

UNIVERSIDAD MIGUEL HERNÁNDEZ DE ELCHE
ESCUELA POLITÉCNICA SUPERIOR DE ELCHE
GRADO EN INGENIERÍA MECÁNICA



"SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE
ANDAMIOS DE FASE A PARA SU
APLICACIÓN EN INGENIERÍA TISULAR"

TRABAJO FIN DE GRADO

Diciembre – 2020

AUTORA: Paula Mollá Santamaría

DIRECTORA: Patricia Mazón Canales

AGRADECIMIENTOS

A mi familia por su apoyo incondicional a lo largo de esta etapa.

A mis amigos por motivarme en todo momento.

Y, por supuesto, a mi tutora Patricia Mazón por guiarme en esta recta final.

Muchas gracias.



ÍNDICE

RESUMEN	10
ABSTRACT	11
1. INTRODUCCIÓN	12
1.1. BIOMATERIALES	15
1.2. DIAGRAMAS DE EQUILIBRIO	16
1.2.1. FASE A	19
1.3. MÉTODO DE RÉPLICA DE ESPONJA POLIMÉRICA	20
1.4. BIOACTIVIDAD	20
2. OBJETIVO	22
3. MÉTODOS Y TÉCNICAS EXPERIMENTALES	23
3.1. TÉCNICAS DE SÍNTESIS Y PROCESAMIENTO	23
3.1.1. HOMOGENEIZACIÓN	23
3.1.2. PRENSADO ISOSTÁTICO	23
3.1.3. MÉTODO ESTÁTICO DE TEMPLADO	24
3.1.4. MOLIENDA CON MOLINO VIBRATORIO Y PLANETARIO	25
3.1.5. HOMOGENEIZACIÓN POR ULTRASONIDOS	27
3.1.6. MÉTODO DE RÉPLICA DE ESPONJA POLIMÉRICA	28
3.2. TÉCNICAS DE CARACTERIZACIÓN	29
3.2.1. DIFRACCIÓN DE RAYOS X (DRX)	29
3.2.2. CARACTERIZACIÓN FÍSICA DEL TAMAÑO DE PARTÍCULA	31

3.2.3. MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO (MEB) Y ESPECTROSCOPIA DE DISPERSIÓN DE RAYOS X (EDX)	32
3.2.4. POROSIMETRÍA DE MERCURIO	33
3.2.5. ESPECTROSCOPIA INFRARROJA POR TRASFORMADA DE FOURIER (IRTF-RTA)	34
3.2.6. ESTUDIO DE BIOACTIVIDAD <i>IN VITRO</i> EN SFA	36
3.2.7. ESPECTROMETRÍA DE EMISIÓN ÓPTICA DE PLASMA ACOPLADO INDUCTIVAMENTE (EEO-PAI).....	38
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	40
4.1. SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE FASE A	40
4.2. DISEÑO Y CARACTERIZACIÓN DE CERÁMICAS POROSAS	44
4.3. EVALUACIÓN DE LA BIOACTIVIDAD <i>IN VITRO</i>	51
5. CONCLUSIONES	56
6. TRABAJOS FUTUROS.....	58
7. BIBLIOGRAFÍA	59

ÍNDICE DE FIGURAS

<i>Figura 1: Anatomía del hueso, hueso compacto y esponjoso</i>	12
<i>Figura 2: Fases del proceso de remodelación ósea</i>	13
<i>Figura 3: Diagrama de fases Ca_2SiO_4-$Ca_3(PO_4)_2$ propuesto por Fix y col. en 1969 [23]</i>	18
<i>Figura 4: Prensa isostática de ASTUR SINTER, SL y bomba manual P-2282 de ENERPAC</i>	164
<i>Figura 5: Horno de alta temperatura ENTECH, referencia EEF 1/17</i>	25
<i>Figura 6: Molino vibratorio MM301 de Retsch</i>	26
<i>Figura 7: Molino de bolas PM100 de Retsch</i>	27
<i>Figura 8: Homogeneizador por ultrasonidos modelo CY-500 de COMECTA SA</i>	28
<i>Figura 9: (A) Principio de funcionamiento de un difractómetro; (B) Difractómetro de rayos X Bruker AXS D8 Advance (Karksruhe, Germany)</i>	30
<i>Figura 10: Laser de difracción Mastersizer 2000E device-Malvern</i>	31
<i>Figura 11: Microscopio electrónico de barrido (SEM-Hitachi S-3500N, Ibaraki, Japan); Microanálisis de energía dispersa de rayos-X (EDS; Oxford Link Analitical)</i>	33
<i>Figura 12: Poremaster-60 GT de Quantachrome Instruments</i>	34
<i>Figura 13: Espectrómetro THERMO SCIENTIFIC Nicolet iS5</i>	35
<i>Figura 14: Montaje experimental para el ensayo in vitro en SFA de las esponjas cerámicas en el laboratorio</i>	37
<i>Figura 15: Espectrómetro de emisión óptica PerkinElmer Optima 2000™ DV</i>	39
<i>Figura 16: Tratamiento térmico Fase A</i>	41

<i>Figura 17: Patrón de difracción de rayos X de la fase A obtenida. El (*) corresponde a la ficha JCPDS n°11-0676 de la Fase A.....</i>	42
<i>Figura 18: Distribución del tamaño de partícula del polvo cerámico de Fase A.....</i>	43
<i>Figura 19: DRX Fase A a los diferentes tiempos de molienda</i>	43
<i>Figura 20: Tratamientos térmicos andamios de Fase A</i>	44
<i>Figura 21: (A) esponjas poliméricas recubiertas por la suspensión cerámica antes del tratamiento térmico de sinterizado y (B) después del sinterizado</i>	44
<i>Figura 22: Patrón de difracción de rayos X de los andamios (curva roja) y patrón de difracción del polvo cerámico de partida para su comparación (curva naranja). El (*) corresponde a la ficha JCPDS n°11-0676 de la Fase A.....</i>	46
<i>Figura 23: Imágenes ópticas del andamio de Fase A después del tratamiento térmico...46</i>	
<i>Figura 24: Imágenes MEB de andamios:(A) macroporosidad, (B) detalle de puentes, (C) defecto triangular y grietas y (D) detalle de microporosidad.....</i>	47
<i>Figura 25: Curvas de intrusión de mercurio en andamios medidas por porosimetría de mercurio de la esponja de Fase A (curva roja) y de la Fase A densa (curva naranja): (A) volumen intrusivo acumulado vs diámetro de poro; (B) volumen intrusivo diferencial vs diámetro de poro</i>	49
<i>Figura 26: Espectros IRTF-RTA de la esponja de Fase A y la Fase A densa</i>	50
<i>Figura 27: Imágenes MEB de morfología de la superficie del andamio de Fase A después de una inmersión en SFA durante (A) 1h, (B) 3h y (C) 6 h.....</i>	52
<i>Figura 28: Imágenes MEB de morfología de la superficie del andamio de Fase A después de una inmersión en SFA durante (A) 1 día y (B) 3 días</i>	52
<i>Figura 29: Imágenes MEB de morfología de la superficie del andamio de Fase A después de una inmersión en SFA durante (A) 5 días y (B) 7 días</i>	54

Figura 30: Variación en las concentraciones de los iones de Calcio, Silicio y Fósforo del SFA según el tiempo de inmersión de la muestra..... 55

ÍNDICE DE TABLAS

1. Tabla 1: Comparación entre la concentración de iones del plasma sanguíneo y del SFA 36

2. Tabla 2: Orden de adición de los reactivos y cantidades para la preparación del SFA 37





RESUMEN

Hoy en día, uno de los grandes problemas a los que se enfrenta la biomedicina es el crecimiento de enfermedades asociadas a problemas óseos, relacionadas en parte con el aumento significativo de la esperanza de vida. En las últimas décadas, se ha centrado la atención en la investigación de nuevos biomateriales capaces de regenerar y reparar los tejidos óseos dañados para mejorar la salud y calidad de vida a todas aquellas personas que sufren patologías óseas.

En el presente estudio se han desarrollado matrices tridimensionales porosas por el método de réplica de esponja polimérica. La biocerámica monofásica que se empleó fue la Fase A de Nurse ($7\text{CaO}\cdot\text{P}_2\text{O}_5\cdot 2\text{SiO}_2$) dentro del sistema Silicato dicálcico ($\text{Ca}_2\text{SiO}_4 - \text{C}_2\text{S}$) - Fosfato tricálcico ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ - TCP) debido a su creciente interés en la ingeniería de tejidos dada su buena biocompatibilidad y osteoconductividad. Los andamios obtenidos se caracterizaron mineralógicamente por Difracción de rayos X (DRX) y microestructuralmente mediante Microscopía Electrónica de Barrido equipada con Espectroscopía de Dispersión de rayos X (MEB-EDX). Posteriormente, se determinó la microporosidad a través del análisis de porosimetría de mercurio y se identificaron los grupos funcionales presentes en la muestra gracias a la Espectroscopía Infrarroja por Transformada de Fourier (IRTF). Finalmente, se comprobó la bioactividad del biomaterial para actuar como sustituto óseo, realizando un ensayo *in vitro* en Suero Fisiológico Artificial (SFA) mediante inmersión en diferentes periodos de tiempo, tras los cuales se llevó a cabo la caracterización de la superficie por MEB-EDX y el análisis por Espectrometría de Emisión Óptica de Plasma Acoplado Inductivamente (EEO-PAI).

ABSTRACT

Nowadays, one of the main problems facing biomedicine is the increase in diseases associated with bone issues, due to the significant increase in life expectancy. In last decades, attention has been focused on researching new biomaterials able to regenerate and repair damaged bone tissues to offer health and quality of life improvement to all those who suffer from bone pathologies.

In this study, porous three-dimensional matrices have been developed by the polymeric sponge replica method. The monophasic bioceramic used was Nurse Phase A ($7\text{CaO} \cdot \text{P}_2\text{O}_5 \cdot 2\text{SiO}_2$) within Dicalcium Silicate ($\text{Ca}_2\text{SiO}_4 - \text{C}_2\text{S}$) - Tricalcium Phosphate ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2 - \text{TCP}$) system due to its growing interest in tissue engineering given its good biocompatibility and osteoconductivity. The scaffolds obtained were characterized mineralogically by X-ray Diffraction (XRD) and their microstructure by means of Scanning Electron Microscopy fitted with Energy Dispersive X-Ray Spectroscopy (SEM-EDS). Subsequently, the microporosity was determined through the mercury porosimetry analysis and the functional groups present in the sample were identified by the Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR). Finally, in order to check bioactivity of the biomaterial, *in vitro* test on Simulated Body Fluid (SBF) was performed by immersion in different periods of time, after which the characterization of the surface was carried out by SEM-EDS and Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry (ICP-OES) analysis.

1. INTRODUCCIÓN

El aumento de la esperanza de vida durante las últimas décadas, especialmente, en los países más desarrollados, ha incrementado el número de personas de edad avanzada, mayores de 65 años. Según el INE (Instituto Nacional de Estadística) se estima que este porcentaje del total de la población podría llegar a ser del 29,4% en el año 2068 [1].

La longevidad influye en el perfil de las patologías existentes, ya que el envejecimiento natural del organismo puede afectar al funcionamiento y a la calidad de vida de la persona. Como ejemplo de lo expuesto anteriormente, se encuentra una gran prevalencia de las enfermedades musculoesqueléticas, como la osteoporosis, artritis, fracturas osteoporóticas y metástasis óseas [2].

El hueso es el componente principal del sistema esquelético, es un tejido conectivo calcificado que tiene funciones tan imprescindibles como la de proteger los órganos vitales, hacer de sostén para la movilidad corporal, almacenar sales, y albergar la médula ósea roja, encargada de producir las células sanguíneas [3,4].

Existen dos tipos de hueso, el hueso compacto y el esponjoso (Figura 1). La mayor rigidez y soporte lo provee el hueso compacto, formando una capa delgada superficial (hueso cortical). El hueso cortical cubre al núcleo poroso (hueso esponjoso o trabecular). El hueso esponjoso destaca por sus cavidades trabeculares en las que se encuentra la médula ósea roja, lo que da lugar a un tejido óseo poroso y vascularizado.

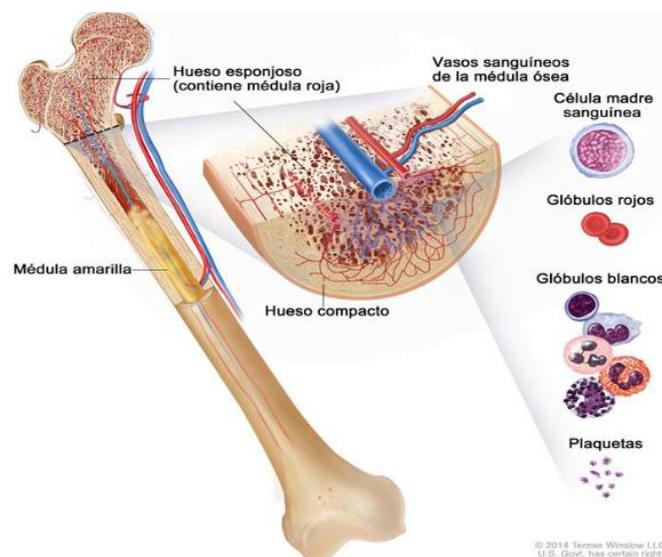


Figura 1: Anatomía del hueso, hueso compacto y esponjoso.

Además de las funciones puramente mecánicas, el tejido óseo tiene la notable capacidad de regenerarse a sí mismo, por lo que el hueso está sometido a un proceso constante de renovación. Este proceso equilibrado se conoce como remodelación ósea, y se lleva a cabo mediante ciclos de resorción o destrucción ósea y formación de hueso nuevo, el cual es posible gracias a las acciones coordinadas de las células principales que componen la estructura ósea (Figura 2).

La estructura ósea está compuesta principalmente por tres tipos de células: osteoclastos, osteoblastos y osteocitos. La remodelación ósea comienza con la resorción ósea, donde intervienen los osteoclastos, células multinucleadas que se adhieren a la superficie ósea y son capaces de reabsorber una determinada cantidad de la misma. Una vez cesa la reabsorción ósea, hay un periodo de transición de la resorción a la formación de hueso. Posteriormente, las células responsables de la formación de osteoide o matriz ósea, llamadas osteoblastos, se ubican en la superficie del hueso. Cuando la matriz ósea está formada, se depositan sobre ésta los cristales de hidroxapatita que promueven su mineralización hasta rellenar los huecos previamente creados y completarse la remodelación ósea. En consecuencia, los osteoblastos se quedan atrapados dentro de la misma y se transforman en osteocitos. Los osteocitos son las células óseas más abundantes y se encargan de mantener vivo el tejido óseo.

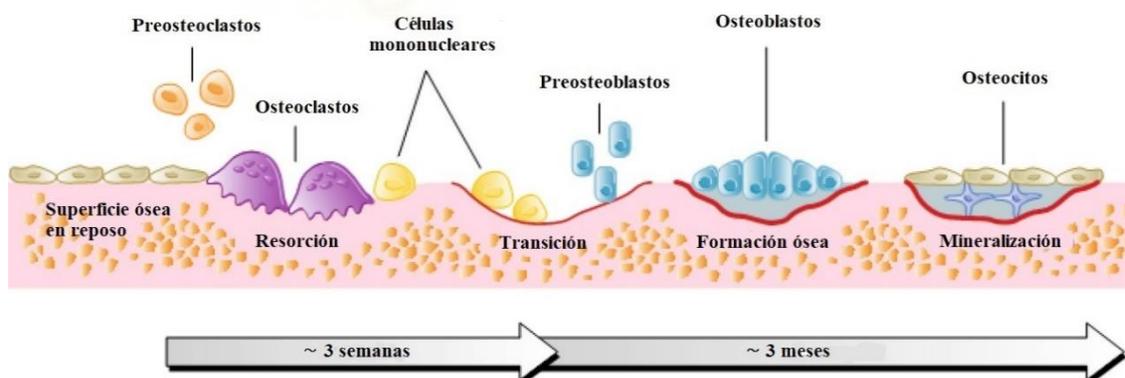


Figura 2: Fases del proceso de remodelación ósea.

El continuo proceso de remodelado proporciona a la estructura ósea la capacidad para regenerarse y adaptarse constantemente a las necesidades mecánicas. Sin embargo, el envejecimiento produce una alteración en la remodelación ósea, aumentando el proceso de reabsorción y disminuyendo el de formación, lo que provoca una pérdida ósea significativa que ocasiona con frecuencia osteoporosis [4].

