

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 758 357**

51 Int. Cl.:

**A61L 27/12** (2006.01)

**A61L 27/36** (2006.01)

**A61L 27/56** (2006.01)

12

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **03.08.2016 PCT/IB2016/054665**

87 Fecha y número de publicación internacional: **09.02.2017 WO17021894**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.08.2016 E 16757963 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.09.2019 EP 3331580**

54 Título: **Andamios porosos 3D grandes hechos de hidroxiapatita activa obtenidos por transformación biomórfica de estructuras naturales y proceso para obtenerlos**

30 Prioridad:

**06.08.2015 IT UB20152962**

**06.08.2015 IT UB20152939**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

**05.05.2020**

73 Titular/es:

**GREENBONE ORTHO S.R.L. (100.0%)**

**Via Albert Einstein 8  
48018 Faenza (RA), IT**

72 Inventor/es:

**TAMPIERI, ANNA;  
SPRIO, SIMONE y  
RUFFINI, ANDREA**

74 Agente/Representante:

**ISERN JARA, Jorge**

**ES 2 758 357 T3**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Andamios porosos 3D grandes hechos de hidroxiapatita activa obtenidos por transformación biomórfica de estructuras naturales y proceso para obtenerlos

5 La presente divulgación se refiere a hidroxiapatita obtenida de madera porosa. En particular, la presente divulgación se refiere a un andamio biomórfico de hidroxiapatita obtenido de madera porosa para su uso como sustituto óseo. La descripción también se refiere a un proceso para convertir madera en un andamio de hidroxiapatita biomórfico que puede usarse como sustituto óseo.

10 Antecedentes

El procesamiento y la ingeniería de cerámica actuales se basan en una secuencia de procesos bien establecida que permite la producción de grandes cuerpos 3D. Más específicamente, las fases cerámicas innovadoras se pueden sintetizar como polvos, donde las características específicas como la estequiometría/sustituciones de iones, el tamaño nanométrico y la actividad superficial, son responsables de funcionalidades específicas. El procesamiento cerámico utilizado actualmente para obtener cuerpos cerámicos 3D macroscópicos con forma y porosidad adecuadas implica el tratamiento térmico (sinterización) de los polvos cerámicos sintetizados adecuadamente formados en un cuerpo 3D (para consolidar el cuerpo). Todos estos pasos son necesarios para obtener cerámicas 3D con propiedades fisicoquímicas y mecánicas adecuadas, la mayoría de las cuales se degradan durante el proceso cerámico mencionado anteriormente (particularmente el tratamiento de sinterización). Las serias limitaciones en el desarrollo de material cerámico funcional, asociado con el proceso cerámico actual, impiden un mayor progreso en el campo. Hoy en día, con la evolución de la sociedad moderna, los productos tecnológicos están asumiendo un papel cada vez mayor en la vida y la productividad de las personas, por lo que existe una gran necesidad de herramientas inteligentes capaces de proporcionar soluciones a demandas complejas y personalizadas, en diversos campos de aplicación, por ejemplo salud, medio ambiente, energía. Por lo tanto, existe un amplio consenso de que se necesitan nuevos enfoques para la producción repetible y masiva de dispositivos macroscópicos con una organización estructural compleja a escala macro pero, al mismo tiempo, con una estructura compleja definida a nanoescala, e incluso a escala de cristal. Tales macro y nanoestructuras son relevantes para inducir efectos funcionales no triviales, pero inteligentes.

30 Con respecto a los problemas mencionados anteriormente en relación con los materiales cerámicos, se requiere un cambio paradigmático para desarrollar grandes cerámicas altamente activas con micro y macroestructuras complejas.

35 Los andamios óseos, con un enfoque particular en la regeneración de defectos óseos grandes que soportan carga, pueden tomarse como un ejemplo representativo, ya que deben ser cerámicas tridimensionales porosas con alta bioactividad, para poder ser colonizadas por las células y finalmente regenerado como defectos óseos grandes. De hecho, hasta la fecha no se han encontrado soluciones adecuadas para resolver esta necesidad clínica.

40 Durante muchas décadas, la hidroxiapatita ( $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ ) ha sido reconocida como el material principal para el andamiaje óseo, ya que se parece mucho a la composición del mineral óseo y ha demostrado una excelente biocompatibilidad y osteoconductividad. Sin embargo, la biomimética de la hidroxiapatita está relacionada con su tamaño nanométrico y la presencia de iones múltiples, reemplazando parcialmente el calcio y el fosfato en la red de apatita, que son la fuente de la actividad biológica del hueso durante la formación, remodelación y reabsorción de nuevos tejidos.

45 La aplicación del tratamiento de sinterización a los andamios de hidroxiapatita activa reacciones superficiales y masivas en la interfaz entre los granos de hidroxiapatita adyacentes que producen el ordenamiento de los cristales, con la expulsión de iones extraños de la red de apatita y la coalescencia del grano hasta varios micrómetros, con reducción de superficie específica, hidrofilia y afinidad con proteínas y células.

50 La extensa coalescencia del grano activada por el proceso de sinterización produce la consolidación de todo el cuerpo de hidroxiapatita mediante la reducción de la porosidad intergranular y, a su vez, del volumen total. Esto también genera tensiones residuales que se encuentran entre las principales fuentes de defectos estructurales en los materiales cerámicos. De hecho, la acomodación de tensiones residuales en los materiales cerámicos es difícil debido a su alta rigidez (en comparación con los metales y polímeros), y se encuentra entre los factores más significativos que afectan el rendimiento mecánico de los materiales cerámicos, particularmente en el caso de piezas grandes caracterizadas por formas complejas y estructuras porosas, donde las variaciones de volumen después de los ciclos de calentamiento/enfriamiento provocan fácilmente daños estructurales críticos.

60 Por las razones anteriores, el proceso clásico de síntesis cerámica no permite la fabricación de materiales cerámicos, en particular hidroxiapatitas que tienen una composición y estructura biomimética, alta bioactividad y reabsorbibilidad. Esto es especialmente cierto cuando se sintetizan grandes cerámicas 3D porosas para la regeneración de defectos óseos de tamaño crítico (es decir,  $\geq 2$  cm).

65 La composición y estructura biomimética tienen una importancia fundamental para inducir la cascada regenerativa in vivo que puede determinar y promover de manera única la regeneración de partes óseas grandes que soportan carga,

como los huesos largos de las extremidades. Estos fenómenos, que están estrechamente relacionados entre sí y deben producirse en sinergia para activar y mantener la regeneración del hueso con todas sus funciones, son: i) osteogénesis rápida, osteoconducción y osteointegración; ii) formación extensa de vasos sanguíneos; iii) capacidad de biorresorción progresiva.

5 La osteogénesis y la osteoconducción rápidas permiten una extensa formación y penetración ósea en el andamio, lo que da como resultado una estrecha interfaz hueso/andamio y una osteointegración óptima. Para lograr estos efectos, se requiere una composición química similar a un hueso, así como una porosidad abierta e interconectada, de modo que además de la penetración extensa del tejido óseo nuevo, se pueda lograr una formación simultánea de una red  
10 vascular que ayude a la formación y maduración del hueso nuevo.

La colonización incompleta del andamio puede dar lugar a la formación de huecos, tejidos fibrosos o áreas necróticas, y reducirá la fuerza general y el rendimiento biomecánico de la construcción de hueso/andamio.

15 Dentro de los tiempos compatibles con la formación de hueso nuevo, el andamio debe reabsorberse progresivamente para lograr una regeneración óptima del hueso después de un daño o enfermedad. Todos los andamios óseos 3D desarrollados hasta ahora se basan en fosfatos de calcio sinterizados que son materiales cristalinos que obstaculizan la actividad de los osteoclastos, en comparación con la apatita nanocristalina, nanodimensionada, sustituida con iones; por lo tanto, a pesar de que los andamios de hidroxiapatita porosa de hueso pueden integrarse bien en el hueso  
20 circundante mediante la adhesión de la superficie, la falta de biorresorción no permite el proceso completo de remodelación, es decir, el reemplazo del andamio con el hueso nuevo. Esto da como resultado una recuperación incompleta de la capacidad funcional del hueso enfermo, particularmente en el caso de segmentos óseos muy largos que soportan carga.

25 Particularmente en el caso de huesos largos que soportan carga, el andamio también debe exhibir un rendimiento mecánico adecuado, mientras mantiene una macroporosidad abierta, lo cual es un desafío considerando que estas características están normalmente relacionadas inversamente (es decir, cuanto mayor es la porosidad, menor es la resistencia mecánica) y que se requiere un alto grado de porosidad para proporcionar una adecuada colonización de andamios y osteointegración. Este es uno de los factores más relevantes que limitan la aplicación de los andamios  
30 actuales en la regeneración de porciones extensas de huesos largos que soportan carga. A este respecto, los andamios con estructuras porosas organizadas jerárquicamente pueden exhibir un rendimiento mecánico superior en comparación con materiales con una porosidad similar, pero organizada al azar. A este respecto, solo los andamios con una estructura tan organizada pueden activar eficientemente los procesos de mecanotransducción a nivel celular, desencadenando así la regeneración de hueso maduro, organizado y mecánicamente competente.

35 La innovación propuesta se basa en un cambio paradigmático del proceso clásico de síntesis cerámica a una nueva forma de *sinterización reactiva* que permite la generación de fases cerámicas con composición química definida, organizadas en un gran cuerpo 3D con morfología compleja, estructura jerárquica y, al mismo tiempo, rendimiento mecánico optimizado, a partir de estructuras naturales organizadas jerárquicamente. A este respecto, la transformación biomórfica es el punto de apoyo de este enfoque innovador que se puede aplicar a estructuras  
40 naturales organizadas jerárquicamente (por ejemplo, madera, plantas, exoesqueletos).

Se intentó con éxito la transformación biomórfica de estructuras leñosas en cerámica que imita los huesos utilizando maderas con estructuras porosas como el pino y el ratán, y maderas más densas como el roble rojo y el sipo, como  
45 plantillas para reproducir la estructura y el rendimiento mecánico del hueso esponjoso y cortical, respectivamente.

Anna Tampieri et al. Informaron sobre el uso de madera en la formación de andamios de hidroxiapatita biomiméticos. In the Journal of Material Chemistry, 2009, 19, 4973-4980. En esta publicación, Tampieri et al. describe el proceso de  
50 convertir piezas de 1 cm de largo (por lo tanto, una pieza pequeña, no adecuada para la regeneración de defectos de tamaño crítico) de madera de ratán y madera de pino en hidroxiapatita. El proceso implicó la pirólisis de las muestras de madera a una temperatura de 1000°C usando una velocidad de calentamiento lenta, seguida de una carburación en la que la plantilla de carbono se transformó en carburo de calcio. La carburación se logró mediante infiltración en fase líquida o infiltración en fase de vapor. La infiltración de vapor se realizó a temperaturas superiores al punto de ebullición del calcio (1484°C). El proceso de carburación consistió en calentar inicialmente la madera pirolizada a  
55 800°C, luego calentar a 1100°C y finalmente a 1650°C durante 3 horas. Fue necesario calentar la madera pirolizada a esta temperatura durante 3 horas para garantizar que la reacción se completara. Después de la carburación, el andamio tridimensional de carburo de calcio se oxidó para transformar el carburo de calcio en óxido de calcio, preservando la morfología de la madera nativa. Después de la oxidación, el andamio tridimensional de óxido de calcio fue carbonatado para transformar el andamio de óxido de calcio en un andamio de carbonato de calcio. Se emplearon  
60 valores de alta presión (2.2 MPa) para permitir la penetración de CO<sub>2</sub> a través de la escala de CaCO<sub>3</sub> en formación, hasta el núcleo de la estructura de CaO. Finalmente, se realizó un paso de fosfatación para transformar el andamio de carbonato de calcio en andamio de hidroxiapatita con una morfología anisotrópica organizada jerárquicamente que se asemeja a la de la madera nativa. Durante este paso, las plantillas de CaCO<sub>3</sub> derivadas de la madera se remojaron en una solución acuosa de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> a una temperatura de 200°C, a una presión de 1.2 MPa durante 24 horas.

65

El proceso descrito anteriormente produjo andamios de cerámica de hidroxiapatita con la morfología anisotrópica organizada jerárquicamente de la madera nativa.

5 La resistencia a la compresión del andamio derivado de la madera de pino, medida en la dirección longitudinal varió entre 2.5 y 4 MPa, y en la dirección transversal, varió entre 0.5 y 1 MPa. Por lo tanto, solo los andamios de dimensión limitada, típicamente de menos de 1 cm, se pueden obtener mediante dicho proceso. Los bajos valores de resistencia a la compresión, también en asociación con un tamaño  $\leq 1$  cm, hacen que estos andamios no sean relevantes para la regeneración ósea, particularmente en el caso de los huesos que soportan carga. De hecho, se acepta que, para ser crítico, un defecto óseo debe tener una longitud de 2-3 veces el diámetro del hueso afectado. Por lo tanto, un andamio de 1 cm de tamaño no puede considerarse útil a este respecto.

15 El paso de fosfatación mencionado anteriormente en la conversión de madera a hidroxiapatita, fue informado con más detalle por Ruffini et al. in Chemical Engineering Journal 217 (2013) 150-158. En esta publicación, se utilizaron plantillas cilíndricas de carbonato de calcio derivado de ratán que tenían diámetros de 8 mm y longitudes de 10 mm como materiales de partida. El proceso de fosfatización se llevó a cabo utilizando soluciones acuosas de hidrogenofosfato de diamonio, dihidrogenofosfato de amonio y amoniaco.

20 La solicitud de patente WO 2012/063201 publicada el 18 de mayo de 2012, describe un sustituto óseo que comprende un núcleo, basado en hidroxiapatita, obtenido de al menos una madera porosa, y una carcasa basada en hidroxiapatita o carburo de silicio obtenido de al menos una madera que tiene una porosidad que la al menos una madera del núcleo. La carcasa se preparó en una forma cilíndrica hueca adecuada para acomodar el núcleo, que podría prepararse como un cilindro sólido que se inserta en la cavidad de la carcasa. El proceso para obtener el sustituto óseo de la madera también se describe en la solicitud. El primer paso es la pirólisis de una madera nativa como el ratán o el pino, calentándola a una temperatura de entre 800 y 2000°C. De este proceso, se obtiene un material de carbono. En el segundo paso, el material de carbono se transforma en carburo de calcio a una temperatura de entre 1500 y 1700°C. A continuación, el carburo de calcio se oxida a una temperatura entre 900 y 1000°C. Para convertir el material de óxido de calcio en carbonato de calcio, la carbonatación se realiza en un autoclave a una temperatura de 400°C con una presión de CO<sub>2</sub> de 2.2 MPa durante 24 horas. El material de carbonato de calcio se transforma luego en hidroxiapatita parcialmente sustituida con carbonato por fosfatación. Los andamios de hidroxiapatita resultantes derivados del ratán, tienen una resistencia a la compresión de entre 4 y 5 MPa en la dirección longitudinal, y una resistencia a la compresión de 1 MPa en la dirección transversal.

35 Aunque las publicaciones mencionadas anteriormente describen la transformación exitosa de la madera como el ratán y el pino en hidroxiapatita, al tiempo que reproducen de manera justa la morfología tridimensional de la madera, no se pudieron obtener andamios que exhiban características adecuadas para la regeneración de segmentos largos de hueso con carga.

40 De hecho, todas las publicaciones mencionadas se refieren a andamios de hidroxiapatita obtenidos de madera, que tienen dimensiones pequeñas (es decir, un volumen de menos de 1 cm<sup>3</sup>) que no pueden tener aplicaciones clínicas reales, particularmente para la regeneración de partes óseas grandes que soportan carga. Los procesos descritos en la técnica anterior no son adecuados para fabricar andamios de hidroxiapatita que tengan dimensiones que sean convenientes para aplicaciones clínicas, tales como para la regeneración de defectos óseos que soportan cargas de tamaño crítico donde se necesitan andamios grandes, es decir, con un tamaño de al menos igual a 2 cm.

45 Por lo tanto, sigue existiendo la necesidad en la técnica de un andamio biomórfico, en particular un andamio 3D poroso, con una composición química biomimética que exhiba un rendimiento mecánico adecuado, una morfología que sea favorable para la colonización celular y el crecimiento vascular y, al mismo tiempo, que tiene dimensiones que son adecuadas para aplicaciones clínicas.

50 Tal andamio biomórfico sería particularmente adecuado para la regeneración ósea, en particular para la implantación en defectos óseos que soportan carga, como huesos largos de las extremidades (por ejemplo, fémur, tibia, húmero, peroné, radio), pero también para la sustitución y regeneración de los huesos de la columna (p. ej. cuerpos vertebrales, disco intervertebral), partes óseas craneales o partes óseas maxilofaciales.

55 La presente divulgación satisface las necesidades anteriores proporcionando un andamio biomórfico, preferiblemente un andamio de hidroxiapatita particularmente adecuado para la sustitución y regeneración ósea, en particular para la sustitución y regeneración de huesos largos que soportan carga.

60 La presente divulgación también satisface las necesidades anteriores proporcionando un proceso para la fabricación de un andamio biomórfico, preferiblemente un andamio biomórfico 3D. En particular, el andamio biomórfico es un andamio de hidroxiapatita.

#### Resumen de la divulgación

65 En general, la presente divulgación describe un andamio de hidroxiapatita obtenido de una madera que tiene una porosidad total de entre 60% y 95%, midiéndose dicha porosidad después de someter la madera a un paso de pirólisis,

teniendo el andamio una longitud, medida a lo largo de una dirección en la cual una dimensión del andamio es máxima, mayor o igual a 2 cm.

Más particularmente, la presente divulgación describe un andamio biomórfico de hidroxiapatita obtenido de una madera que tiene una porosidad total de entre 60% y 95% (dicha porosidad se mide después de someter la madera a un paso de pirólisis), siendo caracterizada dicha hidroxiapatita por una estructura de poro organizado jerárquicamente y una resistencia a la compresión superior a 5 MPa, preferiblemente entre 10 MPa y 20 MPa, medida en la dirección a lo largo de los poros en forma de canal (dirección longitudinal). Preferiblemente, la hidroxiapatita de la descripción muestra una resistencia a la compresión a lo largo de la dirección perpendicular del eje largo de los canales (dirección transversal) de hasta 10 MPa.

Preferiblemente, el andamio de hidroxiapatita biomórfico obtenido de madera, tiene una estructura de poros organizada jerárquicamente que se deriva de la estructura de poros organizada jerárquicamente de la madera de la que se obtiene (madera nativa).

La presente divulgación también se refiere a un andamio biomórfico de hidroxiapatita derivado de madera, en donde la hidroxiapatita está parcialmente sustituida (dopada) con uno o más iones seleccionados del grupo que comprende magnesio, estroncio, silicio, titanio, carbonato, sodio, potasio, galio, plata, cobre, hierro, zinc, manganeso, europio y gadolinio.

La madera de la que se deriva la hidroxiapatita biomórfica tiene una porosidad total de entre 60% y 95%, preferiblemente entre 65% y 85% (dicha porosidad se mide después de someter la madera a un paso de pirólisis). Las maderas que exhiben porosidad dentro de estos rangos incluyen ratán, pino, abachi, balsa, sipo, roble, palo de rosa, kempas y madera de nogal. Preferiblemente, la hidroxiapatita biomórfica se obtiene de madera de ratán.

