Obtención de matriz ósea desmineralizada bovina empleando cavitación

Daniela Murcia [1], Ronald Jimenez [2] and Diana Millán [3, *]

[1] Estudiante de Química Farmacéutica; Universidad El Bosque; dlmurcia@unbosque. edu.co
[2] Universidad El Bosque, Facultad de Ciencias, Programa de Química Farmacéutica, Semillero ABC, Grupo de investigación en Química Aplicada INQA, Tutor; rajimenez@unbosque.edu.co
[3] Universidad El Bosque, Facultad de Medicina, Grupo de investigación GIBAT; Profesora asociada; millandiana@unbosque.edu.co

Resumen: Este estudio tuvo como objetivo comparar dos métodos de desmineralización para evaluar la efectividad de la cavitación en la desmineralización de una matriz ósea bovina. Se caracterizaron sus propiedades fisicoquímicas y mecánicas mediante diversas técnicas analíticas. Se utilizó microscopía electrónica de barrido (SEM) para evaluar la morfología, técnicas de desplazamiento de líquido para medir la porosidad, espectroscopía infrarroja y difracción de rayos X (DRX) para analizar las características estructurales, y un texturómetro para determinar las propiedades mecánicas. Además, se realizaron una titulación complejométrica para determinar el calcio remanente y pruebas gravimétricas para cuantificar la pérdida de peso por desmineralización, comparando así ambos métodos.

Los resultados gravimétricos mostraron que la cavitación eliminó un 60% del material inorgánico, frente al 40% logrado por el método convencional. La titulación complejométrica reveló un contenido de calcio remanente similar en ambos procedimientos, con aproximadamente un 0.02% al día 6. La porosidad de la matriz tratada con cavitación fue significativamente mayor, alcanzando un 55%, comparado con el 45% del método sin cavitación. No obstante, las mediciones de dureza resultaron muy dispersas, por lo que se descartaron por falta de precisión.

En conclusión, la desmineralización mediante cavitación resultó ser más eficiente, con una mayor pérdida de material inorgánico y calcio, una reducción de la dureza y un incremento de la porosidad en comparación con el método convencional. Las técnicas gravimétricas, de análisis de porosidad y la titulación complejométrica fueron las más efectivas para comparar los procesos, con una duración de 6 a 9 días.

Los hallazgos no solo evidenciaron mejoras en porosidad y reducción de tiempos de tratamiento con cavitación, sino que también destacaron parámetros clave para la integración y estabilidad de implantes óseos. Por tanto, la cavitación podría representar un avance significativo en los tratamientos clínicos para la restauración de tejidos óseos.

Palabras clave:: Desmineralización; Cavitación; Matriz ósea desmineralizada; Propiedades Mecánicas, Características estructurales.

1. INTRODUCCIÓN

El tejido óseo es el segundo más trasplantado en el ser humano, y su demanda ha aumentado considerablemente, especialmente en regiones con una población envejecida. Las personas mayores suelen experimentar más fracturas y defectos óseos debido a la fragilidad ósea y enfermedades relacionadas con la edad, lo que genera una mayor necesidad de tratamientos y alternativas de reemplazo óseo [1,2,3].

Existen varias opciones para suplir estas necesidades, como los autoinjertos, en los cuales se transfiere hueso del mismo paciente de una parte del cuerpo a otra. Aunque este método presenta alta biocompatibilidad, está limitado por la cantidad de tejido disponible y la posibilidad de causar dolor y complicaciones en el sitio donante. Los aloinjertos son otra opción, y consisten en hueso proveniente de otro individuo de la misma especie, generalmente de donantes cadavéricos. Aunque los aloinjertos eliminan la necesidad de un segundo procedimiento quirúrgico en el paciente, existen riesgos asociados con la transmisión de enfermedades y la compatibilidad inmunológica [4]. Por último, los xenoinjertos involucran la transferencia de tejido de otra especie, como tejido bovino o porcino, hacia un receptor humano. Este tipo de injerto tiene sus propias limitaciones, como una mayor posibilidad de rechazo y problemas inmunológicos.

Ante esta problemática, surge la matriz ósea desmineralizada (MOD) como una solución prometedora. La MOD se obtiene mediante la eliminación de la fracción mineral del hueso, lo que deja una matriz principalmente compuesta por colágeno, útil para la regeneración ósea. Este tipo de matriz es empleada en diversas aplicaciones ortopédicas y de medicina regenerativa, pues conserva las propiedades bioquímicas que promueven el crecimiento y la reparación del hueso [5]. Sin embargo, los métodos convencionales para obtener MOD, como el tratamiento con ácidos, presentan ciertas limitaciones. Aunque este enfoque es biocompatible y no provoca una respuesta inmunológica significativa, su principal desventaja es la degradación de componentes importantes de la matriz, como glicoproteínas y proteoglicanos, que son esenciales para la estructura y función del tejido óseo [3,6].

Con el fin de mejorar la calidad de la matriz ósea y optimizar el proceso de desmineralización, se propone un nuevo enfoque basado en la cavitación asistida por ácido. La cavitación es un proceso físico en el cual se generan burbujas de gas en un líquido bajo condiciones de baja presión, lo que provoca la desintegración de los materiales circundantes cuando las burbujas colapsan. En el contexto de la desmineralización ósea, la cavitación tiene el potencial de acelerar el proceso de eliminación de la fracción mineral, al tiempo que preserva la calidad de la matriz orgánica [7]. Esta técnica, que aún no ha sido explorada extensivamente, podría reducir tanto el tiempo como los costos de producción, haciendo el proceso más eficiente y conservando la estructura y funcionalidad de la matriz ósea.

Este estudio se enfoca en evaluar la eficacia del método de cavitación para obtener MOD en comparación con los métodos convencionales. Los principales parámetros evaluados fueron la calidad y cantidad de matriz producida, así como la duración del proceso. Se investigaron factores clave que influyen en la eficacia del método, como la intensidad de la cavitación y el tiempo de exposición al ácido, con el objetivo de identificar las condiciones óptimas para mejorar el producto final. En esta investigación se utilizó fémur bovino como material de partida, ya que es un tejido comúnmente empleado en la medicina regenerativa y las cirugías ortopédicas. El fémur bovino es un sustituto óseo adecuado debido a su similitud estructural y propiedades mecánicas comparables a las del hueso humano [10].

Además, es importante destacar que la MOD obtenida mediante cavitación podría mejorar la integración y estabilidad de los implantes óseos, lo que a su vez favorece la recuperación de los pacientes con defectos óseos. Si bien el método convencional ha sido efectivo hasta cierto punto, la incorporación de la cavitación puede representar un avance significativo en el desarrollo de biomateriales para la medicina regenerativa, proporcionando un material más eficiente en términos de regeneración ósea y con menos complicaciones a largo plazo.

Este estudio busca contribuir al desarrollo de alternativas innovadoras y más efectivas para suplir la creciente demanda de injertos óseos en tratamientos médicos. Además, los resultados podrían tener un impacto positivo en la regeneración ósea al proporcionar matrices con mejores propiedades fisicoquímicas, lo que mejoraría la integración de los implantes y reduciría el tiempo de recuperación de los pacientes.

1.1 OBJETIVOS

General

Desarrollar un protocolo para la generación de una matriz ósea de origen bovino por cavitación con atributos mecánicos y fisicoquímicos adecuados para su aplicación como alternativa en el tratamiento de lesiones óseas.

Objetivos específicos
Determinar las condiciones óptimas de desmineralización de una matriz ósea de origen bovino en función del tiempo empleando cavitación.
Caracterizar la matriz ósea desmineralizada de origen bovino obtenida mediante ensayos mecánicos y fisicoquímicos.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Materiales y Equipos Utilizados:

Para este estudio, se utilizó hueso de fémur bovino, adquirido de un frigorífico local. Los reactivos empleados incluyeron solución de HCl al 30%, NaOH 6 M, EDTA (5 mg/25 ml) e hipoclorito de sodio al 2%.

Los equipos y herramientas utilizados en este estudio comprendieron un sonicador QSONICA SONICATORS para cavitación, un durómetro PHARMAG INSTRUMENTS - EZ TAB para pruebas de dureza, un texturómetro LAMY RHEOLOGY para la determinación del módulo de Young, un espectrómetro IR ALPHA II marca BRUKER, un microscopio electrónico de barrido Dual Beam SEM-FIB, y un difractómetro de rayos X PANalytical modelo X'PERT PRO MPD. Para las pruebas gravimétricas, se utilizó una balanza OHAUS con capacidad de 3000 g y precisión de ±0.01 mg.

El análisis de datos se realizó utilizando la aplicación R Estudio para Windows, Excel y software especializado para análisis ANOVA.

2.2. MÉTODOS

Protocolo para la generación de una matriz ósea de origen bovino por cavitación con atributos mecánicos y físico químicos adecuados

2.2.1 DESMINERALIZACIÓN

Para hacer la comparación de ambos métodos de desmineralización con un agente ácido se adquirió fémur bovino de un frigorífico el cual fue sometido a un corte para obtener cubos de 1cm por lado. Luego se trató con solventes orgánicos (hexano y éter etílico) y con métodos mecánicos para remover todo el contenido que no fuera hueso. Seguido a esto fue sometido a hipoclorito al 2% para eliminar material microbiológico y se lavó varias veces con agua destilada.

Para la determinación del tiempo óptimo de desmineralización, en primer lugar, se propuso un intervalo de tiempo entre uno y nueve días para realizar la desmineralización [11]. Luego se realizó la preparación de una solución de HCl al 0.5 N [12]. Seguido a esto se formaron 9 grupos de muestras de hueso que contenían 30 cubos cada una. Se expuso cada uno de estos grupos a un intervalo de tiempo diferente en el HCl a 20°C con agitación cada 24 horas y algunos acompañados de cavitación según el grupo, exceptuando la muestra control, la cual no se sometió a ningún tipo de desmineralización.

2.2.2 DESMINERALIZACIÓN SIN CAVITACIÓN

Los primeros cuatro grupos de las muestras de hueso (cada una de 30 cubos de 1cm x 1cm) fueron depositados en HCl 0.5 N almacenado en frascos de vidrio de borosilicato 3.3 con agitación suave cada 24 horas. Después de completar los días de desmineralización de cada muestra (1, 3, 6 y 9 días) se retiró el ácido. Se removió el exceso de ácido y minerales presentes en la muestra con dos lavados con agua destilada. Luego de garantizar la completa remoción de los reactivos que se encontraban en el hueso, los cubos se liofilizaron durante 24 horas.

2.2.3 DESMINERALIZACIÓN CON CAVITACIÓN

Para los cuatro grupos de 30 cubos de hueso , se utilizaron los intervalos de tiempo de desmineralización establecidos previamente, y los fragmentos de hueso se sumergieron en HCl 0.5N. A continuación, se empleó la sonda ultrasónica QSONICA SONICATORS, llevando a cabo la sonicación con una amplitud del 50% y pulsos de 5 minutos hasta completar un tiempo total de 30 minutos de exposición cada 24 horas [8,13]. Los intervalos de tiempo se definieron cuidadosamente para evitar el sobrecalentamiento del equipo, ya que la sonda ultrasónica generaba energía en forma de calor, lo que podría ocasionar una degradación indeseada de la fase orgánica de la matriz ósea. Por ello, la temperatura fue monitoreada constantemente con un termómetro, asegurando que no superará los 50°C [13]. Al finalizar los días de desmineralización de cada muestra, se eliminó el exceso de ácido, y se continuó con el procedimiento descrito anteriormente.

Abreviatura de la muestra	Descripción	Abreviatura de la muestra	Descripción
C	Muestras control sin tratamiento de desmineralización	**C1**	Control
DS1	Muestra desmineralizada por 1 día pero sin aplicar cavitación	**D1**	Muestra desmineralizada por 1 dia con cavitación
DS3	Muestra desmineralizada por 3 dias pero sin aplicar cavitación	**D3**	Muestra desmineralizada por 3 dias con cavitación
DS6	Muestra desmineralizada por 6 dias sin aplicar cavitación	**D6**	Muestra desmineralizada por 6 dias con cavitación
DS9	Muestra desmineralizada por 9 dias pero sin aplicar cavitación	**D9**	Muestra desmineralizada por 9 dias con cavitación

Tabla 1 Definición de las abreviaturas de cada uno de los grupos de las muestras de hueso .

