



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE
SAN NICOLÁS DE HIDALGO



INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN EN METALURGIA Y MATERIALES

PROGRAMA DE DOCTORADO EN CIENCIAS EN METALURGIA Y CIENCIA DE
LOS MATERIALES

**FABRICACIÓN DE ANDAMIOS POROSOS DE BIOVIDRIO CEL2 DOPADO CON
ZnO, SrO Y CuO MEDIANTE TECNOLOGÍA DE POLVOS PARA APLICACIÓN
EN INGENIERÍA TISULAR**

Tesis que para obtener el grado de
Doctor en Ciencias en Metalurgia y Ciencia de los Materiales Presenta:

M.C. Anel Flores Jacobo

Director de Tesis

Ph.D. Ena Athenea Aguilar Reyes

Morelia, Mich., diciembre de 2025.



INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN EN METALURGIA Y MATERIALES
Of. Núm.IIMM-053-2025

Morelia Michoacán 12 de febrero de 2025

**M.C. ANEL FLORES JACOBO
P R E S E N T E**

Por medio de la presente, esta dirección del Instituto de Investigación en Metalurgia y Materiales de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo tiene a bien informarle que para presentar su examen de grado de **Doctorado** en Ciencias en Metalurgia y Ciencias de los Materiales con la tesis titulada "**Fabricación de Andamios Porosos de Blovidrio CEL2 Dopado con ZnO, SrO y CuO Mediante Tecnología de Polvos para Aplicación en Ingeniería Tisular**", le ha sido asignada la siguiente mesa sinodal:

02001578	Dra. Ena Athenea Aguilar Reyes	Presidente
02001616	Dr. Carlos Alberto León Patiño	Vocal
97003581	Dr. Juan Zárate Medina	Vocal
19000251	Dra. Tzarara López Luke	Vocal
99002370	Dr. Ramiro Escudero García	Vocal
CONV0925	Dra. Deisy Ramírez Vinasco	Suplente

Agradeciendo de antemano las atenciones que se sirva prestar a la presente, aprovecho para enviarle un cordial saludo.

UMSNH
A T E N T A M E N T E



DR. ARIOSTO MEDINA FLORES
DIRECTOR

INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN EN METALURGIA
Y MATERIALES DE LA UMSNH

C.c. p.- Archivo/AMF/iag

#HumanistaPorSiempre

DEDICATORIA

A Dios por la oportunidad de vida y por permitirme planes de superación y un mejor futuro, por la esperanza y la fe. “Porque cuando me sentía cansada él me dio fuerza, cuando me sentía débil, él me dio fortaleza”.

A mis padres porque ellos fueron mi motor, mi cimiento y son parte importante de mi vida, y de mi formación, porque me enseñaron que la vida no es fácil que si caes debes levantarte y continuar y por enseñarme que mirar atrás es para aprender. A mis hermanos por su paciencia, comprensión y sacrificio.

A mi esposo Luis Ángel, por no dejarme y estar en las buenas y en las malas, por ser mi apoyo incondicional, por ser y formar parte de esta nueva etapa. A mi hijo Eratseni por ser mi nuevo motor de superación personal y profesional.

A mis compañeros y amigos del laboratorio de “Compuestos” por su apoyo incondicional: Rocío, Rodrigo, Alex, Karla, Cindy y Joaquín, y por integrarme a su grupo de trabajo, por animarme a seguir adelante.

“Uno de los mayores regalos de mi vida es mirar a mi alrededor y saber que no estoy sola.

Gracias por estar siempre a mi lado”

AGRADECIMIENTOS

Al Instituto de Investigación en Metalurgia y Materiales de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, por haberme abierto sus puertas y por la oportunidad de ingreso al programa de Doctorado y permitirme continuar formándome profesionalmente en un ambiente lleno de excelentes docentes e investigadores.

A la Secretaría de Ciencias, Humanidades, Tecnología e Innovación (SECIHTI) por la beca de doctorado otorgada en el periodo de septiembre-agosto 2020-2024.

A la Dra. Ena Athenea Aguilar Reyes, por la oportunidad de superación profesional, por su apoyo incondicional en el proyecto de Doctorado y por ser parte de esta hermosa aventura llena de frustración, enojo, buenos y malos ratos, pero de aprendizaje. Y por su ejemplo como profesionista y mamá.

Al M.C. Luis María Suárez Rodríguez, encargado del Laboratorio de Fisiología Molecular de Plantas, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, por la asesoría técnica y experimental en la realización de las pruebas de bioactividad *in vitro*.

Al Dr. Juan José Valdez Alarcón y a sus estudiantes Erick Hernández López y Christian Salto Reyes, por su apoyo incondicional y por la asesoría teórica y experimental en los estudios antibacterianos *in vitro*.

A las y los técnicos encargados de los equipos *Beckman Coulter LS100Q*, microscopio electrónico de barrido *JEOL SEM JSM 6400*, espectrofotómetro de infrarrojo *TENSOR 27 Bruker* por la asesoría técnica y experimental en la colección de datos.

Al Quím. Rufino Lozano, encargado del Laboratorio de Fluorescencia de Rayos X (LFRX), del Laboratorio Nacional de Geoquímica y Mineralogía, Instituto de Geología, Universidad Nacional Autónoma de México, por la asesoría experimental en la colección de los datos de fluorescencia.

A la Dra. Bertha Olivia Aguilar Reyes del Instituto de Investigación en Materiales de la UNAM-Morelia, por la asesoría experimental en la colección de datos de los análisis de difracción de rayos X.

ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS.....	vi
ÍNDICE DE TABLAS.....	xii
RESUMEN.....	xiii
ABSTRACT	xiv
CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Objetivos.....	3
1.1.1 Objetivo general	3
1.1.2 Objetivos particulares	3
1.2 Justificación	4
1.3 Hipótesis	5
CAPÍTULO 2. REVISIÓN Y DISCUSIÓN DEL ESTADO DEL ARTE	6
2.1 El tejido óseo humano.....	6
2.1.1 Composición del tejido óseo.....	6
2.1.2 Clasificación del hueso	6
2.1.3 Células presentes en el tejido óseo.....	8
2.1.4 Propiedades mecánicas del tejido óseo	9
2.2 Patología ósea	11
2.3 Técnicas de regeneración ósea.....	13
2.3.1 Injertos naturales versus injertos sintéticos y la ingeniería de tejidos.....	14
2.4 Ingeniería de tejidos.....	15
2.5 Andamios porosos.....	16
2.5.1 Requisitos de los andamios para ingeniería de tejido óseo	17
2.6 Métodos de fabricación.....	21
2.7 Materiales disponibles para la fabricación de andamios tridimensionales	29
2.7.1 Metales y sus aleaciones	29
2.7.2 Polímeros.....	33
2.7.3 Cerámicos.....	37
2.8 Vidrios bioactivos	38
2.8.1 Biovidrios de silicato.....	42
2.9 Elementos dopantes	47
2.10 Estudios <i>in vitro</i>	54

2.10.1 Estudios de bioactividad y modificación de biovidrios con dopantes	54
2.10.2 Cultivo celular	61
2.10.2.1 Ensayo WST-1	62
2.10.3 Ensayos antibacterianos	64
2.10.3.1 Patógenos comunes	65
2.10.3.2 Impacto en implantes	66
2.10.3.3 Metales como alternativa antibacteriana	67
2.11 Otros biomateriales funcionalizados	74
2.12 Respuesta y comportamiento de un biomaterial	78
2.13 Estado actual	80
CAPÍTULO 3. DESARROLLO EXPERIMENTAL	81
3.1 Fabricación del vidrio bioactivo CEL2	81
3.2 Caracterización microestructural de los polvos de biovidrio	82
3.2.1 Análisis de tamaño y distribución de partícula	83
3.2.2 Calorimetría diferencial de barrido (DSC)	83
3.2.3 Análisis por fluorescencia de rayos X (FRX)	83
3.2.4 Análisis por microscopía electrónica de barrido (MEB)	84
3.2.5 Análisis por espectroscopía infrarroja (FTIR)	84
3.2.6 Análisis por difracción de rayos X (DRX)	84
3.3 Fabricación de andamios de biovidrio CEL2 sin dopar y dopados	84
3.4 Estudios de bioactividad de los andamios sin dopar y dopados	86
3.4.1 Cálculo del volumen de SBF necesario	86
3.4.2 Preparación del fluido corporal simulado (SBF)	86
3.4.3 Proceso de inmersión	87
3.5 Caracterización microestructural y mecánica	88
3.5.1 Cálculo del porcentaje de porosidad	88
3.5.2 Medición de área superficial y tamaño de poro	88
3.5.3 Medición del tamaño poro	89
3.5.4 Microscopía electrónica de barrido (MEB)	89
3.5.5 Análisis por espectroscopía infrarroja (FTIR)	90
3.5.6 Análisis por difracción de rayos X (DRX)	90
3.5.7 Evaluación mecánica de los andamios	90

3.6 Estudios biológicos	90
3.6.1 Unidades formadoras de colonias (UFC)	91
3.6.2 Índice de formación de biopelículas	93
3.7 Análisis estadístico.....	95
CAPÍTULO 4. ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....	96
4.1 Análisis de los polvos de biovidrio, sin dopar y dopados	96
4.1.1 Tamaño y distribución de tamaño de partícula.....	96
4.1.2 Calorimetría diferencial de barrido (DSC).....	100
4.1.3 Fluorescencia de rayos X (FRX).....	105
4.1.4 Microscopía electrónica de barrido (MEB).....	106
4.1.5 Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR)	108
4.1.6 Difracción de rayos X (DRX)	112
4.2 Análisis de los andamios sinterizados.....	114
4.2.1 Microscopía electrónica de barrido (MEB).....	114
4.2.2 Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR)	116
4.2.3 Difracción de rayos X (DRX)	120
4.2.4 Resultados de porosidad y resistencia a la compresión	124
4.3. Resultados de los estudios <i>in vitro</i>	130
4.3.1 Ensayos de bioactividad	130
4.3.1.1 Estudios de pH y pérdida de peso	130
4.3.1.2 Análisis por microscopía electrónica de barrido (MEB)	135
4.3.1.3 Análisis por espectroscopía infrarroja (FTIR).....	141
4.3.1.4 Análisis por difracción de rayos X (DRX)	145
4.3.2 Estudios antibacterianos.....	149
4.3.2.1 Unidades formadoras de colonias (UFC)	149
4.3.2.2. Índice de formación de biopelícula	155
CAPÍTULO 5. CONCLUSIONES.....	163
TRABAJO A FUTURO	166
REFERENCIAS.....	167

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 2.1	Estructura jerárquica del hueso: fibrillas de colágeno, laminillas, osteonas y trabéculas, hueso cortical y trabecular [13].	8
Figura 2.2	Representación esquemática de la estructura ósea [16].	9
Figura 2.3	Comparación de curvas típicas de esfuerzo de compresión-deformación del hueso trabecular y cortical [17, 19].	10
Figura 2.4	Esquema representativo de las opciones disponibles para la regeneración del tejido óseo [29].	15
Figura 2.5	Conceptos básicos de la ingeniería del tejido óseo [31].	16
Figura 2.6	a) Ilustración esquemática y morfologías digitales de tres tipos de estructura de andamios, b) filtración y migración de HUVEC in vitro, tinción DAPI y análisis cuantitativo del número de células migradas y la distancia de migración, c) tiempo de transferencia de fluido de un lado del andamio al otro lado y d) proliferación de HUVEC [35].	19
Figura 2.7	a) Imágenes por MEB de los andamios de celulosa a diferentes magnificaciones, b) ensayo CCK8 de los andamios impresos en 3D de celulosa pura y compuestos y c) resultados de los estudios de resistencia a la compresión y tracción [36].	20
Figura 2.8	Micrografías de MEB e histogramas de distribución de tamaño de poro correspondientes (a, b) andamio de alginato, (c, d) andamio Alg-0.3BG, (e, f) andamio Alg-1BG y (g, h) andamio Alg-1.5BG [37].	21
Figura 2.9	Imágenes de MEB de los andamios (a, d) β -TCP, (b, e) β -TCP después de la impregnación al vacío con solución sol gel de biovidrio 45S5, (c, f) β -TCP/45S5 después del tratamiento térmico a 1200 °C [41].	23
Figura 2.10	Imágenes de los andamios HA: por microscopio óptico (I–III), y por MEB, microporos secundarios (IV–VI) y sección transversal del andamio (VII–IX) y b) porosidad (I), resistencia a la compresión (II) y estadísticas del tamaño de los microporos (III) [42].	25
Figura 2.11	Imágenes MEB de (a) arquitectura de poro-puntal 3D, (b) puntal sinterizado y (c) detalles de la superficie del puntal [43].	25
Figura 2.12	Imágenes MEB de andamios de biovidrio 45S5 con diferentes cantidades de agente espumante: con 0.1 % (A1, A2, A3), 0.2% (B1, B2, B3) y 0.3% (C1, C2, C3) sinterizados a 850 °C durante 2 h [44].	26

Figura 2.13	a) Imágenes por MEB a diferentes aumentos, b) curvas de esfuerzo-deformación y c) tabla de las propiedades de los andamios obtenidos [47].	28
Figura 2.14	Imágenes MEB de los andamios de biovidrio a base de β -TCP/fosfato con diversas cantidades de agente espumante [48].	29
Figura 2.15	a) Macrografías de las muestras porosas de Ti6Al4V impresas en 3D, b) análisis EDS y c) imágenes MEB de las muestras con diferentes tamaños de poro 500 (I), 700 (II) y 900 (III) [50].	30
Figura 2.16	a) Imágenes MEB de las estructuras de NiTi producidas por CAD, b) comparación entre los detalles del modelo CAD y las medidas de las estructuras SLM y c) curvas de esfuerzo deformación con valores de porosidad y módulo de Young [51].	31
Figura 2.17	Imágenes MEB que muestran los detalles de CoCr circulares (izquierda) y trabeculares (derecha) y b) resultados de las propiedades mecánicas de tracción (izquierda) y compresión (derecha). YS = límite elástico, E = módulo de Young y UTS = resistencia máxima a la tracción [52].	32
Figura 2.18	(a, b) Ensayo del kit de recuento celular-8 (CCK-8) después de su cultivo durante 1, 3 y 5 días. (c-e) Reconstrucciones confocales con escaneo láser de células vivas/muertas (1 día). (f-h) Imágenes por MEB de la morfología de rMSC extendida en andamios (1 día) [60].	36
Figura 2.19	Representación esquemática de las unidades estructurales que forman una red de vidrio de óxido (R representa un catión modificador de red genérico; Ø corresponde a átomos de BO) [64].	39
Figura 2.20	a) Imágenes de MEB de los andamios de silicato, borosilicato y borato, y b) curvas de esfuerzo-deformación de los ensayos mecánicos [70].	40
Figura 2.21	a) Imágenes MEB de andamios compuestos con contenidos del 5 a 20 % de BG, b) resistencia a la compresión de los andamios, c) módulo elástico de los andamios, d) pérdida de peso, y e) valores de pH después de la inmersión en SBF [71].	42
Figura 2.22	Imágenes de MEB del vidrio de borato después de su inmersión en diferentes medios [72].	42
Figura 2.23	a) Imagen de MEB del andamio de biovidrio 45S5 sinterizado a 1180°C, y b) curva de resistencia a la compresión contra porosidad [75].	44
Figura 2.24	a) Imágenes MEB de los andamios después de la sinterización (I-III), después del recubrimiento (IV), capa fibrosa de colágeno (V-VI) y	45

	superficie rugosa del biovidrio de la capa fibrosa de colágeno (VII-IX), y b) curvas de esfuerzo-deformación para andamios a bases de BG 45S5 con y sin recubrimiento de colágeno [76].	
Figura 2.25	a) Imagen MEB de los andamios a diferentes magnificaciones, b) resultados de las pruebas mecánicas, c) actividad metabólica bajo el ensayo de reducción AlamarBlue®, y d) imágenes de células vivas/muertas de hDPSC. Barras de error $\pm$ DE y $*p < 0.05$, $**p < 0.01$ y $***p < 0.001$ y la falta de significancia (ns) es $p > 0.05$ según la prueba t de Student [77].	46
Figura 2.26	a) Imágenes de MEB de los andamios con 58% en peso de CEL2 (I-III), con 60% en peso de CEL 2 (IV-V), ambos tratados a 900 °C, y andamios con 58% en peso de CEL2 tratados a 1000 °C (VI) y b) análisis de nano-CT de andamios vitrocerámicos CEL2 con diferentes contenidos de sólidos y sinterizados mediante diferentes tratamientos térmicos [5].	47
Figura 2.27	Elementos incluidos hasta la fecha en los vidrios bioactivos mesoporosos y su actividad biológica. Las líneas continuas indican propiedades bien establecidas, mientras que las líneas discontinuas corresponden a efectos biológicos propuestos [84].	49
Figura 2.28	a) Viabilidad celular con fluorescencia, b) influencia de los productos de disolución iónica (IDP) en la producción de ALP, OPN, OCN y COL1A1 (I-IV), y c) imagen de fluorescencia de células vivas/muertas [85].	51
Figura 2.29	a) Análisis de densidad óptica de las células después de 24 horas, b) imágenes de MEB de adhesión y proliferación celular de MG-63, y c) evaluación angiogénica con células HUVEC a las 24 horas [86].	52
Figura 2.30	a) Respuesta mecánica de las muestras, b) ensayos de bioactividad de las muestras, c-d) estudios de viabilidad celular mBMSC y HUVEC con datos estadísticos representados como medias $\pm$ DE ($*p < 0.05$) [87].	53
Figura 2.31	Representación del mecanismo de integración del biovidrio sobre la superficie del tejido [91].	55
Figura 2.32	a) Formación de hidroxiapatita en la superficie de los andamios: BG (a1–a5), 5Sr-BG (b1–b5), 10Sr-BG (c1–c5), 5Zn-BG (d1–d5) y 10Zn-BG (e1–d5); análisis EDS (a6–e6); b) Resultados de pérdida de peso de los andamios tras inmersión en SBF [92].	56
Figura 2.33	a, b) Imágenes MEB de cristales de hidroxiapatita. c) Análisis EDS de hidroxiapatita formada [93].	58

Figura 2.34	a) Imagen MEB de la superficie de los andamios tras inmersión en SBF por 5 días, b) curvas de pH y pérdida de peso, y c.1-c.4) concentraciones de iones de Si^{4+} , Ca^{2+} , B^{3+} y Sr^{2+} [94].	59
Figura 2.35	Imágenes MEB tras inmersión en SBF: (a, b) sin dopar, (c, d) 1SrBG, (e, f) 2SrBG y (g, h) 5SrBG [95].	59
Figura 2.36	(a) Imagen MEB de las muestras tras inmersión en SBF, (b.1) valores de pH, (b.2-b.4) perfiles de liberación de Co^{2+} , Cu^{2+} y Sr^{2+} [96].	60
Figura 2.37	Perfiles de liberación de Ca, P, Si, Cu y Mg y valores de pH durante la inmersión en SBF [97].	61
Figura 2.38	a) Tinción vivo/muerto a las 3, 5 y 7 semanas, b) ensayo de viabilidad celular indirecta WST-1, expresados como media aritmética $\pm$ error estándar; *diferencia estadísticamente significativa entre d7-ZnHyb y todos los demás grupos ($p < 0.001$ con corrección para pruebas múltiples) [100].	63
Figura 2.39	Viabilidad celular de HaCaT después de 24 h de exposición a diferentes concentraciones de CuO ($p < 0.05$) [101].	64
Figura 2.40	a) Halos de inhibición en discos dopados y no dopados con cepas: (a.1, a.3) <i>E. coli</i> , (a.2, a.4) <i>S. aureus</i> , (a.5, a.7) <i>B. cereus</i> y (a.6, a.8) <i>C. albicans</i> . b, c) Tamaños de zona de inhibición en milímetros [106].	68
Figura 2.41	a) Halos de inhibición tras 24-48 h de incubación. b) Zonas de inhibición en mm (media $\pm$ DE; $p < 0.05$ y $p < 0.01$). c, d) Dinámica de D.O. durante 7 h [107].	69
Figura 2.42	a) CMI en diferentes concentraciones de biovidrio. b) Halos de inhibición tras 24 h de incubación. c) Zonas de inhibición gráficas. d) Potencial de erradicación de biopelículas para <i>A. aceti</i> , <i>P. aeruginosa</i> y <i>S. aureus</i> (**** $p < 0.0001$, *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$ y * $p < 0.05$) [108].	71
Figura 2.43	a) Actividad antimicrobiana de biovidrios dopados y sin dopar. b) Evaluación de la actividad antibacteriana de los andamios [109].	72
Figura 2.44	a, b) Inhibición de <i>E. coli</i> , c, d) inhibición de <i>S. aureus</i> mediante andamios dopados y sin dopar [110].	73
Figura 2.45	a) Viabilidad bacteriana: izquierda <i>E. coli</i> , derecha <i>S. aureus</i> . b) Formación de colonias: (b.1-b.3) <i>E. coli</i> , b.4-b.6) <i>S. aureus</i> [111].	74
Figura 2.46	a) Análisis osteogénico mediante tinción de células con F-actina citoesquelética. b) Representación del número promedio de células madre mesenquimales (MSC) adheridas por microgel, la fracción de superficie del	75

	microgel cubierta por MSC adheridas y el área promedio ocupada por MSC adheridas a lo largo del tiempo (n = 5). c) Evaluación de la inyectabilidad de los microgeles. d) Mediciones de la fuerza de inyección de microgeles acelulares utilizando agujas hipodérmicas de diferentes calibres. e) Análisis de viabilidad celular de MSC tras la inyección [112].	
Figura 2.47	a) Evaluación de la viabilidad y proliferación de las células osteoblásticas MC3T3-E1. b) Perfil de liberación de fármaco en función del tiempo. c) Ensayos osteogénicos, incluyendo actividad de ALP y formación de nódulos mineralizados evaluados mediante tinción con ARS [113].	76
Figura 2.48	Imágenes obtenidas mediante microscopía electrónica de barrido (MEB) de partículas de vidrios bioactivos (BG) después de 14 días de inmersión en fluido corporal simulado (SBF). Las imágenes muestran partículas aglomeradas (a, c, e, g) e individuales (b, d, f, h) de las diferentes muestras sintetizadas, destacando la formación de estructuras características tras el tratamiento [114].	77
Figura 2.49	Esquema representativo del comportamiento de un biomaterial tras su implantación [116].	79
Figura 3.1	Ciclo térmico para la fabricación del biovidrio.	82
Figura 3.2	Esquema representativo para la fabricación de andamios porosos.	85
Figura 3.3	Representación esquemática del diámetro de Feret.	89
Figura 4.1	Curva de distribución de tamaño de partícula del biovidrio CEL2 y biovidrios dopados.	97
Figura 4.2	Curvas termoanalíticas obtenidas por calorimetría diferencial de barrido (DSC) para los polvos de biovidrio.	101
Figura 4.3	Imágenes MEB de los polvos de biovidrio: a) CEL2, b) CEL2-ZnO, c) CEL2-SrO y d) CEL2-CuO.	107
Figura 4.4	Espectros FT-IR de los polvos de biovidrio después del proceso de fusión y temple.	111
Figura 4.5	Difractogramas de los polvos de biovidrio después del proceso de fusión y temple.	113
Figura 4.6	Imágenes MEB de la microestructura de los andamios: a) CEL2, b) CEL2-ZnO, c) CEL2-SrO y d) CEL2-CuO, sinterizados a 900 °C.	115
Figura 4.7	Espectros FT-IR de los andamios sinterizados.	117
Figura 4.8	Difractogramas por DRX de los andamios sinterizados a 900 °C.	121

Figura 4.9	Resultados de las pruebas de resistencia a la compresión de los andamios con diferentes composiciones: a) CEL2, b) CEL2-ZnO, c) CEL2-SrO y d) CEL2-CuO.	125
Figura 4.10	Relación entre el porcentaje de porosidad y la resistencia a la compresión de los andamios sin dopar y dopados con ZnO, SrO y CuO.	128
Figura 4.11	a) Variación de pH en la solución SBF. b) Pérdida de peso de los andamios en función del tiempo de inmersión.	132
Figura 4.12	a) Andamios CEL2 sin dopar después del tratamiento en SBF. b) Andamios CEL2-ZnO tras el tratamiento en SBF .c) Andamios CEL2-SrO tras el tratamiento en SBF d) Andamios CEL2-CuO tras el tratamiento en SBF.	134
Figura 4.13	Micrografías obtenidas por MEB de los andamios de biovidrio CEL2 después de la inmersión en SBF por diferentes tiempos.	136
Figura 4.14	Micrografías obtenidas por MEB de los andamios de biovidrio CEL2 dopados con ZnO después de la inmersión en SBF por diferentes tiempos.	137
Figura 4.15	Micrografías obtenidas por MEB de los andamios de biovidrio CEL2 dopados con SrO después de la inmersión en SBF por diferentes tiempos.	139
Figura 4.16	Micrografías obtenidas por MEB de los andamios de biovidrio CEL2 dopados con CuO después de la inmersión en SBF por diferentes tiempos.	140
Figura 4.17	Espectros FT-IR de los andamios tras distintos tiempos de inmersión en SBF: a) CEL2, b) CEL2-ZnO, c) CEL2-SrO y d) CEL2-CuO	142
Figura 4.18	Difractogramas por DRX de los andamios tras inmersión en SBF por diferentes tiempos: a) CEL2, b) CEL2-ZnO, c) CEL2-SrO y d) CEL2-CuO.	146
Figura 4.19	Imagen representativa de las UFC tras 24 h de tratamiento.	150
Figura 4.20	Comparación estadística entre cepas y composiciones para la densidad celular inicial	151
Figura 4.21	Comparación de medias del índice de formación de biopelículas para cada cepa y compuesto.	156

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 2.1	Composición de tejido óseo [13]	7
Tabla 2.2	Propiedades mecánicas del hueso trabecular y cortical [17, 19]	11
Tabla 2.3	Estrategias de regeneración ósea [28]	13
Tabla 2.4	Requisitos de los andamios para ingeniería de tejido óseo [33, 34]	17
Tabla 2.5	Métodos de fabricación de andamios	22
Tabla 2.6	Polímeros disponibles para la fabricación de andamios multifuncionales	34
Tabla 2.7	Cerámicos disponibles para la fabricación de andamios tridimensionales [63]	37
Tabla 2.8	Vidrios bioactivos para aplicación médica	39
Tabla 2.9	Diferentes tipos de vidrios bioactivos basados en silicato [74]	43
Tabla 2.10	Funciones de Zn, Sr y Cu como iones dopantes y su mecanismo de acción [85-87]	49
Tabla 2.11	Principales antibióticos para tratar diferentes tipos de infecciones [84]	67
Tabla 3.1	Composición de las mezclas de biovidrio CEL2 no dopado y dopado (% mol)	82
Tabla 3.2	Reactivos y cantidades para la preparación de 1000 mL de SBF	87
Tabla 3.3	Valores de densidad de cada una de las composiciones de biovidrio	88
Tabla 4.1	Comparación del efecto del tamaño de partícula en las propiedades microestructurales y funcionales de los andamios de biovidrio [131-133]	99
Tabla 4.2	Temperaturas características (T_g , T_c y T_m en °C) del biovidrio CEL2 sin dopar y dopados	100
Tabla 4.3	Comparación de los resultados obtenidos por análisis de FRX con respecto a la composición nominal del biovidrio CEL2 y sus variantes dopadas	106
Tabla 4.4	Comparación de tamaño de poro, porcentaje de porosidad y resistencia a la compresión en andamios de biovidrio	129
Tabla 4.5	Fases cristalinas y su efecto en las propiedades mecánicas	130

RESUMEN

La ingeniería tisular ha impulsado el uso de andamios tridimensionales bioactivos para la regeneración ósea. Para optimizar su desempeño estructural y funcional, se incorporan dopantes de óxidos metálicos que mejoran la porosidad, bioactividad y respuesta antibacteriana sin comprometer la integridad mecánica, permitiendo el diseño de andamios multifuncionales con alto potencial terapéutico.

En este trabajo se sintetizó el biovidrio CEL2 con composición $45\text{SiO}_2\text{-}3\text{P}_2\text{O}_5\text{-(}26-x\text{)CaO-}15\text{Na}_2\text{O-}7\text{MgO-}4\text{K}_2\text{O-}x\text{MO}$ (% mol), sin dopar ($x=0$) y dopado con ZnO, SrO y CuO ($x=2$) mediante fusión y temple. Los andamios se fabricaron por tecnología de polvos, con una formulación de 55% de biovidrio, 42% de resina fenólica y 3% de agente espumante, y se sinterizaron a 900 °C. El análisis por calorimetría diferencial de barrido (DSC) mostró que los dopantes modifican el comportamiento térmico del biovidrio, reduciendo las temperaturas de transición vítrea (T_g) y cristalización (T_c). Las caracterizaciones FRX, MEB, FTIR y DRX confirmaron la estabilidad composicional, la formación de fases cristalinas secundarias y una red porosa interconectada. La porosidad alcanzó 74 % en el andamio sin dopar, aumentó hasta 77-79% % con ZnO y SrO, y disminuyó a 66 % con CuO. En cuanto a las propiedades mecánicas, el CuO mejoró significativamente la resistencia a la compresión (2.00 ± 0.02 MPa), superando a las composiciones base y dopadas con ZnO y SrO. La evaluación bioactiva *in vitro* en fluido corporal simulado (SBF) evidenció la formación de una capa de hidroxiapatita en todas las formulaciones, aunque ZnO y SrO retardaron su nucleación frente a CuO. Los ensayos antibacterianos frente a *Staphylococcus aureus* (USA 300 y ATCC 25923) y *Escherichia coli* (ATCC 25922) mostraron actividad significativa únicamente en los andamios dopados con CuO.

En conjunto, los resultados demuestran que la incorporación controlada de óxidos metálicos modula de forma selectiva las propiedades estructurales, bioactivas y antibacterianas de los andamios de biovidrio CEL2, destacando el CuO como un dopante promisorio para aplicaciones en ingeniería tisular ósea con requerimientos antibacterianos.

Palabras clave: biovidrio CEL2, andamios, bioactividad, porosidad, antibacteriano.

ABSTRACT

Tissue engineering has driven the development of three-dimensional bioactive scaffolds for bone regeneration. To optimize their structural and functional performance, metal oxides dopants have been incorporated to enhance porosity, bioactivity, and antibacterial response without compromising mechanical integrity, enabling the design of multifunctional scaffolds with high therapeutic potential.

In this work, the CEL2 bioglass with the composition $45\text{SiO}_2\text{-}3\text{P}_2\text{O}_5\text{-(}26\text{-}x\text{)CaO-}15\text{Na}_2\text{O-}7\text{MgO-}4\text{K}_2\text{O-}x\text{MO}$ (mol %) was synthesized undoped ($x = 0$) and doped with ZnO, SrO, and CuO ($x = 2$) using the melt-quenching technique. Scaffolds were fabricated through powder technology, with a formulation of 55% bioglass, 42% phenolic resin, and 3% foaming agent, and subsequently sintered at 900 °C. Differential scanning calorimetry (DSC) analysis revealed that dopants altered the thermal behavior of the bioglass, decreasing the glass transition (T_g) and crystallization temperatures (T_c). XRF, SEM, FTIR, and XRD characterizations confirmed the compositional stability, formation of secondary crystalline phases, and an interconnected porous network. Porosity reached 74% in the undoped scaffolds, increased to 77-79% with ZnO and SrO additions, and decreased to 66% with CuO. Regarding mechanical properties, CuO doping significantly improved compressive strength (2.00 ± 0.02 MPa), outperforming the base composition and those doped with ZnO and SrO. The *in vitro* bioactivity assessment in simulated body fluid (SBF) demonstrated hydroxyapatite layer in all formulations, although ZnO and SrO delayed nucleation compared to CuO. Antibacterial tests against *Staphylococcus aureus* (USA 300 and ATCC 25923) and *Escherichia coli* (ATCC 25922) revealed significant activity only in CuO-doped scaffolds.

Overall, the results demonstrate that the controlled incorporation of metallic oxides selectively modulates the structural, mechanical, bioactive, and antibacterial properties of CEL2 bioglass scaffolds, highlighting CuO as a promising dopant for bone tissue engineering applications requiring antibacterial functionality.

Keywords: CEL2 bioglass, scaffolds, bioactivity, porosity, antibacterial.

CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN

La ingeniería de tejidos se ha consolidado como una alternativa prometedora para la regeneración de tejidos dañados, particularmente del tejido óseo, donde las fracturas complejas, las enfermedades degenerativas y los defectos traumáticos representan un desafío clínico significativo. Esta disciplina se basa en el diseño de andamios tridimensionales que actúan como estructuras temporales capaces de facilitar la adhesión, proliferación y diferenciación celular, promoviendo la formación de nueva matriz extracelular y por ende la regeneración del tejido [1-3]. Para lograr un desempeño adecuado en entornos fisiológicos, estos andamios deben reunir propiedades de biocompatibilidad, bioactividad, porosidad interconectada, resistencia mecánica y biodegradabilidad controlada.

Entre los materiales propuestos, los biovidrios destacan por su capacidad intrínseca para inducir la formación de tejido óseo mediante la formación de una capa de hidroxiapatita, similar al mineral óseo, al interactuar con fluidos fisiológicos [4]. Dentro de esta familia, el biovidrio CEL2 representa una evolución del sistema clásico 45S5, con una composición modificada ($45\text{SiO}_2\text{-}3\text{P}_2\text{O}\text{-}26\text{CaO}\text{-}7\text{MgO}\text{-}4\text{K}_2\text{O}\text{-}15\text{Na}_2\text{O}$, % mol) diseñada para estabilizar el pH del medio y controlar la liberación iónica durante la disolución en fluidos fisiológicos [5]. Sin embargo, a pesar de su reconocida bioactividad y compatibilidad química, el biovidrio CEL2 presenta limitaciones asociadas a su fragilidad, baja resistencia mecánica y ausencia de propiedades antibacterianas, lo que restringe su uso directo en ambientes clínicos que requieren resistencia estructural y respuesta antimicrobiana efectiva. Además, su procesamiento térmico mediante sinterización puede inducir cambios estructurales indeseables, como la cristalización no controlada o la pérdida de porosidad, afectando su integridad funcional [6]. En consecuencia, se requiere modificar y optimizar sus propiedades estructurales, fisicoquímicas, mecánicas y biológicas para ampliar su aplicabilidad en la regeneración ósea.

Una estrategia tecnológica viable para mejorar el desempeño del biovidrio consiste en la incorporación de óxidos metálicos como agentes dopantes, los cuales pueden modular simultáneamente las propiedades estructurales y biológicas del material. En este contexto, los dopantes ZnO, SrO y CuO han demostrado efectos complementarios sobre los mecanismos de regeneración y protección del tejido óseo: el ZnO promueve la

mineralización ósea, acelera la cicatrización y ofrece acción antibacteriana [7]; el SrO estimula la proliferación y diferenciación osteoblástica, favoreciendo la regeneración ósea [8]; mientras que el CuO actúa como agente antibacteriano, inhibiendo el crecimiento de bacterias [9, 10].

No obstante, aún no se comprende completamente cómo la incorporación de estos dopantes afecta de manera conjunta las propiedades estructurales, mecánicas bioactivas y antibacterianas del biovidrio CEL2, lo que limita su aprovechamiento en aplicaciones clínicas específicas. En este sentido, el presente trabajo plantea como pregunta de investigación: ¿De qué manera la incorporación de ZnO, SrO y CuO modula las propiedades térmicas, estructurales y biológicas del biovidrio CEL2 en andamios porosos para regeneración ósea?

De acuerdo con ello, se propone la hipótesis de que la adición controlada de óxidos metálicos (ZnO, SrO y CuO) en proporción de 2 % mol mejora la funcionalidad del biovidrio CEL2, optimizando su desempeño mecánico y bioactivo, y otorgándole propiedades antibacterianas sin comprometer su integridad estructural.

El propósito de este trabajo es fabricar y caracterizar andamios porosos de biovidrio CEL2 dopados con 2 % mol de ZnO, SrO y CuO, a fin de evaluar su potencial como biomateriales avanzados para la ingeniería tisular ósea. En la primera etapa, se sintetizó el biovidrio CEL2 mediante la técnica de fusión y temple, obteniendo composiciones sin dopar y dopadas. En la segunda etapa, se elaboraron los andamios por tecnología de polvos, evaluando su comportamiento térmico, morfológico, mecánico, bioactivo y antibacteriano.

El documento se estructura de la siguiente manera: en el Capítulo II se presentan la revisión y la discusión del estado del arte, abordando los fundamentos del biovidrio, el tejido óseo, las técnicas de fabricación, las propiedades mecánicas y la actividad antibacteriana. El Capítulo III describe la metodología experimental aplicada a la síntesis, el procesamiento y la caracterización de los materiales. El Capítulo IV expone los resultados y su análisis comparativo, estableciendo la relación entre microestructura, resistencia mecánica y comportamiento biológico. Finalmente, el Capítulo V presenta las conclusiones generales y las perspectivas de trabajo futuro.

1.1 Objetivos

1.1.1 Objetivo general

Desarrollar andamios porosos de biovidrio CEL2 dopado con ZnO, SrO y CuO, obtenidos mediante tecnología de polvos, para optimizar sus propiedades mecánicas y biológicas, favoreciendo la integración ósea y la prevención de infecciones.

1.1.2 Objetivos particulares

- Sintetizar el biovidrio de CEL2 dopado con 2 % mol de ZnO, SrO y CuO mediante la técnica convencional de fusión y temple, asegurando la homogeneidad composicional y la estabilidad vítrea del material.
- Fabricar andamios porosos de biovidrio CEL2 dopados con ZnO, SrO y CuO mediante tecnología de polvos, controlando su porosidad interconectada (50-90%) y la resistencia a la compresión (2-12 MPa), comparables al tejido óseo trabecular.
- Evaluar la morfología, la composición química y la estructura cristalina de los polvos de biovidrio y de los andamios mediante técnicas de caracterización como microscopía electrónica de barrido (MEB), espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR) y difracción de rayos X (DRX).
- Analizar la influencia de los dopantes de óxidos metálicos en la microestructura, morfología y propiedades mecánicas de los andamios obtenidos.
- Evaluar la bioactividad y biodegradabilidad *in vitro* de los andamios mediante su inmersión en fluido corporal simulado durante diferentes periodos de tiempo.
- Examinar el efecto de los iones metálicos Zn^{2+} , Sr^{2+} y Cu^{2+} sobre la actividad antibacteriana y la formación de biopelículas frente a cepas patógenas *S. aureus* USA-300, *S. aureus* ATCC-25923 y *E. coli* ATCC-25922.

1.2 Justificación

El tejido óseo cumple funciones estructurales esenciales, pero su regeneración es limitada frente a defectos que superan el tamaño crítico o enfermedades degenerativas, lo que representa un problema médico y social agravado por el envejecimiento y los accidentes de alto impacto. Los injertos óseos, aunque eficaces, presentan limitaciones de disponibilidad y riesgo de rechazo o infección, impulsando la búsqueda de alternativas más seguras y funcionales.

Desde el enfoque científico, la ingeniería de tejidos permite diseñar andamios tridimensionales que sustituyen temporalmente el tejido dañado y estimulan su regeneración. Entre los materiales más prometedores, los biovidrios –en particular el CEL2– destacan por su bioactividad y estabilidad, aunque su fragilidad, baja resistencia mecánica y falta de propiedades antibacterianas limitan su aplicación clínica.

En este contexto, la investigación busca superar dichas limitaciones mediante la incorporación de óxidos metálicos (ZnO, SrO y CuO) como dopantes del biovidrio CEL2. Estos iones pueden modificar la microestructura, mejorar la resistencia mecánica, potenciar la bioactividad e inducir efectos antibacterianos sin recurrir a antibióticos, constituyendo una estrategia tecnológica avanzada frente a la resistencia bacteriana. Sin embargo, el conocimiento sobre cómo estos dopantes alteran simultáneamente las propiedades fisicoquímicas, mecánicas y biológicas del biovidrio CEL2 sigue siendo limitado.

Por tanto, este estudio se justifica científicamente al buscar comprender de manera integral la influencia de los dopantes de óxidos metálicos en el comportamiento estructural, mecánico y biológico de los andamios de biovidrio, y socialmente al contribuir al desarrollo de biomateriales más seguros, eficaces y con potencial clínico, capaces de mejorar la calidad de vida de pacientes con defectos óseos y reducir los costos asociados a infecciones y fallos de implantes.

1.3 Hipótesis

La fabricación de andamios de biovidrio CEL2 mediante tecnología de polvos permitirá obtener una estructura porosa interconectada cuyas propiedades fisicoquímicas y mecánicas puedan ser moduladas mediante el dopaje con óxidos metálicos de Zn, Sr y Cu. Se plantea que la incorporación controlada de estos dopantes modificará la microestructura del biovidrio, mejorando su resistencia mecánica, su bioactividad y su respuesta antibacteriana, sin comprometer la integridad estructural del material ni su biocompatibilidad, lo que podría favorecer su desempeño en aplicaciones de regeneración ósea.

1.4 Metas Científicas

- Desarrollar los principios teórico-prácticos necesarios para implementar una metodología de procesamiento para la síntesis de espumas bioactivas mediante tecnología de polvos, que cumplan con los requerimientos de propiedades mecánicas, osteoconducción y osteoinducción.
- Optimizar el proceso de fabricación —incluyendo agente espumante, temperatura y tiempo de sinterización— para obtener andamios a base de biovidrio CEL2 sin dopar y dopados con ZnO, SrO y CuO, con porosidad interconectada en el rango de 60-90% y tamaño de poro entre 100-500 μm .
- Evaluar las propiedades mecánicas, específicamente la resistencia a la compresión de los andamios resultantes, obteniendo valores dentro del rango del hueso trabecular (2-12 MPa).
- Evaluar la bioactividad in vitro en SBF para la formación de la capa bioactiva de hidroxiapatita en los andamios después de 14 días de tratamiento.
- Evaluar la actividad antibacteriana, buscando una reducción ≥ 3 mm del halo inhibitor y hasta un 0 % de unidades formadoras de colonias (UFC) y del índice de formación de biopelículas (IFB) en los andamios dopados con ZnO, SrO y CuO.

CAPÍTULO 2. REVISIÓN Y DISCUSIÓN DEL ESTADO DEL ARTE

En este capítulo se abordarán los fundamentos científicos y tecnológicos relacionados con la fabricación de andamios, incluyendo los materiales utilizados, técnicas de fabricación, las propiedades químicas, físicas y los principios biológicos que guían la regeneración ósea. Asimismo, se revisan antecedentes relevantes que sustentan la viabilidad y el potencial de estos materiales para su aplicación en el campo de la medicina regenerativa.

2.1 El tejido óseo humano

El tejido óseo es un órgano vascularizado e innervado, compuesto por tejido y médula ósea además de un tejido conectivo circundante llamado periostio. Además, el hueso cumple una serie de funciones, como soporte de los músculos, protección de los órganos internos, producción de sangre, homeostasis del calcio y como amortiguación ácido/base [11].

2.1.1 Composición del tejido óseo

El hueso está compuesto de células y una matriz extracelular (MEC) bifásica. La MEC está compuesta de fases orgánicas e inorgánicas. El 30% corresponde a la fase orgánica que comprende principalmente fibras de colágeno tipo I (COL-I) (98%) y proporcionan elasticidad. Mientras que la fase inorgánica representa el 70% y está compuesta principalmente de fosfatos de calcio en forma de hidroxapatita (HA) proporcionando resistencia y rigidez [12]. La Tabla 2.1 muestra la composición del hueso.

2.1.2 Clasificación del hueso

La organización del hueso se caracteriza por ser una estructura altamente jerárquica. Los huesos humanos y de otros mamíferos generalmente se clasifican en cortical y trabecular. El hueso cortical (compacto o denso) constituye aproximadamente el 80% de la masa total del esqueleto. Dentro del hueso cortical se encuentran espacios vacíos denominados canales de

Havers o ducto osteónico, canales de Volkmann y espacios de reabsorción. El hueso denso está formado por osteonas, unidades cilíndricas formadas por laminillas, a través del cual pasan los suministros vasculares y nerviosos. Los canales de Volkmann son canales transversales que conectan los canales de Havers entre sí. Las cavidades de reabsorción son los espacios temporales creados por las células que eliminan el hueso (osteoclastos) en la etapa inicial de la remodelación ósea. En la matriz ósea también se encuentran espacios llamados lagunas donde el volumen total de lagunas y canalículos es relativamente pequeño y contribuye aproximadamente el 10% de la porosidad total. Mientras que el hueso trabecular, representa el 20% de la masa ósea y se encuentra en la metáfisis, la epífisis y la cavidad medular de los huesos largos y huesos planos, además, consiste en una estructura tridimensional de placas y varillas interconectadas conocidas como trabéculas, con espesor de 200 μm . Uno de los principales parámetros microestructurales del hueso cortical y trabecular es el porcentaje de la porosidad, que es encuentra alrededor del 5-10% para el cortical y 70-95% para el trabecular, así como de una estructura porosa interconectada (Figura 2.1) [13, 14].

Tabla 2.1 Composición del tejido óseo (% en peso) [15]

Fase inorgánica	Fase orgánica
HA $\approx$ 60	Colágeno $\approx$ 20
H ₂ O $\approx$ 9	Proteínas no colagenosas $\approx$ 3
Carbonato $\approx$ 4	Trazas: polisacáridos, lípidos y citocinas
Citrato $\approx$ 0.9	Células óseas primarias: osteoblastos, osteocitos y osteoblastos.
Na ⁺ $\approx$ 0.7	
Mg ²⁺ $\approx$ 0.5	
Cl ⁻	
Otros: K ⁺ , F ⁻ , Zn ²⁺ , Fe ²⁺ , Cu ²⁺ , Sr ²⁺ , y Pb ²⁺	

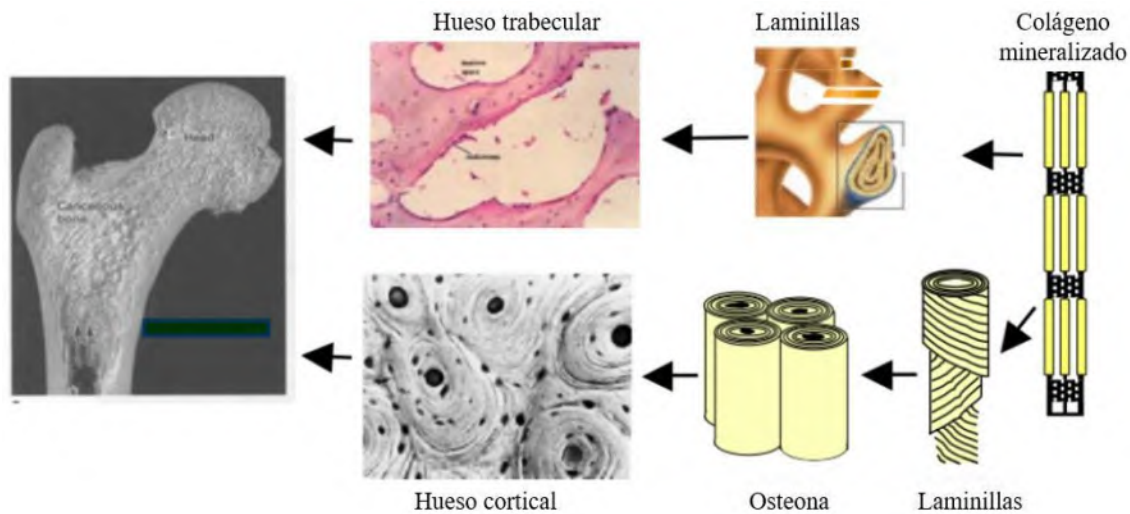


Figura 2.1 Estructura jerárquica del hueso: fibrillas de colágeno, laminillas, osteonas y trabéculas, hueso cortical y trabecular [13].

2.1.3 Células presentes en el tejido óseo

El hueso es un órgano muy complejo, que comprende una red espacial de fibras, diferentes tipos de células, nervios y vasos sanguíneos dentro de una matriz de fosfato de calcio inorgánico sostenida por colágeno y otras proteínas de soporte. Las células madre hematopoyéticas (CMH) dan lugar a linajes de glóbulos rojos y blancos, así como a plaquetas y osteoclastos, que son células multinucleadas derivadas del linaje monocito-macrófago de origen hematopoyético [16]. El microambiente óseo incluye una serie de células madre de origen mesenquimatoso, que permiten que el hueso crezca y mantenga una gran capacidad para sanar y regenerarse. El periostio y el endostio son la fuente de células osteoprogenitoras mesenquimales (CMM), a partir de las cuales se forman los osteoblastos que son responsables de la formación de hueso nuevo y producen osteoide no mineralizado y fosfatasa alcalina, una proteína de superficie que promueve la mineralización. La característica histológica particular es su intensa basofilia citoplasmática. Después de estar rodeado de osteoide, los osteoblastos cambian su actividad metabólica, residen en las lagunas y se convierten en osteocitos, éstos se interconectan a través de diminutos canalículos y protuberancias citoplasmáticas que permiten la transferencia de moléculas, nutrientes y hormonas. Otras células presentes en el tejido óseo incluyen los osteoclastos, que son células

multinucleadas formadas por la fusión y diferenciación de varios monocitos y que son responsables de la resorción ósea (Figura 2.2) [17].

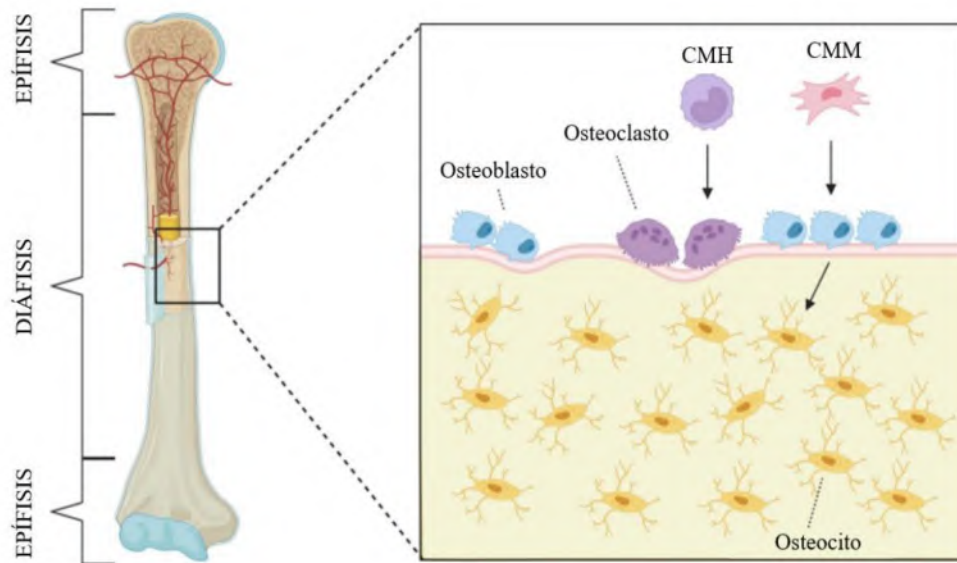


Figura 2.2 Representación esquemática de la estructura ósea [16].

2.1.4 Propiedades mecánicas del tejido óseo

Las propiedades mecánicas del tejido óseo son de vital importancia debido a las múltiples funciones que éste realiza; además, las propiedades están definidas por la dirección de las cargas aplicadas, ubicación anatómica, el tipo de hueso y la edad. La microestructura, en particular la porosidad y la densidad del hueso, juega un rol importante en las propiedades mecánicas. El hueso cortical soporta las cargas de flexión y torsión, mientras que el hueso esponjoso absorbe los efectos de cargas repetitivas. Los factores que afectan las propiedades mecánicas del hueso pueden ser intrínsecos, como la porosidad y la mineralización (que juntas determinan la densidad aparente), la arquitectura, la organización de las fibras de colágeno (el hueso laminar con su disposición paralela de fibras de colágeno es más fuerte que el hueso desorganizado), o pueden ser extrínsecos, como el daño por fatiga (que es perjudicial para las propiedades mecánicas) y la tasa de deformación. En general, los factores

que pueden afectar el entorno mecánico y, por tanto, inducir cambios en la estructura y geometría del hueso incluyen la curación de fracturas, el envejecimiento, el ejercicio y la cirugía [18, 19]. La Figura 2.3 muestra una comparación de curvas típicas de esfuerzo-deformación del hueso trabecular y cortical. Las diferencias morfológicas entre hueso cortical y trabecular producen importantes implicaciones biomecánicas. El hueso cortical posee un módulo elástico mayor, donde se aprecia una mayor pendiente en la región elástica de la curva esfuerzo de compresión-deformación. Esto indica que es capaz de soportar un alto grado de carga por unidad de superficie con un bajo índice de deformación, lo que le confiere una gran rigidez. Sin embargo, el hueso trabecular presenta un módulo elástico (Young) menor, que describe un comportamiento similar a la de un material dúctil mostrado en la curva esfuerzo de compresión-deformación, donde se aprecia un menor esfuerzo de fluencia y de fractura, pero con un mayor índice de deformación a diferencia de las propiedades mecánicas del hueso cortical, lo cual señala que presenta mayor flexibilidad. La Tabla 2.2 muestra los valores de las propiedades mecánicas del hueso cortical y trabecular [20].

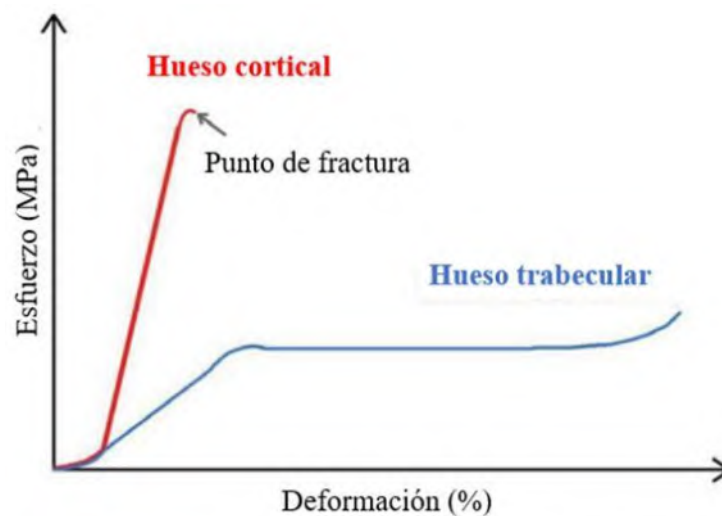


Figura 2.3 Comparación de curvas típicas de esfuerzo de compresión-deformación del hueso trabecular y cortical [17, 19].

Tabla 2.2 Propiedades mecánicas del hueso trabecular y cortical [17, 19]

Propiedades mecánicas	Tipo de hueso	
	Trabecular	Cortical
Resistencia a la compresión [MPa]	0.1-16	130-200
Resistencia a la flexión [MPa]	10-20	135-193
Resistencia a la tracción [MPa]	1-5	50-151
Modulo elástico [GPa]	0.1-5	10-20
Tenacidad a la fractura [MPa m ^{1/2}]	0.1-0.8	2-12
Porosidad [%]	50-90	5-10

2.2 Patología ósea

Los trastornos óseos constituyen las causas más comunes de dolor intenso a largo plazo y discapacidad física. Pueden ser el resultado de varias afecciones, incluidos tumores, trastornos genéticos, traumatismos, trastornos relacionados con la edad y enfermedades autoinmunes, entre otras. En particular, las alteraciones en el acoplamiento entre la resorción y la formación ósea durante el ciclo de remodelación ósea conducen a la pérdida de masa y compromete la integridad del esqueleto [12, 21].

La *osteoporosis* es una enfermedad que se caracteriza por una disminución de la densidad ósea que da lugar a la disminución en la resistencia mecánica del hueso ocasionando la fractura. También es el desequilibrio entre la actividad de los osteoblastos, formadores de hueso, y los osteoclastos, que reabsorben el hueso, y se acompaña de un aumento de la adipogénesis en la médula ósea [1]. Se pueden distinguir tres tipos diferentes de osteoporosis: La osteoporosis primaria incluye variedades seniles y posmenopáusicas, ambas relacionadas con la pérdida gradual natural de masa ósea. En la posmenopausia, los estrógenos son responsables de inhibir la resorción ósea. La osteoporosis secundaria ocurre en pacientes con enfermedades crónicas que provocan pérdida de masa ósea, como deficiencias nutricionales, anorexia, alcoholismo y enfermedad hepática crónica. La osteoporosis idiopática ocurre en adultos jóvenes o niños sin anomalías endocrinas o factores de riesgo [22].

La *diabetes* tipo 1 (DT1) y 2(DT2) también causa fragilidad en los huesos lo que conduce a un riesgo significativamente mayor de sufrir una fractura después de un traumatismo mínimo. Además, la cicatrización deficiente de las fracturas y la hospitalización prolongada después de una fractura conducen a la pérdida de la capacidad funcional y la independencia, así como a un aumento de la mortalidad posterior a la fractura [16].

La *enfermedad de Paget* es una enfermedad metabólica ósea de etiología controvertida. Se ha demostrado que los factores genéticos afectan el desarrollo de Paget, específicamente las mutaciones que afectan el RANK, OPG y el sequestosoma 1. Los pacientes de Paget muestran una mayor actividad metabólica ósea y un desequilibrio entre la formación y la resorción ósea. La fosfatasa alcalina sérica constituye un marcador de formación ósea que permite el diagnóstico y seguimiento de los pacientes. El dolor óseo, la osteoartritis, las deformidades, las fracturas y la hipercalcemia son complicaciones de la enfermedad de Paget [23].

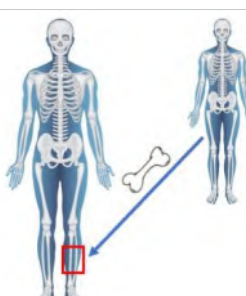
La *metástasis ósea* constituye una consecuencia frecuente de muchos cánceres y normalmente indica un pronóstico a corto plazo en pacientes con cáncer. De hecho, los pacientes con metástasis ósea tienen una mayor tasa de mortalidad y sufren dolor y complicaciones clínicas como fracturas, compresión de la médula espinal e hipercalcemia, que reducen gravemente la calidad de vida. Se clasifican en osteolíticas, osteoblásticas o mixtas, según la interferencia con el ciclo de remodelación ósea. La metástasis osteolítica está presente en la gran mayoría de los cánceres de hueso, destruyendo el hueso normal mediada principalmente por osteoclastos, el péptido relacionado con la hormona paratiroidea (PTHrP) y RANKL. La metástasis osteoblástica se caracteriza por el depósito de hueso nuevo y ocurre en el cáncer de próstata y el linfoma de Hodgkin [24, 25].

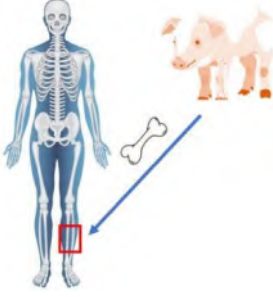
El *estilo de vida* y la *actividad física* son factores clave en la salud del tejido óseo, ya que un estilo de vida inadecuado puede contribuir al debilitamiento de la estructura ósea y aumentar el riesgo de lesiones. Las lesiones se encuentran entre las más comunes en el cuerpo humano y afectan la calidad de vida de millones de personas en todo el mundo. Sin embargo, mantener un estilo de vida saludable es un factor externo determinante en el desarrollo de la masa ósea, tanto durante el crecimiento como en la edad adulta, ayudando a la formación de un esqueleto adulto fuerte [26, 27].

2.3 Técnicas de regeneración ósea

Las enfermedades óseas representan la mitad de las enfermedades crónicas en personas mayores de 50 años, que siguen siendo un desafío clínico importante. Aunque los huesos tienen cierta capacidad de auto regeneración, en algunos casos ésto no puede ser posible cuando los defectos superan el tamaño crítico, es decir, aquellas pérdidas de tejido óseo que el organismo no es capaz de curar por sí mismo. Los defectos o lesiones óseas mayores al tamaño crítico, causados por la vejez, accidentes de tráfico, fracturas pseudoartrosis, resección de tumores óseos, etc., son problemas graves en ortopedia y traen grandes daños a la salud y la calidad de vida [15]. Por tal motivo y con la finalidad de ayudar a la reparación del tejido dañado existen técnicas que pueden facilitar el proceso de curación. La Tabla 2.3 presenta las diferentes estrategias de regeneración ósea.

Tabla 2.3 Estrategias de regeneración ósea [28]

Técnicas de reparación de tejido dañado	
	<i>Autoinjerto:</i> tejido tomado del mismo individuo, capaz de proporcionar una matriz con células osteogénicas y factores osteoinductivos, sin rechazo inmunológico. Además, conservan las mismas propiedades de regeneración y remodelación del hueso vivo del huésped. Sin embargo, su uso es limitado debido al dolor crónico, infecciones, cicatrices y debilitamiento del hueso donante ocasionando fracturas. Además, existe una alta morbilidad asociada con este procedimiento, ya que se necesita más de una cirugía.
	<i>Alloinjertos:</i> tejido tomado de otro individuo de la misma especie, con capacidad osteoinductiva y osteoconductora. El riesgo de transmisión de enfermedades es significativo. Limitaciones como riesgo de rechazo inmunológico e infección, aunque requieren menos procedimientos que los autoinjertos, lo que minimiza el tiempo quirúrgico, estos injertos se integran más lentamente y en un grado menor que los autoinjertos.

	<i>Xenoinjertos:</i> tejido tomado de otro tipo de especie, son fácilmente disponibles, menos costosos aproximadamente una décima parte del precio de los aloinjertos disponibles comercialmente. Debido a los extensos procesos de esterilización, su vida útil suele ser larga. Sin embargo, presentan varios desafíos, como el riesgo de transmisión de enfermedades y un mayor riesgo de respuesta inmune del tejido huésped en comparación con los aloinjertos. Además, requieren un procesamiento estéril intensivo, lo que puede disminuir sus propiedades osteoinductivas.
---	---

Debido a las múltiples desventajas que ofrecen los injertos óseos naturales como la escasez de tejido circundante, la morbilidad del sitio donante y la incompatibilidad, estos tratamientos son limitados por lo que se requieren nuevas estrategias para ayudar a la reparación de tejido dañado. De aquí surgen los injertos óseos sintéticos y la ingeniería de tejidos.

2.3.1 Injertos naturales versus injertos sintéticos y la ingeniería de tejidos

En el ámbito clínico, la regeneración ósea es la curación de fracturas. Existen dos tipos de consolidación de fracturas: la consolidación primaria (o directa) requiere una fijación estable y una reducción anatómica correcta de los extremos de la fractura. La consolidación secundaria (o indirecta) consiste en la curación ósea tanto endocondral como intramembranosa; no requiere reducción anatómica ni condiciones estables. Sin embargo, la renovación ósea a veces se ve afectada, por fracturas de unión tardía y no unión que ocurre cuando hay una fijación inestable. En algunos casos la demanda regenerativa está más allá del potencial normal de autocuración, como defectos óseos de tamaño crítico derivados de cirugías ortopédicas o buco-maxilofaciales después de traumatismos, infecciones y resecciones tumorales. Existen dos opciones de andamiaje disponibles para tratar defectos óseos: injertos óseos naturales o sintéticos. Los injertos naturales se pueden clasificar por su origen en autoinjertos, aloinjertos o xenoinjertos descritos previamente. Los injertos óseos sintéticos se clasifican como biomateriales, sustancias diseñadas para interactuar con

sistemas vivos y destinadas al reemplazo de tejidos, que pueden clasificarse según su composición en metales, cerámicos, polímeros y compuestos (Figura 2.4)[29].

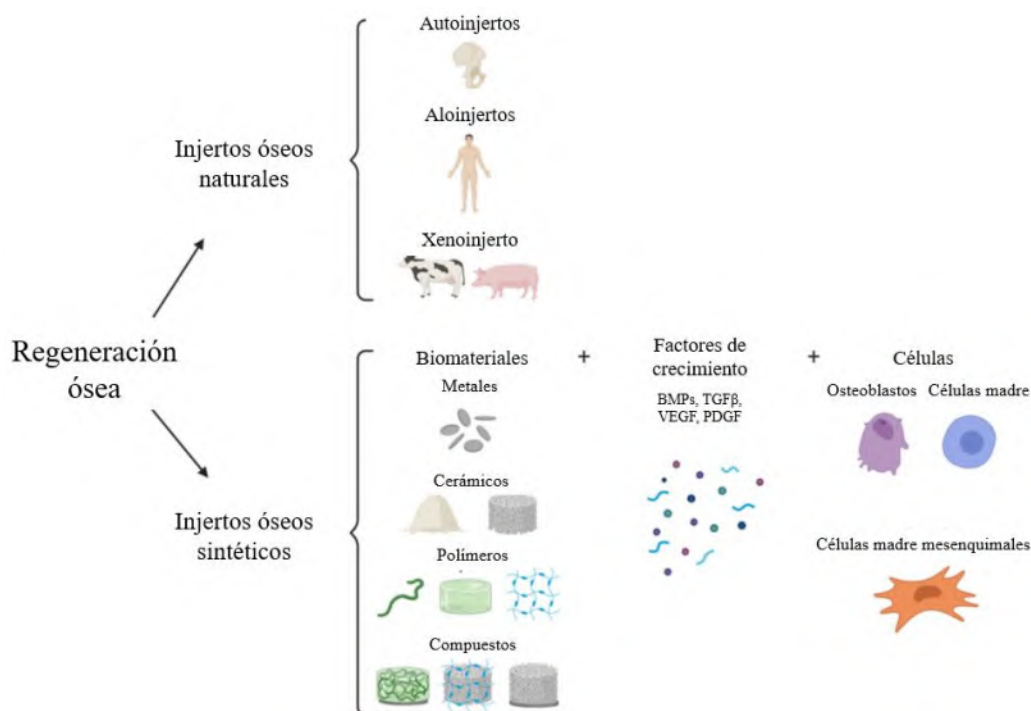


Figura 2.4 Esquema representativo de las opciones disponibles para la regeneración del tejido óseo [29].