La patología ósea más frecuente en los seres humanos es la osteoporosis. Se caracteriza por la pérdida de densidad de masa ósea y el deterioro de la microarquitectura del tejido óseo [5,6]. En concreto, en España, aproximadamente 2,8 millones de personas padecen osteoporosis, principalmente mujeres, en base a los datos registrados en el estudio “Huesos rotos, vidas rotas: guía para afrontar la crisis de fracturas por fragilidad en España”, de la International Osteoporosis Foundation (IOF) [7].

Tradicionalmente, los defectos óseos han sido tratados implantando injertos autólogos, alogénicos y xenólogos. El trasplante más utilizado ha sido el autoinjerto, que requiere una donación de tejido del propio paciente. El injerto alogénico requiere de dos sujetos genéticamente diferentes de la misma especie. Por último, el trasplante xenólogo es aquel en el que el tejido óseo es obtenido de otra especie. No obstante, los métodos mencionados conllevan una serie de inconvenientes, como es la escasez de donantes, los posibles rechazos y transmisión de enfermedades.

Para paliar este tipo de limitaciones, nace la ingeniería de tejidos, que se define como “una ciencia interdisciplinar que combina las aplicaciones de la ingeniería, del diseño y el desarrollo de implantes biomiméticos (capaces de imitar ciertos aspectos biológicos de la matriz ósea) para reparar los huesos y guiar su regeneración hasta el completo restablecimiento de su funcionalidad”. En ella se combina el uso de células, matrices tridimensionales y moléculas bioactivas, evitando así la necesidad de utilizar injertos óseos. Esta combinación es conocida como triada de la ingeniería tisular. Por todo ello, una parte esencial de la ingeniería tisular es el desarrollo de nuevos biomateriales destinados a la elaboración de andamios [8,9].

Actualmente, de acuerdo con la definición proporcionada por D. F. Williams "un biomaterial es una sustancia que ha sido diseñada para tomar una forma que, sola o como parte de un sistema complejo, se utiliza para dirigir, mediante el control de interacciones con componentes de sistemas vivos, el curso de cualquier procedimiento terapéutico o diagnóstico, en humanos o medicina veterinaria" [10].

El andamio es una matriz tridimensional porosa que sirve de apoyo para la adhesión, proliferación y migración celular, además de proporcionar el ambiente y la arquitectura para la regeneración de tejido óseo [9], por lo que se deben tener en consideración una serie de requisitos. En primer lugar, existe la necesidad de que el andamio sea poroso para

favorecer así la proliferación y la diferenciación de las células con el fin de permitir la generación de tejido nuevo. Asimismo, debe presentar poros abiertos e interconectados, necesarios para la difusión de nutrientes, la vascularización y el crecimiento óseo. El andamio ideal también debe tener la capacidad de degradarse de manera controlada, ya que lo que se pretende es que se produzca la formación de tejido nuevo y se adhiera a la estructura del andamio, así como los productos de degradación generados, presentar baja toxicidad y biocompatibilidad [11].

Han sido varios los métodos empleados para producir andamios cerámicos con el fin de regenerar tejidos, entre ellos, destaca el uso de porógenos [12], técnicas de impresión 3D [13] o réplica de esponja polimérica [14].

1.1. BIOMATERIALES

A lo largo de la historia existen numerosas referencias a materiales usados en el campo de la medicina. Sorprendentemente, ya en el antiguo Egipto y en las civilizaciones clásicas griega y romana se empleaban materiales como metales y otros productos naturales para reparar el tejido dañado. Concretamente, en el siglo XVI, en Europa se empezaron a realizar reparaciones óseas con metales nobles como oro y plata. Sin embargo, no fue hasta después de la Segunda Guerra Mundial cuando se produjo un gran avance en las prótesis e implantes óseos.

Los progresos en medicina como la aparición de técnicas asépticas quirúrgicas, la pasteurización y el descubrimiento de los rayos X hicieron posible la proliferación del uso de biomateriales [15].

Una gran variedad de materiales se ha utilizado para el reemplazo y la reparación de tejidos dañados. Estos materiales incluyen metales, cerámicas y polímeros, tanto naturales como sintéticos, y sus combinaciones. Pero son las biocerámicas las que han causado un especial interés en la ingeniería tisular, debido a su fácil producción, buena biocompatibilidad y osteoconductividad (capacidad de proporcionar soporte estructural para la formación y crecimiento de hueso nuevo), junto con su estrecha similitud con el componente mineral óseo y excelente bioactividad [16].

Un avance en las biocerámicas fue la incorporación de Silicio, elemento esencial en los procesos de mineralización del hueso, con el fin de mejorar su bioactividad. En la década de 1970, por primera vez, puede verse el papel esencial que juega el Silicio en el desarrollo esquelético, cuando Carlisle lo encuentra en las áreas activas del hueso joven y forma parte en la etapa temprana de la calcificación ósea [17-19]. En consecuencia, los materiales que contienen Silicio, Calcio y Fósforo son excelentes candidatos para preparar biomateriales con propiedades osteogénicas mejoradas.

Atendiendo a su evolución, los biomateriales se pueden clasificar en tres generaciones. Cada generación presenta unos requisitos y unas propiedades de los materiales. La primera generación comienza a partir del descubrimiento de la biocompatibilidad de los biomateriales con el ser humano. Esta generación tiene como único requisito, sustituir el tejido óseo dañado, para ello los materiales deberán ser inertes, no interaccionando con el tejido receptor. Los materiales de segunda generación tienen la función de reparar el tejido dañado. Son materiales capaces de interactuar con el entorno biológico, bien a través de una unión química entre el material y el hueso, o bien siendo sustituidos por el hueso circulante mientras se produce la degradación progresiva del material. Para ello, deben ser bioactivos o biodegradables, químicamente estables, poseer propiedades mecánicas como la resistencia mecánica y a fatiga, y también tener una densidad y peso adecuados.

Actualmente, la ingeniería de tejidos tiene como función principal regenerar el tejido afectado, adentrándonos así en la tercera generación de biomateriales. En esta etapa, se busca que los materiales sean capaces de estimular respuestas celulares específicas a nivel molecular, además de ser bioactivos y biodegradables. El objetivo es desarrollar matrices tridimensionales porosas teniendo en cuenta que deben actuar como soporte, a la vez que se produce una unión química con el hueso y son reemplazadas por el tejido óseo nuevo, permitiendo así la regeneración [20].

1.2. DIAGRAMAS DE EQUILIBRIO

En las últimas décadas, la tecnología y la ciencia de los materiales ha sufrido un notable crecimiento gracias a la utilización de los diagramas de fase como fuente para el desarrollo de nuevos biomateriales.

Un diagrama de fases representa de manera gráfica las relaciones de temperatura (o presión) y composición química, correspondientes a las fases, o combinación de fases, que existen en condiciones de equilibrio termodinámico. Estas condiciones de equilibrio entre fases se rigen por la ley de Gibbs, que determina las fases estables que coexisten en un sistema de composición y temperatura específicos [21].

La importancia de los diagramas de fases radica en las distintas microestructuras que se originan a partir de las transformaciones de fases que se producen al variar la temperatura.

El sistema binario Silicato dicálcico (Ca_2SiO_4 - C_2S) - Fosfato tricálcico ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ - TCP) fue estudiado por primera vez en 1959 por Nurse y col. [22]. En dicho estudio se identificaron dos compuestos intermedios estables a temperatura ambiente: la Fase A de Nurse ($7\text{CaO} \cdot \text{P}_2\text{O}_5 \cdot 2\text{SiO}_2$) y la Silicocarnotita ($5\text{CaO} \cdot \text{P}_2\text{O}_5 \cdot \text{SiO}_2$). Además, se encontró por debajo de la zona de líquido, una solución sólida continua a alta temperatura para cualquier proporción dada de $\text{C}_2\text{S}/\text{TCP}$ denominada Fase R ($\text{R}_{\text{ss}} = \alpha\text{C}_2\text{S} - \alpha' - \text{TCP}$).

Posteriormente, este diagrama de fases fue estudiado y revisado por Fix y col. (Figura 3) en 1969 [23], incluyendo modificaciones importantes en cuanto a la extensión de varios campos de solución sólida. Por un lado, la Fase A_{ss} experimenta fusión congruente en vez de incongruente, el campo de la Silicocarnotita es más estrecho que como se había descrito anteriormente y también se modificó el punto eutectoide del subsistema Silicocarnotita-TCP. Por otro lado, se determina el campo metaestable a temperatura ambiente de la solución sólida $(\alpha\text{C}_2\text{S} - \alpha'\text{TCP})_{\text{ss}}$ conocido como R, el cual produce un cambio notable en el diagrama propuesto por Nurse.

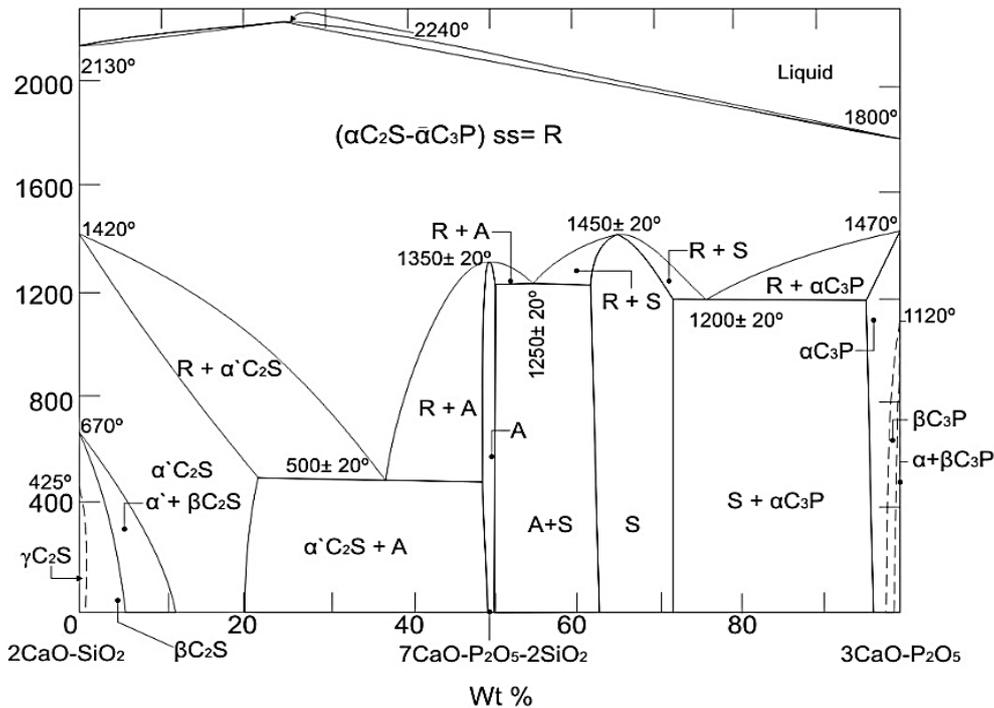


Figura 3: Diagrama de fases Ca_2SiO_4 - $Ca_3(PO_4)_2$ propuesto por Fix y col. en 1969 [23].

Recientemente, el diagrama de fases C_2S -TCP ha sido revisado y modificado por Rubio y col. [24], por Martínez y col. [25] y por Ros-Tárraga y col. [26] en nuestro grupo de trabajo, en el Instituto de Bioingeniería de la Universidad Miguel Hernández (IB-UMH). En dichos estudios, el diagrama ha sufrido modificaciones en los tres puntos eutéctoides invariantes presentes en los subsistemas Fase A-Silicocarnotita, C_2S -Fase A y Silicocarnotita-TCP.

El TCP es uno de los biomateriales para implantes óseos más importante entre los compuestos de fosfato de calcio, debido su composición química similar al hueso. Cuando se emplea TCP en la regeneración ósea, es no tóxico, antigénicamente inactivo, no cancerígeno y proporciona una adhesión directa al hueso huésped sin participación de tejido conectivo. Asimismo, ha recibido un creciente interés como material de implante óseo dada su gran biocompatibilidad y osteoconductividad. Esta cerámica presenta tres formas polimórficas β , α y α' dependiendo de la temperatura, de las cuales, todas se emplean como biomateriales excepto el α' -TCP, debido a que no puede mantenerse estable a temperatura ambiente [27].

Por otra parte, el C_2S también ha sido empleado como biomaterial debido a su bioactividad al entrar en contacto con el hueso vivo. Además, el C_2S presenta buenas

propiedades mecánicas y una gran biocompatibilidad, por esto se considera un potencial sustituto óseo [28,29].

Las fases intermedias presentes en el diagrama son la Silicocarnotita y la Fase A. La Silicocarnotita es un silicofosfato de calcio con estructura de carnotita, aunque algunos autores indican que su estructura es más parecida a la del hidroxiapatito (HA) debido a la pérdida de todo el -OH de la red de HA y su sustitución por silicato (SiO_4), considerando de esta forma a la Silicocarnotita como una mezcla de una apatita deshidratada sustituida con silicio y oxiapatita [25]. Este biomaterial ha despertado gran interés en la reparación ósea.

La otra fase intermedia, comúnmente conocida como Fase A de Nurse presenta un gran potencial en la ingeniería de tejidos como sustituto o andamio para implantes óseos gracias a su biocompatibilidad, osteoconductividad, bioactividad, reabsorción parcial y estimulación en la regeneración ósea [30,31].

1.2.1. FASE A

La Fase A pertenece al grupo de compuestos ABXO_4 , los cuales han cobrado una notable importancia desde la década de 1930 con el estudio pionero de Bredig [32]. La cerámica monofásica, Fase A, es una solución sólida correspondiente a la composición $7\text{CaO} \cdot \text{P}_2\text{O}_5 \cdot 2\text{SiO}_2$. La misma composición química se puede encontrar en el mineral llamado Nagelschmedita, además de la misma estructura a alta temperatura $\alpha\text{C}_2\text{S}$ - α' TCP. Por lo tanto, al poder ser confundidas fácilmente, el rango de $(\alpha\text{C}_2\text{S}$ - α' TCP)_{ss} también se acoge al término Fase R [22]. La transformación de la Fase R a la Fase A ocurre a $1350^\circ\text{C} \pm 20^\circ\text{C}$, con un campo de cristalización muy pequeño, entre el 47,39% y el 49,96% en peso de TCP [30]. Estudios recientes del diagrama de fases C_2S -TCP han demostrado que la transformación tiene lugar concretamente a 47,39% en peso de TCP y 52,61% en peso de C_2S [26].

1.3. MÉTODO DE RÉPLICA DE ESPONJA POLIMÉRICA

Una de las técnicas más utilizadas para la producción de cerámicos porosos es el método de réplica o llamado también método de la esponja polimérica, patentado por Schwartzwalder y Somers en 1963 [33].

Este método consiste en la impregnación de una esponja polimérica con estructura de poros abiertos mediante inmersión en una suspensión cerámica. Una vez se elimina el exceso de suspensión ya sea por compresión, centrifugación u otro método, se deja secar. Posteriormente, se somete a la esponja a un tratamiento térmico, que llevará a la eliminación del polímero y la sinterización del cerámico. De esta manera, proporciona una estructura reticulada de poros abiertos, imitando la arquitectura trabecular del hueso esponjoso, cumpliendo así con el objetivo de la ingeniería tisular.

La técnica de la esponja polimérica es un método simple y flexible, ya que es aplicable a cualquier material cerámico que tenga una capacidad de dispersión adecuada. Además, se puede controlar fácilmente el tamaño de poro al poder escoger la plantilla de la esponja que deseemos, así como cortarla y adaptar su forma a la que consideremos adecuada [34].

1.4. BIOACTIVIDAD

El éxito de la regeneración ósea depende en gran medida de que los andamios implantados en el huésped sean capaces de interactuar con el hueso que los rodea.

En el siglo pasado, a finales de los años 80 y principios de los 90, Kokubo y col. determinaron que para que un material se una al hueso vivo debe ser capaz de formar una capa de apatita sobre su superficie cuando sea implantado en el cuerpo humano [35]. Propusieron también que la formación de apatita podría reproducirse en una disolución que imitase la composición química del componente inorgánico del plasma sanguíneo humano, suero fisiológico artificial (SFA). Es decir, el grado de bioactividad de un material se puede prever sabiendo el grado de capacidad de la apatita para formarse en su superficie en SFA. Por esa razón, elaboraron un método para predecir la bioactividad de los materiales, el cual consiste en la inmersión de las muestras en SFA durante el tiempo suficiente para conseguir la formación de hidroxiapatita o de otro fosfato de calcio en la

superficie de estas [36,37]. Esta técnica se caracteriza por ser flexible, contar con tecnología simple y por no necesitar de instalaciones especiales para llevarse a cabo.