El andamio biomórfico de hidroxiapatita obtenido de la madera de la descripción tiene cohesión estructural y propiedades mecánicas que lo hacen particularmente adecuado para su uso como sustituto óseo.

Por lo tanto, la presente divulgación se refiere al uso del andamio biomórfico de hidroxiapatita como sustituto óseo, así como a un sustituto óseo que comprende dicho andamio biomórfico de hidroxiapatita. La divulgación también se refiere a un sustituto óseo que consiste en dicho andamio biomórfico de hidroxiapatita.

El andamio biomórfico de hidroxiapatita derivado de la madera puede usarse como un sustituto óseo para regenerar un hueso o una porción de hueso, en particular huesos humanos y animales. Preferiblemente, el andamio biomórfico de hidroxiapatita derivado de la madera puede usarse como un sustituto óseo para huesos o porciones de hueso que están sujetas a cargas mecánicas. Más preferiblemente, el hueso o las porciones de hueso son huesos largos de la pierna y el brazo, tales como tibia, peroné, fémur, húmero y radio.

El andamio biomórfico de hidroxiapatita derivado de la madera también se puede usar en la sustitución y/o reconstrucción de partes de huesos craneales, partes de huesos maxilofaciales y huesos de la columna vertebral (por ejemplo, cuerpos vertebrales, disco intervertebral).

El andamio biomórfico de hidroxiapatita de la descripción también se puede usar como filtro para líquidos o gases.

La presente divulgación también describe un proceso para obtener un andamio de hidroxiapatita biomórfico derivado de madera.

Más particularmente, la presente divulgación describe un proceso para producir un andamio de hidroxiapatita biomórfico que tiene una longitud, medida a lo largo de una dirección en la que una dimensión del andamio es máxima, mayor o igual a 2 cm, que comprende los pasos de pirólisis, carburación, oxidación, hidratación, carbonatación y fosfatación de una pieza de madera (madera nativa) que tiene una porosidad total de al menos 20%, preferiblemente al menos 40%, más preferiblemente comprendida entre 60% y 95%, en donde dicha porosidad se mide después de someter la madera al paso de la pirólisis. Ejemplos de madera nativa que puede someterse al proceso de la invención son: ratán, pino, abachi, balsa, sipo, roble, palo de rosa, kempas y nuez.

Si bien se describen múltiples realizaciones, aún otras realizaciones serán evidentes para los expertos en la técnica a partir de la siguiente descripción detallada. Como será evidente, ciertas realizaciones, como se divulga en el presente documento, son capaces de modificaciones en diversos aspectos obvios, todo sin apartarse de la divulgación. Por consiguiente, los dibujos y la descripción detallada deben considerarse de naturaleza ilustrativa y no restrictiva.

Breve descripción de las figuras.

Las siguientes figuras ilustran realizaciones preferidas de la materia descrita aquí. El tema reivindicado puede entenderse por referencia a la siguiente descripción tomada junto con las figuras adjuntas, en las cuales:

La Figura 1 muestra una realización particular del andamio biomórfico que presenta un canal central.

- La Figura 2 muestra fotografías que representan tejidos de ratones con explantes de calvaria después de 8 semanas. Se logró una formación y penetración ósea extensa de los poros del andamio en un grado similar cuando se implantó solo o con células estromales osteogénicas, donde a) representa madera y no células, b) representa hidroxiapatita y no células, c) representa madera y células, y d) representa hidroxiapatita y células. Las flechas en la Figura 2 f) apuntan a los poros en forma de canal del andamio que imitan los sistemas Haversianos. Los sistemas Haversianos u osteones son la unidad funcional del hueso compacto, en forma de cilindros hechos de láminas óseas organizadas en capas concéntricas. En el medio de las osteomas existe un canal que contiene el nervio óseo y el suministro de sangre.
- 5
- 10 La Figura 3 muestra una curva de tensión-deformación de un andamio biomórfico sometido a carga de compresión, en donde  $y$  = tensión (N) y  $x$  = deformación (mm).
- La Figura 4 muestra la distribución del volumen de poro interno de la hidroxiapatita biomórfica de la presente divulgación en comparación con el volumen de poro de la hidroxiapatita estructurada jerárquicamente obtenida con un método conocido en la técnica.
- 15
- La Figura 5 muestra un gráfico que representa la viabilidad mejorada de las células madre mesenquimales cuando están en contacto con andamios que comprenden 2 y 5% en moles de Sr, en comparación con un andamio libre de estroncio (BC) después de 24 horas, 48 horas, 72 horas, 7 días y 14 días.  $y$  = % respecto a BC.
- 20
- La Figura 6 muestra gráficos que representan la expresión de genes relevantes para la osteogénesis, como (a) RUNX2 y (b) ALP en andamios que contienen 2% en moles (Sr2%-BC) y 5% en moles (Sr5%-BC) de estroncio.  $y$  = expresión de cambio de pliegue relativa a BC y  $x$  = días.
- 25
- La Figura 7 muestra un gráfico que representa la viabilidad de los osteoblastos cuando está en contacto con andamios que comprenden 2 mol% (Sr2% BC) y 5 mol% (Sr5% BC) de Sr, en comparación con un andamio libre de estroncio (BC) después de 24 horas, 48 horas, 72 horas, 7 días y 14 días.  $y$  = % respecto a BC.
- 30
- La Figura 8 muestra gráficos que representan la expresión de genes relevantes para la osteogénesis, como (a) Osterix, (b) BGLapyc) IBSP en andamios que contienen 2% en moles (Sr2%-BC) y 5% en moles (Sr5%-BC) de estroncio.  $y$  = expresión de cambio de pliegue relativa a CT y  $x$  = días.
- 35
- La Figura 9 muestra gráficos que representan la expresión de genes relevantes para osteoclastos, tales como (a) Osacr, (b) CTSK y c) Itg $\beta$ 3 en andamios que contienen 2% en moles (Sr2%-BC) y 5% en moles (Sr5%-BC) de estroncio.  $y$  = expresión de cambio de pliegue relativa a CT y  $x$  = días. Se puede observar una disminución significativa de los genes involucrados en las principales vías moleculares de los osteoclastos con el tiempo; indicando así que la presencia de iones Sr<sup>2+</sup> en el andamio inhibe la formación y actividad de osteoclastos; en la Figura a) los datos de 14 días estaban por debajo del límite de detección.
- 40
- La Figura 10 muestra una comparación de la distribución de poros de dos andamios de carburo de calcio obtenidos después de la etapa de carburación de la técnica anterior y la etapa de carburación de la presente invención, en comparación adicional con la distribución de poros de la madera pirolizada de partida. La superficie específica de los dos andamios de carburo de calcio también se informa en la figura;
- 45
- Las Figuras 11, 12 y 13 de las dos imágenes superiores muestran imágenes SEM de dos andamios de carburo de calcio obtenidos con el proceso de la invención y el proceso de la técnica anterior, respectivamente;
- Las dos imágenes inferiores de la Figura 13 muestran una comparación de la dimensión de los granos de carburo de calcio;
- 50
- La Figura 14 muestra una comparación de la fase cristalina de los dos andamios de carburo de calcio, medida con rayos x-XRD, obtenida con el proceso de la invención y el proceso de la técnica anterior, respectivamente.
- 55
- La Figura 15 muestra imágenes SEM del andamio de óxido de calcio obtenido después de la etapa de oxidación de la presente invención y la etapa de oxidación de la técnica anterior;
- La Figura 16 representa la distribución de poros de los dos andamios de óxido de calcio obtenidos después de la etapa de oxidación de la presente invención y la etapa de oxidación de la técnica anterior, respectivamente;
- 60
- Las Figuras 17 y 18 muestran imágenes SEM del carbonato de calcio obtenido después de la etapa de carbonatación según la presente invención y la etapa de carbonatación de la técnica anterior, respectivamente;
- 65
- La Figura 19 muestra que la distribución de poros de los dos andamios de carbonato de calcio obtenidos después de la etapa de carbonatación según la presente invención y la etapa de carbonatación de la técnica anterior, respectivamente;

La Figura 20 muestra la comparación entre la distribución de poros del andamio de hidroxiapatita biomórfico final (después de la fosfatización) obtenido con el proceso de la divulgación y el andamio de hidroxiapatita biomórfico final de la técnica anterior;

5 La Figura 21 muestra el resultado obtenido después de someter una pieza de madera de ratán que tiene una longitud, medida a lo largo de una dirección en la que la dimensión del andamio es máxima, igual o mayor que 2 cm, a los pasos del proceso de acuerdo con las condiciones descritas en la técnica anterior: incluso antes del paso de fosfatización, el andamio puede romperse;

10 La Figura 22 muestra el resultado obtenido después de someter una pieza de madera de ratán que tiene una longitud, medida a lo largo de una dirección en la que la dimensión del andamio es máxima, igual o mayor que 2 cm, a los pasos del proceso de acuerdo con las condiciones descritas en la técnica anterior: incluso si el andamio sobrevive, el proceso avanza hacia la fosfatización, después de la fosfatización el andamio se rompe;

15 La Figura 23 muestra la cuantificación relativa ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ) de la expresión génica con respecto a la expresión del andamio de la técnica anterior no dopado usado como calibrador, después de 14 días de mMSCs 3D cultivadas en condición dinámica con todas las muestras analizadas;

La Figura 24 muestra una realización del andamio biomórfico con forma de cuboide.

20 La Figura 25 muestra que la estructura en forma de canal del andamio de hidroxiapatita biomórfica obtenida con el proceso de la presente divulgación se caracteriza únicamente por canales grandes permeables (100-300 micras de diámetro) (micro CT Escanear). Dichos canales son permisivos para la formación de vasos sanguíneos adecuados que apoyan la regeneración ósea.

25 Descripción detallada de la divulgación

30 Como se usa en la presente descripción y en las reivindicaciones adjuntas, "estructura de poros jerárquica" o "estructura de poros organizada jerárquicamente" indica un material que tiene una estructura de poros tridimensional anisotrópica en la cual los poros en forma de canal están interconectados a través de canales transversales y en donde los micro y los nanoporos están presentes en el área que rodea los poros en forma de canal.

35 Como se usa en la presente descripción y en las reivindicaciones adjuntas, los valores de "resistencia a la compresión" se obtienen con el método descrito en la siguiente descripción ejerciendo fuerzas mecánicas a lo largo de las direcciones longitudinales y direcciones transversales, con respecto a los poros en forma de canal.

40 Como se usa en la presente divulgación y en las reivindicaciones adjuntas, "defecto óseo" se refiere a una parte o porción faltante del hueso o al hueso completo que falta y necesita ser reemplazado totalmente por el andamiaje de la divulgación.

45 Como se usa en la presente descripción, "hidroxiapatita biomórfica" se refiere a un material que: 1) consiste en hidroxiapatita o 2) comprende hidroxiapatita o 3) es un material que comprende o consiste en hidroxiapatita y fosfato tricálcico. En caso de que el material consista en hidroxiapatita y fosfato tricálcico, el material es un material bifásico. En una realización de la invención, cuando la "hidroxiapatita biomórfica" es un material que comprende o consiste en hidroxiapatita y fosfato tricálcico, la hidroxiapatita se dopa con uno o más iones elegidos en el grupo que consiste en magnesio, estroncio, silicio, titanio, carbonato, potasio, sodio, plata, galio, cobre, hierro, zinc, manganeso, europio, gadolinio y sus mezclas.

50 Los inventores de la presente solicitud de patente han encontrado sorprendentemente que es posible obtener un andamio de hidroxiapatita biomórfico de madera que exhibe una composición química biomimética, un rendimiento mecánico adecuado, una morfología que es favorable para la colonización celular y el crecimiento vascular y, al mismo tiempo, tiene dimensiones que son adecuadas para aplicaciones clínicas.

55 En un primer aspecto, la presente divulgación describe un andamio biomórfico de hidroxiapatita obtenido de una madera que tiene una porosidad total de al menos 20%, preferiblemente al menos 40%, más preferiblemente comprendido entre 60% y 95%, en donde dicha porosidad se mide después de someter a la madera al paso de la pirólisis, el andamio tiene una longitud, medida a lo largo de una dirección en la que la dimensión del andamio es máxima, mayor o igual a 2 cm.

60 La porosidad total del andamio de hidroxiapatita biomórfica obtenida después del proceso de la divulgación es la misma que la porosidad total de la madera de partida medida después de someter la madera al paso de pirólisis. En particular, la porosidad total del andamio biomórfico de hidroxiapatita obtenido después del proceso de la divulgación es al menos 20%, preferiblemente al menos 40%, más preferiblemente comprendido entre 60% y 95%.

65 Preferiblemente, el andamio tiene una longitud, medida a lo largo de una dirección en la que la dimensión del andamio es máxima, que es mayor o igual a 2 cm y alcanza un valor final que se determina de acuerdo con la aplicación clínica.

Por ejemplo, en el caso de la sustitución ósea de huesos largos, como tibia, fémur, peroné, húmero, radio, la longitud del andamio, medida a lo largo de una dirección en la que la dimensión del andamio es máxima, puede estar comprendida entre 2 y 20 centímetros.

- 5 Preferiblemente, el andamio de la descripción tiene una resistencia a la compresión medida en la dirección longitudinal de más de 5 MPa, preferiblemente entre 10 MPa y 20 MPa.

Preferiblemente, el andamio de la descripción muestra una resistencia a la compresión a lo largo de la dirección transversal de hasta 10 MPa.

- 10 Preferiblemente, el andamio biomórfico de hidroxiapatita se caracteriza por una estructura de poros organizada jerárquicamente.

- 15 La "estructura de poros jerárquica" o "estructura de poros organizada jerárquicamente" del andamio de hidroxiapatita de la divulgación deriva de la compleja estructura jerárquica tridimensional de la madera de partida de la que se obtiene el andamio y, por lo tanto, tiene una gama de poros de diferentes tamaños. Los poros de diferentes tamaños en la estructura jerárquica lo hacen deseable para su uso como sustituto óseo.

- 20 Por ejemplo, los poros que tienen un diámetro  $\geq 200 \mu\text{m}$ , preferiblemente entre  $150\text{-}300 \mu\text{m}$ , más preferiblemente  $200\text{-}300 \mu\text{m}$  permitirán la colonización y proliferación celular y la formación de un árbol de vascularización apropiado. Poros que tienen un diámetro  $\leq 10 \mu\text{m}$ , preferiblemente  $<1 \mu\text{m}$ , más preferiblemente entre  $0.01$  y  $0.1 \mu\text{m}$  (micro y nanoporos), que interconectan parcialmente los poros en forma de canal, permiten el intercambio de fluidos nutritivos y la descarga de los productos de desecho del metabolismo celular.

- 25 La preservación de la estructura jerárquica de poros de la madera en la hidroxiapatita, proporciona andamios con características mecánicas óptimas y permite la descarga eficiente de cargas mecánicas.

Como la hidroxiapatita obtenida de la madera reproduce en detalle la estructura de un material natural, se puede denominar biomórfica.

- 30 En particular, la estructura de poros organizada jerárquicamente del andamio de la divulgación incluye entre 30% y 80% (de la porosidad total) de poros que tienen un diámetro inferior a  $150 \mu\text{m}$ , el recordatorio de que el 100% de la porosidad total son poros que tienen un diámetro mayor de  $150 \mu\text{m}$ .

- 35 En una realización, preferiblemente cuando la madera de partida es de ratán, entre el 30% y el 60% de la porosidad total del andamio se debe a poros que tienen un diámetro  $\leq 10 \mu\text{m}$ .

- 40 En una realización, preferiblemente cuando la madera de partida es de ratán, al menos el 25% de la porosidad total, preferiblemente entre el 25% y el 50% de la porosidad total del andamio de hidroxiapatita se debe a poros que tienen un diámetro  $\leq 1 \mu\text{m}$ , preferiblemente  $\leq 0.1 \mu\text{m}$ , en particular entre  $0.01$  y  $0.1 \mu\text{m}$ .

En una realización, preferiblemente cuando la madera de partida es de ratán, al menos el 20% de la porosidad total del andamio de hidroxiapatita se debe a poros que tienen un diámetro  $\geq 150 \mu\text{m}$ .

- 45 Preferiblemente, el andamio de hidroxiapatita tiene un área superficial específica (SSA)  $> 9 \text{ m}^2/\text{g}$ , preferiblemente de 9 a  $20 \text{ m}^2/\text{g}$ .

- 50 La madera utilizada para obtener el andamio de hidroxiapatita puede ser cualquier madera que tenga una porosidad total de al menos 20%, preferiblemente al menos 40%, más preferiblemente comprendida entre 60% y 95%, incluso más preferiblemente una porosidad de entre 65% y 85% (dicha porosidad se mide después de someter la madera a un paso de pirólisis).

Ejemplos de maderas adecuadas utilizadas para obtener la hidroxiapatita incluyen ratán, pino, abachi, balsa, sipo, roble, palo de rosa, kempas y madera de nogal, preferiblemente la madera utilizada es madera de ratán.

- 55 El andamio de hidroxiapatita obtenido de la madera puede comprender hidroxiapatita que está parcialmente sustituida con uno o más iones. Ejemplos de tales iones son carbonato, magnesio, estroncio, silicio, titanio, sodio, potasio, plata, galio, cobre, hierro, zinc, manganeso, europio y gadolinio. La introducción de carbonato en el sitio de fosfato aumenta la biosolubilidad y mejora la afinidad de la superficie a las células de osteoblastos.

- 60 La introducción de magnesio proporciona una mayor capacidad de nueva aposición y formación de hueso. La introducción del estroncio ayuda a restablecer la producción ósea, afectada por enfermedades metabólicas como la osteoporosis, de modo que su presencia puede mejorar la regeneración ósea.

- 65 La introducción de plata, galio, cobre y zinc proporciona propiedades antibacterianas. Cuando el andamio de hidroxiapatita obtenido de la madera comprende hidroxiapatita que está parcialmente sustituida con uno o más iones,

el andamio es un material que comprende o consiste en hidroxiapatita dopada y fosfato tricálcico. Según otra realización, el andamio biomórfico de hidroxiapatita de la presente divulgación puede comprender:

- 5 • 0-15% en peso de magnesio, preferiblemente 1-10% en peso; y/o
- 0-15% en peso de carbonato, preferiblemente 1-10% en peso; y/o
- 0-15% en peso de estroncio, preferiblemente 1-10% en peso; y/o
- 10 • 0-20% en peso de titanio, preferiblemente 1-10% en peso; y/o
- 0-15% en peso de potasio, preferiblemente 1-10% en peso; y/o
- 15 • 0-15% en peso de sodio, preferiblemente 1-10% en peso; y/o
- 0-15% en peso de silicio, preferiblemente 1-10% en peso y/o;
- 0-15% en peso de plata, preferiblemente 1-10% en peso y/o;
- 20 • 0-15% en peso de galio, preferiblemente 1-10% en peso y/o;
- 0-15% en peso de cobre, preferiblemente 1-10% en peso y/o;
- 25 • 0-30% en peso de hierro, preferiblemente 1-10% en peso; y/o
- 0-15% en peso de zinc, preferiblemente 1-10% en peso y/o;
- 0-15% en peso de manganeso, preferiblemente 1-10% en peso y/o;
- 30 • 0-15% en peso de europio, preferiblemente 1-10% en peso y/o;
- 0-15% en peso de gadolinio, preferiblemente 1-10% en peso y/o.