2.4. CARACTERIZACIÓN DE LA MATRIZ ÓSEA DESMINERALIZADA DE ORIGEN BOVINO MEDIANTE ENSAYOS FISICO QUIMICOS Y MECANICOS

Se caracterizó la matriz ósea desmineralizada (MOD) de origen bovino por medio de pruebas como gravimetría, prueba de dureza y la rigidez con las siguientes pruebas:

2.6. PRUEBA DE GRAVIMETRÍA

Para estudiar la desmineralización ósea a través de la pérdida de peso, en primer lugar, se seleccionó un total de siete cubos de hueso por cada uno de los 9 grupos, conforme a los días (0,1, 3, 6 y 9), al proceso que se aplicó (con cavitación o sin cavitación) y el grupo de las muestras control. De esta forma se registraron los pesos dados por una balanza OHAUS con capacidad de 3000 g y precisión de ±0.01

mg. Se realizó un promedio de los pesos obtenidos por cada grupo y entró a comparar versus los controles, calculando el porcentaje de peso perdido conforme a los controles de hueso sin tratar.

2.7 PRUEBA DE DUREZA

Se sometieron las muestras de matriz ósea desmineralizada (MOD) de cada grupo tratado y el grupo control a una fuerza proporcionada un durómetro PHARMAG INSTRUMENTS - EZ TAB hasta que se generó una deformación o en algunos casos la ruptura del material en el durómetro. Se registró el valor de la dureza en Newtons (N) sobre el área de la cara donde se aplicó la fuerza en el cubo de hueso, asegurando que la matriz ósea desmineralizada (MOD) siempre contará con su cara más uniforme orientada en la misma dirección con respecto a la fuerza aplicada por parte del durómetro [14]. Se efectuó la medición de la dureza en 7 muestras de la Matriz ósea desmineralizada (MOD) en cubos por cada grupo de tiempo definido y método de desmineralización junto con 7 del grupo control [14]. El equipo reporta la fuerza en N que ejerce sobre un área determinada del material, por lo tanto, tendríamos que él; cálculo de la dureza para este caso se puede definir mediante la ecuación:

$$Dureza=P/A$$

P: Fuerza aplicada en Newtons
A: Área sobre la cual se aplica la fuerza.
En donde se define el porcentaje de dureza a través de la comparación que se realiza con la muestra control y se calcula a través de esta fórmula:

2.8 DETERMINACIÓN DEL MÓDULO DE YOUNG

Para evaluar la rigidez de los cubos de matriz ósea desmineralizada por grupo y el grupo control, se realizó una prueba de compresión el cual empleó un texturómetro de marca LAMY RHEOLOGY a una velocidad de 0.1mm/s y con una posición de 70 mm. A continuación, se describen los procedimientos y cálculos necesarios para determinar el módulo de Young de las muestras [15].

Preparación de las muestras y configuración del equipamiento:

- **Preparación de las muestras:** Se prepararon cubos uniformes de las muestras y se registraron sus dimensiones iniciales con precisión.
- **Configuración del Texturómetro:** El texturómetro se equipó con un accesorio de compresión adecuado para la prueba. Se verificó y calibró el equipo para asegurar la precisión de las mediciones. En primer lugar, se seleccionó el tipo de ensayo que se iba a realizar el cual fue compresión directa, luego ajustó a una velocidad de 0.1mm/s de desplazamiento. Todas las muestras se midieron con la variable de fuerza en función de la distancia.
- **Posicionamiento de las muestras:** Las muestras se humedecieron con agua destilada y se posicionaron en la plataforma del texturómetro, asegurándose de que estuvieran adecuadamente alineadas y fijadas para evitar cualquier movimiento durante la prueba, a continuación, se seleccionó una fuerza inicial de 0.005N, la fuerza para 1 mm.

Procedimiento de la Prueba:

Durante la prueba de compresión, el texturómetro aplicó una fuerza controlada a las muestras y midió la respuesta en términos de fuerza aplicada y deformación. Estos datos permitieron calcular el módulo de Young, que es una medida de la elasticidad del material [16].

Cálculo del Módulo de Young:

- **Medición de la Fuerza Aplicada:** El texturómetro proporcionó datos sobre la fuerza aplicada a las muestras. Esta fuerza se mide en newtons (N).
- **Determinación del Área de Aplicación de la Fuerza:** Se calculó el área (A) sobre la cual se aplicó la fuerza. El área se midió en metros cuadrados (m^2).
- A=LxL
- A= cm^2 x (m^2/10000m^2)
  La tensión se calculó empleando la fórmula:
  σ=F/A
  donde F fue la fuerza aplicada (en newtons) y A el área (en metros cuadrados).
- **Medición de la deformación:** Se midió el grosor de la muestra antes de aplicar cualquier fuerza (Longitud inicial). Luego, se aplicó la fuerza correspondiente con el texturómetro y se midió la nueva longitud de la muestra (Longitud final). La deformación (ϵ) se calculó a partir del cambio en la longitud (ΔL) con respecto a la longitud inicial (L0)
  Cambio de longitud:
  ϵ=ΔL/L0
  Deformación:
  D=d(mm)/(L(mm)/10mm)
  donde L es la longitud final y L0 es la longitud original de la muestra.
- **Cálculo del Módulo de Young:** Con los valores de esfuerzo (σ\sigma$\sigma$) y deformación (ϵ\epsilon$\epsilon$) obtenidos, el módulo de Young (E) se determinó mediante la siguiente fórmula:
  E=ϵ/σ
  El módulo de Young se expresó en Pascales (Pa) en el Sistema Internacional de Unidades [17][18].

Se repitió el proceso con siete muestras por cada intervalo de tiempo en cada uno de los métodos para obtener un valor promedio y se tuvo en cuenta la variabilidad entre ellas.

Por otro lado, para cumplir completamente los objetivos también se caracterizaron parámetros de carácter físicoquímico como el calcio remanente, la porosidad y grupos funcionales mayoritarios a partir de espectroscopia IR.

2.9 TITULACIÓN COMPLEJOMÉTRICA PARA DETERMINAR CALCIO REMANENTE

Para determinar el contenido de calcio en las muestras de hueso de manera más exacta, se realizó una titulación complejométrica con EDTA. Se realizó el corte del hueso de tal manera que el peso aproximado fuera de 400 mg de cada muestra de hueso, luego se realizó una digestión ácida empleando HCl 6 M. La digestión se llevó a cabo a 100 °C con agitación a 130 rpm durante 20 minutos en una plancha de calentamiento marca OHAUS GUARDIAN 5000[19]. Posteriormente, se enfrió la solución y se ajustó el pH a entre 10 y 11 con NaOH 6 M. Se añadieron 3 gotas de Negro de Eriocromo T como indicador y se tituló con EDTA (5mg/25 ml)) [20]. El punto final de la titulación se identificó por el cambio de color de rosa tenue a morado intenso, lo que permitió cuantificar el contenido de calcio en las muestras.
La prueba se realizó por triplicado en un total de 27 muestras de hueso correspondientes al tiempo de desmineralización y al método empleado (cavitado o sin cavitar), incluyendo las muestras control.

2.10 DETERMINACIÓN DE LA POROSIDAD

Para llevar a cabo este estudio, se emplearon cuatro muestras de cubos desmineralizados mediante cavitación, las cuales fueron etiquetadas con los días correspondientes a su proceso de

desmineralización. Asimismo, se seleccionaron otras cuatro muestras obtenidas a través de la desmineralización tradicional con ácido, que se rotularon de la misma manera. Por último, se incluyó una muestra control sin desmineralizar, que se etiquetó como CC. A continuación, se realizó un corte en cada uno de los cubos para reducir su tamaño y permitir que encajaran en los picnómetros, los cuales tenían una capacidad de 25 mL. Se establecieron cuatro pesos fundamentales: (w1) peso base de la muestra, (W2) peso de la muestra más PBS, (W3) peso del picnómetro vacío y (W4) peso total del picnómetro con solución PBS y muestra húmeda [21].

En primer lugar, se pesó la muestra seca. Luego los cubos de hueso se sumergieron en una solución buffer con pH 7.4 para su rehidratación. Después de un tiempo de remojo, se retiraron los cubos, se pesaron nuevamente para registrar el peso post-rehidratación, indicando la cantidad de líquido absorbido [21].

Los cubos de hueso fueron ubicados en el picnómetro lleno de buffer y se dejaron reposar durante 10 minutos. A continuación, se añadió más buffer hasta completar el volumen del picnómetro, y luego se pesó el conjunto que incluía el hueso y el buffer. Se registraron tres medidas de peso: el del picnómetro vacío, el del cubo rehidratado y el del picnómetro con el hueso sumergido en buffer. Este procedimiento permitió determinar el porcentaje de porosidad de cada cubo, mediante el desplazamiento de líquido, midiendo el volumen desplazado por el hueso poroso al sumergirlo en el buffer.

$$P(\%) = 1 - \left(\frac{\rho \text{ soporte húmedo}}{\rho \text{ fibras de colágeno}}\right) x100$$

2.11 ESPECTROSCOPIA INFRARROJA

La prueba de IR se realizó con un espectrómetro IR ALPHA II de la marca BRUKER, con el propósito de determinar los grupos funcionales orgánicos que se encontraban en la muestra, y el análisis se realizó en un espectrofotómetro a temperatura ambiente y presión constante en Bogotá. Las mediciones para ambos casos se registraron en un intervalo de longitud de onda entre 4000-400 cm^{-1} [22].

El primer paso consistió en realizar una limadura del hueso, generando un polvo que se almacenó en tubos falcon para prevenir la absorción de humedad. Posteriormente se llevaron a cabo 5 escaneos para obtener cada espectro de IR analizando las muestras correspondientes al control, día 9 sin cavitación y día 9 con cavitación.

2.12 MICROSCOPÍA ELECTRÓNICA DE BARRIDO (SEM)

Esta prueba ayudó a determinar la morfología del hueso a través de la medición de los poros utilizando el microscopio electrónico de barrido Dual Beam SEM-FIB, configurado con un voltaje de aceleración de 10 kV, a una ampliación de imagen de 100 X, una distancia de trabajo de 9.89mm y un campo de visión 2.07. La estimación del tamaño de los poros se realizó de manera independiente a través de la aplicación ImageJ, y posteriormente se calculó el índice de polidispersidad. La ecuación utilizada para determinar este índice proporciona información sobre el grado de dispersión de los poros entre sí.

$$PDI = \left(\frac{\sigma}{d_{\text{medio}}}\right)^2$$

σ= corresponde a la desviación estándar calculada con el área del poro
dmedio= Se obtiene mediante el promedio de las áreas halladas

2.13 DIFRACCIÓN DE RAYOS X

Para estudiar la cristalinidad de las muestras de hueso, se utilizó la difracción de rayos X (XRD) con el equipo MULTIUSOS MARCA PANalytical modelo X'PERT PRO MPD, configurado con la óptica de Bragg-Brentano en una plataforma fija MPS, calibrada a un voltaje de 45 kV y una corriente de 40 mA. El procedimiento comenzó con la preparación de las muestras, que debían ser secadas y molidas hasta obtener un polvo fino. Este polvo se utilizó para asegurar una distribución uniforme y obtener mediciones precisas.

Las muestras en polvo se posicionaron en un soporte adecuado para la difracción y se introdujeron en el difractómetro de rayos X. Se ajustó el difractómetro para realizar mediciones en el rango de ángulos 2θ. Las mediciones de difracción estaban alrededor de 40 a 60° 2 THETA l.

2.14 ANÁLISIS ESTADÍSTICO CON ANOVA

El análisis estadístico se desarrolló a través de la comparación de los resultados empleando un analizador de varianza unidireccional denominado ANOVA. El análisis se realizó a través de una aplicación denominada R-Studio para Windows. El intervalo de confianza se ajustó a un 95%, considerando de esta manera que $p<0.05$.

