

UNIVERSIDAD MIGUEL HERNÁNDEZ DE ELCHE



# OBTENCIÓN, CARACTERIZACIÓN Y BIOACTIVIDAD DE BIOCERÁMICAS MONOFÁSICAS

Departamento de Ciencia de Materiales Óptica y Tecnología Electrónica

Facultad CC. Experimentales

Grado en Biotecnología

**Autora:** Rocío González Molina

**Tutores:** Piedad N de Aza Moya

Patricia Mazón Canales

Curso 2014-2015

## ÍNDICE

<b>0. RESUMEN</b>	4
<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	6
1.1. CLASIFICACIÓN DE LAS BIOCERÁMICAS	6
1.2. MATRICES TRIDIMENSIONALES POROSAS	8
1.3. MECANISMO DE FORMACIÓN DE HIDROXIAPATITO EN BIOCERÁMICAS	10
1.4. BIOACTIVIDAD	11
1.4.1. Ensayos in vitro	11
1.4.2. Ensayos in vivo	12
1.5. CERÁMICAS MONOFÁSICAS	12
1.5.1. Fosfato tricálcico	12
1.5.2. Silicato dicálcico	12
1.5.3. Nurse's A Phase: $7\text{CaOP}_2\text{O}_5\text{2SiO}_2$	12
<b>2. OBJETIVOS</b>	13
<b>3. MÉTODOS Y TÉCNICAS EXPERIMENTALES</b>	14
3.1. TÉCNICAS DE PROCESAMIENTO	14
3.1.1. Homogenización	14
3.1.2. Prensado isostático	14
3.1.3. Molienda	14
3.1.4. Procesamiento térmico	14
3.1.5. Preparación de muestras para microscopía	14
3.2. TÉCNICAS DE CARACTERIZACIÓN	15
3.2.1. Difracción de rayos X (DRX)	15
3.2.2. Microscopía electrónica de barrido-Microanálisis de energía dispersiva de rayos X. (SEM-EDS)	16
3.3. ENSAYOS DE BIOACTIVIDAD "IN VITRO"	17
<b>4. ESTUDIO Y CARACTERIZACIÓN DE LOS MATERIALES: FOSFATO TRICÁLCICO, SILICATO DICÁLCICO, <math>7\text{CaOP}_2\text{O}_5\text{2SiO}_2</math></b>	19
4.1. FOSFATO TRICÁLCICO	19
4.1.1. Tratamientos térmicos	19
4.1.2. Difracción de rayos X	20
4.1.3. Microscopía electrónica de barrido-Microanálisis de energía dispersiva de rayos X.	21

4.2. SILICATO DICÁLCICO	21
4.2.1. Tratamientos térmicos	21
4.2.2. Difracción de rayos X	23
4.2.3. Microscopía electrónica de barrido-Microanálisis de energía dispersiva de rayos X.	23
4.3. NURSE'S A PHASE: $7\text{CaOP}_2\text{O}_52\text{SiO}_2$	24
4.3.1. Tratamientos térmicos	24
4.3.2. Difracción de rayos X	25
4.3.3. Microscopía electrónica de barrido-Microanálisis de energía dispersiva de rayos X.	26
<b>5. ENSAYOS DE BIOACTIVIDAD</b>	<b>27</b>
5.1. FOSFATO TRICÁLCICO	27
5.2. SILICATO DICÁLCICO	29
5.3. NURSE'S A PHASE: $7\text{CaOP}_2\text{O}_52\text{SiO}_2$	30
<b>6. CONCLUSIONES</b>	<b>32</b>
<b>7. PROYECCIÓN FUTURA</b>	<b>33</b>
<b>8. BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>34</b>



## RESUMEN

En los últimos años la ingeniería de tejidos juega un papel esencial en la regeneración de los tejidos dañados o enfermos, por lo que se están desarrollando matrices artificiales extracelulares altamente porosas que permiten el crecimiento de las células y la regeneración del tejido. En este sentido, uno de los materiales que más interés está generando como material de soporte en la ingeniería de tejido óseo son las cerámicas bioactivas, debido a que presentan una buena bioactividad gracias a que son capaces de establecer un enlace directo con el hueso sin la participación de tejido conectivo fibroso.

Con el objetivo de obtener estas matrices porosas, se empleó un porógeno, la celulosa, sobre tres materiales cerámicos monofásicos: fosfato tricálcico, silicato dicálcico y la fase A. A continuación, se les aplicó un tratamiento térmico para eliminar el porógeno y se procedió a su caracterización mediante Difracción de Rayos X (DRX) y Microscopía Electrónica de Barrido equipado con Espectroscopía Dispersiva de Energía de Rayos X (SEM-EDX). Finalmente, se analizó la bioactividad de estas estructuras porosas mediante estudios in vitro realizando inmersiones en suero fisiológico artificial (Symulated Body Fluid (SBF)) según el procedimiento introducido por Kokubo et al [1].

Los resultados ponen de manifiesto como la celulosa cambia la microestructura del material, pasando de un material compacto a una estructura porosa. Los ensayos de bioactividad han resultado positivos dado que los tres materiales presentan un depósito de hidroxiapatito en su superficie.

## ABSTRACT

In recent years, tissue engineering plays an essential role in the regeneration of damaged or diseased tissues, as artificial extracellular highly porous matrices are developing to allow cell growth and tissue regeneration. In this regard, one of the materials which is generating more interest as carrier material in the bone tissue engineering are the bioactive ceramics. They have a good bioactivity because they are able to establish a direct link with the bone without the fibrous connective tissue involvement.

In order to obtain these porous matrices it was employed a porogen, cellulose, on three single phase ceramic materials: tricalcium phosphate, dicalcium silicate and their mixture in a 2/1 molar ratio (C2S / TCP). Then, it applied a heat treatment to each of them to remove the porogen and proceeded to their characterization by X-ray diffraction (XRD) and Scanning Electron Microscopy equipped with Energy-Dispersive X-ray spectroscopy (SEM-EDX). Finally, the bioactivity of these porous structures was analyzed by in vitro studies doing inmersiones on Symulated Body Fluid (SBF) according to the procedure introduced by Kokubo et al [1]

The results show as the cellulose changes the microstructure of the material, from a compact material to a porous structure. Likewise the bioactivity assays have tested positive since all three materials exhibit a deposit of hydroxyapatite on the surface.



## 1. INTRODUCCIÓN

El hombre siempre ha tenido un gran interés en mejorar su calidad de vida, y por consiguiente, reparar cualquier tejido que se ha dañado, o ha sufrido mucho desgaste, lo que le ha llevado a buscar materiales capaces de sustituirlos o repararlos.

El empleo de algunos materiales para ciertas aplicaciones con un grado de adaptación relativamente aceptable, se remonta a hace miles de años, de hecho hace 2500 años los egipcios ya desarrollaron sofisticados implantes con fines de distinción social [2].

También se sabe que hace más de 2000 años, los chinos, fenicios, etruscos y aztecas ya empleaban oro para la cirugía dental. Las cerámicas también han sido empleadas desde hace muchos años, como demostró Amadeo Bobbio en 1972, al descubrir cráneos Mayas, que poseían dientes de nácar como sustituyente de piezas dentales.

La Ciencia de los Biomateriales no se desarrolló rigurosamente hasta bien entrado el siglo XX, en respuesta a ofrecer tratamientos paliativos a los accidentes causados en la segunda guerra mundial. Estos biomateriales, definidos como *“materiales sintéticos diseñados para cumplir una función cuando se implantan en un sistema vivo”* constituyen en la actualidad, un campo importantísimo para la investigación y el desarrollo.

Un aspecto de enorme importancia sobre la posible aplicación de los biomateriales es la necesidad de que tanto los componentes, como los productos que se generan en el proceso de biodegradación, tienen que ser biocompatibles, es decir, deben de tener la capacidad de dar una respuesta apropiada en una aplicación específica sin producir rechazo o respuesta tóxica.

Se pueden fabricar biomateriales con metales, cerámicas, polímeros, etc.

Los fosfatos cálcicos son los principales componentes minerales de los tejidos duros biológicos. En forma de carbohidroxiapatito, están presentes en hueso, dientes y tendones, dando a estos órganos estabilidad y fortaleza. Por lo tanto, las biocerámicas basadas en fosfato de calcio, tiene muchas aplicaciones clínicas en la reparación de defectos óseos, aumento de hueso, cementos óseos y en el revestimiento para implantes metálicos.

Una característica que tienen en común todas las cerámicas bioactivas, es la modificación cinética que sufre su superficie tras la implantación del material. La superficie forma una capa de carbohidroxiapatita biológicamente activa, proporcionando la interfaz de unión química con los tejidos vivos [3].

### 1.1. CLASIFICACIÓN DE LAS BIOCERÁMICAS

Las biocerámicas se definen como *“un material cerámico diseñado para lograr un comportamiento fisiológico específico al ser usado en la construcción de prótesis u órganos artificiales internos”* según la norma ISO/TR 10993-9 de 1994. Las biocerámicas son materiales

difíciles de producir, debido a las elevadas temperaturas necesarias para su elaboración, pero tienen una serie de ventajas por las cuales es interesante utilizarlas como biomateriales, entre las que destacan su inercia química, su excelente resistencia al desgaste, su alta resistencia a compresión y su excelente apariencia estética.

Las biocerámicas se pueden clasificar bajo diferentes criterios [2]:

- **Según el tipo de respuesta al tejido:**

- **Bioinertes:** Son aquellas biocerámicas “estables”. La respuesta biológica que producen, es la formación de una capsula de tejido fibroso, el cual hace que éstas queden aisladas del medio. Entre las biocerámicas bioinertes encontramos la alúmina, la zircona y los carbonos pirolíticos.
- **Bioactivas:** Tiene lugar una unión química entre éstas y el hueso, sin formación de tejido conectivo en medio. El único material capaz de unirse directamente al hueso es el hidroxapatito (HA), que es un compuesto similar a la fase mineral del hueso. El resto de los materiales biocerámicos bioactivos se unen al hueso a través de la formación previa de una capa de HA sobre su superficie.

Dentro de este grupo están los biovidrios, vitrocerámicas y cerámicas bioactivas de wollastonita, diposido, etc.

- **Biodegradables:** Se disuelven y se degradan, en el medio gradualmente, siendo sustituidas por el tejido que las rodea. Son materiales ideales siempre que permanezcan en el cuerpo el tiempo suficiente para que el tejido dañado se regenere, y que una vez se haya sanado, el tejido sustituya al material. El problema de este tipo de materiales, reside en su resistencia, la cual va disminuyendo a medida que se va reabsorbiendo el propio material. Pertenecen a este grupo los corales y los fosfatos cálcicos, como el fosfato tricálcico (TCP), fosfato tetracálcico, etc.

- **Según la aplicación final:**

- **Estructurales:** Son biocerámicas de gran resistencia mecánica, generalmente bioinertes. Encontramos dentro de este grupo a la alúmina y zircona.
- **No estructurales:** Son biocerámicas bioactivas o biodegradables, densas o porosas, con baja resistencia mecánica. En este grupo se encuentran el hidroxapatito (HA) y el TCP.

- **Según las características intrínsecas del material:**

- **Biocerámicas densas inertes:** Son biocerámicas con nula porosidad que se unen al hueso morfológicamente, de tres formas distintas: por crecimiento del tejido en las irregularidades superficiales del implante; por unión a través de un cemento, o por acoplamiento del

implante en el defecto mediante presión. Un ejemplo típico de este tipo de materiales es la alúmina.

- **Biocerámicas porosas inertes:** El biomaterial se une al hueso mecánicamente, con una fijación biológica, debido a que se produce el crecimiento del hueso a través de los poros de la biocerámica. Como ejemplo de este tipo de biocerámicas encontramos la alúmina policristalina porosa.
- **Biocerámicas densas o porosas bioactivas:** La unión al tejido óseo es de tipo químico, y la fijación biológica, ya que se produce por el crecimiento del hueso a través de los poros del implante. A este grupo pertenecen los biovidrios y las vitrocerámicas bioactivas.
- **Biocerámicas densas biodegradables:** El implante, lentamente es reemplazado por el hueso. A este grupo pertenecen el TCP y el sulfato cálcico.

