

UNIVERSIDAD MIGUEL HERNÁNDEZ DE ELCHE

ESCUELA POLITÉCNICA SUPERIOR DE ELCHE

GRADO EN INGENIERÍA MECÁNICA



UNIVERSITAS
Miguel Hernández

"DESARROLLO DE BIOMATERIALES
CERÁMICOS POROSOS DE ALTA
RESISTENCIA MECÁNICA"

TRABAJO FIN DE GRADO

Junio -2022

AUTOR: Iván Lorente Jiménez

DIRECTOR: Ángel Murciano Cases

UNIVERSIDAD MIGUEL HERNÁNDEZ DE ELCHE

ESCUELA POLITÉCNICA SUPERIOR DE ELCHE

GRADO EN INGENIERÍA MECÁNICA



UNIVERSITAS
Miguel Hernández

"DESARROLLO DE BIOMATERIALES
CERÁMICOS POROSOS DE ALTA
RESISTENCIA MECÁNICA"

TRABAJO FIN DE GRADO

Junio - 2022

AUTOR: Iván Lorente Jiménez

DIRECTOR: Ángel Murciano Cases

ÍNDICE

| | |
|---|-----------|
| RESUMEN | 7 |
| ABSTRACT | 8 |
| 1. INTRODUCCIÓN | 9 |
| 1.1. Historia de los Biomateriales..... | 9 |
| 1.2. Ingeniería de Tejidos..... | 10 |
| 1.3. Fisiología Ósea..... | 11 |
| 1.4. Scaffolds | 12 |
| 1.5. Biocerámicas..... | 13 |
| 1.5.1. Tipos de Biocerámicas..... | 14 |
| 1.5.2. Desarrollo de Biocerámicas..... | 14 |
| 1.6. Proceso Sol-Gel | 15 |
| 1.7. Mecanismo de Generación de Apatito en Biocerámicas (Bioactividad) | 18 |
| 1.8. Antecedentes y Objetivos | 20 |
| 2. MATERIALES Y MÉTODOS | 22 |
| 2.1. Preparación de las Muestras | 22 |
| 2.1.1. Preparación de Núcleos de Wollastonita..... | 23 |
| 2.1.2. Sinterizado | 25 |
| 2.1.3. Desarrollo de Recubrimientos Vítreos | 27 |
| 2.1.4. Obtención de Fases Vítreas | 28 |
| 2.1.5. Desarrollo de Recubrimientos Reguladores de Solubilidad... 29 | |
| 2.1.6. Desarrollo de Recubrimiento de Alta Bioactividad | 31 |

| | | |
|-----------|---|-----------|
| 2.2. | Técnicas de Caracterización de las Cerámicas | 32 |
| 2.2.1. | Ensayos de Resistencia Mecánica | 32 |
| 2.2.2. | Difracción de rayos X (DRX)..... | 33 |
| 2.2.3. | Microscopía Electrónica de Barrido-Microanálisis de Energía Dispersiva de Rayos X (SEM-EDX)..... | 34 |
| 2.2.4. | Ensayos de Bioactividad..... | 35 |
| 3. | RESULTADOS Y DISCUSIÓN | 38 |
| 3.1. | Comportamiento de los vidrios de composiciones P4, P6, P4Li y P6Li..... | 39 |
| 3.2. | Ensayos de Resistencia Mecánica | 41 |
| 3.3. | Composición mineralógica y microestructural..... | 47 |
| 3.3.1. | Difracción de Rayos X | 47 |
| 3.3.2. | SEM-EDX | 50 |
| 3.4. | Ensayos de Bioactividad..... | 51 |
| 3.4.1. | Composiciones P4WBio/P6WBio..... | 52 |
| 3.4.2. | Composiciones P4W3D/P6W3D..... | 54 |
| 3.4.3. | Composiciones P4BBio/P6BBio..... | 57 |
| 4. | CONCLUSIONES..... | 60 |
| 5. | PROYECCIÓN FUTURA..... | 62 |
| 6. | BIBLIOGRAFÍA..... | 63 |

RESUMEN

El envejecimiento de la población mundial ha provocado el incremento de afecciones relacionadas con la pérdida de hueso. Debido a este incremento, resulta necesario mejorar los métodos actuales de regeneración ósea, avanzando hacia la creación de sustitutos sintéticos del hueso. En este sentido, la investigación en ingeniería de tejidos, se centra en la creación de matrices tridimensionales porosas, las cuales se unen al hueso a reparar, promoviendo la proliferación y diferenciación de las células necesarias para su regeneración.

Las cerámicas bioactivas resultan de gran interés para la creación de estas matrices, ya que son capaces de unirse al hueso a reparar, promoviendo su regeneración. Sin embargo, la bioactividad no es la única propiedad a tener en cuenta, la resistencia mecánica, entre otras, es una propiedad fundamental, necesaria para el correcto funcionamiento del implante. Conseguir buenas propiedades mecánicas y bioactividad resulta complicado, ya que, generalmente, son características antagónicas.

Con el objetivo de obtener matrices con ambas propiedades, en el presente proyecto, se ha desarrollado una nueva metodología, la cual permite obtener matrices tridimensionales porosas de alta resistencia mecánica. Para ello, se ha utilizado la técnica sol-gel, formando un núcleo poroso de Wollastonita (CaSiO_3), el cuál se recubre con fase vítrea perteneciente al sistema binario $\text{CaO-P}_2\text{O}_5$, obtenida también mediante técnica sol-gel. Esta estructura de alta resistencia mecánica presenta un exceso de fase vítrea, por lo que, para controlar este exceso, se vuelve a recubrir con Wollastonita, también con una fase vítrea de Boro. Con objeto de dotar a los núcleos obtenidos de bioactividad, se realiza un recubrimiento de Wollastonita dopada con iones Mg^{2+} y K^+ , obteniendo los núcleos finales. Los núcleos finales no mostraron bioactividad adecuada, debido a falta de control en el exceso de fase vítrea, por lo que se desarrolló un nuevo proceso capaz de eliminar este exceso, sumergiendo los núcleos en suero fisiológico artificial (SFA) durante 3 días. Una vez eliminado el exceso de fase vítrea, se obtuvieron núcleos de alta bioactividad, en los que sucede un proceso cíclico de precipitación y disolución de hidroxiapatito. Las muestras obtenidas a lo largo del proyecto se caracterizaron mediante Microscopía Electrónica de Barrido con Espectroscopía Dispersiva de Energía de Rayos X (SEM-EDX) y Difracción de Rayos X (DRX). Por último, se realizaron ensayos de bioactividad *in vitro* de los núcleos finales, realizando inmersiones en SFA.

ABSTRACT

World population ageing has led to an increase in diseases related to bone loss. Because of this increase, it has been needed to create new synthetic bone substitutes, replacing actual bone regeneration methods. On this matter, tissue engineering research, focuses on the creation of highly porous 3D extracellular matrix or scaffold, that bonds to the bone, promoting bone regeneration.

Bioactive ceramics have shown as the main candidates for bone regeneration, due to their good bioactivity properties and their biocompatibility. However, as well as bioactivity, these bone substitutes need to have other properties, such as mechanical strength, among others. Having a mechanical performance similar to the bone one is essential, but, generally, bioactivity is antagonistic to mechanical strength.

In this project, it has been developed a new methodology, which allows the creation of highly porous scaffolds with high mechanical strength. These scaffolds were created using sol-gel processing, by forming a wollastonite (CaSiO_3) core, that was coated with a layer of $\text{CaO-P}_2\text{O}_5$ glass. Those scaffolds had an excess of glassy phase so, to control that excess, the high strength scaffolds were coated with one of these phases: wollastonite or borate bioactive glass. Moreover, to improve their bioactivity, these scaffolds were coated with a layer of doped wollastonite, resulting in the final scaffolds. These final scaffolds were not bioactive, because of the excess of glassy phase, so, by soaking them in SBF for 3 days, that excess was removed, obtaining new bioactive scaffolds. The scaffolds obtained in this project have been studied using X-Ray Diffraction (XRD) and Scanning Electron Microscope fitted with Energy-Dispersive X-Ray Spectroscopy (SEM-EDX). Furthermore, the bioactivity of these scaffolds has been analyzed in vitro in simulated body fluid (SBF).

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Historia de los Biomateriales

A lo largo de la historia del ser humano se puede observar un claro avance en términos tanto de longevidad como de calidad de vida. Esta evolución, está relacionada con el interés de la sociedad en la mejora de la vida de las personas, que lejos de haber cesado, está cada vez más a la orden del día.

Parte de este interés puede observarse a través de la historia en la constante búsqueda de formas de reparar el cuerpo humano. Claros ejemplos de esta búsqueda, quedan plasmados tanto en la utilización de técnicas incipientes de reparación del cuerpo, como la utilización de madera en la antigüedad para reemplazar tejidos dañados debido a enfermedades, hasta la actual utilización de implantes de cadera o mallas metálicas extensibles, utilizadas para la apertura de conductos obstruidos en el cuerpo humano (“stents”) [1].

De este interés nació una nueva rama del conocimiento que se encarga del estudio de materiales para aplicaciones médicas: los biomateriales. Sin embargo, aunque la utilización de materiales en aplicaciones relacionadas con la salud comienza ya en épocas de la era cristiana o del antiguo Egipto, se considera que la investigación planificada y sistemática, en el área de los biomateriales, se da a partir de la segunda mitad del siglo XX, consecuencia de los numerosos heridos ocasionados en la II Guerra Mundial [2]. Además, la revolución de la Biología Molecular de los años setenta y los avances de Genómica y Proteómica de finales del siglo XX y principios del XXI, ocasionaron una nueva revolución en el diseño y utilización de biomateriales, que se tradujo en un incremento considerable de los estudios relacionados con esta materia y, en consecuencia, la creación de numerosos equipos y departamentos especializados. Por ejemplo, solo en Estados Unidos, se pasó de la presencia de solo 12 departamentos de ingeniería biomédica en 1975, a más de 75 departamentos en 2009 [1].

Para entender de una mejor forma la evolución de los biomateriales, estos se dividieron en tres generaciones. Esta división no se ha de interpretar como un orden cronológico sino como uno conceptual, cada generación responde a una evolución en las propiedades y requerimientos de los biomateriales, de modo que una generación no desplaza a la anterior, como ocurre en clasificaciones clásicas, sino que todas siguen

teniendo sus aplicaciones específicas y siguen en desarrollo. Profundizando más en estas generaciones, se tiene, en la primera generación, a materiales “bioinertes”, en ellos se busca una serie de características físicas, a la vez que reducir a la mínima expresión posible la respuesta inmune del organismo. En la segunda generación se encuentran materiales “bioactivos”, en los que se busca una respuesta biológica, una unión del tejido al material, así como una posterior degradación de este, dejando paso a nuevo tejido sano. Por último, a la tercera generación pertenecen nuevos materiales, capaces de estimular respuestas celulares específicas a nivel molecular [3].

El desarrollo de materiales incluidos en estas tres generaciones ha permitido que afecciones que antes parecían incurables, se presenten como problemas rutinarios, todo gracias a los éxitos logrados en el campo de la cirugía y a los avances en ingeniería de tejidos [4].

1.2. Ingeniería de Tejidos

El envejecimiento de la población mundial trae consigo una serie de consecuencias relacionadas con la pérdida de hueso. La principal enfermedad referida a este fenómeno sería la osteoporosis, causada por un desbalance entre la reabsorción y la formación de hueso, produciéndose una reducción de la densidad y la resistencia del mismo [5]. Solo en Reino Unido, se datan aproximadamente 150.000 fracturas por año debidas a la osteoporosis [6]. Además, no solo está la osteoporosis como causa de la pérdida de hueso, los traumatismos, las infecciones o la artritis son también relevantes en este aspecto. Todos estos fenómenos hacen que sea necesario adoptar diferentes estrategias para conseguir reparar el hueso dañado.

Como métodos generalizados de regeneración ósea se encuentran, actualmente, los injertos de hueso y trasplantes de células, ya sean del propio paciente (autólogos), de un donante (allogénicos) o de otra especie (xenogénicos). Sin embargo, estos procesos tienen una serie de desventajas, como: una fuente insuficiente de hueso o células, problemas relacionados con morbilidad en el sitio donante o, si el injerto es de un donante, problemas relacionados con la transmisión de enfermedades, el rechazo del trasplante o la reabsorción del mismo [5,6].

Debido a las restricciones antes comentadas, los métodos actuales de regeneración ósea necesitan avanzar hacia la creación de sustitutos sintéticos del hueso, que imiten su estructura original, de forma que la respuesta biológica y mecánica del sustituto promueva la regeneración del hueso dañado. La ingeniería de tejidos responde a esta necesidad, aunando conocimientos de distintas ramas, como pueden ser la ciencia de materiales, la química, la biología o la medicina. Con la unión de estas ramas del conocimiento se busca desarrollar un tejido viable para la implantación en el cuerpo humano, cuyo objetivo es mantener o recuperar la funcionalidad perdida [3]. En este sentido, para optimizar los resultados obtenidos, ha sido imprescindible ampliar los conocimientos sobre fisiología ósea, siendo necesario descartar la visión del hueso como estructura inerte.

1.3. Fisiología Ósea

El esqueleto óseo presenta un papel fundamental en el cuerpo humano, siendo sus principales funciones las de protección de órganos vitales, almacenamiento de minerales, factores de crecimiento y protección la médula ósea roja.

En el hueso humano se pueden identificar una parte orgánica y otra inorgánica. Esta primera, conocida como matriz orgánica o sustancia osteoide, representa aproximadamente el 35% del peso óseo, compuesta principalmente por proteínas, siendo el colágeno el principal componente. La parte inorgánica del hueso, está formada por una fase mineral compuesta por fosfatos cálcicos en forma de microcristales de hidroxapatita (HA, $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) [7]. Esta parte mineral del hueso cumple dos funciones principales, mecánica y homeostática. Los cristales de apatito refuerzan la matriz de colágeno, dándole resistencia y rigidez al hueso, además de servir de almacenamiento para iones fundamentales, como pueden ser los iones de Ca^{2+} , Mg^{2+} o PO_4^{3-} [8].

Como últimas consideraciones sobre la fisiología del hueso, es necesario entender que el hueso no es un material compacto y uniforme, sino que está formado por una capa externa de mayor densidad y resistencia llamada hueso cortical, que rodea a un tejido poroso menos denso, llamado hueso trabecular. Esta porosidad presente en el hueso es fundamental, ya que permite el acceso de los fluidos corporales y las células a las diferentes zonas del tejido óseo, además de provocar una anisotropía mecánica [9].

El entendimiento de todos estos aspectos ha permitido el avance del diseño de biomateriales, de modo que se busca que estos materiales se asemejen lo máximo al hueso real y a su comportamiento. Un claro ejemplo de esto son los denominados “scaffolds”, estructuras soporte que se inspiran en la estructura del hueso trabecular y que sirve de base para la elaboración de biomateriales de tercera generación.

1.4. Scaffolds

Los scaffolds son los pilares de la ingeniería tisular centrada en el sistema óseo. Estos scaffolds son matrices tridimensionales biodegradables cuyo objetivo es servir de soporte para las células osteogénicas. Su función es unirse al tejido a reparar, promoviendo la proliferación y diferenciación de las células necesarias para su regeneración. A su vez, el scaffold debe degradarse, dando paso a nuevo tejido sano [6,10].

Como primer requerimiento de un scaffold, se encuentra la biocompatibilidad. El scaffold debe actuar de soporte para una actividad celular normal, sin producir ningún efecto tóxico. Además, debe ser osteoinductivo, de modo que las células puedan adherirse a él, proliferando y formando una matriz extracelular; y osteoinductor, induciendo la formación de hueso mediante señalización molecular y reclutamiento de células progenitoras [11].

Las propiedades mecánicas del scaffold deben ser similares a las del hueso del paciente, transmitiendo la carga de una forma eficiente. Existe una gran variedad de propiedades mecánicas entre los distintos elementos que conforman el sistema esquelético humano, por lo que el estudio del comportamiento mecánico del scaffold es fundamental [11].

Además de resistencia mecánica, para la supervivencia de las células, se necesita una correcta difusión de nutrientes esenciales y oxígeno, es decir, se requiere una vascularización de la zona. Para ello, los scaffolds deben presentar una porosidad interconectada, siendo 200–350 μm el rango óptimo de tamaño de poro. También se ha demostrado que son importantes las porosidades tanto a nivel macroscópico como a nivel microscópico. Sin embargo, la presencia de porosidad reduce las propiedades mecánicas de los scaffolds, además de complicar su diseño [11].

