo elástico aparente con el agregado de gelatina. El andamio original tiene una baja resistencia, debido a su estructura trabecular y a la presencia de fisuras provenientes del proceso de sinterizado, como se discutió previamente. Cabe destacarse que debido al método experimental (no es enteramente correcto mecánicamente calcular el módulo elástico en un ensayo de compresión), la desviación estándar de los resultados es muy elevada.

Tabla 3. Valores medios de módulo de elasticidad para los andamios de 13-93 B2 Cu-Z con los dos tipos de recubrimientos.

	Módulo elástico (E, en MPa)		
Tipo de muestra	Cu-Zn	Gelatina	Gelatina + clavo
Media	48,91	124,75	125,96
Desviación standard	32,48	50,1	22,66

Como ya se mencionó anteriormente, la gelatina rellena parcialmente las grietas de las trabéculas. Estas resisten más la flexión al comprimirse el andamio, por lo que se requerirá mayor fuerza para el mismo desplazamiento.

6.6 Evaluación Biológica (Actividad Antibacteriana y Citotoxicidad)

6.6.1 Actividad Antibacteriana

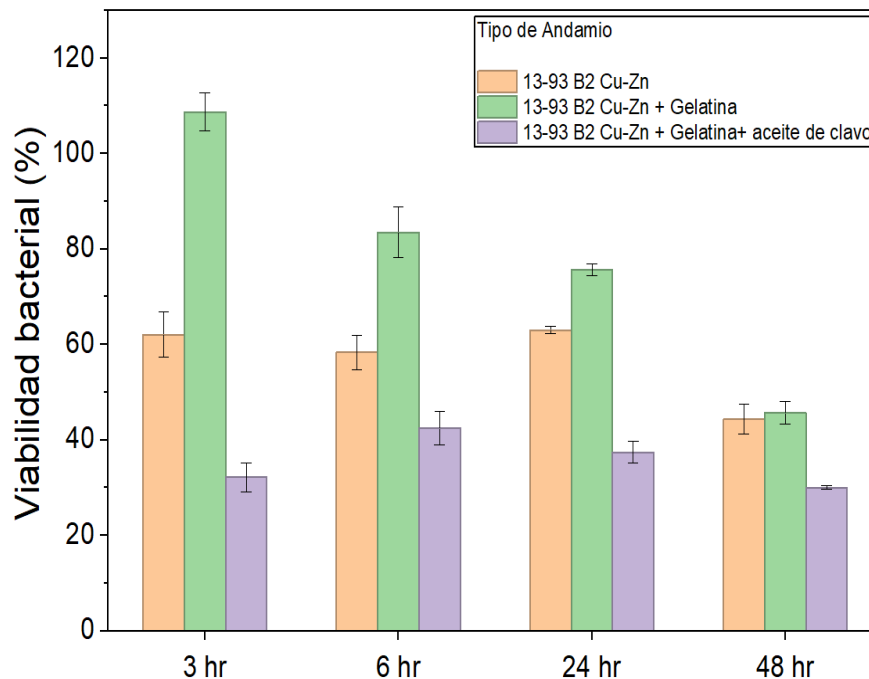


Figura 29. Gráfico de viabilidad bacterial de las tres condiciones de recubrimiento a diferentes tiempos.

La Figura 29 muestra la viabilidad bacteriana de *S. aureus* en contacto con distintos andamios (Cu-Zn, gelatina y gelatina con aceite de clavo) a lo largo del tiempo. Se postuló la hipótesis de que el agregado de gelatina promueve la proliferación de bacterias (Foster & Höök, 1998). De ahí que se haya decidido agregar una sustancia con conocidas propiedades antibacteriales como el aceite de clavo (Damian-Buda et al., 2025).