## 1.2. MATRICES TRIDIMENSIONALES POROSAS

Tradicionalmente las lesiones óseas se trataban mediante cirugía reconstructiva, utilizando implantes autólogos, alogénicos o xenogénicos que implicaban grandes restricciones tanto de disponibilidad de tejido como desde el punto de vista inmunológico. Dadas las restricciones antes mencionadas, ha sido necesario el desarrollo de una disciplina científica, como la ingeniería de tejidos, que es capaz de desarrollar tejido viable para la implantación en el cuerpo humano y así mantener o recuperar la funcionalidad perdida.

La ingeniería tisular afronta el reto de solucionar los crecientes problemas del tejido óseo mediante la manipulación de matrices tridimensionales porosas (scaffolds) que hacen de soporte a las células osteogénicas [4]. En este sentido, para cumplir su cometido, las matrices deben reunir una serie de requisitos como son:

- **Osteogénesis:** Aunque todos los sustitutos óseos terminan siendo sustituidos por el hueso en mayor o menor grado, sólo el injerto autólogo de hueso se integra y desarrolla el proceso de formación ósea desde el primer momento.
- **Osteoconducción o capacidad del sustituto para que crezca el hueso desde los márgenes del defecto,** reabsorbiendo gradualmente la matriz implantada, como ocurre con los aloinjertos de hueso cortical y los biomateriales reabsorbibles. Para que se dé un proceso de osteoconducción adecuado, se precisa que el implante esté próximo al hueso vecino, permita la viabilidad de las células osteogénicas que crecen aprovechando sus poros y que haya una estabilidad entre el propio implante y el hueso vecino.
- **Osteoinducción:** Es la capacidad de un material para promover la transformación fenotípica de células indiferenciadas en osteoblastos.

- Osteopromoción: Es la propiedad de las sustancias que mejoran o estimulan la cascada natural de la reparación ósea.

Todos estos requisitos dificultan la obtención del material adecuado y muchos son los candidatos para cumplir esta misión [5].

El cumplimiento de todos estos objetivos de optimizar los resultados obtenidos mediante la ingeniería de tejidos, ha sido necesario ampliar el conocimiento sobre fisiología ósea, descartando la visión del hueso como estructura inerte. El esqueleto óseo tiene funciones tan imprescindibles como las de proteger órganos vitales, almacenar minerales y factores de crecimiento y albergar la médula ósea roja, encargada de generar las células sanguíneas. El componente inorgánico más importante que forma parte de los tejidos duros, como son los huesos, son los fosfatos cálcicos en forma de carbohidroxiapatito (CHA), que tiene dos funciones primarias: mecánicas y homeostáticas. Estos cristales de apatito refuerzan la matriz de colágeno, proporcionándole resistencia y rigidez al tejido, además sirven como un depósito de almacenamiento para el Ca, el Mg y los iones de fosfato inorgánico [6]. Por otra parte, los materiales basados en fosfatos cálcicos con sustituciones de Si son interesantes dentro de las aplicaciones ortopédicas y maxilofaciales gracias a su biocompatibilidad y su fuerte unión química directa con el hueso, es decir, su bioactividad, que da lugar a un crecimiento de tejido sano directamente sobre la superficie del material. Si al hecho de mejorar las propiedades osteogénicas le añadimos que se trata de materiales biodegradables, éstos proporcionan unos niveles adecuados de iones de Si, Ca y P a su ambiente biológico, permitiendo su sustitución por tejido nuevo [7, 8].

Se han realizado diversos estudios para intentar desarrollar poros en las biocerámicas densas para poder utilizarlas como soportes celulares en implantes. Un estudio realizado fue determinar el efecto sobre el crecimiento óseo de las interconexiones en hidroxiapatita y  $\beta$ -fosfato tricálcico. En este estudio se comprobó que un tamaño medio de poros de 20 micras solo permite la penetración celular y la formación de tejido condroide; sin embargo, los tamaños de los poros deben ser mayores de 50 micras para favorecer el crecimiento del hueso nuevo dentro de los mismos [9].

El método de colada a base de congelación de canfeno, donde se elimina el canfeno congelado mediante sublimación obteniendo canales de poros completamente interconectados. Se ha utilizado para obtener biocerámicas de hidroxiapatita altamente porosa [10].

Otro método, es mezclando metil celulosa con el material en forma de una suspensión acuosa. Las muestras se calientan lentamente, en una atmósfera de aire, a una temperatura suficientemente alta para compactar el material y eliminar la metil celulosa. Este proceso lo que permite es obtener una porosidad interconectada del orden de 60-90% con tamaños de poros que van desde 100 hasta 250 micras [11].

### 1.3. MECANISMO DE FORMACIÓN DE HIDROXIAPATITO EN BIOCERÁMICAS.

La unión entre la cerámica y el tejido óseo se lleva a cabo mediante una capa de carbohidroxiapatito (CHA) biológicamente activo sobre la superficie del material implantado, siendo ésta, tal vez, la única característica común de todos los materiales bioactivos que se conocen.

El mecanismo por el cual se forma la capa de CHA sobre las biocerámicas expuestas a medios fisiológicos fue propuesto por primera vez por Hench [12] y consta de las siguientes etapas:

- 1) Lixiviación con intercambio iónico de protones del medio fisiológico por iones lábiles modificadores de red ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ , etc.). El intercambio catiónico incrementa la concentración de grupos hidroxilo en la interfaz cerámica/solución, dando lugar a una elevación del pH hasta niveles del orden de 10,5 tal como ha sido demostrado por De Aza et al. [13] mediante medidas del pH interfacial con un microsensor (ISFET) en diferentes materiales bioactivos.
- 2) La elevación del pH facilita la disolución de la red y formación de grupos silanoles adicionales, así como, la pérdida de sílice soluble en forma de  $\text{Si}(\text{OH})_4$  que pasa a la disolución.
- 3) Polimerización de la capa rica en  $\text{SiO}_2$  mediante condensación de los grupos vecinos de Si-OH, dando lugar a una capa rica en sílice amorfa.
- 4) En esta etapa, se produce una migración de iones  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{PO}_4^{3-}$  a la superficie de la capa rica en sílice, formando un film amorfo rico en  $\text{CaO-P}_2\text{O}_5$  seguido por el crecimiento de dicho film debido a la incorporación de  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{PO}_4^{3-}$  procedentes de la disolución.
- 5) Cristalización del film amorfo de  $\text{CaO-P}_2\text{O}_5$  por incorporación de los aniones  $\text{OH}^-$ ,  $\text{CO}_3^{2-}$ , o F desde la disolución para formar un carbohidroxiapatito o un fluorcarbohidroxiapatito.

Frente al mecanismo descrito por Hench, hoy en día parece admitirse como innecesaria la migración de los iones calcio y fosfato a través de la capa de sílice amorfa (etapa 4ª), para facilitar la nucleación de los iones calcio y fosfato procedentes del medio fisiológico. Además, las cerámicas bioactivas basadas en CaO,  $\text{SiO}_2$  son capaces de formar una capa de apatito sobre su superficie cuando son sumergidas en suero fisiológico artificial (SFA), lo que indica que el material no necesita tener P en su estructura para producir HA [14].

Posteriormente, Kokubo et al. [15] consideraron que los grupos silanoles formados en la superficie del material son los responsables de la formación de la capa de CHA al proporcionar sitios favorables para su nucleación y crecimiento.

### 1.4. BIOACTIVIDAD

Para que un material sea utilizado en un implante ha de caracterizarse por tener una alta biocompatibilidad.

A nivel mundial existen tres tipos de normas, unas de carácter general para materiales y dispositivos, otras específicas para un tipo determinado de material, y por último, los que se refieren a un método de ensayo concreto.

#### **1.4.1. Ensayo “in vitro”**

Los ensayos “in vitro” centran sus ensayos en cultivos celulares o en fluidos fisiológicos [16].

Los ensayos en cultivos celulares para evaluar la biocompatibilidad del material vienen siendo empleados desde hace varias décadas, hasta el punto que se han generado bancos de células para la realización de dichos ensayos. Raramente se usan las células primarias (salvo los eritrocitos en ensayos de hemólisis) porque presentan menos reproducibilidad en el ensayo y, en algunos casos, disponibilidad.

Los ensayos realizados en cultivos celulares son de toxicidad, donde se miden los efectos tóxicos del material en el cultivo, tales como, alteraciones en la permeabilidad de la membrana celular, inhibiciones enzimáticas,... Los cultivos de proliferación y adherencia celular sobre un sustrato del material a estudiar proporcionan información sobre las características de la superficie de éste. Estudios de biodegradación o mutagénesis por parte de los cultivos frente al material completan los ensayos “in vitro” más utilizados con células.

Para obtener la respuesta y el comportamiento de los distintos materiales en un ambiente que se asemeje al de los fluidos biológicos, en el interior del cuerpo humano, se realizan ensayos en fluidos biológicos.

Los ensayos en suero fisiológico artificial (SFA) recrean las condiciones de composición y pH existentes en el cuerpo humano, lo que permite extrapolar, y conocer de antemano, el comportamiento del material al ser implantado. Otro ensayo con fluido corporal sería el realizado con saliva humana parotidea.

#### **1.4.2. Ensayos “in vivo”**

Estos ensayos tienen como objetivo medir la respuesta del huésped frente al material, es decir la respuesta al tejido adyacente y en particular su unión determinaran como de bueno es el material para su inserción [17]. Existen cuatro tipos de respuestas que puede provocar el tejido adyacente al implante:

- El tejido circundante se necrosa, por lo que el material es tóxico.
- Se forman varias capas de tejido fibroso irregular que aíslan al material, no hay necrosis y no se forma unión química, el enlace es únicamente físico. El material es inerte.
- La prótesis se ancla mediante un enlace químico al tejido, por lo que el material es bioactivo.
- Biodegradable: Un material biodegradable no es tóxico y se disuelve al colocarlo en el medio biológico. La composición del material debe ser tal que pueda ser disuelto químicamente por los fluidos fisiológicos, o bien consumido por los macrófagos.

## 1.5. CERÁMICAS MONOFÁSICAS

### 1.5.1. Fosfato tricálcico

El fosfato tricálcico es el material para implantes óseos más conocido entre los compuestos de fosfato de calcio. Se utiliza en cerámicas de sustitución ósea, recubrimientos de prótesis metálicas, cementos y materiales compuestos [2].

La fórmula química del fosfato tricálcico es  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ , tiene una relación molar Ca/P de 1,5. Pertenece a la familia de las Whitlockitas que corresponden a la fórmula general  $(\text{Ca},\text{Mg})_3(\text{PO}_4)_2$ , en la cual el calcio puede ser sustituido total o parcialmente por magnesio ( $\text{Mg}^{+2}$ ).

El fosfato tricálcico, existe en cuatro isoformas diferentes, de las cuales todas, salvo el  $\alpha$ -TCP, se utilizan como biomaterial.

El  $\alpha$ -TCP puede ser retenido a temperatura ambiente en un estado metaestable, y su gama de estabilidad está fuertemente influenciada por las sustituciones iónicas. Al igual que el  $\beta$ -TCP, es biocompatible, pero más soluble, e hidroliza rápidamente hidroxapatita deficiente en calcio, lo que lo convierte en un componente útil para la preparación de materiales biocerámicos biodegradables y materiales compuestos para la reparación ósea [18].

### 1.5.2. Silicato dicálcico

Desde el descubrimiento del Bioglass por Hench y sus colaboradores en los años 70, varios tipos de vidrios y vitrocerámicas de silicato, tales como los vidrios bioactivos, y las vitrocerámicas AW, han sido investigadas como posibles biomateriales para reparación y sustitución ósea. Los resultados de dichas investigaciones muestran cómo los biomateriales que contienen CaO y  $\text{SiO}_2$  presentan una excelente bioactividad y poseen la capacidad de unión al hueso vivo y a los tejidos blandos.

Además, los estudios realizados por Lamy y col. y Liu y col. han demostrado que el silicato dicálcico ( $\text{Ca}_2\text{SiO}_4$ ) en forma de recubrimiento por plasma en sustratos de aleaciones de titanio, presenta una buena bioactividad [19,20]. También el  $\text{C}_2\text{S}$  es una fase importante del cemento Portland, modificado a MTA (mineral trióxido agregado), para prótesis cementadas ampliamente utilizado en odontología [21].

