



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE
SAN NICOLÁS DE HIDALGO



INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN EN METALURGIA Y MATERIALES

PROGRAMA DE MAESTRIA EN
METALURGIA Y CIENCIAS DE LOS MATERIALES

FABRICACIÓN POR COLADA EN GEL INORGÁNICA DE ANDAMIOS DE BIOVIDRIO
4SS5 PARA APLICACIÓN EN REGENERACIÓN DE TEJIDO ÓSEO

Tesis que para obtener el Grado de
Maestro en Metalurgia y Ciencias de los Materiales

Presenta

ING. ANEL FLORES JACOBO

Directora de Tesis

DRA. ENA ATHENEA AGUILAR REYES

Morelia, Michoacán

AGOSTO 2020.

DEDICATORIA

A Dios por permitirme obtener un grado más dentro de mi formación académica. A mi padre el señor Héctor Flores López y a mi madre la señora Hilda Jacobo Campos, por enseñarme los valores necesarios, por guiarme con sus consejos las cuales me llevaron a ser una persona totalmente diferente. A mis hermanos y hermanas por su apoyo incondicional. A mi familia paterna y materna por su apoyo moral.

A la Dra. Ena Athenea Aguilar Reyes, por su apoyo incondicional como asesora de tesis y por la oportunidad trabajar en su equipo de trabajo.

A mis compañeros y amigos del laboratorio de compuestos (Karla, Cindy, Joaquín, Rodrigo, Alejandro Pulido, Alejandro Miranda, Roció, Miguel) por su apoyo incondicional y por permitirme ser parte de su grupo.

A Luis Ángel Lázaro Lobato, por ser parte de esta nueva etapa de mi vida profesional además de su apoyo moral.

AGRADECIMIENTOS

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.

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.

A la Dra. Rosa Elvira Núñez Anita de la unidad de Proteómica y Bioingeniería Celular, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, por la asesoría técnica y experimental en la realización de las pruebas biológicas in vitro.

Al M.C. Manuel Robles Melgarejo encargado del Laboratorio de Cinética Química y Catálisis del Posgrado de Ingeniería Química, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, por la asesoría técnica y experimental en la colección de datos de tamaño de poro y distribución de tamaño de poro.

A los técnicos encargados de los equipos *Beckman Coulter LS100Q*, módulo de análisis térmico simultáneo TG/DSC a 1600°C *SDT Q600 TA Instruments*, microscopio electrónico de barrido *JEOL SEM JSM 6400*, difractómetro de rayos X *D8 Advance BRUKER*, espectrofotómetro de infrarrojo *TENSOR 27 Bruker* por la asesoría técnica y experimental en la colección de datos.

Al Instituto de Investigación en Metalurgia y Materiales de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, por la oportunidad de ingreso al programa de Maestría.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por la beca de maestría otorgada en el periodo de marzo 2018- febrero 2020.

Este trabajo fue apoyado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, México, CONACYT [Proyecto CB-2013-C01-222262]; la Coordinación de la Investigación Científica - Programas de Investigación UMSNH 2018-2019 y 2019-2020, y el Programa SEP-PFCE de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.

ÍNDICE

RESUMEN	xiii
ABSTRACT	xiv
CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. Objetivos	2
1.1.1. Objetivo general	2
1.1.2. Objetivos particulares.....	2
1.2. Justificación	4
1.3. Hipótesis.....	4
1.4. Metas científicas.....	4
CAPÍTULO II. MARCO TEÓRICO	6
2.1. El hueso.....	6
2.1.1. Fisiología del hueso	7
2.1.2. Propiedades mecánicas del hueso	10
2.2 Mecanismo biológico de regeneración ósea	10
2.2.1 Fases de remodelado.....	11
2.3. Técnicas de regeneración y reparación ósea	12
2.3.1. Autoinjertos (autólogo).....	13
2.3.2. Aoinjertos (homólogos).....	13
2.3.3. Xenoinjertos (heterólogos).....	13
2.3.4 Materiales sintéticos	13
2.4. Ingeniería de tejidos	14
2.5. Andamios 3D	15
2.6. Propiedades mecánicas de los andamios	16
2.7. Métodos de fabricación de andamios 3D para aplicaciones biomédicas	21
2.7.1. Sol-gel.....	21
2.7.2. Metalurgia de polvos.....	22
2.7.3. Réplica de espumas de polímeros.....	24
2.7.4. Impresión 3D.....	26
2.7.5. Colada en gel inorgánica	28
2.8. Vidrios bioactivos	32
2.8.1. Bioglass® 45S5 para regeneración de tejido óseo.....	33

2.9. Mecanismos de reacción de vidrios bioactivos a base sílice (Bioglass 45S5)	34
2.10 Andamios funcionalizados.....	36
2.10. Ensayos de Bioactividad	38
2.11 Cultivos celulares.....	41
CAPITULO III. DESARROLLO EXPERIMENTAL.....	50
3.1. Preparación del biovidrio 45S5.....	50
3.1.1. <i>Caracterización del polvo de biovidrio 45S5</i>	51
3.1.1.1. <i>Distribución de tamaño de partícula</i>	51
3.1.1.2. <i>Calorimetría diferencial de barrido (DSC)</i>	52
3.1.1.3 <i>Análisis por fluorescencia de rayos X (FRX)</i>	52
3.1.1.4. <i>Análisis por microscopía electrónica de barrido (MEB)</i>	52
3.1.1.5. <i>Análisis por difracción de rayos X (DRX)</i>	53
3.1.1.6. <i>Análisis por espectroscopía infrarroja (FT-IR)</i>	53
3.2 Fabricación de los andamios por colada en gel inorgánica	53
3.3. Estudios de bioactividad.....	54
3.3.1. <i>Esterilización de las muestras (discos)</i>	55
3.3.2. <i>Preparación del fluido corporal simulado (SBF)</i>	55
3.3.3. <i>Cálculo del volumen de SBF</i>	56
3.3.4. <i>Proceso de inmersión</i>	56
3.3.5. <i>Control del pH</i>	57
3.4. Caracterización microestructural y mecánica de los andamios de biovidrio 45S5.....	57
3.4.1. <i>Determinación del área superficial y distribución de poro</i>	57
3.4.2. <i>Análisis por microscopía electrónica de barrido (MEB)</i>	58
3.4.3. <i>Análisis por difracción de rayos X (DRX)</i>	58
3.4.4. <i>Análisis por espectroscopía infrarroja (FT-IR)</i>	58
3.4.5. <i>Determinación del porcentaje de porosidad</i>	58
3.4.6. <i>Evaluación mecánica de los andamios</i>	59
3.5. Pruebas biológicas	59
3.5.1. <i>Medición del pH</i>	59
CAPITULO IV. ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....	62
4.1. Análisis del biovidrio 45S5	62
4.1.1 <i>Distribución de tamaño de partícula</i>	62
4.1.2. <i>Comportamiento térmico</i>	63

4.1.3. <i>Análisis por fluorescencia de rayos X (FRX)</i>	64
4.1.4. <i>Análisis por microscopía electrónica de barrido (MEB)</i>	65
4.1.5. <i>Análisis por difracción de rayos X (DRX)</i>	66
4.1.6. <i>Análisis por espectroscopía infrarroja (FT-IR)</i>	67
4.2. Análisis de los andamios de biovidrio 45S5 sinterizados	68
4.2.1. <i>Determinación del área superficial y distribución de tamaño de poro</i>	68
4.2.2. <i>Microscopía electrónica de barrido (MEB)</i>	72
4.2.3. <i>Análisis por difracción de rayos X (DRX)</i>	76
4.2.4. <i>Análisis por espectroscopía infrarroja (FT-IR)</i>	77
4.2.5. <i>Resultados de porosidad y de pruebas de resistencia a la compresión</i>	78
4.3. Ensayos de bioactividad	80
4.3.1. <i>Análisis por microscopía electrónica de barrido (MEB)</i>	82
4.3.2. <i>Análisis por difracción de rayos X (DRX)</i>	84
4.3.3. <i>Análisis por espectroscopía infrarroja (FT-IR)</i>	87
4.3.4. <i>Pruebas biológicas</i>	89
CAPITULO V. CONCLUSIONES	92
REFERENCIAS	95

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 2.1.	Clasificación del tejido óseo	5
Figura 2.2	Representación esquemática del tejido óseo.	6
Figura 2.3.	Tipos de células que componen al tejido óseo [20].	8
Figura 2.4.	Partes del tejido óseo [21].	8
Figura 2.5.	Fases de remodelación ósea [24].	11
Figura.2.6.	Esquema representativo utilizando la combinación de células con una matriz para la regeneración de tejido nuevo [2].	13
Figura 2.7.	Representación de una matriz tridimensional (andamio), células progenitoras (madre) u osteoblastos y un componente molecular necesarios para la creación de implantes osteogénicos [8].	15
Figura 2.8.	Micrografías MEB de andamios de TCP, (a)-(c) sin adición de biovidrio 45S5, con adición de biovidrio 45S5, (d)-(f) y (g)-(i) con 5 y 7% en peso, respectivamente.	16
Figura 2.9.	Comportamiento mecánico: porosidad para espumas de vidrio bioactivo 45S5 sinterizadas a varias temperaturas [36].	17
Figura 2.10.	Micrografías por MEB que muestran la microestructura de las espumas de vidrio bioactivo 45S5 sinterizadas a (a) 950 ° C y (b) 1025 ° C en aire durante 1 h [36].	17
Figura 2.11.	Figura 2.11. Micrografías por MEB y espectros EDS de andamios CEL2/POL: sección fracturada de (a) CEL2/POL 0/100, (b) CEL2/POL 40/60, (c) CEL2/POL 70/30 [37].	18
Figura 2.12.	Curvas tensión-deformación de los andamios compuestos porosos comprimidos a una deformación de (0–60%) [37].	19
Figura2.13.	(a) Micrografía por MEB, y (b) imagen por μ CT [39].	21
Figura 2.14.	Microestructura por MEB de los andamios sinterizados a 975/1 h: (a) 15x, (b) 50x, (c) 100x, (d) 200x, (e) 400x y (f) 2000x [42].	22
Figura 2.15.	Micrografías por MEB de los andamios (a-b) 900 °C/5 h, (c-d) 950 °C/2 h, y (e-f) 1000 °C/1 h [44].	24
Figura 2.16.	Imagen por MEB del andamio fabricado mediante impresión 3D; (a) muestra sinterizada con un diámetro de 11.5 mm, (b) vista superior (izquierda) y vista lateral (derecha). Las dimensiones de los canales oscilan entre 447 ± 37 μ m en la dirección z y 569 ± 33 μ m en la dirección x [46].	26
Figura 2.17.	(a) Andamios MBG producidos por impresión 3D de diferentes tamaños, formas y morfologías. (b – d) andamios con poros de; (b)	27

1307 ± 40, (c) 1001 ± 48, (d) 624 ± 40 μm. (d – f) Andamios MBG con diferentes morfologías de poros. (g) Morfología de los poros del lado inferior de los andamios MBG. Los poros en el lado inferior permanecen abiertos. (h) Imagen MEB de la microestructura de las paredes de los poros. (i) Micrografías MET que demuestran la estructura bien organizada del canal mesoporoso de las paredes de los poros en los andamios [47].

- Figura 2.18.** Imagen por MEB de los andamios con diferente carga de CEL 2; (a – c) espumas con 58% en peso de carga sólida a 900 °C, (d, e) con 60% en peso de carga a 900 °C y (f) con 60% de carga a 1000 °C [53]. 29
- Figura 2.19.** Imagen por MEB de los andamios con diferente contenido de WD antes y después de sinterizar a 1000 °C;(a, b) espumas con 60% en peso; (c, d) espumas con 65% en peso [48]. 29
- Figura 2.20.** Diagrama ternario del sistema SiO₂-CaO-Na₂O con 6 % en peso de P₂O₅ [59]. 32
- Figura 2.21.** Mecanismo de integración del biovidrio sobre la superficie del tejido [65] 35
- Figura 2.22.** (a)Imágenes MEB de fibroblastos adheridos a la superficie del andamio CEL2 cargado con microesferas de quitosano después de 5 días en medio a 500x, (b) Liberación de acetaminofén de las microesferas de quitosano y andamios cargados de microesferas de quitosano [66]. 36
- Figura 2.23.** (a) Liberación acumulativa (%) de dexametasona (DEX) con el tiempo y (b) la cantidad de DEX liberada en cada punto de tiempo desde los andamios de MBG impresos en 3D [47]. 37
- Figura 2.24.** Imágenes por MEB de los andamios de MBG fabricados por impresión 3D inmersos en SBF por (a) 1 y (b, c) 3 días, (inserto en b) análisis EDS, y (d) los resultados por FTIR de MBG después de ser inmerso en SBF por 3 días [54]. 39
- Figura 2.25.** Micrografías por MEB que muestran el desarrollo de la capa de hidroxiapatita en la superficie de los andamios bioactivos en varios tiempos de inmersión en SBF: (a) 0, (b) 7, (c) y (d) 21 días [42]. 40
- Figura 2.26.** Porcentaje medio de absorbancia, obtenido con el ensayo MTT, de β-TCP, β-TCP/5 BG y β-TCP/7.5 BG y grupo control (100%) después de 24 h en contacto con células MG 63 [2]. 42
- Figura 2.27.** Imagen por MEB de la adhesión celular en (a) β-TCP, (b) β-TCP/5 BG y (c) β-TCP/7.5 BG después de 3 días [2]. 43
- Figura 2.28.** Ensayo MTT de fibroblastos cultivados en TCP (condición de control) o en espuma de vitrocerámico WD durante 3 y 7 días. Diferencia significativa *(p <0.05);**(p <0.01);***(p <0,001) [48]. 44

Figura 2. 29.	Ensayo de actividad LDH de fibroblastos cultivados en TCP (condición de control) o en espuma de vitrocerámico WD durante tres y siete días. (a) actividad intracelular de LDH; (b) actividad extracelular de LDH. Diferencia significativa *(p <0.05); **(p<0.01);***(p<0.001) [48].	45
Figura 2.30.	Imágenes por MEB a 100 y 500 x) de fibroblastos cultivados en espuma de WD durante 3 días (a, b) y 7 días (c, d). migración de las células a los poros (c, flechas amarillas) después de siete días. Los cuadros blancos en (a, c) representan las áreas que se muestran con mayor aumento en (b, d) [48].	46
Figura 2.31.	El pH en función del tiempo de inmersión en; (a) primeras 48 h, (b) segundas 48 h [71].	47
Figura 2.32.	Citotoxicidad de los materiales de prueba usando células MG63, detectada midiendo la liberación de LDH en el medio que contiene las sustancias extraídas durante 2 días de cultivo [71].	48
Figura 2.33.	(a) 1 día, solo células divididas; (b) 4 días, células ampliamente diseminadas (de modo que es difícil reconocer el límite de la célula en la foto); (c) 6 días, una célula en expansión, que muestra procesos membranosos en contacto con la superficie del andamio [71].	48
Figura 3.1.	Esquema general de la ruta experimental del proyecto.	49
Figura 3.2.	Ciclo térmico para la preparación del biovidrio 45S5.	50
Figura 3.3.	Diagrama esquemático del proceso de obtención de los andamios de biovidrio 45S5.	53
Figura 3.4.	Método para medir el pH de las muestras.	59
Figura 3.5.	Cultivo de las células donde; (a) células sin material, (b) células con material control y (c) células con material con SBF por 7 días.	60
Figura 4.1.	Curva de distribución de tamaño de partícula del polvo de biovidrio 45S5.	61
Figura 4.2.	Análisis térmico diferencial del biovidrio 45S5 en polvo.	63
Figura 4.3.	(a) Imagen por MEB a 1000x y (b) el análisis EDS correspondiente al polvo de biovidrio 45S5.	64
Figura 4.4.	Difractograma del polvo de biovidrio 45S5.	66
Figura 4.5.	Análisis por espectroscopía infrarroja del polvo de biovidrio 45S5.	67
Figura 4.6.	Isotermas de adsorción de nitrógeno por BET de los andamios sinterizados a: (a) 800, (b) 850 y (c) 900 °C.	68

Figura 4.7.	Distribución de tamaño de poro mediante BJH, de los andamios de biovidrio 45S5 sinterizados a (a). 800, (b) 850 y (c) 900 °C.	69
Figura 4.8.	Histogramas por Nano measurer; (a) 800 °C, (b) 850°C y (c) 900 °C.	70
Figura 4.9.	Imágenes por MEB de los andamios sinterizados a 800°C durante 3 horas, (a) 20x, (b)100x, (c)250x y (d)1000x.	71
Figura 4.10.	Imágenes por MEB de los andamios sinterizados a 850 °C durante 3 horas, (a) 20x, (b)100x, (c)250x y (d)1000x.	72
Figura 4.11.	Imágenes por MEB de los andamios sinterizados a 900°C durante 3 horas, (a) 20x, (b)100x, (c)250x y (d)1000x.	73
Figura 4.12.	Comparación de los tamaños de poro en los andamios sinterizados a: (a) 800°C a 100x, (b) 850°C a 1000x y (c) 900°C a 1000x.	74
Figura 4.13.	Micrografías de los andamios de vidrio bioactivo 45S5 sinterizados a; (a) 950 °C. (b) 975 °C, (c) 1000 °C y (d) 1025 °C [36].	75
Figura 4.14.	Difractogramas de los andamios de biovidrio 45S5 sinterizados a 800, 850 y 900 °C.	76
Figura 4.15.	a) Comparación de los espectros FT-IR obtenidos de los andamios sinterizados a diferentes temperaturas con respecto al andamio en verde.	77
Figura 4.16.	Comportamiento mecánico-poroso de los andamios sinterizados a diferentes temperaturas.	78
Figura 4.17.	Gráfica de variación del pH de la solución SBF en los diferentes puntos de tiempo de inmersión.	81
Figura 4.18.	Micrografías obtenidas por MEB de los andamios de biovidrio en los diferentes puntos de tiempo de inmersión en SBF: (a) 1 d, (b) 3 d, (c) 7 d, (d) 14 d, (e) 21d y (f) 28 d.	83
Figura 4.19.	Micrografías obtenidas por MEB del vidrio convencional en los diferentes puntos de tiempo de inmersión en SBF: (a) 0 d, (b) 7 d, (c) 14 d y (d) 28 d.	84
Figura 4.20.	Difractogramas resultantes después de la inmersión de los andamios en SBF.	86
Figura 4.21.	Difractogramas resultantes después de la inmersión del vidrio convencional en SBF.	87
Figura 4.22.	Espectros FT-IR en los diferentes puntos de tiempo de inmersión de los andamios en SBF.	88
Figura 4.23.	Espectros FT-IR después de la inmersión del vidrio convencional en SBF.	89

Figura 4.24. Imágenes mediante microscopio óptico; (a) células sin material, (b) 90 células con el andamio sin pre-tratamiento en SBF, (c) células con andamios después del pre-tratamiento por 7 días en SBF.

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 2.1.	Resumen de las propiedades mecánicas del hueso humano [7].	9
Tabla 2.2.	Valores de porosidad y resistencia a la compresión para andamios con β -TCP preparados con diferentes cantidades de agente surfactante [2].	16
Tabla 2.3.	Valores de porosidad y resistencia a la compresión para andamios β -TCP y β -TCP/x%-BG espumados con 0.23% de surfactante y sinterizados a 1200° C durante 2 h [2].	16
Tabla 2.4.	Datos de poros de andamios CEL2 / POL obtenidos por μ CT [37].	19
Tabla 2.5.	Ventajas y desventajas de los métodos de fabricación de andamios 3D [7].	30
Tabla 2.6.	Vidrios bioactivos [32].	32
Tabla 2.7.	Reactivos y cantidades para preparar 1000 mL de SBF mM (= mmol/dm ³) [67].	38
Tabla 4.1.	Resultados del análisis por FRX del p polvo de biovidrio 45S5 en % en peso.	63
Tabla 4.2.	Comparación de los resultados EDS con la composición del biovidrio 45S5.	65
Tabla 4.3.	Resultados de los análisis por BJH y BET.	69
Tabla 4.4.	Resultados de la prueba de resistencia a la compresión.	78
Tabla 4.5.	Comparación de métodos de fabricación de andamios para la ingeniería de tejidos.	79

RESUMEN

La ingeniería de tejidos constituye una alternativa para el tratamiento de enfermedades degenerativas óseas como la osteoporosis y osteoartritis a través del diseño de implantes temporales en base a andamios 3D biocompatibles capaces de estimular la regeneración y el crecimiento del hueso. Se investigó la fabricación de andamios 3D de biovidrio 45S5, biomaterial ampliamente estudiado por su fácil adhesión y unión a tejidos blandos y duros, además, de degradarse fácilmente al contacto con los fluidos fisiológicos. Los andamios 3D se obtuvieron por la técnica de gel inorgánica, método novedoso, fácil y económico. El procedimiento permitió la obtención de andamios altamente porosos con la ayuda de agitación mecánica y la adición del agente surfactante Triton X-100, para finalmente ser sinterizados a 800, 850 y 900 °C.

Los andamios sinterizados a 800 °C presentaron 74% de porosidad abierta e interconectada, característica requerida para la regeneración ósea. Mediante técnicas experimentales y modelos de cuantificación de distribución de tamaños de poros se confirmó la presencia de nanoporos interconectados de 1.5-2.2 nm viables para la unión de las células, además de macroporos interconectados de 5-300 μm , óptimos para el crecimiento óseo. Se determinó por el método de adsorción física BET un área superficial de los andamios sinterizados (800, 850 y 900°C) de 0.289, 1.319 y 0.351 m^2/g , respectivamente. La estructura y propiedades de las espumas fueron afectadas por la temperatura de sinterización; a mayor temperatura, mayor grado de consolidación. Los andamios cristalizaron a todas las temperaturas de sinterización obteniendo una fase primaria $\text{Na}_6\text{Ca}_3\text{Si}_6\text{O}_{18}$ y una fase secundaria $\text{Na}_2\text{Ca}_4(\text{PO}_4)_2\text{SiO}_4$. La resistencia a la compresión promedio de los andamios sinterizados a 800 °C fue de 4.94 ± 0.2 MPa. La bioactividad de las espumas se evaluó por inmersión in vitro en solución fisiológica simulada (SBF - *Simulated Body Fluid*) a los tiempos de 1, 3, 7, 14, 21 y 28 días, obteniendo la formación de la capa bioactiva de hidroxiapatita en los andamios expuestos a partir de 7 días de inmersión. Finalmente, se efectuaron pruebas biológicas in vitro por interacción con células MG63 en los andamios después de incubación en SBF por 7 días, encontrando que este periodo de tiempo no fue suficiente para la formación de la capa bioactiva de hidroxiapatita causando la muerte celular.

Palabras clave: andamios, biovidrio 45S5, colada en gel, bioactividad, regeneración ósea.

ABSTRACT

Tissue engineering constitutes an alternative for the treatment of degenerative bone diseases such as osteoporosis and osteoarthritis through the design of temporary implants based on biocompatible 3D scaffolds capable of stimulating bone regeneration and bone growth. The manufacture of 3D bioglass 45S5 scaffolds was investigated, a biomaterial widely studied for its easy adhesion and binding to soft and hard tissues, in addition to easily degrading on contact with physiological fluids. The 3D scaffolds were obtained by the inorganic gel casting technique, a novel, easy and inexpensive method. The procedure allowed the obtaining of highly porous scaffolds with the help of mechanical stirring and the addition of the surfactant agent Triton X-100, to finally be sintered at 800, 850 and 900 °C.

The scaffolds sintered at 800°C presented 74% open and interconnected porosity, a characteristic required for bone regeneration. By means of experimental techniques and quantification models of pore size distribution, the presence of interconnected nanopores of 1.5-2.2 nm viable for cell attachment, as well as interconnected macropores of 5-300 µm, optimal for bone growth, was confirmed. A surface area of the sintered scaffolds (800, 850 and 900°C) of 0.289, 1.319 and 0.351 m²/g, was determined by the BET physical adsorption method. However, the structure and properties of the foams were affected by the sintering temperature at higher temperature, higher degree of consolidation. The scaffolds crystallized at all sintering temperatures obtaining a primary phase Na₆Ca₃Si₆O₁₈ and a secondary phase Na₂Ca₄(PO₄)₂SiO₄. The average compressive strength of the sintered scaffolds at 800 °C was 4.93 ± 0.2 MPa. The bioactivity of the foams was evaluated by in vitro immersion in simulated body fluid (SBF) at different times of 1, 3, 7, 14, 21 and 28 days, obtaining the formation of the bioactive hydroxyapatite layer in the scaffolding exposed after 7 days of immersion. Finally, in vitro biological tests were carried by interaction with MG63 cells in the scaffolds after incubation in SBF for 7 days, it was found that this period of time was not sufficient for the formation of the hydroxyapatite bioactive layer causing cell death.

Keywords: scaffolding, 45S5 bioglass, gel casting, bioactivity, bone regeneration.

CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN

El tejido óseo es un tejido vivo que permite la protección de órganos además de brindar soporte a la estructura del cuerpo, pero también susceptible a sufrir daño. En la actualidad, enfermedades relacionadas con lesiones como las osteocondrales, eliminación de tumores, o aquellas debidas a la edad biológica como la osteoporosis y la osteoartritis, originan la necesidad clínica de reparación de defectos óseos. La ingeniería de tejidos es una opción prometedora para la reparación y regeneración de tejido y órganos dañados o perdidos por lesiones [1-4] a través de la combinación de células pertenecientes al cuerpo humano con biomateriales denominados andamios. Los andamios deben ser bioabsorbibles para llevar a cabo la proliferación y la formación de una matriz extracelular [5].

Un material prometedor para la fabricación de andamios son los biovidrios, los cuales tienen una composición basada en el sistema $\text{SiO}_2\text{-CaO-Na}_2\text{O-P}_2\text{O}_5$, que tienen la capacidad de unirse fuertemente con el tejido vivo sin generar daños al tejido huésped [6]. La unión al tejido vivo conlleva un intercambio iónico y reacciones químicas con los fluidos corporales que producen una capa de hidroxiapatita en la superficie con una composición similar a la del hueso permitiendo así el fortalecimiento del tejido.

Dentro de los biovidrios bioactivos, el Bioglass® 45S5 de composición en peso 45% SiO_2 , 24.5% Na_2O , 24.5% CaO , 6% P_2O_5 , es el más estudiado, con mayor índice de bioactividad y con la capacidad de unirse tanto a tejido suave como duro promoviendo la bioreparación y evitando la fractura del hueso [7].

Una de las dificultades encontradas en la fabricación de andamio 3D, es el método de fabricación y los tratamientos térmicos que el método conlleva. Existen diversos métodos que permiten la obtención de andamios porosos para la regeneración ósea. El método impresión 3D permite la obtención de andamios altamente porosos con propiedades similares al hueso trabecular. La desventaja es su elevado costo. El método de colada en gel permite la formación de un gel por medio de la polimerización de monómeros orgánicos [8]. El cuerpo en verde obtenido se somete a secado y sinterizado para obtener un cuerpo cerámico poroso. Este método produce combinaciones de macro y microporosidad, que favorecen el crecimiento celular y la vascularización. En resumen, el método seleccionado debe permitir fabricar andamios altamente porosos con propiedades

mecánicas similares a las del tejido óseo, además de promover la formación de la capa de hidroxiapatita para la fácil adhesión y proliferación de las células.

El propósito del presente trabajo fue fabricar andamios porosos y llevar a cabo el estudio de la microestructura previo y después a la formación de la capa de hidroxiapatita, así como la evaluación de la resistencia a la compresión y estudios biológicos con células pertenecientes al tejido óseo. La primera etapa consistió en la mezcla y fusión de los polvos 45%SiO₂, 24.5%Na₂O, 24.5%CaO, 6%P₂O₅, para la obtención del biovidrio 45S5. La segunda fue la fabricación de los andamios porosos. En el Capítulo II de revisión bibliográfica se presentan conceptos relevantes para el desarrollo del trabajo, como son las aplicaciones, fundamentos del tejido óseo, técnicas de fabricación y propiedades mecánicas. El Capítulo III detalla la metodología empleada en la fabricación de los andamios, caracterización y funcionalización. Finalmente, el Capítulo IV de resultados y discusión presenta el estudio de los andamios sinterizados a diferentes temperaturas, la evaluación de las propiedades mecánicas, la microestructura previo y posterior a la inmersión de solución SBF y los estudios biológicos con células MG63.

1.1. Objetivos

1.1.1. Objetivo general

Estudiar el efecto de las variables de procesamiento en la respuesta biológica de andamios de biovidrio 45S5 fabricados por el método de colada en gel inorgánica.

1.1.2. Objetivos particulares

- Fabricar andamios vitrocerámicos por medio de colada en gel inorgánica variando la cantidad y tipo de agente tensioactivo, temperatura y tiempo de sinterización, que conduzcan a estructuras, con características apropiadas de porosidad y resistencia a la compresión.
- Evaluar la resistencia a la compresión de los andamios y su analogía con las propiedades de resistencia del hueso trabecular humano.

- Evaluar in vitro la respuesta biológica de los andamios inmersos en fluido corporal simulado y cultivos celulares para determinar su bioactividad, biodegradabilidad, toxicidad, adhesión y proliferación celular.
- Caracterizar microestructuralmente los andamios previo y posterior a las pruebas in vitro por medio de difracción de rayos X (DRX), microscopía electrónica de barrido (MEB) y espectroscopía infrarroja (FT-IR).

1.2. Justificación

El tejido humano está sometido a cargas cíclicas diarias que lo hacen susceptible a lesiones y/o fracturas. El diseño y fabricación de andamios 3D que permitan reparar y generar el tejido dañado representa una necesidad y alternativa médica. La ingeniería de tejidos posibilita andamios 3D de biomateriales como el biovidrio 45S5, material vitrocerámico estudiado activamente por su excelente biocompatibilidad y fácil adhesión al tejido.

El método de colada en gel inorgánico conocido también como geopolímero permite la fabricación de andamios 3D por espumación directa proporcionada por agitación intensiva en activación alcalina y gelificación con ayuda de un agente tensioactivo, permitiendo mimetizar andamios con características de porosidad y resistencia como las del hueso trabecular, mientras que la formación de apatita superficial en fluidos corporal simulado es útil para estimar la capacidad ósea. Estos materiales de alta ingeniería, representan además de una posible solución a lesiones óseas, una propuesta de alto sentido social al otorgar la posibilidad de una mejor calidad de vida a los receptores de implantes.

1.3. Hipótesis

La implantación del método de colada en gel inorgánico, partiendo del biovidrio 45S5 y surfactante en solución alcalina, permitirá obtener por espumado, andamios 3D con porosidad interconectada, que bajo un proceso de sinterización controlada y manipulación sistemática de las relaciones y condiciones de los precursores, conducirá a estructuras con un balance entre las características microestructurales, mecánicas y bioactivas que permitirán la adhesión, diferenciación y proliferación de los osteoblastos en su aplicación como implante óseo trabecular.

1.4. Metas científicas

- Fabricación de andamios con porosidad interconectada igual o mayor a 80% para permitir la vascularización y el paso de las células y nutrientes.
- Formación de la capa de hidroxiapatita en al menos el 80% de la superficie del andamio después de la inmersión en SBF.

- Obtención de valores de resistencia a la compresión de los andamios en el rango de 2-12 MPa, el cual corresponde al del hueso trabecular o esponjoso.

CAPÍTULO II. MARCO TEÓRICO

2.1. El hueso

El hueso es un tejido vivo compuesto de minerales, proteínas, agua, células y otras macromoléculas. Forma la mayor parte del esqueleto, posee una estructura rígida mineralizada que se conecta entre sí por medio de ligamentos y con músculos a través de tendones, ambos permiten soportar los tejidos blandos y proteger los órganos [9, 10].

El tejido óseo contiene una fase mineral o fase inorgánica (69% hidroxiapatita, fosfato de calcio, carbonato de calcio y fosfato de magnesio) que le confiere el refuerzo estructural, rigidez, homeostasis mineral, y una fase orgánica (22% del cual el 90% es colágeno y el resto son compuestos celulares) que otorga flexibilidad, tenacidad, soporte de funciones celulares, y un 9% de agua [11-13].

El sistema óseo se clasifica por el nivel de madurez y estructura macroscópica (Figura 2.1) [14].

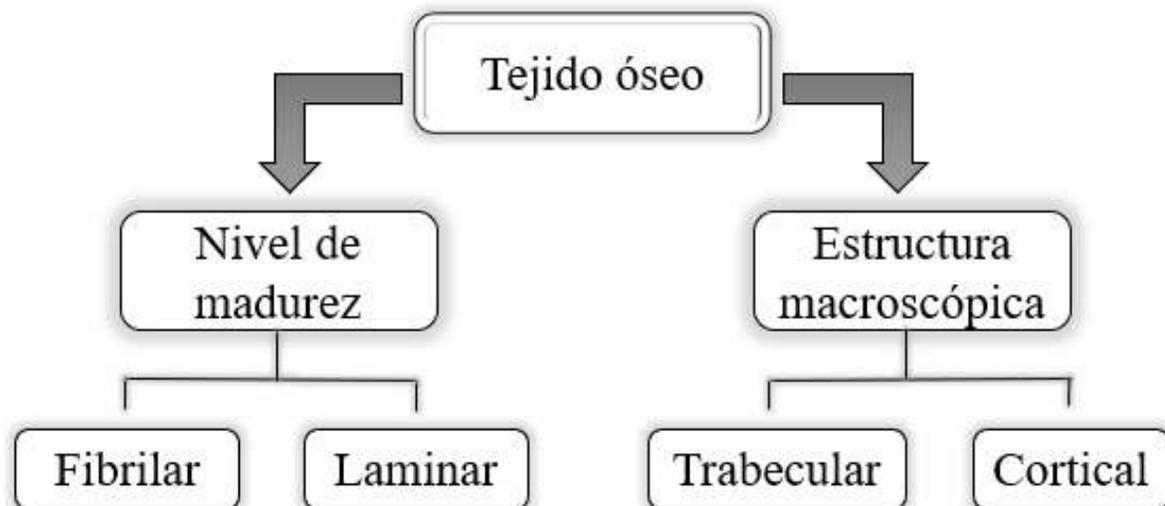


Figura 2.1. Clasificación del tejido óseo.

El grado de madurez puede ser: fibrilar o laminar. El hueso fibrilar, es considerado como hueso inmaduro, normalmente se encuentra en los embriones y recién nacidos. El hueso laminar, se forma un mes después del nacimiento por lo que es maduro, éste se encuentra a lo largo del esqueleto tanto en el hueso trabecular como en el cortical.

Dentro de la estructura macroscópica se encuentra el hueso trabecular o esponjoso que representa el 20% de la masa ósea, posee una porosidad interconectada entre 50 y 90% y se encuentra principalmente en la epífisis, es decir al extremo de los huesos largos, permite el intercambio de nutrientes y oxígeno entre la sangre y los osteocitos, y se encarga además de amortiguar y soportar la mayor parte del peso corporal. Mientras que el hueso cortical o compacto, que representa el 80% de la masa ósea, se encuentra en la parte superior de los huesos, en la parte central de los huesos largos (diáfisis) y en la región exterior e interior de los huesos planos, y es una capa externa la cual está encargada de proveer la estabilidad al sistema esquelético además de conferir al hueso rigidez y elasticidad (Figura 2.2) [14, 15].

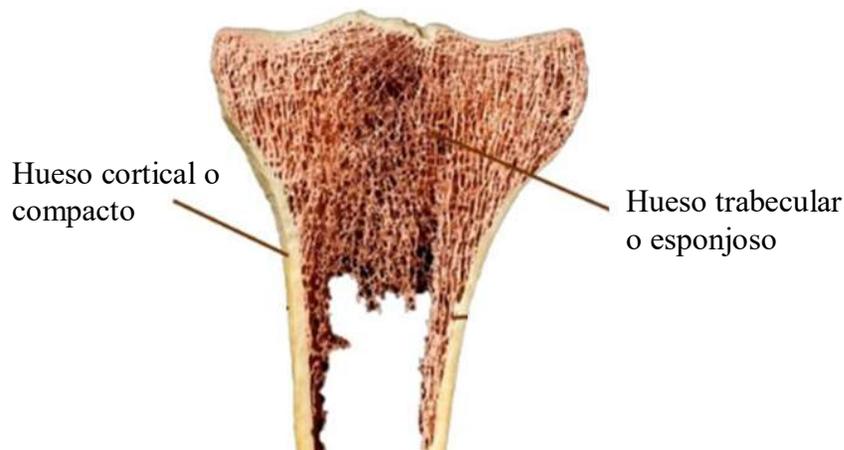


Figura 2.2. Representación esquemática del tejido óseo.

2.1.1. Fisiología del hueso

Las fases orgánicas e inorgánicas que conforman el hueso, juegan un rol importante en su funcionamiento. Sin embargo, su distribución y arreglo se encuentra en constante formación y reabsorción que permiten el reemplazo del hueso viejo por nuevo. Los componentes fundamentales del hueso, como todos los tejidos conectivos, son las células y la matriz. Aunque las células óseas componen una pequeña cantidad del volumen óseo, son cruciales para la función de los huesos. Se encuentran 4 tipos de células dentro del tejido óseo cada una con sus funciones [16, 17].

Tipos de células que forman el tejido óseo (Figura 2.3) [18].

Osteoclastos: son las células responsables de la resorción de (100 μm), multinucleadas, ricas en mitocondrias y vacuolas. Los osteoclastos contienen fosfatasa ácida resistente a tartrato (TRAP), que permite la desfosforilación de las proteínas, cuya actividad se utiliza para su identificación tanto in vivo como in vitro. Además, poseen receptores para calcitonina. Este tipo de célula se originan en las células madre hematopoyéticas de la médula ósea conocidas como "Unidades formadoras de colonias de macrófagos y granulocitos" precursores de macrófagos y monocitos. Tienen dos características especiales en la membrana: un borde con volantes, donde tiene lugar la reabsorción, y un área clara rica en microfilamentos, con integrinas que sirven de anclaje a la matriz. Con este fin, los osteoclastos se mueven hacia el área a reabsorber y luego se adhieren inmediatamente a la superficie mineralizada del hueso con el borde ondulado y sellando los bordes del área con las integrinas.

Células osteoprogenitoras (células madre): éstas se encuentran en la capa externa del periostio y en el endostio. Derivan del mesénquima embrionario y pueden dar origen por diferenciación a los osteoblastos. Son células en forma de huso con un núcleo oval, escaso citoplasma, con poco retículo endoplásmico rugoso (RER) y un aparato de Golgi pobremente desarrollado. Tiene abundantes ribosomas y se encuentran muy activadas durante el periodo de crecimiento óseo (Figura 2.3(c)).

Osteoblastos: son de tamaño grande (20-30 μm), en forma de poliedro. Se originan en las células madre mesenquimales de la médula ósea, el endosteum, el periostio y los pericitos perivasculares. Los osteoblastos y los osteocitos se comunican entre sí mediante proteínas que actúan como un enlace entre las células, permitiendo el paso del calcio, las citocinas y las prostaglandinas. Los osteoblastos sintetizan la matriz orgánica o el material osteoide y expresan una enzima característica, la fosfatasa alcalina (ALP), que permite la mineralización. Estas células se caracterizan por ser células polarizadas, es decir, su núcleo se encuentra en el extremo de la célula. Se localizan particularmente en el periostio, una membrana que envuelve la parte externa de los huesos medianos y grandes (excepto zonas particulares) y en membrana endosteal, la cual se desarrolla sobre la pared interna del canal medular (Figura 2.4) [19].