3. RESULTADOS

3.1 GRAVIMETRÍA

En la figura 1 se presenta el porcentaje de desmineralización en función del tiempo para cada una de las muestras, las cuales cuentan con una tendencia decreciente en función del tiempo y tipo de tratamiento. La muestra control inició con un 100% y finalizó, la muestra desmineralizada mediante cavitación en el día 9 (D9) mostró un 40% de material desmineralizado, mientras que la muestra correspondiente al día 9 de desmineralización sin cavitación (DS9) evidenció un 60% de hueso remanente.

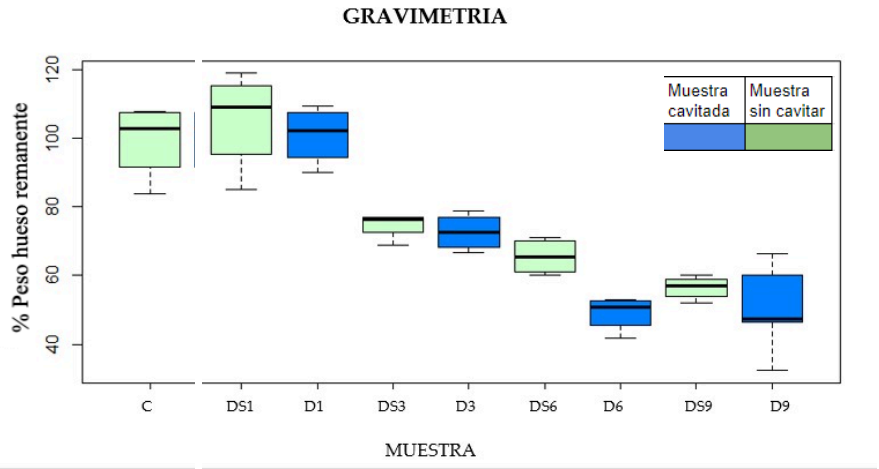


Figura 1: Gráfica de cajas y bigotes resultados de % peso remanente de las muestras desmineralizadas frente a los controles de acuerdo a días 0,1,3,6 y 9

3.2 PRUEBA DE DUREZA

La figura 2 muestra los valores de dureza normalizada con respecto a la dureza inicial de los huesos sin tratar, por ende se exponen como porcentajes de la caída de la dureza en las muestras desmineralizadas. Cabe resaltar que el valor promedio de dureza inicial de los huesos sin tratar oscila entre 16.9 N/cm^2 y 38.33 N/cm^2.

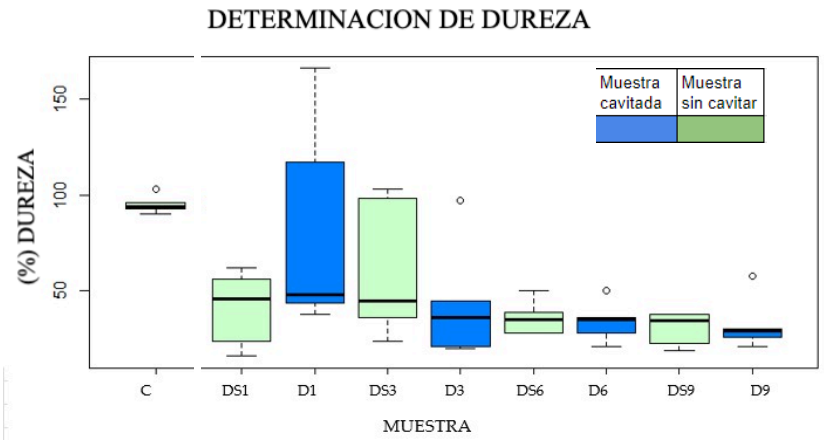


Figura 2: Resultados de la dureza inicial comparada con la dureza de todas las muestras según los días,1,3,6 y 9 de acuerdo con la metodología expuesta

3.3 PRUEBA DE DETERMINACIÓN DEL MÓDULO DE YOUNG

Los valores obtenidos para el proceso **sin** cavitación oscilan entre $1X10^{-8}$ y $4x10^{-9}$ mientras que en la muestra **con** cavitación oscilan entre $1x10^{-8}$ y $3x10^{-9}$ como se observa en la figura 3.

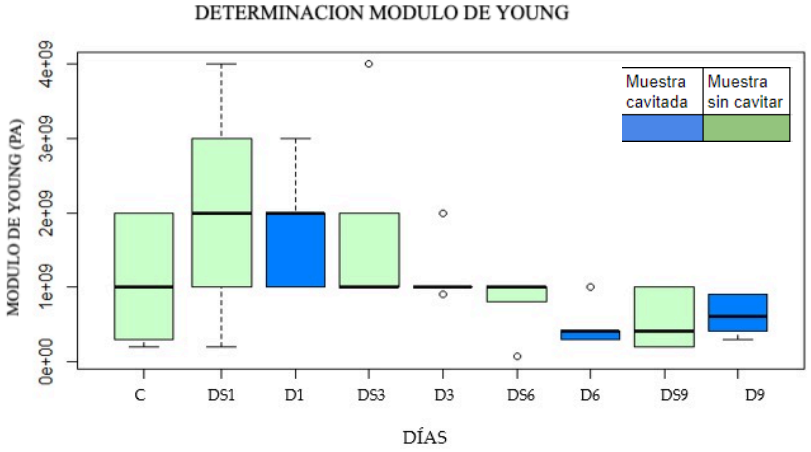


Figura 3: Determinación del módulo de young de las muestras cavitadas y sin cavitar a través del tiempo.

3.4 TITULACIÓN COMPLEJOMÉTRICA PARA DETERMINAR CALCIO REMANENTE

La figura 4 mostrada a continuación permite observar el comportamiento de las muestras cavitadas (Azul) y sin cavitar (naranja) en función de los días de desmineralización de cada una de las muestras y se observa una tendencia en la disminución del porcentaje de calcio de las muestras.

Figura 4: Porcentaje de calcio remanente por día a muestras desmineralizadas sin cavitación, además, de la muestra control sin desmineralizar.

	Sin Cavitación	Cavitado	
Días	**Desviación Estándar**	**Días**	**Desviación estándar**
Control	1.537E-05	NA	NA
Dia 1	1.266E-05	Dia 1	1.006E-05
Dia 3	1.006E-05	Dia 3	6.071E-10
Dia 6	7.683E+06	Dia 6	1.047E-05
Dia 9	4.470E+05	Dia 9	1.006E-05

Tabla 2: Promedio y Desviación Estándar del Proceso de Desmineralización en Muestras Control, Cavitadas y Sin Cavitar en prueba de determinación del % de calcio remanente.

3.5 POROSIDAD

Los resultados de la prueba de porosidad se consignan en la figura 5 de las muestras de matriz ósea con y sin cavitación por cada uno de los días sometidos a desmineralización acompañado de la muestra control para comparar, donde se evidencia claramente un aumento proporcional de la porosidad que va desde un 30% hasta un 50% conforme se someten a más días de desmineralización.

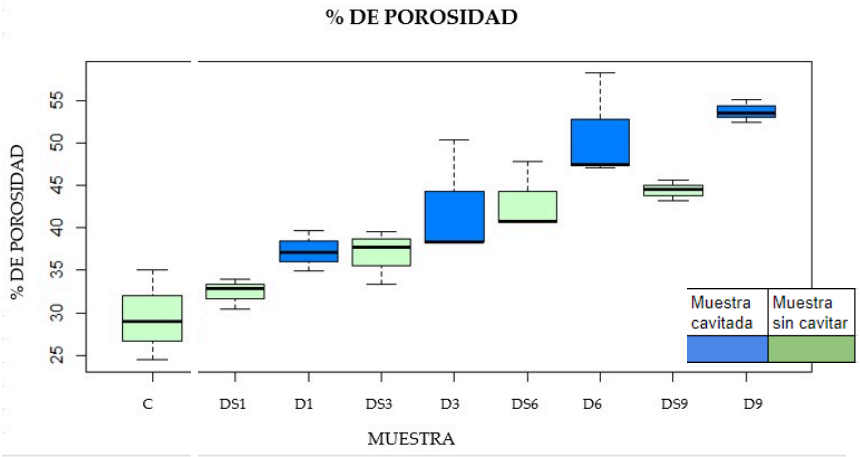


Figura 5: Gráfica de cajas y bigotes resultados de porcentaje de porosidad en función del tiempo de desmineralización frente a los controles

3.6 ESPECTROSCOPIA INFRARROJA (IR)

Se analizaron las muestras tratadas con cavitación (b) y sin cavitación (a) mediante Espectroscopia IR para determinar los grupos funcionales presentes en los dos materiales, obteniendo las siguientes bandas en 1634 cm^{-1},1737 cm^{-1}, 1470 cm^{-1}, 1177 cm^{-1}, 2010 cm^{-1} y 2015 cm^{-1}.

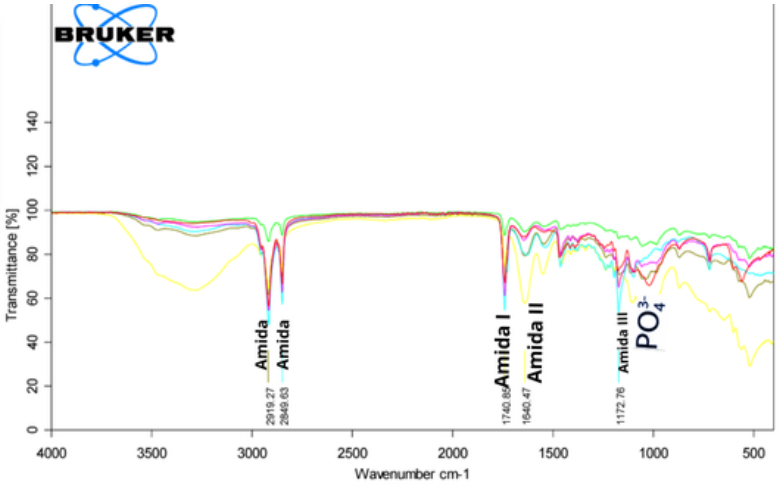


Figura 6: Espectro IR muestra **sin cavitación** en función de los días de desmineralización (0, 1, 3,6 y 9)

Tabla 3: Descripción de la relación de colores según muestra control (azul agua marina), día 1 (verde manzana), día 3 (café), día 6 (amarillo) y día 9 (rosa)

Muestra	Colores
Control	Azul
Dia 1	rojo
Dia 3	rosa
Dia 6	Gris
Dia 9	Verde

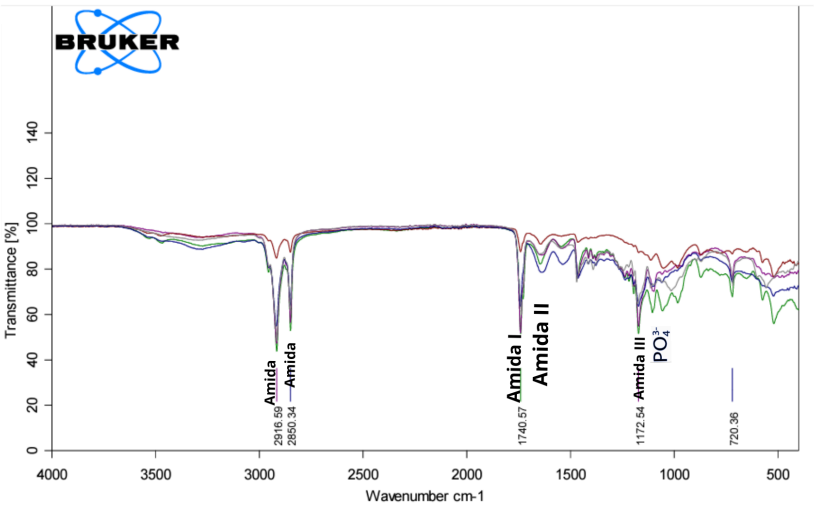


Figura 7: Espectro IR muestra **con cavitación** en función de los días de desmineralización (0,1,3,6 y 9)

	Colores
Control	Verde
Dia 1	Rosa
Dia 3	Azul
Dia 6	cafe
Dia 9	rojo

Tabla 4: Descripción de la relación de colores según muestra control (Rojo), día 1 (amarillo), día 3 (rosa), día 6 (azul agua marina) y día 9 (verde manzana)

3.7 MICROSCOPÍA ELECTRÓNICA DE BARRIDO

La microscopía electrónica de barrido permitió observar la superficie del hueso desmineralizado en cada uno de los métodos, con cavitación, sin cavitar y también la muestra control.