Este descubrimiento tuvo un gran impacto a nivel internacional, es por ello que se realizaron posteriores investigaciones para perfeccionar la elaboración de SFA. De hecho, en 1991, Kokubo tuvo que corregir el SFA original ya que no disponía de iones SO_4^{2-} contenidos en el plasma sanguíneo humano [38,39]. No obstante, fue en 2003 cuando el Comité Técnico ISO/TC150 de la Organización Internacional de Normalización propuso el SFA convencional con una preparación detallada como medio para ensayos *in vitro* para establecer la bioactividad de los materiales de implante.

Diversos estudios manifiestan que cuando se implanta una cerámica bioactiva en el hueso primeramente se forma una capa de apatita en la superficie de la cerámica y, más adelante, la matriz ósea se integra en la apatita. La apatita formada activa las proteínas y las células de señalización para iniciar una serie de procesos (fijación, proliferación y diferenciación), hasta conseguir que el tejido óseo circundante pueda adherirse a la apatita superficial. Por consiguiente, se forma un enlace químico entre el material y el hueso vivo a través de la capa de apatita, lo que finalmente conduce a la formación de hueso [40].

2. OBJETIVO

En el Instituto de Bioingeniería de la UMH, dentro del área de Biomateriales, se han desarrollado diferentes biomateriales densos consiguiendo propiedades óptimas para la regeneración ósea. Si bien, se podría contribuir a una mejor vascularización y con ello favorecer la formación de tejido óseo nuevo, buscando una mejora mediante la elaboración de andamios.

El presente TFG tiene como objeto principal desarrollar matrices tridimensionales porosas de cerámica, con una composición correspondiente a la Fase A para su aplicación en ingeniería tisular. Para alcanzar dicho objetivo principal se abordarán los siguientes objetivos específicos:

- ✓ Síntesis de la cerámica monofásica, Fase A, con composición $7\text{CaO} \cdot \text{P}_2\text{O}_5 \cdot 2\text{SiO}_2$, presente en el diagrama de equilibrio de fases del sistema $\text{Ca}_2\text{SiO}_4\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ como fase intermedia, y su caracterización mineralógica mediante DRX.
- ✓ Estudio del tamaño óptimo de partícula del material en polvo obtenido para facilitar la preparación del andamio a partir del método de réplica de esponja polimérica.
- ✓ Preparación de los andamios cerámicos y estudio del tratamiento térmico apropiado para su sinterizado.
- ✓ Caracterización de las estructuras porosas, desde un punto de vista mineralógico y microestructural a través del DRX, la microscopía óptica y el MEB-EDX. Evaluación de la microporosidad de los andamios mediante porosimetría de Hg y su caracterización química por medio de IRTF.
- ✓ Estudio de la bioactividad del andamio de Fase A *in vitro* a través de la inmersión en SFA, incluyendo un análisis por EEO-PAI del suero.

3. MÉTODOS Y TÉCNICAS EXPERIMENTALES

3.1. TÉCNICAS DE SÍNTESIS Y PROCESAMIENTO

3.1.1. HOMOGENEIZACIÓN

Esta técnica consiste en mezclar los reactivos utilizados en estado sólido, en nuestro caso, para la elaboración de la Fase A, introduciéndolos en una cápsula de porcelana. Empleando acetona y una varilla de vidrio, se mezcla hasta conseguir una adecuada homogeneidad y posteriormente, se coloca la cápsula en la estufa para lograr que la acetona se evapore. Este procedimiento se realizó tres veces, para garantizar una buena homogenización.

3.1.2. PRENSADO ISOSTÁTICO

Una vez homogenizada la muestra, se introduce en gomas de látex (marca Rusch) con la ayuda de un embudo para compactar el material antes de llevar a cabo el prensado. A la hora de realizar el embutido se utilizan dos gomas, se coloca la segunda goma por seguridad, evitando así cualquier contacto entre el material y el aceite de la prensa. La prensa cuenta con una bomba que aumenta la presión de aceite en su interior, compactando el material bajo presión isostática, es decir, de manera uniforme en todas las direcciones.

La prensa isostática en frío empleada fue de ASTUR SINTER, SL con una bomba manual de ultra alta presión P-2282 de ENERPAC (Figura 4). Las muestras fueron sometidas a una presión máxima de 200 MPa durante un periodo de 20 minutos.



Figura 4: Prensa isostática de ASTUR SINTER, SL y bomba manual P-2282 de ENERPAC.

3.1.3. MÉTODO ESTÁTICO DE TEMPLADO

Todos los tratamientos térmicos han sido realizados mediante un horno de alta temperatura de tipo vertical de ENTECH con referencia EEF 1/17 (Figura 5), tanto el tratamiento térmico para la homogenización del material una vez prensado como los de sinterizado.

La temperatura máxima que se alcanza en estos modelos de horno es de 1650°C, debido a que tienen elementos calefactores de siliciuro de molibdeno. Además, presenta un panel digital (JUMO IMAGO 500) que posibilita la programación de los tratamientos, controlando la temperatura y los tiempos.



Figura 5: Horno de alta temperatura ENTECH, referencia EEF 1/17.

3.1.4. MOLIENDA CON MOLINO VIBRATORIO Y PLANETARIO

El proceso de molienda con molino vibratorio se realizó para reducir el tamaño de partícula de la muestra. Para ello, primero, se utilizó un mortero de ágata y más tarde, la muestra se molió con alcohol isopropílico en un molino mezclador, modelo MM301 de RETSCH (Figura 6), utilizando como medio de molienda, bolas de circonio PSZ de 20 mm de diámetro.

La molienda es posible debido a las vibraciones que se producen en los recipientes que se encuentran en posición horizontal. Estos realizan un movimiento en forma de arco circular provocando que las bolas en su interior choquen por inercia contra el material, las paredes del recipiente y también entre ellas, produciéndose choques con fricción. Por lo tanto, los principios de molienda son el impacto y la fricción.

Además, el molino permite ajustar la frecuencia de vibración y la duración de la molienda. En nuestro caso, se reguló con una frecuencia de 15 Hz durante 3 minutos.



Figura 6: Molino vibratorio MM301 de Retsch.

Para conseguir una mayor reducción en el tamaño final de partícula se llevó a cabo una molienda adicional en un molino planetario, modelo PM100 de RETSCH (Figura 7), usando bolas de circonio PSZ de 20 mm, cubetas de 50 ml y alcohol isopropílico para la molienda en húmedo.

En los molinos planetarios de bolas el recipiente de molienda gira sobre su propio eje y alrededor del eje de la rueda principal en dirección contraria a la misma. Esto hace que las bolas se muevan generando una gran energía de trituración. El alto grado de trituración se debe a la gran interacción entre las fuerzas de choque y fricción, provocadas por la diferencia de velocidad entre las bolas y los recipientes. Así, los molinos planetarios pueden alcanzar granulometrías muy finas en tiempos muy cortos de molienda.

El molino planetario cuenta con un sistema de control que permite ajustar la velocidad, el tiempo de molienda, la entrada de energía, el cambio de dirección y los intervalos de tiempo [41].

En el presente estudio, se estudiaron distintos tiempos de molienda, desde 30 minutos a 4 horas, buscando la distribución de tamaños de partícula más apropiada.



Figura 7: Molino de bolas planetario PM100 de Retsch.

3.1.5. HOMOGENEIZACIÓN POR ULTRASONIDOS

El proceso de homogeneización por ultrasonidos se empleó en la suspensión cerámica con el objetivo de romper los aglomerados y dispersarlos en partículas individuales.

Para llevar a cabo la desaglomeración y dispersión de las partículas, se deben vencer las fuerzas de atracción entre las partículas, como las fuerzas de Van der Waals y fuerzas de tensión superficial, generando notables fuerzas de cizalladura, mediante la cavitación ultrasónica. Para ello se utilizó un homogeneizador por ultrasonidos modelo CY-500 de COMECTA SA (Figura 8).

Este equipo está compuesto por la unidad de control y potencia (generador) y por el transductor por ultrasonidos.



Figura 8: Homogeneizador por ultrasonidos modelo CY-500 de COMECTA SA.

En cuanto a su funcionamiento, el generador de ultrasonidos transforma la corriente eléctrica de 220V/50Hz en energía ultrasónica de 20KHz, alimentando al transductor ultrasónico. Este transductor proporciona una deformación elástica siguiendo la corriente alterna, que se traduce en una vibración mecánica longitudinal produciendo un efecto de cavitación en la sonda inmersa en la solución. Esta cavitación es la que permite la desaglomeración y dispersión de las partículas liberando una energía significativa mediante las burbujas producidas [42].

3.1.6. MÉTODO DE RÉPLICA DE ESPONJA POLIMÉRICA

La preparación de estructuras cerámicas porosas se realizó por medio del método de esponjas poliméricas. Los andamios se elaboraron mediante el uso de esponjas de poliuretano (PU) como plantillas, con un diámetro de 8 mm y una altura de 7 mm.

Las esponjas se impregnaron mediante la suspensión cerámica que se preparó mezclando Fase A, agua destilada, como dispersante se agregó Dolapix CE 64 (Zschimmer & Schwarz, Chemische Fabriken) y, por último, como aglutinante Optapix PAF 35 (Zschimmer & Schwarz, Chemische Fabriken, Lahnstein, Alemania).

3.2. TÉCNICAS DE CARACTERIZACIÓN

A continuación, se comentan brevemente las distintas técnicas de caracterización empleadas en el laboratorio, con sus objetivos.

3.2.1. DIFRACCIÓN DE RAYOS X (DRX)

En 1895, el físico alemán W. C. Röntgen, descubrió la existencia de un nuevo tipo de rayos capaces de atravesar cuerpos opacos, a los que llamó Rayos X. Años más tarde, concretamente en 1912, M. V. Laue descubrió la difracción de rayos X en cristales. Los materiales cristalinos adoptan una distribución regular de átomos en el espacio dejando pequeños agujeros por los que pasa la luz y produce difracción. Este descubrimiento mostró la naturaleza de los rayos X y proporcionó un nuevo método para investigar la estructura de la materia.

Los rayos X son una radiación electromagnética, similar a la luz, pero de longitud de onda mucho más corta y de mayor energía. Cuando un haz de rayos X incide en un material sólido, parte de ese haz se dispersa en todas direcciones a causa de los electrones asociados a los átomos o iones que encuentra en su trayectoria.

En 1913, William Henry Bragg y William Lawrence Bragg fueron quienes desarrollaron la espectroscopía de rayos X para la determinación de estructuras cristalinas. Lo que les permitió explicar la difracción como la interferencia de los rayos X reflejados por planos cristalinos paralelos. Obteniendo así, la condición esencial que debe cumplirse para que ocurra la difracción, conocida como la ley de Bragg:

$$n\lambda = 2 d \sin\theta$$

Donde:

- n es un número entero.
- λ es la longitud de onda de los rayos X.
- d es la distancia entre los planos paralelos sucesivos de la red cristalina.
- θ es el ángulo de incidencia entre los rayos incidentes y los planos de dispersión.

Esta relación se cumple cuando los rayos X difractados por planos paralelos separados por una distancia “d”, presentan una diferencia de camino recorrido igual a un número entero de la longitud de onda del haz incidente [43].

La difracción de rayos X es un método utilizado para identificar las distintas fases cristalinas presentes en los materiales. Además, determina características estructurales, como la composición de la fase o fases presentes en un material.

El aparato empleado para determinar los ángulos en los cuales se presenta el fenómeno de difracción es el difractómetro. El haz de rayos X incide de manera constante sobre la muestra, colocada en una placa plana permitiendo su giro, mientras el detector va cambiando de posición y va contando la cantidad de rayos (pulsos) que son dispersados por la muestra en las distintas posiciones.

La geometría más empleada es la de Bragg-Brentano ($\theta/2\theta$), en la cual el ángulo de incidencia del haz de rayos X es igual al ángulo de difracción respecto a la muestra. De esta manera, una rotación θ de la muestra, provoca una rotación 2θ del detector. El esquema de funcionamiento de un difractómetro está representado en la Figura 9A [44].

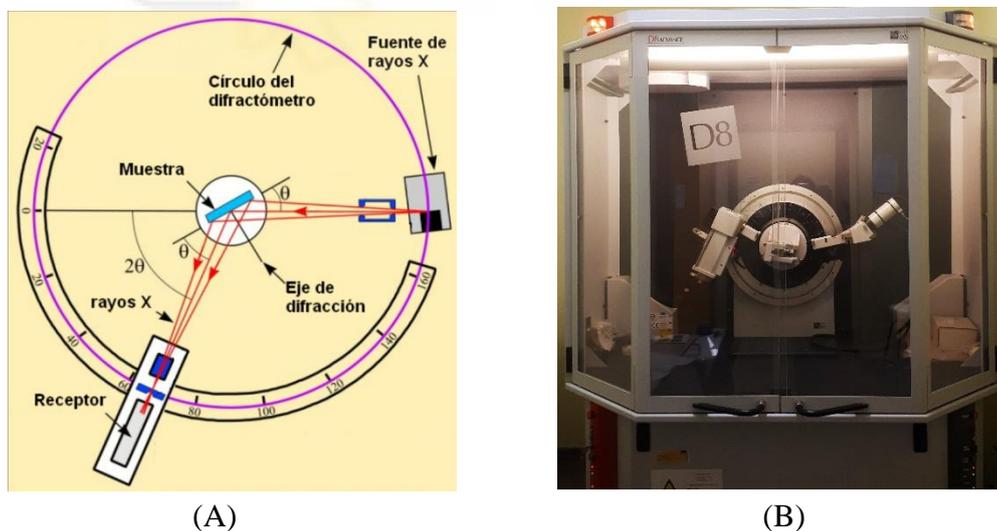


Figura 9: (A) Principio de funcionamiento de un difractómetro; (B) Difractómetro de rayos X Bruker AXS D8 Advance (Karklsruhe, Germany).

En nuestro caso, se utilizó un difractor modelo D8 ADVANCE de BRUKER AXS, con radiación $\lambda_{Cu, k\alpha_1} = 0,15418\text{nm}$ (Figura 9B). Con la geometría vertical Bragg-Brentano ($\theta/2\theta$) se recogieron los datos entre 5° y 65° (2θ) a $0,05^\circ$ por paso, midiendo 6 segundos por paso. Durante la obtención de los patrones, las muestras giraron a 30 rpm y el tubo de rayos X trabajó a 40KV y 30mA.

Puesto que todos los sólidos cristalinos poseen su difractograma característico. Una vez obtenidos los difractogramas de la muestra, se compararon con los datos de la base del *Joint Committee on Powder Diffraction Standards* (JCPDS).

3.2.2. CARACTERIZACIÓN FÍSICA DEL TAMAÑO DE PARTÍCULA

La distribución del tamaño de partícula de un material afecta considerablemente a las propiedades mecánicas del mismo. Por ello, se realizó un control del tamaño de partícula usando un analizador de tamaño por difracción láser, Master Sizer 2000, modelo APA2000 de Malvern Instruments, UK (Figura 10).



Figura 10: Laser de difracción Mastersizer2000E device-Malvern.

En este equipo, un rayo láser incide sobre una muestra de partículas dispersas en un medio líquido, generando una dispersión de la intensidad de la luz con una variación angular diferente para cada tamaño de partícula. Luego se analizan los datos de la intensidad de dispersión angular para calcular el tamaño de las partículas responsables de crear ese patrón de dispersión.

Además, el equipo consta de una fuente de luz azul LED y un láser de He-Ne, que permite la medición de partículas entre rangos de tamaños de 0,02 y 2000 μm en tiempos muy cortos y con gran reproducibilidad y precisión.

Para realizar las mediciones se utiliza como medio líquido, isopropanol y una cantidad de muestra en polvo en suspensión suficiente como para no saturar el equipo de medición. El proceso se repite 4 veces para los distintos tiempos de molienda de 30 min a 4 horas, y, finalmente, se escoge el tiempo óptimo de molienda que corresponda con el tamaño de partícula más pequeño y homogéneo.