35 El andamio biomórfico de hidroxiapatita obtenido de la madera según la presente divulgación, tiene características de bioactividad y biorreabsorbibilidad combinadas con características y dimensiones de resistencia mecánica que lo hacen particularmente adecuado para uso clínico como sustituto óseo, en particular en humanos y animales. Tal sustituto óseo podría usarse para sustituir y/o reconstruir y/o regenerar hueso, porciones óseas o defectos óseos. Por ejemplo, el sustituto óseo podría usarse para sustituir o regenerar hueso o porciones de hueso que están sujetas a cargas mecánicas. Por ejemplo, el sustituto óseo podría usarse para sustituir o regenerar huesos largos de brazos y  
40 piernas. Dichos huesos largos pueden incluir tibia, fémur, peroné, húmero, radio, etc.

El sustituto óseo también podría usarse en la sustitución y/o reconstrucción de partes óseas craneales, partes óseas maxilofaciales y huesos de la columna vertebral, por ejemplos cuerpos vertebrales, disco intervertebral) y en procedimientos de cirugía de fusión espinal.

45 Cuando se usa como un sustituto óseo, el andamio biomórfico de hidroxiapatita puede tener una forma que se adapte a la forma del defecto óseo que necesita ser reconstruido de tal manera que llene sustancialmente la brecha ósea. Por lo tanto, el andamio y el sustituto óseo de la descripción pueden tener cualquier forma que sea adecuada para el propósito de reconstruir y regenerar defectos óseos o para sustituir cualquier parte faltante del hueso.

50 Por ejemplo, el andamio o el sustituto óseo de la presente divulgación puede tomar la forma de un cilindro, prisma derecho, cuboide o cuñas. En una realización, el andamio o el sustituto óseo comprende un canal central con un diámetro de entre aproximadamente el 20% y aproximadamente el 60% del diámetro del andamio o el sustituto óseo. En particular, el andamio o el sustituto óseo tiene una forma tubular.

55 En una realización, la presente divulgación se refiere además a un andamio o un sustituto óseo que tiene una forma cilíndrica, prisma derecha, cuboide o tubular, que tiene una altura mayor o igual a 2 cm.

60 En una realización de la presente divulgación, el andamio o el sustituto óseo pueden recubrirse con una capa delgada basada en hidroxiapatita y/o colágeno para aumentar la adhesión celular y la proliferación, y por lo tanto la osteointegración en el tejido óseo circundante. La capa puede comprender adicionalmente hidroxiapatita sustituida con uno o más iones relevantes para la estimulación de la regeneración ósea tal como carbonato, magnesio, silicio, potasio, sodio y estroncio, o con efecto antibacteriano como galio, plata, cobre o zinc.

En una realización adicional de la presente divulgación, el andamio o el sustituto óseo se pueden remojar en un polímero natural (elegido entre el grupo que comprende gelatina, colágeno, alginato, quitosano, gelano, celulosa) para aumentar aún más las propiedades mecánicas y promover aún más la adhesión celular.

5 Para el andamio o las células de sustitución ósea, se puede agregar plasma rico en plaquetas, anticuerpos, proteínas de factores de crecimiento, fragmentos de ADN, ARNmi, ARNsi para ayudar a la adhesión celular.

También se pueden agregar medicamentos, como antibióticos o medicamentos contra el cáncer, al andamio o al sustituto óseo.

10 La descripción también se refiere a un método de reconstrucción y/o regeneración de un hueso humano o animal que tiene un defecto óseo, que comprende los pasos de:

15 • proporcionar un sustituto óseo que comprende o consiste en el andamio biomórfico de hidroxiapatita de la descripción que tiene una forma que corresponde a la forma de un defecto óseo;

• implantar el sustituto óseo en el defecto óseo del paciente.

20 Preferiblemente, el método de reconstrucción y/o regeneración incluye los pasos de proporcionar un modelo 3D del defecto óseo y, basándose en el modelo 3D obtenido, impartir al andamio una forma correspondiente a la forma del defecto óseo. El paso de impartir una forma al andamio se puede aplicar a la pieza inicial de madera o al andamio de hidroxiapatita obtenido al final del proceso de transformación de la divulgación o al andamio obtenido después de cada paso del proceso (por ejemplo, después de paso de carbonatación). Preferiblemente, el paso de impartir la forma se aplica sobre la pieza inicial de madera.

25 El andamio de hidroxiapatita biomórfico de la descripción y el andamio de hidroxiapatita biomórfico parcialmente sustituido con uno o más iones, se obtiene de un proceso de transformación de múltiples pasos que comprende los siguientes pasos:

30 1) Pirólisis: una madera nativa se calienta a una temperatura en el rango de 600°C a 1000°C bajo una atmósfera inerte para permitir la descomposición y la eliminación de todas las sustancias orgánicas. De este proceso, se obtiene una plantilla de carbono.

35 2) Carburización: la plantilla de carbono se infiltra con calcio en estado de vapor a una temperatura en el rango de 900 a 1200°C, y a una presión < 1000 mbar, preferiblemente <600 mbar, más preferiblemente en el rango de 0.05 a 100 mbar, transformando así la plantilla de carbono en carburo de calcio (CaC<sub>2</sub>).

40 3) Oxidación: la plantilla de carburo de calcio se calienta en aire a una temperatura en el rango de 750 a 1300°C, preferiblemente 1000-1200°C, permitiendo así la transformación del carburo de calcio en óxido de calcio (CaO).

4) Hidratación: la plantilla de óxido de calcio se expone al agua, permitiendo así la absorción de agua en una cantidad de 1-25% en moles, preferiblemente 5-15% en peso.

45 5) Carbonatación: la plantilla de óxido de calcio se transforma en carbonato de calcio mediante calentamiento a una temperatura en el rango de 500 a 900°C, preferiblemente a una temperatura en el rango de 750 a 850°C bajo una presión de CO<sub>2</sub>, o una mezcla de CO<sub>2</sub> y una presión de gas inerte (por ejemplo, argón, nitrógeno). El rango de presión es de 4 a 20 MPa.

50 6) Fosfatización: la plantilla de carbonato de calcio se trata con al menos una sal de fosfato.

En la etapa de pirólisis 1) del proceso de múltiples pasos, la madera nativa se selecciona preferiblemente entre ratán, pino, abachi, balsa sipo, roble, palo de rosa, kempas y madera de nogal. Más preferiblemente, la madera nativa es madera de ratán.

55 La madera nativa tiene una porosidad total de al menos 20%, preferiblemente al menos 40%, más preferiblemente comprendida entre 60% y 95%, en donde dicha porosidad se mide después de someter la madera a la etapa de pirólisis.

60 Antes de la etapa de pirólisis 1), la madera nativa de partida se puede secar opcionalmente a una temperatura entre 50°C y 90°C, preferiblemente a una temperatura entre 60°C y 80°C, más preferiblemente a una temperatura entre 65°C y 75°C. La madera nativa puede secarse durante más de 6 horas, preferiblemente durante más de 12 horas, preferiblemente durante más de 18 horas, preferiblemente durante un tiempo comprendido entre 20 y 30 horas.

65 En la etapa de pirólisis del proceso de etapas múltiples, la atmósfera inerte puede ser una atmósfera de un gas seleccionado del grupo que comprende nitrógeno y argón.

En la etapa de pirólisis del proceso de etapas múltiples, la madera nativa se puede calentar a una temperatura de entre 600°C a 1000°C, preferiblemente a una temperatura de entre 800°C y 1000°C. La etapa de pirólisis puede durar más de 6 horas, preferiblemente más de 12 horas, preferiblemente más de 18 horas, preferiblemente dicha etapa puede durar un tiempo comprendido entre 20 y 30 horas.

5 El ciclo térmico de la etapa de pirólisis 1) puede llevarse a cabo calentando la madera nativa a una velocidad no superior a 5°C/min, preferiblemente no superior a 3°C/min y enfriando a una velocidad no superior a 3°C/min, preferiblemente no superior a 2°C/min, para evitar la formación de grietas y fracturas internas del material.

10 Antes del paso 1) de pirólisis, el método de varios pasos puede comprender adicionalmente un paso i) de selección y preparación de la madera nativa, en donde dicha madera nativa se puede cortar en una pieza que tenga una forma que corresponda a la forma de un defecto óseo reconstruido. En particular, la madera nativa se forma en una pieza de madera que tiene una longitud, medida a lo largo de una dirección en la que la dimensión de la madera es máxima, que es mayor o igual a 2 cm. Preferiblemente, la dimensión de la madera alcanza un valor final que se determina de acuerdo con la aplicación clínica.

15 Por ejemplo, la madera nativa puede tener forma de cilindro, prisma derecho o cuboide. La madera nativa también puede tener una forma tal que comprenda un canal central con un diámetro de entre aproximadamente el 20% y aproximadamente el 60% del diámetro de la pieza de madera. En particular, la madera nativa se puede cortar en forma tubular. Preferiblemente, el paso i) de selección y preparación de la madera nativa, comprende los pasos de: proporcionar un modelo 3D de un defecto óseo y, basándose en el modelo 3D obtenido, impartir a la madera nativa una forma correspondiente a la forma del hueso defecto. El paso de impartir una forma a la madera nativa se puede aplicar a la madera nativa inicial o al andamio de hidroxiapatita obtenido al final del proceso de transformación de múltiples pasos. Preferiblemente, la etapa de impartir la forma se aplica sobre la madera nativa de partida para evitar daños internos y externos (fractura) del andamio.

20 En la etapa de carburación 2) del proceso de etapas múltiples, la reacción se lleva a cabo preferiblemente con una relación molar Ca/C (al comienzo de la reacción) en el rango de 1.10 a 2.50, preferiblemente en el rango de 1.50 a 2.00. La relación molar Ca/C es importante porque las relaciones por debajo del rango conducen a reacciones incompletas y las relaciones por encima del rango conducen a la obstrucción de los poros por los residuos de Ca.

25 En la etapa de carburación del proceso de múltiples etapas, la plantilla de carbón se calienta a una velocidad de calentamiento en el rango de 1 a 10°C/min, preferiblemente a una velocidad de calentamiento en el rango de 1 a 7°C/min.

30 Los inventores de la presente solicitud de patente han encontrado sorprendentemente que llevar a cabo la etapa de carburación a una presión reducida como se describió anteriormente es una ventaja para la aplicación exitosa de las etapas posteriores del proceso, particularmente cuando se necesita producir un andamio biomórfico grande.

35 De hecho, al usar las condiciones de presión descritas anteriormente, la evaporación del calcio puede ocurrir a temperaturas que son aproximadamente 400-500°C más bajas que el punto de ebullición del calcio en la atmósfera ambiente (es decir, 1484°C), lo que produce, inesperadamente, la transformación completa de la madera pirolizada en carburo de calcio a una temperatura mucho más baja que cualquier otro proceso conocido en la técnica. En particular, el uso de presión en el rango de 50-60000 Pa (0.5-600 mbar), o preferiblemente 5-10000 Pa (0.05 a 100 mbar), da como resultado una transformación sustancialmente completa de la madera pirolizada en carburo de calcio.

Una transformación sustancialmente completa de la madera pirolizada en carburo de calcio dará como resultado una ventaja para los rendimientos de las etapas de transformación posteriores.

40 Las condiciones de carburación de la presente divulgación también mejoran la preservación de los micro y nanoporos que tienen diámetros  $\leq 1 \mu\text{m}$  (preferiblemente de 0.01 a 0.1  $\mu\text{m}$ ) de la madera nativa tanto en el andamio después de la carburación como en el andamio biomórfico final, con respecto a los andamios conocidos obtenidos de la madera utilizando procesos conocidos.

45 La fase de carburación es un paso crítico en el proceso porque una buena preservación de la micro y nanoporosidad después de este paso asegurará que el andamio biomórfico final exhiba una nano/micro porosidad similar. La presencia de un alto porcentaje de microporos y nanoporos bien interconectados en el andamio biomórfico final permite el intercambio de fluidos nutrientes y la descarga de los productos de desecho del metabolismo celular.

50 Además de mejorar la preservación de los microporos y nanoporos con diámetros  $\leq 1 \mu\text{m}$ , las condiciones de carburación aquí descritas producen un andamio después de la cementación (y también un andamio biomórfico final) con un área superficial específica (SSA) de 9 a 20  $\text{m}^2/\text{g}$ . Tal área superficial específica es aproximadamente 2 veces mayor que la SSA de un andamio obtenido con un proceso conocido en la técnica, que es de aproximadamente 5-6  $\text{m}^2/\text{g}$  (véase el ejemplo comparativo 4 y las figuras 10-13).

65

Las condiciones de carburación de la presente divulgación también producen un andamio poroso de carburo de calcio que contiene granos de carburo de calcio que son más pequeños que los granos de un andamio obtenido con un proceso conocido (véase el ejemplo comparativo 4 y las figuras de la Figura 13).

5 Los ejemplos comparativos muestran que las dimensiones de los granos de carburo de calcio en el andamio después de la carburación según la presente divulgación es de aproximadamente 5-15  $\mu\text{m}$  (preferiblemente aproximadamente 10  $\mu\text{m}$ ), mientras que las dimensiones cristalinas del andamio después de la carburación obtenida con procesos conocidos son aproximadamente 100  $\mu\text{m}$ .

10 Los inventores de la presente solicitud de patente han descubierto sorprendentemente que el área superficial específica más alta (SSA) y la dimensión más pequeña de los granos que se obtienen con las condiciones de carburación descritas anteriormente, y que no pueden obtenerse mediante los métodos descritos anteriormente, es importante para garantizar alto rendimiento de transformación de la madera nativa después de cada paso del proceso.

15 El ejemplo comparativo 4 y la figura 14 también muestran que el andamio después de la carburación según la presente divulgación contiene carburo de calcio con una mezcla de celosía de cristal tetragonal y cúbico, mientras que el andamio obtenido con procesos conocidos contiene carburo de calcio con una celosía de cristal tetragonal solamente. Dado que el óxido de calcio solo tiene una estructura de cristal cúbico, la transformación de un carburo de calcio, que está parcialmente en forma cúbica, a óxido de calcio, puede ocurrir con un menor riesgo de generar microfracturas en el andamio. Esto es extremadamente ventajoso para la calidad del andamio biomórfico final.

Por lo tanto, las condiciones empleadas en la etapa de carburación reducen en gran medida el número de defectos que se pueden observar en la estructura jerárquica de los poros del carburo de calcio.

25 Además, las bajas temperaturas empleadas en la presente divulgación (es decir, muy por debajo de 1500°C) evitan la coalescencia del grano y la consolidación excesiva del carburo de calcio, lo que provoca una distorsión estructural y desviaciones de la microestructura original de la madera de partida, lo que perjudica el resultado de los siguientes pasos del proceso.

30 En el paso de oxidación 3) del proceso de múltiples pasos, la plantilla de carburo de calcio se puede calentar a una temperatura final en el rango de 800 a 1300°C, preferiblemente a una temperatura final en el rango de 1000 a 1200°C.

En la etapa de oxidación, la plantilla de carburo de calcio se puede calentar a una velocidad de calentamiento en el rango de 1 a 15°C/min, preferiblemente a una velocidad de calentamiento en el rango de 1 a 7°C/min. La oxidación del carburo de calcio obtenido bajo presión de acuerdo con la etapa de carburación descrita anteriormente conduce a un andamio de óxido de calcio con mayor área superficial específica (SSA) y una porosidad con una mayor fracción de microporos y nanoporos con respecto a los andamios obtenibles con los procesos conocidos (véase ejemplo comparativo 4 y Figura 16). El experimento comparativo muestra que la micro y nanoporosidad se conserva también después del paso de oxidación.

40 En la etapa de hidratación 4) del proceso de múltiples etapas, la plantilla de óxido de calcio se expone al agua, permitiendo así la absorción de agua en una cantidad comprendida preferiblemente en el rango de 1-25% en moles, más preferiblemente comprendida en el rango de 5-15 moles %. Este paso conduce a la formación de óxido de calcio hidratado que contiene hidróxido de calcio en una cantidad  $\leq 50\%$  en peso de la estructura 3D, que cataliza la posterior carbonatación de CaO. La cantidad de hidróxido de calcio ( $\text{Ca}(\text{OH})_2$ ) como producto intermedio debe controlarse estrictamente para evitar el colapso de la estructura 3D. Las condiciones de hidratación aquí descritas permiten mantener la cantidad de hidróxido de calcio  $\leq 50\%$ .

50 En una realización preferida, la etapa de hidratación se realiza al mismo tiempo que la etapa de carbonatación, por ejemplo usando  $\text{CO}_2$  enriquecido con agua.

En el paso de carbonatación 5) del proceso de varios pasos, el uso de alta temperatura al tiempo que aumenta progresivamente la presión de  $\text{CO}_2$  en el sistema hasta los valores indicados anteriormente, sorprendentemente permite la conversión sustancialmente completa de óxido de calcio hidratado en una plantilla de carbonato de calcio que exhibe sorprendentemente alta cohesión y resistencia mecánica.

El paso de carbonatación del proceso de varios pasos se puede llevar a cabo de acuerdo con uno de los siguientes ciclos térmicos:

60 • a una presión constante de  $\text{CO}_2$  de aproximadamente 10-15 MPa, aumentando lentamente la temperatura a un valor en el rango de aproximadamente 750-850°C, preferiblemente a aproximadamente 800°C;

• a una temperatura constante de aproximadamente 750-850°C (o aproximadamente 700-800°C), preferiblemente a aproximadamente 800°C, elevando la presión hasta aproximadamente 10-15 MPa;

65

- mantener la presión a aproximadamente 4-6 MPa mientras se eleva la temperatura hasta aproximadamente 750-850°C (o aproximadamente 700-800°C), preferiblemente hasta aproximadamente 800°C y posteriormente aumentar la presión hasta aproximadamente 10-15 MPa.

5 El proceso de carbonatación ocurre a través de la formación de intermedios reactivos, tal como el hidróxido de calcio. Esto conduce a un carbonato de calcio final caracterizado por una estructura de grano fino sustancialmente libre de cualquier cristal cúbico grande de carbonato de calcio ( $> 10 \mu\text{m}$ ), lo que podría comprometer la integridad estructural de la estructura 3D. El ejemplo comparativo 4 y las Figuras 17-18 muestran que, gracias a la aplicación de una etapa de hidratación, después de la etapa de carbonatación se obtiene una estructura de grano más fino, en comparación con la estructura 3D intermedia que se obtiene con los procesos conocidos en la técnica.

10 El paso de carbonatación llevado a cabo en las condiciones descritas anteriormente da como resultado propiedades mecánicas superiores del andamio de hidroxiapatita biomórfico que se puede obtener mediante el proceso de la divulgación en comparación con procesos similares conocidos en la técnica, en donde el paso de carbonatación se lleva a cabo a alta temperatura y baja presión o a alta presión y baja temperatura.