### 1.5.3. Nurse's A phase: $7\text{CaO}\cdot\text{P}_2\text{O}_5\cdot 2\text{SiO}_2$

La Fase A, más conocida como la fase de Nurse o Nurse's A phase, corresponde a la composición estequiométrica  $7\text{CaO}\cdot\text{P}_2\text{O}_5\cdot 2\text{SiO}_2$ , pero no debe ser confundida con el mineral de la misma composición química identificado como Nagelschmedita (fase R), ya que poseen la misma estructura asociada a la solución sólida continua a alta temperatura  $\gamma\text{-C}_2\text{S}\text{-}\alpha'\text{-TCP}$ . Para evitar confusiones en la nomenclatura el término Nagelchsmedita puede ser extendido para describir todo el rango de ( $\gamma\text{ C}_2\text{S}\text{-}\alpha'\text{-TCP}$ )ss [22]. La Fase A transforma directamente a R a  $1350^\circ\text{C} \pm 20^\circ\text{C}$ , observándose que es un material que se restringe a un campo muy pequeño, menor del 1% alrededor de los 47,38% en peso en el sistema  $\text{C}_2\text{S}\text{-TCP}$  [23].

## 2. OBJETIVOS

Con el presente proyecto se persigue un propósito de gran incidencia social, como es la mejora de la salud y la calidad de vida de la población a través del diseño y obtención de materiales biocerámicos monofásicos porosos que podrían ser empleados como implantes óseos.

De entre todas las técnicas que existen para obtener matrices tridimensionales porosas se optó por la utilización de un porógeno, en nuestro caso, celulosa, que posteriormente se eliminó mediante un tratamiento térmico adecuado, permitiendo de esta forma, que en el lugar donde se encontraba la celulosa, se forme un poro.

Los objetivos principales son:

### 1. Obtención de tres tipos de biocerámicas monofásicas:

- El primer material desarrollado fue el fosfato tricálcico ( $\alpha$ -TCP), cuya bioactividad ha sido ampliamente demostrada.
- El segundo material, fue el silicato dicálcico ( $C_2S$ ) ya que se ha demostrado que el silicio juega un importante papel en el crecimiento óseo, y es capaz de aumentar la bioactividad de otros materiales.
- Finalmente se desarrolló su intermedio, la fase A, más conocido como la fase de Nurse o Nurse's A phase, correspondiente a la composición  $7CaO \cdot P_2O_5 \cdot 2SiO_2$ .

2. Caracterización de los materiales obtenidos mediante difracción de rayos X y Microscopía electrónica de barrido-Microanálisis de energía dispersiva de rayos X (SEM-EDX).
3. Realización de ensayos de bioactividad de los materiales obtenidos mediante su inmersión en suero fisiológico artificial (SFA)
4. Caracterización del precipitado de HA mediante Microscopía electrónica de barrido-Microanálisis de energía dispersiva de rayos X (SEM-EDX).

### **3. MÉTODOS Y TÉCNICAS EXPERIMENTALES**

#### **3.1. TÉCNICAS DE PROCESAMIENTO**

##### **3.1.1. Homogenización**

Es una técnica que se emplea para mezclar los compuestos utilizados para la elaboración de la muestra. Se utilizó para ello una capsula de porcelana, donde se introdujo los compuestos en polvo, los cuales se mezclaron, empleando para ello acetona y una varilla de vidrio. Cuando la muestra consiguió una adecuada homogeneidad, se introdujo en la estufa, para que la acetona se evaporara. Esto se realizó en tres ocasiones, asegurando una correcta homogenización.

##### **3.1.2. Prensado Isostático**

En primer lugar se preparó la muestra. Para ello el material se introdujo en gomas de látex, primero en una goma de un número superior y luego sobre esta goma otra de un número inferior evitando de esta forma que el aceite de la prensa entrase en contacto con el material.

La muestra se introdujo en la prensa, que disponía de una bomba que aumenta la presión del aceite que hay en su interior, permitiendo de esta forma que el material se prensé isostáticamente.

La prensa isostática que se empleó fue la de la empresa ASTUR SINTER, S.L, que posee una bomba manual de ultra-alta presión de la empresa ENERPAC 11-400 A 1204 C.E. Esta prensa está compuesta por un cierre superior, una válvula de presión, una bomba de diafragma, un tanque de almacenamiento de fluido (aceite) y un elevador neumático.

Para prensar las muestras se empleó una presión de 20000 bares durante 20 minutos, consiguiendo de esta forma una compactación de la muestra uniforme en todas las direcciones, obteniéndose así un sinterizado más uniforme.

##### **3.1.3. Molienda**

Se empleó para moler la muestra el mortero de ágata. El material se trituró, y molió con ayuda de acetona, reduciendo de esta forma el tamaño de grano. Luego para que se evaporase la acetona, se introdujo en la estufa. Esto se repite dos veces.

##### **3.1.4. Procesamiento térmico**

Para realizar los tratamientos térmicos de las muestras se utilizó el horno de alta temperatura de tipo vertical de la marca ENTECH referencia EEF 1/17 Elevator furnace.

Este tipo de hornos, alcanzan una temperatura máxima de 1650 °C, gracias a que disponen de elementos calefactores de silicio de molibdeno. Este horno tiene un panel digital (JUNMO IMAGO 500) que permite programar los distintos tratamientos, controlando de esta forma, la temperatura, los tiempos de subida, mantenimiento y bajada de temperatura.

##### **3.1.5. Preparación de muestras.**

La preparación de las muestras se dividió en los siguientes pasos:

- **Cortar:** En primer lugar hay que cortar una pastilla del material lo más plano posible para que luego pudiera verse de forma correcta en el SEM. Para ello se empleó una cortadora de precisión que posee un disco de diamante.
- **Embutir:** La muestra obtenida, se embutió en moldes, con resina epoxi. En los casos en que la muestra es muy porosa, esta se embute al vacío con el fin de rellenar todos los poros con la resina, evitando de esta manera que pueda romperse durante los posteriores procesos.
- **Pulir:** La fase de desbastado se realiza mediante el sistema modular “tegrasystem” de “STRUERS”, con una pulidora-desbastadora “TagraPol-15” equipada con un brazo, en el que se montaron discos abrasivos. El abrasivo que se empleó para el desbastado de las muestras cerámica fue el de Carburo de Silicio, para eliminar la rugosidad, y obtener de esta forma una superficie más uniforme. Luego estas muestras se pulieron con el disco Dur y después con el disco Mol, empleando para ello sus respectivos lubricantes.
- **Ataque:** El último paso consiste en el ataque mediante una disolución al 1% en volumen de ácido acético en agua a diferentes tiempos, dependiendo del material a atacar. El ataque mediante ácido afecta en diferente medida a los distintos cristales, fases y límites de grano de la muestra, por lo que se consigue revelar su superficie.

## 3.2. TÉCNICAS DE CARACTERIZACIÓN

### 3.2.1. Difracción de rayos X

En el año 1895 el físico Wilhelm Conrad Röntgen, descubrió que del ánodo de los tubos de rayos catódicos con los que trabajaba, salían emanaciones, a las que denominó rayos X. Este descubrimiento tuvo gran importancia tanto en el desarrollo sucesivo de la ciencia como en sus aplicaciones prácticas.

Dada la propiedad de los rayos X de atravesar sustancias y de ser absorbidos de distinta manera por diferentes sustancias dependiendo de su composición y densidad, fueron inmediatamente aplicados a lo que después se llamó radiografía. Como es bien sabido los rayos X se utilizan ampliamente en la medicina, así como en la industria para la correcta fabricación de materiales [24].

Los rayos X se definen como una radiación electromagnética de longitud de onda corta producida por la desaceleración de electrones de elevada energía o por transiciones electrónicas que implican electrones de los orbitales internos de los átomos. El intervalo de longitudes de onda de los rayos X va desde aproximadamente  $10^{-6}$  nm hasta alrededor de 10 nm.

Actualmente la difracción de rayos X se emplea con fines analíticos, siendo la única técnica capaz de resolver con toda evidencia las estructuras cristalinas o la diferenciación de formas alotrópicas o isomórficas.

El fundamento del método de difracción de rayos X, como demostró Max von Laue en 1912, radica en que un cristal es una distribución regular en el espacio de sus átomos, iones o moléculas constituyentes y que la distancia entre ellos es del mismo orden de magnitud que la longitud de onda de los rayos X, por lo que los cristales, de acuerdo con las leyes ópticas, pueden producir fenómenos de difracción de la radiación característica.

El espacio que hay entre dos átomos vecinos en una red cristalina actúa como pequeños agujeros por los que la luz pasa y produce la difracción.

Posteriormente al descubrimiento de Laue, W.L. Bragg, desarrolló una explicación alternativa a la de Laue, que resultó ser más sencilla.

Cuando una haz monocromático de rayos X llega a un cristal con un ángulo de incidencia  $\Theta$ , para que la radiación reflejada esté en concordancia de fase y por lo tanto de lugar a la difracción (con interferencias constructivas y destructivas), es necesario que la diferencia de recorrido de dos rayos sea, múltiplo de la longitud de onda [25].

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

El difractor de Rayos X que se utilizó para la caracterización de materiales en el presente proyecto es el modelo D8 ADVANCE de la casa BRUKER AXS.

### **3.2.2. Microscopía electrónica de barrido (SEM). Microanálisis de energía dispersiva de rayos X (EDX)**

El SEM permite generar figuras de una superficie, con una alta resolución y una apariencia tridimensional dentro de un intervalo amplio de aumentos. Una de las funciones más importantes es que permite realizar microanálisis para determinar la presencia cualitativa y/o cuantitativa de elementos en detalles microscópicos [26].

El SEM proporciona figuras y datos físico-químicos de la superficie de cuerpos generalmente opacos a los electrones, por medio de un delgadísimo haz de electrones que recorre dicha superficie y de detectores que transducen las señales que de ella emanan, transformándolas en corrientes eléctricas que se emplean en formar una figura en un monitor.

Las figuras principales producidas en el SEM son:

- i. Figuras de electrones secundarios.
- ii. Figuras de electrones retrodispersados.

Algunas colisiones son elásticas de modo que algunos electrones del haz primario pueden salir de la superficie de la muestra sin una significativa pérdida de energía, estos son los llamados electrones retrodispersados. Pero la mayoría de las colisiones son inelásticas y, entre otros efectos, originan emisión de electrones de baja energía conocidos como electrones secundarios [27].

El SEM tiene un rango de aumentos que va desde x10 hasta x200.000, y depende de la relación entre las dimensiones de la figura final y el área de la muestra. Los electrones acelerados incidentes pueden tener una energía de entre 500 eV hasta 50 KeV.

Para poder utilizado se requiere muy poco en lo que respecta a la preparación de las muestras, a excepción de que las muestras deben ser compatibles con el uso del vacío. Si la muestra es conductora no hay problema alguno. El problema reside en si es aislante, pero en este caso, el material se recubre con una película conductora de carbono, oro o algún otro metal. En nuestro caso se empleó para ello paladio.

El microscopio empleado va equipado con un detector de dispersión de rayos X, que se basa en la captura de fotones de alta energía que emite cada elemento al ser bombardeado por el haz primario de electrones, permitiéndonos obtener una información detallada de los átomos que forman parte de la muestra.

El microscopio electrónico de barrido que se utilizó en el presente proyecto fue el modelo S-3500 de HITACHI, con un poder de resolución de 30Å y equipado con un detector de dispersión de rayos X de la casa Oxford Link Analytical, que permite conocer los elementos que constituyen un área de la muestra y además, de forma semicuantitativa, el porcentaje de cada uno de los elementos involucrados en la superficie de la misma. El sistema permite realizar el análisis de todo el área que se encuentre bajo observación en el microscopio al cual está acoplado, y además se pueden seleccionar puntos específicos en el área observada correspondientes a la amplificación elegida, teniéndose entonces la posibilidad de analizar puntos tan pequeños como 1µm o aún áreas menores, dependiendo de las características que la muestra posea.