Osteocito: son células derivadas de los osteoblastos que quedan atrapados dentro de hueso después de la mineralización. Este tipo de células se encuentran en el interior de hueso, además, son las células más abundantes (10 veces más que los osteoblastos). Son de forma estrellada y se encuentran en los espacios (lagunas) rodeados de tejido óseo.

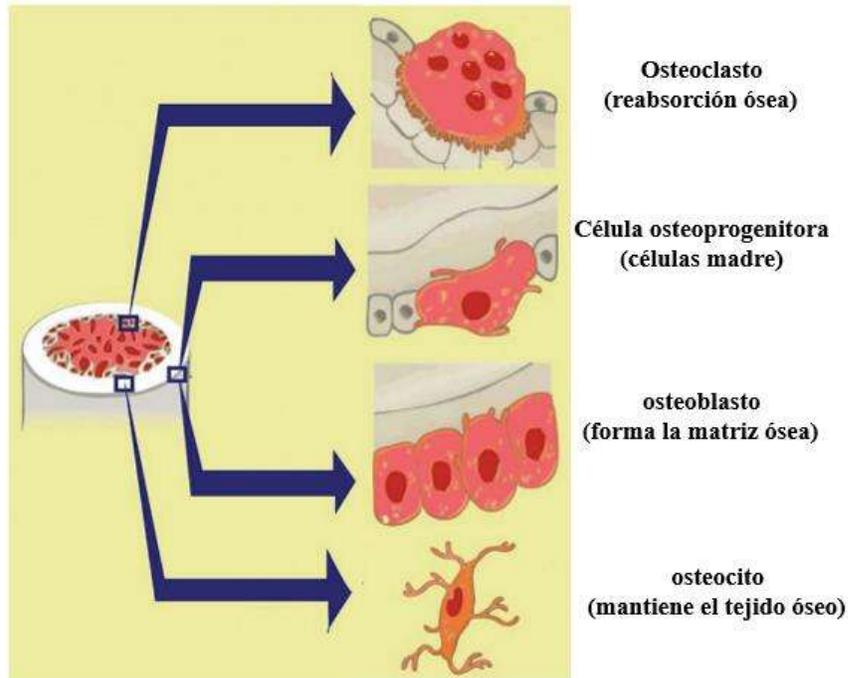


Figura 2.3. Tipos de células que componen al tejido óseo [20].

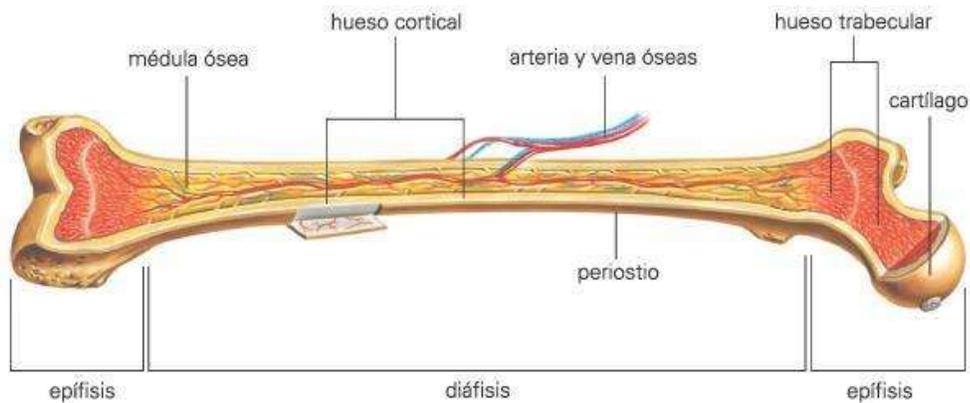


Figura 2.4. Partes del tejido óseo [21].

2.1.2. Propiedades mecánicas del hueso

El hueso se puede considerar tanto como tejido o como una estructura, ya que desempeña dos funciones básicas: control del metabolismo de Ca, P y Mg (función biológica) y soporte del organismo como protección de los órganos (función mecánica) [20].

Por tanto, las propiedades mecánicas dependen entonces de factores tales como la distribución mineral, el arreglo estructural, la variación entre los individuos (edad, sexo o padecimiento). Es por ello que las propiedades varían punto a punto, así como las diversas sustancias de acuerdo a las diferentes partes del esqueleto [3, 21].

El sistema esquelético está diseñado para soportar diferentes tipos de carga debido a las actividades del individuo ya sea compresiva, a la tracción e inclusive de cizalladura. Así mismo, la resistencia mecánica depende también de si el hueso es cargado a flexión, compresión o tracción. El hueso se distingue en dos tipos, cortical y trabecular, con capas densas y con un interior poroso y esponjoso. Estos dos tipos de arreglos no difieren en su composición, pero presentan sensibles variaciones en la morfología y comportamiento. Las diferencias estructurales se explican a través de su función mecánica. El hueso cortical soporta las cargas de flexión y torsión, mientras que el hueso esponjoso absorbe los efectos de cargas repetitivas [22, 23]. En la Tabla 2.1 se presentan los valores de las propiedades mecánicas del hueso cortical y trabecular de acuerdo a las diferentes cargas mecánicas.

Tabla 2.1. Resumen de las propiedades mecánicas del hueso humano [7].

	Resistencia a la compresión (MPa)	Resistencia a la flexión (MPa)	Resistencia a la tracción (MPa)	Módulo elástico (GPa)	Tenacidad a la fractura (MPa·m ^{1/2})	Porosidad (%)
Hueso cortical	100-150	135-193	50-151	10-20	2-12	5-10
Hueso trabecular	2-12	10-20	1-5	0.1-5	0.1-0.8	50-90

2.2 Mecanismo biológico de regeneración ósea

El proceso de regeneración permite el mantenimiento del volumen óseo, la reparación del daño tisular y la homeostasis del metabolismo fosfocálcico. Se permite la remodelación de un 5% del

hueso cortical y un 20% del hueso trabecular. A nivel microscópico, la remodelación ósea se produce en pequeñas áreas de la parte cortical o superficie trabecular. La reabsorción siempre procede a la formación de un esqueleto joven, la vida media de una remodelación es de 2 a 8 meses, que incluye diferentes fases [9, 16].

2.2.1 Fases de remodelado

- *Fase quiescente*: se dice que el hueso se encuentra en condiciones de reposo. Los factores que inician el proceso de remodelación aún no son conocidos (Figura 2.5(a) y (f)).
- *Fase de activación*: primer fenómeno que da lugar a la activación ósea previo a la reabsorción, en esta fase comienza el proceso de remodelación determinado por microfracturas inactivas por los osteocitos, o por estímulo hormonal u otros factores, además, el reclutamiento de preostoclastos, los cuales proliferan, se diferencian y se fusionan para formar las grandes células multinucleadas que constituyen los osteoclastos maduros (Figura 2.5 (b)).
- *Fase de reabsorción*: en esta fase los osteoclastos comienzan a disolver la matriz mineral y a descomponer la matriz osteoide. Este proceso es acabado por los macrófagos y permite la liberación de los factores de crecimiento contenidos en la matriz, fundamentalmente TGF- β (factor transformante del crecimiento β), PDGF (factor de crecimiento derivado de las plaquetas), IGF-I y II (factor análogo a la insulina I y II). (Figura 2.5(c)).
- *Fase de formación*: aquí se produce el fenómeno de agrupamiento de preosteoblastos atraídos por los factores de crecimiento que se liberaron de la matriz que actúan como quimiotácticos y además estimulan su proliferación (Figura 2.5 (d)).
- *Fase de mineralización*: a los 30 días del depósito de osteoide comienza la mineralización, que finalizará a los 130 días en el hueso cortical y a 90 días en el trabecular (Figura 2.5 (e)).

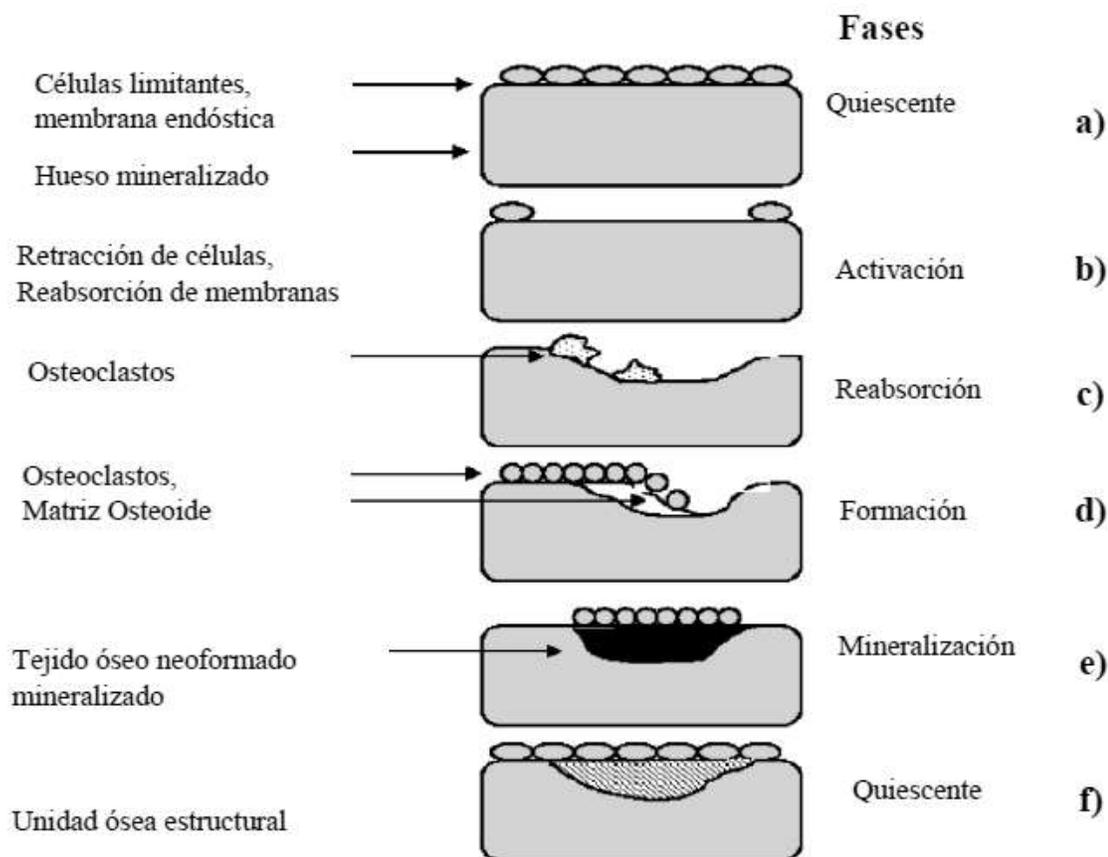


Figura 2.5. Fases de remodelación ósea [24].

2.3. Técnicas de regeneración y reparación ósea

El daño total o parcial de tejido y la pérdida de la función de un órgano se encuentran entre los problemas más graves y costosos de la salud humana. Por lo tanto, se han desarrollado materiales de diferente naturaleza como: polímeros biodegradables como el ácido poliláctico (PLA), el ácido poliglicólico (PGA) y la policaprolactona (PCL); cerámicos a bases de $\text{Al}_2\text{O}_3\text{-CaO}$, $\text{TiO}_2\text{-CaO}$ y $\text{ZrO}_2\text{-CaO}$ los cuales exhiben una buena biocompatibilidad; metales, los aceros inoxidable, las aleaciones cromo-cobalto y el titanio y su aleación más utilizada, el Ti-6Al-4V; y los materiales compuestos de matriz polimérica con refuerzo cerámico (PLA-fosfato tricalcico TCP), para la reconstrucción de órganos y tejidos con la finalidad de reparar los daños causados a los huesos [25-28]. Materiales para soporte de carga y otras tendencias han sido estudiados los andamios 3D de Bioglass® 45S5, CEL2 y el fosfato tricalcico $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, los cuales son materiales prometedores

para la reparación de tejido óseo con la intención de superar problemas de desgaste, enfermedades a causa de la edad o alguna lesión.

El objetivo de la regeneración por diferentes técnicas de restauración de defectos óseos y fracturas, es para obtener una máxima funcionalidad del hueso fracturado y/o lesionado.

Existen tres tipos de técnicas para la regeneración ósea, los cuales dependen del origen ya sea animal, humano o materiales sintéticos (polímeros y cerámicos, principalmente) denominados injertos, o en forma de estructuras tridimensionales para ingeniería de tejidos [1].

2.3.1. Autoinjertos (autólogo)

Compuestos por tejido tomado del mismo individuo, y proporcionan mejores resultados, ya que son los únicos que cumplen con los 3 mecanismos de regeneración ósea (osteogénesis, osteoinducción y osteoconducción), además evitan la transmisión de enfermedades y el rechazo inmunológico.

2.3.2. Aloinjertos (homólogos)

Se componen de tejido tomado de un individuo de la misma especie, no relacionado genéticamente con el receptor; cuentan con capacidad osteoinductiva y osteoconductor. Se comportan como una estructura que permite la neoformación ósea a partir del remplazo gradual que sufre el injerto por el hueso del huésped, haciendo este proceso lento y con considerable pérdida de volumen. Existen 3 tipos de aloinjertos óseos: congelados, desecados (liofilizados) y desmineralizados.

2.3.3. Xenoinjertos (heterólogos)

Se componen de tejido tomado de un donador de otra especie, además clínicamente no son aceptables debido a su gran antigenicidad.

2.3.4 Materiales sintéticos

Por otro lado, los defectos debido a las fracturas óseas requieren de dispositivos de fijación elaborados a partir de materiales en forma de estructuras tridimensionales con propiedades mecánicas que les permitan soporte de carga elevadas para ingeniería de tejidos.

2.4. Ingeniería de tejidos

La ingeniería de tejidos o ingeniería tisular es un campo nuevo interdisciplinario de investigación que aplica los principios de ingeniería, apoyándose así en expertos de la medicina clínica y en las ciencias de la vida, e implica el uso de las tecnologías de la biología molecular y celular [5]. Aunque algunas técnicas de regeneración tisular guiada se basan en matrices y células solas, la mayoría de los investigadores en ingeniería de tejidos usan células combinadas con matrices para lograr la formación de nuevos tejidos. Lo cual se logra gracias a la elaboración de pruebas biológicas *in vitro* de células que forman parte del tejido de interés, y de materiales compuestos de matriz, ya sea cerámica o metálica, para posteriormente ayudar a la reparación o producir la sustitución y llevar a cabo la regeneración o mejorar la función de los tejidos vivos (Figura 2.6) [29]. Es por ello que la ingeniería de tejidos ha surgido como un enfoque prometedor para la reparación y regeneración de tejidos y órganos dañados o perturbados como resultado de lesiones traumáticas, enfermedades o envejecimiento [12].

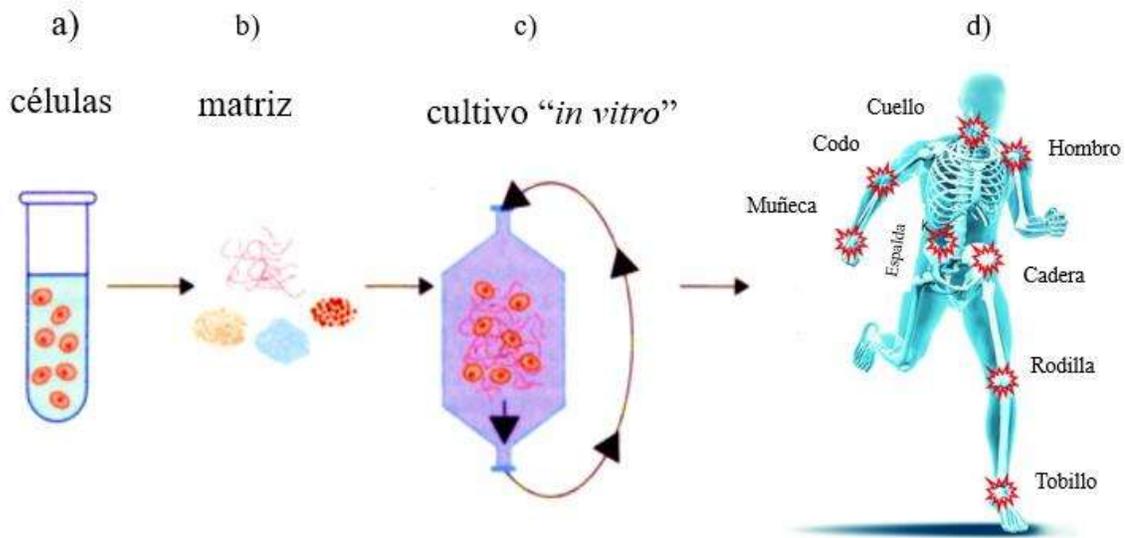


Figura.2.6. Esquema representativo utilizando la combinación de células con una matriz para la regeneración de tejido nuevo [3].

Es también un área de amplio desarrollo en aplicaciones biomédicas, al permitir cambios reproducibles y controlados. Proporcionan los medios tecnológicos para revelar los mecanismos fundamentales de la función celular en un entorno 3D y el potencial para mejorar la calidad de los

tejidos diseñados [30]. El campo se basa en gran medida del uso de andamios 3D porosos que proporcionan un entorno adecuado para la regeneración de tejidos y órganos nuevos.

2.5. Andamios 3D

Son matrices cerámicas porosas interconectadas que actúan como plantillas temporales para la adhesión y proliferación celular, al mismo tiempo proporcionan soporte mecánico hasta dar lugar a la formación de nuevo tejido en el área afectada [31]. Por tal efecto, los andamios deben ser fabricados con materiales que promuevan la regeneración sin provocar respuestas inmunes al tejido huésped [32]. Requieren además de una estructura porosa interconectada y con una amplia distribución del tamaño de poro (10-500 μm), ya que la porosidad proporciona espacio no sólo para que las células se infiltren en el andamio, sino también para la formación de la matriz extracelular (ECM) de alta permeabilidad. Por otro lado, permite la entrada de nutrientes y la evolución de los residuos metabólicos y la biodegradación de los subproductos [33]. Es importante tener en cuenta que el cambio de porosidad o permeabilidad del andamio puede tener un impacto significativo en las características de degradación del andamio.

Los andamios también pueden servir como portadores para células, factores de crecimiento debido a la química de superficie adoptada y otras señales biomoleculares [33]. El diseño del andamio requiere al menos del 90% porosidad con el fin de proporcionar un área superficial alta para el crecimiento de tejido, así como la reabsorción y las propiedades mecánicas (rigidez, resistencia a la compresión y resistencia a la fractura) [34]. Para mejorar y acelerar aún más la regeneración ósea, es esencial que el andamio cumpla con los requisitos biológicos tales como: biocompatibilidad, osteoconductividad y bioactividad, es decir, que tenga la capacidad de formar puntos de anclaje con el hueso circúndate y los tejidos blandos, estimulando el crecimiento óseo [35]. La regeneración de nuevo tejido puede ser guiada a través de la combinación de células, biomateriales (andamios 3D) y moléculas bioactivas por ello es representado mediante un esquema denominada triada en la Figura 2.7.

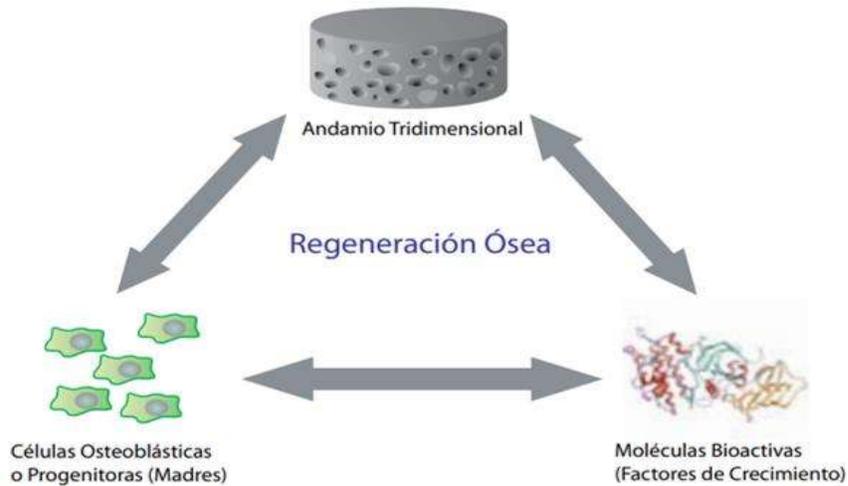


Figura 2.7. Representación de una matriz tridimensional (andamio), células progenitoras (madre) u osteoblastos y un componente molecular necesarios para la creación de implantes osteogénicos [35].

2.6. Propiedades mecánicas de los andamios

Las propiedades de los andamios dependen principalmente de la composición y la microestructura de los materiales. Lopes y col. [3] investigaron la microestructura y las propiedades mecánicas de materiales porosos de β -TCP reforzados con biovidrio 45S5 (5% y 7.5% en peso) fabricados mediante fundición en gel y variando la cantidad de surfactante (0.12 a 0.70% en peso). La Figura 2.8, muestra las imágenes por MEB de los andamios de β -TCP con y sin adición de biovidrio donde se observa una microestructura homogénea en todas las muestras con presencia de poros esféricos interconectados y tamaño de poro en el rango de 200-500 μm . Por lo que la adición del agente surfactante permitió la obtención de andamios altamente porosos, pero con valores de resistencia a la compresión bajas (Tabla 2.2). La adición de biovidrio 45S5 permitió la mejora en las propiedades de resistencia a la compresión de alrededor del 200% en comparación de los andamios con β -TCP puro (Tabla 2.3).

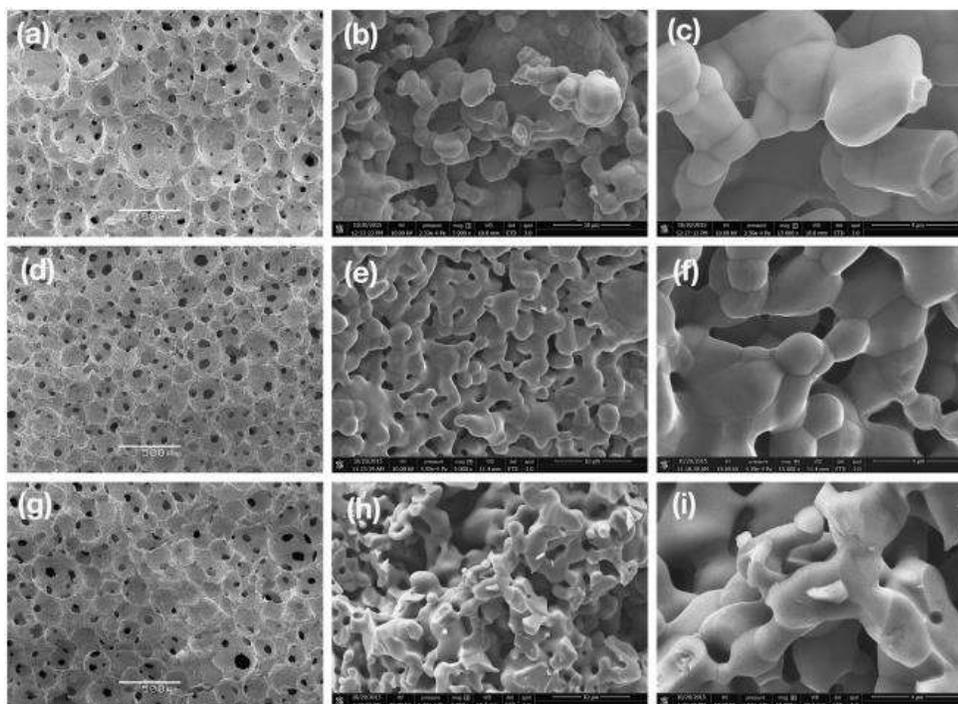


Figura 2.8. Micrografías MEB de andamios de TCP, (a)-(c) sin adición de biovidrio 45S5, con adición de biovidrio 45S5, (d)-(f) y (g)-(i) con 5 y 7% en peso, respectivamente [3].

Tabla 2.2. Valores de porosidad y resistencia a la compresión para andamios con β -TCP preparados con diferentes cantidades de agente surfactante [3].

Surfactante (% en peso)	Porosidad (%)	Resistencia a la compresión (MPa)
0.12	81.6 \pm 0.6	0.9 \pm 0.3
0.23	83.6 \pm 0.8	0.7 \pm 0.4
0.50	86 \pm 1	0.3 \pm 0.2
0.70	89 \pm 1	0.1 \pm 0.2

Tabla 2.3. Valores de porosidad y resistencia a la compresión para andamios β -TCP y β -TCP/x%-BG espumados con 0.23% de surfactante y sinterizados a 1200° C durante 2 h [3].

β -TCP/x%-BG	Porosidad (%)	Resistencia a la compresión (MPa)
0	83.6 \pm 0.8	0.7 \pm 0.4
5	84.1 \pm 0.6	1.5 \pm 0.6
7.5	83.4 \pm 0.4	1.4 \pm 0.2

Aguilar y col. [36] fabricaron andamios 3D a partir del vidrio bioactivo 45S5, mediante el método de tecnología de polvos. Los andamios resultantes fueron sinterizados a diferentes temperaturas (950, 975, 1000 y 1025 °C) presentando una porosidad de 64-79%, finalmente los andamios fueron sometidos a pruebas de resistencia a la compresión obteniendo valores de 1.7 - 5.5 MPa (Figura 2.9). El aumento de las propiedades mecánicas es debido al incremento de la temperatura que afecta la microestructura del andamio densificándolo y mejorando así la resistencia a la compresión (Figura 2.10).

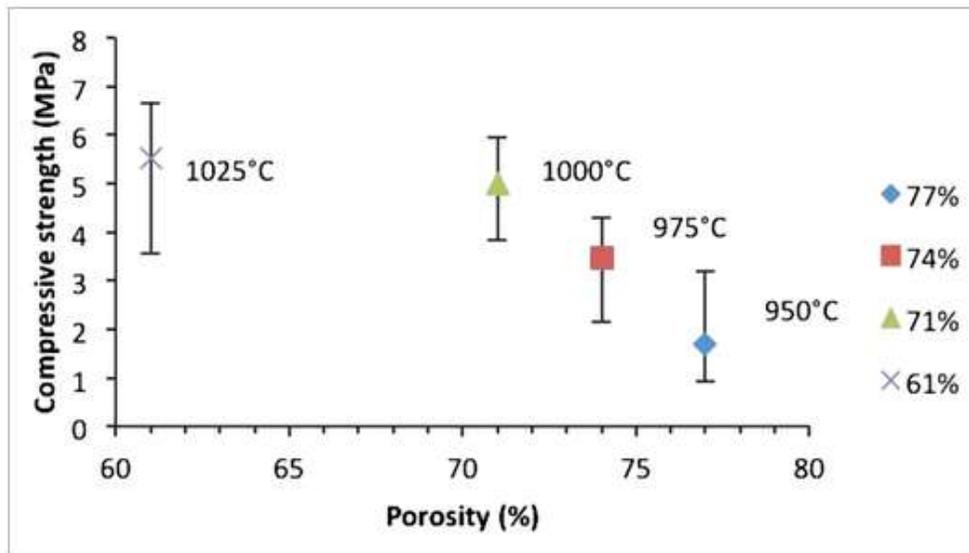


Figura 2.9. Comportamiento mecánico: porosidad para espumas de vidrio bioactivo 45S5 sinterizadas a varias temperaturas [36].

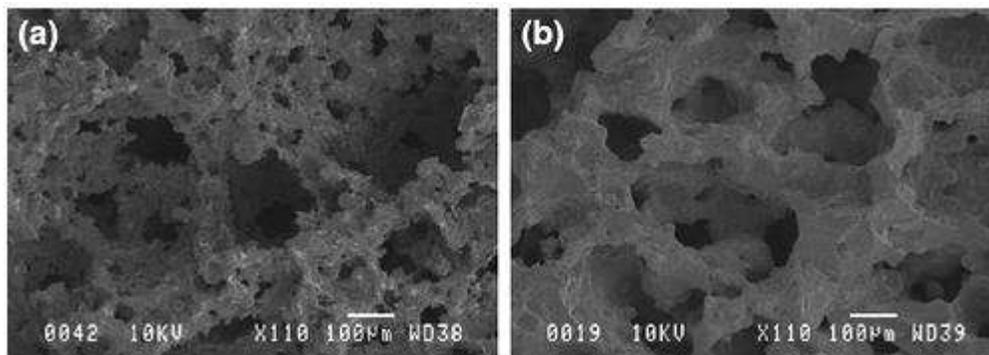


Figura 2.10. Micrografías por MEB que muestran la microestructura de las espumas de vidrio bioactivo 45S5 sinterizadas a (a) 950 °C y (b) 1025 °C en aire durante 1 h [36].

Gentil y col. [37] fabricaron andamios de quitosano/gelatina (POL) con diferentes cantidades de vidrio bioactivo CEL2. Los andamios fabricados fueron de CEL 2/POL (0/100, 40/60, 70/30 % en peso), mediante la técnica de liofilización. Los andamios de CEL 2/POL (0/100), presentaron una porosidad de 84%, con poros interconectados y con tamaños de poro de hasta 179.3 μm (Figura 2.11). La adición del biovidrio CEL 2 cambi3 notoriamente la porosidad total y el tama3o medio de los poros disminuy3 ligeramente porque las part3culas de biovidrio se depositaron en las paredes polim3ricas de los poros llenando parte del espacio vac3o de la matriz (Tabla 2.4). Por otro lado, con la adici3n del CEL se obtiene una resistencia a la compresi3n de 2.1 MPa, la Figura 2.12, muestra una curva de esfuerzo-deformaci3n de los andamios porosos mediante la prueba de compresi3n excesiva a una deformaci3n de 0-60%. Por lo que un andamio que posea una alta porosidad permitir3 el crecimiento y la proliferaci3n celular, pero sacrificar3 la resistencia mec3nica.

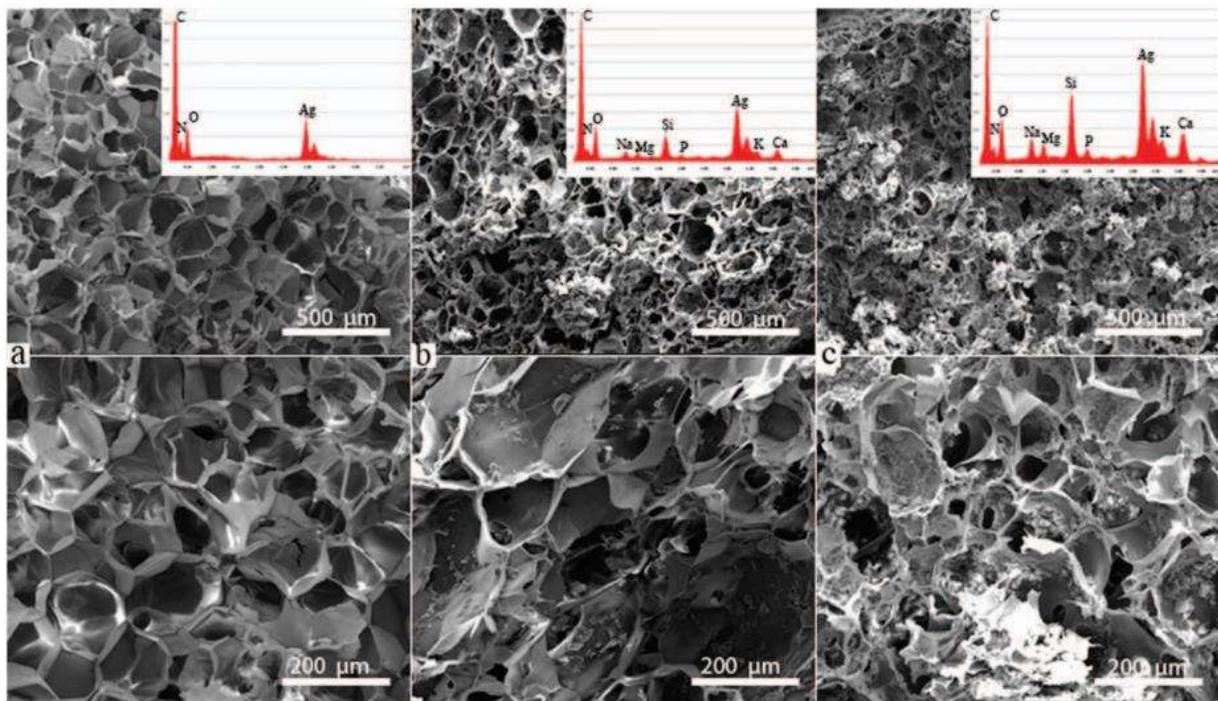


Figura 2.11. Micrograf3as por MEB y espectros EDS de andamios CEL2/POL: secci3n fracturada de (a) CEL2/POL 0/100, (b) CEL2/POL 40/60, (c) CEL2/POL 70/30 [37].

Tabla 2.4. Datos de poros de andamios CEL2 / POL obtenidos por μ CT [37].

CEL2/POL	Porosidad (%)	Interconectividad de poro (%)	Tamaño de poro (μ m)
0/100	84.8	97.5	179.3
40/60	72.5	96.0	160.6
70/30	67.1	95.6	136.2

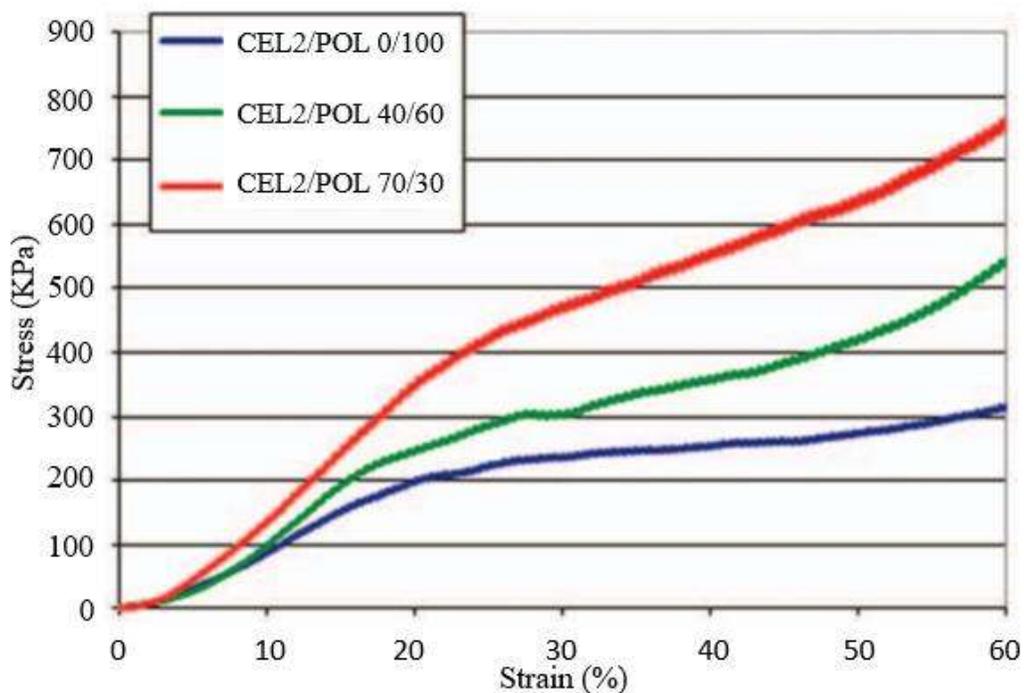


Figura 2.12. Curvas tensión-deformación de los andamios compuestos porosos comprimidos a una deformación de (0–60%) [37].

Otra de las condiciones importantes para la fabricación de andamios es la competencia mecánica, es decir, la capacidad de cubrir las demandas mecánicas del sitio lesionado durante el proceso de regeneración sin impedir la movilidad del paciente durante la formación y remodelación de tejido vivo. Lo que implica que las propiedades y mecanismos de degradación deben trabajar en equilibrio con la formación de tejido nuevo, esta propiedad depende principalmente de las propiedades del material, de la zona de regeneración y del paciente como tal [35].

El hueso es conocido como un compuesto (unión íntima de dos materiales cuyas propiedades superan las de cada material individual). Gran parte de los estudios se centran en la respuesta mecánica a la compresión de carga, especificando datos acerca de la resistencia a la compresión y en ocasiones, acerca del módulo elástico para una serie de tasas de deformación. Para poder entender las características mecánicas de los andamios es conveniente entender la fisiología del hueso, la cual se describe en el apartado 2.1.1.

2.7. Métodos de fabricación de andamios 3D para aplicaciones biomédicas

Existen diversos métodos para la fabricación de andamios tridimensionales, con el objetivo de obtener poros interconectados con un diámetro medio de 100 μm o más y una porosidad abierta mayor a 50%, los cuales se consideran requisitos mínimos para el flujo de los fluidos corporales y así estimular el crecimiento y la regeneración del tejido óseo.

2.7.1. Sol-gel

Implica la hidrólisis de los precursores de alcóxidos para crear un sol o líquido coloidal. El sol se puede considerar como una solución de especies de sílice que pueden sufrir policondensación para formar una red de sílice, el polvo obtenido a partir de sol-gel tiene un área superficial específica típicamente de 200 m^2/g . Es un proceso que implica típicamente la formación de una espuma sólida mediante la agitación vigorosa y la adición de un agente tensioactivo, seguido por reacciones de condensación y de gelificación; el gel se somete a continuación a los procesos de envejecimiento para fortalecerlo, el secado para eliminar el subproducto líquido y, posteriormente, la sinterización para formar los poros tridimensionales [38].

Los andamios fabricados por este método poseen una arquitectura de poros jerárquica, que consiste en macroporos interconectados de 10-500 μm como resultado del proceso de espumación y mesoporos de 2-50 nm que son inherentes en el proceso sol-gel.

Jones y col. [39] fabricaron andamios 3D a base del biovidrio 70S30C (70% SiO_2 , 30% CaO) mediante el método sol-gel, como agente tensioactivo utilizaron Teepol[®], los andamios resultantes fueron tratados térmicamente a diferentes temperaturas. La temperatura de envejecimiento, secado y sinterización fueron de 60 $^\circ\text{C}/72$ h, 130 $^\circ\text{C}/120$ h y 600 $^\circ\text{C}$, respectivamente. El método permitió

la obtención de andamios con porosidad de 60-95% y con tamaños de poro de 10-600 μm . La cantidad de agente surfactante (5% vol) y la baja temperatura de sinterización permitió la obtención de andamios altamente porosos (Figura 2.13).

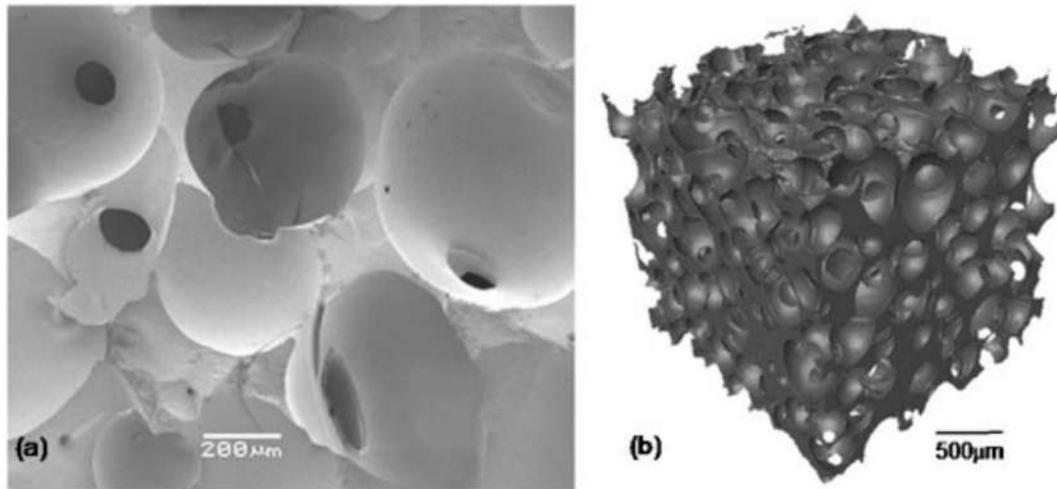


Figura 2.13. (a) Micrografía por MEB, y (b) imagen por microtomografía (μCT) [39].