3.2.3. MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO (MEB) Y ESPECTROSCOPIA DE DISPERSIÓN DE RAYOS X (EDX)

Con el fin de analizar la morfología superficial y la composición química del andamio cerámico se utilizó el microscopio electrónico de barrido (MEB), más conocido por sus siglas en inglés como SEM (Scanning Electron Microscopy), con el detector de EDX.

Esta técnica consiste esencialmente en hacer incidir un haz de electrones sobre una muestra. Este bombardeo en la superficie de la muestra realiza un barrido de ésta siguiendo una trayectoria de líneas paralelas, provocando la aparición de diferentes señales captadas con detectores específicos que se amplifican, y elaboran una imagen ampliada de la superficie. Las imágenes formadas tienen una alta resolución y una gran profundidad de campo, la cual permite que se enfoque a la vez una gran parte de la muestra. Asimismo, la señal de rayos X generada nos permite realizar un análisis de los elementos químicos que forman parte de un área de superficie muy localizada de la muestra, de 1 μm de área o aún menores, y, además, conocer el porcentaje de cada uno de estos [45].

Las muestras deben ser eléctricamente conductoras, en caso contrario, deberán ser recubiertas con una fina capa conductora metálica, paladio en nuestro caso. Además, para mantener el control del haz de electrones uniforme, es necesario mantener la columna del microscopio en condiciones de alto vacío.

El microscopio electrónico de barrido que se utilizó para la observación y caracterización del material fue el modelo S-3500 de HITACHI, con un poder de resolución de 30 \AA y

equipado con un detector de dispersión de rayos X de la casa Oxford Link Analytical (Figura 11).



Figura 11: Microscopio electrónico de barrido (MEB-Hitachi S-3500N, Ibaraki, Japan); Microanálisis de energía dispersa de rayos-X (EDX; Oxford Link Analytical).

3.2.4. POROSIMETRÍA DE MERCURIO

La porosimetría de mercurio es una técnica ampliamente utilizada en la caracterización de la estructura porosa de los materiales.

Esta técnica consiste en la penetración controlada de mercurio por efecto de una presión aplicada en el entramado poroso de un sólido. Este proceso se puede llevar a cabo gracias a la propiedad del mercurio como líquido no humectante, este hecho impide la penetración de forma espontánea del mercurio en el espacio poroso hasta que se aplique una determinada presión.

Existe una relación que indica la presión requerida para forzar al mercurio a entrar en poros de diámetro específico, conocida como la ecuación de Washburn:

$$d = \frac{4\gamma \cos\theta}{P}$$

Donde:

- P es la presión requerida.
- d es el diámetro del poro.
- θ es el ángulo de contacto mercurio-material.
- γ es la tensión superficial del mercurio.

A partir de la medición del volumen de mercurio introducido en la muestra mediante la presión aplicada, se puede conocer la distribución de tamaño de poro y el volumen de poro o porosidad [46].

El equipo empleado para medir la porosidad de las muestras fue el porosímetro de mercurio modelo POREMASTER-60 de QUANTACHROME INSTRUMENTS (Figura 12), el cual dispone de dos estaciones en baja presión y dos en alta presión hasta un máximo de 60.000psi [47].



Figura 12: Poremaster-60 GT de Quantachrome Instruments.

3.2.5. ESPECTROSCOPIA INFRARROJA POR TRANSFORMADA DE FOURIER (IRTF-RTA)

La Espectroscopía Infrarroja por Transformada de Fourier – Reflectancia Total Atenuada (IRTF-RTA) es una técnica que estudia los fenómenos de interacción que se producen entre la radiación infrarroja y la materia.

El análisis de una muestra por IRTF-RTA proporciona como resultado un espectro de absorción de infrarrojo a partir del cual se obtiene información de los grupos funcionales presentes en las moléculas que componen la muestra, con lo que es posible identificar los materiales. La mayoría de las moléculas presentan un espectro de infrarrojo específico, que constituye la huella dactilar del compuesto, debido a que todas las moléculas pueden manifestar una serie de bandas de absorción. Cada banda en un espectro es la representación de un movimiento de vibración de un enlace dentro de la molécula

El principio básico de esta técnica se basa en la excitación de grupos moleculares por la absorción de radiación infrarroja que genera movimientos vibracionales en los enlaces químicos de los átomos de la molécula. La radiación es absorbida por un enlace cuando la frecuencia vibracional de la onda electromagnética coincide con la del propio enlace. Es decir, se producirán vibraciones activas en la molécula únicamente en aquellos enlaces en los que se produzca un cambio en el momento dipolar durante la interacción con la energía infrarroja. Los movimientos vibracionales se distinguen por el tipo de desplazamiento generado en los enlaces, conociéndose como vibraciones de tensión o flexión. Las tensiones provocan cambios en la distancia interatómica a lo largo del eje del enlace entre dos átomos y las flexiones están originadas por cambios en el ángulo que forman dos enlaces [48,49].

En este caso, el equipo que se utilizó para obtener el espectro infrarrojo fue un espectrómetro modelo THERMO SCIENTIFIC Nicolet iS5 (Figura 13), equipado con un accesorio RTA iD5, con una resolución de 4cm^{-1} e intervalo espectral de medición de $4000\text{-}500\text{cm}^{-1}$ [50].



Figura 13: Espectrómetro THERMO SCIENTIFIC Nicolet iS5.

3.2.6. ESTUDIO DE BIOACTIVIDAD *IN VITRO* EN SFA

Cuando se implanta un material bioactivo en el cuerpo humano, este debe reaccionar químicamente con los fluidos biológicos dando lugar al proceso de regeneración del tejido óseo, formándose una capa de hidroxiapatita en su superficie.

Para evaluar la bioactividad de la Fase A se realizaron ensayos *in vitro* a través de la inmersión en SFA a distintos tiempos. El SFA utilizado para el estudio fue el establecido por Kokubo y col. en 1991 [40], el cual presenta una concentración de iones similar a la existente en el plasma humano (Tabla 1):

	Concentración de iones (mM)							
	Na ⁺	K ⁺	Mg ²⁺	Ca ²⁺	Cl ⁻	HCO ₃ ⁻	HPO ₄ ²⁻	SO ₄ ²⁻
Plasma sanguíneo	142	5	1,5	2,5	147,8	4,2	1	0,5
SFA	142	5	1,5	2,5	103	27	1	0,5

Tabla 1: Comparación entre la concentración de iones del plasma sanguíneo y del SFA.

El procedimiento de preparación del SFA se llevó a cabo agregando los reactivos uno a uno, disolviendo completamente un reactivo, con la ayuda de una espátula, antes de añadir el siguiente. Asimismo, para disolver el último reactivo, el Tris, se hizo uso de un pH-metro para medir el pH de la disolución y poder mantenerlo en el rango de 7,45 a 7,42, debido a que el aumento del pH de la disolución puede provocar la precipitación del fosfato cálcico. La siguiente tabla muestra los reactivos utilizados, las cantidades concretas y el orden de adición de estos.

Orden	Reactivo	Cantidad
1	Cloruro de sodio (NaCl)	8,035 g
2	Bicarbonato sódico o hidrogenocarbonato de sodio (NaHCO ₃)	0,355 g
3	Cloruro de potasio (KCl)	0,225 g
4	di-Potasio hidrogenofosfato trihidratado (K ₂ HPO ₄ ·3H ₂ O)	0,231 g
5	Cloruro de magnesio hexahidratado (MgCl ₂ ·6H ₂ O)	0,311 g
6	Ácido clorhídrico 1 M (mol/L) (HCl)	39 mL
7	Cloruro de calcio (CaCl ₂)	0,292 g
8	Sulfato de Sodio (Na ₂ SO ₄)	0,072 g
9	Tris-hidroximetil aminometano ((HOCH ₂) ₃ CNH ₂) (Tris)	6,118 g

Tabla 2: Orden de adición de los reactivos y cantidades para la preparación del SFA.

Con el fin de determinar la bioactividad de las esponjas de material cerámico, se introdujeron en tubos Falcon con 50 mL de SFA (Figura 14) y se mantuvieron a una temperatura de 37°C. Durante el ensayo *in vitro* las muestras sumergidas en el SFA se agitaban todos los días al menos una vez para de esta forma evitar los inconvenientes provocados por la sobresaturación iónica.

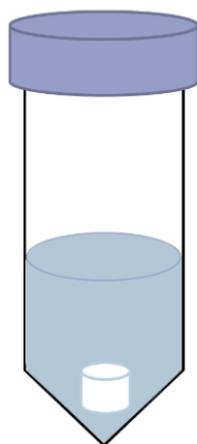


Figura 14: Montaje experimental para el ensayo *in vitro* en SFA de las esponjas cerámicas en el laboratorio.

3.2.7. ESPECTROMETRÍA DE EMISIÓN ÓPTICA DE PLASMA ACOPLADO INDUCTIVAMENTE (EEO-PAI)

La espectrometría de emisión óptica por plasma acoplado inductivamente (EEO-PAI) es una de las técnicas más utilizadas en el análisis elemental. Esta técnica permite la cuantificación simultánea de la mayoría de los elementos de la tabla periódica en niveles de concentración muy bajos (mg/L o partes por billón, ppb) con una excelente precisión y exactitud. Se utilizó para determinar la liberación de iones de Si, Ca y P de las muestras en el SFA después de los diferentes días de inmersión.

El espectrómetro de emisión óptica dispone de una fuente de radiación (plasma, bobina de inducción y generador de radiofrecuencia), un sistema de introducción de la muestra (bomba peristáltica, cámara ciclónica, nebulizador y antorcha), un sistema óptico (monocromador), un detector y sistema de lectura.

El funcionamiento del EEO-PAI consiste en transportar mediante una bomba peristáltica la muestra líquida hacia el nebulizador, el cual forma un aerosol suspendido en argón. Dicho aerosol es conducido por una corriente de argón hacia el plasma generado, acoplado inductivamente por radio frecuencia. En el plasma, debido a las altas temperaturas, se produce la desolvatación, vaporización y atomización. Después, se experimenta la ionización y excitación de los analitos presentes en la muestra. Los átomos e iones excitados tienden a volver a su estado fundamental, devolviendo la energía absorbida emitiendo radiaciones electromagnéticas dirigidas al sistema óptico, el cual separa la luz emitida según sus longitudes de onda. Cada elemento proporciona un conjunto de radiaciones a longitudes de onda específicas, que integran el espectro atómico característico. Finalmente, el detector convierte la energía luminosa en corriente eléctrica y mide la potencia para su cuantificación [51].

Para este análisis se empleó el espectrómetro de emisión óptica Perking-Elmer Optima 2000TM DV (Figura 15) basado en un sistema secuencial de barrido de alta velocidad, con un sistema de visualización dual del plasma y un generador de radiofrecuencia de 40

MHz. El espectrómetro abarca un rango espectral de longitud de onda de 160 a 900 nm y una resolución de 0,009 a 220 nm [52].



Figura 15: Espectrómetro de emisión óptica PerkinElmer Optima 2000™ DV.

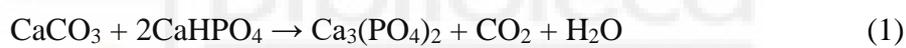


4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE FASE A

Las materias primas de carácter comercial que se emplearon para preparar la Fase A fueron: hidrógeno fosfato cálcico (CaHPO_4 , Acros organics), carbonato cálcico (CaCO_3 , Panreac) y óxido de silicio (SiO_2 , Strem Chemical), según la reacción estequiométrica (3).

En el área de biomateriales del IB-UMH también se ha obtenido la Fase A a partir de los óxidos de Silicato dicálcico y Fosfato tricálcico, aunque se ha demostrado que es una ruta de síntesis más compleja y menos económica. Por un lado, el Fosfato tricálcico se elabora mediante la mezcla de los óxidos hidrógeno fosfato cálcico (CaHPO_4) y carbonato cálcico (CaCO_3), en estado sólido, mediante la reacción (1). Por otro lado, el Silicato dicálcico se obtiene a partir de la reacción (2) de carbonato cálcico (CaCO_3) y óxido de silicio (SiO_2) en estado sólido.



Las cantidades estequiométricas en peso requeridas de los reactivos se pesaron en una balanza y se homogenizaron con acetona en una cápsula de porcelana para llevar a cabo el embutido y prensado isostático del material. Posteriormente, se realizó un tratamiento térmico, en el que se colocaron las muestras en un crisol de platino y se fue elevando la temperatura del material progresivamente durante 3 horas para alcanzar 1500°C . Esta temperatura se mantuvo otras 3 horas hasta que se llevó a cabo el quenching de homogenización o enfriamiento rápido, sacando las muestras rápidamente y sumergiéndolas en nitrógeno líquido.

A continuación, la muestra se molió con el mortero y el molino de bolas. Más tarde, se procedió a realizar el embutido y prensado del polvo y así, una vez compactado, efectuar el tratamiento térmico de sinterizado de la Fase A (Figura 16), donde la muestra se calentó

hasta 1300°C en hora y media y una vez alcanzada esta temperatura se mantuvo durante 3 horas. Seguidamente, la temperatura descendió a 1200°C en media hora y se mantuvo durante 24 horas para asegurar que se alcanzara el equilibrio. Por último, se llevó a cabo un enfriamiento lento en el horno.

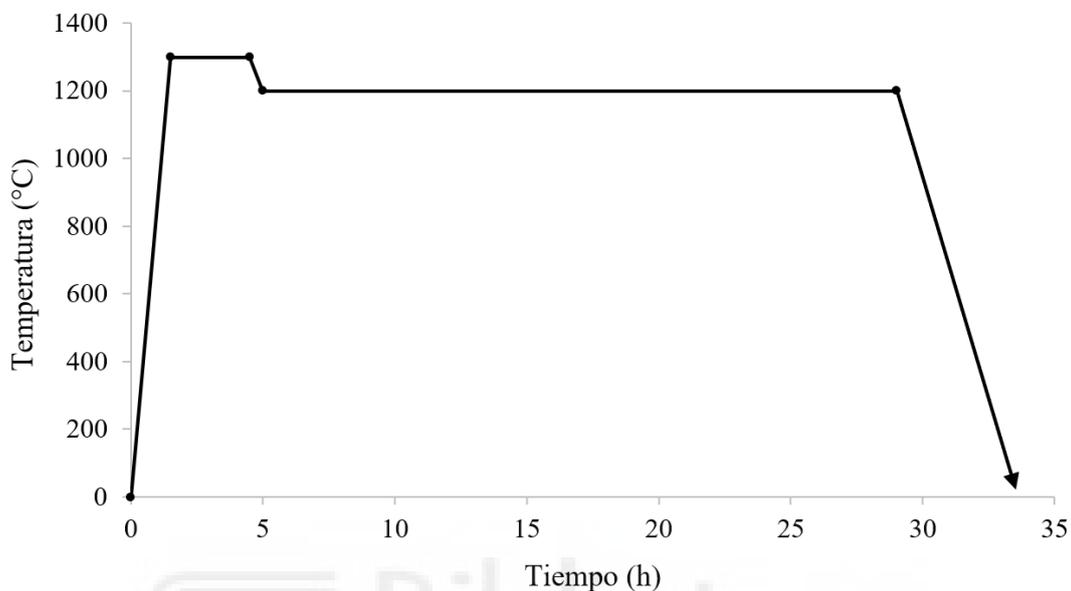


Figura 16: Tratamiento térmico Fase A.

Después de este tratamiento térmico, se evaluó la composición del material cerámico mediante la caracterización mineralógica por DRX. En la Figura 17 se muestra el patrón de difracción de DRX realizado al polvo cerámico. Estos resultados se compararon con las referencias de la base de datos (JCPDS), donde se comprobó que todos los picos de difracción obtenidos correspondían a las difracciones características de la fase A, $7\text{CaO} \cdot \text{P}_2\text{O}_5 \cdot 2\text{SiO}_2$, según el n.º de ficha 11-0676. Así se demostró que, con el tratamiento realizado, se había conseguido efectivamente la cerámica monofásica Fase A buscada.