Los resultados de la tabla 5 muestran los valores obtenidos para las muestras en esta prueba, donde la **muestra control** presenta un área promedio de 0.120 mm² y un diámetro promedio de 0.368 mm, mientras la **muestra sin cavitar** tiene un área promedio de 0.068 mm² y un diámetro promedio de 0.264 mm, y por otra parte **muestra cavitada** muestra un área promedio de 0.010 mm² y un diámetro promedio de 0.110 mm.

Muestra	Área promedio	Desviación	Diámetro promedio	Desviación estándar
Muestra control	0.120	0.080	0.368	0.134
Muestra sin cavitar	0.068	0.038	0.264	0.086
Muestra cavitada	0.010	3.221E-04	0.110	0.032

Tabla 5 : Comparación de los valores promedio de área y diámetro, junto con sus respectivas desviaciones estándar, para tres tipos de muestras: **control**, **sin cavitar** y **cavitada**.

Como se muestra en la tabla 5, a través del resultado de tamaño de poro se calculó el índice de polidispersidad (IPD) donde la muestra control arrojó un valor de 2.821,la muestra sin cavitación 1.035 y por último la muestra cavitada un valor 1.6766.

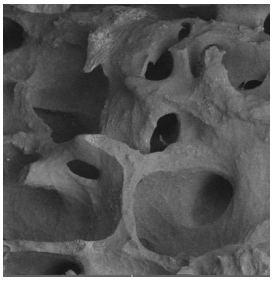
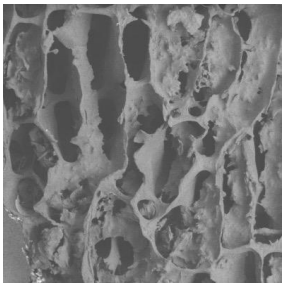
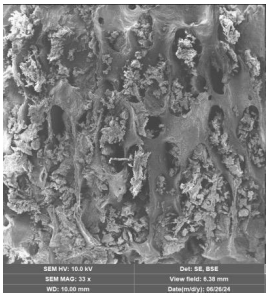
 (a)	 (b)	 (c)
Índice de polidispersidad: Muestra control 2.821120272	Índice de polidispersidad: Sin cavitación 1.035936227	Índice de polidispersidad: Con cavitación 1.676665934

Figura 8: (a) Microscopia electrónica de barrido en función del tiempo de desmineralización muestra control, (b) Microscopía electrónica de barrido en función del tiempo de desmineralización día 9 sin cavitación, (c) Microscopía electrónica de barrido en función del tiempo de desmineralización día 9 con cavitación

3.8 ESPECTROSCOPIA DE RAYOS X DE DISPERSIÓN DE ENERGÍA (ERX)

En las figuras que se muestran a continuación se registran los resultados arrojados por la prueba de espectroscopia de rayos x, tanto las imágenes proporcionadas por el equipo de las distintas muestras sometidas a la prueba como los gráficos de la composición porcentual de la superficie de las muestras.

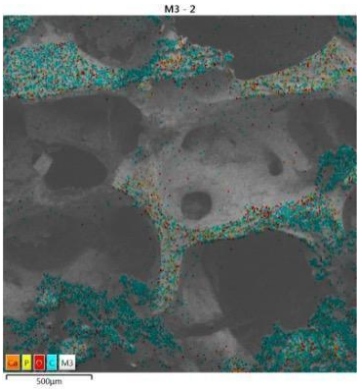


Figura 9: Mapa de composición superficial de la matriz ósea desmineralizada (muestra control). Muestra la distribución de componentes con diferentes colores naranja (calcio), amarillo(fósforo), rojo (oxigeno) azul (carbono) y M3 (la muestra control) que indican variaciones en la concentración de elementos

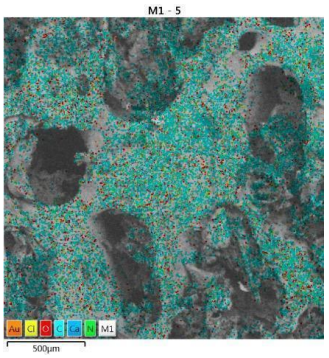


Figura 10: Mapa de composición superficial de la matriz ósea desmineralizada (muestra cavitada). Muestra la distribución de componentes con diferentes colores naranja (oro), amarillo(cloro), rojo (oxigeno) azul agua marina (carbono), azul oscuro(calcio), verde (nitrógeno) y M1 (la muestra control) que indican variaciones en la concentración de elementos

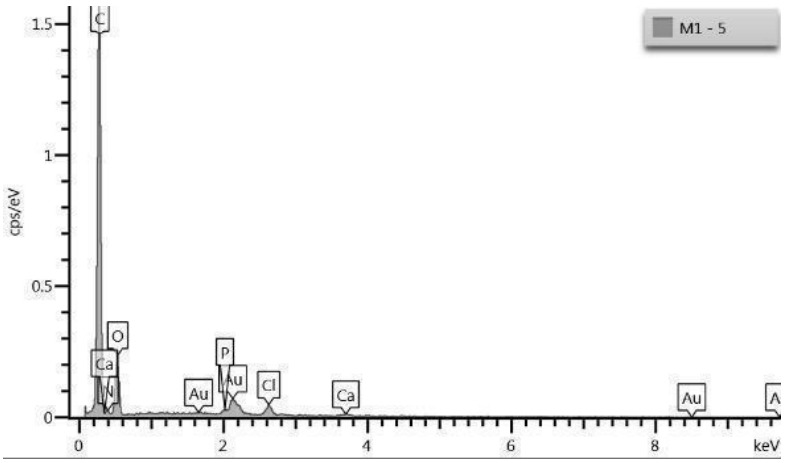


Figura 11: Espectro de absorción de la matriz ósea desmineralizada (muestra cavitada). Presenta las bandas de absorción que indican la presencia y concentración de elementos presentes en la matriz.

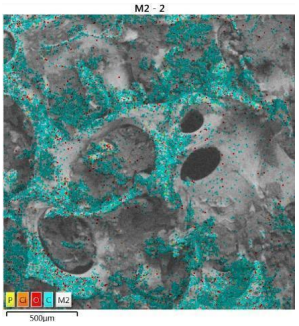


Figura 12: Mapa de composición superficial de la matriz ósea desmineralizada (muestra sin cavitación). Muestra la distribución de componentes con diferentes colores naranja (cloro), amarillo(fósforo), rojo (oxigeno) azul (carbono) y M2 (la muestra sin cavitar) que indican variaciones en la concentración de elementos.

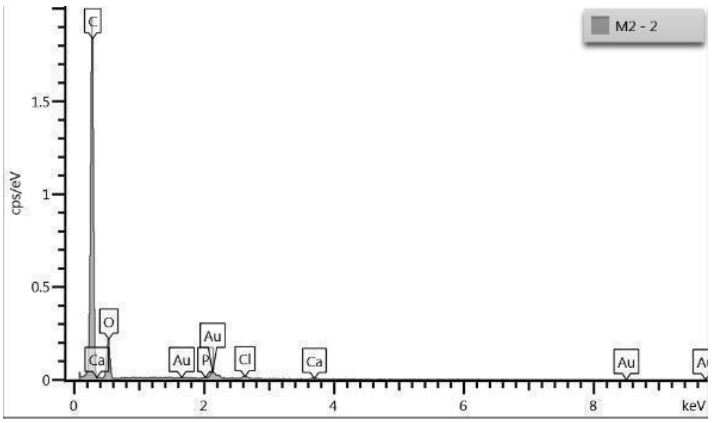


Figura 13: Espectro de absorción de la matriz ósea desmineralizada (muestra sin cavitar). Presenta las bandas de absorción que indican la presencia y concentración de elementos presentes en la matriz.

Sin Cavitación		Cavitado	
Elementos	**(%) Presente en la muestra**	**Elemento**	**(%) Presente en la muestra**
C	86.080	C	79.290
O	13.60	N	4.900
P	0.02	O	14.99
Cl	0.19	P	0.12
Ca	0.10	Cl	0.52
NA	NA	Ca	0.53
NA	100	NA	100

Tabla 6:(a) Resultados obtenidos de la composición superficial de la matriz ósea desmineralizada sin el método de cavitación (izquierda), (b) Resultados obtenidos de la composición superficial de la matriz ósea desmineralizada con el método de cavitación (Derecha).

3.9 DIFRACCIÓN DE RAYOS X

Las figuras 14 y 15 presentan los perfiles de difracción de rayos X (XRD) de la muestra control y de la muestra tratada con cavitación, respectivamente. En ambas figuras se pueden observar los picos correspondientes a las fases cristalinas presentes en las muestras, lo que refleja las características estructurales asociadas a cada tratamiento. En el difractograma se evidencian pocas señales, constituidas por picos anchos.

Figura 14: Perfil de difracción de rayos X de la muestra control

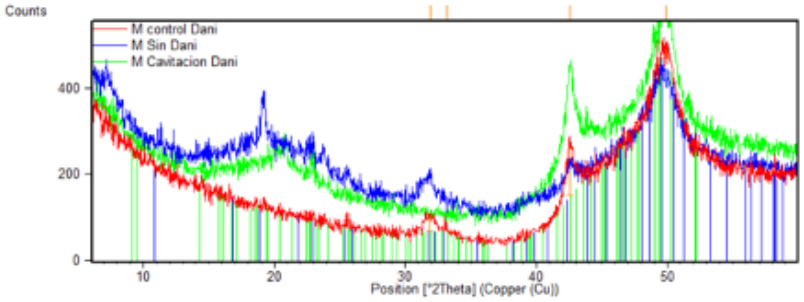


Figura 15: Perfil de difracción de rayos X de la muestra cavitada

4. Discusión.

4.1 GRAVIMETRÍA

El hueso es un material biológico que está constituido un 50-70% de componente inorgánico en su mayor parte hidroxiapatita y el restante como fase orgánica como colágeno, material celular, entre otras. [23] La hidroxiapatita que es la encargada de contener la fase mineral y a su vez es responsable tanto de la dureza como de la rigidez del tejido óseo,[24 25] es retirada durante el proceso de desmineralización. [27]

La determinación de la pérdida de peso durante el proceso de desmineralización es esencial para evaluar la cantidad de material inorgánico eliminado de las muestras óseas[27]. Al analizar los tres tipos de muestras, las cavitadas, sin cavitación y el grupo control, los resultados obtenidos indican que el proceso de desmineralización alcanzó su mayor eficiencia alrededor del día 6 con un valor de 39.225%, en el caso de la muestra cavitada y 52.783% en el caso de la muestra sin cavitar , como se detalla en la Figura 1.