### **3.3. ENSAYOS DE BIOACTIVIDAD**

La finalidad del ensayo “in vitro” es poder observar la bioactividad de los distintos materiales sinterizados mediante su inmersión en SBF a distintos intervalos de tiempo. Para realizar el ensayo de bioactividad “in vitro”, se preparó SBF por disolución en agua miliQ de cloruro de sodio (NaCl), cloruro de potasio (KCl), bicarbonato de sodio (NaHCO<sub>3</sub>), hidrogenofosfato de potasio trihidratado (K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O), cloruro de magnesio hexahidratado (MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O) y cloruro de calcio (CaCl<sub>2</sub>), tamponado a un pH de 7,25 con trihidroximetil aminometano (Ca<sub>4</sub>H<sub>11</sub>O<sub>3</sub>N) y ácido clorhídrico (HCl) [1].

Las concentraciones de iones de SBF se muestran en la Tabla 1.

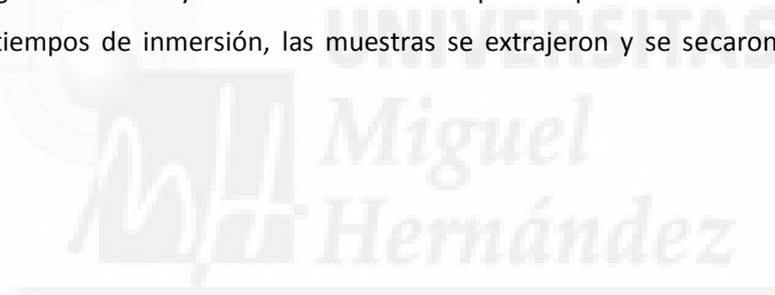
Iones	Suero humano (mM)	SBF (mM)
Na <sup>+</sup>	142	142
K <sup>+</sup>	5	5
Mg <sup>2+</sup>	1,5	1,5
Ca <sup>2+</sup>	2,5	2,5
Cl <sup>-</sup>	103	148,8
HCO <sup>3-</sup>	13,5	4,2
HPO <sub>4</sub> <sup>-2</sup>	1	1

Tabla 1. Concentraciones de los iones del suero humano y SBF.

En 50 ml de dicho suero, en tubos de Falcon a la temperatura del cuerpo humano (36,6 °C) y con agitación periódica, se introdujeron muestras de los materiales sinterizados de aproximadamente 1 centímetro de grosor.

Los botes con las muestras se agitaron todos los días, para evitar sobresaturación del medio. A pesar de esta agitación el ensayo se denomina estático puesto que el suero no se cambia.

Tras los tiempos de inmersión, las muestras se extrajeron y se secaron previamente a su caracterización.



#### 4. ESTUDIO Y CARACTERIZACIÓN DE LOS MATERIALES: FOSFATO TRICÁLCICO, SILICATO DICÁLCICO Y $7\text{CaOP}_2\text{O}_5\text{2SiO}_2$ .

##### 4.1. FOSFATO TRICÁLCICO

###### 4.1.1. Tratamientos térmicos

Hay varios métodos para obtener TCP. Para la realización del presente trabajo se obtuvo TCP por reacción en estado sólido a partir de los óxidos de partida [28], de esta forma podemos obtener el material de una forma mucho más económica. Para preparar el material se partió de:

- Carbonato cálcico ( $\text{CaCO}_3$ ), de la marca Fluka.
- Hidrogenofosfato cálcico ( $\text{CaHPO}_4$ ), de la marca Panreac.



Las cantidades se pesaron en una balanza con un error de aproximadamente 0,0001 g. La mezcla se homogenizó con acetona en una cápsula de porcelana. Después de evaporar la acetona en la estufa, se procedió a realizar el tratamiento térmico correspondiente para obtener el polimorfo  $\alpha$ -TCP. El material se calentó con una rampa de subida de dos horas hasta 1550 °C, y se mantuvo a esta temperatura durante 3 horas. Seguidamente se realizó un “quenching” con nitrógeno líquido para enfriar rápidamente el material, y conseguir de esta forma que la fase de TCP a alta temperatura fuera estable a temperatura ambiente.

Finalizado el tratamiento térmico, se procedió a realizar un DRX para comprobar qué polimorfismo de TCP se había obtenido.

Obtenido el material, se molió y mezcló con celulosa con una relación del 70% en peso de TCP - 30% en peso de celulosa. La mezcla se homogenizó con acetona y se prensó isostáticamente. Posteriormente se le aplicó un tratamiento térmico, con el objetivo de eliminar la celulosa y generar una estructura porosa. El material se calentó a 900 °C con una rampa de subida de 2 horas, y se mantuvo a esta temperatura durante 5 horas, posteriormente se llevó a 1400 °C con una rampa de subida de 1 hora y se mantuvo a esta temperatura durante 5 horas. Una vez finalizado se apagó el horno y se dejó enfriar libremente (Figura 1).

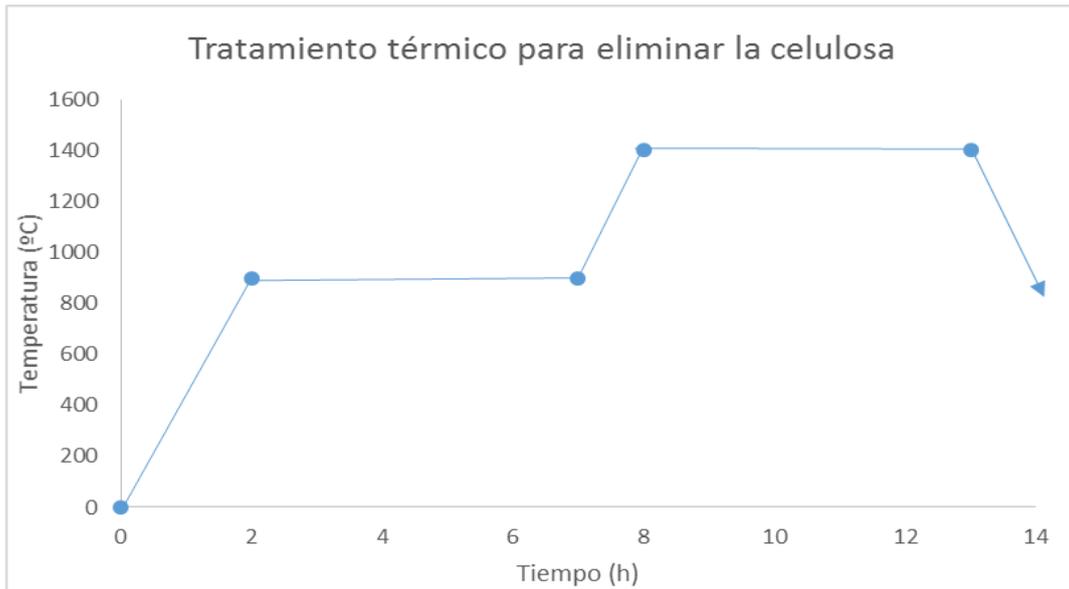


Figura 1. Tratamiento térmico para eliminar la celulosa del TCP.

#### 4.1.2. Difracción de rayos X.

En primer lugar, se muestran los resultados de la caracterización del material desde el punto de vista mineralógico. En las Figuras se pueden ver los difractogramas realizados al material una vez sinterizado (Figura 2A) y después de haber eliminado la celulosa del material (Figura 2B).

Se observa cómo el tratamiento térmico que se ha empleado para eliminar la celulosa, no produce ningún efecto sobre la composición mineralógica del material, pues sigue siendo el polimorfo alfa.

Según la ficha PDF: 09-0348, todos los picos corresponden a la fase  $\alpha$ -TCP, demostrando de esta forma que el material se encuentra en equilibrio metaestable.

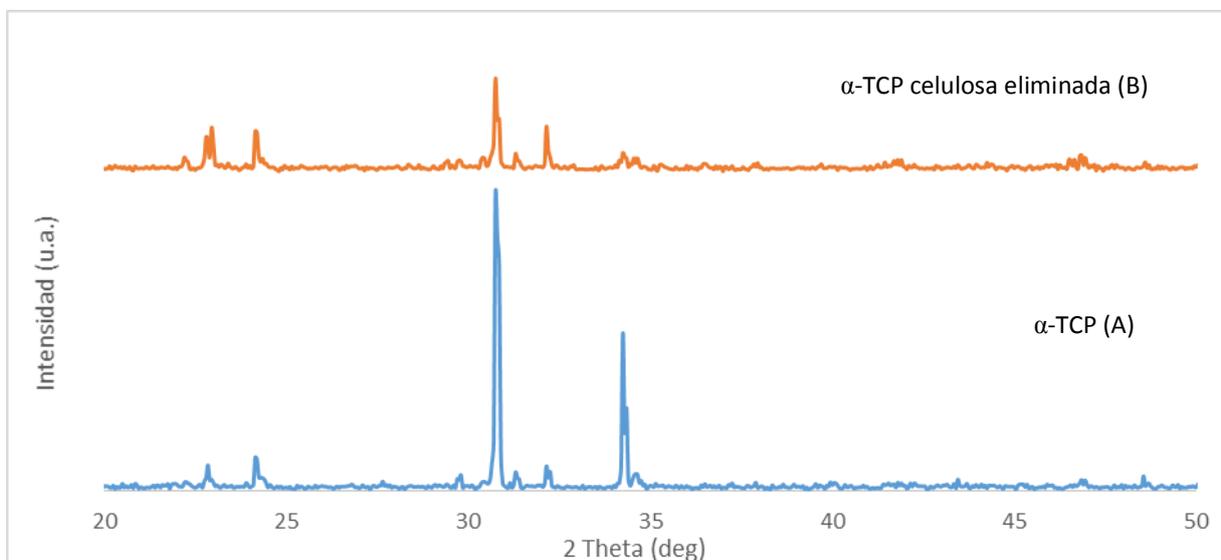


Figura 2. (A) Difractograma del  $\alpha$ -TCP sinterizado y (B) del  $\alpha$ -TCP después de eliminar la celulosa.

#### 4.1.3. Microscopía electrónica de barrido-Microanálisis de energía dispersiva de rayos X.

En segundo lugar, se realizó una caracterización de la microestructura del material obtenido antes (Figura 3) y después de la eliminación de la celulosa (Figura 4). En la Figura 3 se muestra una microfotografía de SEM del  $\alpha$ -TCP, en la cual se puede apreciar que el material obtenido era monofásico.

Comparando ambas Figuras se puede ver cómo al eliminar la celulosa, el material presenta unos huecos de mayor tamaño, observándose una matriz que no posee una estructura uniforme.

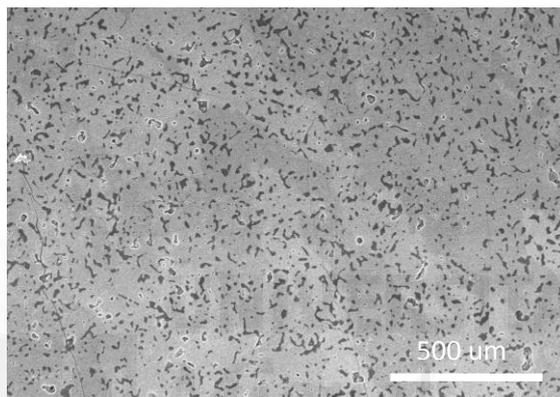


Figura 3. Microfotografía de la microestructura del  $\alpha$ -TCP.

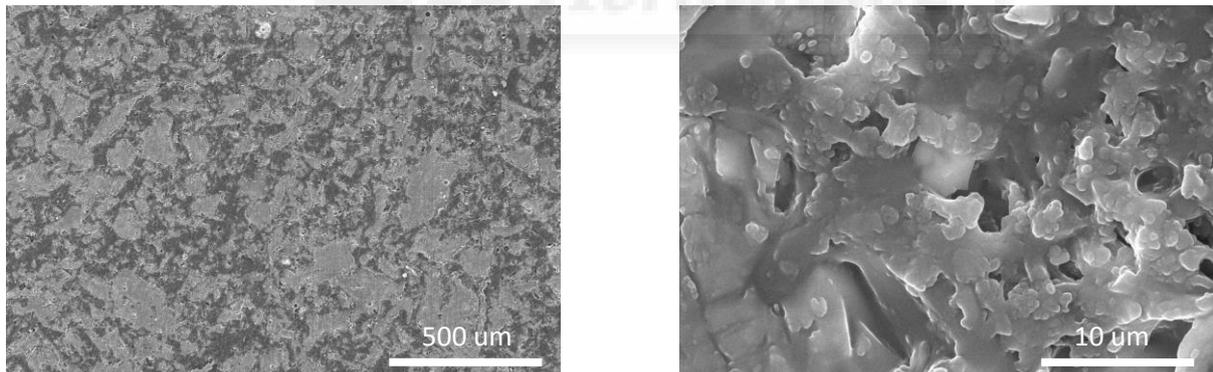


Figura 4. Microfotografías de la microestructura del  $\alpha$ -TCP después de eliminar la celulosa.