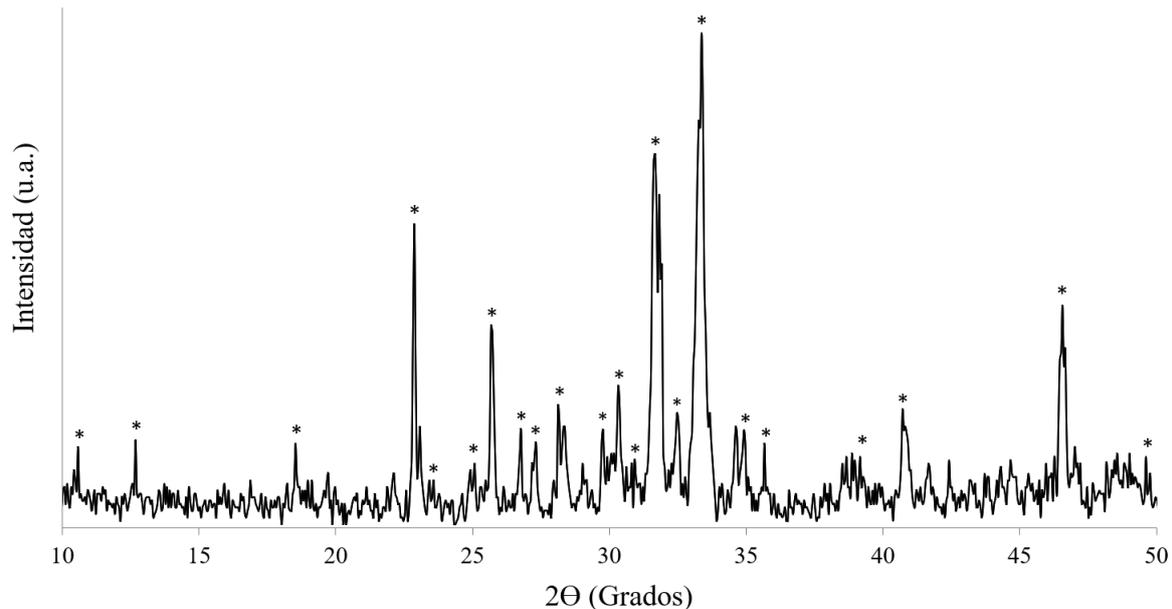


Figura 17: Patrón de difracción de rayos X de la fase A obtenida. El () corresponde a la ficha JCPDS n°11-0676 de la Fase A.*

A partir del material cerámico obtenido y con el fin de preparar andamios cerámicos, se llevó a cabo una molienda en molino planetario con el objeto de obtener un tamaño de partícula pequeño y homogéneo de cara a la realización de la técnica de réplica de esponja polimérica. Se realizó la molienda en diferentes periodos de tiempo de 30 min a 4 h y, posteriormente se analizó el tamaño de partícula (Figura 18).

En base a los resultados observados, se consideró que el tiempo óptimo de molienda era a 1,5 horas, ya que compagina el tamaño de partícula más pequeño y menos variable, con una distribución desplazada más a la izquierda y más estrecha, que corresponde a la curva de color verde de la Figura 18. Por lo tanto, la duración de molienda fue 1,5 horas a 300 rpm, consiguiendo así un tamaño de partícula promedio de 10,372 μm , lo cual favorece la preparación de la suspensión y posterior adhesión al andamio.

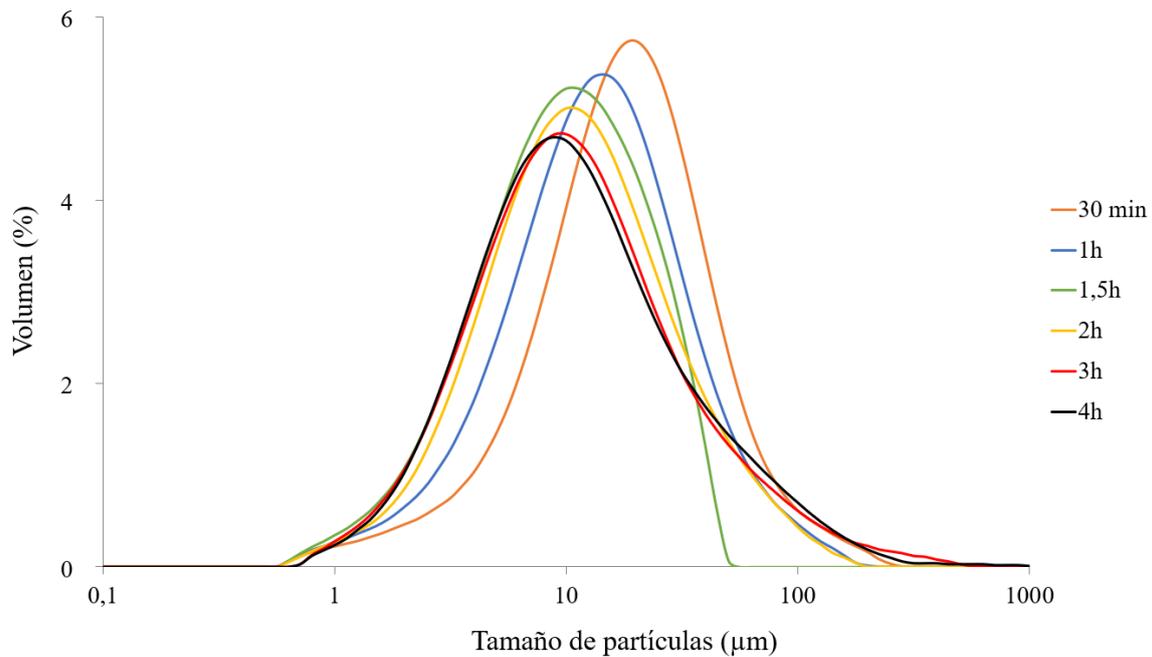


Figura 18: Distribución del tamaño de partícula del polvo cerámico de Fase A.

Además, se examinaron las muestras a los distintos tiempos de molienda por DRX (Figura 19) por si hubiera ocurrido algo de amorfización [53]. Así, pudimos confirmar que la molienda no había afectado de manera significativa al grado de cristalinidad ni a las fases cristalinas del material, debido a la anchura y altura que presentaron los picos de difracción.

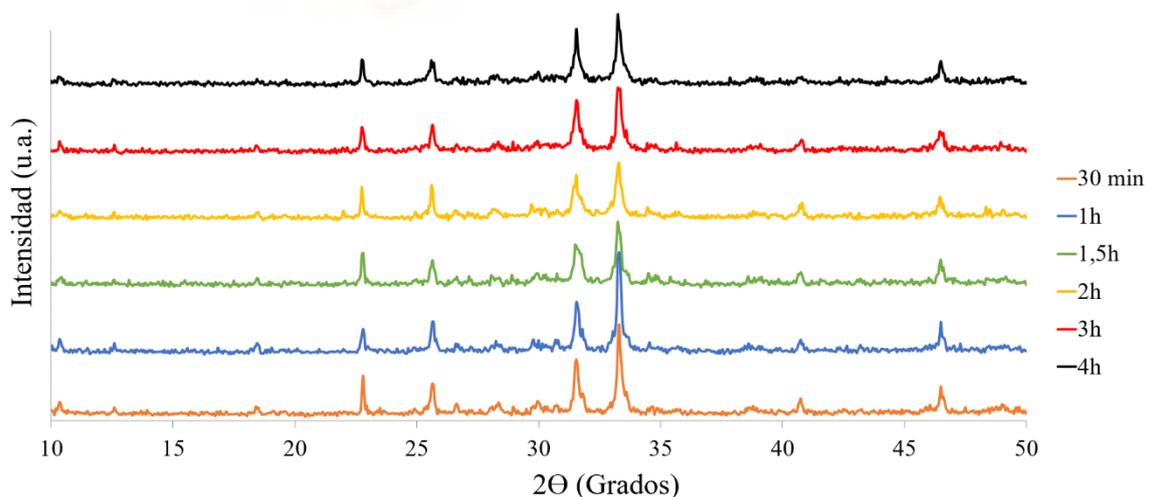


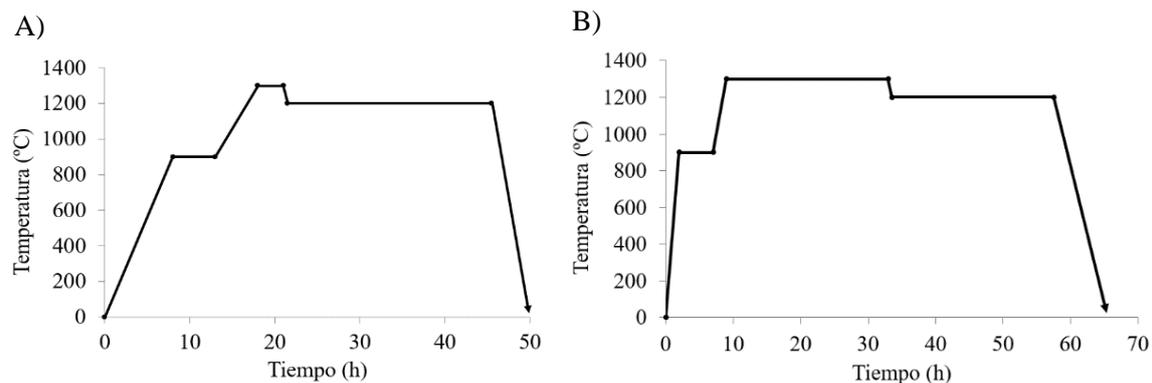
Figura 19: DRX Fase A a los diferentes tiempos de molienda.

4.2. DISEÑO Y CARACTERIZACIÓN DE CERÁMICAS POROSAS

El método de réplica de esponja polimérica nos permitió preparar los andamios utilizando la cerámica en polvo previamente molida a 1,5 horas y la plantilla de PU, como estructura 3D. Las plantillas se impregnaron sumergiéndolas en la suspensión cerámica dos o tres veces a fin de lograr una mayor resistencia mecánica en el andamio final. Después de cada recubrimiento se eliminó el exceso de material, se empleó aire a presión para abrir los poros y se llevó a cabo la homogeneización por ultrasonidos de la suspensión cerámica para evitar aglomerados gracias a la dispersión de las partículas.

Una vez impregnadas las esponjas, se dejaron secar al aire, y seguidamente, se realizó un tratamiento térmico con el objetivo por un lado de eliminar el polímero y por otro de aportar una mayor resistencia a la cerámica, obteniendo así la matriz tridimensional porosa buscada.

Se probaron varios tratamientos térmicos hasta encontrar aquel que nos permitió obtener esponjas con un adecuado grado de manipulabilidad. La figura 20 muestra los diferentes tratamientos térmicos que se examinaron y el finalmente utilizado (Figura 20E), el cual incluyó un calentamiento durante 3 horas hasta 1300°C y se mantuvo esta temperatura 48 horas, llevando a cabo a continuación un enfriamiento lento dentro del horno.



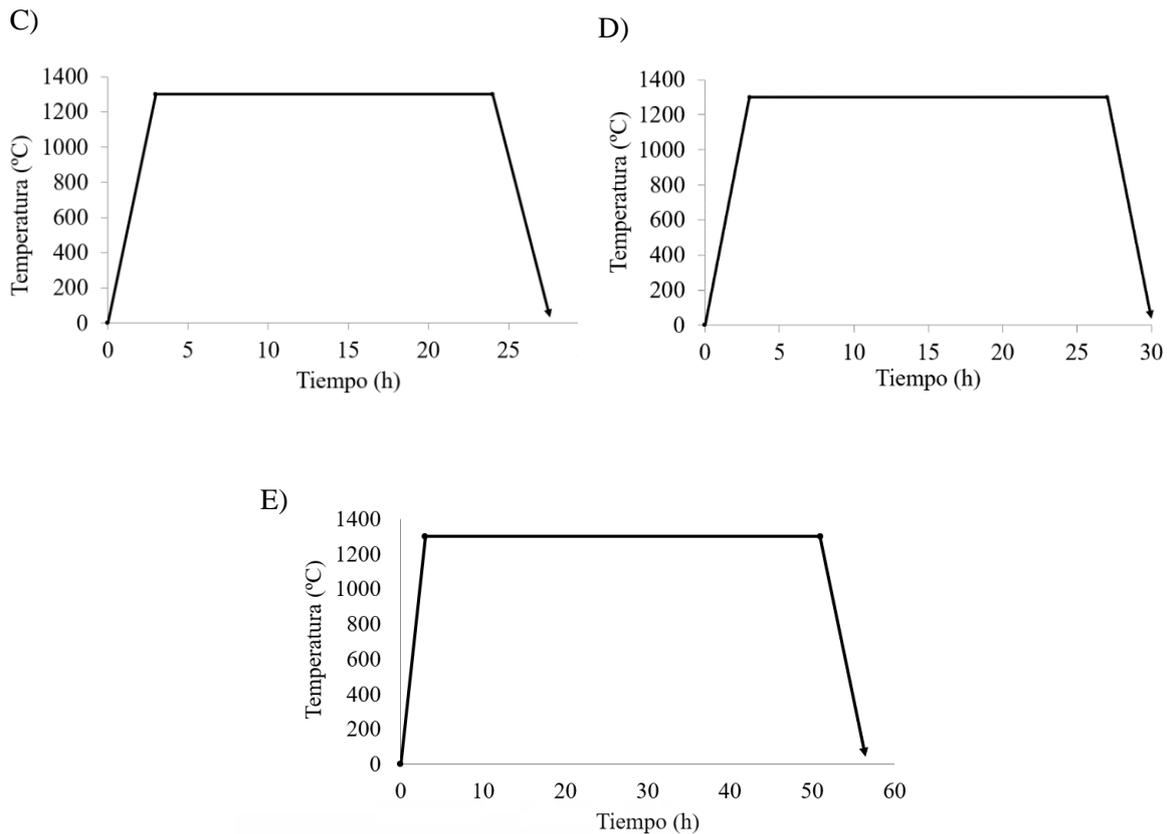


Figura 20: Tratamientos térmicos andamios de Fase A.

Para realizar el tratamiento térmico las esponjas se colocaron en una bandeja para introducirlas en el horno como se puede observar en la Figura 21. En la cual se muestran las esponjas antes y después de dicho tratamiento de sinterizado.

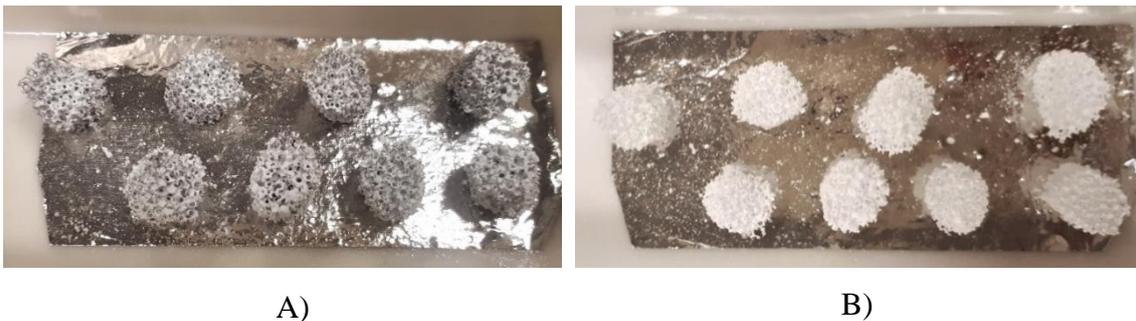


Figura 21: (A) esponjas poliméricas recubiertas por la suspensión cerámica antes del tratamiento térmico de sinterizado y (B) después del sinterizado.

A continuación, se analizaron los andamios por difracción de rayos X para confirmar que no se había producido cambios mineralógicos con respecto a la muestra de fase A en polvo (Figura 22). Con el difractograma obtenido se comprobó que el procedimiento de preparación del andamio no había alterado la composición de la Fase A.