En cuanto a la regeneración ósea, en las últimas décadas, la investigación sobre biomateriales se ha centrado en la aceleración del proceso de generación del hueso, buscando una regeneración del hueso dañado desde el momento de la implantación del material. Para ello, el estudio exhaustivo de la superficie del scaffold es fundamental, ya que es la primera parte que entrará en contacto con el cuerpo del paciente. Las modificaciones en la superficie del material serán fundamentales para obtener una bioactividad y osteoconductividad adecuadas [12].

La biorreabsorbilidad se presenta como última característica fundamental de los scaffolds. Se debe obtener un material que se degrade *in vivo* de una forma controlada, creando un espacio para el crecimiento del nuevo hueso [11].

Otra función a tener en cuenta es la utilización de scaffolds para la aplicación regulada de medicamentos en la zona afectada. De este modo, se pueden administrar antibióticos para evitar infecciones o se pueden administrar sustancias que favorezcan la regeneración del hueso. [13,14].

Para cumplir con las necesidades anteriormente mencionadas, es necesario que el scaffold induzca la proliferación y diferenciación de las células madre mesenquimales, además de crear una unión al hueso [15,16]. En este sentido, los principales candidatos son los polímeros, composites y biocerámicas, siendo estas últimas objeto de estudio de este proyecto.

1.5. Biocerámicas

Desde el descubrimiento del 45S5 *Bioglass* por parte del profesor Hench en 1969, las biocerámicas se han convertido en la base de la investigación de materiales para regeneración ósea. Este material es considerado el primero perteneciente a la tercera generación, ya que se probó que además de obtenerse una fuerte unión tejido-implante, también se consiguió una activación genética que ocasionaba una respuesta beneficiosa a nivel celular [17].

El término biocerámica aúna no solo a los materiales cerámicos, sino que se refiere a todos los vidrios, cerámicas y vitrocerámicas que se usan a modo de implante [18]. En cuanto a las biocerámicas de tercera generación, estas se caracterizan por presentar una fuerte unión al hueso, gracias a la aparición en su superficie de una capa de hidroxiapatito

(HA), similar al HA del hueso [19]. Además de unirse al hueso, estos implantes promueven la generación de nuevo tejido a lo largo de la superficie del material, es decir, son osteoconductivos. Algunos de ellos incluso pueden ser osteoprodutores, estimulando la proliferación de células en lugares distintos de la zona del implante [20,21,22].

1.5.1. Tipos de Biocerámicas

Dentro de las cerámicas bioactivas, se puede hacer una división en función de que material forma la base de la cerámica:

- Biocerámicas basadas en silicatos: la joya de la corona de estos materiales es el vidrio 45S5. Basándose en la investigación de la unión de este material al hueso, se pudo observar el rol fundamental del silicio en la formación de la capa superficial de HA. No solo resulta interesante la formación de esta capa de HA, sino que a este proceso le sigue la proliferación y diferenciación de las células osteoprogenitoras. Aunque la bioactividad del vidrio 45S5 se presenta como el estándar, sus limitaciones, como pueden ser su difícil procesabilidad o baja degradabilidad, hacen que otros materiales basados en silicatos estén cobrando más importancia [23].
- Biocerámicas basadas en boratos: las recientes investigaciones sobre vidrios basados en boro han demostrado la aparición de la capa de HA en un proceso similar al que ocurre en las biocerámicas basadas en silicatos. Además, estos vidrios también ayudan a la diferenciación y proliferación de células. El control sobre su degradabilidad hace de estos materiales un gran sujeto de estudio actualmente, si bien es necesario estudiar la toxicidad del boro que se libera al organismo [23].
- Biocerámicas basadas en fosfatos: estos materiales resultan interesantes por la similitud de sus componentes con los de la fase mineral del hueso. La afinidad química y la capacidad de controlar su solubilidad son sus principales ventajas [23], además de que se ha demostrado que los fosfatos cálcicos inducen una respuesta celular favorable que promueve la formación de hueso [24,25].

1.5.2. Desarrollo de Biocerámicas

A la hora de obtener un scaffold de un material biocerámico se pueden seguir diferentes métodos. El principal modo de obtención de biocerámicas es la formación de

partículas o fibras, utilizando un método tradicional de procesamiento de cerámicas y vidrios, para posteriormente darle la forma deseada utilizando un molde. El proceso se finaliza uniendo las partículas, ya sea mediante un tratamiento térmico o utilizando otros materiales que actúen a modo de nexo [23]. Esta forma de obtener el scaffold presenta una serie de desventajas, como dificultad para obtener un tamaño de poro adecuado o conseguir una correcta conectividad entre poros [23].

Otra forma básica de obtener biocerámicas es mediante la técnica sol-gel, empleada en el desarrollo de este proyecto, en la que se obtiene una disolución donde los precursores sufren una reacción polimérica formando un gel. Si bien la técnica sol-gel requiere una menor temperatura de sinterizado, los procesos de secado y condensación hacen que las biocerámicas finales presenten una serie de grietas que pueden comprometer su resistencia mecánica. Sin embargo, las ventajas que presenta son significativas, presentando las biocerámicas obtenidas mediante sol-gel una nanoporosidad inherente, además de un área superficial dos órdenes de magnitud mayor que la de las biocerámicas obtenidas por otros métodos. Además, se ha probado que se degradan de forma más rápida y presenta una mejor bioactividad, formando la capa de HA más rápidamente que las biocerámicas con misma composición obtenidas mediante el método antes comentado [18,22].

Estos son los dos principales métodos de procesamiento de biocerámicas, aunque no son los únicos, la pulverización catódica o la ionización por electrospray, entre otros, son métodos más innovadores y complejos que han aparecido en los últimos años, pudiendo resultar interesantes en el futuro [26].

1.6. Proceso Sol-Gel

La sintetización de materiales inorgánicos mediante la técnica sol-gel comenzó a mediados del siglo XIX, gracias a los estudios realizados por Ebelman y Graham. Como resultado de sus investigaciones se observó que la hidrólisis del TEOS ($\text{Si}(\text{OC}_2\text{H}_5)_4$) en condiciones ácidas, promovía en la obtención de SiO_2 en forma vítrea [27]. Sin embargo, no fue hasta los años treinta que finalmente se aceptó, principalmente gracias al trabajo de Hurd, la teoría de que la estructura de los geles de sílice consistía en un esqueleto polimérico (basado en ácido silícico) que encapsulaba una fase líquida [28].

Más tarde, entre los años cincuenta y sesenta, Roy y colaboradores aprovecharon el potencial del sol-gel, por el cual se podían alcanzar grados niveles de homogeneidad química en los geles coloidales, para desarrollar gran cantidad de nuevas cerámicas que no se podían conseguir mediante los métodos tradicionales que utilizaban polvos cerámicos [29]. No obstante, no fue hasta la mitad de los años setenta, que se realizó una de las investigaciones más relevantes, en la que se demostró que se podía producir geles monolíticos a temperaturas bajas. [30]

El proceso sol-gel, como su propio nombre indica, consiste en la formación de un sol (dispersión de partículas coloidales en fase líquida que son suficientemente pequeñas para permanecer suspendidas por movimiento Browniano) y su posterior gelificación y densificación. La gelificación del sol da como resultado un gel, siendo este un sólido consistente en al menos dos fases: una fase sólida que atrapa e inmoviliza a una fase líquida. [29]

Los pasos seguidos para la realización de materiales cerámicos mediante el proceso sol-gel en el presente proyecto son los siguientes:

- Mezcla.
- Vaciado.
- Gelificación.
- Secado.

El proceso de mezclado se puede llevar a cabo utilizando diferentes tipos de precursores. A lo largo de esta investigación se utilizarán precursores del tipo alcóxido, como puede ser el ortosilicato de tetraetil (TEOS). En esta primera etapa, el TEOS se mezcla con agua y se hidroliza en medio ácido, obteniendo como resultado ácido silícico (*Figura 1*).

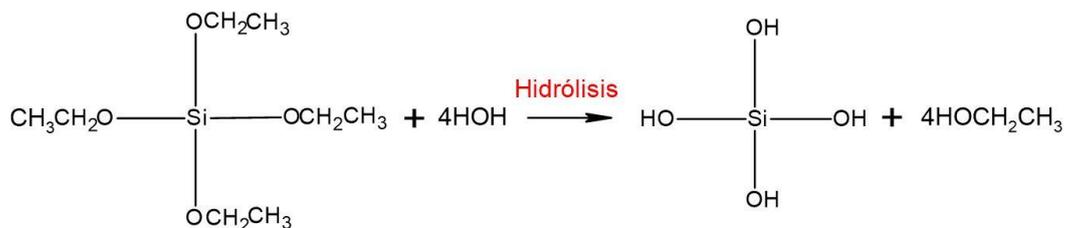


Figura 1: Reacción de hidrólisis del TEOS

Una vez formados los ácidos silícicos, estos interactúan entre sí mediante reacciones de condensación, formando enlaces Si-O-Si y liberando al medio agua o alcohol (*Figura 2*).

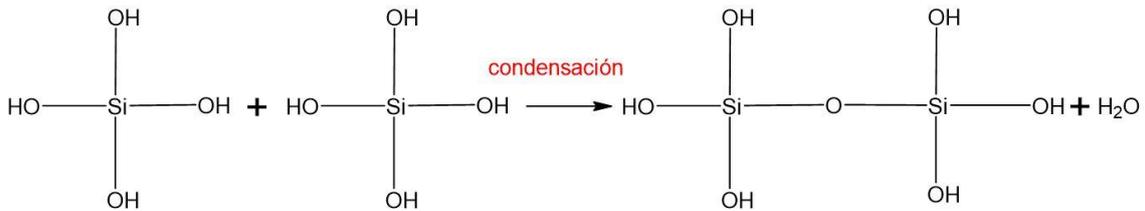


Figura 2: Reacción de condensación

Posteriormente, se siguen formando enlaces Si-O-Si en una reacción de policondensación, dando como resultado una red tridimensional (*Figura 3*). El H₂O y los alcoholes liberados durante esta reacción permanecen en los poros de la red.

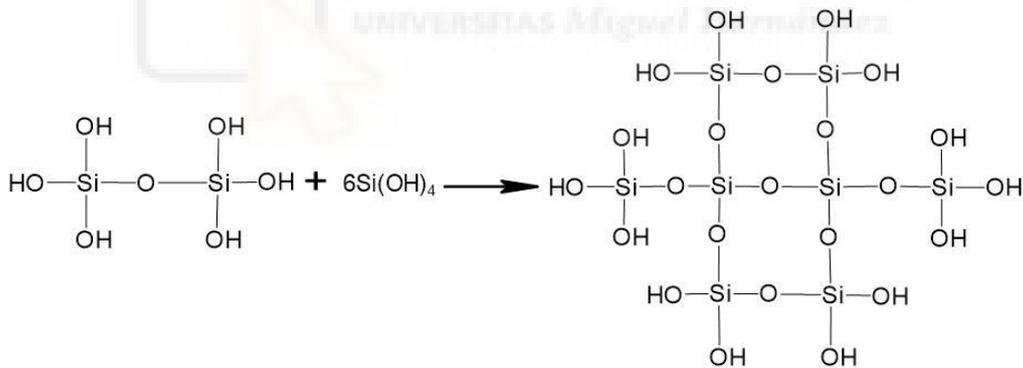


Figura 3: Reacción de policondensación y formación de la red tridimensional

Cuando se tienen suficientes enlaces Si-O-Si, estos responden en conjunto como partículas coloidales o sol. El tamaño de las partículas del sol y el grado de entrecruzamiento dependen principalmente del pH y de la variable R (proporción agua/TEOS), siendo $R = \left(\frac{[\text{H}_2\text{O}]}{[\text{Si}(\text{OCH}_2\text{CH}_3)_4]} \right)$.

La hidrólisis se inicia a pH 7, así que trabajando con pHs más ácidos o básicos se provocaría una aceleración del proceso, provocando una disminución del tamaño de

partícula. En cuanto al parámetro R, se conseguiría un mayor tamaño de partícula aumentando este parámetro, ya que se conseguiría una mejor hidrólisis de los monómeros.

Una vez obtenido el sol, este puede ser introducido en cualquier tipo de molde, ya que este es un líquido de baja viscosidad. Este proceso se denomina vaciado y en el presente proyecto se ha realizado sumergiendo esponjas de poliuretano en el sol. Este proceso se denomina réplica de esponja de polímero, y su combinación con la técnica sol-gel, permite obtener una cerámica con una estructura con poros de gran tamaño interconectados, pudiendo controlarse el tamaño de poro [31].

A medida que pasa el tiempo, se produce la gelificación del sol, aumentando las reacciones de condensación, generando la red tridimensional que provoca el aumento de la viscosidad de la disolución hasta convertirse en un sólido (gel), que adopta la forma de las esponjas de polímero.

Posteriormente se realiza el secado del gel, eliminando el agua presente en los poros de la red tridimensional. Durante este proceso, se eliminan parcialmente los enlaces silanol (Si-OH) de la superficie de la red porosa, obteniéndose un sólido de alta porosidad. Una vez finalizado el secado, se realiza la densificación del sólido obtenido, aplicando altas temperaturas al gel y obteniendo la cerámica final.

Una vez obtenida la cerámica, resulta necesario comprobar si se ha obtenido un material bioactivo. La principal característica que deben presentar las cerámicas bioactivas es la formación de una capa de hidroxiapatito (HA) biológicamente activo en su superficie en contacto con el suero fisiológico artificial (SFA). Esta capa es similar estructural y químicamente a la fase mineral del tejido óseo, por lo que produciría una unión entre el implante y el tejido óseo [19].

1.7. Mecanismo de Generación de Apatito en Biocerámicas (Bioactividad)

El mecanismo de formación de esta capa de HA en cerámicas fue descrito por Hench [19] y consta de las siguientes etapas:

1. Lixiviación e intercambio iónico de protones (H^+ o H_3O^+) del medio fisiológico por iones lábiles modificadores de red (Na^+ , K^+ o Ca^{2+} entre otros).

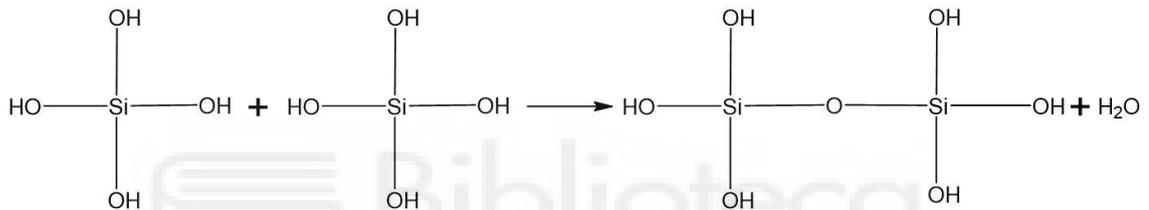


Este intercambio entre protones e iones modificadores de red provoca un aumento del pH en la interfase cerámica-disolución, el cuál puede variar en valores del rango de 9 a 10.5, según el estudio realizado por De Aza et al. [32] en el que se realizaron medidas de pH interfacial con un microsensar (ISFET) sobre diferentes materiales bioactivos.

2. Reducción de protones en la disolución que provoca un aumento en el pH. Este aumento del pH provoca la disolución de la red de SiO₂ en la interfase cerámica-disolución, formándose en consecuencia grupos silanol (Si-OH). Además se pierde sílice soluble en forma de Si(OH)₄.



3. Condensación y polimerización de una capa amorfa de SiO₂ en la superficie



4. Migración de los iones Ca²⁺ y PO₄³⁻ a la superficie de la capa rica en sílice, formando una película amorfa rica en CaO-P₂O₅. Esta película irá creciendo debido a la captación de más iones Ca²⁺ y PO₄³⁻ procedentes de la disolución.
5. Cristalización de la capa amorfa de CaO-P₂O₅ debido a la incorporación de aniones OH⁻, CO₃²⁻ o F⁻ de la disolución formando carbohidroxiapatito o fluorcarbohidroxiapatito

El mecanismo expuesto por Hench ha sido actualizado, de modo que en la actualidad se toma como innecesaria la migración de los iones calcio y fosfato a través de la capa de sílice amorfa (etapa 4). Además, se observó que las cerámicas basadas en CaO y SiO₂ son capaces de formar la capa de apatito en su superficie al ser introducidas en suero fisiológico (SFA), demostrando que las cerámicas no precisan contener fósforo en su composición para producir HA [33].

Kobuko et al. [34] sopesaron que los grupos silanoles proporcionaban sitios favorables para la nucleación y crecimiento de la capa de HA, por lo que estos serían los responsables de la aparición de esta capa.