15 Los inventores de la presente solicitud de patente han encontrado sorprendentemente que el logro de las características descritas anteriormente en el carbonato de calcio es una condición importante para permitir la transformación completa de piezas grandes (es decir,  $\geq 2 \text{ cm}$ ) en un andamio biomórfico final que tiene la composición deseada y mantenimiento de la microestructura de madera original.

20 En el paso de fosfatación 6) del proceso de múltiples pasos, la al menos una sal de fosfato se puede seleccionar del grupo que consiste en fosfato de amonio, fosfato de sodio y fosfato de potasio. El uso de fosfato de amonio permite un mejor control del pH, por lo tanto, el proceso de conversión es más eficiente y el cuerpo resultante tiene propiedades mecánicas favorables y cohesión física.

25 En la etapa de fosfatación del proceso de múltiples etapas, la plantilla de carbonato de calcio puede sumergirse en una solución que comprende al menos una de dichas sales de fosfato. La solución puede tener una concentración de 0.1 a 5M, preferiblemente una concentración de 0.5 a 2.0M.

30 La relación inicial de  $\text{PO}_4/\text{CO}_3$  en la etapa de fosfatación del proceso de múltiples etapas es preferiblemente de 1,5 a 5 veces el valor estequiométrico teórico, preferiblemente de 2 a 4 veces el valor estequiométrico teórico.

35 En la etapa de fosfatación del proceso de varias etapas, la plantilla de carbonato de calcio sumergida en una solución rica en fosfato puede calentarse de 25°C a 300°C bajo una presión de vapor en el rango de 0.1 a 2.5 MPa (condiciones hidrotérmicas).

40 La etapa de fosfatación puede durar de aproximadamente 12 a aproximadamente 180 horas, preferiblemente de aproximadamente 48 a aproximadamente 120 horas, más preferiblemente de 24 a 72 horas.

45 El pH inicial de la solución rica en fosfato en la etapa de fosfatización del método de etapas múltiples está preferiblemente entre pH 7 y 12.

50 La sustitución de la hidroxiapatita con otros iones se puede lograr mediante la introducción de sales solubles adecuadas que contienen los iones de interés durante o después de la finalización del proceso, preferiblemente durante el proceso de fosfatación. Los iones adecuados pueden incluir estroncio, magnesio, silicio, titanio, carbonato, sodio, potasio, galio, plata, cobre, hierro, zinc, manganeso, europio, gadolinio, y mezclas de los mismos. Un ejemplo de una solución que contiene iones de magnesio es  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , y un ejemplo de una solución que contiene iones de estroncio es  $\text{SrCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ .

55 Como consecuencia del dopaje iónico, el andamio biomórfico final comprende o consiste en un material que comprende o consiste en hidroxiapatita dopada y fosfato tricálcico.

60 De acuerdo con una realización menos preferida, donde la madera nativa no se ha conformado en forma y dimensiones adecuadas para usarse como sustituto óseo (es decir, si no se lleva a cabo el paso i), el andamio biomórfico de hidroxiapatita obtenido del proceso de múltiples pasos puede convenientemente conformarse en un andamio que tenga la forma y conformación requeridas por técnicas conocidas.

65 La divulgación también se refiere al andamio biomórfico de hidroxiapatita obtenido (u obtenible) del proceso descrito anteriormente, que tiene propiedades físicas y mecánicas mejoradas en comparación con las hidroxiapatitas estructuradas jerárquicamente obtenidas por procesos similares conocidos en la técnica.

En particular, el andamio biomórfico de hidroxiapatita obtenido (u obtenible) del proceso de la presente divulgación posee todas las características descritas anteriormente para el andamio o sustituto óseo de la divulgación.

En particular, con respecto a la técnica anterior, el andamio biomórfico final obtenido con el proceso aquí descrito posee una porosidad que está compuesta por un mayor porcentaje de microporos y nanoporos que los andamios obtenidos por procesos similares conocidos en la técnica. En particular, al menos el 25% de la porosidad total, preferiblemente entre el 25% y el 50% de la porosidad total del andamio de hidroxiapatita de la descripción se debe a poros que tienen un diámetro  $\leq 1 \mu\text{m}$ , preferiblemente  $\leq 0.1 \mu\text{m}$ , en particular entre  $0.01$  y  $0.1 \mu\text{m}$ .

Este alto porcentaje de micro y nanoporosidad es extremadamente ventajoso desde un punto de vista clínico porque los micro y nanoporos permiten el intercambio de fluidos nutrientes y la descarga de los productos de desecho del metabolismo celular mejoran, mejorando así la regeneración ósea.

Además, el andamio biomórfico de la descripción muestra un área superficial específica más alta ( $9$  a  $20 \text{ m}^2/\text{g}$  frente a  $5-6 \text{ m}^2/\text{g}$ ) que un andamio obtenido con un proceso conocido en la técnica. Un área superficial mayor determina una bioactividad superficial mejorada y una humectabilidad mejorada del andamio o sustituto óseo, mejorando así el proceso de osteointegración y biorreabsorción.

Además, el andamio biomórfico de la descripción incluye granos de hidroxiapatita de aproximadamente  $100-200 \text{ nm}$  (es decir, nanogranos), mucho más pequeños que los presentes en hidroxiapatita sinterizada (es decir, típicamente  $> 1 \mu\text{m}$ ). Los granos pequeños muestran una ventaja clínica para la regeneración ósea porque pueden ser reabsorbidos más fácilmente por las células, permitiendo así una mejor regeneración ósea con respecto al andamio conocido en la técnica.

Además, el andamio biomórfico de la descripción exhibe una resistencia a la compresión superior a  $5 \text{ MPa}$ , preferiblemente entre  $10 \text{ MPa}$  y  $20 \text{ MPa}$ , medida en la dirección a lo largo de los poros en forma de canal (dirección longitudinal), y una resistencia a la compresión a lo largo de la dirección de los canales transversales (dirección transversal) de hasta  $10 \text{ MPa}$ . Los inventores de la presente divulgación encontraron sorprendentemente que estas características mecánicas hacen que el andamio de hidroxiapatita final sea un material independiente, por lo tanto, se puede aplicar en procedimientos de regeneración de partes óseas que soportan carga sin el uso de ninguna estructura de refuerzo o soporte como conchas o barras.

En la naturaleza, la hidroxiapatita nanocristalina sustituida con iones es el componente principal presente en los tejidos del cuerpo duro; de hecho, la fase mineral en el hueso es una fase nanoestructurada compuesta de plaquetas de hidroxiapatita finamente dispersas de dimensiones inferiores a  $100 \text{ nm}$  que se organizan en una estructura porosa organizada jerárquicamente en 3D que representa todo el tejido óseo.

A este respecto, los inventores de la presente divulgación encontraron sorprendentemente que, en comparación con la técnica conocida anteriormente, la transformación biomórfica de las estructuras de madera natural obtenida por el proceso descrito anteriormente, puede dar lugar de forma única a andamios óseos de hidroxiapatita finales que exhiben simultáneamente composición que imita los huesos, macro/micro/nanoporosidad alta abierta e interconectada y resistencia mecánica superior, asociada con un tamaño relevante para la aplicación en sitios de carga, particularmente en huesos largos y segmentarios de las extremidades, o regiones maxilofaciales grandes, o en la columna vertebral.

Todas estas características, que nunca se ha demostrado que ocurran simultáneamente, son de suma importancia para permitir la regeneración ósea extensa en sitios de carga. Las diferencias en la estructura del andamio de hidroxiapatita biomórfica que se puede obtener con el proceso de acuerdo con la presente divulgación proporcionan importantes ventajas clínicas que se muestran en el ejemplo comparativo 6. En particular, los andamios actuales muestran un mayor poder inductivo sobre la expresión de genes relacionados con osteogénicos, con respecto a los andamios de la técnica anterior, que se traducen en un mejor rendimiento clínico en términos de regeneración ósea.

La presente divulgación se ilustra adicionalmente mediante los siguientes ejemplos no limitativos.

### Ejemplos

#### Métodos de medición

Porosidad total de la madera sometida a una etapa de pirólisis (madera pirolizada): se pesa un trozo de madera pirolizada, con forma de prisma o cilindro, luego se obtiene el volumen midiendo el diámetro y la altura. La densidad absoluta (A.D.) de la madera pirolizada se obtiene por relación peso/volumen; la densidad relativa (R.D.) se obtiene dividiendo el A.D. de la madera pirolizada por la densidad teórica del carbono (es decir,  $R.D. = A.D./2.25$ ). La porosidad total (%) se obtiene por  $(1-R.D)*100$ .

Porosidad total de un andamio obtenido después de cada paso del proceso y del andamio de hidroxiapatita biomórfico obtenido al final del proceso:

La porosidad se calcula aplicando el mismo método que el anterior utilizando valores apropiados para la densidad teórica de cada material obtenido después de cada paso (es decir, la densidad teórica de  $\text{Ca}_2$ ,  $\text{CaO}$ ,  $\text{CaCO}_3$ , HA).

Resistencia a la compresión: el andamio final o el sustituto óseo, con forma de prisma o cilindro, se somete a carga mediante el uso de una máquina universal de prueba de tipo tornillo para obtener curvas de material independientes y la carga de fractura. La resistencia a la compresión viene dada por la relación entre la carga de fractura y el área sometida a compresión.

Diámetro de poro: la distribución del tamaño de poro y la morfología de poro del andamio final o después de cada paso del proceso se evalúan mediante porosimetría de intrusión de mercurio y microscopía electrónica de barrido (SEM), respectivamente. El análisis de porosimetría de intrusión de mercurio se basa en la medida de la intrusión de mercurio en los poros de la muestra a diversas presiones.

Fases cristalinas: identificación y cuantificación: las fases cristalinas en los andamios se realizan mediante la técnica de difracción de rayos-X en polvo (DRX), evaluando el resultado de la incidencia de radiación X en la muestra, con ángulos diferentes y continuos.

Área superficial específica: el área superficial total de los materiales por unidad de volumen a granel ( $m^2/g$ ) se evalúa utilizando el método BET, estimado a partir de la cantidad de gas adsorbido en relación con su presión.

#### Ejemplo 1

Preparación de una hidroxiapatita derivada de madera utilizando el proceso de múltiples pasos:

1. i) Una pieza de madera de ratán nativo tiene forma cilíndrica y tiene las siguientes dimensiones: diámetro = 2 cm; altura = 3 cm;

#### 1) Pirólisis de la Madera Nativa

La pieza de madera de partida se seca a 70°C durante 24 horas, luego se trata a 800°C durante más de 30 minutos bajo flujo de nitrógeno, transformándose así en una plantilla de carbono puro. Ciclo térmico: calentamiento a 1°C/min hasta 350°C y 2°C/min de 350° a 800°C. La muestra se mantiene a una temperatura de 800°C durante aproximadamente al menos 30 min y posteriormente la plantilla se enfría a 1°C/min.

#### 2) Carburación

La plantilla de carbono se somete a calentamiento a 1000°C bajo atmósfera de argón y calcio a 0.5 mbar, transformándose así en carburo de calcio. Tiempo de permanencia a 1000°C = 30 minutos.

#### 3) Oxidación

La plantilla de carburo de calcio se calienta en el aire hasta 1100°C después de una velocidad de calentamiento en el rango de 1-7°C/min, lo que permite la transformación completa en óxido de calcio.

#### 4) Hidratación

El cuerpo de óxido de calcio se activa por la exposición al agua, lo que permite la absorción de agua en cantidades de aproximadamente 10% en moles.

#### 5) Carbonatación

El cuerpo hidratado preacondicionado se calienta a 800°C bajo una presión de CO<sub>2</sub> progresivamente creciente de 0.5 a 10 MPa. Esto transforma el cuerpo de óxido de calcio en carbonato de calcio.

#### 6) Fosfatización

El cuerpo de carbonato de calcio se sumerge en una solución de fosfato de amonio 0.5 M y una relación inicial de PO<sub>4</sub> a CO<sub>3</sub> de 2 veces el valor estequiométrico teórico, a temperaturas de 200°C bajo una presión de vapor de agua de 2 MPa.

La resistencia a la compresión del andamio se evaluó ejerciendo fuerzas mecánicas a lo largo de la dirección perpendicular y transversal, con respecto a la orientación de los poros en forma de canal.

Al cargar a lo largo de la dirección del poro (que es la configuración clínicamente más reflexiva para imitar los estímulos biomecánicos *in vivo* en el caso de huesos largos segmentarios), el andamio (desarrollado como un cilindro hueco con

diámetro externo = 15 mm; diámetro interno = 6 mm de altura = 20 mm, y una extensión de poro de 60-65% en volumen) exhibió una resistencia a la compresión de hasta 16 MPa (es decir, 250 Kg de carga final (Figuras 1 y 3). En la dirección transversal, el andamio mostró una resistencia a la compresión de hasta 4 MPa.

- 5 El andamio también podría someterse a tratamiento térmico a una temperatura máxima de 1300°C, en una atmósfera controlada, para aumentar aún más la resistencia mecánica del andamio.

10 Las características microestructurales similares a los huesos del andamio biomórfico permiten la entrega de información topológica a las células para construir nuevo tejido óseo con estructura organizada. Esto se confirmó mediante pruebas in vivo en las que el andamio se implantó en fémures de conejo y calvaria de ratón.

15 El andamio no indujo reacciones adversas tóxicas ni necrosis o infecciones después de la cirugía. El andamio produjo una colonización extensa por el hueso recién formado después de 1 mes, similar al control que era un andamio de apatita poroso comercial: EngiPore, Finceramica S.p.A., Italy.

20 Los tejidos explantados de calvaria de ratones mostraron una extensa formación y penetración ósea en los poros del andamio tanto cuando el andamio se implantó solo como también cuando se agregaron células estromales osteogénicas al andamio implantado (Figura 2a-d). La porosidad en forma de canal del andamio indujo la formación de estructuras óseas que imitan los sistemas Haversianos (como lo indican las flechas en la figura 2f). Además, los poros en forma de canal del andamio indujeron una angiogénesis rápida para ayudar a la formación y penetración del hueso nuevo. Este resultado confirma que una orientación adecuada de la porosidad en relación con la orientación de la red vascular endógena puede ser eficaz para promover el desarrollo temprano de la angiogénesis extensa.

#### 25 Ejemplo 2

Comparación de la hidroxiapatita biomórfica de la descripción y la hidroxiapatita estructurada jerárquicamente conocida en la técnica

30 Se realizó una prueba de comparación entre la distribución del tamaño de poro de la hidroxiapatita biomórfica de la presente divulgación obtenida de madera nativa de ratón y la distribución del tamaño de poro de una hidroxiapatita estructurada jerárquicamente obtenida de la misma madera nativa de acuerdo con las enseñanzas de Anna Tampieri et al en Journal of Material Chemistry, 2009, 19, 4973-4980 utilizando la enseñanza de Ruffini et al. en Chemical Engineering Journal 217 (2013) 150-158 solo para el paso de fosfatización (Mezcla de  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ - $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ , pH=9, Tmax=60°C, tiempo=80 horas).

35 Los resultados se muestran en la Figura 4, en la que las columnas negras se refieren a la hidroxiapatita biomórfica de la descripción y las columnas gris oscuro a la hidroxiapatita conocida en la técnica.

40 Es evidente el aumento en el número de poros que tienen un diámetro comprendido en el rango de 200-300  $\mu\text{m}$  en la hidroxiapatita biomórfica de la presente divulgación en comparación con la hidroxiapatita organizada jerárquicamente conocida, siendo dichos poros los que tienen las dimensiones más apropiadas para promover una fisiología vascularización de la hidroxiapatita biomórfica cuando se implanta como sustituto óseo.

45 Además, la misma Figura 4 muestra un número creciente de poros que tienen un diámetro en el rango de 0.01-0.1 micras, lo que indica claramente que la microestructura de la madera nativa se conserva en el producto final.

#### Ejemplo 3

50 Preparación de una hidroxiapatita derivada de madera dopada con  $\text{Mg}^{2+}$  y/o  $\text{Sr}^{2+}$ :

Se siguen los pasos 1 a 5 del método de múltiples pasos como se describe en el ejemplo 1 para producir el cuerpo de carbonato de calcio. El dopaje con iones  $\text{Mg}^{2+}$  y/o  $\text{Sr}^{2+}$  se ha logrado de acuerdo con cada uno de los siguientes métodos:

##### 55 Método 1

60 Se agrega una solución de  $\text{Sr}^{2+}$  (en forma de SrCl) a una solución rica en fosfato 1.0 M. El cuerpo de carbonato de calcio preparado de acuerdo con el método de múltiples etapas se sumerge en la solución combinada y se calienta a una temperatura de 200°C bajo una presión de vapor de agua de 2 MPa. Esto produce una hidroxiapatita dopada con  $\text{Sr}^{2+}$  con la morfología de la pieza de madera inicial.

##### Método 2

65 El cuerpo de carbonato de calcio se sumerge en una solución rica en fosfato 1.0 M. Mientras se calienta a una temperatura de 25-90°C bajo una presión de vapor de agua de 0.1 MPa, se agrega progresivamente una solución  $\text{Sr}^{2+}$ . Esto produce una hidroxiapatita dopada con  $\text{Sr}^{2+}$  con la morfología de la pieza de madera inicial.

Método 3

5 El cuerpo de carbonato de calcio puro (o parcialmente convertido en hidroxiapatita por inmersión en solución rica en fosfato 1.5 M a temperatura ambiente o superior durante 24 horas) se sumerge en una solución acuosa u orgánica que contiene iones  $\text{Sr}^{2+}$  durante 24 horas. Luego se retira de la solución y se sumerge en una solución rica en fosfato de 1.5 M. Mientras se calienta a una temperatura de 200°C bajo una presión de vapor de agua en el rango de 0.5-1.5 MPa. Esto produce una hidroxiapatita dopada con  $\text{Sr}^{2+}$  con la morfología de la pieza de madera inicial.

10 Propiedades del andamio sustituido con estroncio

Se desarrollaron andamios de hidroxiapatita sustituidos con estroncio y se observó que exhibían una mayor viabilidad de las células madre mesenquimales (MSC) en comparación con los andamios libres de estroncio (Figura 5).

15 Los andamios de estroncio también mostraron una morfología bien extendida y una mayor expresión de genes relevantes para la osteogénesis, como RUNX2 y ALP (Figura 6), actuando así como promotores de la diferenciación osteoblástica. En particular, cuando se compara con el andamio libre de Sr, se detectó un aumento significativo en el nivel de ARNm de ambos genes ( $p < 0.05$ ). Este aumento fue particularmente alto para el andamio con 2% en moles de Sr.

20 Se observó una proliferación mejorada de preosteoblastos durante 14 días de investigación cuando se usaron andamios de hidroxiapatita sustituidos con Sr (Figura 7). De hecho, un aumento de estroncio en el andamio produjo una viabilidad celular mucho mayor a largo plazo. Estos resultados implican que la formación de hueso nuevo podría ser inducida y sostenida con éxito.

25 El andamio también demostró la posibilidad de mantener el fenotipo osteoblástico durante las dos semanas de la investigación (Figura 8).

30 El comportamiento de las células en contacto con el andamio sustituido con estroncio se investigó también observando el comportamiento de los osteoclastos. Se realizó un análisis morfológico preliminar para confirmar y validar el modelo de osteoclastogénesis. Los osteoclastos cultivados en la superficie del andamio exhiben su morfología típica.