2.4 Ingeniería de tejidos

La ingeniería de tejidos es una opción para regenerar y reparar tejido dañado o enfermo ya que tiene como objetivo desarrollar nuevos tejidos biofuncionales. Esto implica la combinación de un soporte sintético, factores de crecimiento y células, para el desarrollo de sustitutos biológicos con propiedades biológicas, fisicoquímicas y mecánicas funcionalmente iguales a un tejido. Para la fabricación de las plantillas biofuncionales se pueden aplicar materiales como polímeros, cerámicos, metales o combinaciones de éstos en diversas formas, como membranas y andamios tridimensionales (3D) [30]. Por lo que las estrategias de ingeniería de tejido óseo son prometedoras para reemplazar el tejido óseo dañado o enfermo,

en comparación con las estrategias de injerto óseo naturales. La Figura 2.5 muestra una representación gráfica de la fabricación de andamios para su uso como injerto óseo.

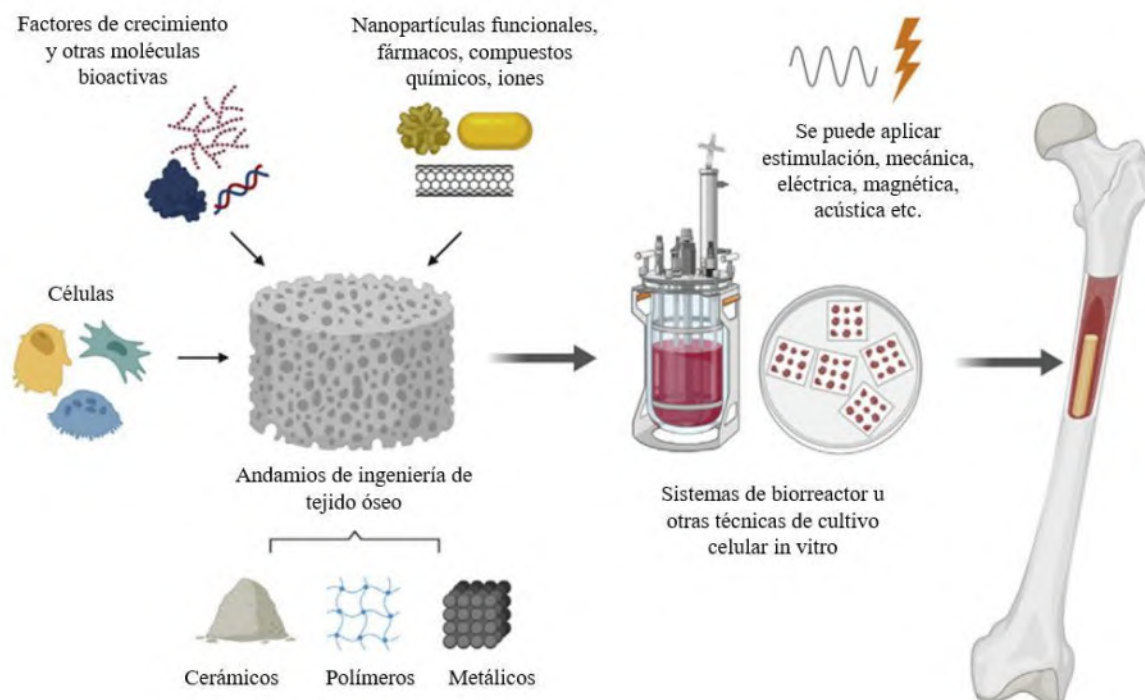


Figura 2.5 Conceptos básicos de la ingeniería del tejido óseo [31].

2.5 Andamios porosos

Son biomateriales tridimensionales (3D) porosos, fibrosos o permeables destinados a permitir el transporte de líquidos y gases corporales, promueven la interacción celular, la viabilidad y la deposición de matriz extracelular (MEC) con mínima inflamación y toxicidad mientras se biodegradan a una cierta velocidad controlada y pueden utilizarse como plantilla para la reconstrucción de defectos en nervios, músculos, huesos, etc. [32]. Estos andamios pueden fabricarse con una microestructura y propiedades fisicoquímicas y mecánicas similares a las del tejido óseo para ser utilizados en la regeneración ósea.

2.5.1 Requisitos de los andamios para ingeniería de tejido óseo

Debido a la demanda en el uso de materiales para la reparación de tejido dañado, los andamios deben ser fabricados con materiales que promuevan la regeneración sin provocar respuestas inmunes al tejido huésped. Para poder utilizar este tipo de materiales es importante considerar propiedades que lo hagan adecuado para fines de ingeniería de tejidos. El diseño de un andamio incluye requisitos mecánicos, fisicoquímicos y biológicos (Tabla 2.4).

Tabla 2.4 Requisitos de los andamios para ingeniería de tejido óseo [33, 34]

Requisitos	Descripción
Biológicos	Se incluye la no toxicidad y la biocompatibilidad permitiendo que los andamios promuevan simultáneamente la formación de nuevos tejidos mientras sufren degradación, sin interferir con otras funciones de las células.
Superficiales	Importante en la adhesión y proliferación de las células. La hidrofobicidad y hidrofiliidad influyen en gran medida en las respuestas celulares ya que las células tienden a crecer más en las superficies hidrófilas.
Porosidad y tamaño de poro	90% de porosidad, el tamaño de poro influye en la respuesta de las células, incluida la migración celular, la infiltración, el suministro de nutrientes y oxígeno y el intercambio de productos de desecho, los poros de 200-400 μm para la formación de tejido óseo, de 50-200 μm adecuados para el crecimiento de células del músculo liso, de 10-44 y 44-75 μm permiten el alojamiento sólo de tejido fibroso, superiores a 100 μm permiten el crecimiento y la vascularización del tejido, los microporos (<2 nm) y mesoporos (2 a 50 nm) promueven la adhesión celular y la reabsorción a tasas controlables.
Biodegradabilidad	La tasa de degradación debe ajustarse adecuadamente a la tasa de crecimiento del tejido, de tal manera que cuando la lesión esté totalmente regenerada, el andamio esté totalmente degradado.

Osteoconductividad	Refleja la capacidad del biomaterial para estimular la adhesión celular, la proliferación y la formación de la matriz extracelular ósea (ECM) por los osteoblastos, lo que favorece el crecimiento óseo.
Mecánicos	Deben tener suficiente resistencia mecánica para soportar las presiones hidrostáticas y mantener los espacios necesarios para el crecimiento celular y la producción de matriz, debido a que el hueso siempre está bajo tensión continua, lo ideal es que las propiedades mecánicas coincidan con las del hueso vivo.

Wang y col. [35] fabricaron y estudiaron andamios sin canales, de un solo canal y múltiples canales de β -fosfato tricálcico (β -TCP) (Figura 2.6a) con la finalidad de descubrir la funcionalidad de la estructura para la difusión de nutrientes y el proceso de angiogénesis, las células utilizadas fueron las células endoteliales vasculares umbilicales humanas HUVEC. Entre los estudios realizados fue el transporte de fluidos con un colorante comestible que pasa de un lado a otro en función del tiempo, infiltración y migración, y proliferación celular. En el estudio de transporte de fluidos, se observó que los andamios sin canales tardaron más en permitir el paso del fluido (8 min), en comparación con los andamios con un canal, que lo hicieron en menos de 4 min. Sin embargo, los andamios con múltiples canales transportaron fluidos en poco más de 5 min, siendo aún más efectivos para este propósito. En cuanto a los estudios de infiltración y migración celular mediante la tinción con DAPI, los resultados mostraron que los tres tipos de andamios permiten la infiltración y migración celular, aunque los andamios con múltiples canales demostraron ser los más eficientes. En el caso de la proliferación celular utilizando células endoteliales HUVEC, los andamios con múltiples canales facilitaron significativamente la proliferación en comparación con aquellos sin canales y con un solo canal (Figura 2.6b-d). Por lo que se concluye que una estructura porosa interconectada y abierta proporcionar espacio para la proliferación de las células y los vasos sanguíneos recién formados además de permitir una buena difusión de nutrientes.

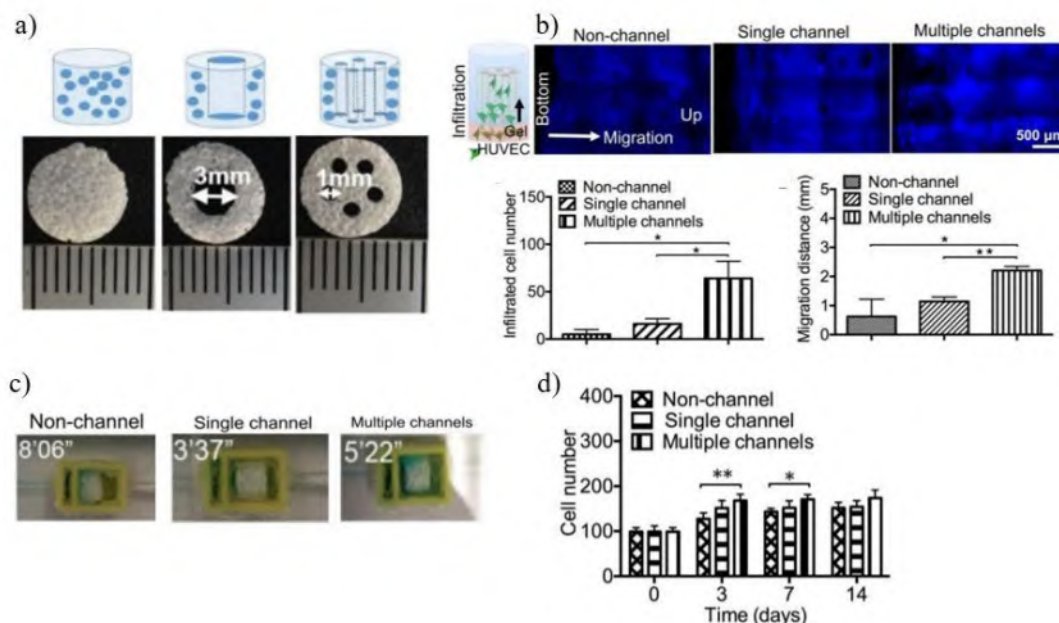


Figura 2.6 a) Ilustración esquemática y morfologías digitales de tres tipos de estructura de andamios, b) filtración y migración de HUVEC *in vitro*, tinción DAPI y análisis cuantitativo del número de células migradas y la distancia de migración, c) tiempo de transferencia de fluido de un lado del andamio al otro lado y d) proliferación de HUVEC [35].

Li y col. [36] fabricaron andamios de celulosa con biovidrio 45S5 utilizando diferentes proporciones (celulosa/biovidrio BG = 5:1, 2:1 y 1:1 en peso) para ser utilizados en ingeniería de tejido óseo. A partir del análisis por MEB, los autores observaron una estructura porosa e interconectada con espacios entre fibras de ~200 μm para todos los andamios, en el caso de los andamios sin BG se observaron tamaños de poro más pequeños, a diferencia de los andamios con BG. Una vez obtenido los andamios realizaron estudios bioactivos en SBF por 3 días, donde observaron que la formación de hidroxiapatita para todas las composiciones, pero con una relación de Ca/P favorable en los andamios 2CELL/1BG con un valor de 1.34 cercano al valor 1.67 original de la hidroxiapatita (Figura 2.7a). Mientras que los estudios con células mostraron que los andamios 2CELL-1BG estimularon una viabilidad celular mucho mayor a diferencia de los otros, los autores concluyen que la viabilidad celular es debido a la buena relación Ca/P de la capa de hidroxiapatita formada por la inmersión en SBF en la superficie los andamios con las 4 formulaciones (Figura 2.7b). Por otro lado, el análisis

de las propiedades mecánicas mostró que una mayor cantidad de BG en los andamios de celulosa mejora la resistencia a la compresión debido a que su adición provee una mejor estabilidad a la estructura, Sin embargo, en los ensayos de compresión una mayor cantidad de BG afecta esta propiedad (Figura 2.7c).

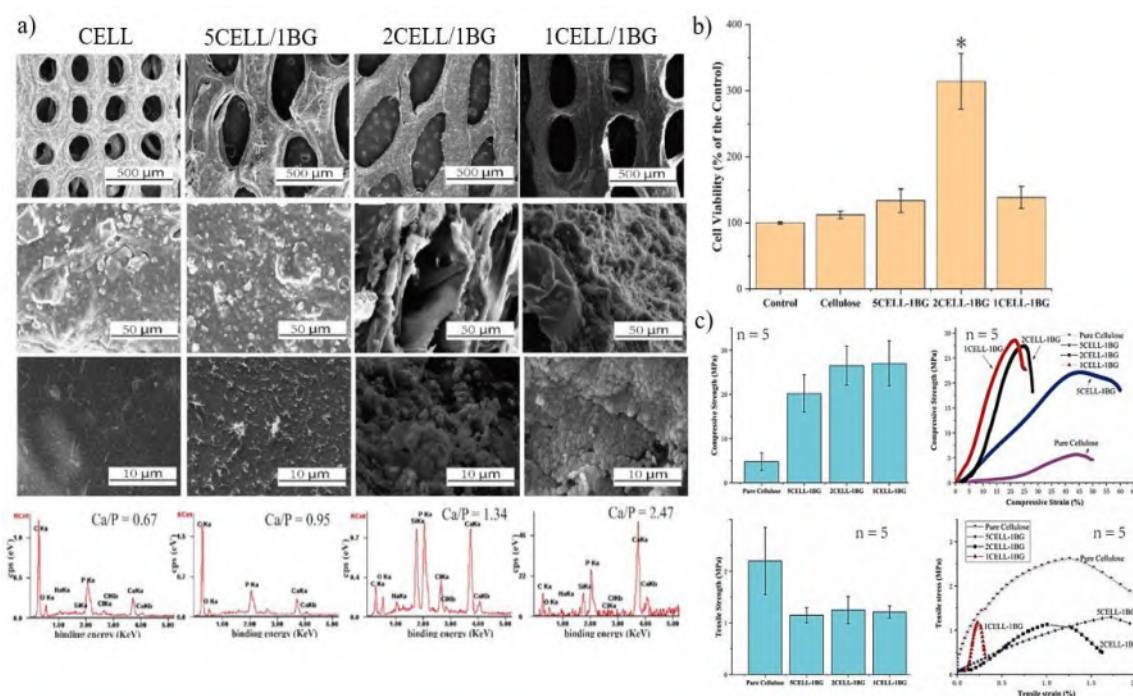


Figura 2.7 a) Imágenes por MEB de los andamios de celulosa a diferentes magnificaciones, b) ensayo CCK8 de los andamios impresos en 3D de celulosa pura y compuestos y c) resultados de los estudios de resistencia a la compresión y tracción [36].

Zamani y col. [37] fabricaron andamios compuestos de alginato con biovidrio (BG) que contenía partículas de ZnO y MgO ($60\text{SiO}_2\text{-}26\text{CaO-}4\text{P}_2\text{O}_5\text{-}5\text{ZnO-}5\text{MgO}$, % mol) mediante el método de liofilización. De los resultados obtenidos por MEB (Figura 2.8), se observa una amplia distribución de tamaño de poro de tipo bimodal para los andamios de alginato y los compuestos, con tamaños promedio de 75 y 275 μm. La amplia distribución de tamaños de poro mejoró la función de las células y la regeneración ósea, mientras que los poros ultrafinos de escala nanométrica permitieron la unión celular y la adhesión de proteínas. Por lo que se

concluye que el tamaño de los poros se vió afectado por el aumento de la proporción de biovidrio en relación con el alginato. Dicha disminución es por la presencia de Zn y Mg, que tienen una mayor energía de enlace con respecto al Ca presente en el biovidrio.

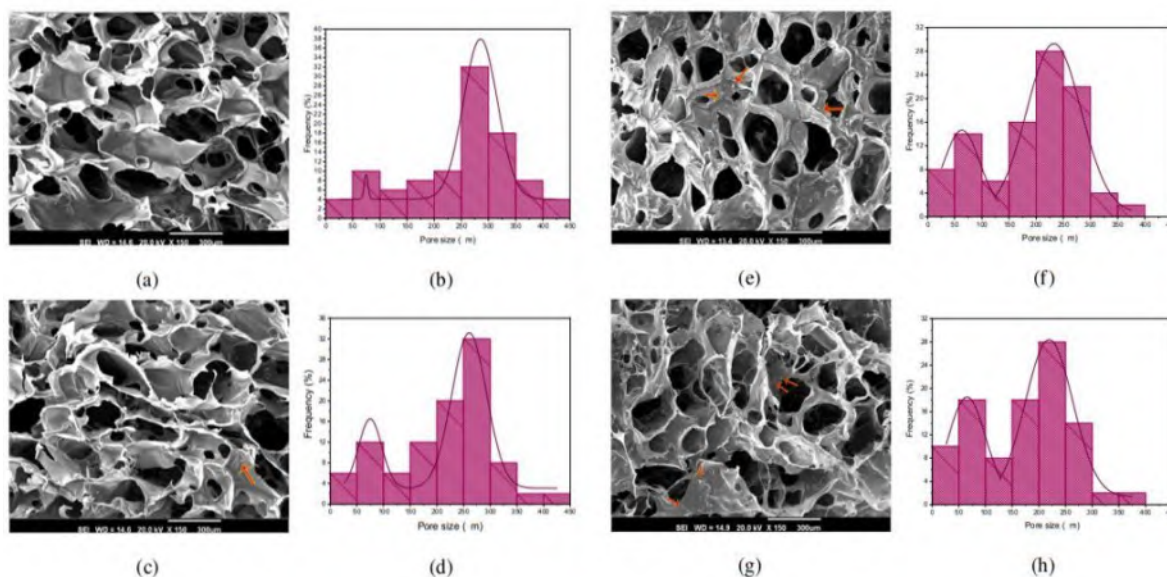


Figura 2.8 Micrografías de MEB e histogramas de distribución de tamaño de poro correspondientes: a, b) andamio de alginato, c, d) andamio Alg-0.3BG, e, f) andamio Alg-1BG y g, h) andamio Alg-1.5BG [37].

2.6 Métodos de fabricación

La fabricación de andamios con propiedades fisicoquímicas, mecánicas y biológicas adecuadas representa uno de los principales desafíos en la ingeniería de tejidos. Por ello, es fundamental explorar alternativas para producir andamios con estructuras jerárquicas y propiedades que emulen las del tejido dañado. Aunque existen materiales que cumplen con estas características y muestran un gran potencial en ensayos *in vitro*, muchos de ellos no logran el mismo éxito *in vivo* debido a un desequilibrio entre la resistencia mecánica y la porosidad de la estructura, factores que están influenciados por el proceso de fabricación. La Tabla 2.5 muestra algunos métodos de fabricación de andamios para su aplicación en la ingeniería de tejidos.

Tabla 2.5 Métodos de fabricación de andamios

Método	Descripción	Ref.
Sol-gel	Capacidad de producir andamios con estructuras de porosas y composiciones que requieren bajas temperaturas de densificación. Algunos de los inconvenientes son los altos costos de los precursores, dificultad de producir piezas densas y tiempos prolongados.	[38]
Impresión 3D	Es una tecnología prometedora para una variedad de aplicaciones, las características como: porosidad, tamaños e interconectividad de los poros son prediseñadas en un software para obtener valores según sea su aplicación. Entre sus desventajas es el uso de un software para su diseño y altos costos de producción.	[39]
Réplica de espuma polimérica	Implica la impregnación de la esponja polimérica con una suspensión de polvos cerámicos y un tratamiento térmico posterior, obteniendo estructuras con tamaños de poros controlados y alta interconexión. Entre su desventaja es que se debe mantener la viscosidad de la suspensión para evitar el colapso de la estructura durante el tratamiento térmico.	[40]
Colada en gel	Una técnica eficiente para la fabricación de andamios porosos mediante la incorporación de aire, bajo agitación mecánica intensiva, con la ayuda de un surfactante. Este método permite obtener espumas con porosidad superior al 90% y con una amplia distribución de poros, no requiere control atmosférico, y es de bajo costo. Una desventaja es que no se puede controlar la porosidad.	[5]

Spirandeli y col. [41] fabricaron andamios porosos de β -TCP con incorporación de biovidrio 45S5 para mejorar la bioactividad. La fabricación de andamios de β -TCP se realizó por el método de colada en gel, seguida por la inmersión en la solución sol-gel de biovidrio 45S5 y posterior sinterización a 1200 °C por 2 h. Los resultados por MEB (Figura 2.9a-f) mostraron, en el caso de los andamios β -TCP (Figura 2.9a) una estructura bimodal de macroporos en el rango de 100-500 μm y microporos ($<1 \mu\text{m}$) con una buena interconexión y distribución uniforme. Mientras que los andamios impregnados con biovidrio 45S5 (Figura 2.9b y e) mostraron la deposición de productos que surgen de la solución sol gel sobre la superficie de

los poros, formando placas de xerogel 45S5. Sin embargo, para los andamios β -TCP/45S5 después del tratamiento térmico a 1200 °C (Figura 2.9c y f) ya no se observaron las placas. Los andamios tanto de β -TCP y β -TCP/45S5 presentaron valores de 72.4 ± 0.9 y 72.9 ± 1.3 % porosidad y 2.98 (2.40-3.71) y 3.29 (2.68-4.05) MPa de resistencia a la compresión, respectivamente, valores similares al hueso trabecular. Además, observaron que los andamios de β -TCP disminuyeron en resistencia debido a la sinterización a 1200°C que condujo a una transformación parcial de β -TCP a α -TCP, ya que dicha fase presenta microfisuras en la matriz de β -TCP debido a la expansión volumétrica de la celda unitaria y diferencias de densidad entre las fases β - y α -TCP.

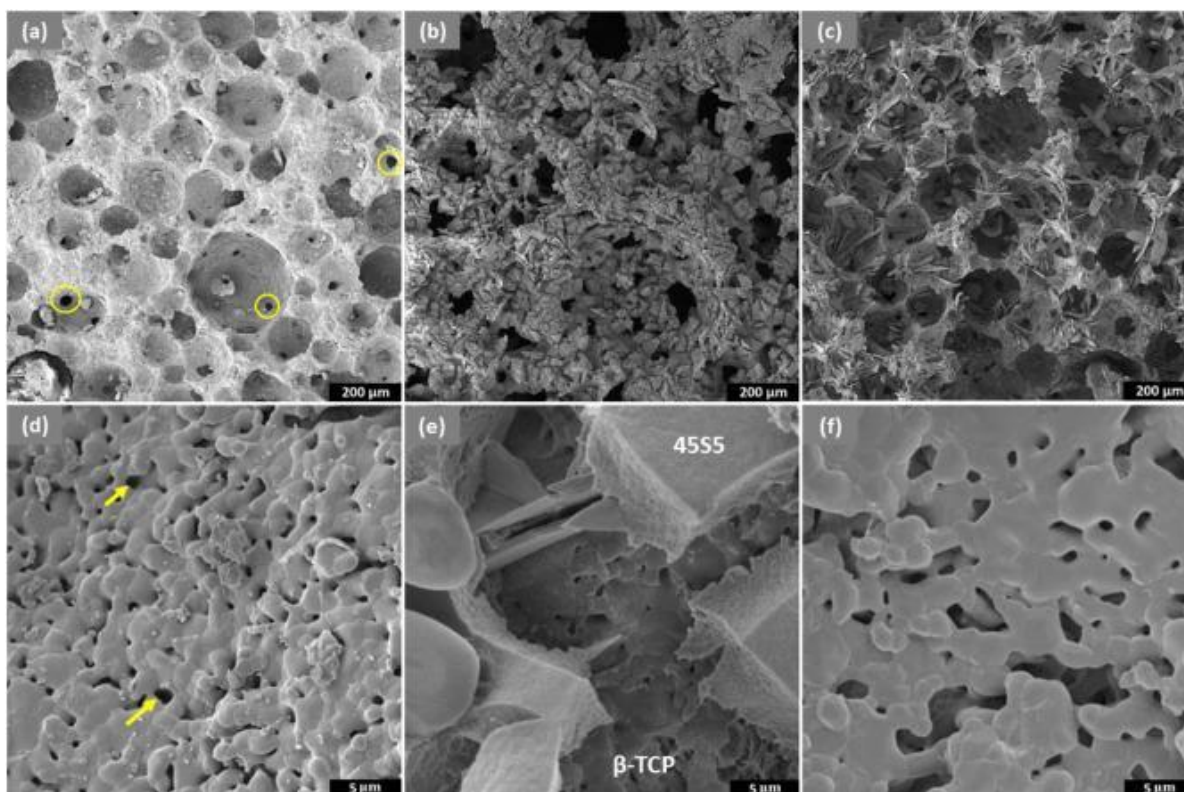


Figura 2.9 Imágenes de MEB de los andamios: a, d) β -TCP, b, e) β -TCP después de la impregnación al vacío con solución sol gel de biovidrio 45S5, c, f) β -TCP/45S5 después del tratamiento térmico a 1200 °C [41].

Gui y col. [42] fabricaron andamios de hidroxiapatita (HA) mediante impresión 3D para la regeneración de hueso craneal. Los andamios se sometieron inicialmente a un sinterizado a 600°C por 10 horas para eliminar los polímeros orgánicos. Luego, los andamios fueron sinterizados a diferentes temperaturas 1050, 1150 y 1250 °C durante 2 horas, para aumentar la resistencia mecánica. A través de análisis MEB (Figura 2.10a), los autores observaron que los andamios tratados a 1150 °C presentaban una estructura porosa de aproximadamente 65%, con poros de ~ 400 μm y microporos de ~ 1-5 μm . De la misma manera, también analizaron la influencia de la porosidad y el tamaño de poro en las propiedades mecánicas (Figura 2.10b). Los andamios sinterizados a 1050 °C presentaron una mayor porosidad (72 %) y una distribución amplia de tamaño de poro, mientras que los sinterizados a 1250 °C mostraron una porosidad reducida de 62 % y una disminución significativa en el tamaño de los poros. Concluyeron que tanto la porosidad como el tamaño de los poros influyen en las propiedades mecánicas de los andamios: una mayor porosidad reduce la resistencia mecánica, mientras que una menor porosidad mejora la resistencia, pero puede afectar negativamente la osteoconducción.

Baino y col. [43] fabricaron andamios en base a dióxido de silicio, fluorapatita y wollastonita mediante la técnica de réplica de espuma polimérica. Los andamios resultantes fueron sinterizados a 800 °C durante 3 h. A partir del análisis por MEB, Figura 2.11, se observó una microestructura porosa interconectada y con tamaños de poros superiores a 100 μm , una estructura adecuada para facilitar la migración de células, con un valor de porosidad de 68 ± 10 %. Otro de sus estudios fue la evaluación mecánica con una resistencia a la compresión obteniendo valores de 29.7 ± 14.9 MPa y módulo elástico de 1.4 GPa. Los autores concluyen que el método de fabricación permitió la obtención de andamio con una arquitectura de poro-puntal 3D y una porosidad total que coincidía con la del hueso esponjoso, mientras que la resistencia a la compresión y el módulo elástico fueron superiores a los del tejido óseo trabecular, lo que sugiere su idoneidad para la aplicación en sitios de carga.

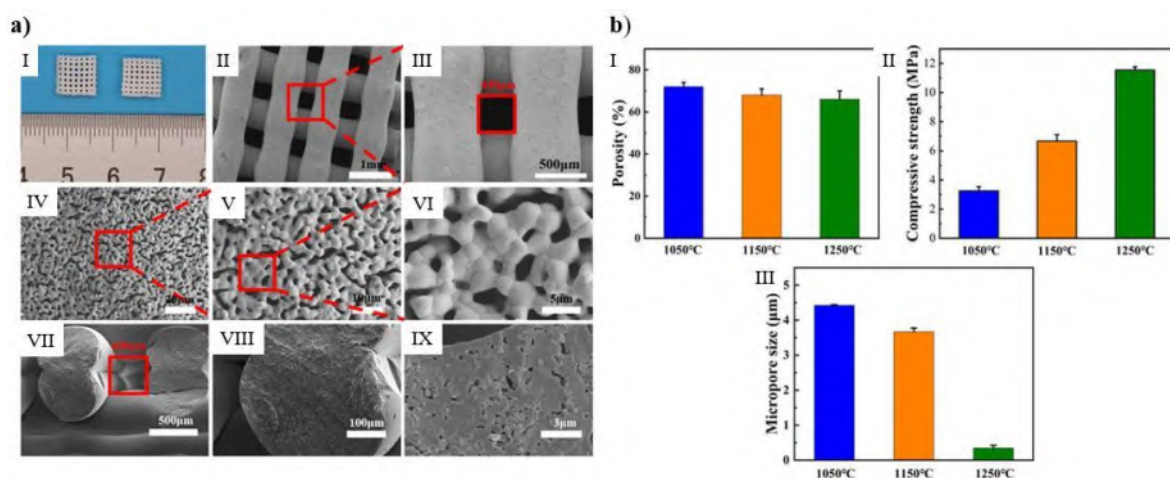


Figura 2.10 Imágenes de los andamios HA: por microscopio óptico (I–III), y por MEB, microporos secundarios (IV–VI) y sección transversal del andamio (VII–IX) y b) porosidad (I), resistencia a la compresión (II) y estadísticas del tamaño de los microporos (III) [42].

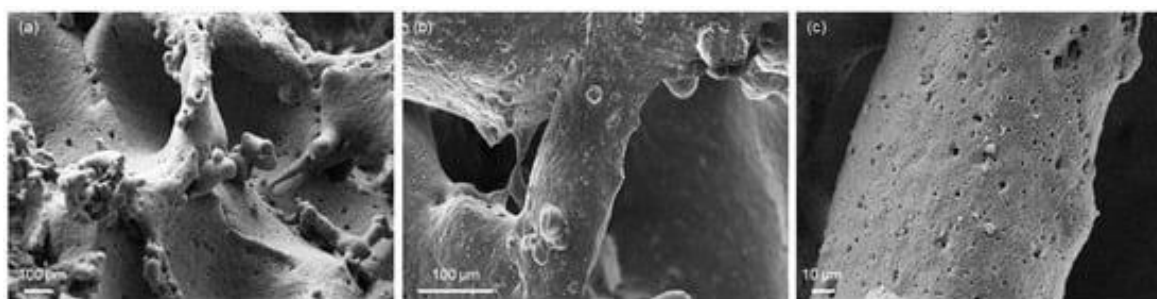


Figura 2.11 Imágenes MEB de a) arquitectura de poro-puntal 3D, b) puntal sinterizado y c) detalles de la superficie del puntal [43].

De Siqueira y col. [44] fabricaron andamios de biovidrio 45S5 altamente porosos mediante colada en gel con diferentes cantidades de agente espumante (0.1, 0.2 y 0.3%), sinterizados a 850 °C durante 2 h. Los andamios resultantes fueron analizados por MEB (Figura 2.12), donde se observó una amplia distribución de poros interconectados con un tamaño en el rango de 100-500 μm. Además de observar cómo el aumento del espumante aumenta la porosidad de los andamios, con 0.1, 0.2 y 0.3 % de espumante se obtienen valores de porosidad 70.7 ± 0.8 %, 83.2 ± 1.6 % y 86.3 ± 2.9 %, respectivamente. Los estudios de resistencia a la

compresión mostraron valores bajos. Con 0.1 % de espumante no se registraron resultados, mientras que con 0.2 % se obtuvo un valor de 1.22 ± 0.7 y con 0.3%, un valor de 0.78 ± 0.4 MPa. Por lo tanto, se concluyó que la técnica de fabricación es una opción viable para la producción de andamios, ya que permite obtener valores de porosidad y resistencia a la compresión similares a los del hueso trabecular (50-90 % porosidad y 0.8-12 MPa).

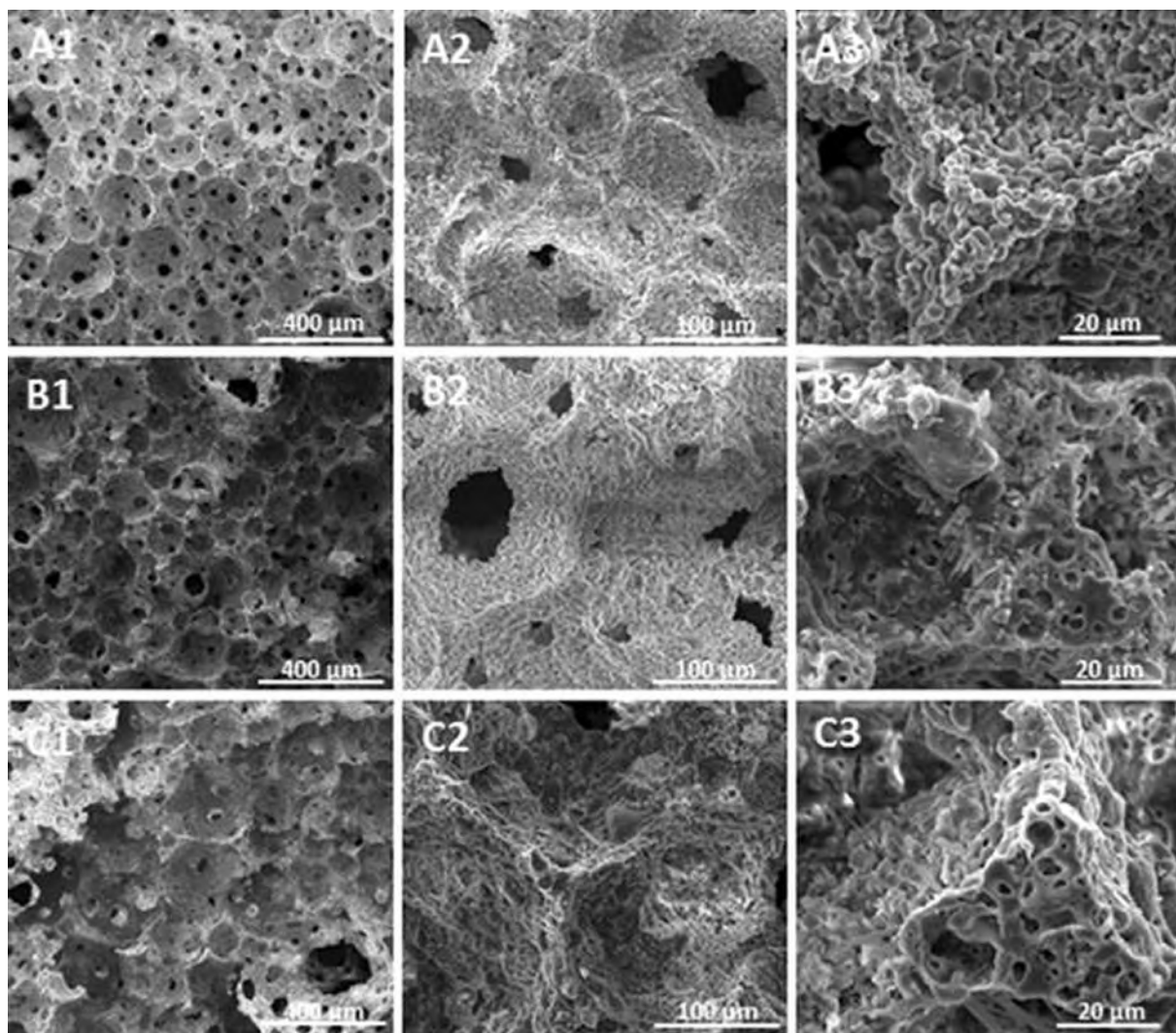


Figura 2.12 Imágenes MEB de andamios de biovidrio 45S5 con diferentes cantidades de agente espumante: con 0.1 % (A1, A2, A3), 0.2% (B1, B2, B3) y 0.3% (C1, C2, C3) sinterizados a 850 °C durante 2 h [44].

La técnica de tecnología de polvos es otro método ampliamente utilizado para la fabricación de andamios cerámicos y metálicos, especialmente en la industria, debido a que permite personalizar las composiciones de los materiales, así como sus propiedades mecánicas y geométricas, facilitando la producción masiva de implantes con características específicas [45]. Esta técnica consiste en mezclar partículas de polvos metálicos o cerámicos, los cuales se compactan y luego se sinterizan, con o sin el uso de ligantes. La sinterización puede combinarse con técnicas que emplean soportes espaciales temporales para generar poros, logrando altos niveles de porosidad y un control preciso sobre la estructura porosa de los andamios [46].

Aguilar-Reyes y col. [47] fabricaron andamios de biovidrio 45S5 mediante la técnica de tecnología de polvos combinada con el espumado de polímeros. Los andamios obtenidos fueron sometidos a un tratamiento térmico en tres etapas: primero el espumado, seguido de la pirólisis de la resina y finalmente la sinterización a 975 °C durante 1 h. El análisis por MEB reveló que los andamios presentaban una estructura porosa con porosidad abierta e interconectada (Figura 2.13a). Además, se evaluó la resistencia a la compresión, obteniendo curvas típicas de esfuerzo-deformación que mostraban el esfuerzo máximo y el comportamiento gradual del colapso de los poros (Figura 2.13b). Los resultados de porosidad, tamaño de poro y resistencia a la compresión se encuentran dentro del rango del hueso trabecular (Figura 2.13c).

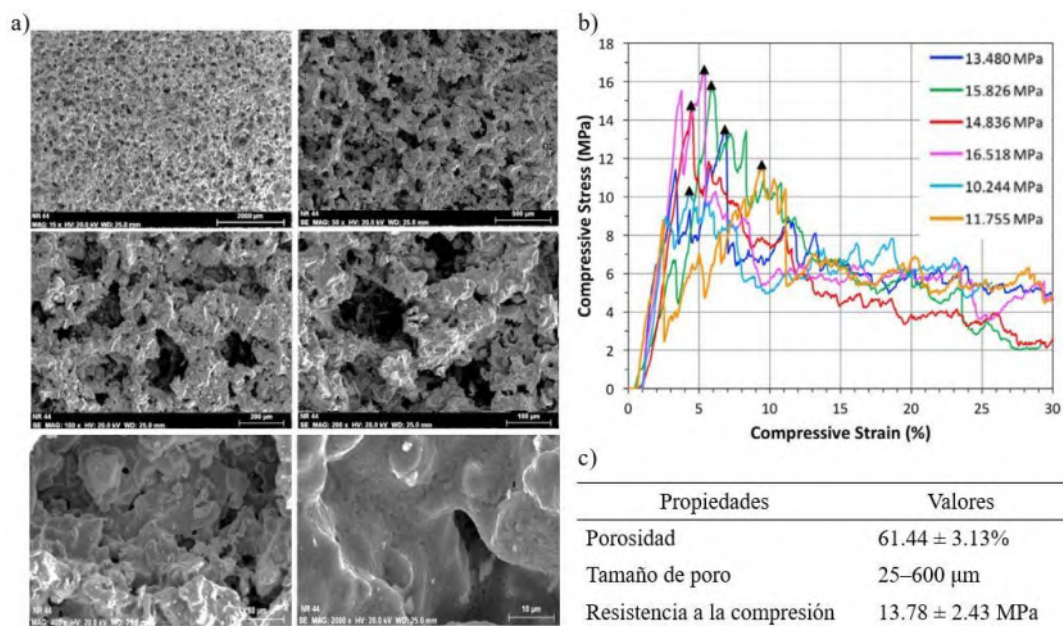


Figura 2.13 a) Imágenes por MEB a diferentes aumentos, b) curvas de esfuerzo-deformación y c) tabla de las propiedades de los andamios obtenidos [47].

Ruiz-Aguilar y col. [48] fabricaron andamios porosos de β -TCP/biovidrio a base de fosfato, que contenían diferentes cantidades de zirconia (0, 0.25, 0.5, 0.75 y 1.0 % mol) en una proporción de 80:20 (% en peso). El método de fabricación por tecnología de polvos permitió obtener una estructura con una porosidad del 50-53%, tamaños de poro en el rango de 1.41 a 303 μm y valores de resistencia a la compresión entre 0.6 y 1 MPa, con un módulo de Young de 357 a 574 MPa (Figura 2.14). Los autores concluyeron que tanto el método de fabricación como la temperatura de sinterización fueron adecuados para generar un andamio con propiedades similares a las del hueso trabecular.

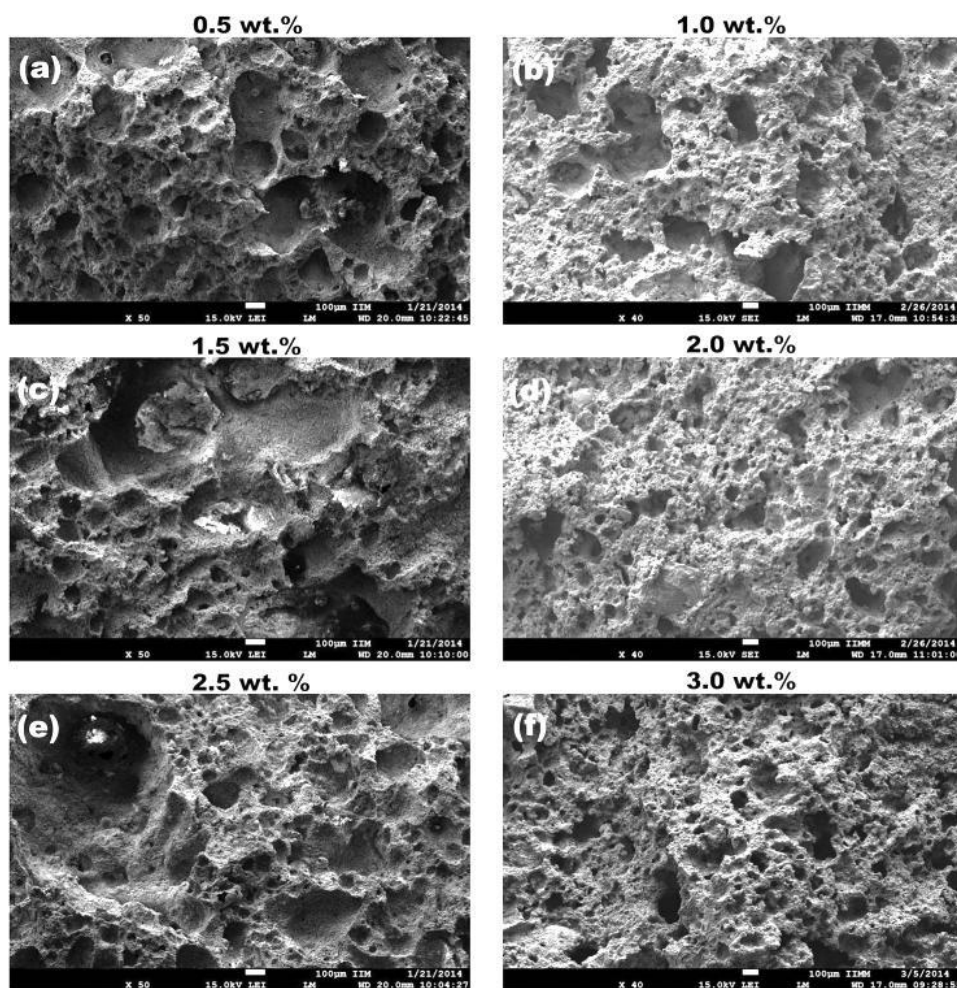


Figura 2.14 .Imágenes MEB de los andamios de biovidrio a base de β -TCP/fosfato con diversas cantidades de agente espumante [48].

2.7 Materiales disponibles para la fabricación de andamios tridimensionales

2.7.1 Metales y sus aleaciones

Los primeros metales utilizados en aplicaciones biomédicas incluyeron Fe, Mg, Zn y sus aleaciones. En la actualidad, el titanio y sus aleaciones son los biomateriales metálicos más utilizados para implantes dentales y ortopédicos, debido a su alta biocompatibilidad. Las aleaciones metálicas en general se emplean ampliamente como reemplazos en articulaciones e implantes para la fijación de fracturas, debido a su buena biocompatibilidad, resistencia a la corrosión y resistencia mecánica. Ejemplos de estos metales incluyen el acero inoxidable,

el titanio y sus aleaciones compuestas de elementos no tóxicos y hipoalergénicos, así como las aleaciones de Co-Cr [29, 49].

Ran y col. [50] fabricaron andamios tridimensionales de la aleación Ti6Al4V con diferentes tamaños de poro (500, 700 y 900 μm) mediante la técnica de fusión selectiva por láser (SLM), orientados a potenciales aplicaciones ortopédicas. En la Figura 2.15a se muestran los andamios obtenidos por SLM; además, mediante análisis EDS (Figura 2.15b), se evaluó la composición elemental de Ti, Al y V, encontrando porcentajes en peso cercanos a los de la aleación estándar Ti6Al4V. A través de un análisis MEB (Figura 2.15c) se observó la microestructura de los andamios, caracterizada por poros de diseños de 500, 700 y 900 μm . Los tamaños de poro reales medidos fueron de 401 ± 26 , 607 ± 24 y 801 ± 33 μm , con valores de resistencia a la compresión de 493.17 ± 16.5 , 334.7 ± 16.3 y 252.1 ± 17.4 MPa y módulos de Young de 7.56 ± 0.25 , 5.97 ± 0.19 y 5.04 ± 0.15 GPa, respectivamente.

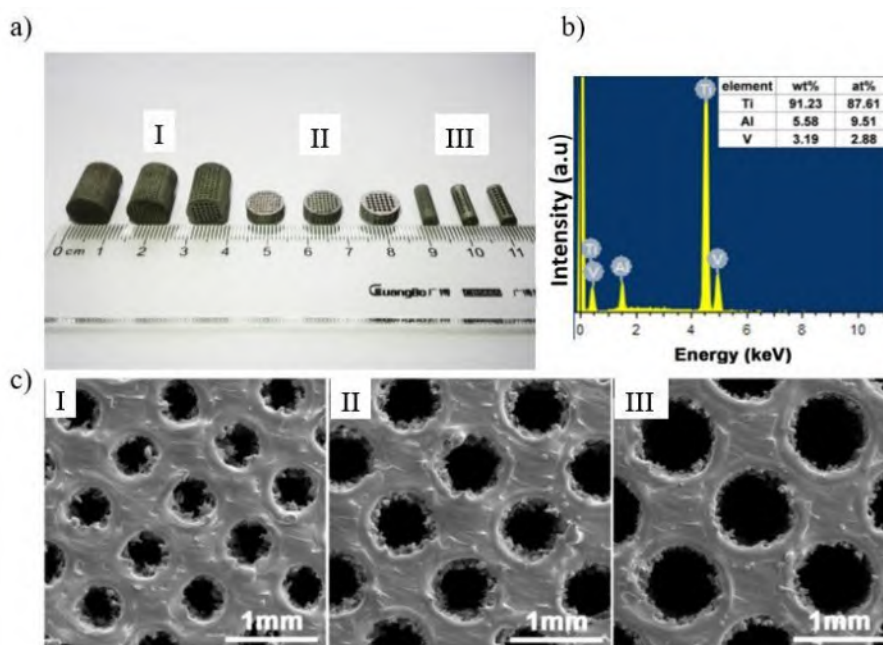


Figura 2.15 a) Macrografías de las muestras porosas de Ti6Al4V impresas en 3D, b) análisis EDS y c) imágenes MEB de las muestras con diferentes tamaños de poro 500 (I), 700 (II) y 900 (III) [50].

Bartolomeu y col. [51] fabricaron andamios de NiTi mediante la técnica de fusión selectiva por láser (SLM), explorando distintos diseños con variaciones en el porcentaje de porosidad y tamaños de poro. Mediante análisis MEB, observaron que los andamios basados en diseño CAD presentaban una estructura porosa con una red interconectada (Figura 2.16a). Además, compararon los datos de diseño de los andamios con los valores reales obtenidos, encontrando una variación significativa en el tamaño de la celda, el tamaño de poro y el porcentaje de porosidad (Figura 2.16b). Los resultados de resistencia a la compresión mostraron curvas de esfuerzo-deformación que indicaron que, a menor porcentaje de porosidad, correspondía una mayor resistencia y un módulo de Young más elevado (Figura 2.16c).

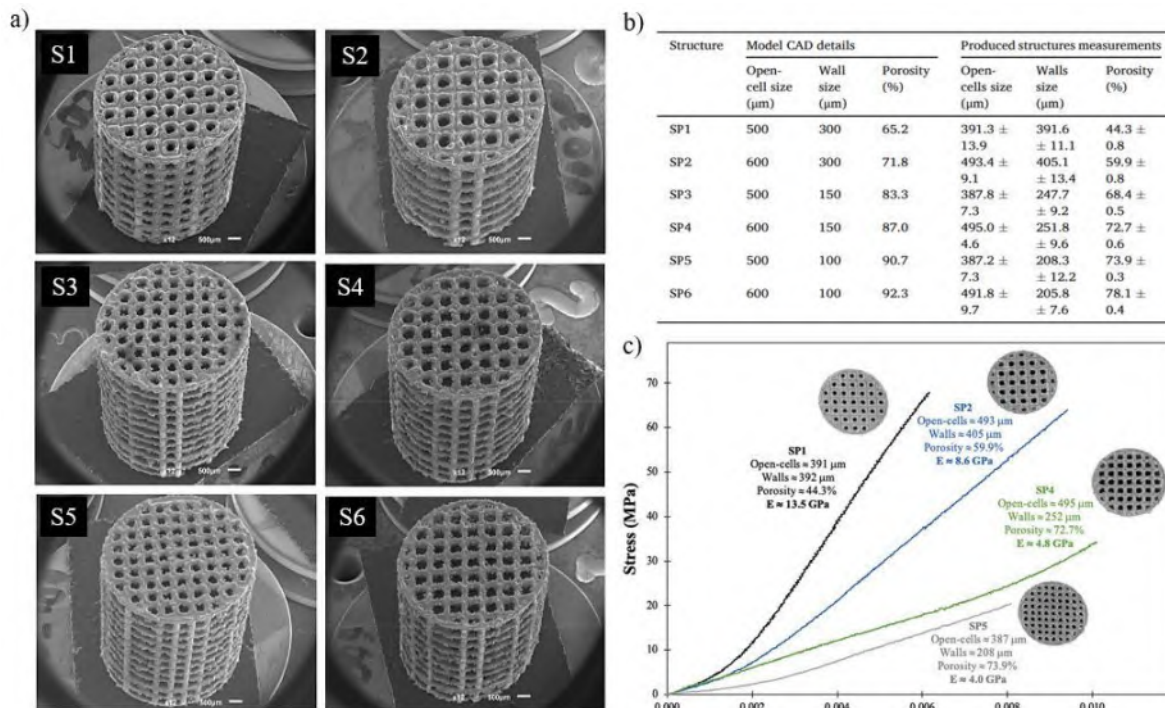


Figura 2.16 a) Imágenes MEB de las estructuras de NiTi producidas por CAD, b) comparación entre los detalles del modelo CAD y las medidas de las estructuras SLM y c) curvas de esfuerzo deformación con valores de porosidad y módulo de Young [51].

Caravaggi y col. [52] fabricaron andamios porosos de la aleación Co-Cr mediante fusión selectiva por láser (SLM) con diferente geometría de red, circular, de varillas cruzadas y una de red similar a la del hueso trabecular es decir de red porosa e interconectada. Un análisis mediante MEB (Figura 2.17a) reveló que las muestras de Co-Cr de geometría circular presentaban irregularidades entre ~ 15 y $100\ \mu\text{m}$, causadas por granos de Co-Cr parcialmente fundidos. Estas irregularidades están distribuidas aleatoriamente en la superficie externa de los andamios y presentan formas esféricas. Los ensayos de tracción y compresión se realizaron en andamios con geometría circular y de varillas cruzadas. Donde las muestras con geometría de varilla cruzada mostraron una mayor rigidez en tensión y una resistencia superior en comparación con las muestras circulares, tanto bajo cargas de tracción como de compresión. Las propiedades de tracción de las muestras circulares fueron entre un 10% y 15% superiores a las de las muestras de densidad completa del mismo material, con valores de límite elástico = $720 \pm 10\ \text{MPa}$, resistencia máxima = $1030 \pm 18\ \text{MPa}$ y módulo de elasticidad de $190 \pm 18\ \text{GPa}$ (Figura 2.17b).

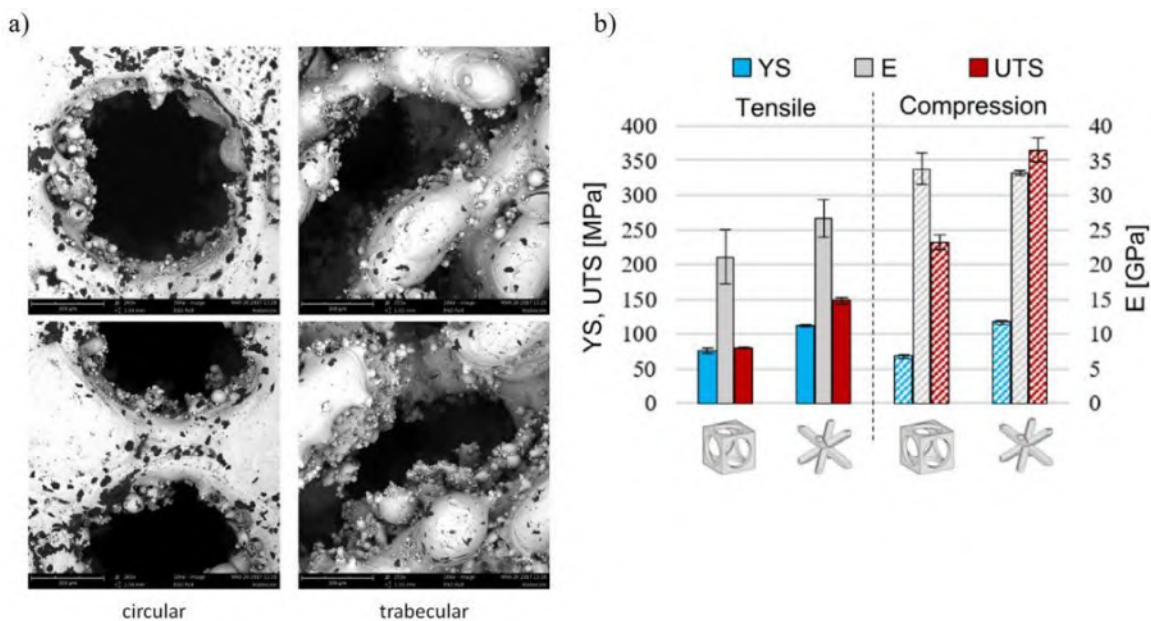


Figura 2.17 a) Imágenes MEB que muestran los detalles de CoCr circulares (izquierda) y trabeculares (derecha) y b) resultados de las propiedades mecánicas de tracción (izquierda) y compresión (derecha). YS = límite elástico, E = módulo de Young y UTS = resistencia máxima a la tracción [52].

Cegan y col. [53] fabricaron piezas de acero inoxidable 316L mediante tres métodos: (i) fusión selectiva por láser (SLM), (ii) SLM seguida de prensado isostático en caliente (HIP) y (iii) SLM seguida de tratamiento térmico (HT). Las muestras obtenidas únicamente por SLM presentaban una porosidad abierta e interconectada, mientras que el tratamiento HIP redujo significativamente la porosidad. Las muestras fabricadas por SLM, con una porosidad inferior al 1.3%, mostraron un límite elástico de 570 MPa, una resistencia a la tracción de 650 MPa y una baja ductilidad, entre 30 y 34%. En contraste, las muestras tratadas con HIP mostraron límites elásticos más bajos pero una mayor ductilidad, entre 47.8 a 48.5%, independientemente de las condiciones de SLM utilizadas.

Estos materiales metálicos presentan excelentes propiedades físicas y mecánicas, con valores de resistencia incluso superiores a los del tejido óseo humano. Sin embargo, diversos factores pueden contribuir al fracaso de los implantes metálicos, como la liberación de iones desde la superficie metálica, su alta rigidez, la reactividad con enzimas, la alta tasa de corrosión, toxicidad, aflojamiento, inestabilidad e infecciones asociadas [54]. Por estas desventajas, es esencial considerar el uso de otros tipos de biomateriales, en aplicaciones biomédicas.

2.7.2 Polímeros

Los polímeros se utilizan ampliamente en el tratamiento de tejido traumatizado debido a sus propiedades como biocompatibilidad, propiedades físicas y mecánicas similares a las de los tejidos conectivo y bajo costo. Existen dos tipos de polímeros biodegradables, naturales y sintéticos. Su tasa de degradación depende del peso molecular, la disposición estructural de las macromoléculas (estructura amorfa/cristalina), las características isoméricas, la formulación, la arquitectura y la cantidad del material [32, 49]. La Tabla 2.6 muestra algunos polímeros disponibles de origen natural o sintético para su uso en la fabricación de andamios multifuncionales.

Tabla 2.6 Polímeros disponibles para la fabricación de andamios multifuncionales

Tipo	Biomaterial	Ventajas	Desventajas	Ref.
Natural	Quitano/quitina	Excelente biocompatibilidad y potencial osteogénico	Rápida velocidad de degradación y fácil de deformar	[55]
	Alginato	Es biocompatible, biodegradable, hidrofílico y de bajo costo	No degradable en mamíferos, la esterilización provoca degradación.	[56]
	Colágeno	Biocompatible, biodegradable, tiene una fuerte plasticidad y baja inmunogenicidad.	Rápida tasa de degradación y bajas propiedades mecánicas.	[57]
Sintéticos	Ácido poliláctico (PLA)	Biodegradable, biocompatible y alta resistencia mecánica.	Tasa de degradación lenta, osteoconductividad deficiente.	[58]
	Policaprolactona (PCL)	Biocompatible, biodegradable	Poca bioactividad, tasa de degradación lenta y ciclo de degradación largo.	[59]

Zhang y col. [60] fabricaron andamios de ácido L-poliláctico (PLLA)/hidroxiapatita (HA) y evaluaron su bioactividad y características mecánicas, empleando el método de deposición fundida (FDM) para aplicaciones de reparación ósea. Mediante caracterización por microscopía electrónica de barrido (MEB) observaron que los andamios con diferentes contenidos de HA (30 y 50%) presentaban estructuras similares, donde los filamentos de la misma capa eran paralelos entre sí y los de capas adyacentes se cruzaban en un ángulo de 90°. Los estudios de hidrofobicidad mostraron que los andamios de PLLA poseían una superficie hidrófoba con un ángulo de contacto de 95.9°. No obstante, la hidrofiliidad aumentó con el incremento en el contenido de hidroxiapatita, alcanzando ángulos de contacto de 87.2° para una concentración de 30% nHA y de 77.4° para una concentración de 50% nHA. En cuanto a la resistencia a la compresión, los andamios de PLLA sin refuerzo

alcanzaron un valor de 45 MPa, que disminuyó a 30 MPa y 15 MPa en los andamios con 30 y 50 % de nHA, respectivamente. Los ensayos *in vitro*, evaluados mediante el kit de conteo celular CCK-8, indicaron que todos los andamios eran citocompatibles (Figura 2.18a). Los resultados de la viabilidad celular mostraron que, independientemente de la composición, todos los andamios promovieron la proliferación celular (Figura 2.18b). Observaciones por microscopía confocal revelaron que, para el primer día de cultivo, las células se adherían adecuadamente a los andamios porosos, y la morfología de las células en el andamio con 50% nHA se presentó de mejor forma. Sin embargo, se observó una pequeña cantidad de células muertas en los andamios con 30% de nHA (Figura 2.18c-e). El análisis de MEB mostró la adhesión y propagación de células en los diferentes andamios. En la superficie lisa del PLLA, las células se extendieron sin formación notable de pseudópodos (Figura 2.18f). En contraste con HA, las células se adhirieron preferentemente a la superficie rugosa, observándose pseudópodos prominentes en la superficie de los andamios con 50% de nHA (Figura 2.18h), extendiéndose sobre las partículas de expuestas de HA. Estos resultados sugieren que un mayor contenido de HA mejora la afinidad celular en los andamios.

Zhu y col. [61] fabricaron un andamio biomimético para el disco intervertebral (DIV) mediante una combinación de técnicas impresión 3D y electrohilado. La fabricación se llevó a cabo en tres etapas: en la primera, se imprimió en 3D un marco de PLA (ácido poliláctico); en la segunda, se simuló la estructura del anillo fibroso (AF) mediante haces de fibras orientadas de PLLA (poli-L-lactida); y en la tercera, se emuló la estructura del núcleo pulposo (NP) utilizando un hidrogel de GG/PEGDA encapsulante de células vivas. A simple vista, observaron un andamio DIV uniforme, mientras que a través de MEB evidenciaron fibras de PLLA con una estructura porosa del 50-60% y nanofibras de $1.74 \pm 0.35 \mu\text{m}$, además de poros de $267 \pm 32 \text{ nm}$. Esta estructura porosa se considera adecuada y esencial para permitir la migración y difusión celular en el andamio, el transporte de nutrientes y metabolitos, así como la comunicación celular. Sin embargo, uno de los inconvenientes observados en estudios histológicos fue el colapso del andamio, lo cual resultó en una baja producción de colágeno y proteoglicanos, moléculas esenciales para la retención de agua, además de desencadenar una leve respuesta

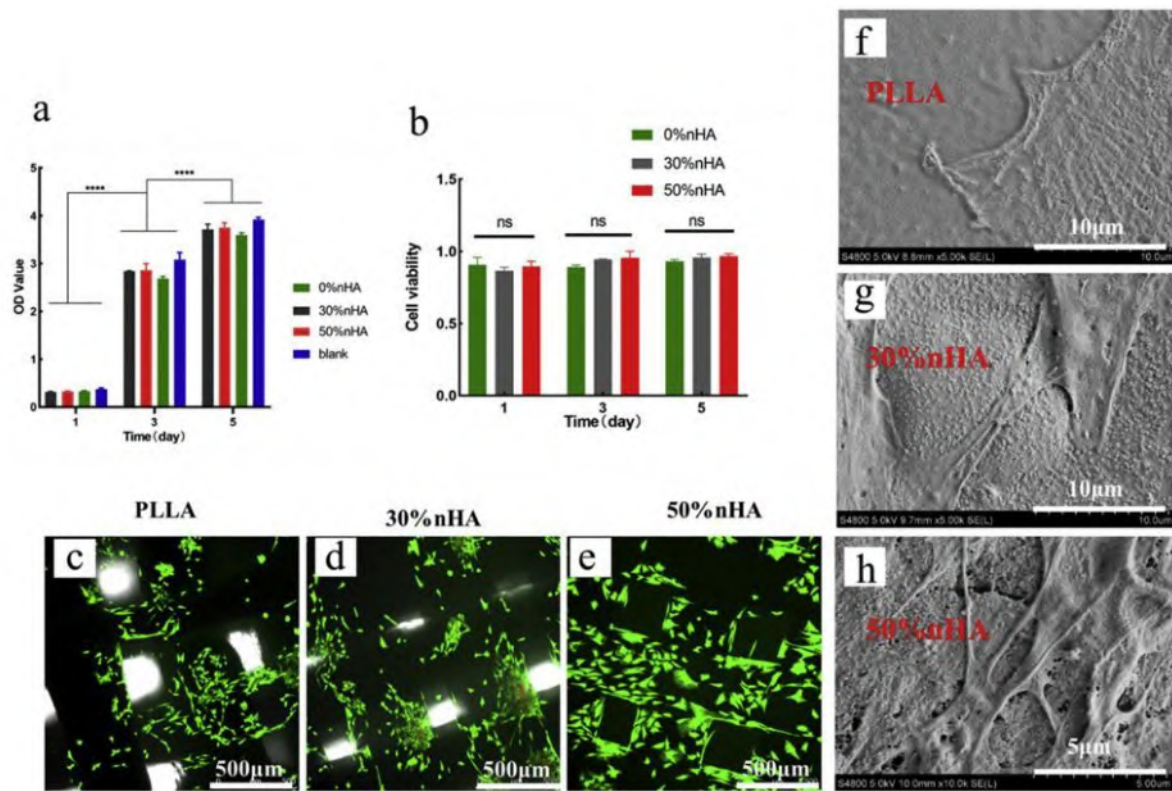


Figura 2.18 a, b) Ensayo del kit de recuento celular-8 (CCK-8) después de su cultivo durante 1, 3 y 5 días. c-e) Reconstrucciones confocales con escaneo láser de células vivas/muertas (1 día). f-h) Imágenes por MEB de la morfología de rMSC extendida en andamios (1 día) [60].

Por su parte, Rotbaum y col. [62] analizaron la respuesta mecánica de andamios de policaprolactona (PCL) fabricados mediante impresión 3D bajo condiciones cuasi estáticas y dinámicas. Los andamios mostraron poros de 150 a 650 μm y estructuras de poros cuadrangulares, hexagonales, triangulares y complejas con una porosidad constante de aproximadamente 70%. Los resultados demostraron que las propiedades mecánicas de estos andamios eran independientes de la velocidad de deformación y dependían principalmente del tamaño de los poros más que de su geometría, lo que limita su viabilidad debido a su comportamiento mecánico inadecuado.

El uso de polímeros, no obstante, presenta otros inconvenientes, tales como el aflojamiento aséptico debido al daño óseo mediado por monómeros, propiedades inertes y desajustes mecánicos durante el uso prolongado. Por estas razones, es fundamental explorar materiales

alternativos para la fabricación de andamios tridimensionales que puedan replicar el entorno natural y ofrezcan propiedades multifuncionales, mejorando la adhesión, proliferación y diferenciación celular [32]. Ante estas limitaciones, la búsqueda de nuevos materiales es imprescindible, como los biocerámicos.