Es relevante mencionar que, según el estudio de Siyuan Pang et al., en su investigación sobre la comparación de diferentes protocolos para la desmineralización del hueso cortical, se llevó a cabo un tratamiento de 7 días utilizando una solución de EDTA/HCl, la cual logró degradar casi todo el contenido inorgánico de la fase mineral, dejando solo un 10% de minerales. Estos resultados concuerdan con nuestros hallazgos de desmineralización, ya que los resultados indican que la desmineralización alcanzó su mayor eficiencia alrededor del día 6 en el proceso con cavitación, momento en el cual la eliminación de minerales de la matriz ósea fue notable, alcanzando una pérdida de peso promedio del 60% en muestras cavitadas, en contraste con las no cavitadas, que no superaron el 50% sugiriendo que la cavitación acelera la remoción de la fase inorgánica. [28]

Sin embargo, es importante destacar que en el día 1 de desmineralización, las muestras tanto cavitadas como no cavitadas mostraron un porcentaje muy similar al de la muestra control (100%). En el día 3, el

porcentaje disminuyó a un 80%, indicando que el proceso de desmineralización comienza a ser más efectivo en ese tiempo.De acuerdo a Figueiredo M que habla de los tiempos de inmersión de 48 h en solución ácida 0.6 M, la cual es congruente con nuestros resultados pues ellos estipulan que a las 48 horas aun queda mas del 50% del calcio residual, confirmando que nuestro proceso de desmineralización se encuentra de acuerdo a la tendencia.[29]

Esto es consistente con los resultados obtenidos en este estudio, ya que para las muestras analizadas, se evidencia que, aunque hubo avances en la desmineralización, aún se mantenía una cantidad significativa de material inorgánico en días tempranos del proceso.

Se observa que para las muestras desmineralizadas, tanto cavitadas como no cavitadas, no se alcanzaron pérdidas de peso del 80% lo cual indica que no se produjo la degradación del material orgánico de la muestra ósea [23]. Estos hallazgos son consistentes con la literatura, que establece que el contenido inorgánico en el hueso no debe exceder el 70% [28], por ende, su pérdida de peso no debería superar este valor. Este proceso de desmineralización es efectivo para el caso de la cavitación hasta el día 6 comparándolas con las muestras sin cavitación, las cuales alcanzaron pérdidas de peso hasta el día 9.

El análisis ANOVA, encontrado en el ANEXO 1, mostró diferencias estadísticamente significativas entre varias de las muestras desmineralizadas con y sin cavitación, con valores de probabilidad menores a 0.05 en la mayoría de las comparaciones. Destacan las diferencias entre las muestras **C y B** ($p = 0.00169$), **D y A** ($p = 0.0004266$) y **D1 y A1** ($p = 0.0000004$), lo que indica que los tratamientos, especialmente la cavitación, afectan significativamente el proceso de desmineralización.

Se muestra entonces como la desmineralización vía ácida empleando cavitación es efectiva al remover gran parte del material inorgánico y preservar las fibras de colágeno [30] que constituyen dicha fase [23]. A pesar de lo anterior no fue conveniente dejar este proceso hasta el día 9, dado que entre el día 6 y el día 9 no se evidencian cambios importantes en la masa remanente y si podrían iniciarse degradación del colágeno.v

4.2 PRUEBA DE DUREZA

En la Figura 2, se presenta el promedio y la desviación estándar de las pruebas de dureza en muestras control, cavitadas y sin cavitación. En el grupo sin cavitación, la dureza promedio comenzó en 95.574% (control) y cayó a 41.472% en el Día 1, 61.926% en el Día 3, 36.645% en el Día 6, y 30.368% en el Día 9 con respecto a la dureza de las muestras control. Como se puede observar el día 3 no sigue la tendencia decreciente de la dureza conforme al tiempo, pero esto se explica con la heterogeneidad del hueso en donde se encontrarán las partes externas con más dureza que las internas [24,25].

Por otro lado, en el proceso con cavitación, también se evidencia una alta incertidumbre en los valores iniciales lo cual puede encontrar explicación en la heterogeneidad inherente del hueso la cual afecta las propiedades mecánicas intrínsecas del material [26]. Los valores promedios de dureza en este grupo comenzaron en **82.866%** en el Día 1, cayeron a **44.238%** en el Día 3, y luego a **34.543%** en el Día 6 y **33.286%** en el Día 9. Estas diferencias indican que, aunque el proceso de cavitación también promueve la desmineralización, los resultados reflejan características que difieren entre el hueso poroso y el hueso trabecular. Al no hacer una correcta selección del hueso dependiendo de su ubicación, se generan diferencias significativas en las muestras dentro del mismo grupo de desmineralización [23].

En los días posteriores las diferencias en dureza no son significativas, aunque los valores fueron ligeramente menores en comparación con el proceso sin cavitación. Como se muestra en los resultados de ANOVA que indican la relación entre las muestras desmineralizadas D-A1 y D1-A1 las cuales presentan probabilidades de 0.0216 y 0.0155, respectivamente, sugiriendo que la comparación entre estas es significativa. Sin embargo, otros pares, como D-B1 ($p = 0.1412$) y E-B1 ($p = 0.0644$), no muestran diferencias significativas.

La incertidumbre en las mediciones limitan la capacidad para determinar cuál es el mejor método. La disminución observada en el día 9 con cavitación, aunque no es altamente significativa, muestra una tendencia clara de reducción en la dureza en comparación con la muestra sin cavitación. Esta tendencia puede atribuirse al efecto mecánico de la cavitación, que genera microburbujas que, al colapsar,

producen fuerzas de choque y microjets que impactan en la superficie del hueso. Estos eventos pueden intensificar el proceso de desmineralización al remover de manera más efectiva las partículas minerales y orgánicas, debilitando la estructura y reduciendo su dureza. Aunque el impacto no es drásticamente mayor, la presencia de esta tendencia sugiere que la cavitación contribuye a un mayor grado de descomposición de la matriz ósea en comparación con los tratamientos sin cavitación.

4.3 ESPECTROSCOPIA INFRARROJA

Los espectros infrarrojos obtenidos con ambos métodos de desmineralización (sin cavitación y con cavitación) se pueden observar en las Figuras 6 y 7 respectivamente. La banda a 1737 cm^{-1} indica la presencia de grupos carbonilo (C=O) [30,31], que son comunes en la estructura orgánica del colágeno, formado en el momento del enlace peptídico en donde se unen dos aminoácidos por un lado de la amina y del ácido carboxílico,[30] sugiriendo que, a pesar de los tratamientos, se conservan las características proteicas del hueso y se relaciona esta banda con una amida primaria [31].

Por otro lado, la banda a 1634 cm^{-1}, asociado con las vibraciones de CH_2, refuerza la idea de que las bandas de CH_2 simétricas y antisimétricas aumentan en intensidad tras el tratamiento, lo que es indicativo de la presencia de una amida secundaria [32]. La banda en 1470 cm^{-1} podría estar relacionada con bandas de amida terciaria, sugiriendo que ciertos grupos funcionales propios de proteínas como el colágeno permanecen a pesar del tratamiento. Finalmente, la banda a 2819 cm^{-1} puede asociarse con vibraciones de grupos funcionales asociados a grupos C=C y se le asigna la amida B, por otro lado, la banda correspondiente a 2919 cm^{-1} corresponde a una amida A. Por último se evidencia una banda no tan evidente en 1014 cm^{-1} que representa el grupo fosfato. Todas las bandas citadas anteriormente son similares a las bandas que se encuentran en descritas por Pang S que menciona bandas de fosfato entre 500 cm^{-1} y 1012 cm^{-1} , las presencia de amidas primarias secundarias y terciarias, ademas de la presencia de picos alrededor de 2919 que representa la amida A , confirman la coherencia de los datos obtenidos [35]

La disminución de los picos propios del grupo fosfato, especialmente aquellos en la banda correspondiente a 1014 cm^{-1}, sugiere que la desmineralización provoca la pérdida de parte de la fase mineralizada del hueso, dado que los fosfatos son componentes clave de la hidroxiapatita [23, 24, 25]. Sin embargo, la persistencia de estas bandas indica que no todo el componente mineral se elimina durante el proceso [27, 34]. Se observa también como con el pasar de los días las bandas del espectro infrarrojo correspondientes a amidas disminuyen de intensidad independientemente del uso o no de cavitación en el proceso de desmineralización, pero son menos prominentes que cuando se inicio el proceso de cavitacion. Lo anterior sugiere que el colágeno (mayor componente de la matriz orgánica) se encuentra presente en la muestra y que lo que se conserva tras el ataque del ácido son los componentes orgánicos, lo cual proporciona una visión crucial sobre la dinámica de la desmineralización.

En conjunto, estas señales evidencian el comportamiento tanto de la matriz orgánica como de la matriz inorgánica en la desmineralización ósea, ofreciendo información valiosa sobre los efectos diferenciados del tratamiento en la estructura y composición de los huesos [33, 34]

4.4 MICROSCOPÍA ELECTRÓNICA DE BARRIDO (SEM)

El análisis micrográfico de las muestras de hueso, mostrado en la figura 8, reveló una notable heterogeneidad en términos de porosidad, resaltando la complejidad estructural del tejido óseo incluso antes del tratamiento. Antes de comenzar, se consideró el término polidispersidad, que se utiliza para describir la distribución de tamaños de poro, en este caso, de los poros presentes en la muestra de matriz ósea desmineralizada. Los resultados se expresan como PDI, y según este valor, se puede determinar si la distribución de los poros es amplia o estrecha [36]. La micrografia resultante de esta investigación muestran claramente los mismos patrones característicos tridimensionales en los poros de la matriz ósea desmineralizada reportadas por Londoño Lopez , 2021[37]

Las imágenes obtenidas muestran una variabilidad considerable en la distribución y tamaño de los poros. La presencia de microfragmentos en los poros puede ser atribuida a dos procesos principales: el astillado durante el corte de la muestra y el proceso de desmineralización. La acumulación de estos microfragmentos puede alterar la representación visual del material, como ha sido descrito por Rincón

y colaboradores, quienes señalaron que los fragmentos resultantes del corte pueden quedar adheridos en la superficie del hueso y que cubren total o parcialmente su superficie [38].

Por otra parte, para el investigador es más difícil identificar la cantidad total de poros cuando se encuentran estos microfragmentos dentro de los poros, afectando así las mediciones realizadas por imagen y generando datos no tan robustos. La heterogeneidad observada entonces puede ser atribuida a varios factores, incluyendo la naturaleza del hueso utilizado, el astillado durante el corte de la muestra, el proceso de desmineralización.

Además, el análisis de las muestras mediante microscopía electrónica de barrido (SEM), como se presenta en la **tabla 5**, complementa esta observación al mostrar variaciones en el índice de polidispersidad (PDI) según las condiciones de desmineralización. La muestra control mostró un PDI elevado (2.82), lo que indica una distribución amplia de poros. En contraste, la muestra sin cavitación presentó un PDI bajo (1.04), sugiriendo una distribución más estrecha. La muestra con cavitación, con un PDI intermedio (1.68), sugiere que este proceso puede influir en la heterogeneidad de los poros. Los valores obtenidos pueden verse afectados por varios factores, incluyendo la naturaleza del hueso utilizado y el proceso de desmineralización, donde las áreas de mayor densidad pueden reaccionar de manera diferente al tratamiento [39]. No se encuentran referencias en la literatura similares que cuantifiquen el SEM por medio del índice de polidispersidad pero si se adentra de las características de la morfología que son muy similares a las que se pueden observar en las imagenes obtenidas en la investigación.[40]

Lo anterior indica que tanto el tamaño de poro como el IPD se pudieron ver afectados debido a la presencia de microfragmentos presentes en la muestra tras el tratamiento.

4.5 ESPECTROSCOPIA DE DISPERSIÓN DE ENERGÍA (EDS)

La EDS es una técnica analítica utilizada para identificar y cuantificar la composición elemental de materiales, a través de un haz de electrones que realizan un barrido alrededor de la superficie del hueso identificando cada elemento de acuerdo a su composición con un color diferente según las características propias del elemento.