35 Se evaluó la expresión génica relativa del marcador principal involucrado en la actividad y formación de osteoclastos (Oscar, Integrina  $\beta 3$  y Catepsina K) (Figura 9). El análisis mostró una disminución significativa en la expresión génica con el tiempo de todos los genes involucrados en las principales vías moleculares de los osteoclastos, lo que indica que la presencia de iones  $\text{Sr}^{2+}$  en el andamio inhibe la formación y actividad de los osteoclastos.

40 En conclusión, la sustitución de hidroxiapatitas con iones  $\text{Sr}^{2+}$  produjo un efecto biológico en las células óseas, causando específicamente: i) un efecto inductivo significativo en los genes osteogénicos relacionados con MCS; ii) un efecto inductivo sobre la proliferación de osteoblastos y iii) un efecto inhibitorio sobre la actividad de los osteoclastos.

45 En el caso de la implantación en un defecto óseo segmentario, el nuevo andamio está diseñado para presentar un canal central que se extiende en dirección paralela a la porosidad unidireccional principal para exponerse a los muñones óseos como guía para el desarrollo de una nueva médula ósea (Figura 1). El tamaño del canal se define en función del defecto específico; sin embargo, para mantener una resistencia adecuada, el canal tiene un diámetro en el rango del 20 al 60% con respecto al ancho total del andamio.

50 Ejemplo 4 - Comparación de hidroxiapatita biomórfica de la divulgación e hidroxiapatita estructurada jerárquicamente conocida en la técnica

55 Se realizó una prueba de comparación entre una hidroxiapatita biomórfica fabricada utilizando el proceso de la divulgación y un andamio de hidroxiapatita obtenido de la misma madera nativa (ratán) de acuerdo con las enseñanzas de Anna Tampieri et al. en el Journal of Material Chemistry, 2009, 19, 4973-4980. La madera de ratán utilizada en el proceso de divulgación tiene una longitud, medida a lo largo de una dirección en la que la dimensión del andamio es máxima, igual a 2 cm. La madera de ratán utilizada en el proceso de la técnica anterior tiene una longitud, medida a lo largo de una dirección en la que la dimensión del andamio es máxima, igual a 1 cm.

60 Después de cada paso de los dos procesos, se analizó y comparó el área superficial específica (SSA) y la distribución de poros de los andamios intermedios y finales (véase Figuras 10, 16, 19 y 20). Además, después de la etapa de carburación, se compararon las dimensiones de los cristales de carburo de calcio de los dos andamios intermedios (véase Figura 13 - imágenes inferiores).

65 La estructura reticular cristalina de los dos andamios de carburo de calcio se comparó después de la etapa de carburación. La comparación se muestra en la Figura 14.

La Figura 10 muestra una comparación de la distribución de poros de los dos andamios de carburo de calcio obtenidos después de los pasos de carburación respectivos, en comparación con la distribución de poros de la madera pirolizada de partida. La superficie específica de los dos andamios de carburo de calcio también se informa en la figura. Los resultados muestran que solo el andamio de carburo de calcio obtenido después de la etapa de carburación de la descripción conserva la distribución de micro y nanoporos de la madera de ratán (dimensión de poros  $<1\ \mu\text{m}$ ). Además, la comparación de las dos áreas de superficie específicas muestra una mejora para el andamio según la presente divulgación.

Las Figuras 11, 12 y 13 de las dos imágenes superiores muestran imágenes SEM de los dos andamios de carburo de calcio desde los cuales se puede ver claramente la mejor preservación de la micro y nanoporosidad de la madera nativa.

La Figura 13, en la parte inferior de las dos imágenes, muestra una comparación de la dimensión de los cristales de carburo de carbono. El carburo de calcio obtenido según la presente divulgación muestra granos con un tamaño promedio de aproximadamente  $10\ \mu\text{m}$ , mientras que los granos obtenidos con el proceso de la técnica anterior tienen un tamaño promedio de aproximadamente  $100\ \mu\text{m}$ .

La Figura 14 muestra una comparación de la fase cristalina de los dos andamios de carburo de calcio, medida con rayos X-DRX. Los resultados muestran que el carburo de calcio obtenido de acuerdo con la presente divulgación tiene una red cristalina tetragonal y cúbica, mientras que el carburo de calcio de la técnica anterior tiene solo una red tetragonal. El andamio de carburo de calcio de la descripción contiene una mayor cantidad de  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  con respecto al andamio de la técnica anterior.

La Figura 15 muestra imágenes de SEM del andamio de óxido de calcio obtenido después de los pasos de oxidación respectivos. Las imágenes correspondientes al andamio obtenido según la presente divulgación conservan una microporosidad entre los granos de  $\text{CaO}$ , mientras que en el andamio de la técnica anterior la microporosidad se pierde por completo.

La Figura 16 representa la distribución de poros de los dos andamios de óxido de calcio. La comparación muestra claramente que la fracción de micro y nanoporosidad obtenida después de la etapa de oxidación es mayor en el andamio de acuerdo con la presente divulgación, así como el área superficial específica.

Las Figuras 17 y 18 muestran imágenes SEM del carbonato de calcio obtenido después de la carbonatación respectiva. El material de acuerdo con la presente divulgación muestra una estructura fina extendida, en comparación con la técnica anterior, donde grandes cristales de calcita (hasta aproximadamente  $50\ \mu\text{m}$ ) caracterizan la estructura completa. Los cristales grandes hacen que la estructura se rompa o colapse durante el paso de fosfatización.

La Figura 19 muestra que la distribución de poro de los dos andamios de carbonato de calcio se obtuvo después de la etapa de carbonatación. La comparación de la distribución de poros y el área superficial específica muestra un resultado similar al discutido anteriormente para el óxido de calcio: la estructura de micro y nanoporos  $<1\ \mu\text{m}$  se mantiene con el presente proceso y se obtiene un SSA más alto con respecto al estado de la técnica.

La Figura 20 muestra la comparación entre la distribución de poros del andamio de hidroxiapatita biomórfico final (después de la fosfatización) obtenido con el proceso de la divulgación y el andamio de hidroxiapatita biomórfico final de la técnica anterior. También se muestra una comparación de los respectivos SSA.

Los resultados muestran que el andamio biomórfico de la descripción posee una fracción de micro y nanoporosidad más alta que el andamio de la técnica anterior, así como un área superficial específica más alta.

Ejemplo 5: proceso de la técnica anterior aplicado a una pieza de madera de ratán que tiene una longitud, medida a lo largo de una dirección en la que la dimensión del andamio es máxima, igual a 2 cm.

Se realizó una prueba para demostrar que el proceso de la técnica anterior (Anna Tampieri et al. en el Journal of Material Chemistry, 2009, 19, 4973-4980) no permite fabricar andamios que tengan una longitud, medida a lo largo de una dirección en la que una dimensión de el andamio es máxima, igual o mayor a 2 cm, es decir, andamios de interés clínico para la regeneración ósea.

Para este propósito, una pieza de madera de ratán ha sido sometida a los pasos del proceso de acuerdo con las condiciones descritas en Tampieri et al.

Las Figuras 21 muestran que incluso antes del paso de fosfatización, el andamio puede romperse. La Figura 22 muestra que incluso si el andamio sobrevive, el proceso avanza hacia la fosfatización, después de la fosfatización el andamio se rompe.

La prueba muestra claramente que la ampliación de un producto cerámico a menudo no es una operación sencilla; en cambio, las condiciones del proceso deben cambiarse (a veces muy cambiadas) para preparar productos más grandes, incluso cuando se conoce en la técnica un proceso para fabricar productos cerámicos pequeños.

5 Ejemplo 6 - Prueba comparativa

Se realizó un estudio *in vitro* con células madre mesenquimales de ratón (mMSC). Se analizó el perfil de expresión génica para probar la sobreexpresión de genes específicos implicados en la diferenciación osteogénica inducida por un andamio de hidroxiapatita biomórfica obtenida con el proceso de la presente divulgación y un andamio de hidroxiapatita biomórfica obtenida con el proceso de la técnica anterior.

10 Descripción de la muestra

Los dos andamios probados se definen de la siguiente manera:

15

	Muestra			Dimensión de disco	Número de muestras	Método de esterilización
Andamio para la presente divulgación	dopado (divulgación)	Ca/P = Mg/Ca = Sr/Ca =	1,65 1,64 0,59	Ø: 8.00 mm, L: 4.00 mm	5	irradiación EtOH + UV

	No dopado (divulgación)	Ca/P =	1,70	Ø: 8.00 mm, L: 4.00 mm	5	irradiación EtOH + UV
Andamio de Tampieri et al.	No dopado (técnica anterior)	Ca/P =	1,77	Ø: 8.00 mm, L: 4.00 mm	8	radiación rayos $\gamma$ 25 kGy (RadGamma)

Resultados

20 Los genes probados, relacionados tanto con el compromiso temprano (Runx2 y ALP) como con el compromiso de la etapa tardía (OPN) de diferenciación osteogénica, parecen estar regulados positivamente en las células cultivadas en todos los andamios de divulgación en comparación con los andamios de la técnica anterior, con una diferencia significativa para Runx2 y OPN ( $p \leq 0.0001$ ). No se observaron diferencias en la expresión del gen BMP2 y Col15 en todas las muestras analizadas, probablemente porque BMP2, que es el regulador corriente arriba de la ruta de diferenciación, después de 14 días de cultivo dinámico, ya ha llevado a cabo su función biológica como lo sugiere la regulación al alza de Runx2, Alp y OPN [1]. Por el contrario, Col15 es un marcador muy tardío relacionado con la producción de matriz ósea mineralizada [2] y probablemente el tiempo de cultivo no fue suficiente para inducir su expresión. No se observaron diferencias entre el efecto inductivo de los andamios de divulgación dopados o no dopados (véase Figura 23).

30 La Figura 23 muestra la cuantificación relativa ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ) de la expresión génica con respecto a la expresión del andamio de la técnica anterior no dopado usado como calibrador, después de 14 días de mMSCs 3D cultivadas en condición dinámica con todas las muestras analizadas. Se indicaron errores promedio y estándar de tres muestras. El análisis estadístico se realizó mediante ANOVA de dos vías, seguido de la prueba post-hoc de Bonferroni y la diferencia significativa se indica en el gráfico: \*\*\*\* $p \leq 0.0001$ .

35

A partir de las pruebas anteriores, es posible afirmar que los andamios de divulgación muestran un mayor poder inductivo sobre la expresión de genes osteogénicos relacionados, con respecto a los andamios de la técnica anterior.

Referencias

40

[1] Arch Oral Biol. 2013 Jan;58(1):42-9. doi: 10.1016/j.archoralbio.2012.07.010. Epub 2012 Aug 9. Leader genes in osteogenesis: a theoretical study. Orlando B, Giacomelli L, Ricci M, Barone A, Covani U.

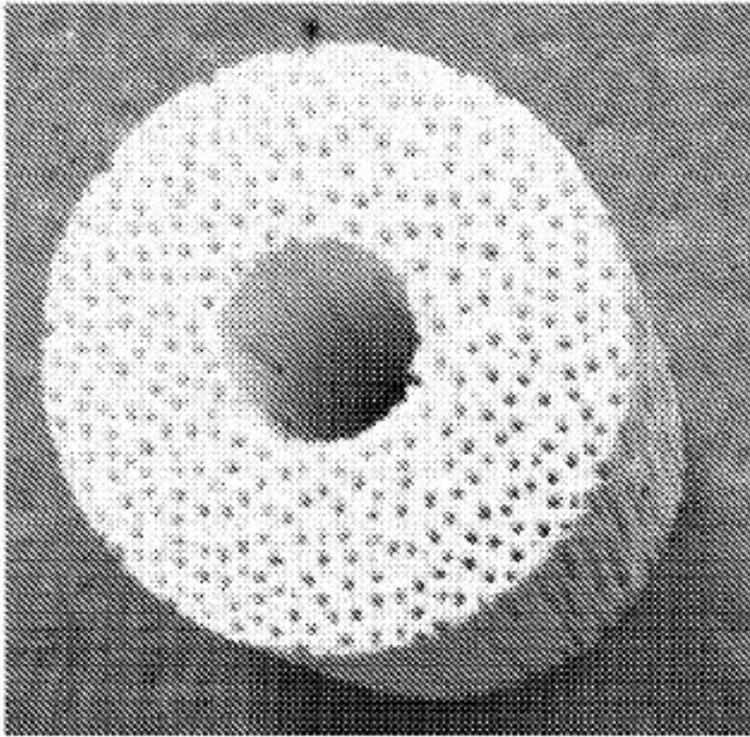
5 [2] J Cell Physiol. 2012 Aug;227(8):3151-61. doi: 10.1002/jcp.24001. Extracellular calcium chronically induced human osteoblasts effects: specific modulation of osteocalcin and collagen type XV. Gabusi E, Manferdini C, Grassi F, Piacentini A, Cattini L, Filardo G, Lambertini E, Piva R, Zini N, Facchini A, Lisignoli G.

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Un andamio biomórfico de hidroxiapatita obtenido de una madera que tiene una porosidad total de al menos 20%, preferiblemente al menos 40%, más preferiblemente entre 60% y 95%, midiéndose dicha porosidad después de someter la madera a un paso de pirólisis, dicho andamio que tiene una longitud, medida a lo largo de una dirección en la que la dimensión del andamio es máxima, mayor o igual a 2 cm.
- 10 2. Un andamio biomórfico de hidroxiapatita de acuerdo con la reivindicación 1, que tiene una resistencia a la compresión, medida en la dirección longitudinal, mayor que 5 MPa, preferiblemente entre 10MPa y 40 MPa, más preferiblemente entre 10 MPa y 20 MPa.
- 15 3. El andamio biomórfico de hidroxiapatita de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, que tiene una estructura de poros organizada jerárquicamente, que se deriva de la estructura de poros organizada jerárquicamente de la madera de la que se obtiene.
- 20 4. El andamio biomórfico de hidroxiapatita de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde la madera se selecciona entre ratán, pino, abachi, balsa, sipo, roble, palo de rosa, kempas y madera de nogal, preferiblemente ratán.
- 25 5. El andamio biomórfico de hidroxiapatita de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde la estructura de poros organizada jerárquicamente incluye entre 30 y 80%, de la porosidad total, de poros que tienen un diámetro inferior a 150  $\mu\text{m}$ , siendo el resto hasta el 100% de la porosidad total poros que tienen un diámetro superior a 150 $\mu\text{m}$ .
- 30 6. El andamio biomórfico de hidroxiapatita de acuerdo con la reivindicación 5, en donde, preferiblemente cuando la madera es de ratán, entre el 30% y el 60% de la porosidad total del andamio se debe a poros que tienen un diámetro  $\leq 10 \mu\text{m}$ .
- 35 7. El andamio biomórfico de hidroxiapatita de acuerdo con la reivindicación 5, en donde, preferiblemente cuando la madera es de ratán, al menos el 25% de la porosidad total, preferiblemente entre el 25% y el 50% de la porosidad total del andamio se debe a poros que tienen un diámetro  $\leq 1 \mu\text{m}$ , preferiblemente  $\leq 0.1 \mu\text{m}$ , más preferiblemente entre 0.01 y 0.1  $\mu\text{m}$ .
- 40 8. El andamio biomórfico de hidroxiapatita de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 5 a 7, en donde, preferiblemente cuando la madera es de ratán, al menos el 20% de la porosidad total del andamio se debe a poros que tienen un diámetro  $\geq 150 \mu\text{m}$ .
- 45 9. El andamio biomórfico de hidroxiapatita de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 5 a 8, que tiene un área superficial específica (SSA)  $> 9 \text{ m}^2/\text{g}$ , preferiblemente de 9 a 20  $\text{m}^2/\text{g}$ .
- 50 10. El andamio biomórfico de hidroxiapatita de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde dicha hidroxiapatita está parcialmente sustituida con uno o más iones seleccionados del grupo que comprende magnesio, estroncio, silicio, titanio, carbonato, sodio, potasio, plata, galio, cobre, hierro, zinc, manganeso, europio y gadolinio.
- 55 11. El andamio biomórfico de hidroxiapatita de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, para usar en el campo médico, preferiblemente para usar como un sustituto óseo, en donde preferiblemente el sustituto óseo tiene una forma correspondiente a la forma de un defecto óseo que va a ser reconstruido.
- 60 12. El andamio biomórfico de hidroxiapatita de acuerdo con la reivindicación 11 para uso en la sustitución o regeneración de un hueso o una porción de hueso.
- 65 13. El andamio biomórfico de hidroxiapatita para uso de acuerdo con la reivindicación 12, en donde dicho hueso o porción de hueso es un hueso o porción de hueso sometida a cargas mecánicas, preferiblemente un hueso largo de la pierna y el brazo, o dicha porción de hueso o hueso es una parte de hueso craneal, una columna vertebral o una parte del hueso maxilar facial.
14. El andamio biomórfico de hidroxiapatita para uso de acuerdo con la reivindicación 13, en donde dicho hueso largo de la pierna y el brazo es tibia, metatarso, peroné, fémur, húmero o radio.
15. Un sustituto óseo que comprende el andamio biomórfico de hidroxiapatita de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10.
16. Un proceso para producir un andamio de hidroxiapatita biomórfico de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14 o el sustituto óseo de acuerdo con la reivindicación 15, que comprende los pasos de:

## ES 2 758 357 T3

- 1) Pirólisis: una madera nativa, probablemente seleccionado entre ratán, pino, abachi, balsa, sipo, roble, palo de rosa, kempas y nuez, más preferiblemente una pieza de madera de ratán, se calienta a una temperatura en el rango de 600°C a 1000°C bajo una atmósfera inerte para producir una plantilla de carbono;
- 5 2) Carburación: la plantilla de carbono se infiltra con calcio en estado de vapor a una temperatura en el rango de 900 a 1200°C y a una presión de <100000 pa (<1000 mbar), preferiblemente < 60000 Pa (<600 mbar), más preferiblemente en el intervalo de 5 a 10000 Pa (0.05 a 100 mbar), para producir una plantilla de carburo de calcio;
- 10 3) Oxidación: la plantilla de carburo de calcio (CaC<sub>2</sub>) se calienta en aire a una temperatura en el rango de 750 a 1300°C, preferiblemente 1000-1200°C, para producir una plantilla de óxido de calcio;
- 15 4) Hidratación: la plantilla de óxido de calcio se expone al agua, preferiblemente a la humedad del agua, permitiendo así la absorción de agua en una cantidad comprendida en el rango de 1-25% en moles, preferiblemente comprendida en el rango de 5-15% en moles;
- 20 5) Carbonatación: la plantilla de óxido de calcio se transforma en carbonato de calcio calentando a una temperatura en el rango de 500 a 900°C, preferiblemente a una temperatura en el rango de 750 a 850°C bajo una presión en el rango de 4 a 20 MPa;
- 25 6) Fosfatización: la plantilla de carbonato de calcio se trata con al menos una sal de fosfato, preferiblemente seleccionada del grupo que consiste en fosfato de amonio, fosfato de sodio, fosfato de potasio y mezclas de los mismos, para producir el andamio biomórfico de hidroxiapatita.
- 25 17. El proceso de acuerdo con la reivindicación 16, en donde después del paso 1) la madera nativa tiene una porosidad total de al menos 20%, preferiblemente al menos 40%, más preferiblemente comprendida entre 60% y 95%.
- 30 18. El proceso de acuerdo con la reivindicación 16 o 17, en donde antes del paso 1) de pirólisis, el proceso comprende un paso i) de selección y preparación de la madera nativa, en donde dicha madera nativa se corta en una pieza que tiene una longitud, medida a lo largo de una dirección en la cual la dimensión de la madera es máxima, que es mayor o igual a 2 cm, en donde preferiblemente dicho paso i) comprende además los pasos de proporcionar un modelo 3D de un defecto óseo y, basado en el modelo 3D obtenido, impartiendo a la madera nativa una forma correspondiente a la forma del defecto óseo.
- 35 19. El proceso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 16 a 18, en donde el paso 2) de carburización es llevado a cabo con una relación molar Ca/C, al inicio de la reacción, en el rango de 1.10 a 2.50 en el rango de 1.50 a 2.00.
- 40 20. El proceso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 16 a 19, en donde la etapa de carbonatación 5) se lleva a cabo de acuerdo con uno de los siguientes ciclos térmicos:
- 45 - a una presión constante de CO<sub>2</sub> de 10 MPa, aumentando lentamente la temperatura a un valor en el rango de 750-850°C, preferiblemente a 800°C;
- 45 - a una temperatura constante de 750-850°C, preferiblemente a 800°C, elevando la presión hasta 10 MPa;
- 45 - mantener la presión a 4-6 MPa mientras se eleva la temperatura hasta 750-850°C, preferiblemente hasta 800°C y posteriormente aumentar la presión hasta 10 MPa.
- 50 21. El proceso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 16 a 20, en donde en la etapa 6 de fosfatización) la plantilla de carbonato de calcio se sumerge en una solución a base de agua que comprende al menos una sal de fosfato, teniendo dicha solución una concentración de fosfato de 0.1 a 5 M, preferiblemente una concentración de 0.5 a 2.0M.
- 55 22. El proceso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 16 a 21, en donde la relación de partida de PO<sub>4</sub>/CO<sub>3</sub> en la etapa de fosfatización 6) es de 1,5 a 5 veces el valor estequiométrico teórico, preferiblemente de 2 a 4 veces el valor estequiométrico teórico.
- 60 23. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 16 a 22, en donde la etapa de fosfatización 6) se lleva a cabo en presencia de magnesio, estroncio, silicio, titanio, carbonato, sodio, potasio, plata, galio, cobre, hierro, zinc, manganeso, europio, iones de gadolinio o mezclas de los mismos.