2.7.2. Metalurgia de polvos

Mediante esta técnica de fabricación, los poros pueden originarse a partir de la disposición de compactación de las partículas o de cambios en esta disposición, cuando la descomposición de las partículas espaciadoras causa un aumento de la porosidad y de la difusión en estado sólido en la etapa de sinterización. En algunos estudios, un porógeno (NaCl, almidón o polímero orgánico, p-tolueno sulfonilhidrazida) es mezclado con las partículas de vidrio bioactivo o cerámico como una fase fugitiva para aumentar el tamaño de los poros y la porosidad del andamio. El porógeno se elimina por lixiviación o descomposición térmica después de formar el andamio, pero antes de la sinterización [40, 41].

Aguilar y col. [42] fabricaron andamios a base del vidrio bioactivo 45S5 mediante el método de tecnología de polvos. La fabricación de los andamios consistió en la mezcla del vidrio bioactivo, un aglutinante polimérico sólido (Varcum 29217) y un agente espumante (p-toluenosulfonil hidrazida o TSH). Durante el proceso de espumación el aglutinante se fundió para formar una suspensión con las partículas de vidrio y el agente espumante. La descomposición del agente

espumante liberó gases (N_2 y CO_2) que permitieron la expansión de la estructura creando la porosidad interconectada, previo a la sinterización el aglutinante se eliminó mediante un tratamiento térmico a $500\text{ }^\circ\text{C}$ por 2 h. Finalmente, la sinterización a $975\text{ }^\circ\text{C}$ por 1 h, permitió una estructura con una porosidad de $61.44 \pm 3.13\%$, con poros abiertos de $25\text{--}600\text{ }\mu\text{m}$ e interconectados (Figura 2.14). La temperatura de sinterización fue suficiente para crear un andamio con propiedades similares a las del hueso trabecular, ya que si la temperatura de sinterización incrementa favorecerá en las propiedades mecánicas, pero sacrificará la microestructura del andamio.

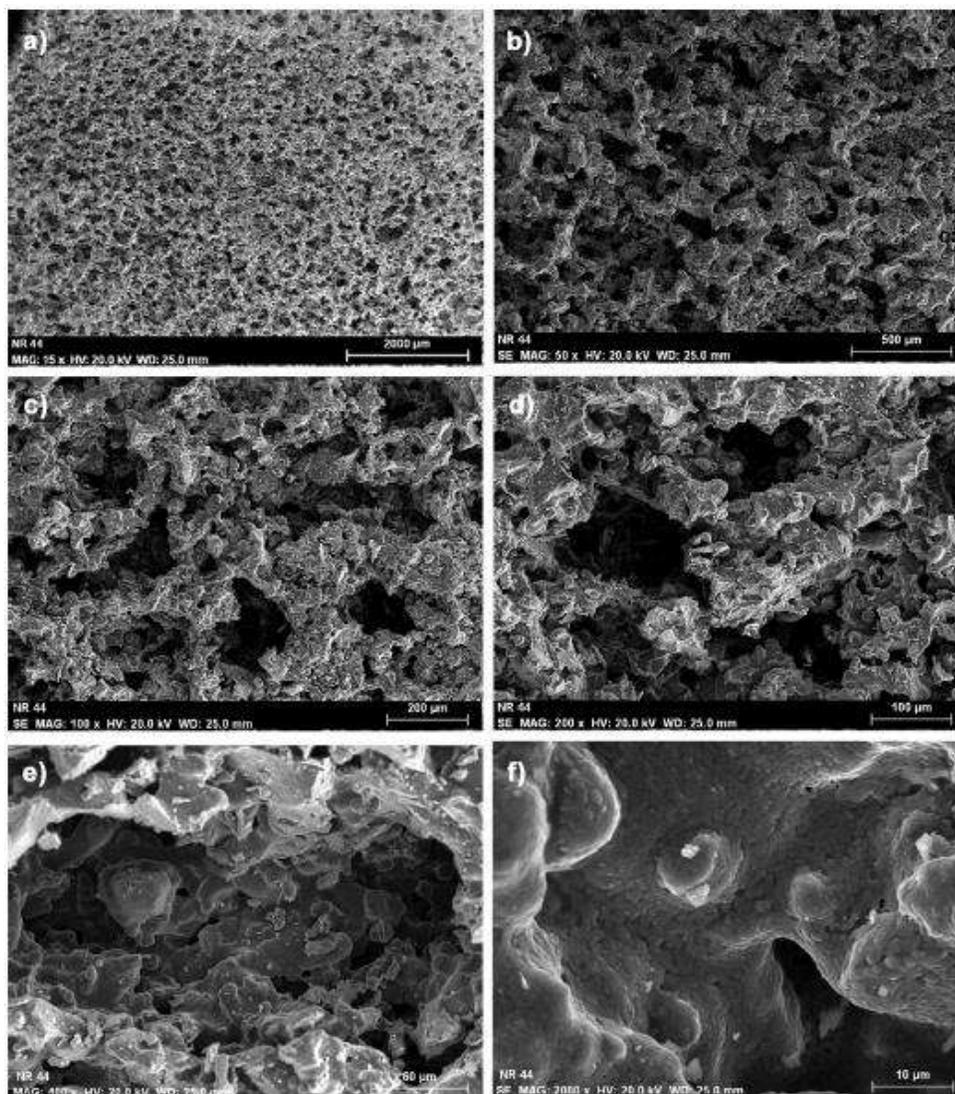


Figura 2.14. Microestructura por MEB de los andamios sinterizados a $975/1\text{ h}$: (a) 15x, (b) 50x, (c) 100x, (d) 200x, (e) 400x y (f) 2000x [42].

2.7.3. Réplica de espumas de polímeros

En este método, una esponja sintética (poliuretano) o natural (coral o madera) se impregna en una suspensión cerámica de viscosidad adecuada para obtener un recubrimiento uniforme [43]. Para maximizar la resistencia mecánica del andamio, se deben optimizar diferentes parámetros, como la carga sólida de la suspensión cerámica, el tipo y cantidad de aglutinante. De esta manera, después de retirar eliminar la esponja por sinterización, se obtendrá un andamio 3D sin defectos con suficiente resistencia mecánica [40]. La suspensión cerámica debe poseer una viscosidad adecuada para permitir el recubrimiento total sobre la esponja polimérica, por otro lado, la disminución o aumento del aglutinante incrementará o disminuirá el tamaño de poro así mismo la temperatura y tiempo de sinterización afectaran las propiedades mecánicas como resistencia a la compresión.

Después de secar la espuma en un tratamiento térmico a 100°C las zonas de vidrio se densifican por sinterización a 600-1000°C, dependiendo de la composición y tamaño de la partícula.

Chen y col. [44] fabricaron andamios 3D de Bioglass® 45S5, empleando el método de la réplica. El método consistió en sumergir una espuma de poliuretano en la mezcla cerámica (Bioglass® 45S5), la mezcla se infiltró en la estructura y las partículas del cerámico (biovidrio) se adhirieron a la superficie del polímero recubriéndolo totalmente. Los andamios obtenidos fueron secados lentamente a 400 °C por 1 h para eliminar el polímero y finalmente fueron sinterizados de 900-1000 °C de 0-5 h. El método permitió la obtención de andamios altamente porosos de 89-92% y con poros interconetados de 510-720 µm. (Figura 2.15). La alta porosidad obtenida es gracias a la utilización de la esponja polimérica que ya poseé una estructura altamente porosa por naturaleza.

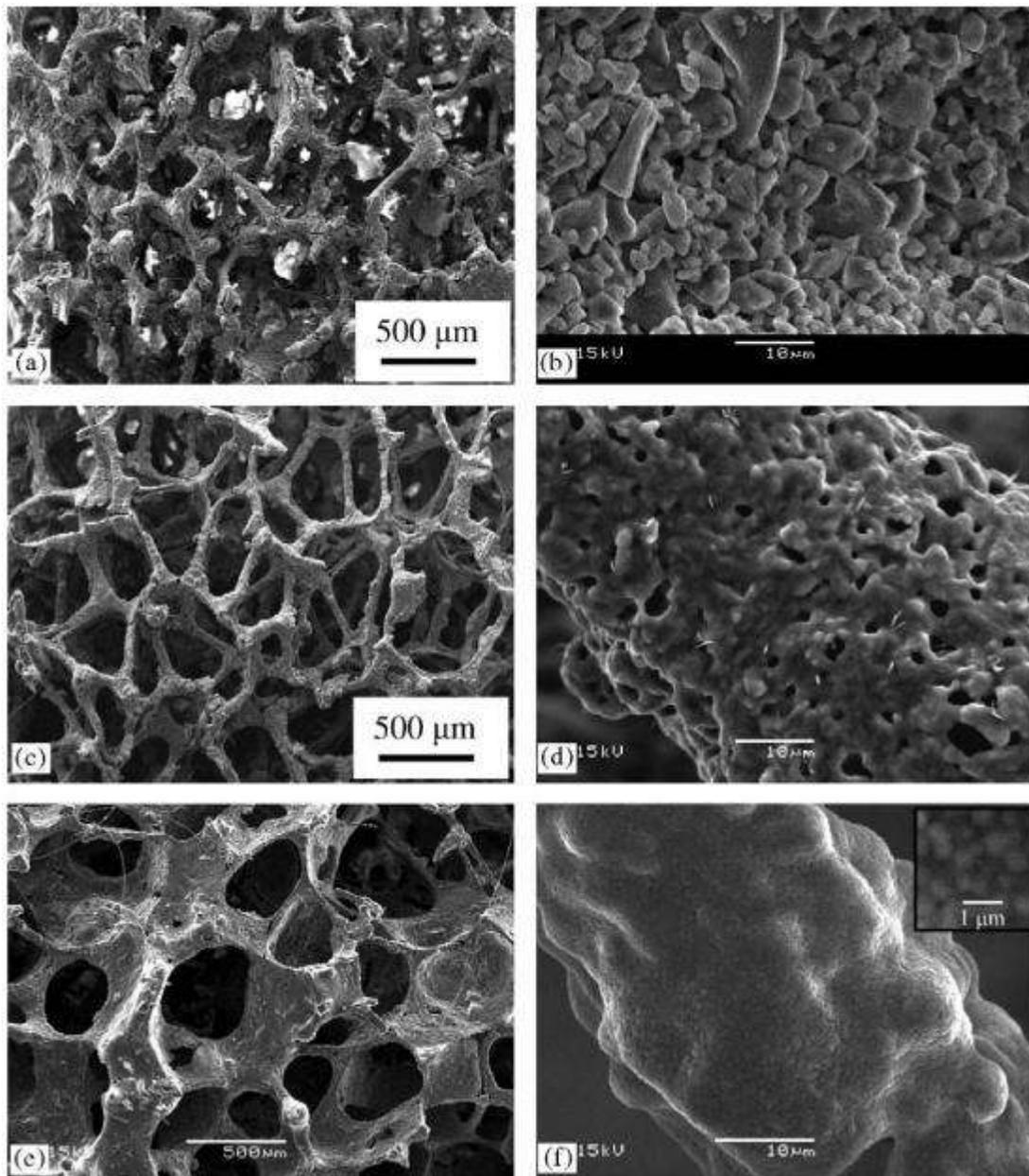


Figura 2.15. Micrografías por MEB de los andamios (a-b) 900 °C/5 h, (c-d) 950 °C/2 h, y (e-f) 1000 °C/1 h [44].

2.7.4. Impresión 3D

También conocida como creación rápida de prototipos, es un término para describir un grupo de técnicas que se pueden usar para fabricar objetos capa por capa a partir de un archivo de diseño asistido por computadora (CAD) sin la necesidad de moldes, matrices o herramientas especializadas. Recientemente, se han fabricado andamios por extrusión por congelación, sinterización selectiva por láser y robocasting [45]. En el método de robocasting, una pasta acuosa de polvo de vidrio bioactivo se extruye a través de una boquilla fina en forma filamentosa y se deposita sobre la capa mientras se mantiene el peso de la estructura impresa. La bioimpresión en 3D permite que la distribución de diferentes células se desarrolle de manera compleja, para producir la microarquitectura que se muestran tanto en tejidos como en los órganos.

Seitz y col. [46] fabricaron andamios 3D a base de polvo de hidroxiapatita. El proceso comienza con un conjunto de datos 3D en computadora para generar la matriz de impresión de cada capa. El mecanismo de recubrimiento lleva una cantidad de polvo cerámico a la caja de construcción, creando una capa delgada de polvo en la superficie de la caja. El aglutinante líquido mezclado con el polvo se imprime en capas utilizando una válvula de microdispensación. Cuando se completa la capa, el pistón de la caja de construcción se mueve hacia abajo por el grosor de una capa y se deposita una nueva capa de aglutinante con polvo en la primera. La primera capa de aglutinante con polvo circundante soporta la pieza durante el proceso de construcción. Una vez completada, la pieza se retira de la caja de construcción, se limpia con un soplador de aire y se seca al aire. La pieza resultante se sinteriza a 1250 °C por 2 h en un horno de cámara eléctrica (Carbolite, Ubstadt-Weiher, Alemania) en atmósfera de aire ambiental. El aglutinante orgánico se elimina durante la sinterización mediante pirólisis y el cuerpo verde obtiene sus propiedades mecánicas deseadas. La sinterización también suele provocar la contracción del cuerpo verde cerámico. El andamio resultante presentó una porosidad de 90% con resistencia a la compresión de 21.2 ± 2.2 MPa (Figura 2.16).

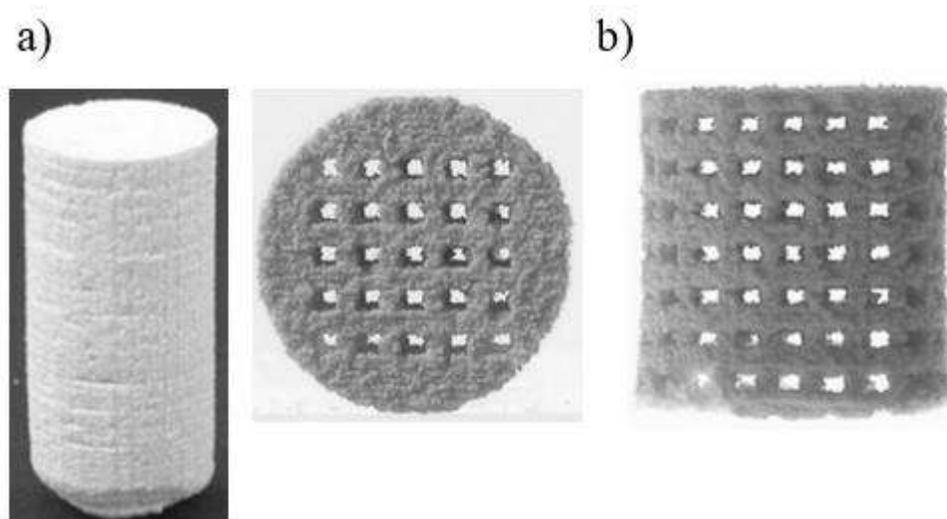


Figura 2.16. Imagen por MEB del andamio fabricado mediante impresión 3D; (a) muestra sinterizada con un diámetro de 11.5 mm, (b) vista superior (izquierda) y vista lateral (derecha). Las dimensiones de los canales oscilan entre $447\pm 37\ \mu\text{m}$ en la dirección z y $569\pm 33\ \mu\text{m}$ en la dirección x [46].

Wu y col. [47] fabricaron andamios de vidrio bioactivo mesoporoso MBG (Si/Ca/P, 80/15/15). El método consistió en inyectar la pasta de MBG en el dispositivo de impresión de andamios 3D basado en un sistema de posicionamiento de tres ejes de precisión. Para controlar la morfología del andamio, la estructura del poro, el tamaño del poro y la porosidad, se seleccionaron diferentes parámetros de trazado y tamaños de boquilla. Los andamios de MBG obtenidos se secaron a $40\ ^\circ\text{C}$ durante la noche, luego se calentaron a $150\ ^\circ\text{C}$ por 30 min obteniendo una microestructura de poros abiertos e interconectados (Figura 2.17). El método de fabricación permitió la obtención de andamios no tóxicos y con un procesamiento sencillo, además, con tamaños de poros controlados e interconectados.

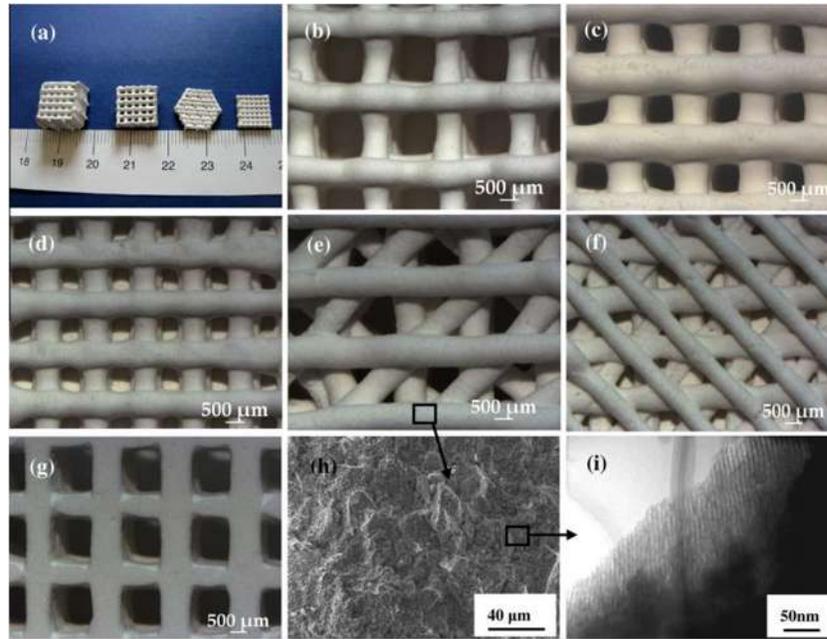


Figura 2.17. (a) Andamios MBG producidos por impresión 3D de diferentes tamaños, formas y morfologías. (b – d) andamios con poros de; (b) 1307 ± 40 , (c) 1001 ± 48 , (d) 624 ± 40 μm . (d – f) Andamios MBG con diferentes morfologías de poros. (g) Morfología de los poros del lado inferior de los andamios MBG. Los poros en el lado inferior permanecen abiertos. (h) Imagen MEB de la microestructura de las paredes de los poros. (i) Micrografías MET que demuestran la estructura bien organizada del canal mesoporoso de las paredes de los poros en los andamios [47].

2.7.5. Colada en gel inorgánica

Inicialmente este es un método que se utilizó y se sigue utilizando en la actualidad para la fabricación de piezas cerámicas macroporosas en la industria de la construcción. Son materiales a base de silicatos activados por medio de una solución alcalina, los cuales se producen a través de la reacción de un silicato de aluminio con un compuesto alcalino, es típicamente una solución acuosa concentrada de hidróxido o silicato alcalino. Este tipo de materias primas producen un gel “zeolita”, que consiste en una red tridimensional de aluminio-silicato, amorfa o cristalina. La red presenta el puente de los tetraedros de $[\text{SiO}_4]$ y $[\text{AlO}_4]$, este último formado por la presencia de iones alcalinos en los espacios circundantes, para la compensación de carga [48, 49].

Es un método de formación de un gel a partir de una combinación de cerámica tradicional y la química de polímeros. El proceso implica la formación de un gel por medio de la polimerización in situ de monómeros orgánicos o bien de agentes específicos como reticulantes y catalizadores [8].

Sepulveda y col. [50-52] a principios de la década de 2000, combinaron la ruta sol-gel con métodos de espumación para obtener andamios jerárquicos macro/nano-porosos: el sol se hizo espuma usando un tensoactivo y, en la gelificación, las burbujas esféricas formadas en el sol después de una agitación vigorosa se volvieron permanentes en el gel, lo que condujo a una espuma tridimensional como una estructura altamente porosa que imita la arquitectura del hueso esponjoso. La técnica de colada en gel fue adoptada para producir espumas porosas de hidroxiapatita (HA) mediante la introducción de una etapa de espumado en el proceso original antes de la gelificación. Posterior a la mezcla de la solución alcalina, agente espumante y biocerámico se obtiene un gel, el producto obtenido es colocado en un molde hasta alcanzar un cuerpo en verde con alta densidad y resistencia, capaz de completarse por métodos convencionales. Enseguida, el cuerpo en verde es sometido a un secado y posteriormente a un sinterizado para así obtener un cuerpo cerámico microporoso consolidado; se incluye también un esquema que muestra las etapas del sinterizado del cuerpo en verde y el desarrollo de la porosidad [48].

Elsayed y col. [48, 53] fabricaron dos tipos de andamios porosos de diferente composición química CEL 2 (carga de 58 y 60% peso) y wollastonita-dióxido (WD, cargas de 60 y 65% en peso) por el método de colada en gel inorgánica. El proceso consistió en mezclar los polvos finos con una solución acuosa (NaOH 1 M). La suspensión se mantuvo en agitación mecánica a 500 rpm por 3 h, se agregó el agente surfactante (Triton X-100) y se dejó agitando durante 5 min. La mezcla obtenida se vertió en moldes de poliestireno para ser secados a 40 °C por 24 h para posteriormente sinterizarlos a 900-1000 °C y 1 h, el tratamiento de sinterización comprendió una temperatura intermedia 300 °C por 2 h, para eliminar agua absorbida y los residuos orgánicos. Gracias a la agitación vigorosa que el método conlleva y la adición del surfactante permitió la obtención de andamios con porosidad de 60 y 80 % para los andamios de CEL 2 con resistencia a la compresión de 2.5-5 MPa, para los andamios de WD la porosidad fue de 80% con resistencia a la compresión de 5 MPa. (Figura 2.18 y 2.19). Los reactivos, sus cantidades relativas y los protocolos de procesamiento térmico fueron críticos para obtener un andamio exitoso.

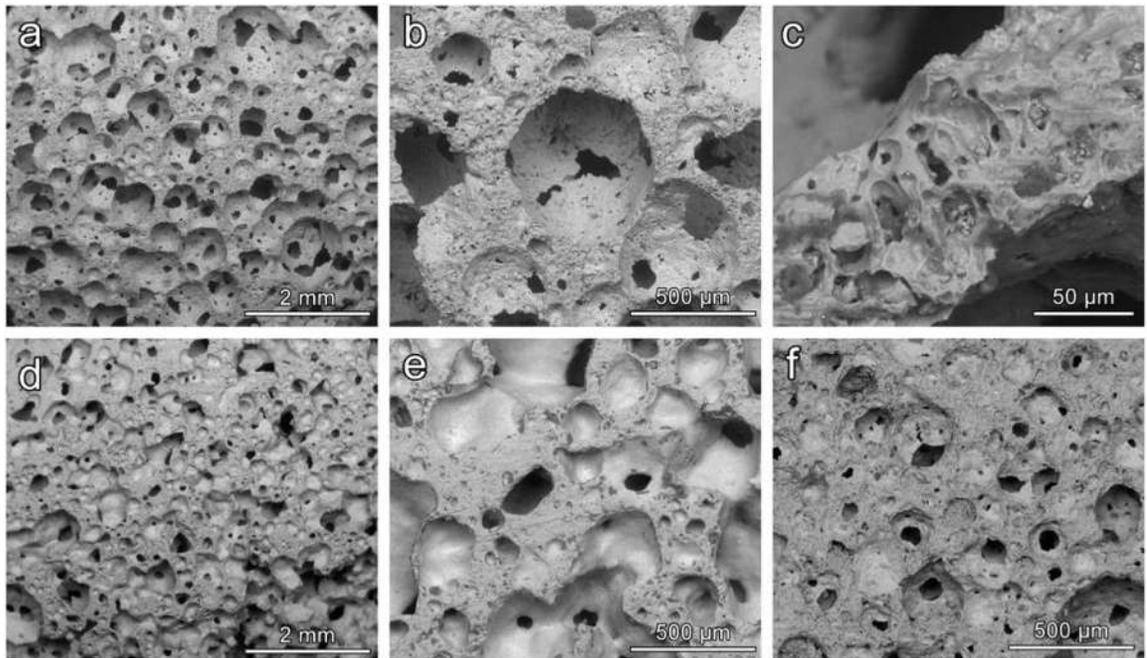


Figura 2.18. Imagen por MEB de los andamios con diferente carga de CEL 2; (a – c) espumas con 58% en peso de carga sólida a 900 °C, (d, e) con 60% en peso de carga a 900 °C y (f) con 60% de carga a 1000 °C [53].

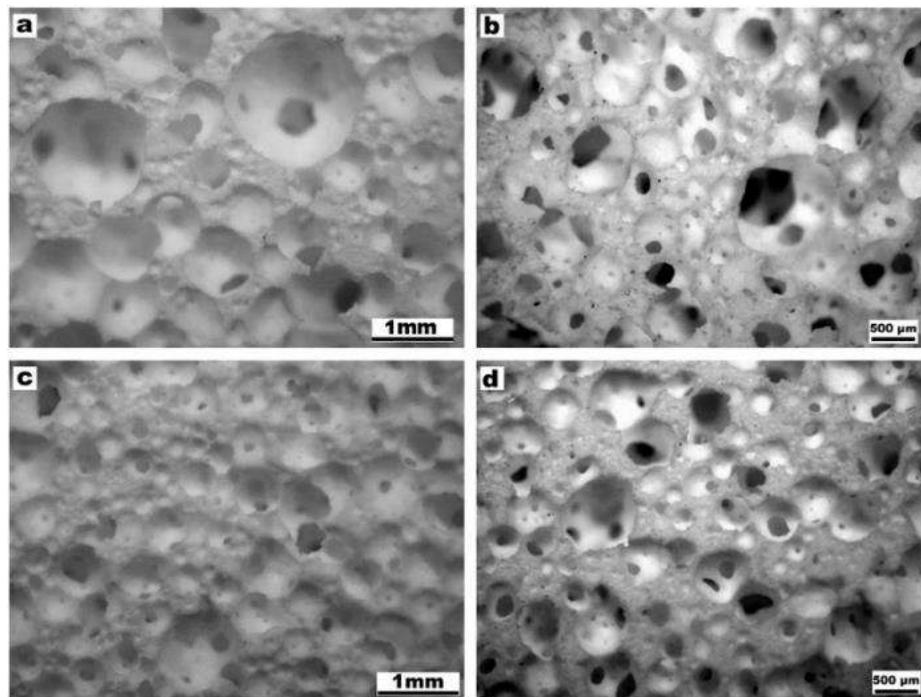


Figura 2.19. Imagen por MEB de los andamios con diferente contenido de WD antes y después de sinterizar a 1000 °C; (a, b) espumas con 60% en peso; (c, d) espumas con 65% en peso [48].

Este método se ha utilizado anteriormente para producir estructuras cerámicas o metálicas densas o porosas. Los andamios fabricados por el método sol-gel pueden degradarse demasiado rápido (2-3 semanas) lo cual no es conveniente para ciertas aplicaciones donde el hueso tardará mucho tiempo en regenerarse [54].

Los diversos métodos de fabricación antes mencionados, son alternativas para la fabricación de andamios utilizados en la regeneración de tejido óseo. Sus ventajas y desventajas se mencionan en la Tabla 2.5.

Tabla 2.5. Ventajas y desventajas de los métodos de fabricación de andamios 3D [7].

Método de fabricación	Ventajas	Desventajas
Sol-gel	Los andamios se degradan más fácilmente y se convierte rápidamente en HA.	Tienen una resistencia baja (0.3-2.3 MPa), por lo que son adecuados para sustituir sitios de baja carga.
Metalurgia de polvos	Facilidad de fabricación sin la necesidad de maquinaria compleja.	Pobre interconexión de poros con una carga de poros bajos.
Replicación de espumas de polímero	Fabricación de andamios con poros abiertos e interconectados en el rango 40-95%.	La resistencia del andamio es baja, menor a las del hueso trabecular. Por lo que su uso se limita para sitios de baja carga.
Impresión 3D	Muestran una resistencia a la compresión (136 MPa), comparable a la del hueso cortical.	Se requiere de andamios prediseñados en un software, para poder controlar y optimizar la respuesta mecánica deseada y guiar la formación del hueso.
Colada en gel inorgánica	Permite la obtención de andamios con porosidad interconectada.	No se puede controlar la porosidad

2.8. Vidrios bioactivos

Fueron desarrollados por primera vez por Hench y col. [55] en 1969, los cuales representan un grupo de materiales reactivos que pueden unirse al tejido óseo mineralizado. Estos biomateriales están basados en el sistema $\text{SiO}_2\text{-CaO-Na}_2\text{O-P}_2\text{O}_5$, donde la composición se diseña de tal manera que da lugar a una reactividad química determinada con el sistema fisiológico entre los tejidos y la superficie del implante. El diagrama ternario del sistema $\text{SiO}_2\text{-CaO-Na}_2\text{O}$ (6% en peso de P_2O_5 constante) se muestra en la Figura 2.20 con sus cuatro zonas características. La región de mayor interés del diagrama es la zona A, cuyas composiciones forman vidrios de superficie bioactiva que pueden unirse a tejidos duros y/o suaves dependiendo del índice de bioactividad. La zona B incluye los vidrios bioinertes. La zona C incluye las composiciones de los vidrios que son reabsorbibles dentro de 10-30 días en el tejido. Finalmente, en la zona D no existe la formación de vidrios. Por lo que sólo las composiciones de la zona A, los llamados biovidrios o vidrios bioactivos, son utilizados para la fabricación de andamios en implantes óseos. La función principal del vidrio bioactivo es unirse al tejido para producir una capa de hidroxiapatita en su superficie y fortalecer el tejido. Asimismo, estos biovidrios forman un enlace al hueso mucho más rápido. La estructura de los biovidrios está formada por óxidos y los iones oxígeno que lo constituyen tienen coordinación de tipo tetraédrico o triangular unidos entre sí por iones formadores Si, P, B, etc [55-58].

Los biovidrios fueron los primeros materiales diseñados para ser bioactivos y dieron lugar a varios productos comerciales; entre los biovidrios en base a silicatos se encuentran 45S5, 58S y S70C30 que comparados con 45B5S5 no contienen B_2O_3 , los biovidrios 58S y S70C30 no contienen Na_2O , la presencia de Si_2O y CaO es común en la composición de los diferentes biovidrios, pero en diferentes cantidades. (ver Tabla 2.6).

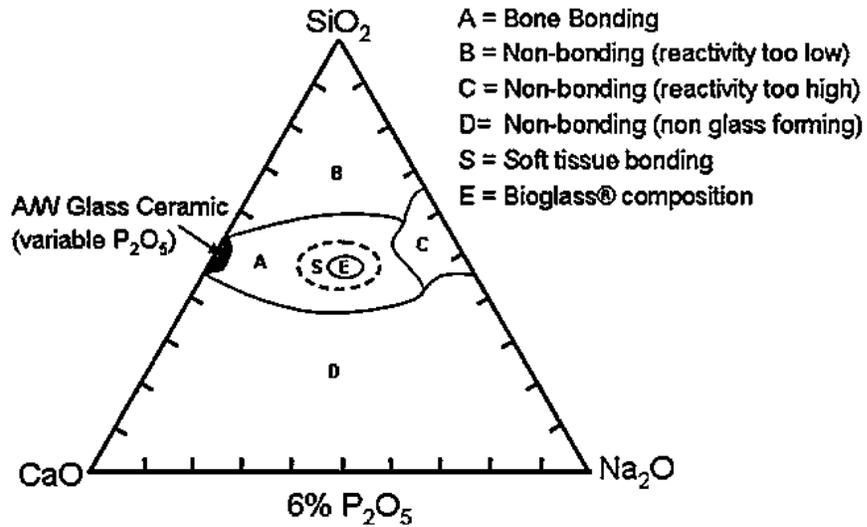


Figura 2.20. Diagrama ternario del sistema SiO₂-CaO-Na₂O con 6 % en peso de P₂O₅ [59].

Tabla 2.6. Vidrios bioactivos [32].

Óxidos (% peso)	Vidrios bioactivos			
	45S5	45B5S5	58S	S70C30
SiO₂	45.0	40.0	60.0	70.0
Na₂O	24.5	24.5		
CaO	24.5	24.5	36.0	30.0
P₂O₅	6.0	6.0	4.0	
B₂O₃		5.0		

2.8.1. Bioglass® 45S5 para regeneración de tejido óseo

Hench a finales de 1960 desarrolló el *Bioglass® 45S5* como el primer material artificial bioactivo, de composición química 45% SiO₂, 24.5% Na₂O, 24% CaO y 6% P₂O₅ en % en peso, similar a la de la hidroxiapatita, el componente mineral de hueso. El primer uso quirúrgico exitoso del Bioglass

45S5 fue el reemplazo de huesecillos en el oído medio, como tratamiento de la pérdida auditiva conductiva, o en el campo de la odontología como recubrimientos dentales [6].

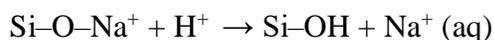
Varios estudios han demostrado que el biovidrio 45S5, se puede insertar al tejido óseo afectado a gran escala para ayudar a aumentar su bioreparación. Además, posee la habilidad de adherirse al hueso y evitar su fractura. Así mismo, una rápida unión con el hueso estimula el crecimiento, lejos de la interfaz hueso-implante, así como la diferenciación osteogénica de los osteoblastos primarios. El mecanismo para la unión se atribuye a una capa de hidroxiapatita carbonatada (HCA) en la superficie del vidrio, luego de la disolución inicial del vidrio. La hidroxiapatita carbonatada formada en la superficie es similar al mineral óseo que interactúa con las fibrillas de colágeno para integrarse con el hueso huésped [59, 60].

2.9. Mecanismos de reacción de vidrios bioactivos a base sílice (Bioglass 45S5)

Las características principales del mecanismo de formación de la capa de hidroxiapatita carbonatada (HCA) in vitro de vidrios bioactivos dependen de la tasa de degradación, la conversión hacia un material de tipo apatita, sus propiedades mecánicas, pero principalmente de la composición y arquitectura del andamio.

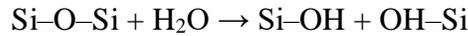
Normalmente la cinética de degradación del vidrio y su conversión a hidroxiapatita carbonatada (HCA) in vitro se evalúa mediante la inmersión de dicho vidrio en una solución acuosa de fosfato como el fluido corporal simulado (SBF) a 37°C y midiendo la pérdida de peso del vidrio en función del tiempo. Enuncia cinco etapas propuestas para la formación de HCA descrito por Hench [61, 62].

Etapas 1. El rápido intercambio catiónico de Na^+ y Ca^{2+} con H^+ de la solución, conduce a la hidrólisis de los grupos de la sílice y crea grupos silanol (Si-OH) en la superficie del vidrio:



El pH de la solución aumenta y se forma una región rica en sílice cerca de la superficie del vidrio. El fosfato también se pierde del vidrio si está presente en la composición.

Etapa 2. Un alto pH conduce al ataque de la red de vidrio de sílice por OH^- , rompiendo los enlaces Si-O-Si . La sílice soluble se pierde en forma de Si(OH)_4 en la solución, dejando más Si-OH (silanoles) en la interfaz vidrio-solución:



Etapa 3. Condensación de grupos Si-OH cerca de la superficie del vidrio: repolimerización de la capa rica en sílice.

Etapa 4. Disolución adicional del vidrio junto con la migración de iones Ca^{2+} y $(\text{PO}_4)^{3-}$ del vidrio a través de la capa rica en SiO_2 y de la solución, lleva a la formación de una capa rica en fosfato de calcio amorfo (ACP) en la superficie de la capa rica en sílice.

Etapa 5. Incorporación de hidroxilos y de carbonatos de la solución y cristalización del ACP como una capa de HCA.

Por otro lado, la Figura 2.21 muestra el mecanismo de integración de los vidrios bioactivos con el tejido circundante siguiendo las etapas descritas anteriormente, este ensayo es in vivo e involucra la presencia del biovidrio 45S5 sin reaccionar, la liberación de especies solubles de iones Na^+ que depende de la composición del vidrio, permitiendo la formación de la capa de hidroxiapatita, participación de las células formadoras de hueso recubierta con HA, y cristalización y maduración ósea conduce a la formación de nuevo hueso [63].

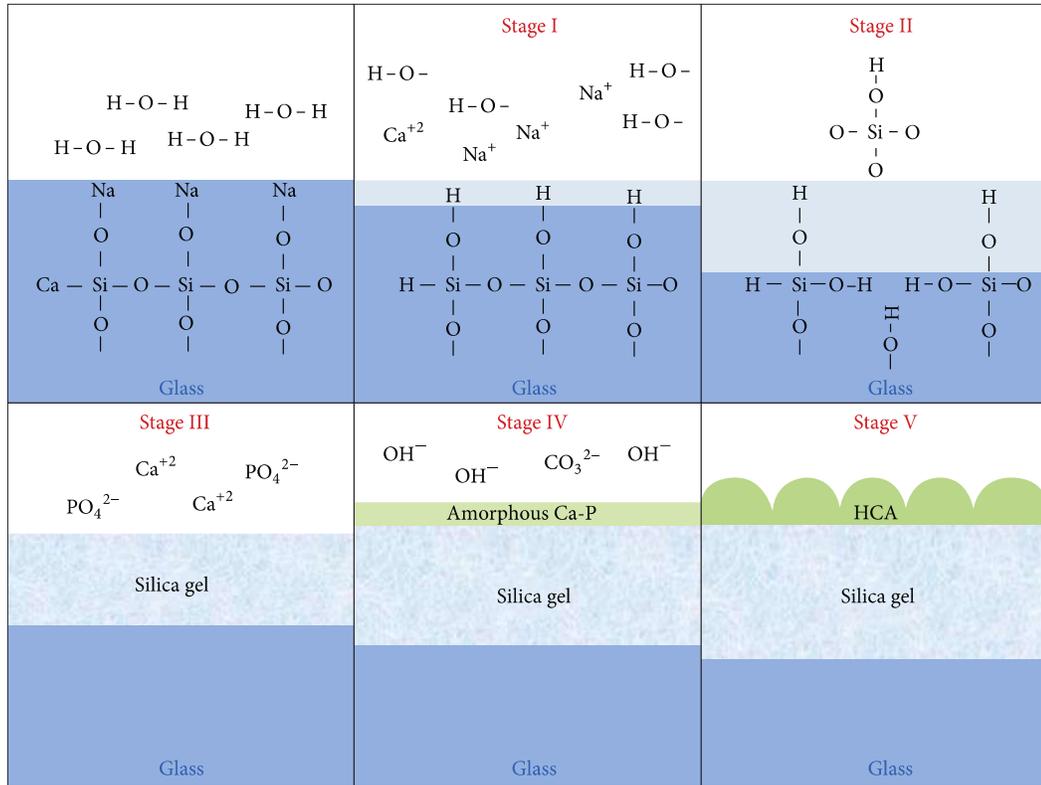


Figura 2.21. Mecanismo de integración del biovidrio sobre la superficie del tejido [64].