La presencia de material amorfo sugiere que la desmineralización pudo generar subproductos que alteraron la estructura del material. En términos de composición química, ambas muestras desmineralizadas muestran una disminución significativa en la cantidad de hidroxiapatita, con niveles de calcio y fósforo que no superan el 1%. Esto indica que el proceso de desmineralización fue efectivo en la eliminación de estos minerales, un resultado consistente con estudios previos que analizan la eficacia de la desmineralización [41][42]. La predominancia de componentes orgánicos, evidenciada en la figura 11 por la presencia de carbono, sugiere que, tras la desmineralización, los componentes orgánicos del material se vuelven más prominentes como también se muestra en la figura 13. Cuando realizamos la comparación entre los resultados obtenidos en esta investigación y los resultados que se y los resultados de Londoño Lopez , 2021, se evidencia la presencia de oxígeno, calcio , calcio y fósforo, en el caso de la cavitacion por via convencional, que es congruente con los resultados obtenidos ya que se encuentran los mismos elementos pero en proporciones muy bajas del 1 %. [37]

La presencia de cloro en ambas muestras desmineralizadas puede explicarse por la utilización de ácido clorhídrico (HCl) durante el proceso de desmineralización. Además, la detección de nitrógeno en la muestra desmineralizada con cavitación figura 10 y figura 11 , pero no en la muestra sin cavitación como se evidencia en las figuras 12 y 13 las cuales no arrojan señales de dicho elemento ni en la muestra control tal y como se observa en la figura 9. Esto sugiere que el proceso de cavitación permite que el nitrógeno interactúe de manera diferente durante el tratamiento, lo que explica su presencia únicamente en el proceso de cavitación, como se detalla en la tabla 11.

4.6 POROSIDAD

La porosidad se manifiesta como una propiedad en constante aumento en función de las muestras desmineralizadas. Como se ilustra en la figura 5, existe una relación directamente proporcional entre el

tiempo de desmineralización y el porcentaje de porosidad. Las muestras comenzaron con un porcentaje aproximado de 29.48% y finalizaron con un porcentaje de porosidad de aproximadamente 53.58% en el caso de la muestra D9, y 44.46% para la muestra DS9. Este incremento en la porosidad se debe a la degradación gradual de la matriz inorgánica del material, un fenómeno ampliamente documentado en la literatura y respaldado por las micrografías obtenidas mediante Microscopía Electrónica de Barrido (SEM) [42].

En los primeros días del tratamiento, el ritmo de aumento de la porosidad fue más pronunciado, lo que puede atribuirse a la rápida disolución de componentes más reactivos o menos cristalinos de la matriz inorgánica. Sin embargo, conforme el proceso avanzó, se detectó una desaceleración en este incremento del porcentaje de desmineralización como se observa en la figura 5, particularmente entre los días 6 y 9 tanto del proceso de desmineralización con cavitación con valores correspondientes a 50.99% y 53.78% respectivamente como en el proceso de desmineralización sin cavitación con resultados 43,06% y 44.46%. Los resultados antes obtenidos son coherentes con lo descrito en la investigación de la revista scielo en el año 2007, en donde menciona que se obtuvieron matrices macroporosas de hidroxiapatita cristalina con porosidades entre 35,85% y 45,61%, estos rangos son muy parecidos a los obtenidos en la investigación presente correspondiente a la matriz osea desmineralizada, lo que sugiere la validez y confiabilidad de nuestros hallazgos. [44]

La comparación entre las muestras sometidas a cavitación y las que no fueron sometidas es particularmente reveladora. La cavitación, al generar microburbujas que colapsan severamente, produce micro turbulencias, ondas de choque y otros fenómenos mecánicos que pueden fragmentar la matriz inorgánica de manera más efectiva. Puede pensarse que este proceso no sólo aceleró la disolución de la matriz, sino que también podría estar generando poros adicionales al inducir microfracturas en la estructura del material. Este comportamiento se refleja en la porosidad superior de las muestras cavitadas, lo que demuestra la mayor efectividad de este tratamiento en comparación con la desmineralización convencional [46].

El comportamiento de material poroso a través del desplazamiento de líquidos se analizó de manera estadística con ayuda del programa ANOVA. El análisis ANOVA presentado en el ANEXO 3 revela que las muestras cavitadas presentan diferencias significativas en sus probabilidades gravimétricas en comparación con las muestras no cavitadas. Por ejemplo, la relación D1-A1 mostró una probabilidad de 0.0001944, indicando que hay una diferencia significativa en la porosidad entre estas muestras. En contraste, relaciones como B-A y B1-B, con probabilidades de 0.9970585 y 0.9204027 respectivamente, indican que no hay diferencias significativas entre ellas. Esto sugiere que las muestras cavitadas tienen una mayor variabilidad en su porosidad en comparación con las muestras no cavitadas.

4.7 DETERMINACIÓN DE CALCIO REMANENTE

En un análisis detallado de la figura 4, se observa que en el intervalo comprendido entre el día 0 y el día 1, las muestras sometidas a cavitación mostraron una reducción más pronunciada en la cantidad de calcio en comparación con aquellas que no fueron tratadas con cavitación. En este caso la cavitación facilita una remoción más eficiente de los componentes inorgánicos en las etapas iniciales del proceso, al igual que se evidenció en la prueba anterior de gravimetría. Este efecto es especialmente notable en las primeras etapas, como se puede apreciar en la tabla 2, donde la estructura mineral aún se mantiene relativamente intacta y responde más rápidamente a las perturbaciones mecánicas inducidas por la cavitación [47].

Sin embargo, al iniciar la desmineralización con cavitación se evidenció de manera más efectiva y en menor tiempo la desmineralización, pero conforme el proceso de desmineralización avanza, se observa una estabilización a partir del día 6 en la tasa de disminución del calcio, tanto en las muestras con cavitación como sin ella. Para el día 9, los niveles de calcio se igualan prácticamente en ambos grupos, lo que indica que, aunque la cavitación acelera inicialmente la disolución del calcio, su efecto no se mantiene de manera significativa a lo largo del tiempo. Aunque teniendo en cuenta los valores obtenidos en la investigación no se encuentran descritas más procesos de titulación con el propósito de determinar calcio en una matriz ósea, pero en un investigación afín se realizó con el propósito de determinar hidroxiapatita,calcio y fósforo en cáscara de huevo, lo que nos indica que a una estructura biológica se le puede determinar la concentración de fase inorgánica a través de titulacion.[48]

Este comportamiento sugiere que una vez que se ha alcanzado un cierto umbral en la desmineralización, el proceso continuó a un ritmo similar en ambos casos, independientemente de la aplicación de cavitación.

4.8 PRUEBA DETERMINACIÓN DEL MÓDULO DE YOUNG

Al analizar la figura x podemos observar como al inicio las muestras de hueso experimentaron un cambio significativo en su comportamiento cuando se redujo la fase inorgánica al principio de la desmineralización (DIA 1), ya que esto lo hizo más elástico, capaz de soportar mayores fuerzas antes de deformarse plásticamente o romperse. En consecuencia, su módulo de elasticidad aumentó significativamente como se ve en la imagen nombrada anteriormente.

Sin embargo, al continuar reduciendo la fase inorgánica después del día 1 de desmineralización, el material llegó a un punto en el que se volvió excesivamente elástico por la gran pérdida de la fase inorgánica, tanto así que Cualquier fuerza aplicada lo deformaba fácilmente lo que produce el descenso de los valores de módulos de young de las muestras de hueso a través de los días, y aunque según la literatura un material elástico recuperaba su forma inicial al retirar la fuerza [poner cita de módulo de young, cualquier artículo], era extremadamente susceptible a las deformaciones a comparación de las muestras iniciales sin desmineralizar. Dicho hallazgo concuerda con los factores claves de calidad que debe tener una matriz ósea desmineralizada en cuanto al comportamiento del material [poner cita que hable sobre matriz ósea desmineralizada], lo cuales son que debe ser un material capaz de soportar fuerzas mecánicas, para lo cual es indispensable un buen grado de elasticidad pues de esta forma puede absorber y distribuir fuerzas mecánicas que actúan sobre esta, como compresión o tensión y también debe permitir un buen grado de deformación, que va de la mano con la elasticidad que le proporciona la fase orgánica, especialmente el colágeno, esto con la finalidad de que se deforme y recupere su forma cuando la fuerza aplicada sea retirada.

Este cambio en el comportamiento del material se reflejó en su capacidad para soportar gigapascales debido a la reducción de la fase inorgánica aumentó su resistencia, pero al continuar reduciéndola, su capacidad para soportar fuerzas disminuyó.

En resumen, la reducción de la fase inorgánica inicialmente mejoró la elasticidad del material, pero su exceso lo hizo más propenso a las deformaciones. Esto sugiere que existe un equilibrio óptimo entre la fase inorgánica y la elasticidad para maximizar la resistencia del material.

La muestra control obtenida durante el proceso de desmineralización es aproximadamente 1 Gpas lo que concuerda con lo que se encuentra en literatura de acuerdo a Jae-Young Rho [26] en donde menciona que el módulo de young inicial de un hueso cortical es aproximadamente entre 0,7% y 1,3% , el cual es coherente con el peso inicial planteado durante la investigación

Comparando con valores encontrados en bibliografía) para materiales mayormente rígidos como el hueso tenemos valores entre 7 a 17 GPa (7×10^9 Pa a 1,7×10^10 Pa) [42][43] que al ser comparados con los valores obtenidos si son ligeramente mayores a los valores encontrados en la bibliografía del doctor Po-Yu Chen [49]

En la Figura 3, se evidencia una marcada imprecisión en los resultados del módulo de Young obtenidos para las muestras cavitadas y sin cavitar a lo largo del tiempo de desmineralización. Este comportamiento se manifiesta en las amplias desviaciones estándar observadas, que alcanzan magnitudes comparables a las de los valores medidos. Dicha dispersión sugiere que las mediciones no presentan consistencia suficiente para establecer una conclusión significativa respecto a la influencia de la cavitación en la rigidez del material.

Como se ha venido mencionando la amplia dispersión de los datos que se evidencia de mejor manera en la figura 3, sugiere que la prueba no puede ser considerada para caracterizar la Matriz osea desmineralizada (MOD), no obstante el conocer la naturaleza de nuestro material sería un factor ideal a la hora de su caracterización por lo que se recomiendo en futuras investigaciones no repetir esta metodología de obtención de módulo de Young o mejorar el protocolo de forma más trazable y reproducible de tal forma que no afecte la heterogeneidad de las muestras.

El análisis estadístico de la prueba de texturómetro dio como resultado que $p>0.05$, mediante ANOVA, el cual nos dice que no podemos rechazar la hipótesis nula de que todas las medidas son iguales, lo que concuerda con la alta variabilidad que hemos venido hablando en el análisis de resultados, esta afirmación nos permite identificar que esta prueba no es la más acertada para determinar datos significativos de pruebas mecánicas por lo que se recomienda descartar esta prueba.

4.9 RAYOS X

Se debe tener en cuenta en este caso que la matriz ósea desmineralizada es un material biológico, esto genera limitaciones en la técnica de difracción de rayos x. [47] La sensibilidad intrínseca del método puede verse comprometida en la difracción de rayos x con la distribución poco uniforme de los componentes de la muestra como se observa en ambas figuras de los resultados **figura 14 y 15**. Si bien, se entiende que la técnica es eficaz para identificar y cuantificar las fases cristalinas, la capacidad del equipo para distinguir las diferencias entre distribuciones espaciales de estos componentes es limitada por no decir nula. El análisis de IR muestra una disminución de cristalinidad en las muestras desmineralizadas y cavitadas, pasando del 38% en la muestra sin tratamiento, al 31% en la muestra sin cavitar y 28% en la muestra cavitada. Esta reducción se debe principalmente a la pérdida de hidroxiapatita, que es la fase inorgánica cristalina. A medida que la cristalinidad disminuye, la fase amorfa aumenta, evidenciando un cambio estructural en la matriz ósea. Las bandas de fosfato en IR, características de la hidroxiapatita, pierden intensidad, mientras que los grupos orgánicos como las amidas ganan protagonismo, indicando una mayor exposición de la matriz colágena[51].

5. Sugerencias y Recomendaciones

- Para futuras investigaciones se aconseja evitar la metodología adaptada para el cálculo del módulo de Young, pues arrojó datos muy dispersos dando desviaciones estándar muy grandes como para ser considerados datos precisos y analizables.

6. Conclusiones

- La matriz ósea desmineralizada de origen bovino se caracterizó por una pérdida de peso, una disminución en la dureza, una reducción en el contenido de calcio, y un aumento en la porosidad en comparación con la muestra de hueso bovino.

