



**UNIVERSIDAD MICHOACANA DE
SAN NICOLÁS DE HIDALGO**



INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN EN METALURGICA Y MATERIALES

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

**ESTUDIO DE BIOACTIVIDAD IN VITRO DE ESPUMAS DE BIOVIDRIO 45S5
PRODUCIDAS POR TECNOLOGÍA DE POLVOS PARA APLICACIONES EN
REGENERACIÓN ÓSEA**

**Tesis que para obtener el Grado de Doctor en Metalurgia y Ciencia de los Materiales
presenta:**

M.C. Víctor Iván Macías Andrés

Directora de Tesis

Dra. Ena Athenea Aguilar Reyes

Morelia, Michoacán agosto del 2016

Agradecimientos

Deseo expresar mi agradecimiento en primer lugar a mi directora de tesis, Dra. Ena Athenea Aguilar Reyes, por haberme recibido en su grupo de investigación, así como a toda mi mesa doctoral, Dr. Carlos León, Dr. Juan Serrato, Dra. Georgina Carbajal, Dr. Ariosto Medina y el Dr. Guillermo Carreón por su tiempo y dedicación durante todo el desarrollo de esta tesis.

A todos y cada uno de las personas que directa e indirectamente me apoyaron dentro del Instituto de Investigación en Metalurgia y Materiales donde se llevó a cabo éste proyecto doctoral. En especial a todos los técnicos de laboratorio por siempre prestar un servicio de calidad que me permitió realizar un trabajo de calidad de principio a fin.

Todo esto no hubiera sido posible sin todo el apoyo que mi familia me brindó de manera constante, durante mi preparación y superación académica, profesional y personal.

Agradezco a mi esposa su incondicionalidad, y ayuda en motivarme e impulsarme a concluir éste proyecto.

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN.....	x
ABSTRACT.....	xi
CAPITULO I. INTRODUCCIÓN.....	1
PRÓLOGO.....	1
1.1 OBJETIVOS.....	2
1.1.1 Objetivo General.....	2
1.1.2 Objetivos Particulares.....	2
1.2 JUSTIFICACIÓN.....	3
1.3 HIPÓTESIS.....	4
CAPITULO 2. ANTECEDENTES	5
2.1 INGENIERÍA DE TEJIDOS PARA LA RECONSTRUCCIÓN ÓSEA.....	5
2.1.1 Estrategias de la Ingeniería de Tejido Óseo	7
2.1.2 Andamios para Ingeniería de Tejidos.....	8
2.1.3 Requerimientos en el Diseño.....	9
2.2 BIOMATERIALES.....	9
2.3 CLASIFICACIÓN DE LOS BIOMATERIALES DE ACUERDO CON LA INTERFASE FORMADA CON EL TEJIDO.....	12
2.4 MATERIALES BIOACTIVOS.....	13
2.5 BIOCERÁMICOS.....	14
2.6 BIOVIDRIOS.....	15
2.7 MÉTODOS PARA LA OBTENCIÓN DE MATERIALES POROSOS.....	19
2.7.1 Método de la Réplica.....	19
2.7.2 Método del Molde de Sacrificio.....	20
2.7.3 Método de Espumado Directo.....	21
2.7.4 Variante de Metalurgia de Polvos.....	21
2.8 EVALUACIÓN DE LA BIOACTIVIDAD.....	22
2.8.1 Fluido Corporal Simulado (SBF– Simulated Body Fluid).....	22

2.8.2 El suero fetal bovino (FBS – Foetal Bovine Serum) como Medio de Aportación de Proteínas Contenidas en el Fluido Corporal Humano para la Predicción de la Bioactividad en Biomateriales.....	25
2.9 PRUEBAS IN VITRO DE VIABILIDAD CELULAR.....	27
2.10 TÉCNICAS UTILIZADAS PARA LA CARACTERIZACIÓN DE LAS ESPUMAS DE BIOVIDRIO 45S5.....	29
2.10.1 Análisis por Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC).....	29
2.10.2 Análisis de las Fases Presentes Mediante Difracción de Rayos X (DRX).....	31
2.10.3 Microscopia electrónica de barrido (MEB).....	34
2.10.4. Medición de las Propiedades Mecánicas de las Espumas.....	36
2.10.5 Espectroscopia Infrarroja (FT-IR).....	37
CAPITULO 3. DESARROLLO EXPERIMENTAL.....	39
3.1. PREPARACIÓN DEL BIOVIDRIO 45S5.....	39
3.1.1 Reactivos de Partida.....	39
3.1.2 Obtención del Biovidrio 45S5.....	39
3.1.3 Obtención del Biovidrio 45S5 en Polvo.....	40
3.2. CARACTERIZACIÓN DE LOS POLVOS DE BIOVIDRIO 45S5.....	40
3.2.1 ANÁLISIS POR FLUORESCENCIA DE RAYOS X (FRX).....	40
3.2.2 Análisis de las Fases Presentes Mediante Difracción de Rayos X (DRX)	40
3.2.3 Análisis de la Morfología de los Polvos Mediante Microscopia Electrónica de Barrido (MEB)	40
3.2.4 Distribución de Tamaño de Partícula.....	41
3.2.5 Análisis de la Sinterización y Cristalización de Polvos de Biovidrio 45S5.....	41
3.2.5.1 Análisis de la Morfología Mediante MEB.....	41
3.2.5.2 Análisis Mediante DXR.....	41
3.2.5.3 Análisis por FT- IR.....	41
3.2.5.4 Análisis por Microscopia Electrónica de Transmisión (MET).....	42
3.2.5.5 Análisis mediante DSC.....	42
3.2.5.6 Dilatometría.....	43
3.3 PRODUCCIÓN DE LAS ESPUMAS DE BIOVIDRIO 45S5.....	43

3.4 CARACTERIZACIÓN DE LAS ESPUMAS DE BIOVIDRIO 45S5.....	45
3.4.1 Caracterización Mediante MEB.....	45
3.4.2 Difracción de Rayos X (DRX).....	45
3.4.3 Medición de las Propiedades Mecánicas de las Espumas.....	45
3.4.4. Evaluación de la Permeabilidad.....	46
3.5. EVALUACIÓN DE LA BIOACTIVIDAD.....	46
3.5.1 Preparación del Fluido Corporal Simulado (SBF).....	46
3.5.2 Cálculo del Volumen de SBF Necesario.....	48
3.5.3 Inmersión de los Discos de Biovidrio 45S5.....	48
3.5.4 Viabilidad Celular.....	49
3.6 CARACTERIZACIÓN DE LAS ESPUMAS DESPUÉS SER SUMERGIDAS EN SBF.....	50
3.6.1 Medición del pH y Degradación de las Espumas de Biovidrio 45S5 en SBF.....	50
3.6.2 Caracterización de la Superficie Mediante FT-IR.....	50
3.6.3 Estudio Superficial de las Espumas de Biovidrio 45S5 por Difracción de Rayos X de Haz Rasante (GIXRD) y MEB.....	51
3.6.4. Evaluación de las Propiedades Mecánicas.....	51
3.6.5 Análisis de la proliferación celular mediante MEB.....	51
CAPÍTULO 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	52
4.1. CARACTERIZACIÓN DEL BIOVIDRIO 45S5 OBTENIDO MEDIANTE TECNOLOGÍA DE POLVOS.....	52
4.1.1 Análisis por FRX.....	52
4.1.2 Análisis mediante DRX.....	53
4.1.3 Análisis Mediante MEB.....	54
4.1.4 Medición de Tamaño de Partícula.....	55
4.1.5 Análisis de la Sinterización y Cristalización de Polvos de Biovidrio 45S5.....	56
4.1.5.1 Análisis por microscopia electrónica de barrido (MEB).....	56
4.1.5.2 Análisis Mediante DXR.....	57
4.1.5.3 Análisis por FT- IR.....	58
4.1.5.4 Análisis por MET.....	59

4.1.5.5 Estudio Mediante DSC.....	61
4.1.5.6 Dilatometría.....	65
4.2 CARACTERIZACIÓN DE ESPUMAS DE BIOVIDRIO 45S5 OBTENIDAS MEDIANTE TECNOLOGÍA DE POLVOS.....	67
4.2.1 Caracterización estructural de las espumas de biovidrio 45S5 mediante MEB.....	67
4.2.2 Caracterización de las Espumas por Difracción de Rayos X (DRX).....	71
4.2.3 Evaluación de las Propiedades Mecánicas.....	73
4.2.4 Evaluación de la Permeabilidad.....	74
4.3 CARACTERIZACIÓN IN-VITRO DE LA BIOACTIVIDAD DE LAS ESPUMAS DE BIOVIDRIO 45S5 EN SBF.....	76
4.3.1 Degradación en SBF.....	76
4.3.2 Caracterización de la Superficie Mediante FT-IR.....	78
4.3.3 Estudio Superficial de las Espumas de Biovidrio 45S5 por Difracción de Rayos X de Haz Rasante (GIXRD) y MEB.....	80
4.3.4. Evaluación de las propiedades mecánicas después de inmersión en SBF.....	81
4.3.5 Proliferación Celular.....	83
CAPITULO 5. CONCLUSIONES.....	87
RECOMENDACIONES.....	89
TRABAJO FUTURO.....	90
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	91

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 2.1 Estrategia de la ingeniería de tejidos [3].....	5
Figura 2.2 Espectro de bioactividad de varios implantes biocerámicos: (a) relación relativa de bioactividad, (b) Dependencia con el tiempo de formación de unión ósea en la interfase del implante [10].....	15
Figura 2.3 Regiones de bioactividad del sistema CaO-SiO ₂ -Na ₂ O [15].....	17
Figura 2.4 Imagen de MEB de fibras de colágenos [C] incorporado en la capa de [HCA] que crecen sobre un sustrato de biovidrio 45S5 in vitro. (foto cortesía del profesor Carlo Pantano de la Universidad del estado de Pensilvania de EUA) [20].....	18
Figura 2.5 Adhesión de fibras de colágeno a biovidrio [20].....	18
Figura 2.6 Imagen de MEB de espuma de Bioglass 45S5 obtenida por el método de replicación [23].....	20
Figura 2.7 Imagen de MEB de espuma de Ti [27].....	22
Figura 2.8 Micrografías de MEB de la superficie (izq.) y la sección transversal (der.) de una capa de apatita formada en una vitro-cerámica A-W en SBF [29].....	24
Figura 2.9 Imagen por microscopia electrónica de transmisión de la sección transversal de una capa de apatita formada en una vitro-cerámica A-W en SBF [29].....	24
Figura 2.10 Imagen de microscopia electrónica de transmisión de la interfase entre una vitro-cerámica del tipo A-W y la tibia proveniente de una rata [29].....	25
Figura 2.11 Curvas de DTA obtenidas de Bioglass a diferentes velocidades de calentamiento [36].....	29
Figura 2.12 Espectro de DRX para un biovidrio 45S5 cristalizado. El cual fue indexado como Na ₂ Ca ₂ Si ₃ O ₉ [38].....	31
Figura 2.13 Espectros de DRX de polvos de Bioglass 45S5 no sinterizados y sinterizados a diferentes temperaturas por 1 hora [37].....	32
Figura 2.14 Espectros de DRX de espumas de Bioglass 45S5 sinterizadas a 1000°C por una hora inmersas en SBF por 3, 7, 14, 28 días. Los picos de la fase Na ₂ Ca ₂ Si ₃ O ₉ y de la hidroxiapatita son marcados con (∇) y (●), respectivamente [45].....	33
Figura 2.15 Imagen de MEB de espumas de Ni (a) baja magnificación, (b) alta magnificación [47].....	34
Figura 2.16 Imágenes de MEB de espumas de Bioglass 45S5 obtenidas con alcohol polivinílico como agente porógeno.....	35

Figura 2.17 Imágenes de MEB de la superficie de Bioglass 45S5 sumergida durante 7 días en SBF [49].....	36
Figura 2.18 Imágenes de MEB de la formación de HA sobre la superficie de espumas de Bioglass 45S5 después de la inmersión en SBF por (a) 3 días, (b) 7 días, (c) 14 días y (d) 28 días [45].....	36
Figura 2.19 Espectros de FT-IR de espumas de Bioglass 45S5 antes y después de la inmersión en SBF [50].....	38
Figura 3.1 Ciclo de calentamiento para la obtención del biovidrio 45S5.....	39
Figura 3.2 Diagrama de la ruta de obtención del biovidrio 45S5.....	40
Figura 3.3 Diagrama de la ruta de obtención de las espumas de biovidrio 45S5.....	44
Figura 3.4 Tratamiento térmico de espumas de biovidrio 45S5. (a) Espumado, (b) Pirolisis y (c) Sinterización.....	44
Figura 4.1 Difractograma de rayos-x de polvos de biovidrio 45S5.....	53
Figura 4.2 Micrografía electrónica de barrido de los polvos de biovidrio a diferentes magnificaciones, a) 250x y b) 1500x.....	54
Figura 4.3 EDS de los polvos de biovidrio.....	55
Figura 4.4 Gráfico de la distribución de tamaño de partícula.....	56
Figura 4.5 Imágenes MEB de polvos de biovidrio a diferentes temperaturas de tratamiento térmico. (a) 975°C, (b) 850°C, (c) 750°C, (d) 650°C, (e) 500°C.....	57
Figura 4.6 Difractogramas de polvos de biovidrio 45S5 a diferentes temperaturas de tratamiento térmico. (a) 975°C, (b) 850°C y (c) 750°C.....	58
Figura 4.7 Espectro IR-FT de biovidrio 45S5 a diferentes temperaturas de tratamiento térmico (a) 500°C, (b) 650°C, (c) 750°C, (d) 850°C, (e) 950, (f) 975°C.....	59
Figura 4.8 (a) Imagen HRTEM de polvos de biovidrio 45S5 sinterizado a 975°C, (b) Imagen filtrada de HRTEM y su respectivo FFT (transformada rápida de Fourier) (Inserto).....	60
Figura 4.9 EDS de polvo de biovidrio 45S5.....	60
Figura 4.10 Curvas de DSC de biovidrio 45S5 a diferentes velocidades de calentamiento.....	61
Figura 4.11 Cálculo de la energía de activación para la cristalización por los resultados de DSC.....	63
Figura 4.12 Gráfico Ozawa para el análisis cinético del biovidrio 45S5.....	64
Figura 4.13 Representación de la fracción transformada en función de la temperatura para diferentes velocidades de calentamiento para el biovidrio 45S5.....	65

Figura 4.14 Curva dilatometrica de biovidrio 45S5 obtenida a una velocidad de calentamiento de 25 °C/min.....	66
Figura 4.15 Imágenes MEB de espuma de biovidrio 45S5 sinterizada 975°C a diferentes magnificaciones (a) 15x, (b) 250x, (c) 500x, (d) 1000x.....	68
Figura 4.16 Imágenes MEB a 15x de espumas sinterizadas a 975 °C con diferentes tiempos de estancia. (a) 1h, (b) 2 h y (c) 3 h.....	70
Figura 4.17 Imágenes MEB a 250x de espumas sinterizadas a 975 °C con diferentes tiempos de estancia. (a) 1h, (b) 2 h y (c) 3 h.....	71
Figura 4.18 Difractogramas de espumas de biovidrio 45S5 sinterizadas a 975°C a diferentes tiempos de permanencia 1, 2 y 3h.....	72
Figura 4.19 DRX de espumas de biovidrio 45S5. sinterizadas a diferentes tiempos de permanencia a 975°C.....	73
Figura 4.20 Resistencia a la compresión de espumas de bioglass 45S5 sinterizadas a diferentes tiempos de permanencia a 975°C.....	74
Figura 4.21 Permeabilidad de las muestras BG1, BG2 y BG3.....	76
Figura 4.22 Gráficos de degradación vs tiempo y pH vs tiempo de espumas de bioglass 45S5 sinterizadas a diferentes tiempos de permanencia a 975°C.....	77
Figura 4.23 Espectro IR-FT de biovidrio 45S5 sinterizadas a diferentes tiempos de permanencia a 975°C.....	78
Figura 4.24 Espectro IR-FT de biovidrio 45S5 sinterizadas a diferentes tiempos de permanencia a 975°C después de inmersión en SBF. (a) BG1, (b) BG2, (c) BG3.....	79
Figura. 4.25 DRX de espumas de biovidrio 45S5 después de inmersión en SBF de la muestra BG1.....	80
Figura 4.26 Micrografía electrónica de barrido de espumas de biovidrio 45S5 después de 14 días de inmersión en SBF de la muestra BG1.....	81
Figura 4.27 Resistencia a la compresión de espumas de biovidrio 45S5 después de 28 días en SBF.....	82
Figura 4.28 Imágenes MEB de espuma de biovidrio 45S5 después de inmersión en SBF. (a) 14 d, (b) 7 d y (c) 3 d.....	82
Figura 4.29 Proliferación celular de murine pre-osteoblastos (MC3T3-E1 subclon 4).....	84
Figura 4.30 Imágenes MEB de andamios mostrando la presencia de células dentro de la estructura porosa. (a) BG1, (b) BG2, (c) BG3.....	84
Figura 4.31 Imágenes MEB de la muestra BG3 a diferentes magnificaciones de andamios después de una semana de sembrar células.....	85

Figura 4.32 Imágenes MEB de espumas de biovidrio 45S5 después de pretratamiento en cultivo celular.....86

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 2.1 Módulos de Young para diferentes biomateriales.....	7
Tabla 2.2 Biomateriales, propiedades y aplicaciones [7].....	11
Tabla 2.3 Tipos de respuestas de materiales en contacto con tejido vivo [8].....	12
Tabla 2.4 Composiciones de diferentes tipos de Bioglass [14].....	16
Tabla 2.5 Concentración de iones de SBF y el plasma sanguíneo [28].....	23
Tabla. 2.6 Concentración de iones de FBS [31].....	26
Tabla 2.7 Velocidades de calentamiento y temperatura de transición [36].....	30
Tabla 2.8 Velocidad y temperaturas de transición obtenidas [39].....	30
Tabla 2.9 Resistencia a la compresión y porosidades obtenidas a diferentes temperaturas [39].....	37
Tabla 3.1 Muestras sinterizadas a diferentes tiempos de estancia 975 °C.....	45
Tabla 3.2. Reactivos con sus respectivas cantidades y pureza para la preparación del SBF.....	47
Tabla 4.1. Composición de los polvos de biovidrio obtenido por FRX.....	52
Tabla 4.2. Análisis elemental por EDS de los polvos de biovidrio.....	55
Tabla 4.3 Temperaturas T_p y T_g para el biovidrio 45S5 a diferentes velocidades de calentamiento.....	62
Tabla 4.4. Valores de n para el biovidrio 45S5 a diferentes velocidades de calentamiento.....	64
Tabla 4.5. Valores de m para el biovidrio 45S5 calculados a partir del método de Ozawa.....	65
Tabla 4.6. Densidad volumétrica y % de porosidad de espumas de biovidrio sinterizadas a diferentes tiempos de estancia a 975 °C.....	69
Tabla 4.7. IC calculados para las espumas de biovidrio 45S5.....	73

RESUMEN

El biovidrio 45S5 es considerado como el material cerámico más biocompatible en el campo de la regeneración de tejido óseo debido a su bioactividad, osteoconductividad y osteoinductividad. En esta tesis se fabricaron espumas con porosidad y resistencia mecánica adecuada para ser utilizadas en ingeniería de tejidos mediante un proceso alterno de tecnología de polvos, desarrollada recientemente por el Industrial Materials Institute-National Research Council Canada. Dicho método puede producir espumas cerámicas o metálicas mediante una mezcla de polvos compuesta por partículas de biovidrio 45S5, un ligante y un agente espumante. Las probetas obtenidas fueron sinterizadas a diferentes tiempos de permanencia a la temperatura de 975°C. Las espumas presentaron una porosidad en el rango de 69-74 % con resistencias a la compresión en el rango de 3.5 a 3.7 Mpa. La caracterización de las muestras se llevó a cabo mediante difracción de rayos X (DRX), microscopia electrónica de barrido (MEB), microscopia electrónica de transmisión (MET), calorimetría diferencial de barrido (DSC), espectroscopia de infrarrojo por transformada de Fourier (FT-IR) y dilatometría.

La segunda parte de esta investigación estuvo enfocada al estudio de la bioactividad de las espumas obtenidas. El requisito principal para que un material artificial pueda crear un enlace directo con el hueso es la formación de una capa de hidroxiapatita, similar al hueso, en su superficie después de ser implantado en el cuerpo humano. Para el estudio de la bioactividad, las muestras fueron inmersas en solución fisiológica simulada (SBF) durante 0, 1, 3, 7, 14, 21 y 28 días. Todas las muestras presentaron formación de hidroxiapatita en su superficie siendo el sistema BG1 el que más bioactividad presentó al formar más rápido hidroxiapatita superficial. Se evaluó la formación de la capa de hidroxiapatita por medio de las técnicas de difracción de rayos X (GIXRD), espectroscopia infrarroja (FT-IR), y microscopia electrónica de barrido (MEB) después del periodo de inmersión en el medio de SBF. Por último, se caracterizó la respuesta biológica del material sembrando pre-osteoblastos MC3T3-E1 subclone 4 sobre la superficie de las espumas midiendo su proliferación mediante una técnica colorimétrica con azul de alamar. El sistema BG3 presentó la mejor viabilidad celular.

Palabras clave: biovidrio, biomaterial, bioactividad, in-vitro, espumas.

ABSTRACT

Bioglass 45S5 is considered as the most biocompatible ceramic material in the bone regeneration field, due to its bioactivity, osteoconductivity and even osteoinductivity. In the present thesis porous glass-ceramics scaffolds with appropriate mechanical properties were prepared using an alternative powder technology process developed by The National Research Council Canada–Industrial Materials Institute. NRC–IMI’s proprietary process, combining powder technology and polymer foam technique for application in tissue engineering. It can be used to produce ceramics or metallic scaffolds, combining powder technology and polymer foam technique allows the production of materials having different structures and properties. The produced scaffolds were sintered to different residence times to 975°C. Foams exhibited open porosity (69-74%) and compressive strength (3.5-3.7 MPa) optimal for bone ingrowth. The mechanical and microstructural properties were characterized by Fourier transformed infrared spectroscopy (FT-IR), scanning electron microscopy (SEM), differential scanning calorimetric (DSC), transmission electron microscopy (TEM) and dilatometry.

The bioactivity of the porous bioglass 45S5 scaffolds was investigated using a simulated body fluid (SBF) during 0, 1, 3, 7, 14, 21 y 28 days. In all cases, foams presented formation of hydroxyapatite on their surfaces, where BG1 was the most bioactive system. The bioactivity was characterized by grazing incidence x-ray diffraction (GIXRD), Fourier transformed infrared spectroscopy (FT-IR) and scanning electron microscope (MEB). The last part of the present thesis consisting on the biological response of the 45S5 bioglass scaffolds. The in-vitro cellular proliferation was evaluated by alamarBlue assay and characterized by Scanning Electron Microscope (MEB) and a colorimetric method, where BG3 exhibited the best cellular viability

CAPITULO I. INTRODUCCIÓN

PRÓLOGO

Esta tesis presenta una propuesta de síntesis y fabricación de un biomaterial cerámico. El material elegido fue el biovidrio 45S5 con el cual se fabricaron espumas porosas con propiedades físicas y químicas necesarias para ser utilizado en ingeniería de tejidos (IT) en la regeneración de tejido óseo.

A lo largo de los capítulos encontraremos una breve descripción de lo que es un biomaterial, los diferentes tipos que existen y como se clasifican, centrándose en los biomateriales cerámicos, así como los conceptos básicos necesarios para entender cómo funcionan y son utilizados en IT. Por otra parte, se presentan las diferentes técnicas para la elaboración de espumas porosas, así como una descripción de las técnicas de laboratorio utilizadas para la caracterización de las muestras obtenidas. Además, se presenta la discusión de los resultados que se obtuvieron a través de esta investigación. Las conclusiones de la obra se presentan en el último capítulo.

1.1 Objetivos

1.1.1 Objetivo General

Estudiar la biodegradabilidad y bioactividad *in vitro* de las espumas de biovidrio 45S5 mediante experimentos por inmersión en soluciones fisiológicas simuladas a través del seguimiento de la formación de la capa de hidroxiapatita superficial para determinar su aplicación potencial como sustituto óseo.

1.1.2 Objetivos Particulares

- Preparar los armazones macroporosos de biovidrio 45S5 por las técnicas de tecnología de polvos y espumado de polímeros con propiedades físicas y mecánicas ajustadas.
- Caracterizar los armazones de biovidrio 45S5 en términos de los parámetros estructurales porosidad, permeabilidad y propiedades mecánicas que permitan su posterior utilización en IT.
- Realizar pruebas de inmersión *in vitro* de las espumas de biovidrio 45S5 en soluciones fisiológicas simuladas (SBF) a diferentes tiempos de permanencia.
- Examinar la hidroxiapatita superficial formada en SBF de las espumas de biovidrio 45S5, por medio de difracción de rayos X de haz rasante (GIXRD), espectroscopia infrarroja (FTIR) y microscopia electrónica de barrido (MEB).
- Realizar y analizar mediante colorimetría y MEB las pruebas celulares *in vitro* de las probetas de biovidrio 45S5, para determinar la viabilidad celular de las espumas porosas.

1.2 Justificación

Los actuales procedimientos clínicos para la regeneración de grandes defectos óseos son el trasplante e implante. Sin embargo, para el trasplante hay un número limitado de donantes; las listas de espera son largas y hay un riesgo de rechazo o la transmisión de enfermedades. Los implantes artificiales tales como el reemplazo total de cadera, tienen éxito para un tiempo limitado, pero todos los implantes ortopédicos carecen de las tres características fundamentales de los tejidos vivos: (1) la capacidad de auto-reparación, (2) tener una estructura que permita la vascularización y (3) la capacidad de modificar su estructura y propiedades en respuesta a factores ambientales.

Una estructura óptima para ser utilizada como biomaterial en ingeniería de tejidos debe cumplir con varios criterios. En primer lugar, el andamio debe ser biocompatible (no tóxico) y actuar como una plantilla 3D para el crecimiento óseo; para lograr esto, debe consistir en una red interconectada macroporosa con un diámetro de poro de al menos 100 micras para permitir la migración celular y, finalmente, el crecimiento y vascularización del tejido interno.

Uno de los materiales actualmente estudiado y que cumple con las características antes descritas son los biovidrios, materiales que han demostrado una excelente biocompatibilidad además de ser bioactivos al presentar osteoconducción y osteoinducción.

1.3 Hipótesis

El diseño y desarrollo de espumas de biovidrio 45S5, con microestructura y características únicas hechas a la medida a través de una ruta combinada de tecnología de polvos y espumado de polímeros, permitirá novedosos materiales que satisfagan los criterios que requiere una matriz tridimensional o scaffold a ser empleada en ingeniería de tejidos para aplicaciones de implantes ortopédicos, reconstrucciones maxilofaciales, relleno de cavidades en los huesos y otras. Es de esperar que la estructura y propiedades inferidas a las espumas (porosidad interconectada de 64-79%, tamaño de poro 175-820 micras, resistencia a la compresión 1.7-5.5 MPa) y que son semejantes a las del tejido óseo, contribuyan y favorezcan su respuesta bioactiva bajo ensayo de inmersión en SBF, desarrollando una capa de hidroxiapatita en la superficie porosa que proporcione a las células capacidad para su proliferación y el mantenimiento de sus funciones diferenciadas

CAPITULO 2. ANTECEDENTES

En este capítulo se realiza una revisión de los temas más importantes relacionados con los biomateriales, ingeniería de tejidos, síntesis de materiales porosos cerámicos y biovidrios andamios; temas necesarios para el entendimiento de esta investigación.

2.1 Ingeniería de Tejidos para la Reconstrucción Ósea

La ingeniería de tejidos ha sido definida como la aplicación de los principios científicos para el diseño, construcción, modificación y crecimiento de los tejidos vivos utilizando biomateriales, células y factores de crecimiento, solos o combinados [1].

La ingeniería de tejidos, que aplica métodos de la ingeniería y de las ciencias de la vida para crear elementos artificiales que dirijan la regeneración del tejido, ha atraído a numerosos científicos y cirujanos con la esperanza de tratar pacientes de una manera mínimamente invasiva y menos dolorosa. El paradigma de la ingeniería de tejidos consiste en aislar células específicas a través de una pequeña biopsia del paciente, para hacerlas crecer en un andamio tridimensional bajo condiciones de cultivo controladas apropiadamente, a fin de trasplantar este conjunto a la zona deseada del cuerpo del paciente y para dirigir la formación del nuevo tejido dentro del andamio que puede ir degradándose a través del tiempo [2] (Fig. 2.1.).

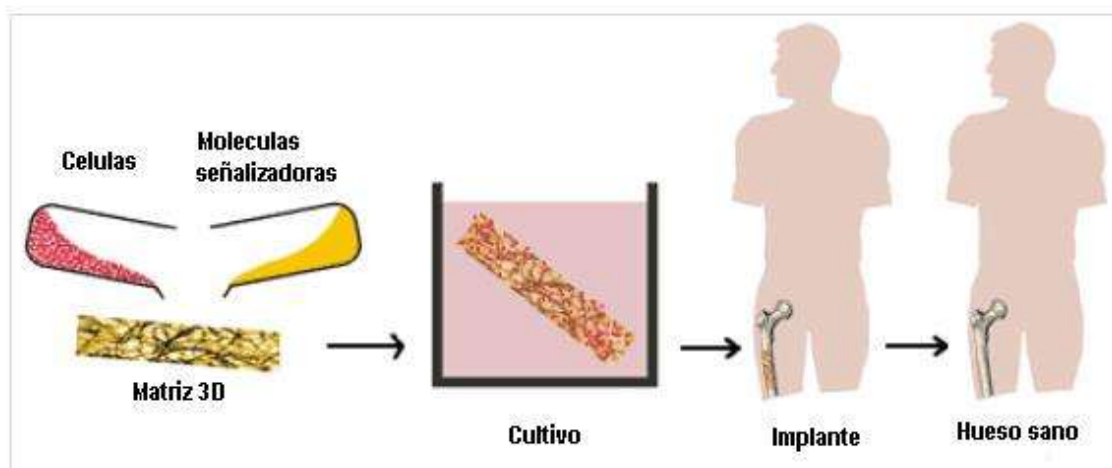


Figura 2.1 Estrategia de la ingeniería de tejidos [3]

Los tratamientos médicos actuales para daños severos de hueso son muy problemáticos y generan resultados muy pobres. La mejor técnica con la que se cuenta en la actualidad es el trasplante de tejido óseo natural del mismo paciente (autoinjerto). Sin embargo, existen sitios limitados del cuerpo de donde el hueso puede ser extraído sin perder su función. Los

autoinjertos son menos efectivos en defectos óseos con formas irregulares y pueden ser reabsorbidos en lugar de completar la curación. Además, existen complicaciones inherentes a esta técnica como infecciones, fracturas, dolores, parestesia, daños en los nervios o algún tipo de enfermedad en el sitio del cuerpo del paciente del cual se extrae el tejido.

Otro tipo de tejido óseo utilizado son los aloinjertos derivados de cadáveres. Sin embargo, la transmisión de enfermedades y los riesgos de rechazo son problemas serios cuando se utilizan aloinjertos sin procesar. Al mismo tiempo, los aloinjertos procesados, por ejemplo, una matriz ósea desmineralizada, pierden algunos de los factores de crecimiento necesarios para la eficacia del injerto.

Los xenoinjertos, que son tejidos óseos obtenidos de especies diferentes, tampoco resultan una solución debido a los altos riesgo de transmisión de enfermedades y de rechazo inmunológico que poseen. Por otro lado, metales como el hierro, cobalto y titanio pueden ser implantados de manera permanente en el tejido óseo para llenar un defecto y brindar fijación interna; sin embargo, la fatiga, la corrosión, la infección de los tejidos y la pobre interface que se crea entre el tejido y el implante generan muchos problemas a los pacientes. Adicionalmente, el módulo elástico de los metales es significativamente mayor al del hueso natural, esto hace que ellos absorban la mayor parte de los estímulos mecánicos necesarios para la correcta formación del nuevo hueso. Esta atenuación de los estímulos mecánicos puede generar la reabsorción del hueso alrededor del implante, haciendo necesaria su remoción.

Por otro lado, las cerámicas, los biovidrios, son también usadas en el tratamiento de daños y problemas óseos. Entre ellas, el Bioglass 45S5 es una de las más utilizadas ya que presenta unión ósea. Pero, mientras que las cerámicas pueden ofrecer una excelente biocompatibilidad, son demasiado frágiles para proveer un soporte estructural y resistir a las cargas de los huesos, pero al tener un módulo de Young más cercano al del hueso permite bajar la rigidez de la interfase implante-tejido, contrario a lo que sucede con los implantes metálicos. En la Tabla 2.1 se muestran los módulos de Young para diferentes biomateriales.

Tabla 2.1 Módulos de Young para diferentes biomateriales

Material	Módulo de Young (GPa)
Acero inoxidable 316L	190
Aleaciones Co-Cr	210-253
Ti F67	110
Ti F136	116
Bioglass	22
Alúmina	380
Hueso cortical	15-30

2.1.1 Estrategias de la Ingeniería de Tejido Óseo

Actualmente ocurren numerosas fracturas y enfermedades relacionadas con la pérdida de hueso. El daño del hueso en fracturas severas o la remoción por la existencia de tumores producen desuniones que no pueden ser reparadas por la respuesta natural del cuerpo y, por tanto, se requiere de intervención médica. Sin embargo, los tratamientos más avanzados disponibles en la actualidad poseen una efectividad limitada y diversas complicaciones inherentes. En ello radica la necesidad de encontrar una estrategia alternativa para el tratamiento de estos problemas. El tratamiento ideal sería aquel que pueda imitar o mejorar la respuesta natural del cuerpo frente a los daños en el hueso a través del uso de células y factores de crecimiento bioactivos. Este tratamiento daría como resultado un hueso natural, de crecimiento mecánicamente inducido en el lugar del daño, eliminando la necesidad del implante permanente de un material que pueda impedir el crecimiento natural del hueso.

La ingeniería de tejidos busca combinar la tecnología de la ingeniería con los principios de las ciencias biológicas para desarrollar nuevas estrategias para la reparación y regeneración del tejido perdido o dañado. Sus estrategias se pueden dividir en tres categorías:

1. Basada en células.
2. Basada en factores de crecimiento.
3. Basada en matrices.

En la práctica, la mayor parte de los trabajos experimentales implementan más de una de estas estrategias juntas. Por ejemplo, un andamio biodegradable puede estar diseñado para transportar células a un defecto mientras libera factores de crecimiento al tejido circundante a medida que se degrada. En el campo de la ingeniería de tejidos, estas estrategias requieren la interacción entre elementos **osteogénicos**, **osteoinductivos** y **osteoconductivos**. Los componentes osteogénicos incluyen células capaces de producir hueso como las células osteoprogenitoras o los osteoblastos diferenciados. Los factores osteoinductivos son elementos químicos bioactivos que inducen al reclutamiento, diferenciación y proliferación de las células apropiadas para la reparación y regeneración de un defecto óseo. Un material osteoconductivo es aquel que actúa como soporte para el crecimiento del hueso. Por ejemplo, un andamio osteoconductivo puede dar soporte mecánico, permitir que las células se adhieran, facilitar la vascularización y actuar como vehículo para las células y los factores de crecimiento [4].