1.8. Antecedentes y Objetivos

La investigación en biocerámicas para regeneración ósea es un campo en continuo desarrollo, numerosos estudios se llevan a cabo con el objetivo de encontrar un material óptimo para su utilización en implantes. Gran número de materiales son los candidatos, si bien es complicado encontrar un material que cumpla todas las especificaciones necesarias: biocompatibilidad, bioactividad, osteoinducción, osteoconducción, biodegradabilidad, propiedades mecánicas, etc.

Como punto de partida en el desarrollo de materiales en el contexto de este proyecto, la investigación se centrará en conseguir una buena relación entre propiedades mecánicas y bioactividad, dado que esta relación es fundamental para el adecuado comportamiento del implante, aunque, en general, son propiedades opuestas.

Se han realizado numerosos estudios buscando obtener materiales con comportamiento adecuado en ambas propiedades. En este sentido, recientemente Mata et al. [35], han publicado un estudio en el que se desarrollaron scaffolds compuestos por pirofosfato dopado con iones Mg^{2+} , mostrando la presencia de una matriz vítrea, basada en el sistema $CaO-P_2O_5$, que rodeaba los cristales de pirofosfato, dotando al scaffold final de altas capacidades mecánicas. En base a este resultado, en el presente proyecto, se emplearán vidrios pertenecientes al sistema binario $CaO-P_2O_5$ para desarrollar scaffolds de alta resistencia mecánica. Las composiciones vítreas pertenecientes a este sistema, que se estudiarán a lo largo del proyecto, serán CaP_4O_{11} y $Ca_2P_6O_{17}$, ya que estas composiciones presentan una relación Ca/P similar a la fase vítrea analizada en los scaffolds desarrollados por Mata et al. ($0.25 < Ca/P < 0.35$).

En el proceso de obtención de estos vidrios, es necesario utilizar altas temperaturas, imposibilitando la creación de un scaffold de vidrio mediante réplica de esponja de polímero, ya que, a la hora de obtener la fase vítrea, la esponja se calcinará, fluyendo el vidrio, no obteniendo la forma deseada. Por lo tanto, es necesario el desarrollo de un molde cerámico altamente poroso, que resista la temperatura de fusión de los vidrios, y que actúe como núcleo del scaffold. En este sentido, para desarrollar estos núcleos, se empleará Wollastonita ($CaSiO_3$), debido a que numerosas investigaciones realizadas sobre sistemas bidimensionales de esta fase demuestran una buena biocompatibilidad y degradabilidad, indicando que la Wollastonita tiene el potencial de convertirse en una muy buena opción para desarrollar scaffolds tridimensionales

orientados a regeneración ósea, sin embargo, esta fase presenta alta fragilidad, así como baja resistencia mecánica y alta disolución iónica, características que han condicionado su uso [36]. De este modo, al recubrir los núcleos de Wollastonita con las fases vítreas mencionadas anteriormente, se obtendrá un scaffold con alta resistencia mecánica.

Además de las características mencionadas, la Wollastonita presenta una excelente bioactividad, tanto *in vivo* como *in vitro* [37,38,39]. Esta condición es altamente deseable, dado que, en base a los resultados obtenidos en el estudio de materiales basados en pirofosfatos y fase vítrea, anteriormente mencionado, la fase vítrea inhibía la bioactividad de las muestras. De esta forma, la presencia de Wollastonita en el núcleo, así como recubrimientos externos de Wollastonita dopada con iones Mg^{2+} y K^+ [36], permitirá modular la bioactividad.

En base a lo anteriormente expuesto, el objetivo general del presente proyecto es “el desarrollo y caracterización de estructuras porosas multicapa de alta resistencia mecánica, basadas en las fases Wollastonita/ CaP_4O_{11} /Wollastonita y Wollastonita/ $Ca_2P_6O_{17}$ /Wollastonita”

Con el objetivo de cumplir con el objetivo general mencionado, se han planteado los objetivos específicos del presente proyecto:

- Obtención de núcleos de Wollastonita altamente porosos mediante técnica sol-gel y replica de esponja de polímero.
- Recubrimiento vítreo de los núcleos de Wollastonita empleando las composiciones CaP_4O_{11} y $Ca_2P_6O_{17}$.
- Estudio y comparación de las propiedades mecánicas de los núcleos obtenidos.
- Desarrollo de estructuras soporte basadas en Wollastonita/ CaP_4O_{11} /Wollastonita y Wollastonita/ $Ca_2P_6O_{17}$ /Wollastonita.
- Desarrollo de estructuras soporte basadas en Wollastonita/ CaP_4O_{11} / B_2O_3 y Wollastonita/ $Ca_2P_6O_{17}$ / B_2O_3 .
- Determinación de la composición mineralógica y microestructural de las muestras mediante Microscopía Electrónica de Barrido (SEM), Microanálisis de Energía Dispersiva de Rayos X (EDX) y Difracción de Rayos X (DRX)
- Realización de ensayos de bioactividad en suero fisiológico (SFA) de las muestras obtenidas.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Preparación de las Muestras

Como se ha descrito en secciones anteriores, las propiedades que debe reunir un material para su empleo en regeneración ósea son múltiples, y en muchos casos opuestas, claro ejemplo es que el material posea alta porosidad y alta resistencia mecánica. En este sentido, es altamente improbable que un material con una formulación sencilla sea capaz de cumplir todos los requisitos deseables en regeneración ósea. Por este motivo, en este proyecto, se ha desarrollado una nueva metodología para obtener materiales de alta resistencia mecánica y con bioactividad.

En este estudio se ha desarrollado un material multicapa complejo, constituido por un núcleo de alta resistencia mecánica, basado, principalmente, en las fases vítreas $\text{CaP}_4\text{O}_{11}$ (a partir de ahora P4) y $\text{Ca}_2\text{P}_6\text{O}_{17}$ (a partir de ahora P6).

Este núcleo, además de las fases vítreas antes mencionadas, estaba constituido por una capa de Wollastonita, con la que se recubría el molde de esponja de polímero. Esta capa de Wollastonita se obtiene por sucesivos recubrimientos de la esponja, hasta obtener el grosor adecuado. Una vez sinterizada la esponja con la Wollastonita, se recubre con una capa de la composición conducente a la fase vítrea P4 o P6, según se puede observar en la *Figura 4*. Con el objeto de obtener la fase vítrea se vuelve a sinterizar, obteniendo un núcleo preliminar, de altas propiedades mecánicas, pero con exceso de fase vítrea. Para modular el exceso de fase vítrea, este núcleo preliminar, se vuelve a recubrir con Wollastonita (*Figura 5a*) o con vidrio de Boro (*Figura 5b*), volviéndose a sinterizar, obteniendo así el núcleo final. Este núcleo, tal como se describe en los antecedentes, no es bioactivo, de modo que, con el objeto de dotarlo de bioactividad, se recubre de una capa de Wollastonita dopada con iones Mg^{2+} y K^+ .

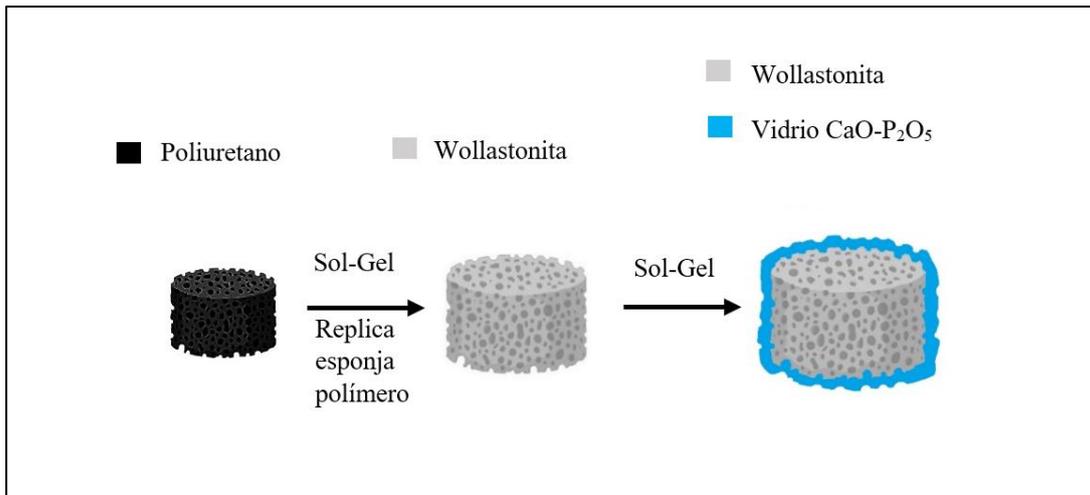


Figura 4: Obtención del núcleo preliminar de altas capacidades mecánicas

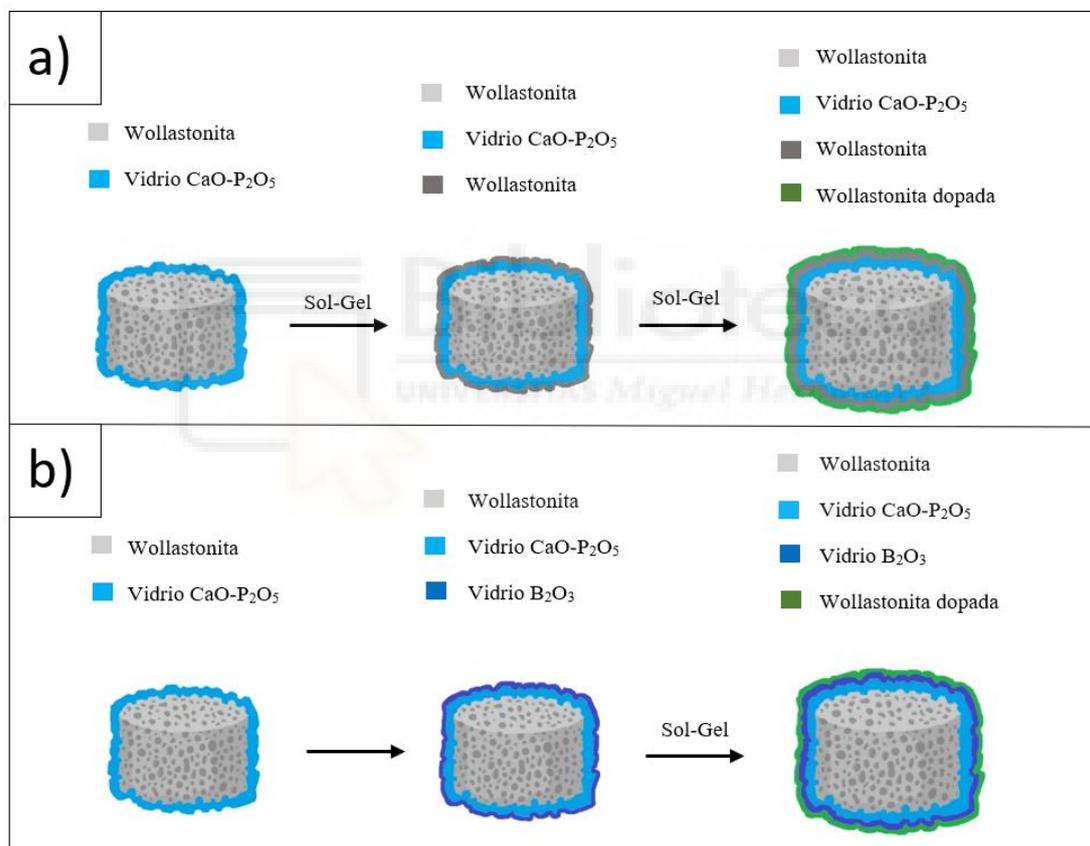


Figura 5: Distintos recubrimientos realizados a los núcleos preliminares: a) núcleo basado en Wollastonita/CaO-P₂O₅/Wollastonita; b) núcleo basado en Wollastonita/CaO-P₂O₅/B₂O₃

2.1.1. Preparación de Núcleos de Wollastonita.

El desarrollo de este material multicapa comienza con la formación de un núcleo poroso de Wollastonita. Como ya se ha comentado anteriormente, estos núcleos se desarrollaron mediante el proceso sol-gel, utilizando como precursores ortosilicato de

tetraetilo (TEOS, $\text{Si}(\text{OC}_2\text{H}_5)_4$), cuya función es aportar el silicio necesario, y carbonato cálcico (CaCO_3), que aportará el calcio.

Para la obtención de 10 g de Wollastonita se tienen que aportar 19,2 mL de TEOS y 8,6 g de CaCO_3 , realizándose dos disoluciones diferentes, que se mezclan para la obtención de la disolución final. Los pasos a seguir son los siguientes:

1. Se realiza una disolución en la que se añaden consecutivamente los 19,2 mL de TEOS, 5 mL de etanol y 15 mL de H_2O .
2. Se hidroliza el TEOS, añadiendo 2 mL de ácido clorhídrico concentrado (37%).
3. Finalizada la hidrólisis, se añade CaCO_3 hasta obtener un pH final entre 2 y 3, obteniendo la primera disolución.
4. Se realiza una segunda disolución, mezclando el CaCO_3 restante con 20 mL de H_2O .
5. Se añade ácido clorhídrico a esta disolución hasta conseguir un pH, de nuevo, de entre 2 y 3.
6. Esta segunda disolución se añade a la primera, obteniendo la disolución final con la que se desarrollaran los scaffold de Wollastonita.

En el desarrollo de las disoluciones es importante el control del pH, ya que con un pH más básico no se podría disolver todo el CaCO_3 , provocando una gelificación de la disolución. Trabajar con un pH ácido hace que las muestras finales se degraden más fácilmente en suero fisiológico, pero ha de llevarse cuidado, ya que un pH demasiado ácido podría afectar a los diferentes equipos con los que se trabaja.

A partir de las disoluciones descritas, se obtienen estructuras tridimensionales, constituidas mediante la formación de enlaces Si-O-Si. La existencia de iones calcio, provoca que además se generen enlaces tipo iónico $\text{Si-O}^- \text{--Ca}^{2+} \text{--O}^- \text{--Si}$. Este fenómeno permite tener una bioactividad adecuada, ya que favorece el intercambio catiónico, pero al disminuir el número de enlaces de interconexión Si-O-Si, ocurre una disminución de las propiedades mecánicas de la estructura final.

Durante el desarrollo de los enlaces Si-O-Si, antes de que el número de enlaces sea elevado, provocando la gelificación, se introducen repetidamente, en la disolución, esponjas de poliuretano con un tamaño aproximado de 1 cm de diámetro y 0,8 cm de altura, que actúan de molde. Tras cada capa de disolución es necesario centrifugar las

esponjas, de modo que se elimine el exceso de líquido y no se comprometa la porosidad de las muestras finales. Una vez centrifugadas las esponjas, se secaron a una temperatura de entre 140° y 180° antes de realizar la siguiente capa. El secado permite una densificación de la estructura que se quiere formar, mejorando sus propiedades mecánicas.

2.1.2. Sinterizado

Una vez las esponjas de poliuretano tienen la cantidad de formulación suficiente para obtener muestras con una resistencia mecánica final que permita su manejo (*Figura 6*), se procede a sinterizarlas. El sinterizado es un tratamiento térmico que consiste en aplicar temperaturas que permitan eliminar el componente orgánico (esponjas de poliuretano) y obtener las fases deseadas, tanto cristalinas como vítreas, sin llegar a la temperatura de fusión de la estructura. En este proyecto se ha llevado a cabo el tratamiento térmico descrito en la *Figura 7*, donde se ejecuta una primera etapa en la que se realiza una rampa de calentamiento hasta 950° durante 55 horas, partiendo desde la temperatura ambiente de la sala. La duración de esta primera rampa permite que no se produzcan excesivas fracturas en el material, debidas a una rápida condensación, evitando así disminuir las propiedades mecánicas de la muestra final.



Figura 6: Esponjas de poliuretano con reactivos incorporados



Figura 7: Proceso de sinterizado de la Wollastonita

Una vez se alcanza la temperatura de 950°, esta se mantiene durante 8h, realizándose las transformaciones de fase deseadas y alcanzando un tamaño de grano óptimo. Como resultado del sinterizado descrito se obtuvieron los scaffolds cerámicos de Wollastonita, que se puede apreciar en la *Figura 8*.



Figura 8: Scaffolds cerámicos de Wollastonita post sinterizado

Por último, las muestras se enfrían hasta temperatura ambiente dentro del horno. Con un enfriamiento lento, se evita, de igual modo que con el calentamiento lento, la aparición de microfracturas en el material que comprometan su resistencia mecánica final, además de obtener de esta forma las fases estables a temperatura ambiente.