- Ambos métodos logran la obtención de matriz ósea desmineralizada, no obstante, el método acompañado con cavitación promete mejoras en el tiempo de obtención y la calidad de esta al observarse una mayor porosidad junto con un porcentaje de calcio remanente menor hasta el día 6.

- Las pruebas experimentales más efectivas para obtener información cuantitativa al comparar los procesos de desmineralización fueron: gravimetría, análisis de porosidad, y la determinación del calcio remanente mediante titulación complejométrica.

- Las condiciones óptimas para desmineralizar una matriz ósea de origen bovino acompañadas de cavitación fueron: Emplear un agente desmineralizante ácido (HCl) con una concentración 0.5M, se considera que la amplitud óptima es 50% con pulsaciones de 5 min hasta completar 30 minutos cada 24 horas sin sobrepasar los 60 ºC.

Referencias

[1]Chaparro, W.F.M.; Díaz-Roa, K.A.; Otálvaro-Cifuentes, E.H. Situación actual de los bancos de tejidos en Colombia: tejidoosteomuscular. *Rev. Colomb. Ortop. Traumatol.* 2020, *34*(2), 93–101. https://doi.org/10.1016/j.rccot.2020.06.006

[2]FASGO. Descifrando la mineralización ósea y sus dilemas: factores cardiovasculares, metabólicos, herramienta FRAX, modelo FRIDEX y DMO. Revista FASGO, 2020, N° 7. Disponible en: https://www.fasgo.org.ar/index.php/home-revista/111-revista-fasgo/n-7-2020/2059-descifrando-la-mineralizacion-osea-y-sus-dilemas-factores-cardiovasculares-metabolicos-herramienta-frax-modelo-fridex-y-dmo.

[3]Aguirre García, W.D. Análisis de costo efectividad en pacientes con fractura de cadera para dos tipos de tratamientos quirúrgicos, DHS y artroplastia. Caso base: creación Centro de Excelencia Hospital El Tunal. *Univ. de Los Andes* 2015. Recuperado el 5 de mayo de 2023, de https://repositorio.uniandes.edu.co/bitstream/handle/1992/17489/u713710.pdf?sequence=1&isAllowed=y

[4]Martínez Álvarez, O.; Barone, A.; Covani, U.; Fernández Ruíz, A.; Jiménez Guerra, A.; Monsalve Guil, L.; Velasco Ortega, E. Injertos óseos y biomateriales en implantología oral. *Scielo* 2017. Recuperado el 5 de mayo de 2023, de https://scielo.isciii.es/pdf/odonto/v34n3/0213-1285-odonto-34-3-111.pdf

[5]Medrano David, D. Sustituto óseo inyectable portador de matriz ósea desmineralizada con potencial uso en regeneración ósea. *Doctoral dissertation, Universidad EIA* 2021.Recuperado 5 de mayo de 2023:https://repository.eia.edu.co/entities/publication/c0c4cb94-7db1-4080-9281-ae1c5537518d

[6] La célula. 2. Matriz extracelular. Glicoproteínas. Atlas de Histología Vegetal y Animal. Disponible en: https://mmegias.webs.uvigo.es/5-celulas/2-componentes_glucoproteinas.php.

[7]América, N.L. La cavitación explicada e ilustrada. *Noria Latinoamérica* 2023. https://noria.mx/control-de-contaminacion-c/la-cavitacion-explicada-e-ilustrada/

[8]Rodríguez Ramírez, J.A. Estudio de la cavitación ultrasónica controlada para la apertura transcraneal de la BHE con FUS en modelos murinos. *Master's thesis, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN, Departamento de Ingeniería Eléctrica/Sección de Bioelectrónica* 2019.Disponible en: https://repositorio.cinvestav.mx/handle/cinvestav/3133

[9]Chen, I.; Su, C.; Lai, C.; Tsou, Y.; Zheng, Y.; Fang, H.W. Preparación y caracterización de materiales de injerto óseo compuesto de matriz ósea desmineralizada moldeable/sulfato de calcio. Rev. Biomater. Func. 2021, 12(4), 56. https://doi.org/10.3390/jfb12040056

[10]Rodrigues Laureano Filho, J.; Allais, M.; Edward Maurette, P.; Albergaria Barbosa, J.R. Estudio comparativo del uso de la matriz ósea desmineralizada de origen humano y de la poliuretana derivada del aceite de mamona sobre el proceso de regeneración ósea: Estudio histométrico en calota de conejos. Rev. Esp. Cir. Oral Maxilofac. 2007, 29(4), 250–259. Recuperado el 19 de abril de 2023, de http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1130-05582007000400004&lng=es&tlng=es

[11]Le Chi Linh, H.; Huynh Duy Thao, N.; Nguyen Van Doi, T.; Trinh Ngoc Khoa, H.; Ha Thi Thao Mai, H. Initiation of Process Standardization to Fabricate Demineralized Bone Directed Towards Making Materials for Bone Grafting.2024.

[12]. Mark J. Águila, Paul Rooney, John N. Kearney (2014). Optimized demineralization of human cancellous bone by application of a vacuum. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*, 103(5), 1023-9. doi: 10.1002/jbm.b.33280. Epub 2014 Sep 15. PMID: 25220892.

[13]Medina, N.C. EFECTO DEL ULTRASONIDO EN LA EXTRACCIÓN Y NANOENCAPSULACIÓN DE POLIFENOLES DE LIMÓN PERSA (CITRUS LATIFOLIA). [Institutional Repository of ConacytJ] 2024. Available online: https://ciatej.repositorioinstitucional.mx/jspui/bitstream/1023/447/1/Nelly%20Carolina%20Medina.pdf.

[14]Fonseca, J. C., & Garzón López, P. (2017). Efecto de la fuerza de compresión sobre los atributos críticos de calidad en tabletas de liberación inmediata de furosemida. *Universidad Nacional de Colombia*, [https://repositorio.unal.edu.co/bitstream/handle/unal/66588/67958-365147-1-PB.pdf?sequence=1&isAllowed=y]. Recibido para evaluación: 13 de junio de 2016; aceptado para publicación: 14 de agosto de 2017.

[15]Ortiz-Domínguez, M.; Cruz-Avilés, A. Medición de Módulo de Elasticidad de Young. *UAEH* 2022, Vol. 9, No. 17, 52-63. Martínez, P.; Azuaga, M. Young's Modulus. Física Recreativa 1997. Available online: https://www.fisicarecreativa.com/informes/infor_mecanica/young97.pdf

[16]Universidad Tecnológica de Bolívar. *Resistencia de materiales: Práctica de laboratorio 2. Módulo de elasticidad resistencia a la compresión del concreto*. https://www.researchgate.net/publication/328049834_MODULO_DE_YOUNG

[17]Ortiz-Domínguez, M., & Cruz-Avilés, A. (2022). Determinación del módulo de Young. *Ingenio y Conciencia: Boletín Científico de la Escuela Superior Ciudad Sahagún*, 9(17), 52-63. ISSN: 2007-784X.

[18]Lorenzo, R. H. (2017). *Módulo de elasticidad*. https://es.slideshare.net/slideshow/mdulo-de-elasticidad-72685107/72685107

[19]Lafuente Hernández, L. (2017). Optimización de un procedimiento de digestión en muestras ambientales con horno microondas y su aplicación a la separación radioquímica del Po-210. *Repositorio de* Universitat Politécnica de Valencia.https://riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/90691/Lafuente%20Hern%c3%a1ndez%20-%20Optimizaci%c3%b3n%20de%20un%20procedimiento%20de%20digesti%c3%b3n%20en%20muestras%20ambientales%20con%20horno%20microondas%20y%20su%20aplicaci%c3%b3n%20a%20la%20separaci%c3%b3n%20radioqu%c3%admica%20del%20Po-210.pdf?sequence=2&isAllowed=y

[20]Cepeda Calderón, M. J., & Olvera Cedillo, F. J. Determinación cuantitativa de calcio (Ca^{2+}) en el cascarón de huevo de gallina (Gallus gallus), aplicando volumetría de complejos.https://es.scribd.com/document/431743485/Determinacion-Cuantitativa-Del-Calcio-en-Las-Cascaras-de-Huevo-de-Gallina

[21]Millán Cortés, D. Desarrollo de conductos bifásicos laminares de colágeno tipo I para usar en regeneración de nervio periférico. Universidad Nacional de Colombia 2022.https://repositorio.unal.edu.co/handle/unal/82254

[22]González, M.; Hernández, L. Análisis de los Espectros de Infrarrojo. [Institutional Repository of CIATEJ] 2024. Available online: https://ciatej.repositorioinstitucional.mx/jspui/bitstream/1023/743/1/Cap%206%20Analisis%20de%20los%20espectros%20de%20infrarrojo.pdf.

[23] Universidad Complutense de Madrid. Facultad de Medicina. Tema 2: Fisiopatología ósea. Concepto y funciones. https://www.ucm.es/data/cont/docs/420-2014-02-18-01%20fisiopatologia%20osea.pdf

[24] Villani A, Millán A, González G. Caracterización fisicoquímica y cerámica de hidroxiapatitas producidas por distintos métodos de síntesis: Parte II: Efectos del tratamiento térmico. Rev Fac Ing UCV. 2015;30(1):1-10. Disponible en: https://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0798-40652012000400002

[25]Ayala Ham, AR; Ramos Payán, R.; Aguilar Medina, EM Evaluación de regeneración ósea empleando matriz ósea desmineralizada y en combinación con hidroxiapatita. Universidad Autónoma de Sinaloa 2022. http://repositorio.uas.edu.mx/jspui/bitstream/DGB_UAS/276/1/Evaluaci%C3%B3n%20de%20regeneraci%C3%B3n%20%C3%B3sea%20empleando%20matriz%20%C3%B3sea.pdf

[26]Rho, J. Y., Kuhn-Spearing, L., & Zioupos, P. (1998). Mechanical properties and the hierarchical structure of bone. Medical Engineering & Physics, 20(2), 92-102. doi:10.1016/s1350-4533(98)00007-1

[27]Roberts WE, Mangum JE, Schneider PM. Fisiopatología de la desmineralización, parte I: atrición, erosión, abfracción y lesiones cervicales no cariosas. *Curr Osteoporos Rep*. 2022;20(1):90-105. Publicado en línea el 7 de febrero de 2022. doi: 10.1007/s11914-022-00722-1.[34]Pang S, Su FY, Verde A, Salim J, McKittrick J, Jasiuk I. Comparación de diferentes protocolos para la desmineralización del hueso cortical. Sci Rep. 2021 Mar 29; 11:7012. doi: 10.1038/s41598-021-86257-4.[34]Pang S, Su FY, Verde A, Salim J, McKittrick J, Jasiuk I. Comparación de diferentes protocolos para la desmineralización del hueso cortical. Sci Rep. 2021 Mar 29; 11:7012. doi: 10.1038/s41598-021-86257-4.

[28]Pang S, Su FY, Verde A, Salim J, McKittrick J, Jasiuk I. Comparación de diferentes protocolos para la desmineralización del hueso cortical. Sci Rep. 2021 Mar 29; 11:7012. doi: 10.1038/s41598-021-86257-4.

[29] Figueiredo M, Cunha S, Martins G, Freitas J, Judas F, Figueiredo H. Influencia de la concentración de ácido clorhídrico en la desmineralización del hueso cortical. *Chem Eng Res Des* . 2011;89(4):270-277. doi:10.1016/j.cherd.2010.04.013.

[30]Cuervas-Mons Cantón M, Mora Alañón F. Capítulo 1 - Tejido óseo. En: Igualada Blazquez C, coordinador. *Manual del Residente en Traumatología y Ortopedia*. Hospital General Universitario Gregorio Marañón, Madrid. Disponible en: https://unitia.secot.es/web/manual_residente/CAPITULO%201.pdf

[31]KPU. IR Spectrum and Characteristic Absorption Bands. [KPU Pressbooks] 2024. Available online: https://kpu.pressbooks.pub/organicchemistry/chapter/6-3-ir-spectrum-and-characteristic-absorption-bands/#:~:text=The%20absorption%20bands%20in%20IR,a%20more%20intense%20absorption%20band.