Para lograr un tratamiento efectivo en la regeneración del tejido óseo, un dispositivo diseñado dentro del campo de la ingeniería de tejidos deberá cumplir con los siguientes requerimientos [5]:

1. Proveer de resistencia mecánica de manera temporal en el área afectada.
2. Actuar como un substrato para la deposición y crecimiento de los osteoides.
3. Poseer una estructura porosa que permita la vascularización y el crecimiento óseo.
4. Fomentar la migración de células reparadoras del hueso a la zona del defecto y estimular su actividad para la regeneración y reparación.
5. Degradarse de manera controlada para facilitar la transferencia de la solicitación mecánica al hueso en formación y para permitir su crecimiento dentro del defecto.
6. Degradarse liberando productos no tóxicos que puedan ser eliminados por el cuerpo.
7. No causar una respuesta inflamatoria significativa.
8. Ser esterilizable sin perder su cualidad de bioactivo.

2.1.2 Andamios para Ingeniería de Tejidos

Las estrategias de la ingeniería de tejido óseo basadas en factores de crecimiento y aquellas basadas en células proveen del componente osteogénico y osteoinductivo para un potencial tratamiento de daños severos del hueso o pérdida del mismo. De igual manera, un andamio preparado a partir de un biomaterial es esencial para llenar el defecto y para actuar como transportador de las células y/o de los factores de crecimiento utilizados en la reparación del defecto.

Adicionalmente, el andamio debe proveer de soporte mecánico temporal, osteoconductividad, una arquitectura porosa, una capacidad de degradación controlada, biocompatibilidad por sí mismo y de los productos que libera durante su degradación, y debe poder ser esterilizado.

2.1.3 Requerimientos en el Diseño

Las propiedades mecánicas de un andamio deben adecuarse a aquellas del tejido que se busca reparar o regenerar para proveer una estabilidad estructural en el lugar del daño. El biomaterial elegido debe ser lo suficientemente fuerte para soportar la carga fisiológica del cuerpo sin absorber el estímulo mecánico requerido para el crecimiento natural en el área afectada. También es imprescindible que el biomaterial permita una transferencia gradual de carga para permitir una reparación correcta del tejido.

La osteoconductividad se refiere a la capacidad que un material posee para actuar como un sustrato en el cual las células puedan adherirse y desarrollar sus funciones, mientras que se facilita el crecimiento del hueso a través de un andamio tridimensional que llene el defecto. Para ello se requiere de una estructura porosa que permita el crecimiento del hueso y la vascularización a través del andamio. Idealmente, un andamio debe estar diseñado para maximizar la porosidad manteniendo unas propiedades mecánicas suficientes, y poseer poros interconectados de aproximadamente 200-400 μm [6]. Este tipo de estructura provee una elevada área superficial para la adhesión, crecimiento y desarrollo de la función de las células, y al mismo tiempo, espacios vacíos de un tamaño suficiente para permitir la formación del hueso y la vascularización. Un biomaterial que pueda ser inyectado ofrece la ventaja adicional de la fabricación de implantes de formas irregulares mediante el uso de moldes o de su inyección directa en un defecto. El andamio tampoco deberá producir una respuesta inflamatoria significativa que pueda resultar en la formación de una cápsula fibrosa alrededor del implante, de lo contrario éste se vuelve inefectivo. Una respuesta tóxica del tejido circundante al biomaterial causaría la muerte celular y agravaría el daño.

2.2 Biomateriales

Un biomaterial es un material sintético que se utiliza en íntimo contacto con los tejidos vivos. Una definición más precisa de un biomaterial se dio en 1986, en la conferencia de consenso de la sociedad europea de biomateriales, cuando un biomaterial se definió como “un material utilizado en un dispositivo médico que va a interactuar con los sistemas biológicos” [7].

La principal aplicación de los biomateriales, incluyendo las aleaciones metálicas, es reparar o reconstruir las partes del cuerpo humano que han sufrido daño o se han perdido, con lo que se busca relevar el sufrimiento y prolongar la vida. Los biomateriales cumplen funciones básicas en el cuerpo humano, asegurando la calidad de vida de las personas enfermas o de quienes han sufrido accidentes traumáticos, proveyéndolas de implantes ortopédicos, reguladores de

sistemas cardiovasculares y biosensores, por mencionar algunos ejemplos. Según su composición química, los biomateriales se clasifican en metálicos, plásticos (o poliméricos), cerámicos y compuestos; de acuerdo con su origen, en naturales y sintéticos y por su estructura, en sólidos y porosos, pero existe otra clasificación práctica que comprende dispositivos implantables: ortopédicos y vasculares (como los tubos de dacrón utilizados como sustitutos de venas), marcapasos, anticonceptivos, dentaduras fijas y removibles. Los dispositivos no implantables incluyen sondas, catéteres y globos angioplásticos que permiten realizar operaciones de dilatación de venas o arterias obstruidas. El conocimiento y la aplicación de los biomateriales involucra un amplio espectro de disciplinas: medicina, biología, química, física, mecánica, metalurgia, ingeniería, informática y computación; así como numerosas áreas de actividad, algunas bien establecidas y otras nuevas o innovativas, las cuales se desarrollan en instituciones de estudio e investigación, hospitales y escuelas de medicina.

Los dispositivos biomédicos adaptados al cuerpo humano se fabrican con los cuatro materiales de ingeniería convencionales: metálicos, plásticos, cerámicos y compuestos; según el uso, ubicación, función; órgano o tejido duro o blando a reemplazar o reparar. Los metales se utilizan básicamente en implantes y fijaciones ortopédicas; los plásticos flexibles para corregir tejidos blandos, cartílagos, venas y arterias; los plásticos rígidos para reemplazar la cabeza del fémur que gira dentro de la concavidad de la pelvis; asimismo, los materiales cerámicos se emplean en el reemplazo de huesos y como recubrimientos sobre metales. También se aplican materiales avanzados como las aleaciones con memoria de forma, las cuales pueden cambiar por efecto de la temperatura dentro del cuerpo humano. Los materiales porosos, por su parte, permiten el crecimiento del hueso dentro de los poros y su posterior unión con las fibras de los tejidos adyacentes. Las espirales elásticas de acero inoxidable introducidas en venas o arterias cubren el objetivo de evitar que éstas se colapsen. La composición química de los metales y aleaciones afecta en forma significativa el comportamiento de corrosión en el cuerpo humano; un ejemplo puede ser el caso del contenido de carbono y nitrógeno, así como su microestructura, el tamaño de grano, la presencia de inclusiones no metálicas y la rugosidad de la superficie, factores que se rigen por normas nacionales y en particular por el estándar ISO5832.

Los biomateriales deben cumplir con tres exigencias elementales: ser biocompatibles, resistir a la corrosión de los fluidos corporales y cumplir la función biológica o mecánica planeada. En la Tabla 2.2 se presentan ejemplos de los cuatro tipos de biomateriales, sus propiedades y sus variadas aplicaciones primordiales.

Tabla 2.2 Biomateriales, propiedades y aplicaciones [7]

BIOMATERIAL	PROPIEDADES	APLICACIONES
Metales y Aleaciones. Aceros inoxidables, aleaciones de Titanio (Ti), de cobalto (Co), Nitinol.	Alta densidad, resistencia mecánica al desgaste, impacto, tensión y compresión, baja biocompatibilidad, resistencia a la corrosión	Implantes y fijaciones ortopédicas con tornillos, placas, alambres, varillas, clavos, implantes dentales
Cobre (Cu)	Se corroe en el útero	Dispositivos anticonceptivos
Amalgamas y aleaciones dentales	Biocompatibles con saliva	Implantes dentales y reparaciones.
Espirales vasculares elásticas (stents)	Biocompatibles con sangre	Reparación de venas y arterias.
Plásticos (polímeros) Hule (goma) sintéticos, polietileno, polipropileno, acrílicos, teflón.	Baja densidad y resistencia mecánica, facilidad de fabricación, formación de biopelículas	Suturas, sustitución de arterias y venas, restauración maxilofacial.
Dacron, Nylon (poliéster)		Hilos de suturas
Cerámicos Óxidos metálicos, alúmina (Al ₂ O ₃), zirconia (ZrO ₂), Titania (TiO ₂), fibra de carbono, apatita artificial. Biovidrios.	Buena biocompatibilidad, resistencia a la corrosión, inertes, alta resistencia a la compresión, alta densidad y dureza, dificultad de maquinado y fabricación	Caderas protésicas, dientes cerámicos, cementos.
Compuestos	Buena biocompatibilidad, inertes, alta resistencia a la corrosión y a la tensión. Falta	Implantes ortopédicos reforzados con fibras de carbono, válvula artificial

Metal cubierto con cerámica: Ti con hidroxiapatita porosa.	de consistencia en la fabricación del material.	cardiaca, restauración de articulaciones.
---------------------------------------------------------------	----------------------------------------------------	----------------------------------------------

Material cubierto con carbón
o diamante

2.3 Clasificación de los Biomateriales de Acuerdo con la Interfase Formada con el Tejido

Por muchos años, se pensaba que las interacciones entre el cuerpo y los implantes podría causar solo reacciones no deseadas, tales como irritación y daño de los tejidos y finalmente la muerte. Esto era debido a la observación de que si un material tóxico era puesto en contacto con un tejido éste moría [8]. Por esta razón, los biomateriales utilizados en un principio debían ser tan químicamente inertes como fuera posible. Sin embargo, incluso el material más inerte (bioinerte) provoca una reacción del cuerpo una vez implantado [9,10]. Una delgada no adherente cápsula fibrosa se desarrolla en materiales bioinertes después de que permanecen en contacto con el medio ambiente del cuerpo durante algún tiempo. Este previene interacciones adicionales con los tejidos. El espesor de la capa fibrosa protectora desarrollada depende del tipo de material bioinerte. Este tipo de interfaz no dura mucho tiempo. Eventualmente, se produce un deterioro, y la eliminación quirúrgica del dispositivo es necesaria. Por esta razón, la investigación en biomateriales cambio al desarrollo de materiales que pueden interactuar con el cuerpo induciendo una respuesta deseable por el tejido del huésped. Existen cuatro tipos de respuestas de los tejidos, los cuales se resumen en la Tabla 2.3

Tabla 2.3 Tipos de respuestas de materiales en contacto con tejido vivo [8]

Material	Respuesta
Tóxico	El tejido circundante muere
No-tóxico y biológicamente inactivo (cercano a inerte)	Formación de tejido fibroso de espesor variable
No-tóxico y biológicamente activo (bioactivo)	Formación de una unión interfacial
No-toxico y se disuelve	El tejido circundante lo reemplaza

Los materiales porosos pueden lograr una fijación biológica. En este caso, una unión mecánica se obtiene por crecimiento del hueso en los poros, si éstos tienen un diámetro mayor de 100 micras [11]. El aumento de la zona interfacial entre el implante y el tejido aumenta la resistencia al movimiento del dispositivo en el tejido. Sin embargo, también los materiales porosos no duran mucho tiempo una vez implantados. Su resistencia mecánica no es tan alta como los materiales densos, y la corrosión debido a la exposición de una gran área superficial a los fluidos corporales disminuye aún más su resistencia.

Los biocerámicos reabsorbibles representan una solución alternativa al problema, estos materiales se supone que aumentan la capacidad del cuerpo para auto-repararse. Esto ocurre ya que el material se degrada gradualmente durante un periodo de tiempo, y es sustituido por el tejido huésped natural. Una cuestión importante es la biocompatibilidad de los productos de la resorción o reabsorción. Además, la reabsorción debe de producirse a un ritmo similar al metabolismo celular. Estos requisitos son muy difíciles de cumplir, y por esta razón no muchos materiales reabsorbibles son de aplicación clínica todavía. Una solución valiosa para resolver este problema es la utilización de materiales bioactivos

2.4 Materiales Bioactivos

Los materiales artificiales que son implantados en defectos óseos son generalmente aislados del hueso circundante por medio de una cápsula fibrosa. Consecuentemente, no pueden adherirse al hueso y esto ha sido un problema crítico en su aplicación para la regeneración ósea. Desde 1970, este hecho ha podido ser resuelto por medio del uso de materiales bioactivos que espontáneamente crean un enlace y se integran al hueso en el cuerpo.

De acuerdo a la Conferencia de Consenso sobre Definiciones en Biomateriales organizada por la Sociedad Europea de Biomateriales (ESB – *European Society of Biomaterials*) de 1987 [4], un material bioactivo es aquel “que ha sido diseñado para inducir una actividad biológica específica”. Obviamente, esta definición ha cambiado con el curso del tiempo. *Kokubo* y *Takadama* [1] afirman que, “el requisito esencial para que un material pueda unirse al hueso vivo es la formación hueso tipo apatita sobre la superficie del material cuando es implantado en el cuerpo vivo”.

Diversos tipos de materiales bioactivos han sido desarrollados durante las últimas tres décadas. De entre ellos, los más usados en aplicaciones clínicas son: el Bioglass® en el sistema $\text{Na}_2\text{O}-\text{CaO}-\text{SiO}_2-\text{P}_2\text{O}_5$, la hidroxiapatita sintética (HA) $(\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2)$, el fosfato tricálcico β sintético (TCP) $(\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2)$, el cerámico bifásico HA/TCP, el vitrocerámico A-W que contiene oxifluorapatita cristalina $(\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{O},\text{F}_2))$ y la wollastonita β $(\text{CaO}\cdot\text{SiO}_2)$ en una matriz vítrea $\text{MgO}-\text{CaO}-\text{SiO}_2$. Estos materiales han sido desarrollados en volumen y en partículas con estructuras densas y porosas.

Los materiales bioactivos presentan una característica común en la interface con el hueso después de su integración. Por ejemplo, el Bioglass®, la HA y el vitrocerámico A-W, revelan una capa de apatita en la interface que es mediadora de la integración con el hueso.

Evaluaciones histológicas *in vivo* muestran que esta capa de apatita se forma en la superficie de estos materiales en una etapa temprana del periodo de inmersión, y que más tarde la matriz ósea se integra a esta apatita. Esta capa de apatita consiste en cristales nanométricos de una apatita que contiene iones de carbono, una estructura defectuosa y de baja cristalinidad. Estas características son similares a las de la fase mineral del hueso y, entonces, las células encargadas de la regeneración del hueso, pueden proliferar en la apatita y diferenciarse para formar una matriz extracelular compuesta por apatita biológica y colágeno. Como resultado, el hueso circundante se encuentra en contacto directo con la superficie de la capa de apatita. Cuando este proceso ocurre, se crea un enlace químico entre el hueso mineral y la superficie de apatita para disminuir la energía interfacial existente entre ambas [12].

2.5 Biocerámicos

Se presenta una revisión de los diferentes biocerámicos que actualmente se estudian haciendo énfasis en los biovidrios ya que este material es el que será utilizado durante el desarrollo de este proyecto.

Los cerámicos utilizados especialmente para la reparación, reconstrucción y sustitución de partes enfermas o dañadas del cuerpo son conocidos como biocerámicos. En el pasado, los cerámicos y vidrios fueron utilizados en una amplia gama de aplicaciones relacionadas con la medicina, como, por ejemplo: lentes, instrumentos de análisis, etc. Sin embargo, el uso de cerámicos en el interior del cuerpo es relativamente nuevo. Hoy en día, los biocerámicos se utilizan para una gran cantidad de aplicaciones diferentes en el interior del cuerpo humano.

Los biocerámicos pueden ser policristalinos (alúmina o hidroxiapatita), biovidrios (Bioglass 45S5), vitrocerámicos bioactivos (A/W), o compósitos bioactivos (polietilen-hidroxiapatita).

Una comparación de la actividad química relativa de los diferentes tipos de biocerámicos, se muestra en la Figura 2.2. La reactividad relativa mostrada en la Figura 2.2(a) tiene una relación muy cercana con la velocidad de formación de una unión interfacial en los implantes cerámicos, biovidrios, y vitrocerámicos con el hueso de la Figura 1.2(b). En nivel de reactividad de un implante influye en el espesor de la zona interfacial o la capa que existe entre el material y el tejido. Análisis de fallas a implantes durante los pasados 20 años generalmente muestran que la falla se origina en la interface biomaterial-tejido.

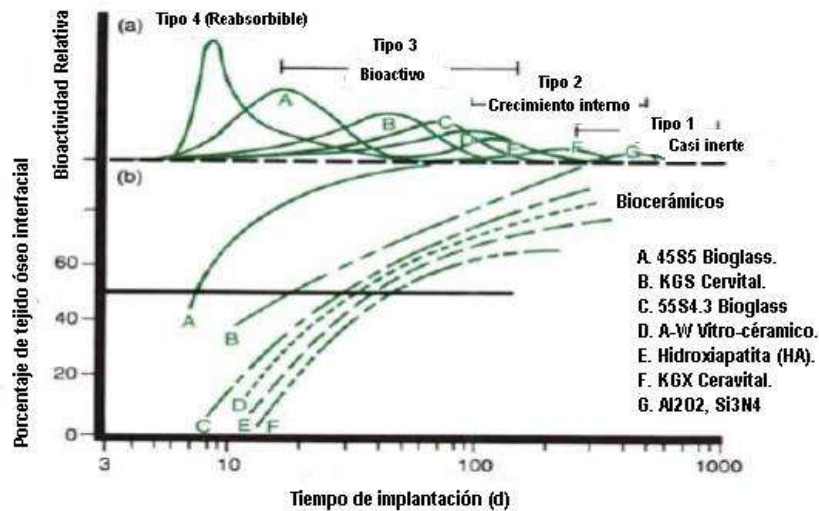


Figura 2.2 Espectro de bioactividad de varios implantes biocerámicos: (a) relación relativa de bioactividad, (b) Dependencia con el tiempo de formación de unión ósea en la interfase del implante [10]

2.6 Biovidrios

Biovidrios es el nombre de una serie de composiciones de vidrios que poseen la habilidad de crear un enlace con el hueso y otros tejidos, descubiertos por Hench en 1969 [13]. Estos vidrios son producidos como los vidrios convencionales en los cuales los componentes básicos son SiO₂, Na₂O, CaO y P₂O₅, y se comercializan con el nombre de Bioglass®. Una técnica más reciente para la obtención de los vidrios bioactivos es el uso del proceso de sol-gel que da como resultado estructuras porosas finas con una bioactividad más alta que los vidrios convencionales de la misma composición. Cada componente brinda su propia contribución a los vidrios bioactivos, pero el CaO y el Na₂O pueden ser sustituidos sin afectar en gran medida al enlace con el hueso. Incluso los vidrios sin P₂O₅ son bioactivos, contrariamente a lo que se creía hace unos años que era un componente indispensable. La habilidad de crear un enlace con el hueso se basa en la reactividad química de los vidrios bioactivos en los cuales los enlaces de silicio están rotos y, finalmente, una capa rica en fosfato de calcio (CaP) se deposita en la superficie del vidrio que cristaliza transformándose en hidroxiapatita carbonatada (HCA) que provee una interface de unión con los tejidos.

La unión hacia el tejido óseo fue primeramente demostrada para un rango composicional de biovidrios con contenidos de SiO₂, Na₂O, CaO y P₂O₅ en proporciones específicas mostradas en la Tabla 2.4.

Tabla 2.4 Composiciones de diferentes tipos de Bioglass [14]

	45S5	45S5F	45S5.4F	40S5B5	52S4.6	55S4.3
	Bioglass	Bioglass	Bioglass	Bioglass	Bioglass	Bioglass
SiO ₂	45	45	45	40	52	55
P ₂ O ₅	6	6	6	6	6	6
CaO	24.5	12.25	14.7	24.5	21	19.5
CaF ₂		12.25	9.8			
Na ₂ O	24.5	24.5	24.5	24.5	21	19.5
B ₂ O ₃				5		
Estructura	Vidrio	Vidrio	Vidrio	Vidrio	Vidrio	Vidrio

Existen tres características claves en la composición de estos biovidrios que los distinguen de los vidrios tradicionales de cal-sílice: menos de 60% mol de SiO₂, alto contenido de Na₂O y CaO, y alto valor en la relación CaO/P₂O₅. Estas características hacen la superficie altamente reactiva cuando se exponen a un medio acuoso.

Una variedad de biovidrios base sílice están basados en la fórmula llamada 45S5, que significa 45% peso de SiO₂ y la relación molar de 5:1 de calcio a fósforo (Ca/P). Vidrios con relaciones substancialmente menores de Ca/P no presentan unión ósea. Sin embargo, algunas sustituciones en la fórmula 45S5 de 5-15% peso de B₂O₃ por SiO₂ o 12.5% de CaF₂ por CaO, no tienen efecto sobre la habilidad del material de formación de unión con el tejido óseo. No obstante, cuando se adiciona un pequeño contenido (3% en peso) de Al₂O₃ a la fórmula, ésta previene la capacidad de unión con el tejido óseo del biovidrio.

La dependencia composicional de la unión ósea de los vidrios de composición Na₂O-CaO-P₂O₅-SiO₂ se ilustra en la Figura 2.3. Todos los vidrios en la Figura 2.3 contienen 6% peso de P₂O₅.

Las composiciones en el centro del diagrama (región A) forman una unión con el hueso. Consecuentemente, la región A es llamada el límite bioactivo de unión ósea. Los vidrios silicatados dentro de la región B (vidrios de botellas, ventanas, portaobjetos de microscopios) se comportan de manera casi inerte y provocan un encapsulamiento del tejido fibroso en la interface implante-tejido. Los vidrios dentro de la región C son reabsorbibles y desaparecen en el rango de 10-30 días después del implante. Los vidrios dentro de la región D no son teóricamente prácticos y por lo tanto no han sido analizados como implantes. *Gross et al.* [14] han mostrado que un rango bajo de álcalis (0-5% en peso) de biovidrios basados en SiO_2 también presentan unión con el hueso.

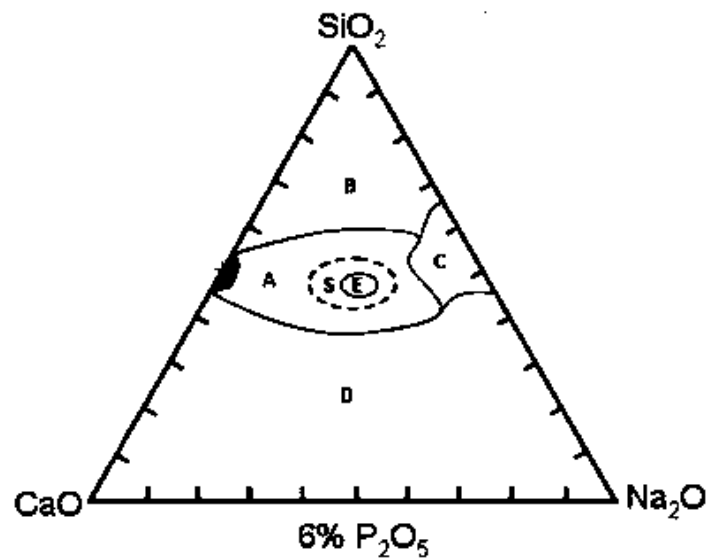


Figura 2.3 Regiones de bioactividad del sistema $\text{CaO-SiO}_2\text{-Na}_2\text{O}$ [15]

El colágeno, constituyente de los tejidos blandos, puede adherirse fuertemente a los biovidrios que se encuentran en la gama de composiciones de la región A, que se muestra en la Figura 2.3. Las fibras de colágeno forman un tejido en la interfase por el crecimiento de una capa de HCA sobre la superficie del biovidrio como se muestra en la Figura 2.4. Los aglomerados densos de colágeno-HCA imitan la naturaleza del enlace entre ligamentos y tendones, compuestos completamente de fibras de colágeno y del hueso y los dientes que son compósitos de cristales de HCA y colágeno [16,17]. Pruebas con colágeno-biovidrio produjeron uniones interfaciales similares a las que se producen en el tejido suave conectivo Figura 2.5, como lo descubierto por primera vez por *Wilson et al.* [18,19].

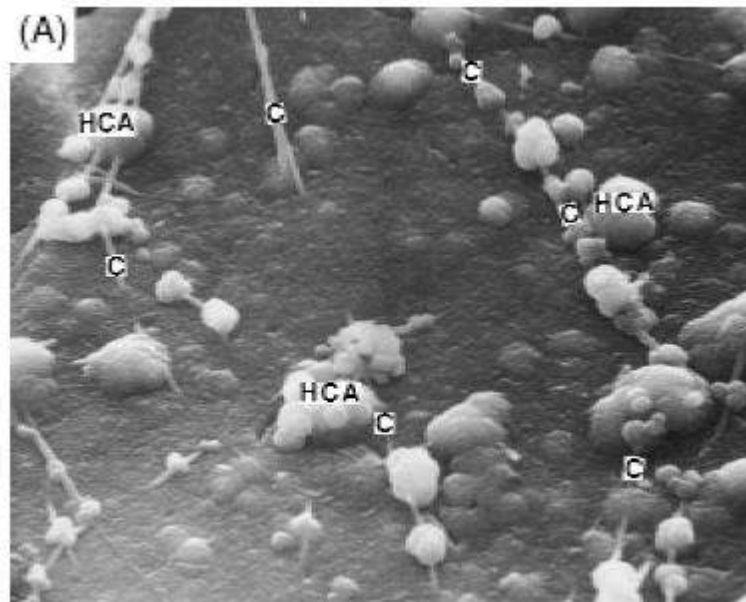


Figura 2.4 Imagen de MEB de fibras de colágenos [C] incorporado en la capa de [HCA] que crecen sobre un sustrato de biovidrio 45S5 in vitro. (foto cortesía del profesor Carlo Pantano de la Universidad del estado de Pensilvania de EUA) [20]

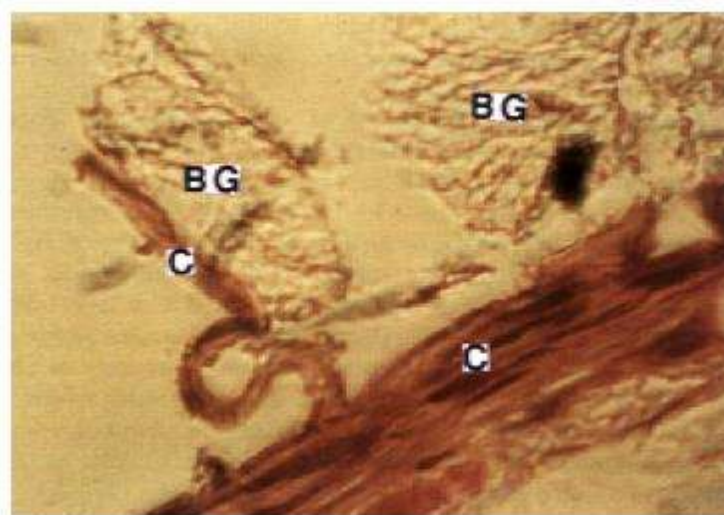


Figura 2.5 Adhesión de fibras de colágeno a biovidrio [20]

La interfaz compuesta de HCA-colágeno sobre biovidrio 45S5 es de 35-60 μm del espesor total de la interface que es de 100-200 μm . Este espesor de unión es equivalente al que se da en las interfaces de origen natural, donde se produce una transición entre los materiales con bajo módulo de Young (tendones y ligamentos) y aquellos con moderadamente altos módulos de

Young (huesos y dientes). Esta es una de las grandes ventajas en utilizar el biovidrio 45S5 ya que puede formar enlace tanto con tejidos duros como suaves.

2.7 Métodos para la Obtención de Materiales Porosos

2.7.1 Método de la Réplica

El método de la réplica consiste en sumergir una estructura celular (sintética o natural) en una suspensión que contiene partículas cerámicas y aditivos apropiados (aglutinantes y dispersantes), seguido por el secado para evaporar el disolvente, y de un calentamiento a temperaturas de entre 300 y 800 °C, velocidades menores a 1 °C/min son usualmente requeridas en este paso para promover la descomposición de la parte orgánica y así evitar la acumulación de presión dentro de las paredes de la estructura. Ligantes y plastificantes son usualmente adicionados en la suspensión inicial con la finalidad de proveer al recubrimiento cerámico de resistencia suficiente para prevenir fracturas de las paredes durante el calentamiento. Los ligantes típicos utilizados son: ortofosfato de aluminio coloidal, silicato de potasio y sodio, ortoborato de magnesio, alúmina hidratable, sílice coloidal, entre otros. Una vez removido el molde polimérico, la capa cerámica es finalmente densificada por sinterización bajo una atmósfera apropiada en un rango de temperaturas de 1100 a 1700 °C, dependiendo del material [21].

Cerámicos macroporosos de diferentes composiciones químicas han sido preparados mediante la técnica de réplica, Al_2O_3 , SiC, SiO_2 , TiO_2 , Si_3N_4 , HA. Los cerámicos porosos obtenidos mediante la técnica de la réplica con esponja pueden llegar a niveles de porosidad abierta en el rango de 40-95% y son caracterizadas por una estructura reticular con porosidad interconectada con tamaños de 200 μm a 3 mm. La alta interconectividad de los poros mejora la permeabilidad de los fluidos y gases a través de la estructura porosa [22].

Chen et al. [23] obtuvieron espumas de Bioglass 45S5 mediante la técnica de réplica. En la Figura 2.6, se observa una micrografía de MEB de una espuma de Bioglass 45S5 obtenida por Chen mediante el método de replicación, en la cual se puede observar que obtuvieron una porosidad tipo panal.

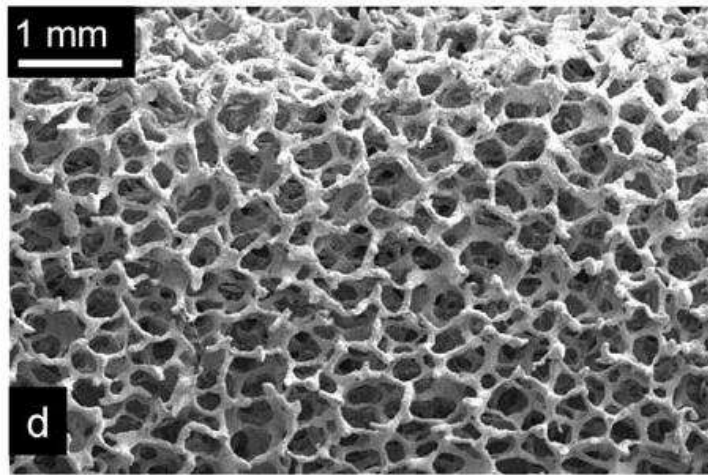


Figura 2.6 Imagen de MEB de espuma de Bioglass 45S5 obtenida por el método de replicación [23]

Una desventaja de la técnica de réplica con esponjas es el hecho de que los puntales de la estructura reticular se fracturan con frecuencia durante el calentamiento del molde, bajando considerablemente la resistencia mecánica final del cerámico.

2.7.2 Método del Molde de Sacrificio

La técnica del molde de sacrificio usualmente consiste en la preparación de un compuesto bifásico, que contiene una matriz continua de partículas cerámicas y una fase dispersa de sacrificio, que es distribuida homogéneamente en toda la matriz y es en última instancia, extraída para generar la porosidad dentro de la microestructura. Este método conduce a un material poroso que muestra una réplica negativa de la plantilla de sacrificio original, contrario a la morfología positiva obtenida de la técnica de réplica descrita anteriormente.

El compuesto bifásico es comúnmente preparado por la compresión de una mezcla de polvos de dos componentes, la formación de una suspensión bifásica, la cual es subsecuentemente tratada por rutas húmedas coloidales o por la impregnación previa de preformas consolidadas del material de sacrificio con suspensión cerámica [24,25].

La manera en la cual el material de sacrificio es removido del compuesto depende primordialmente del tipo de formador de poro empleado. Una gran variedad de materiales de sacrificio han sido usados como formadores de poro, incluyendo orgánicos naturales y sintéticos, sales líquidas, metales y compuestos cerámicos. Orgánicos naturales y sintéticos son usualmente removidos por pirólisis aplicando tratamientos térmicos largos a temperaturas de 200-600 °C. Los largos periodos requeridos para una pirólisis completa del componente orgánico y la gran cantidad de productos gaseosos generados durante este proceso son las principales desventajas del uso de materiales orgánicos como materiales de sacrificio.

2.7.3 Método de Espumado Directo

En el método de espumado directo, los materiales porosos son producidos mediante la incorporación de aire en una suspensión o medio líquido que, posteriormente, es mantenido para conservar la estructura de burbujas de aire creadas. En la mayoría de los casos, las espumas consolidadas son más tarde sinterizadas a altas temperaturas para obtener cerámicos porosos de alta resistencia.

La porosidad total de la espuma cerámica es proporcional a la cantidad de gas incorporado dentro de la suspensión o medio líquido durante el proceso de espumado. Por otro lado, el tamaño de poro, es determinado por la estabilidad de la espuma antes de que ésta se realice. Los métodos de espumado directo usualmente son fáciles, baratos y se preparan de una manera rápida, obteniéndose los cerámicos macroporosos con porosidades abiertas y cerradas que van en el rango de 40 al 97%. La estabilización y formación de las espumas es un paso decisivo en este método. Las espumas suelen ser estabilizadas con surfactantes para obtener cerámicos porosos que exhiben tamaño de poro que van de 35 μm a 1.2 mm.

Estructuras celulares preparadas por espumado directo, usualmente exhiben resistencia mecánica considerablemente mayor que las obtenidas por la técnica de réplica debido principalmente a la ausencia de defectos en los puntales de la estructura. Resistencia a la compresión de 16 MPa a niveles de porosidad de 87-90% han sido obtenidas de cerámicos porosos producidos por espumado directo.

2.7.4 Variante de Metalurgia de Polvos

Este proceso consiste en la mezcla en seco de los polvos cerámicos o metálicos con un aglutinante polimérico sólido y un agente espumante [26]. La mezcla entonces se moldea en la forma deseada y es tratada térmicamente en un ciclo de tres periodos. Durante la primera etapa (espumado), el aglutinante es fundido para crear una suspensión cargada con partículas metálicas o cerámicas. Durante este periodo, el agente espumante se descompone y libera un gas que expande la estructura, creando así porosidad interconectada en la estructura. La segunda etapa (pirólisis) consiste en la descomposición del ligante polimérico a una temperatura intermedia. La tercera etapa (sinterizado) es realizada para proveer resistencia mecánica a la espuma. La estructura de la espuma puede ser modificada mediante cambios en la formulación o con la variación de las condiciones de espumado y/o sinterizado.

Lefebvre et al. [27] han logrado obtener espumas de titanio mediante el método de tecnología de polvos y espumado de polímeros, las cuales presentan una estructura celular abierta y son permeables. En la Figura 2.7 se muestra una micrografía de MEB donde se pueden observar la porosidad abierta de las espumas obtenidas por este grupo de investigadores.