A las 3 horas, el andamio recubierto con gelatina presenta la mayor viabilidad bacteriana, indicando una baja o nula actividad antibacteriana. Esto podría deberse a que la gelatina previene la liberación de iones Cu y Zn; además se ha reportado que el colágeno presente en la gelatina favorece la adhesión del *S. aureus* (Foster & Höök, 1998). En cambio, el andamio con Cu-Zn muestra una reducción moderada, mientras que el recubierto con gelatina y aceite de clavo presenta la menor viabilidad; lo que evidencia un efecto bactericida más pronunciado por la presencia del extracto. Con el paso del tiempo, la viabilidad disminuye en todos los grupos, aunque la tendencia se mantiene, siendo siempre menor para el andamio con gelatina y aceite de clavo. Este

comportamiento podría atribuirse principalmente a la acción antimicrobiana del eugenol presente en el aceite de clavo, que potencia la capacidad antibacteriana del recubrimiento en comparación con los demás sistemas, como ya se ha reportado (Damian-Buda et al., 2025).

La potente actividad antimicrobiana del eugenol se fundamenta en su naturaleza lipofílica y en la reactividad de su grupo hidroxilo libre, características estructurales que le permiten penetrar la capa de lipopolisacáridos de las bacterias. Al interactuar con la bicapa lipídica, el compuesto desestabiliza la integridad de la membrana bacteriana provocando una alteración irreversible de su permeabilidad, lo que resulta en la fuga masiva de macromoléculas intracelulares críticas, incluyendo proteínas, ácidos nucleicos y ATP, privando a la bacteria de su fuente de energía primaria. Una vez en el citoplasma, el eugenol desencadena un estado de estrés oxidativo mediante la generación excesiva de especies reactivas de oxígeno (ROS), proceso que satura y agota los sistemas enzimáticos de defensa antioxidante como la dismutasa, la catalasa y el glutatión peroxidasa, conduciendo a la oxidación de lípidos y proteínas vitales. Además, el eugenol se une a la enzima enoil-ACP reductasa (FabI), que está presente en la *S. aureus*, con un rol importante en la creación de los ácidos grasos importantes para el mantenimiento de la membrana bacteriana, bloqueando así su biosíntesis. Por último, su interacción directa con el material genético induce la escisión del ADN y suprime la actividad bacteriana al inhibir la formación y actividad metabólica de los biofilms (Bai et al., 2023).