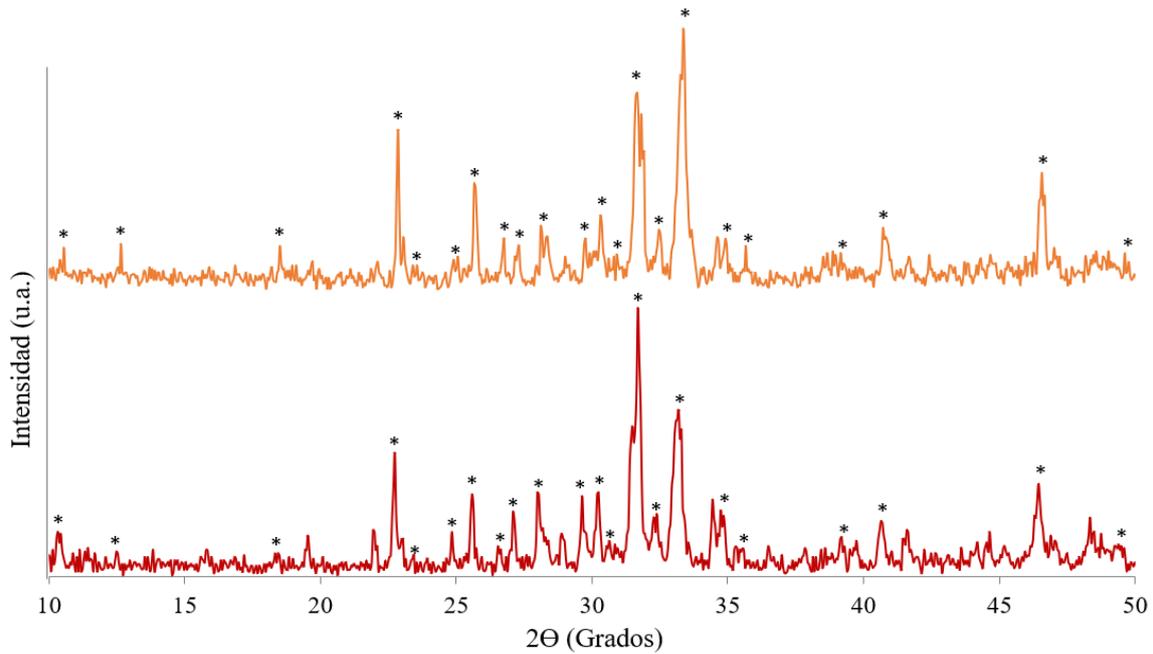


Figura 22: Patrón de difracción de rayos X de los andamios (curva roja) y patrón de difracción del polvo cerámico de partida para su comparación (curva naranja). El (*) corresponde a la ficha JCPDS n°11-0676 de la Fase A.

Los andamios cerámicos obtenidos, se observaron mediante microscopía óptica. La estructura 3D que se muestra en la Figura 23 presenta un alto grado de porosidad, semejante al de la plantilla de PU utilizada inicialmente.

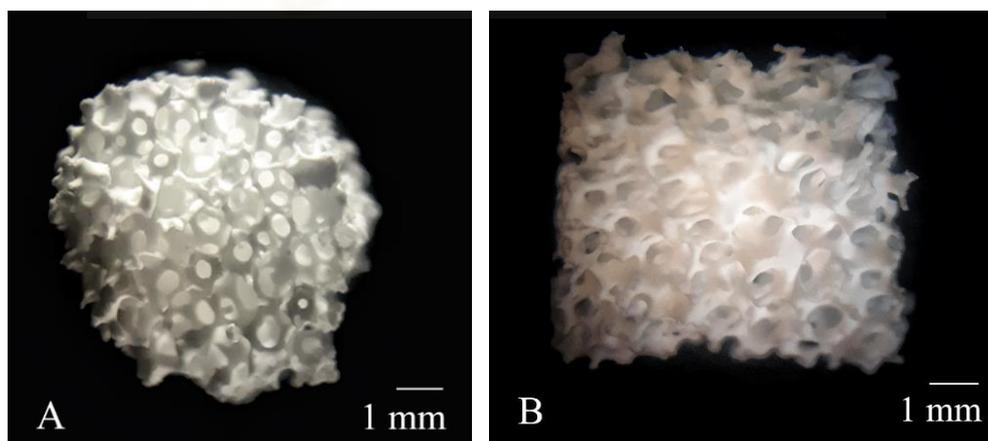


Figura 23: Imágenes ópticas del andamio de Fase A después del tratamiento térmico.

La microestructura de los andamios cerámicos fue analizada mediante un análisis MEB. Las imágenes obtenidas se ilustran en la Figura 24, las cuales mostraron un alto grado de porosidad abierta interconectada (Figura 24A). Esta estructura porosa lograda en el

andamio se asemeja a la del hueso trabecular favoreciendo así la vascularización [54]. Además, a partir de estas imágenes se determinó el tamaño de poro y de los puentes de los andamios. Para ello se escogieron 2 andamios y se tomaron 25 mediciones en cada uno, obteniéndose un rango entre 165-290 μm para los puentes y 380-770 μm para los poros.

En algunas zonas de la muestra, como se observa en la Figura 24A y 24B con más detalle, los puentes aparecen rotos por la fragilidad de la muestra durante su manipulación. Asimismo, pudieron apreciarse los defectos característicos del método de esponja polimérica, como defectos triangulares en los puentes, provocados durante la eliminación de la plantilla de PU en el tratamiento térmico (Figura 24C) [55].

La observación de la superficie de los andamios reveló también la presencia de cierta microporosidad (Figura 24D), con un tamaño de poro dentro del rango 1,35-3,5 μm medido en el MEB.

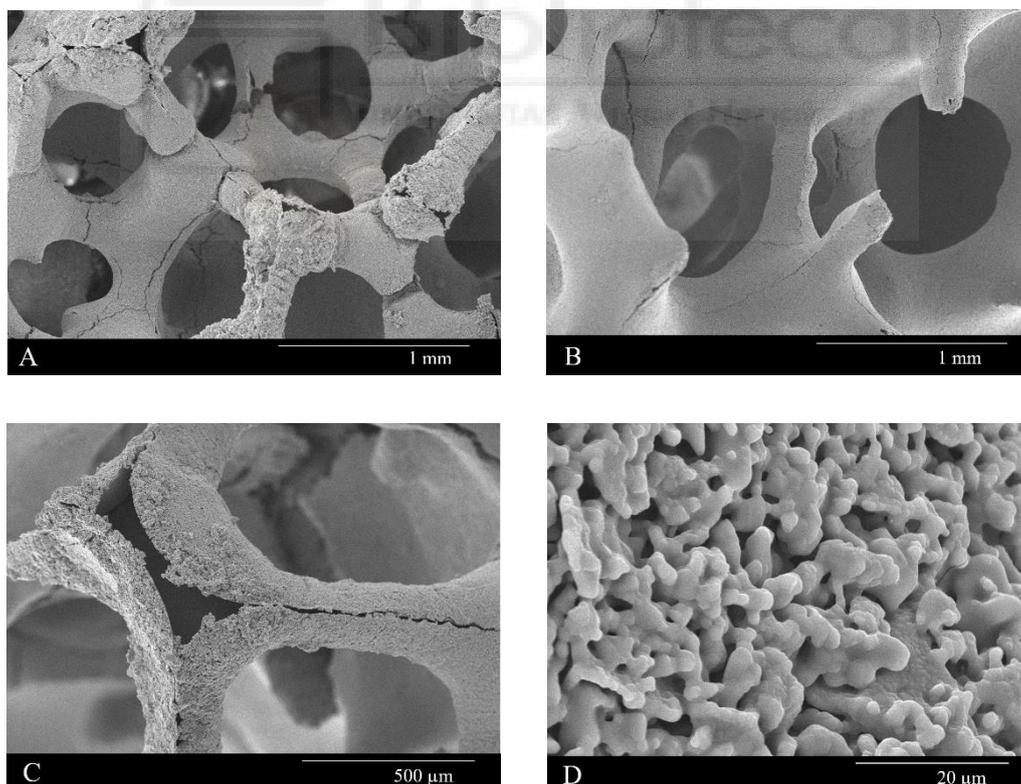


Figura 24: Imágenes MEB de andamios: (A) macroporosidad, (B) detalle de puentes, (C) defecto triangular y grietas y (D) detalle de microporosidad.

La composición de los andamios se determinó a través de un análisis cuantitativo por EDX, en el que se tomaron varias medidas en distintos puntos de la superficie, dando como resultado 19,46% en peso de Si, 22,19% en peso de P y, 58,35% en peso de Ca. Dicho resultado se corresponde a la composición del material monofásico de la fase A.

Una vez conocida la macroporosidad presente en el andamio se llevó a cabo la porosimetría de mercurio. Este método nos permitió determinar la microporosidad de los andamios cerámicos, examinándose tanto los espacios vacíos entre partículas (conocidos como “intersticios” o “interpartículas”), como los espacios que corresponden a las propias partículas (denominados “poros” o “intrapartículas”).

La porosimetría se realizó mediante la intrusión controlada de mercurio en los poros con un crecimiento de la presión progresivo. La Figura 25 muestra los resultados obtenidos de la esponja, donde se observó como a medida que la presión aumentaba, el mercurio accedía a poros cada vez más pequeños. El rango medido de tamaño de poros de los andamios cerámicos comprende desde 260 μm hasta 0,0036 μm . Asimismo, la Figura 25 incluye la porosimetría de la Fase A densa, preparada para una mejor comparación y control del nivel de porosidad de nuestro andamio.

Por un lado, en la curva acumulativa, Figura 25A, se observaron dos absorciones principales para la esponja de Fase A. La primera de ellas comprende diámetros de poro entre 153-46,3 μm , que se refleja en el volumen diferencial (Figura 25B) en el pico representado de 56,1 μm . La segunda absorción se asocia a diámetros de poro dentro del rango de 4,2-1,78 μm , que corresponde al pico acentuado a 2,71 μm en la gráfica de volumen diferencial. Se identificó también una intrusión de mercurio menor en la pendiente que abarca los diámetros de poro desde 46,3 a 4,2 μm . Cabe destacar que las primeras penetraciones del mercurio en el andamio podrían hacer referencia a la ocupación de los espacios interparticulares y las siguientes absorciones a los espacios intraparticulares.

Por otro lado, la Fase A densa, en el volumen acumulativo (Figura 25A), presenta una absorción principal que corresponde a un pico centrado a 8,46 representado en el volumen diferencial (Figura 25B).

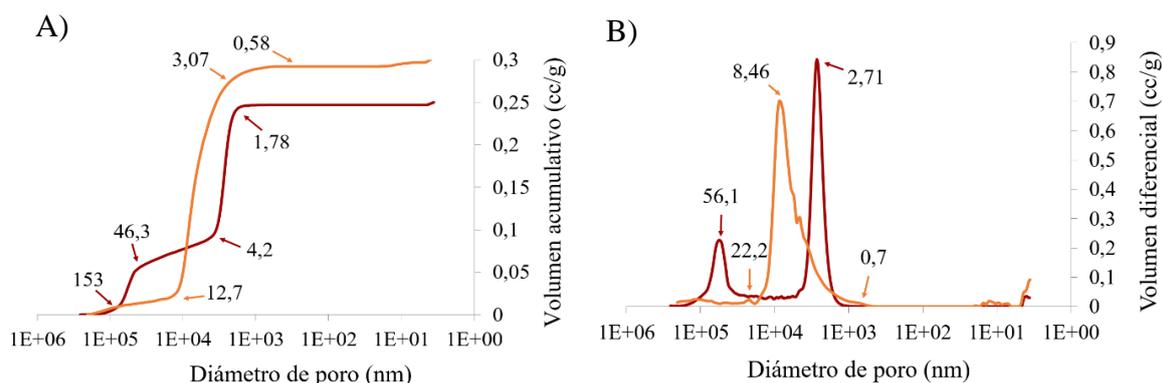


Figura 25: Curvas de intrusión de mercurio en andamios medidas por porosimetría de mercurio de la esponja de Fase A (curva roja) y de la Fase A densa (curva naranja): (A) volumen intrusivo acumulado vs diámetro de poro; (B) volumen intrusivo diferencial vs diámetro de poro.

En el campo de la ingeniería de tejidos se ha profundizado acerca del tamaño de poro ideal para los andamios, ya que desempeña un papel clave en la progresión de la osteogénesis [56].

A pesar del considerable desacuerdo sobre el tamaño de poro ideal, se ha determinado que los poros interconectados con un diámetro que supere los 100 μm , mejoran la adhesión mecánica entre el andamio y el tejido huésped circundante, y el aporte de micronutrientes. No obstante, se recomiendan tamaños de poros superiores a 300 μm , pues favorecen la vascularización de los andamios y el crecimiento óseo [57]. Además, se ha establecido que los poros menores de 10 μm , proporcionan una mayor área de superficie, fomentando así la interacción hueso-andamio que permite la adsorción de proteínas, el intercambio iónico y la formación de apatita [58]. En el caso de nuestro andamio, como se ha demostrado anteriormente, presenta una estructura jerarquizada con poros mayores a 300 μm y menores de 10 μm . Como consecuencia, se podría afirmar que estas aproximaciones deben proporcionar en el andamio una estabilidad mecánica y un entorno idóneo para la formación de hueso nuevo. Es decir, permitir una adecuada colonización y vascularización del andamio, así como un flujo correcto de nutrientes y eliminación de desechos. Generalmente, los poros interconectados con un diámetro alrededor de 100 μm o mayor, y una porosidad abierta que supere el 50% son considerados los requisitos mínimos para permitir el crecimiento del tejido óseo en andamios porosos [59].

La caracterización de la composición química de los andamios se llevó a cabo mediante Espectroscopía Infrarroja (IRTF-RTA) como se muestra en la Figura 26. Se ha incluido también el espectro infrarrojo de la Fase A densa para su comparación.

La Fase A presenta absorciones de IRTF con alta intensidad entre $550\text{-}1150\text{ cm}^{-1}$. En el espectro IRTF, las bandas de absorción están definidas en dos grupos, un primer grupo a $550\text{-}650\text{ cm}^{-1}$ y un segundo a $850\text{-}1106\text{ cm}^{-1}$. Las bandas de absorción que aparecen entre los números de onda 550 y 620 cm^{-1} corresponden a las vibraciones de flexión simétrica de O-P-O. Alrededor de longitudes de onda entre $700\text{-}1200\text{ cm}^{-1}$ aparecen bandas de absorción de silicato dicálcico pertenecientes a estiramientos simétricos y antisimétricos, que se encuentran tradicionalmente en torno a $850, 875, 895, 925, 995$ y 1010 cm^{-1} [60-64]. Por último, las bandas de estiramiento simétricas terminales P-O, no degeneradas, se manifiestan a 970 cm^{-1} (ν_1) y las de estiramiento asimétrico triple deterioradas, corresponden al rango entre $1070\text{-}1125\text{ cm}^{-1}$ (ν_3) [65].

Los espectros de la fase A nos permiten identificar las componentes de silicato y fosfato presentes en su estructura como se muestra en la Figura 26. Las bandas de absorción asociadas a una longitud de onda por debajo de 900 cm^{-1} corresponden a la red de silicato, especialmente al modo de estiramiento simétrico de los grupos SiO_4 . La región de longitudes de onda desde 900 a 1025 cm^{-1} están relacionadas con la superposición de las vibraciones de estiramiento de los grupos fosfato y silicato. El grupo fosfato pudo observarse principalmente en las bandas de absorción entre $1050\text{-}1110\text{ cm}^{-1}$. Además, cabe destacar que no se detectaron bandas de absorción definidas en el rango de $1200\text{-}2000\text{ cm}^{-1}$.

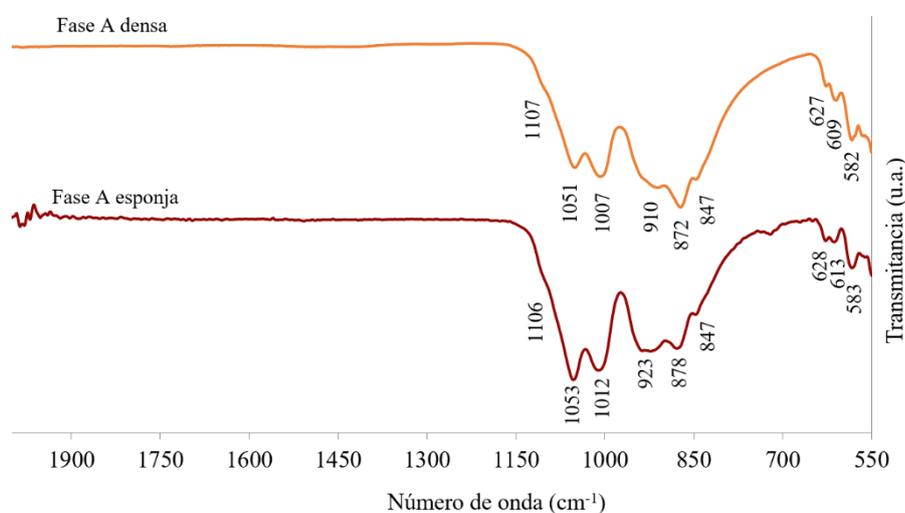


Figura 26: Espectros IRTF-RTA de la esponja de Fase A y la Fase A densa.