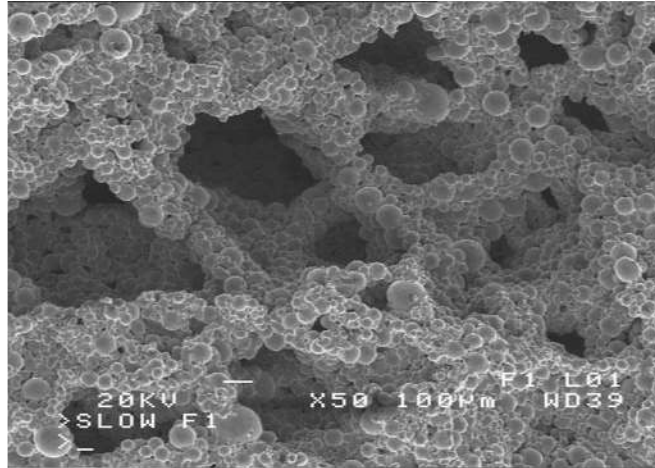


Figura 2.7 Imagen de MEB de espuma de Ti [27]

2.8 Evaluación de la Bioactividad

Como fue expuesto anteriormente, los materiales artificiales que son implantados en defectos óseos son generalmente aislados por medio de una cápsula fibrosa, y, por tanto, no pueden estar en contacto con el hueso. Después de que en 1972 se demostró que algunos vidrios bioactivos crean espontáneamente enlaces con el hueso sin formar cápsula fibrosa, surgió el concepto de bioactividad y numerosos tipos de materiales han sido estudiados, buscando determinar sus propiedades bioactivas.

La realización directa de estudios *in vivo* en animales con este fin resulta una práctica muy costosa y poco eficiente. Por ello, se requieren métodos de evaluación de la bioactividad *in vitro*, que brinden información preliminar, evitando el sacrificio innecesario de animales.

A continuación, se abordan dos métodos que permiten obtener información previa sobre las propiedades bioactivas de materiales, sumergiéndolos en medios líquidos con características similares a las de los fluidos fisiológicos.

2.8.1 Fluido Corporal Simulado (SBF– Simulated Body Fluid)

En el año 1991 fue propuesto por Kokubo [28] que el requisito principal para que un material artificial pueda crear un enlace directo con el hueso es la formación de una capa de apatita similar a la del hueso en su superficie, luego de ser implantado en el cuerpo humano. Según Kokubo, esta formación puede ser reproducida en un fluido corporal simulado (SBF) que contiene concentraciones de iones similares a las del plasma sanguíneo humano (Tabla 2.5) [28]. Esto significa que la bioactividad de un material puede predecirse por medio de la formación de apatita en su superficie cuando se lo sumerge en SBF.

Tabla 2.5 Concentración de iones de SBF y el plasma sanguíneo [28]

Ion	Plasma sanguíneo (mM)	SBF (mM)
Na⁺	142.0	142.0
K⁺	5.0	5.0
Mg²⁺	1.5	1.5
Ca²⁺	2.5	2.5
Cl⁻	103.0	147.8
HCO³⁻	27.0	4.2
HPO₄²⁻	1.0	1.0
SO₄²⁻	0.5	0.5
pH	7.2-7.4	7.4

Desde entonces, la bioactividad de muchos tipos de materiales ha sido evaluada por inmersión en SBF. Por ejemplo, los vitrocerámicos del tipo A-W han demostrado formar apatita en su superficie al ser sumergidos en SBF, como puede verse en la Figuras 2.8 y 2.9. Esto fue confirmado, además, por su capacidad de crear un enlace directo con el hueso en estudios *in vivo* (Fig. 2.10.). Por otro lado, los vitrocerámicos del mismo tipo A-W, pero esta vez con presencia de aluminio, no formaron capa de apatita en su superficie al ser sumergidas en SBF, así como tampoco se observaron enlaces con el hueso en estudios *in vivo*. Existen otros ejemplos en la literatura y son expuestos con mayor detalle en [29]. Para todos estos materiales, la formación de apatita en su superficie, al ser sumergidas en SBF, presenta una buena correlación con su comportamiento bioactivo en estudios realizados *in vivo*.

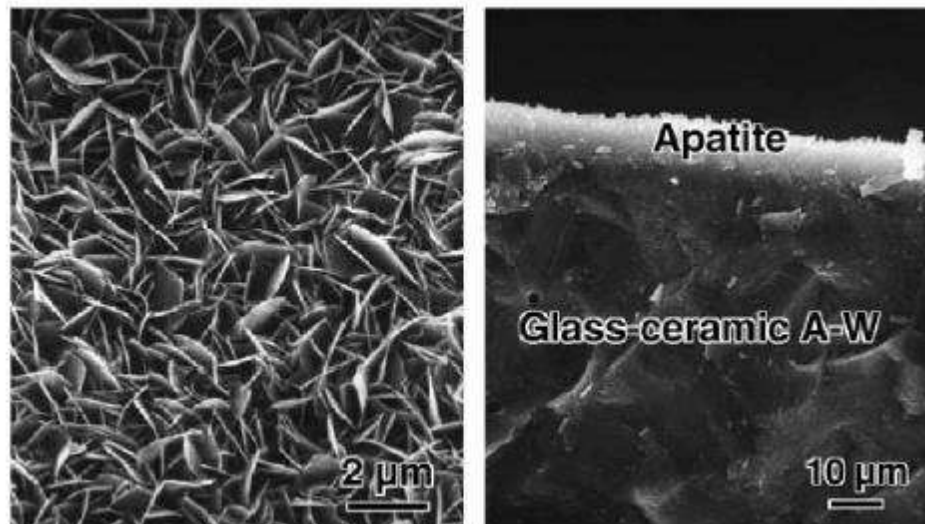


Figura 2.8 Micrografías de MEB de la superficie (izq.) y la sección transversal (der.) de una capa de apatita formada en una vitro-cerámica A-W en SBF [29]

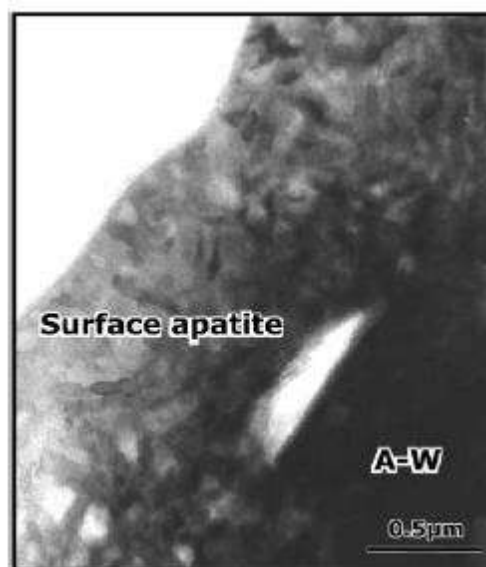


Figura 2.9 Imagen por microscopía electrónica de transmisión de la sección transversal de una capa de apatita formada en una vitro-cerámica A-W en SBF [29]

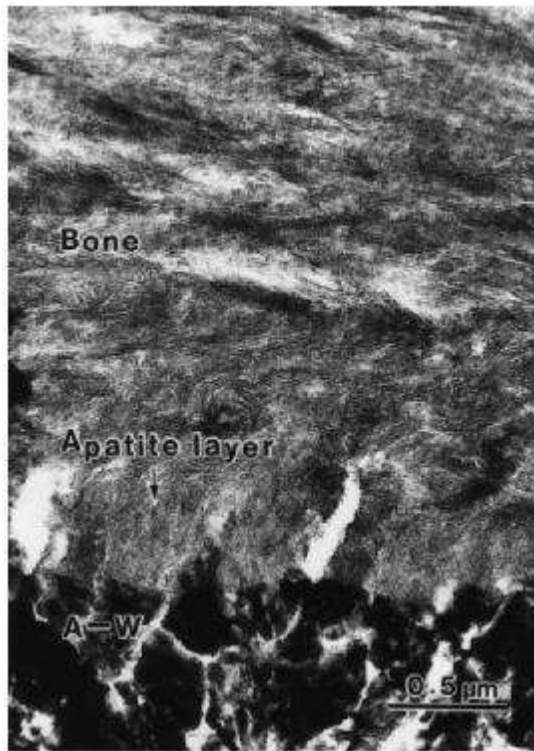


Figura 2.10 Imagen de microscopía electrónica de transmisión de la interfase entre una vitro-cerámica del tipo A-W y la tibia proveniente de una rata [29]

A partir de estos resultados, se puede decir que, si un material es capaz de formar apatita en su superficie al ser sumergido en SBF, podrá crear enlaces directos con el hueso a través de esta capa de apatita que se forma en su superficie *in vivo*, siempre y cuando el material no contenga ninguna sustancia que induzca reacciones de toxicidad o de anticuerpos. Por otro lado, también existen resultados cuantitativos [29] que muestran que el grado de formación de apatita de los materiales inmersos en SBF permite predecir el grado de formación que se tendrá *in vivo*.

Se concluye entonces, que este método puede ser usado para obtener información sobre la bioactividad de materiales antes de proceder a pruebas en animales, y que, de esta manera, se puede reducir la cantidad de animales necesarios. De este modo se pueden desarrollar nuevos materiales bioactivos de manera más efectiva y económica.

2.8.2 El suero fetal bovino (FBS – Foetal Bovine Serum) como Medio de Aportación de Proteínas Contenidas en el Fluido Corporal Humano para la Predicción de la Bioactividad en Biomateriales

El suero fetal bovino es el medio de cultivo *in vitro* y *ex vivo*, de células, tejidos y órganos más utilizado. Éste contiene los mismos componentes esenciales del suero humano como hormonas, vitaminas, proteínas de transporte y de adhesión, y factores de crecimiento [30]. El plasma es

el componente líquido de la sangre, en el cual las células están suspendidas, y sin los componentes que producen la coagulación, el plasma sanguíneo es conocido como suero.

El FBS es obtenido a partir de los fetos extraídos de presas bovinas sanas que son destinadas al consumo humano [31]. Básicamente, consiste en la sangre del feto que es recolectada y separada, de manera aséptica, de los componentes que producen la coagulación y de las células. Los fluidos fisiológicos poseen grandes concentraciones de sustancias de peso molecular bajo y alto que podrían inhibir la formación de HA. Sus componentes principales son citados en la Tabla 2.6; y como puede observarse, la mayor parte de los componentes inorgánicos están presentes en concentraciones similares a las del SBF.

Tabla. 2.6 Concentración de iones de FBS [31]

Componente	Peso molecular	g/litro	μmol/litro
Ca²⁺	40.08	0.1	2.5
Na⁺	22.99	3.31	144.0
K⁺	39.1	0.196	5.0
Mg²⁺	24.31	0.036	1.5
Cl⁻	34.45	3.79	107.0
HCO₃⁻	60	1.62	27.0
HPO₃²⁻, H₂PO₄⁻	94.97 (PO ₄)	0.19	2.0
SO₂²⁻	64.06	0.032	500
Urea	60.04	0.24	4.0
Albúmina	66000	40	600
IgG	150000	8-17	53-113

Glucosa	180	1	5.6
Lactasa	90	0.11	1.2
proteínas	-----	10-20	600

A partir de un estudio comparativo de la degradación *in vitro* de un cemento de brucita en FBS, realizado por *Grover et al* [32] se demostró que el efecto de las proteínas puede inhibir la precipitación espontánea de hidroxiapatita debido a la captación de calcio. *Meyer y Fleisch* [33] observaron que la transformación de proteína portadora de acilo en Polihidroxialcanoatos, en condiciones fisiológicas normales, es inhibida principalmente por la albúmina, seguida por el magnesio, los pirofosfatos y los citratos. Los mismos autores han observado también que el citrato, el magnesio y la albúmina aumentan la constante de equilibrio de solubilidad de la brucita, mientras que el fosfato provoca su disminución. Cada una de estas especies actúa de manera distinta. *Martin y Brown* [34] exponen que los fluidos biológicos poseen concentraciones significativas de sustancias de bajo y alto peso molecular que pueden inhibir la formación de HA. Además, afirman que la albumina rápidamente cubre la superficie de los polihidroxialcanoatos formando una capa proteica. Al realizar un estudio comparativo de la formación de HA en agua destilada y en FBS por medio de una reacción de ácido-base de dos fosfatos de calcio precursores, han observado que la formación de hidroxiapatita deficiente de calcio es considerablemente inhibida en FBS.

La utilización del FBS en estudios para la determinación del efecto de las especies orgánicas y para estimar el comportamiento de las muestras en cultivos celulares y bioreactores, es de gran utilidad, debido a su origen natural y su composición cercana a la del suero humano. No obstante, por los mismos motivos, el FBS posee un costo relativo elevado, y por tanto, se considera una práctica eficiente la realización de estudios previos con otros métodos, como por ejemplo, la utilización del SBF como medio de inmersión para obtener información preliminar sobre las propiedades bioactivas del material.

2.9 Pruebas *in vitro* de viabilidad celular

In vitro (latín: dentro del vidrio) son técnicas para realizar experimentos en tubos de ensayo, en un ambiente controlado fuera del organismo vivo. Debido a que las condiciones experimentales pueden no corresponder a las condiciones dentro del organismo, los experimentos *in vitro* pueden ser poco exactos. Este tipo de investigación apunta a describir los efectos de una variable experimental en un subconjunto de las partes constitutivas de un organismo por lo que este tipo de experimentos se enfoca en órganos, tejidos, células, componentes celulares,

proteínas y/o biomoléculas. Las pruebas *in vitro* son apropiadas para deducir un mecanismo de acción, con menos variables y reacciones amplificadas.

Los experimentos *in vitro* permiten la simplificación del sistema bajo estudio. Por ejemplo, la identidad de las proteínas del sistema inmune (por ejemplo, anticuerpos), y el mecanismo por el cual se reconocen y se unen a los antígenos extraños, seguiría siendo muy oscuro si no fuera por el uso extensivo del trabajo *in vitro* para aislar las proteínas, identificar las células y los genes que las producen, su interacción con los antígenos, e identificar cómo las interacciones conducen a las señales celulares que activan otros componentes del sistema inmune. La principal desventaja de las pruebas *in vitro* es la dificultad de extrapolar los resultados de ensayo a la biología del organismo intacto.

Entre los métodos de laboratorio para medir la viabilidad y funcionalidad celular se encuentra la evaluación de la integridad de la membrana celular. Estos métodos presuponen que las células tendrán su membrana intacta, mientras que la célula apoptótica tendrá la membrana celular alterada, por lo que permite el paso de sustancia que en condiciones normales no difundirían. Los métodos para evaluar el proceso de proliferación celular incluyen la detección de antígenos de proliferación asociados por inmunohistoquímica, la cuantificación de la síntesis de ADN mediante la medición de timidina tritiada, bromodesoxiuridina, la captación de tinción de yoduro de propidio, la cuantificación de ambiente intracelular mediante la sal de tetrazolio, la reducción de alamar Blue y cuantificación de la concentración de ATP intracelular. En estos ensayos basados en el principio de exclusión celular se utilizan sustancias capaces de atravesar la membrana plasmática y teñir las células. Existen descritos en la literatura varios reactivos como por ejemplo el rojo neutro, violeta de genciana, y azul de tripano. Otro ensayo de enlazamiento es el azul de kenacid, en donde se mide el contenido de proteínas totales a través de la proliferación celular. Otros ensayos utilizan los indicadores de viabilidad celular, como el alamar Blue. Estos permiten detectar el crecimiento, viabilidad y susceptibilidad de varios compuestos. La detección de células muertas se da por el uso de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, en donde las células vivas pueden reducir fácilmente la resazurina, y el aumento de fluorescencia resultante se puede medir con un lector de microplacas o un fluorómetro. Las células muertas no tienen capacidad metabólica y no reducirán el colorante.

La prueba *in vitro* con alamarBlue es una prueba simple y rápida mediante la cual se agrega 10% de una solución comercialmente disponible al medio celular y se mide mediante colorimetría u fluorimetría. El alamarBlue al no ser un componente tóxico para las células no requiere de la eliminación de células para conseguir la medición como si lo es en el caso de las pruebas con 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide (MTT). Esto permite reutilizar células para otras investigaciones, ahorrando tiempo, dinero, especialmente en el caso de tejidos primarios [35].

2.10 Técnicas Utilizadas para la Caracterización de las Espumas de Biovidrio 45S5

En siguiente apartado se presenta una revisión bibliográfica acerca de las diferentes técnicas de caracterización que serán utilizadas en la realización de este proyecto.

2.10.1 Análisis por Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC)

La técnica de DSC es una técnica de caracterización que es utilizada para determinar temperaturas de transición vítrea, cristalización y fusión, las cuales son de suma importancia determinar en el presente proyecto, ya que serán de utilidad para determinar con mayor exactitud las temperaturas que se fijarán para el ciclo térmico al que se someterán las espumas producidas.

Bretcanu et al. [36] realizaron estudios de análisis térmico diferencial (DTA). Esta técnica es muy parecida a la técnica de DSC, la única diferencia es que en DTA se mantiene constante el flujo de calor y en el DSC son la temperatura de la muestra y la de la referencia las que se mantienen constantes. Ambas técnicas, DTA y DSC, proporcionan información parecida, no obstante, el DSC es más utilizado. Las curvas de DTA obtenidas por este grupo de investigadores fueron realizadas a diferentes velocidades de calentamiento las cuales se muestran en la Figura 2.11. Todas las curvas presentan un pico exotérmico entre 600 y 750 °C, y dos picos endotérmicos en el rango de 1150-1250 °C. El pico exotérmico mencionado antes corresponde a la cristalización del Bioglass 45S5, los dos picos endotérmicos representan procesos de fusión de dos fases cristalinas como se discute en la literatura [37]. Las temperaturas de transición vítrea (T_g), temperatura de cristalización (T_c) y temperatura de fusión (T_m) que se obtuvieron, así como las velocidades de calentamiento se muestran en la Tabla 2.7.

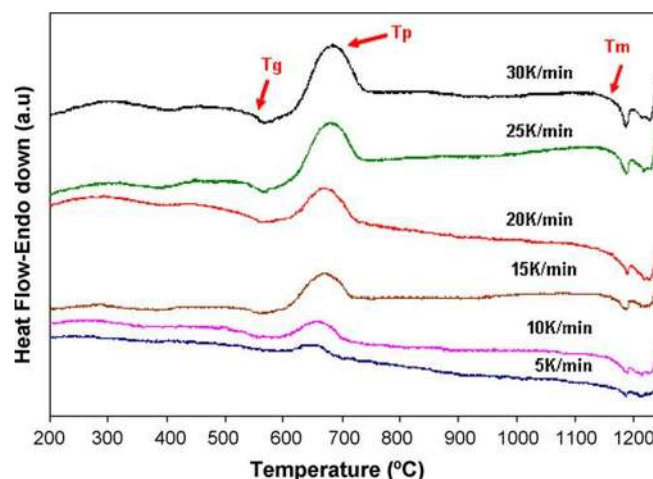


Figura 2.11 Curvas de DTA obtenidas de Bioglass a diferentes velocidades de calentamiento [36]

Tabla 2.7 Velocidades de calentamiento y temperatura de transición [36]

Velocidad de calentamiento °C/min.	T_g (°C)	T_c (°C)	T_m (°C)
5	505	650	1174
10	536	664	1172
15	544	674	1168
20	549	676	1165
25	553	686	1160
30	551	690	1155

Estos resultados están de acuerdo con *Clupper y Hench* [38]. Durante el proceso de cristalización el desarrollo de dos fases cristalinas es detectado. La fase cristalina principal es $\text{Na}_2\text{Ca}_2\text{Si}_3\text{O}_9$ y la fase secundaria es $\text{Na}_2\text{Ca}_4(\text{PO}_4)_2\text{SiO}_4$, que pueden ser identificadas por FTIR.

En el grupo de investigación del Instituto de Investigación en Metalurgia y Materiales se han realizado estudios de DSC a muestras de biovidrio 45S5, obteniéndose las temperaturas de T_g , T_m y T_c . Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 2.8 [39].

Tabla 2.8 Velocidad y temperaturas de transición obtenidas [39]

Velocidad de calentamiento °C/min.	T_g (°C)	T_c (°C)	T_m (°C)
5	570	695	1145

2.10.2 Análisis de las Fases Presentes Mediante Difracción de Rayos X (DRX)

La técnica de DRX nos ayudara a conocer las fases cristalinas presentes en nuestro material antes y después de la sinterización a las que serán sometidas las espumas de biovidrio 45S5 obtenidas.

ElBatal et al. [40] y *El-Ghannam et al.* [41] mostraron una baja velocidad de formación de HCA sobre la superficie de materiales vitrocerámicos con cristalización parcial (de 10 a 20 horas para la formación de HCA para materiales con $\geq 60\%$ de fase cristalina [42]). *El-Ghannam et al.* atribuyen este cambio en la bioactividad a que la fase cristalina tiene un potencial zeta más negativo, que a su vez afecta la interacción de las proteínas del suero (cantidad de suero absorbido [43]).

Generalmente se acepta que la fase amorfa del vidrio conduce a la formación de cristales de sodio-calcio-silicato. Sin embargo, reportes recientes indican que la estequiometría del vidrio puede ser diferente a diferentes temperaturas del tratamiento térmico [44]; a altas temperaturas la fase que se forma es $\text{Na}_2\text{Ca}_2\text{Si}_3\text{O}_9$ y a bajas temperaturas la fase formada es $\text{Na}_2\text{CaSi}_2\text{O}_6$ [45]. Las dos fases tienen una estructura similar (pero a altas temperaturas la fase tiene dos iones de sodio reemplazando a un ion de calcio) y están reducidos en seis anillos de silicatos [46]. Otros postulan que hay otra fase que se encuentra a alta temperatura, la cual contiene ion fosfato, $\text{Na}_2\text{Ca}_4(\text{PO}_4)_2\text{SiO}_4$ [37]. A pesar de todo, aún no hay un entendimiento completo acerca de los procesos y cambios térmicos ocurridos en estas estructuras cristalinas y las propiedades de los materiales. En la Figura 2.12 se muestra un espectro de DRX donde se observa la fase que se forma después del tratamiento térmico dado al biovidrio 45S5.

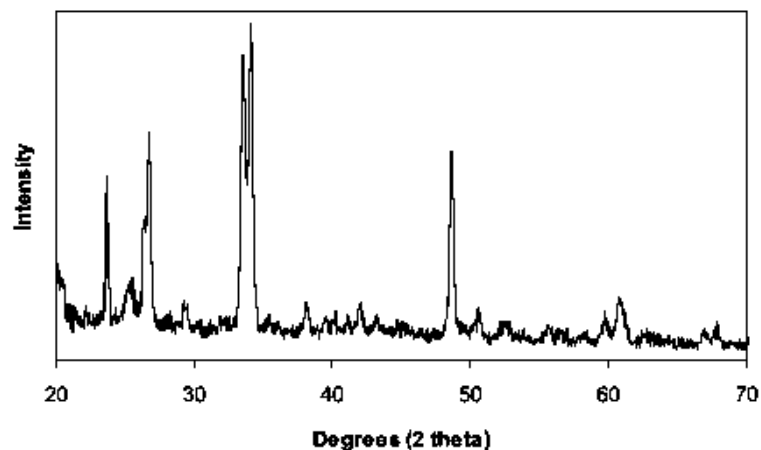


Figura 2.12 Espectro de DRX para un biovidrio 45S5 cristalizado. El cual fue indexado como $\text{Na}_2\text{Ca}_2\text{Si}_3\text{O}_9$ [38]

Wu et al. [44] midieron el nivel de desvitrificación o formación de fase cristalina en el Bioglass 45S5 a diferentes temperaturas de tratamiento térmico. En la Figura 2.13 se muestran los espectros de difracción de DRX para el Bioglass 45S5 no sinterizados y sinterizados a diferentes temperaturas. Se puede observar que los polvos de Bioglass 45S5 son amorfos, y a medida que se aumenta la temperatura del tratamiento térmico van apareciendo los picos característicos de la fase cristalina $\text{Na}_2\text{Ca}_2\text{Si}_3\text{O}_9$ que fue identificada como la principal. A una temperatura de 650 °C se puede apreciar la aparición de fase cristalina lo que es reportado por *Clupper and Hench* [38] quienes encontraron que la cristalización se da antes de la sinterización por flujo viscoso en el biovidrio 45S5. Esto concuerda por lo informado por *Chen et al.* [45], en donde encontraron que no se da una unión evidente entre las partículas de Bioglass 45S5 sinterizadas a 900°C por 5 horas.

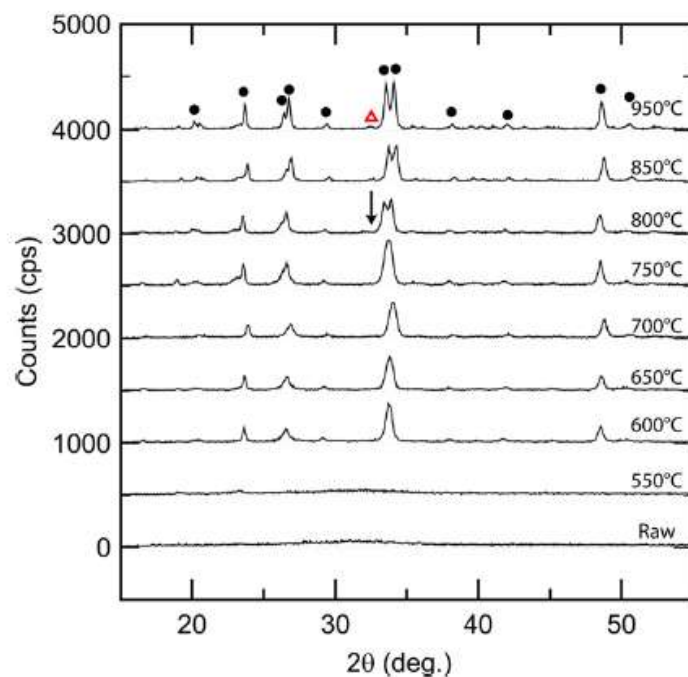


Figura 2.13 Espectros de DRX de polvos de Bioglass 45S5 no sinterizados y sinterizados a diferentes temperaturas por 1 hora [37]

Es importante el estudio de las fases cristalinas formadas en las espumas de biovidrio obtenidas después del tratamiento térmico ya que aumentan las propiedades mecánicas, pero pueden poner en peligro el comportamiento bioactivo del material.

Puesto que el material sinterizado de Bioglass 45S5 es un vitrocerámico, se podría decir que la bioactividad del material sinterizado puede atribuirse a la fase de vidrio residual. *Chen et al.* [23] sugieren que la bioactividad se mantiene también con la fase cristalina $\text{Na}_2\text{Ca}_2\text{Si}_3\text{O}_9$, basados en dos razones: (1) la bioactividad de la fase pura $\text{Na}_2\text{Ca}_2\text{Si}_3\text{O}_9$ ha sido reportada [42], y la transición de la fase $\text{Na}_2\text{Ca}_2\text{Si}_3\text{O}_9$ a una fase amorfa proporcionó una explicación de que la

fase $\text{Na}_2\text{Ca}_2\text{Si}_3\text{O}_9$ disminuyó la cinética de formación de apatita, pero no inhibió el crecimiento de una capa de apatita en las superficies, esto ha sido reportado en la literatura [46].

Los mecanismos de la transformación de $\text{Na}_2\text{Ca}_2\text{Si}_3\text{O}_9$ a una fase amorfa podrían estar basados en los mecanismos de unión–hueso de biovidrios, que fueron propuestos por *Hench et al.* [46]. En la secuencia de reacciones interfaciales sobre la superficie del bioglass en contacto con los fluidos corporales, el biovidrio primero se disuelve para formar una capa de sílica-gel, enseguida una capa de fosfato de calcio amorfo se forma a partir de la sílica-gel hidratada, y finalmente cristales de apatita nuclean y crecen a partir de la capa de fosfato de calcio amorfo. *Chen et al.* [23] sugieren que en general estas secuencias de reacciones deben ser aplicables a la fase $\text{Na}_2\text{Ca}_2\text{Si}_3\text{O}_9$, que se disuelve a un ritmo más lento que la fase de vidrio. Este grupo de investigadores encontraron una fase amorfa mediante DRX después de la inmersión en SBF durante 28 días (Figura 2.14) atribuyéndosela a la formación de la capa amorfa de fosfato de calcio, de acuerdo a la teoría de *Hench et al.* [46].

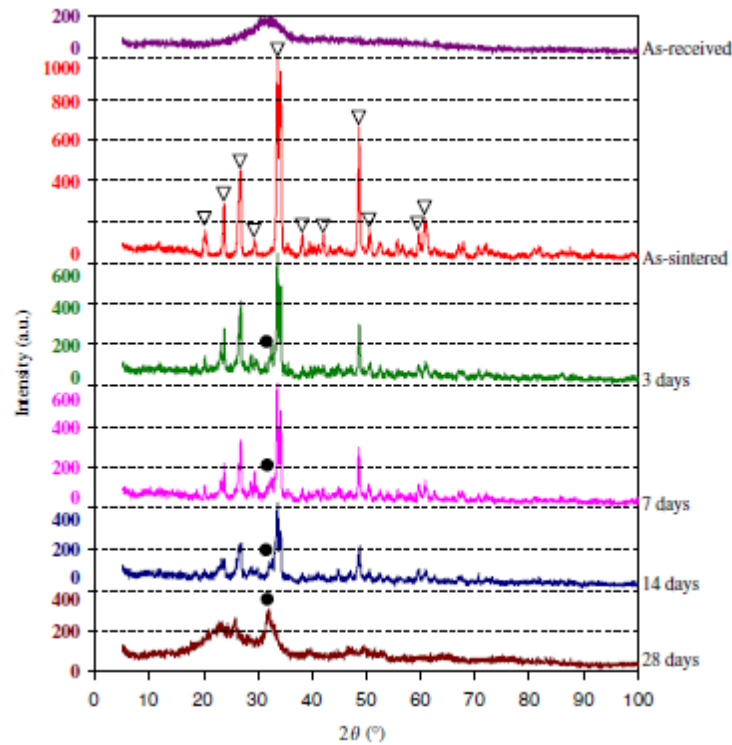


Figura 2.14 Espectros de DRX de espumas de Bioglass 45S5 sinterizadas a 1000°C por una hora inmersas en SBF por 3, 7, 14, 28 días. Los picos de la fase $\text{Na}_2\text{Ca}_2\text{Si}_3\text{O}_9$ y de la hidroxiapatita son marcados con (▽) y (●), respectivamente [45]

2.10.3 Microscopia electrónica de barrido (MEB)

La técnica de MEB es una poderosa herramienta que ayudará a obtener imágenes acerca de morfología de la superficie de las muestras de biovidrio 45S5 que se obtendrán durante el desarrollo de este proyecto.

Lefebvre et al. [47], obtuvieron espumas con porosidad abierta de diferentes metales, caracterizando la microestructura mediante MEB. La Figura 2.15 muestra las espumas de Ni obtenidas mediante este proceso.

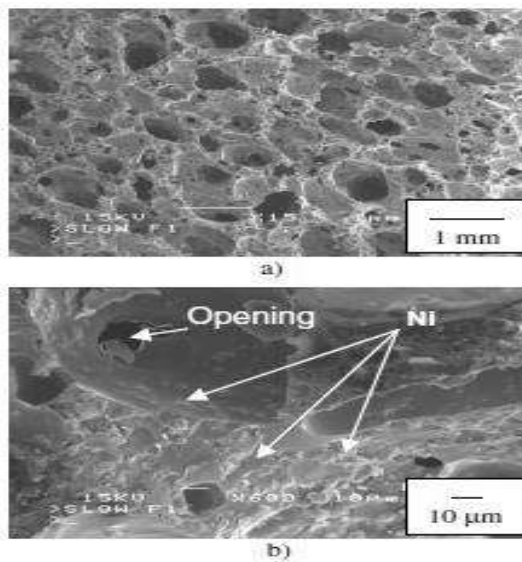


Figura 2.15 Imagen de MEB de espumas de Ni (a) baja magnificación, (b) alta magnificación [47]

Deb et al. [48] obtuvieron espumas de Bioglass 45S5 mezclando los polvos de Bioglass con alcohol polivinílico como porógeno. La microestructura la caracterizaron mediante MEB. En la Figura 2.16 se muestran las micrografías MEB de las espumas obtenidas donde se observa que obtuvieron diferentes tamaños de poro.

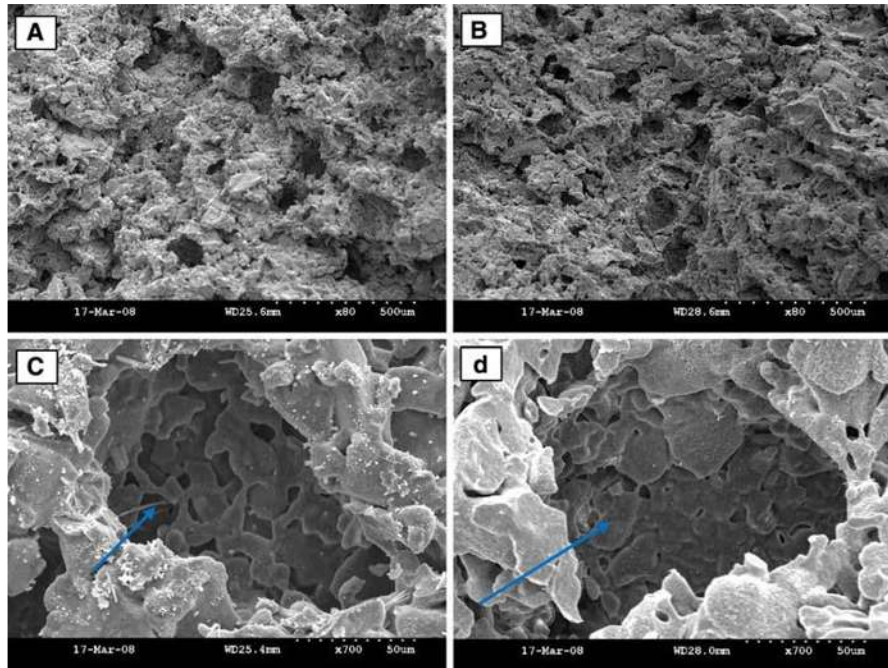


Figura 2.16 Imágenes de MEB de espumas de Bioglass 45S5 obtenidas con alcohol polivinílico como agente porógeno

Comparando la microestructura de las espumas obtenidas mediante la técnica de tecnología de polvos con la del de la figura anterior se puede observar que se logran obtener materiales con una mejor distribución de tamaño de poro además de tener micro porosidad, que es de gran importancia para este tipo de materiales que van a ser utilizados como biomateriales, debido a que se quiere que las espumas tengan bioactividad al momento de ser implantadas en el cuerpo, y en este caso la microporosidad ayudará a la vascularización del tejido así como a la proliferación y crecimiento de células formadoras de hueso.