2.10 Andamios funcionalizados

Villicaña y col. [65] fabricaron andamios porosos vitrocerámicos CEL2 recubiertos con microesferas de quitosano para administración de fármacos. La fabricación de los andamios porosos fue por el método combinado de metalurgia de polvos y espumado de polímeros. Las microesferas de quitosano fueron cargadas con acetaminofén, y fabricadas por el método de emulsión y evaporación de solvente, y posteriormente se adhirieron a la superficie de los andamios mediante una técnica simple de recubrimiento por inmersión. Los resultados de la liberación acumulativa en la solución de PBS (Figura 2.22(b)) muestran una liberación de fármaco inicial de 75% debido al fármaco adherido a la superficie y al infiltrado a través de los poros en las microesferas y posteriormente sostenida hasta por 9 días.

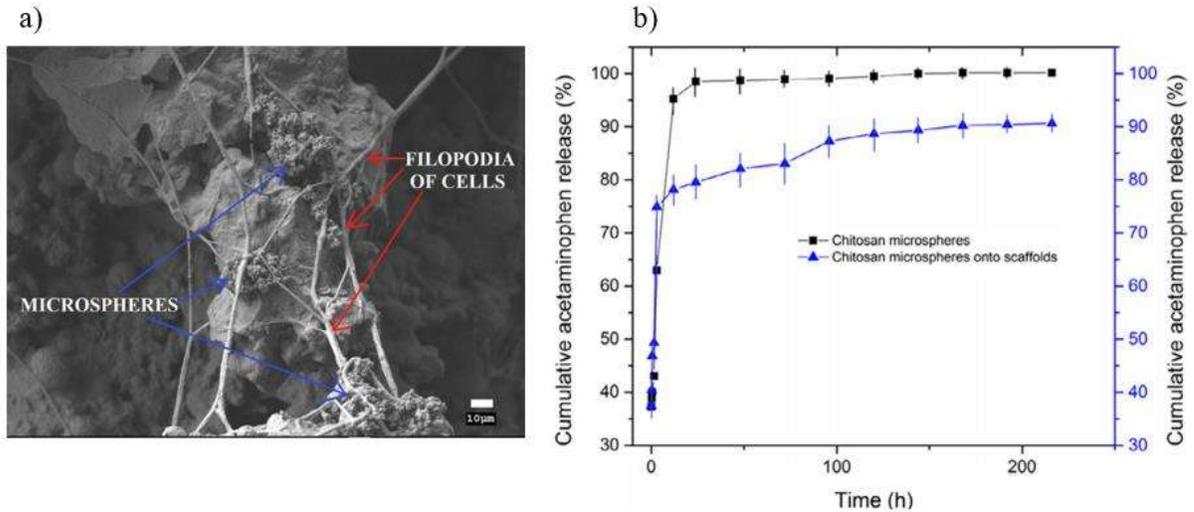


Figura 2.22. (a) Imágenes MEB de fibroblastos adheridos a la superficie del andamio CEL2 cargado con microesferas de quitosano después de 5 días en medio a 500x, (b) Liberación de acetaminofén de las microesferas de quitosano y andamios cargados de microesferas de quitosano [65].

Wu y col. [47] fabricaron andamios de vidrio bioactivo mesoporoso MBG (Si/Ca/P, 80/15/15) cargados de dexametasona (DEX) mediante impresión 3D. La dexametasona (DEX) se disolvió en etanol a una concentración de 0.5 mg/ml. Se añadieron 2 g de polvo de MBG a 24 mL de solución de DEX/ etanol, mediante agitación se evaporó el etanol. Los polvos MBG cargados con DEX se obtuvieron después de secar a 50 °C por 5 h. Luego, los polvos MBG cargados con DEX se usaron para preparar andamios MBG mediante impresión 3D. Los andamios MBG obtenidos cargados con DEX se volvieron a calentar a 50 °C por 24 h. Durante los primeros 2 días se observó la liberación repentina de DEX, para después pasar a una cinética más lenta hasta el día 10 (240 h) (Figura 2.23).

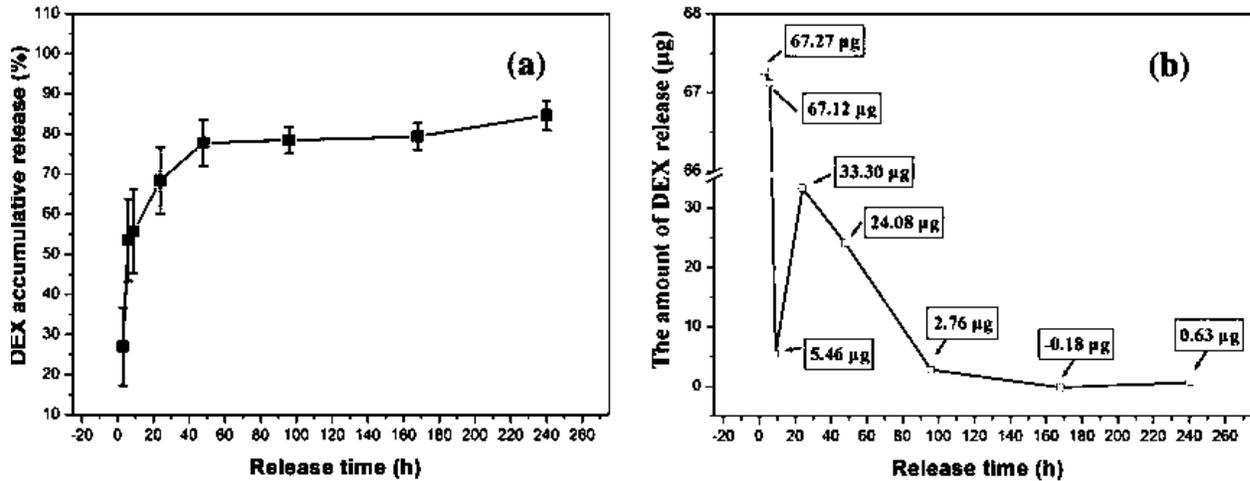


Figura 2.23. (a) Liberación acumulativa (%) de dexametasona (DEX) con el tiempo y (b) la cantidad de DEX liberada en cada punto de tiempo desde los andamios de MBG impresos en 3D [47].

2.10. Ensayos de Bioactividad

Kokubo en 1991 [66] propuso que el requisito principal para que un material artificial pueda crear un enlace directo con el tejido óseo, era la formación de una capa de apatita en su superficie similar al del hueso una vez implantado en el cuerpo vivo, y que la formación de apatita podía ser reproducida en fluido corporal simulado (SBF) con concentraciones de iones casi igual a los del plasma sanguíneo humano en una solución tampón TRIS (tri-hidroximetil-aminometano), una solución buffer biológica con un pH 7.4. Por lo que la bioactividad de un material puede ser prevista por medio de la formación de apatita una vez de sumergir el material en SBF. La bioactividad ósea in vitro de varios tipos de materiales ha sido evaluada por la formación de apatita después de la inmersión en SBF. En la Tabla 2.7, muestra los componentes y cantidades de la solución SBF.

Tabla 2.7. Reactivos y cantidades para preparar 1000 mL de SBF mM (= mmol/dm³) [67].

Orden	Reactivo	Cantidad (g)	Ion	Plasma sanguíneo humano (mM)	Fluido corporal simulado (SBF) (mM)
1	NaCl	8.035	Na ⁺	142	142
2	NaHCO ₃	0.355	K ⁺	5.0	5.0
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⁻	1.0	1.0
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

Wu y col. [54] fabricaron andamios 3D a base del vidrio bioactivo mesoporoso MBG (Si/Ca/P, 80/15/15) mediante el método de impresión 3D. Los andamios resultantes mediante dicho método fueron inmersos en SBF, utilizando el método de Kokubo y Takamada [67]. El tiempo de inmersión fue de 1 y 3 días por medio de MEB y IR corroboraron la formación de la capa de hidroxiapatita después de los 3 días de inmersión. El tiempo de inmersión (3 d) fue suficiente para permitir que el vidrio bioactivo MBG reaccione con el SBF, permitiendo la formación de la capa de hidroxiapatita el cual cubre en su totalidad el área del andamio. La morfología de la capa de hidroxiapatita es reconocida por su forma de una coliflor (Figura 2.24).

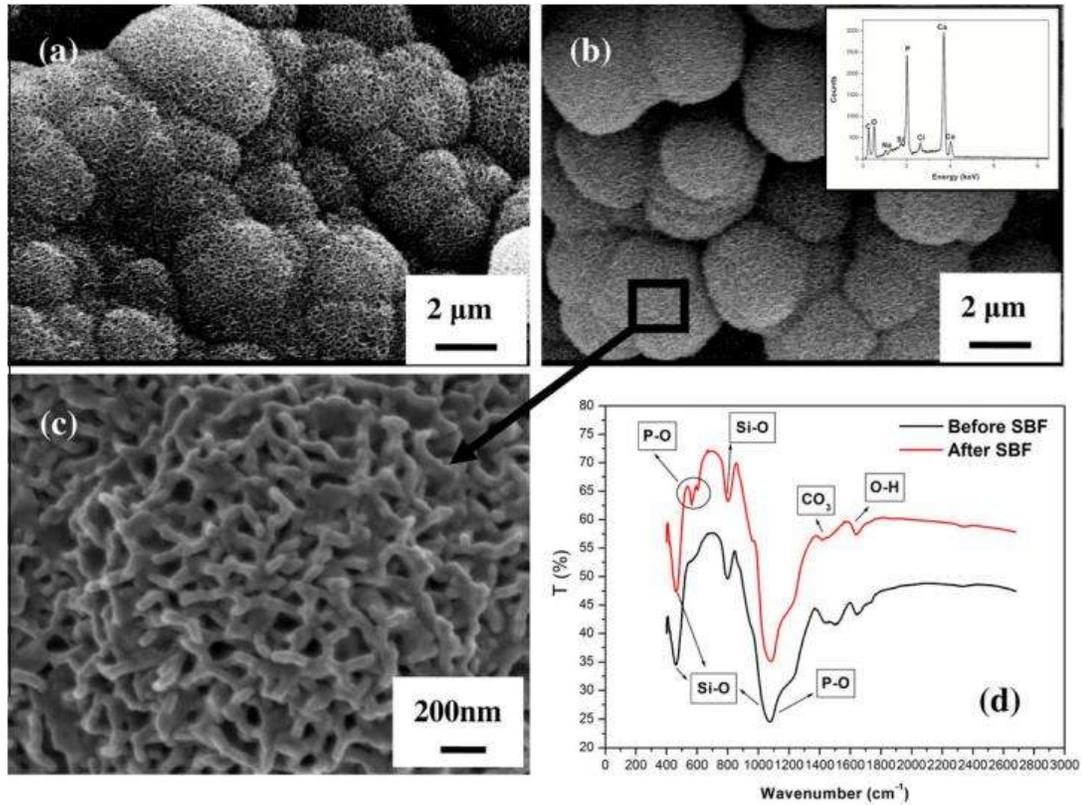


Figura 2.24. Imágenes por MEB de los andamios de MBG fabricados por impresión 3D inmersos en SBF por (a) 1 y (b, c) 3 días, (inserto en b) análisis EDS, y (d) los resultados por FTIR de MBG después de ser inmerso en SBF por 3 días [54].

Aguilar y col. [42] fabricaron andamios para la regeneración de tejido óseo a base del vidrio bioactivo 45S5, mediante el método tecnología de polvo. Los andamios resultantes fueron evaluados mediante la evaluación bioactiva in vitro mediante la inmersión en SBF por diferentes periodos de tiempo (0, 1, 3, 7, 14, 21 y 28 días), utilizando tres muestras para cada tiempo de inmersión. La formación de la capa de hidroxiapatita fue confirmada mediante el análisis de MEB, el cual se puede observar que la capa de hidroxiapatita adopto una morfología de nanopartículas esféricas en la superficie del andamio (Figura 2.25).

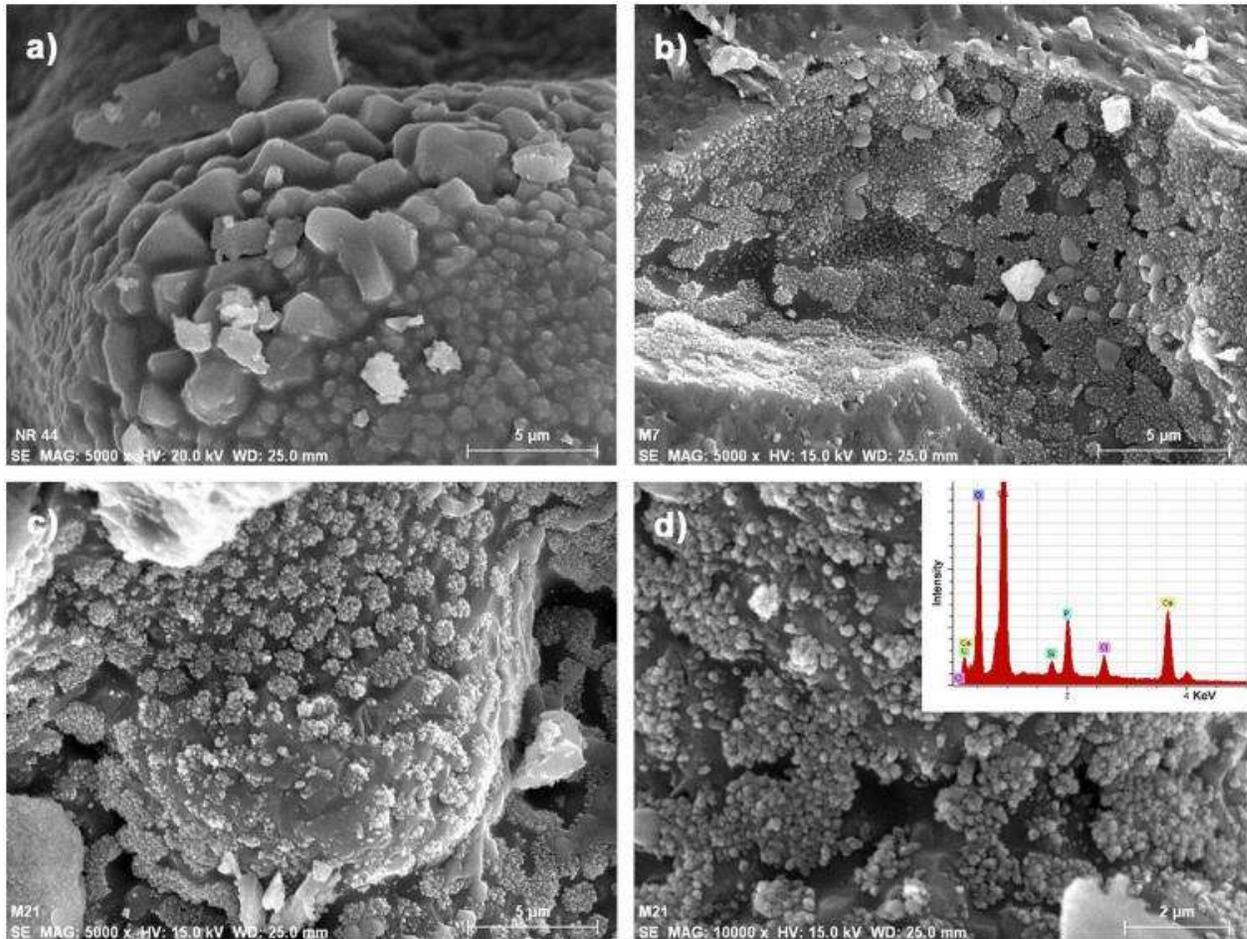


Figura 2.25. Micrografías por MEB que muestran el desarrollo de la capa de hidroxiapatita en la superficie de los andamios bioactivos en varios tiempos de inmersión en SBF: (a) 0, (b) 7, (c) y (d) 21 días [42].

2.11 Cultivos celulares

Los cultivos celulares in vitro se han utilizado principalmente para estudiar el crecimiento y la diferenciación celular. Los modelos de cultivo celular representan una fuente inagotable de material experimental para estudiar la producción y el efecto de las hormonas; factores de crecimiento, interleucinas y productos celulares. En la actualidad, los modelos de cultivo celular se utilizan en pruebas de biocompatibilidad para los siguientes propósitos; toxicidad, liberación de lixiviados tales como plastificantes, estabilizadores, colorantes y cargas, que podrían producir efectos tóxicos una vez liberados in vitro e in vivo [68].

Método MTT. Es uno de los métodos más utilizados para evaluar la citotoxicidad o proliferación celular. Se basa en la reducción metabólica del bromuro de ([3-4,5-dimetiltiazol-2-ilo]-2,5-difeniltetrazol) realizada por la enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa, es un método colorimétrico cuantitativo. En el que la sal de tetrazolio MTT (tonalidad amarilla) es reducida por las células vivas a cristales de formazán (tonalidad púrpura), que debe ser disuelto utilizando como solvente el isopropanol. La sal de tetrazolio es reducida en los procesos mitocondriales durante la cadena respiratoria, las fracciones citoplasmáticas y microsomales también están implicados en la formación de formazán. El método MTT ha sido ampliamente usado para medir la supervivencia y proliferación celular, es una prueba sensible que muestra linealidad en un amplio rango de concentraciones celulares, la cantidad de células vivas es proporcional a la cantidad de formazán producido [68, 69].

Método DAPI. Es un marcador fluorescente que se une fuertemente a regiones enriquecidas en adenina y timina en secuencias de ADN. DAPI o (4, 6-diamino-2-fenilindol), puede pasar a través de la membrana celular, por ello tiñe las células vivas y también células fijadas. Es ampliamente utilizado en la microscopía de fluorescencia. DAPI se asocia con el surco menor del ADN de doble cadena, con preferencia por los grupos adenina-timina. Las células deben ser permeabilizadas y/o fijadas para que DAPI pueda entrar en la célula y unirse al ADN. La fluorescencia aumenta aproximadamente 20 veces cuando DAPI se une al ADN de doble cadena [70].

Lopes y col. [3] fabricaron andamios para la regeneración ósea a base de β -TCP (fosfato tricálcico) reforzados con biovidrio 45S5 (5 y 7.5 % en peso) mediante el método de colada-gel. Los andamios resultantes fueron estudiados por otras técnicas con el objetivo de obtener resultados similares al tejido óseo. Finalmente se realizaron estudios celulares con el objetivo de evaluar la citotoxicidad, adhesión y viabilidad celular, la línea celular requerida fueron los osteoblastos MG-63. Las células se cultivaron en medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) suplementado con 10% de suero fetal bovino (FBS), penicilina (100 U/mL) y estreptomicina (100 mg/mL) y mantenida a 37 °C y 5% de CO₂. La unión y la morfología se estudiaron por MEB después de 3 días de crecimiento de células MG63 en las muestras. Para las pruebas de citotoxicidad, se sembraron 8×10^3 células en placas de 96 pocillos. Se usaron ocho pocillos para cada material y control positivo ($n = 2$). Las células se mantuvieron en DMEM suplementado con FBS al 10%, penicilina (100 U/mL) y

estreptomicina (100 mg/ml) a 37 °C/24 h en una atmósfera con 5% de CO₂. La proliferación celular en contacto con las muestras se determinó usando el sustrato enzimático soluble en agua 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difenil tetrazolio bromuro (MTT). El MTT se convierte en un producto soluble formazana acumulado en el citoplasma de células viables. La viabilidad celular se cuantificó mediante la disolución de MTT en 0.1 mol/L NaOH en DMSO (dimetilsulfóxido) y la absorbancia del formazán producido se midió a 570 nm con un espectrofotómetro a 570 nm. La citotoxicidad se expresó como porcentaje relativo al grupo de control (100%). Los resultados obtenidos fueron que los materiales analizados no son tóxicos, la (Figura 2.26) muestra una disminución en la viabilidad celular para β -TCP (68.4 %) y para β -TCP/5 BG (64.5%) mientras que para β -TCP/7.5 BG (132.4%) por lo que el aumento del BG permitió un aumento en la viabilidad de las células. La evaluación de la citotoxicidad midió la viabilidad después del contacto con las células mediante MTT, por lo que se observó β -TCP y β -TCP/5 BG, disminuyeron el número de células viables. Por otro lado, el β -TCP/7.5BG promovió una alta proliferación celular. Por lo que a mayor concentración de BG, mayor es el número de células viables. La unión celular es la parte más importante de la célula en la interacción con un biomaterial porque es necesaria para otras actividades celulares, como la proliferación y propagación. Se observó que las células presentes en el β -TCP/x% -BG estaban parcialmente sumergidas en la masa del material y cierta extensión citoplasmática sentenciada a los poros de los andamios (Figura 2.27). Dentro de dicho estudio, se dice que las células pueden adherirse y extenderse en la superficie de todos los materiales, lo que sugiere una excelente interacción entre las células y los andamios.

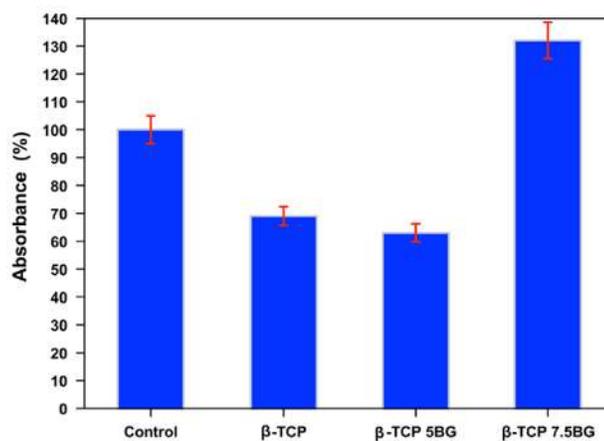


Figura 2.26. porcentaje medio de absorbancia, obtenido con el ensayo MTT, de β -TCP, β -TCP/5 BG y β -TCP/7.5 BG y grupo control (100%) después de 24 h en contacto con células MG 63 [3].

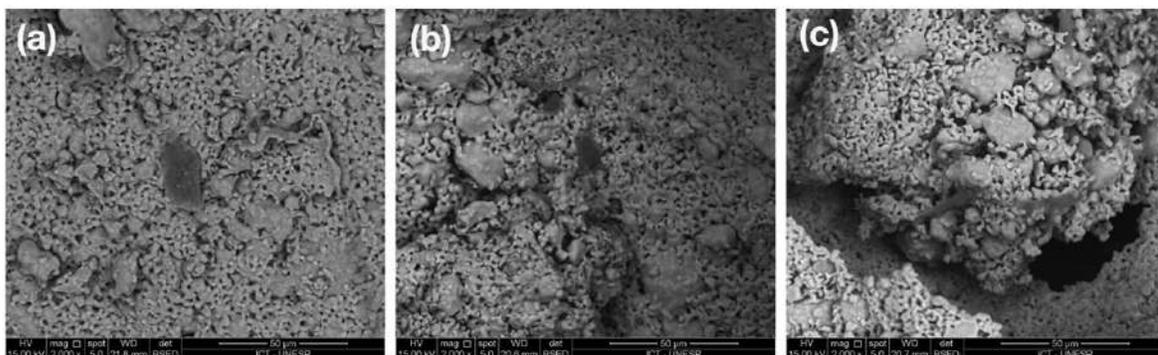


Figura 2.27. Imagen por MEB de la adhesión celular en (a) β -TCP, (b) β -TCP/5 BG y (c) β -TCP/7.5 BG después de 3 días [3].

Elsayed y col. [48] fabricaron andamios de wollastonita-dióxido mediante el método colada en gel inorgánica. Para fortalecer los estudios de los andamios resultantes, realizaron pruebas de bioactividad in vitro utilizando la línea celular utilizada fueron los fibroblastos dérmicos humanos. Para los estudios de cultivo celular, las muestras se cortaron a $10 \times 10 \times 5 \text{ mm}^3$ y se esterilizaron en autoclave a $121 \text{ }^\circ\text{C}/20 \text{ min}$. Las muestras se fijaron en placas de 48 pocillos. Se sembraron fibroblastos dérmicos humanos normales a una densidad de 4×10^5 células/pieza en cDMEM, que consistía en medio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM) suplementado con 10% en volumen de suero fetal bovino (FBS) y 1% en volumen de penicilina/estreptomicina (P/S). Los cultivos 3D se incubaron a $37 \text{ }^\circ\text{C}$ y 5% de CO_2 durante siete días, con cambios de medios cada dos días. Las condiciones de control fueron representadas por células cultivadas en placas de cultivo de tejidos (TCP) en cDMEM durante el mismo tiempo de cultivo. La tasa de proliferación celular se evaluó después de tres y siete días desde la siembra con el ensayo de proliferación basado en MTT (metiltiazolil-tetrazolio), las muestras se incubaron durante 3 h a $37 \text{ }^\circ\text{C}$ en 1 mL de solución de MTT de 0.5 mg/mL preparada en solución salina tamponada con fosfato (PBS). Después de eliminar la solución de MTT, se añadieron 0.5 ml de DMSO al 10% en isopropanol para extraer el formazán en las muestras durante 30 minutos a $37 \text{ }^\circ\text{C}$. Para cada muestra, los valores de absorbancia a 570 nm se registraron por duplicado en partes alícuotas de 200 μL depositadas en placas de micropocillos utilizando un lector de placas multicapas. La actividad de LDH se midió usando el kit de ensayo de actividad de lactato deshidrogenasa. Todas las condiciones se probaron por duplicado. El medio de cultivo se reservó para determinar la LDH extracelular. La LDH intracelular

se estimó después de la lisis de las células con el tampón de ensayo. Todos los muestreados se incubaron con una mezcla de reacción suministrada, dando como resultado un producto cuya absorbancia se midió a 450 nm usando un lector de placas multicapas. Los resultados obtenidos de MTT se muestran en la (Figura 2.28), se observar un aumento significativo en la viabilidad celular con el tiempo de cultivo, lo que indica la biocompatibilidad del material producido. Una tendencia similar en el crecimiento celular es evidente en la condición de control (TCP). Esto sugiere que la viabilidad de los fibroblastos no se vio afectada por la formulación del material estudiado.

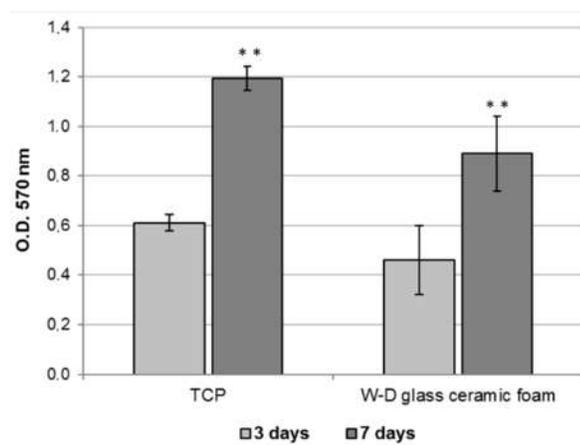


Figura 2.28. Ensayo MTT de fibroblastos cultivados en TCP (condición de control) o en espuma de vitrocerámico WD durante 3 y 7 días. Diferencia significativa *($p < 0.05$); **($p < 0.01$); ***($p < 0,001$) [48].

La (Figura 2.29(a)) muestra la actividad intracelular de LDH de los fibroblastos sembrados sobre espumas de vitrocerámico WD durante 3 y 7 días. Los resultados sugieren que las células sembradas en espumas de WD fueron capaces de producir metabolitos, con una actividad significativamente mejorada después de 7 días desde la siembra, como se observó para los fibroblastos cultivados en TCP. La cuantificación de LDH intracelular muestra la misma tendencia observada con el ensayo MTT. La (Figura 2.29(b)) muestran bajos niveles de actividad de LDH en el medio de cultivo extracelular tanto en células cultivadas en monocapa como en el andamio, lo que indica la ausencia de citotoxicidad de las espumas de vitrocerámica WD.

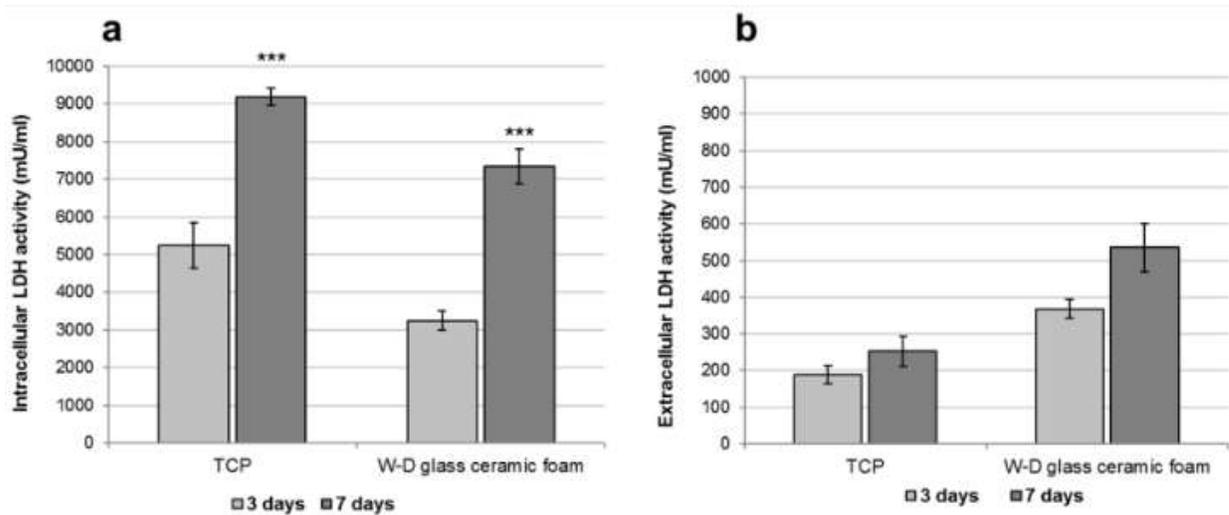


Figura 2. 29. Ensayo de actividad LDH de fibroblastos cultivados en TCP (condición de control) o en espuma de vitrocerámico WD durante tres y siete días. (a) actividad intracelular de LDH; (b) actividad extracelular de LDH. Diferencia significativa *($p < 0.05$); **($p < 0.01$); ***($p < 0.001$) [48].

Las imágenes por MEB de las espumas de WD cultivadas con fibroblastos humanos se muestran en la Figura 2.30. Después de 3 días de siembra (Figura 2.30 (a, b)) se encontró que los fibroblastos se diseminaban y adherían a la superficie de las muestras, mostrando su típica morfología alargada. Después de 7 días (Figura 2.30(c, d)), las células habían colonizado la superficie de las espumas de WD, mostrando una mejor adhesión y proliferación, pero mostrando formas alargadas. Además, es posible notar que, a los 7 días de la siembra, las células no solo habían poblado completamente el andamio, sino que también se habían infiltrado en sus poros (flechas amarillas en la Figura 2.30(c)). Todas estas observaciones fortalecen aún más la evidencia de la biocompatibilidad del material.

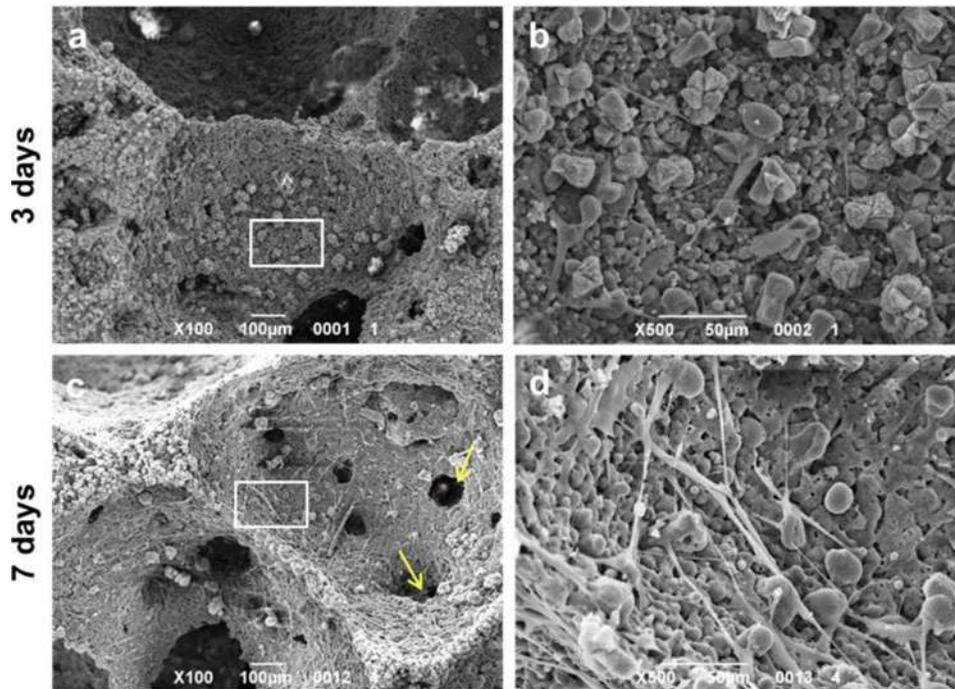


Figura 2.30. Imágenes por MEB a 100 y 500 x) de fibroblastos cultivados en espuma de WD durante 3 días (a, b) y 7 días (c, d). migración de las células a los poros (c, flechas amarillas) después de siete días. Los cuadros blancos en (a, c) representan las áreas que se muestran con mayor aumento en (b, d) [48].

Chen y col. [71] fabricaron andamios de *Bioglass*[®] 45S5 mediante sol-gel para la regeneración del tejido óseo, las células requeridas fueron los osteoblastos MG-63. Se realizaron estudios de medición de pH, para dicha prueba los andamios fueron inmersos en medio de cultivo Eagle modificado de Dulbecco (DMEM) se incubaron a 37°C con 5% de CO₂. La acidez se midió a las 4, 12, 24, 36 y 48 h. Esto fue seguido por la sustitución del medio con DMEM fresco, que posteriormente se incubó durante otras 48 h. los resultados obtenidos se muestran en la (Figura 2.31), se observa una comparación de la variación de pH en andamios de *Bioglass*[®] 45S5 derivados de sol-gel y réplica. La Figura 2.31(a) muestra la variación de pH de las primeras 48 h, para las primeras 12 h los andamios derivados del sol-gel y réplica alcanzaron un valor de 8.6 y 8.3, respectivamente, a medida que incrementaba el tiempo de inmersión en DMEM alcanzaron valores de pH de 9.0 y 8.7. Sin embargo, los valores de pH saturado de DMEM causados por la incubación de los dos tipos de andamios no fueron significativamente diferentes. Las segundas 48 h, en las primeras 12 h para los andamios por sol-gel y réplica obtuvieron valores de pH de 7.9 y 7.7, incrementando el tiempo los valores incrementaron a 8.4 y 7.9. El cambio del pH causado por los

andamios 45S5 derivados de sol-gel se puede atribuir directamente a la liberación más rápida de iones Na^+ de este tipo de espuma.

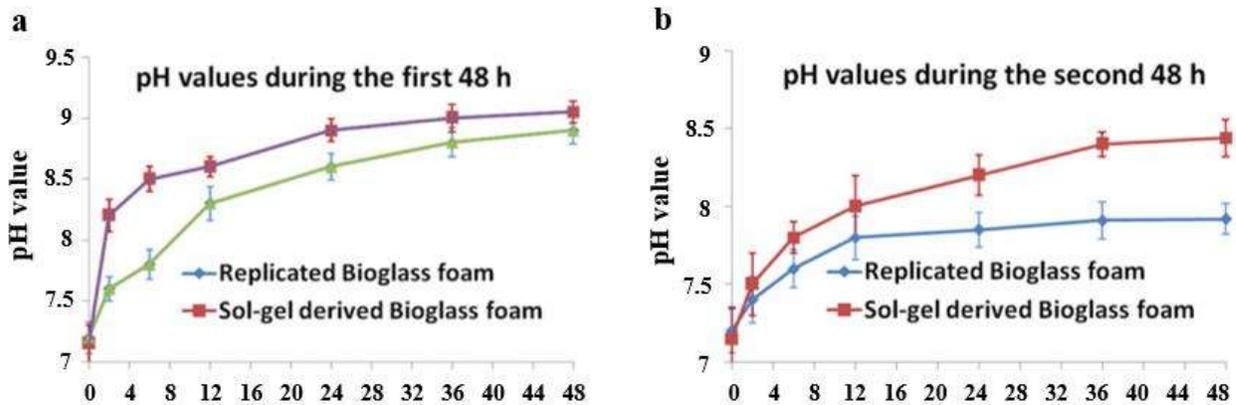


Figura 2.31. pH en función del tiempo de inmersión en; (a) primeras 48 h, (b) segundas 48 h [71].

Realizaron también pruebas de citocompatibilidad in vitro, los andamios fueron colocados en medio de cultivo (DMEM suplementado con suero de ternera fetal (FCS) al 10%, L-glutamina al 1% y penicilina/estreptomicina al 0,5% durante 24 h a 37 °C por debajo del 5% de CO_2 , como material de control se utilizó la hidroxiapatita. Se sembraron las células (MG-63) en el medio estándar con una densidad de 2000 células/pocillo en placas de 96 pocillos, se incubaron a 37 °C y 5% de CO_2 , cuando la monocapa alcanza un 80% de confluencia (día 4) se removió el medio todos los cultivos se dejaron 2 días. Al final del período de incubación, se recogió el medio de cultivo y se determinó el grado de muerte celular mediante la medición de los niveles de lactato deshidrogenasa (LDH). A cada pocillo que contenía células vivas, se cambió el medio de cultivo. Las vivas se utilizaron para determinar el contenido celular de LDH. El nivel general de LDH se determinó midiendo la absorbancia del sobrenadante del medio centrifugado a 490 nm (después de restar la absorbancia de fondo a 690 nm) utilizando un espectrofotómetro UV-vis de formato de placa de pocillos múltiples. Los resultados se muestran en la (Figura 2.32) no se encontraron diferencias significativas en el porcentaje de células muertas entre dos de los tres grupos ($P > 0.05$) $n = 5$.

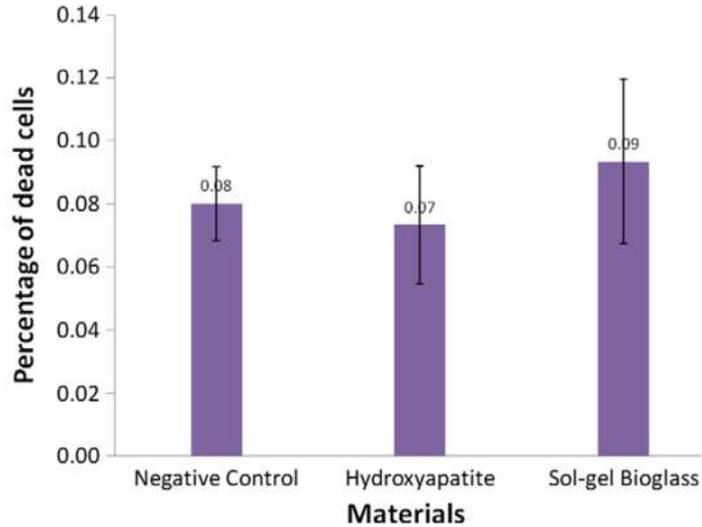


Figura 2.32. Citotoxicidad de los materiales de prueba usando células MG63, detectada midiendo la liberación de LDH en el medio que contiene las sustancias extraídas durante 2 días de cultivo [71].

Finalmente se sembraron las células en andamios derivados del sol-gel. Los andamios se cortaron a un tamaño de 15 mm de diámetro y 5 mm de espesor. Todos los andamios se esterilizaron en calor seco a 180 °C por 2 h y se acondicionaron previamente en medio de cultivo durante 48 h antes del cultivo celular. Se sembraron células MG63 en los andamios esterilizados a una variedad de concentraciones: 1000, 2000, 5000, 10,000 y 20,000 células por muestra. Las muestras se mantuvieron a 37 °C en una atmósfera de 5% de CO₂ durante períodos de incubación de 1 y 6 días (Figura 2.33).