2.7.3 Cerámicos

Estos materiales son mecánicamente resistentes y suelen incluir sales inorgánicas de calcio o fosfato, las cuales poseen propiedades osteoconductoras (promueven el crecimiento de nuevo tejido óseo) y osteoinductivas (estimulan la diferenciación de células osteoblásticas). Los materiales cerámicos pueden clasificarse en inertes (no absorbibles), semiinertes (bioactivos) y no inertes (reabsorbibles). Aunque en general son de naturaleza frágil, presentan buena resistencia a la compresión y a la corrosión [32]. En la Tabla 2.7 se enumeran algunos cerámicos disponibles para la fabricación de andamios tridimensionales.

Tabla 2.7 Cerámicos disponibles para la fabricación de andamios tridimensionales [63]

Biocerámicos	Características	Ventajas	Desventajas
Alúmina	Cerámico inerte con buena estabilidad química, alta rigidez mecánica, a las altas temperaturas y a la corrosión.	Estable, biocompatible y excelente resistencia al desgaste, no citotóxico.	Presentan baja elasticidad y son frágiles ocasionando problemas de carga y control de la tasa de degradación.
Vitrocerámicos	Combinación de un vidrio con un cerámico. Cuenta con una o más fases cristalinas y se pueden moldear fácilmente.	Biocompatible, con resistencia y estabilidad química, resistente a la corrosión.	El proceso de producción es complicado y de alto costo.

Hidroxiapatita	Principal componente inorgánico de huesos y dientes humanos o animales.	Buena biocompatibilidad, bioactividad y conductividad ósea.	Tasa de degradación lenta, inducción ósea deficiente y tiene una alta fragilidad.
Fosfatos de calcio	Composición similar a los minerales óseos, los sustitutos óseos sintéticos más utilizados.	Excelente biocompatibilidad, bioactividad, conductividad ósea y absorbible.	Baja resistencia a la compresión, sin tenacidad y degradación lenta.
Vidrios bioactivos	Bioactivos, pueden unirse al tejido biológico. De composición ajustable.	Mejora la diferenciación y osteogénesis	Baja resistencia y fragilidad

2.8 Vidrios bioactivos

Los vidrios bioactivos han atraído considerablemente la atención en el ámbito de la ingeniería de tejidos y la medicina regenerativa debido a sus destacadas propiedades, como una alta biocompatibilidad y bioactividad. Estas características los convierten en materiales prometedores por su capacidad para formar hidroxiapatita (HA) al entrar en contacto con fluidos fisiológicos, lo que crea una fuerte unión con tejidos duros y blandos. Además, los vidrios bioactivos pueden liberar iones con actividad biológica que promueven la diferenciación osteogénica de células madre e inducen el crecimiento vascular, facilitando el desarrollo de nuevos tejidos [64].

Desde el punto de vista composicional, los vidrios bioactivos se clasifican en tres grupos de acuerdo con el tipo de elemento formador de red. Las unidades estructurales se conectan a través de los vértices creando puentes de oxígeno (BO) (Figura 2.19). Ejemplos comunes de estos formadores de red son SiO_2 , B_2O_3 y P_2O_5 [65]. La Tabla 2.8 muestra los tres grupos de vidrios bioactivos, clasificados en función del óxido principal.

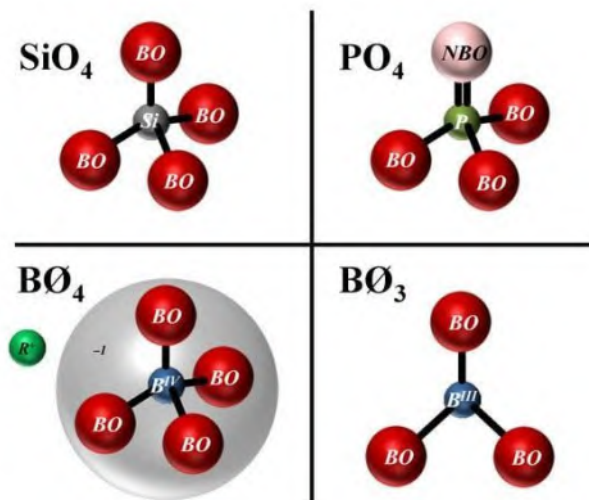


Figura 2.19 Representación esquemática de las unidades estructurales que forman una red de vidrio de óxido (R representa un catión modificador de red genérico; Ø corresponde a átomos de BO) [64].

Tabla 2.8 Vidrios bioactivos para aplicación médica

Tipo de vidrios bioactivos	Características	Ref
Base SiO ₂	Buena bioactividad y fácil unión con el tejido huésped. Algunos inconvenientes son: propiedades mecánicas pobres (causadas por su naturaleza amorfa) y su tendencia a cristalizar durante la sinterización por lo que la presencia de las fases cristalinas retarda el proceso de formación de la capa de hidroxiapatita.	[66]
Base B ₂ O ₃	Se caracterizan por su mayor bioactividad en comparación con los vidrios a base de sílice, lo que lleva a una menor durabilidad química, una transición rápida y completa del bovidrio (BG) a hidroxiapatita (HA) y, como tal, posee características de degradación y bioactividad fácilmente controladas.	[67, 68]
Base P ₂ O ₅	Son materiales reabsorbibles y bioactivos y su velocidad de disolución se puede ajustar de acuerdo con su composición de óxidos.	[69]

Schuhladen y col. [70] fabricaron andamios basados en silicato (13-93), borosilicato (13-93-BS) y borato (13-93-B) mediante el método de réplica. Los andamios resultantes presentaron una estructura porosa, con una porosidad del 78% para los de silicato, 57% para los de borosilicato y 95% para los de borato, y tamaños de poro entre 200 y 400 μm . El análisis microestructural por MEB de los tres tipos de andamos reveló una estructura de red interconectada en todos los casos (Figura 2.20a). La alta porosidad observada en los andamios de borato se atribuye a que el boro afecta la viscosidad del biovidrio, impidiendo la fusión completa de las partículas. En relación con la evaluación mecánica, se observó que el alto porcentaje de porosidad reduce significativamente la resistencia a la compresión de los andamios, con valores de 4 ± 2 MPa para los andamios de silicato, 0.6 ± 0.3 MPa para los de borosilicato y 0.2 ± 0.1 MPa para los de borato (Figura 2.20b). Finalmente, los estudios de bioactividad en SBF mostraron una mayor reactividad en los andamios de borato y borosilicato en comparación con los de silicato.

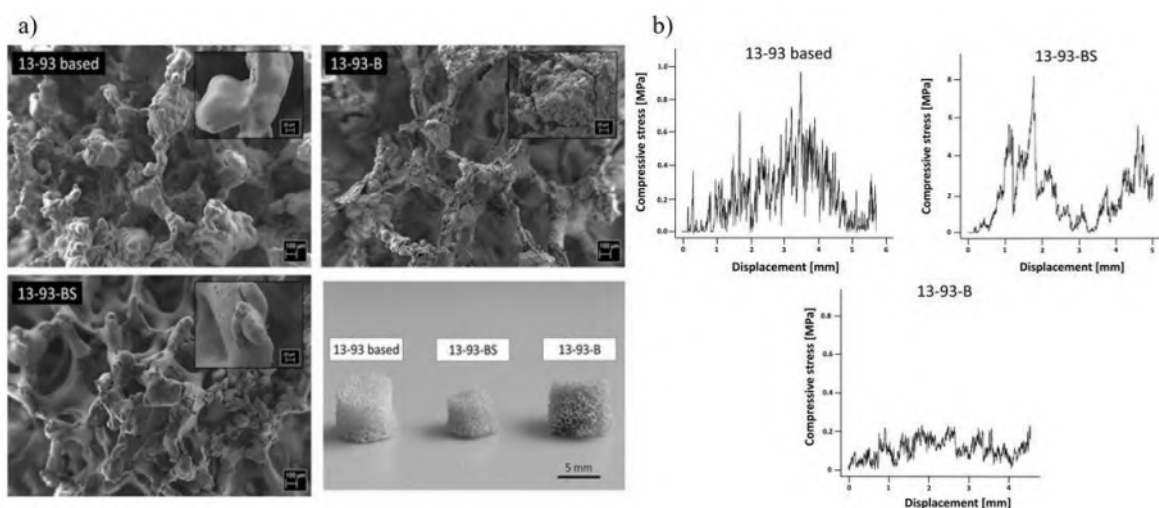


Figura 2.20 a) Imágenes de MEB de los andamios de silicato, borosilicato y borato, y b) curvas de esfuerzo-deformación de los ensayos mecánicos [70].

Por otro lado, Ma y col. [71] fabricaron andamios de β -TCP reforzados con distintas concentraciones de biovidrio (BG) Na_2O – CaO – MgO – P_2O_5 (5-20% en peso) por el método

de impresión 3D. El refuerzo con biovidrio tuvo como objetivo reducir la temperatura de sinterización, mejorar la actividad biológica y aumentar la degradabilidad del β -TCP. Los andamios fueron sinterizados a diferentes temperaturas y analizados por MEB, donde se observó una estructura porosa en todos los casos, con una porosidad cercana al 60% y tamaño de poro de 400 μm . Además, se observó que los andamios con 5% de BG presentaban granos más pequeños en comparación con los andamios con 20% de BG (Figura 2.21a). Las pruebas de resistencia mecánica revelaron que los andamios con un 20 % de BG tenían una resistencia a la compresión de 8.34 MPa y un módulo elástico de 208.5 MPa, superando a los andamios con menores cantidades de biovidrio (Figura 2.21b-c). En los estudios de bioactividad, los andamios con 20% de BG mostraron una mayor pérdida de peso, lo que indica que la adición de biovidrio mejora la degradación de los andamios. Respecto al comportamiento del pH, no observaron cambios significativos aparte de un ligero aumento inicial, atribuible a la presencia de la fase $\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7$ (Figura 2.21d-e).

Lepry y col. [72] investigaron la bioactividad del vidrio de borato en seis medios diferentes: fluido corporal simulado (SBF), tris(hidroximetil)aminometano tamponada (TRIS), solución salina tamponada con fosfato (PBS), medio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM), solución salina (SAL) y agua desionizada. A través de análisis por MEB, observaron la formación de la hidroxiapatita (HA) en los vidrios de borato. En los medios SBF, TRIS y PBS, la cinética de formación de HA fue similar, destacando que, aunque TRIS carece de iones de Ca y P, aún favoreció la formación de HA, al igual que SBF, aunque en este último ocurrió casi de inmediato, a las 2 horas. Por otro lado, el DMEM retrasó el proceso de formación de HA debido su alto contenido de calcio y carbonato, lo cual redujo la liberación de calcio del vidrio en comparación con los otros medios. Finalmente, tanto la solución salina como el agua desionizada también indujeron la formación de la capa bioactiva, aunque de manera más lenta (Figura 2.22).

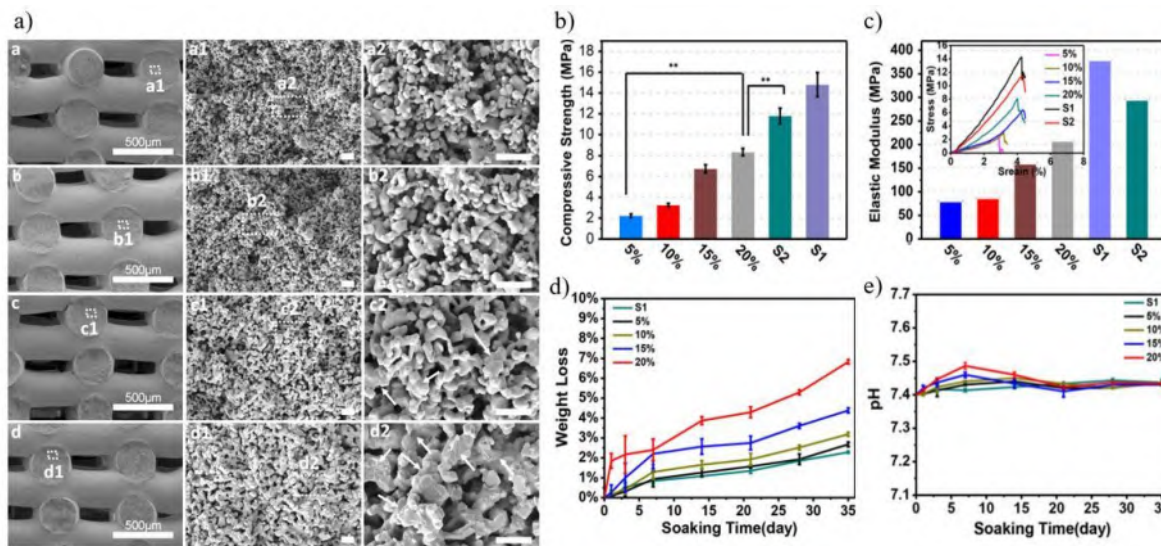


Figura 2.21 a) Imágenes MEB de andamios compuestos con contenidos del 5 a 20 % de BG, b) resistencia a la compresión de los andamios, c) módulo elástico de los andamios, d) pérdida de peso, y e) valores de pH después de la inmersión en SBF [71].

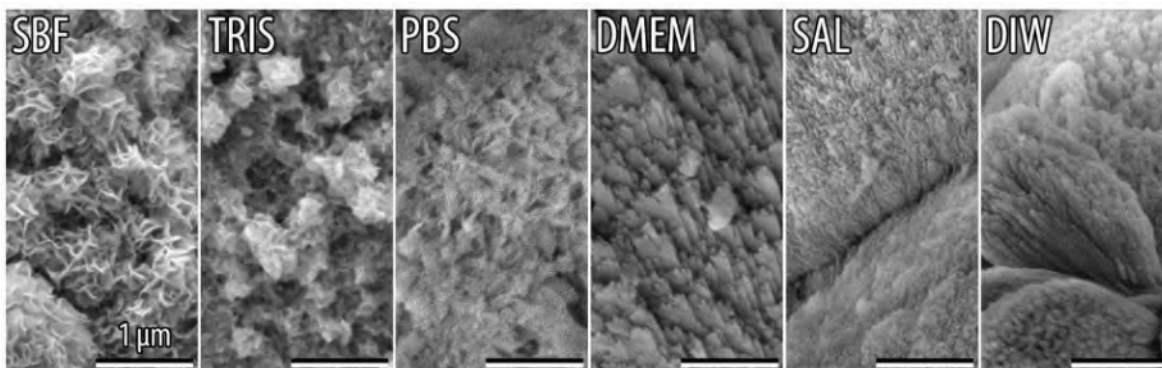


Figura 2.22 Imágenes de MEB del vidrio de borato después de su inmersión en diferentes medios [72].

2.8.1 Biovidrios de silicato

Estos biomateriales sintéticos fueron descubiertos por primera vez en 1969 por Larry Hench en la Universidad de Florida. El primer biomaterial desarrollado fue el Bioglass® 45S5, compuesto por un sistema de óxidos cuaternario $\text{SiO}_2\text{-CaO-Na}_2\text{O-P}_2\text{O}_5$, con la siguiente

composición en porcentaje en peso: 45 % SiO₂, 24.5 % Na₂O, 24.5 % CaO y 6 % P₂O₅. Este material demostró una alta capacidad para establecer una unión sólida con el tejido óseo, lo que lo hace muy prometedor en aplicaciones de reparación o reemplazo de tejidos [73]. Al combinar diferentes proporciones de estos cuatro óxidos con otros tipos de óxidos, se han desarrollado varias composiciones de biovidrios que ofrecen acciones terapéuticas específicas. La Tabla 2.9 presenta algunos biovidrios a base de silicio con aplicaciones médicas.

Tabla 2.9 Tipos de vidrios bioactivos basados en silicato [74]

Composición [% peso]	Vidrios bioactivos				
	45S5 Bioglass®	S53P4 BonAlive®	13-93	13-93B2	13-93B3
SiO ₂	45	53	53	18	-
Na ₂ O	24.5	23	6	6	6
CaO	24.5	20	20	22	20
P ₂ O ₅	6	4	4	2	4
MgO	-	-	5	8	5
K ₂ O	-	-	12	8	12
B ₂ O ₃	-	-	-	36	53

Baino y col. [75] fabricaron andamios de biovidrio 45S5 mediante el método de réplica, con aplicaciones potenciales en ingeniería de tejidos. Estos andamios se sinterizaron a 1180 °C por 3 horas, eliminando el polímero de sacrificio y fusionando las partículas de vidrio. El análisis microestructural mostró una estructura porosa del 0.68 ± 0.032 %, con tamaños de poro mayores a 100 µm, y una en el rango de propiedades del hueso trabecular (Figura 2.23 a y b).

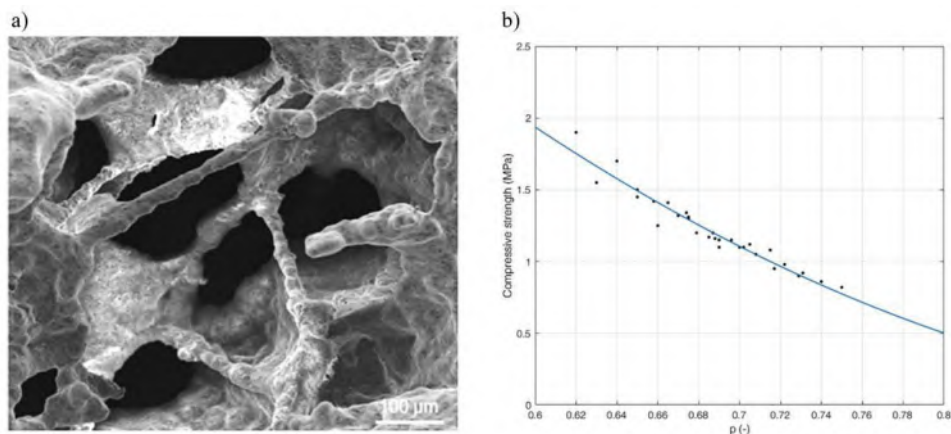


Figura 2.23 a) Imagen de MEB del andamio de biovidrio 45S5 sinterizado a 1180°C, y b) curva de resistencia a la compresión contra porosidad [75].

Hum y col. [76] fabricaron andamios de biovidrio 45S5 con una estructura porosa a través del método de réplica, y los recubrieron con colágeno para mejorar su rendimiento mecánico, ya que el biovidrio es frágil a pesar de presentar buena bioactividad. Los andamios fueron sinterizados a 1050 °C por 2 horas y luego recubiertos con una solución de colágeno al 0.5 %. El análisis MEB reveló una microestructura con poros cuyo tamaño oscila entre 250 y 500 µm y puntales de 50 a 100 µm (Figura 2.24a).

Las pruebas de resistencia a la compresión mostraron que los andamios recubiertos con colágeno presentaron un aumento significativo en la resistencia, debido a que el colágeno rellenaba las microfisuras, incrementando la resistencia mecánica. La Figura 2.24b muestra las curvas típicas de esfuerzo-deformación de materiales porosos divididos en tres regiones bien definidas.

Por su parte, Park y col. [77] desarrollaron andamios híbridos de colágeno denso (DC) y vidrio bioactivo S53P4 Bonalive® mediante compresión plástica, un método para fabricar hidrogeles de colágeno denso que mantienen la estructura fibrilar del colágeno y la microestructura mesoporosa necesaria para la funcionalidad biológica. Los análisis MEB confirmaron la incorporación de partículas de vidrio bioactivo en la matriz de colágeno fibrilar (Figura 2.25a). Las pruebas de compresión revelaron que los andamios DC-S53P4 incrementaron su rigidez ocho veces tras 7 días en SBF, en comparación con los andamios

de colágeno. Además, el módulo de compresión aumentó significativamente en los andamios híbridos, mientras que en los de colágeno puro se mantuvo constante. Los ensayos de cultivo celular mostraron que la actividad metabólica alcanzó su pico a los 7 días en las muestras de colágeno DC y fue estable desde el día 14 en ambos materiales (Figura 2.25c). Los análisis de células vivas/muertas mostraron claramente que existía muerte celular en el día 7 en los andamios DC-S53P4, tanto en medio de control (MC) como en el medio osteogénico (OGM). Finalmente, se evaluó el número de células presentes en los andamios, sin observar diferencias significativas entre los andamios de colágeno DC y los andamios híbridos DC-S53P4 (Figura 2.25d).

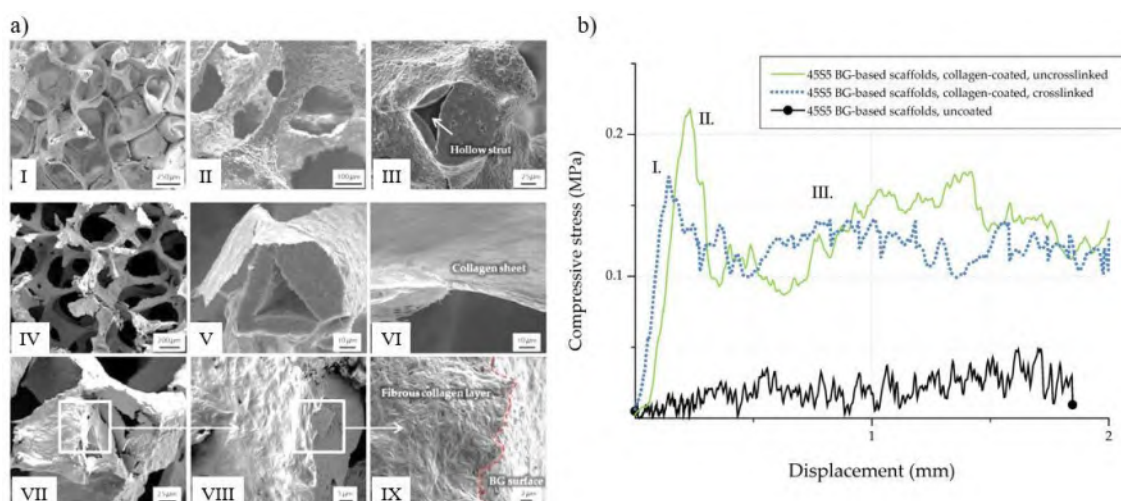


Figura 2.24 a) Imágenes MEB de los andamios después de la sinterización (I-III), después del recubrimiento (IV), capa fibrosa de colágeno (V-VI) y superficie rugosa del biovidrio de la capa fibrosa de colágeno (VII-IX), y b) curvas de esfuerzo-deformación para andamios a bases de BG 45S5 con y sin recubrimiento de colágeno [76].

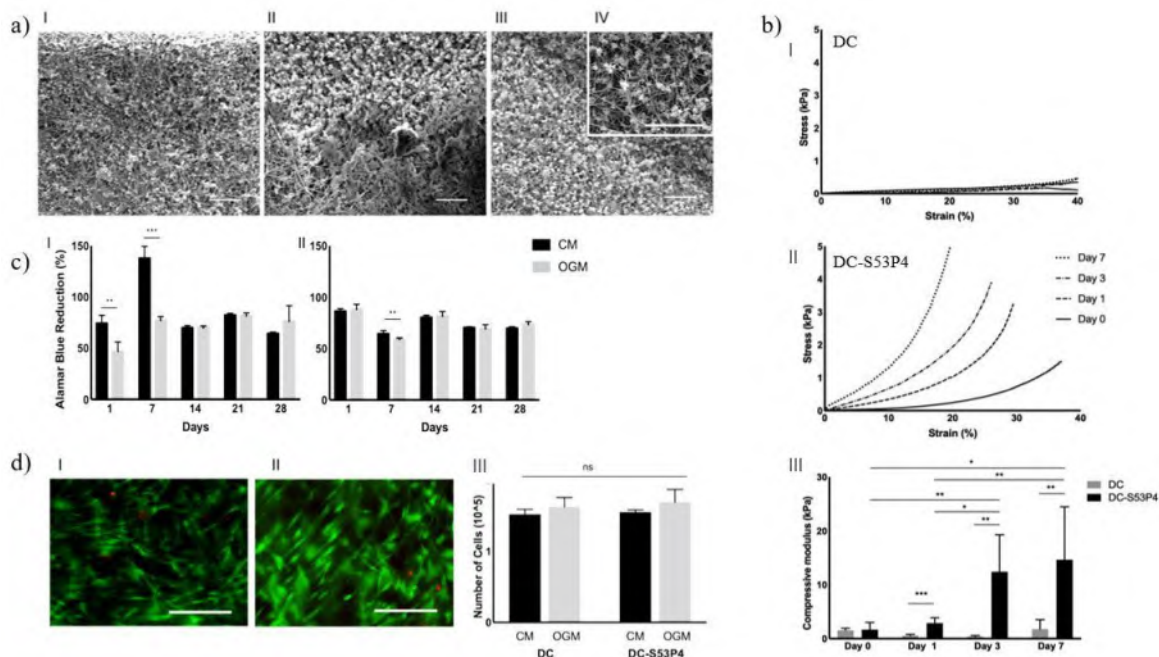


Figura 2.25 a) Imagen MEB de los andamios a diferentes magnificaciones, b) resultados de las pruebas mecánicas, c) actividad metabólica bajo el ensayo de reducción AlamarBlue®, y d) imágenes de células vivas/muertas de hDPSC. Barras de error $\pm$ DE y * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ y *** $p < 0.001$ y la falta de significancia (ns) es $p > 0.05$ según la prueba t de Student [77].

En cuanto al biovidrio CEL2 (45% SiO₂, 3% P₂O₅, 26% CaO, 7% MgO, 4% K₂O, 15% Na₂O), desarrollado en el Politécnico di Torino, destaca su baja alcalinidad (menos del 20% mol) y mayor contenido de P₂O₅ (3% mol) para controlar variaciones de pH por lixiviación de iones en fluidos fisiológicos. El vitrocerámico CEL2 ha demostrado alta biocompatibilidad y bioactividad, y su cristalización parcial mejora las propiedades mecánicas sin comprometer su bioactividad. El contenido de MgO y K₂O, además de ajustar la velocidad de la interacción química con los tejidos blandos, promueve el metabolismo celular [78, 79].

Elsayed y col. [5] fabricaron andamios de biovidrio CEL2 (58% y 60% en peso) mediante colada en gel inorgánica. Este método emplea espumación directa en vidrio sintético con agentes tensioactivos y solución alcalina, logrando estructuras de 60 a 80% de porosidad y con poros interconectados, confirmados mediante análisis de tomografía (Figura 2.26a yb).

Estos andamios exhibieron resistencia a la compresión entre 2.5 y 5 MPa, lo cual señala que se encuentra dentro del rango del hueso trabecular humano.

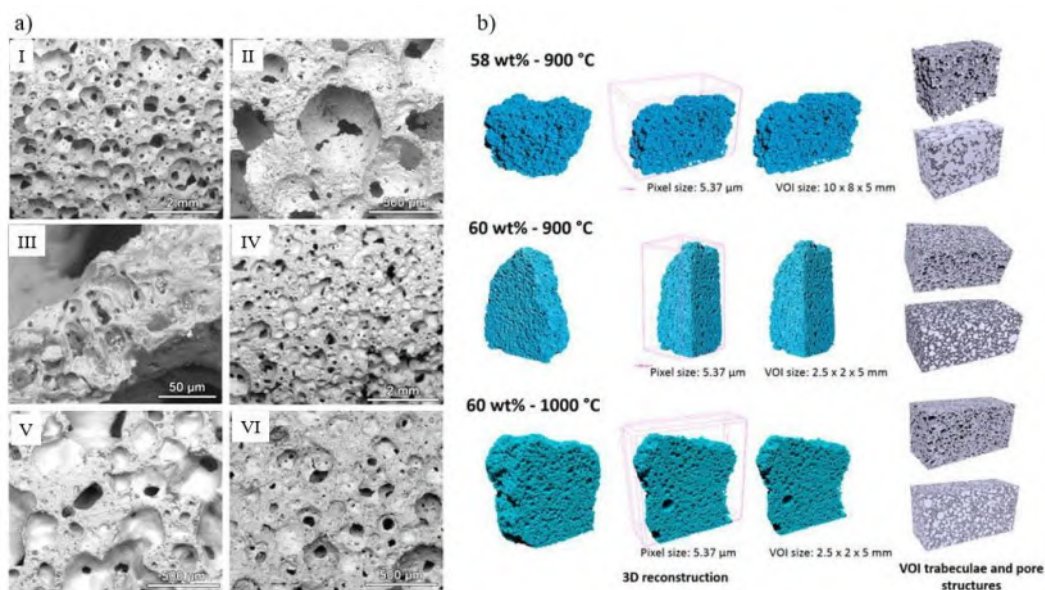


Figura 2.26 a) Imágenes de MEB de los andamios con 58% en peso de CEL2 (I-III), con 60% en peso de CEL 2 (IV-V), ambos tratados a 900 °C, y andamios con 58% en peso de CEL2 tratados a 1000 °C (VI) y b) análisis de nano-CT de andamios vitrocerámicos CEL2 con diferentes contenidos de sólidos y sinterizados mediante diferentes tratamientos térmicos [5].

La excelente biocompatibilidad y degradabilidad de los vidrios bioactivos los hace adecuados para inducir osteoconducción en el tejido circundante. No obstante, para cumplir con las demandas actuales de multifuncionalidad en ingeniería de tejido óseo, es necesario incorporar elementos dopantes en la composición de estos biovidrios.

2.9 Elementos dopantes

El dopaje se define como la incorporación de una baja concentración de un elemento específico en el material base, variando desde pocas partes por millón (ppm) hasta un

pequeño porcentaje. Un contenido moderado de dopantes puede desempeñar un papel crucial en la promoción de la nucleación de diferentes fases cristalinas. Significa que las características del material original pueden cambiar permitiendo obtener un material con propiedades mejoradas. La incorporación a los biovidrios mejoran las propiedades angiogénicas, osteogénicas, y la actividad antimicrobiana y antiinflamatoria, dependiendo de los iones metálicos adicionados, haciéndolo ideal para diversas aplicaciones biomédicas [80, 81].

Además de iones Na^+ y Ca^{2+} presentes en la composición de vidrios bioactivos, se pueden incluir otros cationes, como: Sr^{2+} , Mg^{2+} , Zn^{2+} , Ag^+ , K^+ , Cu^{2+} , Mn^{2+} y $\text{Co}^{2+/3+}$. Estos oligoelementos son esenciales en múltiples funciones metabólicas y son fundamentales para el crecimiento y desarrollo óseo [82].

Así mismo, las tierras raras como cerio (Ce^{3+}), terbio (Tb^{3+}), erbio (Er^{3+}), europio (Eu^{3+}), lantano (La^{3+}), y disprosio (Dy^{3+}) se han investigado recientemente como dopantes en biocerámicos y vidrios bioactivos, creando una nueva categoría prometedora de nanomateriales ópticos luminiscentes. Estos materiales pueden ofrecer una alternativa innovadora a los fluoróforos orgánicos y los puntos cuánticos, con aplicaciones en bioimagen para el diagnóstico de cáncer, guía intraoperatoria, y evaluación postoperatoria [83].

La Figura 2.27 muestra una lista completa de elementos que pueden integrarse en la composición química de los vidrios bioactivos y destaca la actividad biológica buscada en cada caso.

En el presente trabajo se incorporaron Zn^{2+} , Sr^{2+} y Cu^{2+} en forma de óxidos como agentes dopantes en el biovidrio CEL2 a base de silicato, con el objetivo de mejorar sus propiedades biológicas y obtener un material multifuncional innovador para aplicaciones en medicina regenerativa. La Tabla 2.10 presenta la actividad y respuesta biológica *in vivo* de los iones dopantes utilizados en este proyecto de investigación.

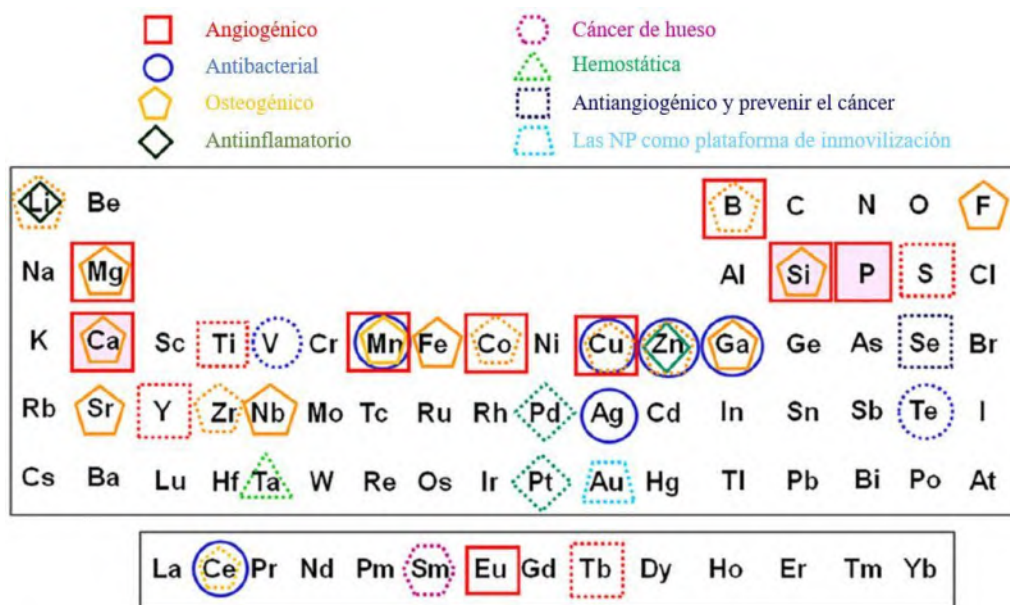


Figura 2.27 Elementos incluidos hasta fecha en los vidrios bioactivos mesoporosos y su actividad biológica. Las líneas continuas indican propiedades bien establecidas, mientras que las líneas discontinuas corresponden a efectos biológicos propuestos [84].

Tabla 2.10 Funciones de Zn, Sr y Cu como iones dopantes y su mecanismo de acción [85-87]

Ion	Actividad biológica	Respuesta biológica
Zn ²⁺	Osteogénesis	- Participa en la regulación estructural, catalítica o de la expresión de fosfatasa alcalina. - Importante en la osteogénesis y la mineralización. - Puede suprimir el proceso de reabsorción osteoclástica. - Mejora la regeneración nerviosa. - Propiedad antiinflamatoria. - Mejora los procesos de cicatrización de heridas. - Aumenta la actividad del trifosfato de adenosina (ATP). - Estimula la formación ósea <i>in vitro</i>.
Sr ²⁺	Osteogénesis	- Promueve la actividad de las células osteoblásticas formadoras de hueso, al tiempo que inhibe los osteoclastos que reabsorben el hueso. - Activa CaSR y las vías de señalización posteriores.

		• Aumenta la producción osteoprotegerina (OPG) y disminuye la expresión del ligando de receptor activador para el factor nuclear κ B (RANKL). Esto promueve la proliferación, diferenciación y viabilidad de los osteoblastos e induce la apoptosis de los osteoclastos que resulta en la disminución de la resorción ósea.
Cu ²	Angiogénesis Osteogénesis	• Estimula la angiogénesis. • Demuestra propiedad antimicrobiana. • Aumenta la diferenciación de las células madre mesenquimales (MSC). • Promueve la angiogénesis mediante la regulación positiva del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y mediante la estimulación de la proliferación de células endoteliales.

Westhauser y col. [85] estudiaron la diferenciación osteogénica y la formación de la matriz de células estromales mesenquimales (MSC) en vidrios bioactivos mesoporosos dopados con 5% mol de Zn y Cu. Evaluaron la viabilidad celular y la actividad de fosfatasa alcalina (ALP) mediante un ensayo combinado de fluorescencia (FDA) con 4-metilumbeliferil fosfato (4-MUP) como sustrato de ALP. Los resultados de viabilidad celular con fluorescencia (FDA) indicaron que las muestras con 5% mol de Cu promovieron mejor la viabilidad celular en comparación con las dopadas con Zn (Figura 2.28a). Por otro lado, los ensayos de viabilidad celular con tinción vivo/muerto mostraron una morfología celular similar en las muestras sin dopar y en aquellas dopadas con 5% mol de Zn y Cu. Este comportamiento se atribuyó a que las células alcanzaron confluencia, lo que limitó el crecimiento debido al alto número celular en todos los grupos tras 14 y 21 días (Figura 2.28c). Así mismo, se evaluaron los productos de disolución iónica y su efecto en la producción de fosfatasa alcalina (ALP), osteopontina (OPN), osteocalcina (OCN) y colágeno tipo I (COL1A1). En cuanto a la producción de ALP, las muestras sin dopar y las dopadas con Zn mostraron un efecto notable, siendo especialmente significativa la influencia del Zn en la actividad de ALP. En relación con la expresión OPN, OCN y COL1A1, las muestras dopadas con Zn y Cu presentaron mayores

niveles de expresión, con un incremento particularmente destacado en el día 21 (Figura 2.28b.1-b.4).

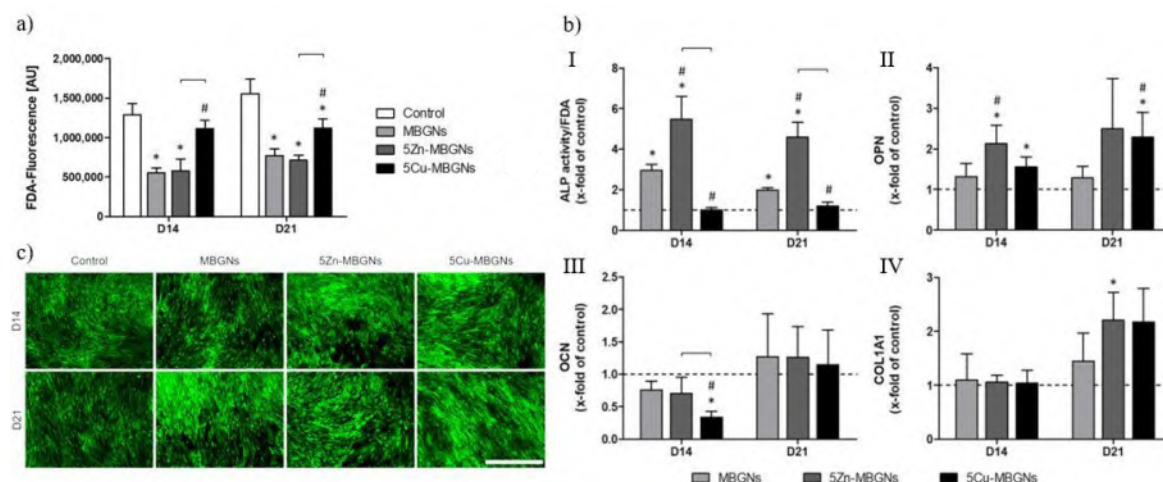


Figura 2.28 a) Viabilidad celular con fluorescencia, b) influencia de los productos de disolución iónica (IDP) en la producción de ALP, OPN, OCN y COL1A1 (I-IV), y c) imagen de fluorescencia de células vivas/muertas [85].

Kermani y col. [86] investigaron el efecto de la incorporación de los iones de Sr^{2+} y Co^{2+} en la angiogénesis en muestras de biovidrio CEL2. Los estudios incluyeron ensayos de mineralización *in vitro* y pruebas de viabilidad celular. Los resultados de viabilidad mostraron que la adición de estos dopantes no tuvo efectos adversos sobre el crecimiento y la proliferación celular, debido a que el biovidrio CEL2 contiene oligoelementos naturalmente presentes en el cuerpo humano (Figura 2.29a). Además, el análisis de microscopía electrónica de barrido (MEB) evidenció una buena adhesión y proliferación de células MG-63 en la superficie del material, lo cual confirma su citocompatibilidad (Figura 2.29b). Por último, los ensayos de osteogénesis indicaron una mayor migración de células HUVEC en las muestras dopadas con Sr (Figura 2.29c). Los autores concluyeron que los iones de Sr^{2+} y Co^{2+} , expandieron la red vítrea debido a las diferencias en los radios iónicos respecto al Ca. Además, el dopaje con iones más alto (Sr^{2+}) podría cambiar la concentración

de vacancias de oxígeno y facilitar la liberación de iones, mejorando así la bioactividad del material.

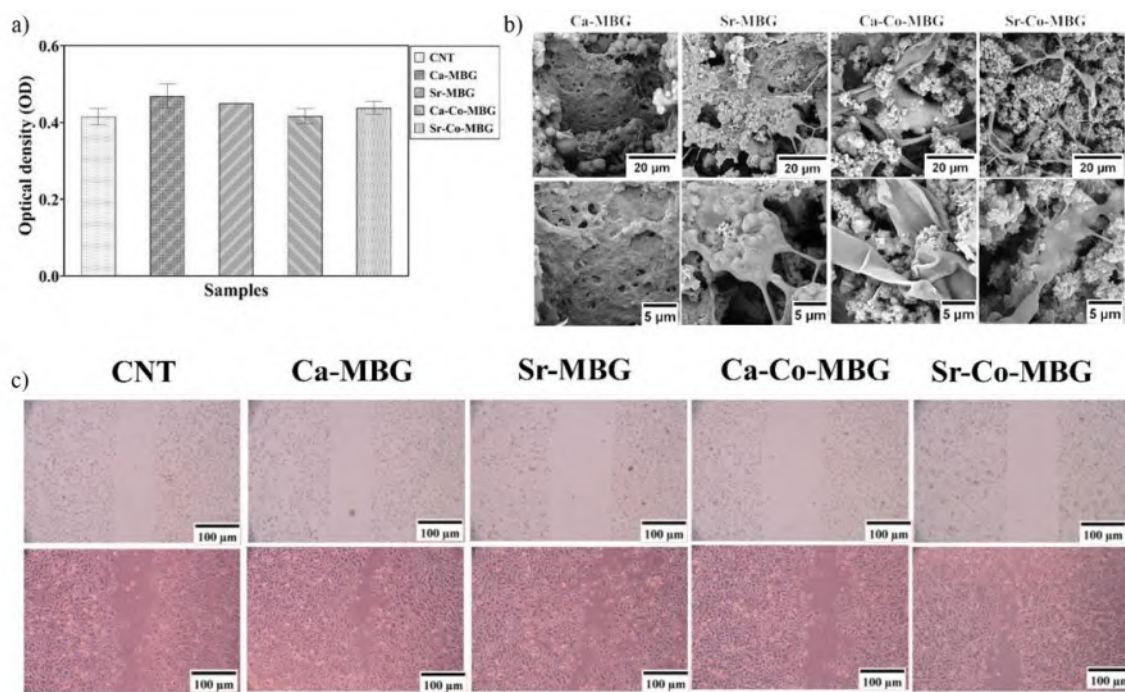


Figura 2.29 a) Análisis de densidad óptica de las células después de 24 horas, b) imágenes de MEB de adhesión y proliferación celular de MG-63, y c) evaluación angiogénica con células HUVEC a las 24 horas [86].

Zhang y col. [87] evaluaron el efecto de iones de Cu en cementos de fosfato tricálcico (TCP) y fosfato cálcico (CPC). Los estudios incluyeron ensayos de resistencia mecánica, pruebas de bioactividad en solución tampón Tris-HCl, así como evaluaciones osteogénicas y angiogénicas *in vitro*. Los resultados mecánicos mostraron que las muestras de fosfato cálcico presentaron un valor de resistencia de 21.55 ± 1.1 MPa, que aumentó a 29.19 ± 3.3 MPa al combinar TCP con CPC. Además, una mayor concentración de Cu mejoró la resistencia a la compresión, alcanzando un valor de 28.38 ± 2.9 MPa en comparación con muestras con menor concentración de Cu (Figura 2.30a). Los ensayos de liberación de iones Cu en solución Tris a 1, 3 y 7 días indicaron que la liberación Cu^{2+} aumentaba con el tiempo,

mostrando un mecanismo de disolución-precipitación y facilitando la formación de hidroxiapatita (Figura 2.30b). Las propiedades osteogénicas y angiogénicas de TCP/CPC-Cu se evaluaron mediante cocultivo con células estromales de médula ósea de ratón (mBMSC) y células endoteliales de la vena umbilical humana (HUVEC). Los resultados indicaron que las muestras TCP-CPC con distintas concentraciones de Cu permitieron la proliferación celular de mBMSC y HUVEC, siendo óptima la viabilidad a todas las concentraciones de Cu (Figura 2.30c y d).

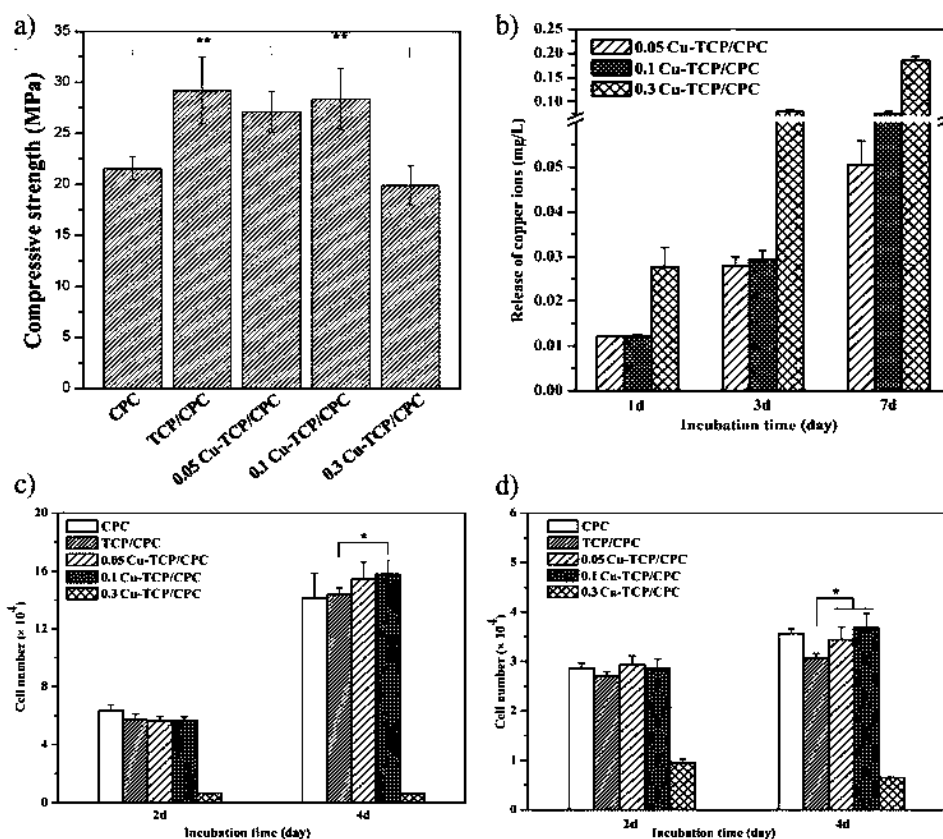


Figura 2.30 a) Respuesta mecánica de las muestras, b) ensayos de bioactividad de las muestras, c- d) estudios de viabilidad celular mBMSC y HUVEC con datos estadísticos representados como medias $\pm$ DE ($*p < 0.05$) [87].

Para evaluar las reacciones de un organismo ante las sustancias que componen un material, es esencial realizar ensayos *in vitro* bajo condiciones controladas, los cuales permiten

analizar con seguridad una amplia variedad de materiales. Los estudios que se describen a continuación son fundamentales para confirmar que el material diseñado cumple con las características físicas, mecánicas y biológicas, asegurando su potencial como una alternativa viable en medicina regenerativa.

2.10 Estudios *in vitro*

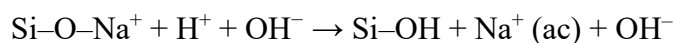
2.10.1 Estudios de bioactividad y modificación de biovidrios con dopantes

De acuerdo con Kokubo y col. un material bioactivo se define como aquel sobre el cual se forma hidroxiapatita (HA) similar al hueso cuando se sumerge en una solución acuosa análoga al plasma sanguíneo humano y este proceso está influenciado por parámetros del material como sus propiedades físicas, químicas y la estructura jerárquica de la superficie [88]. El mecanismo de degradación y formación de la hidroxiapatita carbonatada (HCA) en soluciones acuosas como el fluido corporal simulado (SBF) a 37°C también está relacionado con la pérdida de peso del andamio de biovidrio en función del tiempo [89, 90]. A continuación, se describen las etapas del mecanismo de formación de la hidroxiapatita y en la Figura 2.31 se muestra una representación esquemática del mismo.

Etapas del mecanismo de formación de HCA:

1. Intercambio iónico:

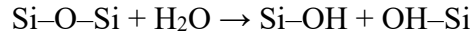
Los iones Ca^{2+} y Na^+ del material intercambian con los iones H_3O^+ de la solución, formando enlaces de silanol (Si-OH) en la superficie del material:



Esto incrementa el pH de la solución y genera una capa rica en sílice en la superficie del vidrio. Además, los iones $(\text{PO}_4)^{3-}$, si están presentes, son liberados al medio.

2. Ruptura de enlaces en la red de sílice:

Un pH elevado provoca la ruptura de los enlaces Si-O-Si debido a la acción de los grupos OH^- , liberando sílice soluble como $\text{Si}(\text{OH})_4$ y exponiendo grupos silanol:



3. Repolimerización:

Los grupos silanol (Si-OH) se condensan, formando una capa amorfa rica en sílice y pobre en iones Na^+ y Ca^{2+} .

4. Formación de una capa de fosfato de calcio amorfo (ACP):

Los iones Ca^{2+} y grupos $(\text{PO}_4)^{3-}$ migran desde el material y la solución hacia la superficie, depositándose sobre la capa rica en sílice.

5. Cristalización de HCA:

Los grupos hidroxilo y carbonato provenientes de la solución se incorporan a la superficie, donde la capa amorfa se cristaliza formando hidroxiapatita carbonatada.

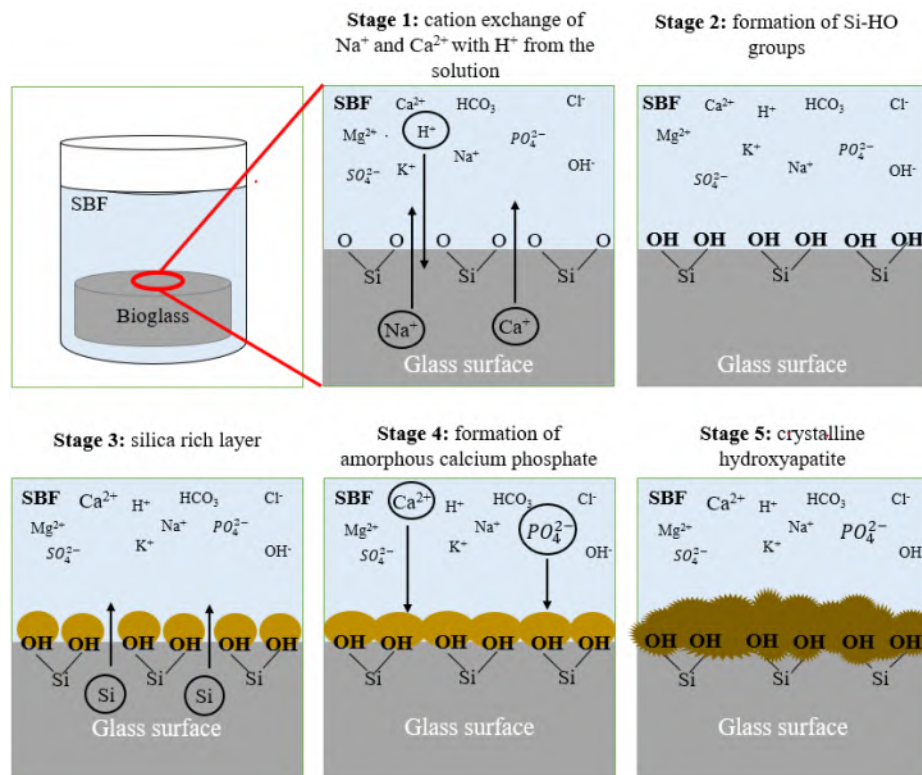


Figura 2.31 Representación del mecanismo de integración del biovidrio sobre la superficie del tejido [91].

Zhao y col. [92] fabricaron andamios de vidrio bioactivo dopados con ZnO y SrO (0, 5 y 10 % mol) mediante el método de réplica. Evaluaron la bioactividad *in vitro* y la pérdida de peso tras inmersión en SBF durante 1, 3, 7, 14 y 28 días. Los análisis por microscopía electrónica de barrido (MEB) mostraron la formación de hidroxiapatita en todas las muestras. Inicialmente, los andamios tenían una superficie lisa, pero tras el primer día de inmersión se observaron pequeños cristales que crecieron con el tiempo (Figura 2.32a). En los andamios dopados con ZnO y SrO la formación de hidroxiapatita fue menor. En cuanto a la pérdida de peso, los andamios sin dopar mostraron mayores valores en comparación con los dopados: BG (sin dopar), $24.20 \pm 2.1\%$; 5Sr-BG, $17.57 \pm 3.2\%$; 10Sr-BG, $12.55 \pm 2.5\%$; 5Zn-BG, $14.63 \pm 1.8\%$; 10Zn-BG, $8.18 \pm 1.6\%$ (Figura 2.32b).

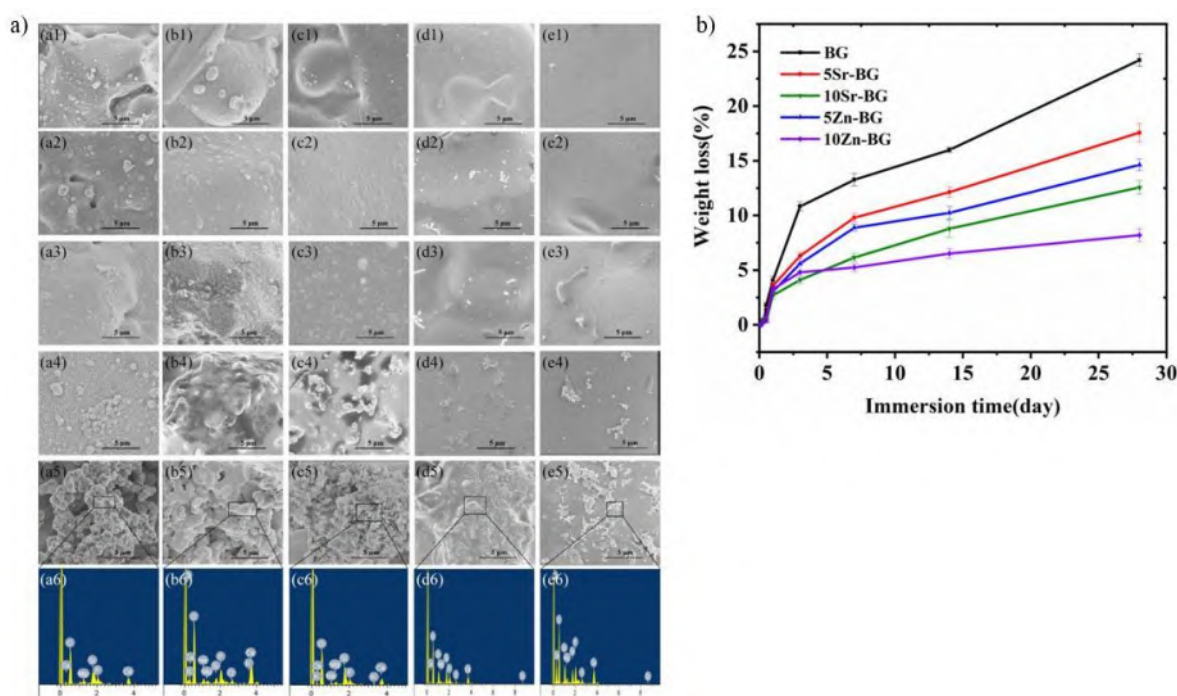


Figura 2.32 a) Formación de hidroxiapatita en la superficie de los andamios: BG (a1–a5), 5Sr-BG (b1–b5), 10Sr-BG (c1–c5), 5Zn-BG (d1–d5) y 10Zn-BG (e1–e5); análisis EDS (a6–e6); b) Resultados de pérdida de peso de los andamios tras inmersión en SBF [92].

La menor formación de hidroxiapatita en los andamios dopados se relaciona con una degradación reducida, ya que los dopantes (Zn y Sr) disminuyen los enlaces no puente (NBO, *Non-bridging oxygens*) en la red de sílice. El proceso de degradación involucró el intercambio rápido de iones Na^+ y H_3O^+ con la solución, pero este proceso se ralentizó debido al dopaje, reduciendo la liberación de iones de metales alcalinotérreos (Ca^{2+} , Mg^{2+}) y alcalinos (Na^+ , K^+).

Sergi y col. [93] fabricaron vidrios bioactivos con la composición $\text{SiO}_2\text{--P}_2\text{O}_5\text{--Na}_2\text{O--K}_2\text{O--CaO--MgO--SrO}$, dopados con diferentes concentraciones de ZnO (2, 3.8 y 5 %mol) para estudiar el rendimiento biológico del material. Evaluaron la bioactividad mediante inmersión en fluido corporal simulado (SBF) durante 1, 3, 7 y 14 días. A través de microscopía electrónica de barrido (MEB), observaron que no hubo formación de hidroxiapatita tras 3 y 7 días de inmersión; sin embargo, después de 14 días, se detectó una morfología de hidroxiapatita tipo coliflor, aunque en cantidades limitadas (Figura 2.33a y b). El análisis EDS confirmó la presencia de reflexiones de calcio (Ca) y fósforo (P), indicadores de hidroxiapatita (Figura 2.33c).

La baja formación de la capa bioactiva se atribuye al lento intercambio de iones entre la muestra y el SBF debido al dopaje con ZnO (3.8 % mol). Este fenómeno está relacionado con el papel del zinc como modificador de red: al reemplazar al CaO, el Zn puede formar tetraedros Zn_4^{2-} que requieren iones de calcio para equilibrar la carga. Esto provoca la eliminación de cationes de la red de sílice y reduce los enlaces no puente (NBO). Aunque el ZnO disminuye la degradación, los autores concluyen que el material conserva su bioactividad, aunque ésta no sea suficiente para predecir su capacidad de unión ósea *in vivo*.

Yin y col. [94] fabricaron andamios de biovidrio 19-93B2 dopados con 0-9 % mol de Sr mediante la técnica de réplica. Los andamios fueron inmersos en SBF durante 1, 3, 5, 8, 15 y 20 días para estudiar su bioactividad. Después de 5 días, las imágenes MEB revelaron nanocristales atribuibles a la formación de hidroxiapatita en andamios dopados con 6 %mol de Sr (Figura 2.34a). El pH incrementó a 8.1 tras 20 días, mientras que la pérdida de peso fue más significativa en los primeros 5 días (Figura 2.34b).

El análisis ICP mostró un intercambio de iones de Si^{4+} , Ca^{2+} , B^{3+} y Sr^{2+} . Los andamios dopados con mayores concentraciones de Sr liberaron más Si^{4+} y Ca^{2+} desde los primeros días (Figura 2.34c.1-c.2) mientras que la concentración de B^{3+} disminuyó gradualmente (Figura 2.34c.3). La alta concentración de Si^{4+} y Ca^{2+} se atribuyó a una mayor disolución de la sílice en SBF, favoreciendo la formación de la hidroxiapatita bioactiva. El Sr inhibió la liberación de boro al ocupar un mayor espacio en la red vítrea, debilitando los enlaces Si-O (Figura 2.34c.4).

Amudha y col. [95] analizaron el efecto de SrO en biovidrio 45S5. Las muestras inmersas en SBF durante tres semanas, mostraron formación de hidroxiapatita desde el día 7. En muestras sin dopar, los cristales de hidroxiapatita tenían forma de aguja y estaban homogéneamente distribuidos. En las dopadas con Sr, la hidroxiapatita fue más abundante y cubrió completamente la superficie al aumentar la concentración de Sr y el tiempo de inmersión. Este fenómeno se debe a que el Sr incrementa los sitios de nucleación y mineralización, favoreciendo la formación de hidroxiapatita (Figura 2.35).

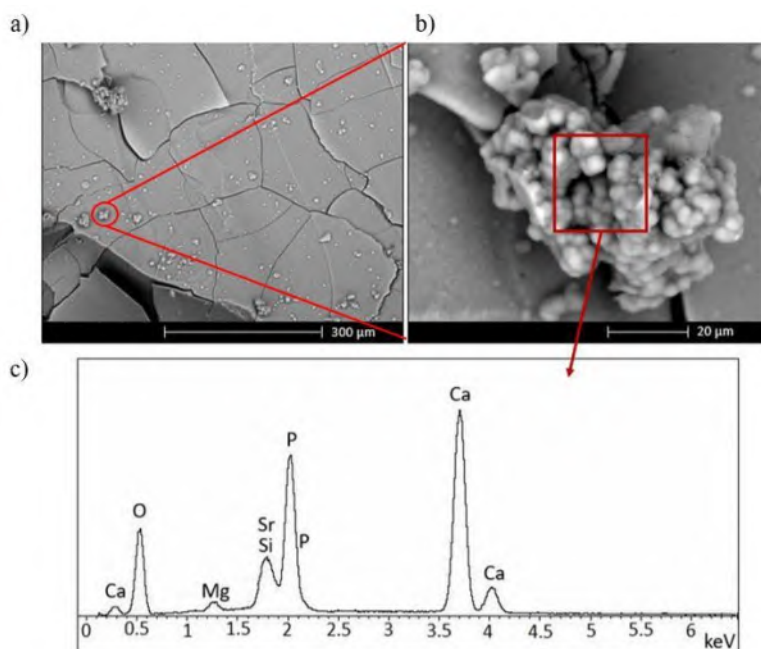


Figura 2.33 a, b) Imágenes MEB de cristales de hidroxiapatita. c) Análisis EDS de hidroxiapatita formada [93].

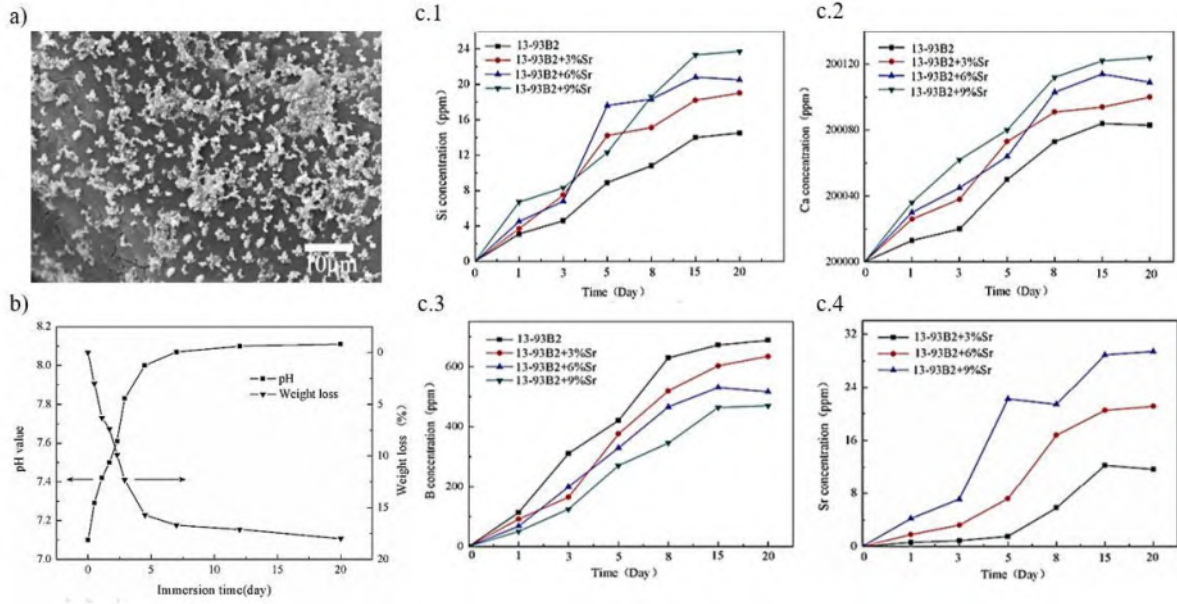


Figura 2.34 a) Imagen MEB de la superficie de los andamios tras inmersión en SBF por 5 días, b) curvas de pH y pérdida de peso, y c.1-c.4) concentraciones de iones de Si^{4+} , Ca^{2+} , B^{3+} y Sr^{2+} [94].

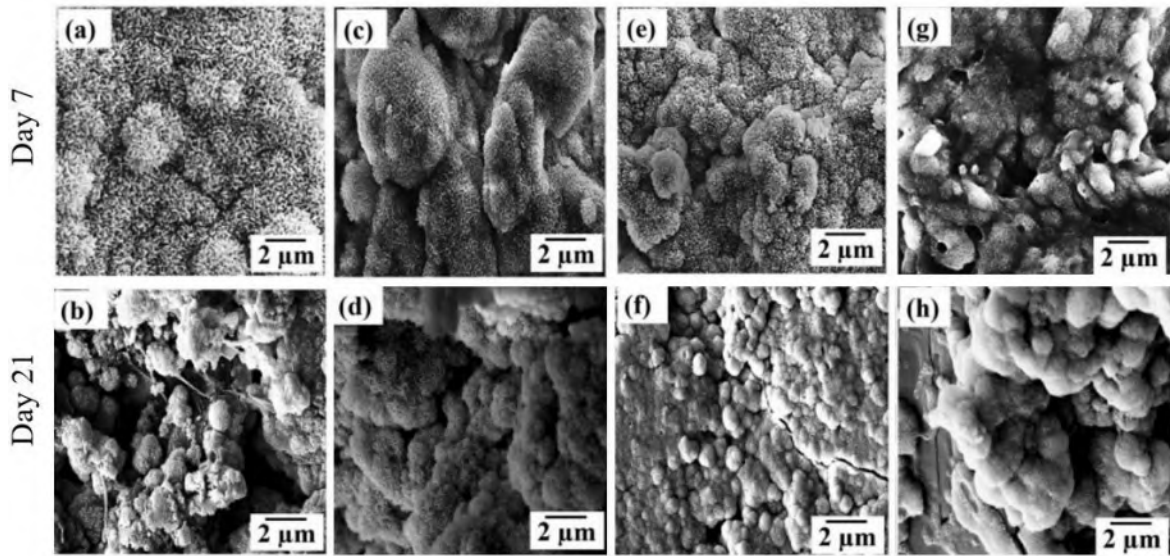


Figura 2.35 Imágenes MEB tras inmersión en SBF: (a, b) sin dopar, (c, d) 1SrBG, (e, f) 2SrBG y (g, h) 5SrBG [95].