2.1.3. Desarrollo de Recubrimientos Vítreos

Los núcleos de Wollastonita servirán de soporte para la estructura vítrea que se quiere formar. El objetivo es recubrir, estos núcleos, con vidrios de fosfato cálcico, de modo que el vidrio penetre en la estructura porosa y la dote de altas capacidades mecánicas.

Con el fin anteriormente descrito, se desarrollaron cuatro composiciones diferentes de vidrios: $\text{CaP}_4\text{O}_{11}$ (P4), $\text{Ca}_2\text{P}_6\text{O}_{17}$ (P6) y sus equivalentes dopados con litio (P4Li y P6Li). Este ion se utiliza en biomateriales como dopante, favoreciendo la formación de hueso y la angiogénesis [40,41,42]. Además, el litio reduciría la temperatura de fusión de los vidrios, siendo posible formar los recubrimientos a temperaturas menores.

Estos recubrimientos también se realizaron mediante el proceso sol-gel, utilizando esta vez como precursores el fosfato de tetraetilo (TEP, $(\text{C}_2\text{H}_5)_3\text{PO}_4$), el carbonato cálcico (CaCO_3) y el carbonato de litio (Li_2CO_3), en las proporciones que aparecen en la *Tabla 1*.

| | TEP (mL) | CaCO_3 (g) | Li_2CO_3 (g) |
|---|----------|---------------------|------------------------------|
| P6 ($\text{Ca}_2\text{P}_6\text{O}_{17}$) | 18,94 | 3,72 | 0 |
| P4 ($\text{CaP}_4\text{O}_{11}$) | 19,99 | 2,94 | 0 |
| P6Li ($\text{Ca}_2\text{P}_6\text{O}_{17} + \text{Li}$) | 18,94 | 3,72 | 0,5 |
| P4Li ($\text{CaP}_4\text{O}_{11} + \text{Li}$) | 19,99 | 2,94 | 0,5 |

Tabla 1: Composición de los distintos recubrimientos vítreos (Cantidades calculadas para 10 g de composición)

Los pasos a seguir para obtener las distintas composiciones son los siguientes:

1. Se realiza una primera disolución donde se mezcla el TEP con 5 mL de etanol y 15 mL de agua (en ese orden).
2. Una vez mezclado todo, se hidroliza el TEP añadiendo 2 mL de HCl concentrado (37%).
3. Una vez finalizada la hidrólisis, se añade el carbonato cálcico poco a poco hasta conseguir un pH final entre 2-3, teniendo así la primera disolución.
4. La segunda disolución se inicia añadiendo el resto de carbonato cálcico en 10 mL de agua.

5. A continuación, se disuelve el carbonato añadiendo ácido clorhídrico hasta conseguir un pH entre 2-3.
6. La segunda disolución se añade a la primera.

En cuanto a las composiciones que contienen carbonato de litio, este simplemente se mezcla con el carbonato cálcico, ejecutando el resto de los pasos de igual forma, añadiendo esta mezcla en lugar de solo el carbonato cálcico.

Obtenida la disolución final, esta se calienta, generándose una clara separación de fases en el proceso de calentamiento. Una fase polar, de mayor densidad, donde se encuentra el Ca^{2+} , y otra, apolar, de menor densidad, donde se encuentra el precursor TEP hidrolizado. Durante el proceso de calentamiento, se produce la evaporación de los disolventes, permitiendo que las dos fases se unan, obteniendo así la disolución final con la composición formulada.

Una vez se tiene la disolución con la viscosidad deseada, se procede a sumergir los scaffolds de Wollastonita en ella, para posteriormente secarlos a temperaturas entre 180° y 200° . Este paso se repite hasta recubrir completamente los scaffolds, no siendo necesario centrifugar, ya que, durante la obtención del vidrio, este penetrará en la estructura y se adaptará a la forma porosa del núcleo de Wollastonita.

2.1.4. Obtención de Fases Vítreas

Una vez obtenidas las muestras recubiertas en su totalidad por las formulaciones vítreas, es necesario realizar el tratamiento térmico conducente a la obtención del vidrio. Para ello es necesario realizar el estudio del diagrama de equilibrio de fases del sistema binario $\text{CaO-P}_2\text{O}_5$.

Según la versión de este diagrama ofrecida en 1967 por Kreidler y Hummel [43] (*Figura 9*), las dos composiciones de vidrio que se han desarrollado, alcanzan la fase líquida a temperaturas inferiores a 900° . Sabiendo esto, y con el objetivo de optimizar los procesos llevados a cabo durante el desarrollo de este proyecto, se decidió utilizar la misma rampa térmica que se utilizó para realizar el sinterizado de la Wollastonita (*Figura 7*).

Para la realización del estudio de resistencia mecánica se realizaron muestras con varias capas de vidrio, de forma que se pueda estudiar cómo afecta la cantidad de vidrio

en la muestra o el número de recubrimientos a las propiedades mecánicas. La forma de actuar fue aportarles más vidrio a las muestras, volviendo a realizar los pasos comentados en el apartado 2.1.3., pero esta vez con núcleos que ya presentaban vidrio, repitiendo el proceso hasta obtener muestras con 1,2 y 3 recubrimientos vítreos.

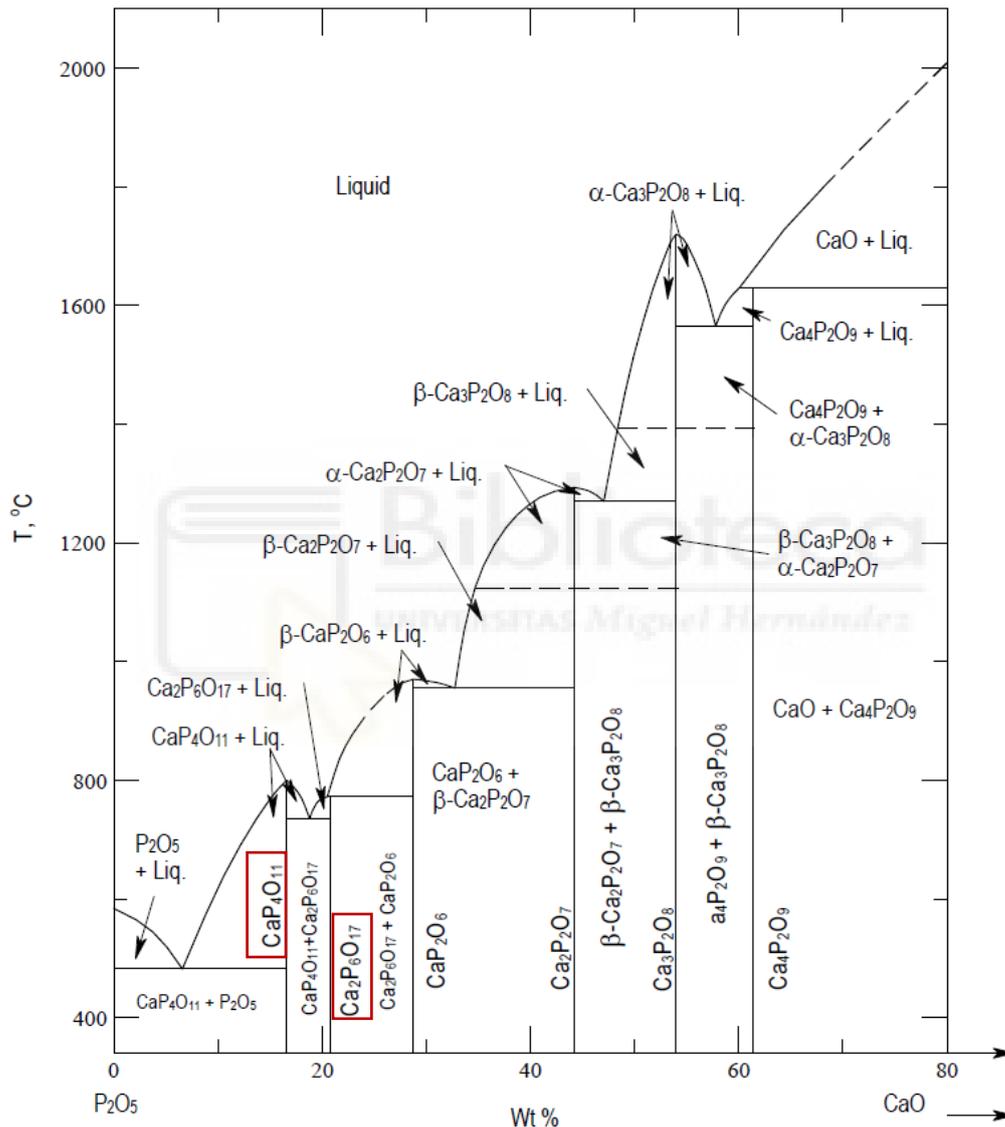


Figura 9: Diagrama de equilibrio de fases del sistema binario CaO-P₂O₅.

2.1.5. Desarrollo de Recubrimientos Reguladores de Solubilidad

Como ya se ha comentado con anterioridad, los vidrios que se han utilizado para recubrir los núcleos de Wollastonita se hidrolizan rápidamente al ser sumergidos en suero

fisiológico, formando grandes cantidades de un precipitado blanco que enturbia y condiciona el comportamiento del suero. Con el objetivo de solucionar esta problemática, se decidió realizar un nuevo recubrimiento que “selle” la capa superficial de las muestras, bloqueando así la rápida liberación de partículas al suero, además de ofrecer una superficie susceptible de formar hidroxiapatito.

Para realizar este recubrimiento sellante se tomaron dos caminos diferentes: un recubrimiento de Wollastonita o un recubrimiento de vidrio de Boro. El recubrimiento con Wollastonita está motivado al ser una fase con alto contenido de calcio, un calcio por cada silicio (CaSiO_3), siendo esta fase fuente de calcio, mientras que las fases vítreas, deficientes en calcio, son fases receptoras de estos iones, obteniendo fases con mayor relación Ca/P. Por otro lado, la fase Wollastonita, ya se ha empleado en el desarrollo del núcleo, dentro de este proyecto, por tanto, no se añade una nueva composición al material final. A la hora de realizar este recubrimiento, se recubren las muestras vidriadas según los pasos comentados en el apartado 2.1.1., realizándose posteriormente su sinterizado.

Además de las fases vítreas ya descritas, se empleó una fase vítrea de boro, esperando un comportamiento complementario a las fases vítreas de fósforo, permitiendo controlar la solubilidad, evitando la liberación excesiva de partículas en suero fisiológico por parte del vidrio de fosfato. La formulación empleada está basada en los estudios sobre vidrios bioactivos desarrollados por Gu et al. [44]. En este sentido, para realizar el recubrimiento, se utilizaron como precursores ácido bórico (H_3BO_3), carbonato cálcico (CaCO_3) y bicarbonato sódico (NaHCO_3).

| Vidrio de Boro | |
|-------------------------|---------|
| H_3BO_3 | 11,34 g |
| CaCO_3 | 3,06 g |
| NaHCO_3 | 5,13 g |

Tabla 2: Composición recubrimiento de vidrio de Boro (cantidades para obtener 10 g de composición)

Para realizar el recubrimiento primero se mezclaron los precursores (Tabla 2) con un poco de agua, obteniendo una pasta con la que se recubrieron las muestras. Una vez recubiertas las muestras, estas se secaron y sinterizaron utilizando de nuevo la misma rampa térmica que la de sinterizado de la Wollastonita.

2.1.6. Desarrollo de Recubrimiento de Alta Bioactividad

Hasta el momento, el núcleo desarrollado no es de esperar que presente bioactividad, ni con la adición superficial de Wollastonita, ya que la función de esta es liberar calcio para modular el comportamiento de la fase vítrea en contacto con el suero. Con la metodología descrita, se ha proporcionado una posible solución a la problemática relacionada con la rápida hidrolización de los vidrios de fosfato cálcico, y, como último paso a realizar en el material multicapa que se está desarrollando, se decidió dar un último recubrimiento que fuese capaz de dotar a las muestras de una alta bioactividad. De nuevo, el candidato elegido para esta última capa es la Wollastonita, esta vez según la formulación de Wollastonita dopada aportada por Ros-Tárraga et al. [36]. Esta Wollastonita dopada presenta una gran bioactividad, llegando a formarse apatito en la superficie del material estando sumergido en suero tan solo durante 6 horas.

La elaboración del recubrimiento de Wollastonita dopada se realizó de forma similar a la que se utilizó para crear los núcleos de Wollastonita (*apartados 2.1.1. y 2.1.2.*), pero esta vez utilizando la formulación de Wollastonita dopada. El único cambio en el procedimiento es la sustitución del carbonato cálcico por una mezcla de los precursores $MgCl_2$, K_2CO_3 y $CaCO_3$ (*Tabla 3*).

| Wollastonita dopada | |
|---------------------|----------|
| $MgCl_2$ | 0,70 g |
| $CaCO_3$ | 8,08 g |
| K_2CO_3 | 0,24 g |
| TEOS | 19,20 mL |

Tabla 3: Composición recubrimiento de Wollastonita dopada (cantidades para obtener 10 g de composición)

Una vez elaborada la disolución, se le dieron 10 capas de esta a las muestras obtenidas tras realizar los recubrimientos descritos en el *Apartado 2.1.5.*, sinterizándose posteriormente, obteniendo así el material final.

2.2. Técnicas de Caracterización de las Cerámicas

2.2.1. Ensayos de Resistencia Mecánica

Ya que el principal objetivo de este proyecto es lograr obtener muestras porosas con una alta resistencia mecánica, es necesario poder caracterizar las propiedades mecánicas de las muestras generadas para, además de saber si se ha conseguido este objetivo, compararlas entre sí para saber cuáles cumplen mejor con las especificaciones que se buscan.

Para conseguir estas medidas de resistencia mecánica, se dispone de una máquina de ensayos de tracción, la cual también permite realizar ensayos de compresión. Las muestras se colocaron entre las dos mordazas de la máquina, como se puede ver en la *Figura 10*, sometiendo a las muestras a una fuerza de compresión creciente hasta provocar su rotura.

Una vez ocurre la rotura de la muestra, se registra la fuerza que ha provocado dicha rotura y, utilizando la *Ecuación 1*, se obtiene la tensión de rotura de cada muestra:

- Ecuación 1:
$$\sigma_f = \frac{F}{\pi r^2}$$

Donde F es la fuerza de rotura de la muestra en Newtons y r es el radio de la muestra en metros.

Observando de nuevo la *Figura 10*, se puede ver como la muestra que está siendo sometida al ensayo de compresión, estando situada entre dos placas de esponja polimérica. Esta disposición de la muestra trata de paliar el hecho de que las superficies superior e inferior de las muestras no son perfectamente lisas, por lo que, al realizar el ensayo, la fuerza se concentraría en los pocos puntos del relieve que harían contacto con las mordazas. Debido a este fenómeno, la fuerza no se aplica a lo largo de la superficie de la muestra, por lo que la tensión obtenida en la *Ecuación 1* no sería real. Añadiendo las superficies poliméricas, se permite una mejor distribución de la fuerza a lo largo de la superficie de la muestra, ya que la esponja se adapta a esta, obteniendo así datos más cercanos a la realidad. El fenómeno se reduce, pero sigue ocurriendo, y, además, la utilización de estas esponjas hace que la curva tensión-deformación no sea válida, sin embargo, los datos de la tensión de rotura sí son válidos, lo que permite realizar una comparativa entre muestras. De este modo, y como se ha comentado en el apartado 2.1.4.,

se podrán comparar las propiedades de las muestras con distintas capas de vidrio, así como comparar las propiedades mecánicas de las diferentes composiciones de los vidrios de fosfato.



Figura 10: Ensayo de resistencia mecánica de una muestra porosa

2.2.2. Difracción de rayos X (DRX)

La técnica DRX permite conocer las distintas fases cristalinas presentes en un material, además de poder identificar la composición de estas fases.

La técnica de difracción de rayos X, se basa en la reflexión de ondas electromagnéticas por planos sucesivos de átomos en un cristal. Sabiendo que las

longitudes de onda λ de los rayos X son similares a las distancias interatómicas presentes en los materiales cristalinos, se pueden utilizar para identificar parámetros característicos de los materiales cristalinos.