6.6.2 Citotoxicidad

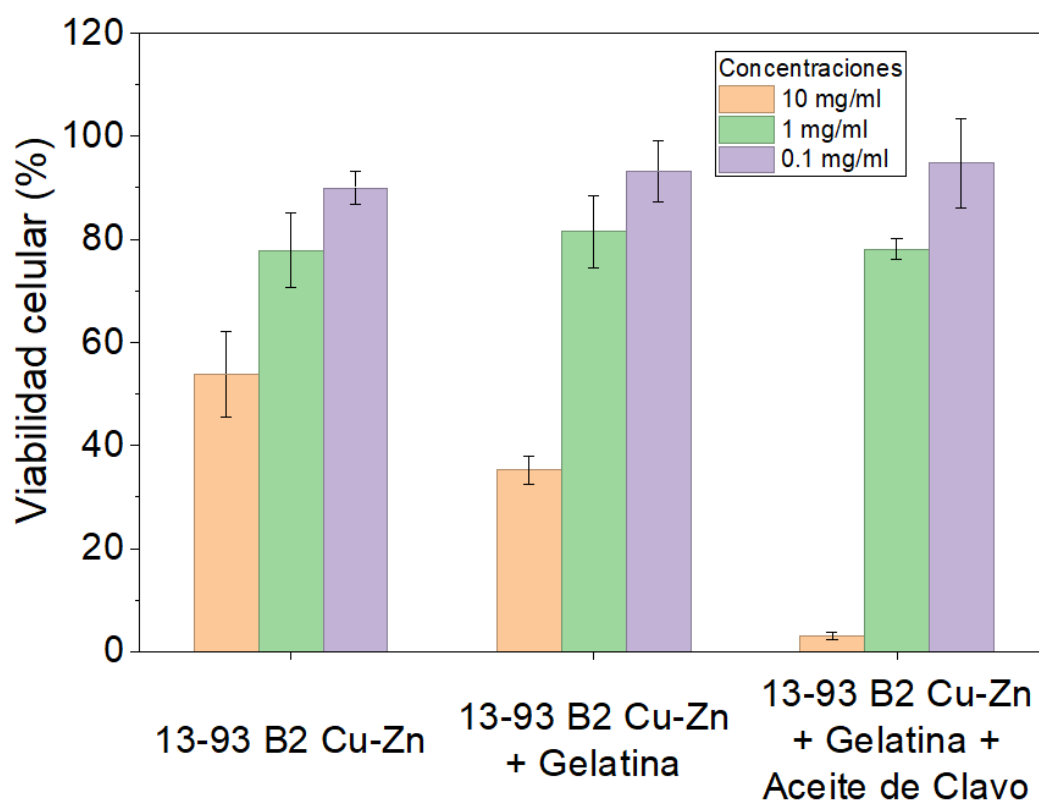


Figura 30. Gráfico de viabilidad celular de las tres condiciones de recubrimiento a diferentes concentraciones de extractos de andamios.

La Figura 30 muestra la viabilidad celular de osteoblastos MC3T3-E1 tras la exposición a extractos de andamios de Cu-Zn, gelatina y aceite de clavo a diferentes concentraciones (10, 1 y 0,1 mg/ml). Se observa una clara tendencia dependiente de la concentración: a medida que la concentración del extracto disminuye, la viabilidad celular aumenta. A 10 mg/ml, todos los materiales muestran una reducción significativa en la viabilidad, especialmente el aceite de clavo, que presenta valores cercanos a cero, indicando una alta citotoxicidad a concentraciones elevadas. Esto podría deberse a que, a altas concentraciones, los componentes liberados generarían estrés oxidativo en el caso de los iones metálicos (Jomova & Valko, 2011) o afectar la funcionalidad de las células en el caso del eugenol presente en los andamios recubiertos con aceite de clavo y gelatina, debido a este último componente (Ho et al., 2006). En el caso de los andamios recubiertos con gelatina, la disminución podría relacionarse con la presencia de genipina residual utilizada como entrecruzante que reduce la viabilidad celular a determinadas concentraciones (Li et al., 2014) dado que

la gelatina es de por sí biocompatible (Bikuna-Izagirre et al., 2022). En cambio, a 1 y 0,1 mg/ml, la viabilidad supera el 80 % en todos los casos, lo que sugiere buena biocompatibilidad en rangos más diluidos. Estos resultados indican que, aunque los componentes activos del aceite de clavo y los iones metálicos del Cu-Zn pueden ejercer efectos citotóxicos a altas concentraciones, en condiciones más diluidas los materiales no afectan significativamente la viabilidad celular.

7. Conclusiones

Se han logrado fabricar los andamios de las tres formulaciones planteadas (13-93, 13-93 B2 y 13-93 B2 dopados con cobre y zinc). Estos andamios son íntegros y poseen porosidades alrededor del 45%, con tamaños promedio de trabéculas de entre 170 y 250 micrones. Esta porosidad sería óptima para la vascularización e irrigación de los andamios. Los ensayos de cambio de peso han arrojado que la tercera de estas formulaciones, la que contiene Cu y Zn presenta la pérdida de peso más rápida, mientras que para los andamios de la formulación 13-93. La pérdida de peso por degradación se compensa enteramente por el aumento de peso al formarse la hidroxiapatita lo que conllevó una pérdida de peso casi nula, lo que haría suponer de una integridad relativamente buena en un mediano plazo de los andamios.

Se pudo evidenciar la presencia de depósitos de hidroxiapatita con su estructura de coliflor o de agujas en la superficie de los andamios para todos los casos, mediante microscopía electrónica de barrido, luego de su inmersión en solución fisiológica simulada. Pudo observarse también esta presencia desde el punto de vista composicional, mediante ensayos de FTIR. La bioactividad lograda es clave para este tipo de estructuras, para favorecer la oseointegración del andamio.

Los andamios de la formulación 13-93 B2 dopados con Cu y Zn fueron recubiertos con gelatina y con gelatina y aceite de clavo, para mejorar su performance mecánica a la compresión, así como también mantener características antibacteriales. La resistencia mecánica se vio favorecida de forma significativa obteniendo valores más altos para los andamios recubiertos con gelatina y aún más para los de gelatina y aceite de clavo, debido a la impregnación del biopolímero en la superficie de las trabéculas. El extracto, por otro lado, se postula que remarca este mecanismo, aumentando aún más la resistencia a la compresión y el módulo elástico del sistema compuesto. Por otro lado, los ensayos antibacteriales arrojaron que la viabilidad bacteriana de los andamios aumenta con el agregado de gelatina, pero disminuye con la incorporación del extracto de clavo, lo que verifica que la gelatina promueve la proliferación bacteriana y el aceite de clavo la impide, como era hipotetizado. Por último, los estudios de viabilidad celular verificaron que la citocompatibilidad de los andamios aumenta con el agregado de gelatina y con extracto de clavo aumenta aún más, analizado de forma indirecta con bajas concentraciones de productos de liberación.