Zonotto et al. [49] estudiaron la formación de HA sobre la superficie de Bioglass 45S5, caracterizándola por MEB. En la Figura 2.17 se muestran las imágenes de la capa de HA formada sobre diferentes muestras de Bioglass en las cuales la superficie fue polarizada negativa y positivamente.

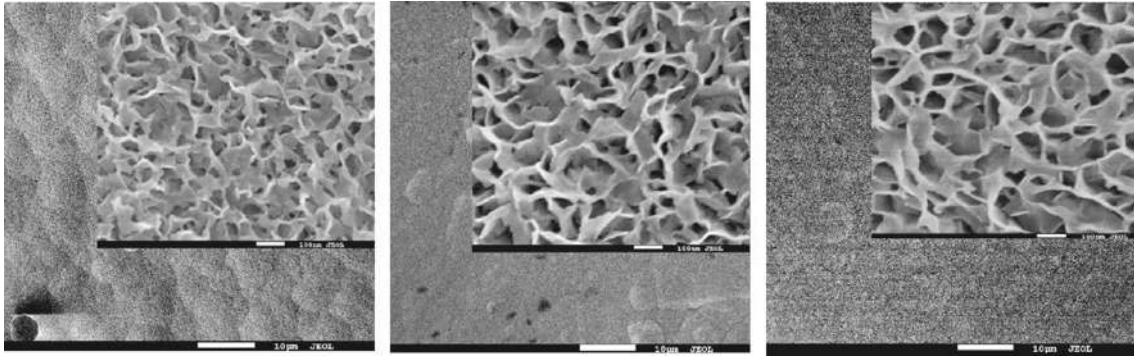


Figura 2.17 Imágenes de MEB de la superficie de Bioglass 45S5 sumergida durante 7 días en SBF [49]

Chen et al. [23] también estudiaron la formación de HA en la superficie de Bioglass 45S5. En la Figura 2.19 se muestran las imágenes de MEB de los resultados que obtuvieron. La técnica de MEB es una técnica muy útil para conocer la morfología de la superficie de las muestras después de la inmersión en SBF, esto será de utilidad para determinar de una manera rápida si se forma o no la capa de HA sobre la superficie del biovidrio 45S5.

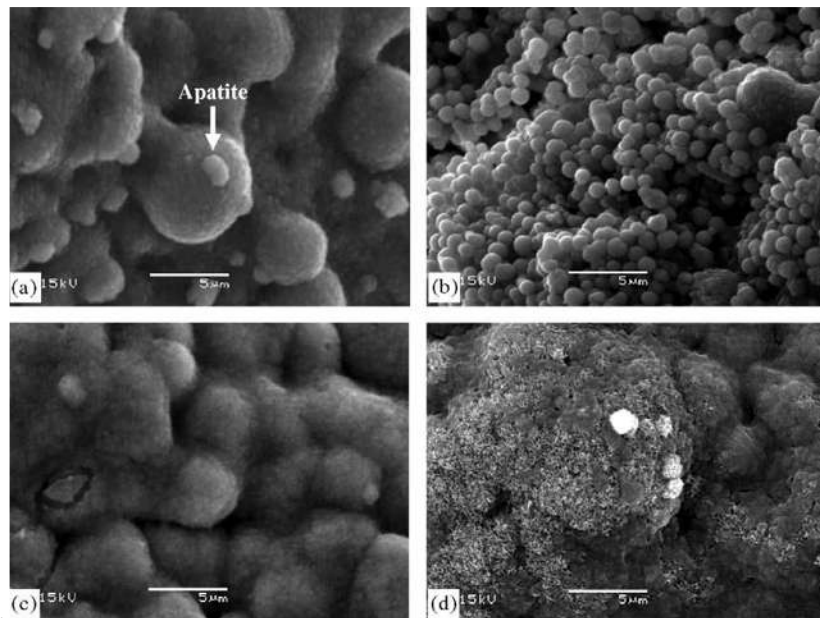


Figura 2.18 Imágenes de MEB de la formación de HA sobre la superficie de espumas de Bioglass 45S5 después de la inmersión en SBF por (a) 3 días, (b) 7 días, (c) 14 días y (d) 28 días [45]

2.10.4. Medición de las Propiedades Mecánicas de las Espumas

Es importante medir las propiedades mecánicas de las espumas ya que dará una visión más clara del comportamiento del biomaterial una vez implantando. Es necesario para disminuir la

rigidez entre el implante y el tejido vivo (hueso) se requiere que éste tenga propiedades similares a la del hueso trabecular que son alrededor de 2-12 MPa de resistencia a la compresión.

En trabajos previos realizados en el grupo de trabajo se midió la resistencia a la compresión de espumas sinterizadas a diferentes temperaturas, obtenidas mediante el proceso de tecnología de polvos y espumado de polímeros. Los resultados obtenidos mostraron que a medida que se aumenta la temperatura de sinterización la resistencia a la compresión aumenta, esto se le atribuye al aumento en la densificación lo que provoca una disminución de la porosidad de la espuma. En la Tabla 2.9 se muestran los valores obtenidos de resistencia a la compresión para diferentes temperaturas de sinterización de las espumas [39].

Tabla 2.9 Resistencia a la compresión y porosidades obtenidas a diferentes temperaturas [39]

Temperatura (°C)	Porosidad (%)	Resistencia a la compresión (MPa)
950	79.3±2.44	1.69±0.96
975	76.3±2.56	3.46±0.86
1000	71.2±0.91	5.01±0.82
1025	64.1±2.59	5.53±1.21

Chen et al. [44] reportaron valores de 0.3-0.4 MPa para materiales altamente porosos de Bioglass 45S5 (~90%). Estos valores son más bajos que los medidos en las espumas obtenidas mediante metalurgiatecnología de polvos, esto podría deberse a la diferencia en porosidad, así como al método de obtención de las espumas ya que este grupo de investigación utilizó el método de réplica.

2.10.5 Espectroscopia Infrarroja (FT-IR).

La técnica de FT-IR permite hacer un estudio de las fases formadas en la superficie de las espumas de biovidrio 45S5 obtenidas.

Bil et al. [50] hicieron un estudio de la formación de la capa de HA en la superficie de muestras de Bioglass 45S5 inmersas por diferentes tiempos en SBF mediante FT-IR (Figura 2.19). La formación de la capa de HA sobre las muestras de Bioglass 45S5 después de la inmersión en SBF se demuestra por la aparición de picos alrededor de 560, 603 y 1023-1039 cm^{-1} correspondientes a las vibraciones de flexión y estiramiento de los grupos PO_4 , respectivamente [51]. Además, la aparición de la banda a 873 cm^{-1} corresponde al modo de vibración de los grupos carbonato, lo que sugiere la formación de apatita carbonatada, como se discute en la literatura [52].

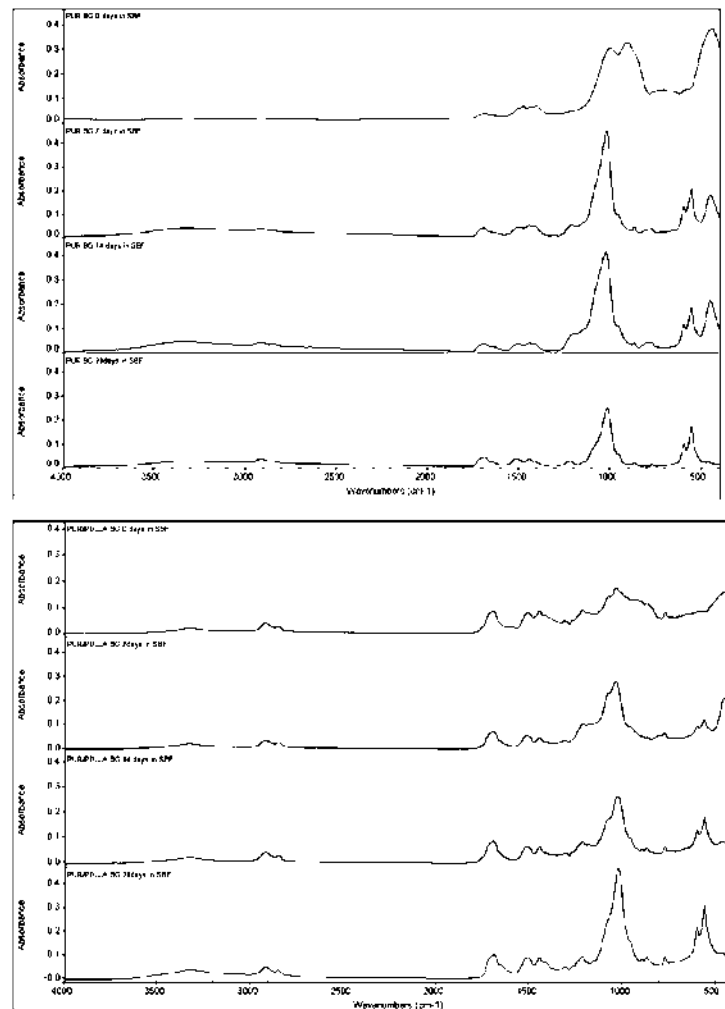


Figura 2.19 Espectros de FT-IR de espumas de Bioglass 45S5 antes y después de la inmersión en SBF [50]

CAPITULO 3. DESARROLLO EXPERIMENTAL

En este capítulo se describen los diferentes procesos y procedimientos de preparación del biovidrio 45S5. Así mismo, se describe el proceso de obtención de espumas y su caracterización estructural y mecánica, y como se realizaron las pruebas de bioactividad.

3.1. Preparación del Biovidrio 45S5

3.1.1 Reactivos de Partida

Los reactivos que se utilizaron para la fabricación del biovidrio 45S5 fueron polvos de alta pureza de Na_2CO_3 anhidrido marca JT Baker y CaO , SiO_2 y P_2O_5 de Sigma-Aldrich. Estos reactivos se adicionaron en un recipiente de polietileno para homogeneizarlos mediante un molino de bolas convencional durante 15 minutos. Se realizó la mezcla estequiométricamente para obtener una composición final de $24.5\text{Na}_2\text{O}-24.5\text{CaO}-6\text{P}_2\text{O}_5-45\text{SiO}_2$ en porcentaje peso.

3.1.2 Obtención del Biovidrio 45S5

El biovidrio 45S5 se obtuvo mediante la técnica convencional de fusión y temple. Una vez obtenida la mezcla de polvos, ésta se vertió en un crisol de sílice fundida el cual fue llevado a un horno marca Carbolite® HTF17 para ser sometida a un ciclo térmico (Figura 3.1). La mezcla fundida se vació en una placa de acero fría de espesor de $\frac{1}{4}$ pulgada, la cual estaba en contacto (parte inferior) con un recipiente con agua, que funcionó como refrigerante de la placa y así obtener mayor cantidad de calor extraído por parte del elemento metálico.

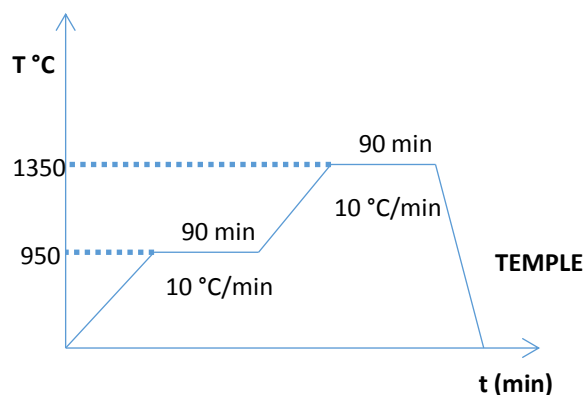


Figura 3.1 Ciclo de calentamiento para la obtención del biovidrio 45S5

3.1.3 Obtención del Biovidrio 45S5 en Polvo

Una vez obtenido el vidrio, éste se pulverizó en un molino de mortero de ágata (Mortar Grinder PULVERISETTE 2, FRITSCH), hasta obtener un tamaño de partícula $< 63 \mu\text{m}$, esto se realizó en lotes de 15 g; el polvo obtenido se pasó a través de una malla de #250 para obtener un tamaño de partícula menor a $63 \mu\text{m}$. En la Figura 3.2 se muestra un esquema general del proceso de obtención del biovidrio 45S5.

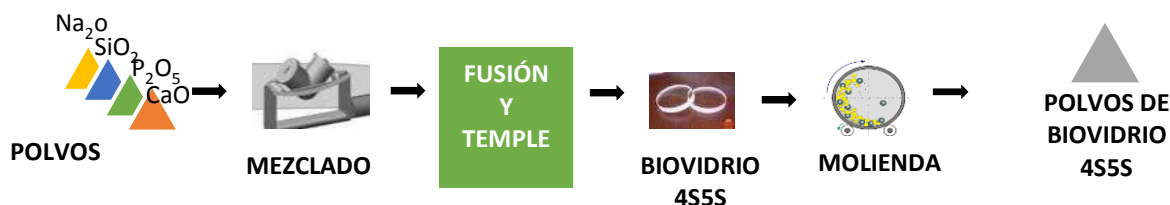


Figura 3.2 Diagrama de la ruta de obtención del biovidrio 45S5

3.2. Caracterización de los Polvos de Biovidrio 45S5

3.2.1 Análisis por Fluorescencia de Rayos X (FRX)

Con el objetivo de corroborar la composición final del biovidrio 45S5 se llevaron a cabo un análisis de fluorescencia de rayos X al polvo de biovidrio obtenido por fusión y temple utilizando un Espectrómetro de Fluorescencia de Rayos X SPECTRO XEPOS III.

3.2.2 Análisis de las Fases Presentes Mediante Difracción de Rayos X (DRX)

Con la finalidad de corroborar la naturaleza amorfa del biovidrio 45S5, los polvos obtenidos fueron caracterizados mediante la técnica de difracción de rayos X (DRX) en un equipo Siemens D5000 X-ray Diffractometer. La adquisición se llevó a cabo en el rango de 10° - 90° 2θ con 0.01° por paso (2 segundos por paso) con radiación de Cu Ka (longitud de onda 1.5406 \AA).

3.2.3 Análisis de la Morfología de los Polvos Mediante Microscopía Electrónica de Barrido (MEB)

Los polvos obtenidos se observaron mediante MEB en un microscopio JEOL JSM-640 para obtener información acerca de la estructura y la morfología de las muestras obtenidas. Se tomó una pequeña muestra de biovidrio la cual fue metalizada con cobre para poder ser observada debido a la naturaleza no conductora del material cerámico obtenido.

3.2.4 Distribución de Tamaño de Partícula

Una vez pulverizado el biovidrio obtenido por fusión y temple, se realizó una medición de la distribución de tamaño de partícula por difracción láser usando un analizador Beckman Coulter LS 13 320.

3.2.5 Análisis de la Sinterización y Cristalización de Polvos de Biovidrio 45S5

Se realizó un estudio del comportamiento del polvo de biovidrio 45S5 a diferentes temperaturas de sinterización para determinar los parámetros de temperatura para la fabricación de las espumas.

3.2.5.1 Análisis de la Morfología Mediante MEB

Se tomaron 5 muestras de polvos de biovidrio 45S5, posteriormente fueron calentadas a diferentes temperaturas las cuales fueron 500 °C, 650 °C, 750 °C, 850 °C, 975 °C. Seguido las muestras fueron metalizadas con cobre y se observaron mediante un Microscopio Electrónico de Barrido marca JEOL JSM-640 para observar los cambios en la morfología de las partículas.

3.2.5.2 Análisis Mediante DXR

Mediante DXR se determinaron las fases presentes de los polvos tratados a diferentes temperaturas. Las muestras fueron analizadas en un equipo Siemens D5000 X-ray Diffractometer, la adquisición se llevó a cabo en el rango de 10°-90° 2θ con 0.01° por paso (2 segundos por paso) Cu Ka (longitud de onda 1.5406 Å).

3.2.5.3 Análisis por FT- IR

La técnica de FT-IR es una técnica que permitió hacer un estudio de la estructura de los polvos de biovidrio 45S5. Con esta técnica, se puede analizar las vibraciones de los diferentes grupos químicos en la superficie de la muestra, dependiendo de la preparación de la misma. Para su análisis las muestras fueron mezcladas con bromuro de potasio. La mezcla obtenida fue prensada con un dado de acero para obtener pastillas que fueron analizadas en un equipo Nicolet 6700, Thermo Scientific, USA en el rango de número de onda de 4000-400 cm⁻¹.

3.2.5.4 Análisis por Microscopía Electrónica de Transmisión (MET)

Se realizó un estudio por Microscopía Electrónica de Transmisión (200 kV Philips Tecnai F-20 TEM) para identificar las fases formadas una vez sinterizada la espuma de biovidrio 45S5.

3.2.5.5 Análisis mediante DSC

Con la finalidad de determinar las temperaturas de transición vítrea, cristalización y fusión del biovidrio 45S5, se realizaron análisis por calorimetría diferencial de barrido. Las mediciones se llevaron a cabo en un equipo TA Instruments SDT Q600. Las mediciones se realizaron utilizando 20 mg de muestra en un crisol de alúmina y bajo atmósfera de argón desde temperatura ambiente hasta 1250 °C a diferentes velocidades de calentamiento.

La cinética de cristalización fue estudiada mediante DSC para determinar las temperaturas pico de cristalización (T_p) y de transición vítrea (T_g) así como el cálculo de la energía de activación para la cristalización del sistema de biovidrio. Las mediciones se realizaron en una atmósfera de argón desde temperatura ambiente hasta 1000 °C a diferentes velocidades de calentamiento en el rango de 1-10 °C/min.

La cinética de cristalización se estudió usando un método no isotérmico. La energía de activación (E) fue calculada por la ecuación de Kissinger [53]:

$$\ln\left(\frac{\alpha}{T_p^2}\right) = -\frac{E}{RT_p} + \text{constante} \quad (3.1)$$

Donde E = energía de activación (kJ/mol); α =velocidad de calentamiento (K/min)
 T_p =temperatura de pico de cristalización; R =constante de los gases (8.314 JK⁻¹mol⁻¹).

La energía de activación puede ser calculada por la pendiente del gráfico [$\ln(\alpha/T_p^2)$] contra $1/T_p$. Los mecanismos de nucleación y crecimiento de cristal pueden ser definidos por el parámetro de Avrami, n , el cual puede ser determinado por la ecuación de Augis-Bennet [53].

$$n = \frac{2.5 RT_p^2}{\Delta T E} \quad (3.2)$$

Donde $\Delta T(K)$ es el ancho del pico de cristalización a la mitad de la intensidad máxima. Si $n \approx 1$ la cristalización ocurre en la superficie. Si $n \approx 3$ la cristalización se da de manera volumétrica [38,54].

3.2.5.6 Dilatometría

Mediante dilatometría (dilatómetro Netzsch modelo DIL 402) se determinó el ciclo térmico utilizado para la sinterización de las espumas obtenidas. Las mediciones se llevaron a cabo desde temperatura ambiente hasta 975 °C en atmósfera de aire a una velocidad de 10 °C/min. Para la fabricación de las barras prismáticas se pesaron 3 gr de biovidrio en una balanza analítica. El polvo de biovidrio se introdujo en un dado de acero inoxidable y se aplicó una presión de 4 toneladas. La dimensión de las probetas fue de 5 x 5 x 50 mm.

3.3 Producción de las Espumas de Biovidrio 45S5

En la Figura 3.3 se muestra el procedimiento para la fabricación de las espumas de biovidrio 45S5. Este es una variante del proceso de tecnología de polvos en combinación con el espumado de polímeros, en el cual, los diferentes materiales en polvo se mezclan para ser tratados térmicamente. El biovidrio en polvo se mezcla con una resina fenólica y un agente espumante (p-tolueno sulfonil hidrazida o TSH) y la mezcla se coloca dentro de un molde de acero inoxidable para ser tratado térmicamente en un horno. Durante el espumado a 200 °C, el ligante (resina fenólica) se funde y crea una suspensión cargada con partículas de biovidrio 45S5, al mismo tiempo el agente espumante se descompone y forma un gas que es el encargado de expandir la estructura. Después del espumado el material resultante es una espuma de resina fenólica sólida cargada con partículas de biovidrio. Las espumas fueron maquinadas en pequeños cilindros ($D = 15.2$ mm; $L = 8$ a 13 mm) con la finalidad de crear una estructura más uniforme y evitar problemas de colapso durante los pasos térmicos posteriores. Los cilindros resultantes fueron pirolizados a 500 °C para eliminar la resina fenólica y sinterizados a 975 °C por 1, 2 y 3 h, para darle resistencia mecánica a la estructura porosa. En la Figura 3.4 se muestran los diferentes tratamientos térmicos utilizados. Las muestras fueron identificadas como se muestra en la Tabla 3.1.

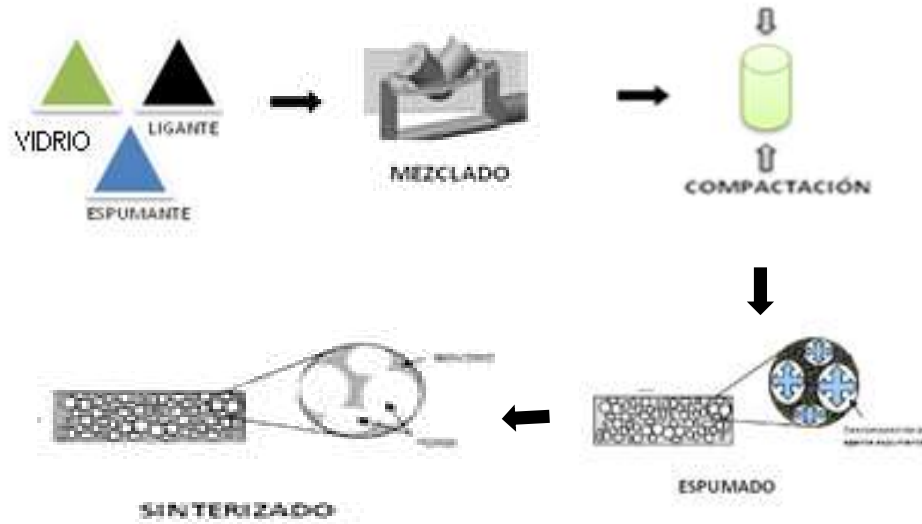


Figura 3.3 Diagrama de la ruta de obtención de las espumas de biovidrio 45S5

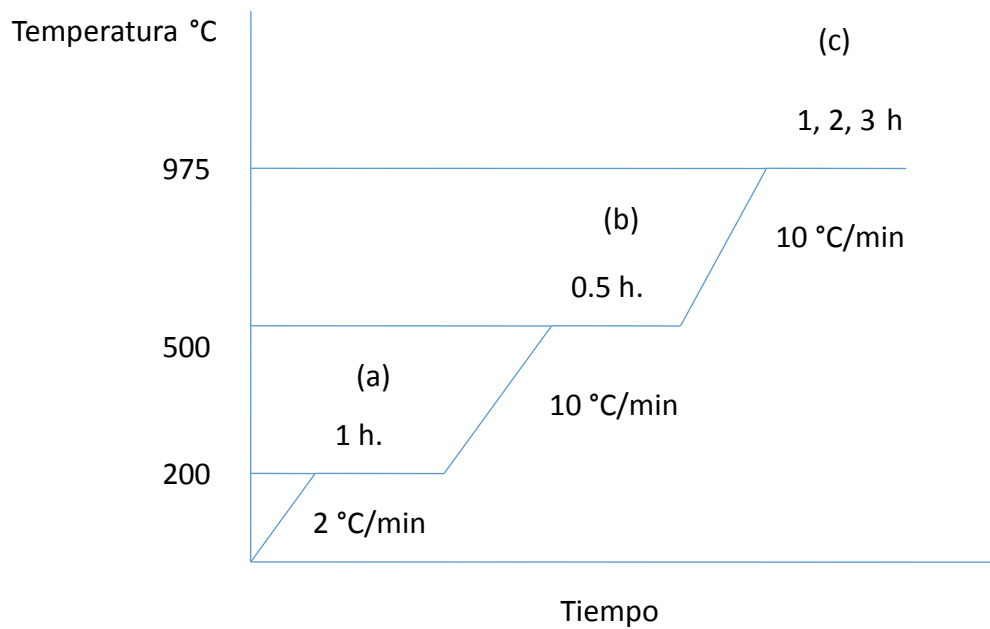


Figura 3.4 Tratamiento térmico de espumas de biovidrio 45S5. (a) Espumado, (b) Pirolisis y (c) Sinterización

Tabla 3.1 Muestras sinterizadas a diferentes tiempos de estancia 975 °C

Muestra	Tiempo de sinterización (h).
BG1	1
BG2	2
BG3	3

3.4 Caracterización de las Espumas de Biovidrio 45S5

3.4.1 Caracterización Mediante MEB

Las espumas obtenidas se observaron mediante MEB en un microscopio JEOL JSM-640 y en un microscopio de emisión de campo JEOL JSM-7600, para obtener información acerca de la estructura y la morfología de las muestras obtenidas. El método de tecnología de polvos puede ser utilizado para la fabricación de espumas con porosidad abierta de diversos materiales (por ejemplo, metales y cerámicos).

3.4.2 Difracción de Rayos X (DRX)

Mediante la técnica de DRX en un equipo Siemens D5000 X-ray Diffractometer, la adquisición se llevó a cabo en el rango de 20° - 90° 2θ con 0.01° por paso (2 segundos por paso) Cu Ka (longitud de onda 1.5406 \AA). Se determinaron las fases cristalinas formadas en las espumas sinterizadas después de aplicar el tratamiento térmico. Los tratamientos térmicos de Bioglass 45S5 han sido estudiados en términos de composición de fases, temperaturas de transformación y bioactividad.

3.4.3 Medición de las Propiedades Mecánicas de las Espumas

La resistencia a la compresión fue evaluada en 5 especímenes por serie utilizando una máquina de ensayos universal (Zwick modelo Z100) con una celda de carga de 5 kN a una velocidad de deformación de 2.5 mm/min. Las muestras fueron maquinadas en cilindros de 9-12 mm de longitud y 9-10 mm de diámetro.

3.4.4. Evaluación de la Permeabilidad

La permeabilidad fue determinada por medio de una prueba de conductividad con carga de agua variable basada en la ley de Darcy. Se construyó un dispositivo que consiste en un tubo vertical que proporcionaba la carga de agua, una cámara de permeabilidad para posicionar la muestra y un recipiente para coleccionar el agua. Antes de la prueba las muestras fueron sumergidas en agua destilada durante una hora a presión negativa para eliminar el aire remanente dentro de la estructura. La permeabilidad k y la conductividad hidráulica fueron calculados basados en la ley de Darcy:

$$k = K \frac{\mu}{\rho g} \quad (3.3)$$

y

$$K = \frac{a L}{A t} \ln \frac{H_1}{H_2} \quad (3.4)$$

donde μ es la viscosidad dinámica del agua, ρ es la densidad del agua, a es el área de sección transversal del tubo A es el área de sección transversal de la muestra, L es el ancho de la muestra, H_1 y H_2 son la altura inicial y final del medio líquido, respectivamente. Para el estudio de la permeabilidad fueron evaluadas 5 muestras por serie.

3.5. Evaluación de la Bioactividad

Se evaluó la bioactividad de las espumas de biovidrio 45S5 obtenidas mediante inmersión en fluido corporal simulado (SBF). Se realizaron pruebas celulares *in-vitro*, por cultivo en medio celular. Se le dio seguimiento mediante la degradación de alamarBlue.

3.5.1 Preparación del Fluido Corporal Simulado (SBF)

Debido a que el SBF está sobresaturado con respecto a la apatita, un método de preparación inapropiado puede llevar a la precipitación de apatita en solución. Para la preparación del fluido corporal simulado (SBF) se utilizó el protocolo publicado por Kokubo y col. [28] cuyos pasos se detallan a continuación.

1. Se lavaron todos los elementos que fueron usados en la preparación del SBF con 1 M HCl, detergente neutro y agua destilada. Los elementos que deben incluirse son los siguientes: un agitador magnético, ocho bandejas de plástico, una caja petri, un

- recipiente de plástico de 1000 mL, una botella de plástico de 1000 mL, un matraz aforado de vidrio de 1000 mL, una cuchara, un termómetro, un agitador de plástico, una pipeta desechable para ajustar el pH (para ser utilizada con 1 M HCl), un embudo de plástico, un cilindro aforado de 50 mL y un recipiente de 50 mL. Se utilizó un baño térmico para ajustar la temperatura y un equipo de medición de pH para ajustar su valor.
2. Se añadieron aproximadamente 700 mL de agua pura destilada dentro del recipiente de plástico de 1000 mL y se agitó por medio de un agitador magnético mientras se elevó la temperatura hasta 36.5°C (en el mismo agitador o en un baño térmico).
 3. Se añadieron los reactivos dentro del recipiente de plástico con agua pura destilada, siguiendo el orden mostrado en la Tabla 3.2, asegurando la completa disolución de cada reactivo antes de agregar el siguiente.

Tabla 3.2 Reactivos con sus respectivas cantidades y pureza para la preparación del SBF

Reactivos	Pureza	SBF (gr)
NaCl	>99.5	8.036
NaHCO₃	>99.5	0.325
KCl	>99.5	0.225
K₂HPO₄·3H₂O	>99.0	0.23
MgCl₂·6H₂O	>98.0	0.311
1.0M-HCl	-----	40 mL
Na₂SO₄	>99.0	0.072
CaCl₂	>95.0	0.293
TRIS	>99.9	6.063
1.0M-HCl	-----	ajustar pH

4. Se introduce el recipiente de plástico con todos los reactivos disueltos, dentro de un baño térmico a 36.5°C y se ajusta el pH a 7.4 mediante la adición de una solución 1 M HCl; se agita mediante un agitador mecánico. El termómetro, el agitador mecánico y el medidor del pH se lavan con agua destilada luego de sacarlos de la solución, el agua utilizada se vierte en el recipiente con los reactivos disueltos.
5. Se traspasa la solución del recipiente de plástico de 1000 mL al matraz aforado de vidrio de 1000 mL y se deja enfriar hasta 20°C. Se ajusta el volumen total a 1000 mL añadiendo agua destilada.
6. Se traspasa la solución a la botella de plástico de 1000 mL tapándola. Se mantiene refrigerada la solución a 4°C.

Esta solución es estable hasta 8 semanas, pero si se advierte la presencia de algún tipo de precipitado de las sales disueltas, debe ser desechada y debe prepararse una nueva solución. Antes de utilizar el SBF se debe dejar reposar a temperatura ambiente y filtrarlo utilizando filtros estériles de 0.22 µm bajo flujo laminar.

3.5.2 Cálculo del Volumen de SBF Necesario

El volumen del SBF necesario fue calculado mediante la Ec. 3.5 [36].

$$V = A/10 \quad (3.5)$$

donde V es el volumen del medio necesario por muestra y A es el área superficial aparente de una muestra. A fue calculada por medio de la siguiente ecuación (Ec. 3.6):

$$A = 2 * \pi * r^2 + 2 * \pi * l \quad (3.6)$$

donde r es el radio del cilindro o disco y l es el largo.

3.5.3 Inmersión de los Discos de Biovidrio 45S5

Las espumas de biovidrio 45S5 fueron seccionadas en discos de dimensiones 1×1 cm (diámetro×altura). Una vez obtenidas las muestras, éstas deben ser esterilizadas para evitar o disminuir la presencia de bacterias que puedan afectar las condiciones del estudio. Para ello, se recurrió a la esterilización por medio de radiación ultra violeta (UV). Una de las aplicaciones de los rayos UV es como forma de esterilización, junto con los rayos infrarrojos, ya que pueden eliminar toda clase de bacterias y virus sin dejar residuos. Para este estudio las muestras fueron sumergidas en SBF a 36.5°C y un pH de 7.4 durante diferentes periodos de tiempo por un máximo de 4 semanas. El siguiente paso fue el cálculo del volumen necesario de SBF.

Reemplazando los valores del radio y largo de los discos en la Ec. 3.5 y la Ec. 3.6, se obtuvo un volumen de SBF de 9.42 mL por disco. Se optó por utilizar un valor que fuera aproximadamente 1.5 veces mayor para asegurar la formación de la capa bioactiva de hidroxiapatita. De este modo, cada disco fue inmerso en 15 mL de SBF después de ser esterilizado. Este valor corresponde a una relación entre el volumen y el área superficial de 1.9098 cm.

Los tiempos de inmersión fueron de 3, 7, 14 y 28 días, y para ello, se utilizaron recipientes de polietileno que se conservaron a 37°C. También se analizó una muestra en un tiempo cero la cual fue inmersa en SBF y retirada inmediatamente para poder ver si hay algún cambio significativo al contacto con la solución. El SBF se renovó semanalmente para imitar en lo posible las condiciones reales a las que estaría sometido el material, ya que en el cuerpo existe una renovación continua del fluido fisiológico. Según *Grover et al.* [32], la renovación del medio incrementa la formación de capa de HA.

3.5.4 Viabilidad Celular

Se midió la viabilidad celular mediante una técnica colorimétrica con alamarBlue. Los pasos se detallan a continuación:

1. El biomaterial (BM) estéril se acondicionó en medio de cultivo MEMalfa para ajustar el pH a 7.4.
2. Se preparó una suspensión celular de 300,000 células/mL (medio de cultivo MEMalfa con 10% de suero fetal bovino) con una viabilidad de 99.6% (determinada por el método de exclusión de azul de tripano en una cámara de Neubauer y microscopio invertido Leica).
3. Con pinzas estériles se pasó cada pieza de BM a un pozo de 2 cm² nuevo (placa de cultivo de 24 pozos).
4. Se colocó 1 mL de la suspensión celular sobre cada pieza de BM mismo que fue previamente pesado.
5. Como control de adherencia, se colocó 1 mL de la suspensión en un plato de cultivo de 10 cm².
6. Se incubó por 5 h (37°C y 5% CO₂).
7. A las 5 h se observó en el microscopio invertido que el 99% de las células se habían adherido al plato de cultivo de 10 cm² (control; poliestireno) por lo que se procedió a pasar cada pieza de BM a un pozo nuevo y se le agregó 1 mL de medio MEMalfa con 70 µL de alamarBlue.
8. A los pozos en los que se quedaron las células no adheridas, también se añadió alamarBlue (70 µL/mL), con el fin de evaluar el grado de adherencia al BM.
9. Se incubó por 5 h, a las cuales se retiró el sobrenadante (1 mL) de cada pozo y se tomaron lecturas en el espectrofotómetro a 570 y 600 nm.

10. Se determinó el factor de corrección $R_0 = A_0570/A_0600$, donde A_0 corresponde al control negativo.
11. El porcentaje de reducción de alamarBlue es proporcional al número de células viables y se determinó como: $Red AA = 100 \times (A570 - (A600 \times R_0))$
12. Las primeras lecturas corresponden al día CERO; para los días subsecuentes se repitieron los pasos (a) pasar el material a un pozo nuevo, (b) adición de medio de cultivo fresco con alamarBlue (70 $\mu\text{L}/\text{mL}$), (c) incubación de 5 h, y (d) toma de lecturas.