**FIG 1**

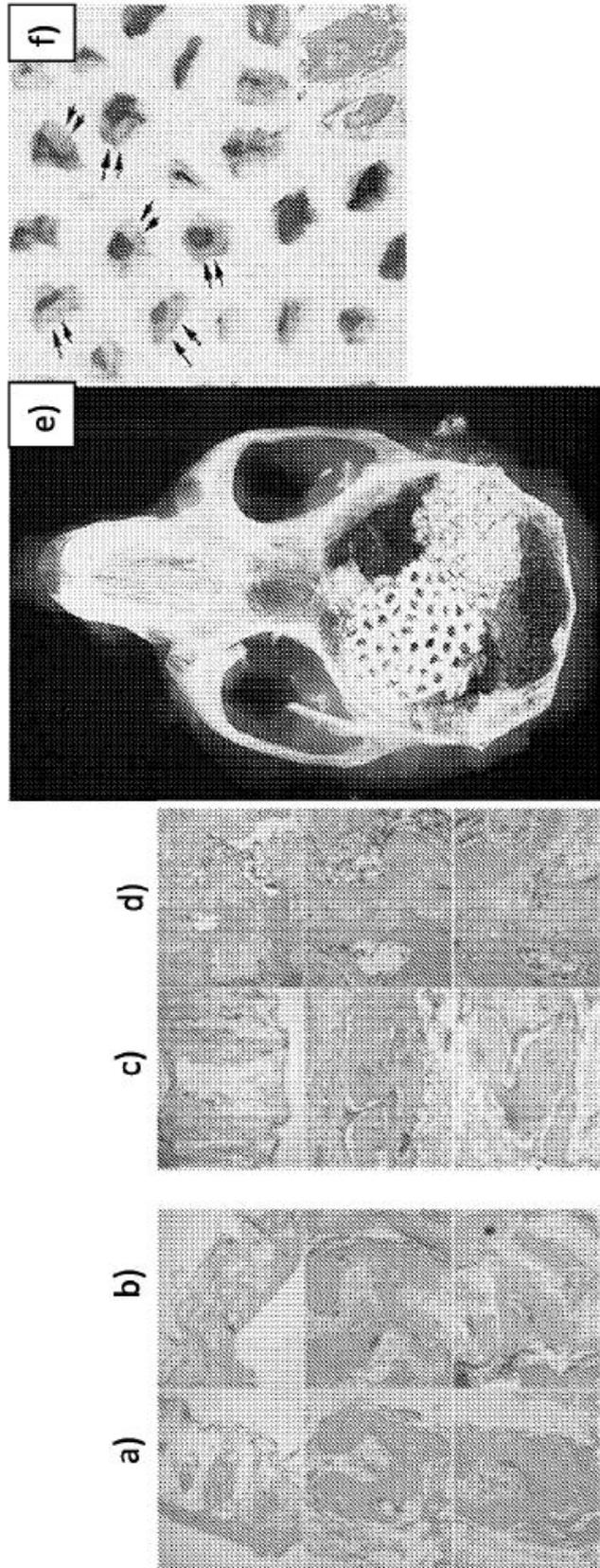


FIG 2

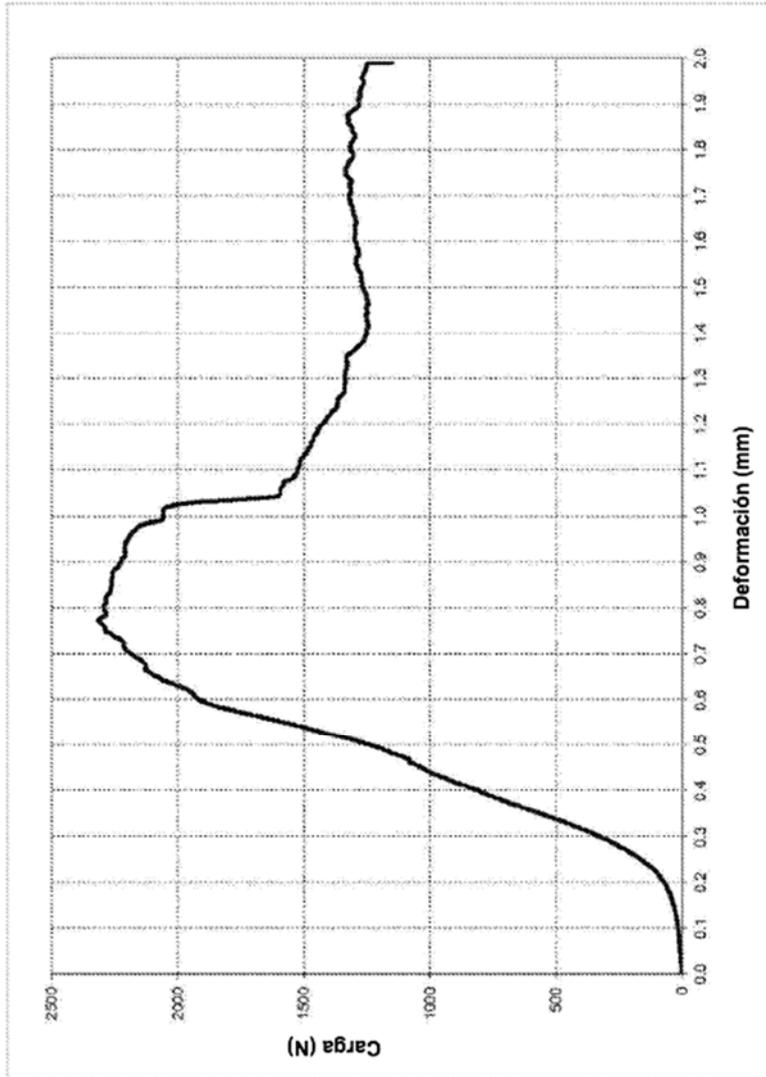


FIG 3

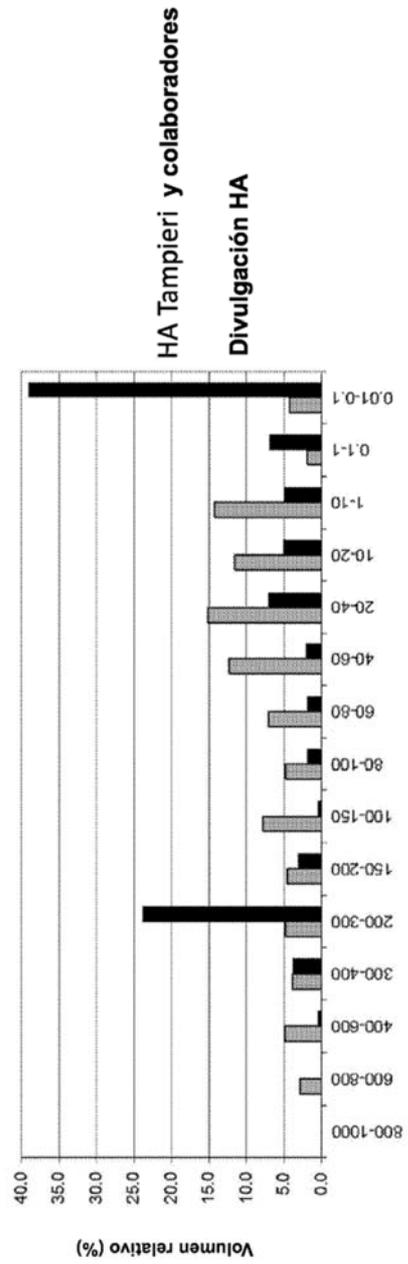


FIG 4

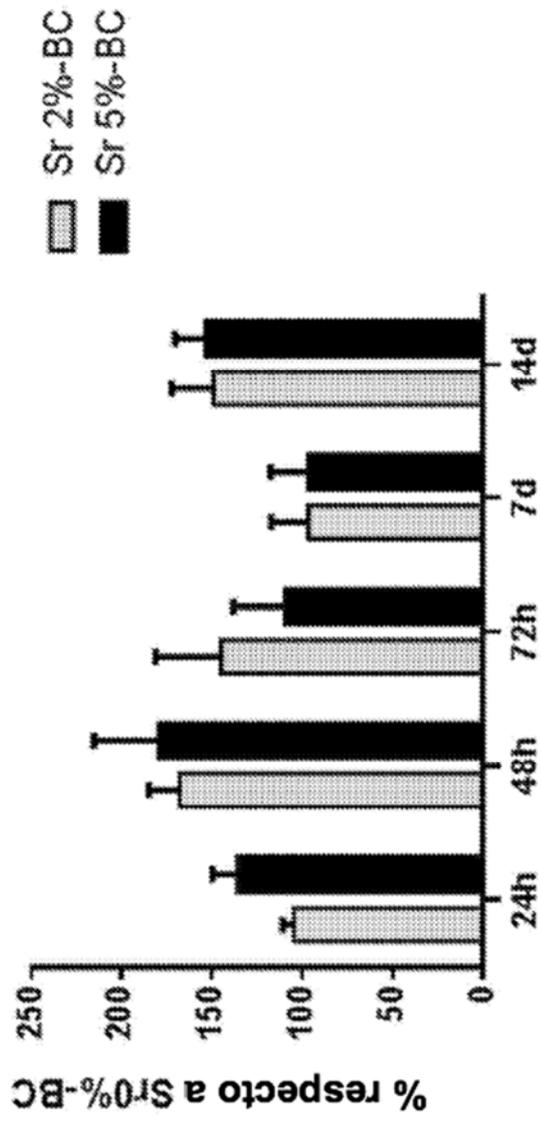


FIG 5

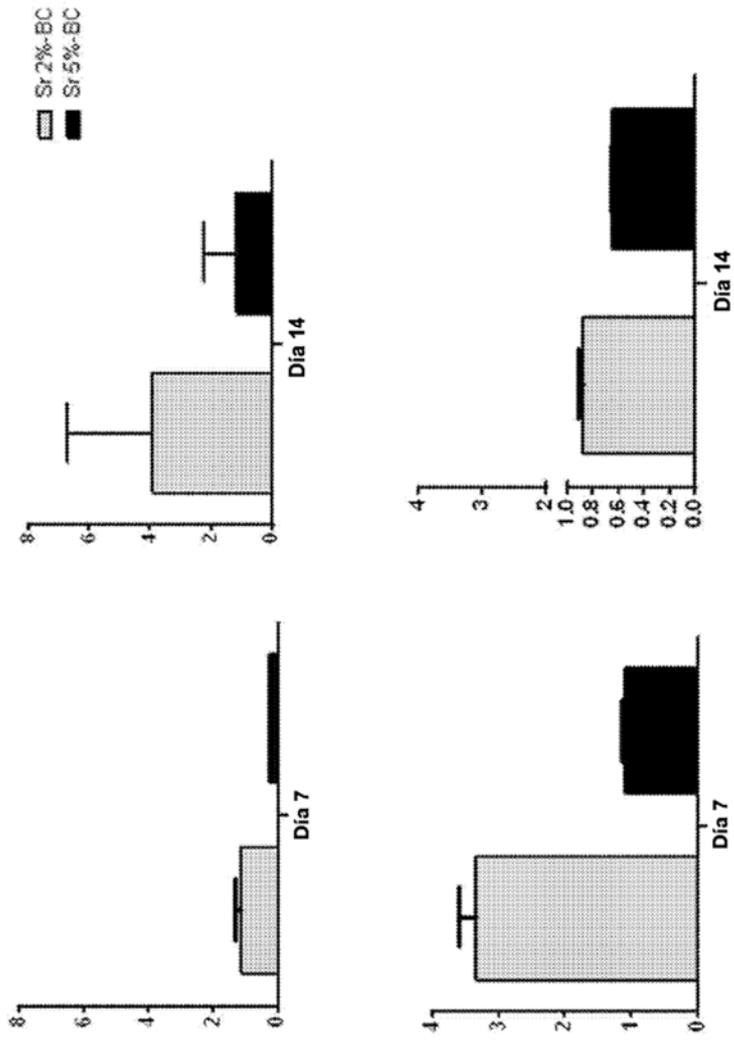


FIG 6

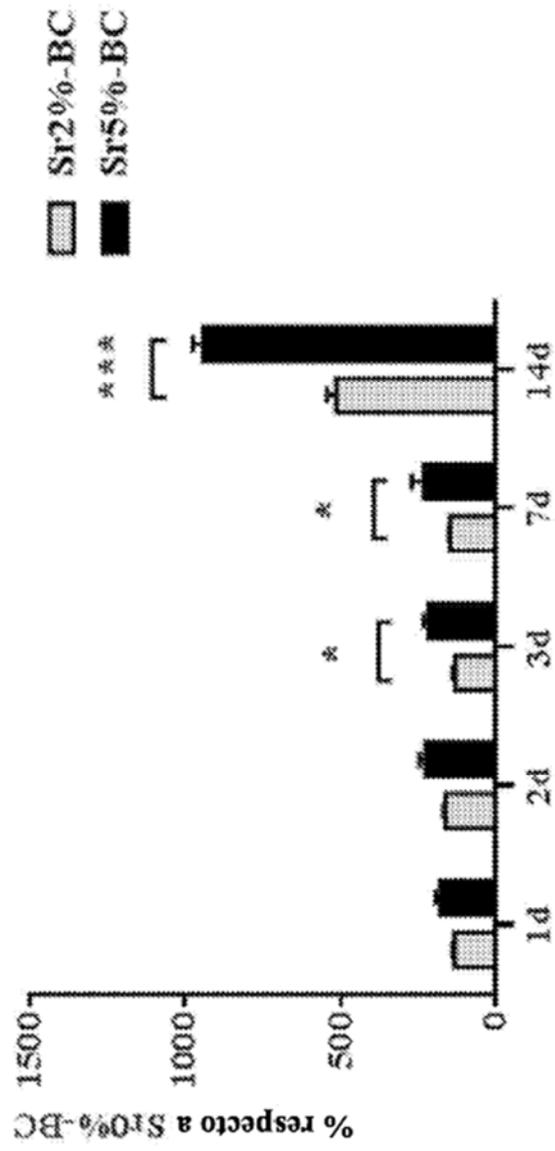


FIG 7

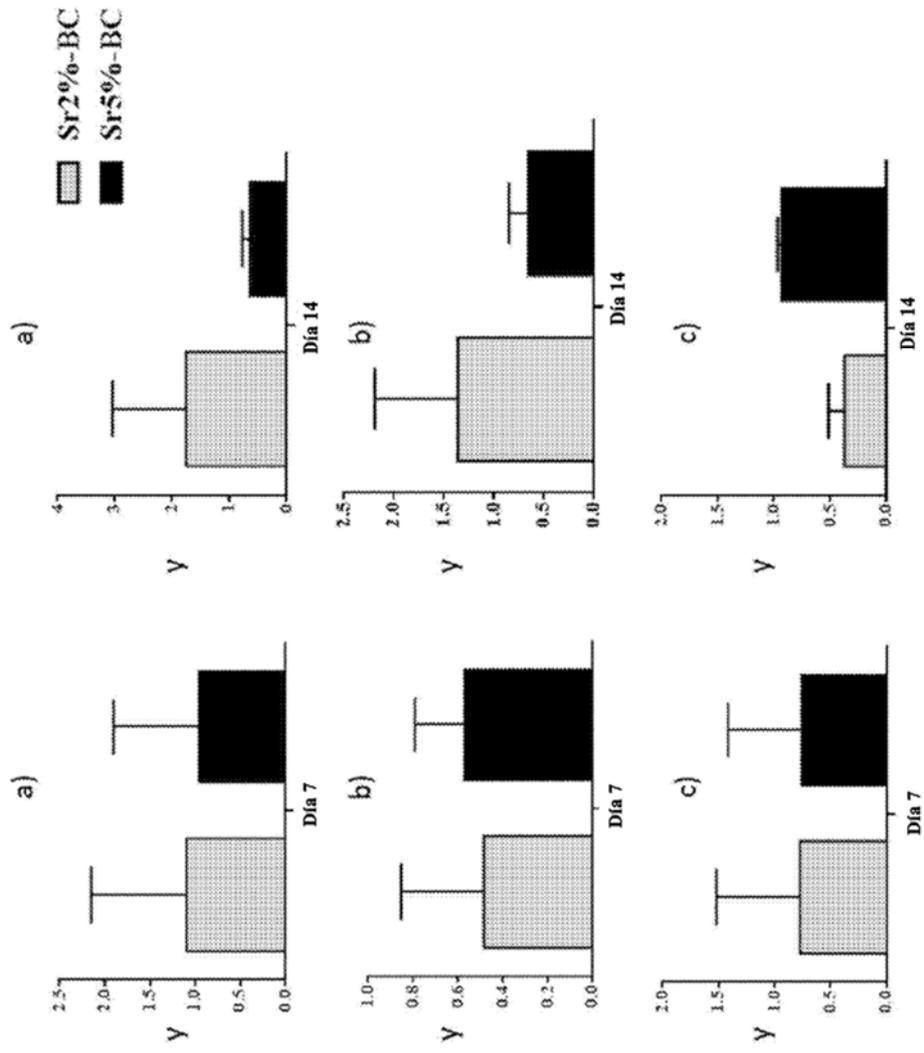


FIG 8

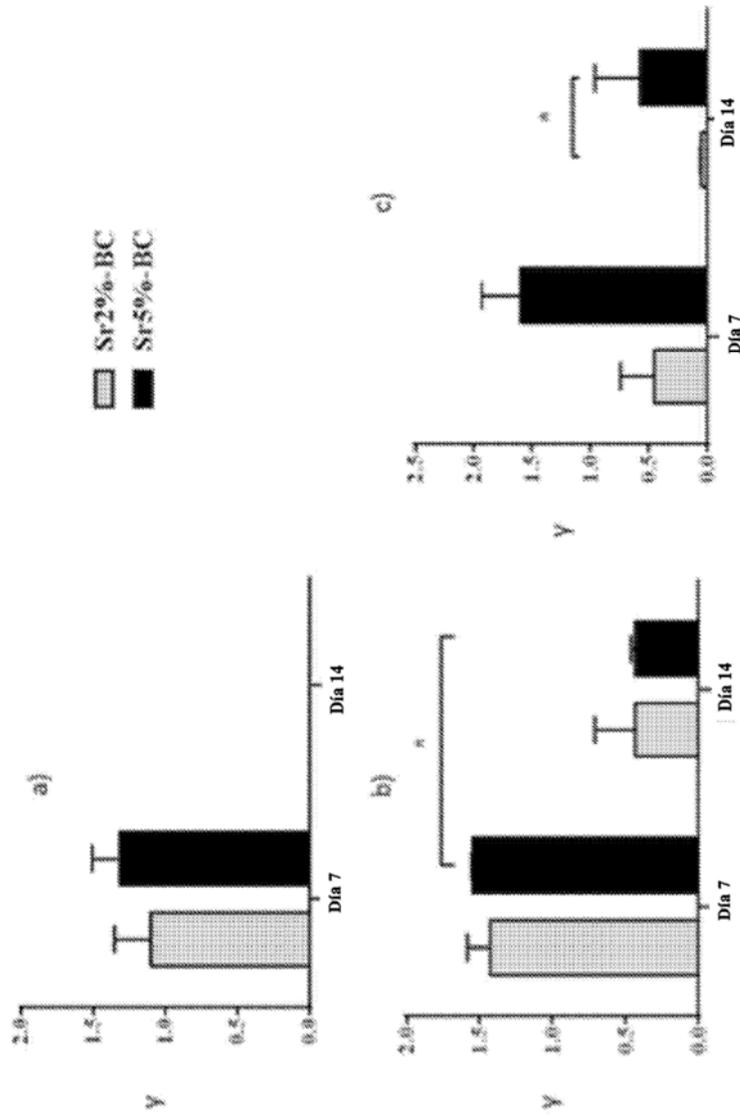