## 4.2. SILICATO DICÁLCICO

### 4.2.1. Tratamientos térmicos

Para sintetizar el  $\text{C}_2\text{S}$  por reacción en estado sólido a partir de óxidos [28], se empleó las cantidades estequiométricas de los siguientes compuestos de partida:

- Carbonato cálcico,  $\text{CaCO}_3$ , de la marca Fluka.
- Óxido de silicio,  $\text{SiO}_2$ , de la marca Strem Chemicals.

Se pesó las correspondientes cantidades estequiométricas, y se homogenizó la mezcla con acetona. Luego a la muestra se le aplicó un tratamiento térmico de 12 horas a 1000 °C en el horno para descarboxilarla.

Una vez finalizó el tratamiento térmico de descarboxilación, se molió y prensó isostáticamente, y se le aplicó el correspondiente tratamiento térmico. Se le programó una rampa de subida de 5 horas hasta 1525 °C se mantuvo a esa temperatura durante 12 h, con su posterior rampa de bajada de 5 horas.

Una vez obtenido el material, se procedió a realizar el mismo procedimiento que con el TCP. Se mezcló con celulosa con una relación del 70% en peso de  $C_2S$  - 30% en peso de celulosa. La mezcla se homogenizó con acetona y se prensó. Posteriormente se le aplicó el tratamiento térmico, mediante el cual se eliminó la celulosa. El material se calentó a 900 °C con una rampa de subida de 2 horas, y se mantuvo a esta temperatura durante 5 horas, posteriormente se llevó a 1100 °C con una rampa de subida de 2 horas y se mantuvo a esta temperatura durante 5 horas (Figura 5).

Sin embargo, no se obtuvo el material bien consolidado con esta relación de peso, por lo que se procedió a comprobar si disminuyendo la cantidad de celulosa empleada y realizando el mismo tratamiento térmico, se podía obtener el material bien consolidado. Se utilizó por lo tanto, una relación del 80% en peso de  $C_2S$  - 20% en peso de celulosa, a la cual se le aplicó el mismo tratamiento térmico. Con esta relación en peso, tampoco fue posible obtener una buena consolidación, puesto que el material se rompió al ser manipulado. Por dicho motivo, se probó realizar la mezcla con una relación del 90% en peso de  $C_2S$  - 10% en peso de celulosa, al que se le aplicó el mismo tratamiento térmico. Finalmente se obtuvo  $C_2S$  bien consolidado.

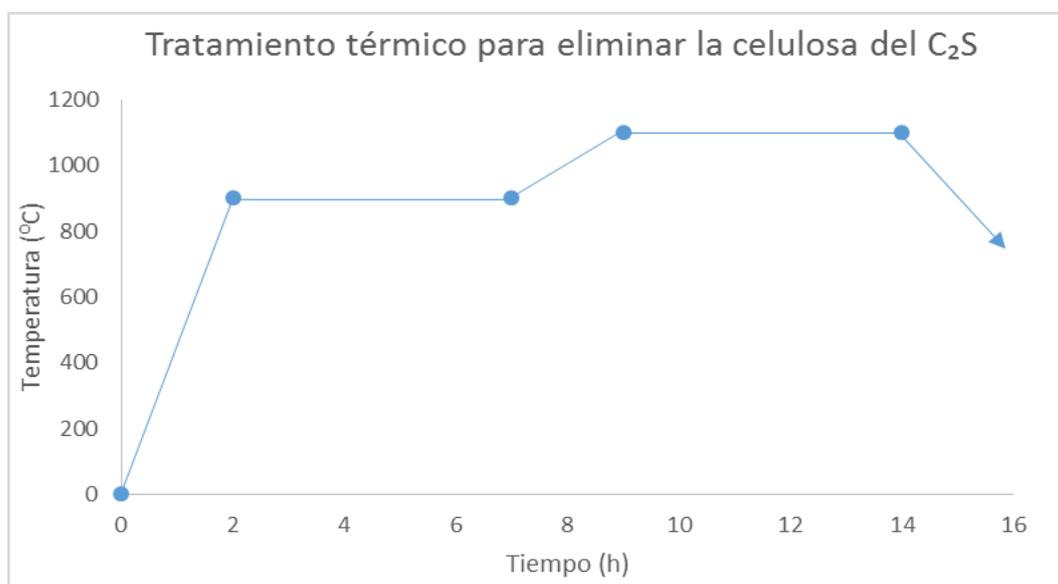


Figura 5. Tratamiento térmico para eliminar la celulosa.

#### 4.2.2. Difracción de rayos X.

A continuación se presentan los resultados de la caracterización del material desde el punto de vista mineralógico. Se realizó dos DRX, uno al material sin mezclarse con celulosa, y otro después de su eliminación (Figura 6A y 6B).

Como se puede apreciar en la Figura 6, el tratamiento térmico que se empleó para eliminar la celulosa no hace variar la composición mineralógica del material.

Según la ficha PDF: 87-1257 todos los picos corresponden a la fase  $\gamma$ -C<sub>2</sub>S, obteniéndose la forma polimórfica de baja temperatura.

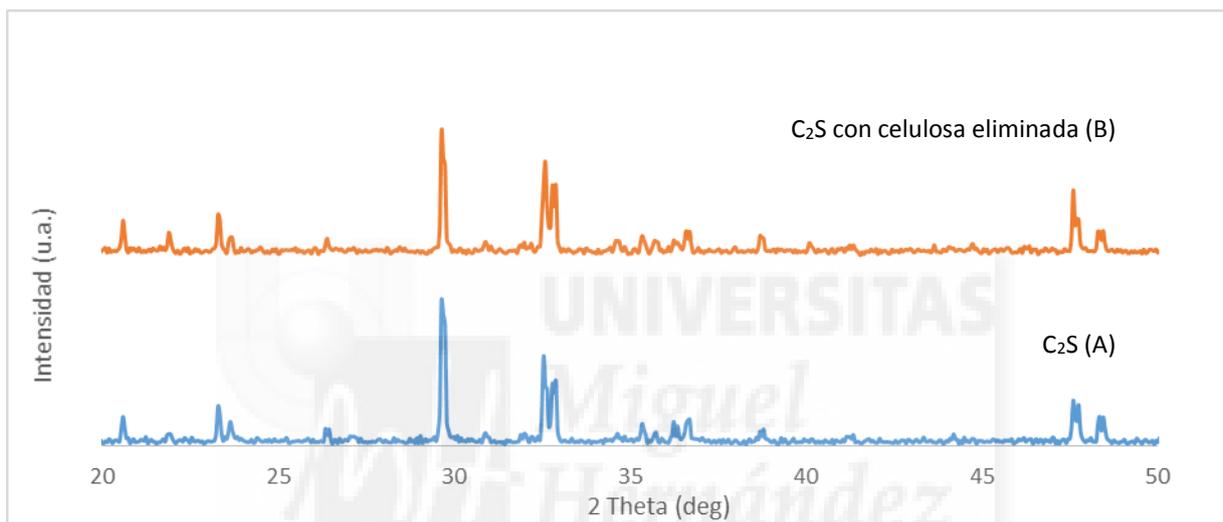


Figura 6. (A) Difractograma del  $\gamma$ -C<sub>2</sub>S sinterizado y (B) del  $\gamma$ -C<sub>2</sub>S después de eliminar la celulosa

#### 4.2.3. Microscopía electrónica de barrido-Microanálisis de energía dispersiva de rayos X.

Se realizó una caracterización de su microestructura.

Se vio en el SEM las Figuras que se muestran a continuación. La Figura 7 corresponde al  $\gamma$ -C<sub>2</sub>S antes de la eliminación de la celulosa, y en la Figura 8 se aprecia los pequeños hueco que generó la eliminación de la celulosa.

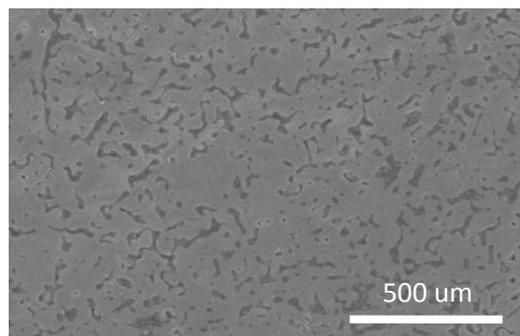


Figura 7. Microfotografía del  $\gamma$ -C<sub>2</sub>S antes de eliminar la celulosa

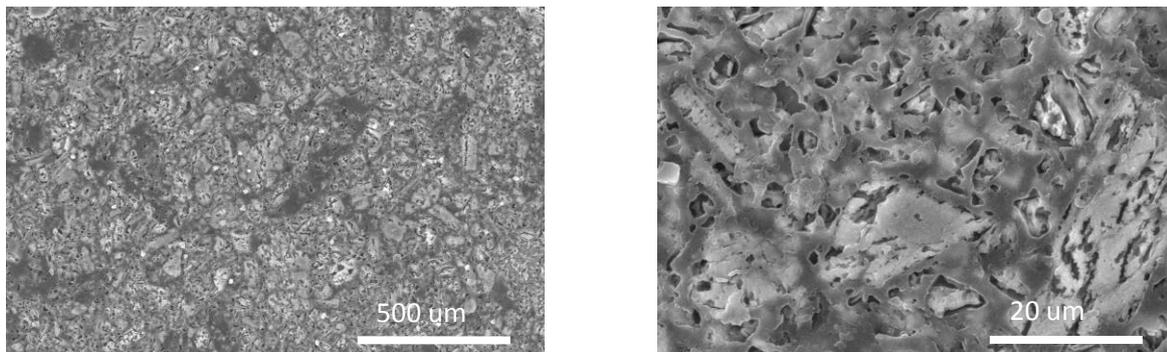


Figura 8. Microfotografías de la microestructura del  $\gamma$ - $C_2S$  después de eliminar la celulosa.

### 4.3. NURSE'S A PHASE: $7CaOP_2O_5 \cdot 2SiO_2$

#### 4.3.1. Tratamientos térmicos.

Para obtener la Fase A, por reacción en estado sólido a partir de los óxidos de partida [28], se partió de una mezcla estequiométrica de los siguientes compuestos:

1. Óxido de silicio,  $SiO_2$ , de la marca Strem Chemicals.
2. Carbonato cálcico,  $CaCO_3$ , de la marca Fluka.
3. Hidrogenofosfato cálcico ( $CaHPO_4$ ), de la marca Panreac.

La mezcla de los compuestos nombrados se homogenizó con acetona en una cápsula de porcelana. Después se procedió a realizar el tratamiento térmico correspondiente para obtener la fase A (Figura 9). El material se calentó con una rampa de subida de hora y media hasta  $1300\text{ }^\circ\text{C}$ , y se mantuvo a esta temperatura durante 3 horas. Luego se bajó la temperatura a  $1200\text{ }^\circ\text{C}$  con una rampa de bajada de media hora y se mantuvo a esa temperatura durante 24 h y se dejó enfriar.