3.6 Caracterización de las Espumas Después ser Sumergidas en SBF

3.6.1 Medición del pH y Degradación de las Espumas de Biovidrio 45S5 en SBF

Una vez inmersas las muestras de espumas de biovidrio 45S5 en SBF se midió el pH a diferentes intervalos de tiempo a 1, 3, 7, 14, 23 y 28 días. Las mediciones se hicieron dentro de la incubadora a 37.5 °C para evitar la variación del pH debido a la temperatura. Las mediciones se llevaron a cabo en un pHmetro marca JENWAY modelo 3510.

El seguimiento de la degradación de las probetas se realizó pesando las espumas antes y después de la inmersión en SBF en una balanza analítica marca DISCOVERY OHAUS. Las muestras fueron pesadas después de secarlas en una estufa a 60 °C.

Bohner et al. [55] reportan que la adición de un sólido en SBF puede modificar la composición local de la solución. Un cambio local en la supersaturación puede ser positivo o negativo hacia la formación de apatita. En el caso del Bioglass 45S5, al ser un material básico, provoca un cambio local de pH en el SBF. Este incremento puede ser de hasta 2 unidades de pH lo que puede disminuir de 10 a 100 veces la solubilidad de la HA, aumentando la aceleración de nucleación de apatita. Este fenómeno es realizado por la liberación de iones Ca^+ del Bioglass 45S5.

3.6.2 Caracterización de la Superficie Mediante FT-IR

La técnica de FT-IR es una técnica que permitió hacer un estudio de la superficie de las espumas de biovidrio 45S5 una vez que fueron inmersas en SBF. Con esta técnica, se puede analizar las vibraciones de los diferentes grupos químicos en la superficie de la muestra, dependiendo de la preparación de la misma.

FT-IR es una de las técnicas más potentes que pueden ser utilizadas con el fin de extraer una imagen cualitativa de las características superficiales de los materiales. Muchos autores utilizan la técnica, para estudiar la formación de la capa de hidroxiapatita en la superficie del biovidrio

45S5 después de ser inmerso en SBF. Las muestras fueron analizadas en un equipo Nicolet 6700, Thermo Scientific, USA, en el rango de número de onda de 4000-400 cm^{-1} .

3.6.3 Estudio Superficial de las Espumas de Biovidrio 45S5 por Difracción de Rayos X de Haz Rasante (GIXRD) y MEB

Mediante la obtención de imágenes de las muestras por microscopia electrónica de barrido es posible observar la evolución morfológica de la superficie, la macroporosidad y microporosidad, así como la microestructura de los cristales de HA que se formen. Las probetas se observaron en un microscopio de emisión de campo JEOL JSM-7600.

La difracción de rayos X es fundamentalmente una técnica de caracterización estructural de sólidos. Las longitudes de onda de los rayos X empleados son del mismo orden que las distancias interatómicas de los cristales, que actúan como redes de difracción: difractan los rayos X en direcciones y con intensidades determinadas. La señal de difracción de un sólido es reflejo de su estructura cristalina. Esta técnica de caracterización fue utilizada para analizar los cambios estructurales, las fases cristalinas, posibles transiciones de fase y reacciones en estado sólido. De esta manera se pudo observar el grado de transformación del biovidrio 45S5. En los discos, se realizaron los análisis con un ángulo rasante de incidencia de 2° . Con este ángulo de incidencia se pueden estudiar capas delgadas. Esta técnica se utilizó ya que lo que se quiere estudiar después de las pruebas de inmersión en SBF es la formación de la capa superficial de HA sobre el biovidrio 45S5. Las muestras fueron analizadas en un equipo de DRX marca Bruker modelo D8 ADVANCE DAVINCI en un rango de 20 a $50^\circ 2\theta$ con 0.01° por paso (2 segundos por paso) Cu Ka (longitud de onda 1.5406 \AA).

3.6.4. Evaluación de las Propiedades Mecánicas

Se evaluó la resistencia a la compresión de las espumas de biovidrio 45S5 después de 28 días de inmersión en SBF. Las muestras fueron evaluadas en húmedo en una máquina de ensayos universal (Zwick modelo Z100) con una celda de carga de 5 kN a una velocidad de deformación de 2.5 mm/min. La resistencia a la compresión fue evaluada en 5 especímenes por serie. Las muestras fueron maquinadas en cilindros de 9-12 mm de longitud y 9-10 mm de diámetro.

3.6.5 Análisis de la proliferación celular mediante MEB

Una vez sembradas las espumas con células pre-osteoblastos de murine, se tomaron muestras a diferentes tiempos (1, 3 y 7 días) para ser observadas mediante MEB en un microscopio de emisión de campo JEOL JSM-7600.

CAPÍTULO 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En esta tesis el estudio se centra en la caracterización y obtención de espumas de biovidrio 45S5. Las espumas obtenidas se sinterizaron a diferentes tiempos de permanencia a la temperatura de 975 °C y se caracterizaron sus propiedades estructurales, mecánicas y de bioactividad. Los resultados más importantes se presentan en el presente capítulo.

4.1. Caracterización del Biovidrio 45S5 Obtenido Mediante Tecnología de Polvos

La primera parte del proyecto se centró en la síntesis del biovidrio 45S5 mediante la técnica descrita en el Capítulo 3. En los siguientes apartados se presenta la caracterización estructural realizada a los polvos de biovidrio 45S5 obtenidos.

4.1.1 Análisis por FRX

En la Tabla 4.1 se resume la composición del polvo de biovidrio 45S5 obtenido. Mediante FRX se determinó que la composición es muy cercana a la composición deseada. Sin embargo, a pesar de no tener la composición exacta del Bioglass® 45S5, ésta es una composición que mantiene una relación molar Ca/P alta, lo cual es indispensable para que el biovidrio presente bioactividad.

Tabla 4.1 Composición de los polvos de biovidrio obtenido por FRX.

Óxido	% en peso biovidrio	% en peso Bioglass®
SiO ₂	44.58	45
Na ₂ O	21.29	24.5
CaO	25.01	24.5
P ₂ O ₅	5.13	6
Al ₂ O ₃	2.76	-
Fe ₂ O ₃	0.1265	-

MgO	0.1582	-
MnO	0.00235	
TiO ₂	0.7307	-
K ₂ O	0.1969	-

4.1.2 Análisis mediante DRX

En la Figura 4.1 se muestra el difractograma de los polvos de biovidrio 45S5 obtenidos por fusión y temple, antes de someterlos a tratamiento térmico. Se puede observar la señal característica a 30° de un material amorfo lo cual concuerda con lo esperado debido al método de obtención del biovidrio 45S5.

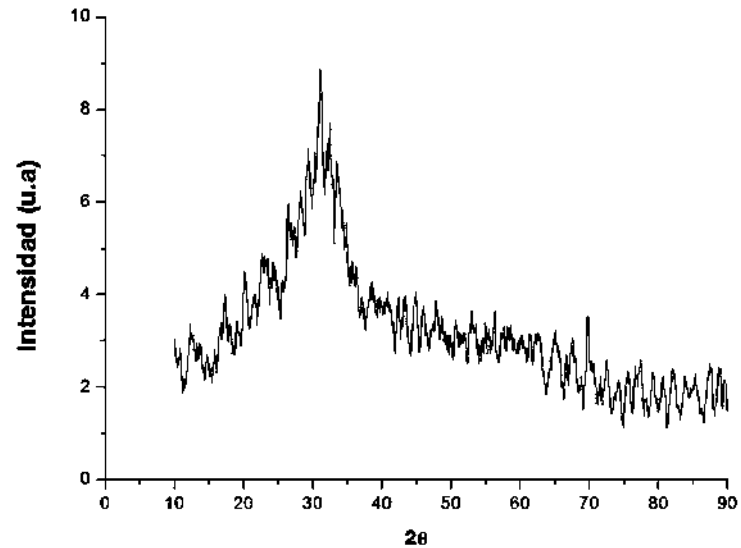


Figura 4.1 Difractograma de rayos-x de polvos de biovidrio 45S5

4.1.3 Análisis Mediante MEB

En la Figura 4.2 se puede observar que el polvo de biovidrio está constituido por partículas de diferentes tamaños y morfologías, las cuales son características del método de molienda descrito en el Capítulo 3. Se observan partículas irregulares características de un material frágil sometido a esfuerzos de fractura por reducción de tamaño de partícula. En la Figura 4.3 se presenta en EDS de los polvos donde se observan los picos correspondientes a los elementos que constituyen las partículas de biovidrio, los cuales son Si, Na, Ca y O. En la Tabla 4.2 se presenta el análisis elemental realizado al biovidrio; a partir de estos datos se calculó % en peso de los óxidos presentes. En ellos se puede observar que se mantiene una relación alta de Ca/P en el biovidrio obtenido. Los valores determinados para los óxidos por análisis EDS, coinciden aproximadamente con el valor preciso que se obtiene por FRX, como se mostró en la Tabla 4.1.

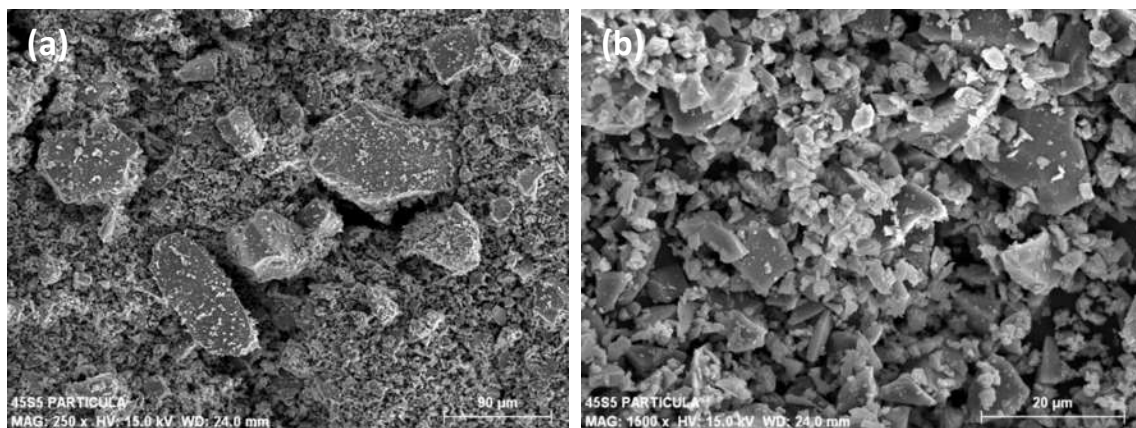


Figura 4.2 Micrografía electrónica de barrido de los polvos de biovidrio a diferentes magnificaciones, a) 250x y b) 1500x

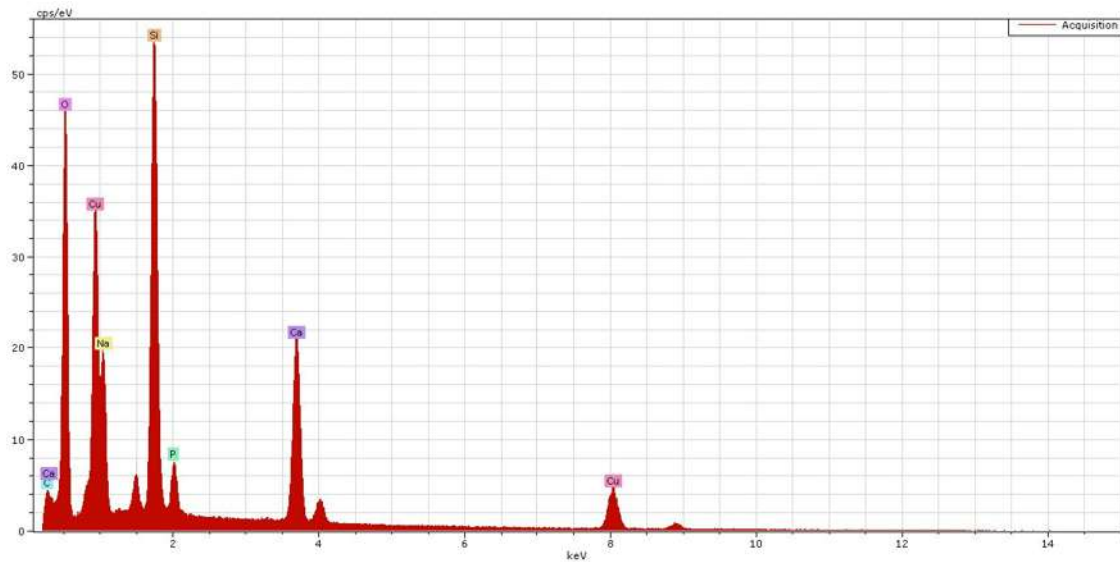


Figura 4.3 EDS de los polvos de biovidrio

Tabla 4.2 Análisis elemental por EDS de los polvos de biovidrio

Elemento	% peso	% error	Óxido	% peso
Na	12.40	0.79394	Na ₂ O	22.10
Si	15.46	0.66771	SiO ₂	43.72
Ca	14.60	0.46160	CaO	27.01
P	2.20	0.11027	P ₂ O ₅	6.62
Al	0.16	0.08553	Al ₂ O ₃	0.53
O	49.73	4.878292	-	-

4.1.4 Medición de Tamaño de Partícula

En la Figura 4.4 se observa que se obtuvo una distribución trimodal de tamaño de partícula después de la molienda efectuada al biovidrio, con clases de tamaños desde 0.5-1 μ m, 13-21 μ m y 27-41 μ m, con una media estadística de 13.28 μ m de diámetro de partícula. Este tipo de

distribución es necesario ya que ayuda a obtener diferentes tamaños de poro en las espumas de biovidrio que se sintetizarán en la siguiente etapa del proyecto. Es importante el obtener diferentes tamaños de poro debido a que es un requerimiento en biomateriales que van a ser utilizados como soportes para la regeneración del hueso, que tengan tanto macro como micro porosidad.

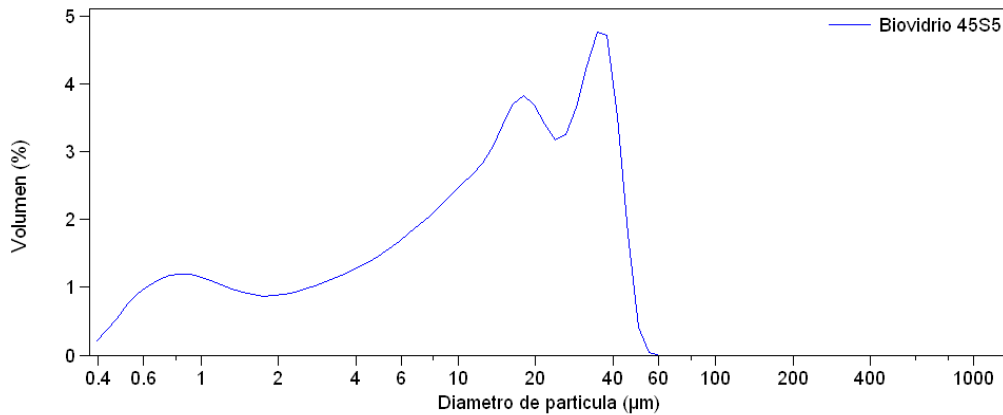


Figura 4.4 Gráfico de la distribución de tamaño de partícula

4.1.5 Análisis de la Sinterización y Cristalización de Polvos de Biovidrio 45S5

Una vez obtenidos los polvos de biovidrio 45S5 se realizó un análisis del comportamiento de desifificación a diferentes temperaturas de sinterización.

4.1.5.1 Análisis por microscopia electrónica de barrido (MEB)

En la Figura 4.5 se puede observar el cambio en la morfología de las partículas de biovidrio a medida que aumenta la temperatura de 500 hasta 975°C. A 500°C se observan partículas de diferentes tamaños facetados, características de un material cerámico sometido a molienda. A medida que aumenta la temperatura, la morfología es más lisa en la superficie de las partículas; esto puede ser atribuido a la separación de fases vítreas en el material lo cual sucede cuando dos iones de alta valencia están presentes en un vidrio [37]. Cada tipo de ion tiende a separarse en una fase. Por efecto de transporte másico térmicamente activado, las partículas sinterizan y se obtienen estructuras más densas y robustas con la temperatura.

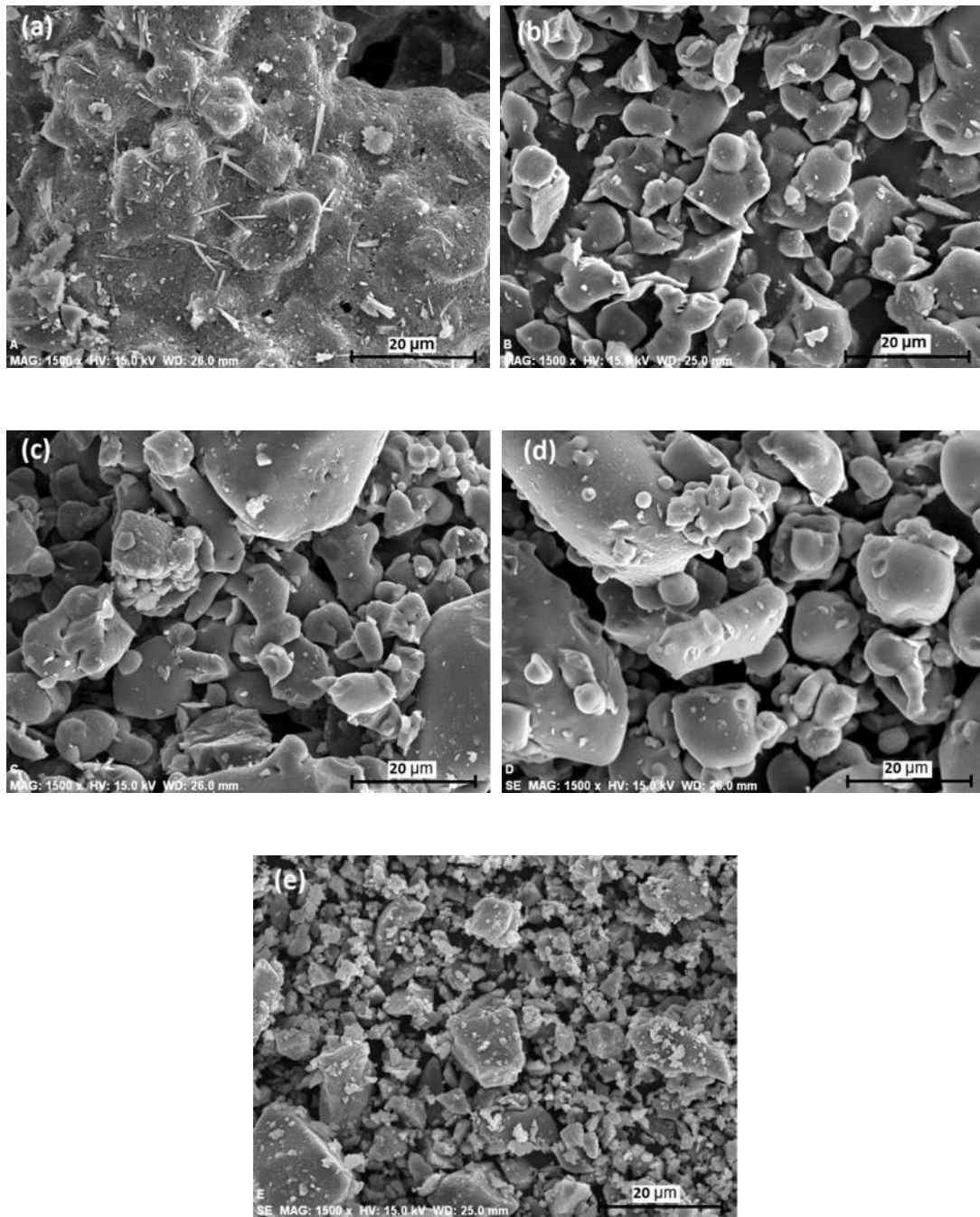


Figura 4.5 Imágenes MEB de polvos de biovidrio a diferentes temperaturas de tratamiento térmico. (a) 975°C, (b) 850°C, (c) 750°C, (d) 650°C, (e) 500°C.

4.1.5.2 Análisis Mediante DXR

En la Figura 4.6 se muestran los difractogramas de los polvos de biovidrio 45S5 a diferentes temperaturas de tratamiento térmico entre 750 a 975°C. La principal fase cristalina a 750°C se identificó como $\text{Na}_2\text{CaSi}_2\text{O}_6$ (JCPDS 77-2189). A 850 y 975°C se observa la aparición de un nuevo pequeño pico lo que sugiere la formación de una nueva fase cristalina secundaria la cual

fue identificada como silicorerhenanite $\text{Na}_2\text{Ca}_4(\text{PO}_4)_2\text{SiO}_4$ (JCPDS 32-1053). Esta fase nunca fue identificada por tratamientos térmicos cortos a 800°C . En el Bioglass 45S5 el fósforo, tiende a despolimerizar la red de silicio y entrar como un catión cuádruple coordinado en la red. A 850°C se observa la separación del pico principal en dos partes, siendo observada más claramente a 975°C . *Lefebvre et al.* [37] realizaron un análisis mediante difracción de rayos X encontrando una dependencia lineal entre la separación de los picos y la temperatura, por lo que le atribuyeron este fenómeno a un cambio en los parámetros de red más que a un cambio de fase del material.

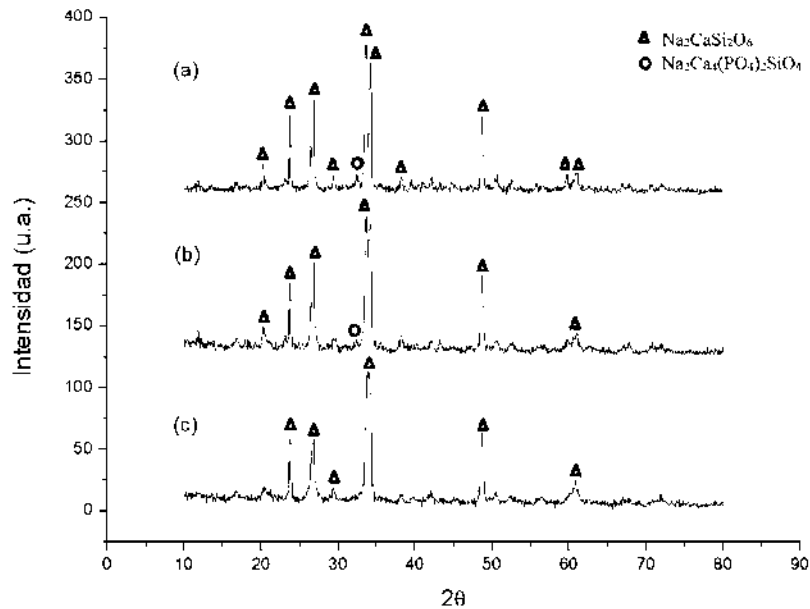


Figura 4.6 Difractogramas de polvos de biovidrio 45S5 a diferentes temperaturas de tratamiento térmico. (a) 975°C , (b) 850°C y (c) 750°C .

4.1.5.3 Análisis por FT- IR

Durante el proceso de cristalización del Bioglass 45S5 se desarrollan dos fases cristalinas; una fase principal formada de un silicato de sodio calcio y una fase secundaria de fosfato [36]. En la Figura 4.7 se muestran los espectros de FT-IR del biovidrio 45S5 a diferentes temperaturas de tratamiento térmico. Se pueden observar las señales características de las bandas de vibración de flexión de los enlaces Si-O-Si entre $400\text{-}600\text{ cm}^{-1}$ además se encuentra una señal a 635 cm^{-1} correspondiente a la señal de modo flexión de la banda P-O [49,56]. Alrededor de 730 cm^{-1} está la banda debida a las vibraciones de flexión de Si-O [57,58]. Las bandas a aproximadamente 933 y 1036 cm^{-1} se pueden atribuir a las vibraciones de estiramiento de Si-O y Si-O-Si, respectivamente [49,59]. Se puede observar el incremento en las bandas de señal de los enlaces Si-O-Si y los enlaces P-O con la temperatura debido a la cristalización de las fases

de sílice y fosfato presentes en el biovidrio 45S5. No se encontraron señales que nos indiquen contaminación dejada por la resina utilizada durante el proceso de espumado y pirolisis.

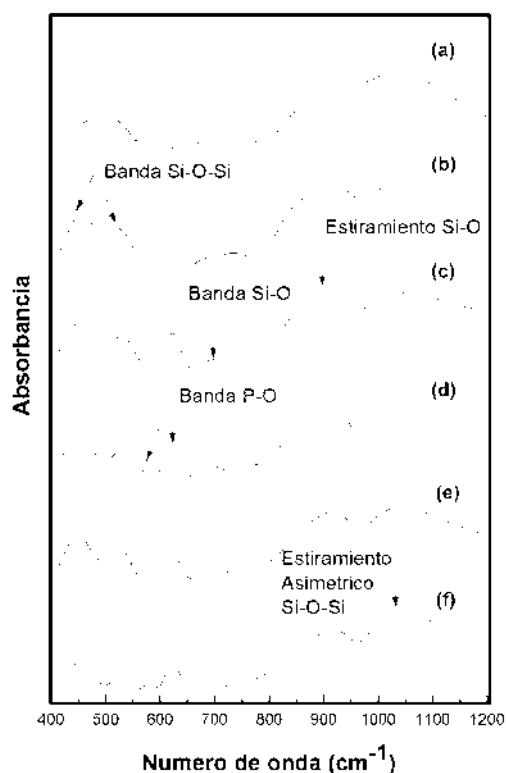


Figura 4.7 Espectro IR-FT de biovidrio 45S5 a diferentes temperaturas de tratamiento térmico (a) 500°C, (b) 650°C, (c) 750°C, (d) 850°C, (e) 950, (f) 975°C

4.1.5.4 Análisis por MET

El análisis mediante HRTEM permitió determinar la fase cristalina de la espuma obtenida a 975°C. En la Figura 4.8 (a) se puede observar la estructura cristalina de la espuma. En la figura 4.8 (b) se muestra una imagen filtrada donde se aprecian más claramente los planos cristalinos. Mediante la FFT (transformada rápida de Fourier) se muestran los puntos de difracción de los planos con un eje de zona de [2-201] y se midieron las distancias interplanares, las cuales fueron 2.62 Å, correspondiente a los planos (220) y de 2.67 Å, correspondiente a los planos (024), distancias que corresponden a la fase $\text{Na}_2\text{CaSi}_2\text{O}_6$, lo que corrobora lo obtenido por difracción de rayos X. Por EDS se pudo determinar la presencia de los elementos principales del biovidrio 45S5, los cuales se presentan en la Figura 4.9.

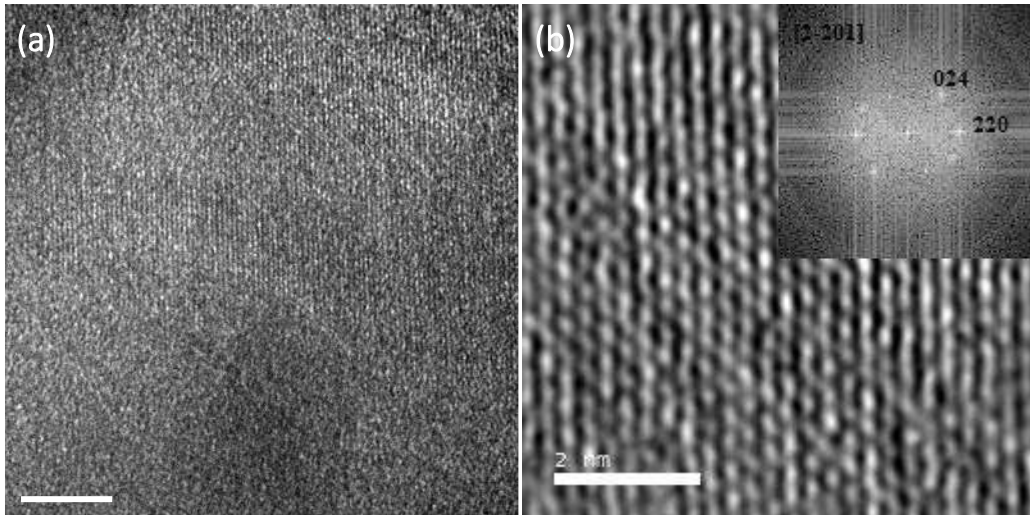


Figura 4.8 (a) Imagen HRTEM de polvos de biovidrio 45S5 sinterizado a 975°C, (b) Imagen filtrada de HRTEM y su respectivo FFT (transformada rápida de Fourier) (Inserto)

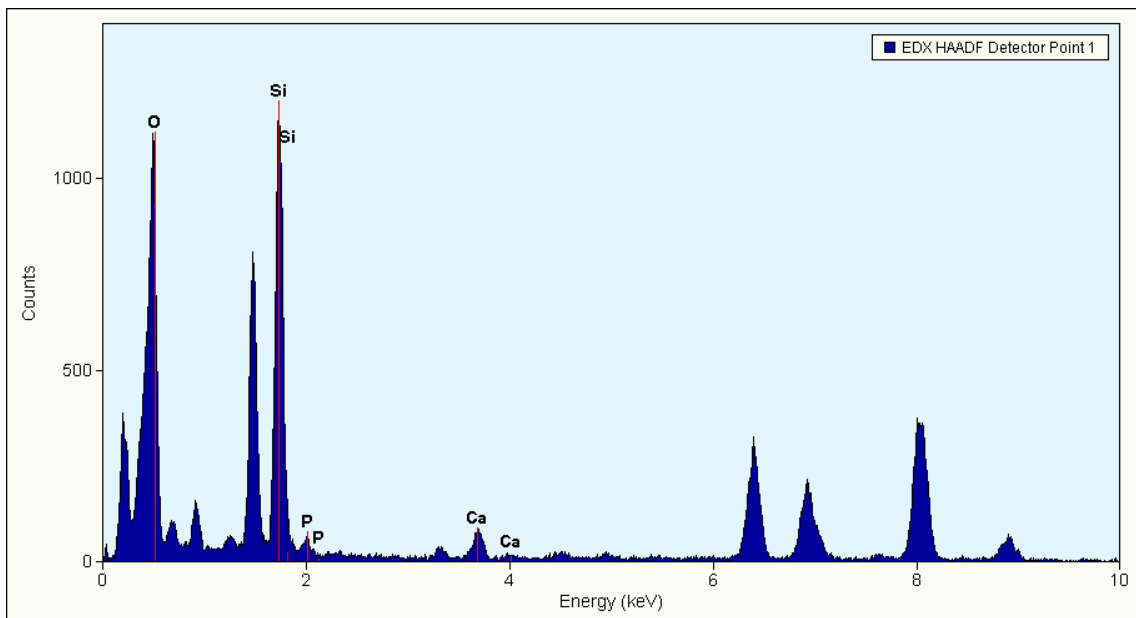


Figura 4.9 EDS de polvo de biovidrio 45S5

4.1.5.5 Estudio Mediante DSC

Las curvas de DSC a diferentes velocidades de calentamiento se muestran en la Figura 4.10. Todas las muestras presentaron un pico exotérmico entre 650 -800 °C que corresponde a la cristalización del biovidrio 45S5, y un cambio de pendiente en 550-580 °C que corresponde a la temperatura de transición vítrea (T_g). Las temperaturas características se muestran en la Tabla 4.3.

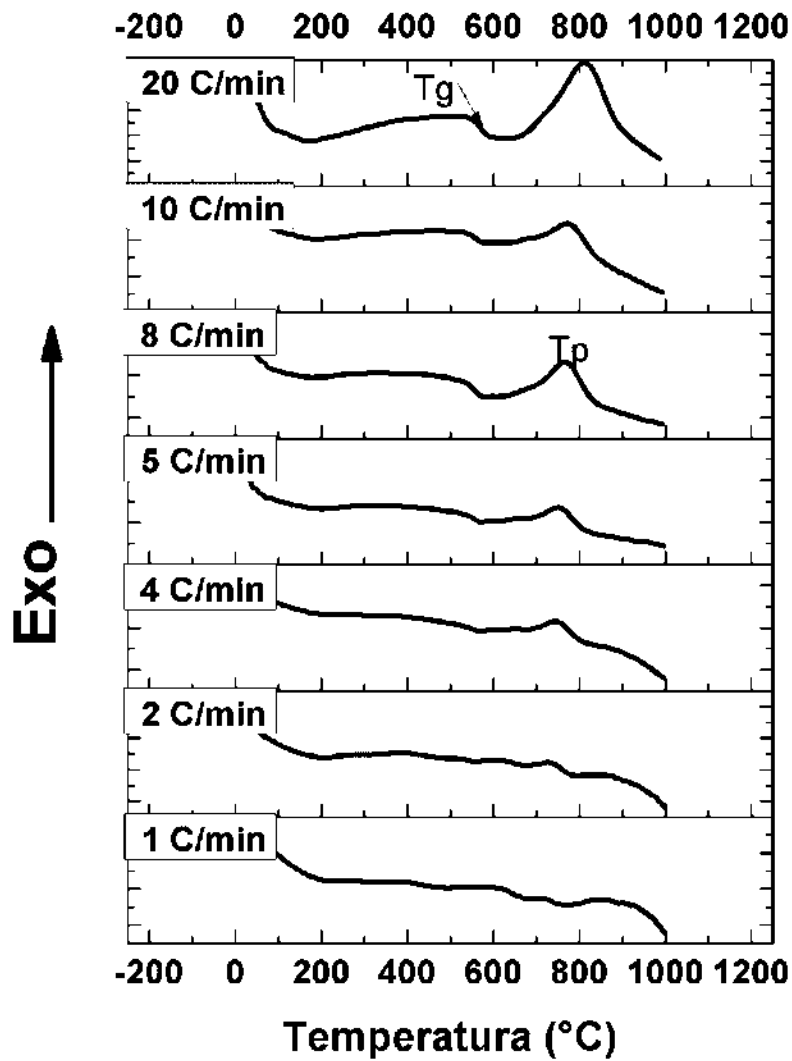


Figura 4.10 Curvas de DSC de biovidrio 45S5 a diferentes velocidades de calentamiento

Tabla 4.3 Temperaturas T_p y T_g para el biovidrio 45S5 a diferentes velocidades de calentamiento

Velocidad de calentamiento °C/min	T_p (°C)	T_g (°C)
1	715.82	552.17
2	730.08	554.67
4	746.79	557.96
5	754.00	564.26
8	768.80	568.23
10	775.92	570.56

La grafica de $[\ln(\alpha/T_p^2)]$ contra $1/T_p$ se presenta en la Figura 4.11. El valor para la energía de activación de la cristalización fue calculado con la pendiente de la curva en 310.44 kJ/mol. Este valor es parecido al calculado por *Oana Bretcanu et al.* para polvo de Bioglass® 45S5 [54]. Debido a que la energía de activación es menor que las fuerzas de los enlaces iónicos del Si-O y del P-O que son de 443 y 464 kJ/mol, respectivamente, la cristalización del biovidrio 45S5 involucra el rompimiento de los enlaces de Na-O y Ca-O que tiene valores de 111 y 84 kJ/mol [60]. Los valores de n para las diferentes velocidades de calentamiento se enlistan en la Tabla 4.4. Los valores calculados de n están entre 1 y 2, lo que indica que a velocidades bajas de calentamiento predomina una cristalización en volumen en una dirección, mientras que a altas velocidades predomina la cristalización superficial.