Alasvand y col. [96] sintetizaron biovidrios que contenía estroncio dopados con Cu y Co. Tras 14 días en SBF, se observó formación de hidroxiapatita en forma de esferas que cubrieron completamente la superficie (Figura 2.36a). El pH de la solución aumentó significativamente entre los días 3 y 28 debido al intercambio de los iones de Ca^{2+} y H_3O^+ (Figura 2.36b.1). El análisis ICP mostró la liberación de iones terapéuticos de Cu^{2+} , Co^{2+} y Sr^{2+} , siendo más significativa en biovidrios con Sr. La mayor liberación de iones se asocia con el mayor radio atómico de Sr^{2+} , que afecta la cinética de liberación.

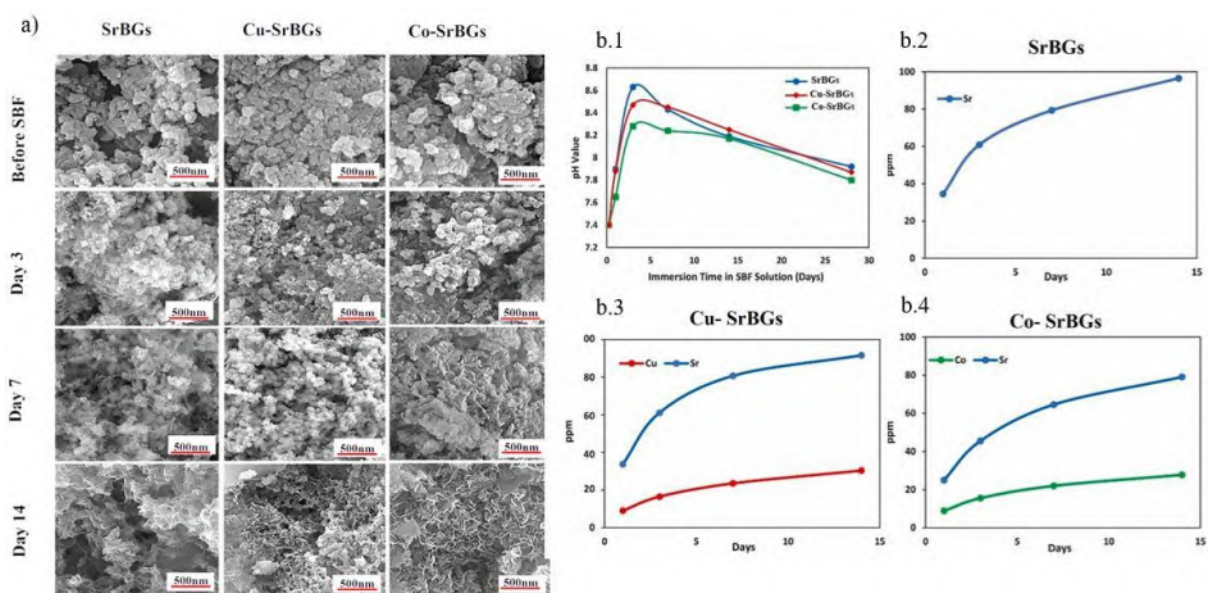


Figura 2.36 (a) Imagen MEB de las muestras tras inmersión en SBF, (b.1) valores de pH, (b.2-b.4) perfiles de liberación de Co^{2+} , Cu^{2+} y Sr^{2+} [96].

Anand y col. [97] evaluaron la bioactividad de biovidrios $80\text{SiO}_2-15\text{CaO}-5\text{P}_2\text{O}_5$ dopados con CuO y MgO tras inmersión en SBF durante 4 horas, 8 horas, 1 día, 7 días y 14 días. Detectaron lixiviación de iones, disolución y precipitación, lo que resultó en una capa de hidroxiapatita en la superficie. Las muestras dopadas con Cu mostraron mayor liberación de iones Si^{4+} y Ca^{2+} inicialmente, mientras que las muestras sin dopar liberaron menores cantidades debido a una menor área superficial. La disminución de P tras el primer día se atribuyó a la precipitación de fases de apatita en una solución sobresaturada.

El pH incrementó debido al intercambio de iones H_3O^+ , siendo más pronunciado en las muestras dopadas con Cu y Mg, ya que estos dopantes desestabilizan la estructura del vidrio, reduciendo su estabilidad química en medios acuosos (Figura 2.37).

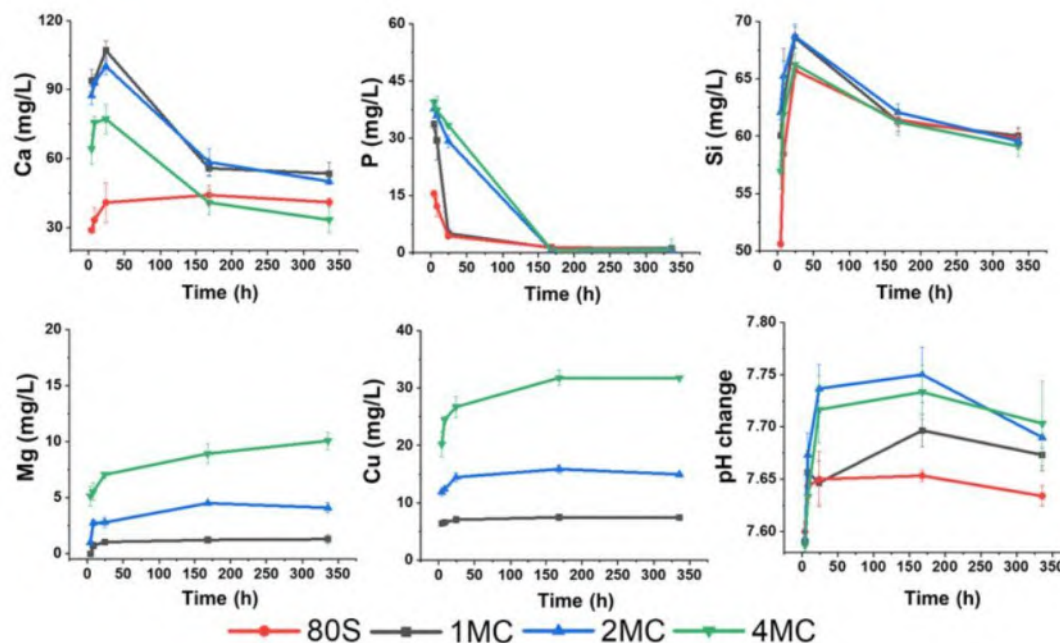


Figura 2.37 Perfiles de liberación de Ca, P, Si, Cu y Mg y valores de pH durante la inmersión en SBF [97].

2.10.2 Cultivo celular

Los cultivos celulares *in vitro* son herramientas esenciales para investigar el crecimiento y diferenciación celular, además de ser una fuente inagotable de material experimental. Permiten estudiar la producción y efectos de hormonas, factores de crecimiento, interleucinas y productos celulares. Actualmente, el cultivo celular se emplea ampliamente en pruebas de biocompatibilidad, evaluando tanto la toxicidad como la liberación de lixiviados que podrían generar efectos adversos *in vitro* e *in vivo* [98].

Existen múltiples líneas celulares adecuadas para evaluar la biocompatibilidad de materiales, siempre y cuando se conserven sus propiedades fisiológicas, bioquímicas y genéticas.

2.10.2.1 Ensayo WST-1

El ensayo WST-1 es una técnica ampliamente utilizada para la evaluación de la proliferación celular y la citotoxicidad, ofreciendo una cuantificación rápida y sensible de la viabilidad celular. Su principio se basa en la reducción de sales de tetrazolio a formazán, un complejo coloreado cuya concentración es proporcional al número de células viables y se mide espectrofotométricamente. La reducción del reactivo 2-(4-yodofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-(2,4-disulfofenil)-2H-tetrazolio (WST-1) ocurre tanto dentro como fuera de las mitocondrias. Esta actividad enzimática, exclusiva de células vivas, depende de su metabolismo, y su alteración por sustancias tóxicas puede ser detectada mediante este método. Los ensayos basados en tetrazolio han demostrado ser herramientas valiosas para medir la actividad metabólica celular [99].

El kit de WST-1 permite analizar la proliferación celular en respuesta a factores como compuestos farmacéuticos, agentes citotóxicos (p. ej., fármacos anticancerígenos), citocinas, mitógenos y factores de crecimiento. Este ensayo es sencillo, no requiere pasos adicionales como solubilización o lavado, y es más rápido y sensible que otros métodos basados en MTS, MTT o XTT.

Elahpour y col. [100] fabricaron andamios híbridos compuestos por un 30 % en peso de biovidrio dopado con ZnO y un 70 % de policaprolactona (PCL) mediante impresión 3D. Para evaluar su biocompatibilidad, se estudió el comportamiento *in vitro* a través de ensayos directos e indirectos de viabilidad celular, utilizando células mesenquimales humanas derivadas de médula ósea (hMSC). Las células fueron cultivadas en medio esencial mínimo α , suplementado con suero bovino fetal al 10 %, penicilina (60 IU/ml), estreptomicina (60 μ g/ml) y anfotericina B (2.5 μ g/ml), a 37 °C y 5 % de CO₂. Posteriormente, se realizaron los ensayos de viabilidad y proliferación celular utilizando el método WST-1, y se analizó la viabilidad celular mediante tinción vivo/muerto. En los análisis vivo/muerto, se observaron células viables en todos los tiempos para ambas composiciones. sin embargo, en los andamios ZnHyb80, se observó una mayor cantidad de células muertas (marcadas en rojo) después de 5 días (Figura 2.38a).

Los resultados de viabilidad celular indirecta no mostraron diferencias significativas entre los andamios no dopados (Hyb80) y los grupos control en los días 1, 5 y 7, lo que sugiere una excelente citocompatibilidad. Por otro lado, los andamios dopados con ZnO (Zn-Hyb80) no presentaron disminución en la cantidad de células metabólicamente activas después de 1 día, indicando que no hubo efecto citotóxico (Figura 2.38b).

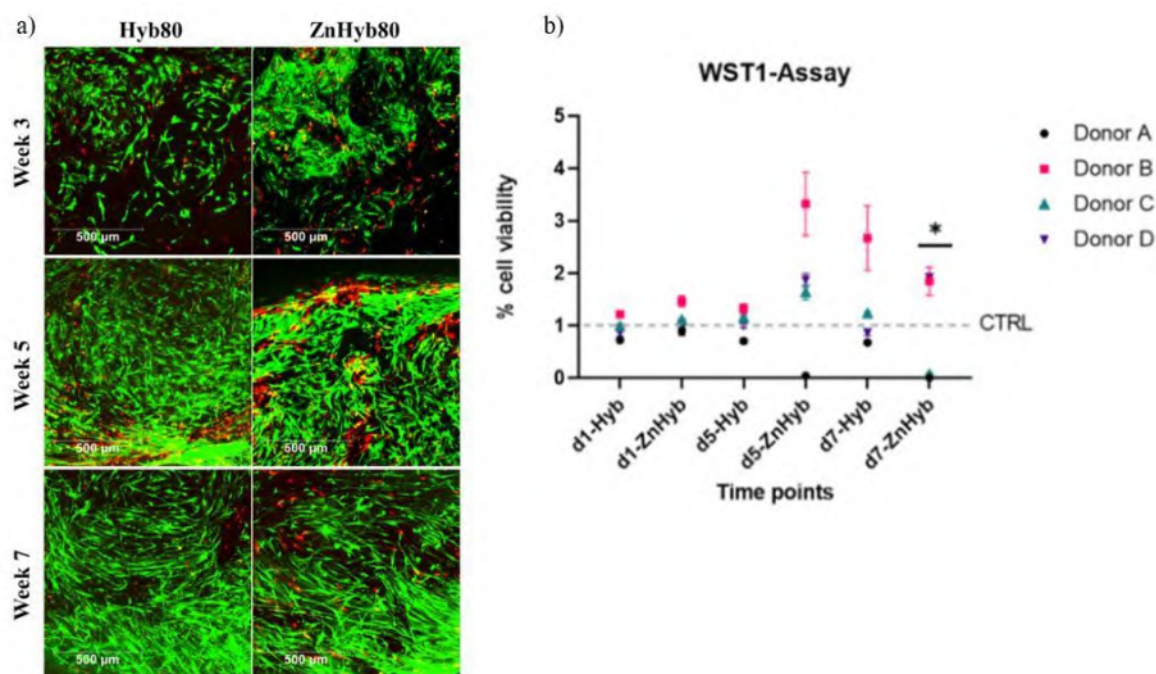


Figura 2.38 a) Tinción vivo/muerto a las 3, 5 y 7 semanas, b) ensayo de viabilidad celular indirecta WST-1, expresados como media aritmética $\pm$ error estándar; *diferencia estadísticamente significativa entre d7-ZnHyb y todos los demás grupos ($p < 0.001$ con corrección para pruebas múltiples) [100].

Magyari y col. [101] fabricaron biovidrios de composición $60\text{SiO}_2\text{-}32\text{CaO-}8\text{P}_2\text{O}_5$ dopados con CuO en concentraciones de 0, 0.1, 0.2 y 0.5 % mol, con el objetivo de evaluar el impacto del contenido de cobre en su biocompatibilidad. Éstos fueron sometidos a estudios *in vitro* para analizar la viabilidad celular mediante el ensayo WST-1, utilizando células de queratinocitos humanos (HaCaT, Cell Line Service, Alemania). Los resultados mostraron que

los biovidrios dopados con 0.1 y 0.2 % mol de CuO promovieron una mayor viabilidad celular, indicando que estas concentraciones no son tóxicas para las células. En contraste, los biovidrios dopados con 0.5 % mol de CuO presentaron una disminución significativa en la viabilidad celular, lo que sugiere un efecto citotóxico en dicha concentración (Figura 2.39).

Se concluyó que un mayor contenido de CuO en la composición del biovidrio incrementa la cinética de liberación de iones Cu^{2+} , lo que resulta en un aumento de la citotoxicidad y, por ende, una reducción en la viabilidad celular.

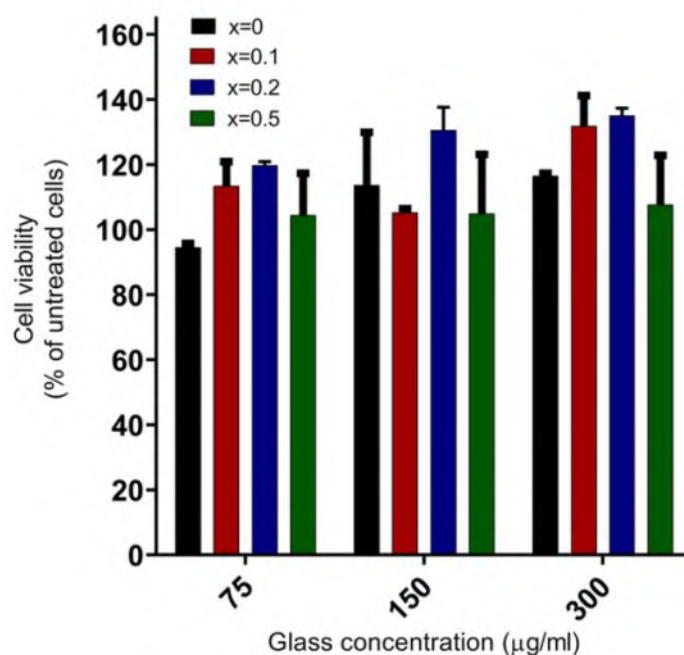


Figura 2.39 Viabilidad celular de HaCaT después de 24 h de exposición a diferentes concentraciones de CuO ($p < 0.05$) [101].

2.10.3 Ensayos antibacterianos

Los cultivos bacterianos son herramientas fundamentales en la investigación médica y científica, ya que permiten tanto la identificación y estudio de agentes infecciosos como la evaluación de la efectividad de tratamientos, incluidos los antibióticos. Su análisis requiere instalaciones de laboratorio adecuadas con nivel de bioseguridad 2, personal capacitado,

cepas de referencia para control de calidad y protocolos estándar. Las bacterias son organismos unicelulares que existen en diversas formas y ubicaciones, incluyendo el cuerpo humano. Mientras algunas bacterias son inofensivas o incluso beneficiosas, otras son patógenas y pueden replicarse rápidamente en el organismo, provocando enfermedades [102].

Las bacterias han desarrollado una pared celular que las protege del entorno y les permite la importación y exportación de nutrientes seleccionados y productos de desecho celular. La pared celular bacteriana es una estructura en forma de malla de múltiples capas, compuesta de proteínas, lípidos y carbohidratos. En relación con las diferencias en la estructura de la pared celular, las bacterias se clasifican en función de su tinción Gram-positiva o Gram-negativa. La Gram-positiva consiste en una capa gruesa de peptidoglicano (PNG) que mide 20-80 nm contienen ácidos teicoicos y que están unidos covalentemente al PGN, mientras que la pared celular Gram-negativa es más compleja, pero contiene una capa PNG más delgada de 7-8 nm que se coloca entre la membrana celular y la membrana externa [103].

2.10.3.1 Patógenos comunes

Staphylococcus aureus (*S. aureus*):

Bacteria caracterizada por una morfología de cocos en racimos, gram-positiva, este patógeno es responsable de diversas infecciones, como lesiones cutáneas, mastitis, infecciones digestivas, osteomielitis, insuficiencia cardíaca y septicemia. Entre los factores que aumentan su virulencia se encuentran:

- Proteínas antifagocíticas: Reducen la eliminación por el sistema inmune.
- Lipasa: Facilita la penetración a través de la piel.
- Coagulasa: Favorece la formación de abscesos.
- Enterotoxinas: Inducen vómitos y diarrea.
- Exotoxinas: Destruyen leucocitos, causan necrosis y pueden producir fiebre, escalofríos, shock y erupciones cutáneas.

S. aureus se transmite por contacto directo entre personas, aerosoles o superficies contaminadas. Es un organismo robusto, resistente a agentes de limpieza y antimicrobianos, capaz de sobrevivir durante semanas en el ambiente [104].

Escherichia coli (*E. coli*):

Morfológicamente caracterizada como bacilos gram-negativos, es residente habitual del tracto intestinal humano, puede causar desde malestar estomacal leve hasta infecciones urinarias, sepsis y meningitis. Algunas cepas patógenas incluyen:

- *E. coli enteropatógena* (EPEC): Provoca diarrea en lactantes.
- *E. coli enterotoxigénica* (ETEC): Causa diarrea infantil y del viajero.
- *E. coli enterohemorrágica* (EHEC): Asociada a colitis hemorrágica y síndrome urémico hemolítico.
- *E. coli enteroinvasiva* (EIEC): Produce una enfermedad similar a la shigelosis.
- *E. coli enteroagregativa* (EAEC): Relacionada con diarrea aguda y crónica [104].

Muchas cepas de *E. coli* producen biopelículas que les permiten adherirse a dispositivos médicos, como catéteres e implantes quirúrgicos, aumentando el riesgo de infecciones durante procedimientos hospitalarios.

2.10.3.2 Impacto en implantes

La inserción de implantes es una práctica común en la medicina moderna para reemplazar tejidos o partes del cuerpo. Sin embargo, estos procedimientos conllevan un riesgo significativo de infecciones bacterianas, que pueden provocar el fracaso del implante y un gran sufrimiento para el paciente. Los antibióticos son una opción estándar para tratar estas infecciones (Tabla 2.11).

Sin embargo, el creciente problema de la resistencia antimicrobiana ha cuestionado su uso, generando un debate sobre alternativas más eficaces.

Tabla 2.11 Antibióticos para tratar diferentes tipos de infecciones [84]

Antibiótico	Efecto biológico principal
Amoxicilina	Betalactámico semisintético
Ciprofloxacino	Fluoroquinolona de segunda generación
Gentamicina	Aminoglucósido
Levofloxacino	Inhibidor sintético inhibidor de la replicación del ADN (fluoroquinolona)
Moxifloxacino	Fluoroquinolona
Rifampicina	Antibiótico semisintético
Teicoplanina	Tratamiento de bacterias grampositivas
Tetraciclina	Amplio espectro
Triclosán	Antibacteriano y antifúngico
Vancomicina	Glicopéptidos eficaz contra grampositivos

2.10.3.3 Metales como alternativa antibacteriana

Ante el aumento de resistencia bacteriana, los metales han emergido como una opción prometedora debido a sus propiedades antimicrobianas. Además, varios metales son esenciales para funciones celulares y metabólicas, incluyendo cobre (Cu), zinc (Zn), estroncio (Sr), plata (Ag) y oro (Au). Los modos de acción reportados incluyen:

- Interrupción de la membrana celular.
- Alteración de complejos proteicos esenciales.
- Degradación de componentes clave como ADN y proteínas

El uso de metales podría representar una solución innovadora para prevenir infecciones postoperatorias y mitigar la resistencia bacteriana [103, 105].

Ranga y col. [106] desarrollaron andamios de vidrio bioactivo dopado con iones metálicos como Zn^{2+} , Mg^{2+} y Sr^{2+} para aplicaciones en ingeniería de tejido. Para prevenir infecciones bacterianas durante cirugías, evaluaron *in vitro* las propiedades antimicrobianas de las muestras utilizando cuatro cepas patógenas: *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Candida albicans* y *Staphylococcus aureus*, agentes comunes de infecciones quirúrgicas. Emplearon

el método de difusión en disco de agar, colocando discos de las muestras en cajas Petri con cultivos bacterianos en medios adecuados, incubándolos a 37 °C durante 24 horas. Las muestras dopadas mostraron halos de inhibición evidentes, mientras que las no dopadas no generaron dicho efecto. Entre cepas estudiadas, *S. aureus* presentó halos de inhibición ligeramente mayores en comparación con *B. cereus* (Figura 2.40a-c).

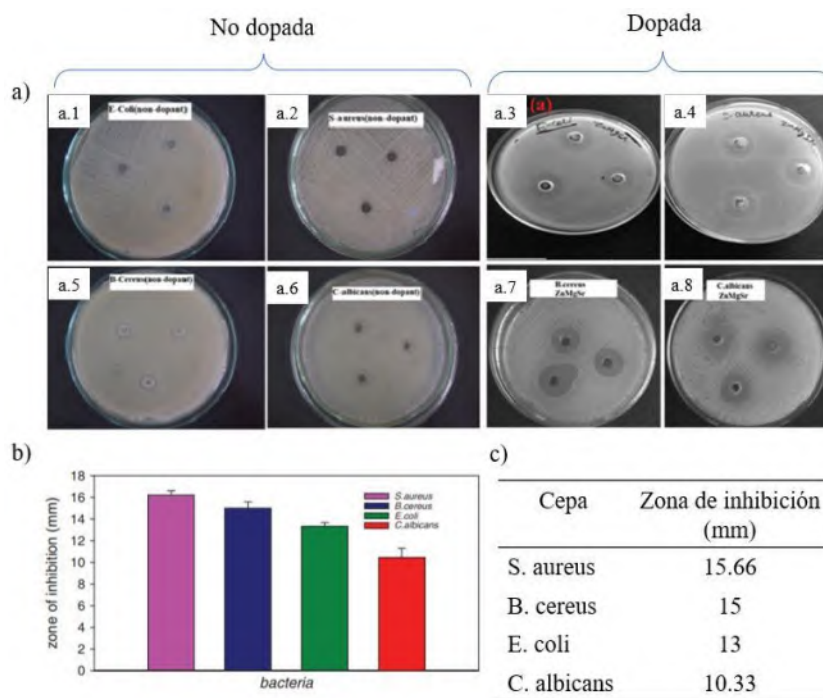


Figura 2.40 a) Halos de inhibición en discos dopados y no dopados con cepas: (a.1, a.3) *E. coli*, (a.2, a.4) *S. aureus*, (a.5, a.7) *B. cereus* y (a.6, a.8) *C. albicans*. b, c) Tamaños de zona de inhibición en milímetros [106].

Babu y col. [107] fabricaron vidrios bioactivos dopados con diferentes concentraciones de ZnO (0-10 % mol) para evaluar su actividad antibacteriana mediante el método de difusión en disco frente a *S. aureus* (Gram-positivo) y *E. coli* (Gram-negativo), con incubaciones de 24 y 48 horas. Las muestras dopadas formaron halos inhibidores, siendo más significativos para *E. coli*. La densidad óptica (D.O.) a 600 nm también fue analizada en intervalos de 0 -7 horas, mostrando que la cepa *E. coli* presentó un crecimiento inicial, pero ambas cepas

evidenciaron una disminución en la D.O. con concentraciones de ZnO de 8 % mol, destacando un efecto antibacteriano potenciado. Este efecto se atribuye al estrés oxidativo inducido por el ZnO, que daña la pared celular bacteriana y otras estructuras críticas (Figura 2.41a-d).

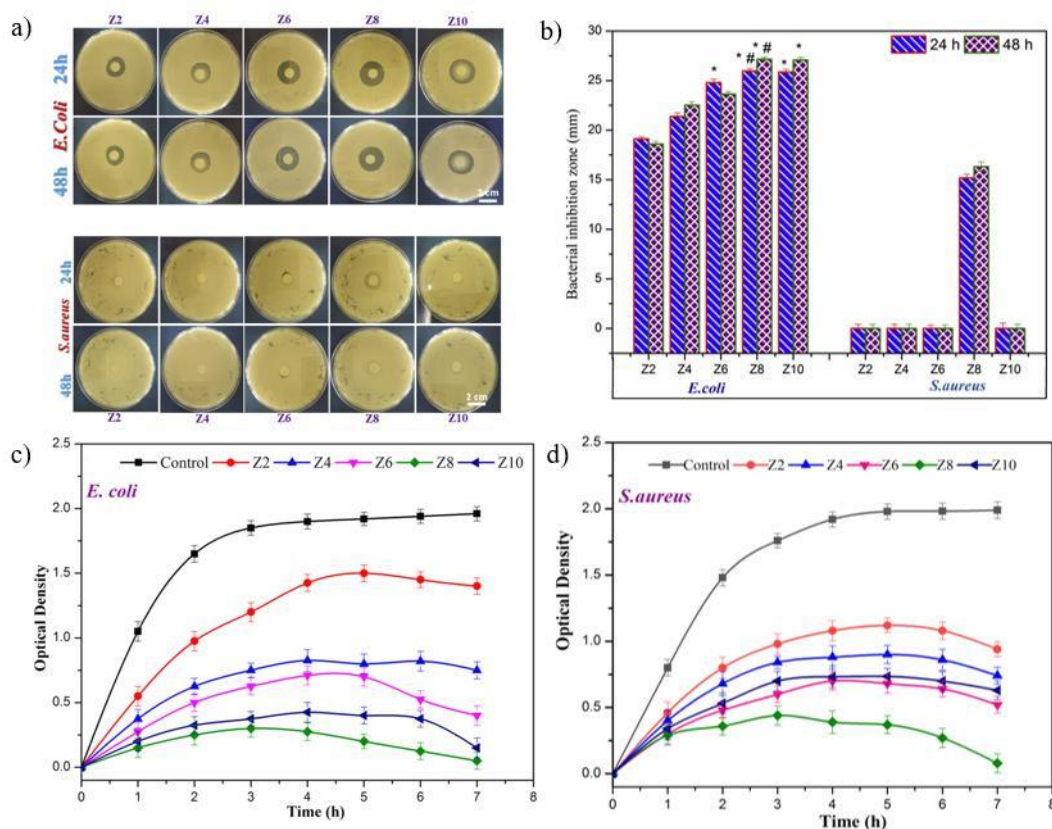


Figura 2.41 a) Halos de inhibición tras 24-48 h de incubación. B) Zonas de inhibición en mm (media $\pm$ DE; $p < 0.05$ y $p < 0.01$). c, d) Dinámica de D.O. durante 7 h [107].

Paramita y col. [108] investigaron el Zn como agente antibacteriano en biovidrios $55\text{SiO}_2\text{-}40\text{CaO-}5\text{P}_2\text{O}_5$ en % mol destinados a la regeneración de tejido óseo. Analizaron la actividad antibacteriana frente a cepas asociadas con osteosepsis (*E. coli*, *S. aureus*, *Klebsiella pneumonia*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus mirabilis* y *Enterococcus faecalis*). Se emplearon biovidrios no dopados (nBGC) y dopados (Zn-nBGC) para evaluar la zona de

inhibición y la concentración mínima inhibitoria (CMI). Los resultados mostraron un aumento en la inhibición bacteriana proporcional a la concentración de Zn, confirmada por mediciones de D.O. y halos de inhibición. Adicionalmente, las muestras dopadas presentaron una actividad anti-biopelícula mejorada (Figura 2.42a-d).

Manoochchhri y col. [109] analizaron los efectos de la incorporación de Sr como ion dopante en la composición de biovidrios para la fabricación de andamios, con potencial aplicación en medicina regenerativa. En sus estudios, evaluaron la actividad antibacteriana frente a cepas *S. aureus* (ATCC 25923) y *E. coli* (ATCC 25922). Inicialmente, determinaron las concentraciones mínimas inhibitoria (CMI) y bactericida (CMB) de los polvos dopados y no dopados mediante cultivos en agar Mueller Hinton (MH), incubados a 37 °C con concentraciones de biovidrio entre 100 y 1000 µg/ml. Posteriormente, evaluaron el efecto antibacteriano de los andamios mediante ensayos de difusión en agar MH, inoculando las cepas y evaluando la inhibición del crecimiento bacteriano (Figura 2.43a).

Los resultados de los andamios de biovidrio dopados con Sr presentaron un efecto antibacteriano significativo contra *S. aureus*, mientras que los andamios no dopados exhibieron una menor actividad. Los autores atribuyen esta eficacia a la liberación de iones Si, Ca, P y Sr, generando un aumento en la presión osmótica desfavorable para el crecimiento bacteriano. Además, la sustitución de Ca por Sr incrementó significativamente la solubilidad del biovidrio y la tasa de liberación de iones, potenciando su actividad antimicrobiana (Figura 2.43b).

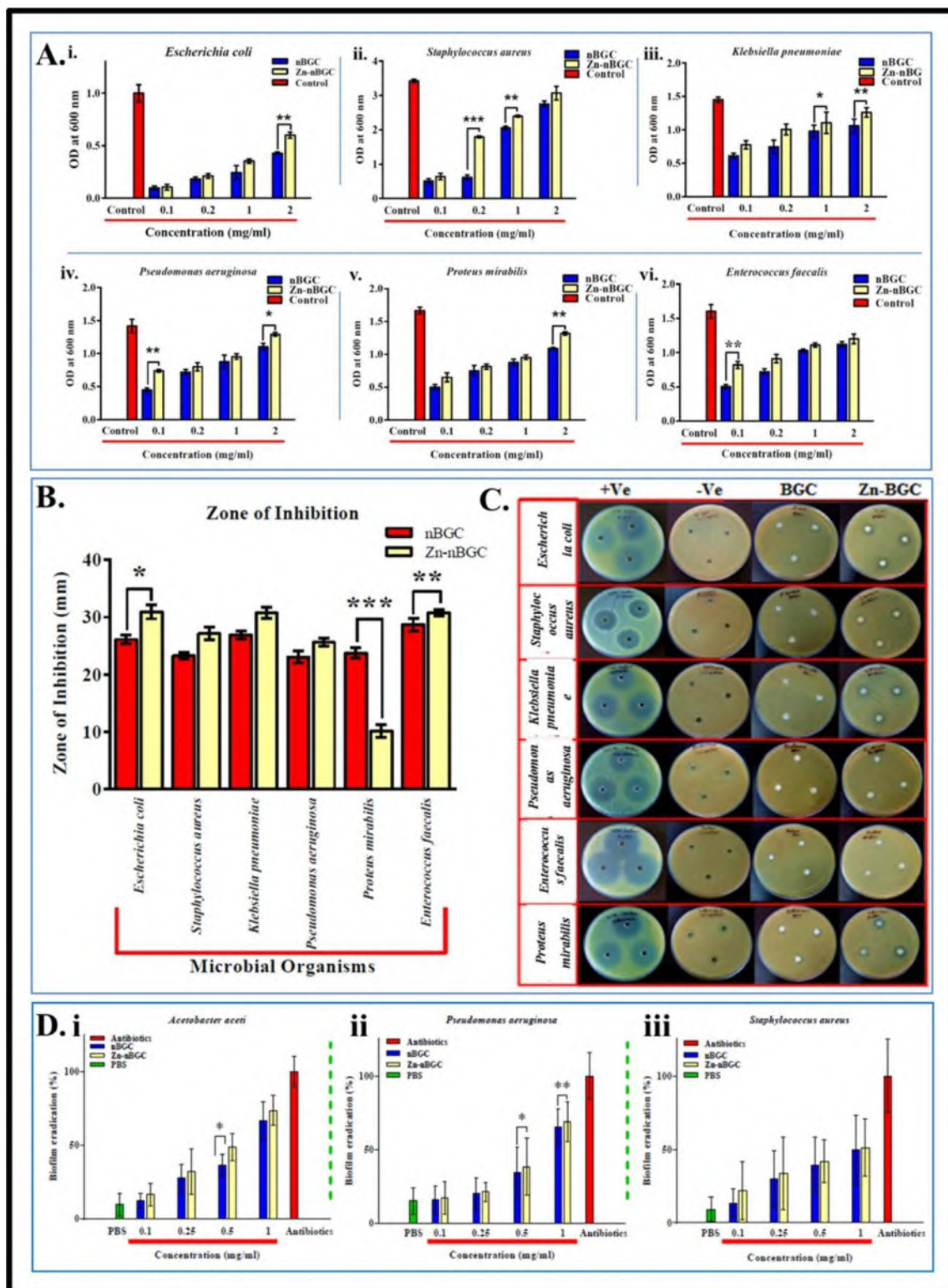


Figura 2.42 a) CMI en diferentes concentraciones de biovidrio. b) Halos de inhibición tras 24 h de incubación. c) Zonas de inhibición gráficas. d) Potencial de erradicación de biopelículas para *A. aceti*, *P. aeruginosa* y *S. aureus* ($***p < 0.0001$, $***p < 0.001$, $**p < 0.01$ y $*p < 0.05$) [108].

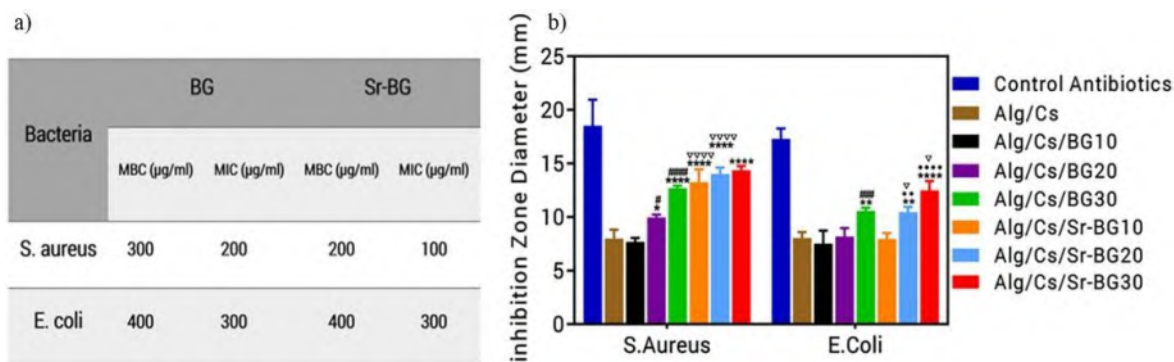


Figura 2.43 a) Actividad antimicrobiana de biovidrios dopados y sin dopar. b) Evaluación de la actividad antibacteriana de los andamios [109].

Baheiraei y col. [110] desarrollaron andamios de vidrio bioactivo basados en el sistema $\text{CaO-SiO}_2\text{-Na}_2\text{O-P}_2\text{O}_5$ dopado con un 5 % en peso de Sr mediante liofilización. Evaluaron la actividad antibacteriana contra las cepas *S. aureus* (ATCC 28923) y *E. coli* (ATCC 28922). Los ensayos consistieron en añadir 2 mL de medio de cultivo a los andamios (175 mg/mL) e incubarlos bajo condiciones aeróbicas. Posteriormente, se inocularon con microorganismos a una concentración final de 10^6 UFC/mL y se incubaron a 37 °C. Finalmente, las muestras fueron diluidas y cultivadas en cajas Preti con agar Mueller Hinton.

Los resultados indicaron que *E. coli* no formó colonias, ya que fue inhibida completamente por los andamios dopados y no dopados (Figura 2.44a y b). En cambio, en el caso de *S. aureus*, los andamios no dopados no mostraron efecto antibacteriano, mientras que los dopados con Sr provocaron una ligera inhibición (Figura 2.44c y d). Este efecto se debe a la liberación de iones Ca, P y Sr, que aumentan la presión osmótica y alteran actividades bacterianas esenciales, como la glucólisis y la translocación de protones transmembrana. La disolución de los iones de Sr generó un entorno adverso para el crecimiento bacteriano.

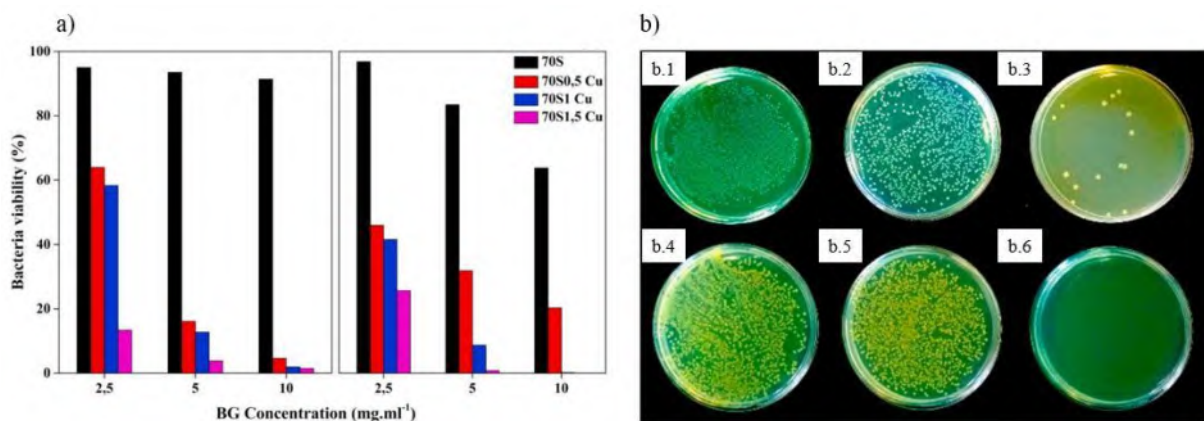


Figura 2.45 a) Viabilidad bacteriana: izquierda *E. coli*, derecha *S. aureus*. b) Formación de colonias: (b.1-b.3) *E. coli*, b.4-b.6) *S. aureus* [111].

2.11 Otros biomateriales funcionalizados

Patrick y col. [112] desarrollaron microgeles nanoporosos inyectables diseñados para la vascularización y regeneración ósea en defectos de tamaño crítico, utilizando una técnica de emulsión simple agua en aceite (W/O). A partir de estudios *in vitro* evaluaron la proliferación y viabilidad celular en microgeles con células madre mesenquimales (MSC). Tras la siembra de MSC, se observó adherencia celular a la superficie en una hora. A las 12 horas, las células comenzaron a extenderse, cubriendo completamente la superficie del microgel en 24 h (Figura 2.46a). Un análisis estadístico (ANOVA de una vía) no evidenció diferencias significativas en el número de células adheridas ni en la fracción de superficie cubierta por células a lo largo del tiempo (Figura 2.46b). Sin embargo, el área de propagación celular mostró un aumento significativo a las 12 y 24 horas en microgeles con hidroxiapatita (HA), sin que la adición de quitosano o HA alterara la adhesión celular respecto a los microgeles de gelatina de control.

Para validar su aplicación mínimamente invasiva, los microgeles fueron inyectados a través de agujas hipodérmicas (calibre 16-25). Las mediciones de fuerza de inyección mostraron resultados comparables con soluciones de PBS, sin afectar significativamente la viabilidad celular tras la inyección (Figura 2.46c-e). Esto confirma que los microgeles son inyectables y adecuados para rellenar defectos óseos complejos.

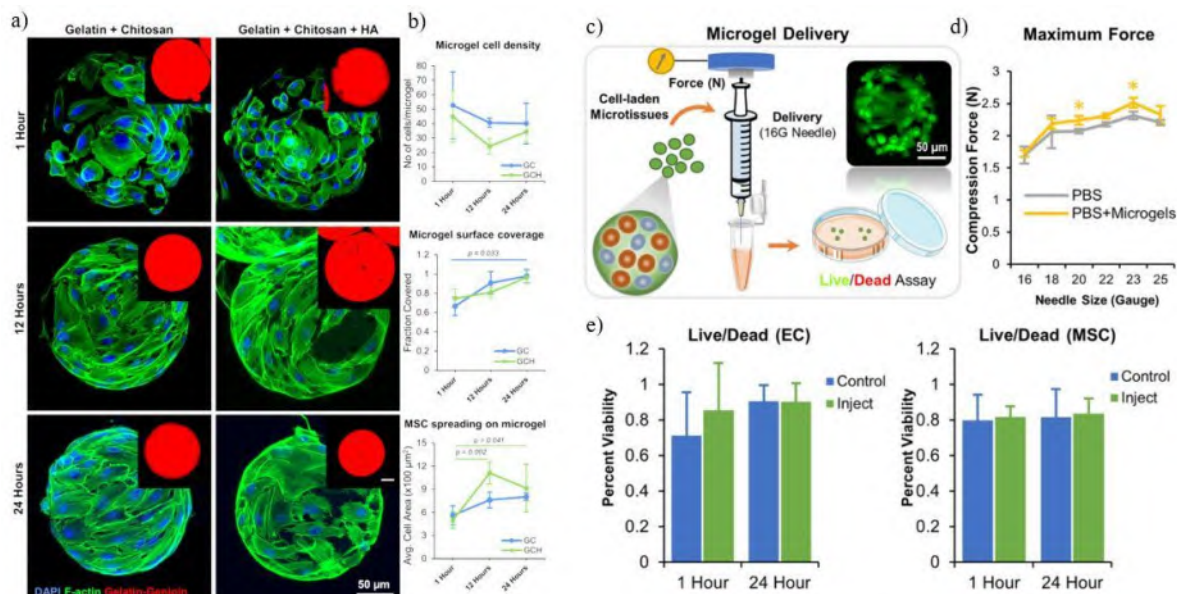


Figura 2.46 a) Análisis osteogénico mediante tinción de células con F-actina citoesquelética. b) Representación del número promedio de células madre mesenquimales (MSC) adheridas por microgel, la fracción de superficie del microgel cubierta por MSC adheridas y el área promedio ocupada por MSC adheridas a lo largo del tiempo (n = 5). c) Evaluación de la inyectabilidad de los microgeles. d) Mediciones de la fuerza de inyección de microgeles acelulares utilizando agujas hipodérmicas de diferentes calibres. e) Análisis de viabilidad celular de MSC tras la inyección [112].

Hong y col. [113] fabricaron microesferas de vidrio bioactivo ($55\text{SiO}_2\text{-}40\text{CaO-}5\text{P}_2\text{O}_5$ %mol) dopadas con Sr (0, 5 y 10 % mol) para investigar su respuesta biológica y mecanismo de liberación de fármacos. Los estudios de viabilidad y la proliferación de las células MC3T3-E1, no mostraron efecto citotóxico (Figura 2.47a). Utilizando sulfato de gentamicina como modelo, observaron que la estructura porosa de las microesferas facilitó una liberación más rápida del fármaco, alcanzando hasta 96.2% frente al 40% de los polvos iniciales (Figura 2.47b). La incorporación de Sr retrasó la liberación del fármaco, favoreciendo un control sostenido. En ensayos osteogénicos, las microesferas dopadas con Sr aumentaron la actividad de fosfatasa alcalina (ALP) y la formación de nódulos mineralizados destacando su potencial para aplicaciones regenerativas (Figura 2.47c).

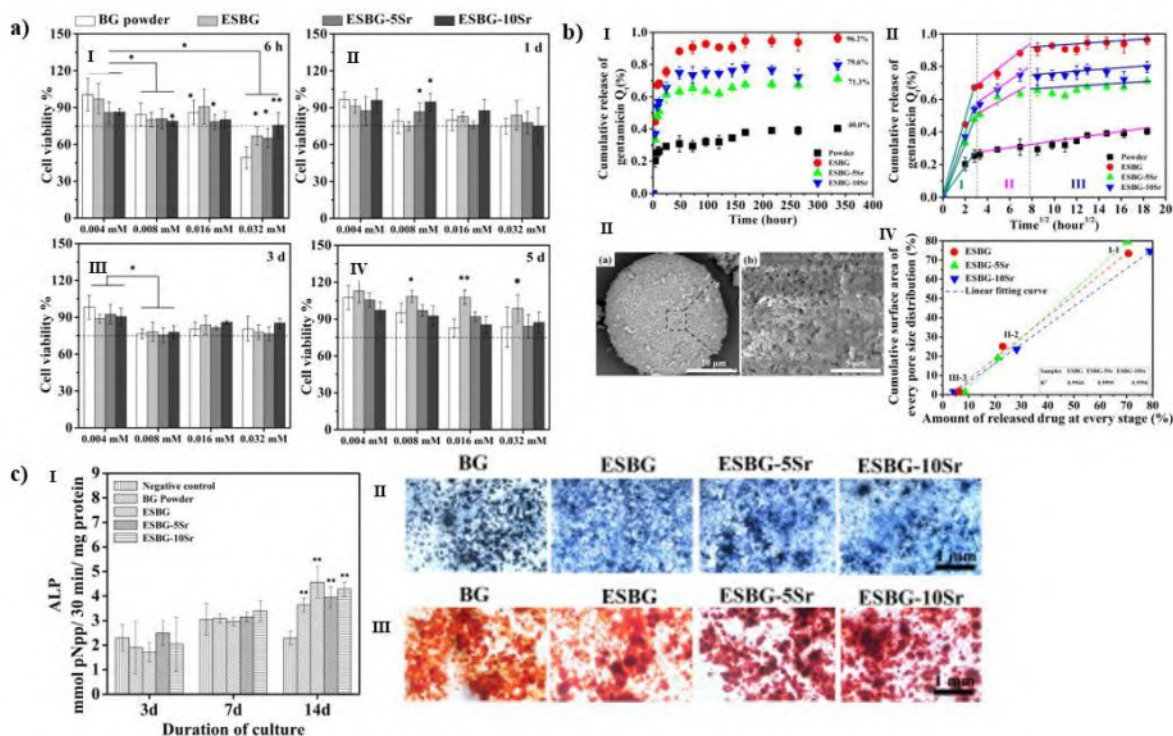


Figura 2.47 a) Evaluación de la viabilidad y proliferación de las células osteoblásticas MC3T3-E1. b) Perfil de liberación de fármaco en función del tiempo. c) Ensayos osteogénicos, incluyendo actividad de ALP y formación de nódulos mineralizados evaluados mediante tinción con rojo de alizarina (ARS) [113].

Vecchino y col. [114] evaluaron microesferas de vidrio bioactivo dopadas con Cu (1, 2.5, 5 % at.) mediante estudios en SBF. La formación de hidroxiapatita (HA) en la superficie se observó a partir de 14 días, correlacionada con la liberación de iones Ca^{2+} , Cu^{2+} , SiO_4^{4-} y PO_4^{3-} . Estos resultados confirman la capacidad de las microesferas para inducir bioactividad y favorecer la nucleación de HA en un medio simulado (Figura. 2.48).

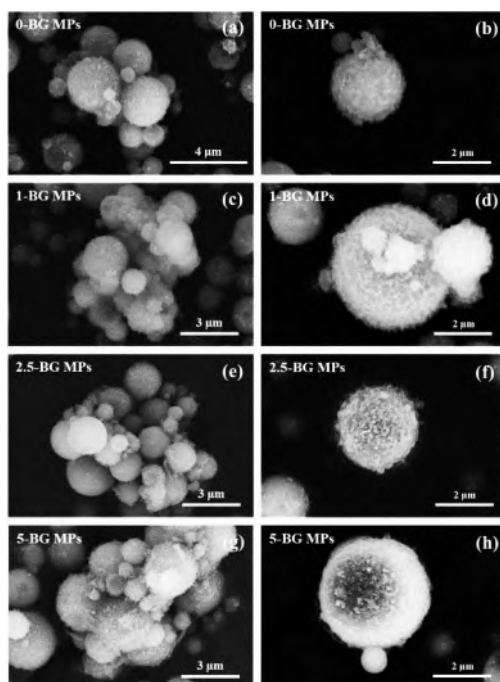


Figura 2.48 Imágenes obtenidas mediante microscopía electrónica de barrido (MEB) de partículas de vidrio bioactivo (BG) después de 14 días de inmersión en fluido corporal simulado (SBF). Las imágenes muestran partículas aglomeradas (a, c, e, g) e individuales (b, d, f, h) de las diferentes muestras sintetizadas, destacando la formación de estructuras características tras el tratamiento [114].

El desarrollo de biomateriales funcionales para aplicaciones en medicina regenerativa ha sido ampliamente estudiado como se evidenció en los materiales mencionados anteriormente. Es fundamental considerar que, tras la implantación de un biomaterial, se genera una interacción dinámica entre el sistema inmunológico del huésped y el biomaterial implantado. Este proceso da lugar a una respuesta tisular específica que involucra complejos mecanismos biológicos. Comprender estas interacciones y el comportamiento del biomaterial implantado es crucial para optimizar su desempeño y garantizar su biocompatibilidad y eficacia en aplicaciones médicas [115].

2.12 Respuesta y comportamiento de un biomaterial

Zhang y col. [116] describen de manera detallada las respuestas biológicas que ocurren tras la implantación de un biomaterial. Al ser implantados, los biomateriales entran en contacto con la sangre y los fluidos corporales, desencadenando una serie de eventos biológicos. La cantidad y el tipo de proteínas que se adsorben en la superficie del implante dependen de las características físico-químicas del material. Estas proteínas influyen significativamente en el reconocimiento y activación de células inmunes, desencadenando respuestas inmunológicas complejas que incluyen la reacción a cuerpo extraño (FBR).

1. *Inflamación aguda*

Este proceso comienza una hora después de la implantación. Los mastocitos y leucocitos polimorfonucleares (PMN, principalmente neutrófilos) se convierten en las células predominantes durante las primeras 48 horas. Estas células liberan enzimas proteolíticas y especies reactivas de oxígeno (ROS) para combatir posibles patógenos infiltrados. Adicionalmente, secretan citocinas como interleucina-8 (IL-8) para atraer monocitos y macrófagos al sitio de la herida. Los macrófagos, a su vez, liberan mediadores proinflamatorios como IL-1, IL-6, IL-8, TNF- α y diversas quimiocinas, que amplifican el reclutamiento de leucocitos. Paralelamente, los mastocitos liberan histamina, lo que potencia la respuesta inmune y facilita la migración de macrófagos al implante.

2. *Inflamación crónica*

Esta fase comienza entre los días 4 y 7 tras la implantación y se caracteriza por la presencia de monocitos y linfocitos alrededor del material del biomaterial. Los monocitos se diferencian en macrófagos, los cuales desempeñan un papel crucial en la regulación inmunológica y la reparación tisular. Aunque los macrófagos intentan fagocitar el biomaterial, el tamaño del implante generalmente impide su digestión completa. Esto conduce a la formación de células gigantes de cuerpo extraño multinucleadas (FBGC) mediante la acción de citocinas como IL-4 e IL-13, secretadas por mastocitos y linfocitos.

En respuesta a estas interacciones celulares, se liberan factores de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y el factor de crecimiento transformante beta (TGF- β), los cuales estimulan la migración de fibroblastos al sitio del implante. Los fibroblastos depositan colágeno en exceso, contribuyendo a la formación de una cápsula fibrótica que encapsula el material. Esta cápsula, formada predominantemente por fibroblastos y miofibroblastos activados por TGF- β , alcanza su máxima densidad alrededor de los 28 días. Además, los linfocitos T y las células B también desempeñan roles importantes al influir en la respuesta inflamatoria y en la generación de anticuerpos. En las etapas finales de este proceso, la secreción de VEGF por células mieloides estimula la vascularización dentro de la cápsula fibrótica, proporcionando un entorno funcional alrededor del implante (Figura 2.49).

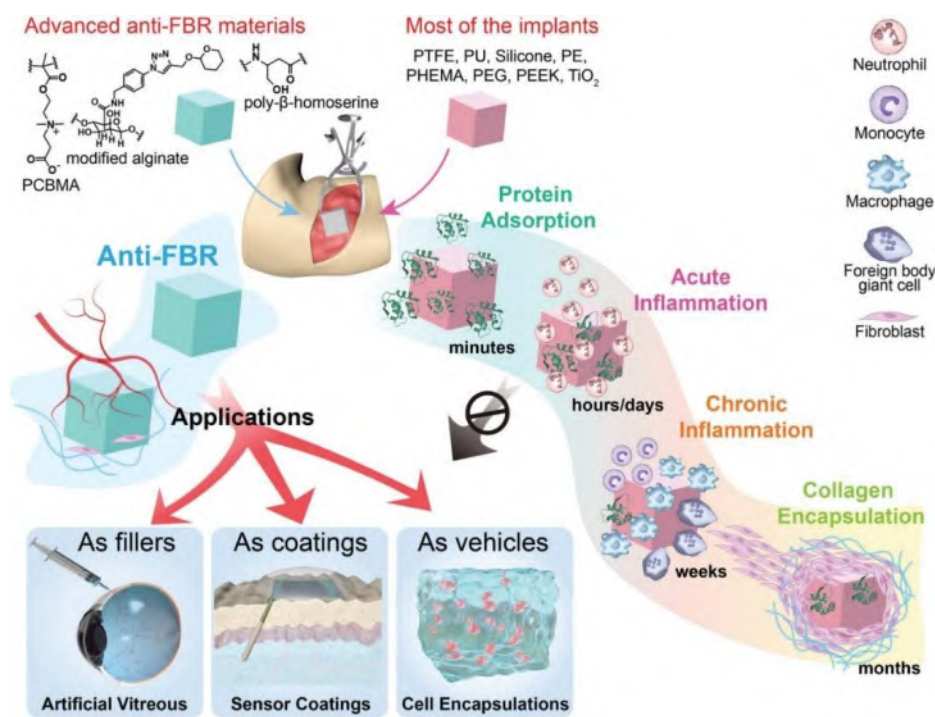


Figura 2.49 Esquema representativo del comportamiento de un biomaterial tras su implantación [116].

2.13 Estado actual

En la actualidad, los andamios porosos fabricados a partir de vidrios bioactivos siguen siendo un foco central de investigación en medicina regenerativa. Estos materiales destacan por su capacidad para formar enlaces fuertes con el tejido óseo huésped mediante la generación de una capa de hidroxiapatita (HA) en fluidos biológicos. Además, presentan propiedades clave como osteointegración, osteoinducción y osteoconducción, fundamentales para aplicaciones clínicas [117].

El potencial de los vidrios bioactivos no se limita a los andamios porosos; también se extiende a diversas aplicaciones innovadoras. Por ejemplo, se han desarrollado hidrogeles o hidrogeles inyectables con capacidades terapéuticas en el tratamiento de cáncer, trastornos neurodegenerativos, cicatrización de heridas, regeneración de tejidos y sistemas de administración de fármacos. Estos materiales ofrecen ventajas como la encapsulación y protección de agentes activos en condiciones adversas, como la degradación enzimática y las respuestas inmunes [118, 119].

Además, la funcionalización de biovidrios mediante la incorporación de iones trivalentes (Eu^{3+} , Gd^{3+} , Yb^{3+} , Nb^{3+}) ha ampliado sus aplicaciones hacia el diagnóstico temprano de tumores malignos y tratamientos oncológicos, gracias a sus excepcionales propiedades ópticas, magnéticas y luminiscentes. Por otro lado, oligoelementos como Ag, Co, Cu, Ga, Mg, Se, Sr y Zn han demostrado ser útiles en procesos cicatrización de heridas y como agentes antibacterianos. Estos elementos no solo inhiben la formación de biopelículas resistentes, sino que también actúan como hemostáticos y promueven la regeneración tisular [120, 121].

CAPÍTULO 3. DESARROLLO EXPERIMENTAL

En este capítulo se detalla la metodología empleada para la síntesis del biovidrio CEL2 y la preparación de los andamios correspondientes, tanto sin dopar como dopado con óxidos metálicos (ZnO, SrO y CuO). Se describe el desarrollo, los materiales, equipos utilizados, y las técnicas de caracterización aplicadas.

3.1 Fabricación del vidrio bioactivo CEL2

El biovidrio CEL2 no dopado y dopado se fabricó por el método convencional de fusión y temple. La síntesis partió de una mezcla estequiométrica de polvos reactivos de SiO₂, P₂O₅, CaO, NaCO₂, MgO, K₂O, y ZnO, SrO o CuO, cuya composición final se detalla en la Tabla 3.1. Todos los reactivos fueron adquiridos de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) con una pureza del 99%.

El proceso comenzó con la mezcla homogénea de los polvos de óxidos en un molino de rodillos durante 30 minutos. Posteriormente, la mezcla obtenida se colocó en un crisol de sílice fundida y se sometió al siguiente ciclo térmico (Figura 3.1) en un horno de cámara CARBOLITE HTF 1700°C. Durante el proceso, inicialmente se realizó una etapa de desgasificación, en la cual el material se calentó hasta 950 °C y se mantuvo a dicha temperatura durante 90 minutos. Posteriormente, se llevó a cabo la etapa de fusión, elevando la temperatura hasta 1350 °C, con una permanencia adicional de 90 minutos para asegurar la completa homogeneización del biovidrio. Al finalizar el ciclo térmico, la masa fundida se vertió en agua fría para formar una frita, posteriormente se secó en una mufla THERMO SCIENTIFIC durante 3 horas a 120 °C. Finalmente, la frita seca se pulverizó utilizando un molino de discos vibratorio RS 200 RETSCH, y el material resultante se tamizó a través de una malla 230 (63 µm), obteniendo un polvo fino adecuado para las etapas posteriores de fabricación.

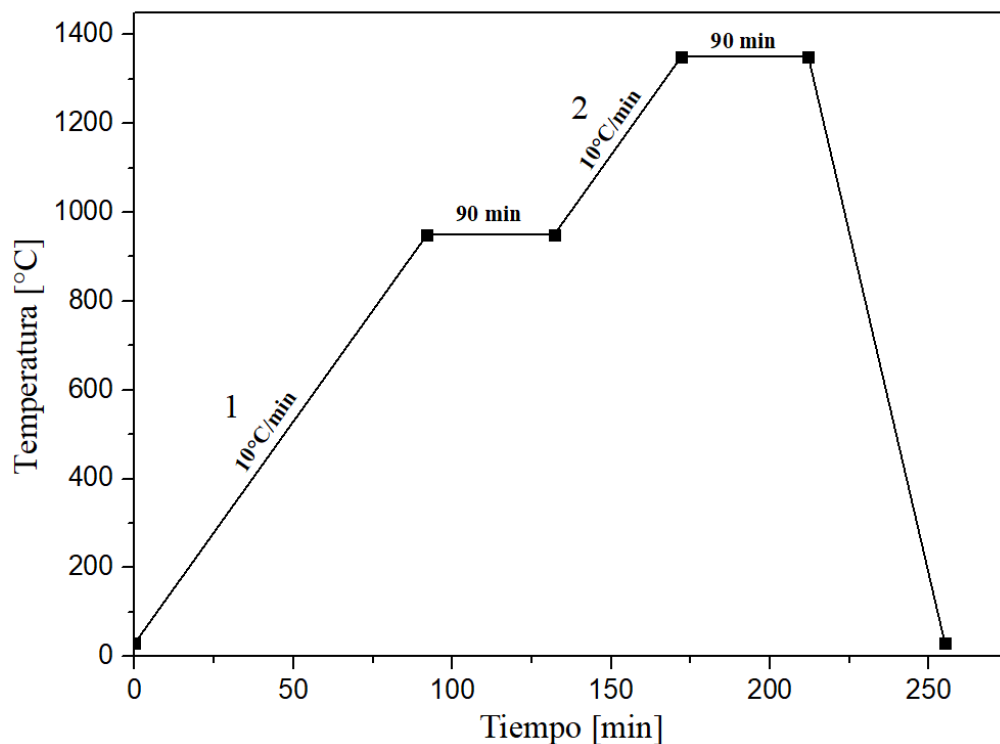


Figura 3.1 Ciclo térmico para la fabricación del biovidrio.

Tabla 3.1 Composición de las mezclas de biovidrio CEL2 no dopado y dopado (% mol)

Nomenclatura	SiO ₂	P ₂ O ₅	CaO	Na ₂ O	MgO	K ₂ O	ZnO	SrO	CuO
CEL2	45	3	26	15	7	4			
CEL2-Zn	45	3	24	15	7	4	2		
CEL2-Sr	45	3	24	15	7	4		2	
CEL2-Cu	45	3	24	15	7	4			2

3.2 Caracterización microestructural de los polvos de biovidrio

En esta sección se describen las técnicas empleadas para caracterizar la microestructura de los polvos de biovidrio obtenidos mediante fusión-temple y pulverización.

3.2.1 Análisis de tamaño y distribución de partícula

Tras la obtención del biovidrio en polvo con un tamaño menor a 63 μm , se realizó un análisis de tamaño y distribución de partícula en una muestra representativa de 5-10 g. Este análisis se llevó a cabo utilizando el analizador de partículas LS100Q BECKMAN COULTER, asegurando una caracterización precisa del rango de tamaños presentes en el material.

3.2.2 Calorimetría diferencial de barrido (DSC)

Para determinar las temperaturas de transición vítrea, cristalización y fusión de las distintas composiciones de vidrio bioactivo, se llevó a cabo un análisis por calorimetría diferencial de barrido utilizando un módulo de análisis térmico simultáneo TG/DSC (SDT Q600 TA INSTRUMENTS). Este equipo tiene un rango de operación desde temperatura ambiente hasta 1600 °C. En los experimentos se pesaron 5 mg de polvo de cada composición, los cuales se colocaron en crisoles de alúmina. El programa de calentamiento abarcó desde temperatura ambiente hasta 1200 °C, con una tasa de calentamiento constante de 10 °C/min, bajo una atmósfera dinámica de argón a un flujo de 100 mL/min.

3.2.3 Análisis por fluorescencia de rayos X (FRX)

Se realizaron análisis de fluorescencia de rayos X para confirmar la composición de las distintas formulaciones de biovidrio obtenidas por fusión y temple. Para ello, se utilizó un espectrómetro secuencial RIGAKU PRIMUS II de WD-FRX, equipado con un tubo de Rh con una potencia máxima de 4000 W y un límite de detección de hasta 1 $\mu\text{g/g}$. La preparación de las muestras incluyó el secado del material a 110°C durante 2 horas. Posteriormente, se elaboraron pastillas compactas a partir de 2.5 g de polvo mezclado con un 15 % en peso de cera-C como aglutinante.

3.2.4 Análisis por microscopía electrónica de barrido (MEB)

Tras obtener el polvo de biovidrio mediante fusión y temple, se realizó un análisis por microscopía electrónica de barrido a diferentes magnificaciones para examinar la morfología y distribución de las partículas. El equipo empleado fue un microscopio JEOL SEM JSM 6400. Dado que el análisis requería muestras metalizadas, una pequeña cantidad de polvo se depositó en el portamuestras de cobre y se recubrió por pulverización catódica con un equipo EDWARDS SI50A SPUTTER COATER. El proceso de metalización se llevó a cabo durante 20 minutos.

3.2.5 Análisis por espectroscopía infrarroja (FTIR)

Para identificar los grupos funcionales característicos presentes en las diferentes composiciones de biovidrio, se utilizó la técnica de espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR). Las muestras requeridas consistieron en 0.003 g de polvo mezclado con 0.3 g de KBr. El análisis se realizó en un espectrofotómetro TENSOR 27 BRUKER en un rango de barrido de 4000 a 400 cm^{-1} .

3.2.6 Análisis por difracción de rayos X (DRX)

El análisis de difracción de rayos X se empleó para confirmar la fase amorfa del biovidrio en polvo después de la fusión y temple. Este análisis se llevó a cabo utilizando un difractómetro de rayos X D2 PHASER BRUKER del Instituto de Investigación en Materiales de la UNAM, Campus Morelia. Las condiciones de trabajo incluyeron un barrido en el rango 2θ de 10 a 90°, con una velocidad de 0.05° por paso y un tiempo de 2 segundos por paso.