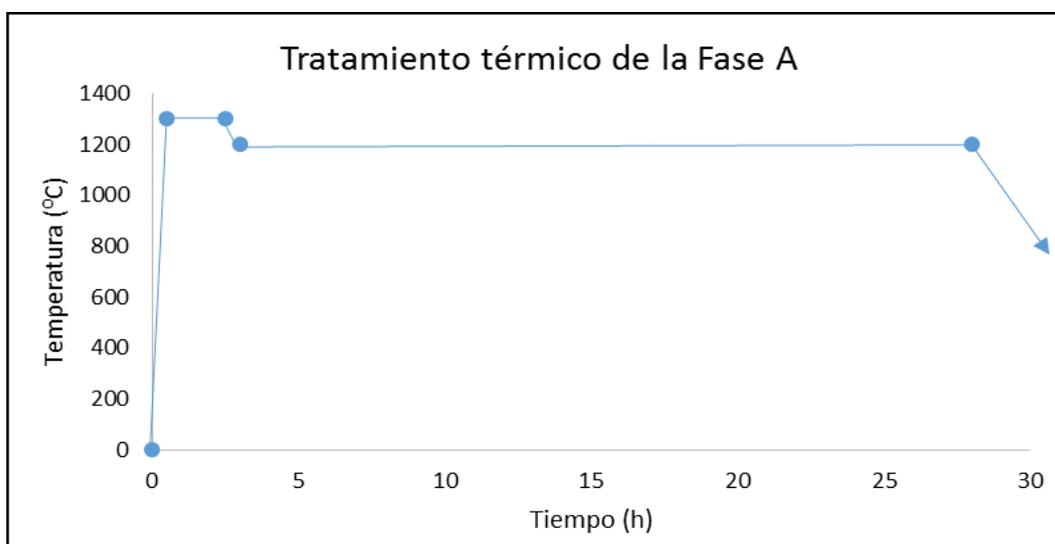


Figura 9. Tratamiento térmico de la fase A.

La fase A, se molió y se mezcló con celulosa con una relación en peso del 70% - 30% de fase A y celulosa respectivamente. A esta mezcla, se le aplicó el correspondiente tratamiento térmico para la eliminación de la celulosa. Para ello, se calentó a 900 °C con una rampa de subida de 2 horas, y se mantuvo a esta temperatura durante 5 horas, posteriormente se llevó a 1200 °C con una rampa de subida de 3 horas y se mantuvo a esta temperatura durante 5 horas (Figura 10).

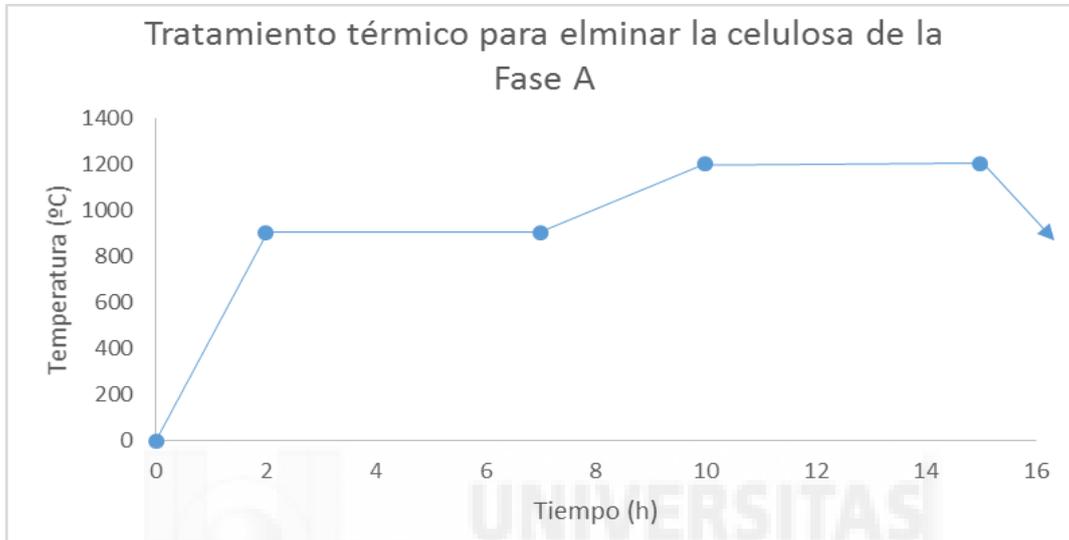


Figura 10. Tratamiento térmico para eliminar la celulosa

#### 4.3.2. Difracción de rayos X.

En la siguiente Figura podemos ver los resultados del DRX realizado a la fase A. La Figura 11A corresponde al difractograma de la fase A cuando no se ha mezclado con celulosa, y la Figura 11B representa el difractograma de la fase A una vez mezclada y eliminada la celulosa.

Según la ficha PDF: 11-0676 todos los picos corresponden a la fase A:  $7\text{CaOP}_2\text{O}_5\text{2SiO}_2$ , obteniéndose un material monofásico.

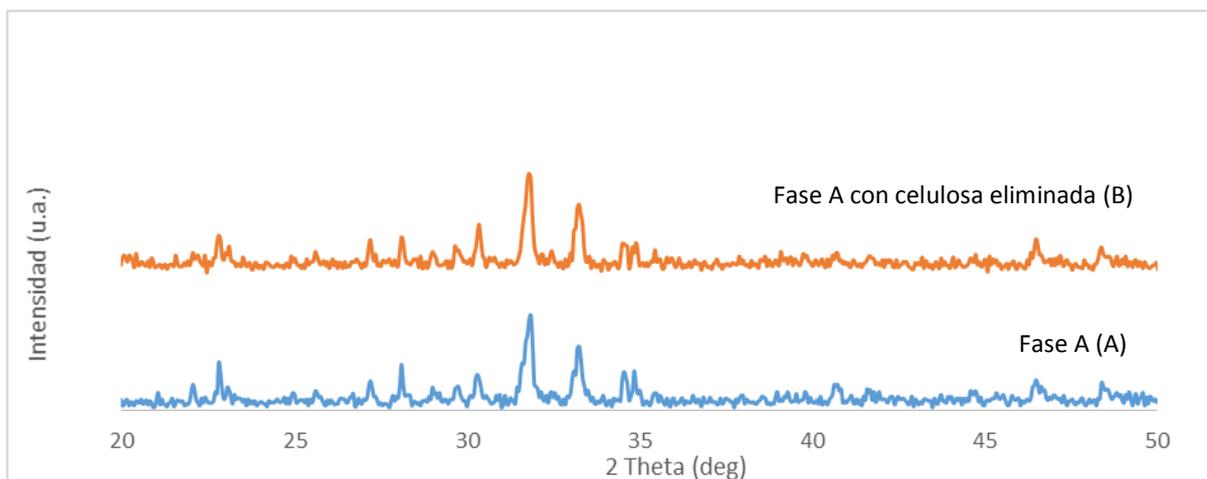


Figura 11. (A) Difractograma de la Fase A sinterizada y (B) de la Fase A después de eliminar la celulosa.

#### 4.3.3. Microscopía electrónica de barrido-Microanálisis de energía dispersiva de rayos X.

Luego se realizó una caracterización microestructura de la fase A obtenida antes (Figura 12) y después de la eliminación de la celulosa (Figura 13). Comparando las Figuras se puede ver cómo al eliminar la celulosa del material, éste presenta unos huecos de mayor tamaño, observándose una matriz que no posee una estructura uniforme.

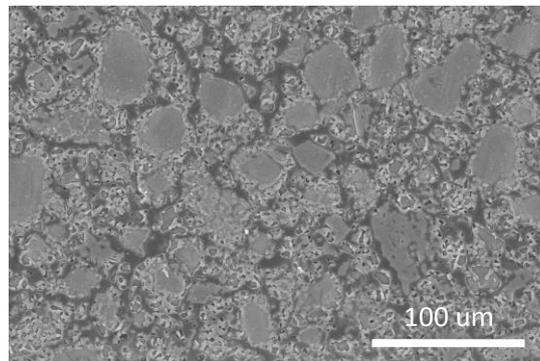


Figura 12. Microfotografía de la fase A antes de eliminar la celulosa

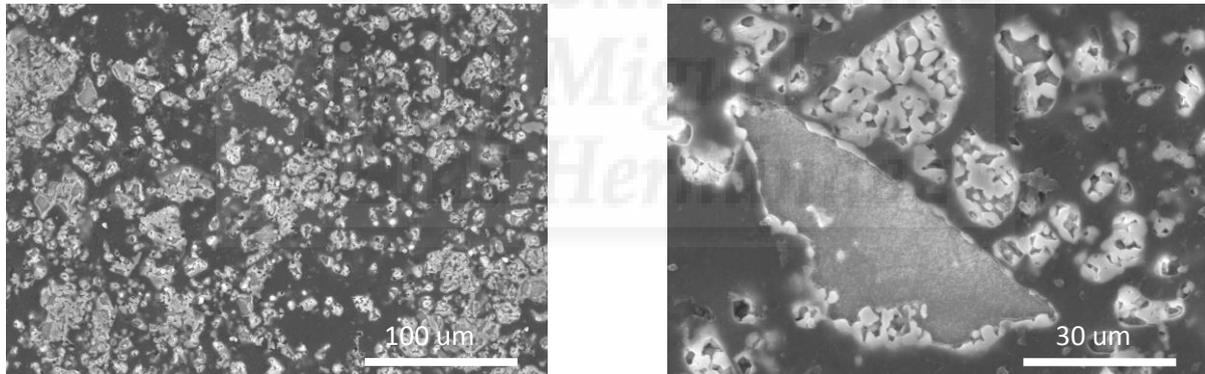


Figura 13. Microfotografías de la microestructura de la Fase A después de eliminar la celulosa.

## 5. ENSAYO DE BIOACTIVIDAD

Una vez eliminada la celulosa de los materiales, se cortó discos de unos 10 mm para sumergirlos en SBF a diferentes tiempos, con el fin de saber si se producía la formación de hidroxiapatito en la superficie del material. Los tiempos que se emplearon para cada material fueron los siguientes:

- El  $\alpha$ -TCP se ensayó a 1 día, 3 días, 5 días, 7 días, 14 días y 21 días.
- El  $\gamma$ -C<sub>2</sub>S y la fase A se ensayaron a 6 horas, 1 día, 3 días, 5 días y 7 días

Una vez pasados los correspondientes tiempos, se sacaron las muestras y se dejaron secar.

### 5.1 FOSFATO TRICÁLCICO

- **1, 3 y 5 días en SBF**

En la Figura 14.A, 14.B y 14.C se muestra una microfotografía pasados 1, 3 y 5 días de inmersión en SFB, respectivamente. Tras un día de inmersión no se encuentra ningún cambio aparente en la superficie del material. Pasados tres días, se aprecia como empiezan a formarse pequeñas partículas esféricas blanquecinas aisladas, y cómo al cabo de cinco días éstas crecen en número y en tamaño, con una distribución irregular.

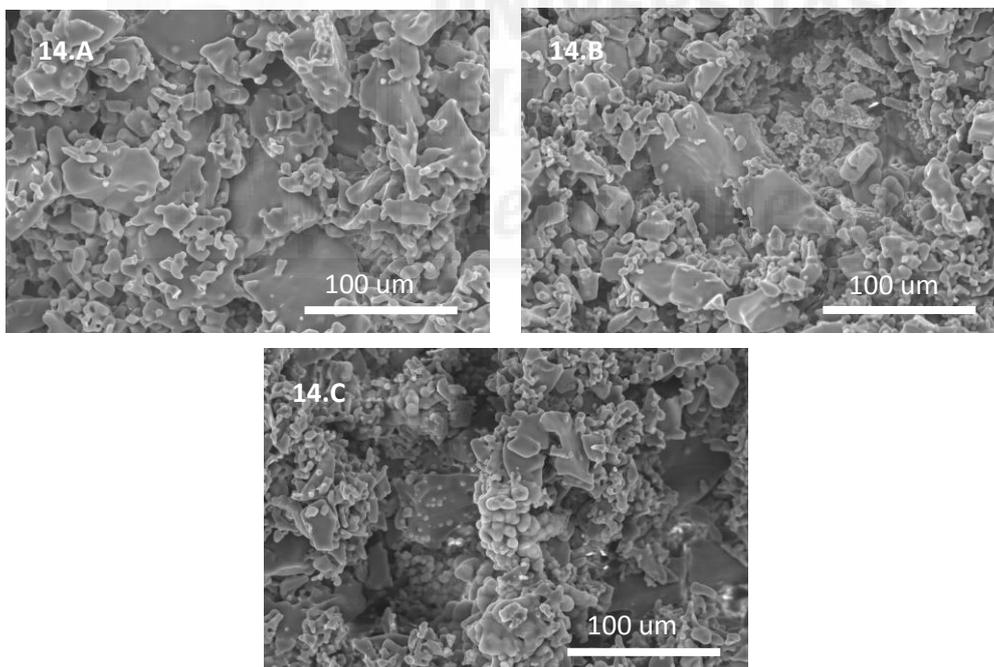


Figura 14. Microfotografía SEM del TCP en SBF durante 1 día (14.A), 3 días (14.B) y 5 días (14.C)

Los resultados del EDX sobre la superficie del material, muestran que la relación Ca/P es de aproximadamente 1,5 lo que nos confirma que el material que estamos viendo es TCP. Los EDX realizados sobre las pequeñas partículas son de una relación Ca/P ligeramente superior a la de la superficie.