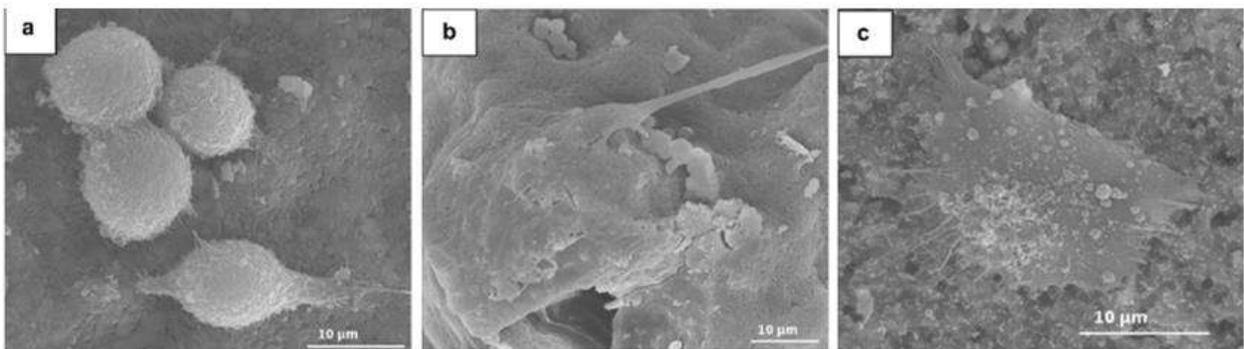


Figura 2.33. (a) 1 día, solo células divididas; (b) 4 días, células ampliamente diseminadas (de modo que es difícil reconocer el límite de la célula en la foto); (c) 6 días, una célula en expansión, que muestra procesos membranosos en contacto con la superficie del andamio [71].

CAPITULO III. DESARROLLO EXPERIMENTAL

En la Figura 3.1 se describen esquemáticamente cada una de las etapas que se desarrollaron para la fabricación de andamios partiendo del biovidrio 45S5 para aplicación en regeneración de tejido óseo utilizando el método de fabricación de colada en gel inorgánica.

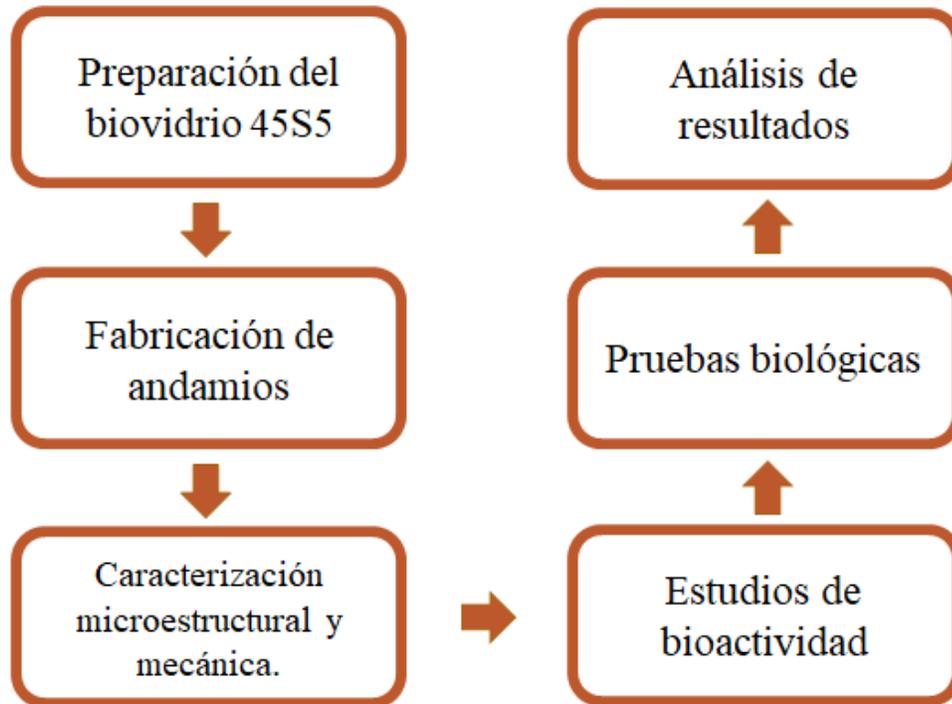


Figura 3.1. Esquema general de la ruta experimental del proyecto.

3.1. Preparación del biovidrio 45S5

La preparación del biovidrio 45S5 se realizó por el método convencional de fusión y temple a partir de una mezcla de óxidos de SiO_2 , Na_2CO_3 , CaO y P_2O_5 , usando las cantidades de polvo estequiométrico para obtener una composición final de 45% SiO_2 , 24.5% Na_2O , 24% CaO y 6% P_2O_5 en peso. Todos los polvos fueron adquiridos de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA, pureza 99%). Posteriormente, los polvos fueron mezclados en un molino de bolas convencional durante 30 min, la mezcla obtenida se colocó en un crisol de sílice fundida la cual fue sometida a un ciclo térmico usando un horno de cámara CARBOLITE HTF 1700°C; el ciclo comprende una

temperatura intermedia a 950°C durante 90 min para desgasificación y un segundo paso a 1350 °C durante 90 min, como se observa en la Figura 3.2, al final del ciclo la masa fundida se vertió en agua a temperatura ambiente para formar una frita. La frita obtenida se secó en una mufla durante 12 horas a 100 °C, seguido de una molienda en un molino de discos vibratorio RS 200 RETSCH, pasado a través de un tamiz de malla 230 (63 µm).

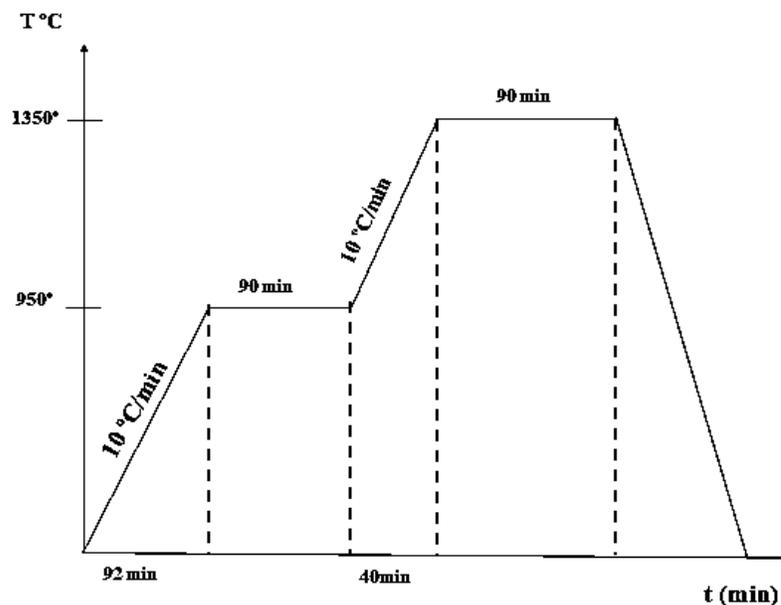


Figura 3.2. Ciclo térmico para la preparación del biovidrio 45S5.

3.1.1. Caracterización del polvo de biovidrio 45S5

3.1.1.1. Distribución de tamaño de partícula

Después de la obtención del biovidrio por fusión y temple, pulverización y pasado por el tamiz menor a 63 µm, se realizó el análisis de distribución de tamaño de partícula en una muestra representativa de 5-10 g, utilizando el equipo analizador de partícula *Beckman Coulter LS100Q*.

3.1.1.2. Calorimetría diferencial de barrido (DSC)

El análisis térmico se realizó con el objetivo de conocer el comportamiento térmico del biovidrio 45S5 y determinar las temperaturas de transición vítrea, cristalización y fusión. El equipo utilizado fue un módulo de análisis térmico simultáneo TG/DSC a 1600°C *SDT Q600 TA Instruments*. Para efectuar los experimentos se pesaron muestras de aprox. 30 mg que se colocaron en un crisol de alúmina utilizando un programa de temperatura controlado desde temperatura ambiente hasta 1200 °C con una velocidad de calentamiento de 5°C/min bajo atmósfera dinámica de argón de 100 mL/min.

3.1.1.3 Análisis por fluorescencia de rayos X (FRX)

Se realizaron análisis por fluorescencia de rayos X (FRX) del polvo de biovidrio 45S5 obtenido por fusión, utilizando un equipo espectrómetro secuencial *RIGAKU PRIMUS II* de WD-FRX equipado con tubo de Rh para ser manejado hasta una potencia máxima de 4000 watts y manejando límites de detección de hasta 1 µg/g, con la finalidad de confirmar la composición del biovidrio 45S5 (45% SiO₂, 24.5% CaO, 24.5% Na₂O y 6% P₂O₅). La preparación de la muestra consistió en secar la muestra a 110°C por 1 hora, y el análisis de los elementos mayoritarios se realizó en una perla preparada con 90% de Li₂B₄O₇.

3.1.1.4. Análisis por microscopía electrónica de barrido (MEB)

Después de la obtención del polvo por fusión y temple, se realizó el análisis por MEB a diferentes magnificaciones con el objetivo de analizar la morfología, distribución y tamaño de las partículas. El equipo requerido fue el microscopio electrónico de barrido *JEOL SEM JSM 6400*, y se realizaron análisis químicos por espectroscopía de energía dispersiva (EDS) para determinar la composición puntual. Para el análisis del polvo de biovidrio fue necesario metalizar el material colocando una pequeña cantidad en un portamuestras de Cu. El equipo requerido fue de la marca *Edward, SI50A SPUTTER COATER* el tiempo de metalización fue de 20 min.

3.1.1.5. Análisis por difracción de rayos X (DRX)

Se empleó dicho análisis con la finalidad de corroborar la fase amorfa del biovidrio en polvo después de la fusión y temple. El equipo utilizado fue un difractómetro de rayos X *D8 Advance BRUKER*. Las condiciones de trabajo fueron un barrido en el rango 2θ de $10^\circ - 70^\circ$ con velocidad de $0.05^\circ/\text{paso}$ y con un tiempo de 2 s/paso.

3.1.1.6. Análisis por espectroscopía infrarroja (FT-IR)

Se requirió esta técnica con el objetivo de identificar los grupos funcionales característicos del biovidrio 45S5 en polvo. La cantidad de muestra requerida fue de 0.003 g con 0.3 g de KBr, y el equipo utilizado fue un espectrofotómetro de infrarrojo *SENSOR 27 Bruker*. El rango de barrido fue de 4000 a 400 cm^{-1} .

3.2 Fabricación de los andamios por colada en gel inorgánica

En la fabricación de andamios se utilizó una composición en peso por lote de 60% de biovidrio, 36% de NaOH, y 4% de agente surfactante (Triton X-100, Sigma-Aldrich). La mezcla de biovidrio con el hidróxido de sodio se mantuvo en agitación mecánica en un equipo del tipo IKA C-MAG HS 7 a 1500 rpm durante 3 horas, posteriormente, se agregó el agente surfactante y se continuó agitando a 1500 rpm durante 8 min. Finalmente, la mezcla obtenida se vertió en moldes de polipropileno. Después del desmolde de los andamios y previo a la sinterización se realizó un secado a 40°C durante 24 horas en una mufla *ThermoScientific-LINDBERG BLUE M*. Finalmente, se llevó a cabo el sinterizado en una mufla *ThermoScientific THERMOLYNE*, a tres diferentes temperaturas de 800 , 850 y 900°C con una velocidad de calentamiento de $5^\circ\text{C}/\text{min}$ y con un tiempo de permanencia de 180 min como se observa en la Figura 3.3.

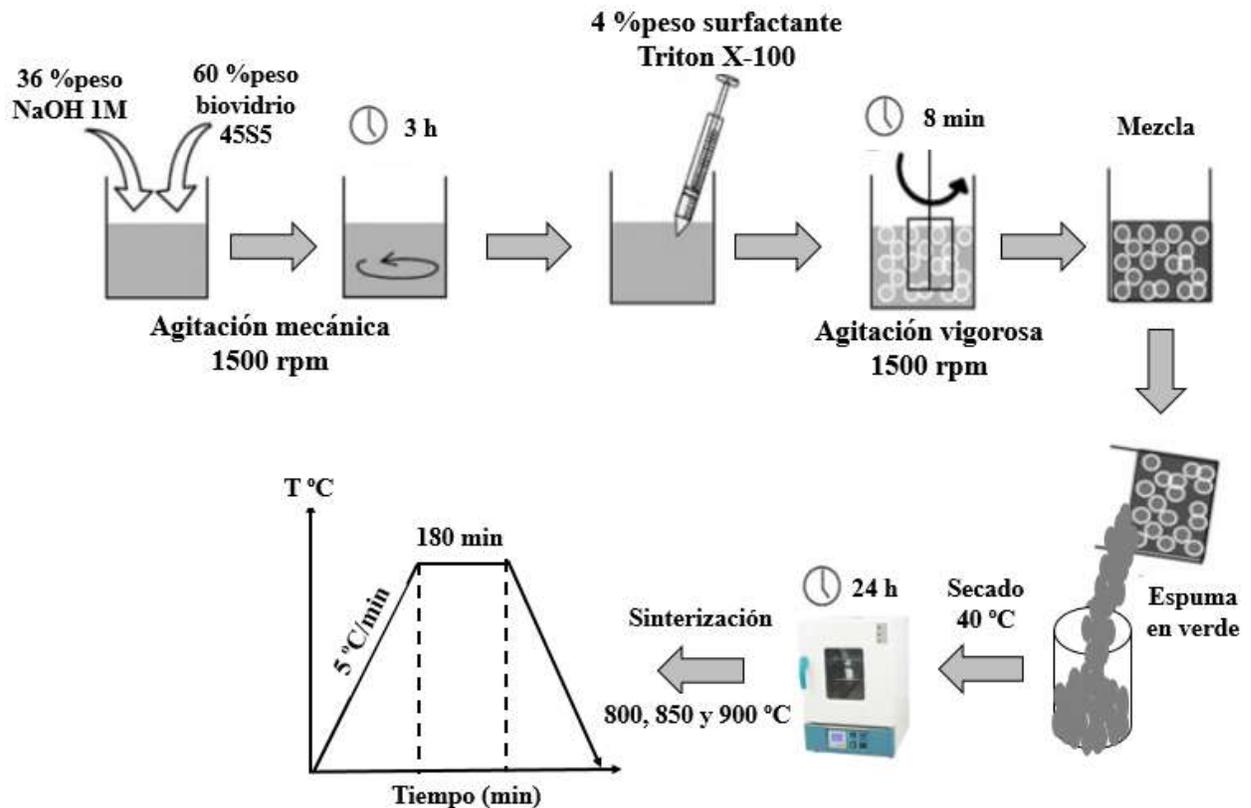


Figura 3.3. Diagrama esquemático del proceso de obtención de los andamios de biovidrio 45S5.

3.3. Estudios de bioactividad

De los andamios obtenidos, se realizaron pequeños cortes para obtener discos con dimensiones de 10 mm de diámetro por 3 mm de espesor. Se utilizó como control negativo una pieza de vidrio inerte (vidrio convencional) de dimensiones 10 mm × 10 mm × 3 mm, el objetivo de utilizar un control negativo fue sustentar que la formación de la capa de hidroxiapatita en la superficie de las muestras bioactivas era resultado de la reacción con el fluido corporal simulado y no de la precipitación de sales de la solución.

Los discos de biovidrio (andamios) así como los vidrios inertes, fueron sumergidos en fluido corporal simulado (SBF) a diferentes tiempos de inmersión 1, 3, 7, 14, 21 y 28 días, siguiendo el protocolo descrito por Kokubo y Takamada [68].

Para cada tiempo de inmersión se utilizaron triplicados con el objetivo de limitar la dispersión de los resultados al realizar la caracterización. Por lo que el número total de muestras utilizadas fueron

36 de las cuales 18 corresponden a los cortes de los andamios y las 18 muestras restantes fueron del vidrio inerte.

3.3.1. Esterilización de las muestras (discos)

Los discos deben ser esterilizados para evitar la presencia de bacterias que puedan afectar las condiciones de trabajo. Los discos fueron esterilizados en baño ultrasónico con etanol y acetona por 30 min, seguido de un secado por 24 h y expuestas a radiación ultravioleta por 40 min.

3.3.2. Preparación del fluido corporal simulado (SBF)

Para la preparación de la solución de SBF se siguió el protocolo propuesto por Kokubo y Takamada [67] cuyos pasos se detallan a continuación:

1. Previo a la preparación de la solución, se lavó todo el material de laboratorio con agua destilada y detergente neutro.
2. Se vertieron 700 mL de agua destilada en un vaso de precipitado de polipropileno de 1000 mL, el cual se colocó sobre una plancha de calentamiento con agitación magnética a una temperatura constante de 36°C.
3. Se fueron añadiendo y disolviendo cada uno de los reactivos siguiendo el orden de la Tabla 2.4. La adición del siguiente reactivo se detiene hasta que el reactivo anterior se haya disuelto completamente.
4. Disuelto los reactivos a 36 °C, se adicionó Tris y el HCl 1M, para ajustar el pH de la solución a un valor de 7.4.
5. La solución se transfirió a un matraz aforado de polipropileno de 1000 mL, se dejó enfriar a 20 °C, y se agregó agua destilada hasta la afore.

El SBF preparado debe conservarse en una botella de plástico con una tapa bien apretada y mantenerse a 5-10 °C en un refrigerador. El SBF debe usarse dentro de los 30 días posteriores a la preparación.

Antes de utilizar la solución, ésta se deja reposar a temperatura ambiente. Una vez reposada la solución se filtra con un filtro de 0.20 μm dentro de una campana de flujo laminar.

3.3.3. Cálculo del volumen de SBF

Para la determinación del volumen de SBF necesario para cada ensayo, se utilizó la siguiente fórmula [67]:

$$V_s = S_a/10 \quad (3.1).$$

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 cálculo del área superficial aparente se realizó mediante análisis por BET, obteniéndose un valor de 0.7980 m^2/g (798,000 mm^2/g) para una muestra de 0.2985 g. El valor de V_s calculado fue de 24 mL, por lo que el volumen requerido para cada pastilla se definió finalmente de 30 mL.

3.3.4. Proceso de inmersión

Para este proceso, se utilizó una campana de flujo laminar, la cual fue necesario limpiar de residuos de polvo con benzal al 10%. Antes de realizar el proceso todos los discos ($n = 3$ para cada tiempo de inmersión) se incubaron durante 1, 3, 7 14, 21 y 28 días en tubos de centrifuga cónicos estériles de 50 mL (un disco por tubo) (Sigma-Aldrich) con 30 mL de solución SBF por tubo. Los tubos se cerraron herméticamente con una tapa roscada para minimizar la evaporación durante la incubación y se mantuvieron a 37 °C. Además, los controles ($n = 3$) que consistieron en las muestras de vidrio inerte con 30 mL de SBF se usaron para cada punto de tiempo con el fin de detectar cualquier nucleación homogénea en la solución o nucleación heterogénea en la superficie del vidrio inerte. El SBF se refrescó cada tercer día.

Para cada punto de tiempo de inmersión se retiraron los discos de los tubos, se lavaron cuidadosamente con agua destilada y se secaron a 40 °C durante 24 horas en una mufla *ThermoScientific-LINDBERG BLUE M*. Posteriormente, se almacenaron para la caracterización de la superficie.

3.3.5. Control del pH

El pH es un factor muy importante sobre la solubilidad de los vidrios bioactivos ya que la concentración de iones en la solución está sobresaturada respecto a varios de ellos. Por lo que es de suma importancia llevar a cabo el control de pH.

Dentro de la experimentación con el SBF, se realizó la medición de pH mediante un medidor de pH *Fisher Scientific AB15*, el proceso consistió en extraer la muestra para cada punto de tiempo de inmersión (1, 3, 7, 14, 21 y 28 días), y medir el pH en la solución remanente.

3.4. Caracterización microestructural y mecánica de los andamios de biovidrio 45S5

Después de la fabricación por colada en gel los andamios en verde, sinterizados a 800, 850 y 900°C, y después de la inmersión en SBF, se caracterizaron por diversas técnicas de análisis.

3.4.1. Determinación del área superficial y distribución de poro

Para realizar los análisis de área superficial, se empleó el método B.E.T., desarrollado por Brunauer, Emmett y Teller, que permite determinar la superficie de un sólido basándose en la adsorción de un gas inerte, generalmente N₂, a baja temperatura. El método Barrett Joyney-Halenda (BJH) es empleado para el cálculo de distribuciones de tamaños de poro en el rango de los mesoporos (2-50 nm) con geometría cilíndrica [72]. El equipo utilizado fue un analizador de sorción de gas automatizado *Autosorb IQ Series Quantachrome INSTRUMENT*.

3.4.2. Análisis por microscopía electrónica de barrido (MEB)

La microestructura de los andamios sinterizados a diferentes temperaturas, fueron estudiados por MEB a diferentes magnificaciones con el objetivo de analizar la distribución, interconectividad y diámetro de los poros. También por medio de esta técnica se examinará la formación de la capa de hidroxiapatita de los andamios para cada punto de tiempo de inmersión en SBF (1, 3, 7, 14, 21 y 28 días) y se realizarán análisis químicos por espectroscopía de energía dispersiva (EDS) para determinar la relación Ca/P. Para estos estudios se utilizó un microscopio electrónico de barrido *JEOL SEM JSM 6400*.

3.4.3. Análisis por difracción de rayos X (DRX)

Se empleó dicho análisis con la finalidad de identificar las fases cristalinas presentes en los andamios después de la sinterización a diferentes temperaturas, así como la identificación de la fase cristalina de hidroxiapatita en cada punto de tiempo de inmersión en SBF (1, 3, 7, 14, 21 y 28 días). El equipo utilizado fue un difractómetro de Rayos X *D8 Advance BRUKER*. Las condiciones de trabajo fueron un barrido en el rango 2θ de $10^\circ - 70^\circ$ con velocidad de paso de $0.05^\circ/\text{paso}$ y con un tiempo de 2 s/paso.

3.4.4. Análisis por espectroscopía infrarroja (FT-IR)

Se requirió esta técnica con el objetivo de estudiar la formación de los grupos funcionales característicos de los andamios sinterizados y después de ser inmersos en SBF. Se prepararon pastillas de 0.003 g de muestra con 0.3 g de KBr, el rango de barrido fue de 4000 hasta 400 cm^{-1} y el equipo utilizado fue un espectrofotómetro FT-IR *TENSOR 27 Bruker*.

3.4.5. Determinación del porcentaje de porosidad

El % de porosidad se evaluó utilizando la siguiente ecuación,

$$\% \text{ Porosidad} = \left(1 - \frac{\rho_{\text{andamio}}}{\rho_{\text{Bioglass 45S5}}} \right) \times 100 \quad (3.2)$$

donde la densidad del andamio, $\rho_{andamio}$, se calculó a partir de la masa y las dimensiones de las muestras sinterizadas, $\rho_{Bioglass\ 45S5} = 2.7\text{ g/cm}^3$, es la densidad teórica del Bioglass 45S5 [73].

3.4.6. Evaluación mecánica de los andamios

Se llevó a cabo la medición de la resistencia a la compresión de los andamios sinterizados a 800, 850, 900°C, en una máquina universal *LLOYD Instruments (EZ50)*, a probetas cilíndricas con dimensiones de $\phi = 12\text{ mm}$ y $h = 24\text{ mm}$, aplicando una carga de 15 N/min y una velocidad de 100 mm/min. La prueba consistió en colocar cada andamio al centro de dos placas metálicas para posteriormente aplicar la carga axial.

3.5. Pruebas biológicas

3.5.1. Medición del pH

Previo a los análisis con las células se midió el pH, de los andamios con y sin la inmersión en SBF. Para la medición del pH, las muestras fueron colocadas en placas de 24 pocillos, se esterilizaron durante 15 min para cada lado dentro de una campana de flujo laminar con luz ultravioleta, pasado el tiempo de esterilización, se adicionó medio de cultivo Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) y se dejó incubar a 37 °C/24 h con 5% CO₂, como se muestra en la Figura 3.4. El valor del pH fisiológico es 7.4 ± 0.4 . En la literatura se ha observado que, si el pH es mayor o menor a ese rango, el material suele ser tóxico para las células y provocar su muerte.

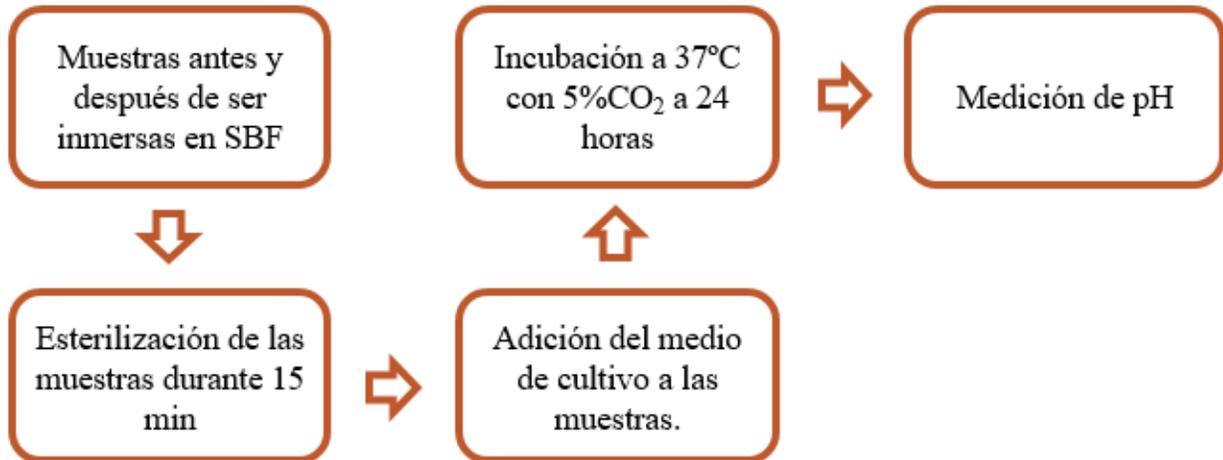


Figura 3.4. Método para medir el pH de las muestras.

Para las pruebas biológicas se utilizaron las células MG-63 (línea celular de fibroblastos osteocitos de humano, ATCC CRL-1427), el proceso de cultivo se detalla a continuación:

1. Se descongelaron las células a 37 °C aproximadamente 2 min, dicho proceso fue realizado de manera lenta y cuidadosa para evitar el daño de las células. Se colocaron en una caja petri se centrifugaron y se añadió el medio de cultivo Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) suplementado con 10% de suero fetal bovino (FBS); penicilina (100 U/mL); estreptomycin (100 mg/mL) a 37 °C y 5 % de CO₂. Después se retiró el medio de precondicionamiento.
2. Se sembraron las células; para ello las células se mezclaron con el medio de cultivo moviéndolas cuidadosamente para evitar el daño de las células, se retiró el medio pipeteando suavemente y se lavaron.
3. Proceso de tripsinización; para esto se retiró el medio por aspiración y se añadieron 3 mL de PBS para lavar la monocapa celular, sobre la pared de la placa para evitar que se levanten las células y se movió lentamente. Se retiró el PBS y se adicionaron 0.5 mL de tripsina al 0.025 % se incubó durante 3-5 min a 37 °C hasta que se levantaran las células, para confirmar que la tripsinización había sido eficiente se observó en un microscopio, una vez obtenida la suspensión celular, se homogenizó con 2 mL de medio de cultivo para inactivar a la tripsina. Se recuperaron las células con ayuda de una micropipeta, pipeteando

suavemente para disgregar los cúmulos de células. Se colocaron en un tubo falcón de 15 mL y se agregó medio de cultivo hasta 10 mL para dispersar las células. Posteriormente, se tomaron 10 μ L de la alícuota para realizar el conteo.

4. Se realizó el conteo de las células en una cámara de Neubauer, con un $V = 0.1 \text{ mm}^3 = 0.1 \text{ }\mu\text{L}$. Para hacer el conteo en la cámara de Neubauer se utilizó la siguiente ecuación:

$$\text{No. de células por mL} = \frac{\# \text{ cel} \times \text{FD} \times 10,000}{\text{Número de cuadrantes contados}} \quad (3.3)$$

Donde:

cel = número de células contadas en los cinco cuadrantes.

10,000 = factor de volumen (superficie X profundidad).

FD = factor de dilución = volumen total/volumen de alícuota.

Posteriormente, las células se sembraron (40 000 células/pocillo) en placas de múltiples pocillos. Para las pruebas celulares el número de muestras totales fue de $n = 18$ de dos materiales diferentes donde: 9 correspondieron a triplicados de 3 síntesis diferentes de andamios sin SBF que actuaron como material de control y 9 correspondieron a triplicados de 3 síntesis diferentes después de la inmersión en SBF por 7 días las cuales actuaron como material experimental. La masa de los andamios sin SBF fueron aproximadamente de $0.22 \pm 0.001 \text{ g}$, y la masa de los andamios inmersos en SBF durante 7 días, fue de aproximadamente $0.2 \pm 0.008 \text{ g}$, ambos con forma de disco. Finalmente, los andamos fueron colocados en el cultivo celular durante 24 h a $37 \text{ }^\circ\text{C}$ con 5 % CO_2 (Figura 3.5). Transcurrida la incubación se retiraron los materiales. Posteriormente las células se observaron en un microscopio óptico a 10x.

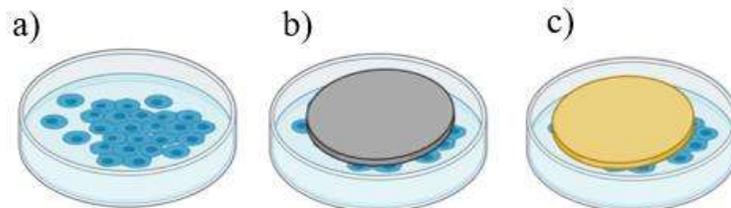


Figura 3.5. Cultivo de las células donde; (a) células sin material, (b) células con material control y (c) células con material con SBF por 7 días.

CAPITULO IV. ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

En este capítulo se presentan los resultados obtenidos de la caracterización fisicoquímica del biovidrio 45S5 obtenido por la técnica de fusión y temple, y de la caracterización fisicoquímica, mecánica y biológica de los andamios de biovidrio 45S5 fabricados por el método de colada en gel inorgánica y sinterizados a diferentes temperaturas.

4.1. Análisis del biovidrio 45S5

4.1.1 Distribución de tamaño de partícula

En la Figura 4.1 se muestra la curva de distribución de tamaño de partícula (% vol.) del polvo de biovidrio 45S5 en una gráfica de tipo bimodal, los resultados obtenidos presentaron tamaños de partícula menor a $63\ \mu\text{m}$ con la siguiente distribución: $d_{10} = 2\ \mu\text{m}$, $d_{50} = 10\ \mu\text{m}$ y $d_{90} = 18\ \mu\text{m}$. El comportamiento bimodal observado puede estar relacionado con el tipo de procesamiento para la obtención del polvo, ya que éste fue pulverizado en diferentes lotes y pasado a través de un tamiz con abertura menor de $63\ \mu\text{m}$. Los resultados obtenidos mediante este análisis se compararán más adelante con los análisis de MEB del biovidrio 45S5.

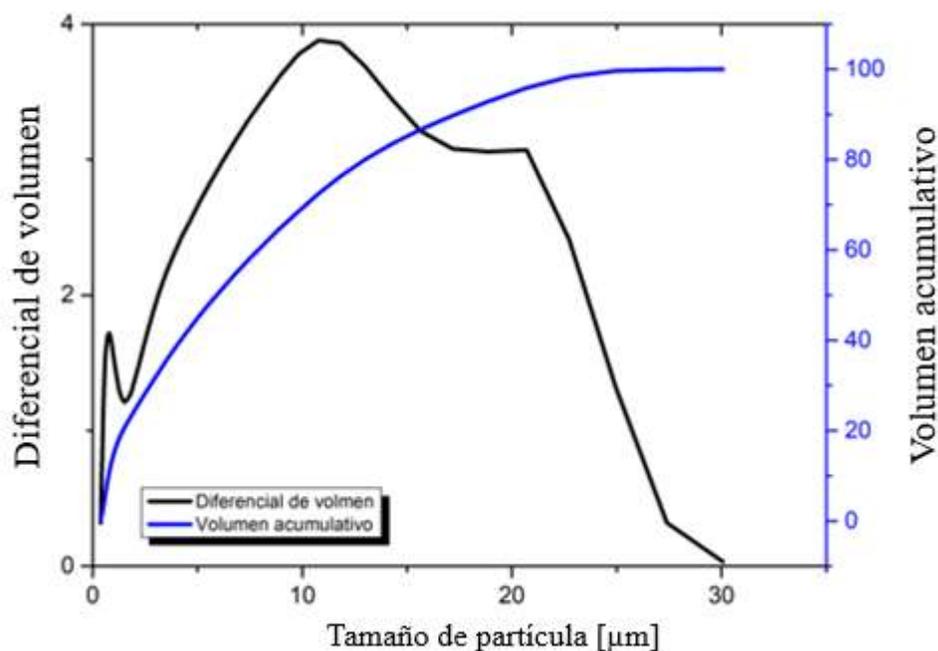


Figura 4.1. Curva de distribución de tamaño de partícula del polvo de biovidrio 45S5.

4.1.2. Comportamiento térmico

Los resultados obtenidos por calorimetría diferencial de barrido del polvo de biovidrio 45S5 se muestran en la Figura 4.2. Las temperaturas características son: temperatura de transición vítrea (T_g), temperatura de cristalización (T_c) y temperatura de fusión (T_m), las cuales se indican en la curva del análisis. La curva presenta una discontinuidad a 572°C correspondiente a la temperatura de transición vítrea, tres picos endotérmicos a 94, 179 y 1191°C correspondientes a la liberación de humedad, y a la temperatura de fusión respectivamente, y un pico exotérmico con una temperatura de inicio de 631°C y un máximo a 720°C correspondiente a la temperatura de cristalización del biovidrio 45S5. Lefebvre y col [74]. obtuvieron las temperaturas características del Bioglass® por medio del análisis térmico diferencial, las cuales fueron de $T_{g1} = 550$ °C, un pico exotérmico que comienza en $T_{c1} = 610$ °C atribuido a la cristalización de la fase $\text{Na}_2\text{CaSi}_2\text{O}_6$, $T_{g2} = 850$ °C, $T_{m1} = 1192$ °C y $T_{m2} = 1235$ °C atribuido a la fusión de dos diferentes fases cristalinas. Por difracción de rayos X identificaron un pequeño pico entre 800 y 950 °C y lo atribuyeron a la presencia de la segunda fase cristalina llamada silicorhenanita ($\text{Na}_2\text{Ca}_4(\text{PO}_4)_2\text{SiO}_4$). Comparando los resultados de esta investigación, se observa que existe una pequeña variación esto puede ser debido a las diferencias en los parámetros usados durante el análisis, estas variaciones incluyen una atmósfera oxidante de 20% N_2 - 80% O_2 contra una atmósfera inerte de argón 99.97% de pureza y la velocidad de calentamiento de 5 °C/min contra 10 °C/min. Los picos exotérmicos y endotérmicos tienden a moverse hacia mayores temperaturas a medida que la velocidad de calentamiento incrementa [75].

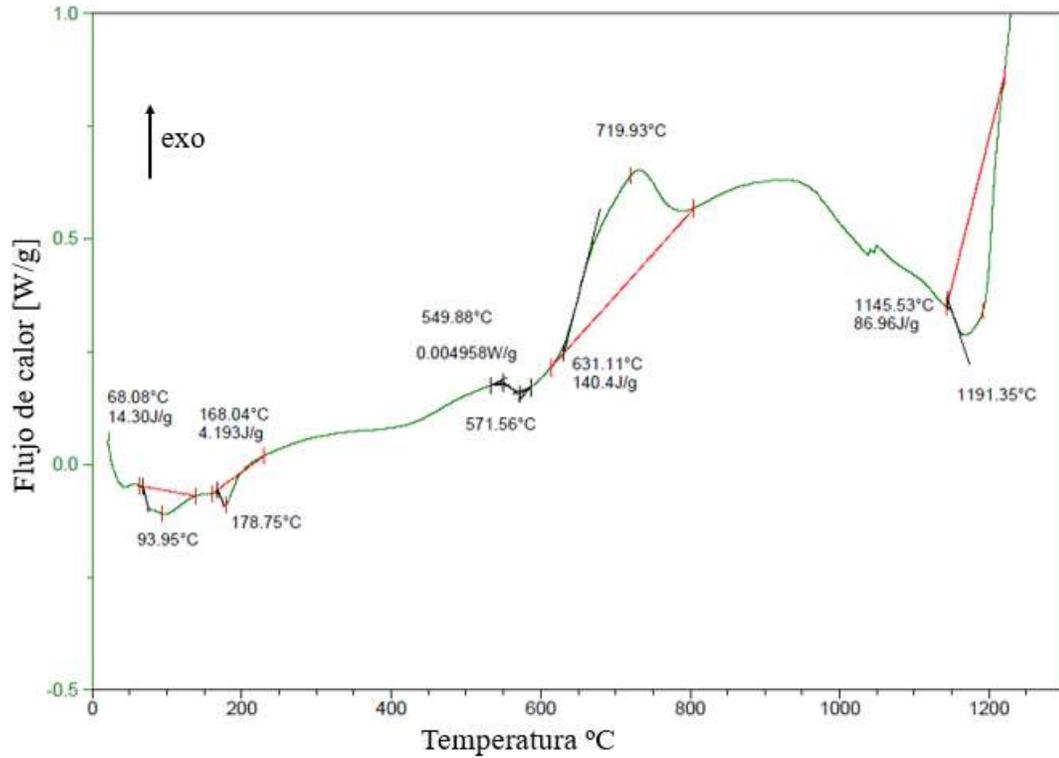


Figura 4.2. Análisis térmico diferencial del biovidrio 45S5 en polvo.

4.1.3. Análisis por fluorescencia de rayos X (FRX)

La Tabla 4.1 muestra los resultados obtenidos por FRX del biovidrio 45S5 pulverizado después de la fusión y temple, donde se observa la composición en % en peso y la cual es similar a la composición teórica del Bioglass® 45S5, por lo que se puede decir que dicho biovidrio contara con las propiedades del Bioglass®. Se puede observar también la presencia de algunas impurezas como: MgO, Al₂O₃, K₂O, TiO₂, MnO y Fe₂O₃, por lo que dichas impurezas no repercutirán en el funcionamiento del biovidrio 45S5 ya que la presencia de ellas en poca cantidad.

Tabla 4.1. Resultados del análisis por FRX del polvo de biovidrio 45S5 en % en peso.

SiO ₂	CaO	Na ₂ O	P ₂ O ₅	MgO	Al ₂ O ₃	K ₂ O	TiO ₂	Fe ₂ O ₃	MnO	Total
47.74	21.48	22.65	3.165	0.197	2.047	0.139	0.068	0.081	0.002	98.987

4.1.4. Análisis por microscopía electrónica de barrido (MEB)

Los resultados del análisis por MEB del polvo de biovidrio 45S5 se muestran en la Figura 4.3. En la imagen por electrones secundarios de la Fig. 4.3(a) muestra un análisis del área del biovidrio a 1000x de donde se puede observar en general una amplia distribución de tamaño de partícula, entre 8-45 μm , Figura 4.3(a), además, las partículas presentan una morfología característica de los materiales frágiles, es decir, partículas con caras facetadas, se observa también alguna zonas con aglomeración. La Figura 4.3(b), muestra el análisis EDS en el que se observan los elementos que componen el biovidrio, así como sus cantidades en % en peso; una vez comparando estos resultados con la composición del biovidrio 45S5, se observa que los valores no coinciden con la composición teórica, esto se debe a que se trata de análisis puntuales que se realizaron a altas magnificaciones y no son representativos del total de la muestra, Tabla 4.2.