3.3 Fabricación de andamios de biovidrio CEL2 sin dopar y dopados

La fabricación de andamios porosos a partir del biovidrio resultante de la fusión y temple se realizó utilizando la tecnología de polvos. La mezcla inicial consistió en 55% de biovidrio,

42 % de resina fenólica y 3 % de agente espumante. Cada composición fue pesada y mezclada durante 1 hora, y luego vertida en moldes de acero para su tratamiento térmico (Figura 3.2). El proceso consta de tres etapas principales. En la etapa de espumado, la resina fenólica se funde y forma una suspensión cargada con partículas de biovidrio, mientras que el agente espumante se descompone liberando gas, lo que genera la expansión de la estructura y confiere al andamio un característico color café. Posteriormente, en la fase de pirólisis y sinterización, la muestra se enfría a temperatura ambiente, se rectifica superficialmente y se somete a un calentamiento de 10 °C/min hasta alcanzar 500 °C durante 2 horas, eliminándose así la resina fenólica y obteniendo el andamio en verde. Finalmente, la temperatura se incrementa nuevamente a 10 °C/min hasta 900 °C, manteniéndose por 90 minutos para permitir la sinterización, etapa que otorga la resistencia mecánica final a la estructura

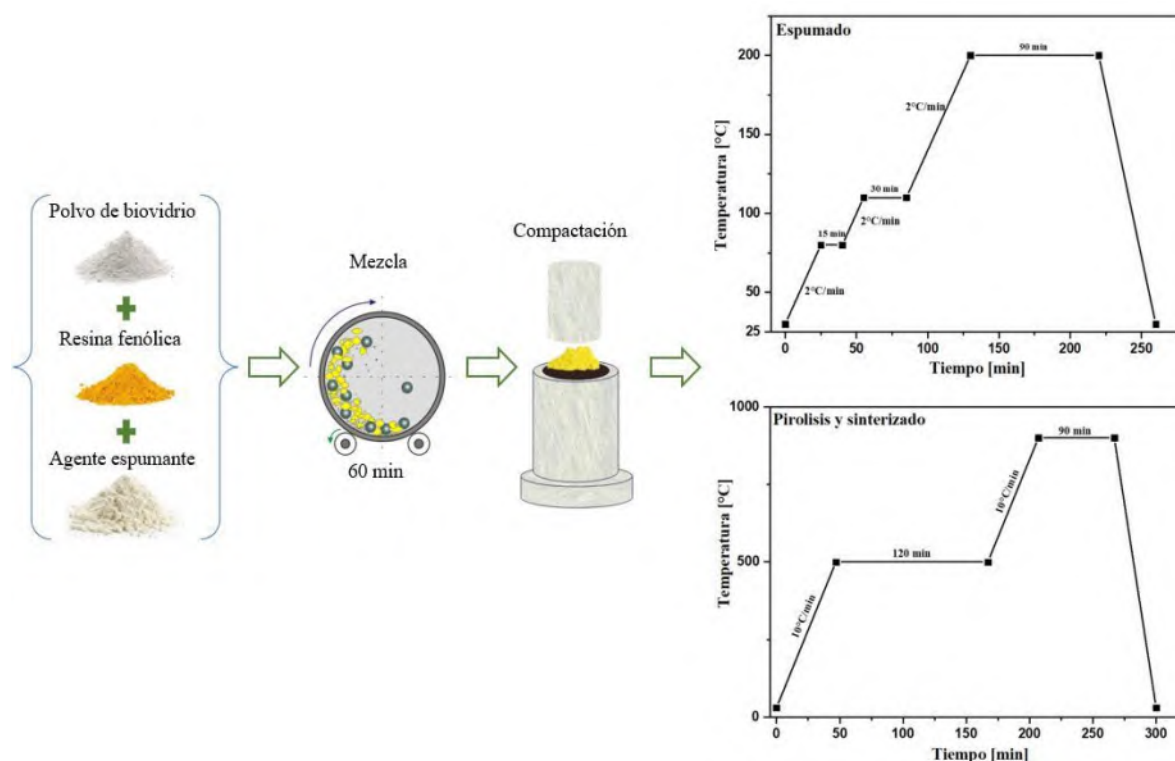


Figura 3.2 Esquema representativo para la fabricación de andamios porosos.

3.4 Estudios de bioactividad de los andamios sin dopar y dopados

Los estudios de bioactividad se llevaron a cabo en andamios CEL2 sin dopar y dopados con ZnO, SrO, o CuO. Los andamios sinterizados se cortaron en discos de dimensiones específicas (diámetro: 10 ± 0.25 mm, espesor: 3 ± 0.263 mm, peso promedio; 0.3264 ± 0.0082 g).

Los andamios fueron esterilizados con luz ultravioleta con 3 pulsos de 5 minutos por lado, mientras que el material de trabajo requerido se esterilizó a presión durante 15 minutos. Los experimentos se realizaron por triplicado en las cuatro formulaciones de biovidrio, evaluando seis tiempos de inmersión en SBF (1, 3, 7, 14, 21 y 28 días).

3.4.1 Cálculo del volumen de SBF necesario

El volumen de SBF para cada ensayo se determinó usando la fórmula [122]:

$$V_s = \frac{S_a}{10} \quad (3.1)$$

donde V_s es el volumen de SBF (mL) y S_a es el área superficial aparente de la muestra (mm^2). Esta fórmula se utiliza para materiales densos. Para materiales porosos, el volumen de SBF debe ser mayor que el V_s calculado. El área superficial aparente se determinó mediante análisis BET, estableciendo un V_g final de 30 mL por pastilla.

3.4.2 Preparación del fluido corporal simulado (SBF)

El SBF se preparó siguiendo el protocolo de Kokubo y Takamada [122]:

1. *Limpieza*: El material de laboratorio se lavó con agua destilada y detergente neutro.
2. *Preparación de la solución*: Se vertieron 700 mL de agua destilada en un vaso de precipitados de polipropileno de 1000 mL, que fue colocada sobre una plancha de calentamiento con agitación magnética a una temperatura constante de 36°C . Se añadieron los reactivos siguiendo el orden de la Tabla 3.2, asegurando la disolución

completa de cada compuesto antes de añadir el siguiente. El pH de la solución se ajustó a un valor de 7.4 utilizando Tris y HCl 1 M.

3. *Enfriamiento y conservación:* La solución se transfirió a un matraz aforado de polipropileno de 1000 mL, se dejó enfriar hasta temperatura ambiente, y se ajustó el volumen con agua destilada hasta el aforo. El SBF preparado se conservó a 5-10 °C en una botella de polipropileno hermética, por un tiempo máximo de 30 días.

Tabla 3.2 Reactivos y cantidades para la preparación de 1000 mL de SBF

Orden	Reactivo	Cantidad [g]	Ion	Plasma sanguíneo humano [mM]	SBF [mM]
1	NaCl	8.035	Na ⁺	142	142
2	NaHCO ₃	0.355	K ⁺	5	5
3	KCl	0.225	Mg ²⁺	1.5	1.5
4	K ₂ HPO ₄ ·3H ₂ O	0.231	Ca ²⁺	2.5	2.5
5	MgCl ₂ ·6H ₂ O	0.311	Cl ⁻	103	147.8
6	1.0 M-HCl	39 mL	HCO ₃ ⁻	27	4.2
7	CaCl ₂	0.292	HPO ₄ ²⁻	1	1
8	Na ₂ SO ₄	0.072	SO ₄ ²⁻	0.5	0.5
9	Tris	6.118	pH a 36.5°C	7.2-7.4	7.4

* mM = mmol/dm³

3.4.3 Proceso de inmersión

Los andamios se colocaron en tubos cónicos estériles de 50 mL con 30 mL de SBF, utilizando una unidad de filtración con membrana de 45 µm. Las muestras se incubaron a 37 °C durante los tiempos especificados (1, 3, 7 14, 21 y 28 días), cambiando el SBF cada tercer día. Posteriormente, se retiraron, lavaron con agua destilada y se secaron a 100 °C durante 2 horas. Finalmente, se almacenaron para su caracterización.

3.5 Caracterización microestructural y mecánica

3.5.1 Cálculo del porcentaje de porosidad

El porcentaje de porosidad se calculó mediante la ecuación:

$$\% \text{ Porosidad} = \left(1 - \frac{\rho_{\text{aparente}}}{\rho_{\text{biovidrio}}}\right) \times 100 \quad (3.2)$$

donde la densidad aparente de cada andamio, ρ_{aparente} , se calculó a partir de la masa y las dimensiones del andamio sinterizado, y $\rho_{\text{biovidrio}}$ es la densidad real del biovidrio, medida con el picnómetro de helio MICROMERITICS ACCUPYC 1330 (Ver Tabla 3.3).

Tabla 3.3 Valores de densidad real de cada una de las composiciones de biovidrio

Biovidrio	Densidad [g/cm ³]
CEL2	2.69
CEL2-ZnO	2.72
CEL2-SrO	2.74
CEL2-CuO	2.75

3.5.2 Medición de área superficial y tamaño de poro

Para los análisis de área superficial, se utilizó el método B.E.T. (Brunauer, Emmett y Teller), el cual permite determinar la superficie específica de un sólido a través de la adsorción de un gas inerte, típicamente nitrógeno (N₂), a bajas temperaturas. Para calcular la distribución de tamaños de poro en el rango de los mesoporos (2-50 nm) con geometría cilíndrica, se empleó el método Barrett Joyney-Halenda (BJH). Los análisis se llevaron a cabo utilizando un AUTOSORB-1 QUANTACHROME, disponible en el Instituto de Ciencias Aplicadas y Tecnología de la UNAM, México.

3.5.3 Medición del tamaño poro

El tamaño de poro de los andamios con diferentes composiciones se determinó mediante el diámetro de Feret, utilizando el *software ImageJ*. El diámetro de Feret (Figura 3.3) se define como la distancia entre dos tangentes paralelas a un objeto en un ángulo arbitrario. El rango de trabajo del software para este análisis fue de 0 a 180°.

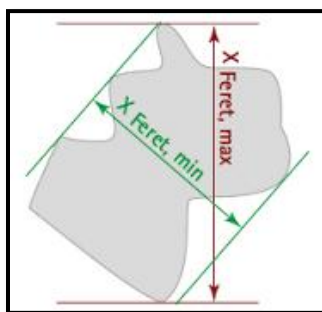


Figura 3.3 Representación esquemática del diámetro de Feret.

3.5.4 Microscopía electrónica de barrido (MEB)

La microestructura de los andamios sinterizados a diferentes temperaturas fue estudiada mediante microscopía electrónica de barrido a diferentes magnificaciones, con el objetivo de analizar la distribución y la interconectividad de los poros. Esta técnica también permitió examinar la formación de la capa de hidroxiapatita en los andamios con distintas composiciones a lo largo de diferentes tiempos de inmersión en SBF (1, 3, 7, 14, 21 y 28 días). Adicionalmente, se realizaron análisis químicos por espectroscopía de energía dispersiva (EDS) para determinar la relación Ca/P. El equipo empleado fue un microscopio JEOL SEM JSM 6400.

3.5.5 Análisis por espectroscopía infrarroja (FTIR)

Se utilizó la espectroscopía infrarroja para identificar la formación de grupos funcionales característicos de los andamios sinterizados, tanto antes como después de ser inmersos en SBF. Las muestras se prepararon en forma de pastillas, utilizando 0.003 g de muestra mezclados con 0.3 g de KBr. Los espectros se registraron en un rango de 4000 a 400 cm^{-1} empleando un espectrofotómetro TENSOR 27 BRUKER.

3.5.6 Análisis por difracción de rayos X (DRX)

El análisis de difracción de rayos X permitió identificar las fases cristalinas presentes en los andamios después de la sinterización a distintas temperaturas, así como la fase cristalina de hidroxiapatita tras diferentes tiempos de inmersión en SBF (1, 3, 7, 14, 21 y 28 días). Se utilizó un difractómetro D2 PHASER BRUKER, perteneciente al Instituto de Investigación en Materiales de la UNAM, campus Morelia. Las condiciones de trabajo incluyeron un rango de barrido 2θ de 10-70°, con una velocidad de paso de 0.05° y un tiempo de 2 s por paso.

3.5.7 Evaluación mecánica de los andamios

La resistencia mecánica a la compresión de los andamios sinterizados a 900°C fue evaluada utilizando una máquina de ensayos UniVert® de la marca Cell Scale®. Las probetas cilíndricas, preparadas conforme a la norma ASTM D695, tenían dimensiones de diámetro: 16 ± 1 mm y altura: 25 ± 1 . Se aplicó una carga de 5 kN y una velocidad de 2.5 mm/min. Durante la prueba, cada andamio se colocó entre dos placas metálicas para la aplicación axial de carga sin confinamiento.

3.6 Estudios biológicos

Se realizaron estudios biológicos utilizando tres cepas bacterianas. Una de ellas corresponde a *S. aureus* USA 300, una cepa de relevancia epidemiológica y causante de infecciones en la piel y los tejidos blandos. Las otras dos cepas pertenecen a la colección estándar *American*

Type Culture Collection (ATCC): *S. aureus* ATCC 25923 y *E. coli* ATCC 25922, recomendadas en el suplemento M100: *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing* del *Clinical and Laboratory Standards Institute*, reconocidas como cepas estándar y de referencia usadas para la evaluación de nuevos compuestos antibacterianos al carecer de factores de resistencia a antibióticos.

3.6.1 Unidades formadoras de colonias (UFC)

El número de Unidades Formadoras de Colonias (UFC) se define como la cantidad mínima de células viables y separables que, al encontrarse en la superficie o dentro de un medio de agar semisólido, forman colonias visibles constituidas por millones de células descendientes. En este estudio, el recuento de UFC en la superficie de los andamios se determinó mediante una modificación del método de Recuento en Placa [104, 123].

Para los ensayos, se emplearon andamios dopados con ZnO, SrO, y CuO, utilizando como referencia los andamios CEL2 sin dopar. Cada análisis se realizó por triplicado. Las especificaciones de los andamios fueron las siguientes: discos con un diámetro de 10 ± 0.25 mm de diámetro, un espesor de 3 ± 0.263 mm y un peso promedio de 0.3264 g. El procedimiento seguido se detalla a continuación:

1. *Recuperación de cepas:*

Las cepas bacterianas fueron descongeladas tras estar crio-preservadas a -80°C y recuperadas en caldo nutritivo TSB (caldo soya tripticaseína). Posteriormente, se sembraron en placas que contenían agar TSB.

2. *Preparación del inóculo:*

Una colonia aislada de cada cepa se cultivó en 5 ml de agar Mueller Hinton (CMH: extracto de carne bovina 2 g, hidrolizado ácido de caseína 17.5 g, almidón 1.5 g, agar 17 g). Las muestras se incubaron durante 24 h a 37°C . Para determinar la densidad óptica (D.O.) de los inóculos, se tomaron 100 μL de cada muestra, y se midió su absorbancia a una longitud de onda de 595 nm con un espectrofotómetro HALO DB-20 UV-VIS

DOUBLE BEAM. Se obtuvieron valores de absorbancia de 0.025 para la cepa *S. aureus* ATCC 25923, 0.021 para *S. aureus* USA 300 y 0.038 de *E. coli* ATCC 25922, que fueron ajustados para obtener una D.O. de 0.1. En base a lo obtenido se realizó el cálculo de la cantidad de inóculo requerido para 5 mL de medio de cultivo.

3. *Evaluación de actividad antibacteriana:*

En tubos Falcon estériles de 50 mL, se colocaron individualmente los andamios junto con 5 mL de CMH y 100 µL de inóculo ajustado y fueron incubados durante 24 h a 37 °C.

4. *Lavado y diluciones seriadas:*

Una vez transcurrido el tiempo de incubación, los discos se extrajeron y se trasladaron a nuevos tubos Falcon donde se lavaron con 1 mL de buffer a base de Tris con 0.9% de NaCl. Posteriormente, 100 µL de esta solución fueron diluidos en 900 µL de Tris, realizando diluciones seriadas (factor 1:10) hasta obtener concentraciones de 1×10^{-6} para *S. Aureus* ATCC 25923, 1×10^{-5} de *S. Aureus* USA 300 y 1×10^{-7} de *E. Coli* ATCC 25922.

5. *Siembra y recuento:*

De cada dilución final, 100 µL fueron sembrados en placas de 10 cm de diámetro que contenían 20 mL de agar Mueller Hinton y se incubaron durante 24 h a 37 °C. Una vez transcurrido el tiempo, se realizó el conteo de colonias desarrolladas en la placa. Con base en el conteo, se calculó la densidad celular original (OCD) con la ecuación:

$$OCD = \frac{CFU}{D \cdot V} \quad (3.3)$$

Donde:

OCD = Densidad Celular Original.

CFU = Unidades Formadoras de Colonias por placa.

D = Factor de dilución.

V = Volumen de siembra (mL).

3.6.2 Índice de formación de biopelículas

La evaluación de la biomasa de las biopelículas bacterianas se realizó utilizando la tinción con cristal violeta, siguiendo el protocolo descrito por García y col. [124]. A continuación, se detallan las etapas del procedimiento:

1. *Recuperación de cepas bacterianas:*

Las cepas, previamente crio-preservadas a -80°C , fueron descongeladas y cultivadas en caldo nutritivo TSB. Posteriormente, se sembraron en placas con agar TSB.

2. *Preparación del inóculo:*

Una colonia de cada cepa fue seleccionada y cultivada en 5 mL de medio de agar Mueller Hinton (CMH). Las muestras se incubaron durante 24 h a 37°C . Para ajustar la densidad óptica (D.O.) del inóculo, se tomaron 100 μL y se mezclaron con 5 mL de CMH en un tubo nuevo. La D.O. se midió a 595 nm con un espectrofotómetro HALO DB-20 UV-VIS DOUBLE BEAM, y los valores obtenidos se utilizaron para calcular el volumen necesario de inóculo que permitiera alcanzar una D.O. de 0.1 en los tubos de ensayo con 5 mL de medio CMH.

3. *Evaluación del índice de formación de biopelículas:*

Los andamios se colocaron en tubos Falcon de 50 mL y se les añadieron 5 mL de CMH con el inóculo correspondiente. Como control negativo, se utilizaron andamios incubados con 5 mL de CMH sin inóculo bacteriano. Los tubos fueron incubados durante 24 h a 37°C .

4. *Fijación de las bacterias:*

Los andamios se retiraron y colocaron en tubos Falcon estériles, dejándolos secar a 37°C durante 1 h. Posteriormente, se agregó 2.5 mL de metanol absoluto a cada tubo, incubándose a 37°C durante 15 min para fijar las bacterias a la superficie de los andamios. El exceso de metanol fue desechado.

5. *Tinción con cristal violeta:*

Se añadió 1 mL de solución de cristal violeta al 0.5% y se dejó actuar durante 15 min a temperatura ambiente. Tras desechar el exceso del colorante, los andamios se lavaron seis veces con 5 mL de PBS 2X para eliminar residuos. Los andamios se dejaron secar a 37 °C durante 10 min.

6. *Resuspensión de la biomasa:*

La biomasa adherida fue resuspendida con 5 mL de etanol absoluto y se dejó reposar durante 30 min a temperatura ambiente. Las suspensiones resultantes se transfirieron a placas de poliestireno de 96 pocillos para medir la absorbancia a 595 nm en un detector de placas VARIOSKAN™ LUX.

7. *Cálculo del índice de formación de biopelículas:*

Los resultados de D.O. obtenidos permitieron realizar los cálculos del índice de formación de biopelículas a partir de la fórmula:

$$IFB = \frac{AB - CW}{G} \quad (3.4)$$

Donde:

IFB = Índice de formación de biopelículas.

AB = D.O. a 595 nm de las muestras con crecimiento teñidas.

CW = D.O. a 595 nm del control negativo.

G = D.O. a 595 nm del crecimiento en el medio de cultivo circulante.

Según el valor obtenido, la formación de biopelículas se clasificó en cuatro categorías [125]:

- Fuerte ($IFB > 1.10$)
- Moderada ($0.70 \leq IFB \leq 1.09$)
- Débil ($0.35 \leq IFB \leq 0.69$)
- Sin formación ($IFB < 0.35$)

3.7 Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó mediante un análisis de varianza unidireccional (ANOVA) para evaluar las diferencias entre grupos. Los resultados cuantitativos se expresaron como la media $\pm$ desviación estándar. Las diferencias estadísticas significativas ($*p < 0.05$) se determinaron utilizando la prueba de Tukey. El análisis se llevó a cabo con el software estadístico *JMP 11.0.0*.

CAPÍTULO 4. ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

En este capítulo se presenta el análisis y discusión de los resultados obtenidos a partir de la caracterización de los polvos de biovidrio y de los andamios fabricados a base de biovidrio CEL2 sin dopar y dopados con ZnO, SrO y CuO. Para los polvos de biovidrio, las técnicas empleadas incluyeron el análisis de tamaño y distribución de tamaño de las partículas, calorimetría diferencial de barrido (DSC), fluorescencia de rayos X (FRX), microscopia electrónica de barrido (MEB), espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR) y difracción de rayos X (DRX). En el caso de los andamios, se utilizaron técnicas como MEB, FTIR y DRX. Además, se evaluaron propiedades microestructurales (porcentaje de porosidad y tamaño de poro), mecánicas, bioactivas y biológicas, factores clave para su funcionalidad en aplicaciones biomédicas.

4.1 Análisis de los polvos de biovidrio, sin dopar y dopados

4.1.1 Tamaño y distribución de tamaño de partícula

En la Figura 4.1 se presentan las curvas de distribución de tamaño de partícula de los polvos de biovidrio sin dopar y dopados. Los resultados muestran una distribución multimodal para todas las formulaciones, con tamaños de partícula inferiores a 63 μm . En todas las gráficas se identifican tres regiones, cada una con un rango de tamaño de partícula específico:

- Tamaño fino ($0-1.78 \pm 0.20 \mu\text{m}$): puede aumentar el área superficial y favorecer la sinterización al promover la formación de cuellos más estables.
- Tamaño medio ($19.62 \pm 2.24 \mu\text{m}$): contribuye directamente a la densificación estructural durante la sinterización, facilitando la formación de trabéculas gruesas y estables, necesarias para mejorar la resistencia mecánica.
- Tamaño grueso ($49.07 \pm 9.60 \mu\text{m}$): adecuado para generar una estructura porosa ideal para ingeniería de tejidos, ya que facilita la migración celular, la vascularización y el crecimiento de nuevo tejido.

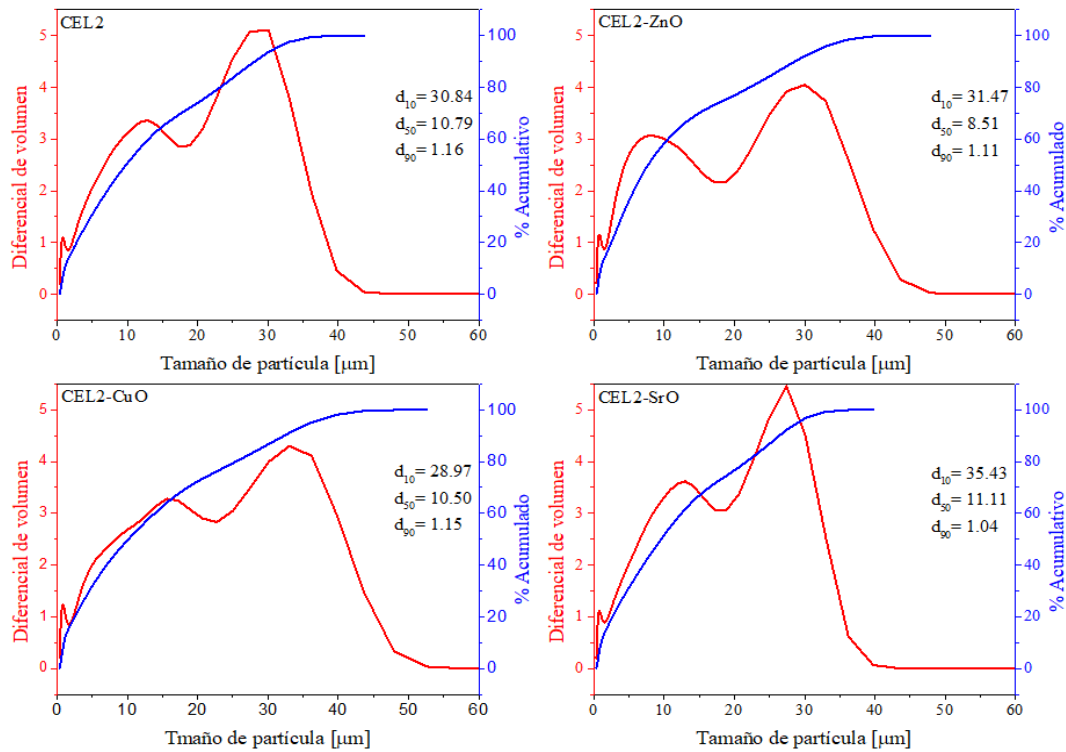


Figura 4.1 Curva de distribución de tamaño de partícula del biovidrio CEL2 y biovidrios dopados.

Los rangos de tamaño de partícula obtenidos en este trabajo son consistentes con lo reportado por Rahaman y col. [126], quienes mencionan que partículas en el rango de 1-45 μm , o incluso en el rango nanométrico, mejoran los puntos de contacto entre partículas durante la sinterización, produciendo estructuras altamente porosas y con una respuesta bioactiva más rápida debido al aumento del área superficial. Por otro lado, partículas entre 45-75 μm proporcionan un área suficiente para favorecer la formación de cuellos estables y obtener microestructuras con poros abiertos e interconectados, a la vez que mantienen una resistencia mecánica adecuada.

Chen y col. [127] fabricaron andamios a partir de polvos de biovidrio con diferentes tamaños de partícula. Como resultado, observaron que los andamios preparados con partículas nanométricas (20-50 nm) presentaron menor densidad, alta porosidad, superficie uniforme y trabéculas delgadas con numerosas microfisuras, lo que redujo su resistencia mecánica debido a una densificación incompleta. En contraste, partículas de mayor tamaño (5-10, 10-

20 y $>30\ \mu\text{m}$) generaron andamios con mejor resistencia mecánica, derivado de una microestructura más densa y trabéculas más gruesas tras la sinterización.

El comportamiento multimodal observado en las curvas de distribución de tamaño de partícula se atribuye al método de procesamiento empleado para obtener los polvos, ya que el biovidrio fundido se vierte en agua fría induciendo un enfriamiento súbito que genera gradientes térmicos elevados en el material, lo que provoca fracturas aleatorias debido a su naturaleza frágil. Estas fracturas no controladas producen fragmentos con tamaños y morfología diversas. A esto se suma la molienda mecánica en diferentes lotes y tamizados utilizando una malla con una abertura de $63\ \mu\text{m}$, como resultado, se tiene una amplia distribución y variabilidad de tamaños de partícula.

Adicionalmente, no se observaron variaciones significativas en el tamaño ni en la distribución de tamaño de partícula al incorporar ZnO, SrO o CuO como dopantes. Esto se atribuye a que su incorporación ocurre a escala atómica, ya que modifican solamente la estructura local de la red vítrea. La concentración de estos elementos en la red de biovidrio es baja para afectar su distribución granulométrica.

Otros autores han reportado que el tamaño y distribución de tamaño de partícula depende de la cantidad de agente dopante adicionado. Barua y col. [128] informaron que la adición de ZnO afecta el tamaño de partícula, en función de su concentración. Con 2.5-5 % en peso, el tamaño disminuyó de 28.05 a 18.56 nm, debido a la modificación de la energía superficial de las partículas facilitando su aglomeración y promoviendo una estructura densa y compacta que puede mejorar las propiedades mecánicas del andamio. Sin embargo, mayores concentraciones (7.5-10 % en peso) incrementó el tamaño de partícula de 22.92 a 23.89 nm, ocasionando una aglomeración excesiva que puede comprometer las propiedades mecánicas y bioactivas. Fandzloch y col. [129] reportaron que la adición del 17 % en peso de ZnO al biovidrio $83\text{SiO}_2\text{--}17\text{CaO}$ aumentó el tamaño de partículas de 86 ± 21 a 105 ± 18 nm, debido a la reducción de viscosidad del sistema y la consecuente aglomeración. Además, observaron que esa alta concentración reduce la bioactividad del biovidrio.

El-Sayed y col. [130] encontraron un efecto similar al incorporar CuO (3, 5 y 7 % mol), observando aglomeración de las partículas con el incremento en su concentración debido a

su papel como modificador de red, que promueve una menor viscosidad del sistema, lo que facilita la movilidad y fusión parcial de partículas así como la disminución de repulsión superficial.

En conjunto, los resultados de este estudio y los reportes de la literatura demuestran que el tamaño y la distribución de tamaño de partícula no solo son propiedades físicas, sino parámetros de diseño clave en la fabricación de andamios. Controlarlos es esencial, ya que influyen directamente en las propiedades fisicoquímicas, mecánicas y biológicas del material, condicionando su desempeño en aplicaciones de ingeniería de tejidos como se resume en la Tabla 4.1.

Tabla 4.1 Comparación del efecto del tamaño de partícula en las propiedades microestructurales y funcionales de los andamios de biovidrio [131-133]

Tamaño de partícula	Bioactividad	Sinterización	Porosidad	Resistencia mecánicas
<100 nm (nanométricas)	Excelente: mayor area superficial	Eficiente a baja temperatura con riesgo de colapso	Alta: posible presencia de micro/nanoporos	Baja: porosidad excesiva
100 nm–1 μ m	Alta: buena disolución y formación de HA	Eficiente: buena densificación sin colapso	Controlada	Moderada: porosidad intermedia, menor densidad
1-10 μ m	Moderada: menor area superficial	Requiere más temperatura	Menor: reducción del volumen de poro	Mejor empaquetamiento y resistencia
> 10 μ m	Baja: Formación de HA lenta	Requiere alta temperatura y mayor tiempo	Baja: partículas grandes llenan espacios	Muy alta

4.1.2 Calorimetría diferencial de barrido (DSC)

El análisis térmico se realizó para evaluar el efecto de la adición de ZnO, SrO o CuO como elementos dopantes en la estructura de la red del biovidrio CEL2. Los resultados obtenidos se presentan como curvas termoanalíticas (Figura 4.2), donde observa para todos los casos cambios de pendiente asociados a la transición vítrea (T_g), así como picos exotérmicos y endotérmicos correspondientes a las temperaturas de cristalización (T_c) y fusión (T_m), respectivamente, para las diferentes composiciones de biovidrio. La T_g indica el cambio del material de un estado rígido y amorfo a un estado más flexible y se representa como un cambio en la pendiente. Mientras que la T_c es otro evento e indica especialmente si el material tiene tendencia a la formación de fases cristalinas bajo condiciones de temperatura, y ocurre cuando las moléculas o átomos empiezan a organizarse a una estructura ordenada, pasando de un estado amorfo a uno cristalino. Este procedimiento requiere que el material libere calor lo que genera un pico exotérmico. Finalmente, la T_m es el proceso donde el material pasa de un estado sólido a uno líquido cuando se alcanza temperatura suficientemente alta, la T_m se presenta como un pico endotérmico e indica el momento en que el material absorbe calor para superar las fuerzas de enlace que mantiene unida su estructura sólida. En la Tabla 4.3 se resumen los valores de estas temperaturas características.

Tabla 4.2. Temperaturas características (T_g , T_c y T_m en °C) del biovidrio CEL2 sin dopar y dopados

Nomenclatura	T_g	T_{c1}	T_{c2}	T_{m1}	T_{m2}
CEL2	650	798	-	1023	1091
CEL2-Zn	590	736	-	1069	-
CEL2-Sr	578	746	-	1091	-
CEL2-Cu	569	694	730	1071	-

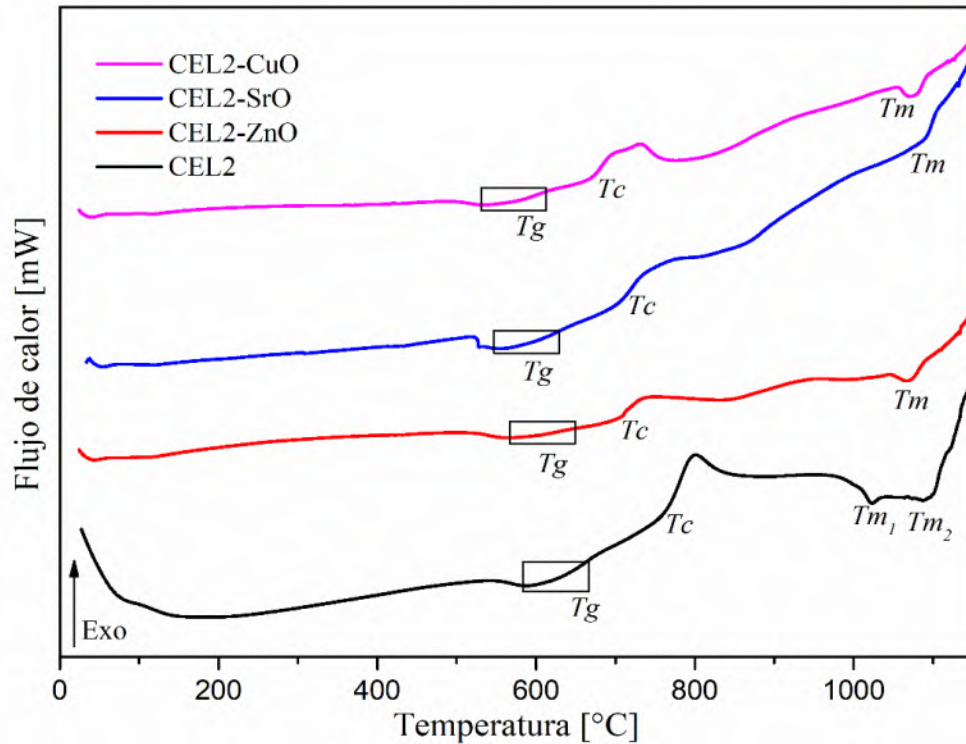


Figura 4.2. Curvas termoanalíticas obtenidas por calorimetría diferencial de barrido (DSC) para los polvos de biovidrio.

Termograma del biovidrio CEL2 sin dopar

En la Figura 4.2 se observa un salto claro entre 560-650 °C, correspondiente a la temperatura de transición vítrea (T_g) del biovidrio CEL2. Este cambio térmico marca el límite entre un comportamiento rígido y otro con movilidad viscosa. En la región de 750-800 °C se observa un pico exotérmico que indica la cristalización de fases como combeita y silicorhenanita, lo cual puede confirmarse mediante DRX. Finalmente, entre 1000 y 1100 °C se presentan dos picos endotérmicos atribuibles a la fusión de las fases cristalinas formadas. Esto demuestra que el biovidrio base devitrifica en al menos dos fases con puntos de fusión distintos, debido a su estructura amorfa y a su composición multicomponente (SiO_2 , P_2O_5 , CaO , NaCO_2 , MgO y K_2O). La presencia de múltiples eventos de cristalización ha sido reportada también por Bairo y col. [134], quienes señalaron que la formación secuencial de fases como combeita

($\text{Na}_4\text{Ca}_4(\text{Si}_6\text{O}_{18})$) y silicorhenanita ($\text{Na}_2\text{Ca}_4(\text{PO}_4)_2\text{SiO}_4$) responde a diferencias en composición, energía de activación y estabilidad térmica.

Efecto del dopaje con ZnO

La adición de 2 % mol de ZnO redujo ligeramente la T_g respecto al biovidrio base. Esto se atribuye a que el ZnO actúa como modificador de red, ocupando posiciones intersticiales o sustituyendo cationes como el Ca^{2+} . Además, los iones Zn^{2+} rompen los enlaces Si–O–Si al formar unidades tetraédricas $[\text{ZnO}_4]^{2-}$, $[\text{ZnO}_6]^{4-}$ y oxígenos no formadores de puente (NBO, *Non-bridging oxygens*), reduciendo la conectividad de la red y, con ello, la viscosidad [135]. A su vez, facilita el movimiento de las cadenas vítreas, desplazando las temperaturas de los eventos endotérmicos y exotérmicos hacia valores más bajos. La variación de T_g puede explicarse por la naturaleza de los enlaces químicos formados en la estructura del biovidrio dopado. Los enlaces más covalentes (direccionales) Zn–O reemplazaron parcialmente los enlaces más iónicos (no direccionales) Ca–O y Mg–O, lo que rigidizó la red vítrea y generó una mayor tensión en el material. Como resultado, se requirió menos energía para relajar estas tensiones, disminuyendo el valor de T_g [136]. Asimismo, el incremento de NBO favorece la movilidad iónica y promueve la cristalización a menor temperatura, reduciendo la T_c . En contraste, la T_m aumentó respecto al biovidrio base, debido a la posible formación de fases ricas en zinc más estables térmicamente. Aunque algunos autores han reportado incrementos de T_g y T_c para contenidos altos de ZnO [137], la tendencia depende fuertemente de la concentración. Rocton y col. [138] y Sergi y col. [93] coinciden con lo observado: la adición de 2 % mol de ZnO reduce T_g , T_c y T_m al debilitar la red por ruptura de enlaces Si–O–Si.

Efecto del dopaje con SrO

La incorporación de 2 % mol de SrO disminuyó T_g y provocó un ligero aumento en T_c , además de un pequeño pico endotérmico correspondiente a T_m , similar al del biovidrio base. La disminución de T_g se relaciona con la ruptura de enlaces Si–O–Si por parte del SrO, que actúa como modificador de red al igual que el ZnO, disminuyendo la conectividad y rigidez de la red, como resultado el biovidrio se vuelve más susceptible a cambios estructurales a menor temperatura. El Sr^{2+} , al poseer un radio iónico mayor (118 pm contra 100 pm del Ca^{2+}),

produce una expansión de la red vítrea y una menor densidad estructural, debilitando los enlaces y facilitando la relajación térmica [139-141]. El leve incremento en T_c se atribuye a que el Sr dificulta la nucleación de fases ricas en calcio y estabiliza temporalmente la fase amorfa, requiriendo mayor energía térmica para iniciar la cristalización. La T_m aumentó ligeramente, posiblemente debido a la estabilización de fases como la silicorhenanita y combeita, donde el Sr sustituye al Ca generando estructuras térmicamente más estables.

La adición de óxidos metálicos como ZnO y SrO permite variaciones en T_g y T_c las cuales están relacionadas con la movilidad de los tetraedros $[\text{SiO}_4]^{2-}$ y $[\text{PO}_4]^{3-}$ que forman la red del biovidrio y, por lo tanto, con la viscosidad de estos materiales [142]. Este tipo de comportamiento fue reportado por Patel y col. [143], quienes reportaron que la sustitución de Ca por Sr genera cambios estructurales en la matriz del biovidrio dando como resultado una variación en las temperaturas características, debido a que esta sustitución ocasiona la expansión y disrupción de la red vítrea de silicato, producto de la diferencia de radio atómico, así como la generación de enlaces Sr–O más débiles que los enlaces Ca–O. Rocton y col. [138], también reportaron que la adición de SrO induce variaciones en las temperaturas de T_g , T_c y T_m , al generar una mayor disrupción en la red vítrea, debido a que el catión Sr es ligeramente más grande y posee una menor fuerza de enlace Sr–O.

Efecto del dopaje con CuO

La adición de 2 % mol de CuO también redujo T_g , debido a que los iones Cu^{2+} actúan como modificadores de red rompiendo los enlaces principales de Si–O–Si y generan una elevada cantidad de NBO, disminuyendo la conectividad de la red. Esto induce distorsión estructural que aumenta el desorden, lo que permite que los átomos vibren y se muevan con menor energía, dejando una red menos rígida y con una mayor facilidad de deformarse térmicamente.

La disminución de T_c se explica por la mayor movilidad atómica inducida por el Cu^{+2} , que facilita la nucleación y crecimiento de fases cristalinas a menor temperatura. En contraste, se observa un pico endotérmico en 1071 °C, mayor que en las otras formulaciones, lo cual indica la formación de fases cristalinas altamente estables.

El contenido de CuO tiene un impacto significativo en las características térmicas. Una cantidad excesiva de cobre o una proporción inadecuada en relación con otros componentes puede favorecer la cristalización de la masa fundida. En los vidrios de silicato-fosfato, el contenido creciente de fósforo aumenta la solubilidad del cobre, lo que a su vez modifica la estructura vítrea y afecta las temperaturas de transición [144, 145]. Un comportamiento similar fue reportado por Wers y col. [146], investigaron el efecto del dopaje de Cu en diferentes cantidades (0, 0,1, 1, 5 y 10 % en peso) sobre el comportamiento térmico de vidrios bioactivos 46S6 obtenidos por fusión y temple. Observaron que la incorporación de Cu en la red de vitrea provocó cambios significativos en la respuesta térmica del material. La introducción del dopante a expensas de CaO aumentó notablemente el grado de relajación de los esfuerzos internos. Como resultado, tanto la temperatura de transición vítrea (T_g) como la temperatura de cristalización (T_c) disminuyeron con el aumento del contenido de Cu. Sin embargo, el efecto más significativo se observó en la temperatura de fusión, donde el incremento del contenido de Cu condujo a una disminución lineal en el punto de fusión del material.

Consideraciones finales

La incorporación de ZnO, SrO y CuO modifica las temperaturas de transición vítrea, cristalización y de fusión del biovidrio base al actuar como modificadores de red que reducen la conectividad del vidrio. Esto disminuye la viscosidad y permite que los andamios puedan sinterizarse a temperaturas más bajas, preservando la porosidad y favoreciendo la liberación de iones terapéuticos. Sin embargo, la reducción excesiva de estas temperaturas puede generar limitaciones asociadas a menor estabilidad térmica, mayor riesgo de cristalización no deseada y disminución de la resistencia mecánica, por lo que es importante un control preciso de los parámetros de sinterización.

Por otro lado, los datos obtenidos mediante calorimetría diferencial de barrido proporcionan información clave sobre las propiedades térmicas de los biovidrios, permitiendo ajustar los parámetros de procesamiento. El conocimiento de las temperaturas de fusión (T_m) y cristalización (T_c) es crucial para evitar la fusión de los andamios durante su fabricación, así como controlar la formación de fases cristalinas. Además, son eventos esenciales para

comprender la estabilidad térmica, la biocompatibilidad y las propiedades mecánicas de los biovidrios, lo que resulta fundamental para su uso en aplicaciones biomédicas.

4.1.3 Fluorescencia de rayos X (FRX)

La Tabla 4.3 presenta los resultados obtenidos mediante fluorescencia de rayos X para el biovidrio CEL2 y sus variantes dopadas después del proceso de fusión y temple. Este análisis permitió confirmar la presencia de los óxidos principales de la composición estequiométrica del biovidrio CEL2, tales como SiO_2 , CaO , P_2O_5 , K_2O , Na_2O y MgO , así como los óxidos dopantes ZnO , SrO y CuO .

Los óxidos detectados presentan ligeras variaciones respecto a las composiciones estequiométricas, lo cual es esperado debido a las posibles pérdidas durante el procesamiento térmico y a la naturaleza inherente del método de fabricación. Estas diferencias no implican una preparación incorrecta, sino que corresponden a efectos derivados de factores físicos, químicos y analíticos que afectan tanto al material como al proceso de análisis.

La presencia de impurezas durante la fabricación de biovidrios es común y se debe a las materias primas, los utensilios y los parámetros empleados (crisoles, atmósfera del horno, entre otros), los cuales pueden aportar trazas de otros óxidos como Al_2O_3 , TiO_2 , y Fe_2O_3 que no forman parte de la formulación teórica. Aunque su concentración es mínima, no se espera que afecten significativamente el desempeño ni la biocompatibilidad del biovidrio, ya que están presentes en niveles que no comprometen la funcionalidad del material. Se ha reportado que contenidos elevados de este tipo de óxidos pueden sustituir los enlaces principales Si-O-Si por enlaces más fuertes como Al-O-Si y Ti-O-Si , incrementando la viscosidad, la estabilidad química y la resistencia mecánica, aunque potencialmente podrían comprometer la formación de la capa de hidroxiapatita en fluidos fisiológicos [147].

Las pequeñas diferencias observadas en la composición no alteran las propiedades esenciales del biovidrio para su aplicación en la fabricación de andamios. La biocompatibilidad, una propiedad fundamental del biovidrio, no se ve afectada debido a su estabilidad química y a la capacidad que presentan para tolerar impurezas en trazas.

En resumen, los resultados obtenidos mediante FRX validan la composición de los biovidrios CEL2 y sus variantes dopadas, demostrando la incorporación adecuada de los óxidos dopantes (ZnO, SrO y CuO), mientras que las impurezas detectadas son despreciables desde el punto de vista funcional.

Tabla 4.3. Comparación de los resultados obtenidos por análisis de FRX con respecto a la composición estequiométrica del biovidrio CEL2 y sus variantes dopadas

Resultados de FRX en % peso													
Nomenclatura	SiO ₂	P ₂ O ₅	CaO	MgO	K ₂ O	Na ₂ O	ZnO	SrO	CuO	TiO ₂	Al ₂ O ₃	Fe ₂ O ₃	Total
CEL2	45.78	7.80	22.69	3.71	6.71	10.94	0	0	0	0.05	1.35	0.11	99.14
CEL2-ZnO	43.22	7.31	22.89	3.67	6.86	10.96	1.40	0	0	0.04	0.13	0.09	96.57
CEL2-SrO	42.96	7.25	22.85	3.12	6.79	10.44	0	2.24	0	0.04	0.13	0.10	95.92
CEL2-CuO	41.77	7.87	23.40	3.65	6.92	10.97	0	0	2.38	0	0.74	0.07	97.77
Composición estequiométrica en % peso													
Nomenclatura	SiO ₂	P ₂ O ₅	CaO	MgO	K ₂ O	Na ₂ O	ZnO	SrO	CuO	TiO ₂	Al ₂ O ₃	Fe ₂ O ₃	Total
CEL2	43.77	6.89	23.60	4.56	6.10	15.05	0	0	0	0	0	0	100
CEL2-ZnO	43.42	6.83	21.61	4.53	6.05	14.93	2.61	0	0	0	0	0	100
CEL2-SrO	43.11	6.79	21.46	4.49	6.00	14.82	0	3.30	0	0	0	0	100
CEL2-CuO	43.44	6.84	21.62	4.53	6.05	14.93	0	0	2.55	0	0	0	100

4.1.4 Microscopía electrónica de barrido (MEB)

La Figura 4.3 presenta las imágenes obtenidas mediante microscopía electrónica de barrido a un aumento de 500x para los polvos de biovidrio con diferentes composiciones, después del proceso de fusión y temple. Se observó que, independientemente de la composición química, las partículas exhiben una amplia distribución en tamaño y forma, con morfologías claramente irregulares.

La amplia distribución de tamaños de partícula observada por MEB puede favorecer que las partículas más pequeñas llenen los espacios entre las partículas de mayor tamaño, mejorando

así el contacto entre partículas durante la sinterización y promoviendo una mayor interconectividad porosa, lo cual es beneficioso para la vascularización y el transporte de nutrientes en aplicaciones de regeneración de tejido óseo. Asimismo, la morfología irregular obtenida presenta ventajas importantes para la fabricación de andamios mediante tecnología de polvos, ya que las partículas con superficies rugosas ofrecen mayor área superficial, facilitando la sinterización a menor temperatura y favoreciendo la adhesión celular.

En contraste, si se obtuvieran partículas esféricas, se lograría una compactación más eficiente y una formación de poros más uniformes; sin embargo, esta morfología suele generar superficies suaves o lisas que dificultan la adhesión celular. Por otro lado, partículas alargadas complicarían la compactación y podrían generar andamios con anisotropía, es decir, propiedades que varían dependiendo de la dirección.

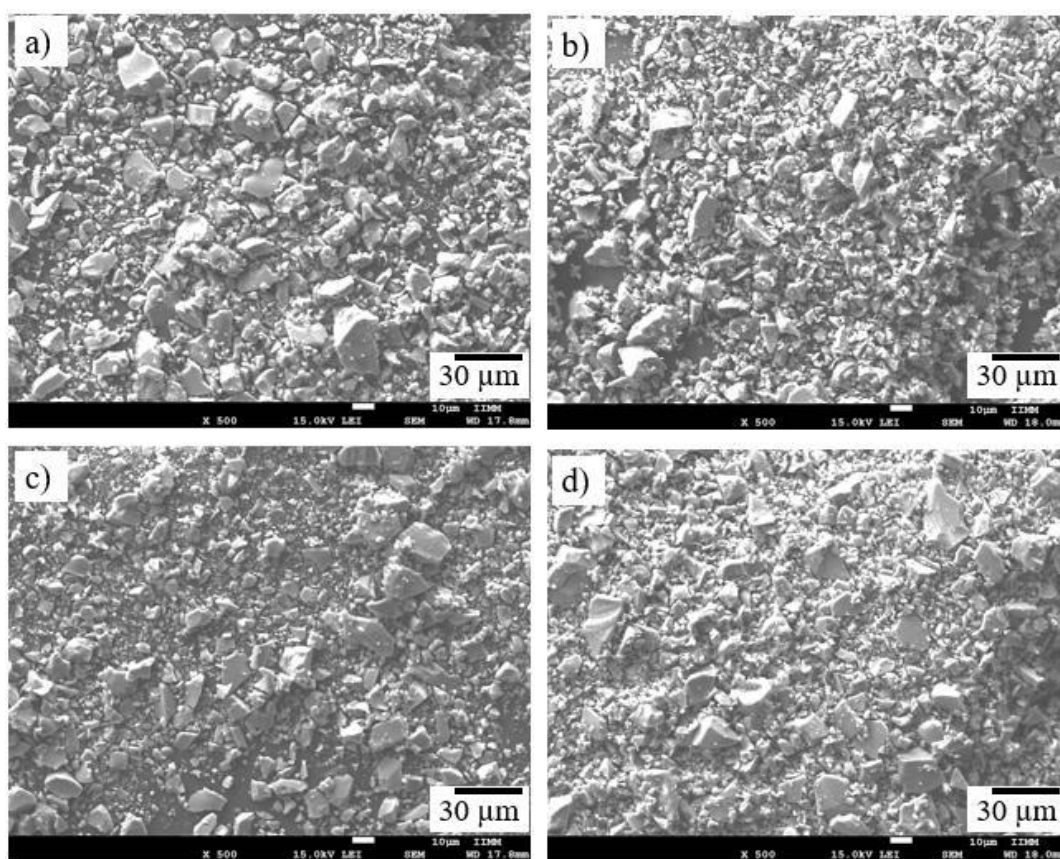


Figura 4.3 Imágenes MEB de los polvos de biovidrio: a) CEL2, b) CEL2-ZnO, c) CEL2-SrO y d) CEL2-CuO.

Los óxidos metálicos añadidos (ZnO, SrO y CuO) no modificaron significativamente la morfología, el tamaño ni la distribución de tamaños de las partículas, en concordancia con los resultados mostrados previamente en la Figura 4.1. No obstante, algunos estudios reportan que la adición de estos dopantes puede influir en la estructura del biovidrio. El ZnO y CuO tienden a reducir la rigidez de la red vítrea, generando partículas más finas y uniformes con cierta tendencia a formas esféricas; mientras que el SrO, debido a su mayor radio iónico, puede inducir una red más abierta pero ligeramente más resistente a la fractura, resultando en partículas más irregulares y de mayor tamaño promedio [101, 140, 148].

La amplia distribución de tamaños de partícula y la morfología irregular obtenida en este trabajo resultan adecuadas para facilitar el proceso de compactación propio de la tecnología de polvos, permitiendo la fabricación de andamios con porosidad jerárquica y buena bioactividad. Sin embargo, es fundamental controlar cuidadosamente estas características para evitar una heterogeneidad estructural excesiva y mantener el equilibrio entre bioactividad y resistencia mecánica.

4.1.3 Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR)

En la Figura 4.4 se comparan los espectros obtenidos mediante FTIR para los diferentes biovidrios después del proceso de fusión y temple. Se identificaron diversas bandas asociadas a grupos funcionales característicos de la red vítrea, con ligeras variaciones en intensidad, número de onda y ancho de la banda.

Variación de la Intensidad

La intensidad depende de la cantidad efectiva de grupos funcionales y del cambio de momento dipolar. En el biovidrio CEL2 sin dopar se observan bandas de mayor intensidad, lo que indica una mayor presencia de grupos funcionales de OH^- , CO_3^{2-} y de los enlaces principales Si-O-Si. En contraste, los biovidrios dopados presentan menor intensidad en estas bandas, lo cual sugiere una disminución relativa de dichos grupos funcionales debido a las modificaciones estructurales inducidas por los dopantes.

Variación en el número de onda

El número de onda aumenta cuando el enlace es más rígido y disminuye cuando la red se despolimeriza. En el CEL2 sin dopar se observan más enlaces Si–O–Si, por lo que las bandas se ubican en números de onda mayores. En los biovidrio dopados, los modificadores de red (ZnO, SrO y CuO) rompen los enlaces principales, reduciendo la polimerización de la red y generando un mayor número de NBO, lo que provoca desplazamientos hacia números de onda menores.

Ancho de la banda

El ancho de banda está relacionado con la distribución de los tipos de enlaces presentes. En general, los espectros obtenidos muestran anchos de banda similares entre sí, con mayor similitud entre los biovidrio dopados, lo que indica una distribución comparable de los enlaces en su estructura vítrea.

Asignación de bandas y grupos funcionales

Grupos O–H:

Esta banda se atribuye a la presencia de agua retenida en la matriz vítrea, consecuencia del temple en agua y de la humedad absorbida por los óxidos precursores, en especial P₂O₅ debido a su alta higroscopicidad [149]. Estos grupos pueden incrementar la polaridad y la reactividad del biovidrio en medios fisiológicos.

1458.12 cm⁻¹ – grupos carbonato:

Corresponde a las vibraciones de los enlaces C–O asociadas a los grupos carbonato (CO₃²⁻). Su presencia se relaciona con el uso de carbonatos (como el Na₂CO₃) como fuente de óxidos. La descomposición térmica durante la fusión libera CO₂, pero no siempre es completa y puede quedar atrapado en la red.

1033.80 y 921.93 cm⁻¹ – Enlaces Si–O–Si y Si–O (puente y no puente):

Se asocian al estiramiento asimétrico de los grupos silicato que conforman el esqueleto principal del biovidrio. Estas bandas son inherentes a biovidrios basados en silicato y están estrechamente relacionadas con sus propiedades mecánicas, térmicas y bioactivas [5].

736.77 y 493.75 cm⁻¹ – Flexiones Si–O (NBO) y Si–O:

Indicativas de la presencia de oxígenos no formadores de puentes generados por los modificadores de red como Mg²⁺, K⁺ y Ca²⁺. Aunque estos iones rompen enlaces Si–O–Si, siempre queda una fracción importante de enlaces Si–O–Si intactos, que contribuyen a la estabilidad térmica y resistencia mecánica [150, 151].

Efecto de los dopantes ZnO, SrO y CuO

La adición de estos óxidos metálicos actúa como modificador de red sustituyendo parcialmente cationes Ca²⁺. Al coordinarse con oxígeno ya presente, no generan nuevos enlaces covalentes detectables por FTIR en las concentraciones utilizadas. Sin embargo, pueden provocar ligeros desplazamientos en las bandas, variaciones en la intensidad, y cambios en el ancho de la banda, lo que refleja alteraciones en el grado de polimerización de la red vítrea. A bajas concentraciones, su distribución es homogénea y no genera nuevas bandas. A concentraciones mayores, pueden aumentar los NBO y ocasionar reorganización estructural [4, 81].

ZnO:

A bajas concentraciones no genera vibraciones detectables de enlaces Zn–O o P–O–Zn. Sin embargo, cuando supera el 10 % mol, puede inducir la despolimerización de las cadenas de fosfato, lo que modifica la estructura vítrea [137, 149].

SrO:

La presencia de los iones de estroncio disminuye la intensidad de las vibraciones de Si–O y de C–O. Este efecto probablemente está relacionado con la expansión de la red vítrea causada por el radio iónico más grande de los iones Sr²⁺ (118 pm) respecto al Ca²⁺ (100 pm) [94].

CuO:

La presencia de iones de cobre contribuye a la despolimerización de la red rompiendo enlaces Si–O–Si y generando más NBO, debido a la electronegatividad del cobre, cercana a la del silicio, lo que genera bandas adicionales asociadas a los enlaces Si–O [144].

Los enlaces Zn–O, Sr–O y Cu–O, suelen ubicarse entre 400-600 cm^{-1} , pero en esta región predominan vibraciones intensas de Si–O–Si o P–O, por lo que las señales quedan solapadas. Además, sus bajas concentraciones dificultan la detección directa.

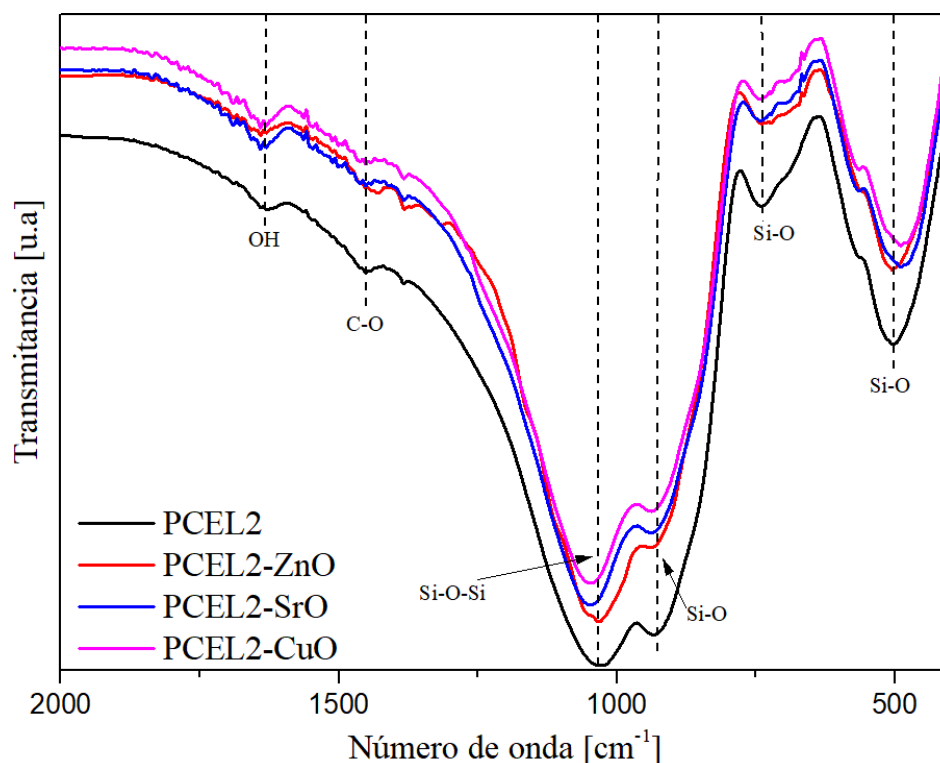


Figura 4.4 Espectros FT-IR de los polvos de biovidrio después del proceso de fusión y temple.

Bejarano y col. [152] informaron que la adición de ZnO y CuO en diferentes concentraciones (1, 5 y 10 % mol) no genera nuevas bandas, pero sí la formación de estiramientos asimétricos Si–O–Si a 1040, 855 y 450 cm^{-1} , enlaces similares a los reportados en esta investigación y con una ligera variación en el número de onda. Por otro lado, Babu y col. [107] observaron

que la adición de 8 % mol de ZnO a un biovidrio con alto contenido de fósforo, promueve la formación de enlaces Zn–O detectables a 520 cm^{-1} pero se encuentra solapada por las bandas P–O–P principales del biovidrio sin afectar su bioactividad. En otra investigación por Babu y col. [149] se reportó que una adición superior al 10 % mol de ZnO, genera nuevos enlaces detectables en FTIR alrededor de 485 cm^{-1} que se atribuye a la presencia de vibraciones Zn–O de unidades tetraédricas ZnO_4 . Además, el incremento de ZnO disminuyó de forma gradual las intensidades de las bandas de los enlaces principales P–O–P ubicadas en 1294, 1169, 666, 386 y 318 cm^{-1} , lo que se debió principalmente a la interrupción de la red vítrea de fosfato por ZnO y que condujo a la despolimerización de la estructura y la formación de NBO que favorecen la bioactividad sacrificando su estabilidad estructural. Finalmente, Oueslati y col. [137] reportaron que una cantidad superior al 30 % mol de ZnO causa cambios estructurales que pueden atribuirse a la interrupción de los enlaces principales y a la despolimerización.

El uso de dopantes ofrece ventajas funcionales; sin embargo, concentraciones altas rompen excesivamente los enlaces principales de los biovidrios Si–O–Si y P–O–P, aumentando los NBO y reduciendo la conectividad de la red. Esto incrementa la solubilidad, reduce las temperaturas de transición vítrea y cristalización, y afecta la estabilidad mecánica del biovidrio. Por ello, se recomienda no exceder el 10 % mol para mantener la homogeneidad estructural y un desempeño óptimo durante la fabricación de andamios para la ingeniería de tejidos.

4.1.4 Difracción de rayos X (DRX)

El análisis por difracción de rayos X corroboró la naturaleza amorfa de los biovidrios para todas las composiciones. Los patrones obtenidos, mostrados en la Figura 4.5, exhiben un halo característico en el rango 2θ de $25\text{--}35^\circ$, típico de materiales amorfos con ordenamiento a corto alcance. El estado amorfo de los polvos de biovidrio es debido al proceso de obtención utilizado, la fusión a alta temperatura ($1350\text{ }^\circ\text{C}$) seguida de un enfriamiento rápido (temple) en agua fría. Este enfriamiento brusco impide que los átomos dispongan del tiempo necesario para ordenarse y formar fases cristalinas, dando lugar a una estructura amorfa. Además, los

óxidos Na_2O y CaO actúan como modificadores de red, reduciendo la conectividad entre los tetraedros de silicio y disminuyendo así la tendencia a la cristalización.

La adición de los dopantes ZnO , SrO y CuO no generó reflexiones asociadas a fases cristalinas, lo que indica que las cantidades utilizadas no son suficientes para inducir la cristalización en la estructura vítrea. La ausencia de fases cristalinas es favorable para las aplicaciones biomédicas del biovidrio, ya que esta característica mejora su bioactividad al interactuar con fluidos fisiológicos. Los resultados experimentales confirman que la estructura amorfa y homogénea del material se mantiene a pesar de la incorporación de los óxidos metálicos.

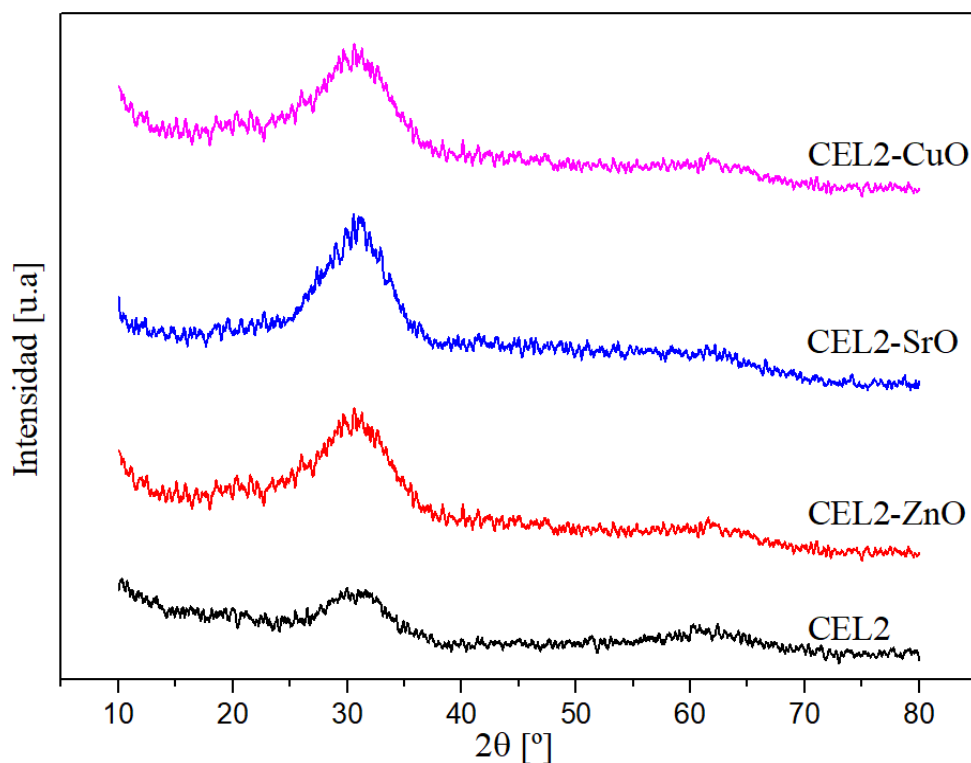


Figura 4.5 Difractogramas de los polvos de biovidrio después del proceso de fusión y temple.

Este comportamiento también ha sido reportado por Neščáková y col. [7], quienes observaron que la adición de 8 % mol de ZnO conservó la estructura amorfa del biovidrio dentro del

rango 2θ de 20-34°, sin promover la formación de fases cristalinas asociadas al ZnO. Mosaddad y col. [153] adicionaron SrO y, mediante análisis de DRX, no detectaron fases cristalinas atribuibles a la presencia de este óxido. De igual manera, Saeidi y col. [154] reportaron que la adición de CuO no modificó la estructura amorfa del biovidrio 45S5 ni promovió la formación de fases cristalinas vinculadas al CuO. No obstante, se ha reportado que concentraciones elevadas de óxidos metálicos pueden favorecer la aparición de fases cristalinas no deseadas, lo que podría comprometer la efectividad del biovidrio.