Una forma alternativa de calcular el parámetro de Avrami n es mediante la ecuación de Ozawa [60].

$$\frac{d[\ln(-\ln(1-\alpha(T)))]}{d(\beta)} = -m \quad (4.1)$$

donde $\alpha(T)$ es el grado de cristalización a una temperatura fija (725 °C, 750 °C y 775°C) a diferentes velocidades de calentamiento. La gráfica de $\ln[-\ln(1-\alpha)]$ vs. $\ln \beta$ se presenta en la Figura 4.12 y a partir de la pendiente de las líneas resultantes se obtiene el parámetro de Avrami m . El valor de $\alpha(T)$ es proporcional al área parcial del pico de cristalización hasta la temperatura T . Los valores obtenidos de m se presentan en la Tabla 4.5. Se puede observar la misma tendencia de cambio del parámetro m desde una cristalización de tipo superficial a valores donde predomina una cristalización en volumen. Estos valores difieren de los obtenidos por otros autores que calcularon el factor de Avrami para polvos de Bioglass® con tamaños de partículas pequeños ($< 3\mu\text{m}$). Esto debido a la distribución de tamaño de los polvos de biovidrio 45S5 obtenidos por molienda, que van desde las $63\mu\text{m}$, hasta partículas $< 1\mu\text{m}$. *Arstila et al.* [61] investigaron la cristalización del Bioglas 45S5; concluyeron que el factor de Avrami puede ser afectado por el tamaño extremadamente pequeño de partícula de los polvos usados para las pruebas de DTA. Es conocido que partículas pequeñas pueden tener cristalización superficial también en sistemas con cristalización volumétrica [61]. La cristalización superficial y en volumen se presenta de manera competitiva durante la cristalización del biovidrio 45S5. En la Figura 4.13 se observa el comportamiento del biovidrio a diferentes velocidades de sinterización. A velocidades bajas el mecanismo que predomina es el de cristalización en volumen ya que se da suficiente tiempo para la formación de núcleos en el interior de las partículas para iniciar el proceso de cristalización; a velocidades altas el mecanismo que predomina es el mecanismo de cristalización superficial en gran parte del proceso (con más que suficiente energía suministrada por el calentamiento rápido y los gradientes térmicos en las partículas, provocando que todo el proceso se lleve a cabo a temperaturas más altas) mientras que el proceso en volumen no tiene el tiempo suficiente de iniciar [62].

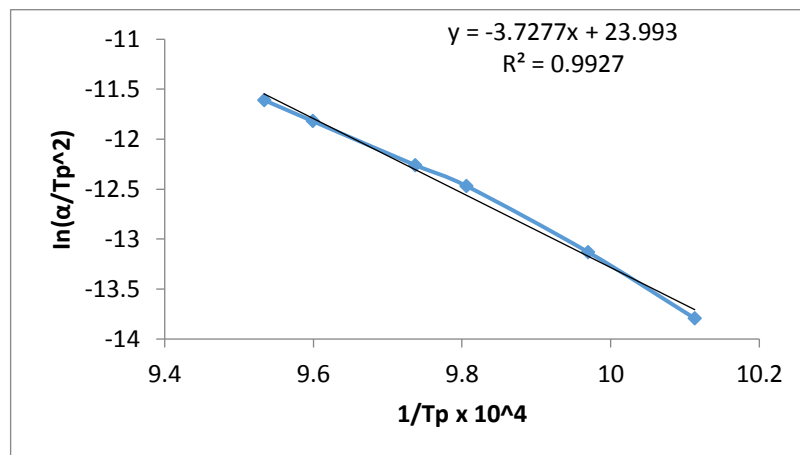


Figura 4.11 Cálculo de la energía de activación para la cristalización por los resultados de DSC

Tabla 4.4 Valores de n para el biovidrio 45S5 a diferentes velocidades de calentamiento

α (°C/min)	T_p (°C)	ΔT (°C)	n
1	715.82	30.00	2.1
2	730.08	39.47	1.7
4	746.79	54.54	1.2
5	754.00	52.63	1.3
8	768.80	63.63	1.1
10	775.92	63.04	1.1

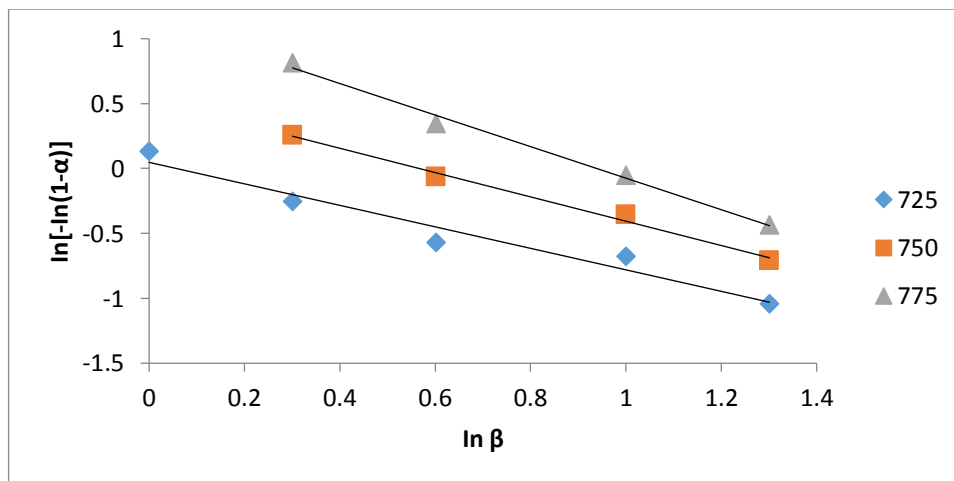


Figura 4.12 Gráfico Ozawa para el análisis cinético del biovidrio 45S5

Tabla 4.5 Valores de m para el biovidrio 45S5 calculados a partir del método de Ozawa

m	Temperatura (°C)
0.83	725
0.93	750
1.22	775

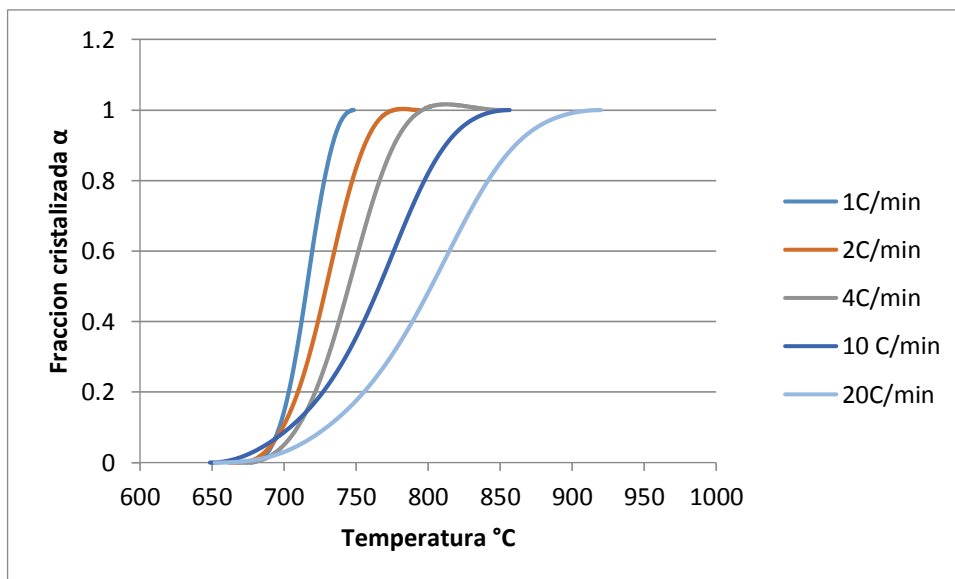


Figura 4.13 Representación de la fracción transformada en función de la temperatura para diferentes velocidades de calentamiento para el biovidrio 45S5

4.1.5.6 Dilatometría

La variación relativa de la longitud de la muestra ($\Delta L/L_0$) contra la temperatura T (°C) durante el calentamiento a 975 °C a una velocidad de calentamiento de 25 °C/min se muestra en la Figura 4.14. Se puede ver claramente que en el punto A comienza la sinterización a una temperatura de 570°C, lo que coincide con la T_g que se determinó por medio de las curvas de DSC. A esta temperatura sucede la sinterización por un mecanismo de flujo viscoso característico de materiales amorfos. En la curva se puede observar que se da una rápida sinterización del biovidrio 45S5 con una contracción mayor a 15%. *Oana Bretcanu et al.* [36]

encontraron que la sinterización del Bioglass® comienza a la temperatura de 550°C para un tamaño de partícula < 3µm, teniendo una primera etapa de densificación con 5% de contracción a lo cual sigue una etapa de cristalización a la temperatura de 620 °C y una segunda etapa de densificación para un máximo de contracción del 36 %. Esta discrepancia en los resultados se puede deber al tamaño de partícula, ya que al tener partículas más grandes se reduce el número de coordinación entre partículas lo que disminuye la densificación. En el punto B a una temperatura de 690 °C se observa una pequeña meseta lo que indica que a esta temperatura en el material comienza a cristalizar la fase principal la $(\text{Na}_2\text{CaSi}_2\text{O}_6)$ hasta una temperatura de 750 °C. En el punto C alrededor de 850 °C se observa un segundo proceso de cristalización el cual coincide con la cristalización de la fase secundaria de $\text{Na}_2\text{Ca}_4(\text{PO}_4)_2\text{SiO}_4$. Después de esta temperatura el material ya no densifica de manera significativa. Esto se debe a que con la formación de nuevas fases cristalinas dentro del material con temperaturas de fusión más elevadas que las del material amorfo se detiene el mecanismo de sinterización por flujo viscoso [63].

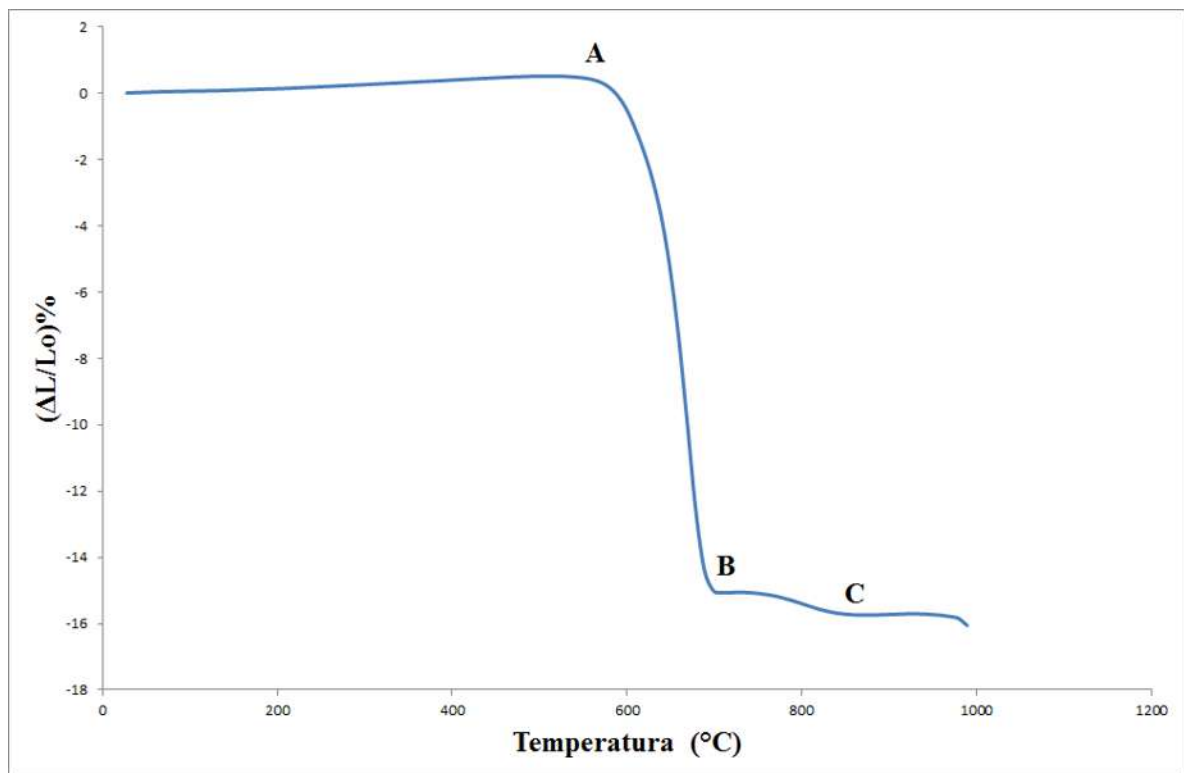


Figura 4.14 Curva dilatométrica de biovidrio 45S5 obtenida a una velocidad de calentamiento de 25 °C/min

4.2 Caracterización de espumas de biovidrio 45S5 obtenidas mediante tecnología de polvos

Una vez obtenidos y caracterizados los polvos de biovidrio 45S5, la siguiente etapa del proyecto consistió en la fabricación de las espumas de biovidrio 45S5 mediante la ruta de tecnología de polvos descrita en el Capítulo 3. Las espumas fueron sinterizadas a 975°C para obtener una buena resistencia mecánica. Además, las probetas fueron tratadas a diferentes tiempos de permanencia a la temperatura de sinterización para ver su efecto en las propiedades mecánicas y posteriormente determinar la bioactividad de las espumas. La caracterización mecánica y estructural de las espumas se muestra en los siguientes apartados.

4.2.1 Caracterización estructural de las espumas de biovidrio 45S5 mediante MEB

En la Figura 4.15 se presenta la microestructura de las espumas obtenidas después del ciclo de sinterización a 975°C. En las imágenes de MEB a diferentes magnificaciones se observan diferentes tamaños de poro de forma esférica que van desde tamaños milimétricos, de 1mm aproximadamente, hasta tamaños micrométricos menores a 50 μm . En la figura 4.15 (c) y (d) se puede observar que la espuma está constituida por la fusión de partículas de diferentes tamaños las cuales presentan una superficie lisa y la formación de cuellos, lo cual es característico en una sinterización en presencia de líquido o sinterización viscosa. *Clupper and Hench* [38] encontraron que la cristalización sucede antes de la sinterización por flujo viscoso en el biovidrio 45S5. Esto concuerda con lo reportado por *Chen et al.* [45] quienes encontraron que no se da una unión evidente entre las partículas de Bioglass 45S5 sinterizadas a 900°C por 5 horas. Las presentes espumas espumas fueron sinterizadas a una temperatura suficientemente alta para lograr la sinterización, pero no se permitió tiempo suficiente de permanencia para evitar fusión completa de las partículas individuales que forman la espuma, lo que se observa en las imágenes a altas magnificaciones.

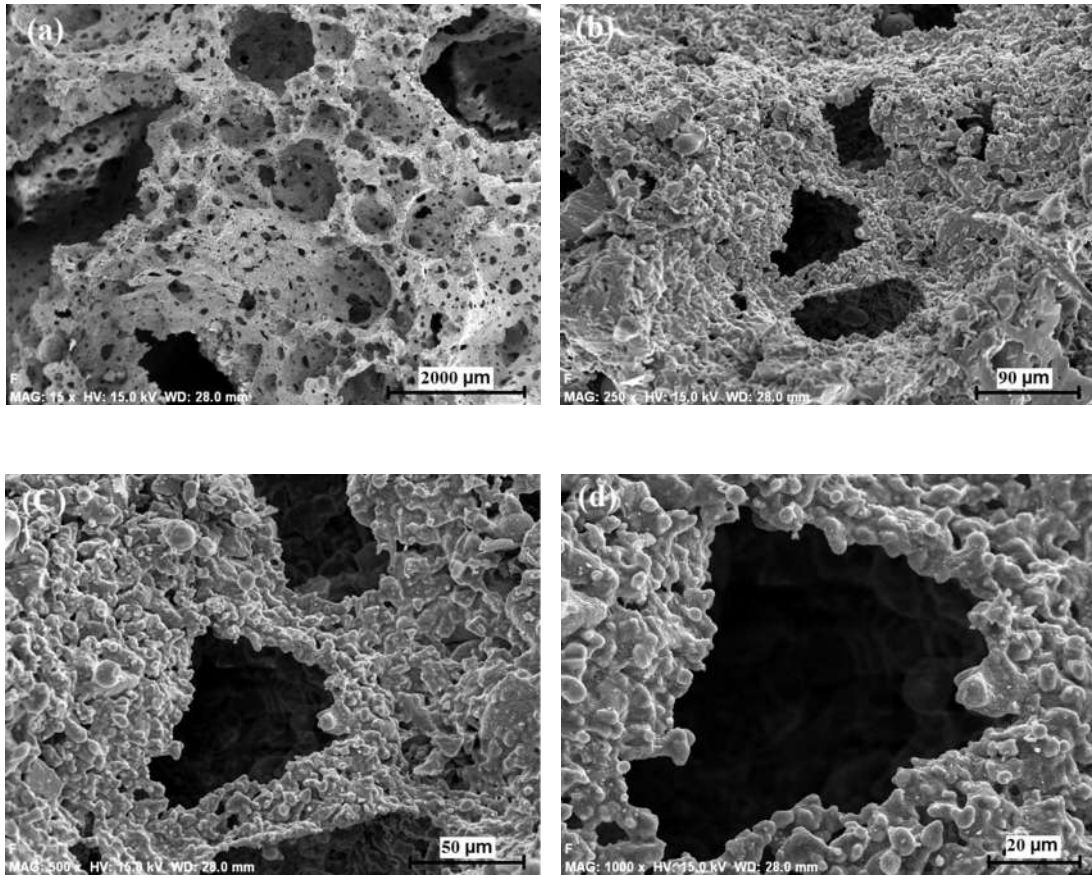


Figura 4.15 Imágenes MEB de espuma de biovidrio 45S5 sinterizada 975°C a diferentes magnificaciones (a) 15x, (b) 250x, (c) 500x, (d) 1000x

Las espumas se sinterizaron a 975 °C con diferentes tiempos de permanencia para lograr un grado mayor de sinterización. Después de sinterizadas se calculó el % porosidad mediante la siguiente formula [64]:

$$\%porosidad = 1 - \rho_r \quad (4.2)$$

donde ρ_r es la densidad relativa:

$$\rho_r = \rho_b / \rho_s \quad (4.3)$$

donde ρ_b es la densidad geométrica y ρ_s es la densidad teórica del biovidrio la cual fue determinada mediante un picnómetro de helio. Los resultados se muestran en la Tabla 4.6. La densidad ρ_s fue de 2.7404 g/cm³. El tiempo de sinterización tuvo un efecto moderado en la porosidad de las espumas, logrando una disminución de hasta 5% entre 1 y 3 h. En la Figura 4.16 se puede observar que a 1 hora la distribución de tamaño de poro es más amplia, encontrándose poros de hasta 1000 μm. A medida que incrementa el tiempo de permanencia,

el tamaño de los poros disminuye. En la Figura 4.16 (c) se observa una distribución de poros más uniforme con tamaños de poro máximo de 500 μm . En la Figura 4.17 se puede observar las paredes que forman los poros, las cuales están formadas por partículas sinterizadas de diferentes tamaños con una morfología irregular obtenida por molienda de un material frágil. En las tres muestras se observan poros con tamaños menores a 50 μm los cuales se forman entre partículas con poco grado de sinterización.

Tabla 4.6 Densidad volumétrica y % de porosidad de espumas de biovidrio sinterizadas a diferentes tiempos de estancia a 975 °C

Muestra	Tiempo de sinterización (h)	% Porosidad
BG1	1	74
BG2	2	71
BG3	3	69

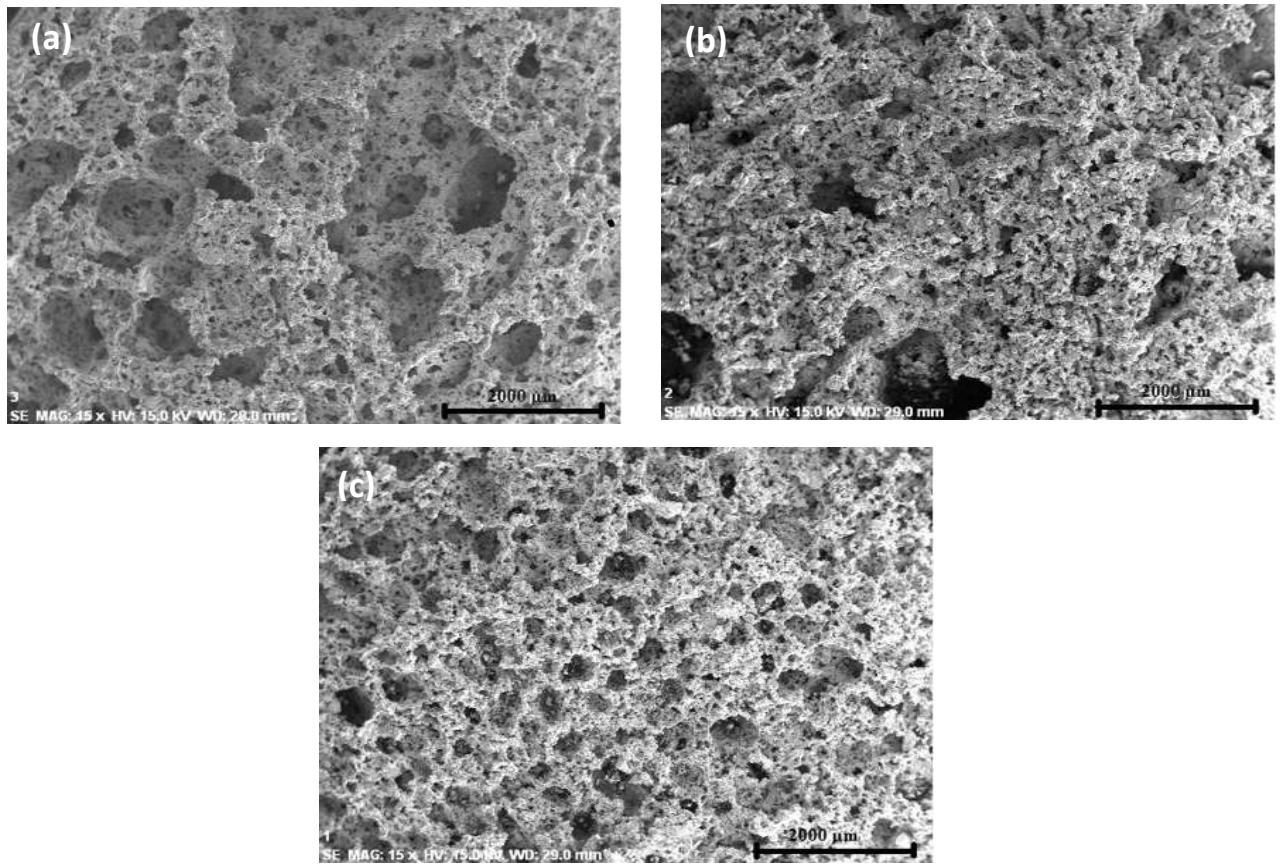


Figura 4.16 Imágenes MEB a 15x de espumas sinterizadas a 975 °C con diferentes tiempos de estancia. (a) 1h, (b) 2 h y (c) 3 h

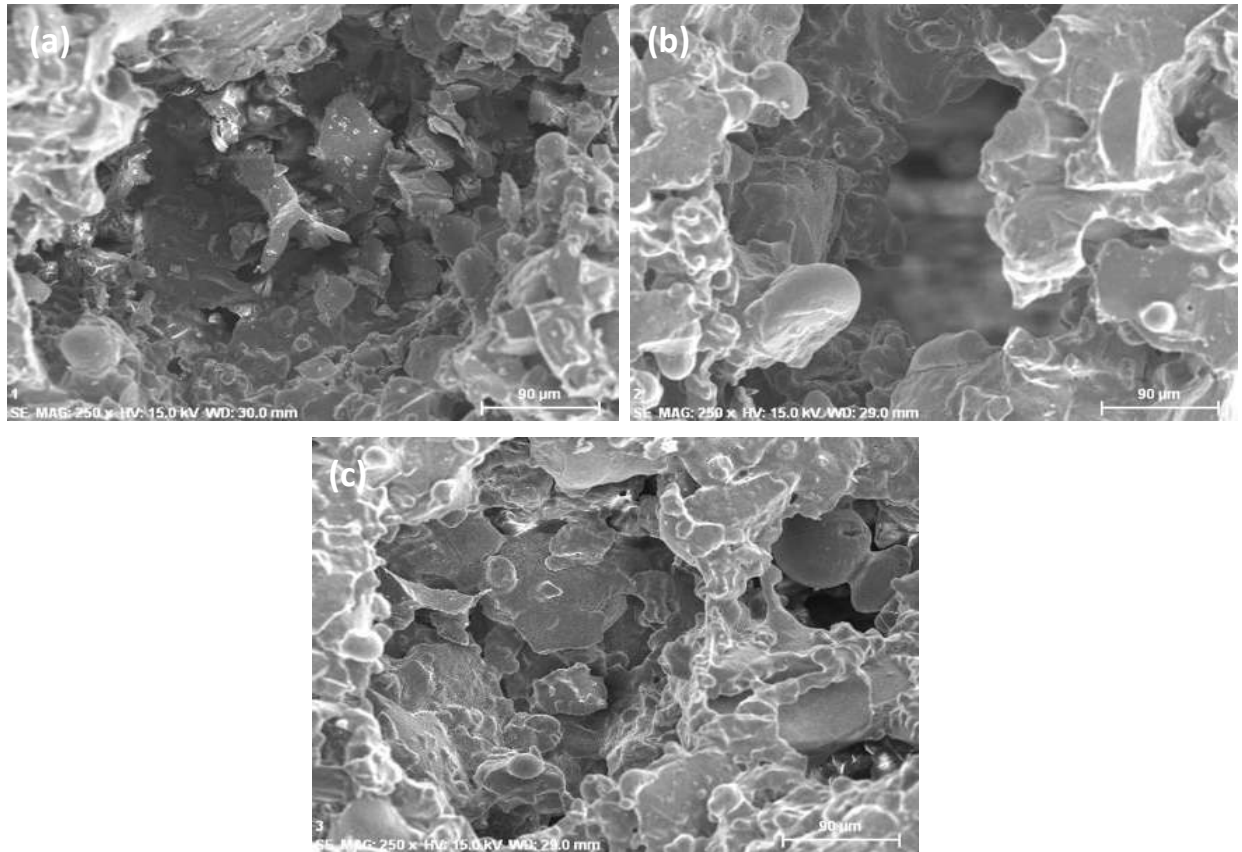


Figura 4.17 Imágenes MEB a 250x de espumas sinterizadas a 975 °C con diferentes tiempos de estancia. (a) 1h, (b) 2 h y (c) 3 h

4.2.2 Caracterización de las Espumas por Difracción de Rayos X (DRX)

Una vez sinterizadas las espumas se llevó a cabo un análisis mediante DRX para determinar las estructuras cristalinas presentes. En la Figura 4.18 se muestran los difractogramas de las espumas sinterizadas a 975 °C con diferentes tiempos de permanencia. Se observa la fase cristalina principal que forma las espumas de biovidrio la cual fue $\text{Na}_2\text{CaSi}_2\text{O}_6$ (JCPDS 77-2189) y una fase secundaria la cual fue identificada como silicorerhenanite $\text{Na}_2\text{Ca}_4(\text{PO}_4)_2\text{SiO}_4$ (JCPDS 32-1053). Una parte importante en el estudio de la bioactividad de las espumas de biovidrio 45S5 es el de mantener parte de la estructura amorfa del material, ya que ésta es más bioactiva que las fases cristalinas formadas. Una manera de medir la cristalinidad de un material es mediante el índice de cristalinidad (IC) el cual es calculado mediante las intensidades relativas de los patrones de difracción. *Person etl.* [65] sugieren hacer esta medición tomando picos de difracción vecinos. Para el caso del biovidrio 45S5 se tomaron las reflexiones (211), (300), (024) y (220) localizadas entre 25° y 35° 2θ. El IC puede ser calculado mediante la siguiente fórmula:

$$IC = \frac{a(211)+b(300)+c(024)}{d(220)} \quad (4.4)$$

Usando las intensidades relativas de los planos $I_{211}=57.7\%$, $I_{300}=8\%$, $I_{024}=99\%$ e $I_{220}=100\%$ (de acuerdo con la tarjeta PDF número JCPDS 77-2189) se calculó el IC igual a 1.649 para una muestra cristalizada. En la Tabla 4.7 se presentan los valores calculados para las muestras a diferentes tiempos de residencia a 975°C . Las tres espumas tuvieron un índice de cristalinidad alto, pero aún conserva material amorfo en la estructura, lo que ayudará en a que el material sea más bioactivo. La muestra BG3 tuvo el IC mas alto, lo que es de esperarse ya que se mantuvo más tiempo a las temperaturas de sinterización. En la Figura 4.19 se presenta la parte del difractograma utilizada para este estudio.

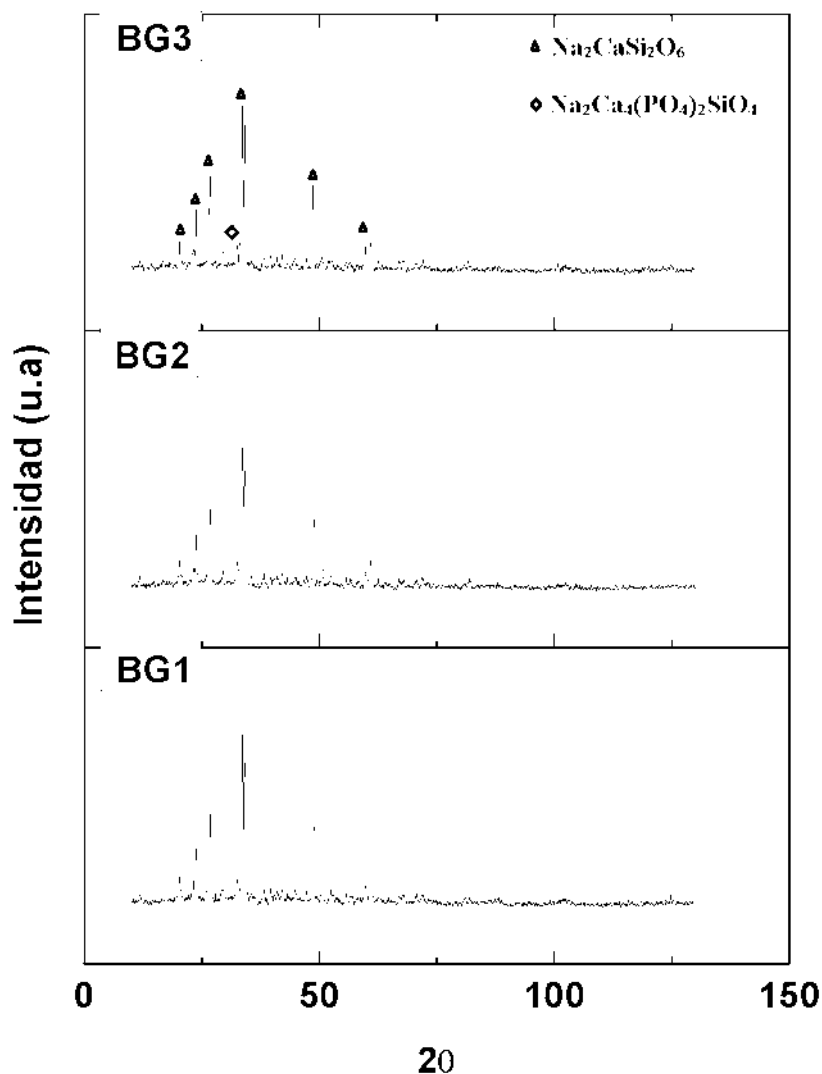


Figura 4.18 Difractogramas de espumas de biovidrio 45S5 sinterizadas a 975°C a diferentes tiempos de permanencia 1, 2 y 3h

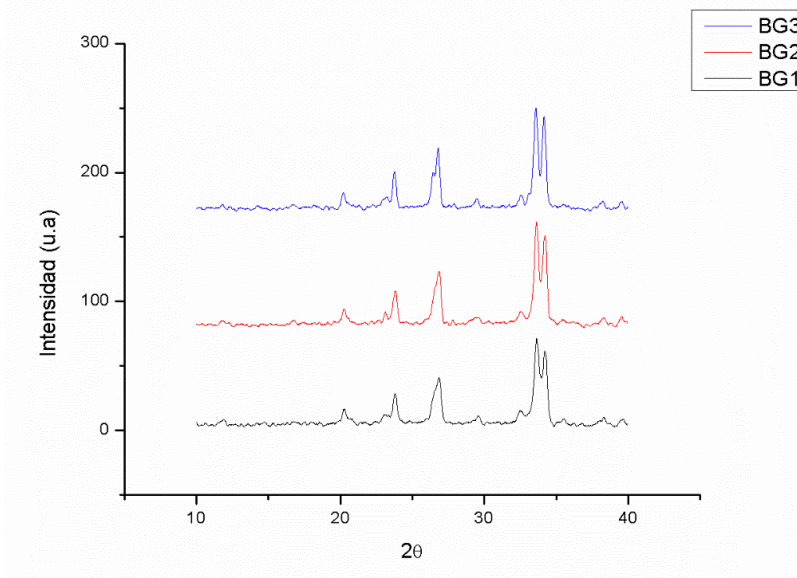


Figura 4.19 DRX de espumas de biovidrio 45S5. sinterizadas a diferentes tiempos de permanencia a 975°C

Tabla 4.7. IC calculados para las espumas de biovidrio 45S5

Muestra	Tiempo de sinterización (h)	IC
BG1	1	1.2
BG2	2	1.4
BG3	3	1.6

4.2.3 Evaluación de las Propiedades Mecánicas

Las pruebas de resistencia a la compresión se llevaron a cabo en las espumas sinterizadas a 975°C a diferentes tiempos de sinterización. La resistencia a la compresión definido como el máximo de las curvas de compresión fue afectado por el tiempo de sinterización e incremento de 3.5 a 3.7 MPa, cuando el tiempo se incrementó de 1 a 3 h (Figura 4.20). El incremento en el tiempo de sinterización tuvo un pobre efecto sobre la la resistencia a la compresión debido a que como se vio en las pruebas de dilatometría a la temperatura de 975°C la contracción es mínima debido a la formación de fases cristalinas en el material lo que provoca una baja

densificación ya que no hay formación de líquido para activar la sinterización por flujo viscoso. Los valores obtenidos en este trabajo son significativamente altos que los reportados por *Chen et al* [45] en espumas de Bioglass® con alta porosidad (~90%). Esto es debido a diferencias en la microestructura y porosidad de los materiales investigados. Las espumas obtenidas en este trabajo presentan uniformidad de poros y paredes densas a través de todo el material; lo que contrasta con las espumas fabricadas mediante el método de réplica que poseen un centro hueco lo que disminuye considerablemente su resistencia a la compresión. Wu et al. [44] reportaron una resistencia a la compresión de espumas de Bioglass® 45S5 con baja porosidad (43-47%) de 7.2-5.4 MPa. El comportamiento mecánico es similar, pero la distribución de poro no es uniforme. Además, los poros son alargados debido a la cascara de arroz utilizada como porógeno

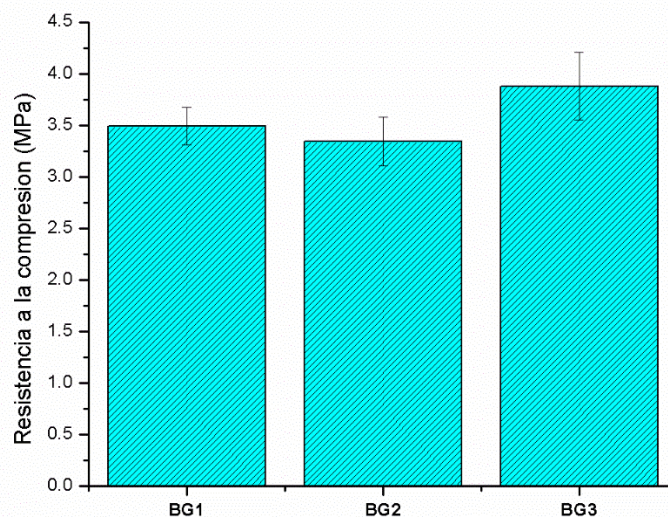


Figura 4.20 Resistencia a la compresión de espumas de bioglass 45S5 sinterizadas a diferentes tiempos de permanencia a 975°C

4.2.4 Evaluación de la Permeabilidad

Uno de los aspectos importantes a considerar en la fabricación de un andamio 3D que será utilizado en ingeniería de tejidos es la permeabilidad. De acuerdo con *Chen y Boccaccini* [45], una espuma ideal debe de ser altamente permeable, con porosidad interconectada y un tamaño de poro en el rango de 10-500 μm para plantar células, permitir el crecimiento de tejido óseo, así como también una buena distribución de nutrientes y permitir la remoción de desechos. Por otra parte, es importante diseñar andamios con un tipo de porosidad bimodal del hueso trabecular, el cual es un factor importante para la buena vascularización y crecimiento del tejido óseo [66].