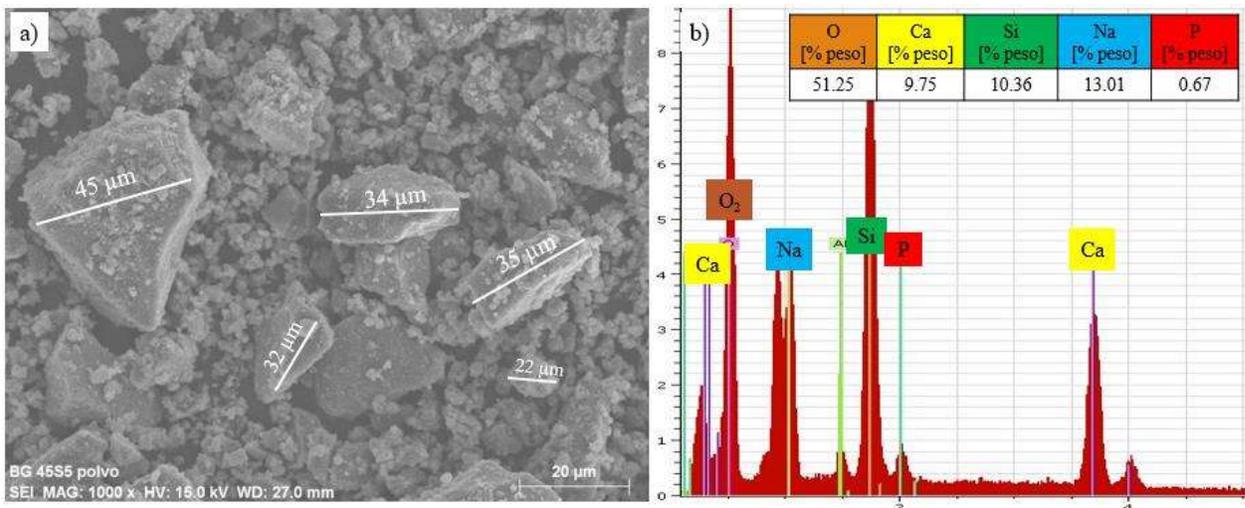


Figura 4.3. (a) Imagen por MEB a 1000x y (b) el análisis EDS correspondiente al polvo de biovidrio 45S5.

Tabla 4.2. Comparación de los resultados EDS con la composición del biovidrio 45S5.

Óxidos	PM	% peso	% mol	Elemento	PA	% peso	% at.	EDS	Norm
SiO ₂	60.08	45	46.13	Si	28.08	21.03	24.19	10.36	12.18
CaO	56.08	24.5	26.91	Ca	40.08	17.50	28.73	9.75	11.46
Na ₂ O	61.96	24.5	24.35	Na	22.98	18.17	17.10	13.01	15.29
P ₂ O ₅	141.94	6	2.60	P	30	2.61	3.32	0.67	0.78
				O	16	40.66	26.63	52.25	60.26
	TOTAL	100	100			100	100	85.04	100

4.1.5. Análisis por difracción de rayos X (DRX)

Con la finalidad de corroborar la naturaleza amorfa característica de los vidrios, se realizó un análisis por difracción de rayos X del polvo de biovidrio 45S5, obteniendo como resultado el patrón de difracción mostrada en la Figura 4.4. El difractograma obtenido presenta un halo amorfo en el rango 2θ de 25-35°, sin la presencia de reflexiones correspondientes a fases cristalinas, característico de un material preparado por la técnica convencional de fusión y temple, que corrobora la capacidad para formar vidrios que tiene esta composición.

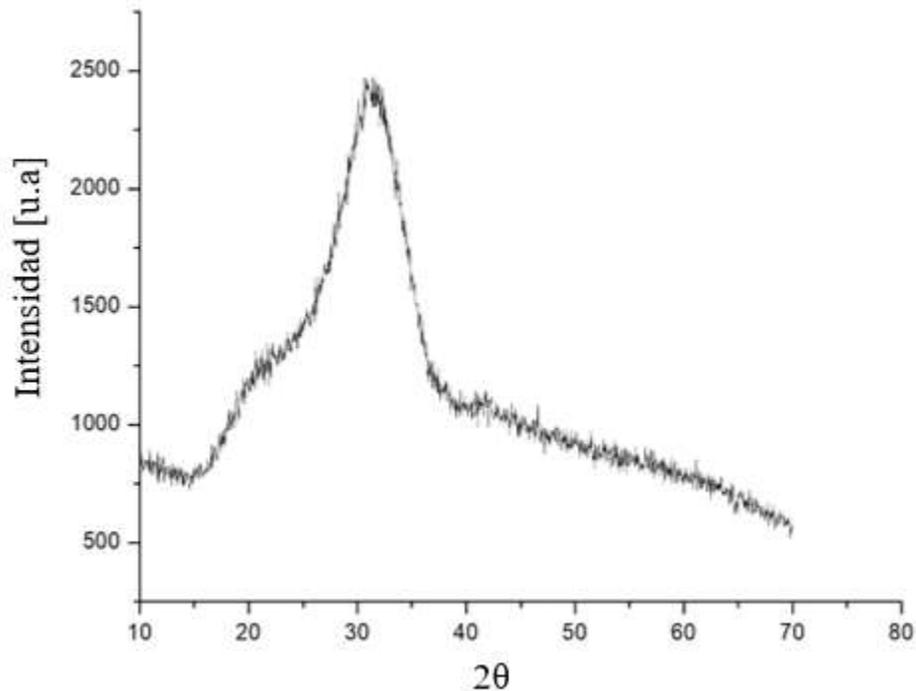


Figura 4.4. Difractograma del polvo de biovidrio 45S5.

4.1.6. Análisis por espectroscopía infrarroja (FT-IR)

La Figura 4.5 muestra el espectro resultante del polvo de biovidrio 45S5 donde se indican las bandas típicas de este material. Se observa en principio una pequeña banda a 3597.66 cm^{-1} correspondiente al grupo Si-OH, la banda ancha centrada en el intervalo de $3000\text{-}3500\text{ cm}^{-1}$ puede asignarse al grupo hidroxilo (O-H) o moléculas de agua adsorbidas. Las bandas 1495.18 y 1440.13 cm^{-1} corresponden a vibraciones características de PO_2 sin puente en PO_4^{3-} [76]. La banda a 1040.22 cm^{-1} corresponde a estiramientos asimétricos de Si-O-Si y la banda a 929.83 cm^{-1} es atribuida al estiramiento simétrico de átomos de oxígeno que no forman puentes entre los tetraedros de silicato, Si-O (NBO – *non-bridging oxygen*) [77, 78]. Finalmente una pequeña banda a 454.17 cm^{-1} corresponde al modo de flexión simétrico del grupo Si-O-Si [78-80]. Estas tres bandas son atribuidas a los vidrios de sílice amorfos.

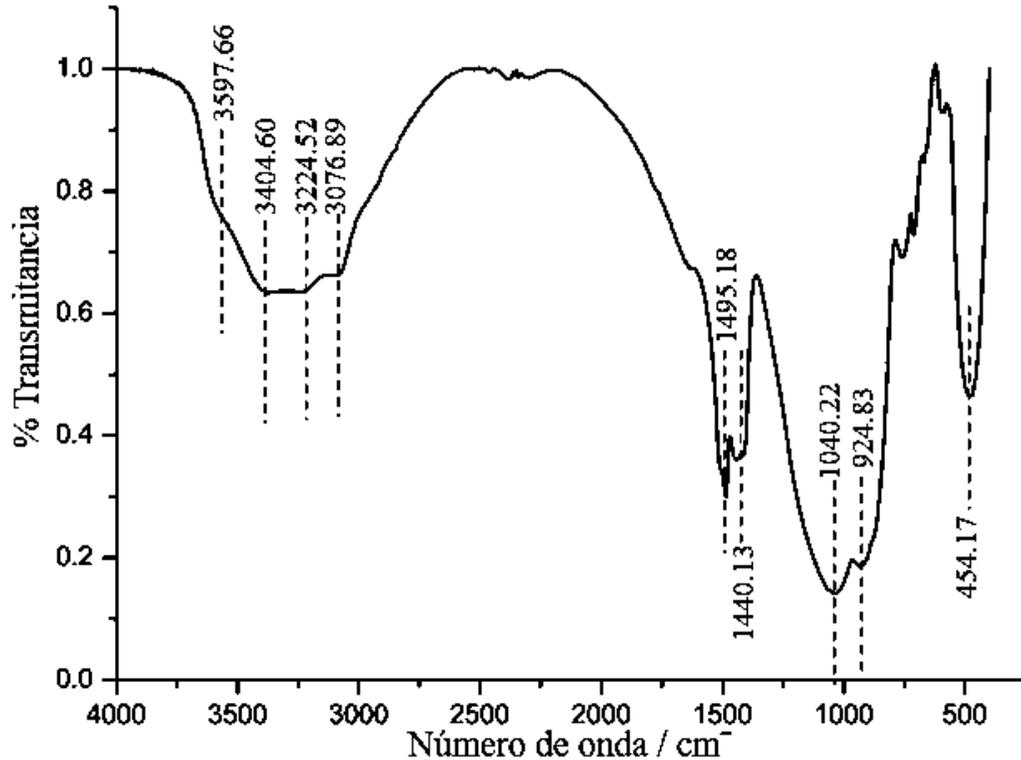


Figura 4.5. Análisis por espectroscopía infrarroja del polvo de biovidrio 45S5.

4.2. Análisis de los andamios de biovidrio 45S5 sinterizados

4.2.1. Determinación del área superficial y distribución de tamaño de poro

La Figura 4.6 muestra las isotermas de adsorción de nitrógeno obtenidas mediante el método de BET, los tipos de isotermas resultantes corresponden al tipo IV. La Figura 4.6(a) muestra la isoterma del andamio sinterizado a 800°C, en el cual se observa una isoterma irreversible debido al comportamiento de desorción (línea roja) que no se superpone al de adsorción (línea negra) permitiendo la formación de lazos de histéresis debido a la distribución de poros angostos por lo que el nitrógeno queda atrapado en los poros. Por otro lado, la Figura 4.6(b) y (c), de los andamios sinterizados a 850 y 900°C, respectivamente, muestran isotermas con un comportamiento aproximadamente lineal, ya que el comportamiento de desorción se superpone al de adsorción, representando una monocapa de gotas de nitrógeno que se condensan en el material. Este tipo de isoterma está relacionado con los materiales mesoporos de acuerdo a las especificaciones marcadas por la IUPAC.

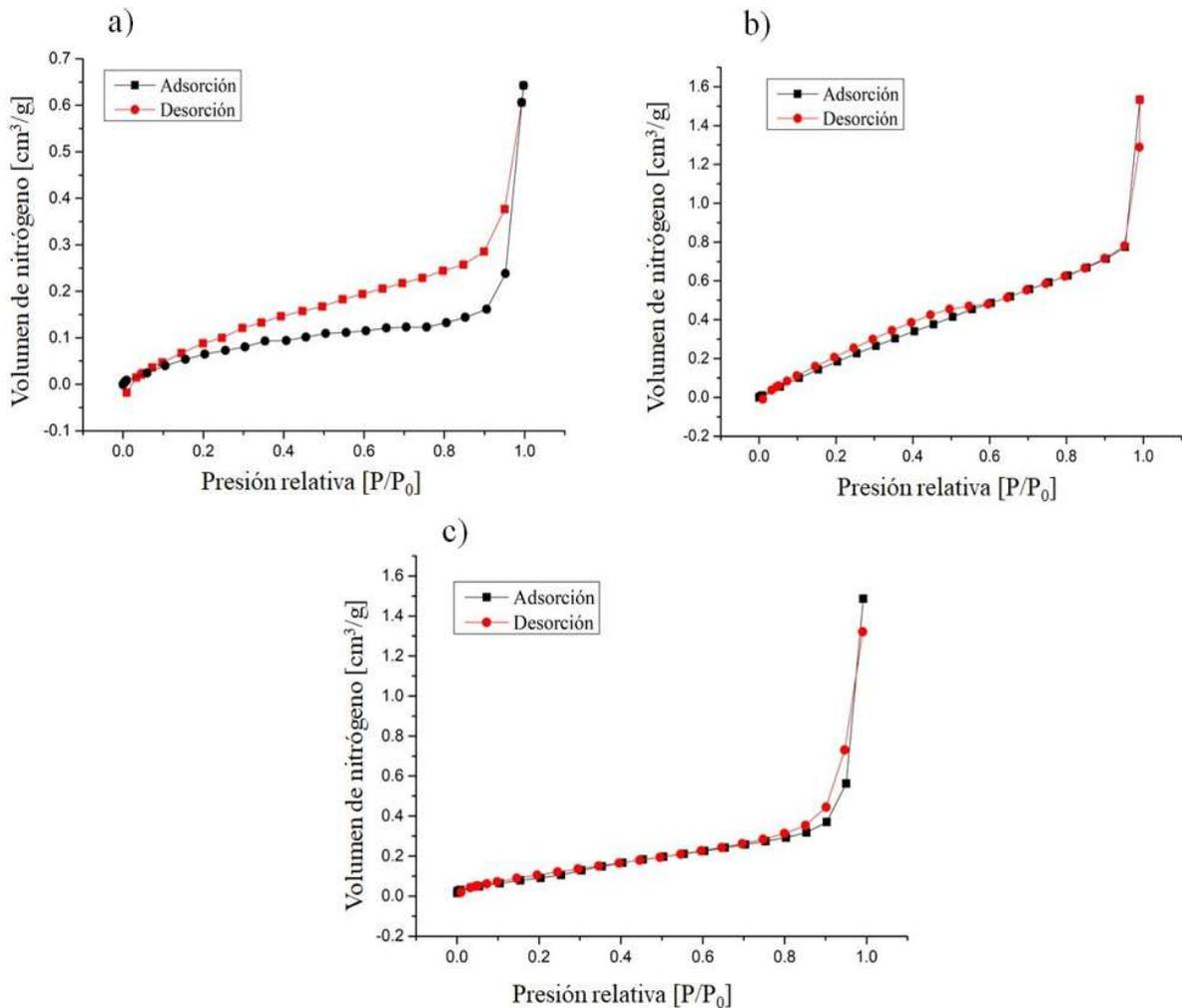


Figura 4.6. Isothermas de adsorción de nitrógeno por BET de los andamios sinterizados a: (a) 800, (b) 850 y (c) 900 °C.

Mediante el método Barrett Joyney Halenda (BJH), se realizó el análisis de distribución de poro el cual se aprecia en la Figura 4.7, donde se observa como efectivamente los andamios sinterizados a 800°C, Figura 4.7(a), presentan una mayor presencia de mesoporos para la unión de las células, pero con poca presencia de macroporos, además, de presentar un amplio volumen de mesoporos a diferencia de los andamios sinterizados a 850 y 900°C. A medida que incrementa la temperatura de sinterización de 850 a 900°C la presencia de meso y macroporos van desapareciendo significativamente el cual es más notorio a 900°C como se muestra en la Figura 4.7(c). La Tabla 4.3, muestra los resultados de área superficial, vol. de poro y diámetro de poro, de los andamios sinterizados a 800, 850 y 900°C.

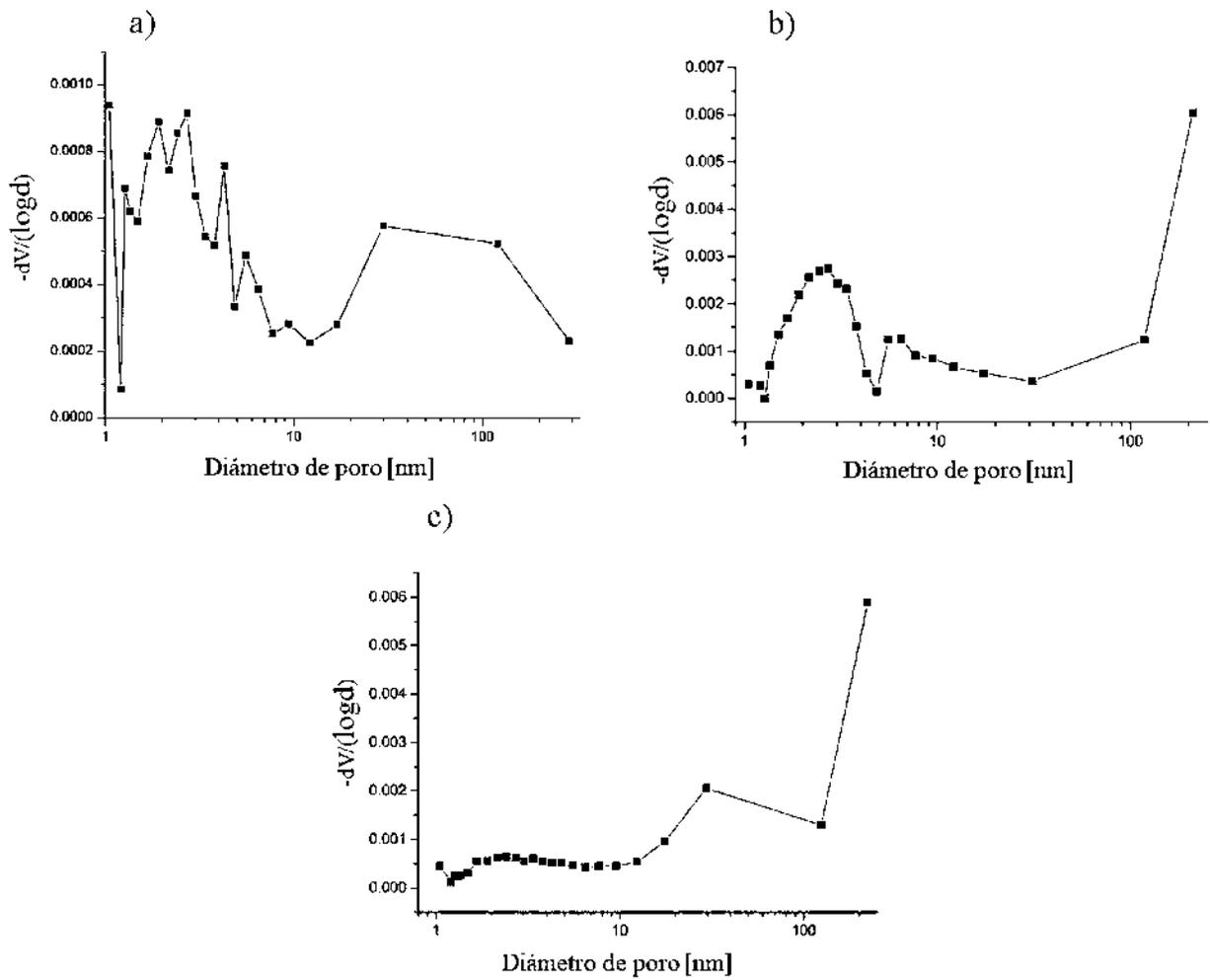


Figura 4.7. Distribución de tamaño de poro mediante BJH, de los andamios de biovidrio 45S5 sinterizados a (a). 800, (b) 850 y (c) 900 °C.

Tabla 4.3. Resultados de los análisis por BJH y BET.

Temperatura sinterización [°C]	Área superficial [m ² /g]	Vol. de poro [cm ³ /g]	Diámetro promedio de poro [nm]
800	0.289	0.001	1.1
850	1.319	0.003	2.2
900	0.351	0.002	1.1

La Figura 4.8 muestra los histogramas resultantes de los andamios sinterizados a diferentes temperaturas analizados mediante el software Nano measurer. Para los andamios sinterizados a 800 °C existe una amplia distribución de tamaños de poros que van desde 5-300 μm (Figura 4.8(a)). Mientras que para los andamios a 850 y 900°C, no se observa una distribución de tamaños de poro homogénea en la microestructura del andamio, esto es debido a las altas temperaturas de sinterización ya que a medida que incrementa la temperatura reduce el tamaño del poro dando lugar a un andamio consolidado con una estrecha distribución de tamaños de poro (Figura (a y b)).

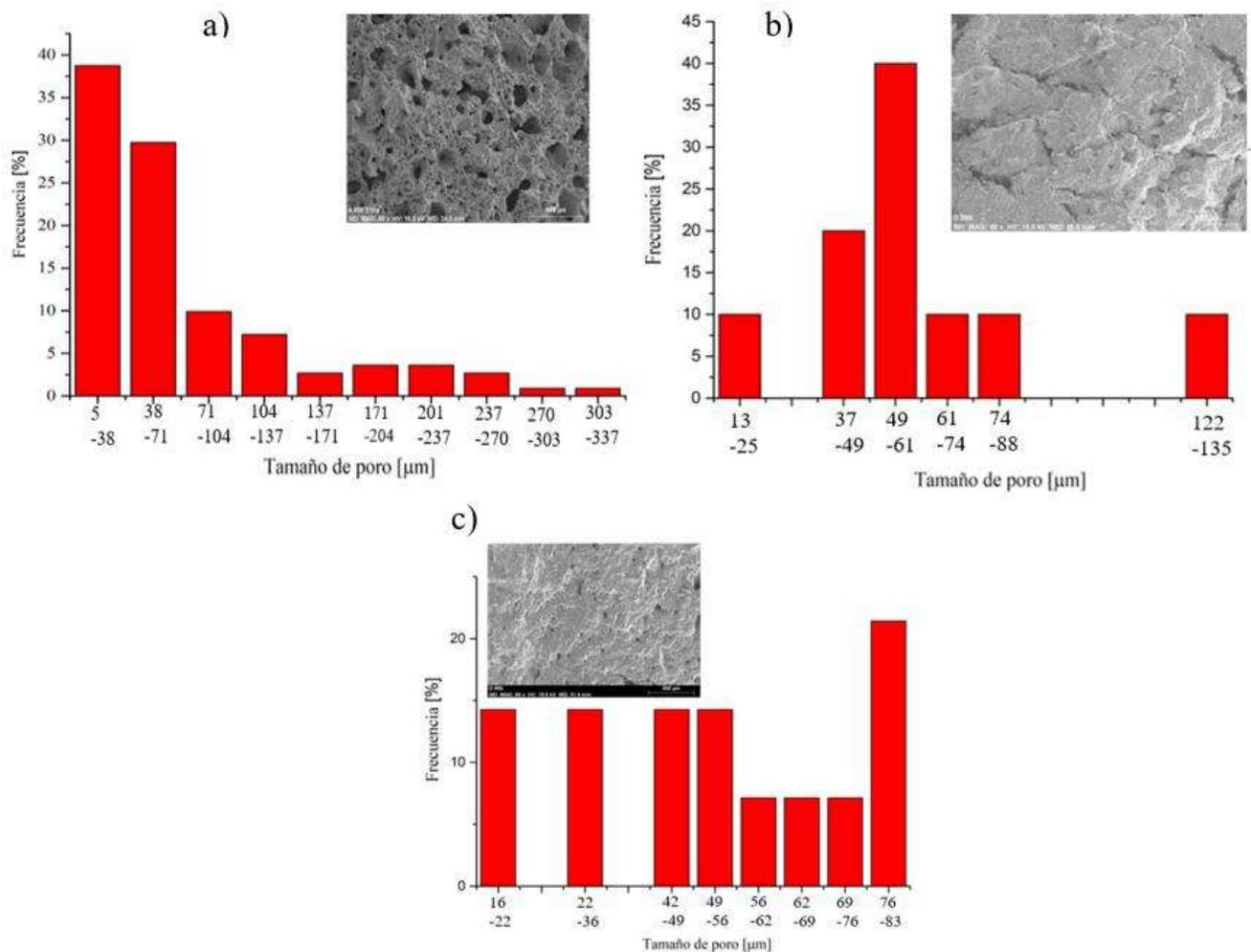


Figura 4.8. Histogramas por *Nano measurer*; (a) 800 °C, (b) 850°C y (c) 900 °C.

4.2.2. Microscopía electrónica de barrido (MEB)

La Figura 4.9, muestra las micrografías resultantes de los andamios sinterizados a 800 °C durante 3 horas, observadas a diferentes magnificaciones. En las micrografías se observa la presencia de poros abiertos e interconectados con macro y microporos de tamaños de 15-271 μm . Se observa también como la temperatura de sinterización, además de permitir la formación de poros interconectados dio lugar a la formación de paredes y superficies rugosas, lo cuales son factores importantes para la fácil adhesión de las células.

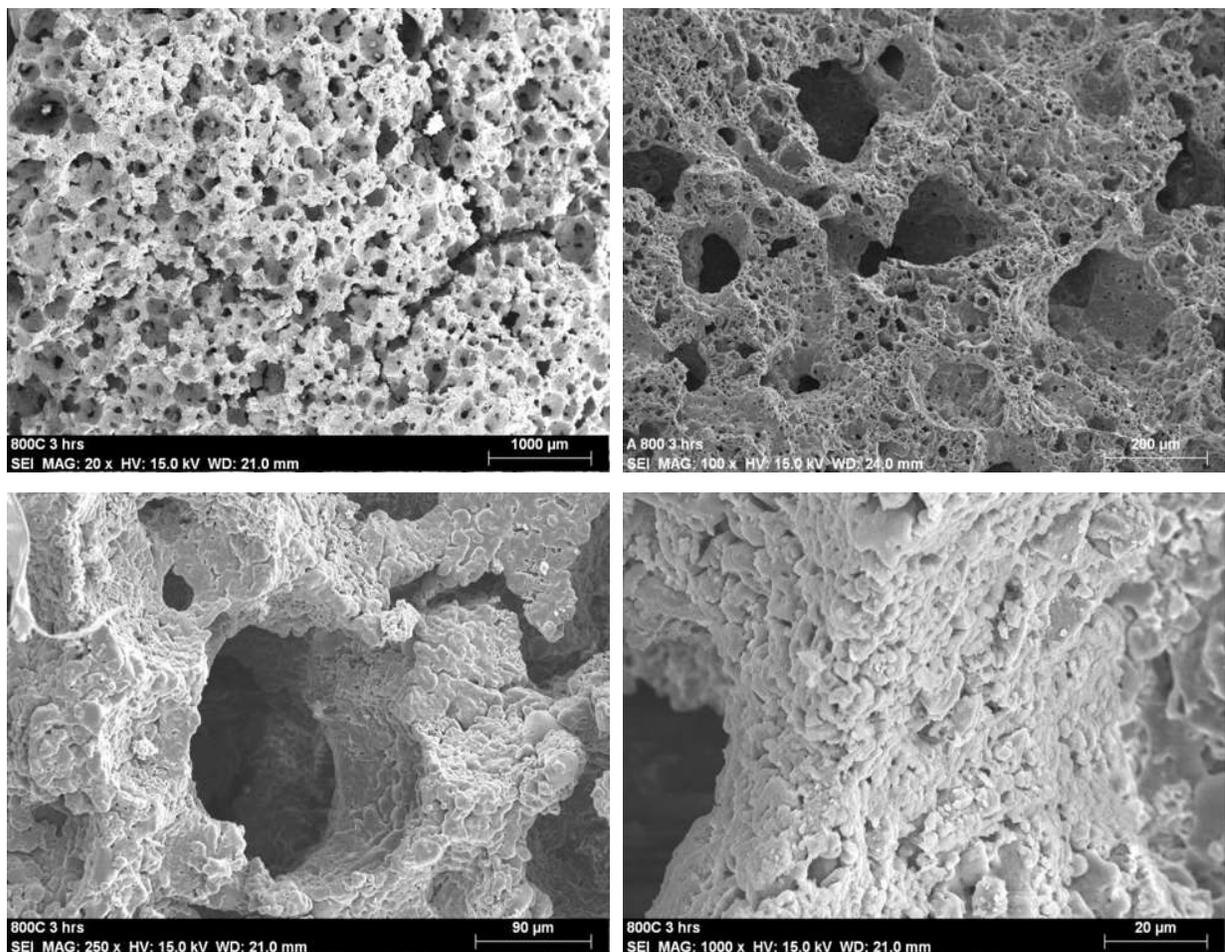


Figura 4.9. Imágenes por MEB de los andamios sinterizados a 800°C durante 3 horas, (a) 20x, (b) 100x, (c) 250x y (d) 1000x.

La Figura 4.10 muestra las micrografías obtenidas de los andamios sinterizados a 850 °C, a 20x de magnificación se pueden observar algunas zonas agrietadas causadas por el desmoldeo de la pieza. Se tomaron imágenes a mayores magnificaciones con la finalidad de observar a más detalle. A 1000x se observan poros cerrados con tamaños que van de 5.6-9.4 μm , asimismo se hacen presentes unas pequeñas hojuelas. Por lo que tratar térmicamente los andamios a 850°C, no es viable ya que a esta temperatura se obtiene andamios con paredes densas y con una ausencia de poros debido a la sinterización extensiva de las partículas de biovidrio.

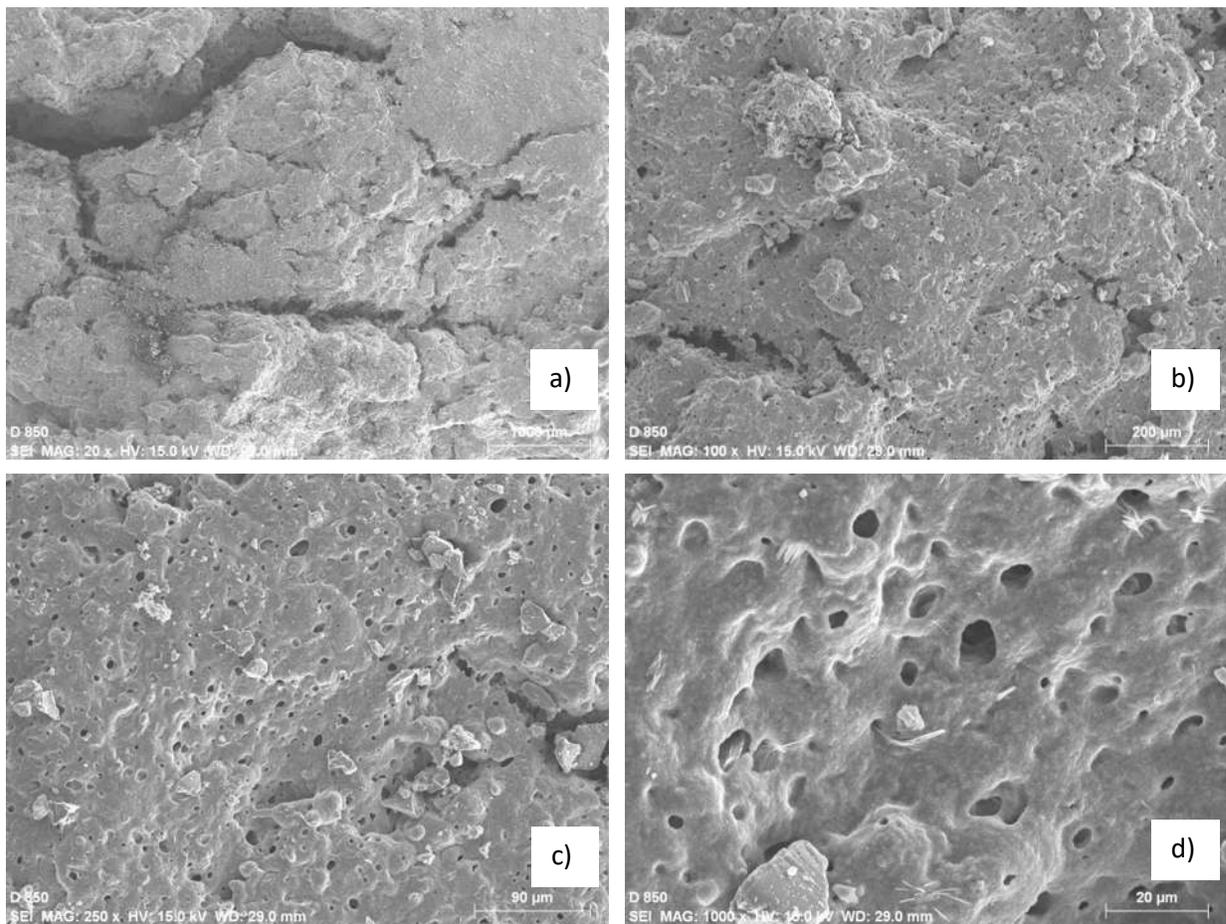


Figura 4.10. Imágenes por MEB de los andamios sinterizados a 850 °C durante 3 horas, (a) 20x, (b)100x, (c)250x y (d)1000x.

Imágenes por MEB de los andamios sinterizados a 900 °C se muestran en la Figura 4.11, donde se puede observar la poca presencia de poros, y las paredes completamente densas. La poca presencia

de poros, de tamaños en el rango de 5.1-9 μm ., es atribuida a la elevada temperatura de sinterización, dado que a medida que aumenta la temperatura favorece la unión entre partículas dando lugar a la formación de andamios completamente consolidados, por lo que las temperaturas de 850 y 900 $^{\circ}\text{C}$ no son viables para la formación de andamios porosos.

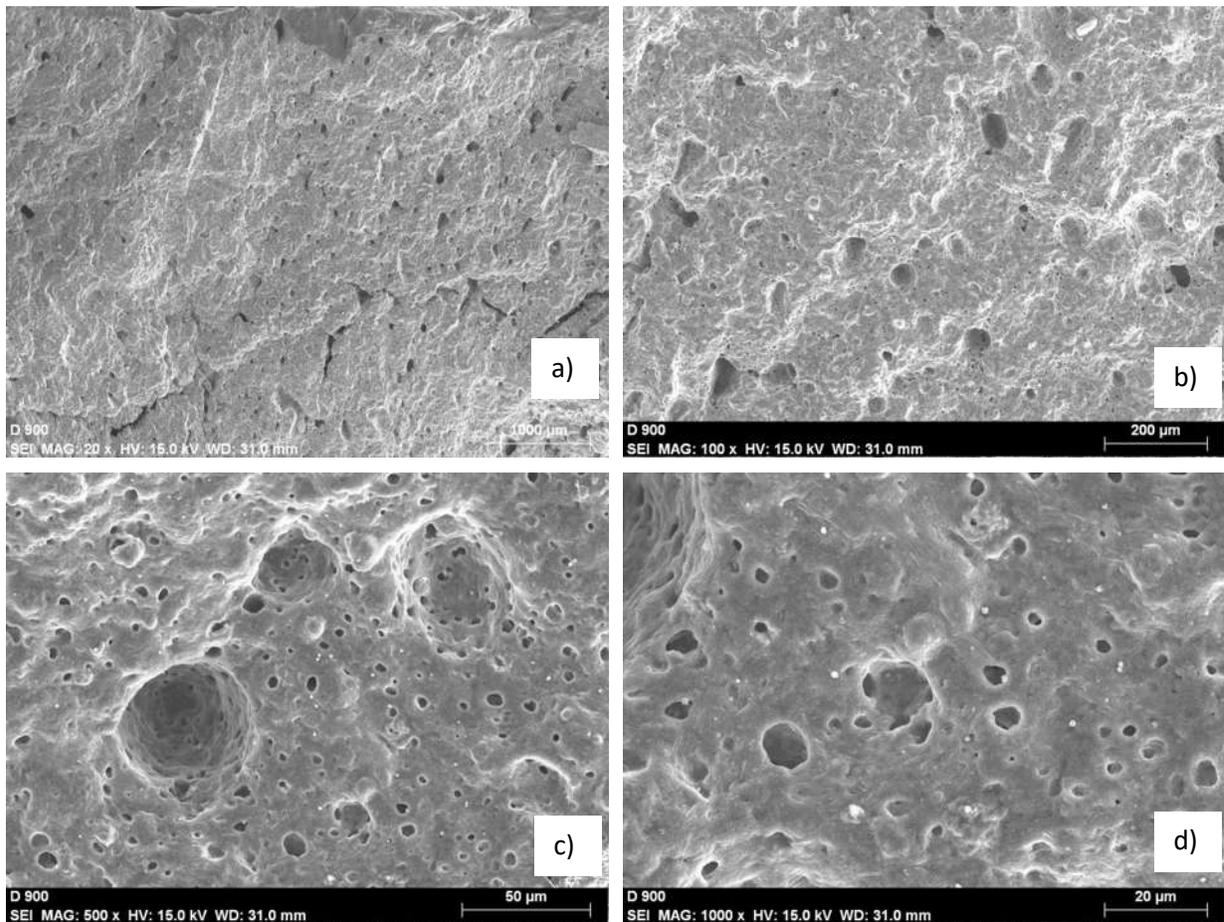


Figura 4.11. Imágenes por MEB de los andamios sinterizados a 900 $^{\circ}\text{C}$ durante 3 horas, (a) 20x, (b)100x, (c)250x y (d)1000x.

La Figura 4.12 es una comparación de los diferentes tamaños de poro obtenidos después de la sinterización de los andamios a 800, 850 y 900 $^{\circ}\text{C}$, con poros de 15-271, 13-135 y 16-83 μm respectivamente. Se observa como a medida que aumenta la temperatura de sinterización los poros se van uniendo entre permitiendo un cambio en la microestructura, por lo que las elevadas temperaturas de sinterización no son viables para tratar térmicamente los andamios.

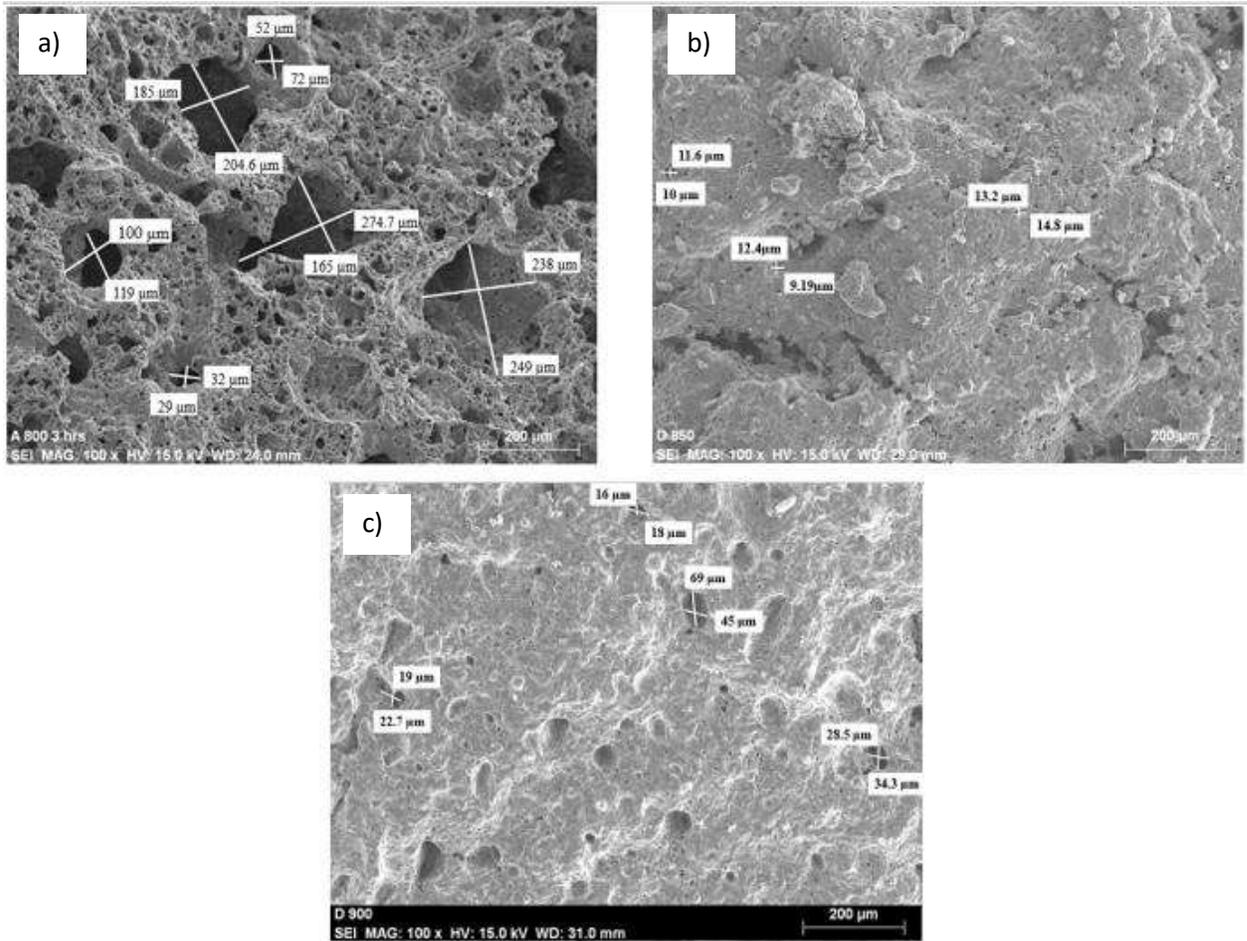


Figura 4.12. Comparación de los tamaños de poro en los andamios sinterizados a: (a) 800°C a 100x, (b) 850°C a 1000x y (c) 900°C a 1000x.