En este sentido, para caracterizar un sólido cristalino, se hace incidir un haz de rayos X en el material a caracterizar, emitiendo para ciertos ángulos un haz difractado, el cuál puede ser captado por un detector. Este haz difractado debe de cumplir la ley de Bragg: $n \cdot \lambda = 2 \cdot d \cdot \sin\Theta$; donde n es el orden de difracción, λ es la longitud de onda, d es la distancia entre planos y Θ es el ángulo donde aparecerá el pico de difracción, teniendo en cuenta que aparece a 2Θ

En el presente proyecto se dispone de un equipo DRX modelo Bruker-AXS D8 Advance. Para caracterización de las muestras con este equipo es necesario preparar las muestras empleando la técnica de Debye-Scherrer o técnica de polvos. Por este motivo, para obtener un alto número de granos muy finos, orientados de manera aleatoria, es necesario moler las muestras a analizar.

2.2.3. Microscopía Electrónica de Barrido-Microanálisis de Energía Dispersiva de Rayos X (SEM-EDX)

Analizar la superficie del material que se ha desarrollado es de gran importancia, ya que esta superficie es la primera que entra en contacto con el cuerpo humano. Para el análisis de superficies se dispone de un equipo de Microscopía Electrónica de Barrido (SEM) modelo Hitachi S-3500N.

El SEM ofrece una imagen magnificada de la superficie del material con una resolución que puede llegar a unos pocos nm. Esta imagen se obtiene de proyectar un haz de electrones acelerados con una energía de 25kV sobre una muestra opaca a estos electrones. El haz realiza un barrido sobre la superficie de la muestra, siguiendo líneas paralelas, mostrando así la superficie del material. La imagen se forma por la detección de los electrones secundarios de baja energía, que son emitidos por la muestra como consecuencia de la interacción con el haz que incide en ella.

En este proyecto se dispone de un equipo SEM acoplado a un equipo de Microanálisis de Energía Dispersiva de Rayos X (EDX). Además de obtenerse electrones secundarios de baja intensidad, debido a la interacción del haz incidente con la muestra,

se obtienen dos tipos de radiación más: electrones retrodispersados y rayos X. El equipo EDX capta los rayos X, permitiendo analizar la composición de la superficie del material. El EDX funciona excitando electrones de capas interiores, haciendo que salga de su nivel de energía, generando en consecuencia un hueco. Este hueco es ocupado por un electrón de un nivel más externo, dando lugar a la emisión de radiación, en forma de rayos X, equivalente a la diferencia energética entre ambos orbitales. La magnitud de esta emisión es característica de cada elemento de la tabla periódica, por lo que el EDX es capaz de detectar la composición atómica del punto que se está analizando, además de poder detectar el porcentaje de cada uno de estos átomos.

Si las muestras a analizar no son conductoras, como es el caso del presente proyecto, es necesario recubrirlas de una capa que sí lo sea. De este modo, las muestras se recubrieron de Paladio, haciéndolas conductoras y evitando que se carguen negativamente.

2.3. Ensayos de Bioactividad

A lo largo del documento se ha insistido en que es imprescindible que los materiales que se vayan a utilizar para regeneración ósea formen una unión al hueso. Esta unión se forma por la aparición de hidroxiapatito en la superficie del material. Se ha demostrado que los implantes que no se unen al hueso de esta forma son menos duraderos, ya que el movimiento relativo entre el hueso y el implante conduce a la degradación de este [19]. De este concepto también nace la definición de bioactividad dada por Hench: “material que permite formar una unión química con el tejido vivo” [19]. Con todo esto en cuenta, se puede definir a un material bioactivo como aquél que es capaz de formar en su superficie una capa de un material similar al componente inorgánico del hueso, es decir, hidroxiapatito.

La necesidad de prever si un material es bioactivo de una forma en la que no sea necesario emplear animales en el proceso, llevó a Tadashi Kobuko a realizar estudios *in vitro* utilizando suero fisiológico artificial (SFA) [45]. Así, gracias al método ofrecido por Kobuko, realizando estudios *in vitro*, se puede saber si un material es candidato para ser implantado, ya que si forma una capa de hidroxiapatito ante SFA, probablemente también será capaz de formarla en el cuerpo humano.

En cuanto al suero fisiológico artificial, este se trata de una disolución con concentración iónica muy similar a la del plasma sanguíneo (*Tabla 4*) [45]. Para producir 1L de suero fisiológico artificial, se siguieron las directrices dadas por Kobuko [45] utilizando los reactivos descritos en la *Tabla 5*.

| Ion | Plasma sanguíneo (mM) | SFA (mM) |
|--------------------------------|-----------------------|----------|
| Na ⁺ | 142 | 142 |
| Cl ⁻ | 103 | 147,8 |
| HCO ³⁻ | 27 | 4,2 |
| K ⁺ | 5 | 5 |
| Ca ²⁺ | 2,5 | 2,5 |
| Mg ²⁺ | 1,5 | 1,5 |
| HPO ₄ ²⁻ | 1 | 1 |
| SO ₄ ²⁻ | 0,5 | 0,5 |
| pH | 7,2-7,4 | 7,4 |

Tabla 4: Concentración de iones del SFA y del plasma sanguíneo humano [45]

| Producto | Cantidad |
|--|----------|
| Cloruro sódico (NaCl) | 8,035 g |
| Bicarbonato de sodio (NaHCO ₃) | 0,355 g |
| Cloruro potásico (KCl) | 0,225 g |
| Hidrogeno fosfato trihidratado de potasio (K ₂ HPO ₄ ·3H ₂ O) | 0,231 g |
| Cloruro de magnesio hexahidratado (MgCl ₂ ·6H ₂ O) | 0,311 g |
| Ácido clorhídrico (HCl 1 M) | 39 mL |
| Cloruro cálcico (CaCl ₂) | 0,292 g |
| Sulfato de sodio (Na ₂ SO ₄) | 0,072 g |
| Tris-hidroximetil aminometano((HOCH ₂) ₃ CNH ₂); (Tris) | 6,118 g |
| Ácido clorhídrico (HCl 1 M) | 0,5 mL |

Tabla 5: Componentes necesarios para realizar 1 L de SFA [45]

Para realizar los ensayos de bioactividad se introducen las muestras a analizar en tubos Falcon para posteriormente rellenarlos de SFA. Para tener unas condiciones

similares a las que se tendría en el cuerpo humano, los tubos se sumergieron en un baño que permanece aproximadamente a 37°. Las muestras permanecieron en estas condiciones durante 3 y 7 días, para así obtener una primera aproximación de su bioactividad. Una vez las muestras se sacan del SFA, es necesario secarlas antes de realizar cualquier otro tipo de prueba.



3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tal y como se ha descrito en el apartado anterior, la realización de cada una de las muestras multicapa es un proceso laborioso, llegando a estar constituidas algunas de las muestras por 4 capas de diferente composición. Por este motivo, el tiempo es un factor clave en el desarrollo de los materiales estudiados. Para completar este estudio ha sido necesario obtener más de 200 muestras.

El estudio y desarrollo de los materiales descritos en este proyecto se puede estructurar en tres grandes bloques:

1. El primer bloque del proyecto se basó en la obtención de muestras altamente resistentes utilizando los vidrios P4, P6, P4Li y P6Li. Para ello, primero se realizó un primer estudio del comportamiento de estos vidrios al desarrollarlos utilizando la técnica sol-gel. Obtenida la composición final de los vidrios, capaz de aportar las propiedades mecánicas a las muestras, se pasó a realizar ensayos de resistencia mecánica de estas.
2. Una vez obtenidas muestras con alta resistencia mecánica, se desarrollaron las muestras finales con los distintos recubrimientos mencionados en el *Apartado 2: Materiales y Métodos*.
3. El proyecto finalizó con la caracterización microestructural de las diferentes muestras obtenidas a lo largo del proyecto mediante DRX y SEM-EDX y la realización de ensayos de bioactividad de las muestras finales.

Ya que se han generado diferentes tipos de muestras, cada una con una composición diferente, y para lograr un mejor manejo de la información, se le ha dado a cada composición un nombre específico. Cada composición y su referencia aparecen recogidos en la *Tabla 6*, donde se ordenan los distintos estratos que forman la muestra, partiendo del núcleo y acabando en su capa más externa.

| Nombre | Núcleo | Capa 1 | Capa 2 | Capa 3 |
|---------------|--------------|-------------|----------------|---------------------|
| P4Li | Wollastonita | Vidrio P4Li | – | – |
| P6Li | Wollastonita | Vidrio P6Li | – | – |
| P4W | Wollastonita | Vidrio P4Li | Wollastonita | – |
| P6W | Wollastonita | Vidrio P6Li | Wollastonita | – |
| P4B | Wollastonita | Vidrio P4Li | Vidrio de Boro | – |
| P6B | Wollastonita | Vidrio P6Li | Vidrio de Boro | – |
| P4WBio | Wollastonita | Vidrio P4Li | Wollastonita | Wollastonita dopada |
| P6WBio | Wollastonita | Vidrio P6Li | Wollastonita | Wollastonita dopada |
| P4BBio | Wollastonita | Vidrio P4Li | Vidrio de Boro | Wollastonita dopada |
| P6BBio | Wollastonita | Vidrio P6Li | Vidrio de Boro | Wollastonita dopada |

Tabla 6: Muestras utilizadas durante el proyecto y las distintas capas que las componen

3.1. Comportamiento de los vidrios de composiciones P4, P6, P4Li y P6Li

El primer acercamiento al desarrollo las estructuras soporte consistió en el recubrimiento de los núcleos de Wollastonita (*Figura 11a*) con la composición sin dopar de los vidrios (P4 y P6), para posteriormente darle un tratamiento térmico, donde se realizó una primera rampa de 8h hasta llegar a 950°, manteniendo esta temperatura durante 3h. Según el diagrama de fases de la *Figura 9*, el vidrio debería haberse formado, sin embargo, los reactivos no alcanzaron la fase líquida.

Una vez observado esto, se dio a estas muestras un tratamiento térmico de mayor duración, utilizando la rampa térmica del sinterizado de la Wollastonita (*Figura 7*), observándose esta vez mejores resultados. Se obtuvieron las muestras que aparecen en la *Figura 11b* y en la *Figura 11c*. Si bien estas presentan ciertas partes donde se ha formado lo que parece ser vidrio, siguen recubiertas por parte de los reactivos que no han fundido y forman “nubes” que se desprenden fácilmente de la estructura, no aportando propiedades mecánicas. Además, al no llegar a la fase líquida gran parte de los reactivos añadidos, la porosidad de la muestra se ve altamente comprometida.

Ya que el aspecto de estas muestras parecía indicar que no se estaba llegando a la temperatura de fusión, incluso habiendo superado con margen la temperatura que indica el diagrama de fases, se decidió añadir una sustancia dopante que redujese la temperatura de fusión de los vidrios. Se decidió esta solución en vez de subir la temperatura del tratamiento térmico, ya que se busca realizar el material a la mínima temperatura posible, además de que la adición de un dopante puede traer una serie de ventajas a la hora de

actuar como implante. De esta forma se recubrió la Wollastonita de las composiciones P4Li y P6Li, obteniendo esta vez un resultado muy diferente.

En efecto, la adición del litio a la composición de los vidrios hace que baje su temperatura de fusión, de modo que esta vez se obtuvieron las muestras que aparecen en la *Figura 11d* y *Figura 11e*. Estas muestras salieron del tratamiento térmico totalmente vidriadas y con un brillo y color característicos, que no aparecían en los procedimientos anteriores. Además, el vidrio fundió totalmente, penetrando por la estructura porosa del núcleo de Wollastonita y dotando a las muestras de una alta resistencia mecánica, la cual se puede apreciar a simple vista.

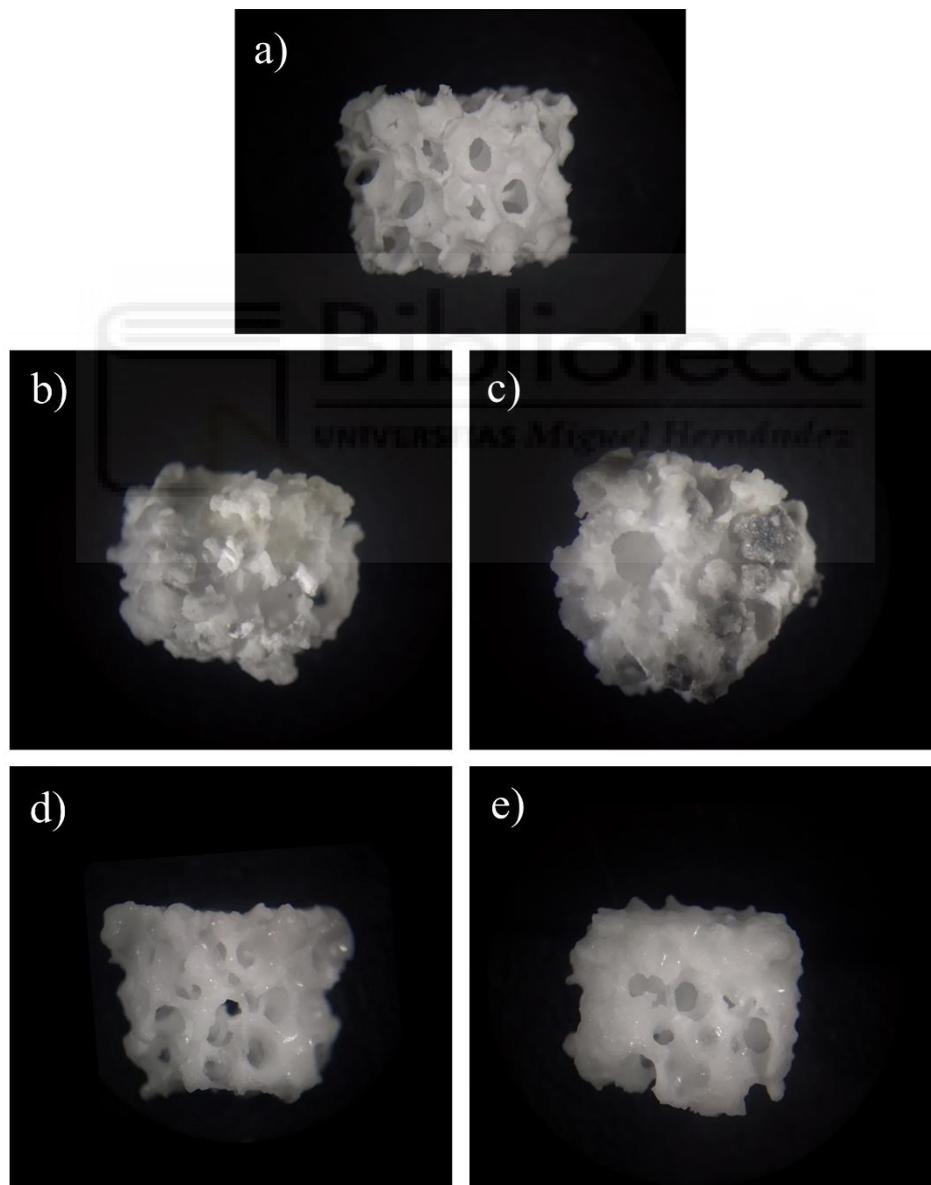


Figura 11: Muestras obtenidas durante el estudio de la formación de los vidrios P4 y P6 mediante sol-gel: a) Scaffold de Wollastonita; b) Scaffold de Wollastonita recubierto de la composición P4; c) Scaffold de Wollastonita recubierto de la composición P6; d) Scaffold de Wollastonita recubierto de la composición P4Li; e) Scaffold de Wollastonita recubierto de la composición P6Li

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en esta parte del proyecto, las composiciones de los vidrios sin dopar (P4 y P6), se descartaron, siguiendo en los siguientes puntos de la investigación con las composiciones dopadas con litio (P4Li y P6Li), las cuales cumplen los requisitos que se buscaban en estos recubrimientos vítreos. En un principio, ambas composiciones parecen mostrar un comportamiento similar. En los siguientes estudios, se realizó una comparativa entre sus comportamientos de resistencia mecánica y bioactividad, para poder decidir cuál de las dos cumpliría mejor los requisitos que se buscan para su uso como biomaterial.

3.2. Ensayos de Resistencia Mecánica

Los ensayos de resistencia mecánica permiten caracterizar la influencia de la cantidad de vidrio presente en la muestra, cada muestra a la que se le realizó el ensayo de resistencia mecánica, fue pesada antes y después de realizar los recubrimientos de vidrios P4Li y P6Li. De este modo, se tienen datos de la tensión máxima que soportaron las muestras y de la cantidad de vidrio que se les añadió. La representación gráfica de los parámetros citados permite analizar la relación entre estas dos variables.