En general, la incorporación de ZnO, SrO y CuO no promovió la formación de cristalinas debido a un enfriamiento rápido empleado en la preparación del material y a que los dopantes actúan como modificadores de red al sustituir cationes presentes sin alcanzar una concentración umbral que induzca la cristalización.

4.2 Análisis de los andamios sinterizados

4.2.1 Microscopía electrónica de barrido (MEB)

La microestructura desempeña un papel fundamental en la ingeniería de tejidos, ya que influye directamente en la adhesión celular y en el transporte de nutrientes, aspectos esenciales en la regeneración del tejido dañado. El proceso de sinterización es clave para obtener andamios con la resistencia mecánica necesaria y una estructura porosa adecuada. Dicho proceso consiste en calentar el material a una temperatura inferior a su punto de fusión, pero suficiente para eliminar la resina fenólica y promover el contacto entre partículas. Durante la sinterización, las partículas comienzan a fusionarse gradualmente, formando “cuellos” que crecen hasta generar una red de poros interconectados. Es importante considerar que la estructura porosa depende tanto del tamaño y la distribución de tamaño de las partículas como de los parámetros de sinterización (temperatura y tiempo).

La Figura 4.6 muestra las imágenes MEB a 50x de los andamios sinterizados con diferentes composiciones. El análisis reveló que tanto los andamios basados en biovidrio CEL2 como aquellos dopados con ZnO, SrO y CuO presentan una estructura porosa interconectada, aunque con diferencias notables en la morfología de los poros dependiendo de la

composición. Asimismo, se observaron poros en las paredes y en los cuellos formados durante la sinterización.

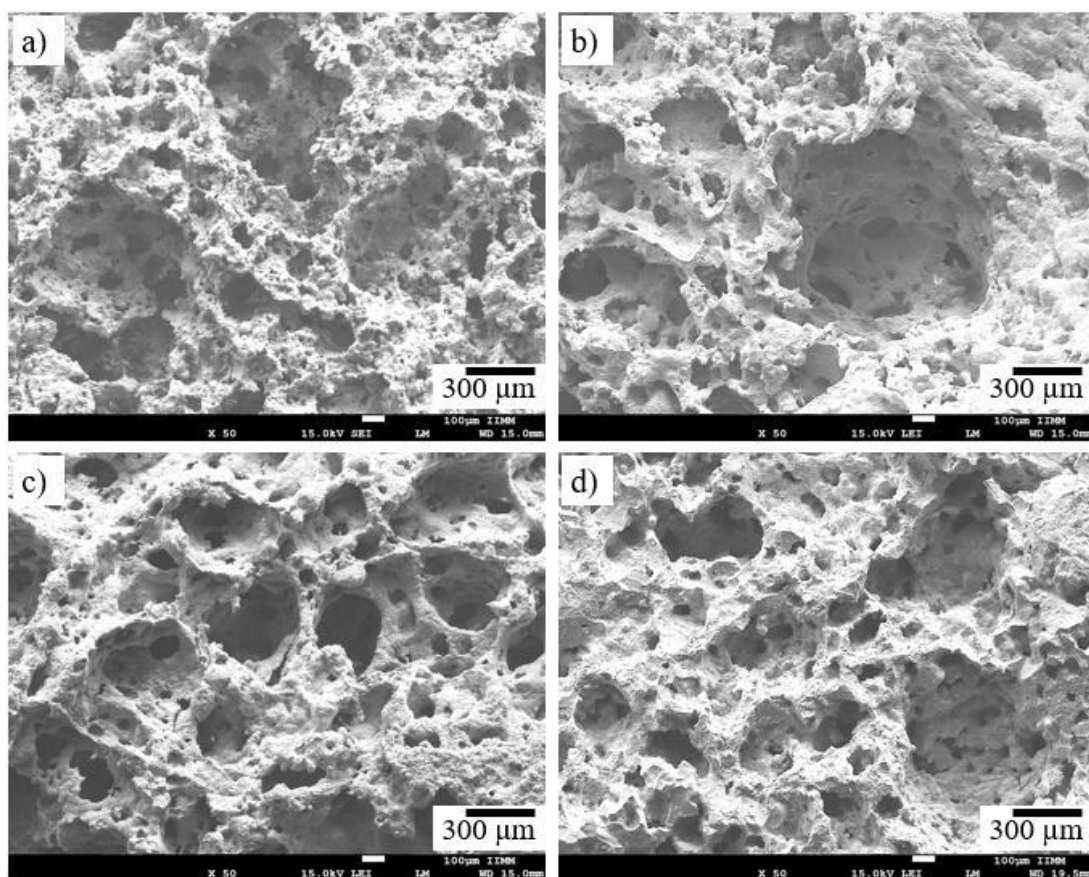


Figura 4.6 Imágenes MEB de la microestructura de los andamios: a) CEL2, b) CEL2-ZnO, c) CEL2-SrO y d) CEL2-CuO, sinterizados a 900 °C.

La microestructura del andamio CEL2 sin dopar (Figura 4.6a) muestra una porosidad interconectada con amplia variabilidad en el tamaño de poro, paredes delgadas y superficie rugosa que favorece la permeabilidad y la adhesión celular. En el caso del andamio dopado con ZnO (Figura 4.6b), también se observa una estructura porosa e interconectada, aunque más compacta, con paredes y cuellos densos; la adición de ZnO promovió la formación de vacíos durante la sinterización, dando lugar a una microestructura más heterogénea. Por su parte, el andamio dopado con SrO (Figura 4.6c) presenta poros más grandes, mejor distribuidos e interconectados, con paredes relativamente más gruesas, lo que indica que el

SrO actúa como un estabilizador de la estructura durante el tratamiento térmico al mantener la porosidad y evitar el colapso estructural. Finalmente, el andamio dopado con CuO (Figura 4.6d) exhibe una microestructura más compacta, con menor cantidad de poros y de menor tamaño, debido al efecto densificante del CuO que reduce la porosidad y genera paredes más cerradas e irregulares.

El ZnO y SrO favorecen la formación y estabilidad de la porosidad, ya que ambos óxidos contribuyen a mantener la fase vítrea estable durante la sinterización y actúan como modificadores de red al generar sitios no enlazados que facilitan la liberación de gases. En particular, el ZnO rompe los enlaces principales de la red, lo que facilita la generación de espacios vacíos. Por su parte, el SrO estabiliza la matriz y evita el colapso de las paredes durante la consolidación, manteniendo así la porosidad abierta. En contraste, el CuO reduce la porosidad debido a su tendencia a comportarse como un óxido densificante, favoreciendo procesos de cierre de poros y, en algunos casos, cristalización parcial, lo que da como resultado una estructura más compacta.

En general, la amplia distribución de tamaños de poro es fundamental, ya que facilita el intercambio catiónico durante el proceso bioactivo del andamio al estar en contacto con el fluido corporal simulado. La estructura porosa en andamios tridimensionales es importante para permitir el paso de proteínas, células y nutrientes, promoviendo la regeneración tisular. Además, la textura rugosa presente en estos andamios contribuye a mejorar la adhesión de las células progenitoras, mejorando su desempeño como soporte para la regeneración de tejido. La adecuada porosidad y rugosidad de estos andamios resalta su potencial para aplicaciones en ingeniería de tejidos.

4.2.2 Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR)

Esta técnica fue fundamental para obtener información sobre los cambios estructurales y la posible formación de nuevos grupos funcionales en la estructura final del andamio. Además, permitió evaluar si el método de tecnología de polvos genera modificaciones en la estructura y composición final del material. En la Figura 4.7 se presenta la comparación de los espectros obtenidos, donde se observa la presencia de grupos funcionales similares a los detectados en

los polvos, pero con ligeras variaciones en número de onda e intensidad. El desplazamiento, los cambios en intensidad y el ancho de las bandas se deben a que el tratamiento térmico altera las fuerzas de los enlaces, la densidad estructural, la cantidad de defectos y el grado de orden. Por tanto, un enlace más fuerte y ordenado genera una banda a mayor número de onda, mientras que un enlace más débil o desordenado presenta una banda más estrecha y a un menor número de onda, tal como se observó en los polvos de biovidrio.

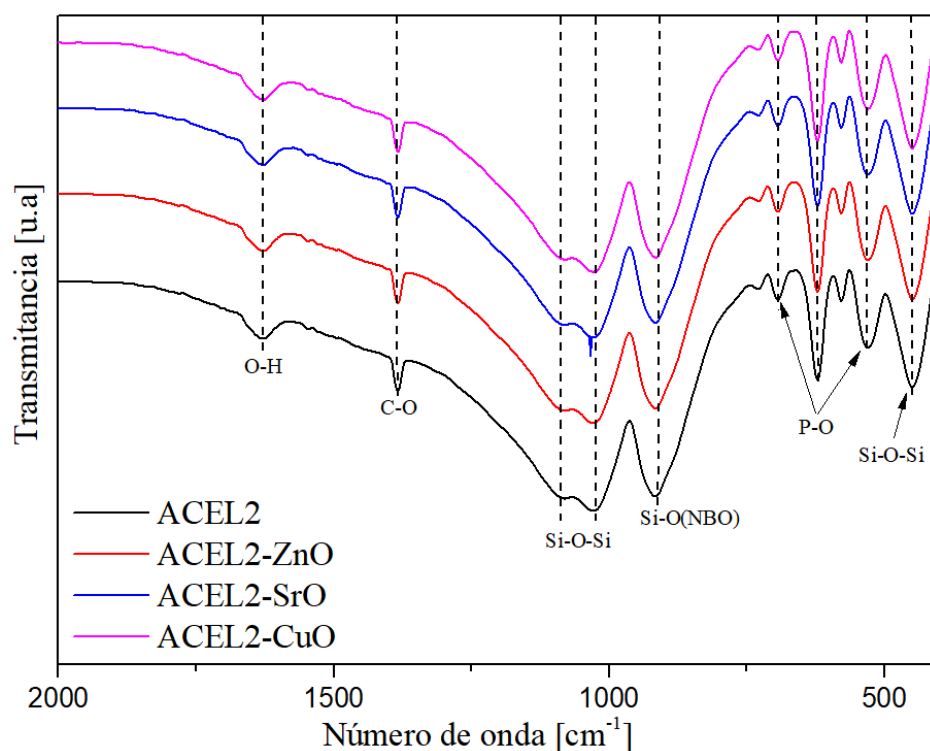


Figura 4.7 Espectros FT-IR de los andamios sinterizados.

Los espectros resultantes de los andamios después del proceso de sinterización no presentan variaciones significativas en intensidades, número de onda ni ancho de las bandas, debido a que las fases cristalinas son prácticamente las mismas para todas las formulaciones y están constituidas principalmente por unidades tetraédricas de SiO_4 , enlazadas mediante puentes Si-O-Si , donde los cationes de los óxidos dopantes tienden a ocupar sitios intersticiales o sustituir parcialmente los cationes de la composición base del vitrocerámico. Durante el

proceso de sinterización se elimina gran parte de los grupos O–H y C–O, representados con bandas de menor intensidad. Sin embargo, no se observan nuevas bandas correspondientes a enlaces con los cationes de los óxidos metálicos dopantes; por ello, las bandas que se observan corresponden a vibraciones típicas de Si–O–Si, Si–O (NBO), P–O, O–H y C–O.

Asignación de bandas y grupos funcionales

Grupos O–H:

A pesar del proceso de sinterización a 900 °C, aún se encuentran presentes bandas asociadas a grupos O–H a 1630.84 cm⁻¹ en todas las formulaciones. Su presencia se relaciona con un modo de deformación del agua molecular absorbida en la muestra, que ahora forma parte de la estructura, lo que evidencia su integración en la red cristalina [155].

Grupos C–O:

La banda de carbonato detectada a 1386.73 cm⁻¹ puede ser CO₂ atmosférico absorbido y/o CO₂ disuelto.

Enlaces Si–O–Si:

Detectados a 1033.81 cm⁻¹, corresponden a estiramientos asimétricos de los enlaces Si–O–Si de los grupos silicato principales o de los oxígenos formadores de puente dentro del estiramiento tetraédrico. Su intensidad es menor debido a la cristalización durante el tratamiento térmico de sinterización, que favoreció la formación de la fase principal denominada combeita corroborado también mediante la técnica de DRX. Además, se puede apreciar un pequeño hombro a 1085.24 cm⁻¹, atribuido a la separación de fases vítreas, es decir, la aparición de una fase rica en silicato y otra rica en fosfato [156-158].

Grupos Si–O (NBO):

Aparecen a 920.06 cm⁻¹ y se atribuyen al estiramiento asimétrico de enlaces Si–O con oxígenos no formadores de puente (NBO). Su formación en los andamios tratados térmicamente resulta de la presencia de cationes (Na⁺, Ca²⁺ y Mg²⁺), que inducen la formación de los enlaces Si–O (NBO). En la red vítrea, algunos oxígenos no están conectados a un átomo de silicio, ya que la presencia de cationes modificadores favorece la formación

de grupos SiO. Con base en esto, los grupos SiO pueden agruparse como “puente” y “no puente” con otros tetraedros SiO₄. Otros autores han reportado que la presencia de los enlaces Si–O (NBO) está relacionada con grupos silanol (Si–OH) los cuales debilitan la red vítrea [158, 159].

El tratamiento térmico permitió la formación de fases cristalinas con nuevos grupos funcionales:

Grupos P–O:

Detectados a 692.42, 622.98 y 532.33 cm⁻¹, estas bandas se atribuyen a la vibración de flexión P–O, relacionadas con el ion fosfato de la fase cristalina silicorhenanita (Na₂Ca₄(PO₄)₂SiO₄). También puede asociarse al modo de deformación de los enlaces P–O en fosfato cristalinos [156]. Su presencia evidencia claramente la formación de fases cristalinas inducidas por la sinterización.

Enlaces Si–O–Si:

Las bandas a 451.32 cm⁻¹ se atribuyen al modo de flexión simétrico de estos enlaces, típicos en biovidrios y cerámicos [82, 160]. También pueden designarse como vibraciones de flexión asociadas a los modos normales de vibración del enlace Si–O en los tetraedros SiO₄, lo que indica la presencia de silicato con estructura amorfa [158].

La persistencia de grupos O–H y NBO puede favorecer la bioactividad, ya que son sitios más reactivos y pueden facilitar la nucleación de hidroxiapatita. Por otro lado, los carbonatos pueden afectar la reactividad inicial, pero suelen disolverse fácilmente en medio fisiológicos. Finalmente, los enlaces Si–O–Si garantizan la estabilidad estructural del andamio.

La sinterización no promovió la formación de nuevos grupos funcionales ni bandas características atribuibles a fases cristalinas derivadas de los agentes dopantes, probablemente debido a su baja concentración. Sin embargo, se ha reportado que la adición de CuO en concentraciones superiores al 2 % mol puede generar cambios microestructurales y, con ello, bandas asociadas a CuO. Srivastava y col. [135] reportaron que la adición de 1% mol de ZnO no promovió la formación de enlaces atribuibles a la presencia de ZnO, pero sí la aparición de bandas Si–O–Si, P–O y enlaces Si–O (NBO), en números de onda similares

a los reportados en esta investigación. Foroutan y col. [161] también reportaron que la adición de 1, 3 y 5 % mol SrO no evidenció la formación de nuevos grupos funcionales. Chitra y col. [162] reportaron que la adición de 0.5, 1.5 y 2.5 % mol de CuO no mostró la formación de enlaces correspondientes a su adición, aunque sí la presencia de los enlaces característicos Si–O–Si y Si–O (NBO). No obstante, el aumento en la concentración de CuO redujo la intensidad de las bandas Si–O–Si.

Por lo tanto, se puede concluir que las bajas concentraciones no promueven la formación de nuevos enlaces, lo que no implica que no influya en la bioactividad o propiedades mecánicas del material.

4.2.3 Difracción de rayos X (DRX)

En la fabricación de andamios por tecnología de polvos, el proceso de sinterización constituye un paso crucial, ya que la temperatura del tratamiento térmico sobrepasa la temperatura de cristalización de las formulaciones de biovidrio y se desarrollan fases cristalinas que contribuirán al comportamiento y las propiedades mecánicas finales del andamio, además de que la cristalización puede reducir la reactividad del material. El mecanismo de formación de fases cristalinas depende de la composición del material, que favorece la nucleación y el crecimiento cristalino una vez que se alcanza la temperatura de cristalización, lo que incrementa la movilidad iónica y permite que los átomos se ordenen en estructuras periódicas.

En la Figura 4.8 se presenta la comparación de los difractogramas obtenidos mediante DRX para los andamios sinterizados a 900 °C. El tratamiento térmico permitió la transición de una fase amorfa (ver Figura 4.5) a tres fases cristalinas asociados a la devitrificación del sistema durante la sinterización, resultado de la nucleación y crecimiento inducido por el incremento de la temperatura.

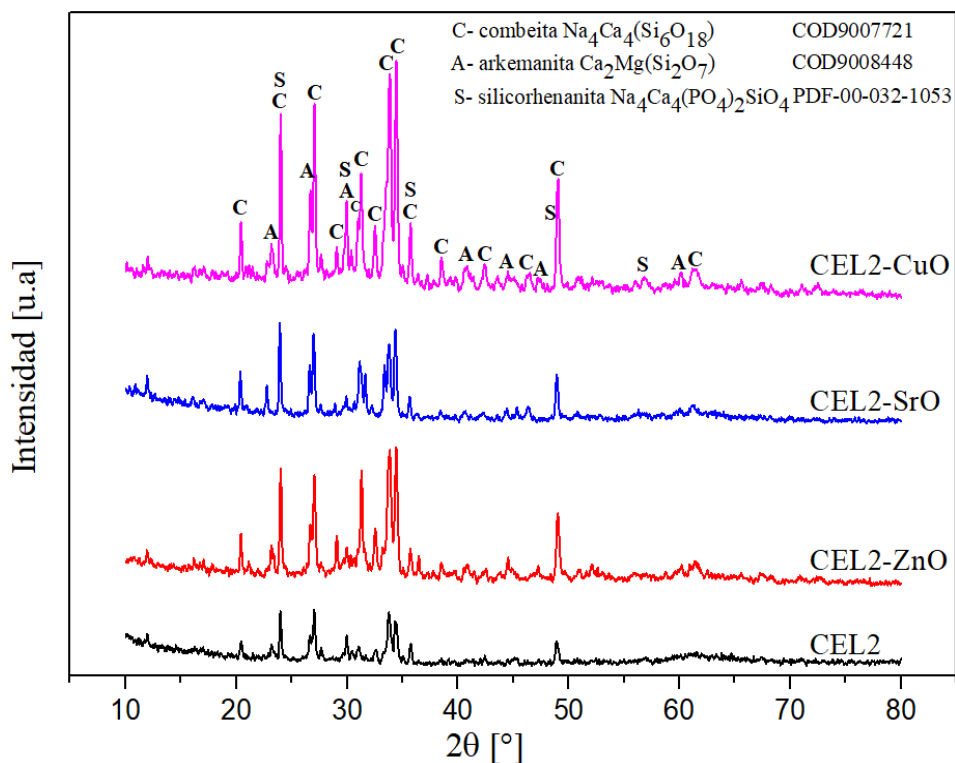


Figura 4.8 Difractogramas por DRX de los andamios sinterizados a 900 °C.

Se identificó la formación de combeita ($\text{Na}_4\text{Ca}_4(\text{Si}_6\text{O}_{18})$) como fase principal, la cual cristaliza entre 690-790 °C, según lo corroborado mediante análisis DSC (ver Figura. 4.2). Su formación se atribuye a la presencia de Si^{4+} y P^{5+} en la estructura vítrea, ya que ambos iones poseen altos números de oxidación y tienden a concentrarse por separado, generando una fase rica en fósforo y otra rica en silicio; esta última corresponde a la combeita. Además, la presencia de Na_2O y CaO en la composición del biovidrio favorece la nucleación y crecimiento de cristales de combeita cuando se alcanzan temperaturas críticas durante el sinterizado [163]. La fase secundaria corresponde a arkemanita ($\text{Ca}_2\text{Mg}(\text{Si}_2\text{O}_7)$), favorecida por la presencia de magnesio (Mg). El Mg^{2+} se coordina con oxígenos en los tetraedros SiO_4 , sustituyendo parcialmente al Ca^{2+} en la red. La combinación de Ca–Mg–Si se reorganiza en capas de tetraedros y octaedros conectados, que al enfriar cristalizan como arkemanita estable. Finalmente, a 800 °C se formó una fase rica en fosfato, conocida como silicorhenanita ($\text{Na}_2\text{Ca}_4(\text{PO}_4)_2\text{SiO}_4$), atribuida a la presencia de P_2O_5 , que actúa como sitio de nucleación para la precipitación de esta fase [78, 82, 163, 164].

El andamio CEL2 sin dopar presenta un difractograma con reflexiones bien definidas y de alta intensidad, características de una estructura cristalina estable obtenida después del tratamiento térmico a 900°C, y se utiliza como referencia para comparar con los otros patrones de difracción. En el andamio CEL2-ZnO se observan picos igualmente intensos y definidos, con un ligero incremento en su intensidad respecto al material sin dopar; aunque no se forman nuevas fases cristalinas ni se detectan picos atribuibles al ZnO, su incorporación favorece la reorganización atómica y el crecimiento cristalino. Por otro lado, el andamio CEL2-SrO muestra picos menos intensos y ligeramente ensanchados, lo que evidencia una menor cristalinidad debida a la posible distorsión de la red ocasionada por el Sr^{2+} , cuyo radio iónico es mayor que el del Ca^{2+} , lo que inhibe parcialmente la formación de la fase principal y promueve fases secundarias. Finalmente, el andamio CEL2-CuO exhibe picos más definidos y de mayor intensidad, reflejando una cristalinidad elevada, ya que la adición de CuO modifica de manera notable el proceso de cristalización y facilita la incorporación eficiente de Cu^{2+} estructura, contribuyendo al desarrollo de fases bien definidas.

En todos los difractogramas se observó la combeita como fase predominante, ya que los precursores de partida contienen Na, Ca y Si que actúan como nucleantes para su formación. Por otro lado, la presencia de Mg y P también favorece la formación de fases secundarias.

Se ha reportado que la fase combeita proporciona un buen soporte mecánico, promueve la bioactividad, facilita la adhesión celular y exhibe actividad antibacteriana al inhibir la formación de biopelículas. Debido a estas ventajas, su presencia es altamente favorable para aplicaciones de ingeniería de tejidos [165]. Fiume y col. [166] fabricaron andamios sinterizados en un rango de 600-850 °C a partir del biovidrio 47.5B, similar en composición al CEL2, e identificaron mediante DRX dos fases cristalinas a medida que aumentaban con la temperatura: combeita como fase principal y akemanita como fase secundaria. Reportaron que la presencia de combeita mejora la resistencia mecánica, alcanzando valores comparables a las del hueso trabecular humano.

Chen y col. [163] demostraron que la combeita es una fase mecánicamente resistente que incrementa la rigidez del vitrocerámico 45S5. Dependiendo del grado de cristalinidad o combeita formada, la bioactividad y la rigidez del Bioglass® pueden ajustarse según las necesidades en la fabricación de andamios para aplicaciones óseas. Sin embargo, obtener

vitrocerámicos con únicamente combeita presenta es difícil debido a la aparición de fases secundarias durante el tratamiento térmico, lo que podría reducir su efectividad.

Por otro lado, la cristalinidad es un parámetro crítico en la fabricación de andamios, ya que reduce la reactividad, pero no la bioactividad. El intercambio iónico en la interfaz material-medio fisiológico se asocia principalmente con la fase vítrea; las fases cristalinas se disuelven más lentamente que el vidrio, liberando iones como Ca^{2+} , Si^{4+} , Mg^{2+} o PO_4^{3-} de manera sostenida. Se ha reportado que una cristalinidad del 40% no afecta la bioactividad; no obstante, incluso una cristalinidad del 100 % no se suprime por completo la formación de una capa de apatita [167]. La cristalización parcial, sin embargo, puede generar inestabilidades *in vivo*, ya que las regiones amorfas remanentes se degradan más rápidamente, comprometiendo la estabilidad del implante a largo plazo por degradación preferencial en los límites de grano. Estos límites desempeñan un papel esencial, ya que contienen defectos y trazas de otros elementos que actúan como centros de nucleación, reduciendo la energía de activación del proceso de cristalización [141, 168].

Thavornnyutikarn y col. [169] estudiaron el efecto de la cristalización en diferentes medios fisiológicos: fluido corporal simulado (SBF), medio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM) y una solución DMEM sin componentes orgánicos (DML). El análisis por DRX mostró combeita como fase principal a 950 °C. Después de los tratamientos *in vitro* observaron mediante DRX una disminución progresiva de la combeita cristalina, indicando una reducción de la cristalinidad, especialmente en SBF. La disminución de combeita se atribuyó a la amorfización de la estructura debido al intercambio de iones de la superficie con las soluciones circundantes, confirmando que la combeita facilita la liberación de Ca^{2+} y Na^+ y promueve la nucleación y crecimiento de hidroxiapatita.

En esta investigación, la incorporación de óxidos metálicos, ZnO, SrO y CuO, en la composición del biovidrio CEL2 no generó nuevas reflexiones en los difractogramas, debido a sus bajas concentraciones, insuficientes para inducir la nucleación de fases cristalinas secundarias. A estas concentraciones, los iones Zn^{2+} , Sr^{2+} y Cu^{2+} se dispersan homogéneamente en la red cristalina sin segregarse ni aglomerarse. Su incorporación implica sustitución parcial de Ca^{2+} o Na^+ , generando oxígenos no formadores de puente (NBO).

Bejarano y col. [152] estudiaron la adición de 1, 5 y 10 % mol de CuO, observando que 5 % mol de Cu favoreció la formación de una fase similar a la apatita junto con cristales de Ca_2SiO_4 , mientras que 10 % mol promovió la formación de cristobalita, coesita y silicatos de calcio del tipo $\text{Na}_2\text{Ca}_3\text{Si}_6\text{O}_{16}$, $\text{Na}_2\text{CaSiO}_4$, CaSiO_3 y Ca_2SiO_4 , resultando en un material vitrocerámico.

Bellucci y col. [141] confirmaron que la adición de 10 % mol de SrO y MgO a un biovidrio con composición similar a la del CEL2 no afecta su bioactividad. Mediante análisis por DRX, identificaron que estos óxidos favorecen la formación de fases de silicato de calcio (CaSiO_3) y de otras fases secundarias; sin embargo, dichas fases fueron difíciles de identificar debido a la superposición de sus reflexiones con las de la fase primaria. Aun así, la cristalización inducida por estos óxidos no modificó el proceso de disolución ni la liberación de iones necesarios para la formación de hidroxiapatita en la superficie del material vitrocerámico.

En conclusión, la presencia de fases cristalinas obtenidas por sinterización es relevante, ya que proporciona estabilidad mecánica y mejora la resistencia frente a un posible colapso estructural, manteniendo una porosidad adecuada. Las fases cristalinas no afectan la bioactividad del material permitiendo la formación de hidroxiapatita de manera sostenida, evitando una degradación acelerada y favoreciendo la estabilidad estructural a largo plazo.

4.2.4 Resultados de porosidad y resistencia a la compresión

La estructura porosa de los andamios desempeña un papel crucial en su resistencia a la compresión; por ello, es fundamental analizar la relación entre porosidad y comportamiento mecánico en los andamios fabricados con biovidrio CEL2, tanto sin dopar como dopados con ZnO, SrO o CuO. Las curvas esfuerzo-deformación presentadas en la Figura 4.9 muestran tres etapas características: una región elástica-lineal inicial; posteriormente, una zona de colapso gradual de la estructura porosa; y finalmente, una región de densificación, en la cual los poros colapsan completamente y el material comienza a comportarse como un sólido denso, elevando bruscamente el esfuerzo hasta alcanzar valores máximos que dependen de la composición.

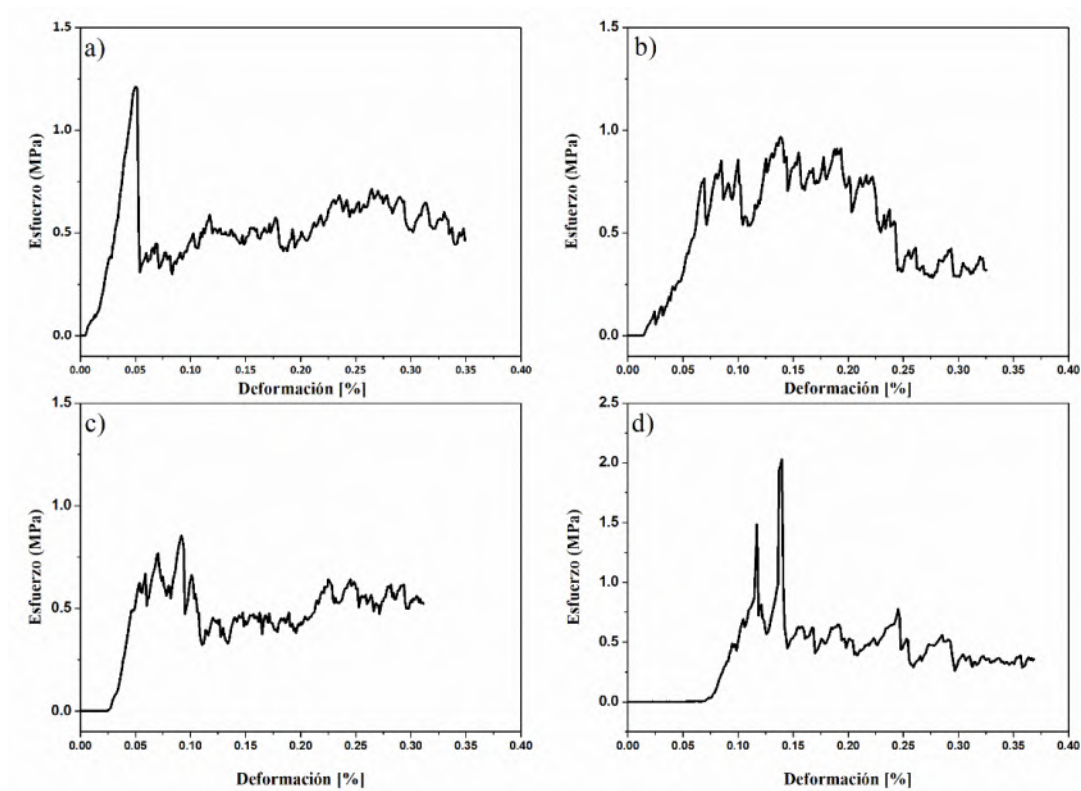


Figura 4.9 Resultados de las pruebas de resistencia a la compresión de los andamios con diferentes composiciones: a) CEL2, b) CEL2-ZnO, c) CEL2-SrO y d) CEL2-CuO.

En el andamio CEL2 sin dopar, la Figura 4.9a muestra un esfuerzo máximo de ~ 1.25 MPa con una deformación baja ($<0.05\%$). Después de alcanzar el valor máximo, la caída abrupta del esfuerzo marca la falla del andamio, indicando baja ductilidad. La curva dentada posterior refleja el colapso progresivo de la estructura porosa.

En el andamio CEL-ZnO (Figura 4.9b), el esfuerzo máximo es de 0.84 ± 0.17 MPa con una deformación de $\approx 0.05\%$. La caída del esfuerzo es menos drástica y se observan fluctuaciones irregulares que indican deformación prematura antes de la falla total. Estas fluctuaciones pueden estar asociadas al efecto del ZnO en la tenacidad del material. La forma de la curva esfuerzo-deformación sugiere que el material es capaz de absorber más energía antes de fallar, lo que se traduce en una falla menos abrupta. Aunque la resistencia máxima es menor que en el material sin dopar, el incremento en la deformación sugiere un comportamiento

menos frágil y potencialmente más favorable para aplicaciones donde una falla súbita es indeseable.

En el andamio CEL2-SrO, el esfuerzo máximo (0.82 ± 0.27 MPa) es similar al del andamio dopado con ZnO. El comportamiento de falla es dúctil-frágil, con picos suavizados y sin una caída inicial tan marcada. De acuerdo con los resultados de DRX, la menor cristalinidad asociada a la incorporación de SrO reduce la probabilidad de fractura catastrófica, permitiendo una mayor deformación plástica antes del colapso total.

En el andamio CEL2-CuO, el diagrama esfuerzo-deformación muestra un máximo de 2 ± 0.02 MPa, seguido de una caída abrupta, indicativa de un comportamiento completamente frágil. La mayor resistencia a la compresión se relaciona con la mayor cristalinidad observada por DRX, donde se identifican reflexiones correspondientes a combeita, arkemanita y silirhenanita. No obstante, esta combinación de fases resulta en una estructura rígida y frágil, lo cual explica la rápida caída del esfuerzo máximo.

En general, las curvas reflejan que la resistencia mecánica disminuye conforme aumenta la porosidad, debido a que los poros absorben el esfuerzo aplicado hasta colapsar gradualmente, provocando la fractura del andamio. En materiales celulares, la carga no se distribuye de manera uniforme, por lo que diversas regiones se fracturan en distintos momentos. A medida que aumenta el esfuerzo, algunas paredes o trabéculas colapsan localmente, lo que genera fluctuaciones. Cada fractura provoca una caída temporal del esfuerzo en la curva, luego el esfuerzo se redistribuye hacia las regiones intactas del andamio, permitiendo que la carga aumente nuevamente. Esta redistribución genera una sucesión de picos y valles en la curva esfuerzo-deformación. Otro aspecto importante en la fractura de los andamos porosos es la geometría y el tamaño del poro; al existir una amplia variación en tamaños y formas, la resistencia varía, lo que contribuye al colapso no uniforme y a las fracturas progresivas observadas.

Los valores de porosidad obtenidos (Figura 4.6) fueron de 74 %, 76.6 % y 79 % para los andamios CEL2, CEL2-ZnO y CEL2-SrO, respectivamente, mientras que el andamio dopado con CuO presentó una porosidad menor (66 %). Estas variaciones se relacionan con el efecto

de los dopantes en la viscosidad del vidrio fundido durante la síntesis. En particular, el CuO puede formar una fase líquida durante la sinterización, favoreciendo la unión entre partículas y acelerando la densificación, lo cual explica la reducción de la porosidad y el aumento del 50% en la resistencia a la compresión respecto al andamio sin dopar [154].

Estudios previos coinciden en que la porosidad incluye tanto en la respuesta mecánica como en la biológica. Torres y col. [170] reportaron andamios con valores de porosidad en el rango de 70-90 %, donde valores mayores representan mayor área superficial, lo que es más favorable para la adhesión celular, y por lo tanto para la proliferación celular. Wang y col. [171] observaron que porosidades >80 % mejoran el transporte de nutrientes ya que existe una mayor permeabilidad, pero disminuye la resistencia mecánica. Zocca y col. [172] obtuvieron andamios vitrocerámicos con porosidades superiores al 60 % y resistencia a la compresión de ~15 MPa, demostrando que porosidades moderadas mantienen un compromiso adecuado entre permeabilidad y resistencia. Morelli y col. [173] fabricaron andamios con porosidades entre 81-83 % y tamaños de poro entre 460-560 μm , dentro del rango óptimo para formación y vascularización ósea.

En general, la porosidad en los andamios es determinante para el rendimiento biológico y mecánico. Una baja porosidad proporciona resistencia, pero limita la regeneración tisular; mientras que una alta porosidad mejora la funcionalidad biológica, aunque requiere de estrategias para compensar su fragilidad. En este trabajo, la porosidad y el tamaño de poro se encuentran dentro del rango reportado para hueso trabecular (50-90 %), lo que confirma la viabilidad de los andamios para aplicaciones en ingeniería de tejido óseo. La Figura 4.10 y la Tabla 4.4 muestran que solo los andamios dopados con CuO alcanzaron valores de resistencia comparables con el hueso trabecular (0.8-12 MPa), aunque todos se encuentran dentro del estándar clínico.

La adición de dopantes también influye en las propiedades mecánicas. El Zn^{2+} con menor radio iónico que el Ca^{2+} (74 pm contra 100 pm), distorsiona la red y reduce la cristalinidad; en concentraciones elevadas (>10 % p/p) disminuye la resistencia debido a la formación de aglomerados [80, 128]. Feng y col. [174] observaron que la adición de ZnO en la red del biovidrio disminuyó el tamaño de partícula de 1.54 a 0.29 μm con contenidos de 0.5-2.5 % en peso, dicha disminución se atribuye a que el ZnO que actúa como un óxido refractario,

que puede tener un efecto inhibitor en el crecimiento de partícula, lo que condujo a la obtención de andamios con estructura densas y compactas mejorando sus propiedades mecánicas a diferencia de los andamios sin dopar. El SrO, por su parte, expande la red al sustituir Ca^{2+} por Sr^{2+} , cuyo mayor tamaño afecta la estabilidad (118 pm contra 100 pm), generando zonas débiles y disminuyendo la estabilidad mecánica [81]. En contraste, el CuO mejora notablemente la resistencia al permitir la formación de estructuras densas y compactas, gracias a su menor radio iónico (77 pm) y a su efecto en la sinterización [175].

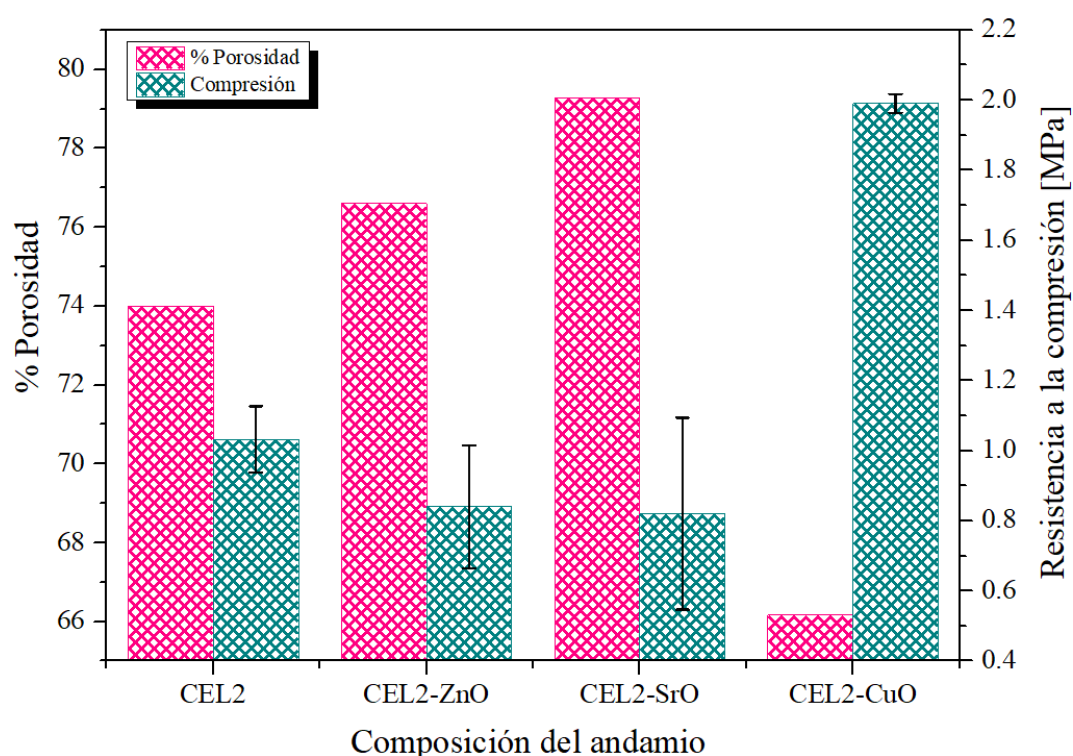


Figura 4.10 Relación entre el porcentaje de porosidad y la resistencia a la compresión de los andamios sin dopar y dopados con ZnO, SrO y CuO.

Los valores obtenidos de resistencia mecánica, porosidad y tamaño de poro son adecuados, ya que estos parámetros afectan directamente la funcionalidad del andamio en términos de soporte estructural, infiltración celular, nutrición y vascularización. Zamani y col. [37] reportaron que la adición de ZnO y MgO generó una amplia distribución de poros en los andamios, con tamaños alrededor de 75 y 275 μm ; esta distribución mejoró la función celular y la regeneración ósea, mientras que los poros ultrafinos favorecieron la adhesión celular y

la adsorción de proteínas. Por otro lado, Yin y col. [94] observaron que la incorporación de SrO en concentraciones de 3, 6 y 9% mol resultó en valores de porosidad de $83 \pm 1.5 \%$, $82 \pm 3 \%$ y $80 \pm 2.7 \%$, respectivamente, con valores de resistencia mecánica de 10.8 ± 0.1 , 11.2 ± 0.5 y 12.3 ± 0.2 MPa, valores similares entre sí. De estos resultados se concluye que mayores contenidos de SrO reducen la porosidad y aumentan la resistencia mecánica al promover la densificación y el refinamiento de grano durante la sinterización. Asimismo, Erol y col. [177] estudiaron el efecto de diferentes concentraciones de CuO, encontrando que una adición de 0.5 % de CuO resultó en valores de resistencia de 0.6-1 MPa, mientras que concentraciones de 5 % y 10 % alcanzaron valores de 1.0 ± 0.3 MPa y 1.5 MPa, respectivamente, con 85% de porosidad. Estos valores son comparables a los obtenidos en esta investigación y se encuentran dentro del rango característico del hueso trabecular. Finalmente, la resistencia mecánica de los andamios también está influenciada por las fases cristalinas formadas tras la sinterización a 900 °C, las cuales actúan como refuerzos estructurales dentro de la matriz porosa, redistribuyen la carga, promueven una densificación parcial, reducen la fragilidad y mejoran la tenacidad a la fractura. La Tabla 4.5 muestra las fases identificadas y su contribución a las propiedades mecánicas.

Tabla 4.4 Comparación de tamaño de poro, porcentaje de porosidad y resistencia a la compresión en andamios de biovidrio

Muestra	Tamaño de poro [μm]	Porosidad [%]	Resistencia a la compresión [MPa]	Ref.
CEL2	42-313	74	1.25 ± 0.09	-
CEL2-ZnO	30-270	76.6	0.84 ± 0.17	-
CEL2-SrO	20-445	79.29	0.82 ± 0.27	-
CEL2-CuO	10-490	66.16	2.00 ± 0.02	-
Hueso trabecular	10-500	50-90	0.8-12	[170, 176]

Tabla 4.5 Fases cristalinas y su efecto en las propiedades mecánicas [163]

Fase cristalina	Efecto en las propiedades mecánicas
Combeita $\text{Na}_4\text{Ca}_4(\text{Si}_6\text{O}_{18})$	Aumenta la dureza y la resistencia a la compresión, mejora la estabilidad mecánica
Arkemanita $\text{Ca}_2\text{MgSi}_2\text{O}_7$	Mejora la resistencia mecánica y el control de la degradación
Silicorhenanita $\text{Na}_2\text{Ca}_4(\text{PO}_4)_2\text{SiO}_4$	Actúa como barrera contra la propagación de grietas, mejorando la tenacidad

En conclusión, la porosidad, la microestructura y la presencia de dopantes determinan las propiedades mecánicas y funcionales de los andamios. Entre los dopantes estudiados, el CuO fue el más eficaz para incrementar la resistencia a la compresión sin comprometer la bioactividad, debido a su efecto sinterizante y a la formación de estructuras más densas y continuas, con menos defectos y microgrietas. En contraste, ZnO y SrO muestran un efecto menos favorable sobre la resistencia mecánica, ya sea por su limitada capacidad de sinterización (ZnO) o por la generación de fases frágiles y discontinuas (SrO).

4.3. Resultados de los estudios *in vitro*

4.3.1 Ensayos de bioactividad

4.3.1.1 Estudios de pH y pérdida de peso

La Figura 4.11a muestra las curvas de variación del pH de los andamios tras su inmersión en SBF durante distintos tiempos. Al entrar en contacto con la solución, los andamios experimentan reacciones químicas fundamentales para evaluar su bioactividad, es decir, su capacidad para formar una capa bioactiva de hidroxiapatita. Estos procesos se reflejan en la variación de pH del medio, la cual presenta dos fases: un aumento inicial del pH seguido de una disminución progresiva. Todas las composiciones parten de un pH inicial de 7.4.

Fase 1: aumento de pH (0-14 días)

Esta etapa se relaciona con la disolución superficial del andamio. En ella, los iones de (Na^+) y calcio (Ca^{2+}) se intercambian con iones de hidrógeno (H^+) de la solución, liberando iones hidroxilo (OH^-), lo que vuelve la solución más alcalina. Este incremento confirma la bioactividad del material, pues favorece la posterior formación de hidroxiapatita.

Andamio CEL2 sin dopar: Presenta el aumento de pH más pronunciado, alcanzando un máximo de 8 alrededor del día 14, lo que sugiere una elevada velocidad de disolución típica de los biovidrios.

Andamio CEL2-ZnO: Alcanza un pH máximo de 7.8 en el día 7. La presencia de ZnO parece ralentizar la disolución, probablemente por la integración de los iones de zinc en la red vítrea, haciéndola más estable.

Andamio CEL2-SrO: Muestra un aumento gradual del pH hasta un máximo de 7.9 en el día 14, similar al andamio sin dopar, aunque con menor intensidad. Esto concuerda con su menor cristalinidad, la cual afecta la cinética de disolución.

Andamio CEL2-CuO: Exhibe un aumento rápido del pH, alcanzando 7.9 en el día 7. Su mayor cristalinidad, especialmente por la presencia de silicorhenanita rica en fósforo, podría favorecer una disolución inicial acelerada.

Fase 2: Diminución del pH

Después del incremento inicial, el pH comienza a descender debido a la precipitación de fosfatos de calcio (CaP), consumiendo iones OH^- , CO_3^{2-} , PO_4^{3-} y Ca^{2+} , esenciales para la formación de carbonato de hidroxiapatita (HCA). La disminución del pH confirma que continúa la mineralización superficial. A los 28 días, todas las composiciones alcanzan valores cercanos o inferiores a 7.2, señal de estabilización y disminución de la disolución. Las diferencias observadas entre andamios reflejan variaciones en su cinética de disolución y velocidad de precipitación de HCA.

El pH desempeña un papel fundamental en la deposición de la Ca/P, ya que valores elevados favorecen la precipitación de fosfatos de calcio. Durante la formación ósea, el pH también

influye en la reticulación del colágeno y en la precipitación subsecuente de hidroxiapatita [178].

La Figura 4.11b muestra la pérdida de peso de los andamios en SBF, la cual aumenta con el tiempo debido a la disolución y degradación superficial. Este parámetro un indicador directo de bioactividad, ya que una degradación controlada permite la reabsorción del andamio y su sustitución por tejido óseo.

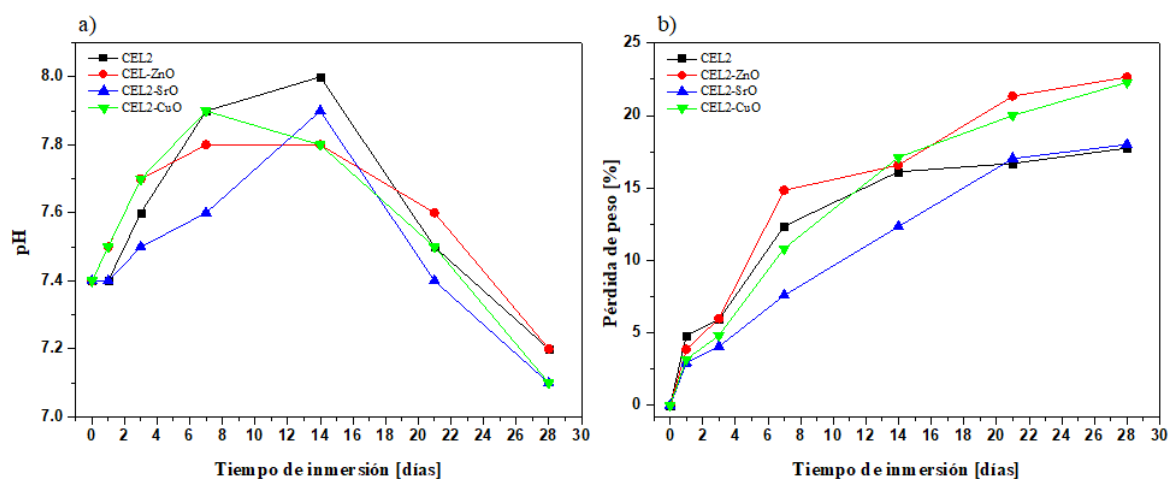


Figura 4.11 a) Variación de pH en la solución SBF. b) Pérdida de peso de los andamios en función del tiempo de inmersión.

Andamio CEL2 sin dopar: Presenta una pérdida de peso inicial rápida, alcanzando 18 % al día 28. Este comportamiento concuerda con su elevada reactividad inicial.

Andamio CEL2-ZnO: Muestra la mayor pérdida de peso (>22 %). Aunque el ZnO estabiliza el pH inicialmente, parece promover una degradación sostenida a largo plazo.

Andamio CEL2-SrO: Exhibe la menor pérdida de peso, alcanzando aproximadamente 18%. Su baja cristalinidad y estructura más estable favorecen una degradación lenta, deseable para aplicaciones que requieren reabsorción prolongada.

Andamio CEL2-CuO: Similar al andamio con ZnO, supera el 22 % de degradación. La presencia de fases cristalinas más estables y modificación de la red vítrea por Cu^{2+} parecen favorecer un proceso de disolución más completo.

El comportamiento de degradación se relaciona estrechamente con la temperatura de cristalización de los andamios. Los andamios sin dopar, con una temperatura de cristalización elevada (798 °C), desarrollan una estructura más compacta y estable, lo que reduce su degradación. Los dopados con SrO (746 °C) también muestran estabilidad gracias al fortalecimiento de los enlaces Si-O. En cambio, los dopados con ZnO (736 °C) y CuO (694 °C) presentan temperaturas más bajas de cristalización lo que se reduce en redes vítreas menos estables y mayor degradabilidad. En particular, el Cu^{2+} , debido a su menor radio iónico en comparación con el Ca^{2+} , debilita la red cristalina, reduciendo la estabilidad al romper los enlaces Si-O-Si, lo que lo hace más propenso a la disolución, y, en consecuencia, promueve una mayor degradación del andamio.

Los resultados evidencian el efecto de los dopantes: los andamios con SrO presentaron menor variación de pH y menor pérdida de peso, lo que sugiere una degradación más controlada dentro del rango fisiológico óptimo (7.4 ± 0.4), condición favorable para cultivos celulares. Por su parte, los andamios dopados con ZnO y CuO exhibieron mayor pérdida de peso, indicando una mayor degradación. Estos resultados resaltan la importancia de la cristalización y la estructura porosa en la bioactividad, ya que una alta cristalinidad puede retardar la formación de HCA, mientras que la porosidad facilita el intercambio iónico, gracias a la interconexión de poros presentes y la alta área superficial. En este contexto, la combinación de cristalinidad y porosidad ha demostrado ser efectiva para propiciar la formación de la hidroxiapatita característica de los materiales bioactivos, como se observa en los resultados de pérdida de peso y cambios de pH. En consecuencia, los andamios estudiados han mostrado una excelente bioactividad y degradabilidad, características que los hacen idóneos para su uso como implantes, debido a su capacidad para formar una capa de hidroxiapatita carbonatada (HCA) similar a la fase mineral de los huesos. Como se mencionó previamente, la cristalización es un factor importante en la bioactividad. En comparación con estudios previos, como los de Sergi y col. [93], donde la formación de HCA se observó hasta después de 14 días en vitrocerámicos altamente cristalinos dopados con ZnO, en esta

investigación se identificaron cristales de HCA desde los días 3 y 7, lo que confirma que la cristalización no inhibe la bioactividad, sino que únicamente la ralentiza.

La Figura 4.12 muestra los andamios después de la inmersión en SBF. Los andamios sin dopar y los dopados con ZnO y SrO (Figura 4.12a-c) conservaron su color original, mientras que los dopados con CuO (Figura 4.12d) presentaron un cambio de tonalidad atribuible a la liberación de iones de Cu^{2+} . Esta liberación puede influir positivamente en los ensayos bacteriológicos, mediante la inhibición del crecimiento bacteriano, así como en estudios celulares, al favorecer procesos como angiogénesis, osteogénesis, y proliferación celular.

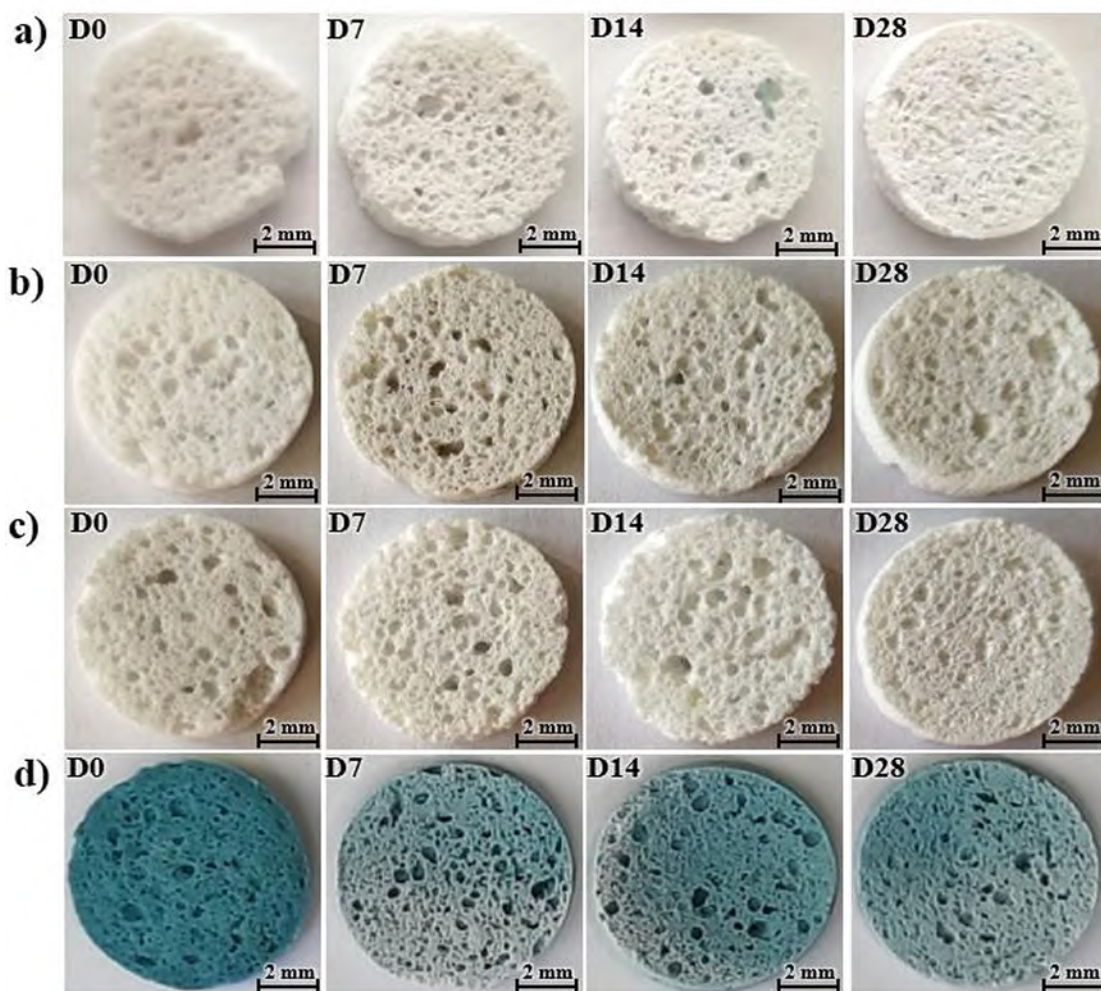


Figura 4.12 a) Andamios CEL2 sin dopar después del tratamiento en SBF, b) andamios CEL2-ZnO, c) andamios CEL2-SrO y d) andamios CEL2-CuO, después del tratamiento en SBF.

4.3.1.2 Análisis por microscopía electrónica de barrido (MEB)

La formación de la capa bioactiva de hidroxiapatita carbonatada (HCA) se confirmó mediante microscopía electrónica de barrido (MEB) utilizando una magnificación de 250x. En la Figura 4.13 se observa claramente la evolución de dicha capa después de los ensayos de bioactividad *in vitro*, resultado del intercambio iónico entre los andamios de biovidrio (CEL2, CEL2-ZnO, CEL2-SrO y CEL2-CuO) y el fluido corporal simulado (SBF) por diferentes tiempos de inmersión (1, 3, 7, 14, 21 y 28 días), identificados como D1, D3, D7, D14, D21 y D28, respectivamente.

Andamios CEL2 sin dopar

Las micrografías obtenidas muestran la progresión de la bioactividad en la superficie del andamio durante su inmersión en SBF. El cambio más significativo corresponde a la formación y crecimiento de la capa de hidroxiapatita.

Días 1 y 3: Se observaron pequeños precipitados en forma de agujas alargadas orientadas aleatoriamente y distribuidas parcialmente sobre la superficie. Este comportamiento indica el inicio de la formación de la capa bioactiva, producto de la liberación de iones Ca^{2+} y PO_4^{3-} hacia la solución SBF. Durante esta etapa, los cambios en pH y pérdida de masa fueron mínimos.

Día 7: El pH alcanzó un valor de 7.9. Para este tiempo, el proceso de nucleación de hidroxiapatita se estabilizó, cubriendo la superficie con una morfología globular. El intercambio iónico continuó, confirmando que el andamio aún se encontraba en etapa activa de disolución.

Día 14: La superficie presentó una capa más gruesa y prácticamente continua, observándose estructuras en forma de racimos características de los cristales de hidroxiapatita. El pH alcanzó su valor máximo (pH 8) y posteriormente comenzó a disminuir, indicando la formación de una capa densa que limita la posterior disolución iónica.

Día 21: La capa de hidroxiapatita se mostró más homogénea y compacta, cubriendo progresivamente los poros originales. El descenso del pH confirmó la continuación del proceso de mineralización.

Día 28: La superficie estuvo completamente cubierta por una capa densa con morfología tipo coliflor. La disolución del material disminuyó, acompañada de un descenso del pH hasta 7.2. Esta capa actuó como barrera, reduciendo la lixiviación de los iones del biovidrio [169]. Como resultado, la pérdida de peso superó el 15%.

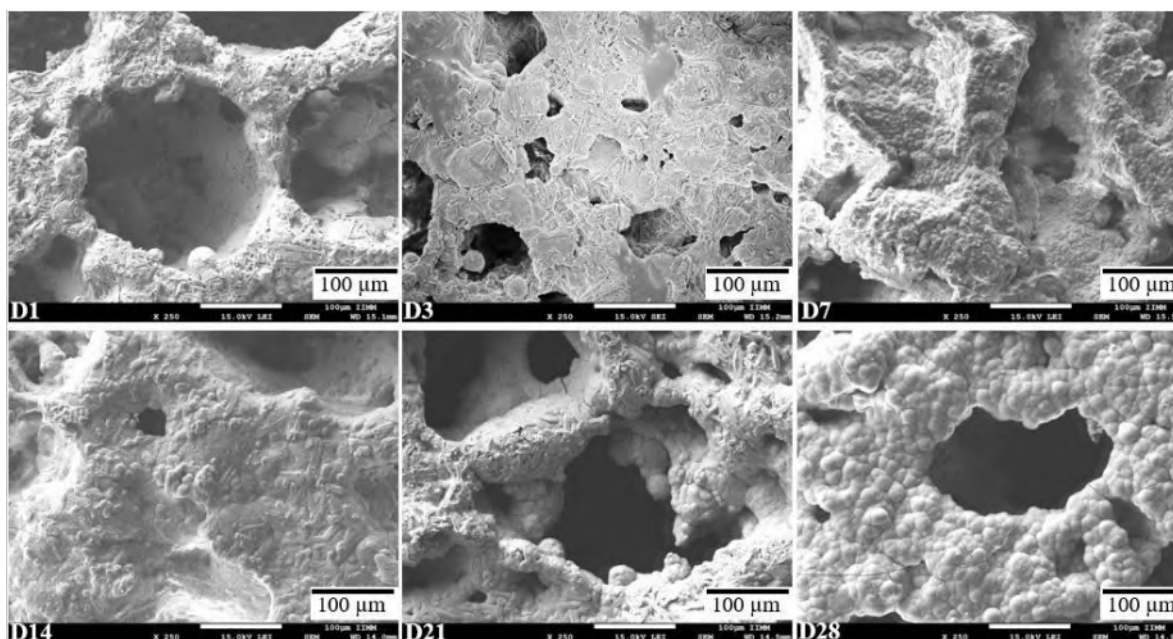


Figura 4.13 Micrografías obtenidas por MEB de los andamios de biovidrio CEL2 después de la inmersión en SBF por diferentes tiempos.

Andamios CEL2 dopados con ZnO

En los andamios dopados con ZnO (Figura 4.14), la formación de la capa bioactiva ocurrió de manera más lenta.

Día 1: Se observó una superficie lisa con escasa formación de hidroxiapatita, a pesar del incremento de pH, sin evidencia visible de nucleación.

Días 3 y 7: Comenzaron a formarse pequeños núcleos sobre la superficie correspondientes a hidroxiapatita, acompañados de un rápido aumento de pH y pérdida de peso.

Día 14: La superficie mostró una capa más densa con morfología de tipo coliflor. El pH alcanzó 7.8 y posteriormente disminuyó, indicando un crecimiento activo.

Días 21 y 28: La capa se volvió más homogénea y compacta, indicando una mineralización completa, con pérdida de peso superior al 20% y pH final de 7.2.

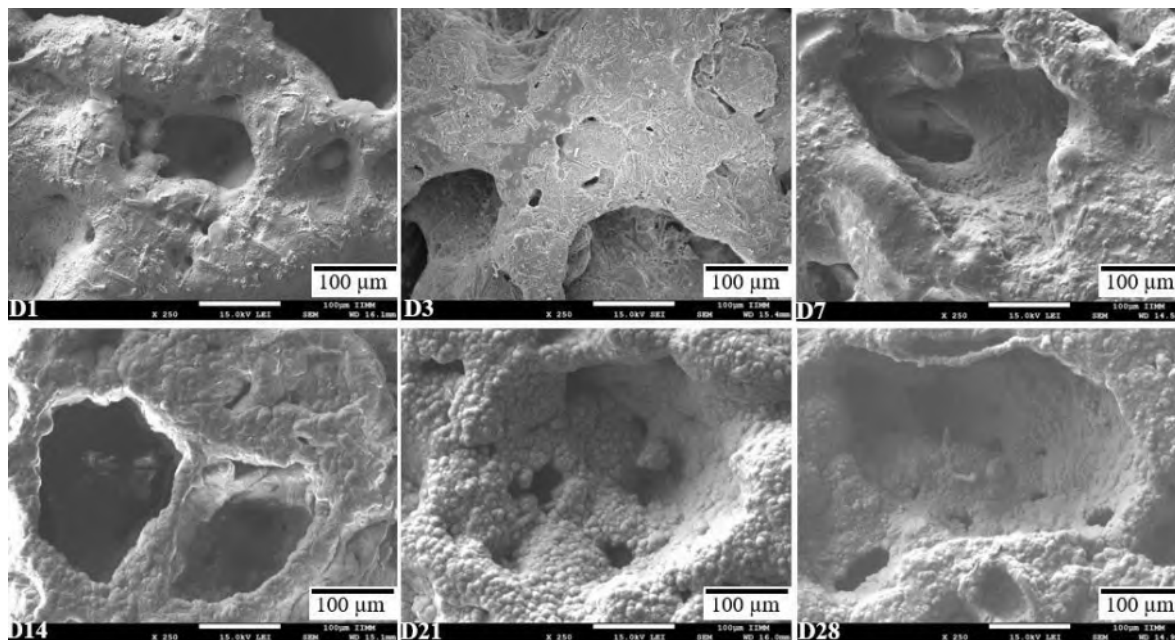


Figura 4.14 Micrografías obtenidas por MEB de los andamios de biovidrio CEL2 dopados con ZnO después de la inmersión en SBF por diferentes tiempos.

En este caso, la presencia de zinc ralentizó la disolución del andamio, reflejándose en una curva de pH menos pronunciada respecto al material sin dopar. Esto se debe a que el Zn^{2+} actúa como formador parcial de red, sustituyendo o compitiendo con el Ca^{2+} en sitios estructurales, aumentando la conectividad de la red y reduciendo la movilidad iónica. Asimismo, los iones Zn^{2+} interactúan con los iones PO_4^{3-} formando fosfatos de calcio y zinc incapaces de cristalizar como hidroxiapatita [7].

En consecuencia, el ZnO retarda la formación de HCA, puede mejorar la resistencia mecánica, aportar actividad antibacteriana dependiendo de su concentración y favorecer la proliferación osteoblástica.

Andamios CEL2 dopados con SrO

En los andamios dopados con SrO (Figura 4.15), la formación de la capa bioactiva presentó una cinética más lenta en comparación con el biovidrio sin dopar.

Día 1: La superficie mostró una morfología lisa con pequeños cristales atribuibles al inicio de la formación de la capa bioactiva.

Día 3: Se observó una superficie rugosa asociada a la nucleación de hidroxiapatita. El incremento del pH fue menos pronunciado, lo que sugiere una disolución más lenta del andamio.

Día 7: La superficie se encontró mayormente recubierta por la nueva fase, con morfología en forma de agujas o cristales alargados. El pH alcanzó un valor de 7.6 y la pérdida de peso superó el 10%.

Día 14: La capa bioactiva se volvió más densa y homogénea, cubriendo de forma más completa la superficie. El pH alcanzó su valor máximo (7.9), favoreciendo el crecimiento de la fase.