- **7 y 14 días en SBF**

Pasados 7 y 14 días de inmersión en SBF (Figura 15.A y 15.B respectivamente), se genera sobre la superficie del TCP un precipitado blanquecino, resultado de la fusión y aglomeración de las partículas esféricas blanquecinas mencionadas anteriormente. Se puede apreciar cómo se aglomeran en distintas zonas de la superficie, por lo que hay zonas en las que podemos seguir viendo la superficie original del material.

Esto se comprueba con los resultados del EDX realizados sobre la superficie, ya que estos nos muestran una relación Ca/P de aproximadamente 1,5.

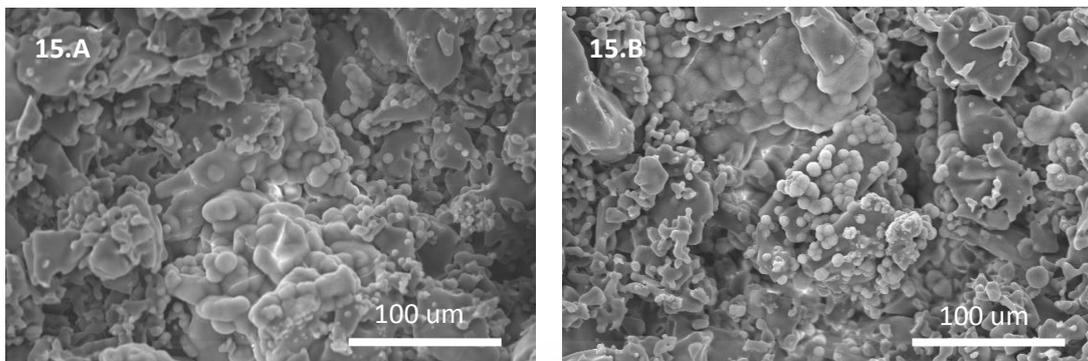


Figura 15. Microfotografía SEM del TCP durante 7 (15.A) y 14 (15.B) días.

- **21 días en SBF**

En la Figura 16 se observa como en casi toda la superficie del material se ha generado un precipitado. La formación de este precipitado no es de forma homogénea en todo el material, ya que hay zonas donde apenas hay, y zonas donde las estructuras esféricas propias de este precipitado han aumentado en gran medida de tamaño, y se han fusionado unas con otras, originando grandes aglomerados.

Los resultados del EDX realizados en la superficie del precipitado nos sugieren que se está formando un tipo de apatito, puesto que la relación Ca/P resultante es de 1,64 por lo que es probable que estemos ante la formación de hidroxiapatito (HA), el cual tiene una relación Ca/P de 1,67.

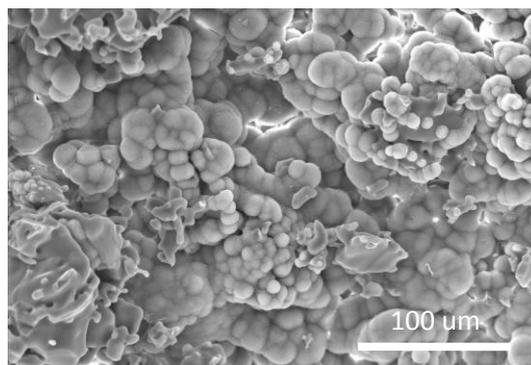


Figura 16. Microfotografía SEM del TCP 21 días en SBF.

## 5.2. SILICATO DICÁLCICO

- **6 horas y 1 día en SBF**

En las siguientes microfotografías (Figura 17) se observa las muestras de silicato dicálcico una vez pasadas 6 horas (17.A) y un día (17.B) en SBF.

Se aprecia la formación de pequeñas partículas esféricas blanquecinas en la superficie del material. Estas partículas no recubren toda la superficie, puesto que se puede apreciar zonas donde no aparecen.

Los resultados del EDX del fondo de la muestra indica la presencia de silicio, calcio y fósforo. Sin embargo, el EDX del precipitado indica que la cantidad de fósforo detectado es mayor pasado un día, aumentando de 4,01 % a 30,53 %, y un drástico descenso en el silicio detectado, pasando de 31,76 % a 9,32 %.

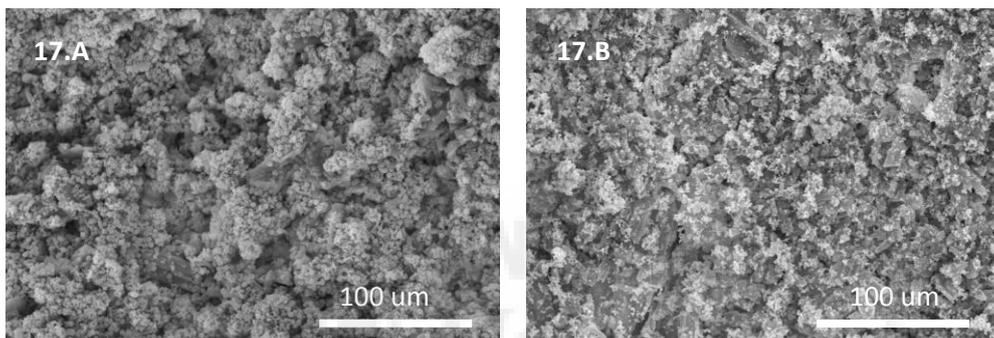


Figura 17. Microfotografías SEM del  $\gamma$ -C<sub>2</sub>S durante 6 horas (17.A) y 1 día (17.B) en SBF.

- **3 y 5 días en SBF**

Pasados 3 y 5 días de su inmersión en SBF, el silicato dicálcico muestra en su superficie como las pequeñas partículas esféricas mencionadas anteriormente, han aumentado en cantidad y tamaño, pasando de 0,5  $\mu\text{m}$  a un tamaño medio de 1/1,3  $\mu\text{m}$ , llegándose a fusionar unas con otras hasta formar un precipitado blanquecino en toda la superficie del material.

Los resultados del EDX realizados en la superficie del material nos sugieren que el grosor de esta capa de precipitado no es muy espesa, puesto que aún se detecta el silicio correspondiente a la superficie original del C<sub>2</sub>S. El grosor es mayor a los 5 días ya que la cantidad de silicio detectado disminuye, indicando además que el material se está lixiviando.

Los resultados del EDX del depósito formado muestran una relación Ca/P próxima a la del hidroxiapatito, 1,67 dando a entender que la capa de precipitado corresponde a este tipo de apatito.

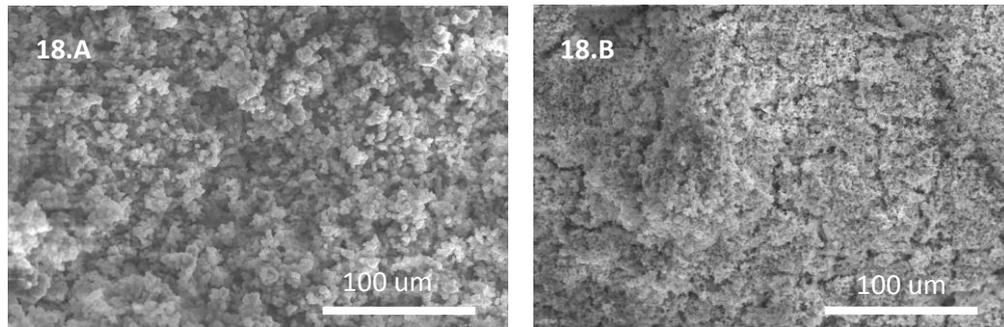


Figura 18. Microfotografía SEM del Y-C<sub>2</sub>S durante 3 (18.A) y 5 días (18.B) días en SBF.

- **7 días en SBF**

En la Figura 19 se observa un aumento del tamaño de las partículas esféricas y como estas se han fusionado hasta generar un precipitado blanquecino que cubre completamente toda la superficie del material.

El EDX realizado a la superficie del precipitado nos da una relación Ca/P de 1,78. Esta relación es mayor que la que tiene el HA, que como se ha mencionado anteriormente es de 1,67. Esto sugiere que el apatito que se ha generado en la superficie del C<sub>2</sub>S corresponde a carbohidroxiapatito (CHA), el cual posee una relación Ca/P superior a la que tiene el HA.

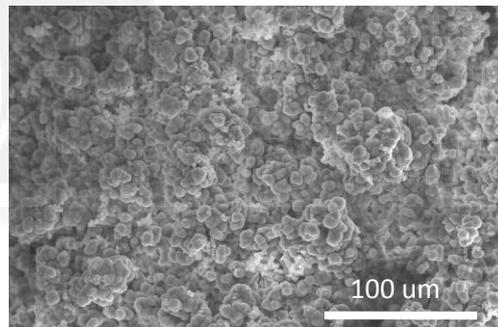


Figura 19. Microfotografía SEM del Y-C<sub>2</sub>S durante 7 días en SBF.

### 5.3. NURSE'S A PHASE: 7CaOP<sub>2</sub>O<sub>5</sub>2SiO<sub>2</sub>

- **6 horas, 1 y 3 días en SBF**

En la microfotografía (Figura 20) se observa la formación de pequeñas partículas esféricas blanquecinas aisladas. A las 6 horas de inmersión en SBF de la fase A (20.A), empiezan a aparecer de forma muy dispersas estas partículas. A medida que aumenta el tiempo de inmersión, aparecen más cantidad de ellas, viéndose a los 3 días (20.B) que la superficie del material está completamente cubierta, e incluso han empezado a aglomerarse y a fusionarse unas con otras hasta llegar a formar una capa de precipitado.

Los resultados del EDX de la superficie del material correspondiente a las 6 horas de inmersión, muestran la presencia de calcio, fósforo y silicio. El porcentaje de silicio detectado en la

superficie de la fase A disminuye en gran medida al día de inmersión, pasando de 13,48% a 2,08% esto es debido a que estamos analizando la composición de las partículas, y al cubrir el material casi por completo no se detecta el silicio. De hecho, tanto al día como a los tres días, la relación Ca/P obtenida de las partículas esféricas es de 1,6 lo que da a entender la formación de un tipo de apatito, que posee una relación Ca/P muy próxima a la del hidroxiapatito, 1,67. La capa de precipitado que se genera a los tres días, posee un grosor considerable puesto que el EDX no detecta el silicio de la superficie original del material.