En la citada representación gráfica, no se puede utilizar directamente la cantidad de vidrio en gramos que se le ha añadido a cada muestra, dado que no permitiría realizar un análisis comparativo entre muestras. Esta restricción viene dada por el hecho de que, aunque dos muestras hayan captado la misma cantidad de vidrio, no significa necesariamente que vayan a presentar una resistencia similar, ya que otras variables, como el tamaño inicial del núcleo de Wollastonita, también influyen en el comportamiento de las muestras a la hora de analizar su resistencia mecánica. Para normalizar este fenómeno, es necesario crear la variable "*Cantidad de vidrio*", que se obtuvo de dividir la cantidad de vidrio en gramos presente en cada muestra entre la masa inicial del núcleo de Wollastonita. De esta forma, se obtiene un parámetro que se puede extrapolar a todas las muestras, relacionando la cantidad de vidrio presente en cada muestra con la masa inicial de su núcleo.

Conocido el origen de la variable “*Cantidad de vidrio*” que aparece en los gráficos de las Figuras 12 y 13, se puede pasar al análisis de estos. Como primera conclusión, se puede observar, gracias a las líneas de tendencia, la relación lineal que existe entre la tensión de rotura de una muestra y la masa de vidrio que se le ha aportado. Este fenómeno es algo esperable, a mayor cantidad de vidrio, mayores son las propiedades mecánicas de las muestras. Además, si comparamos ambas gráficas, se ve un comportamiento muy parecido en cuanto a las propiedades que aporta cada gramo de vidrio. Sin embargo, las tensiones de rotura máximas obtenidas en las muestras con vidrio P6Li son mayores, debido a que las muestras recubiertas de esta composición captaron más cantidad de vidrio. Este fenómeno se observará mejor analizando la influencia del número de capas de vidrio en sus propiedades mecánicas.

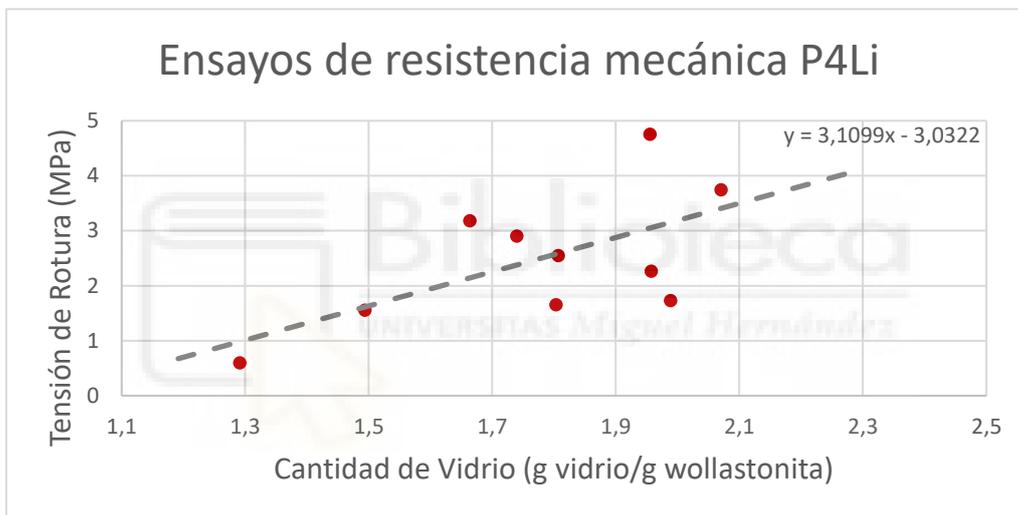


Figura 12: Representación cantidad de vidrio P4Li captada por las muestras frente a tensión de rotura.

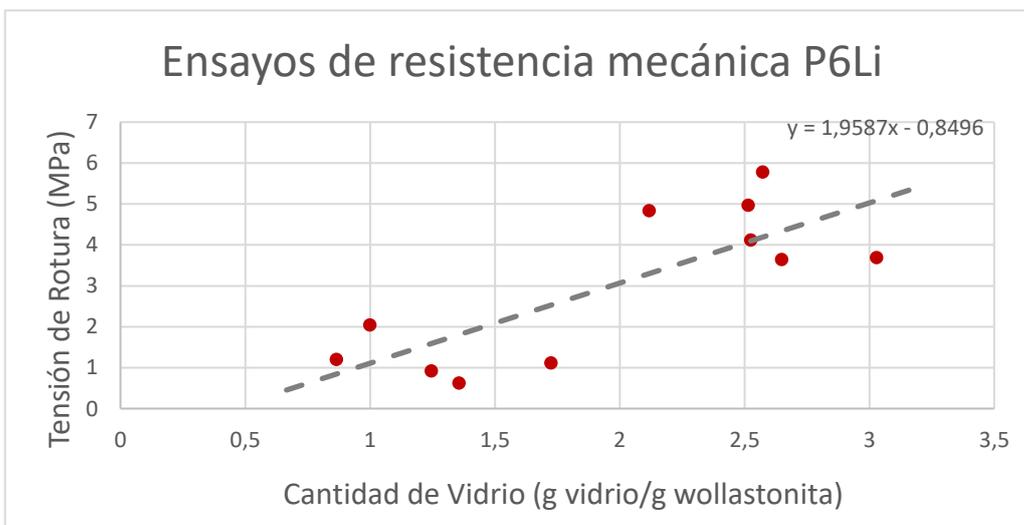


Figura 13: Representación cantidad de vidrio P6Li captada por las muestras frente a tensión de rotura.

Para observar esta influencia, se generaron muestras con 1, 2 y 3 capas de vidrio de ambas composiciones, de modo que se puedan obtener datos de las resistencias que se consiguen con esas muestras. A la hora de representar los datos solo resultarán interesantes las resistencias máximas, mínimas y promedio que se han obtenido, de modo que se pueda observar si este promedio tiende a la resistencia máxima o mínima.

Lo primero que se puede apreciar al observar las representaciones gráficas de las *Figuras 14 y 15* es que, como es evidente, cuantas más capas de vidrio se les da a las muestras, las tensiones máximas y mínimas obtenidas son mayores. Este comportamiento se relaciona con el fenómeno antes comentado de que, a mayor cantidad de vidrio, mayores son las propiedades mecánicas obtenidas, pero, además de esto, se observan mejoras relacionadas con la eliminación de imperfecciones en las muestras, gracias a los sucesivos tratamientos térmicos. Estas mejoras están asociadas al hecho de que, al añadir las sucesivas capas de vidrio a las muestras, y al volver a realizar el tratamiento térmico que permita su fusión, se produce también la fusión de la capa de vidrio ya presente en la muestra. Esto permite eliminar las posibles grietas y otras imperfecciones que se generaron durante la formación de esta capa, mejorando así sus propiedades mecánicas.

Se observa también, en ambas representaciones, un gran salto en las propiedades mecánicas entre la primera capa de vidrio y la segunda, llegando a multiplicar casi por cinco la resistencia mecánica de ambas composiciones. Esto ocurre porque, si no se le da la cantidad suficiente de vidrio a las muestras en esta primera capa, los beneficios que se obtienen distan bastante de las propiedades que se pueden obtener con estas composiciones de vidrio. Con la segunda capa, las muestras ya obtienen la cantidad suficiente de vidrio necesario para dotar a las muestras de una gran resistencia mecánica.

En cuanto a la comparativa entre ambas composiciones, de nuevo se observa que la composición P6Li (*Figura 15*) presenta tensiones de rotura mayores en los tres casos estudiados (1,2 y 3 capas de vidrio). Para observar mejor este fenómeno, se realizó una nueva representación con las resistencias promedio de las composiciones P4Li y P6Li.

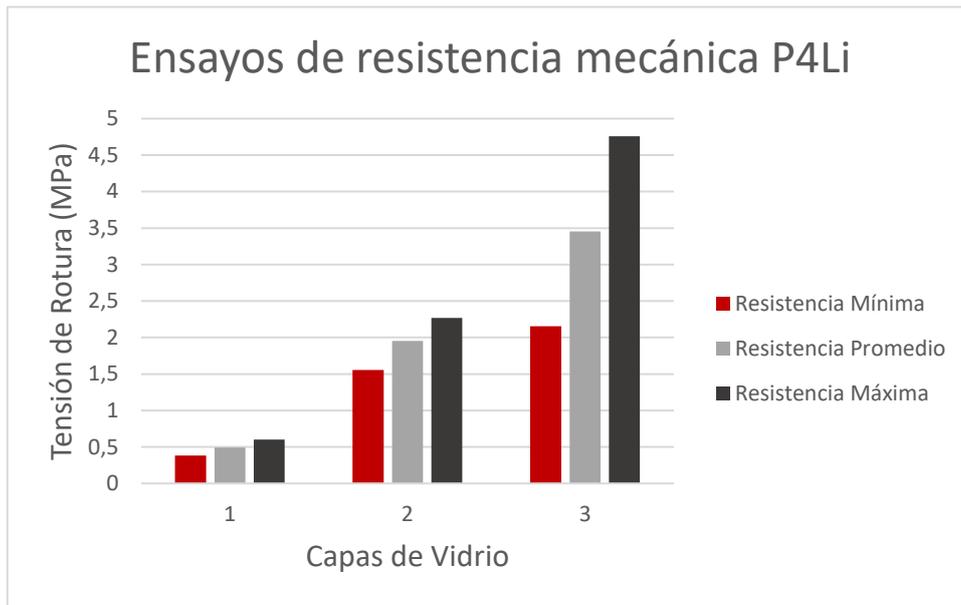


Figura 14: Representación de las tensiones de rotura máximas, mínimas y promedio obtenidas según el número de capas del vidrio de composición P4Li.

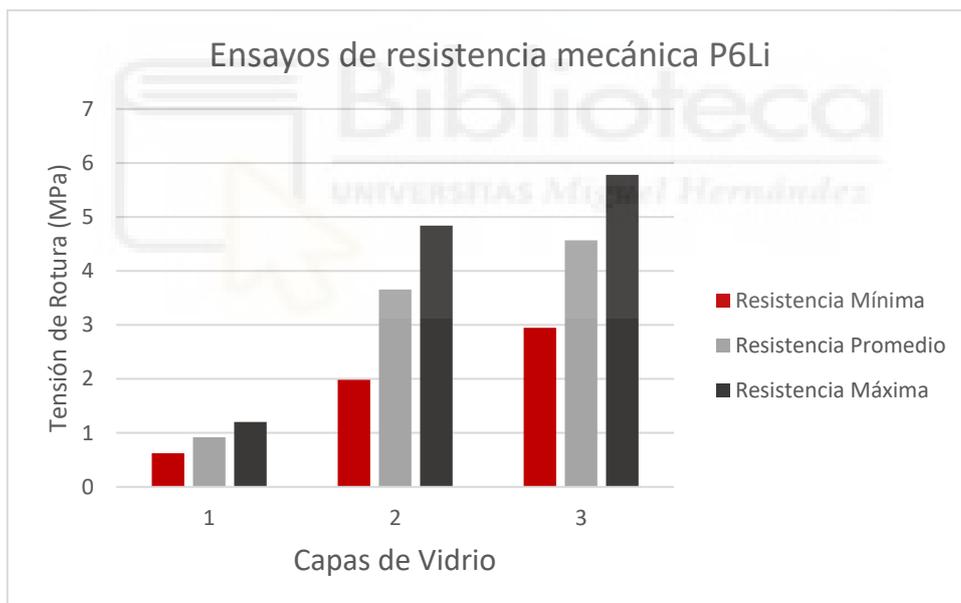


Figura 15: Representación de las tensiones de rotura máximas, mínimas y promedio obtenidas según el número de capas del vidrio de composición P6Li.

Al comparar los resultados promedio obtenidos en las dos composiciones, según la Figura 16, se ve un gran salto en cuanto propiedades mecánicas entre la primera y la segunda capa de la composición P6Li, siendo este salto menos pronunciado en la composición P4Li. Este gran salto de propiedades hace que con dos capas de vidrio de la composición P6Li se obtenga casi el doble de resistencia que con dos capas de P4Li. Además, también se puede observar el mejor comportamiento, en cuanto a resistencia, de

la composición P6Li, en que han sido necesarias 3 capas de P4Li para obtener tensiones de rotura cercanas a las que se obtienen con dos capas de P6Li.

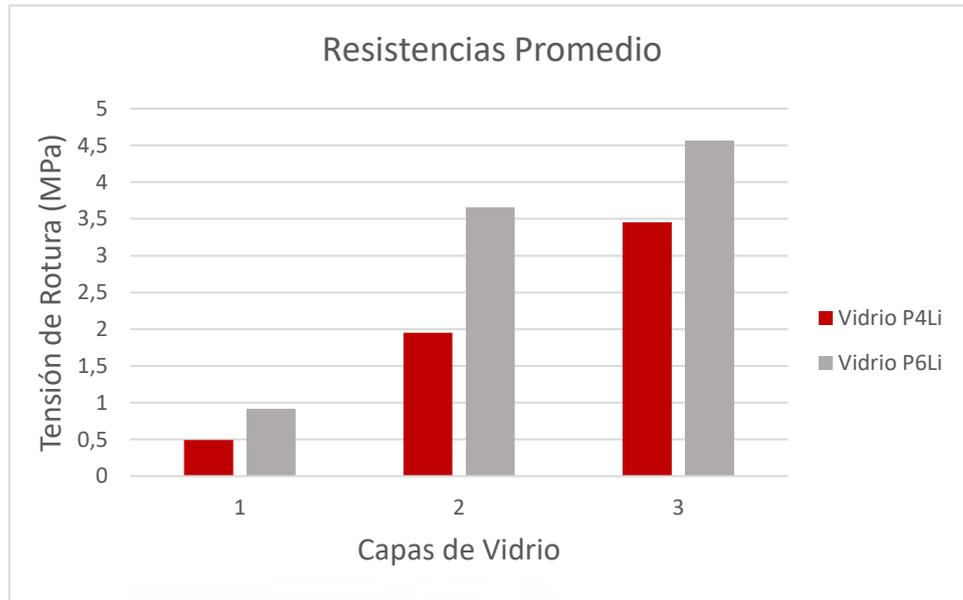


Figura 16: Resistencias máximas conseguidas con los vidrios P4Li y P6Li en función del número de capas de vidrio

Como última consideración, se tiene que los valores máximos de tensión de rotura obtenidos se acercan a los 6 MPa, resistencia que de por sí es bastante notable en comparación con otros biomateriales porosos. Sin embargo, estos valores no son reales. Como ya se ha comentado previamente, la fuerza ejercida por la máquina de ensayos se concentra en ciertos puntos del relieve de las muestras, de modo que no se reparte por toda su superficie. Los resultados reales serían bastante mayores a los obtenidos en el ensayo. Para probar esta afirmación, se realizó un ensayo a una muestra con placas de plástico rígido en vez de con las placas esponjosas utilizadas en el resto de los ensayos. La muestra dejó la huella que se ve en la *Figura 17*, donde se puede observar que la muestra dejó huella solamente en tres puntos. Considerando que esta es el área real de contacto de la muestra y, teniendo en cuenta que cada uno de los puntos de la huella tienen aproximadamente 1 mm de diámetro, se obtuvo una tensión de rotura de aproximadamente 23 MPa. Con esta medida se puede considerar que las muestras superan con margen la resistencia del hueso trabecular, estando esta en el rango entre 1,5 y 9,3 MPa (según Caeiro et al.) [46]. Además, al haber realizado esta prueba con una muestra

de P4Li con dos capas de vidrio, se podría considerar que esta resistencia con las muestras de P6Li sería incluso mayor.

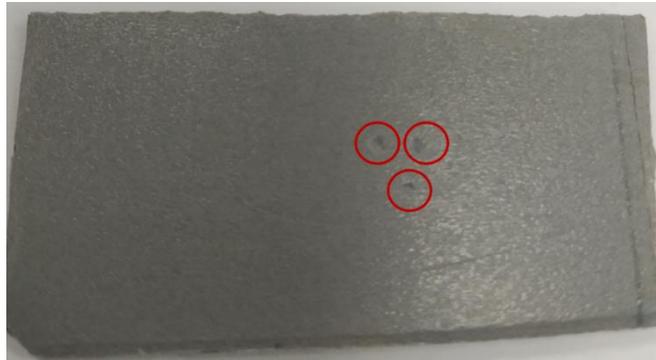


Figura 17: Huella de una muestra de P4Li en una placa de plástico rígido tras un ensayo de compresión

Esta tensión de rotura de 23 MPa se obtiene del ensayo de una muestra porosa, con numerosas zonas de concentración de esfuerzos, que son discontinuidades que alteran la distribución del esfuerzo en sus inmediaciones, alcanzando antes la tensión de fractura [47]. En el caso de las muestras ensayadas, estas discontinuidades serían cada uno de los microporos y macroporos presentes en la estructura, por lo que se tienen gran cantidad de puntos críticos. Además, ya que se trata de un material frágil, cuando en la zona del incrementador de esfuerzos se supera la resistencia a la fractura del material, se forma una grieta, que a su vez también actúa a forma de concentrador de esfuerzos. Entonces, esta grieta avanza rápidamente y provoca el fallo en el material (rotura frágil).