En conjunto, los andamios de 13-93 con boro y a su vez con Cu y Zn, recubiertos con un biopolímero como gelatina, y con un extracto natural antibacterial como es el de clavo, genera estructuras más resistentes, bioactivas y con resistencia a las bacterias, lo que podrían ser potenciales candidatos como sustitutos óseos.

8. Trabajo a futuro

- Realizar ensayos de inmersión en andamios con recubrimiento de gelatina y gelatina y aceite de clavo a 3, 7 y 14 días. Corroborar la formación de depósitos de hidroxiapatita mediante microscopía electrónica de barrido (SEM).
- Realizar recubrimientos sobre los andamios de las otras dos formulaciones (13-93 y 13-93 B2). Realizar nuevos recubrimientos sobre ellos.
- Repetir los ensayos de inmersión con alternativas al SBF, como solución de Hanks o medio dMEM.
- Realizar recubrimientos de gelatina y aceite de clavo sobre andamios de otras formulaciones para seguir explorando el efecto sinérgico de ambos componentes sobre las propiedades mecánicas
- Utilizar otros aceites esenciales con el fin de evaluar sus efectos sobre las propiedades mecánicas de los andamios.
- Explorar ensayos *in vivo* para la viabilidad de los andamios estudiados.

9. Bibliografía

- Bai, J., Li, J., Chen, Z., Bai, X., Yang, Z., Wang, Z., & Yang, Y. (2023). Antibacterial activity and mechanism of clove essential oil against foodborne pathogens. *LWT*, 173. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2022.114249>
- Baino, F., Fiume, E., Barberi, J., Kargozar, S., Marchi, J., Massera, J., & Verné, E. (2019). Processing methods for making porous bioactive glass-based scaffolds—A state-of-the-art review. *International Journal of Applied Ceramic Technology*, 16(5), 1762–1796. <https://doi.org/10.1111/ijac.13195>
- Balestriere, M. A., Schuhladden, K., Herrera Seitz, K., Boccaccini, A. R., Cere, S. M., & Ballarre, J. (2020). Sol-gel coatings incorporating borosilicate bioactive glass enhance anti corrosive and surface performance of stainless steel implants. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 876. <https://doi.org/10.1016/j.jelechem.2020.114735>
- Bejarano, J., Boccaccini, A. R., Covarrubias, C., & Palza, H. (2020). Effect of Cu-and Zn-doped bioactive glasses on the in vitro bioactivity, mechanical and degradation behavior of biodegradable PDLLA scaffolds. *Materials*, 13(13). <https://doi.org/10.3390/ma13132908>
- Bejarano, J., Detsch, R., Boccaccini, A. R., & Palza, H. (2017). PDLLA scaffolds with Cu- and Zn-doped bioactive glasses having multifunctional properties for bone regeneration. *Journal of Biomedical Materials Research - Part A*, 105(3), 746–756. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.35952>
- Bikuna-Izagirre, M., Aldazabal, J., & Paredes, J. (2022). Gelatin Blends Enhance Performance of Electrospun Polymeric Scaffolds in Comparison to Coating Protocols. *Polymers*, 14(7). <https://doi.org/10.3390/polym14071311>
- Chen, Q. Z. (2011). Foaming technology of tissue engineering scaffolds - a review. In *Bubble Science, Engineering and Technology* (Vol. 3, Issue 2, pp. 34–47). <https://doi.org/10.1179/1758897911Y.0000000003>
- Chen, Q. Z., Thompson, I. D., & Boccaccini, A. R. (2006). 45S5 Bioglass®-derived glass–ceramic scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials*, 27(11), 2414–2425. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2005.11.025>
- Cüneyt Tas, A. (2000). Synthesis of biomimetic Ca-hydroxyapatite powders at 37°C in synthetic body fluids. *Biomaterials*, 21(14), 1429–1438. [https://doi.org/10.1016/S0142-9612\(00\)00019-3](https://doi.org/10.1016/S0142-9612(00)00019-3)