La permeabilidad de las espumas está relacionada directamente con el grado de interconectividad de los poros, y es uno de los factores que influyen en la capacidad de regeneración del andamio. La permeabilidad controla el flujo de nutrientes a través del andamio hacia las células que migran en su interior. En estudios realizados se ha encontrado que el crecimiento celular dentro del andamio depende de que los nutrientes puedan permear al interior de la estructura porosa durante el cultivo celular [67, 68].

Como se muestra en la Figura 4.21 se encontró que la permeabilidad para las tres muestras BG1, BG2 y BG3, fue de 4.19×10^{-10} , 3.75×10^{-10} y $3.48 \times 10^{-10} \text{ m}^2$, respectivamente. La permeabilidad disminuyó significativamente debido al cierre de microporos formados en la estructura de los andamios por la unión de partículas pequeñas al momento de la sinterización, lo que provocó que hubiera una menor interconexión de poros dentro de la estructura. Es de notar que la permeabilidad intrínseca es independiente del fluido ya que solo depende de la estructura porosa del andamio. *Ochoa et al.* [72] encontraron valores de permeabilidad en el rango de $1.85 \times 10^{-9} - 2.07 \times 10^{-9} \text{ m}^2$ para andamios de Bioglass® 45S5 en andamios con porosidades de 90-95%. Se han reportado varios valores de permeabilidad de andamios porosos. *Shimko et al.* [70] reportó valores de permeabilidad entre $5.2 \times 10^{-10} - 6.2 \times 10^{-10} \text{ m}^2$ de andamios de tantalio. *Li et al.* [67] reportó una permeabilidad de $2.13 \times 10^{-10} \text{ m}^2$ para biomateriales porosos con 70% de porosidad. Estos valores reportados por varios investigadores están muy cercanos a la permeabilidad de tejido óseo reportado en la literatura por *Nauman et al.* [74] que se encuentra en un rango de 2.68×10^{-11} a 2.00×10^{-8} para hueso trabecular. Los resultados obtenidos en el presente trabajo están en el rango de los reportados en estas investigaciones. Por otra parte, una espuma con alta permeabilidad y alta porosidad no es necesariamente óptimo para regeneración de tejido óseo debido a que sus propiedades mecánicas se verán altamente afectadas por las altas porosidades del material.

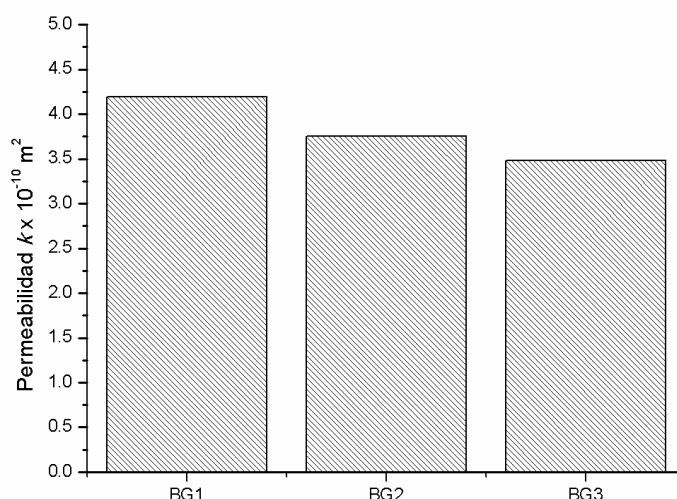


Figura 4.21 Permeabilidad de las muestras BG1, BG2 y BG3

4.3 Caracterización *in-vitro* de la Bioactividad de las Espumas de Biovidrio 45S5 en SBF

Una vez obtenidas las espumas de biovidrio 45S5 sinterizadas a 975°C con diferentes tiempos de permanencia, se caracterizó su bioactividad *in-vitro* en SBF y su viabilidad celular mediante una técnica colorimétrica con alamarBlue.

4.3.1 Degradación en SBF

Al aumentar el tiempo de permanencia a la temperatura de sinterización se puede controlar la velocidad de degradación en SBF de las espumas, como se observa en la Figura 4.22. Para la muestra BG1 se obtuvo un 17% de pérdida de peso, mientras que para la muestra BG3 solo fue de 12 %, lo que indica que a mayor tiempo de exposición el material se vuelve más resistente a la degradación en SBF, lo cual se relaciona con el mayor grado de cristalización de tales espumas. Las fases cristalinas presentes en las espumas son más estables que la fase amorfa retenida en las mismas, lo que permite que las espumas con mayor fase cristalina se degraden a menor velocidad [40]. En la Figura 4.22 se observa que la muestra BG1 provoca un aumento mayor en el pH de la solución debido a la rápida transferencia de iones desde la espuma hacia la solución las muestras. El aumento en el pH de las muestras BG2 y BG3 es más lento, pero igualmente el aumento de pH es gradual a mayores tiempos de inmersión. Por otra parte, después de 14 días de inmersión el pH de la solución decreció; esto puede explicarse por la precipitación de fosfatos y carbonatos de calcio lo cual desplaza el equilibrio $\text{HCO}_3^- \leftrightarrow \text{CO}_3^{2-} + \text{H}^+$ y $\text{HPO}_4^{2-} \leftrightarrow \text{PO}_4^{3-} + \text{H}^+$ hacia el lado de los productos. Esto nos indica que se

puede controlar la reactividad de las espumas mediante su grado de cristalinidad, ya que a mayor tiempo de sinterización, menor reactividad de la espuma con el medio de SBF.

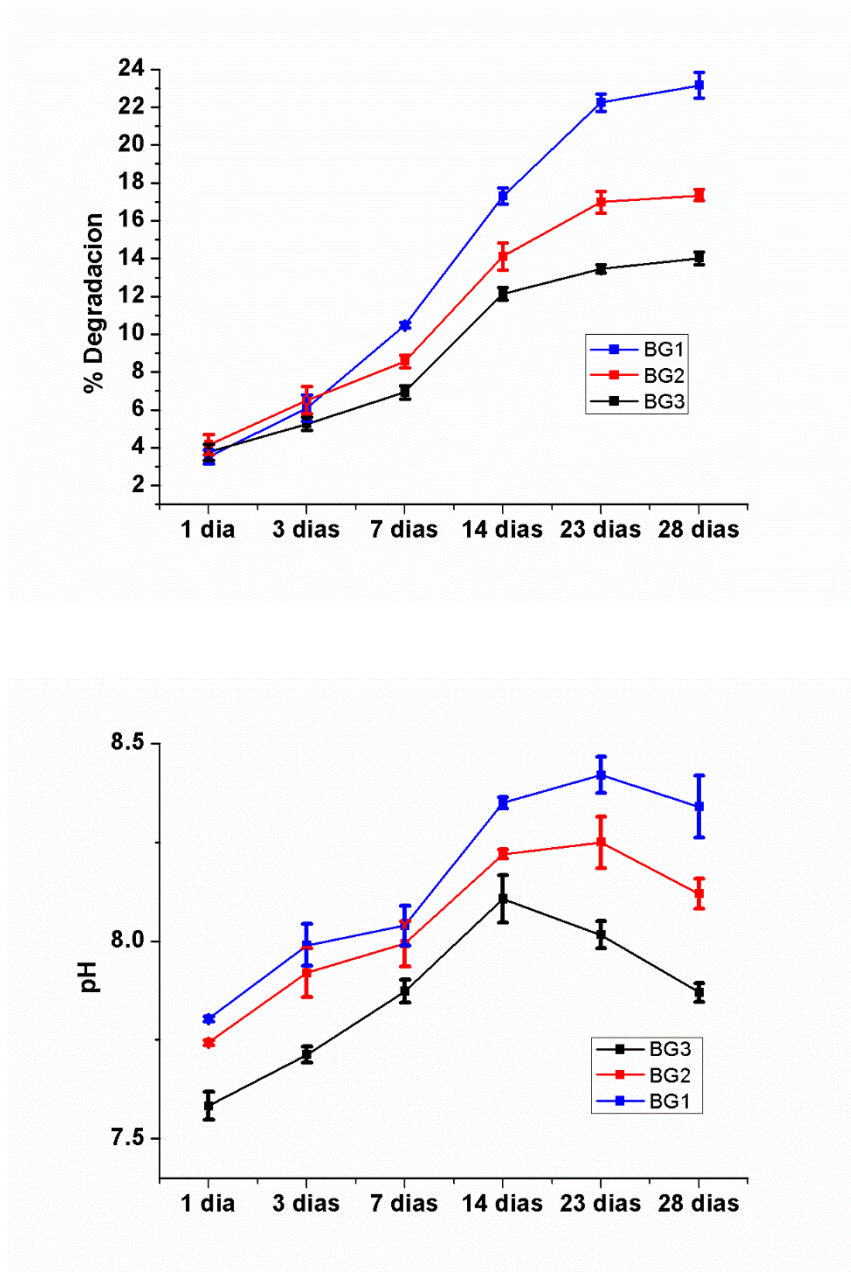


Figura 4.22 Gráficos de degradación vs tiempo y pH vs tiempo de espumas de bioglass 45S5 sinterizadas a diferentes tiempos de permanencia a 975°C

4.3.2 Caracterización de la Superficie Mediante FT-IR

En la Figura 4.23 presenta los espectros FT-IR de las espumas sinterizadas previo a ser inmersas en el fluido SBF. Se observa la formación de las dos fases cristalinas en todas las muestras. A mayor tiempo de sinterización se nota disminución de la banda a 1036 cm^{-1} debido a la pérdida de enlaces Si-O-Si cuando el material cristaliza, lo que resulta en una mayor despolimerización de la red de Si debido a la introducción en la red de iones de P que aún se encuentran en la fase amorfa y cristalizan en la fase secundaria ($\text{Na}_2\text{Ca}_4(\text{PO}_4)_2\text{SiO}_4$).

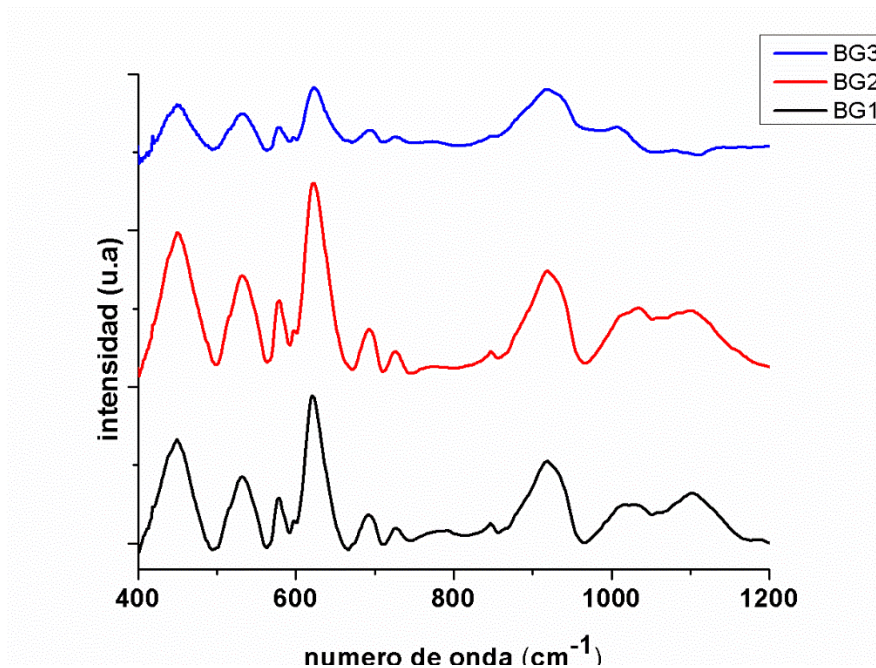


Figura 4.23 Espectro IR-FT de biovidrio 45S5 sinterizadas a diferentes tiempos de permanencia a 975°C

En la Figura 4.24 se presenta el desarrollo de las bandas de FTIR de las muestras a diferentes tiempos de inmersión en SBF. A mayor tiempo de inmersión ocurre la desaparición de la banda a 940 cm^{-1} , lo que se debe a la disolución rápida de los iones de Na y Ca de la red cristalina. El incremento de la banda a 1040 cm^{-1} que corresponde a la vibración de enlaces Si-OH es debido a la hidrolización de la superficie provocada por la reacción de los Si libres de la superficie y los enlazados a los iones de Na y Ca [72]. Se observa en la Figura 4.24 el desarrollo de la formación de hidroxiapatita con la aparición de la banda a 600 cm^{-1} la cual va aumentando en intensidad lo que indica la formación de una capa de hidroxiapatita más homogénea en la superficie de las espumas de biovidrio [73].

Al aumentar el tiempo de sinterización se atenúa la reactividad del material en SBF; esto se puede constatar con la banda a 940 cm^{-1} que desaparece casi por completo a 7 días de inmersión

para la muestra BG1, mientras que para las muestras BG2 y BG3 ocurre hasta los 14 días de inmersión en SBF, lo cual indica que la salida de iones Na y Ca es más rápida en la muestra sinterizada a 975°C durante 1h, lo que permite la formación más rápida de la capa de hidroxiapatita después de 7 días en SBF como indica la aparición de la banda de vibración del fosfato a 600cm⁻¹.

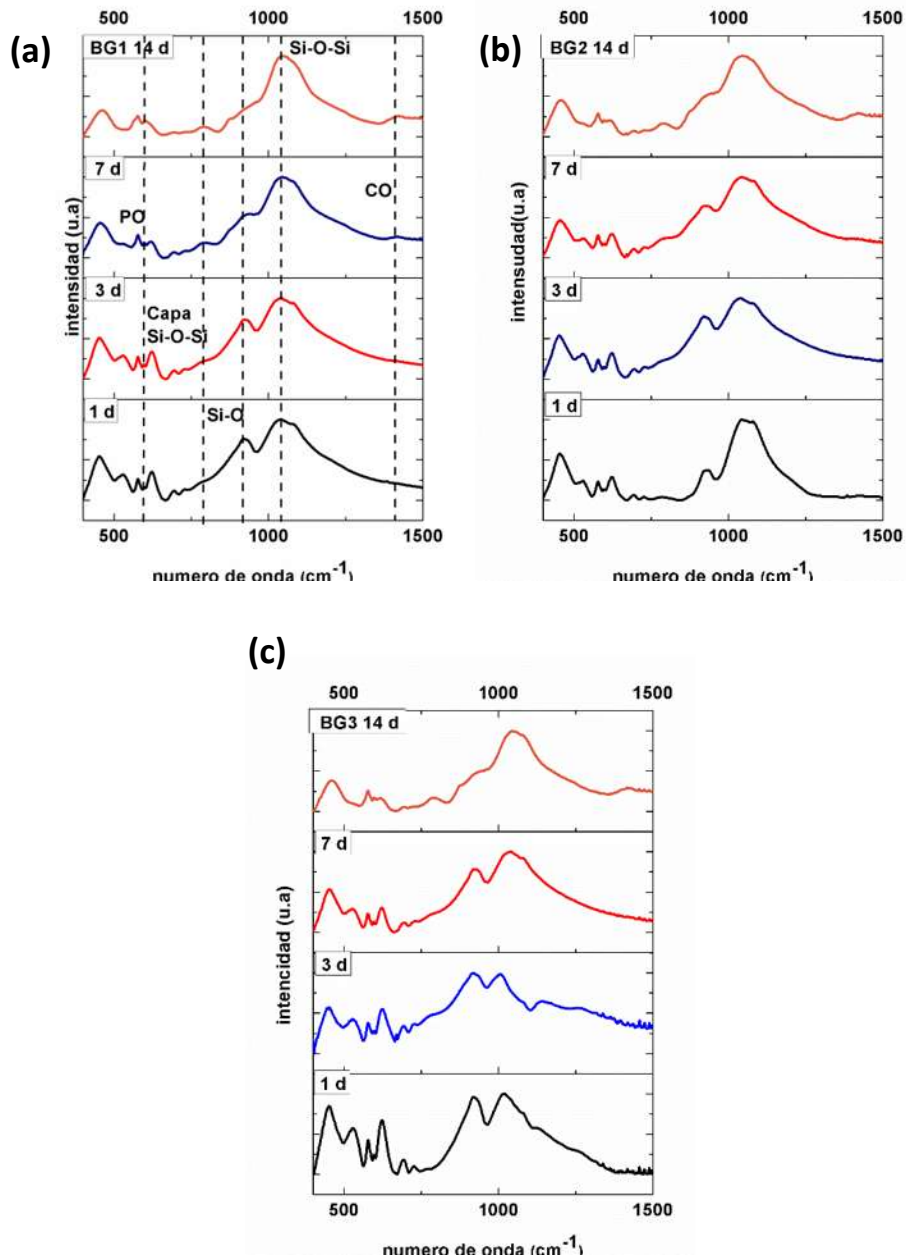


Figura 4.24 Espectro IR-FT de biovidrio 45S5 sinterizadas a diferentes tiempos de permanencia a 975°C después de inmersión en SBF. (a) BG1, (b) BG2, (c) BG3

4.3.3 Estudio Superficial de las Espumas de Biovidrio 45S5 por Difracción de Rayos X de Haz Rasante (GIXRD) y MEB

Las muestras fueron analizadas mediante DRX para comprobar la formación de la capa de hidroxiapatita. En la Figura 4.25 se observa el desarrollo de un pico a 32.95° el cual es debido al crecimiento de hidroxiapatita. La hidroxiapatita precipitada en la superficie del andamio se puede ver en la Figura 4.26 donde se observa la estructura tipo coliflor de la hidroxiapatita así como una estructura tipo silica (Si-O-Si) continua sobre la superficie. La estructura tipo silica es altamente porosa debido a la disolución de la espuma. De acuerdo a Boccaccini [74] la formación de la estructura tipo silica en la espuma es paso importante para la precipitación de la hidroxiapatita, ya que sirve de punto de nucleación.

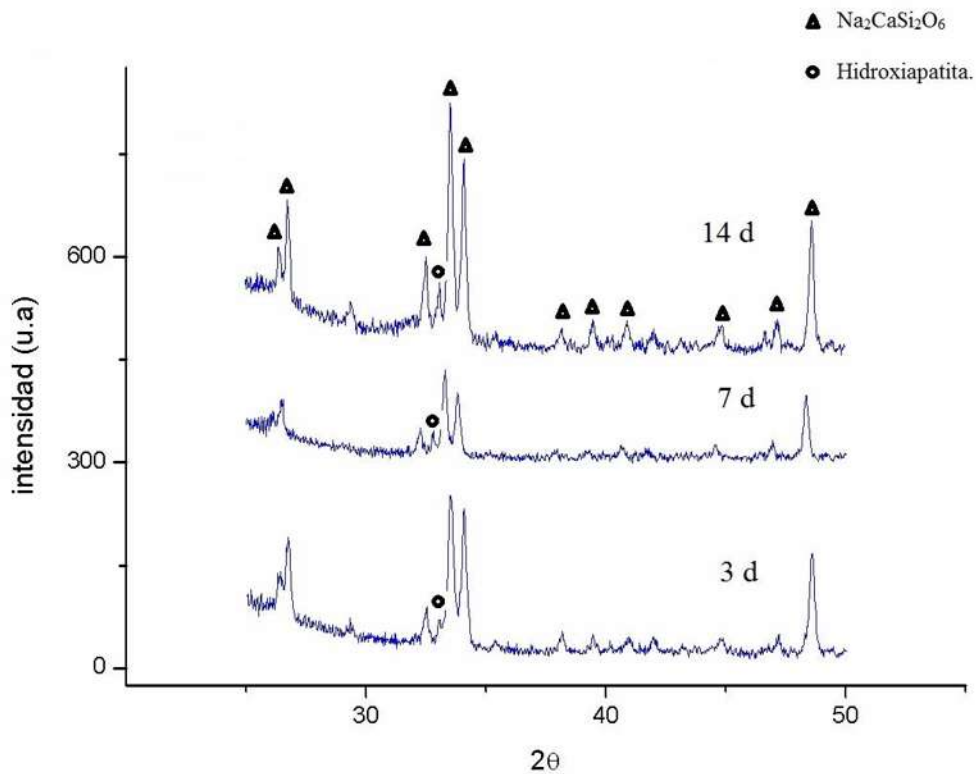


Figura. 4.25 DRX de espumas de biovidrio 45S5 después de inmersión en SBF de la muestra BG1

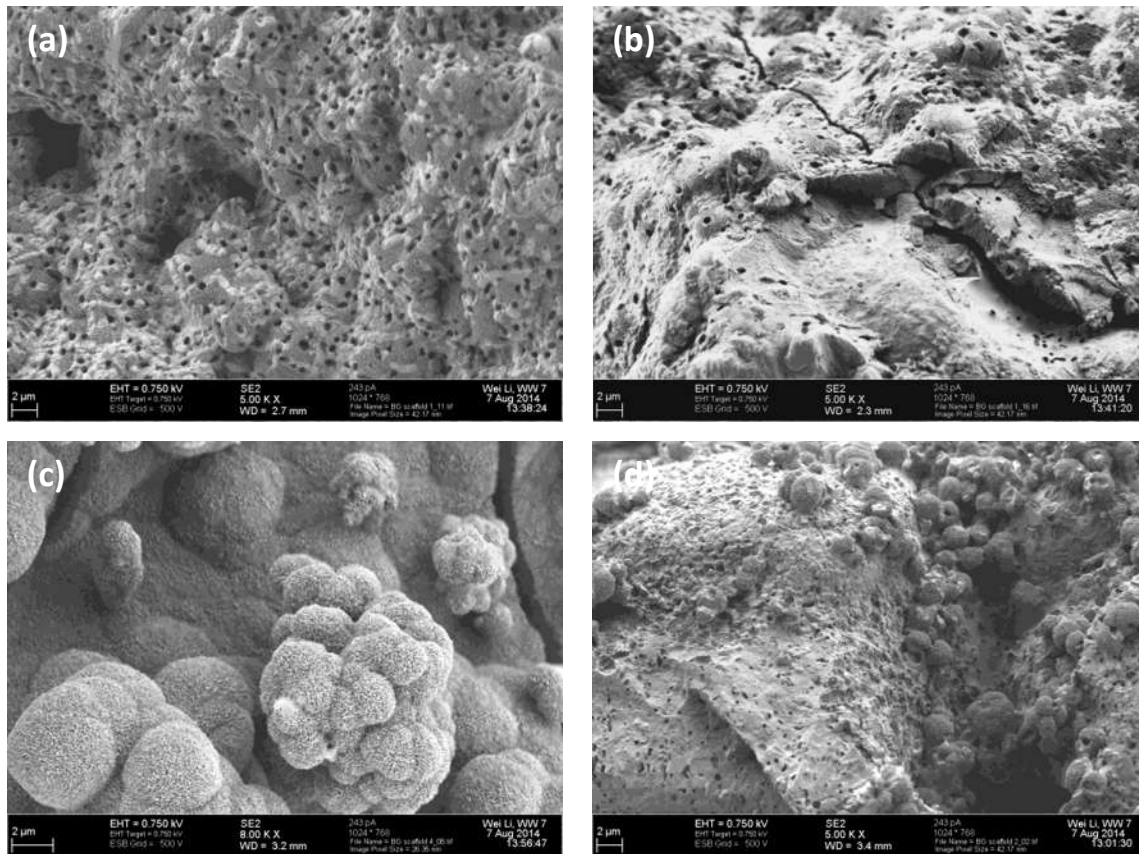


Figura 4.26 Micrografía electrónica de barrido de espumas de biovidrio 45S5 después de 14 días de inmersión en SBF de la muestra BG1

4.3.4. Evaluación de las propiedades mecánicas después de inmersión en SBF

Después de la inmersión en SBF por 28 días, se midió la resistencia a la compresión de las espumas en seco para evaluar los efectos de la degradación sobre las propiedades mecánicas. Como se pudo observar la degradación de las muestras se dio a diferentes velocidades, siendo la BG1 la que más degradación sufrió. Por otra parte, sus propiedades mecánicas disminuyeron a la misma velocidad. La resistencia a la compresión de los andamios fue medida después de 28 de inmersión en SBF (Figura 4.27). Las propiedades mecánicas de todas las probetas disminuyeron después de la prueba de inmersión de 3.5 a 0.3 MPa, 3.6 a 0.45 MPa y 3.7 a 0.36 MPa. La rápida degradación sufrida en SBF debilita la estructura por la formación de microporosidades y grietas como se observa en la Figura 4.30. Además, La formación de hidroxiapatita en la superficie de las espumas debilita la estructura al formar una interfase débil y quebradiza con la espuma.

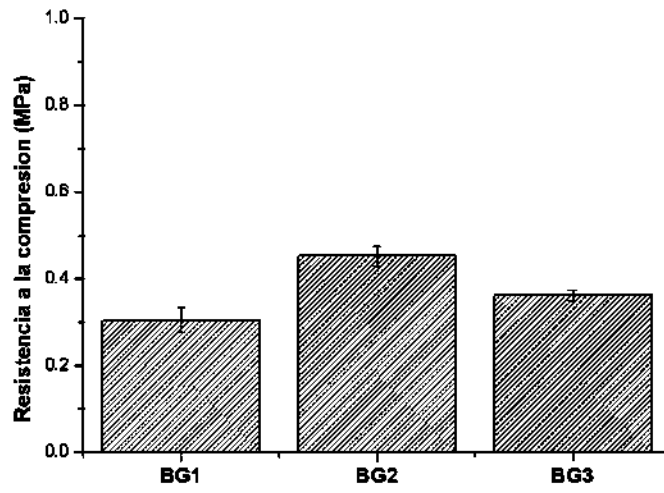


Figura 4.27 Resistencia a la compresión de espumas de biovidrio 45S5 después de 28 días en SBF

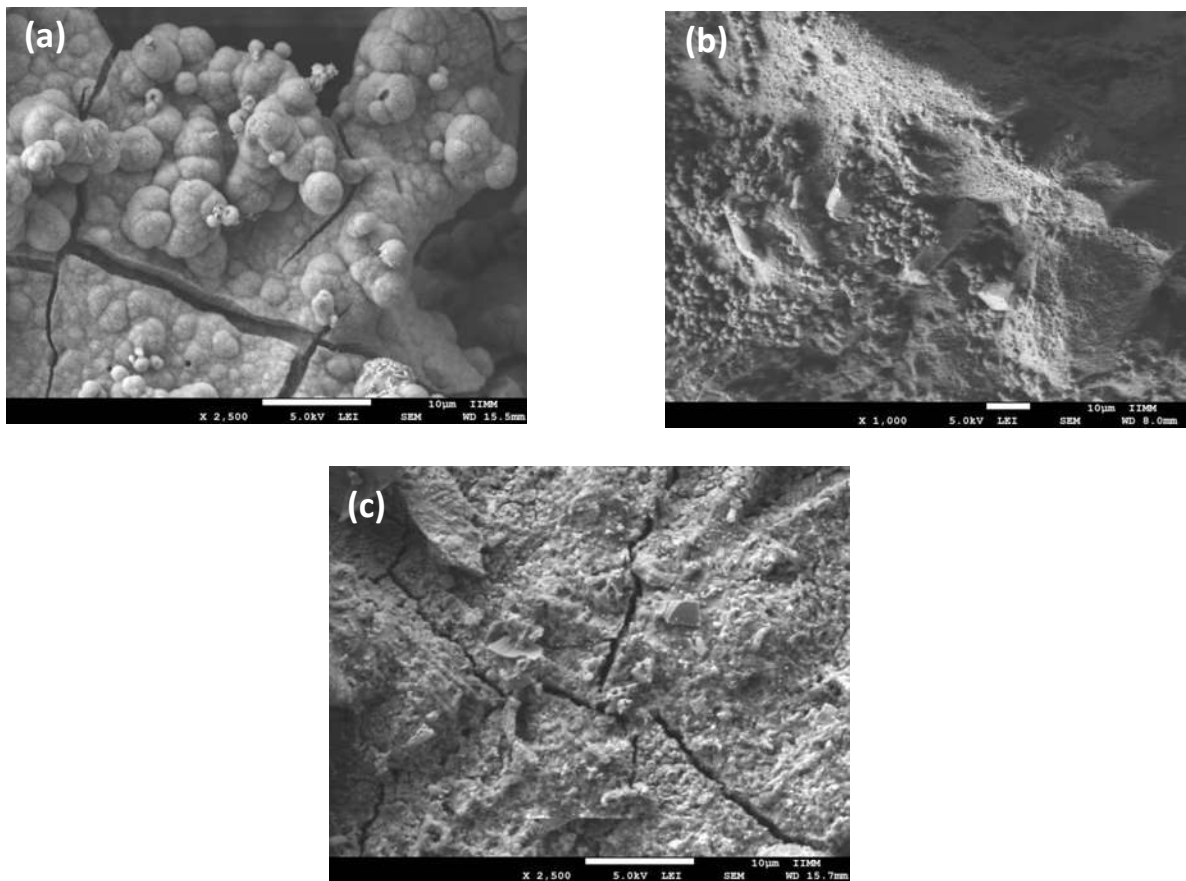


Figura 4.28 Imágenes MEB de espuma de biovidrio 45S5 después de inmersión en SBF. (a) 14 d, (b) 7 d y (c) 3 d

4.3.5 Proliferación Celular

En este apartado se ha examinado la proliferación celular de murine pre-osteoblastos (MC3T3-E1 subclone 4) sobre los andamios de biovidrio 45S5. En la Figura 4.29 se muestran los resultados de porcentaje de reducción de alamarBlue el cual es directamente proporcional al grado de proliferación celular. Todas las espumas demostraron un buen comportamiento a la proliferación celular siendo la muestra BG3 la que presenta un mayor porcentaje de alamarBlue.

En la Figura 4.30 se presentan las imágenes MEB de los andamios después de ser sembrados con células. Las imágenes confirman la proliferación y adherencia de las células sembradas en los andamios. La muestra BG3 revela la presencia de varias morfologías celulares dentro de la estructura de los andamios. Se observan células aplanadas con morfologías estiradas a través de los poros con varios puntos de fijación, mientras otras células tienen numerosas extensiones de tipo filopodios. Todas las células sembradas en las muestras pre-tratadas presentaron filopodias, creando contactos individuales con la superficie y anclaje para las células adheridas. *Gough et al.* [75] investigaron la unión de osteoblasto sobre superficies rugosas de bioglass 45S5, llegando a la conclusión de que la formación de filopodios crea zonas en que una mayor superficie de la célula se puede adherir y esto, a su vez, pueden promover una mayor cantidad de formación de nódulos minerales a largo plazo [76,77]. Después de una semana las células se extendieron por toda la estructura de las espumas, produciendo su propia matriz extracelular, permitiendo una mayor adhesión y proliferación celular, así como también la asociación de las células en la muestra BG3 a través de filopodios que crecen fuera de la matriz extracelular (Figura 4.31).