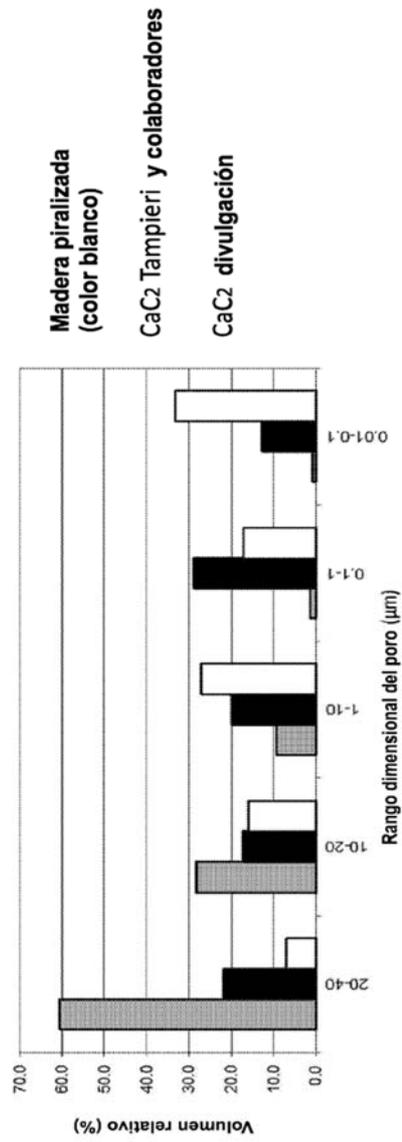


FIG 9



Área de superficie - SSA (m<sup>2</sup>/g)

Tampieri y colaboradores = 5.30

Divulgación = 8.53

FIG. 10

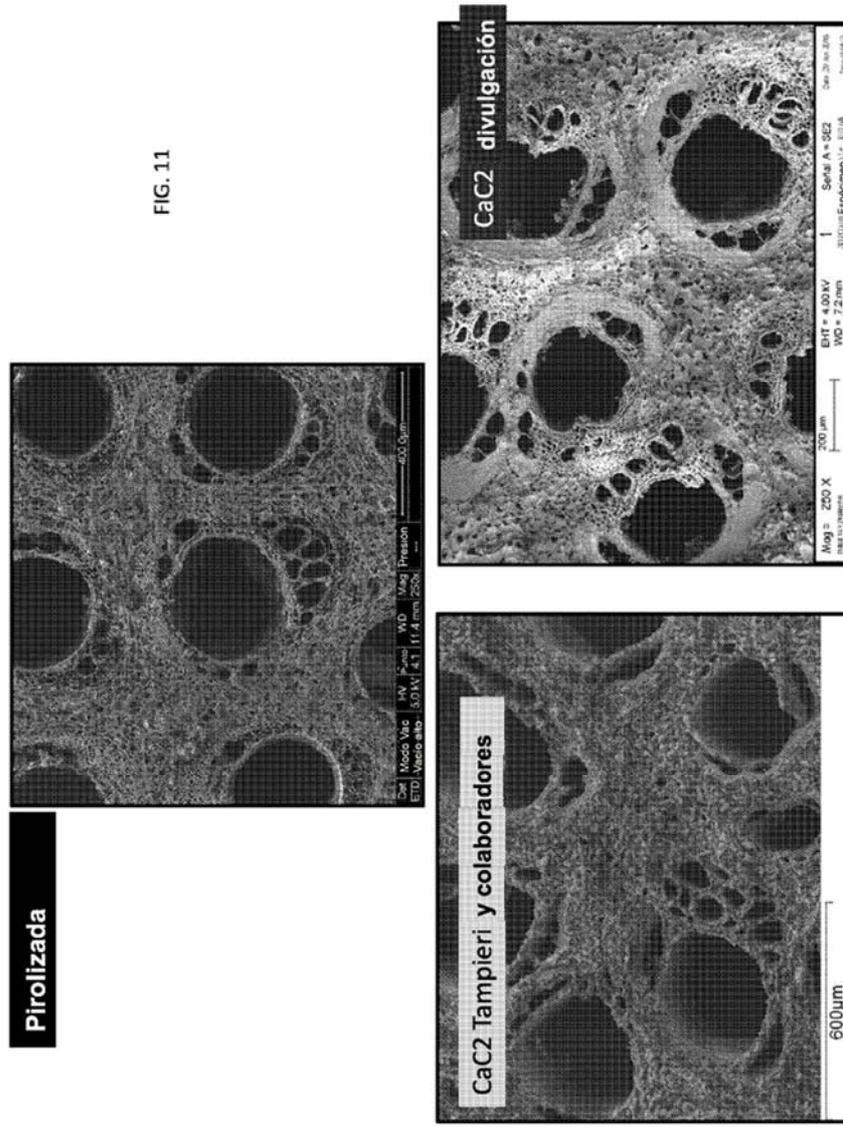
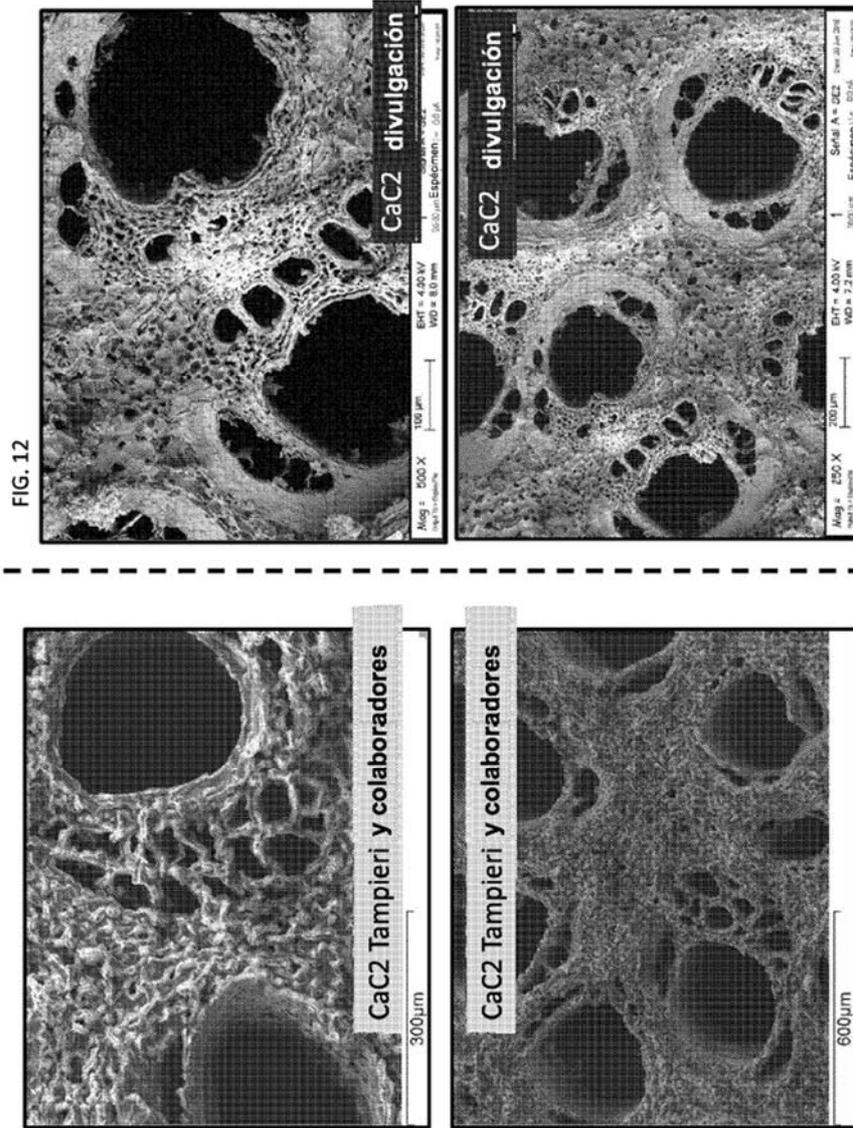


FIG. 11



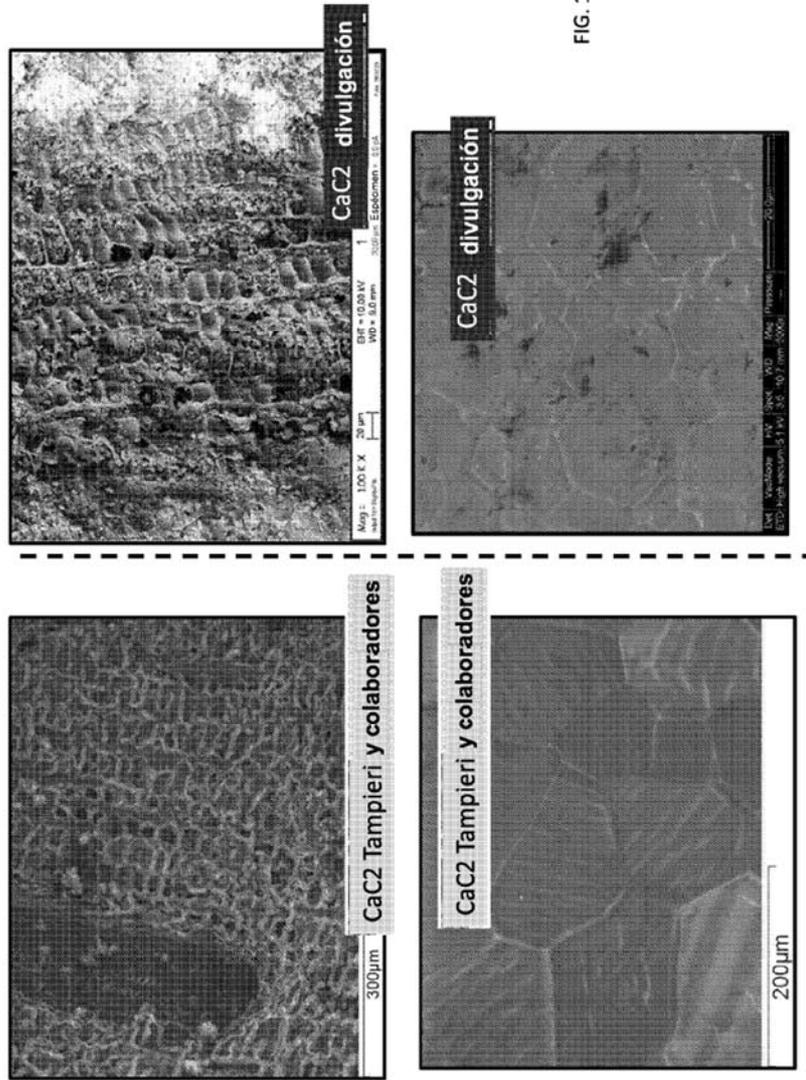


FIG. 13

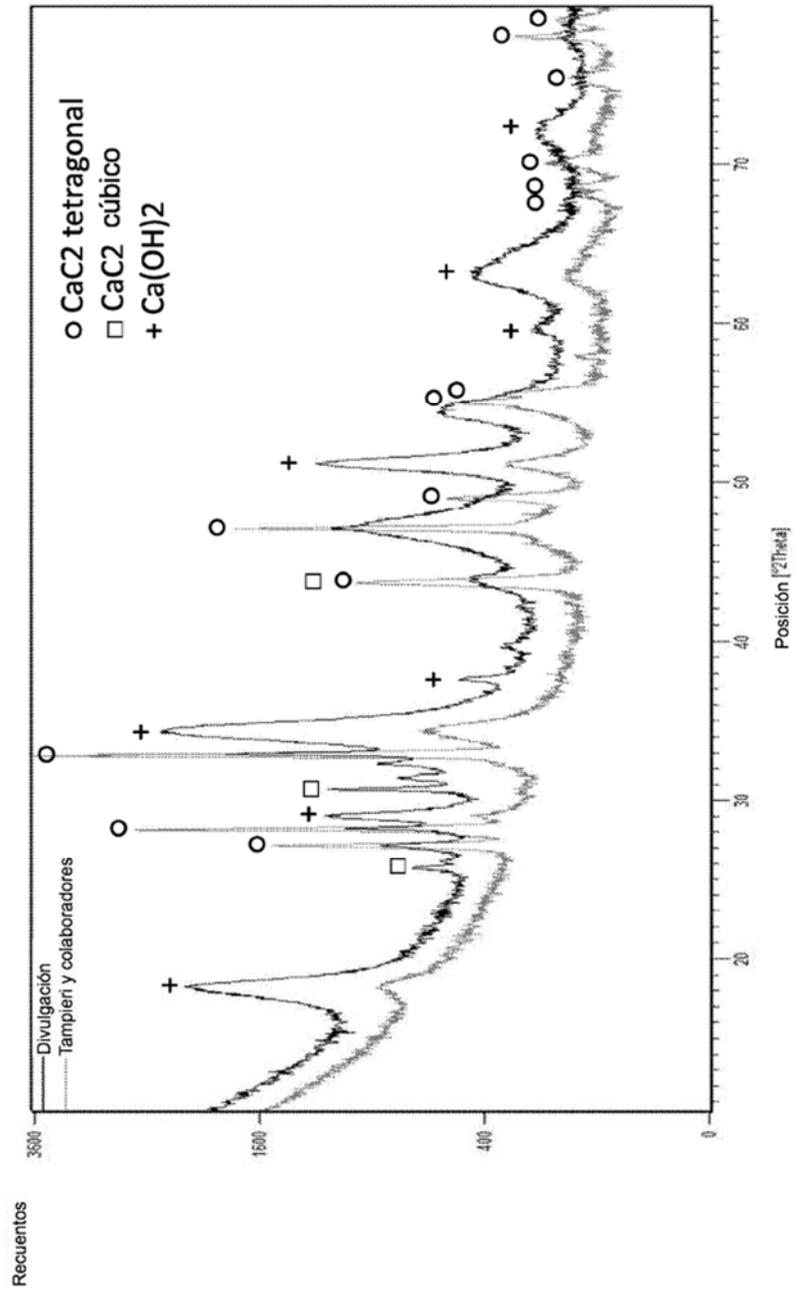


FIG. 14

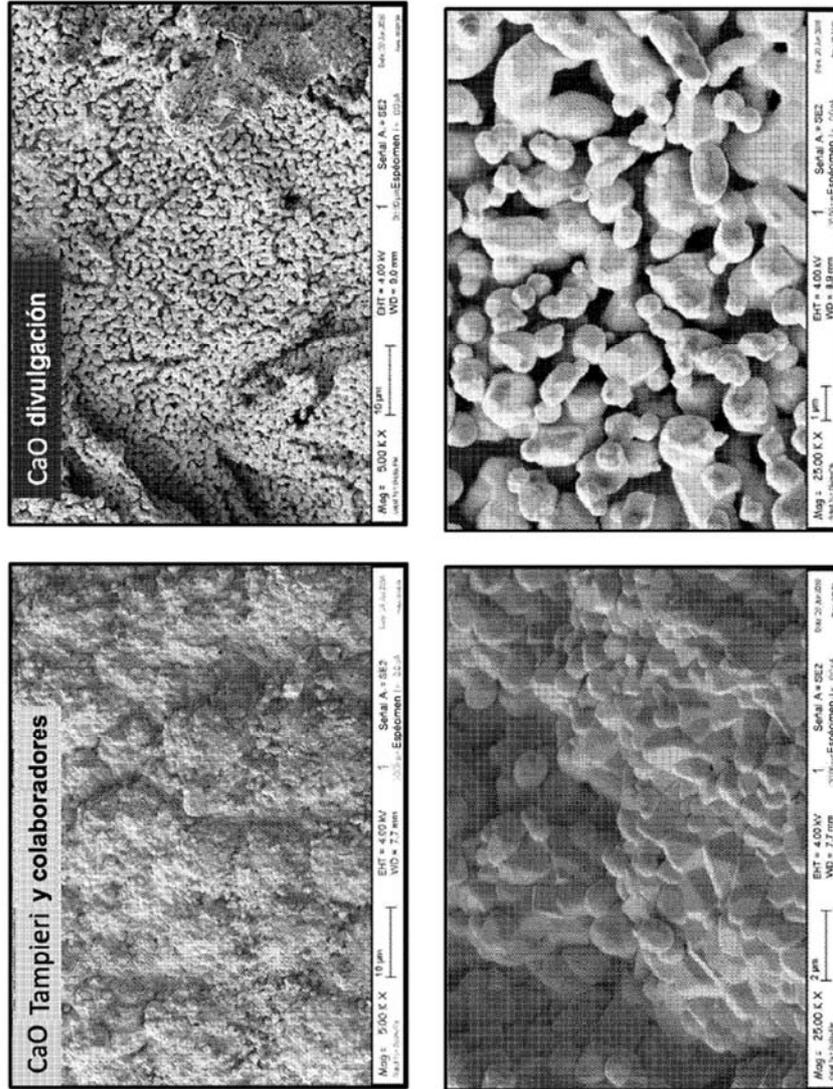
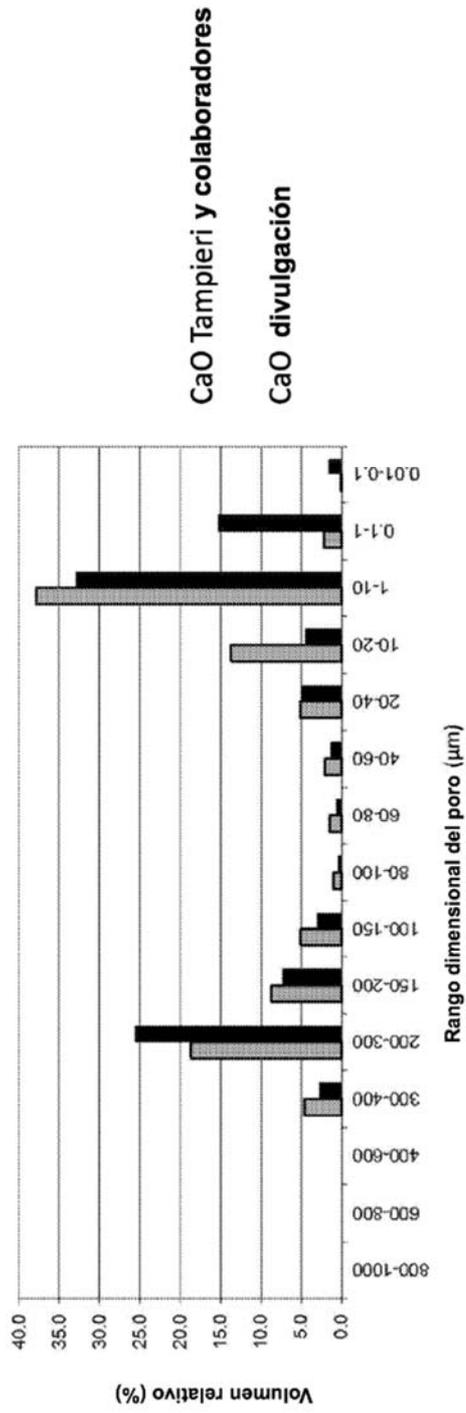