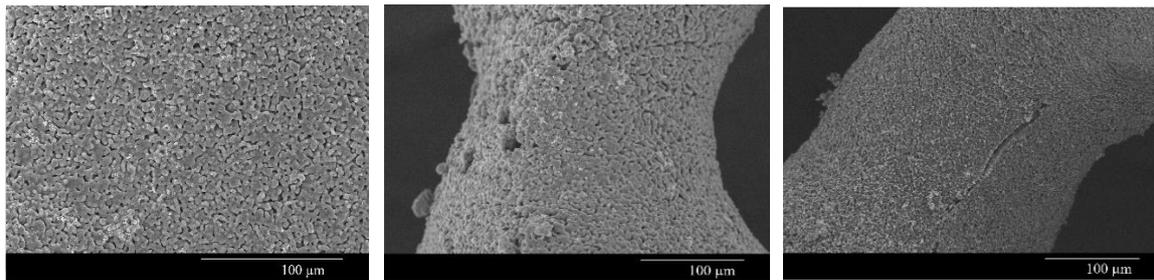
4.3. EVALUACIÓN DE LA BIOACTIVIDAD *IN VITRO*

El requisito principal para la unión de un material artificial al tejido óseo vivo es la formación de apatita en su superficie cuando está en contacto con fluidos fisiológicos. La capacidad de un material de formar una capa de hidroxiapatito *in vitro* puede predecir la bioactividad ósea *in vivo* del material.

Por consiguiente, la bioactividad de los andamios se evaluó a través de un estudio *in vitro*, según el procedimiento propuesto por Kokubo y col. [40], sumergiendo los andamios en SFA, durante distintos períodos de tiempo, a una temperatura de 37°C y un pH de 7.4, con el propósito de imitar el ambiente en el que se produce la regeneración ósea en el cuerpo humano. Los tiempos utilizados para confirmar la formación de hidroxiapatito en la superficie de material fueron de 1h a 7 días, para los cuales se estudió la morfología superficial a través del MEB.

Después de la inmersión en SFA a 1, 3 y 6 horas se obtuvieron los resultados que se muestran en la Figura 27. En primer lugar, pasada 1 hora se pudo apreciar la aparición de partículas esféricas blanquecinas pequeñas y aisladas en la superficie de la cerámica (Figura 27A), que fueron creciendo en cantidad y tamaño conforme aumentaba el tiempo de inmersión a 3 y 6 horas (Figura 27B y 27C). Finalmente, pasadas las 6 horas ya se observaron partículas esféricas dispersas por toda la superficie del andamio.

Además, se realizó un análisis EDX de la superficie del material. Los resultados EDX correspondientes a los andamios después de 6 horas de inmersión en SFA muestran la presencia de Calcio, Fósforo y Silicio, aunque con variaciones en sus concentraciones respecto a la Fase A, observándose un aumento en la cantidad de Calcio y Fósforo y una disminución del Silicio.



(A)

(B)

(C)

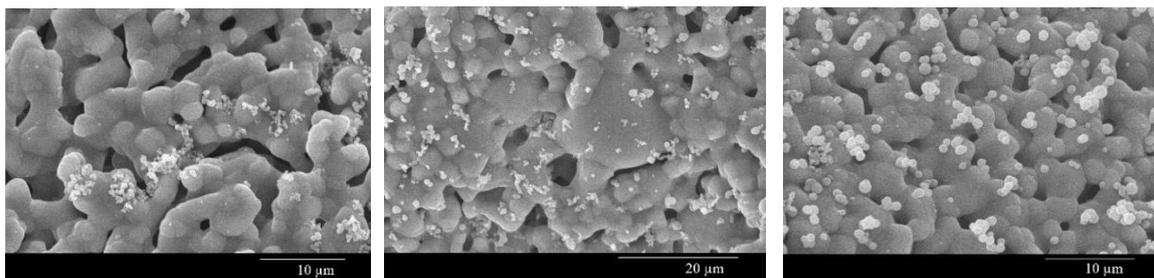


Figura 27: Imágenes MEB de morfología de la superficie del andamio de Fase A después de una inmersión en SFA durante (A) 1h, (B) 3h y (C) 6 h.

A continuación, se siguió aumentando el tiempo de inmersión a 1 y 3 días con el fin de conseguir una capa de precipitado que cubriese completamente la superficie del material. Tras 1 día de inmersión (Figura 28A) se observó como las partículas comenzaron a fusionarse unas con otras produciendo aglomerados en algunas zonas de la superficie, como puede observarse en la Figura 28A inferior con un aumento mayor. A los 3 días de inmersión, las partículas y los aglomerados habían aumentado considerablemente su tamaño y cantidad. Si bien cabe resaltar que el estudio realizado no permitió encontrar ninguna zona en el andamio donde se observase que el precipitado había penetrado a través de los poros. Asimismo, en el análisis EDX se detectó un descenso notable en el porcentaje de Si a los 3 días, en comparación con la cerámica original, pasando de 19,46% a 7,11%. Esto se debe a la capa de precipitado formada en la superficie del material, ya que, en el caso de analizar sólo el precipitado no debería aparecer Si.

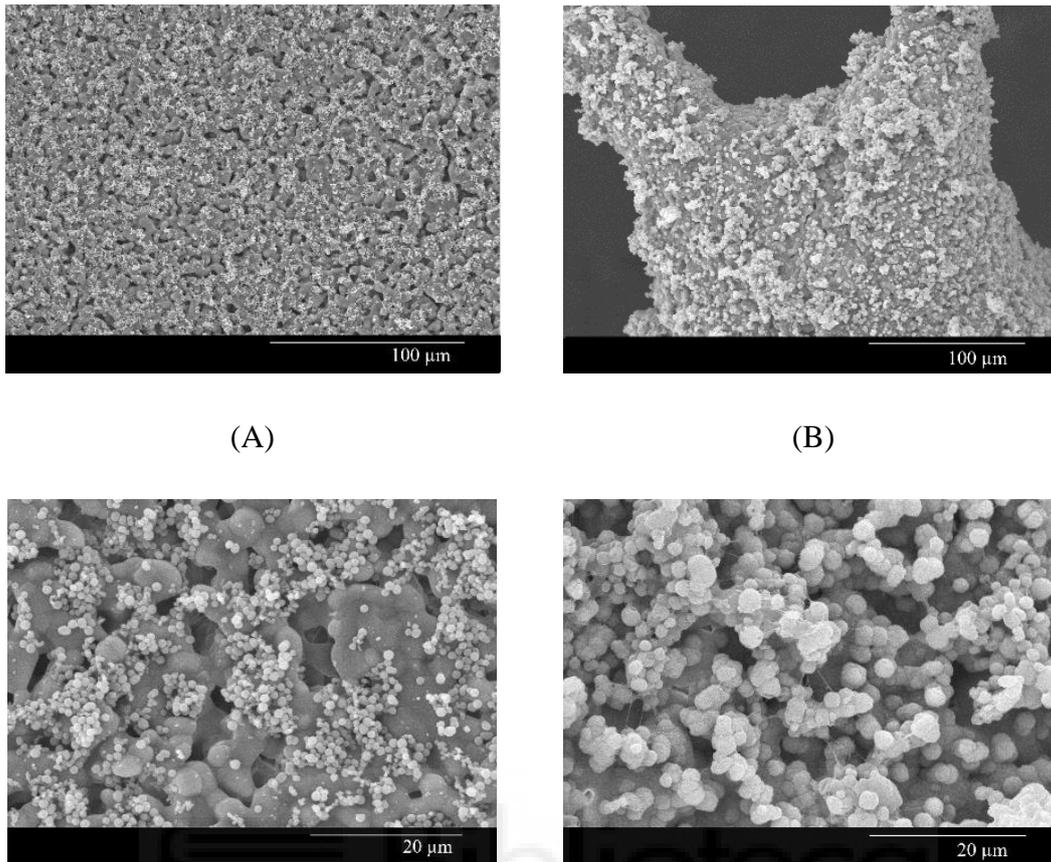


Figura 28: Imágenes MEB de morfología de la superficie del andamio de Fase A después de una inmersión en SFA durante (A) 1 día y (B) 3 días.

Pasados 5 y 7 días (Figura 29), la mayor parte de la superficie del material presenta precipitado llegando incluso a penetrar a través de los poros como se ilustra en la Figura 29A. Además, se aprecia como las partículas esféricas crecen, alcanzando un diámetro máximo aproximado de 7 μm , y continúan fusionándose, formando placas de precipitado a lo largo de la superficie del andamio. Respecto al análisis EDX, continuó observándose una disminución en el porcentaje de Si, llegando al 3,16% a los 5 días y siendo nulo al cabo de 7 días, cuando el precipitado con un espesor importante estaba presente en toda la superficie.

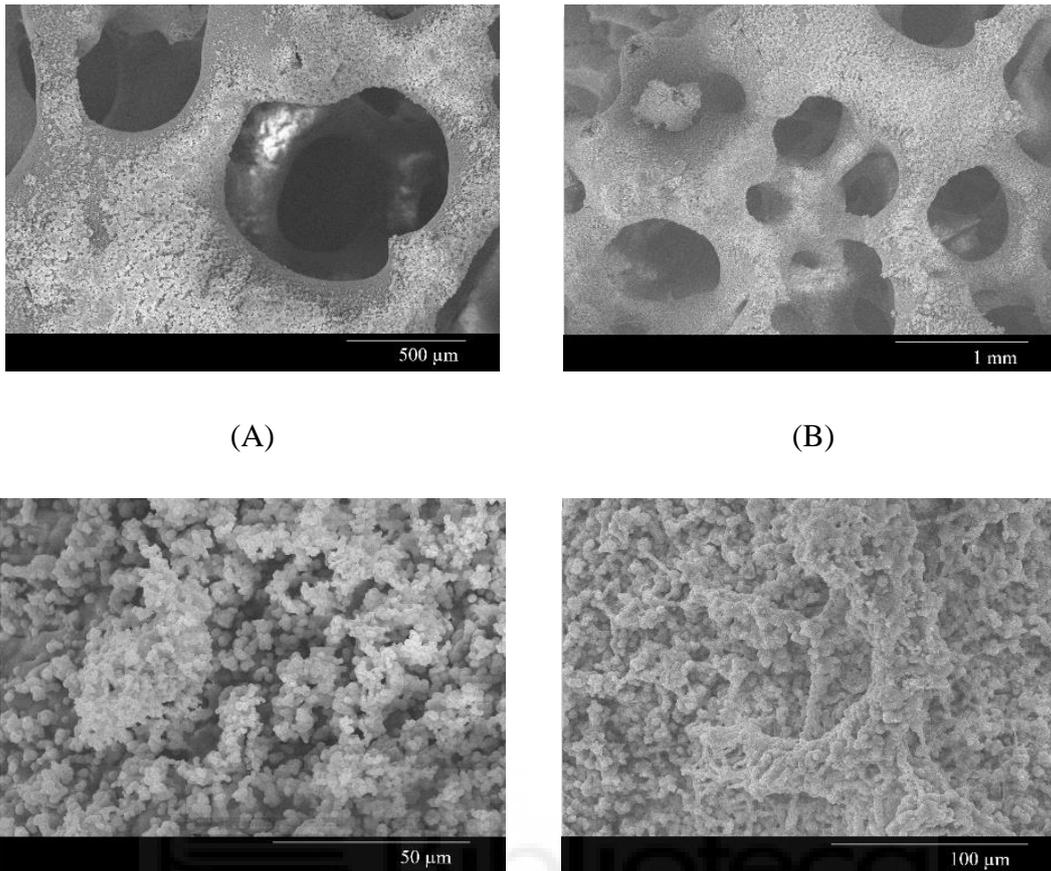


Figura 29: Imágenes MEB de morfología de la superficie del andamio de Fase A después de una inmersión en SFA durante (A) 5 días y (B) 7 días.

Mediante el análisis EDX de las capas de apatito presentes en las muestras, también se determinaron las relaciones Ca/P que en promedio eran aproximadamente 1,98, siendo superior a la de la hidroxiapatita, 1,67. Esta prueba es insuficiente, sin embargo, nos lleva a pensar que en realidad la capa formada en la superficie de la cerámica se trata de carbohidroxipatito (CHA).

Una vez conocida la bioactividad de la cerámica, se determinó la concentración de los iones de Silicio, Calcio y Fósforo liberados por la Fase A en el SFA durante el tiempo de inmersión. Para ello, se recogieron muestras de SFA correspondientes a cada periodo de tiempo de inmersión (6h, 1, 3, 5 y 7 días) para el análisis mediante EEO-PAI (Figura 30). Durante el primer día de inmersión, hubo un aumento significativo de las concentraciones de Calcio y Silicio en el SFA debido a la disolución de la muestra. A continuación, después de 1 día, se observó una ligera disminución de las concentraciones de Si y Ca, que podría deberse a la formación de precipitado cubriendo casi toda la superficie de la

muestra. A partir del tercer día, la continua disolución de la muestra junto con la formación de la capa de precipitado contribuyó nuevamente a un aumento en la concentración de Si y Ca, alcanzando el valor máximo de concentración a los 7 días de 39,46 mg/L y 200,20 mg/L, respectivamente. Los cambios observados en la concentración de P no fueron tan significativos, lo que pudo deberse a que la proporción de P en la composición de la Fase A es menor a la de Ca.

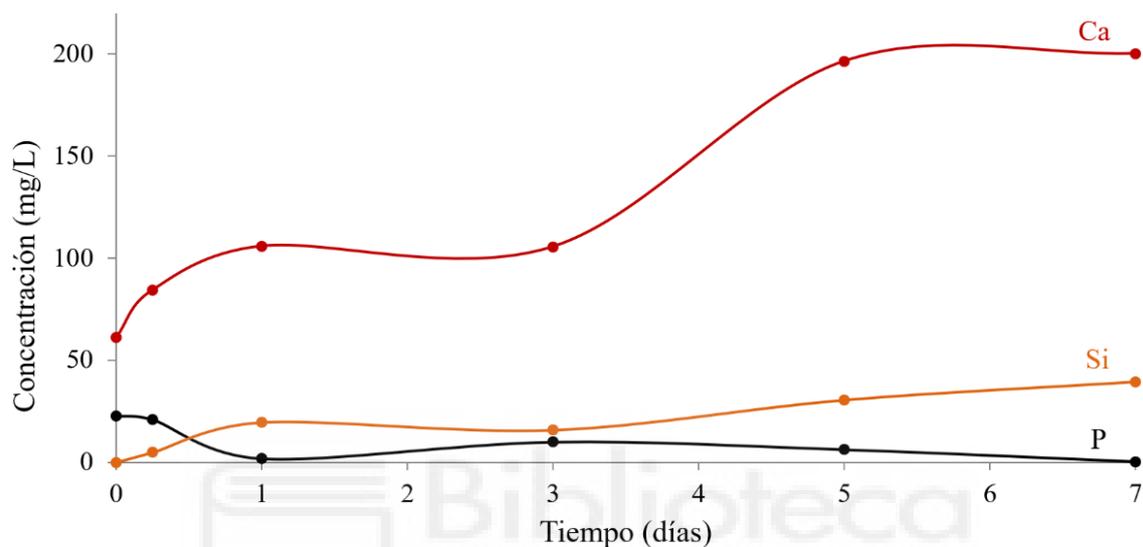


Figura 30: Variación en las concentraciones de los iones de Calcio, Silicio y Fósforo del SFA según el tiempo de inmersión de la muestra.

5. CONCLUSIONES

El proceso llevado a cabo en el presente trabajo, realizado en el IB-UMH, de síntesis y caracterización de un biomaterial cerámico ha permitido desarrollar con éxito andamios para implantes óseos. En concreto, se ha fabricado un material monofásico de Fase A, cuya composición es $7\text{CaO}\cdot\text{P}_2\text{O}_5\cdot 2\text{SiO}_2$, perteneciente al sistema $\text{C}_2\text{S-TCP}$. La técnica empleada para su obtención ha sido el método de esponja polimérica.