Durante el ensayo de las muestras, este fenómeno de rotura frágil, provocada principalmente por concentradores de esfuerzos, condiciona de forma severa la resistencia que se puede obtener con este tipo de muestras. Aún así, se ha demostrado que se puede superar altamente la resistencia del hueso trabecular, por lo que, si se realizase una muestra compacta con alguno de estos vidrios, podría considerarse que se puede obtener una resistencia del mismo orden de magnitud que la hueso cortical (167-200 MPa, según Caeiro et al.) [46].

3.3. Composición mineralógica y microestructural

Una vez realizada la caracterización de las propiedades mecánicas de las muestras, a continuación, se describe la caracterización superficial y las fases presentes en las muestras.

3.3.1. Difracción de Rayos X

Para realizar la caracterización mineralógica del material obtenido, tal como se ha descrito, se empleó la técnica de Difracción de Rayos X, obteniendo los resultados que se muestran a continuación:

- **Composiciones P4W/P6W**

Se muestran en *las Figuras 18 y 19* los difractogramas DRX obtenidos a partir de las muestras con composición P4W y P6W. En ellos aparecen representados los picos principales entre 16° y 52° 2Theta, los cuales nos indican las distintas fases cristalinas presentes en las muestras.

Ambos difractogramas muestran que, tanto en la composición que tiene como base el vidrio P4Li, como la que tiene el P6Li, se obtienen las mismas fases cristalinas, destacando como fases principales presentes en ambas composiciones el Metafosfato y la Wollastonita.

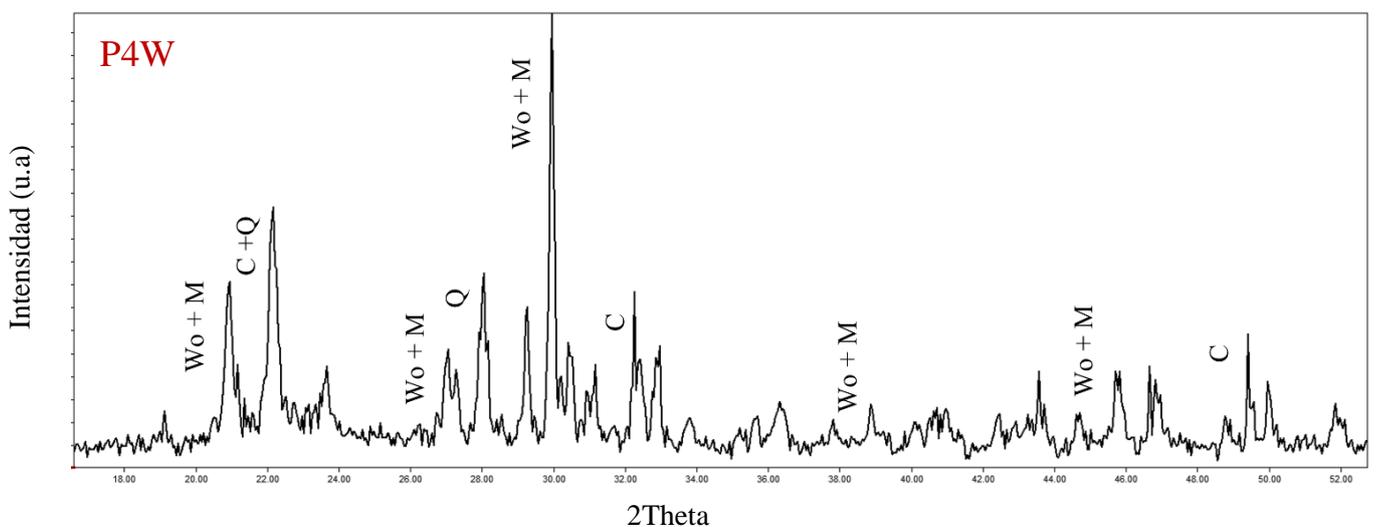


Figura 18: Análisis por DRX de la cerámica de composición P4W donde: Wo=Wollastonita; M= Metafosfato; Q= Cuarzo; C= Cristobalita

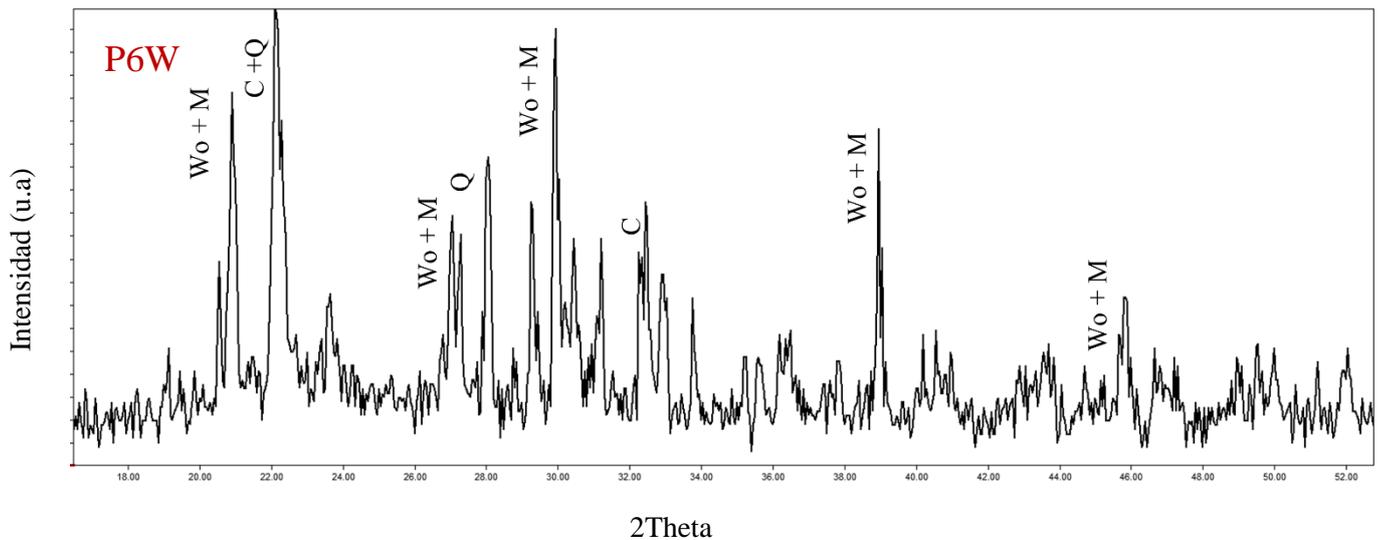


Figura 19: Análisis por DRX de la cerámica de composición P6W donde: Wo=Wollastonita; M= Metafosfato; Q= Cuarzo; C= Cristobalita

A continuación, se describe brevemente las fases cristalinas presentes, justificando su presencia en los materiales desarrollados:

- Wollastonita: una de las fases principales en ambos materiales es la Wollastonita (CaSiO_3). La presencia de gran cantidad de Wollastonita se debe a que el núcleo de las muestras está compuesto de esta fase, sumado a que se le dio un recubrimiento final también de Wollastonita. Esto indica que se ha desarrollado esta fase correctamente durante la creación de las muestras.
- Metafosfato: la segunda fase principal del material es el Metafosfato (CaP_2O_6), fase cristalina que se crea durante la formación de los vidrios. La presencia de una alta cantidad de Wollastonita en la muestra, permite la difusión de iones de calcio presentes en ella a la fase vítrea. La formación de vidrio ocurre por la escasez de iones calcio, por lo que al migrar estos desde la Wollastonita, el vidrio los capta y se forma esta fase cristalina.
- Óxidos de Silicio: como fases cristalinas secundarias, las muestras contienen óxidos de silicio (SiO_2) en forma de Cristobalita y Cuarzo. La presencia de estas fases se debe, en primer lugar, a la utilización de la técnica sol-gel para la formación de Wollastonita, durante la cual se forman enlaces Si-O-Si que

posteriormente se estabilizan en forma de SiO_2 . En segundo lugar, la difusión de iones de calcio hacia el vidrio provoca la formación de SiO_2 en las zonas donde han migrado estos iones.

Del análisis de los difractogramas también se confirma lo comentado en el apartado anterior, que las muestras basadas en P6Li presentan una mayor cantidad de vidrio. La aparición de “ruido” en el difractograma, puede indicar la presencia de fase no cristalina, es decir, fase vítrea. Al tener el difractograma de la composición P6W (*Figura 19*) mayor cantidad de ruido, indicaría que este material tiene mayor cantidad de fase vítrea que el de la composición P4W (*Figura 18*).

- **Composiciones P4B/P6B**

Debido a la complejidad de los difractogramas DRX obtenidos a partir de las muestras con composición P4B (*Figura 20*) y P6B (*Figura 21*), no se pueden extraer conclusiones en cuanto a las fases que componen el material obtenido. Queda pendiente para proyectos futuros la caracterización de este material.

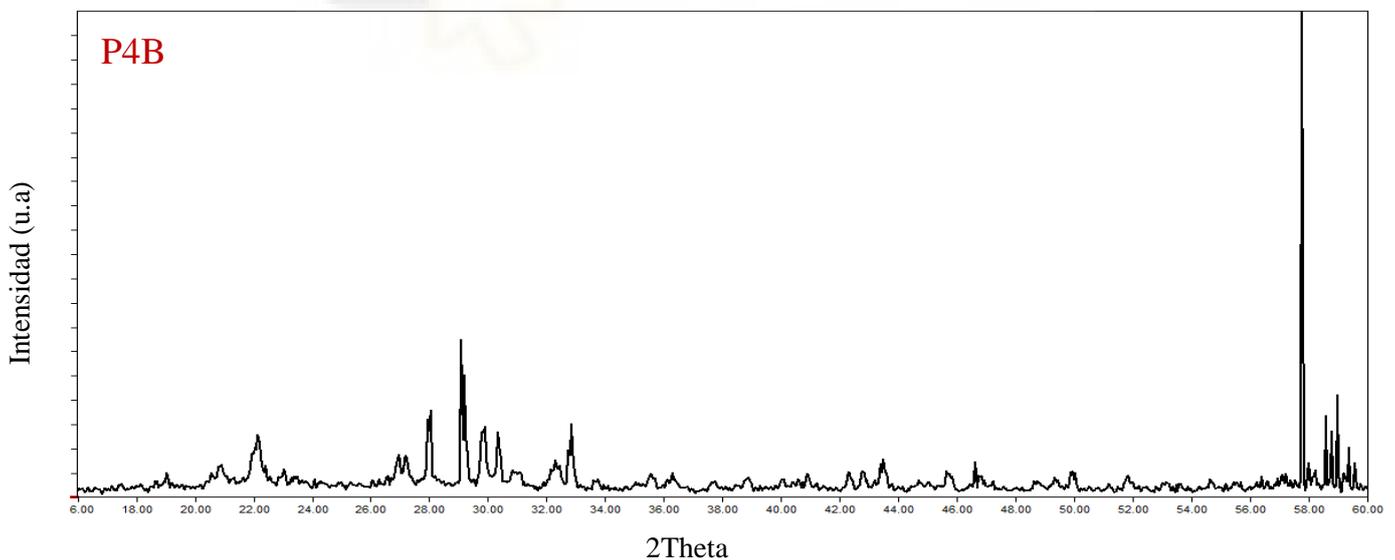


Figura 20: Análisis por DRX de la cerámica de composición P4B

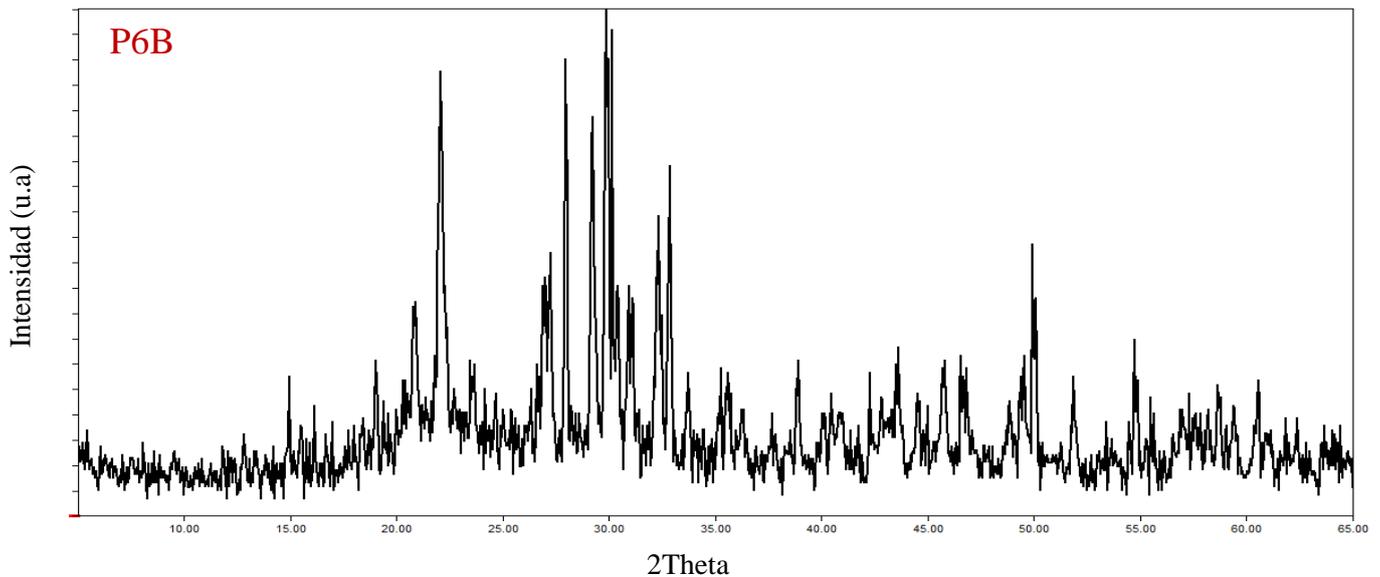


Figura 20: Análisis por DRX de la cerámica de composición P6B

3.3.2. SEM-EDX

Una vez comprobado que con las composiciones P4Li y P6Li, se pueden obtener muestras porosas, de aspecto vítreo, apreciable a simple vista, que proporciona altas propiedades mecánicas. Realizándose, además, la caracterización de las fases presentes en las muestras, mediante la técnica de DRX, queda, por último, caracterizar la morfología superficial de las estructuras desarrolladas. Para este fin, mediante microscopía SEM, se observó la superficie de las muestras a las que se le realizó los ensayos de resistencia mecánica, en concreto, a las muestras constituidas por un núcleo de Wollastonita y dos recubrimientos de vidrio, tanto de la composición P4Li, como de P6Li.

Los resultados de analizar la superficie de estas muestras aparecen representados en la *Figura 22*. Como primera consideración se puede apreciar que ambas composiciones muestran un comportamiento similar, estando compuesta su superficie por una serie de cristales de gran tamaño, los cuales están unidos por una matriz de vidrio. Esta mezcla de cristales y vidrio explicaría la obtención de un material de altas capacidades mecánicas. Estos cristales tienen formas poligonales, principalmente rectangulares, y los análisis EDX de los mismos muestran relaciones Ca/P entre 0.5 y 0.9. Como se ha observado mediante los análisis DRX, estos cristales son metafosfato de calcio (CaP_2O_6) cuya relación Ca/P es de 0.5. Se puede observar en las micrografías que ciertos cristales están evolucionando a formas hexagonales (flechas azules) o a forma de barras, formas que se

relacionan con el pirofosfato de calcio ($\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7$). Esto, sumado a que la presencia de vidrio afecta a las medidas, explicaría la variabilidad entre las relaciones Ca/P obtenidas.

En cuanto a diferencias entre las dos composiciones, se observa, en primer lugar, que los cristales presentes en las muestras recubiertas con P6Li son de mayor tamaño. Como segunda diferencia se tiene que las aristas de los cristales de la composición P4Li están más pronunciadas, debido a que estas muestras presentan menos vidrio. Al tener más vidrio las muestras de P6Li, se forma una capa de vidrio superficial que cubre los cristales y hace que la imagen de estos se difumine.