Días 21 y 28: La capa de hidroxiapatita adquirió una morfología tipo coliflor, completamente continua y compacta, indicando que el proceso de mineralización avanzó significativamente.

La adición de SrO retrasó la formación de hidroxiapatita debido a la reducción del intercambio iónico Na^+/H^+ con el medio circundante. Al igual que el Zn^{2+} , el Sr^{2+} sustituyó parcialmente al Ca^{2+} dentro de la red del biovidrio, generando una expansión local y aumentando la estabilidad estructural debido a la diferencia en radios iónicos. Como consecuencia, la velocidad de disolución disminuyó, especialmente la liberación de Ca^{2+} , esencial para la nucleación de la hidroxiapatita. Aunque el Sr^{2+} puede incorporarse en la estructura de la hidroxiapatita, su incorporación es más lenta. Además, no precipita de manera equivalente al Ca^{2+} en forma de fosfatos estable, lo que reduce la tasa de nucleación inicial.

La menor variación de pH también contribuye a inhibir la formación de fosfatos de calcio [179-181]. Este comportamiento ha sido previamente reportado por Zhao y col. [92], quienes observaron que la incorporación de SrO y ZnO (0, 5 y 10 % mol) mejoró la estabilidad química del material pero disminuyó la velocidad de degradación liberación iónica.

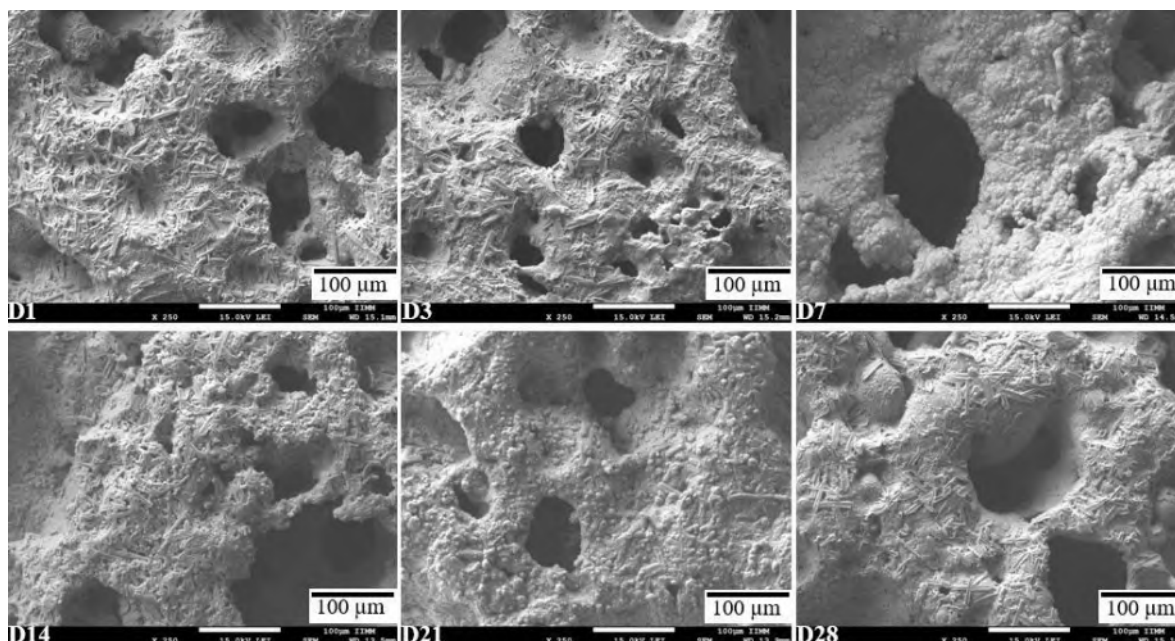


Figura 4.15 Micrografías obtenidas por MEB de los andamios de biovidrio CEL2 dopados con SrO después de la inmersión en SBF por diferentes tiempos.

A pesar del retraso en la formación de la capa bioactiva, la presencia de SrO puede resultar benéfica en aplicaciones a largo plazo, debido a su capacidad para favorecer la proliferación y diferenciación osteoblástica, estimular la expresión de marcadores osteogénicos e inhibir la resorción ósea.

Andamios CEL2 dopados con CuO

Los andamios dopados con CuO (Figura 4.16) exhibieron un comportamiento opuesto, mostrando una formación acelerada de la capa bioactiva.

Días 1 y 3: Se observó una mayor precipitación superficial con aglomerados que crecieron rápidamente, indicando una nucleación temprana.

Día 7: La superficie estuvo completamente cubierta por una capa densa con morfología tipo coliflor, alcanzando un pH de 7.9.

Día 28: La capa se volvió más compacta, reflejando la capacidad del CuO para incrementar la disolución inicial del material y elevar el pH desde los primeros días de inmersión. Esto favoreció la formación de grupos silanol (Si-OH) y una capa rica en fosfatos de calcio [175].

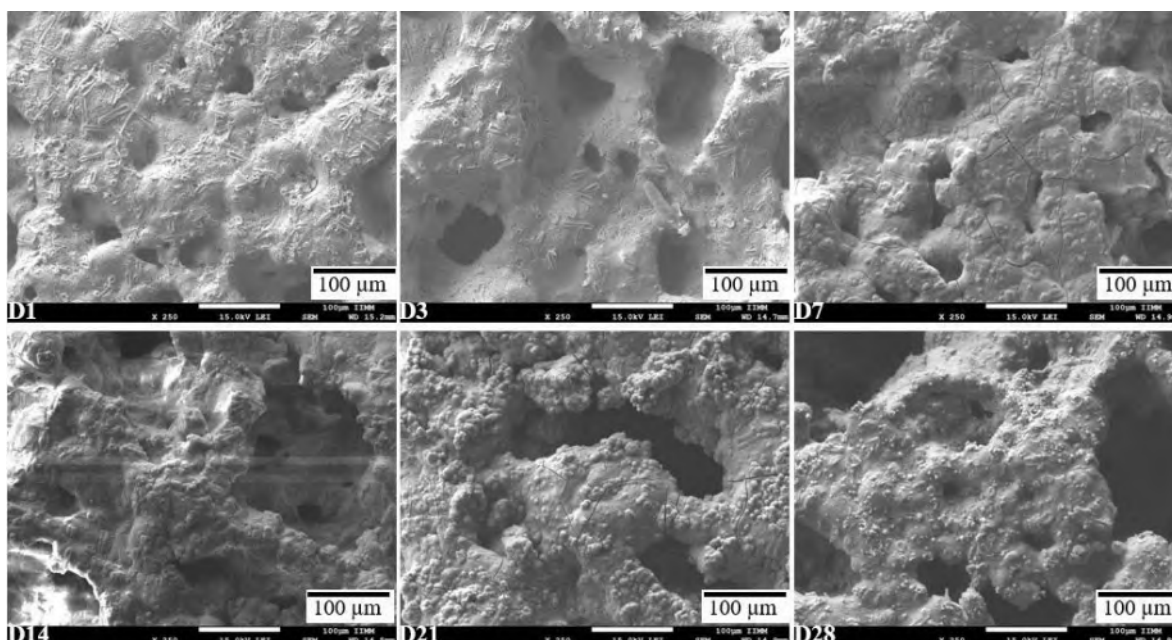


Figura 4.16 Micrografías obtenidas por MEB de los andamios de biovidrio CEL2 dopados con CuO después de la inmersión en SBF por diferentes tiempos.

En este caso, el Cu^{2+} actuó como modificador de red, debilitando los enlaces Si-O-Si y promoviendo una mayor disolución de la matriz vitrocerámica. Como consecuencia, aumentó la liberación de iones de Ca^{2+} y PO_4^{3-} hacia el medio. Su presencia favoreció la formación de defectos estructurales (vacancias, enlaces no puente), aumentando la rugosidad superficial,

generando sitios preferenciales para la precipitación de fosfatos de calcio. Además, el incremento del pH debido al intercambio iónico Na^+/H^+ y Ca^+/H^+ favoreció la nucleación.

No obstante concentraciones superiores a 2-3 % mol pueden inhibir la formación de hidroxiapatita y generar citotoxicidad por sobreliberación iónica.

En conclusión, el biovidrio CEL2 demostró capacidad intrínseca para formar hidroxiapatita. La adición de dopantes modificó la cinética del proceso, pero no impidió la formación final de la capa bioactiva. Estos resultados confirman la bioactividad del material y evidencian los cambios superficiales inducidos por la interacción con fluidos fisiológicos.

La capa de hidroxiapatita carbonatada favorece la integración con tejidos circundantes, promoviendo la diferenciación osteoblástica y la unión entre el biomaterial y el tejido óseo. Para optimizar el desempeño de los andamios en estudios *in vitro*, se recomienda realizar tratamientos previos que minimicen posibles citotóxicos asociados al pH y renovar periódicamente la solución SBF para mantener niveles iónicos adecuados, favoreciendo así el crecimiento de la hidroxiapatita [181, 182].

4.3.1.3 Análisis por espectroscopía infrarroja (FTIR)

El análisis FTIR permitió confirmar la formación de la capa bioactiva mediante la aparición de nuevas bandas y la evolución de grupos funcionales característicos después de la inmersión en SBF a diferentes tiempos. La Figura 4.17 muestra los espectros obtenidos para los andamios evaluados. En 1641.27 cm^{-1} se identificaron grupos O–H asociados a agua molecular adsorbida, mientras que la banda en 1385.71 cm^{-1} corresponde a vibraciones C–O relacionadas con carbonatos formados por la incorporación de iones desde la solución y el incremento del pH, lo que evidencia la nucleación y crecimiento progresivo de cristales de hidroxiapatita carbonatada (HCA). Las bandas asignadas a enlaces Si–O y Si–O–Si, propias de la red vitrocerámica, disminuyen a medida que avanza la disolución del material, permitiendo la liberación de iones y el desarrollo de la nueva capa superficial. Finalmente, las bandas P–O constituyen la evidencia más relevante de la formación de hidroxiapatita, correspondientes a los grupos fosfato (PO_4^{3-}) consumidos desde la solución SBF. Estos

grupos funcionales se observaron en todas las formulaciones, confirmando la bioactividad de los andamios.

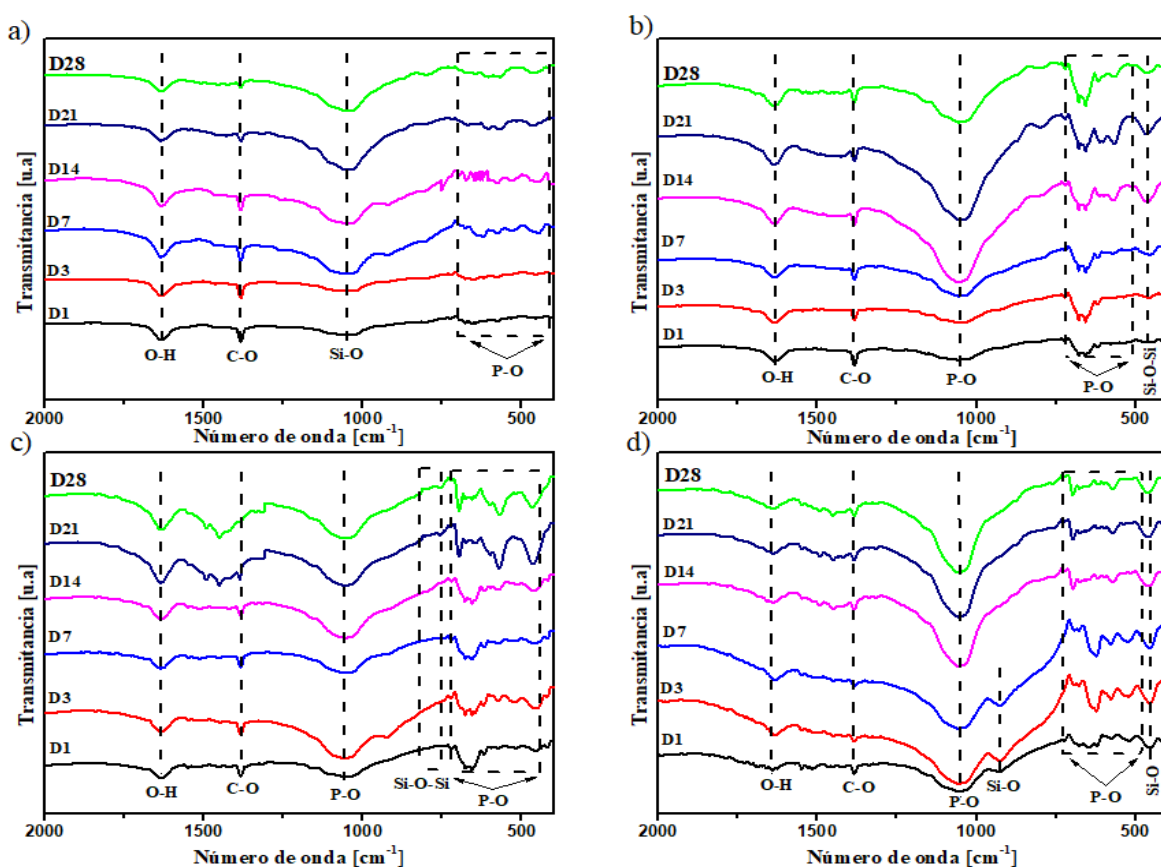


Figura 4.17 Espectros FT-IR de los andamios tras distintos tiempos de inmersión en SBF: a) CEL2, b) CEL2-ZnO, c) CEL2-SrO y d) CEL2-CuO.

Andamio CEL2 sin dopar

La Figura 4.17a muestran un aumento progresivo en la intensidad de las bandas P-O y C-O desde el día 1 y hasta el día 28, indicando la formación continua de fosfato de calcio. La banda Si-O sugiere la formación inicial de un gel rico en SiO₂ que posteriormente evoluciona hacia una película amorfa Ca-P [183], mientras que las vibraciones P-O, aunque de baja intensidad, confirman la presencia temprana de fosfatos de calcio [184]. La rápida aparición

de esta fase es consistente con el incremento más pronunciado del pH registrado para este andamio, lo que refleja una alta reactividad superficial.

Andamio CEL2 dopado con ZnO

En la Figura 4.17b se observa una evolución similar a la del andamio sin dopar, aunque con mayor intensidad de las bandas P–O a partir del día 14, lo que sugiere una formación más abundante de apatita, atribuida a la afinidad de los grupos PO_4^{3-} por coordinarse con los iones Zn^{2+} en lugar de Ca^{2+} [129, 185, 186]. La banda en 463.37 cm^{-1} corresponde al estiramiento simétricos Si–O–Si, indicando la presencia remanente de fases cristalinas a base de silicatos [187, 188]. La mayor intensificación de las bandas P–O entre los días 21 y 28 sugiere que el zinc promovió una nucleación más eficiente y una capa de HA más densa, lo cual coincide con la elevada pérdida de peso registrada, reflejando una tasa de degradación sostenida.

Neščáková y col. [7] reportaron que la adición de ZnO retrasa la formación de hidroxiapatita, incluso después de 14 días de tratamiento. De manera complementaria, Kanzaki y col. [189] señalaron que el zinc ralentiza la nucleación e inhibe la cristalización, debido a que los iones Zn^{2+} presentes en los sitios de crecimiento activos de hidroxiapatita disminuyen su desarrollo durante las etapas iniciales de mineralización en SBF. Finalmente, Dietrich y col. [190] observaron que la incorporación de ZnO favorece la aparición de estiramientos simétricos de Si–O–Si en 470 y 795 cm^{-1} , asociados con la cantidad de sílice presente en la capa formada. Asimismo, reportaron que la intensidad de la banda a 795 cm^{-1} disminuye con el aumento en el contenido de ZnO.

Andamio CEL2 dopado con SrO

La Figura 4.17c revela bandas en 1060.09 cm^{-1} y $447.87\text{-}724.31\text{ cm}^{-1}$ asociadas a enlaces P–O, los cuales se atribuyen a la presencia de hidroxiapatita. Se detectó además una banda adicional entre $740\text{-}835\text{ cm}^{-1}$ atribuida a enlaces Si–O–Si, lo que indica la formación de gel superficial de sílice después del intercambio iónico Na^+/H^+ , observable desde los primeros días y más marcado con el tiempo [86, 191]. Este comportamiento concuerda con la menor variación de pH y la reducción gradual de pérdida de peso, sugiriendo que el SrO ralentizó la disolución del andamio, favoreciendo una formación de HA más lenta y controlada.

La adición de SrO aumentó las temperaturas de transición vítrea y de cristalización con respecto al biovidrio base, lo que ocasiona una ralentización en la formación de hidroxiapatita, como se observó en esta investigación. Un efecto similar fue observado por Hu y col. [192], quienes reportaron que la sustitución parcial de Ca^{2+} por Sr^{2+} disminuyó la liberación de iones de Na^+ en SBF, reduciendo así su capacidad de formación de apatita. En contraste, Taherkhani y col. [193] informaron que la incorporación de una cantidad relativamente alta de estroncio incrementó la formación de HA tanto en vidrios bioactivos obtenidos por fusión y temple como por sol-gel, debido a la disminución de la conectividad de la red de sílice.

Andamio dopado con CuO

La Figura 4.17d muestra una aparición temprana e intensa de bandas P–O en 1053.35 y 501.81-726.33 cm^{-1} , indicando una mayor disolución del material y una rápida cristalización de hidroxiapatita [152]. Se observaron también enlaces Si–O en 455.96 cm^{-1} con baja intensidad y estrechamiento de la banda, asociados a la formación de fases a base de fosfatos. A los 28 días, la alta intensidad de las bandas P–O confirma una capa de HA densa, coherente con la rápida pérdida de peso y la elevada resistencia mecánica. La presencia de fases cristalinas más definidas habría favorecido la formación acelerada de la capa de fosfatos de calcio, resultando en una bioactividad superficial elevada y adecuada en ingeniería de tejidos. Este comportamiento coincide con lo reportado por Hoppe y col. [194], quienes observaron una intensificación temprana de las bandas asociadas con los enlaces P–O y la reducción de bandas Si–O–Si por absorción en la misma región espectral. De manera similar, Ai y col. [195] concluyeron que la incorporación de CuO no afecta negativamente la bioactividad, aunque provoca un desplazamiento de las bandas presentes hacia menores números de onda sin modificar la naturaleza de la hidroxiapatita formada.

La rápida formación de la capa bioactiva de hidroxiapatita se atribuye a la presencia de CuO, el cual modifica la estructura de la red cristalina y ocasionado una disminución en la temperatura de cristalización, como se observó en los análisis DSC. Debido a esta reducción en la temperatura de cristalización, el andamio presenta una mayor disolución. Además, el aumento en el número de enlaces NBO implica una mayor debilidad de la red, lo que reduce la energía de disolución y favorece una mayor liberación de iones, generando así un

incremento en el pH (Figura 4.11a). Esto permite la rápida formación de grupos silanol, que a su vez promueven la precipitación continua de hidroxiapatita [175].

En conjunto, los espectros FTIR confirmaron que todos los andamios presentan bioactividad y son capaces de formar una capa de hidroxiapatita en SBF, aunque la cinética de formación depende del tipo de dopante. Mientras que ZnO y SrO inducen un proceso gradual y sostenido, CuO promueve una formación más rápida e intensa, lo que podría implicar ventajas en la nucleación, pero también riesgos potenciales como la obstrucción prematura de la porosidad antes de la infiltración celular. Estos resultados respaldan que la incorporación de iones metálicos actúa como agente nucleante y acelera la formación de la capa de HCA, etapa clave para la futura biointegración *in vivo* y para comprender los mecanismos iniciales de reacción, incluyendo lixiviación iónica, disolución del vidrio y precipitación de fases cristalinas.

4.3.1.4 Análisis por difracción de rayos X (DRX)

El análisis por DRX es una técnica fundamental para confirmar la formación de la capa de hidroxiapatita. En la Figura 4.18 se presentan los difractogramas obtenidos después de los estudios bioactivos *in vitro* en SBF.

Día 1: En todas las composiciones se observan las fases cristalinas principales previamente identificadas combeita $\text{Na}_4\text{Ca}_4(\text{Si}_6\text{O}_{18})$, akermanita $\text{Ca}_2\text{Mg}(\text{Si}_2\text{O}_7)$ y silicorhenanita $\text{Na}_2\text{Ca}_4(\text{PO}_4)_2\text{SiO}_4$, las cuales permanecen presentes. En el caso del andamio sin dopar, el difractograma muestra ligeros cambios en intensidad y ensanchamiento de picos, lo que indica una disminución inicial de cristalinidad asociada al proceso de disolución y al inicio de la formación de la capa de hidroxiapatita, comportamiento menos evidente en los andamios dopados.

Día 3: En el andamio dopado con SrO se observa una reducción en la intensidad de los picos y un mayor ensanchamiento, atribuible al avance del proceso de disolución. En contraste, los andamios sin dopar y dopados con ZnO y CuO comienzan a presentar picos más definidos y de mayor intensidad, aunque con un ensanchamiento significativo, lo que sugiere la nucleación temprana de la hidroxiapatita con cristales de tamaño pequeño.

Día 7: Todas las composiciones muestran una disminución en intensidad de las fases principales y modificaciones en la forma de los picos. En el andamio sin dopar aparece un cambio más significativo en el difractograma, un halo característico de un material amorfo entre 30-36°, asociado a la formación de una película de fosfato de calcio amorfo (ACP) precursora de la hidroxiapatita, a diferencia de los andamios dopados.

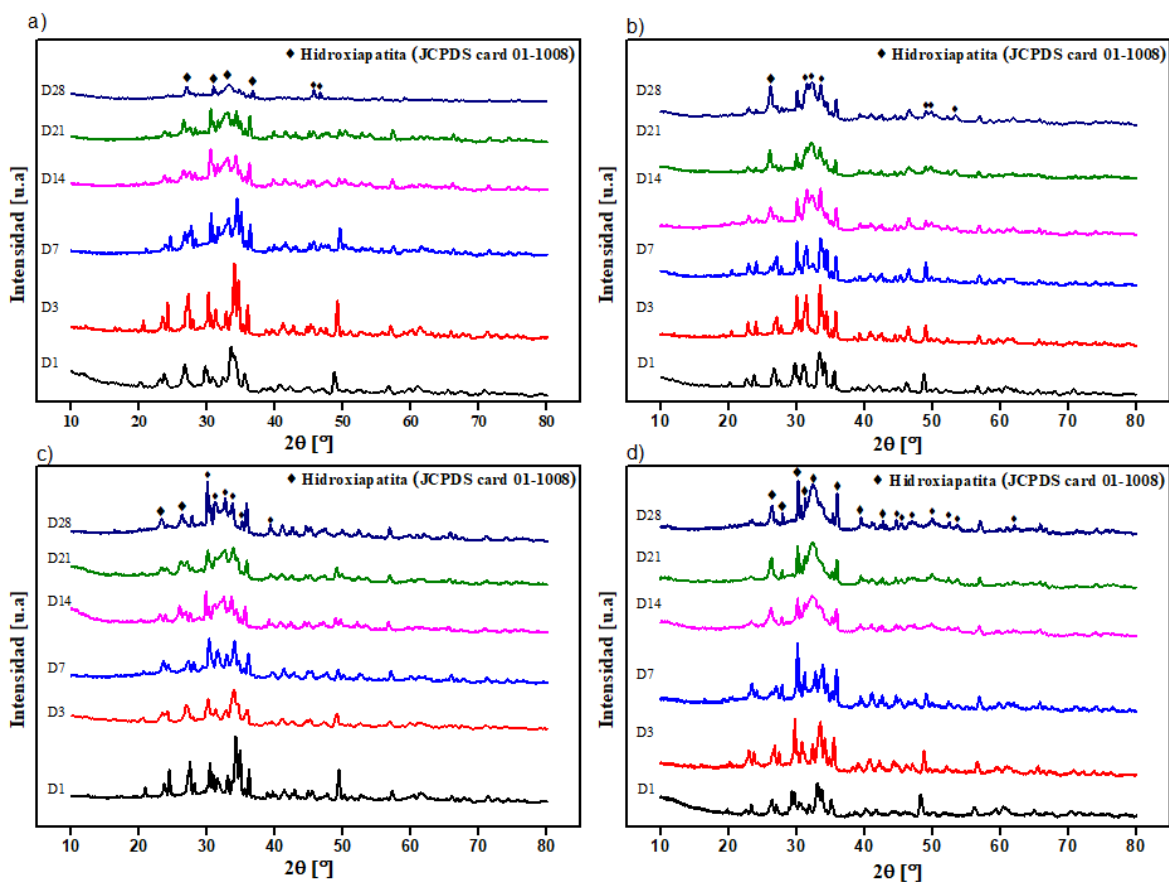


Figura 4.18 Difractogramas por DRX de los andamios tras inmersión en SBF por diferentes tiempos: a) CEL2, b) CEL2-ZnO, c) CEL2-SrO y d) CEL2-CuO.

Día 14: En los andamios sin dopar y dopados con CuO se intensifica la curvatura en el difractograma en el rango 30-36°, lo cual es indicativo de un estado avanzado de amorfización, asociado a la formación de hidroxiapatita pobremente cristalina. En los andamios dopados con ZnO y SrO los picos continúan disminuyendo en intensidad y

adoptando la misma tendencia de amorfización, reflejando la evolución de la película amorfa previa a la cristalización.

Día 21 y 28: Con el aumento del tiempo de inmersión, la capa amorfa se hidrata y comienza a reordenarse lentamente hacia la fase cristalina de hidroxiapatita, lo cual confirma el progreso de la bioactividad.

Andamio CEL2 dopado con ZnO

La adición de ZnO no inhibió la formación de hidroxiapatita; por el contrario, favoreció su nucleación y crecimiento como se observa por el aumento de la intensidad de las reflexiones en los días 21 y 28 respecto al andamio sin dopar. No obstante, su presencia retardó la cinética de formación debido a la disminución del intercambio iónico Na^+/H^+ , fenómeno previamente reportado por Sergi y col. [93]. Además, al sustituir parcialmente al CaO, el ZnO actúa como modificador de red formando especies tetraédricas $[\text{ZnO}_4]^{2-}$ que incrementan la conectividad estructural, reduciendo la solubilidad y reactividad [196].

Andamio CEL2 dopado con SrO

La presencia de SrO promovió la formación de hidroxiapatita, en concordancia con los resultados de pH y pérdida de peso, pero con una cinética más lenta debido al intercambio catiónico reducido. La sustitución parcial de Ca^{2+} por Sr^{2+} genera distorsiones en la red cristalina por su mayor radio iónico, afectando la estabilidad y el crecimiento de la fase mineral. Hesaraki y col. [180] reportaron un comportamiento similar, indicando una precipitación retardada de fosfato de calcio en vitrocerámicos con mayores concentraciones de SrO (10 % mol). La ralentización observada se asocia también con una menor liberación de iones Ca^{2+} y una reducción del pH local. A pesar de ello, la formación de hidroxiapatita se completó en los tiempos finales de tratamiento.

Andamio CEL2 dopado con CuO

En este caso, los picos de hidroxiapatita aparecen tempranamente y su intensidad aumenta de forma pronunciada hacia el día 28, volviéndose más agudos, lo que indica una rápida nucleación y crecimiento cristalino. Este comportamiento coincide con la elevada pérdida de peso y alta bioactividad inicial. No se observan desplazamientos en los picos debido a que el

Cu^{2+} posee menor radio iónico y es menos propenso a sustituir al Ca^{2+} en la red. La incorporación de CuO incrementa los enlaces de oxígeno no puente (NBO), favoreciendo la disolución de la matriz y generando sitios de nucleación [175]. Resultados similares fueron reportados por Hamami y col. [197], quienes observaron formación de hidroxiapatita incluso después de 24 h de inmersión con bajas concentraciones de CuO (0.25 y 0.5 % mol).

La adición de dopantes mostró efectos significativos en la cinética de formación de la capa bioactiva. En particular, la adición de ZnO y SrO retrasó dicho proceso, como se observa en la Figura 4.18b y c. Este comportamiento se atribuye a que ambos dopantes generan alteraciones en la red cristalina, originando posibles defectos y modificaciones estructurales que repercuten en la temperatura de cristalización, como se evidencia en los análisis de DSC. Estas alteraciones forman una red cristalina más estable y compacta, lo que disminuye la velocidad de disolución y la liberación iónica (principalmente de Ca^{2+} y PO_4^{3-}), además de modificar la composición y estabilidad del gel de sílice superficial. Asimismo, la sustitución parcial de Ca^{2+} por Sr^{2+} o Zn^{2+} en la fase mineral final (formando Sr-HA o Zn-HA) es un proceso cinéticamente menos favorable que la formación de HA pura, lo que se refleja en un mayor tiempo de inducción para el desarrollo de la capa bioactiva. No obstante, pese a este retraso, la formación de dicha capa se llevó a cabo. A partir del día 14, las reflexiones asociadas a la hidroxiapatita comienzan a ser detectables y, hacia los tiempos finales de tratamiento, las fases cristalinas muestran modificaciones significativas.

En conjunto, el análisis por DRX confirma que todos los andamios desarrollaron una capa bioactiva de hidroxiapatita, con variaciones en la cinética dependientes de la composición. La disminución progresiva de la intensidad de las reflexiones principales ($25-34^\circ$) y la aparición de reflexiones secundarias de baja intensidad ($45-55^\circ$) evidencian la reestructuración de las fases cristalinas durante la inmersión. Estos cambios sugieren una degradación controlada en fluidos fisiológicos, lo cual es deseable para un andamio temporal destinado a la reparación ósea [198].

La formación de la capa bioactiva de hidroxiapatita es un proceso fundamental en la ingeniería de tejidos, particularmente en la regeneración ósea. Su presencia es esencial para mejorar la biocompatibilidad, favorecer la osteointegración y promover la actividad osteogénica. Además, contribuye a incrementar la durabilidad del implante y a reducir el

riesgo de rechazo. En esta investigación, los andamios vitrocerámicos dopados con ZnO, SrO y CuO, fabricados mediante la tecnología de polvos, demostraron la formación de dicha capa bioactiva. Guo y col. [185] reportaron en ensayos *in vitro* la biodegradabilidad de los andamios y su capacidad para formar hidroxiapatita; sin embargo, la liberación de iones de Zn^{2+} retardó este proceso, debido a la disminución de la solubilidad. Kermani y col. [86] también confirmaron la formación de hidroxiapatita en muestras dopadas con 6 % mol de SrO, evidenciando una respuesta más rápida, ya que la precipitación ocurrió desde las primeras horas. Asimismo, señalaron que una mayor concentración de SrO mejora la actividad bioactiva, a diferencia de los andamios dopados con menor concentración, como los fabricados en este estudio, donde la adición de SrO retrasó la formación de hidroxiapatita. Por otro lado, Wang y col. [199] informaron que la adición de 0, 1 y 3 % peso de CuO promovió la formación de la capa bioactiva, con una relación Ca/P de 1.7 ± 0.1 , cercana al valor estequiométrico de la hidroxiapatita (1.67). No obstante, indicaron que el incremento en la concentración de CuO disminuyó la formación de hidroxiapatita, concluyendo que este agente dopante puede inhibir el proceso al incrementar la estabilidad de la estructura vítrea.

Finalmente, el conjunto de resultados obtenidos mediante MEB, FTIR y DRX confirma la formación de una capa de CaP sobre la superficie del biovidrio en contacto con SBF. El comportamiento de disolución, así como la morfología y composición química de los recubrimientos, dependen tanto de la composición del andamio como del tiempo de inmersión.

4.3.2 Estudios antibacterianos

4.3.2.1 Unidades formadoras de colonias (UFC)

Este análisis es fundamental para evaluar tratamientos relacionados con infecciones en cirugías ortopédicas, las cuales pueden derivarse de la colonización bacteriana y la formación de biopelículas sobre implantes. Estas biopelículas dificultan la acción de los medicamentos y del sistema inmunológico, generando barreras para la regeneración ósea. Se utilizaron tres bacterias con el objetivo de estudiar la influencia de la incorporación de óxidos metálicos

(Zn^{2+} , Sr^{2+} y Cu^{2+}) en andamios a base del biovidrio CEL2, evaluando su actividad antibacteriana.

El método de conteo de unidades formadoras de colonias (UFC) en placas de agar Mueller Hinton permitió estimar el crecimiento bacteriano sobre los andamios CEL2 (control), CEL2-ZnO, CEL2-SrO y CEL2-CuO. Los resultados, mostrados en las Figuras 4.19 y 4.20, revelaron que todos los andamios presentaron algún nivel de crecimiento bacteriano en su superficie. En particular, *S. aureus* USA 300 mostró menor crecimiento en comparación con *S. aureus* ATCC y *E. coli* ATCC.

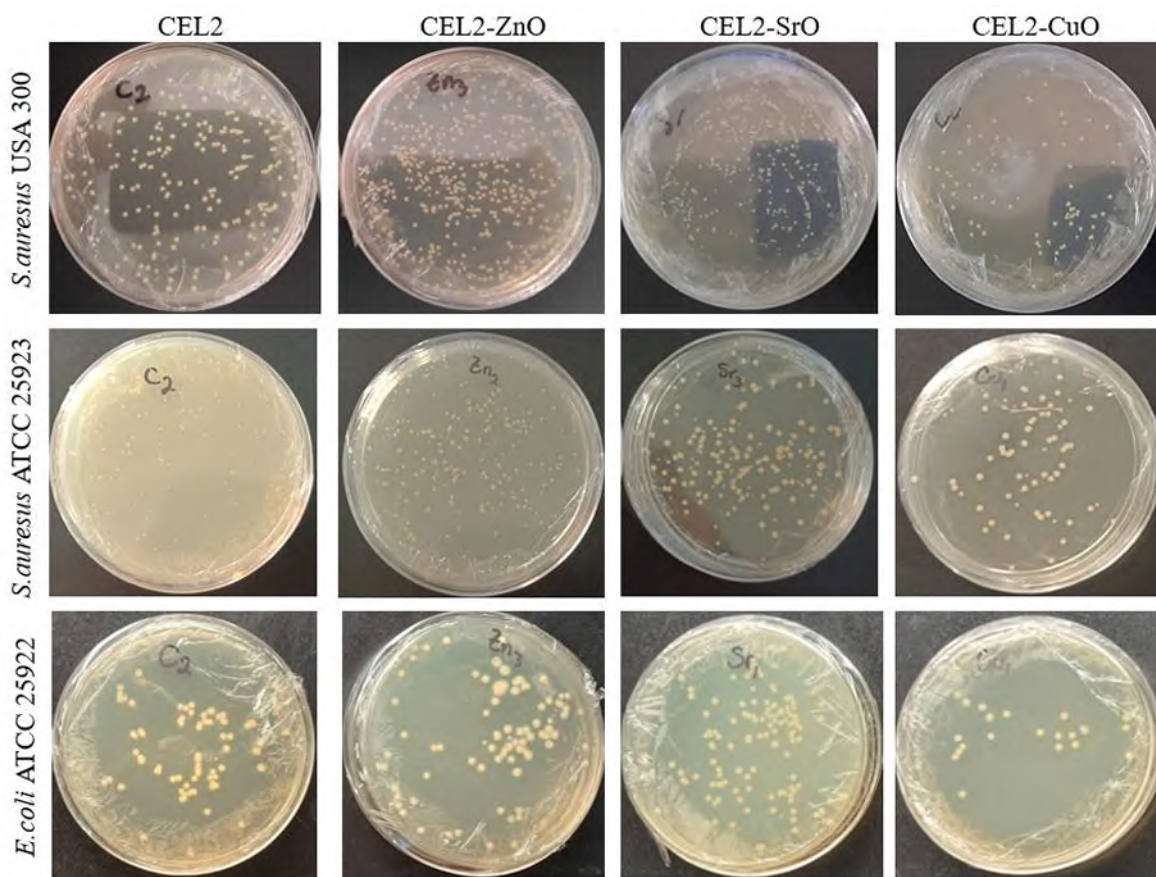


Figura 4.19 Imagen representativa de las UFC tras 24 h de tratamiento.

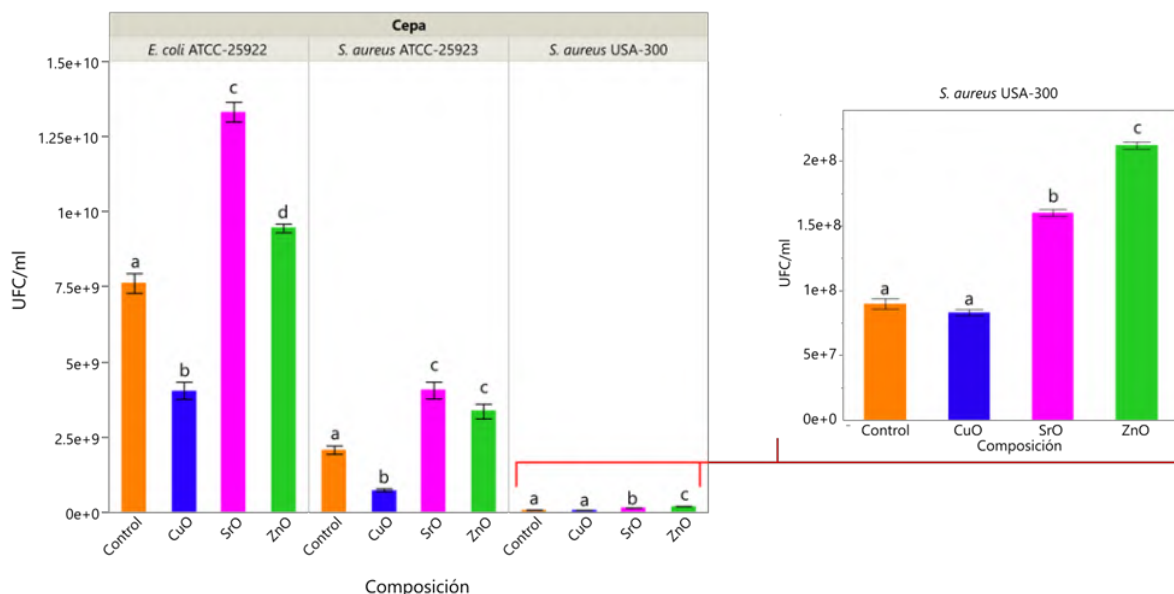


Figura 4.20 Comparación estadística entre cepas y composiciones para la densidad celular inicial.

En este contexto, los iones Zn^{2+} , Sr^{2+} y Cu^{2+} pueden incrementar la producción intracelular de ROS, especialmente al interactuar con peróxido de hidrógeno (H_2O_2), un radical altamente tóxico [103].

Se ha reportado que dichos óxidos metálicos poseen el potencial de reducir o inhibir el desarrollo microbiano al interferir en procesos celulares clave [200, 201], mediante los siguientes mecanismos:

1. *Interferencia con la membrana celular:* Los iones metálicos con carga positiva se atraen hacia la carga negativa de la membrana bacteriana, adhiriéndose a su superficie. Esto puede dañar la membrana, alterar su permeabilidad y provocar la fuga de componentes esenciales, conduciendo a la muerte celular.
2. *Generación de estrés oxidativo:* Algunos iones metálicos catalizan la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS), como radicales libres, que dañan gravemente el ADN, proteínas y lípidos, afectando la funcionalidad celular.
3. *Inhibición de enzimas:* Los iones pueden unirse a sitios activos de enzimas esenciales para el metabolismo bacteriano (respiración, producción de ATP), bloqueando su función.

4. *Daño al ADN*: Los iones metálicos pueden unirse directamente a las bases nitrogenadas, generando mutaciones y alteraciones estructurales que impiden la replicación y división celular.

Andamios de CEL2 sin dopar

En los andamios de control, el elevado crecimiento bacteriano se atribuye a la ausencia de iones capaces de inducir oxidación o generar ROS. Aunque el andamio produce un aumento de pH en el medio por la liberación de iones alcalinos como (Na^+ y Ca^{2+}), este cambio no es suficiente para desestabilizar la membrana bacteriana, especialmente en cepas resistentes como *S. aureus* y *E. coli*, por dos razones principales [202, 203]:

1. Mecanismo de resistencia bacteriana:

- Regulación del pH mediante bombas de iones que mantienen el pH intracelular estable.
- Expresión de proteínas de choque térmico que permiten sobrevivir en condiciones de estrés.
- Modificación de la membrana para reducir la permeabilidad.

2. Límite de alcalinidad:

- El incremento de pH observado no es lo suficientemente drástico, rápido ni sostenido para generar daño irreversible.

Además, el andamio sin dopar no modifica significativamente su carga superficial ni su energía libre, favoreciendo la adsorción de proteínas y la colonización bacteriana.

Andamios CEL2 dopado con ZnO

La liberación de Zn^{2+} promovió la viabilidad bacteriana en lugar de inhibirla, debido principalmente a la baja concentración liberada y a la naturaleza esencial del zinc como micronutriente. El ZnO presenta baja solubilidad en medios acuosos y, tras la sinterización a 900 °C, los iones quedan firmemente incorporados en la red vítrea, limitando su difusión. En consecuencia, no se alcanzó la concentración mínima inhibitoria para a cepas resistentes como *E. coli* y *S. aureus*. Sin embargo, concentraciones elevadas pueden generar toxicidad

celular por alteración de proteínas esenciales [103, 204]. Es importante señalar que el zinc es un oligoelemento esencial para el crecimiento y metabolismo de la mayoría de los organismos, incluidas las bacterias. Participa como cofactor en múltiples enzimas relacionadas con la replicación del ADN, la transcripción del ARN y el metabolismo energético. Cuando la concentración de iones Zn^{2+} liberados por el andamio durante los ensayos se encuentra por debajo del umbral de toxicidad, las bacterias pueden incorporarlos y utilizarlos para favorecer su crecimiento y proliferación, lo que se refleja en una mayor viabilidad en comparación con el andamio control. En este sentido, la limitación de inhibición observada no se atribuye a un defecto en el andamio fabricado, sino a una combinación de baja concentración iónica, mecanismos de resistencia bacteriana y la función del zinc como micronutriente, lo que resultó un efecto no tóxico [205, 206].

Andamio CEL2 dopado con SrO

Los andamios dopados con SrO facilitaron la formación de colonias en todas las cepas, siendo *E. coli* ATCC la que presentó un mayor número de UFC. La interacción electrostática entre los iones Sr^{2+} , cargados positivamente, y las superficies bacterianas, cargadas negativamente, contribuyó al desarrollo de colonias. Al igual que en el caso del Zn^{2+} , la actividad antibacteriana del Sr^{2+} depende de su concentración y del tiempo de interacción; sin embargo, en este estudio la liberación de iones no fue suficiente para generar daño celular significativo [92].

Por otra parte, la liberación de iones Sr^{2+} no es tan efectiva en la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), ya que presenta una baja solubilidad, incluso menor que la del ZnO. Esto limita su disponibilidad para interactuar con las bacterias y disminuir su viabilidad. Además, el ion Sr^{2+} es químicamente similar al Ca^{2+} y, en concentraciones bajas, puede ser utilizado por las bacterias como un elemento traza, por lo que no interfiere de manera agresiva en los procesos metabólicos. Este fenómeno puede incluso favorecer el crecimiento bacteriano, como se observa en este trabajo, reflejando una viabilidad igual o superior al andamio control. En el andamio sinterizado, el SrO forma parte de la estructura cristalina, sustituyendo parcialmente al CaO, esto significa que su liberación es lenta o mínima y no queda expuesto en superficie como partículas activas. Algunos estudios sugieren que el Sr^{2+} puede tener efectos neutros o ligeramente beneficiosos para ciertos microorganismos [206].

Además, las cepas utilizadas son altamente resistentes y han desarrollado mecanismos de tolerancia a iones metálicos, lo que les permite enfrentar la presencia de iones como el Sr^{2+} sin sufrir efectos dañinos. En ausencia de agentes bactericidas, el andamio dopado con SrO actúa como una superficie inerte que no impide la proliferación bacteriana.

Andamios CEL2 dopados con CuO

Estos andamios demostraron una notable actividad antibacteriana debido a la liberación de los iones de cobre, altamente efectivos incluso frente a cepas resistentes como las utilizadas en este estudio.

Mecanismos de acción del cobre [103, 111, 207]:

1. *Daño a la membrana:* Los iones Cu^{2+} se adhieren a la membrana bacteriana, alterando su integridad y permeabilidad, lo que provoca fuga de nutrientes y componentes intracelulares, llevando finalmente a la muerte celular. Este mecanismo es eficaz tanto en bacterias Gram-positivas como Gram-negativas.
2. *Generación de estrés oxidativo:* Como metal de transición, el cobre participa en reacciones redox que inducen la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS), como los radicales hidroxilos ($\bullet\text{OH}$), altamente tóxicos para membranas, proteínas y ácidos nucleicos, desencadenando la apoptosis bacteriana.
3. *Inactivación de enzimas y proteínas:* Los iones Cu^{2+} presentan alta afinidad por los grupos sulfhidrilo ($-\text{SH}$) presentes en proteínas y enzimas bacterianas, alterando su estructura tridimensional e inactivando procesos metabólicos esenciales, como la respiración celular.
4. *Daño al ADN:* El cobre puede unirse directamente al ADN, provocando entrecruzamientos y rupturas de cadena que impiden la replicación y transcripción, lo que detiene la división celular y conduce a la muerte bacteriana.

Es relevante destacar que las tres cepas estudiadas son patógenos multirresistentes a diversos antibióticos y están consideradas como los principales agentes asociados a infecciones humanas. En este contexto, los andamios CEL2-CuO presentan un notable efecto antibacteriano, posicionándolos como una opción prometedora para prevenir infecciones bacterianas tras la implantación. Esto resulta crucial para evitar infecciones postoperatorias

y reducir el riesgo de fallo en la osteointegración del implante, ya que las infecciones bacterianas generan graves consecuencias clínicas y económicas, incluyendo un aumento en la morbilidad y mortalidad.

La efectividad antibacteriana del CuO obtenida en el presente estudio concuerda con lo reportado por Mojtabavi y col. [208], quienes evaluaron la actividad antibacteriana del CuO (0, 3 y 6 % mol) mediante el método de difusión en *E. coli* y *Staphylococcus epidermidis* (*S. epidermidis*). Los andamios dopados con CuO mostraron zonas de inhibición de 3 y 9 mm para *E. coli* en muestras de bioglass con contenidos de 3 y 6 % mol, respectivamente, y de 2.5 y 16 mm para *S. epidermidis*, mientras que el material control no presentó halo de inhibición. Los autores concluyeron que la efectividad antibacteriana aumenta con la concentración del CuO.

En contraste, los andamios dopados con ZnO y SrO favorecieron la proliferación bacteriana, aunque esto no implica que sean inadecuados para su aplicación. Su efecto limitado sobre la viabilidad bacteriana puede atribuirse a la baja concentración de óxidos presentes. Para contrarrestar este comportamiento y prevenir el crecimiento bacteriano, sería necesario complementar su uso con antibióticos externos en dosis más elevadas. No obstante, la adición de ZnO y SrO representa una ventaja, dado que ambos óxidos desempeñan funciones esenciales en el organismo. Entre sus beneficios se encuentran la promoción de la osteogénesis, la mejora de la osteointegración, la estimulación de la proliferación de células óseas y la participación en la replicación del ADN, la síntesis de proteínas y la actividad enzimática. Por lo tanto, su incorporación en los andamios contribuye a mejorar las propiedades funcionales del implante en aplicaciones biomédicas.

4.3.2.2. Índice de formación de biopelícula

La formación de biopelículas es un proceso caracterizado por la acumulación de microorganismos que crecen en agregados rodeados por una matriz extracelular autogenerada. Esta matriz, compuesta principalmente por proteínas, ácido desoxirribonucleico extracelular (DNA-e) y polisacáridos extracelulares (EPS), permite a las bacterias adherirse a superficies y protegerse de antibióticos, del sistema inmunológico del

huésped y de condiciones externas adversas, como variaciones extremas de pH y temperatura. Dentro de una biopelícula, las bacterias interactúan mediante un proceso denominado detección de quórum (*quorum sensing*), que les permite coordinar mecanismos de resistencia, incrementando su tolerancia a los antibióticos en comparación con las células planctónicas (libres en solución). La matriz protectora actúa como una barrera que dificulta la penetración de los antibióticos, limitando su eficacia [209, 210].

En la Figura 4.21 se presenta el índice de formación de biopelículas tras el tratamiento con las tres cepas bacterianas estudiadas. Este índice se clasifica como: fuerte (>1.10), moderado ($0.70\text{--}1.10$), débil ($0.35\text{--}0.70$) y sin formación (<0.35). Los resultados indican que todos los andamios dopados con ZnO, SrO y CuO permitieron la formación de biopelículas, aunque en menor medida que los andamios control.

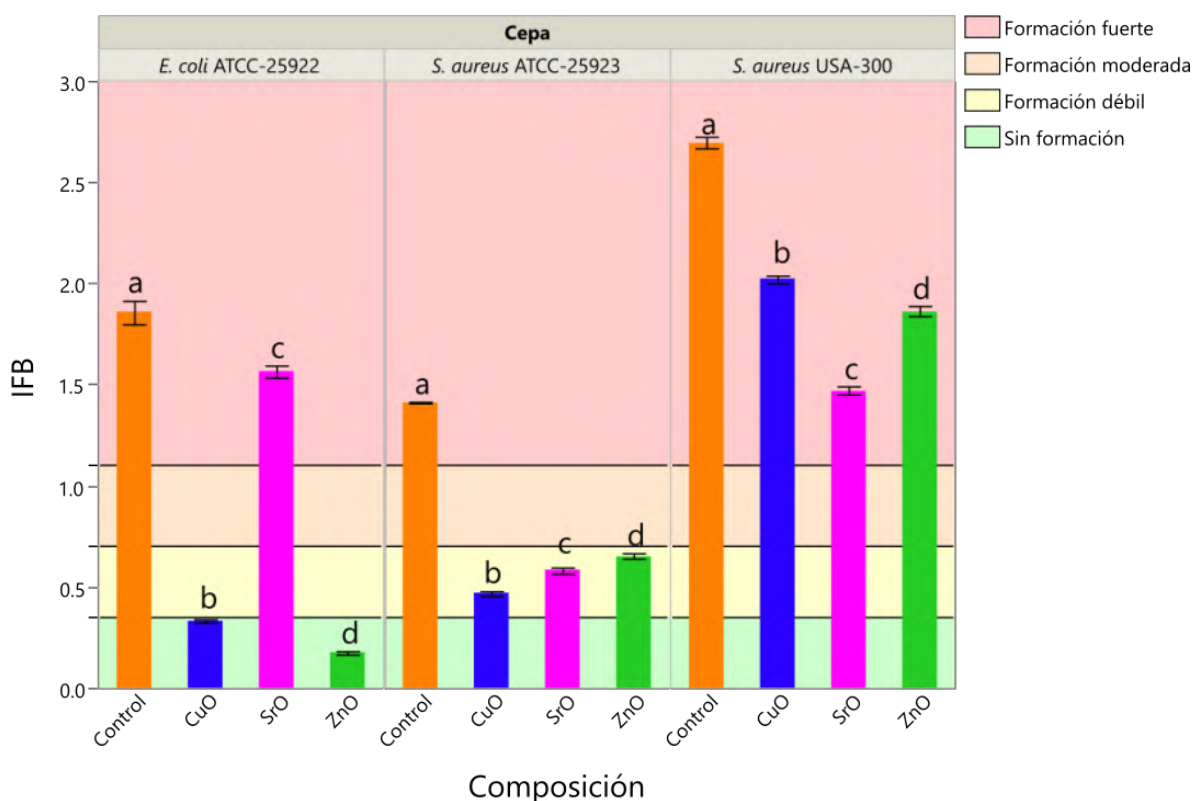


Figura 4.21. Comparación de medias del índice de formación de biopelículas para cada cepa y compuesto.

***E. coli* ATCC-25922**

Se observó que los andamios dopados con CuO y ZnO no presentaron formación de biopelículas, mientras que el control y los dopados con SrO se clasificaron como fuertes. En este caso, la liberación de los iones de Cu^{2+} y Zn^{2+} actuó como una barrera antimicrobiana: al eliminar las bacterias en contacto con la superficie del andamio, se impidió la fase inicial de adhesión. Esto explica la ausencia de biopelícula pese a la conocida resistencia de la cepa.

En relación con los resultados de UFC, especialmente en los andamios dopados con ZnO, se observó que su liberación promovió la viabilidad bacteriana, pero inhibió la formación de biopelícula. Aunque no produjo muerte celular, pudo inducir un estado de estrés superficial que activó mecanismos de defensa como la expulsión de iones y modificaciones en la membrana celular. Esto afectó la adhesión, primer paso en la formación de biopelícula. Por lo tanto, aunque las bacterias sobrevivieron y proliferaron, las condiciones en la superficie del andamio fueron desfavorables para generar la matriz protectora. En contraste, los andamios dopados con SrO y el control mostraron una elevada formación de biopelícula.

***S. aureus* ATCC-25923**

En este caso, todos los andamios dopados desarrollaron biopelículas clasificadas como débiles, destacando que los dopados con CuO presentaron la menor formación.

Los andamios dopados con ZnO exhibieron biopelículas débiles debido al equilibrio entre la toxicidad del zinc y su función como nutriente. La liberación de los iones de Zn^{2+} indujo estrés oxidativo, dañando parcialmente la membrana celular sin causar muerte bacteriana. Ante un entorno adverso, la cepa pudo activar mecanismos de respuesta al estrés que interfieren con la expresión de genes y proteínas necesarias para la adhesión y formación de biopelículas. Así, aunque las bacterias proliferaron, el estrés impidió el desarrollo de una biopelícula robusta.

En los andamios dopados con SrO también se observó una biopelícula débil. El Sr^{2+} no actúa como agente antibacteriano debido a su similitud con el Ca^{2+} y puede ser utilizado como

nutriente sin causar toxicidad. No obstante, el pH superficial resultante de la disolución del andamio creó un entorno estresante, suficiente para evitar una biopelícula fuerte.

Los andamios dopados con CuO mostraron igualmente una formación débil de biopelícula, atribuida a la toxicidad del cobre. La liberación de Cu^{2+} no fue lo suficientemente elevada para eliminar completamente la población bacteriana, pero sí para inducir estrés severo que afectó tanto la adhesión como la organización de la matriz extracelular.

***S. aureus* USA 300**

La formación de biopelículas se clasificó como fuerte en todos los andamios; sin embargo, los dopados con SrO presentaron valores menores en comparación con ZnO y CuO. En general, la presencia de dopantes redujo la formación de biopelículas en comparación con los andamios control.

El andamio sin dopar mostró una formación fuerte de biopelícula debido a la ausencia de propiedades antimicrobianas, permitiendo la adhesión, proliferación y desarrollo de la matriz extracelular sin restricciones. La falta de agente antibacteriano permite que la bacteria siga su ciclo de vida natural, lo que resulta en la formación de una biopelícula fuerte y madura.

Los andamios dopados con ZnO también formaron una biopelícula fuerte a pesar de las propiedades antibacterianas del zinc. Esto se debe al tipo de cepa, conocida por su capacidad para tolerar el estrés por metales. En su sistema de transporte, posee bombas de expulsión (proteínas transportadoras en la membrana) que eliminan activamente los iones Zn^{2+} fuera de la célula, manteniendo la concentración intracelular por debajo de niveles tóxicos. Además, se aprovechó el zinc como un efecto nutrimental, ya que las bacterias lo requieren como cofactor enzimático esencial para su crecimiento.

El andamio dopado con SrO también mostró una fuerte formación de biopelícula, aunque menor en comparación con los dopados con ZnO y CuO. Se sabe que el Sr^{2+} no actúa como agente antibacteriano y, por lo tanto, no ejerció un efecto inhibitorio directo sobre la bacteria. La diferencia en la magnitud de la biopelícula radica en la interacción específica de cada ion con la cepa y su mecanismo de respuesta. En este caso, los iones de estroncio permitieron la

adhesión y proliferación. La menor formación de biopelícula respecto a los andamios dopados con ZnO y CuO se explica porque el zinc fue utilizado como nutriente.

Finalmente, en los andamios dopados con CuO también se observó una fuerte formación de biopelícula, a pesar del potencial bactericida de los iones de Cu^{2+} . En este caso, *S. aureus* USA 300 podría poseer un sistema de respuesta al estrés altamente eficiente que, ante la exposición al cobre, activa genes que no solo la protegen, sino que también promueven la adhesión y la formación de biopelícula como mecanismo de defensa. Además, la bacteria produjo proteínas o metabolitos capaces de unirse a los iones de cobre. Este resultado destaca la notable capacidad de adaptación de *S. aureus* USA 300, para convertir un agente potencialmente tóxico en un catalizador para su propia supervivencia y la generación de biopelícula.

Relación con la capacidad intrínseca de formación de biopelículas en *S. aureus* USA 300

El caso de *S. aureus* USA-300 es particularmente interesante debido a su capacidad intrínseca para formar biopelículas, lo que representa un mecanismo de supervivencia en entornos hostiles [211]. Este factor explicaría el bajo conteo de unidades formadoras de colonias (UFC) observado en esta cepa, incluso cuando la formación de biopelículas disminuyó con los dopantes. No obstante, dicha reducción no fue suficiente para clasificarla como moderada o baja, lo cual refuerza la idea de que dicha capacidad intrínseca es un atributo clave en la resistencia de esta cepa.

Efecto de los dopantes

Los resultados sugieren que los dopantes ZnO, SrO y CuO disminuyen la formación de biopelículas en comparación con el control, indicando un efecto antibacteriano directo. Este efecto está mediado por mecanismos como la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS), daño al ADN bacteriano y desnaturalización de proteínas, los cuales afectan la integridad de la membrana celular y contribuyen a disminuir la formación de biopelículas [212].

En los resultados previos se observó que el ZnO en bajas concentraciones presenta menor actividad antibacteriana; sin embargo, su efectividad aumenta a medida que su concentración

aumenta. Esto fue reportado por Che y col. [213], quienes estudiaron la efectividad del ZnO en diferentes concentraciones (1, 5 y 10 % mol) frente a la cepa *S. aureus* ATCC 33592, una cepa resistente a la meticilina. Se observó que la mayor liberación de iones Zn^{2+} ocurrió con 10 % mol, generando más ROS e induciendo estrés oxidativo y toxicidad celular. Ainaa y col. [214] incorporaron ZnO entre 5-20 % (p/p) en biovidrio 45S5 BG y concluyeron que el elevado contenido de Zn dificultaba su solubilidad al liberar iones Zn^{2+} , interrumpiendo procesos metabólicos. Zhao y col. [92] prepararon andamios de biovidrio con 0, 5 y 10 % mol de ZnO o SrO, mostrando que la proliferación de *E. coli* fue inhibida significativamente en 10Zn-BG y 10Sr-BG respecto al grupo control ($p < 0.05$; *** $p < 0.001$) demostrando un efecto dependiente de la dosis.

Por otro lado, en esta investigación se observó una mayor eficiencia antibacteriana y de inhibición de biopelícula en los andamios dopados con CuO. Olivera y col. [215] reportaron resultados similares utilizando andamios de fosfato tricálcico (β -TCP) recubiertos con nanopartículas de ZnO y CuO frente a la cepa *S. aureus* ATCC 6538, siendo el CuO más efectivo. Hosseini y col. [216] evaluaron vidrios bioactivos dopados con 2 y 5 % mol de CuO, observando que retardaron el crecimiento bacteriano con un efecto comparable al de la vancomicina frente a *S. aureus*. Li y col. [217] demostraron que concentraciones de 37 y 111 μM de Cu^{2+} inhibieron el crecimiento de *S. aureus* en aproximadamente 90 y el 100 %, respectivamente. Con base en estos estudios y los resultados presentes, se concluye que los andamios dopados con CuO son prometedores debido a sus excelentes propiedades, incluyendo resistencia a la compresión, bioactividad, actividad antibacteriana, reducción en la formación de biopelículas y capacidad de mineralización. La incorporación de CuO ofrece nuevas oportunidades para el diseño de biomateriales multifuncionales destinados al tratamiento de defectos óseos y prevención de infecciones, contribuyendo a evitar fallos de implantes y mejorar la calidad de vida de los pacientes.

Importancia del uso de iones metálicos

Con base en lo reportado en esta investigación, el uso de iones metálicos ha ganado interés a nivel mundial debido a su papel en los sistemas biológicos, donde facilitan funciones como la actividad enzimática, el transporte de oxígeno y la química redox. Además, se emplean como productos farmacéuticos y agentes de diagnóstico en medicina regenerativa e

ingeniería de tejidos, atribuibles a la perspectiva de aprovechar sus propiedades con fines terapéuticos.

Los iones metálicos participan en interacciones intercelulares e intracelulares, mantienen la presión osmótica y las cargas eléctricas en el organismo, intervienen en reacciones de transferencia de electrones, contribuyen al emparejamiento, apilamiento y estabilidad de bases de nucleótidos, actúan como cofactores enzimáticos y desencadenan reacciones asociadas a vías de señalización celular, además de regular la transcripción del ADN. Su función es tan esencial para células nerviosas y musculares, el cerebro, el corazón, el suministro de oxígeno y otros procesos fisiológicos, que resulta imposible imaginar la vida sin ellos [218-220].

En los seres humanos, los iones metálicos son necesarios para numerosas funciones críticas. La deficiencia de ciertos elementos puede provocar enfermedades como anemia perniciosa (hierro), retraso en el crecimiento (zinc), cardiopatías en recién nacidos (cobre), además de trastornos metabólicos como cáncer, alteraciones del sistema nervioso central, enfermedades infecciosas, carcinogénesis e incluso la muerte.

Impacto del proceso de fabricación

El proceso de fabricación de los andamios, que induce la cristalización del biovidrio junto con los dopantes, también desempeña un papel crucial en la disponibilidad y actividad de los compuestos utilizados. Esto puede explicar el mayor crecimiento bacteriano observado en los andamios dopados con ZnO y SrO en comparación con los dopados con CuO, para los cuales se requieren concentraciones significativamente menores para alcanzar efectos antibacterianos óptimos [106, 208].

Riesgos y limitaciones de los andamios dopados

La incorporación de iones metálicos como Zn^{2+} , Sr^{2+} y Cu^{2+} en la matriz de los andamios de biovidrio CEL2 ha demostrado beneficios importantes, como una mayor bioactividad, resistencia mecánica y propiedades antibacterianas, especialmente en el caso del CuO, como se evidenció en esta investigación. No obstante, esta estrategia para desarrollar andamios

multifuncionales conlleva riesgos y limitaciones que deben considerarse cuidadosamente para garantizar su seguridad y eficiencia clínica.

La citotoxicidad asociada a la liberación incontrolada de iones metálicos puede tener efectos perjudiciales, superando los umbrales fisiológicos tolerables para las células humanas, especialmente osteoblastos y células madre mesenquimales, y desencadenando respuestas inmunes e inflamatorias [221]. Algunos dopantes metálicos pueden interferir con la nucleación y el crecimiento de la hidroxiapatita, como se observó en este estudio con los andamios dopados con ZnO y SrO, donde su adición retrasó el proceso de formación. En ciertos casos, los dopantes pueden inducir la formación de fases cristalinas no deseadas durante la sinterización, reduciendo la bioactividad o alterando la degradación, como antibióticos o factores de crecimiento, afectando su eficacia.

Saleem y col. [222] reportaron que dosis elevadas de SrO disminuyen la resorción y la densidad óseas, lo que provoca osteomalacia, una enfermedad caracterizada por la acumulación de matriz no mineralizada en el esqueleto. Por otro lado, Monirul y col. [223]. informaron que los iones metálicos en cantidades traza y ultratrazas desempeñan un papel vital en el mantenimiento de procesos moleculares esenciales. Sin embargo, también pueden causar citotoxicidad al interferir con procesos metabólicos, desactivar enzimas, debilitar defensas antioxidantes, inducir estrés oxidativo, destruir proteínas y lípidos y afectar el funcionamiento de órganos como riñones, cerebro, hígado y sistema hematológico. Asimismo, pueden contribuir al desarrollo de enfermedades neurológicas, como Parkinson, Alzheimer, esclerosis múltiple y distrofias, e incluso provocar daños en el ADN que pueden conducir al cáncer.

CAPÍTULO 5. CONCLUSIONES

La presente investigación establece una correlación integral entre la composición, el procesamiento, la microestructura y las propiedades funcionales del biovidrio CEL2 dopado, constituyendo su principal contribución al conocimiento científico sobre la modificación de biovidrios mediante óxidos metálicos. Se evidencia que pequeñas variaciones composicionales generan cambios significativos en el comportamiento mecánico, bioactivo y antibacteriano del material, aportando criterios para el diseño racional de biomateriales multifuncionales. Los resultados obtenidos validan parcialmente la hipótesis planteada, demostrando que la tecnología de polvos permite la fabricación de andamios porosos de biovidrio CEL2 con microestructura interconectada y propiedades dentro del rango del hueso trabecular, mientras que la incorporación de CuO, ZnO y SrO modula su desempeño de forma diferenciada, otorgando funcionalidades complementarias sin comprometer su bioactividad.