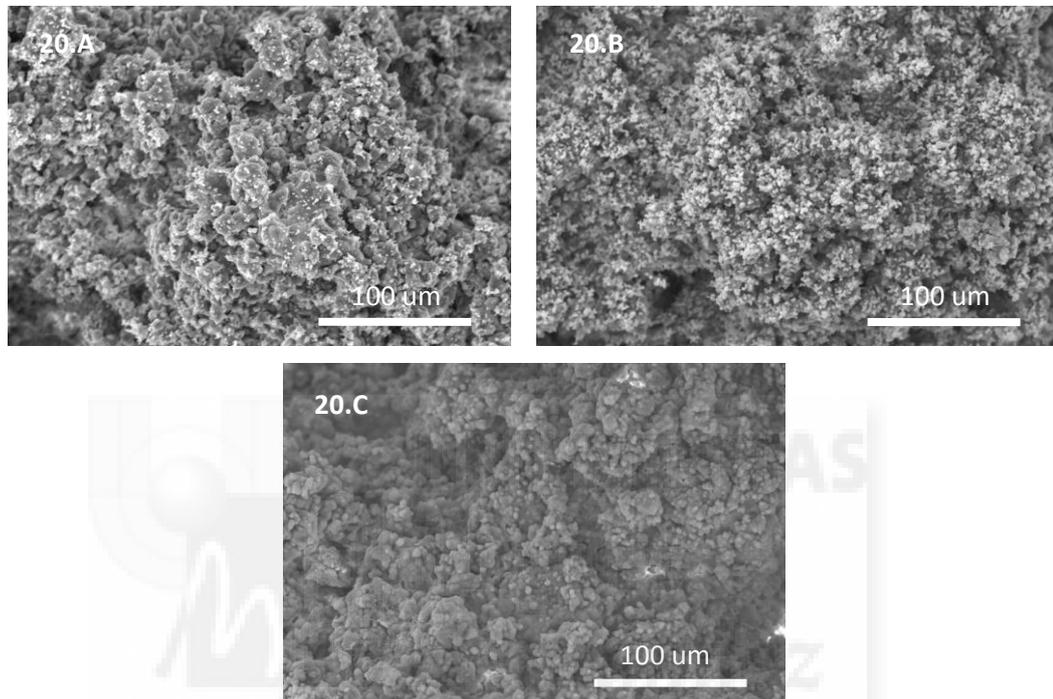


Figura 20. Microfotografía de la Fase A durante 6 horas (20.A), 1 (20.B) y 3 días (20.C) en SBF.

- **5 y 7 días en SBF**

Se observa cómo las partículas esféricas blanquecinas aumentan de tamaño y se siguen fusionando unas con otras dando lugar a placas sobre las cuales siguen formándose más de ésta estructura esférica. Estas partículas alcanzan un tamaño de alrededor 5µm. En algunas zonas su fusión da lugar a capas siendo imposible la medición de dichas esferas. A los 7 días de inmersión el precipitado tiene un grosor considerable, tal que al secarse se generan en él una serie de grietas.

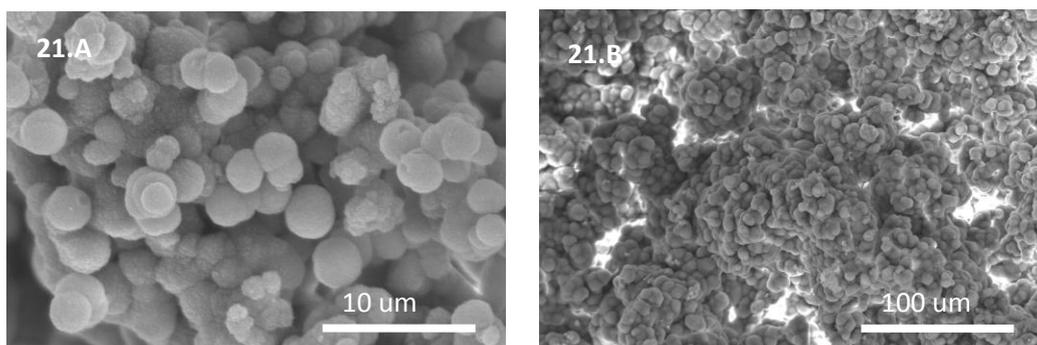


Figura 21. Microfotografía SEM de la Fase A durante (21.A) y 7 días (21.B) en SBF.

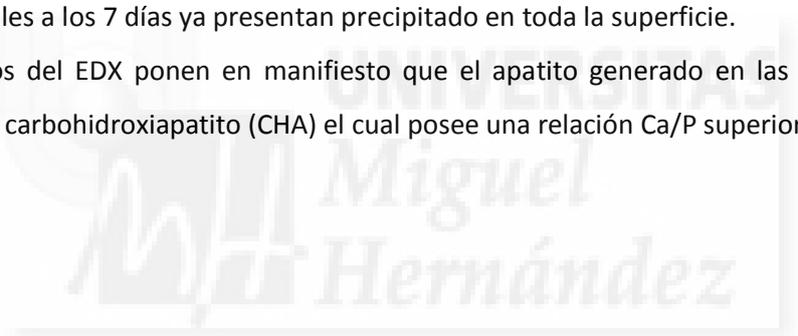
## 6. CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos ponen de manifiesto que:

- Se ha desarrollado la metodología para la obtención de un material poroso mediante la incorporación de un porógeno, como es la celulosa, a la composición de los materiales y su posterior eliminación.
- Los resultados del SEM de las microestructuras de los materiales nos demuestran un cambio aparente en la microestructura antes y después de eliminar la celulosa.
- Se ha demostrado una alta bioactividad en los tres materiales estudiados, puesto que en todos ellos se genera una capa de un tipo de apatito pasado un tiempo determinado en SBF. Sin embargo, de todos ellos el TCP es el que menor bioactividad presenta, puesto que es el material que más tiempo tarda en presentar una capa uniforme en toda su superficie, ya que tarda 21 días en cubrir toda la superficie.

Para el C<sub>2</sub>S y la fase A, en cambio, a las 6 horas ya se aprecia que la superficie está prácticamente cubierta de partículas esféricas, si bien, la cantidad formada es mayor en el C<sub>2</sub>S. Estos materiales a los 7 días ya presentan precipitado en toda la superficie.

- Los resultados del EDX ponen en manifiesto que el apatito generado en las superficie de los materiales es carbohidroxiapatito (CHA) el cual posee una relación Ca/P superior a la del HA.



## 7. PROYECCIONES FUTURAS

Identificar el tipo de hidroxiapatito obtenido mediante Microscopía electrónica de Transmisión (TEM) y por Infrarrojos con Transformada de Fourier (FTIR), técnicas capaces de detectar que tipo de apatito ha precipitado

Aplicar técnicas de Espectroscopía de Plasma de Acoplamiento Inductivo (ICP) sobre los iones de Ca, P y Si del suero para determinar el mecanismo de precipitación del HA deficiente en calcio sobre el material. Todo ello nos permitiría comparar dicho mecanismo con otros propuestos por Ohtsuki [14], kokubo [15].

Añadir diferentes porcentajes de celulosa a las composiciones inicial de los materiales, para generar pequeños poros en toda la superficie, obteniendo de esta forma una matriz porosa uniforme. Se tendría que hacer más ensayos en SBF hasta obtener en cada material una capa homogénea de HA.

Además una vez realizados todos los estudios “in vitro” pertinentes, se tendría que realizar los ensayos “in vivo” para comprobar la eficacia de estos materiales como implantes óseos en personas.



## 8. BIBLIOGRAFÍA

- [1] T. Kokubo, H. Takadama, "How useful is SBF in predicting in vivo bone bioactivity?", *Biomaterials*, vol. 27, nº 15, p.p 2907–2915, (2006).
- [2] R. Sastre, S. De Aza, J. San Román, "Biomateriales", (2004).
- [3] Roderic S. Lakes, Joon Park, "Biomaterials: An Introduction", (2006).
- [4] Catalina Estrada, Ana Cristina Paz, Luis Ernesto López, "Ingeniería de tejido óseo: Consideraciones Básicas" EIA, Escuela de Ingeniería de Antioquia, nº 5, p.p. 93-100, (2006).
- [5] SECOT, "Biomateriales y sustitutos óseos", de Manual de Cirugía Ortopédica y Traumatología, (2010).
- [6] J.X Lu, B. Flautre, K. Anselme, P. Hardouin, A. Gallur, M. Descamps, B. Thierry, "Role of interconnections in porous bioceramics on bone recolonization in vitro and in vivo", *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, vol. 10, nº 2, p.p. 111-120, (1999).
- [7] Alexis M. Pietak, Joel W. Reid, Malcom J. Stott, Michael Sayer, "Silicon substitution in the calcium phosphate bioceramics" *Biomaterials*, vol. 28, nº 28, p.p. 4.023-4.032, Octubre (2007).
- [8] M Vallet-Regí, D Arcos, "Silicon substituted hydroxyapatites. A method to upgrade calcium phosphate based implants", *Journal of Materials chemistry*, nº 15, p.p. 1509-1516, (2005).
- [9] N. Ozgür Engin, A. Cüneyt Tas, "Manufacture of macroporous calcium hydroxyapatite bioceramics", *Journal of the European Ceramic Society*, vol. 19, nº 13-14, p.p. 2569-2572, (1999).
- [10] Eun-Jung Lee, Young-Hag Koh, Byung-Ho Yoon, Hyoun-Ee Kim, Hae-Won Kim, "Highly porous hydroxyapatite bioceramics with interconnected pore channels using camphene-based freeze casting" *Materials Letters*, vol. 61, p.p. 2270–2273, mayo (2007).
- [11] NÖ Engin, AC Taş, "Preparation of Porous Ca<sub>10</sub> (PO<sub>4</sub>)<sub>6</sub> (OH)<sub>2</sub> and β-Ca<sub>3</sub> (PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> Bioceramics", *Journal of the American Ceramic Society*, vol. 83, p.p. 1581–1584, Julio (2000).
- [12] L. L. Hench, R. J. Splinter, W. C. Allen, T. K. Greenlee, "Bonding mechanisms at the interface of ceramic prosthetic materials", *Journal of Biomedical Materials Research*, vol. 5, p.p. 117–141, Noviembre (1971).
- [13] P.N. De Aza, F. Guitian, A. Merlos, E. Lora-Tamayo and S. De Aza. "Bioceramics-Simulated body fluid interfaces: pH and its influence on Hydroxyapatite formation", *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, vol. 7, p.p. 399-402, Julio (1996).
- [14] C Ohtsuki, T Kokubo, T Yamamuro, "Mechanism of apatite formation on CaO SiO<sub>2</sub> P<sub>2</sub> O<sub>5</sub> glasses in a simulated body fluid", *Journal of Non-Crystalline Solids*, vol. 143, p.p. 84-92, (1992).
- [15] T Kokubo, "Apatite formation on surfaces of ceramics, metals and polymers in body environment", *Acta Materialia*, vol. 46, p.p. 2519–2527, Abril (1998).
- [16] Ratner B.D, Hoffman A.S, Schoen P.J, Lemons J.E, "Biomaterials Science: An introduction to Materials in Medicine", (1996).

- [17] W.M.S. Russell, R.L. Burch, C.W. Hume "The principles of humane experimental technique" Johns Hopkins: Bloomberg School of public health, (1959).
- [18] C Frondel, "Whitlockite: a new calcium phosphate,  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ", Am. Mineral, vol. 26, p.p. 145-152, (1941).
- [19] D Lamy, AC Pierre, RB Heimann, "Hydroxyapatite coatings with a bond coat of biomedical implants by plasma projection", Journal of Materials Research, vol. 11, p.p. 680-686, marzo (1996).
- [20] X Liu, S Tao, C Ding, "Bioactivity of plasma sprayed dicalcium silicate coating", Biomaterials, vol. 23, p.p. 963-968, febrero (2002).
- [21] Z Gou, J Chang, "Synthesis and in vitro bioactivity of dicalcium silicate powders", Journal of the European Ceramic Society, vol. 24, p.p. 93-99, Enero (2004).
- [22] RW Nurse, JH Welch, W Gutt, "High-temperature phase equilibria in the system dicalcium silicate-tricalcium phosphate", Journal of the Chemical Society, p.p. 1077-1083, (1959).
- [23] W Fix, H Heymann, R Heinke, "Subsolidus Relations in the System  $2\text{CaO} \cdot \text{SiO}_2 - 3\text{CaO} \cdot \text{P}_2\text{O}_5$ ", Journal of the American Ceramic Society, vol. 52, p.p. 346-347, Junio (1969).
- [24] C. Richard, A. Charles, JR. Evans, S. Wilson, "Encyclopedia of materials characterization" en "X-Ray Diffraction, XRD", (1992).
- [25] E. Braun, "¿Qué son los rayos x? ¿Por qué usar los rayos X?", de Arquitectura de sólidos y líquidos, Fondo De Cultura Económica.
- [26] Gerardo Vázquez Nin, "Introducción a la Microscopía Electrónica Aplicada a Las Ciencias Biológicas", (2000).
- [27] C. R. Brundle, Charles A. Evans, Shaun Wilson, "Encyclopedia of Materials Characterization: Surfaces, Interfaces, Thin Films", (1992).
- [28] GJ. Lugo, P. Mazon, P De Aza "Phase transitions in single phase Si-Ca-P-based ceramic under thermal treatment" Journal of the European Ceramic, (2015).