- Damian-Buda, A. I., Lorke, M., Boccaccini, A. R., & Unalan, I. (2025). Novel Antioxidant and Antibacterial Injectable Hydrogels Incorporating Clove Oil-Loaded Mesoporous Bioactive Glass Nanoparticles: A Promising Strategy for Enhanced Bone Regeneration. *Macromolecular Bioscience*. <https://doi.org/10.1002/mabi.202500252>
- Fiume, E., Ciavattini, S., Verné, E., & Baino, F. (2021). Foam replica method in the manufacturing of bioactive glass scaffolds: Out-of-date technology or still underexploited potential? In *Materials* (Vol. 14, Issue 11). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/ma14112795>
- Foster, T. J., & Höök, M. (1998). Surface protein adhesins of *Staphylococcus aureus*. *Trends in Microbiology*, 6(12), 484–488. [https://doi.org/10.1016/S0966-842X\(98\)01400-0](https://doi.org/10.1016/S0966-842X(98)01400-0)
- Friedman, M., Henika, P. R., & Mandrell, R. E. (2002). Bactericidal Activities of Plant Essential Oils and Some of Their Isolated Constituents against *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, and *Salmonella enterica*. In *Journal of Food Protection* (Vol. 65, Issue 10).
- Fu, H., Fu, Q., Zhou, N., Huang, W., Rahaman, M. N., Wang, D., & Liu, X. (2009). In vitro evaluation of borate-based bioactive glass scaffolds prepared by a polymer foam replication method. *Materials Science and Engineering C*, 29(7), 2275–2281. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2009.05.013>
- Fu, Q., Rahaman, M. N., Bal, B. S., Huang, W., & Day, D. E. (2007). Preparation and bioactive characteristics of a porous 13–93 glass, and fabrication into the articulating surface of a proximal tibia. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 82A(1), 222–229. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.31156>
- Gautam, C., Yadav, A. K., & Singh, A. K. (2012). A Review on Infrared Spectroscopy of Borate Glasses with Effects of Different Additives. *ISRN Ceramics*, 2012, 1–17. <https://doi.org/10.5402/2012/428497>
- Hench, L. L. (1991). Bioceramics: From Concept to Clinic. *Journal of the American Ceramic Society*, 74(7), 1487–1510. <https://doi.org/10.1111/j.1151-2916.1991.tb07132.x>
- Hench, L. L. (2006). The story of Bioglass®. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 17(11), 967–978. <https://doi.org/10.1007/s10856-006-0432-z>