Los principales hallazgos científicos son los siguientes:

- Se logró fabricar andamios porosos de biovidrio CEL2 sin dopar y dopados con 2 % mol de ZnO, SrO y CuO mediante el método de fusión y temple, seguido de procesamiento por tecnología de polvos. Las condiciones establecidas (55% biovidrio, 42% resina fenólica, 3% agente espumante y sinterización a 900 °C durante 60 min) permitieron obtener estructuras con 66-74 % de porosidad, densidad de 2.69-2.75 g/cm³ y resistencia a la compresión de $0.82 \pm .27$ - 2.00 ± 0.02 MPa, dentro del rango del hueso trabecular.
- El análisis de distribución de tamaño de partícula evidenció una morfología multimodal con funciones complementarias en densificación y formación de poros interconectados. La adición de dopantes de óxidos metálicos modificó las temperaturas de transición vítrea (T_g), cristalización (T_c) y fusión (T_m), actuando como modificadores de red, rompiendo los enlaces principales Si–O–Si, lo que reduce la viscosidad y facilita la sinterización a menor temperatura, preservando la porosidad. Sin embargo, esta reducción puede comprometer la estabilidad térmica, favoreciendo la cristalización indeseada y afectando la resistencia mecánica.
- Los análisis por FTIR y DRX confirmaron que, a la concentración empleada, los dopantes no generan nuevas fases detectables, incorporándose en la red vítrea sin alterar su estructura primaria. Tras la sinterización, se identificaron fases cristalinas como combeita

($\text{Na}_2\text{Ca}_2\text{Si}_3\text{O}_9$), akermanita ($\text{Ca}_2\text{Mg}(\text{Si}_2\text{O}_7)$) y silicorhenanita ($\text{Na}_2\text{Ca}_4(\text{PO}_4)_2\text{SiO}_4$), que proporcionan estabilidad mecánica sin reducir la bioactividad, validando el equilibrio entre estructura densa y respuesta biológica favorable.

- En cuanto a propiedades mecánicas, los andamios dopados con CuO mostraron un incremento del 62 % en la resistencia a la compresión respecto al CEL2 sin dopar, mientras que los dopados con ZnO y SrO presentaron una disminución del 42 %, efecto atribuido a la evolución de fases y conectividad porosa. Aun con estas variaciones, todos los materiales mantuvieron valores dentro del rango fisiológico del hueso trabecular, lo que demuestra la eficacia del proceso de dopaje controlado.
- Los ensayos de bioactividad *in vitro* confirmaron que todos los andamios desarrollan una capa de hidroxiapatita sobre su superficie tras la inmersión en fluido corporal simulado, indicando una buena respuesta osteoconductora. La cinética de degradación y variación de pH dependió del tipo de dopante: ZnO y SrO ralentizaron la disolución, proporcionando una degradación más estable y controlada, mientras que CuO promovió una degradación más rápida por la disminución en su temperatura de cristalización, lo que resulta adecuada para aplicaciones de regeneración ósea a corto plazo.
- Los análisis por MEB, FTIR y DRX corroboraron la formación progresiva de la capa bioactiva y el desarrollo de nuevos grupos funcionales con el tiempo de inmersión, demostrando la interacción activa entre la superficie del material y el medio fisiológico.
- Las pruebas antibacterianas mostraron que únicamente los andamios dopados con CuO presentaron un efecto inhibitorio significativo frente a *S. aureus* USA-300, *S. aureus* ATCC-25923 y *E. coli* ATCC-25922, atribuible al mecanismo multifuncional de los iones Cu^{2+} que provoca daño de membrana, estrés oxidativo e inactivación enzimática. En contraste, los andamios dopados con ZnO y SrO no evidenciaron efecto bactericida, debido a la baja concentración de iones liberados y al carácter micronutricional de dichos elementos.
- En los ensayos de biopelícula, los andamios dopados con CuO y ZnO inhibieron la adhesión bacteriana frente a *E. coli*, mientras que los dopados con SrO permitieron un desarrollo parcial. Este comportamiento refleja la relación entre la composición química del material, la liberación iónica y la respuesta superficial frente a microorganismos.

- Los resultados confirman que el dopaje con CuO confiere propiedades multifuncionales, combinando mayor resistencia mecánica, buena bioactividad y efecto antibacteriano, mientras que ZnO y SrO contribuyen a la estabilidad estructural y degradación controlada. Estas diferencias funcionales permiten ajustar el material según los requerimientos clínicos específicos.

TRABAJO A FUTURO

Realizar estudios mediante espectroscopía de emisión óptica con plasma acoplado inductivamente (ICP-OES) con el objetivo de analizar la liberación de iones Zn^{2+} , Sr^{2+} , Cu^{2+} , así como de otros elementos presentes en los andamos vitrocerámicos durante la inmersión en fluido corporal simulado (SBF) por diferentes tiempos.

Fabricar andamios con diferentes concentraciones de ZnO, SrO y CuO, ya que su adición podría mejorar las propiedades mecánicas, especialmente en aplicaciones donde el soporte estructural es esencial. Además, la variación en las propiedades bioactivas promueve la regeneración celular, mineralización ósea, la angiogénesis y la prevención de infecciones. Se evaluaría la actividad antibacteriana de los andamios frente a diferentes cepas patógenas como *Escherichia coli* (*E. coli*), *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) y *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*), tomando como material control un antibiótico con el fin de confirmar su efectividad y su posible aplicación en la ingeniería de tejidos.

Otra alternativa es la fabricación de andamios dopados con tierras raras como cerio (Ce^{4+}) y terbio (Tb^{3+}) mediante tecnología de polvos. Estos elementos tienen el potencial para desarrollar biomateriales con aplicaciones en el diagnóstico de cáncer, guía intraoperatoria y evaluación postoperatoria.

REFERENCIAS

- [1] Damle A, Sundaresan R, Rajwade J M, Srivastava P , Naik A. *A concise review on implications of silver nanoparticles in bone tissue engineering*.**Biomaterials Advances**. 141, 213099, 2022.
- [2] Tzavellas A-N, Kenanidis E, Potoupnis M , Tsiridis E. *3D printing in orthopedic surgery*. **3D Printing: Applications in Medicine and Surgery**. 133-141. 2020.
- [3] O'brien F J. *Biomaterials & scaffolds for tissue engineering*.**Materials today**. 14 (3), 88-95, 2011.
- [4] Hench L L. *The story of Bioglass®*.**Journal of Materials Science: Materials in Medicine**. 17 (11), 967-978, 2006.
- [5] Elsayed H, Rincón Romero A, Molino G, Vitale Brovarone C , Bernardo E. *Bioactive Glass-Ceramic Foam Scaffolds from ‘Inorganic Gel Casting’and Sinter-Crystallization*.**Materials**. 11 (3), 349, 2018.
- [6] Baino F, Hamzehlou S , Kargozar S. *Bioactive glasses: where are we and where are we going?***Journal of functional biomaterials**. 9 (1), 25, 2018.
- [7] Neščáková Z, Zheng K, Liverani L, Nawaz Q, Galusková D, Kaňková H, Michálek M, Galusek D , Boccaccini A R. *Multifunctional zinc ion doped sol–gel derived mesoporous bioactive glass nanoparticles for biomedical applications*.**Bioactive materials**. 4, 312-321, 2019.
- [8] Kazemian Z, Varzandeh M , Labbaf S. *A facile synthesis of mono dispersed spherical silver doped bioactive glass nanoparticle*.**Journal of Materials Science: Materials in Medicine**. 32 (3), 1-6, 2021.
- [9] Paterson T E, Bari A, Bullock A J, Turner R, Montalbano G, Fiorilli S, Vitale-Brovarone C, Macneil S , Shepherd J. *Multifunctional copper-containing mesoporous glass nanoparticles as antibacterial and proangiogenic agents for chronic wounds*.**Frontiers in bioengineering and biotechnology**. 8, 246, 2020.
- [10] Xu S, Wu Q, Guo Y, Ning C , Dai K. *Copper containing silicocarnotite bioceramic with improved mechanical strength and antibacterial activity*.**Materials Science and Engineering: C**. 118, 111493, 2021.
- [11] Brown J L , Laurencin C T. *Bone tissue engineering*. **Biomaterials Science**. 1373-1388. 2020.

- [12] Perić Kačarević Ž, Rider P, Alkildani S, Retnasingh S, Pejakić M, Schnettler R, Gosau M, Smeets R, Jung O , Barbeck M. *An introduction to bone tissue engineering*. **The International Journal of Artificial Organs**. 43 (2), 69-86, 2020.
- [13] Wang X, Nyman J, Dong X, Leng H , Reyes M. *Fundamental biomechanics in bone tissue engineering*. Springer Nature. 2022.
- [14] Agotegaray M , Agotegaray M. *Anatomy, Histology and Physiology of Bone*. **Silica-Based Nanotechnology for Bone Disease Treatment**. 7-23, 2020.
- [15] Qu H, Fu H, Han Z , Sun Y. *Biomaterials for bone tissue engineering scaffolds: A review*. **RSC advances**. 9 (45), 26252-26262, 2019.
- [16] Teissier T, Temkin V, Pollak R D , Cox L S. *Crosstalk between senescent bone cells and the bone tissue microenvironment influences bone fragility during chronological age and in diabetes*. **Frontiers in Physiology**. 13, 812157, 2022.
- [17] Dvorakova J, Wiesnerova L, Chocholata P, Kulda V, Landsmann L, Cedikova M, Kripnerova M, Eberlova L , Babuska V. *Human cells with osteogenic potential in bone tissue research*. **BioMedical Engineering OnLine**. 22 (1), 33, 2023.
- [18] Bueno E M , Glowacki J. *Biologic foundations for skeletal tissue engineering*. Morgan & Claypool Publishers. 2011.
- [19] Morgan E F, Unnikrisnan G U , Hussein A I. *Bone mechanical properties in healthy and diseased states*. **Annual review of biomedical engineering**. 20, 119-143, 2018.
- [20] Grzeszczak A, Lewin S, Eriksson O, Kreuger J , Persson C. *The potential of stereolithography for 3D printing of synthetic trabecular bone structures*. **Materials**. 14 (13), 3712, 2021.
- [21] Cawthray J, Wasan E , Wasan K. *Bone-seeking agents for the treatment of bone disorders*. **Drug delivery and translational research**. 7, 466-481, 2017.
- [22] Zang J, Lu L , Yaszemski M J. *Bone Disorders*. **Materials for Bone Disorders**. 83-118. 2017.
- [23] Pedrero S G, Llamas-Sillero P , Serrano-López J. *A multidisciplinary journey towards bone tissue engineering*. **Materials**. 14 (17), 4896, 2021.
- [24] Tsukamoto S, Kido A, Tanaka Y, Facchini G, Peta G, Rossi G , Mavrogenis A F. *Current overview of treatment for metastatic bone disease*. **Current Oncology**. 28 (5), 3347-3372, 2021.

- [25] Macedo F, Ladeira K, Pinho F, Saraiva N, Bonito N, Pinto L , Gonçalves F. *Bone metastases: an overview*.**Oncology reviews**. 11 (1), 2017.
- [26] Proia P, Amato A, Drid P, Korovljev D, Vasto S , Baldassano S. *The impact of diet and physical activity on bone health in children and adolescents*.**Frontiers in Endocrinology**. 12, 704647, 2021.
- [27] Kargozar S, Mozafari M, Hamzehlou S, Brouki Milan P, Kim H-W , Baino F. *Bone tissue engineering using human cells: a comprehensive review on recent trends, current prospects, and recommendations*.**Applied Sciences**. 9 (1), 174, 2019.
- [28] Carvalho M S, Cabral J M, Da Silva C L , Vashishth D. *Bone matrix non-collagenous proteins in tissue engineering: Creating new bone by mimicking the extracellular matrix*.**Polymers**. 13 (7), 1095, 2021.
- [29] Battafarano G, Rossi M, De Martino V, Marampon F, Borro L, Secinaro A , Del Fattore A. *Strategies for bone regeneration: from graft to tissue engineering*.**International journal of molecular sciences**. 22 (3), 1128, 2021.
- [30] Collins M N, Ren G, Young K, Pina S, Reis R L , Oliveira J M. *Scaffold fabrication technologies and structure/function properties in bone tissue engineering*.**Advanced Functional Materials**. 31 (21), 2010609, 2021.
- [31] Jodati H, Yılmaz B , Evis Z. *A review of bioceramic porous scaffolds for hard tissue applications: Effects of structural features*.**Ceramics International**. 46 (10), 15725-15739, 2020.
- [32] Nikolova M P , Chavali M S. *Recent advances in biomaterials for 3D scaffolds: A review*.**Bioactive materials**. 4, 271-292, 2019.
- [33] Suamte L, Tirkey A, Barman J , Babu P J. *Various manufacturing methods and ideal properties of scaffolds for tissue engineering applications*.**Smart Materials in Manufacturing**. 1, 100011, 2023.
- [34] Madrid A P M, Vrech S M, Sanchez M A , Rodriguez A P. *Advances in additive manufacturing for bone tissue engineering scaffolds*.**Materials Science and Engineering: C**. 100, 631-644, 2019.
- [35] Wang X, Lin M , Kang Y. *Engineering porous β -tricalcium phosphate (β -TCP) scaffolds with multiple channels to promote cell migration, proliferation, and angiogenesis*.**ACS applied materials & interfaces**. 11 (9), 9223-9232, 2019.

- [36] Li L, Lu P, Liu Y, Yang J , Li S. *Three-dimensional-bioprinted bioactive glass/cellulose composite scaffolds with porous structure towards bone tissue engineering*. **Polymers**. 15 (9), 2226, 2023.
- [37] Zamani D, Moztarzadeh F , Bizari D. *Alginate-bioactive glass containing Zn and Mg composite scaffolds for bone tissue engineering*. **International journal of biological macromolecules**. 137, 1256-1267, 2019.
- [38] Deshmukh K, Kovářík T, Křenek T, Docheva D, Stich T , Pola J. *Recent advances and future perspectives of sol–gel derived porous bioactive glasses: a review*. **RSC advances**. 10 (56), 33782-33835, 2020.
- [39] Thurzo A, Gálfiová P, Nováková Z V, Polák Š, Varga I, Strunga M, Urban R, Surovková J, Leško Ľ , Hajdúchová Z. *Fabrication and in vitro characterization of novel hydroxyapatite scaffolds 3D printed using polyvinyl alcohol as a thermoplastic binder*. **International journal of molecular sciences**. 23 (23), 14870, 2022.
- [40] Mehatlaf A A, Farid S B , Atiyah A A. **IOP Conference Series: Materials Science and Engineering**, 012080, 2021
- [41] Spirandeli B, Ribas R, Amaral S, Martins E, Esposito E, Vasconcellos L, Campos T, Thim G , Trichês E. *Incorporation of 45S5 bioglass via sol-gel in β -TCP scaffolds: Bioactivity and antimicrobial activity evaluation*. **Materials Science and Engineering: C**. 131, 112453, 2021.
- [42] Gui X, Zhang B, Su Z, Zhou Z, Dong Z, Feng P, Fan C, Liu M, Kong Q , Zhou C. *3D-printed degradable hydroxyapatite bioactive ceramics for skull regeneration*. **MedComm–Biomaterials and Applications**. 2 (2), e41, 2023.
- [43] Baino F, Tulyaganov D U, Kahharov Z, Rahdar A , Verné E. *Foam-replicated diopside/fluorapatite/wollastonite-based glass–ceramic scaffolds*. **Ceramics**. 5 (1), 120-130, 2022.
- [44] De Siqueira L, Gouveia R F, Grenho L, Monteiro F J, Fernandes M H , Trichês E S. *Highly porous 45S5 bioglass-derived glass–ceramic scaffolds by gelcasting of foams*. **Journal of Materials Science**. 53 (15), 10718-10731, 2018.
- [45] Chen Y, Frith J E, Dehghan-Manshadi A, Attar H, Kent D, Soro N D M, Bermingham M J , Dargusch M S. *Mechanical properties and biocompatibility of porous titanium*

- scaffolds for bone tissue engineering*. **journal of the mechanical behavior of biomedical materials**. 75, 169-174, 2017.
- [46] Montufar E B, Tkachenko S, Casas-Luna M, Škarvada P, Slámečka K, Diaz-De-La-Torre S, Koutný D, Paloušek D, Koledova Z , Hernández-Tapia L. *Benchmarking of additive manufacturing technologies for commercially-pure-titanium bone-tissue-engineering scaffolds: Processing-microstructure-property relationship*. **Additive manufacturing**. 36, 101516, 2020.
- [47] Aguilar-Reyes E A, León-Patiño C A, Villicaña-Molina E, Macías-Andrés V I , Lefebvre L-P. *Processing and in vitro bioactivity of high-strength 45S5 glass-ceramic scaffolds for bone regeneration*. **Ceramics International**. 43 (9), 6868-6875, 2017.
- [48] Ruiz-Aguilar C, Aguilar-Reyes E, Flores-Martínez M, León-Patiño C , Nuñez-Anita R. *Synthesis and characterisation of β -TCP/bioglass/zirconia scaffolds*. **Advances in Applied Ceramics**. 116 (8), 452-461, 2017.
- [49] Chocholata P, Kulda V , Babuska V. *Fabrication of scaffolds for bone-tissue regeneration*. **Materials**. 12 (4), 568, 2019.
- [50] Ran Q, Yang W, Hu Y, Shen X, Yu Y, Xiang Y , Cai K. *Osteogenesis of 3D printed porous Ti6Al4V implants with different pore sizes*. **journal of the mechanical behavior of biomedical materials**. 84, 1-11, 2018.
- [51] Bartolomeu F, Costa M, Alves N, Miranda G , Silva F S. *Engineering the elastic modulus of NiTi cellular structures fabricated by selective laser melting*. **journal of the mechanical behavior of biomedical materials**. 110, 103891, 2020.
- [52] Caravaggi P, Liverani E, Leardini A, Fortunato A, Belvedere C, Baruffaldi F, Fini M, Parrilli A, Mattioli-Belmonte M , Tomesani L. *CoCr porous scaffolds manufactured via selective laser melting in orthopedics: Topographical, mechanical, and biological characterization*. **Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials**. 107 (7), 2343-2353, 2019.
- [53] Cegan T, Pagac M, Jurica J, Skotnicova K, Hajnys J, Horsak L, Soucek K , Krpec P. *Effect of hot isostatic pressing on porosity and mechanical properties of 316 l stainless steel prepared by the selective laser melting method*. **Materials**. 13 (19), 4377, 2020.

- [54] Lv Y, Wang B, Liu G, Tang Y, Lu E, Xie K, Lan C, Liu J, Qin Z , Wang L. *Metal material, properties and design methods of porous biomedical scaffolds for additive manufacturing: a review*. **Frontiers in bioengineering and biotechnology**. 9, 641130, 2021.
- [55] Kozusko S D, Riccio C, Goulart M, Bumgardner J, Jing X L , Konofaos P. *Chitosan as a bone scaffold biomaterial*. **Journal of Craniofacial Surgery**. 29 (7), 1788-1793, 2018.
- [56] Lee Y H, Lee B W, Jung Y C, Yoon B I, Woo H M , Kang B J. *Application of alginate microbeads as a carrier of bone morphogenetic protein-2 for bone regeneration*. **Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials**. 107 (2), 286-294, 2019.
- [57] Yu L, Rowe D W, Perera I P, Zhang J, Suib S L, Xin X , Wei M. *Intrafibrillar mineralized collagen–hydroxyapatite-based scaffolds for bone regeneration*. **ACS applied materials & interfaces**. 12 (16), 18235-18249, 2020.
- [58] Hwang C, Park S, Kang I-G, Kim H-E , Han C-M. *Tantalum-coated polylactic acid fibrous membranes for guided bone regeneration*. **Materials Science and Engineering: C**. 115, 111112, 2020.
- [59] Sani I S, Rezaei M, Khoshfetrat A B , Razzaghi D. *Preparation and characterization of polycaprolactone/chitosan-g-polycaprolactone/hydroxyapatite electrospun nanocomposite scaffolds for bone tissue engineering*. **International journal of biological macromolecules**. 182, 1638-1649, 2021.
- [60] Zhang B, Wang L, Song P, Pei X, Sun H, Wu L, Zhou C, Wang K, Fan Y , Zhang X. *3D printed bone tissue regenerative PLA/HA scaffolds with comprehensive performance optimizations*. **Materials & Design**. 201, 109490, 2021.
- [61] Zhu M, Tan J, Liu L, Tian J, Li L, Luo B, Zhou C , Lu L. *Construction of biomimetic artificial intervertebral disc scaffold via 3D printing and electrospinning*. **Materials Science and Engineering: C**. 128, 112310, 2021.
- [62] Rotbaum Y, Puiu C, Rittel D , Domingos M. *Quasi-static and dynamic in vitro mechanical response of 3D printed scaffolds with tailored pore size and architectures*. **Materials Science and Engineering: C**. 96, 176-182, 2019.

- [63] Khalaf A T, Wei Y, Wan J, Zhu J, Peng Y, Abdul Kadir S Y, Zainol J, Oglah Z, Cheng L , Shi Z. *Bone tissue engineering through 3D bioprinting of bioceramic scaffolds: a review and update*.**Life**. 12 (6), 903, 2022.
- [64] Balasubramanian P, Büttner T, Pacheco V M , Boccaccini A R. *Boron-containing bioactive glasses in bone and soft tissue engineering*.**Journal of the European Ceramic Society**. 38 (3), 855-869, 2018.
- [65] Fernandes H R, Gaddam A, Rebelo A, Brazete D, Stan G E , Ferreira J M. *Bioactive glasses and glass-ceramics for healthcare applications in bone regeneration and tissue engineering*.**Materials**. 11 (12), 2530, 2018.
- [66] Erasmus E, Johnson O, Sigalas I , Massera J. *Effects of sintering temperature on crystallization and fabrication of porous bioactive glass scaffolds for bone regeneration*.**Scientific Reports**. 7 (1), 6046, 2017.
- [67] Abodunrin O D, El Mabrouk K , Bricha M. *A review on borate bioactive glasses (BBG): effect of doping elements, degradation, and applications*.**Journal of Materials Chemistry B**. 11 (5), 955-973, 2023.
- [68] Ege D, Zheng K , Boccaccini A R. *Borate bioactive glasses (BBG): bone regeneration, wound healing applications, and future directions*.**ACS Applied Bio Materials**. 5 (8), 3608-3622, 2022.
- [69] Lepry W C , Nazhat S N. *A review of phosphate and borate sol–gel glasses for biomedical applications*.**Advanced NanoBiomed Research**. 1 (3), 2000055, 2021.
- [70] Schuhladen K, Pantulap U, Engel K, Jeleń P, Olejniczak Z, Hupa L, Sitarz M , Boccaccini A R. *Influence of the replacement of silica by boron trioxide on the properties of bioactive glass scaffolds*.**International Journal of Applied Glass Science**. 2021.
- [71] Ma Y, Dai H, Huang X , Long Y. *3D printing of bioglass-reinforced β -TCP porous bioceramic scaffolds*.**Journal of Materials Science**. 54 (14), 10437-10446, 2019.
- [72] Lepry W C, Rezabeigi E, Smith S , Nazhat S N. *Dissolution and bioactivity of a sol-gel derived borate glass in six different solution media*.**Biomedical glasses**. 5 (1), 98-111, 2019.
- [73] Kargozar S, Hamzehlou S , Baino F. *Potential of bioactive glasses for cardiac and pulmonary tissue engineering*.**Materials**. 10 (12), 1429, 2017.

- [74] Cannio M, Bellucci D, Roether J A, Boccaccini D N , Cannillo V. *Bioactive glass applications: A literature review of human clinical trials*.**Materials**. 14 (18), 5440, 2021.
- [75] Baino F , Fiume E. *Mechanical characterization of 45S5 bioactive glass-derived scaffolds*.**Materials Letters**. 245, 14-17, 2019.
- [76] Hum J , Boccaccini A R. *Collagen as coating material for 45S5 bioactive glass-based scaffolds for bone tissue engineering*.**International journal of molecular sciences**. 19 (6), 1807, 2018.
- [77] Park H, Collignon A-M, Lepry W C, Ramirez-Garcialuna J L, Rosenzweig D H, Chaussain C , Nazhat S N. *Acellular dense collagen-S53P4 bioactive glass hybrid gel scaffolds form more bone than stem cell delivered constructs*.**Materials Science and Engineering: C**. 120, 111743, 2021.
- [78] Vitale-Brovarone C, Verné E, Robiglio L, Martinasso G, Canuto R A , Muzio G. *Biocompatible glass–ceramic materials for bone substitution*.**Journal of Materials Science: Materials in Medicine**. 19, 471-478, 2008.
- [79] Vitale-Brovarone C, Baino F , Verné E. *High strength bioactive glass-ceramic scaffolds for bone regeneration*.**Journal of Materials Science: Materials in Medicine**. 20, 643-653, 2009.
- [80] Schatkoski V M, Do Amaral Montanheiro T L, De Menezes B R C, Pereira R M, Rodrigues K F, Ribas R G, Da Silva D M , Thim G P. *Current advances concerning the most cited metal ions doped bioceramics and silicate-based bioactive glasses for bone tissue engineering*.**Ceramics International**. 47 (3), 2999-3012, 2021.
- [81] Cacciotti I. *Bivalent cationic ions doped bioactive glasses: the influence of magnesium, zinc, strontium and copper on the physical and biological properties*.**Journal of Materials Science**. 52 (15), 8812-8831, 2017.
- [82] Flores-Jacobo A, Aguilar-Reyes E A , León-Patiño C A. *Effect of dopants on the physical, mechanical, and biological properties of porous scaffolds for bone tissue engineering*.**Biomedical Materials & Devices**. 1 (1), 234-255, 2023.
- [83] Pantulap U, Arango-Ospina M , Boccaccini A R. *Bioactive glasses incorporating less-common ions to improve biological and physical properties*.**Journal of Materials Science: Materials in Medicine**. 33, 1-41, 2022.

- [84] Vallet-Regi M , Salinas A J. *Mesoporous bioactive glasses for regenerative medicine*.**Materials Today Bio**. 11, 100121, 2021.
- [85] Westhauser F, Decker S, Nawaz Q, Rehder F, Wilkesmann S, Moghaddam A, Kunisch E , Boccaccini A R. *Impact of zinc-or copper-doped mesoporous bioactive glass nanoparticles on the osteogenic differentiation and matrix formation of mesenchymal stromal cells*.**Materials**. 14 (8), 1864, 2021.
- [86] Kermani F, Mollazadeh Beidokhti S, Bairo F, Gholamzadeh-Virany Z, Mozafari M , Kargozar S. *Strontium-and cobalt-doped multicomponent mesoporous bioactive glasses (MBGs) for potential use in bone tissue engineering applications*.**Materials**. 13 (6), 1348, 2020.
- [87] Zhang J, Wu H, He F, Wu T, Zhou L , Ye J. *Concentration-dependent osteogenic and angiogenic biological performances of calcium phosphate cement modified with copper ions*.**Materials Science and Engineering: C**. 99, 1199-1212, 2019.
- [88] Shen J Z , Fäldt J. *Requirements of Bioactive Ceramics for Dental Implants and Scaffolds*.**Advanced Ceramics for Dentistry**. 279-300. 2014.
- [89] Fiume E, Barberi J, Verné E , Bairo F. *Bioactive glasses: from parent 45S5 composition to scaffold-assisted tissue-healing therapies*.**Journal of functional biomaterials**. 9 (1), 24, 2018.
- [90] Hench L L, Jones J R , Sepulveda P. *Bioactive materials for tissue engineering scaffolds*. **Future strategies for tissue and organ replacement**. 3-24. 2002.
- [91] Renno A C M, Bossini P S, Crovace M C, Rodrigues A C M, Zanotto E D , Parizotto N A. *Characterization and in vivo biological performance of biosilicate*.**BioMed research international**. 2013, 2013.
- [92] Zhao R, Shi L, Gu L, Qin X, Song Z, Fan X, Zhao P, Li C, Zheng H , Li Z. *Evaluation of bioactive glass scaffolds incorporating SrO or ZnO for bone repair: In vitro bioactivity and antibacterial activity*.**Journal of Applied Biomaterials & Functional Materials**. 19, 22808000211040910, 2021.
- [93] Sergi R, Bellucci D, Salvatori R, Maisetta G, Batoni G , Cannillo V. *Zinc containing bioactive glasses with ultra-high crystallization temperature, good biological performance and antibacterial effects*.**Materials Science and Engineering: C**. 104, 109910, 2019.

- [94] Yin H, Yang C, Gao Y, Wang C, Li M, Guo H , Tong Q. *Fabrication and characterization of strontium-doped borate-based bioactive glass scaffolds for bone tissue engineering*. **Journal of Alloys and Compounds**. 743, 564-569, 2018.
- [95] Amudha S, Ramya J R, Arul K T, Deepika A, Sathiamurthi P, Mohana B, Asokan K, Dong C-L , Kalkura S N. *Enhanced mechanical and biocompatible properties of strontium ions doped mesoporous bioactive glass*. **Composites Part B: Engineering**. 196, 108099, 2020.
- [96] Alasvand N, Simorgh S, Kebria M M, Bozorgi A, Moradi S, Sarmadi V H, Ebrahimzadeh K, Amini N, Kermani F , Kargozar S. *Copper/cobalt doped strontium-bioactive glasses for bone tissue engineering applications*. **Open Ceramics**. 14, 100358, 2023.
- [97] Anand A, Kaňková H, Hájovská Z, Galusek D, Boccaccini A R , Galusková D. *Bio-response of copper–magnesium co-substituted mesoporous bioactive glass for bone tissue regeneration*. **Journal of Materials Chemistry B**. 12 (7), 1875-1891, 2024.
- [98] Pizzoferrato A, Ciapetti G, Stea S, Cenni E, Arciola C R , Granchi D. *Cell culture methods for testing biocompatibility*. **Clinical materials**. 15 (3), 173-190, 1994.
- [99] Koleva V, Koynova T, Kuleva I , Dragoeva A. *A simple tool to assess the effect of water-soluble soil pollutants on enzyme activity in human whole blood samples using WST-1 assay*. **Revista internacional de contaminación ambiental**. 39, 2023.
- [100] Elahpour N, Niesner I, Bossard C, Abdellaoui N, Montouillout V, Fayon F, Taviot-Guého C, Frankenbach T, Crispin A , Khosravani P. *Zinc-Doped Bioactive Glass/Polycaprolactone Hybrid Scaffolds Manufactured by Direct and Indirect 3D Printing Methods for Bone Regeneration*. **Cells**. 12 (13), 1759, 2023.
- [101] Magyari K, Pap Z, Tóth Z-R, Kása Z, Licarete E, Vodnar D, Hernadi K , Baia L. *The impact of copper oxide nanoparticles on the structure and applicability of bioactive glasses*. **Journal of Sol-Gel Science and Technology**. 91 (3), 634-643, 2019.
- [102] Bonnet M, Lagier J C, Raoult D , Khelaihia S. *Bacterial culture through selective and non-selective conditions: the evolution of culture media in clinical microbiology*. **New microbes and new infections**. 34, 100622, 2020.
- [103] Godoy-Gallardo M, Eckhard U, Delgado L M, De Roo Puente Y J, Hoyos-Nogués M, Gil F J , Perez R A. *Antibacterial approaches in tissue engineering using metal ions*

- and nanoparticles: From mechanisms to applications*. **Bioactive materials**. 6 (12), 4470-4490, 2021.
- [104] Leboffe M J , Pierce B E. *A photographic atlas for the microbiology laboratory*. Morton Publishing Company. 2021.
- [105] Salgado-Peralvo A-O, Mateos-Moreno M-V, Velasco-Ortega E, Peña-Cardelles J-F , Kewalramani N. *Preventive antibiotic therapy in bone augmentation procedures in oral implantology: A systematic review*. **Journal of Stomatology, Oral and Maxillofacial Surgery**. 123 (1), 74-80, 2022.
- [106] Ranga N, Gahlyan S , Duhan S. *Antibacterial efficiency of zn, Mg and Sr doped bioactive glass for bone tissue engineering*. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**. 20 (4), 2465-2472, 2020.
- [107] Babu M M, Rao P V, Singh R K, Kim H-W, Veeraiah N, Özcan M , Prasad P S. *ZnO incorporated high phosphate bioactive glasses for guided bone regeneration implants: enhancement of in vitro bioactivity and antibacterial activity*. **Journal of Materials Research and Technology**. 15, 633-646, 2021.
- [108] Paramita P, Ramachandran M, Narashiman S, Nagarajan S, Sukumar D K, Chung T-W , Ambigapathi M. *Sol–gel based synthesis and biological properties of zinc integrated nano bioglass ceramics for bone tissue regeneration*. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**. 32, 1-11, 2021.
- [109] Manoochehri H, Ghorbani M, Moosazadeh Moghaddam M, Nourani M R, Makvandi P , Sharifi E. *Strontium doped bioglass incorporated hydrogel-based scaffold for amplified bone tissue regeneration*. **Scientific Reports**. 12 (1), 10160, 2022.
- [110] Baheiraei N, Eyni H, Bakhshi B, Najafloo R , Rabiee N. *Effects of strontium ions with potential antibacterial activity on in vivo bone regeneration*. **Scientific Reports**. 11 (1), 8745, 2021.
- [111] Akhtach S, Tabia Z, El Mabrouk K, Bricha M , Belkhou R. *A comprehensive study on copper incorporated bio-glass matrix for its potential antimicrobial applications*. **Ceramics International**. 47 (1), 424-433, 2021.
- [112] Patrick M D, Keys J F, Suresh Kumar H , Annamalai R T. *Injectable nanoporous microgels generate vascularized constructs and support bone regeneration in critical-sized defects*. **Scientific Reports**. 12 (1), 15811, 2022.

- [113] Hong W, Zhang Q, Jin H, Song L, Tan Y, Luo L, Guo F, Zhao X , Xiao P. *Roles of strontium and hierarchy structure on the in vitro biological response and drug release mechanism of the strontium-substituted bioactive glass microspheres*.**Materials Science and Engineering: C**. 107, 110336, 2020.
- [114] Vecchio G, Darcos V, Le Grill S, Brouillet F, Coppel Y, Duttine M, Pugliara A, Combes C , Soulié J. *Spray-dried ternary bioactive glass microspheres: Direct and indirect structural effects of copper-doping on acellular degradation behavior*.**Acta Biomaterialia**. 181, 453-468, 2024.
- [115] Al-Maawi S, Orlowska A, Sader R, Kirkpatrick C J , Ghanaati S. **Seminars in Immunology**,49-61, 2017
- [116] Zhang D, Chen Q, Shi C, Chen M, Ma K, Wan J , Liu R. *Dealing with the foreign-body response to implanted biomaterials: strategies and applications of new materials*.**Advanced Functional Materials**. 31 (6), 2007226, 2021.
- [117] Gavinho S R, Pádua A S, Holz L I V, Sá-Nogueira I, Silva J C, Borges J P, Valente M A , Graça M P F. *Bioactive glasses containing strontium or magnesium ions to enhance the biological response in bone regeneration*.**Nanomaterials**. 13 (19), 2717, 2023.
- [118] Farasati Far B, Safaei M, Nahavandi R, Gholami A, Naimi-Jamal M R, Tamang S, Ahn J E, Ramezani Farani M , Huh Y S. *Hydrogel Encapsulation Techniques and Its Clinical Applications in Drug Delivery and Regenerative Medicine: A Systematic Review*.**ACS Omega**. 2024.
- [119] Cheng Y, Zhang H, Wei H , Yu C-Y. *Injectable hydrogels as emerging drug-delivery platforms for tumor therapy*.**Biomaterials Science**. 12 (5), 1151-1170, 2024.
- [120] Deliormanlı A M, Ensoylu M , Atmaca H. *Preparation of trivalent rare-earth element-substituted bioactive glass robocast scaffolds for osteosarcoma treatment: structural, morphological, mechanical, drug delivery, and biological properties*.**Applied physics A**. 130 (3), 174, 2024.
- [121] Pawar V , Shinde V. *Bioglass and hybrid bioactive material: A review on the fabrication, therapeutic potential and applications in wound healing*.**Hybrid Advances**. 100196, 2024.

- [122] Kokubo T , Takadama H. *How useful is SBF in predicting in vivo bone bioactivity?***Biomaterials**. 27 (15), 2907-2915, 2006.
- [123] Green L H , Goldman E. *Practical handbook of microbiology*. CRC press. 2021.
- [124] Jenkins R , Maddocks S. *Bacteriology methods for the study of infectious diseases*. Academic Press. 2019.
- [125] García-Heredia A, Orue N, Heredia N , García S. *Efficacy of citrus-based disinfectants to inhibit growth, swarming, and biofilm formation of Salmonella and decontaminate parsley*.**Journal of Food, Agriculture & Environment**. 11 (2), 1295-1299, 2013.
- [126] Rahaman M N, Day D E, Bal B S, Fu Q, Jung S B, Bonewald L F , Tomsia A P. *Bioactive glass in tissue engineering*.**Acta Biomaterialia**. 7 (6), 2355-2373, 2011.
- [127] Chen Q, Mohn D , Stark W J. *Optimization of Bioglass® scaffold fabrication process*.**Journal of the American Ceramic Society**. 94 (12), 4184-4190, 2011.
- [128] Barua E, Deoghare A B, Chatterjee S , Sapkal P. *Effect of ZnO reinforcement on the compressive properties, in vitro bioactivity, biodegradability and cytocompatibility of bone scaffold developed from bovine bone-derived HAp and PMMA*.**Ceramics International**. 45 (16), 20331-20345, 2019.
- [129] Fandzloch M, Bodylska W, Barszcz B, Trzcińska-Wencel J, Roszek K, Golińska P , Lukowiak A. *Effect of ZnO on sol–gel glass properties toward (bio) application*.**Polyhedron**. 223, 115952, 2022.
- [130] El-Sayed A F, Aboulthana W M, Sherief M A, El-Bassyouni G T , Mousa S M. *Synthesis, structural, molecular docking, and in vitro biological activities of Cu-doped ZnO nanomaterials*.**Scientific Reports**. 14 (1), 9027, 2024.
- [131] Wu Z, Lin Z, Yao A, Ye S, Pan H, Cui X , Wang D. *Influence of particle size distribution on the rheological properties and mathematical model fitting of injectable borosilicate bioactive glass bone cement*.**Ceramics International**. 46 (15), 24395-24406, 2020.
- [132] Sun C, Tian X, Wang L, Liu Y, Wirth C M, Günster J, Li D , Jin Z. *Effect of particle size gradation on the performance of glass-ceramic 3D printing process*.**Ceramics International**. 43 (1), 578-584, 2017.

- [133] Hu Q, Jiang W, Li Y, Chen X, Liu J, Chen T , Miao G. *The effects of morphology on physicochemical properties, bioactivity and biocompatibility of micro-/nano-bioactive glasses*. **Advanced Powder Technology**. 29 (8), 1812-1819, 2018.
- [134] Baino F , Verné E. *Production and characterization of glass-ceramic materials for potential use in dental applications: Thermal and mechanical properties, microstructure, and in vitro bioactivity*. **Applied Sciences**. 7 (12), 1330, 2017.
- [135] Srivastava A K , Pyare R. *Characterization of ZnO substituted 45S5 bioactive glasses and glass-ceramics*. **Journal of Materials Science Research**. 1 (2), 207, 2012.
- [136] Sułowska J, Waclawska I , Szumera M. *Comparative study of zinc addition effect on thermal properties of silicate and phosphate glasses*. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**. 123, 1091-1098, 2016.
- [137] Oueslati-Omrani R , Hamzaoui A H. *Effect of ZnO incorporation on the structural, thermal and optical properties of phosphate based silicate glasses*. **Materials Chemistry and Physics**. 242, 122461, 2020.
- [138] Rocton N, Oudadesse H , Lefeuvre B. *Comparison of Zn and Sr effects on thermal properties and on the excess entropy of doped glasses for use in the biomedical field*. **Thermochimica Acta**. 668, 58-64, 2018.
- [139] Sriranganathan D, Kanwal N, Hing K A , Hill R G. *Strontium substituted bioactive glasses for tissue engineered scaffolds: the importance of octacalcium phosphate*. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**. 27 (2), 1-10, 2016.
- [140] Kargozar S, Montazerian M, Fiume E , Baino F. *Multiple and promising applications of strontium (Sr)-containing bioactive glasses in bone tissue engineering*. **Frontiers in bioengineering and biotechnology**. 7, 161, 2019.
- [141] Bellucci D, Sola A, Salvatori R, Anesi A, Chiarini L , Cannillo V. *Role of magnesium oxide and strontium oxide as modifiers in silicate-based bioactive glasses: Effects on thermal behaviour, mechanical properties and in-vitro bioactivity*. **Materials Science and Engineering: C**. 72, 566-575, 2017.
- [142] Lázaro G S, Santos S C, Resende C X , Dos Santos E A. *Individual and combined effects of the elements Zn, Mg and Sr on the surface reactivity of a SiO₂·CaO·Na₂O·P₂O₅ bioglass system*. **Journal of Non-Crystalline Solids**. 386, 19-28, 2014.

- [143] Patel U, Moss R, Hossain K M Z, Kennedy A R, Barney E, Ahmed I , Hannon A. *Structural and physico-chemical analysis of calcium/strontium substituted, near-invert phosphate based glasses for biomedical applications.***Acta Biomaterialia.** 60, 109-127, 2017.
- [144] Wers E, Oudadesse H, Lefevre B, Lucas-Girot A, Rocherullé J , Lebullenger R. *Excess entropy and thermal behavior of Cu-and Ti-doped bioactive glasses.***Journal of Thermal Analysis and Calorimetry.** 117 (2), 579-588, 2014.
- [145] Sułowska J, Waclawska I , Szumera M. *Effect of copper addition on glass transition of silicate–phosphate glasses.***Journal of Thermal Analysis and Calorimetry.** 109 (2), 705-710, 2012.
- [146] Wers E, Oudadesse H, Lefevre B, Lucas-Girot A, Rocherullé J , Lebullenger R. *Excess entropy and thermal behavior of Cu-and Ti-doped bioactive glasses.***Journal of Thermal Analysis and Calorimetry.** 117, 579-588, 2014.
- [147] Başak O, Hruška B, Buňová L, Muñoz F, Michálek M , Chromčíková M. *The influence of time dependent Al₂O₃ dissolution during melting on the structure-bioactivity correlation of Mg containing silica-based bioactive glasses.***Journal of Non-Crystalline Solids.** 629, 122873, 2024.
- [148] Gavinho S R, Pádua A S, Sá-Nogueira I, Silva J C, Borges J P, Costa L C , Graça M P F. *Fabrication, structural and biological characterization of zinc-containing bioactive glasses and their use in membranes for guided bone regeneration.***Materials.** 16 (3), 956, 2023.
- [149] Mohan Babu M, Syam Prasad P, Hima Bindu S, Prasad A, Venkateswara Rao P, Putenpurayil Govindan N, Veeraiah N , Özcan M. *Investigations on Physico-Mechanical and Spectral Studies of Zn²⁺ Doped P₂O₅-Based Bioglass System.***Journal of Composites Science.** 4 (3), 129, 2020.
- [150] Serra J, Gonzalez P, Liste S, Chiussi S, Leon B, Pérez-Amor M, Ylänen H , Hupa M. *Influence of the non-bridging oxygen groups on the bioactivity of silicate glasses.***Journal of Materials Science: Materials in Medicine.** 13 (12), 1221-1225, 2002.

- [151] Aguiar H, Serra J, González P , León B. *Structural study of sol–gel silicate glasses by IR and Raman spectroscopies*. **Journal of Non-Crystalline Solids**. 355 (8), 475-480, 2009.
- [152] Bejarano J, Caviedes P , Palza H. *Sol–gel synthesis and in vitro bioactivity of copper and zinc-doped silicate bioactive glasses and glass-ceramics*. **Biomedical Materials**. 10 (2), 025001, 2015.
- [153] Mosaddad S A, Yazdanian M, Tebyanian H, Tahmasebi E, Yazdanian A, Seifalian A , Tavakolizadeh M. *Fabrication and properties of developed collagen/strontium-doped Bioglass scaffolds for bone tissue engineering*. **Journal of Materials Research and Technology**. 9 (6), 14799-14817, 2020.
- [154] Saeidi A, Heydari M , Banijamali S. *Densification-crystallization behavior of biodegradable copper-doped modified 45S5 glasses*. 2023.
- [155] Carta D, Knowles J C, Smith M E , Newport R J. *Synthesis and structural characterization of P2O5–CaO–Na2O sol–gel materials*. **Journal of Non-Crystalline Solids**. 353 (11-12), 1141-1149, 2007.
- [156] Leenakul W, Tunkasiri T, Tongsiri N, Pengpat K , Ruangsuriya J. *Effect of sintering temperature variations on fabrication of 45S5 bioactive glass-ceramics using rice husk as a source for silica*. **Materials Science and Engineering: C**. 61, 695-704, 2016.
- [157] Pirayesh H , Nychka J A. *Sol–gel synthesis of bioactive glass-ceramic 45S5 and its in vitro dissolution and mineralization behavior*. **Journal of the American Ceramic Society**. 96 (5), 1643-1650, 2013.
- [158] Qian J, Kang Y, Wei Z , Zhang W. *Fabrication and characterization of biomorphic 45S5 bioglass scaffold from sugarcane*. **Materials Science and Engineering: C**. 29 (4), 1361-1364, 2009.
- [159] Cacciotti I, Lombardi M, Bianco A, Ravaglioli A, Montanaro L. *Sol–gel derived 45S5 bioglass: synthesis, microstructural evolution and thermal behaviour*. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**. 23, 1849-1866, 2012.
- [160] Chatzistavrou X, Zorba T, Kontonasaki E, Chrissafis K, Koidis P , Paraskevopoulos K. *Following bioactive glass behavior beyond melting temperature by thermal and optical methods*. **physica status solidi (a)**. 201 (5), 944-951, 2004.

- [161] Foroutan F, Kyffin B A, Abrahams I, Knowles J C, Sogne E, Falqui A , Carta D. *Mesoporous strontium-doped phosphate-based sol-gel glasses for biomedical applications*. **Frontiers in chemistry**. 8, 249, 2020.
- [162] Chitra S, Bargavi P, Balasubramaniam M, Chandran R R , Balakumar S. *Impact of copper on in-vitro biomineralization, drug release efficacy and antimicrobial properties of bioactive glasses*. **Materials Science and Engineering: C**. 109, 110598, 2020.
- [163] Karimi A Z, Rezabeigi E , Drew R A. *Crystallization behavior of combeite in 45S5 Bioglass® via controlled heat treatment*. **Journal of Non-Crystalline Solids**. 502, 176-183, 2018.
- [164] Elbatal F H , El-Bassyouni G T. *Bioactivity of Hench bioglass and corresponding glass-ceramic and the effect of transition metal oxides*. **Silicon**. 3, 185-197, 2011.
- [165] Schitea R-I, Nitu A, Ciobota A-A, Munteanu A-L, David I-M, Miu D, Raileanu M, Bacalum M , Busuioc C. *Pulsed laser deposition derived bioactive glass-ceramic coatings for enhancing the biocompatibility of scaffolding materials*. **Materials**. 13 (11), 2615, 2020.
- [166] Fiume E, Serino G, Bignardi C, Verné E , Baino F. *Sintering behavior of a six-oxide silicate bioactive glass for scaffold manufacturing*. **Applied Sciences**. 10 (22), 8279, 2020.
- [167] Kaur G, Kumar V, Baino F, Mauro J C, Pickrell G, Evans I , Bretcanu O. *Mechanical properties of bioactive glasses, ceramics, glass-ceramics and composites: State-of-the-art review and future challenges*. **Materials Science and Engineering: C**. 104, 109895, 2019.
- [168] Hmood F J, Goerke O, Schmidt F, Epping J D , Günster J. *Structure and crystallization characterization of chemically developed bioactive glass based on ICIE16*. **Open Ceramics**. 3, 100027, 2020.
- [169] Thavornyutikarn B, Feltis B, Wright P F , Turney T W. *Effect of pre-treatment of crystallized bioactive glass with cell culture media on structure, degradability, and biocompatibility*. **Materials Science and Engineering: C**. 97, 188-197, 2019.
- [170] Torres-Sanchez C, Al Mushref F, Norrito M, Yendall K, Liu Y , Conway P P. *The effect of pore size and porosity on mechanical properties and biological response of*

- porous titanium scaffolds*. **Materials Science and Engineering: C**. 77, 219-228, 2017.
- [171] Wang Y-F, Barrera C M, Dauer E A, Gu W, Andreopoulos F , Huang C-Y C. *Systematic characterization of porosity and mass transport and mechanical properties of porous polyurethane scaffolds*. **Journal of the mechanical behavior of biomedical materials**. 65, 657-664, 2017.
- [172] Zocca A, Gomes C M, Bernardo E, Müller R, Günster J , Colombo P. *LAS glass–ceramic scaffolds by three-dimensional printing*. **Journal of the European Ceramic Society**. 33 (9), 1525-1533, 2013.
- [173] Possolli N M, Raupp-Pereira F, Montedo O R K , Arcaro S. *LZS bioactive glass-ceramic scaffolds: colloidal processing, foam replication technique and mechanical properties to bone tissue engineering*. **Open Ceramics**. 9, 100219, 2022.
- [174] Feng P, Wei P, Shuai C , Peng S. *Characterization of mechanical and biological properties of 3-D scaffolds reinforced with zinc oxide for bone tissue engineering*. **PloS one**. 9 (1), e87755, 2014.
- [175] Ali A, Ershad M, Vyas V K, Hira S K, Manna P P, Singh B, Yadav S, Srivastava P, Singh S , Pyare R. *Studies on effect of CuO addition on mechanical properties and in vitro cytocompatibility in 1393 bioactive glass scaffold*. **Materials Science and Engineering: C**. 93, 341-355, 2018.
- [176] Fu Q, Saiz E, Rahaman M N , Tomsia A P. *Bioactive glass scaffolds for bone tissue engineering: state of the art and future perspectives*. **Materials Science and Engineering: C**. 31 (7), 1245-1256, 2011.
- [177] Erol M, Mourinho V, Newby P, Chatzistavrou X, Roether J, Hupa L , Boccaccini A R. *Copper-releasing, boron-containing bioactive glass-based scaffolds coated with alginate for bone tissue engineering*. **Acta Biomaterialia**. 8 (2), 792-801, 2012.
- [178] Arepalli S K, Tripathi H, Hira S K, Manna P P, Pyare R , Singh S. *Enhanced bioactivity, biocompatibility and mechanical behavior of strontium substituted bioactive glasses*. **Materials Science and Engineering: C**. 69, 108-116, 2016.
- [179] Goudarzi Z, Ijadi A, Bakhtiari A, Eskandarinezhad S, Azizabadi N , Jazi M A. *Sr-doped bioactive glasses for biological applications*. **Journal of Composites and Compounds**. 2 (3), 105-109, 2020.

- [180] Hesarakı S, Gholami M, Vazehrad S , Shahrabi S. *The effect of Sr concentration on bioactivity and biocompatibility of sol–gel derived glasses based on CaO–SrO–SiO₂–P₂O₅ quaternary system.***Materials Science and Engineering: C.** 30 (3), 383-390, 2010.
- [181] Silva A V, Gomes D D S, Victor R D S, Santana L N D L, Neves G A , Menezes R R. *Influence of Strontium on the Biological Behavior of Bioactive Glasses for Bone Regeneration.***Materials.** 16 (24), 7654, 2023.
- [182] Ciraldo F E, Boccardi E, Melli V, Westhauser F , Boccaccini A R. *Tackling bioactive glass excessive in vitro bioreactivity: Preconditioning approaches for cell culture tests.***Acta Biomaterialia.** 75, 3-10, 2018.
- [183] Lu X, Kolzow J, Chen R R , Du J. *Effect of solution condition on hydroxyapatite formation in evaluating bioactivity of B₂O₃ containing 45S5 bioactive glasses.***Bioactive materials.** 4, 207-214, 2019.
- [184] Villicaña-Molina E, Aguilar-Reyes E A, León-Patiño C A , Nuñez-Anita R E. *Preparation of CEL2 glass-ceramic porous scaffolds coated with chitosan microspheres that have a drug delivery function.***International Journal of Applied Ceramic Technology.** 2019.
- [185] Guo W, Zhao F, Wang Y, Tang J , Chen X. *Characterization of the mechanical behaviors and bioactivity of tetrapod ZnO whiskers reinforced bioactive glass/gelatin composite scaffolds.***journal of the mechanical behavior of biomedical materials.** 68, 8-15, 2017.
- [186] Du R L, Chang J, Ni S Y, Zhai W Y , Wang J Y. *Characterization and in vitro bioactivity of zinc-containing bioactive glass and glass-ceramics.***Journal of biomaterials applications.** 20 (4), 341-360, 2006.
- [187] Oudadesse H, Dietrich E, Gal Y, Pellen P, Bureau B, Mostafa A , Cathelineau G. *Apatite forming ability and cytocompatibility of pure and Zn-doped bioactive glasses.***Biomedical Materials.** 6 (3), 035006, 2011.
- [188] Moghanian A, Zohourfazeli M, Tajer M H M , Miri A K. *Comprehensive in vitro studies of novel sol gel-derived Zr⁴⁺/Zn²⁺ co-substituted bioactive glass with enhanced biological properties for bone healing.***Journal of Non-Crystalline Solids.** 566, 120887, 2021.

- [189] Kanzaki N, Onuma K, Treboux G, Tsutsumi S , Ito A. *Inhibitory effect of magnesium and zinc on crystallization kinetics of hydroxyapatite (0001) face.***The Journal of Physical Chemistry B.** 104 (17), 4189-4194, 2000.
- [190] Dietrich E, Oudadesse H, Lucas-Girot A, Le Gal Y, Jeanne S , Cathelineau G. *Effects of Mg and Zn on the surface of doped melt-derived glass for biomaterials applications.***Applied surface science.** 255 (2), 391-395, 2008.
- [191] Fredholm Y C, Karpukhina N, Brauer D S, Jones J R, Law R V , Hill R G. *Influence of strontium for calcium substitution in bioactive glasses on degradation, ion release and apatite formation.***Journal of the Royal Society Interface.** 9 (70), 880-889, 2012.
- [192] Hu Q, Jiang W, Chen X, Li Y , Liang Q. *The effects of Sr concentration on physicochemical properties, bioactivity and biocompatibility of sub-micron bioactive glasses spheres.***Advanced Powder Technology.** 28 (10), 2713-2722, 2017.
- [193] Taherkhani S , Moztarzadeh F. *Influence of strontium on the structure and biological properties of sol–gel-derived mesoporous bioactive glass (MBG) powder.***Journal of Sol-Gel Science and Technology.** 78, 539-549, 2016.
- [194] Hoppe A, Meszaros R, Stähli C, Romeis S, Schmidt J, Peukert W, Marelli B, Nazhat S N, Wondraczek L , Lao J. *In vitro reactivity of Cu doped 45S5 Bioglass® derived scaffolds for bone tissue engineering.***Journal of Materials Chemistry B.** 1 (41), 5659-5674, 2013.
- [195] Ai F, Chen L, Yan J, Yang K, Li S, Duan H, Cao C, Li W , Zhou K. *Hydroxyapatite scaffolds containing copper for bone tissue engineering.***Journal of Sol-Gel Science and Technology.** 95, 168-179, 2020.
- [196] Jones J , Clare A. *Bio-glasses: an introduction.* John Wiley & Sons. 2012.
- [197] Hammami I, Graça M P F, Gavinho S R, Jakka S K, Borges J P, Silva J C , Costa L C. *Exploring the Impact of Copper Oxide Substitution on Structure, Morphology, Bioactivity, and Electrical Properties of 45S5 Bioglass®.***Biomimetics.** 9 (4), 213, 2024.
- [198] Adams L A , Essien E R. *Bioactivity of quaternary glass prepared from bentonite clay.***Journal of Advanced Ceramics.** 5, 47-53, 2016.

- [199] Wang H, Zhao S, Xiao W, Xue J, Shen Y, Zhou J, Huang W, Rahaman M N, Zhang C , Wang D. *Influence of Cu doping in borosilicate bioactive glass and the properties of its derived scaffolds*. **Materials Science and Engineering: C**. 58, 194-203, 2016.
- [200] Begg S L. *The role of metal ions in the virulence and viability of bacterial pathogens*. **Biochemical Society Transactions**. 47 (1), 77-87, 2019.
- [201] Krzywoszyńska K, Witkowska D, Świątek-Kozłowska J, Szebesczyk A , Kozłowski H. *General aspects of metal ions as signaling agents in health and disease*. **Biomolecules**. 10 (10), 1417, 2020.
- [202] Mittapally S, Taranum R , Parveen S. *Metal ions as antibacterial agents*. **Journal of Drug Delivery and Therapeutics**. 8 (6), 411-419, 2018.
- [203] Nisar P, Ali N, Rahman L, Ali M , Shinwari Z K. *Antimicrobial activities of biologically synthesized metal nanoparticles: an insight into the mechanism of action*. **JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry**. 24 (7), 929-941, 2019.
- [204] Kazimierczak P, Golus J, Kolmas J, Wojcik M, Kolodynska D , Przekora A. *Noncytotoxic zinc-doped nanohydroxyapatite-based bone scaffolds with strong bactericidal, bacteriostatic, and antibiofilm activity*. **Biomaterials Advances**. 139, 213011, 2022.
- [205] Skłodowski K, Chmielewska-Deptuła S J, Piktel E, Wolak P, Wollny T , Bucki R. *Metallic nanosystems in the development of antimicrobial strategies with high antimicrobial activity and high biocompatibility*. **International journal of molecular sciences**. 24 (3), 2104, 2023.
- [206] Niño-Martínez N, Salas Orozco M F, Martínez-Castañón G-A, Torres Méndez F , Ruiz F. *Molecular mechanisms of bacterial resistance to metal and metal oxide nanoparticles*. **International journal of molecular sciences**. 20 (11), 2808, 2019.
- [207] Hui Y, Dong Z, Wenkun P, Yao D, Huichang G , Tongxiang L. *Facile synthesis of copper doping hierarchical hollow porous hydroxyapatite beads by rapid gelling strategy*. **Materials Science and Engineering: C**. 109, 110531, 2020.
- [208] Mojtavavi L , Razavi A. *The effects of addition of copper on the structure and antibacterial properties of biomedical glasses*. **European chemical bulletin**. 9 (1), 1-5, 2020.

- [209] Muteeb G, Rehman M T, Shahwan M , Aatif M. *Origin of antibiotics and antibiotic resistance, and their impacts on drug development: A narrative review*. **Pharmaceuticals**. 16 (11), 1615, 2023.
- [210] Wang X, Chen C, Hu J, Liu C, Ning Y , Lu F. *Current strategies for monitoring and controlling bacterial biofilm formation on medical surfaces*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**. 282, 116709, 2024.
- [211] Schilcher K , Horswill A R. *Staphylococcal biofilm development: structure, regulation, and treatment strategies*. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**. 84 (3), 10.1128/mmbr. 00026-19, 2020.
- [212] Mukherjee S J, Bugallo L, Scheuer N, Cremin T, Montoro V, Ferrero M, Preston M, Cheng D, Golinkoff R , Popp J. *Conceptions of play by children in five countries: towards an understanding of playfulness (Las concepciones acerca del juego de niños de cinco países: hacia un mejor conocimiento de la actividad lúdica)*. **Journal for the Study of Education and Development**. 46 (1), 109-153, 2023.
- [213] Chen Y-H, Tseng S-P, Wu S-M , Shih C-J. *Structure-dependence of anti-methicillin-resistant staphylococcus aureus (MRSA) activity on ZnO-containing bioglass*. **Journal of Alloys and Compounds**. 848, 156487, 2020.
- [214] Aina V, Perardi A, Bergandi L, Malavasi G, Menabue L, Morterra C , Ghigo D. *Cytotoxicity of zinc-containing bioactive glasses in contact with human osteoblasts*. **Chemico-biological interactions**. 167 (3), 207-218, 2007.
- [215] Oliveira R L, Barbosa L, Pereira T C, Dona L R, Tabuti T G, Tada D B, Triboni E R, De Oliveira L D , Trichês E S. *Multifunctional scaffolds of β -tricalcium phosphate/bioactive glass coated with zinc oxide and copper oxide nanoparticles*. **Nano Trends**. 8, 100059, 2024.
- [216] Hosseini M, Besheli N H, Deng D, Lievens C, Zuo Y, Leeuwenburgh S C , Yang F. *Facile post modification synthesis of copper-doped mesoporous bioactive glass with high antibacterial performance to fight bone infection*. **Biomaterials Advances**. 144, 213198, 2023.
- [217] Li K, Xia C, Qiao Y , Liu X. *Dose-response relationships between copper and its biocompatibility/antibacterial activities*. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**. 55, 127-135, 2019.

- [218] Mukherjee A , Sadler P J. *Metals in medicine: therapeutic agents*.**Wiley Encyclopedia of Chemical Biology**. 1-47, 2007.
- [219] Ayangbenro A S , Babalola O O. *A new strategy for heavy metal polluted environments: a review of microbial biosorbents*.**International journal of environmental research and public health**. 14 (1), 94, 2017.
- [220] Brown T. *Design thinking*.**Harvard business review**. 86 (6), 84, 2008.
- [221] Awais M, Aizaz A, Nazneen A, Bhatti Q U A, Akhtar M, Wadood A , Atiq Ur Rehman M. *A review on the recent advancements on therapeutic effects of ions in the physiological environments*.**Prosthesis**. 4 (2), 263-316, 2022.
- [222] Saleem O, Wahaj M, Akhtar M A , Ur Rehman M A. *Fabrication and characterization of Ag–Sr-substituted hydroxyapatite/chitosan coatings deposited via electrophoretic deposition: a design of experiment study*.**ACS Omega**. 5 (36), 22984-22992, 2020.
- [223] Islam M, Roy D , Singha D. *Metal Ion Toxicity in Human Body: Sources, Effects, Mechanisms and Detoxification Methods*.**Chemistry Africa**. 1-19, 2025.

Anel Flores Jacobo

FABRICACIÓN DE ANDAMIOS POROSOS DE BIOVIDRIO CEL2 DOPADO CON ZnO, SrO Y CuO MEDIANTE TECNOLOGÍA DE P...

 Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo

Detalles del documento

Identificador de la entrega

trn:oid:::3117:535948462

Fecha de entrega

3 dic 2025, 2:06 p.m. GMT-6

Fecha de descarga

3 dic 2025, 2:09 p.m. GMT-6

Nombre del archivo

FABRICACIÓN DE ANDAMIOS POROSOS DE BIOVIDRIO CEL2 DOPADO CON ZnO, SrO Y CuO MEDIA....pdf

Tamaño del archivo

7.4 MB

205 páginas

52.323 palabras

294.022 caracteres

25% Similitud general

El total combinado de todas las coincidencias, incluidas las fuentes superpuestas, para ca...

Fuentes principales

- 24%  Fuentes de Internet
- 18%  Publicaciones
- 0%  Trabajos entregados (trabajos del estudiante)

Marcas de integridad

N.º de alerta de integridad para revisión



Caracteres reemplazados

33 caracteres sospechosos en N.º de páginas

Las letras son intercambiadas por caracteres similares de otro alfabeto.

Los algoritmos de nuestro sistema analizan un documento en profundidad para buscar inconsistencias que permitirían distinguirlo de una entrega normal. Si advertimos algo extraño, lo marcamos como una alerta para que pueda revisarlo.

Una marca de alerta no es necesariamente un indicador de problemas. Sin embargo, recomendamos que preste atención y la revise.

Formato de Declaración de Originalidad y Uso de Inteligencia Artificial

Coordinación General de Estudios de Posgrado
Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo



A quien corresponda,

Por este medio, quien abajo firma, bajo protesta de decir verdad, declara lo siguiente:

- Que presenta para revisión de originalidad el manuscrito cuyos detalles se especifican abajo.
- Que todas las fuentes consultadas para la elaboración del manuscrito están debidamente identificadas dentro del cuerpo del texto, e incluidas en la lista de referencias.
- Que, en caso de haber usado un sistema de inteligencia artificial, en cualquier etapa del desarrollo de su trabajo, lo ha especificado en la tabla que se encuentra en este documento.
- Que conoce la normativa de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, en particular los Incisos IX y XII del artículo 85, y los artículos 88 y 101 del Estatuto Universitario de la UMSNH, además del transitorio tercero del Reglamento General para los Estudios de Posgrado de la UMSNH.

Datos del manuscrito que se presenta a revisión		
Programa educativo	DOCTORADO EN CIENCIAS EN METALURGIA Y CIENCIA DE LOS MATERIALES	
Título del trabajo	FABRICACIÓN DE ANDAMIOS POROSOS DE BIOVIDRIO CEL2 DOPADO CON ZnO, SrO Y CuO MEDIANTE TECNOLOGÍA DE POLVOS PARA APLICACIÓN EN INGENIERÍA TISULAR	
	Nombre	Correo electrónico
Autor/es	ANEL FLORES JACOBO	1731577c@umich.mx
Director	ENA ATHENEA AGUILAR REYES	ena.aguilar@umich.mx
Codirector		
Coordinador del programa	ALBERTO RUIZ MARINES	alruiz@umich.mx

Uso de Inteligencia Artificial		
Rubro	Uso (sí/no)	Descripción
Asistencia en la redacción	NO	

Formato de Declaración de Originalidad y Uso de Inteligencia Artificial

Coordinación General de Estudios de Posgrado
Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo



Uso de Inteligencia Artificial		
Rubro	Uso (sí/no)	Descripción
Traducción al español	SI	Se utilizó para checar y verificar términos técnicos equivalentes al español.
Traducción a otra lengua	NO	
Revisión y corrección de estilo	NO	
Análisis de datos	NO	
Búsqueda y organización de información	SI	Información relevante de artículos científicos que aporten a esta investigación
Formateo de las referencias bibliográficas	NO	
Generación de contenido multimedia	NO	
Otro	NO	

Datos del solicitante	
Nombre y firma	Anel Flores Jacobo / \ U
Lugar y fecha	Morelia, Michoacán., a 03 de diciembre del 2025