FIG. 15

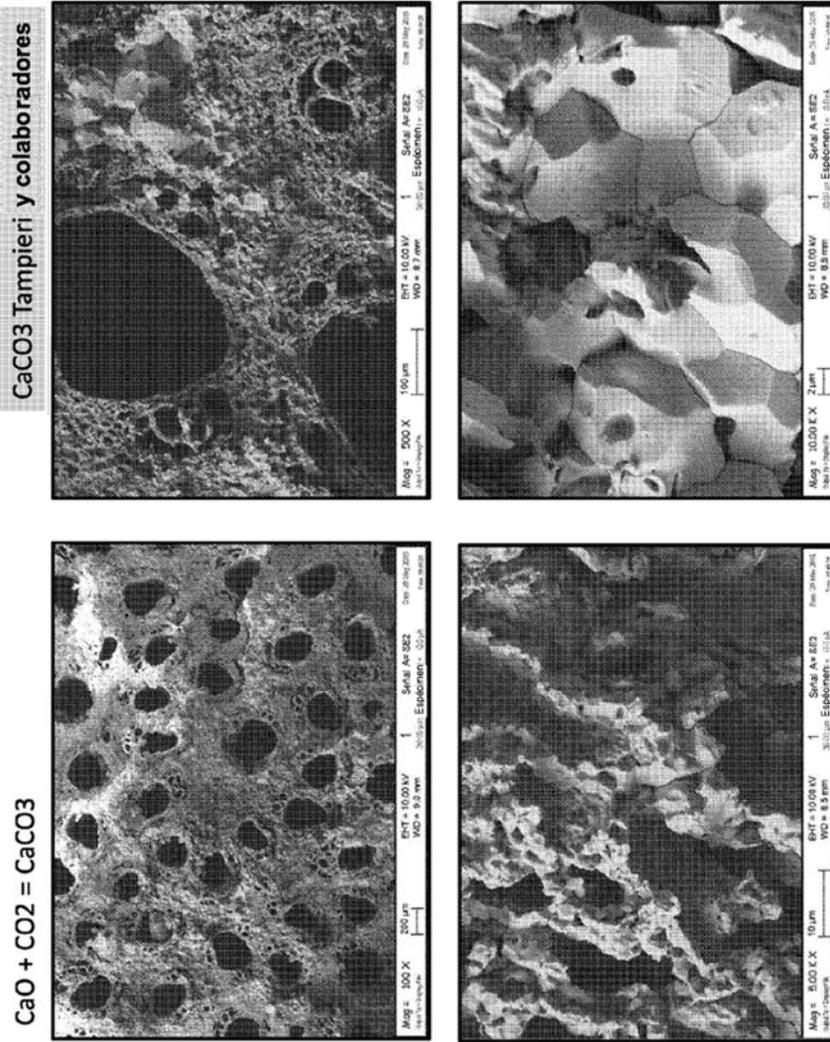


**Área de superficie - SSA (m<sup>2</sup>/g)**

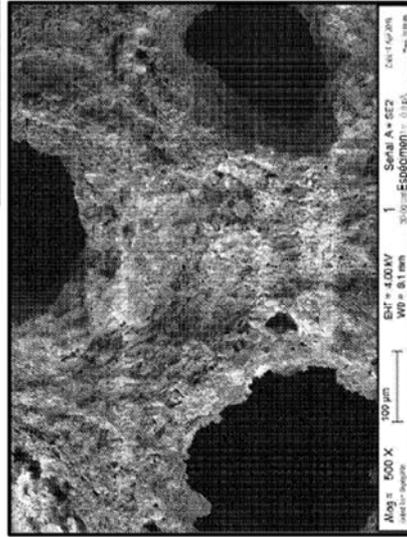
**Tampieri y colaboradores = 6.69**

**Divulgación = 9.56**

FIG. 16



CaCO3 divulgación



CaO + CO2 + H2O = CaCO3 + H2O

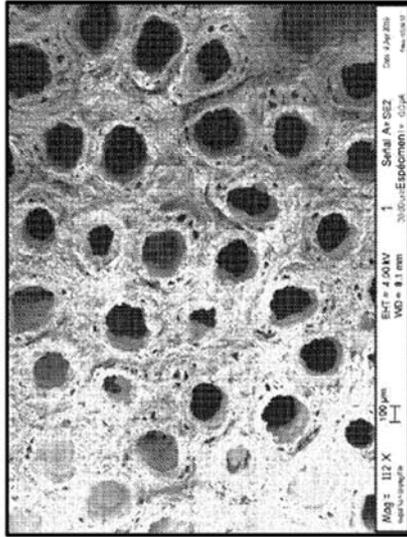
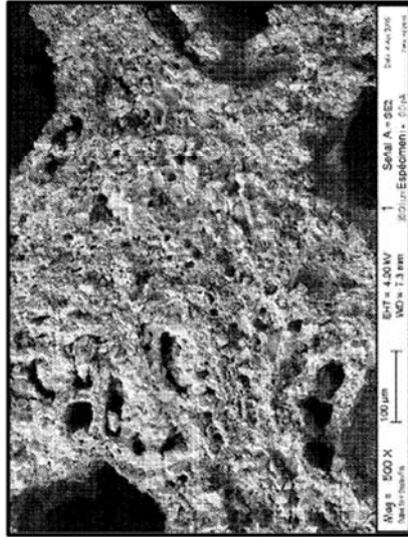
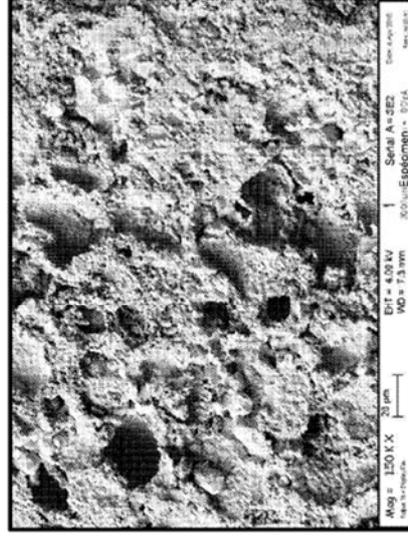
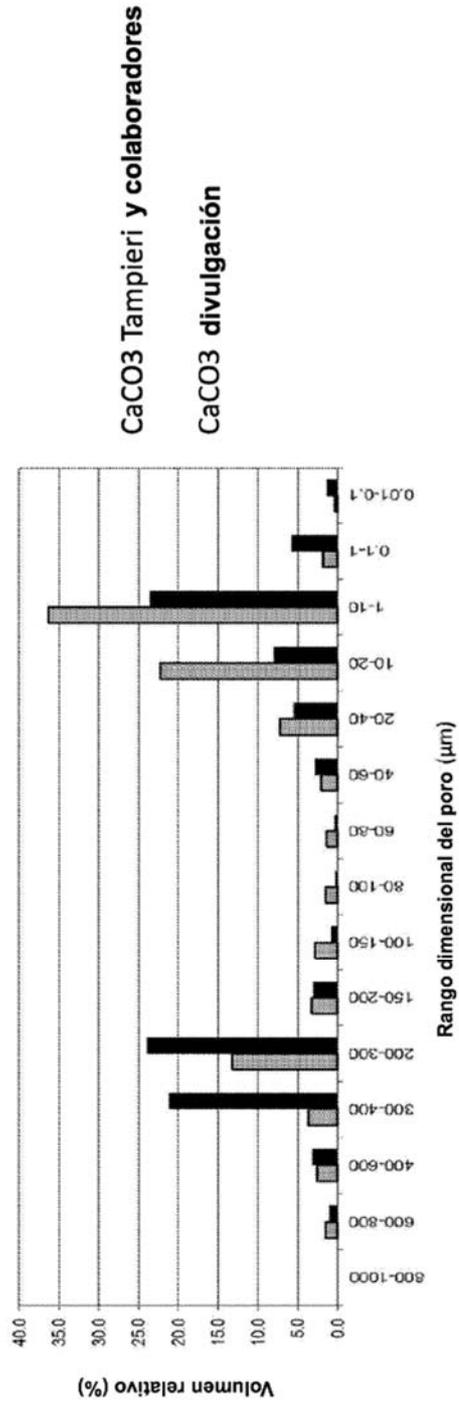


FIG. 18



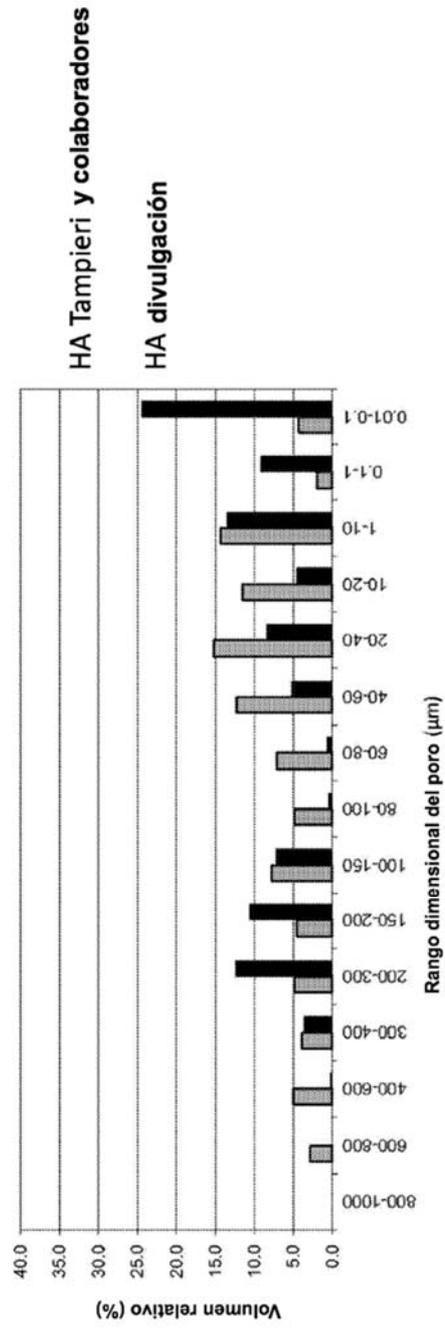


Área de superficie - SSA (m<sup>2</sup>/g)

Tampieri y colaboradores = 3.57

Divulgación = 5.52

FIG. 19



Área de superficie - SSA. (m<sup>2</sup>/g)

Tampieri y colaboradores = 6.28

Divulgación = 9.60

FIG. 20



FIG. 21



FIG. 22

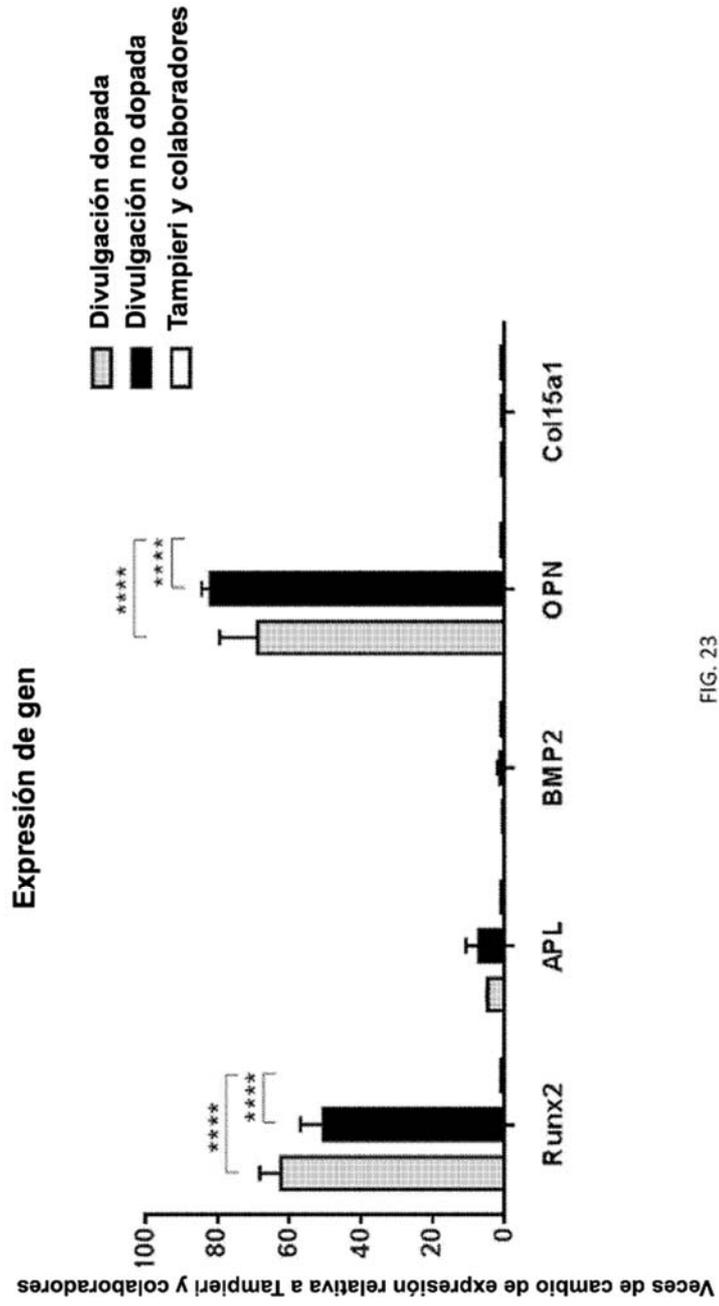


FIG. 23



FIG. 24

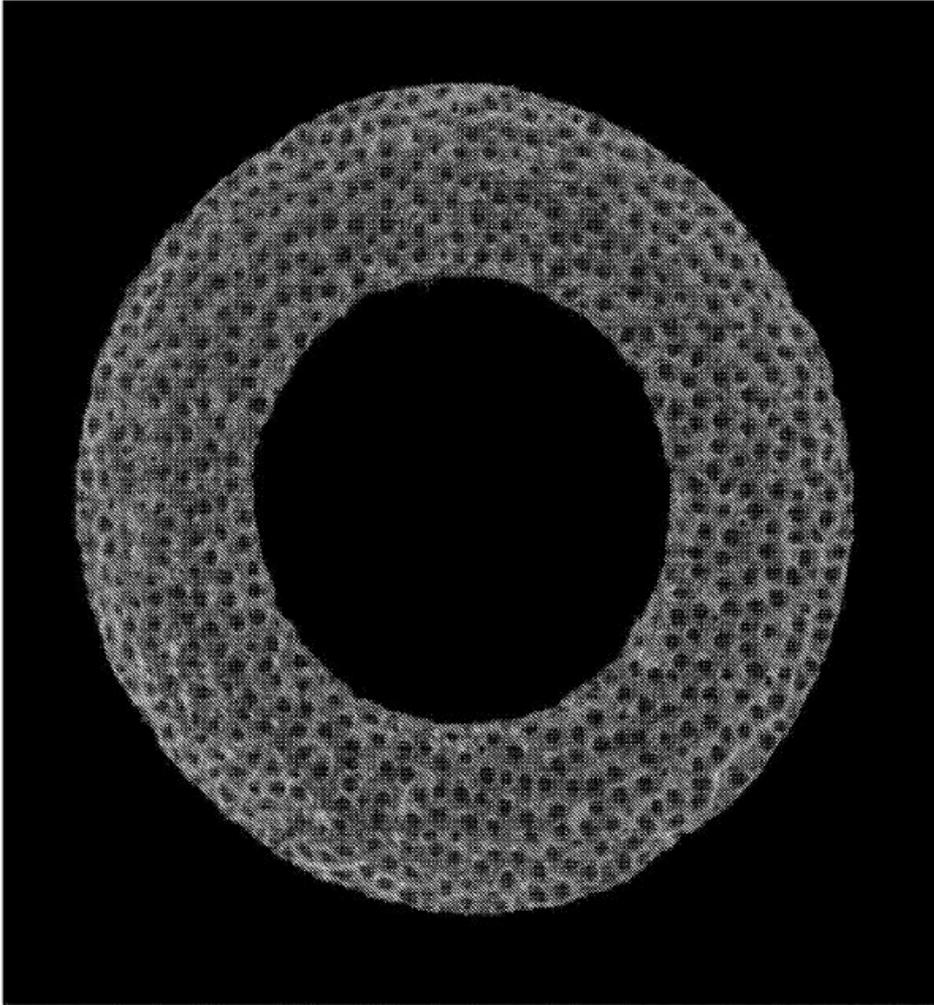


FIG. 25