- Hench, L. L., & Thompson, I. (2010). Twenty-first century challenges for biomaterials. *Journal of The Royal Society Interface*, 7(suppl_4). <https://doi.org/10.1098/rsif.2010.0151.focus>
- Ho, Y. C., Huang, F. M., & Chang, Y. C. (2006). Mechanisms of cytotoxicity of eugenol in human osteoblastic cells in vitro. *International Endodontic Journal*, 39(5), 389–393. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2591.2006.01091.x>
- Ismail, A. A., van de Voort, F. R., & Sedman, J. (1997). *Chapter 4 Fourier transform infrared spectroscopy: Principles and applications* (pp. 93–139). [https://doi.org/10.1016/S0167-9244\(97\)80013-3](https://doi.org/10.1016/S0167-9244(97)80013-3)
- Jomova, K., & Valko, M. (2011). Advances in metal-induced oxidative stress and human disease. In *Toxicology* (Vol. 283, Issues 2–3, pp. 65–87). <https://doi.org/10.1016/j.tox.2011.03.001>
- Karageorgiou, V., & Kaplan, D. (2005). Porosity of 3D biomaterial scaffolds and osteogenesis. In *Biomaterials* (Vol. 26, Issue 27, pp. 5474–5491). Elsevier BV. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2005.02.002>
- Kokubo, T., & Takadama, H. (2006). How useful is SBF in predicting in vivo bone bioactivity? *Biomaterials*, 27(15), 2907–2915. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2006.01.017>
- Levasseur, R. (2019). Fisiología del tejido óseo. *EMC - Aparato Locomotor*, 52(2), 1–25. [https://doi.org/10.1016/s1286-935x\(19\)42130-8](https://doi.org/10.1016/s1286-935x(19)42130-8)
- Li, W., Noeaid, P., Roether, J. A., Schubert, D. W., & Boccaccini, A. R. (2014). Preparation and characterization of vancomycin releasing PHBV coated 45S5 Bioglass®-based glass–ceramic scaffolds for bone tissue engineering. *Journal of the European Ceramic Society*, 34(2), 505–514. <https://doi.org/10.1016/j.jeurceramsoc.2013.08.032>
- Liu, D., Nikoo, M., Boran, G., Zhou, P., & Regenstein, J. M. (2015). Collagen and Gelatin. *Annual Review of Food Science and Technology*, 6(1), 527–557. <https://doi.org/10.1146/annurev-food-031414-111800>
- Metze, A. L., Grimm, A., Noeaid, P., Roether, J. A., Hum, J., Newby, P. J., Schubert, D. W., & Boccaccini, A. R. (2013a). Gelatin Coated 45S5 Bioglass®-Derived Scaffolds for Bone Tissue Engineering. *Key Engineering Materials*, 541, 31–39. <https://doi.org/10.4028/www.scientific.net/KEM.541.31>
- Metze, A. L., Grimm, A., Noeaid, P., Roether, J. A., Hum, J., Newby, P. J., Schubert, D. W., & Boccaccini, A. R. (2013b). Gelatin Coated 45S5 Bioglass®-Derived

- Scaffolds for Bone Tissue Engineering. *Key Engineering Materials*, 541, 31–39. <https://doi.org/10.4028/www.scientific.net/KEM.541.31>
- Moreno, M., H. Amaral, M., M. Sousa Lobo, J., & C. Silva, A. (2016). Scaffolds for Bone Regeneration: State of the Art. *Current Pharmaceutical Design*, 22(18), 2726–2736. <https://doi.org/10.2174/1381612822666160203114902>
- Neščáková, Z., Kaňková, H., Galusková, D., Galusek, D., Boccaccini, A. R., & Liverani, L. (2021). Polymer (PCL) fibers with Zn-doped mesoporous bioactive glass nanoparticles for tissue regeneration. *International Journal of Applied Glass Science*, 12(4), 588–600. <https://doi.org/10.1111/ijag.16292>
- Oldani, C., Salvatierra, N., Reyna, L., & Taborda, R. (n.d.). *Qué es la biocompatibilidad?*
- Pantulap, U., Arango-Ospina, M., & Boccaccini, A. R. (2022). Bioactive glasses incorporating less-common ions to improve biological and physical properties. In *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* (Vol. 33, Issue 1). Springer. <https://doi.org/10.1007/s10856-021-06626-3>
- Park, J. B., & Lakes, R. S. (2007). *Biomaterials*. Springer New York. <https://doi.org/10.1007/978-0-387-37880-0>
- Park, Y.-S., Kim, K.-N., Kim, K.-M., Choi, S.-H., Kim, C.-K., Legeros, R. Z., & Lee, Y.-K. (2006). Feasibility of three-dimensional macroporous scaffold using calcium phosphate glass and polyurethane sponge. *Journal of Materials Science*, 41(13), 4357–4364. <https://doi.org/10.1007/s10853-006-6261-0>
- Pastore, J. I., Bouchet, J., Moler, D., & Ballarin, D. (2006). *Topological Concepts applied to Digital Image Processing*.
- Pastore, J. I., Moler, E. G., & Ballarin, V. L. (2005). Segmentation of brain magnetic resonance images through morphological operators and geodesic distance. *Digital Signal Processing*, 15(2), 153–160. <https://doi.org/10.1016/j.dsp.2004.12.002>
- Pastore, J. I., Moler, E., & Meschino, G. (2005). Segmentación de biopsias de médula ósea mediante filtros morfológicos y rotulación de regiones homogéneas / Segmentation of bone marrow biopsies by morphological filters and labeling of flat zones. *Revista Brasileira de Engenharia Biomédica*, 21(1), 81–88.
- Pawlina, W. (2016). *Histology A TEXT AND ATLAS With Correlated Cell and Molecular Biology*.