Aguilar y col. [36] fabricaron andamios de vidrio bioactivo 45S5 mediante el método de tecnología de polvos. El sinterizado de los andamios se realizó en el rango de temperaturas de 950-1025 °C. De la Figura 4.13 se puede observar que para ambas temperaturas de sinterización de 950 y 1025°C se obtuvieron poros homogéneos e interconectados; sin embargo tanto la microestructura final de los andamios, como la porosidad y la densificación de las paredes se vieron afectadas con el incremento de la temperatura. Se obtuvieron valores de porosidad de 79 y 64%, y densidades de 0.558 y 0.969 g/cm³, para 950 y 1025°C, respectivamente.

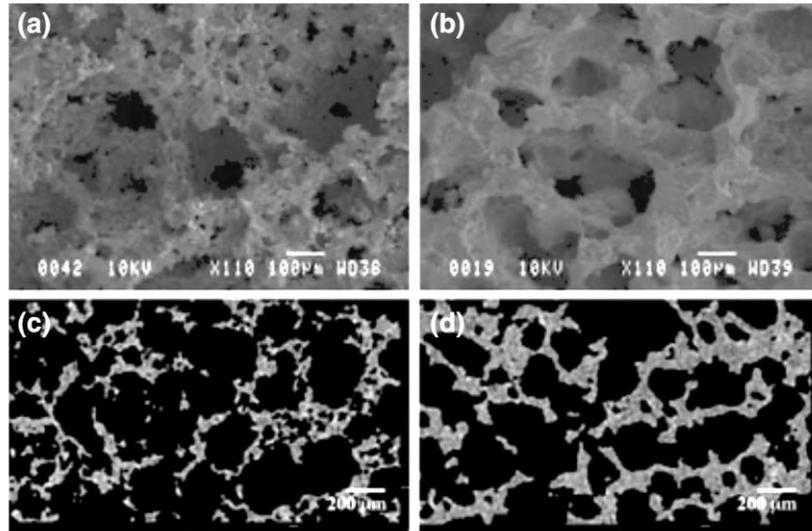


Figura 4.13. Micrografías de los andamios de vidrio bioactivo 45S5 sinterizados a; (a) 950 °C. (b) 975 °C, (c) 1000 °C y (d) 1025 °C [36].

4.2.3. Análisis por difracción de rayos X (DRX)

La Figura 4.14 muestra los difractogramas del biovidrio 45S5 y de los andamios sinterizados a 800, 850 y 900 °C. Es evidente la transformación de la fase amorfa propia del biovidrio 45S5 a dos fases cristalinas en los andamios sinterizados a las diferentes temperaturas. Las fases resultantes corresponden a una fase principal $\text{Na}_6\text{Ca}_3\text{Si}_6\text{O}_{18}$ (JCPDS 77-2187) y una fase secundaria $\text{Na}_2\text{Ca}_4(\text{PO}_4)_2\text{SiO}_4$ (JCPDS 32-1053, silicorhernanita), de acuerdo a los difractogramas obtenidos se puede observar que no existe ninguna variación en los picos obtenidos a las tres temperaturas. Las fases obtenidas ya han sido reportadas anteriormente por otros investigadores para el biovidrio 45S5 tratado térmicamente. Lin y col. [81] encontraron estas dos fases después de tratar térmicamente al biovidrio 45S5 a 715°C. Lefebvre y col. [74] trataron térmicamente al biovidrio 45S5 en el rango de 550-800°C, obteniendo una fase principal de $\text{Na}_2\text{CaSi}_2\text{O}_6$ a 600-700 °C, y una fase secundaria de silicato-reinita a 800°C, esta última es debido a la evolución de la fase vítrea rica en fosfato, que todavía está presente después de la primera cristalización.

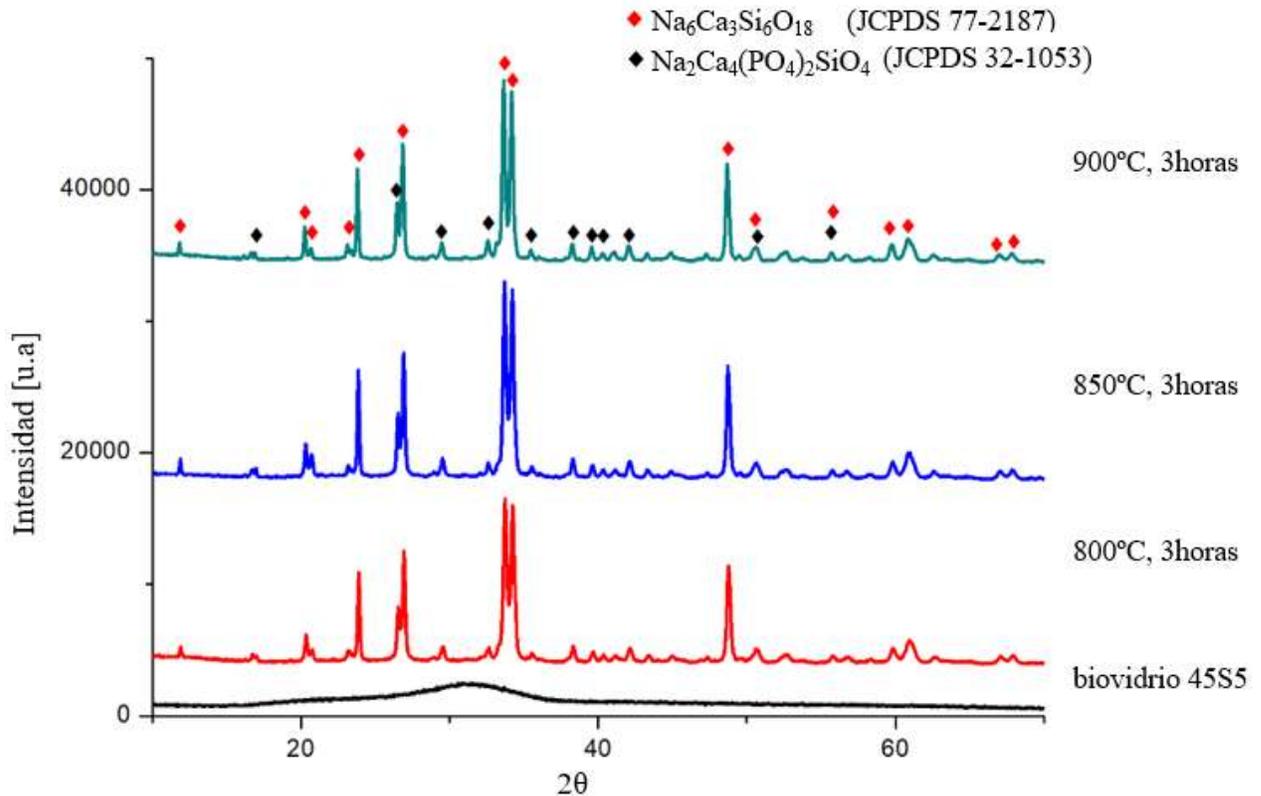


Figura 4.14. Difractogramas de los andamios de biovidrio 45S5 sinterizados a 800, 850 y 900 °C.

4.2.4. Análisis por espectroscopía infrarroja (FT-IR)

La Figura 4.15 muestra los espectros FT-IR resultantes del andamio en verde con respecto a los obtenidos para los andamios sinterizados a 800, 900 y 950 °C. Se observa a 3431.34 cm^{-1} una pequeña banda correspondiente a grupos O-H o moléculas de agua adsorbida. La banda a 2922.35 cm^{-1} es atribuida a los enlaces C-H en el surfactante orgánico [48]. Se observa una banda atribuida al modo de vibración C-O en 1382 cm^{-1} debido a la activación alcalina dando lugar a la formación de compuestos de carbonato. La banda a 1042.53 cm^{-1} corresponde a estiramientos simétricos de Si-O-Si, y la banda a 926.11 cm^{-1} al estiramiento simétrico de átomos de oxígeno que no son formadores de puentes entre los tetraedros de silicato Si-O (NBO). Se identificaron bandas correspondientes a vibraciones de flexión del grupo P-O en 696.28 y 610 cm^{-1} , finalmente una banda a 454.17 cm^{-1} atribuido al modo de flexión simétrico de Si-O-Si [78, 79]. Es evidente que el comportamiento de las bandas O-H, C-H, C-O, Si-O-Si, Si-O(NBO) y P-O, para los andamios en verde y sinterizados no muestran una diferencia significativa en su comportamiento.

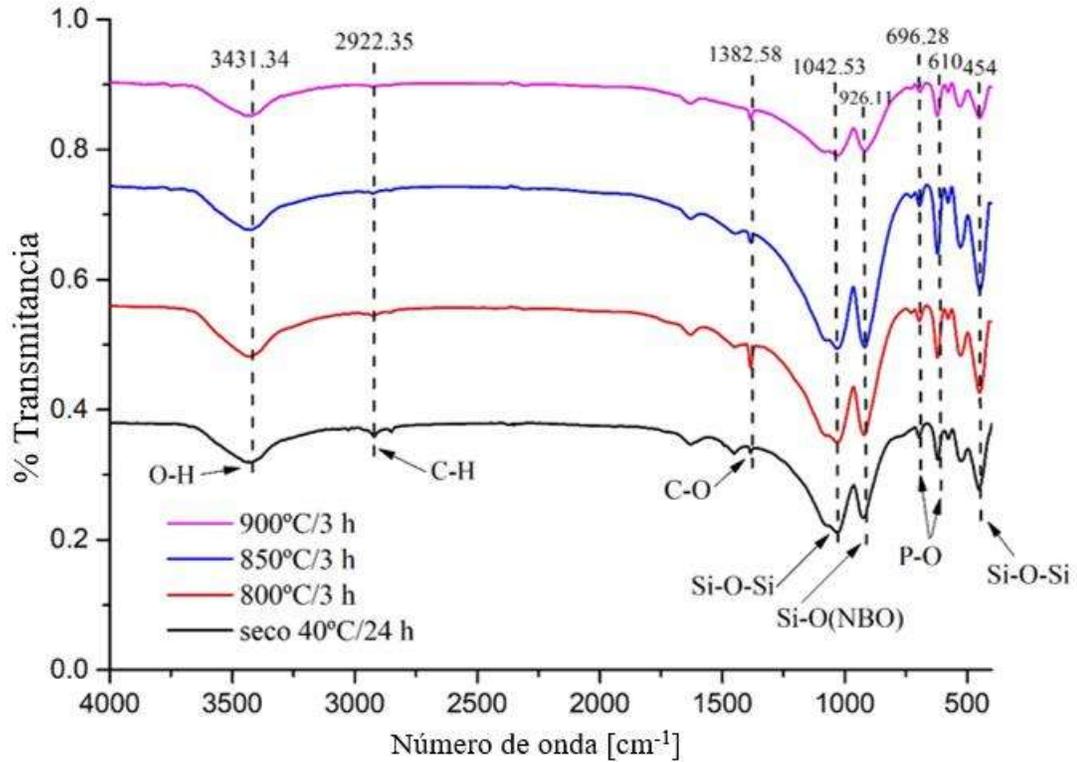


Figura 4.15. a) Comparación de los espectros FT-IR obtenidos de los andamios sinterizados a diferentes temperaturas con respecto al andamio en verde.

4.2.5. Resultados de porosidad y de pruebas de resistencia a la compresión

La Tabla 4.4 y la Figura 4.16 muestran los resultados obtenidos de las pruebas de compresión de los andamios sinterizados a 800, 850 y 900 °C, así como los valores de porosidad correspondientes, observándose como a medida que incrementa la temperatura la porosidad disminuye provocando que el valor de resistencia a la compresión incremente.

Tabla 4.4. Resultados de la prueba de resistencia a la compresión.

Temperatura [°C]	Porosidad [%]	Resistencia a la compresión [MPa]
800	73.94	4.93±0.28
850	34.64	5.12±0.20
900	57.28	6.08±0.17

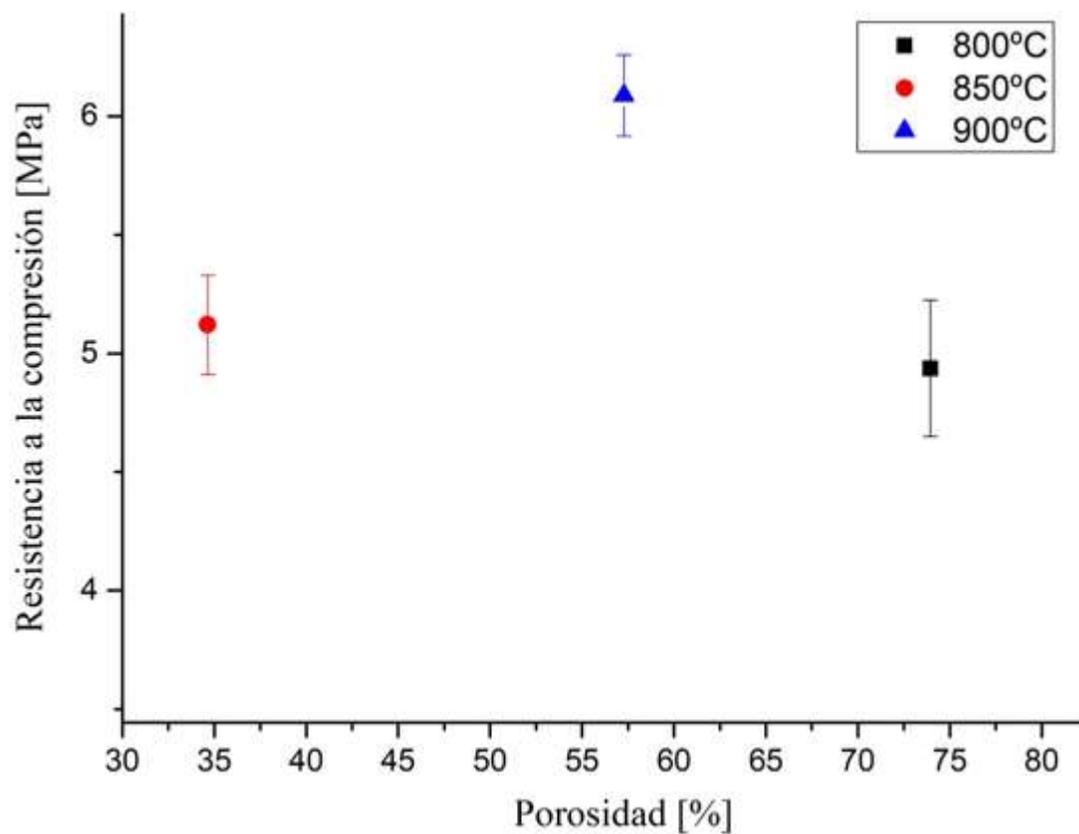


Figura 4.16. Comportamiento mecánico-poroso de los andamios sinterizados a diferentes temperaturas.

La Tabla 4.5, muestra algunos resultados de % porosidad y de resistencia a la compresión obtenidos por otros investigadores utilizando otros métodos de fabricación para la obtención de andamios 3D, para la aplicación en la regeneración del tejido óseo.

Tabla 4.5. Comparación de métodos de fabricación de andamios para la ingeniería de tejidos.

Material	Proceso	Temperatura [°C]	Tamaño de poro [µm]	Porosidad [%]	Resistencia a la compresión	Ref.
Biovidrido 45S5	Tecnología de polvos	950-1025/1 h	335-530	64-79	1.7-5.5	[36]
Biovidrio 45S5	Tecnología de polvos	975	25-600	61.44±3.13	13.78 ± 2.43	[42]
Bioglass® 45S5	Réplica	1000/1 h	510-720	89-92	0.27-0.42	[44]
CEL 2	Colada en gel inorgánica	900-1000/1 h	170	80	2.5-5	[53]
Wollastonita-Diópsido	Colada en gel inorgánica	900-1000/1 h	170	800	5	[48]
Vidrio bioactivo (13-93)	Extrusión por congelación (FEF)	700/ 1 h	300	50	140± 70	[82]

De acuerdo a los resultados obtenidos por otros investigadores, los resultados obtenidos en esta investigación son satisfactorios ya que presentan valores de resistencia a la compresión (2-12 MPa) y de porosidad (50-90%) que se encuentran dentro del rango del hueso trabecular.

4.3. Ensayos de bioactividad

Para los ensayos de bioactividad se utilizaron dos tipos de materiales de diferente composición, con el objetivo de confirmar que la formación de la capa de hidroxiapatita solamente tiene lugar en materiales bioactivos. Se utilizaron los andamios de biovidrio 45S5 sinterizados a 800 °C, ya que presentaron mejor microestructura y resistencia a la compresión a diferencia de los andamios sinterizados a 850 y 900 °C. Además, se utilizó como control negativo el vidrio convencional del sistema Na₂O-CaO-SiO₂ conocidos como vidrio de silicato sódico-cálcico.

La Figura 4.17 muestra la gráfica de variación de pH de la solución SBF en los diferentes puntos de tiempo de inmersión. Se puede observar que el pH fue mayor al valor inicial de 7.4 en los

diferentes puntos de tiempo de inmersión. Al día 1 de inmersión el pH alcanzó un valor máximo de 7.9 y éste fue disminuyendo a medida que los días de inmersión incrementaban. De acuerdo al mecanismo de reacción descrito en la Sección 2.9, los biovidrios a base de silicatos experimentan un intercambio catiónico (Na^+ , Ca^{2+} , H^+) con el fluido fisiológico simulado que hace que incremente el pH, a medida que transcurre el tiempo también se da la formación de una película de gel de silica y posteriormente la depositación de una capa de fosfato de calcio amorfo la cual cristaliza para formar la fase de hidroxiapatita. Este proceso de precipitación va recubriendo la superficie del material quedando menos área expuesta del biovidrio para que se lleven a cabo las reacciones de disolución, observándose así una disminución en el pH. Lo anterior se puede corroborar en las imágenes por MEB en la siguiente Sección.

Por otro lado, el pH del vidrio convencional se mantuvo igual al valor inicial (7.4), para todos los tiempos de inmersión.

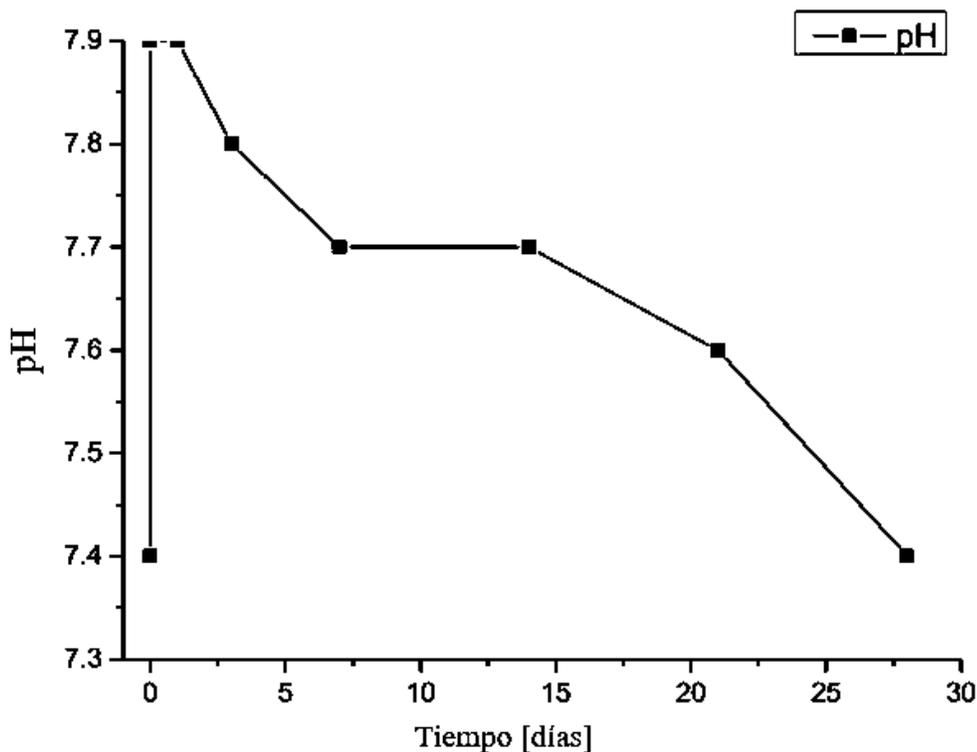
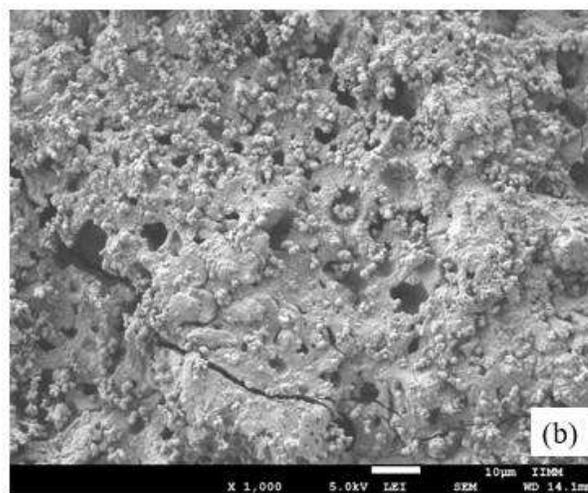
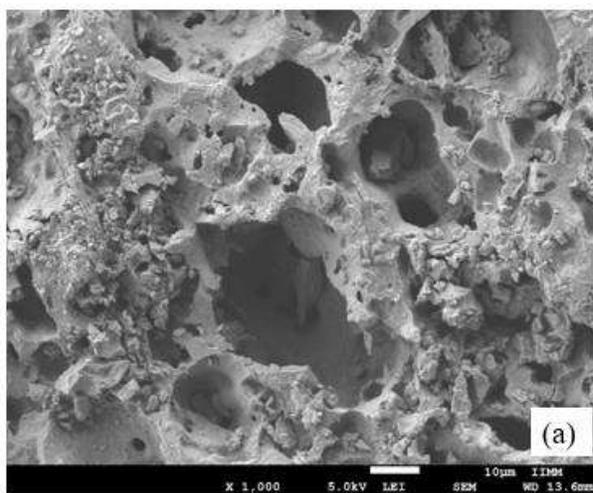


Figura 4.17. Gráfica de variación del pH de la solución SBF en los diferentes puntos de tiempo de inmersión.

4.3.1. Análisis por microscopía electrónica de barrido (MEB)

La Figura 4.18 muestra imágenes por MEB, a la misma magnificación de 1000x para comparación, de los andamios en los diferentes puntos de tiempo de inmersión en SBF (1, 3, 7, 14, 21 y 28 días). En los días 1 y 3 (Figura 4.18(a) y (b)) se pueden observar pequeños precipitados sobre la superficie de los andamios que se distinguen como una fase más brillante y que son el inicio de la formación de la capa de hidroxiapatita. Después de los 7 días de inmersión (Figura 4.18(c)), se observa como la topografía del andamio cambia radicalmente y la superficie se encuentra ahora cubierta por pequeñas esferas aglomeradas que corresponden a la fase de hidroxiapatita con su morfología de tipo coliflor.

En los días 14, 21 y 28 (Figura 4.18(d)-(g)), la formación de dicha capa es aún más abundante logrando cubrir en su totalidad la superficie del andamio y ralentizando de esta manera la reacción de disolución del andamio y el en consecuencia el incremento en pH de la solución. La formación de la capa de hidroxiapatita permitirá que se lleven a cabo los cultivos celulares posteriores al controlar la reactividad de los andamios y mantener un pH constante de 7.4 ± 0.4 necesario para que se logró la adhesión de las células óseas, osteoblastos, y su proliferación, lo cual garantizará en su aplicación in vivo la regeneración del tejido óseo.



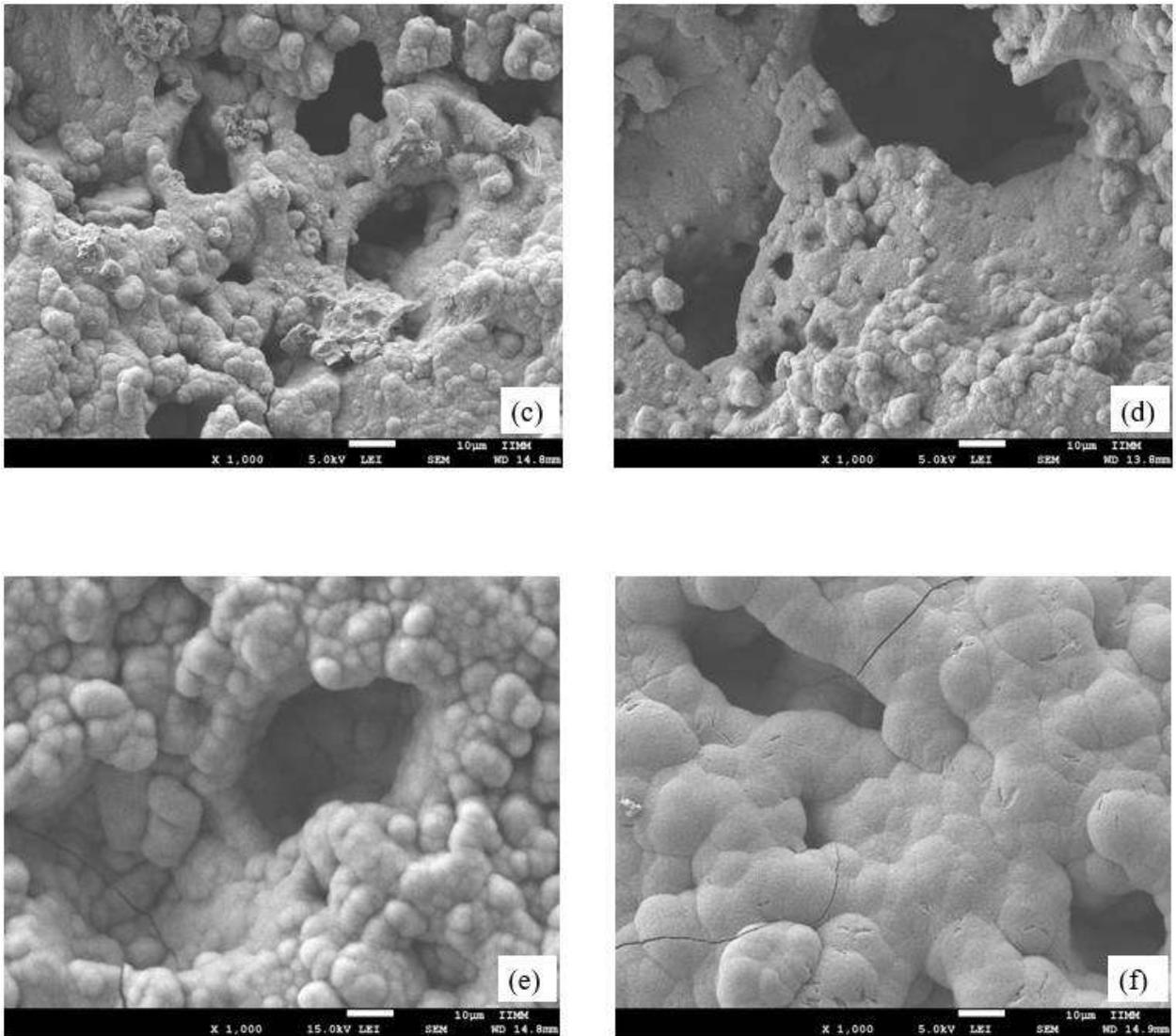


Figura 4.18. Micrografías obtenidas por MEB de los andamios de biovidrio en los diferentes de tiempos de inmersión en SBF: (a) 1 d, (b) 3 d, (c) 7 d, (d) 14 d, (e) 21d y (f) 28 d.

Este tipo de morfología tipo coliflor también ha sido reportada por Villicaña y col. [66] y Wu y col. [54]

La Figura 4.19, muestra una comparación de las micrografías obtenidas por MEB del vidrio convencional después de ser inmerso en SBF a diferentes tiempos. La Figura 4.19(a), corresponde al vidrio convencional previo a ser inmerso en SBF, mientras que las imágenes de 4.19(b) y (c), corresponden al vidrio después de ser inmerso 0, 7 y 28 días, respectivamente; a partir de estas imágenes se puede inferir que al tratarse de un material inerte o no bioactivo, no se llevó a cabo

ninguna reacción de disolución, intercambio iónico con el SBF y/o precipitación de hidroxiapatita sobre la superficie.

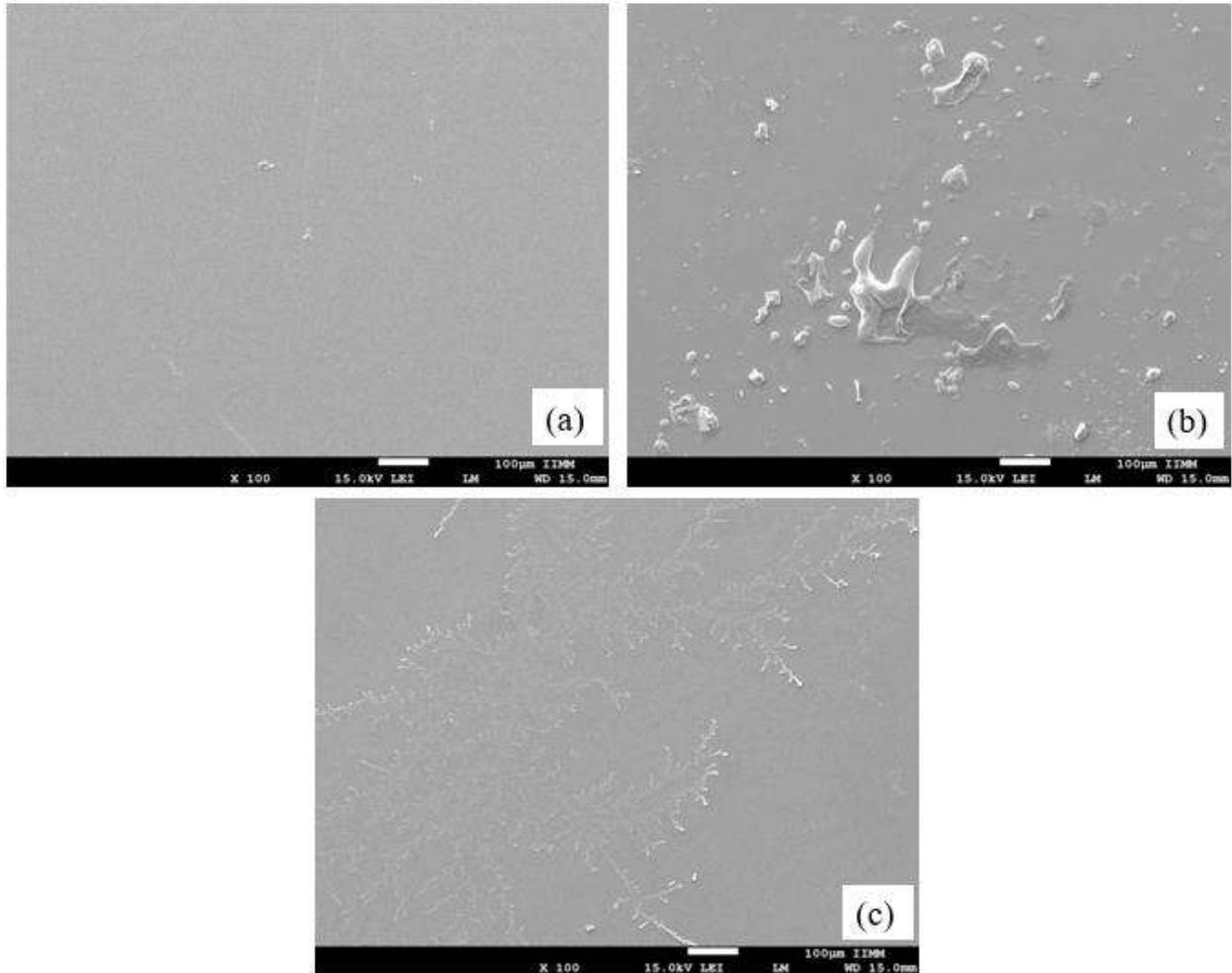


Figura 4.19. Micrografías obtenidas por MEB del vidrio convencional en los diferentes puntos de tiempo de inmersión en SBF: (a) 0 d, (b) 7 d y (c) 28 d.

4.3.2. Análisis por difracción de rayos X (DRX)

La Figura 4.20 muestra los resultados de DRX de los andamios de biovidrio en los diferentes puntos de tiempo de inmersión en SBF. En el primer día de inmersión en SBF, a pesar de que la superficie del andamio ha reaccionado con el fluido fisiológico simulado, todavía se observa un difractograma característico de un material completamente cristalino, con las dos fases cristalinas reportadas para

los andamios sinterizados, $\text{Na}_6\text{Ca}_3\text{Si}_6\text{O}_{18}$ (JCPDS 77-2187) y $\text{Na}_2\text{Ca}_4(\text{PO}_4)_2\text{SiO}_4$ (JCPDS 32-1053). Al día 3 de inmersión, estas reflexiones disminuyen en intensidad lo cual es un indicativo de que el material ha comenzado a amorfizarse en su superficie. La difusión de iones distorsiona la forma periódica y regular de la red de cristales hasta tal punto que finalmente se forma una estructura amorfa. Esto se ha observado en los cerámicos sinterizados de Bioglass 45S5 [83]. Posteriormente, la estructura amorfa se descompone en piezas finas o incluso iones, que pueden ser eliminados por el sistema fisiológico del cuerpo. A partir del día 7 son claramente visibles las reflexiones correspondientes a la fase de hidroxiapatita (JCPDS 01-1008), al mismo tiempo se observa la desaparición de las reflexiones que corresponden a las dos fases cristalinas presentes en los andamios sinterizados antes de la inmersión en SBF. A los 14 días de inmersión, las reflexiones de la hidroxiapatita son de mayor intensidad y en comparación con 21 y 28 días no se observa ningún cambio aparente en los patrones de difracción. Shih y col. [84] fabricaron andamos de vidrio bioactivo $\text{SiO}_2\text{-CaO-P}_2\text{O}_5$, así mismo realizaron pruebas de bioactividad in vitro con la finalidad de formar la capa de hidroxiapatita que facilitara la adhesión celular. Para la evaluación bioactiva se sumergieron los andamios en SBF para diferentes periodos de tiempo. Mediante la caracterización de DRX observaron picos de difracción con dirección 022 y 211 a 31.7° y 25.8° correspondientes a la hidroxiapatita. Por otro lado, Aguilar y col. [42] fabricaron andamios de vidrio bioactivo 45S5 para la regeneración ósea y evaluaron la bioactividad in vitro en diferentes periodos de tiempo (1, 3, 7, 14, 21 y 28 días). Mediante DRX observaron picos de difracción en $2\theta = 32\text{-}33^\circ$ correspondientes a la hidroxiapatita después de sumergir los andamios en diferentes tiempos.

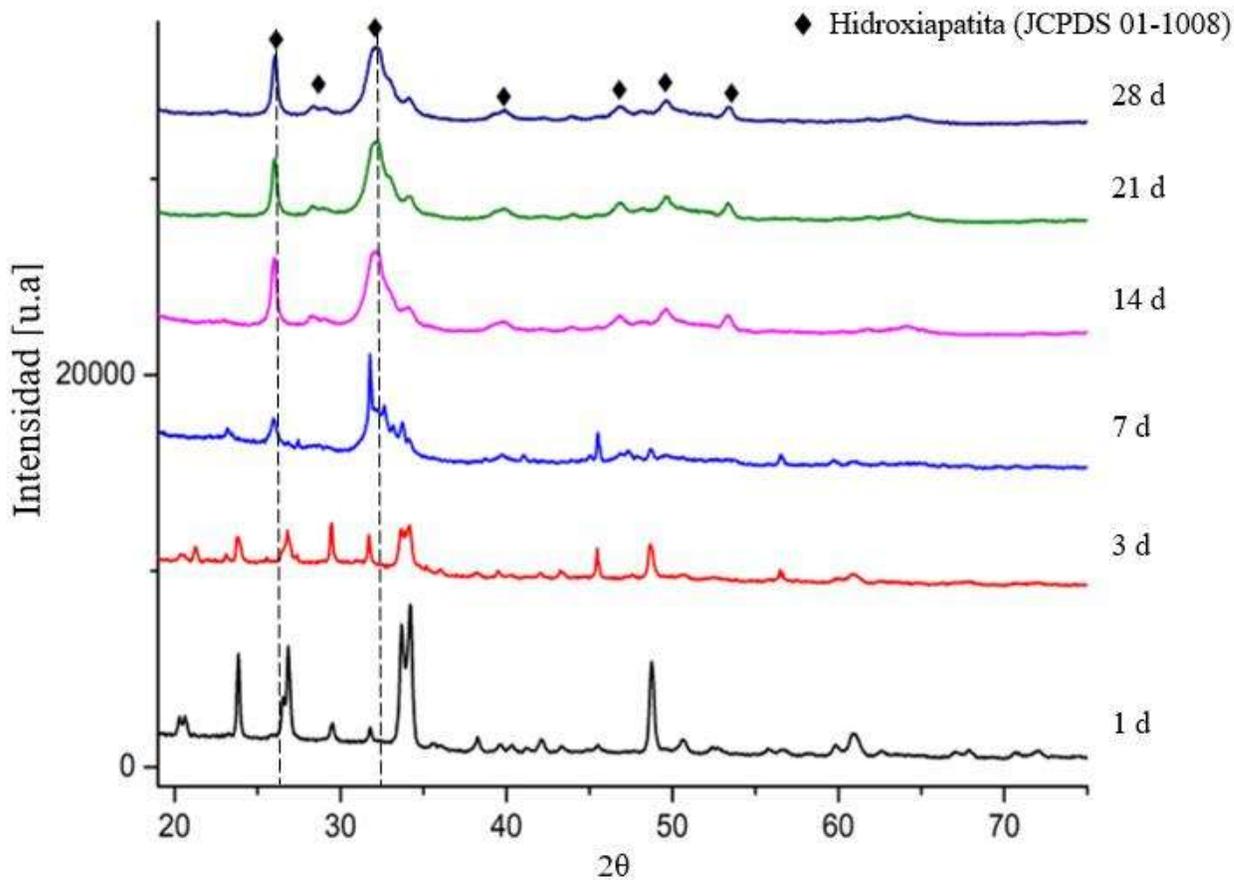


Figura 4.20. Difractogramas resultantes después de la inmersión de los andamios en SBF.