[32]Fisher Scientific. (2024). *Síntesis de amidas*. https://www.fishersci.es/es/es/scientific-products/lab-reporter-europe/chemicals/amide-synthesis.html
df

[33]Elsevier. Colágenos: Tipos, Composición, Características y Distribución en Tejidos. [Elsevier Connect] 2019. Available online: https://www.elsevier.com/es-es/connect/colagenos-tipos-composicion-caracteristicas-y-distribucion-en-tejidos.

[34]Olucha Moreno.D. ESTUDIO DE LA INFLUENCIA DE LOS ULTRASONIDOS DE POTENCIA EN LA TRANSFERENCIA DE MATERIA, PROPIEDADES ÓPTICAS Y MECÁNICAS DURANTE EL TRATAMIENTO PREFRITURA DE PATATA [Internet]. Upv.es. [citado el 24 de agosto de 2024]. Disponible en:

https://riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/27981/TFM%20DAVID%20OLUCHA%20MORENO.pdf;jsessionid=5EE31EF6F47755262773C6ED7F21CA39?sequence=1

[35]Pang S, Su FY, Verde A, Salim J, McKittrick J, Jasiuk I. Comparación de diferentes protocolos para la desmineralización del hueso cortical. Sci Rep. 2021 Mar 29; 11:7012. doi: 10.1038/s41598-021-86257-4..

[36] Rincón Rincón E, Ros Felip A, Claramunt Alonso R, Arranz Merino F. Caracterización mecánica del material óseo. Tecnología y Desarrollo: Revista de Ciencia, Tecnología y Medio Ambiente. 2004; Volumen II, Separata. Universidad Alfonso X el Sabio, Escuela Politécnica Superior, Villanueva de la Cañada (Madrid).

[37] Medrano David D. Sustituto óseo inyectable portador de matriz ósea desmineralizada con potencial uso en regeneración ósea [trabajo de grado]. Londoño López ME, Araque Marín P, directores. Envigado: Universidad EIA; 2021.

[38] Rangel García AM. Obtención y caracterización física y química de membranas de colágeno tipo 1 a partir de la desmineralización de hueso bovino descelularizado, para regeneración cutánea [Tesis]. Universidad Nacional Autónoma de México, Programa de Ciencia e Ingeniería de Materiales; 2021. Recuperado de https://ru.dgb.unam.mx/bitstream/20.500.14330/TES01000806424/3/0806424.pdf

[39]Narváez Grijalva, C. E. (2014). *Grado de desmineralización dentaria que se produce por la exposición al jugo de limón artificial: Estudio in-vitro*. Universidad de las Américas. Recuperado de https://dspace.udla.edu.ec/bitstream/33000/1885/3/UDLA-EC-TOD-2014-30.pdf

[40] Rangel Garcia A (2021) Obtencion y caracterizacion fisica y quimica de membranas de colageno tipo 1, a partir de la desmineralizacion de hueso bovino descelularizado para regeneración cutanea. Recuperado de https://ru.dgb.unam.mx/bitstream/20.500.14330/TES01000806424/3/0806424.pdf

[41]Teitelbaum, S. L. (2000). Bone resorption by osteoclasts. Science, 289(5484), 1504-1508. doi:10.1126/science.289.5484.1504

[42]Choren, J.A.; Heinrich, S.M.; Espina Plateada, M.B. Relaciones entre el módulo de Young y la porosidad volumétrica para aplicaciones de fabricación aditiva. Rev. Cienc. Mater. 2013, 48, 5103-5112.

[43]Robles, V. and Cuero, K., 2019. *Determinación del contenido de Calcio y Magnesio en una muestra de problema*. [online] Universidad Icesi. Available at: https://www.academia.edu/42685707/Determinaci%C3%B3n_del_contenido_de_Calcio_y_Magnesio_en_una_muestra_problema [Accessed 1 Sep. 2024].

[44]Rincón M, Rodríguez A, Londoño ME, Echavarría A. Fabricación y caracterización de una matriz tridimensional de hidroxiapatita macroporosa para aplicación en ingeniería de tejidos óseos. Revista EIA. 2007;7: http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1794-12372007000100008

[45]Rho JY, Tsui TY, Pharr GM. Propiedades elásticas del hueso laminar trabecular y cortical humano medidas mediante nanoindentación. *J Mater Sci Mater Med* .https://doi.org/10.1007/BF007/BF00705348

[46]Cullity, B.D.; Stock, S.R. *Elements of X-Ray Diffraction*; Pearson Education Limited: Harlow, UK, 2014. Accessed September 1, 2024. https://www.eng.uc.edu/~beaucag/Classes/AdvancedMaterialsThermodynamics/Books/B.D.%20Cullity,%20S.R.%20Stock%20-%20Elements%20of%20X-Ray%20Diffraction-Pearson%20Education%20Limited%20(2014).pdf

[47]Sánchez de la Hoz, E.; Buitrago Delgado, E.A. La difracción de rayos X y su aplicación en el campo de los materiales. *Rev. Fac. Ing.* 2007, *13*, 62-75. Accessed September 1, 2024. http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1794-12372007000100008

[48]Wright FC, Riner JC. Incineración en seco de cáscaras de huevo para determinar los niveles de calcio, magnesio y fósforo. J Assoc Off Anal Chem. 1972 mayo;55(3):662-3. doi: 10.1093/jaoac/55.3.662.

[49] Chen PY, McKittrick J. Propiedades mecánicas del hueso esponjoso desmineralizado y desproteinizado. *Acta Biomater* .https://doi.org/10/j.actbio.2011.2011.01.011

[50] Von Euw S, Wang Y, Laurent G, Drouet C, Babonneau F, Nassif N, Azaïs T. Bone mineral: new insights into its chemical composition. Sci Rep. 2019; 9:8456. doi:10.1038/s41598-019-44620-6

[51] Chen X, Hughes R, Mullin N, Hawkins RJ, Holen I, Brown NJ, Hobbs JK. Mechanical heterogeneity in the bone microenvironment as characterized by atomic force microscopy. Biophys J. 2020;119(3):502-513. doi: 10.1016/j.bpj.2020.06.026

ANEXOS

ANEXO 1: ANOVA PRUEBA DE GRAVIMETRÍA

Relación entre las muestras desmineralizadas	Probabilidad Gravimetría <0.05	Relación entre las muestras desmineralizadas	Probabilidad Gravimetría <0.05	Relación entre las muestras desmineralizadas	Probabilidad Gravimetría <0.05
B-A	**0.994473**	**C-B**	0.0016921	E-C	0.1796654
C-A	**0.0191694**	**C1-B**	0.0007165	E1-C	0.0137062
C1-A	**0.00086343**	**D-B**	0.0000325	D-C1	0.9801311
D-A	**0.0004266**	**D1-B**	0.0000000	D1-C1	0.9801311
D1-A	**0.0000004**	**E-B**	0.0000007	E-C	0.1796654
E-A	0.0000090	**E1-B**	0.0000000	E1-C	0.0137062
E1-A	0.0000002	**C-B1**	0.0107300	D-C1	0.9801311
B-A1	0.9944737	C1-B1	0.0047306	D1-C1	0.0286889
C-A1	0.0191694	D-B1	0.0002256	E-C1	0.3122007
C1-A1	0.0086343	D1-B1	0.0000002	E1-C1	0.0310612
D-A1	0.0004266	E-B1	0.0000048	D1-D	0.2929836
D1-A1	0.0000004	C1-C	0.9999993	E-D	0.9237694
E-A1	0.0000090	D-C	0.9114388	E1-D	0.3402359
E1-A1	0.0000002	D1-C	0.0131623	E-D1	0.9751479
B1-B	0.9993713	E-C	0.1796654	E1-D1	1.0000000

ANEXO 2: ANOVA PRUEBA DE DUREZA

Relación entre las muestras desmineralizadas	Probabilidad Gravimetría <0.05	Relación entre las muestras desmineralizadas	Probabilidad Gravimetría <0.05	Relación entre las muestras desmineralizadas	Probabilidad Gravimetría <0.05
B-A	0.0464624	D-A1	0.0216306	D-B1	0.1412429
B1-A	0.9984805	D1-A1	0.0155008	D1-B1	0.1081058
C-A	0.5309181	E-A1	0.0083054	E-B1	0.0644225
C1-A	0.0727819	E1-A1	0.0126454	E1-B1	0.0915121

Relación entre las muestras desmineralizadas	Probabilidad Gravimetría <0.05	Relación entre las muestras desmineralizadas	Probabilidad Gravimetría <0.05	Relación entre las muestras desmineralizadas	Probabilidad Gravimetría <0.05
D-A	0.0216306	B1-B	0.2530922	C1-C	0.9839745
D1-A	0.0155008	C-B	0.9554160	D-C	0.8567471
E-A	0.0083054	D-B	0.9999996	D1-C	0.7949952
E1-A	0.0126454	D1-B	0.9999907	E-C	0.6598002
B-A1	0.0464624	E-B	0.9996611	E1-C	0.7530341
B1-A1	0.9984805	E1-B	0.9999627	D-C1	0.9999699
C-A1	0.5309181	C-B1	0.9407049	D1-C1	0.9997966
C1-A1	0.0727819	C1-B1	0.3477191	E-C1	0.9975183
				E1-C1	0.9994799

ANEXO 3: ANOVA PRUEBA DE POROSIDAD

Relación entre las muestras desmineralizadas	Probabilidad Gravimetría <0.05	Relación entre las muestras desmineralizadas	Probabilidad Gravimetría <0.05	Relación entre las muestras desmineralizadas	Probabilidad Gravimetría <0.05
B-A	0.9970585	D-A1	0.0257174	D-B1	0.8065842
B1-A	0.4827726	D1-A1	0.0001944	D1-B1	0.0232626
C-A	0.5424400	E-A1	0.0109860	E-B1	0.5759321
C1-A	0.0385331	E1-A1	0.0000373	E1-B1	0.0041915
D-A	0.0257174	B1-B	0.9204027	C1-C	0.8514116
D1-A	0.0001944	C-B	0.9475176	D-C	0.7537535
E-A	0.0109860	C1-B	0.1885204	D1-C	0.0188308
E1-A	0.0000373	D-B	0.1336461	E-C	0.5154211
B-A1	0.9970585	D1-B	0.0011629	E1-C	0.0033702
B1-A1	0.4827726	E-B	0.0623798	D1-C1	0.3500003

C-A1	0.5424400	E1-B	0.0002103	E-C1	0.9997890
C1-A1	0.0385331	C1-B1	0.8920911	E1-C1	0.0904374

ANEXO 4: PRUEBA DE DETERMINACIÓN DEL MODULO DE YOUNG

Relación entre las muestras desmineralizadas	Probabilidad Gravimetría <0.05	Relación entre las muestras desmineralizadas	Probabilidad Gravimetría <0.05	Relación entre las muestras desmineralizadas	Probabilidad Gravimetría <0.05
B-A	0.7421368	D1-A1	0.9720775	D1-B1	0.2981163
B1-A	0.9411765	E-A1	0.9889360	E-B1	0.3811146
C-A	0.9411765	E1-A1	0.9952416	E1-B1	0.4500894
		B1-B	0.9999823	C1-C	0.9720775
D-A	0.9997572	C-B	0.9999823	D-C	0.6375930
D1-A	0.9720775	C1-B	0.8255401	D1-C	0.2981163
E-A	0.9889360	D-B	0.3507797	E-C	0.3811146
E1-A	0.9952416	D1-B	0.1233400	E1-C	0.4500894
B-A1	0.7421368	E-B	0.1692688	D1-C1	0.9411765
B1-A1	0.9411765	E1-B	**0.2116100**	E-C1	0.9720775
C-A1	0.9411765	C1-B1	0.9720775	E1-C1	0.9857807
D-A1	0.9997572	D-B1	0.6375930	D1-D	0.9999072
E1-D	0.9999997	E1-D1	0.9999998	E-D	0.9999072