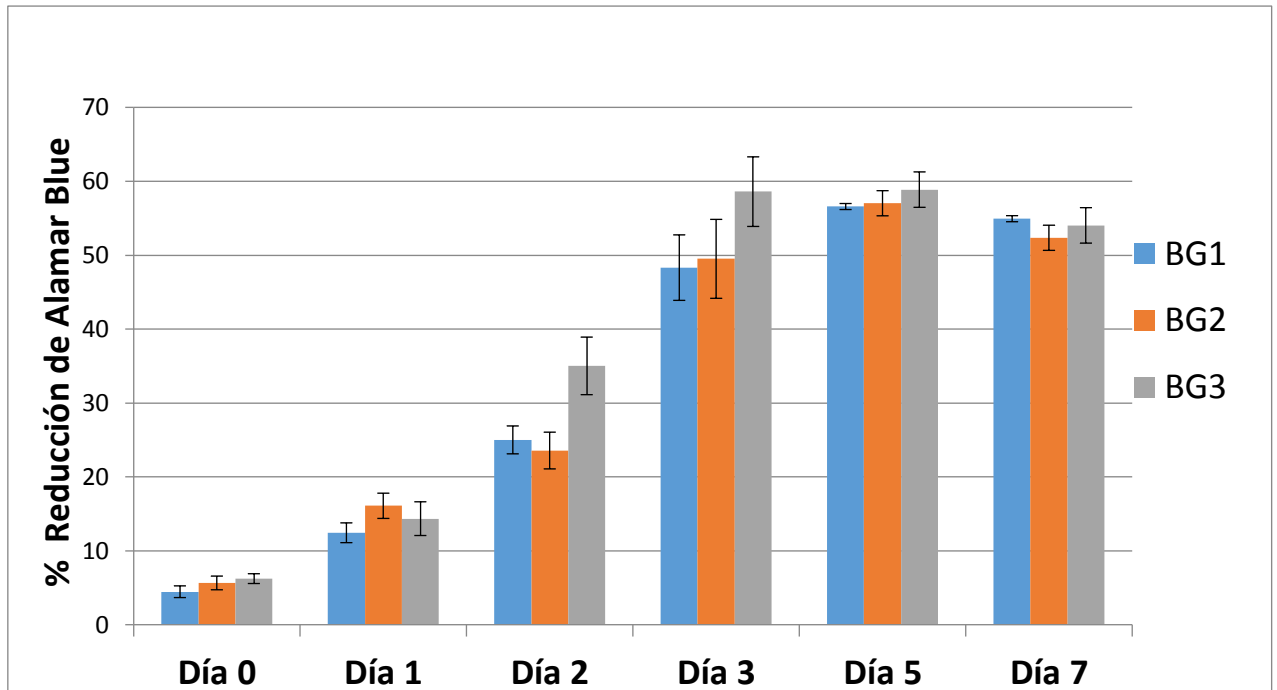


Figura 4.29 Proliferación celular de murine pre-osteoblastos (MC3T3-E1 subclon 4)

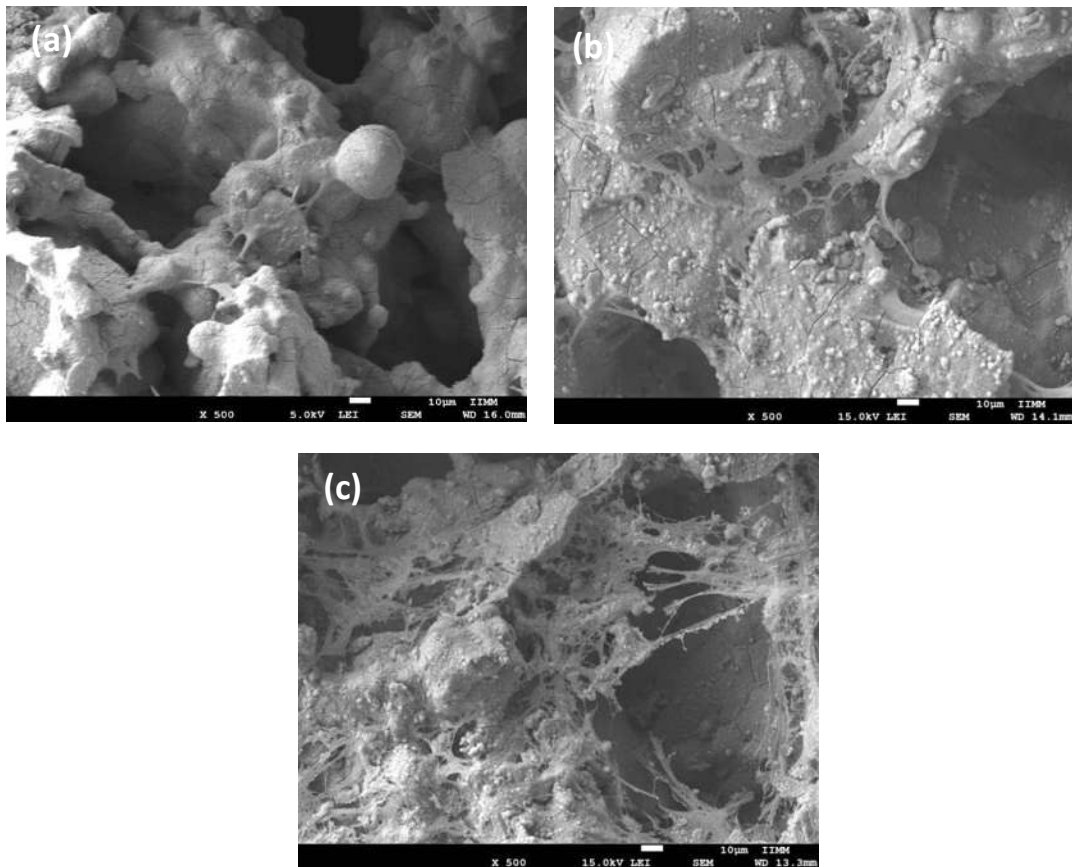


Figura 4.30 Imágenes MEB de andamios mostrando la presencia de células dentro de la estructura porosa. (a) BG1, (b) BG2, (c) BG3

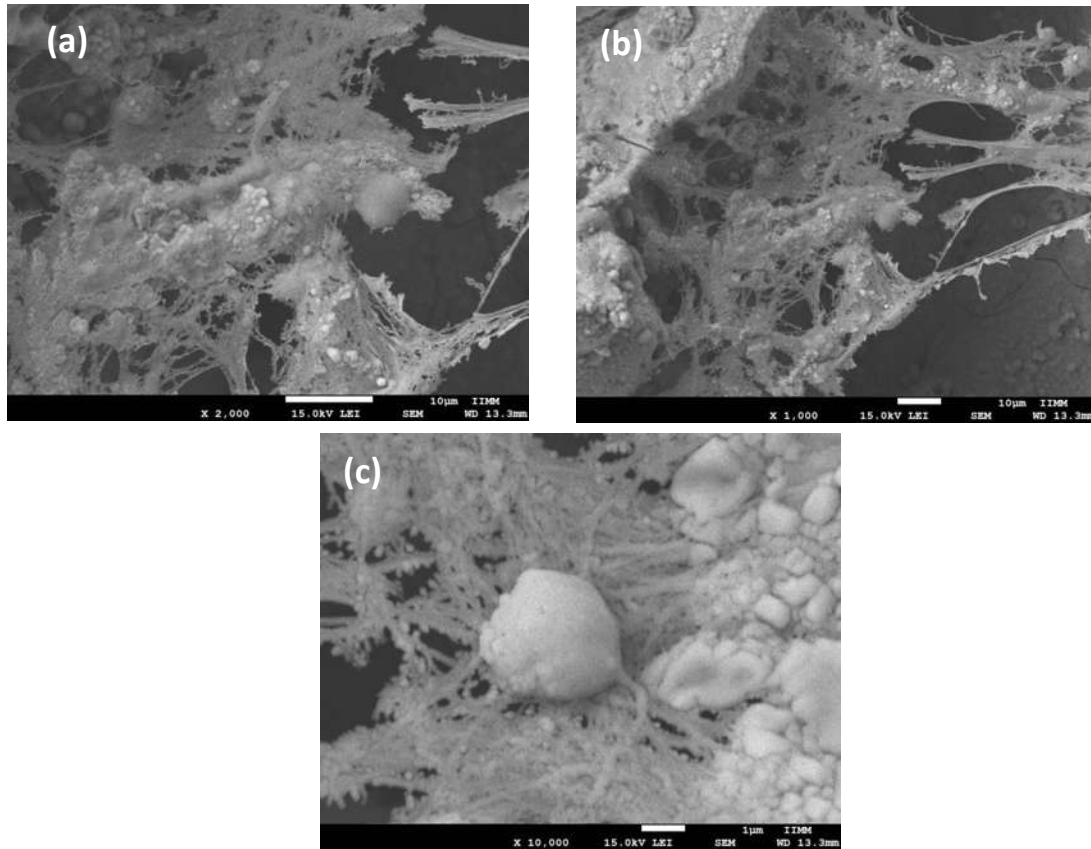


Figura 4.31 Imágenes MEB de la muestra BG3 a diferentes magnificaciones de andamios después de una semana de sembrar células

Como se describió en el capítulo 3 las espumas de biovidrio 45S5 fueron sometidos a un pretratamiento por su alta alcalinidad debido a la liberación rápida de iones Na^+ y Ca^{++} en solución, lo que provoca un incremento rápido del pH a niveles que no son convenientes para la proliferación celular. En la Figura 4.32 se muestra las imágenes MEB de las espumas después del pretratamiento. Se observa que la muestra BG1 tiene una superficie altamente rugosa debido a la precipitación de hidroxiapatita sobre la superficie de la espuma. Como ya se vio en el apartado 4.4.1, la muestra BG1 es la muestra más soluble; además en los resultados de FT-IR se observó que la capa de hidroxiapatita se forma más rápido en este sistema, generando una capa más gruesa de hidroxiapatita en la superficie del material del biovidrio 45S5 después del tratamiento en cultivo celular. La formación de esta capa de hidroxiapatita formada antes de sembrar las células tuvo un efecto en la proliferación celular sobre las espumas. La muestra BG3 presentó una mejor respuesta celular esto puede ser atribuido a que los productos de la disolución de las espumas (Na^+ , Ca^{++} , P^- y Si^{+4}) pasan con mayor facilidad desde el andamio a través de la capa de hidroxiapatita hacia el medio de cultivo. La formación de hidroxiapatita sobre el biovidrio 45S5 y la liberación de Si soluble y iones de calcio son factores importantes en la estimulación del crecimiento de celular [78]. La muestra BG1 al generar una capa de hidroxiapatita gruesa provoca que los productos de disolución del biovidrio 45S5 lleguen al medio de cultivo con mayor dificultad.

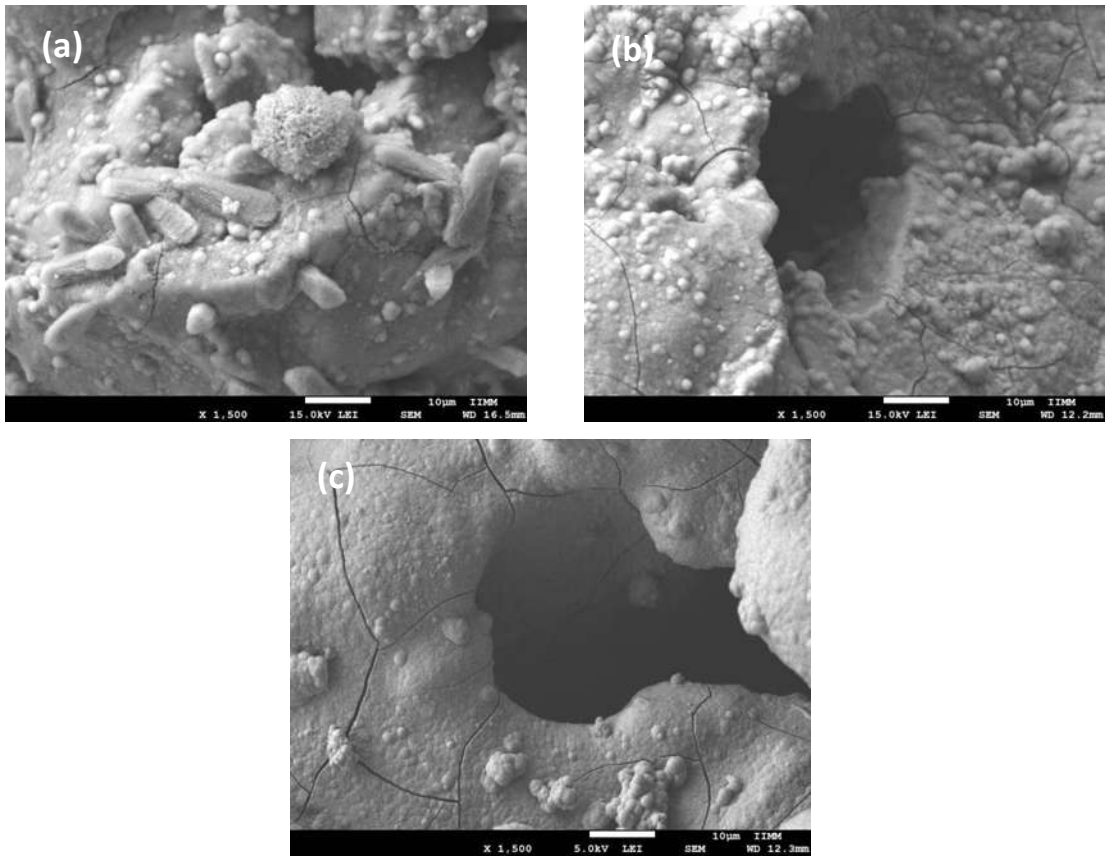


Figura 4.32 Imágenes MEB de espumas de biovidrio 45S5 después de pretratamiento en cultivo celular

CAPITULO 5. CONCLUSIONES

- Se logró fabricar biovidrio con una composición cercana a la del Bioglass 45S5 mediante fusión y temple, lo cual fue corroborado mediante un análisis de FRX. Mediante molienda se obtuvieron polvos de biovidrio con una distribución trimodal con una morfología irregular características del proceso de molienda.
- El biovidrio 45S5 cristalizó en dos fases, una principal $\text{Na}_2\text{Ca}_2\text{Si}_3\text{O}_9$ a 750°C y una secundaria $\text{Na}_2\text{Ca}_4(\text{PO}_4)_2\text{SiO}_4$ alrededor de 850°C , lo cual se corroboró mediante difracción de rayos X, FT-IR y microscopia electrónica de transmisión. Se obtuvieron las primeras espumas de biovidrio 45S5, las cuales tuvieron diferente tamaño de poro que van desde 1 mm hasta $50\ \mu\text{m}$. Se observó la evolución de la morfología de las partículas de biovidrio 45S5 mediante MEB desde partículas facetadas a 500°C a tener una morfología más suave en la superficie generada por la separación de las fases vítreas en el material. Mediante FT-IR no se observaron bandas de absorción que indicaran contaminación por parte de la resina utilizada en el proceso de espumado.
- La cinética de cristalización y la temperatura de sinterización del biovidrio 45S5 fue estudiada por medio de DSC y dilatometría. Se confirmó que el biovidrio cristaliza a una temperatura de $690\ ^\circ\text{C}$ las fases fueron identificadas mediante DRX las cuales fueron una fase principal $\text{Na}_2\text{CaSi}_2\text{O}_6$ y una fase secundaria de fosfato $\text{Na}_2\text{Ca}_4(\text{PO}_4)_2\text{SiO}_4$ la cual cristaliza a una temperatura alrededor de $850\ ^\circ\text{C}$. La temperatura T_g se encontró mediante curvas calorimétricas en el rango de 550 a $580\ ^\circ\text{C}$. Se calculó un valor para la energía de activación de cristalización de $310.14\ \text{kJ/mol}$. Los valores calculados de n estuvieron entre 1-2 lo que indica que se tiene una cristalización superficial y volumétrica en una dirección.
- Mediante dilatometría se determinó que el proceso de sinterización comienza a una temperatura de $570\ ^\circ\text{C}$ llegando a tener una contracción de casi el 16 %. Los resultados del presente trabajo describen la interacción entre la cristalización y la sinterización del biovidrio 45S5 lo que ayudara en la fabricación de mejores andamios propiedades mecánicas adecuadas, cristalinidad controlada y mejor bioactividad para su uso en ingeniería de tejidos. Se calculó el IC lo cual ayudara fabricación de mejores andamios propiedades mecánicas adecuadas, cristalinidad controlada y mejor bioactividad para su uso en ingeniería de tejidos.
- Se logró determinar la degradación de las espumas de biovidrio 45S5 a diferentes tiempos de permanencia a la temperatura de sinterización en el medio de SBF. Las espumas que presentaron la mayor degradación fueron las espumas del sistema $\text{BG1} > \text{BG2} > \text{BG3}$.
- La resistencia a la compresión de todos los sistemas disminuyó considerablemente debido a la degradación después de estar inmersas en SBF por 28 días. La resistencia a la compresión disminuyendo más de un 90 % para todos los sistemas estudiados.
- Todas las muestras presentaron bioactividad lo cual se pudo dar seguimiento por medio de FTIR y MEB donde se observó el desarrollo de la formación de hidroxiapatita en la superficie de las

espumas la cual es necesario para formar una interfase con el hueso una vez que el material es implantado.

- El tratamiento térmico tuvo un efecto en la velocidad de la formación de la capa de hidroxiapatita en la superficie de las espumas el cual fue más rápido para el sistema BG1 y más lento para el sistema BG2.
- Andamios poros de biovidrio 45S5 fueron fabricados mediante la técnica de tecnología de polvos y fueron estudiados en términos de su permeabilidad. Los valores promedios de permeabilidad de los andamios evaluados fueron de 4.19×10^{-10} , 3.75×10^{-10} y $3.48 \times 10^{-10} \text{ m}^2$ los cuales están en el rango de los valores experimentales reportados para el hueso trabecular, confirmando que estos andamios pueden ser utilizados como matrices extracelulares en ingeniería de tejidos.
- Todas las muestras presentaron una buena respuesta celular. Las células crecieron por toda la espuma creando una capa de matriz extracelular a través del andamio poroso. Se observó mediante las imágenes MEB que las células están unidas al andamio mediante estructuras tipo filopodios. La muestra BG3 presentó la mejor respuesta celular, lo cual se comprobó con la prueba de reducción de alamarBlue.

RECOMENDACIONES

En este apartado se comentarán algunas recomendaciones para afinar los resultados de la tesis presentada.

Se recomienda hacer un estudio minucioso del comportamiento de las espumas en diferentes medios fisiológicos con respecto al pH y la formación de la hidroxiapatita en la superficie. Debido a la naturaleza alcalina del biovidrio 45S5, las espumas deben ser sometidas a un pretratamiento en medio fisiológico para atenuar la disolución de iones alcalinos durante las pruebas celulares, ya que estos incrementan el pH del medio a niveles que provocan que las células mueran, por lo que es recomendable hacer un estudio acerca del tratamiento que se le tiene que dar a las espumas antes de las pruebas celulares.

Por otra parte, es importante realizar un estudio minucioso de la microporosidad y área superficial en las espumas, ya que es un parámetro importante que afecta la resistencia a la compresión, la disolución de las espumas y la permeabilidad.

TRABAJO FUTURO

Funcionalización de los andamios mediante diferentes polímeros con propiedades de bioactividad, así como polímeros biodegradables para mejorar las propiedades mecánicas de las espumas y acelerar la regeneración de tejido óseo.

Se diseñan nuevas espumas de diferentes biocerámicos como fosfatos de calcio. Además, se están dopando estas espumas con diferentes iones que pueden actuar como materiales de refuerzo para la espuma, así como moléculas que ayuden a la diferenciación de los pre-osteoblastos.

Probar las espumas fabricadas con pruebas in vivo desarrolladas en animales de laboratorio bajo condiciones controladas para medir su respuesta ante sistemas biológicos complejos.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- [1] F. Oreffo, R. Rose. "Bone Tissue Engineering: Hope vs Hype." *Biochem Biophys Res Commun*, 292, No. 1, (2002), pp. 1-7.
- [2] H. Shin, S. Jo, A. G. Mikos. "Biomimetic materials for tissue engineering." *Biomaterials*, 24, (2003), pp. 4353-4364.
- [3] Carnegie Mellon University. Bone Tissue Engineering Center. <http://www.btec.cmu.edu/reFramed/tutorial/mainLayoutTutorial.html> (acceso el 06-04-2007).
- [4] G. N. Bancroft, A. G. Mikos. "Bone tissue engineering by cell transplantation. Tissue engineering for therapeutic use" *Proceedings of the 5th International Symposium on Tissue Eng. for Ther. Use*, Tsukuba, (2001), pp. 16-17
- [5] J. S. Temenoff, A. G. Mikos. "Injectable biodegradable materials for orthopaedic tissue engineering." *Biomaterials*, 21, No 23, (2000), pp. 2405-2412.
- [6] B. D. Boyan, T. W. Hummert, D. D. Dean, Z. Schwartz. "Role of material surfaces in regulating bone and cell response." *Biomaterials*, 17, (1996), 137-146.
- [7] D.F. Williams, "Definitions in Biomaterials", *Elsevier*, Amsterdam, 26, No. 9, (1987), pp. 77.
- [8] L.L. Hench, E.C. Etheridge. "Biomaterials: An Interfacial Approach." *Academic Press*, New York, (1982).
- [9] L.L. Hench "Bioactive ceramics: theory and clinical applications." *Bioceramics*. 7, (1994), pp. 3-14.
- [10] L.L. Hench. "Bioceramics: From concept to clinic." *J. Am. Ceram. Soc.* 74. (1991), pp. 1487-1510.
- [11] S.F. Hulbert, "The use of alumina and zirconia in surgical implants," in *An Introduction to Bioceramics*, L. L. Hench and J. Wilson, Eds., *World Scientific, Singapore*, (1993), pp. 25-40.
- [12] T. Kokubo, H. Kim, M. Kawashita. "Novel bioactive materials with different mechanical properties." *Biomaterials*, 24, (2003), pp. 2161-2175.
- [13] L. L. Hench, V. J. Shirliff. "Bioactive materials for tissue engineering, regeneration and repair." *J. Mater. Sci.* 38, (2003), pp. 4697-4707.
- [14] U. Gross, R. Kinne, H. J. Schmitz, and V. Strunz, "The response of bone to surface active glass/glass-ceramics," *Crit Rev Biocompat.* 4, (1988), pp. 2-15.
- [15] L.L. Hench, The story of Bioglass., *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 17 (2006) 967-78.
- [16] A. W. Ham, *Histology*. Lippincott, Philadelphia, PA, (1969).
- [17] G. W. Hastings and P. Ducheyne (Eds.), *Natural and Living Materials*. *CRC Press*, Boca Raton, FL, (1984).
- [18] J. Wilson, G. H. Pigott, F. J. Schoen, and L. L. Hench, "Toxicology and biocompatibility of bioglass," *J Biomed Mater Res.* 15, (1981), pp 805-817.
- [19] T. Yamamuro, L. L. Hench, and J. Wilson. "Bioactive glasses and glass-ceramics" *Handbook on Bioactive Ceramics*. 1, (1990), pp 107.
- [20] L. L. Hench, "Bioceramics" *J. Am. Ceram. Soc.* 81, (1998), pp 1705-1728.
- [21] J. Saggio-Woyansky, C. E. Scott, W. P. Minnear. "Processing of porous Ceramics." *J. Am. Ceram. Soc.* 71, (1992), pp. 1674-1682

- [22] M. D. M. Innocentini, P. Sepulveda, V. R. Salvini, V. C. Pandolfelli, J.R. Coury. "Permeability and structure of cellular ceramics: a comparison between two preparation techniques." *J. Am. Ceram. Soc.* 81, (1998), pp. 3349-3352.
- [23] Q. Z. Chen, A. Efthymiou, V. Salih, A. R. Boccaccini. "Bioglass®-derived glass-ceramic scaffolds: Study of cell proliferation and scaffold degradation in vitro" *J Biomed Mater Res* 84, (2008), pp1049-1060.
- [24] P. Colombo, E. Bernardo, L. Biassetto. "Novel microcellular ceramics from a silicone resin." *J. Am. Ceram. Soc.* 6, (2004), pp. 152-154.
- [25] O. Lyckfeldt, J. M. F. Ferreira. "Processing of porous ceramics by starch consolidation." *J. Eur. Ceram. Soc.* 18, (1998), pp.131-140.
- [26] L.P. Lefebvre, Y. Thomas. "Method of making open cell material." 6660224 [ed] *Elservier*. US, (2003).
- [27] L. P. Lefebvre, A. Blouin, S. M. Rochon, M. N. Bureau. "Elastic Response of Titanium Foams During Compression Tests and Using Laser-Ultrasonic Probing" *Adv. Eng. Mater.* 8, (2006) pp841-846.
- [28] T. Kokubo. "Bioactive glass ceramics: properties and applications." *Biomaterials.* 12, (1991), pp. 155-163.
- [29] H. Takadama, T. Kokubo. "How useful is SBF in predicting in vivo bone bioactivity" *Biomaterials.* 27, (2006), pp. 2907–2915.
- [30] J. van der Valka, D. Mellor, R. Brandesc, R. Fischerd, F. Grubere y G. Gstraunthalerf. "The humane collection of fetal bovine serum and possibilities for serum-free cell and tissue culture." *Toxicol. in vitro.* 18, (2004), pp. 1–12.
- [31] Biological Industries. Technical Resources: Sterile Foetal Bovine (Calf) Serum. 2002. http://www.bioind.com/Media/Uploads/serum_info.pdf (acceso el 03-05-2007).
- [32] L. M. Grover, J. C. Knowles, G.J.P. Fleming y J.E. Barralet. "In vitro ageing of brushite calcium phosphate cement." *Biomaterials.* 24, (2003), pp. 4133–4141.
- [33] J. L. Fleisch y H. Meyer. "Determination of calcium phosphate inhibitor activity. Critical assessment of the methodology" *Miner Electrolyte Metab.* 10, (1984), pp. 249–258.
- [34] R. I. Martin, P. W. Brown "Formation of hydroxiapatite in serum" *J. Mater. Sci. - Mater. Med.* 5, (1994), pp. 96-102.
- [35] J. O'Brien, I. Wilson, T. Orton and F. Pognan. "Investigation of alamar blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity" *Eur. J. Biochem.* 267, (2000), pp. 5421-5426
- [36] O. Bretcanu, X. Chatzistavrou, K. Paraskevopoulos, R. Conradt, I. Thompson, A. R. Boccaccini. "Sintering and crystallization of 45S5 Bioglass® powder". *J. Eur. Ceram. Soc.* 29, (2009), pp. 3299–3306.
- [37] L. Lefebvre, J. Chevalier, L Gremillard, R. Zenati, G. Thollet, D. Bernache-Assolant, and A Govin. "Structural transformations of bioactive glass 45S5 with thermal treatments." *Acta Mater.* 55, (2007), pp. 3305–3313.
- [38] D.C. Clupper, L.L. Hench. "Crystallization Kinetics of Tape Cast Bioactive Glass 45S5". *J. Non-Cryst. Solids.* 318, (2003), pp. 43-48.
- [39] B. J. Díaz. "Procesamiento de espumas de vidrio 45S5 por metalurgia de polvos" Tesis de maestría, IIM, UMSNH, (2011), 64-65.

- [40] H.A. ElBatal, M.A. Azooz, E.M.A. Khalil, A. Soltan Monem, Y.M. Hamdy. "Characterization of some bioglass-ceramics" *Mater. Chem. Phys.* 80, (2003), pp. 599–609.
- [41] A. El-Ghannam, E. Hamazawy, and A. Yehia. "Effect of thermal treatment on bioactive glass microstructure, corrosion behavior, z potential, and protein adsorption" *J. Biomed. Mater. Res.*, 55, (2001), pp. 387–395.
- [42] O. Peitl, G.P. La Torre, and L.L. Hench. "Effect of crystallization on apatite-layer formation of bioactive glass 45S5" *J. Biomed. Mater. Res.* 30, (1996), pp. 509–514.
- [43] H. Ohsato, I. Maki, Y. Takeuchi. "Structure of Na₂CaSi₂O₆" *Acta Crystallogr., Sect. C: Cryst. Struct. Commun.* 41, (1985), pp. 1575–1577.
- [44] S. Ch. Wu, H. Ch. Hsu, S. H. Hsiao, W. F. Ho. "Preparation of Porous 45S5 Bioglass-derived Glass-ceramic Scaffolds by Using Rice Husk as a Porogen Additive" *J. Mater. Sci. - Mater. Med.* 20, (2009), pp. 1229–1236.
- [45] Q.Z. Chen, I.D. Thompson, A.R. Boccaccini. "45S5 Bioglass-derived Glass-Ceramic Scaffold for Bone Tissue Engineering" *Biomaterials.* 27, (2006), pp. 2414–2425.
- [46] L.L. Hench, J. Wilson. "Surface-active biomaterials". *Science.* 226, (1984), pp. 630–636.
- [47] M. Gauthier, L. P. Lefebvre, Y. Thomas, M. N. Bureau. "Production of Metallic Foams Having Open Porosity Using a Powder Metallurgy Approach". *Mater. Manuf. Processes* 19, (2004), pp. 793–811.
- [48] S. Deb, R. Mandegaran, L. Di Silvio. "A Porous Scaffold for Bone Tissue Engineering/45S5 Bioglass Derived Porous Scaffolds for Co-culturing Osteoblasts and Endothelial Cells". *J. Mater. Sci. - Mater. Med.* 21, (2009), pp. 893–905.
- [49] O. Peitl, E. D. Zanutto, L.L. Hench. "Highly bioactive P₂O₅-Na₂O-CaO-SiO₂ glass-ceramics" *J. Non-Cryst. Solids.* 292, (2001), pp. 115–126.
- [50] M. Bil, J. Ryszkowska, J. A. Roether, O. Bretcanu and A. R. Boccaccini. "Bioactivity of polyurethane-based scaffolds coated with Bioglass" *Biomed. Mater.* (2007) 93–101
- [51] I. Rehman and W. Bonfield "Characterization of hydroxyapatite and carbonated apatite by photo acoustic FTIR spectroscopy" *J. Mater. Sci. - Mater. Med.* 8, (1997), pp. 1–4.
- [52] M. Wang, L. J. Chen, J. Ni, J. Weng and C. Y. Yue. "Manufacture and evaluation of bioactive and biodegradable materials and scaffolds for tissue engineering" *The J. Mater. Sci. - Mater. Med.* 12, (2001), pp. 855–860.
- [53] Y. Liu, Q. Xiang, Y. Tan, X. Sheng. "Nucleation and growth of needlelike fluorapatite crystals in bioactive glass-ceramics". *J. Non-Cryst. Solids.* 354 (2008) pp. 938–944.
- [54] O. Bretcanu, X. Chatzistavrou, K. Paraskevopoulos, R. Conradt, I. Thompson, A. R. Boccaccini. "Sintering and crystallisation of 45S5 Bioglass® powder". *J. Eur. Ceram. Soc.* 29 (2009) pp. 3299–3306.
- [55] M. Bohner, J. Lemaitre. "Can bioactivity be tested in vitro with SBF solution?" *Biomaterials.* 30, (2009), pp. 2175–2179.
- [56] M. Vallet Regí, A. Romero, C. Ragel, R. LeGeros. "XRD, SEM-EDS, and FTIR studies of in vitro growth of an apatite-like layer on sol-gel glasses". *J Biomed Mater Res A.* 44 (1999) pp. 416–21.
- [57] D. Sanders, W. Person, L. Hench. "Quantitative analysis of glass structure with the use of infrared reflection spectra". *Applied Spectroscop.* 28 (1974) pp. 247–55.
- [58] Serra J, González P, Liste S, Serra C, Chiussi S, León B, et al. "FTIR and XPS studies of bioactive silica based glasses". *J. Non-Cryst. Solids.* 332 (2003) pp. 20–7.

- [59] M. Regina, T. Filgueiras, G. La Torre, L. Hench. "Solution effects on the surface reactions of three bioactive glass compositions". *J. Biomed. Mater. Res.*, 27 (1993) pp. 1485–93.
- [60] J. R. Jones, L. M. Ehrenfried, L. L. Hench. "Optimising bioactive glass scaffolds for bone tissue engineering". *Biomaterials* 27 (2006) pp. 964–973.
- [61] H. Arstila, E. Vedel, L. Hupa, M. Hupa. "Factors affecting crystallization of bioactive glasses". *J. Eur. Ceram. Soc.* 27 (2007) 1543.
- [62] Mourino V, Boccaccini AR. "Bone tissue engineering therapeutics: controlled drug delivery in three-dimensional scaffolds". *J. R. Soc. Interface* 7 (2010) pp. 209–227
- [63] A. R. Boccaccini, W. Stumpfe, D. M. Taplin, C. B. Ponton. "Densification crystallization of glass powder compacts during constant heating rate sintering". *Mater. Sci. Eng.*, 219 (1996) pp. 26–31.
- [64] J. R. Jones, L. M. Ehrenfried, L. L. Hench. "Optimising bioactive glass scaffolds for bone tissue engineering". *Biomaterials* 27 (2006) pp. 964–973.
- [65] A. Person, H. Bocherens, J.F. Saliege, F. Paris, V. Zeitoun, M. Gerard, "Early diagenetic evolution of bone phosphate: An X-ray diffractometry analysis", *J. Archaeol. Sci.* 22 (1995) pp. 211–221.
- [66] L.C. Gerhardt, A.R. Boccaccini, "Bioactive Glass and Glass-Ceramic Scaffolds for Bone Tissue Engineering", *Materials* (Basel). 3 (2010) pp. 3867–3910.
- [67] S. Li, J.R. De Wijn, J. Li, P. Layrolle, K. De Groot, "Macroporous biphasic calcium phosphate scaffold with high permeability/porosity ratio"., *Tissue Eng.* 9 (2003) pp. 535–48.
- [68] E. A. Botchwey, M. A. Dupree, S.R. Pollack, E.M. Levine, C.T. Laurencin, "Tissue engineered bone: Measurement of nutrient transport in three-dimensional matrices", *J. Biomed. Mater. Res. - Part A.* 67 (2003) pp. 357–367.
- [69] I. Ochoa, J. A. Sanz-Herrera, J.M. García-Aznar, M. Doblaré, D.M. Yunos, A.R. Boccaccini, "Permeability evaluation of 45S5 Bioglass-based scaffolds for bone tissue engineering"., *J. Biomech.* 42 (2009) pp. 257–266.
- [70] D. A. Shimko, V.F. Shimko, E. A. Sander, K.F. Dickson, E. A. Nauman, "Effect of porosity on the fluid flow characteristics and mechanical properties of tantalum scaffolds", *J. Biomed. Mater. Res. - Part B Appl. Biomater.* 73 (2005) pp. 315–324.
- [71] E. A Nauman, K.E. Fong, T.M. Keaveny, "Dependence of intertrabecular permeability on flow direction and anatomic site"., *Ann. Biomed. Eng.* 27 (1999) pp. 517–524.
- [72] M. Cerruti, D. Greenspan, K. Powers, Effect of pH and ionic strength on the reactivity of Bioglass 45S5. *Biomaterials.* 26 (2005) pp. 1665–1674.
- [73] S. Jebahi, H. Oudadesse, E. Wers, J. Elleuch, H. Elfekih, H. Keskes, et al., "Effect of pH and Ionic Exchange on the Reactivity of Bioglass / Chitosan Composites Used as a Bone Graft Substitute", *Int. J. Chem. Mol. Nucl. Mat. Metall. Eng.* 7, (2013) 143–148.
- [74] I. Elgayar, a. E. Aliev, a. R. Boccaccini, R.G. Hill, "Structural analysis of bioactive glasses", *J. Non. Cryst. Solids.* 351 (2005) pp. 173–183.
- [75] G. Zhao, O. Zinger, Z. Schwartz, M. Wieland, D. Landolt, B.D. Boyan, "Osteoblast-like cells are sensitive to submicron-scale surface structure", *Clin. Oral Implants Res.* 17 (2006) pp. 258–264.
- [76] J.E. Gough, I. Notingher, L.L. Hench, "Osteoblast attachment and mineralized nodule formation on rough and smooth 45S5 bioactive glass monoliths"., *J. Biomed. Mater. Res. A.* 68 (2004) pp. 640–650.

- [77] J.R. Jones, O. Tsigkou, E.E. Coates, M.M. Stevens, J.M. Polak, L.L. Hench, “Extracellular matrix formation and mineralization on a phosphate-free porous bioactive glass scaffold using primary human osteoblast (HOB) cells”., *Biomaterials*. 28 (2007) pp. 1653–63.
- [78] I.A. Silver, J. Deas, M. Ercin, “Interactions of bioactive glasses with osteoblasts in vitro: effects of 45S5 Bioglass, and 58S and 77S bioactive glasses on metabolism, intracellular ion concentrations and cell viability”, *Biomaterials* 22 (2001) pp. 175–185.