La Figura 4.21 muestra una comparación de los difractogramas resultantes del vidrio convencional antes y después de ser inmersos en SBF. Se puede observar como el vidrio presenta la fase amorfa característica de los vidrios antes y después de ser inmerso en SBF, además se observa un pequeño pico con muy poca intensidad atribuido a precipitados después de la interacción del vidrio con las sales de la solución SBF en los días 7 y 28.

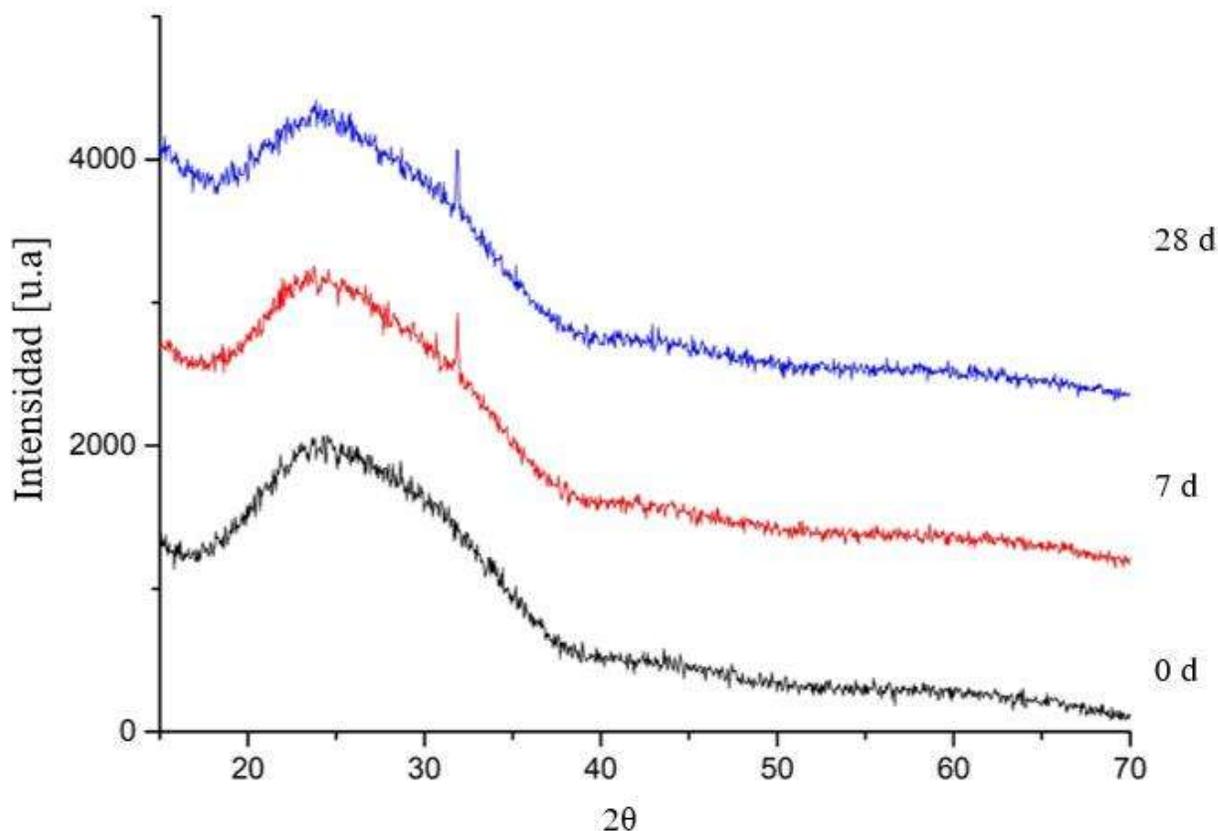


Figura 4.21. Difractogramas resultantes después de la inmersión del vidrio convencional en SBF.

4.3.3. Análisis por espectroscopía infrarroja (FT-IR)

La Figura 4.22 muestra los espectros de los andamios en los diferentes puntos de tiempo de inmersión en SBF. Se observa una banda a 1642.65 cm^{-1} atribuido a la deformación de grupos O-H para todos tiempos de inmersión. La banda a 1383.65 cm^{-1} es atribuida a grupos de P-O, se observa que no existe una variación en el comportamiento de la banda para los días (0, 1 y 3 d), después de los 7 días el comportamiento de la banda es totalmente diferentes a los tiempos iniciales, a medida que avanza el tiempo de inmersión las bandas disminuyen en su intensidad. Después de los 7 días de inmersión se hacen presentes nuevas bandas a 1247.78 y 800.57 cm^{-1} atribuidas a Si-O-Si, Si-OH asociadas a la gran superficie 3D de la silica [85]. Por otro lado, las bandas a 800 y 698 cm^{-1} se pueden atribuir a la presencia de grupos C-O. La banda 1047.70 cm^{-1} corresponde a modos vibracionales de Si-O-Si dicha banda posee un comportamiento similar para todos los tiempos de inmersión. Las bandas a 920.68 cm^{-1} atribuidas a modos vibracionales de P-O indicativo

de la fase amorfa del CaP, pero va desapareciendo a partir de los 3 días de inmersión en SBF. Las bandas a 614.48, 574.51 cm^{-1} atribuido a modos vibraciones de P-O cristalino, a medida que transcurre el tiempo de inmersión, las bandas comienzan a disminuir dando lugar a la formación de la fase amorfa del CaP, nuevamente la banda 574.51 cm^{-1} corresponde a la fase silicorhenanita detectada en estudios como fase secundaria por Magallanes-Perdomo y col. [85]. Finalmente, las bandas a 525 y 457.40 cm^{-1} corresponde a flexiones de Si-O-Si, dichas bandas se vuelven aún más nítidas debido al proceso de cristalización, y la ausencia del modo Si-O-Si indica una capa de HCA cristalina [42].

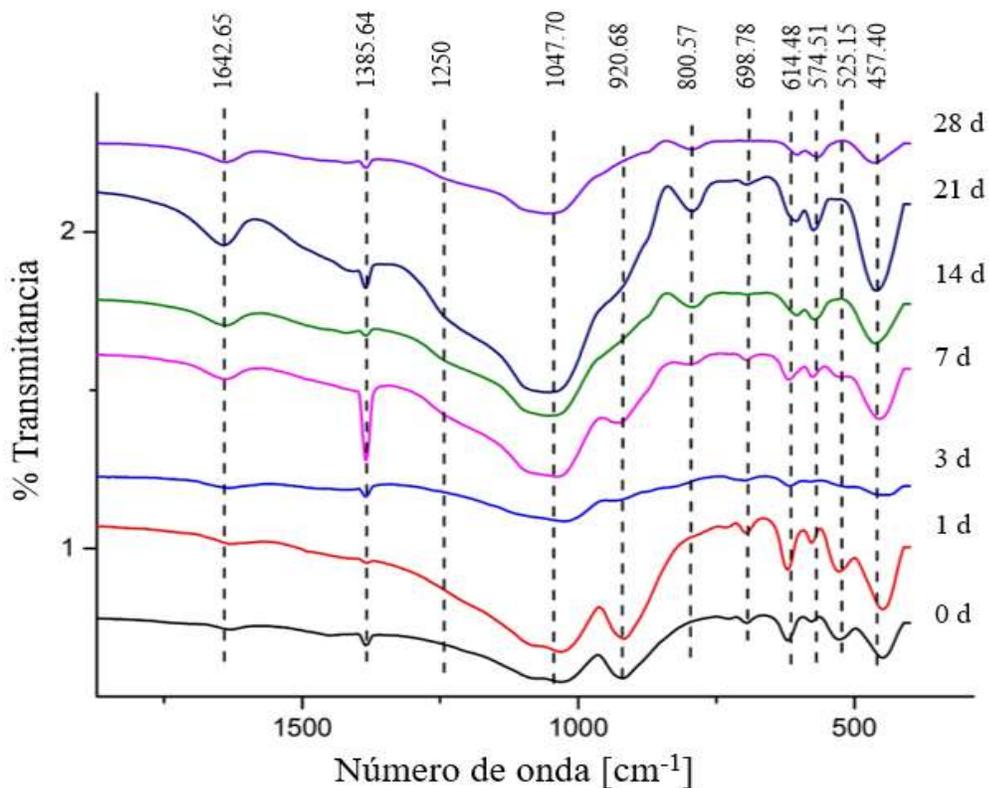


Figura 4.22. Espectros FT-IR en los diferentes puntos de tiempo de inmersión de los andamios en SBF.

La Figura 4.23 muestra los espectros de las muestras de vidrio convencional en los diferentes puntos de tiempo de inmersión en la solución SBF. La banda 3425.57 cm^{-1} se asigna a las vibraciones de estiramiento de O-H y agua molecular. La banda a 1629.25 al grupo H-O-H (agua molecular) y la banda a 1383.25 cm^{-1} se atribuye al grupo C-O. La banda ancha e intensa a 900-

1100 cm^{-1} está asociada con las vibraciones de estiramiento asimétrico de Si-O en los grupos tetraédricos SiO_4 presentes en los silicatos (oxígenos formando puentes de hidrógeno); se observan dos hombros o curvaturas a 1200 cm^{-1} y 900 cm^{-1} correspondientes a las vibraciones anti-simétricas Si-O-Si de los oxígenos que forman puentes de hidrógeno y a las vibraciones de los oxígenos que no forman puentes, respectivamente. Del mismo modo, la banda a 775.90 cm^{-1} es atribuida a las vibraciones de estiramiento simétrico del grupo Si-O en los tetraedros de SiO_4 . Finalmente, la banda a 487.79 cm^{-1} se debe a las vibraciones de flexión de Si-O-Si [86]. Los resultados de FTIR fueron prácticamente idénticos en las diferentes muestras de vidrio.

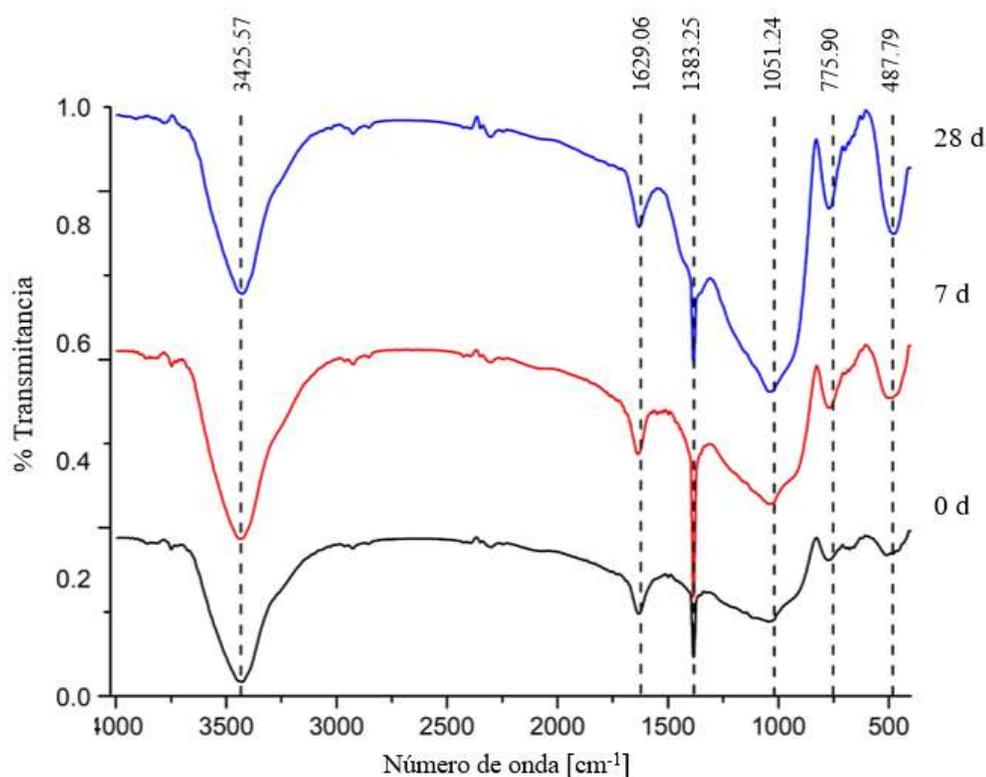


Figura 4.23. Espectros FT-IR después de la inmersión del vidrio convencional en SBF.

4.3.4. Pruebas biológicas

La Figura 4.24, muestra las imágenes obtenidas mediante el microscopio óptico en donde se observan los resultados después del experimento de las células en contacto con los materiales. La Figura 4.24(a) muestra la monocapa de células que no estuvieron en contacto con los andamios. La

Figuras 4.24 (b) y (c) muestran los resultados obtenidos de la interacción de las células con los andamios con y sin pre-tratamiento en SBF incubados a 24 h. En ambas imágenes se observaron morfologías diferentes al de las células sin material. También se observaron algunas zonas de color negro correspondiente a residuos del material sólido que se desprende de los andamios debido a que los andamios se disuelven fácilmente por su composición en el medio de cultivo provocando la muerte celular por apoptosis.

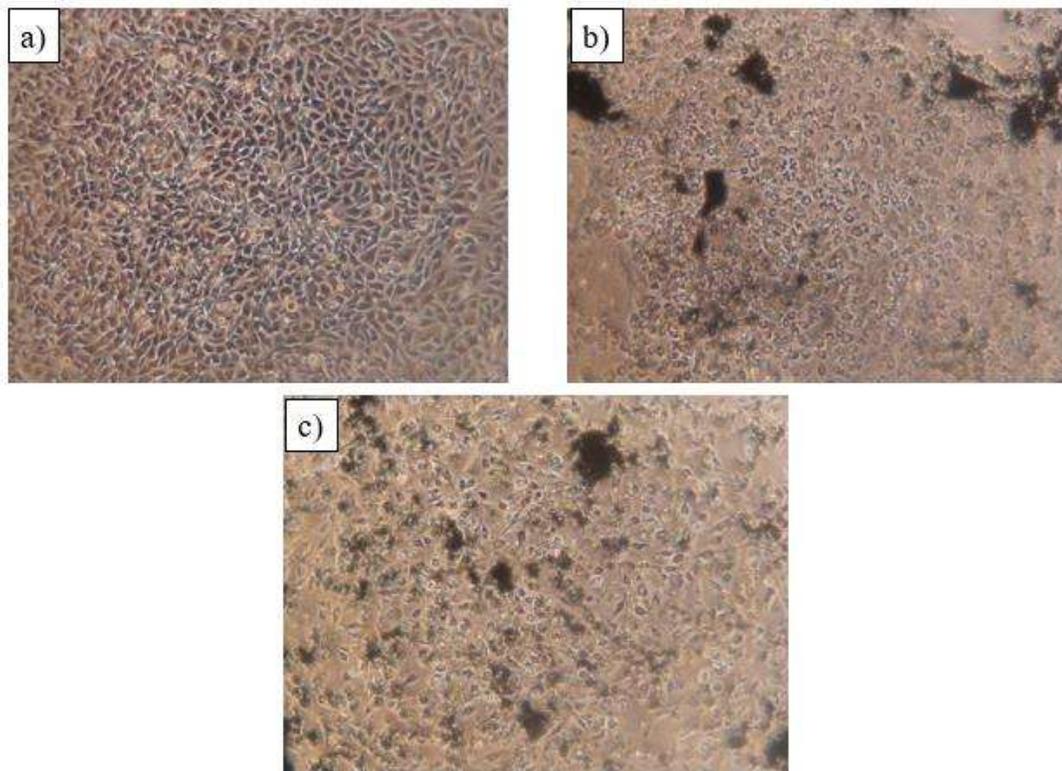


Figura 4.24. Imágenes mediante microscopio óptico; (a) células sin material, (b) células con el andamio sin pre-tratamiento en SBF, (c) células con andamios después del pre-tratamiento por 7 días en SBF.

Después de haber incubado los materiales con medio de cultivo (DMEM) durante 24 h a 37 °C con 5% CO₂, se obtuvieron los siguientes valores de pH: medio de cultivo de células sin andamios 7.9, medio de cultivo de células con andamios sin pre-tratamiento con SBF 9.32 y medio de cultivo de las células con andamios inmersos en SBF por 7 días de 9.06.

El objetivo de realizar las pruebas biológicas, era el análisis de citotoxicidad y la proliferación de las células mediante el método MTT, en contacto con los andamios fabricados a base biovidrio 45S5 mediante el método colada en gel que posteriormente fueron inmersos en fluido corporal simulado (*SBF- simulated body fluid*) durante 7 días con la finalidad de permitir la formación de la capa de hidroxiapatita que facilitaría la adhesión y proliferación celular. Por lo que el método MTT no se pudo realizar, ya que los andamios inmersos en SBF por 7 días, no permitieron que las células sobrevivieran después del contacto con los andamios, debido a que los andamios se disolvieron dejando residuos en el medio de cultivo lo cual indujo a la muerte de las células por apoptosis. Por lo que el tiempo de precondicionamiento en SBF no fue suficiente para las pruebas celulares, por lo que se recomienda sumergir por más tiempo los andamios en la solución de SBF lo cual mejorará la viabilidad y proliferación celular. De acuerdo a los resultados de los ensayos de bioactividad de la Sección 4.3, se determinó un pH de 7.7 en la solución de los andamios inmersos por 7 días. Sin embargo, de acuerdo a las imágenes por MEB, la superficie de estos andamios no están del todo recubiertas por la capa de hidroxiapatita por lo que al estar nuevamente en contacto con fluidos fisiológicos empiezan a reaccionar nuevamente, intercambiando iones que elevan el pH del medio. De acuerdo a esto se requiere un precondicionamiento de los andamios por 28 días en SBF para recubrir el total de la superficie del andamio y prevenir estas reacciones que elevan el pH. Comparando los resultados obtenidos con respecto a los obtenidos por Chen y col. [71], se puede decir que para obtener resultados favorables de proliferación de las células es importante el precondicionamiento del andamio para la formación de la capa de hidroxiapatita lo cual facilitaron no solo la proliferación si no también la adhesión de las células lo cual ayudara a la vascularización del tejido.

CAPITULO V. CONCLUSIONES

De acuerdo al método de fabricación de andamios 3D de biovidrio 45S5 y a la evaluación de las propiedades mecánicas y biológicas in vitro para la determinación de su aplicación potencial en regeneración de tejido óseo, se puede llegar a concluir los siguientes puntos.

1. El método de colada en gel inorgánica es una opción para la fabricación de andamios 3D, a partir de la mezcla del biovidrio 45S5 y la adición de un agente surfactante, permitiendo obtener estructuras con porosidad y resistencia a la compresión con valores dentro del rango del hueso trabecular.
2. Es posible fabricar andamios con macroporos de 10-600 μm para el crecimiento óseo mediante el método colada en gel inorgánica, variando la cantidad de agente surfactante y la temperatura de sinterización. Los andamios sinterizados a 800 $^{\circ}\text{C}$ presentaron la mejor microestructura, logrando una porosidad interconectada de 74% y poros con tamaños en el rango de 5-337 μm .
3. Mediante DRX se identificaron las dos fases cristalinas características del biovidrio 45S5 desarrolladas durante el tratamiento de sinterización, una fase principal $\text{Na}_6\text{Ca}_3\text{Si}_6\text{O}_{18}$ (JCPDS 77-2187) y una fase secundaria $\text{Na}_2\text{Ca}_4(\text{PO}_4)_2\text{SiO}_4$ (JCPDS 32-1053, silicorhnanita).
4. Los resultados de la resistencia a la compresión señalan un valor de 4.93 ± 0.28 MPa para los andamios de biovidrio 45S5 sinterizados a 800 $^{\circ}\text{C}$, valor que se encuentra dentro del rango de 2-12 MPa del hueso trabecular.
5. Mediante MEB, DRX y FTIR se analizó e identificó la capa hidroxiapatita (HA) en la superficie del andamio a partir del día 7 de inmersión. La morfología que adoptó la capa de HA fue de tipo coliflor a partir de pequeñas esferas depositadas en la superficie de los andamios.
6. Los andamios inmersos durante 7 días en SBF no fueron viables para la proliferación de las células MG63, debido al elevado valor de pH (9.0). De acuerdo a los resultados de bioactividad, es necesario un pre-tratamiento de los andamios en SBF por 28 días para

asegurar que toda su superficie esté recubierta de hidroxiapatita y no se den las reacciones de intercambio iónico con el fluido fisiológico y se mantenga un pH constante de 7.4 ± 0.4 .

Se concluye que los andamios fabricados en este proyecto de investigación constituyen excelentes candidatos para su aplicación en la regeneración de tejido óseo debido a que cumplen con las características de microestructura, mecánicas y bioactivas para permitir la adhesión, diferenciación y proliferación de los osteoblastos.

SUGERENCIAS Y TRABAJO A FUTURO

Como trabajo a futuro, se realizarán las pruebas de bioactividad in vitro en SBF durante 28 días como un método de pre-acondicionamiento antes de llevar a cabo los cultivos celulares, ya que de acuerdo a los resultados obtenidos por MEB y de seguimiento de pH en la sección 4.3, la formación de la capa bioactiva de hidroxiapatita cubre totalmente la superficie del andamio después de los 28 días de inmersión y el pH se mantiene a un valor constante de 7.4, lo cual facilitará la adhesión y proliferación de los osteoblastos, evitando además que el andamio reaccione al estar nuevamente en contacto con fluidos fisiológicos ya que a ese período de tiempo ya no habrá intercambio de iones que elevarían el pH del medio.

El método utilizado en este proyecto de investigación permite la manipulación de variables como velocidad de agitación, cantidad de surfactante y temperatura de sinterización para optimizar la fabricación de andamios en la búsqueda de un balance entre las propiedades mecánicas y la porosidad de los andamios, para ser utilizados no sólo como implantes óseos sino que además pueden incorporar sustancias biológicamente activas, como antiinflamatorios, antibióticos o factores de crecimiento, en su microestructura para ser aplicados en la liberación controlada de fármacos, o su aplicación incluso como implantes o rellenos dentales.

REFERENCIAS

- [1] Soto Góngora S , Taxis González M G. *Injertos óseos: Una alternativa efectiva y actual para la reconstrucción del complejo cráneo-facial*. **Revista Cubana de estomatología**. 42 (1), 0-0, 2005.
- [2] Lee J W, Kang K S, Lee S H, Kim J-Y, Lee B-K , Cho D-W. *Bone regeneration using a microstereolithography-produced customized poly (propylene fumarate)/diethyl fumarate photopolymer 3D scaffold incorporating BMP-2 loaded PLGA microspheres*. **Biomaterials**. 32 (3), 744-752, 2011.
- [3] Lopes J H, Magalhães J A, Gouveia R F, Bertran C A, Motisuke M, Camargo S E , De Sousa Trichês E. *Hierarchical structures of β -TCP/45S5 bioglass hybrid scaffolds prepared by gelcasting*. **Journal of the mechanical behavior of biomedical materials**. 62, 10-23, 2016.
- [4] Vacanti J P , Langer R. *Tissue engineering: the design and fabrication of living replacement devices for surgical reconstruction and transplantation*. **The lancet**. 354, S32-S34, 1999.
- [5] O'brien F J. *Biomaterials & scaffolds for tissue engineering*. **Materials Today**. 14 (3), 88-95, 2011.
- [6] Jones J R. *Reprint of: Review of bioactive glass: From Hench to hybrids*. **Acta Biomaterialia**. 23, S53-S82, 2015.
- [7] López M M, Faure J, Cabrera M I E , García M C. *Desarrollo estructural del biovidrio 45S5 obtenido por sol-gel con el tratamiento térmico*.
- [8] Omatete O O, Janney M A , Nunn S D. *Gelcasting: from laboratory development toward industrial production*. **Journal of the European Ceramic Society**. 17 (2-3), 407-413, 1997.
- [9] Fernández-Tresguerres Hernández-Gil I, Alobera Gracia M A, Canto Pingarrón M D , Blanco Jerez L. *Bases fisiológicas de la regeneración ósea II: El proceso de remodelado*. **Medicina Oral, Patología Oral y Cirugía Bucal (Internet)**. 11 (2), 151-157, 2006.
- [10] Menchén L, Ripoll C, Bretón I, Moreno C, Cuerda C, Cambor M, García-Peris P, González-Lara V , Cos E. *Osteoporosis y enfermedad inflamatoria intestinal*. **Nutrición hospitalaria**. 20 (1), 26-37, 2005.

- [11] Buckwalter J. *Intervertebral disk aging, degeneration, and herniation*. **Orthopaedic basic science**. 2000.
- [12] 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.
- [13] Lizarbe M A. *Sustitutivos de tejidos: de los biomateriales a la ingeniería tisular*. **Rev R Acad Cienc Exact Fís Nat (Esp)**. 101 (1), 227-249, 2007.
- [14] Thomas T, Martin A , Lafage-Proust M-H. *Fisiología del tejido óseo*. **EMC-Podología**. 13 (2), 1-17, 2011.
- [15] J. Lafita. *Fisiología y fisiopatología ósea*. Autho. **Anales del sistema sanitario de Navarra**, 26(3), 7-17, 2003.
- [16] Mandalunis P. *Remodelación ósea*. **Actualizaciones en Osteología**. 2 (1), 16-18, 2006.
- [17] Setiawati R , Rahardjo P. *Bone development and growth*. **Osteogenesis and bone regeneration**. 2018.
- [18] Hernandez-Gil I F-T, Gracia M A, Del Canto Pingarrón M , Jerez L B. *Physiological bases of bone regeneration I. Histology and physiology of bone tissue*. **Med Oral**. 11, E47-51, 2006.
- [19] Prentice W E. *Técnicas de rehabilitación en medicina deportiva*. Editorial Paidotribo. 2001.
- [20] Guede D, González P , Caeiro J. *Biomecánica y hueso (I): Conceptos básicos y ensayos mecánicos clásicos*. **Revista de Osteoporosis y Metabolismo Mineral**. 5 (1), 43-50, 2013.
- [21] Yeni Y N, Hou F J, Vashishth D , Fyhrie D P. *Trabecular shear stress in human vertebral cancellous bone:: intra-and inter-individual variations*. **Journal of Biomechanics**. 34 (10), 1341-1346, 2001.
- [22] Cowin S C. *Bone mechanics handbook*. CRC press. 2001.
- [23] Sánchez S M C, Clemente M Y N, González V M , Schouwenaars R. *Modelado del comportamiento mecánico del hueso (análisis de los efectos del grado de hidratación)*. **Ingeniería Mecánica. Tecnología y Desarrollo**. 1 (6), 223-232, 2005.
- [24] Hernández-Gil I, Gracia M a A, Pingarrón M , Jerez L. *Physiological bases of bone regeneration II. The remodeling process*. **Med Oral Patol Oral Cir Bucal**. 11, E151-215, 2006.

- [25] Ríos T, López M E , Franco A. *Biomateriales Compuestos De Matriz Polimérica Con Refuerzo De Cerámico Bioactivo Usados En Sistemas De Fijación Ósea Revision Del Estado Del Arte*. **Revista Colombiana de Materiales**. (5), 270-276, 2014.
- [26] Estrada C, Paz A C , López L E. *Ingeniería de tejido óseo: consideraciones básicas*. **Revista EIA**. (5), 93-100, 2006.
- [27] Orgaz F, Rincón J , Capel F. *Materiales biocerámicos y biovidrios*. **Boletín de la Sociedad Española de Cerámica y Vidrio**. 26 (1), 13-19, 1987.
- [28] Gil F, Ginebra M , Planell J A. *Metales y aleaciones para la substitución de tejidos duros*. **Gil, FJ [et al.]. Metales y aleaciones para la substitución de tejidos duros. Biomecánica, 1999**, vol. VII, núm. 13, p. 73-78. 1999.
- [29] Williams D. *Benefit and risk in tissue engineering*. **Materials Today**. 7 (5), 24-29, 2004.
- [30] Martin I, Wendt D , Heberer M. *The role of bioreactors in tissue engineering*. **Trends in Biotechnology**. 22 (2), 80-86, 2004.
- [31] Torres A L, Gaspar V M, Serra I R, Diogo G S, Fradique R, Silva A P , Correia I J. *Bioactive polymeric–ceramic hybrid 3D scaffold for application in bone tissue regeneration*. **Materials Science and Engineering: C**. 33 (7), 4460-4469, 2013.
- [32] Williams D F. *On the mechanisms of biocompatibility*. **Biomaterials**. 29 (20), 2941-2953, 2008.
- [33] Agrawal C M , Ray R B. *Biodegradable polymeric scaffolds for musculoskeletal tissue engineering*. **Journal of Biomedical Materials Research: An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and The Australian Society for Biomaterials and the Korean Society for Biomaterials**. 55 (2), 141-150, 2001.
- [34] Hutmacher D W. *Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage*. **The biomaterials: Silver jubilee compendium**. 175-189. 2000.
- [35] Alvarez Barreto J F. *Regeneración ósea a través de la ingeniería de tejidos: una introducción*. **RET. Revista de Estudios Transdisciplinarios**. 1 (2), 2009.
- [36] Aguilar-Reyes E A, León-Patiño C A, Jacinto-Díaz B , Lefebvre L P. *Structural characterization and mechanical evaluation of bioactive glass 45S5 foams obtained by a powder technology approach*. **Journal of the American Ceramic Society**. 95 (12), 3776-3780, 2012.

- [37] Gentile P, Mattioli-Belmonte M, Chiono V, Ferretti C, Baino F, Tonda-Turo C, Vitale-Brovarone C, Pashkuleva I, Reis R L , Ciardelli G. *Bioactive glass/polymer composite scaffolds mimicking bone tissue*. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**. 100 (10), 2654-2667, 2012.
- [38] Jones J , Hench L. *Effect of surfactant concentration and composition on the structure and properties of sol-gel-derived bioactive glass foam scaffolds for tissue engineering*. **Journal of Materials Science**. 38 (18), 3783-3790, 2003.
- [39] Jones J R, Lin S, Yue S, Lee P, Hanna J V, Smith M E , Newport R J. *Bioactive glass scaffolds for bone regeneration and their hierarchical characterisation*. **Proceedings of the Institution of Mechanical Engineers, Part H: Journal of Engineering in Medicine**. 224 (12), 1373-1387, 2010.
- [40] Vitale-Brovarone C, Miola M, Balagna C , Verné E. *3D-glass–ceramic scaffolds with antibacterial properties for bone grafting*. **Chemical Engineering Journal**. 137 (1), 129-136, 2008.
- [41] Ryan G, Pandit A , Apatsidis D P. *Fabrication methods of porous metals for use in orthopaedic applications*. **Biomaterials**. 27 (13), 2651-2670, 2006.
- [42] 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.
- [43] Vitale-Brovarone C, Verné E, Robiglio L, Appendino P, Bassi F, Martinasso G, Muzio G , Canuto R. *Development of glass–ceramic scaffolds for bone tissue engineering: characterisation, proliferation of human osteoblasts and nodule formation*. **Acta Biomaterialia**. 3 (2), 199-208, 2007.
- [44] Chen Q Z, Thompson I D , Boccaccini A R. *45S5 Bioglass®-derived glass–ceramic scaffolds for bone tissue engineering*. **Biomaterials**. 27 (11), 2414-2425, 2006.
- [45] Goodridge R D, Wood D J, Ohtsuki C , Dalgarno K W. *Biological evaluation of an apatite–mullite glass-ceramic produced via selective laser sintering*. **Acta Biomaterialia**. 3 (2), 221-231, 2007.
- [46] Seitz H, Rieder W, Irsen S, Leukers B , Tille C. *Three-dimensional printing of porous ceramic scaffolds for bone tissue engineering*. **Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials: An Official Journal of The Society for Biomaterials**,

- The Japanese Society for Biomaterials, and The Australian Society for Biomaterials and the Korean Society for Biomaterials.** 74 (2), 782-788, 2005.
- [47] Wu C, Luo Y, Cuniberti G, Xiao Y , Gelinsky M. *Three-dimensional printing of hierarchical and tough mesoporous bioactive glass scaffolds with a controllable pore architecture, excellent mechanical strength and mineralization ability.* **Acta Biomaterialia.** 7 (6), 2644-2650, 2011.
- [48] Elsayed H, Rincón Romero A, Ferroni L, Gardin C, Zavan B , Bernardo E. *Bioactive glass-ceramic scaffolds from novel ‘inorganic gel casting’ and sinter-crystallization.* **Materials.** 10 (2), 171, 2017.
- [49] Provis J L , Bernal S A. *Geopolymers and related alkali-activated materials.* **Annual Review of Materials Research.** 44, 299-327, 2014.
- [50] Baino F , Vitale-Brovarone C. *Bioactive glass and glass–ceramic foam scaffolds for bone tissue restoration.* **Biomedical Foams for Tissue Engineering Applications.** 213-248. 2014.
- [51] Sepulveda P , Binner J. *Evaluation of the in situ polymerization kinetics for the gelcasting of ceramic foams.* **Chemistry of materials.** 13 (11), 3882-3887, 2001.
- [52] Sepulveda P , Binner J. *Processing of cellular ceramics by foaming and in situ polymerisation of organic monomers.* **Journal of the European Ceramic Society.** 19 (12), 2059-2066, 1999.
- [53] 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.
- [54] Wu Z Y, Hill R G, Yue S, Nightingale D, Lee P D , Jones J R. *Melt-derived bioactive glass scaffolds produced by a gel-cast foaming technique.* **Acta Biomaterialia.** 7 (4), 1807-1816, 2011.
- [55] Hench L L. *The story of Bioglass®.* **Journal of Materials Science: Materials in Medicine.** 17 (11), 967-978, 2006.
- [56] Growney Kalaf E A, Hixon K R, Kadakia P U, Dunn A J , Sell S A. *9 - Electrospun biomaterials for dermal regeneration.* **Electrospun Materials for Tissue Engineering and Biomedical Applications.** 179-231. 2017.

- [57] Jones J R. *19 - Scaffolds for tissue engineering*. **Biomaterials, Artificial Organs and Tissue Engineering**. 201-214. 2005.
- [58] Cao W , Hench L L. *Bioactive materials*. **Ceramics international**. 22 (6), 493-507, 1996.
- [59] Fiume E, Barberi J, Verné E , Baino F. *Bioactive glasses: from parent 45S5 composition to scaffold-assisted tissue-healing therapies*. **Journal of functional biomaterials**. 9 (1), 24, 2018.
- [60] Hench L L, Splinter R J, Allen W , Greenlee T. *Bonding mechanisms at the interface of ceramic prosthetic materials*. **Journal of biomedical materials research**. 5 (6), 117-141, 1971.
- [61] Hench L L. *Bioceramics: from concept to clinic*. **Journal of the American Ceramic Society**. 74 (7), 1487-1510, 1991.
- [62] Hench L L, Jones J R , Sepulveda P. *Bioactive materials for tissue engineering scaffolds. Future strategies for tissue and organ replacement*. 3-24. 2002.
- [63] 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.
- [64] 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.
- [65] 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.
- [66] Kokubo T. *Bioactive glass ceramics: properties and applications*. **Biomaterials**. 12 (2), 155-163, 1991.
- [67] Kokubo T , Takadama H. *How useful is SBF in predicting in vivo bone bioactivity?* **Biomaterials**. 27 (15), 2907-2915, 2006.
- [68] 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.
- [69] Bahuguna A, Khan I, Bajpai V K , Kang S C. *MTT assay to evaluate the cytotoxic potential of a drug*. **Bangladesh Journal of Pharmacology**. 12 (2), Online: Apr 8-2017, 2017.
- [70] Ndiaye D, Patel V, Demas A, Leroux M, Ndir O, Mboup S, Clardy J, Lakshmanan V, Daily J P , Wirth D F. *A non-radioactive DAPI-based high-throughput in vitro assay to assess*

- Plasmodium falciparum* responsiveness to antimalarials—increased sensitivity of *P. falciparum* to chloroquine in Senegal. **The American journal of tropical medicine and hygiene**. 82 (2), 228-230, 2010.
- [71] Chen Q-Z , Thouas G A. *Fabrication and characterization of sol–gel derived 45S5 Bioglass®–ceramic scaffolds*. **Acta Biomaterialia**. 7 (10), 3616-3626, 2011.
- [72] Barrett E P, Joyner L G , Halenda P P. *The determination of pore volume and area distributions in porous substances. I. Computations from nitrogen isotherms*. **Journal of the American Chemical society**. 73 (1), 373-380, 1951.
- [73] Chen Q, Mohn D , Stark W J. *Optimization of Bioglass® scaffold fabrication process*. **Journal of the American Ceramic Society**. 94 (12), 4184-4190, 2011.
- [74] Lefebvre L, Chevalier J, Gremillard L, Zenati R, Thollet G, Bernache-Assolant D , Govin A. *Structural transformations of bioactive glass 45S5 with thermal treatments*. **Acta Materialia**. 55 (10), 3305-3313, 2007.
- [75] Winefordner J , Kolthoff I. *A Series of Monographs on Analytical Chemistry and Its Applications*. **CHEMICAL ANALYSIS-NEW YORK-INTERSCIENCE THEN JOHN WILEY-**. 1993.
- [76] 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 (8), 1849-1866, 2012.
- [77] Boccaccini A R, Chen Q, Lefebvre L, Gremillard L , Chevalier J. *Sintering, crystallisation and biodegradation behaviour of Bioglass®-derived glass–ceramics*. **Faraday discussions**. 136, 27-44, 2007.
- [78] Bretcanu O, Chatzistavrou X, Paraskevopoulos K, Conradt R, Thompson I , Boccaccini A R. *Sintering and crystallisation of 45S5 Bioglass® powder*. **Journal of the European Ceramic Society**. 29 (16), 3299-3306, 2009.
- [79] 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.
- [80] Vyas V K, Kumar A S, Ali A, Prasad S, Srivastava P, Mallick S P, Ershad M, Singh S P , Pyare R. *Assessment of nickel oxide substituted bioactive glass-ceramic on in vitro*

- bioactivity and mechanical properties. Boletín de la Sociedad Española de Cerámica y Vidrio.* 55 (6), 228-238, 2016.
- [81] Lin C-C, Huang L-C , Shen P. *Na₂CaSi₂O₆-P₂O₅ based bioactive glasses. Part 1: Elasticity and structure. Journal of Non-Crystalline Solids.* 351 (40-42), 3195-3203, 2005.
- [82] Huang T, Rahaman M, Doiphode N, Leu M-C, Bal B, Day D , Liu X. *Porous and strong bioactive glass (13–93) scaffolds fabricated by freeze extrusion technique. Materials Science and Engineering: C.* 31 (7), 1482-1489, 2011.
- [83] Hench L L. *Biomaterials: a forecast for the future. Biomaterials.* 19 (16), 1419-1423, 1998.
- [84] Shih C, Chen H, Huang L, Lu P, Chang H , Chang I. *Synthesis and in vitro bioactivity of mesoporous bioactive glass scaffolds. Materials Science and Engineering: C.* 30 (5), 657-663, 2010.
- [85] Magallanes-Perdomo M, Meille S, Chenal J-M, Pacard E , Chevalier J. *Bioactivity modulation of Bioglass® powder by thermal treatment. Journal of the European Ceramic Society.* 32 (11), 2765-2775, 2012.
- [86] Abo-Naf S M, El Batal F H , Azooz M A. *Characterization of some glasses in the system SiO₂, Na₂O· RO by infrared spectroscopy. Materials Chemistry and physics.* 77 (3), 846-852, 2003.