- Peitl, O., Dutra Zanotto, E., & Hench, L. L. (n.d.). *Highly bioactive P 2 O 5 ±Na 2 O±CaO±SiO 2 glass-ceramics*. www.elsevier.com/locate/jnoncrysol
- Pina, S., Reis, R. L., & Oliveira, J. M. (n.d.). *Chapter 4 Ceramic Biomaterials for Tissue Engineering*.
- Rastilantie, M.-, Abd Elgadir, M., Mirghani, M. E. S., & Adam, A. (2005). WFL Publisher Science and Technology Fish gelatin and its applications in selected pharmaceutical aspects as alternative source to pork gelatin. In *Agriculture & Environment* (Vol. 11, Issue 1). www.world-food.net
- Ribas, R. G., Schatkoski, V. M., Montanheiro, T. L. do A., de Menezes, B. R. C., Stegemann, C., Leite, D. M. G., & Thim, G. P. (2019). Current advances in bone tissue engineering concerning ceramic and bioglass scaffolds: A review. *Ceramics International*, 45(17), 21051–21061. <https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2019.07.096>
- Sabino, M. A., Loaiza, M., Dernowsek, J., Rezende, R., & Da Silva, J. V. L. (2017). Técnicas para la fabricación de andamios poliméricos con aplicaciones en ingeniería de tejidos. *Revista Latinoamericana de Metalurgia y Materiales*, 32(2), 120–146.
- Schuhladen, K., Pantulap, U., Engel, K., Jeleń, P., Olejniczak, Z., Hupa, L., Sitarz, M., & Boccaccini, A. R. (2021). Influence of the replacement of silica by boron trioxide on the properties of bioactive glass scaffolds. *International Journal of Applied Glass Science*, 12(3), 293–312. <https://doi.org/10.1111/ijag.15894>
- Schuhladen, K., Wang, X., Hupa, L., & Boccaccini, A. R. (2018). Dissolution of borate and borosilicate bioactive glasses and the influence of ion (Zn, Cu) doping in different solutions. *Journal of Non-Crystalline Solids*, 502, 22–34. <https://doi.org/10.1016/j.jnoncrysol.2018.08.037>
- Sharma, S., Singh, S., Bond, J., Singh, A., & Rustagi, A. (2014). *EVALUATION OF ANTIBACTERIAL PROPERTIES OF ESSENTIAL OILS FROM CLOVE AND EUCALYPTUS*. 7.
- Standring, Susan., Gray, Henry., Anand, Neel., & Tunstall, Richard. (2021). *Gray's anatomy : the anatomical basis of clinical practice*. Elsevier.
- Tathe, A., Ghodke, M., & Nikalje, A. P. (n.d.). *A BRIEF REVIEW: BIOMATERIALS AND THEIR APLLICATION*.

- Tongnuanchan, P., Benjakul, S., & Prodpran, T. (2012). Properties and antioxidant activity of fish skin gelatin film incorporated with citrus essential oils. *Food Chemistry*, 134(3), 1571–1579. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.03.094>
- Unalan, I., Fuggerer, T., Slavik, B., Buettner, A., & Boccaccini, A. R. (2021). Antibacterial and antioxidant activity of cinnamon essential oil-laden 45S5 bioactive glass/soy protein composite scaffolds for the treatment of bone infections and oxidative stress. *Materials Science and Engineering C*, 128. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2021.112320>
- Vitale-Brovarone, C., Miola, M., Balagna, C., & Verné, E. (2008). 3D-glass–ceramic scaffolds with antibacterial properties for bone grafting. *Chemical Engineering Journal*, 137(1), 129–136. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2007.07.083>
- Zhang, X., Do, M. D., Casey, P., Sulistio, A., Qiao, G. G., Lundin, L., Lillford, P., & Kosaraju, S. (2010). Chemical cross-linking gelatin with natural phenolic compounds as studied by high-resolution NMR spectroscopy. *Biomacromolecules*, 11(4), 1125–1132. <https://doi.org/10.1021/bm1001284>