- ✓ Tras la síntesis de la biocerámica de Fase A, se comprobó su composición mineralógica mediante la caracterización por DRX. Además, se estableció como tiempo de molienda 1,5 horas para la obtención de un tamaño de partícula óptimo para la preparación del andamio.
- ✓ Para la elaboración de matrices tridimensionales con estructura porosa, se desarrolló un tratamiento térmico con el que se conseguía una adecuada resistencia y manipulabilidad de las esponjas.
- ✓ La caracterización de los andamios por DRX nos confirmó que la composición de la Fase A no se había visto alterada por la elaboración de las esponjas.
- ✓ El alto grado de porosidad del andamio pudo observarse gracias a la microscopía óptica. No obstante, fue el estudio de la microestructura mediante MEB-EDX, el cual, nos mostró la porosidad interconectada presente en los andamios, así como el rango de tamaño de poro entre 380-770 μm y de los puentes 165-290 μm . También se llevó a cabo un estudio de la microporosidad de la esponja a través de la porosimetría de mercurio, donde se observaron dos absorciones principales entre los diámetros de poros de 153 a 46,3 μm y de 4,2 a 1,78 μm . La composición química de los andamios se examinó con más detalle en la IRTF-RTA, cuyos resultados se relacionaron con los grupos de silicato y fosfato.
- ✓ Finalmente, se demostró mediante el estudio de bioactividad *in vitro* y el posterior análisis EEO-PAI una alta bioactividad de nuestro andamio. Después de tan solo 1 hora de inmersión, ya aparecieron en la superficie partículas esféricas blanquecinas de apatito. Aunque fue a los 3 días cuando la capa de precipitado

generada estaba presente en casi toda la superficie y a los 7 días cubría toda la superficie con un espesor considerable.

En definitiva, se ha demostrado que la Fase A preparada es un material bioactivo prometedor para su uso como sustituto óseo en la ingeniería tisular.



6. TRABAJOS FUTUROS

Son numerosos los trabajos futuros con los que podría continuarse este estudio. A continuación, se exponen algunos de ellos:

- ✓ En el futuro, sería conveniente mejorar la resistencia mecánica del andamio cerámico para favorecer así su función como soporte estructural.
- ✓ También, se podría comprobar si la capa que se genera en la superficie del andamio cerámico en SFA es realmente carbohidroxiapatito (CHA), realizando la Espectroscopía Infrarroja (IRTF-RTA) del precipitado.
- ✓ Además, sería interesante evaluar la biocompatibilidad mediante ensayos *in vitro* a partir del cultivo de células y comprobar si se logra la adhesión, extensión y proliferación celular.
- ✓ Por último, se podrían llevar a cabo estudios *in vivo* en animales de experimentación con el fin de determinar tanto la biodegradabilidad como la biocompatibilidad de la Fase A.

7. BIBLIOGRAFÍA

- [1] Pérez Díaz, J.; Abellán García, A.; Aceituno Nieto, P.; Ramiro Famiras, D. Un perfil de las personas mayores en España, 2020. Indicadores estadísticos básicos. Madrid, *Informes Envejecimiento en red*. 2020; 25:1-39.
- [2] Olmos Martínez, J.; Martínez García, J.; González Macías, J. *Revista Española de Enfermedades Metabólicas Óseas*. 2007; 16(1):1-7.
- [3] Moore Keith, L.; Agur Anne, M. R. Fundamentos de Anatomía con orientación clínica. *Editorial Médica panamericana*. 2003.
- [4] Florencio-Silva, R.; Sasso, GR.; Sasso-Cerri, E.; Simoes, MJ.; Cerri, PS. Biology of bone tissue: structure, function, and factors that influence bone cells. *BioMed Research International*. 2015.
- [5] Alonso González, L.; María Vásquez, G.; Fernando Molina, J. Epidemiology of osteoporosis. *Revista colombiana*. 2009; 16:61-75.
- [6] Lema, C.; Lo Huang, S.; Fernández, R.; González, Blanco M.; Ramos, D., Mastrolonardo, V. Osteoporosis posmenopáusica: calidad de vida. *Rev Obstet Ginecol Venez*. 2013; 73(4):251-260.
- [7] Huesos rotos, vidas rotas: guía para mejorar la atención a las fracturas por fragilidad en España. *International Osteoporosis Foundation (IOF)*. 2018.
- [8] Estrada, C.; Paz, A. C.; López, L. E. Ingeniería de tejido óseo: consideraciones básicas. *Revista EIA*. 2006; 5:93-100.
- [9] Álvarez, Barreto J. Regeneración ósea a través de la ingeniería de tejidos: una introducción. *Laboratorio de Ingeniería de Tejidos Humanos, Instituto de Estudios Avanzados IDEA. Revista de Estudios Transdisciplinarios*. 2009; 1(2).
- [10] Williams, DF. On the nature of biomaterials. *Biomaterials*. 2009; 30(30):5897-5909.

- [11] Sabino, M. A.; Loaiza M.; Dernowsek J.; Rezende R.; Da Silva J. Techniques for manufacturing polymer scaffolds with potencial applications in tissue engineering. *Revista Latinoamericana de Metalurgia y Materiales*. 2017; 37:1-27.
- [12] Mazon, P.; De Aza, PN. Porous scaffold prepared from α 'L-dicalcium silicate doped with phosphorus for bone grafts. *Ceram Int*. 2018; 44(1):537-45.
- [13] Wu, C.; Luo, Y.; Cuniberti, G.; Xiao, Y.; Gelinsky, M. Three-dimensional printing of hierarchical and tough mesoporous bioactive glass scaffolds with a controlable pore architecture, excellent mechanical strength and mineralization ability. *Acta Biomater*. 2011; 7:2644-50.
- [14] Ros-Tarraga, P.; Murciano, A.; Mazon, P.; Gehrke, S.; De Aza PN. New 3D stratified Si-Ca-P porous scaffolds obtained by sol-gel and polymer replica method: microstructural, mineralogical and chemical characterization. *Ceram Int*. 2017; 43(14):6548-53.
- [15] Lizarbe, M.A. Sustitutivos de tejidos: De los biomateriales a la ingeniería tisular. *Rev. Real Acad. Cienc. Exact. Fis. Nat*. 2007; 101:227-249.
- [16] Canillas, M. et al. Calcium phosphates for biomedical applications. *Sociedad Española de Cerámica y Vidrio*, 2017; 56(3):91-112.
- [17] Carlisle, E.M. Silicon: A possible factor in bone calcification. *Science*. 1970; 167:279-280.
- [18] Carlisle, E.M. Silicon: An essential element for chick. *Science*. 1972; 178:619-621.
- [19] Carlisle, E.M. A silicon requirement for normal skull formation in chicks. *J. Nutr*. 1980; 110:352-359.
- [20] Hench, LL.; Polak, JM. Third-generation biomedical materials. *Science*. 2002; 295(5557):1014-7.
- [21] Pena, P.; De Aza, S. Calculo termodinámico de los diagramas de fases. *Sociedad Española de Cerámica y Vidrio*. 2013; 19(5):333-339.

- [22] Nurse, R. W.; Welch, J. H.; Gutt, W. High-Temperature Phase Equilibria in the System Dicalcium Silicate-Tricalcium Phosphate. *Journal of the Chemical Society*. 1959; 00: 1077-1083.
- [23] Fix, W., Heymann, H., Heinke, R. Subsolidus relations in System $2\text{CaO}\cdot\text{SiO}_2\text{-}3\text{CaO}\cdot\text{P}_2\text{O}_5$. *Journal of the American Ceramic Society*. 1969; 52(6):346-347.
- [24] Rubio, V.; de la Casa-Lillo, M.A.; De Aza, S.; De Aza, P.N. The System $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2\text{-Ca}_2\text{SiO}_4$: The Sub-System $\text{Ca}_2\text{SiO}_4\text{-}7\text{CaOP}_2\text{O}_5\text{2SiO}_2$. *Journal of the American Ceramic Society*. 2011; 94(12):4459-62.
- [25] Martínez, I.M.; Velásquez, P.; De Aza, P.N. The Sub-System $\alpha\text{-TCPss-Silicocarnotite}$ Within the Binary System $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2\text{-Ca}_2\text{SiO}_4$. *Journal of the American Ceramic Society*. 2012; 95(3):1112-7.
- [26] Ros-Tárraga, P.; Mazón, P.; Meseguer-Olmo, L.; De Aza, P.N. Revising the Subsystem Nurses's A-Phase-Silicocarnotite within the System $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2\text{-Ca}_2\text{SiO}_4$. *Materials*. 2016; 9(5):322.
- [27] Martínez, I.M.; Velásquez, P.; De Aza, P.N. Synthesis and stability of α -tricalcium phosphate doped with dicalcium silicate in the system $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2\text{-Ca}_2\text{SiO}_4$. *Mater. Charact.* 2010; 61(7):761-767.
- [28] Liu, X.; Xie, Y.; Ding, C.; Chu, PK. Early apatite deposition and osteoblast growth on plasma-sprayed dicalcium silicate coating. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*. 2005; 74(3):356-65.
- [29] Liu, X.; Morra, M.; Carpi, A.; Li, B. Bioactive calcium silicate ceramics and coatings. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2008; 62(8):526-9.
- [30] Lugo, GJ.; Mazón, P.; Baudin, C.; De Aza, PN. Nurse's A-Phase: Synthesis and Characterization in the Binary System $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2\text{-Ca}_2\text{SiO}_4$. *Journal of the American Ceramic Society*. 2015; 98(10):3042-6.
- [31] De Aza, PN.; Mate-Sanchez de Val, JE.; Baudin, C.; Perez Albacete-Martínez, C.; Armijo Salto, A.; Calvo-Guirado, JL. Bone neoformation of a novel porous resorbable Si-Ca-P-based ceramic with osteoconductive properties: physical and mechanical

characterization, histological and histomorphometric study. *Clin Oral Implants Res.* 2016; 27(11):1368-1375.

[32] Bredig, M. A.; Heberling, F.; Földner H.; Beiträge zur Kenntnis der Kalk-Phosphorsäure-Verbindungen. *Z. Elektrochem.* 1932; 38:158-64.

[33] Schwartzwalder, K.; Somers, A.V. Method of making porous ceramic articles. *US3090094 A.* 1963.

[34] Diaz-Arca, A.; Mazón, P.; De Aza, P.N. Eutectoid scaffold as potential tissue engineer guide. *Journal of the American Ceramic Society.* 2019; 102(12):7168-7177.

[35] Kitsugi, T.; Nakamura, T.; Yamamuro, T.; Kokubo T.; Shibuya, T.; Takagi, M. SEM-EPMA observation of three types of apatite-containing glass ceramics implanted in bone: the variance of a Ca, P-rich layer. *J Biomed Mater Res.* 1987; 21:1255-71.

[36] Kokubo, T.; H. Kushitani, H.; Abe, Y.; Kitsugi, T.; Yamamuro, T. Apatite coatings on various substrates in simulated body fluids. *Bioceramics.* 1989; 2:235-242.

[37] Kokubo, T.; Kushitani, H.; Sakka, S.; Kitsugi, T.; Yamamuro, T. Solutions able to reproduce in vivo surface-structure change in bioactive glass-ceramic A-W. *J Biomed Mater Res.* 1990; 24:721-34.

[38] Kokubo, T. Bioactive glass ceramics: properties and applications. *Biomaterials* 1991; 12:155-63.

[39] Ohtsuki, C.; Kushitani, H.; Kokubo, T.; Kotani, S.; Yamamuro, T. Apatite formation on the surface of Ceravital-type glass-ceramic in the body. *J Biomed Mater Res.* 1991; 25:1363-70.

[40] Kokubo, T.; Takadama, H. How useful is SBF in predicting in vivo bone bioactivity? *Biomaterials.* 2006; 27:2907-2915.

[41] Retsch Molino planetario. Disponible en:

<https://www.retsch.es/es/productos/molienda/molinos-de-bolas/molinos-planetarios-bolas-pm-100/funcionamiento-caracteristicas/>.

- [42] Instrumentación Científico Técnica. Disponible en:
<http://www.ictsl.net/productos/aparatos/homogeneizadorporultrasonidoscy500.html>.
- [43] Bragg Lawrence, W. *The Dawn of X-ray Crystallography*. 1913.
- [44] Birkholz, M. *Thin Film Analysis by X-Ray Scattering*. WILEY-VCH. 2006; 00:1-378.
- [45] Brundle, C. R.; Evans C. A.; Wilson S. *Encyclopedia of Materials Characterization: Surfaces, Interfaces, Thin Films*. 1992.
- [46] De Santiago-Buey, C.; Estaire-Gepp, J. La porosimetría de mercurio. Fundamentos físicos, estado del arte, normativa, descripción del equipo y procedimiento experimental. *Centro de Estudios y Experimentación de Obras Públicas, CEDEX*. 2008; 00:1-88.
- [47] Quantachrome Instruments. Disponible en:
https://www.quantachrome.com/pdf_brochures/07128.pdf
- [48] Mondragón Cortez, P. Espectroscopía de infrarrojo para todos. *Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, A.C*. 2017.
- [49] Barraza-Garza, G.; de la Rosa, L. A.; Martínez-Martínez, A.; Castillo-Michel, H.; Cotte M.; Alvarez-Parrilla E. La microespectroscopía de infrarrojo con transformada de Fourier (FTIRM) en el estudio de sistemas biológicos. *Rev. latinoam. quím.* 2013; 41(3):125-148.
- [50] Thermo Fisher Scientific. Disponible en:
<https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/IQLAADGAAGFAHDMAZA>
- [51] Boss C.B.; Fredeen K. J. *Concepts, Instrumentation and Techniques in Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry*. Perkin Elmer Corporation. 1997.
- [52] Instrumentación EVISA. Disponible en:
<http://www.speciation.net/Database/Instruments/PerkinElmer-Inc/Optima-2000-DV-;i195>.

- [53] Ruíz-Aguilar, C.; Olivares-Pinto, U.; Aguilar-Reyes, E.A.; López-Juárez, R.; Alfonso, I. Characterization of β -Tricalcium Phosphate Powders Synthesized by sol-gel and Mechano-synthesis. *Sociedad Española de Cerámica y Vidrio*. 2018; 57(5):213-220.
- [54] Díaz-Arca, P.; Velasquez, P.; Mazón, P.; De Aza, P.N. Mechanism of in vitro reaction of a new scaffold ceramic similar to porous bone. *Journal of the European Ceramic Society*. 2020; 40(5):2200-2206.
- [55] Montanaro, L.; Jorand, Y.; Fantozzi, G.; Negro, A. Ceramic foams by powder processing. *J Europ Ceram Soc*. 1998; 18:1339-50.
- [56] Bruzauskaite, I.; Bironaite, D.; Bagdonas, E.; Bernotiene, E. Scaffolds and cells for tissue regeneration: different scaffold pore sizes-different cell effects. *Cytotechnology*. 2016; 68:355-69.
- [57] Karageorgiou, V.; Kaplan, D.; Porosity of 3D biomaterial scaffolds and osteogenesis. *Biomaterials*. 2005; 26:5475-91.
- [58] Zhang, J.; Luo, X.; Barbieri, D.; Barradas, A.; de Bruijn, JD.; van Blitterswijk, CA. et al. The size of surface microstructures as an osteogenic factor in calcium phosphate ceramics. *Acta Biomater*. 2014; 10(7):3254-63.
- [59] Fu, Q.; Saiz, E.; Rahaman, MN.; Tomsia, AP. Bioactive glass scaffolds for bone tissue engineering: state of the art and future perspectives. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 2011; 31(7):1245-56.
- [60] Handkea, M.; Sitarz, M.; Rokita, M.; Galuskin, E. Vibrational Spectra of Phosphate-Silicate Biomaterials. *J. Mol. Struc*. 2003:651-653:39-54.
- [61] Jilavenkatesa, A.; Condrate, R. A. The Infrared and Raman Spectra of β - and α -Tricalcium Phosphate ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$). *Spectrosc. Lett*. 1998; 31(8):1619-34.
- [62] Carrodegua, R. G.; De Aza, S. α -Tricalcium Phosphate: Synthesis, Properties and Biomedical Applications. *Acta Biomater*. 2011; 7:3536-46.

[63] Slosarczyk, A.; Paluszkiewicz, C.; Gawlicki, M.; Paszkiewicz, Z. The FTIR Spectroscopy and QXRD Studies of Calcium Phosphate Based Materials Produced from the Powder Precursors with Different Ca/P Ratios. *Ceram. Intern.* 1997; 23:297-304.

[64] Martinez, I. M.; Velasquez, P. A.; De Aza, P. N. Synthesis and Stability of α -Tricalcium Phosphate Doped with Dicalcium Silicate in the System $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2\text{-Ca}_2\text{SiO}_4$. *Mater. Charact.* 2010; 61:761-7.

[65] Puertas, F.; Treviño F. Examinations by Infrared Spectroscopy for the Polymorphs of Dicalcium Silicate. *Cement Concr. Res.* 1985; 15:127-33.