Por último, queda comprobar que la composición del vidrio que rodea a los cristales corresponde con la composición buscada. Realizando análisis EDX del vidrio de la muestra de P4Li se obtuvo una relación Ca/P de 0.25, lo que indica que el vidrio analizado corresponde con la composición buscada ($\text{CaP}_4\text{O}_{11}$). En la muestra de P6Li se obtuvo una relación Ca/P de 0.33, de modo que se probó la obtención de la composición $\text{Ca}_2\text{P}_6\text{O}_{17}$.

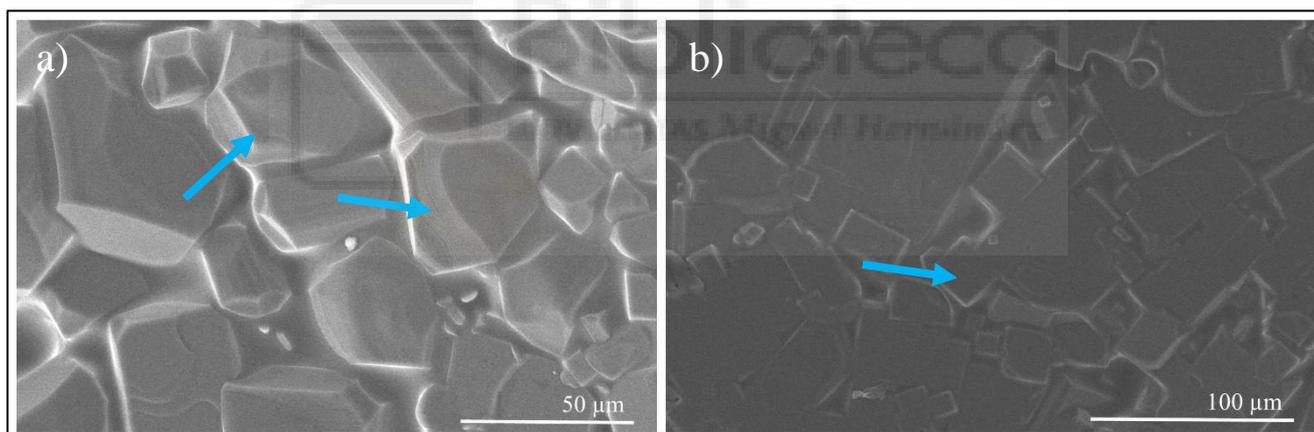


Figura 22: Micrografías SEM de muestras P4Li/ P6Li: a) composición P4Li; b) composición P6Li.

3.4. Ensayos de Bioactividad

Una vez desarrollado y caracterizado el núcleo de alta resistencia mecánica, es necesario dotarlo de bioactividad, dado que, como se ha destacado en los antecedentes, la presencia de altas cantidades de vidrio, ejercen un efecto negativo en la bioactividad. Para este fin, tal como se ha indicado en la *sección 2: Materiales y Métodos*, a las composiciones P4W y P6W, se les dio una primera capa de Wollastonita, con objeto de modular el comportamiento del vidrio, con la presencia del ion calcio. Además, se le dio

una segunda capa con Wollastonita dopada, esto con objeto de promover la bioactividad, obteniendo las estructuras finales denominadas P4WBio y P6WBio.

3.4.1. Composiciones P4WBio/P6WBio

Para las estructuras finales antes descritas, se realizó un único ensayo a 3 días, ya que en este periodo de tiempo ya se percibió que en el suero aparecieron grandes cantidades de precipitado blanco, tanto para las composiciones P4WBio como para las P6WBio, lo que indica que el darle un recubrimiento de Wollastonita final, para controlar la hidrólisis del vidrio de las muestras al sumergirlas en suero, no resultó efectivo. Se puede ver en la *Figura 23* el precipitado que generan las muestras y como este permanece en el fondo.



Figura 23: SBF tras ensayo de bioactividad a 3 días de una muestra P6WBio

Las muestras de la composición P4WBio liberaron menor cantidad de precipitado al suero, debido a, como se ha demostrado en apartados anteriores, la menor cantidad de vidrio que presentan estas muestras frente a las de P6WBio. También se puede ver este fenómeno en la micrografía SEM de la *Figura 24a*, donde se puede observar la morfología superficial de la muestra de composición P4WBio después de la inmersión en

SFA durante 3D. Estas micrografías, muestran los cristales característicos que aparecían en las muestras patrón de este tipo de vidrio, pero esta vez no están rodeados en su totalidad por vidrio, debido a que ha sido hidrolizado y liberado al suero, dejando en la superficie del material los cristales de metafosfato y, alrededor de los mencionados cristales, huecos que estaban ocupados por vidrio, tal como se indica con las flechas azules de la *Figura 24a*.

El mismo comportamiento que el mencionado para la composición P4WBio, se observa para las muestras de la composición P6WBio. Como se puede observar en la micrografía *24b*, aparecen claramente los cristales de metafosfato, observándose nítidamente las aristas de los mismos, mientras que en las micrografías de los patrones no se observaban, debido a la presencia de alto contenido de vidrio. La pérdida de vidrio en esta composición no genera huecos en la superficie de la muestra, posiblemente porque inicialmente esta muestra tenía mayor cantidad de vidrio.

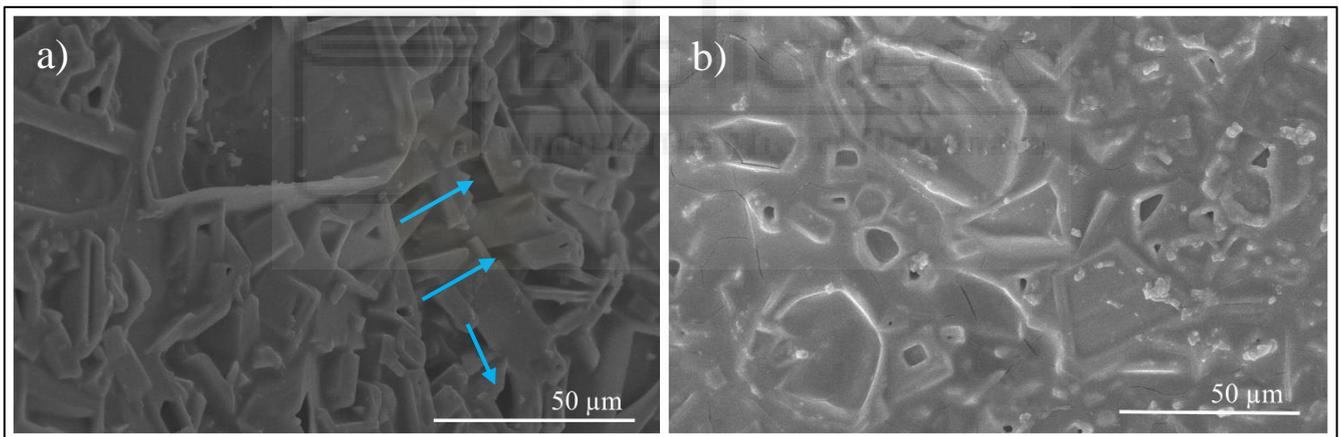


Figura 24: Micrografías SEM de muestras de composición P4WBio/P6WBio tras ensayo de bioactividad a 3D: a) composición P4WBio; b) composición P6WBio.

Como era de esperar al ver las grandes cantidades de precipitado que se liberan al suero y como se observa en las micrografías de la *Figura 24*, en las muestras de composiciones P4WBio y P6WBio no precipitó hidroxiapatito durante el ensayo de bioactividad a 3 días, lo que indica que estas muestras no son bioactivas. Una vez comprobado que las muestras no eran bioactivas a tres días, y que dejaban de generar precipitado blanco, pero mantenían las propiedades mecánicas, habiendo liberado el exceso de vidrio, que inhibe la bioactividad, se decidió utilizar estas muestras como

núcleos para desarrollar las nuevas estructuras. Se denominará a estas nuevas muestras como: P4W3D/P6W3D

3.4.2. Composiciones P4W3D/P6W3D

Para el desarrollo de estas nuevas estructuras, una vez sacadas las muestras de P4WBio y P6WBio de los tubos tras el ensayo a 3 días, y secadas previamente, se recubrieron de nuevo de Wollastonita dopada para mejorar su comportamiento ante el nuevo ensayo de bioactividad. Como resultado final se tienen muestras de composiciones P4WBio/P6WBio en las que se ha eliminado parte del vidrio sumergiéndolas en SFA, y a las que se les ha dado una capa final bioactiva tras este proceso de eliminación de vidrio.

- **Ensayo a 3 días:**

En el ensayo de bioactividad a 3 días de estas nuevas composiciones, se obtuvieron resultados muy diferentes. Esta vez, en las muestras aparecieron partículas esféricas invadiendo la superficie de la muestra, como se puede ver en las imágenes de la *Figura 25*. Si se observan más detalladamente estas partículas, se ve que su superficie no es lisa y está compuesta de otras partículas más pequeñas de morfología nanocilíndrica. El aspecto de estas partículas es característico de los cristales de hidroxiapatito, por lo que se puede afirmar que las muestras presentan una gran bioactividad a 3 días. Los análisis EDX de estas partículas esféricas muestran una relación Ca/P de aproximadamente 2,2, diferente de la relación teórica Ca/P del HA (1,67). Esto se debe a que grupos SiO_4^{4-} sustituyen a grupos PO_4^{3-} dentro del HA, por lo que la relación Ca/P obtenida se ve afectada por este fenómeno. Aun así, el aspecto característico de estas partículas nos permite confirmar que se trata de HA simplemente con las imágenes obtenidas en el SEM.

La formación del precipitado de HA en la superficie de las muestras no es uniforme, estando algunas zonas en la parte inicial del proceso y estando otras totalmente cubiertas de una capa de HA. Además, observando la composición P6W3D, en la *Figura 25b*, se puede ver el aspecto característico del sol-gel (flecha azul) en la parte central de la superficie de la muestra, y como este va invadiendo poco a poco la superficie. Esto indicaría que, parte de los hidróxidos de silicio, que se disolvieron durante la formación

del HA, estarían precipitando en la superficie del material, disolviendo los cristales de HA en el proceso. Este fenómeno también se puede observar en las micrografías 25 a, c y d, indicando que sucede en ambas composiciones.

En cuanto a la comparación entre las dos composiciones, no se han encontrado grandes diferencias. El único punto que se podría tener en cuenta es una posible diferencia entre las velocidades de aparición del HA, ya que se notó una mayor coalescencia del HA en la muestra de P6W3D. Por ejemplo, a una escala parecida, en la composición P4W3D (Figura 25e), todavía se ve un residuo de la forma esférica de las partículas de HA. En cambio, en la composición P6W3D (Figura 25f), la superficie está totalmente recubierta de HA, el cual ha formado placas en las que prácticamente ha desaparecido su forma esférica.

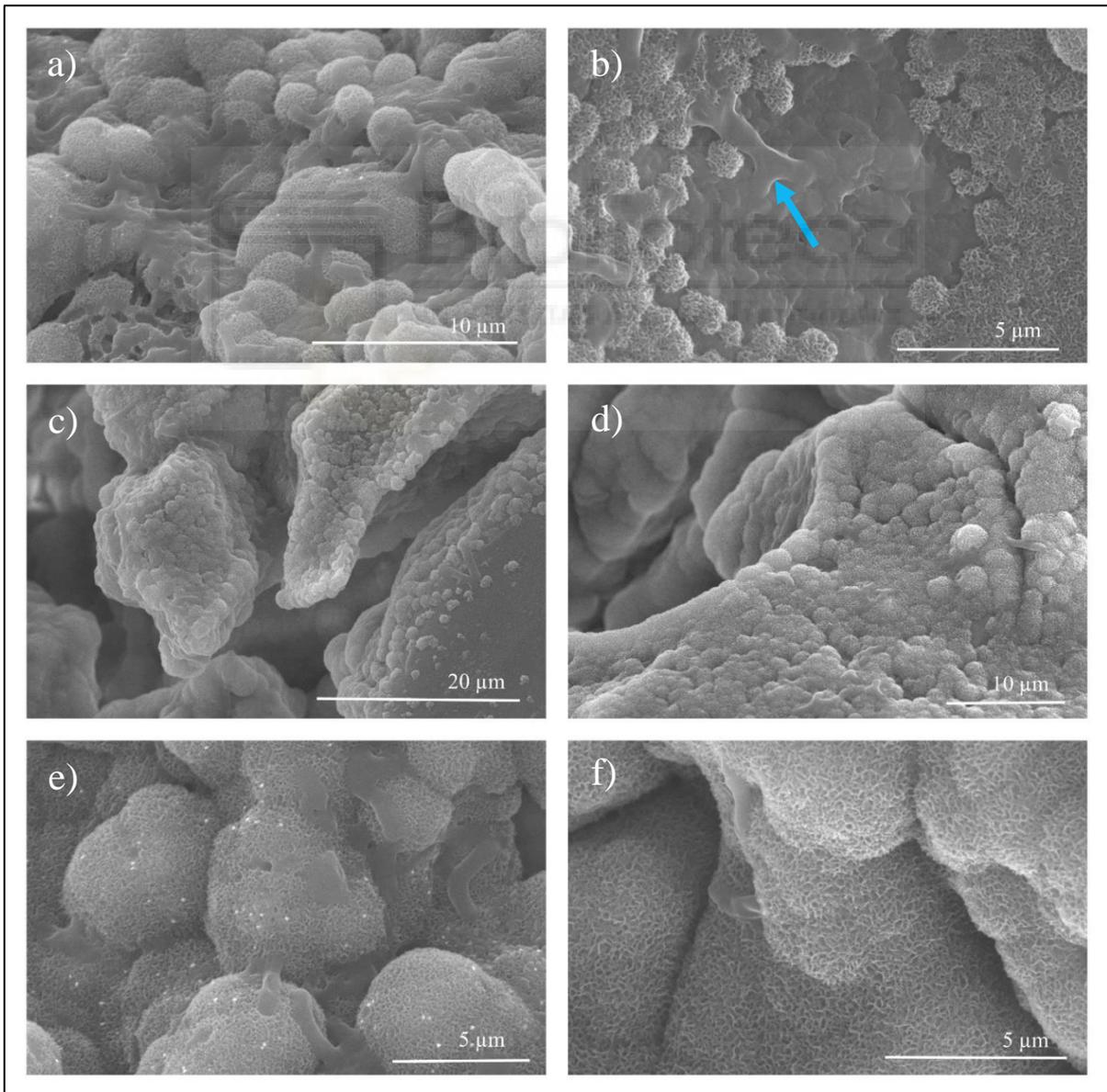


Figura 25: Micrografías SEM de muestras de composición P4W3D/P6W3D tras ensayo de bioactividad a 3D: a), c) y e) composición P4W3D; b), d) y f) composición P6W3D.

- **Ensayo a 7 días:**

Tras estar sumergidas 7 días en suero fisiológico, se observó en la superficie un nuevo fenómeno. Los cristales de HA, que aparecieron en las muestras sumergidas 3 días, habían desaparecido, quedando una superficie basada en silicio y calcio (según análisis EDX). Este fenómeno se observó en el estudio realizado por Mata et al. [48], donde se desarrollaron scaffolds cerámicos multicapa dopados con iones de hierro. Esta disolución del HA, se trata de un proceso cíclico, en el que el silicio disuelto en el suero precipita en la superficie de la muestra, captando calcio de esta y disolviendo el HA en consecuencia. Tras este fenómeno, la superficie rica en silicatos cálcicos debería favorecer la cristalización en forma de HA del fósforo disuelto en el suero, repitiéndose el proceso de formación de cristales de HA. Este fenómeno se puede relacionar con el análisis realizado durante el ensayo a 3 días, pudiendo confirmar que este proceso de precipitación de hidróxidos silícicos habría comenzado ya al estar sumergidas las muestras durante 3 días en SFA. Quedaría por comprobar si de verdad es un proceso cíclico, realizando ensayos a, por ejemplo, 14 días para ver si se vuelve a formar HA en la superficie.

Examinando las micrografías de la *Figura 26*, se observan comportamientos diferentes entre composiciones. En la muestra de P4W3D todavía se encontró en su superficie cristales de HA, pudiéndose observar cómo está ocurriendo el fenómeno antes comentado. En la *Figura 26a* se ve a alta magnificación como los hidróxidos silícicos están precipitando encima de los cristales de HA (flecha azul) y los están disolviendo, mientras que en la *Figura 26c* se ve a una escala mayor como los hidróxidos silícicos ya han formado placas que cubren la mayor parte de la superficie (flechas amarillas).

En la superficie de la muestra P6W3D no se encontraron cristales de HA, indicando que el proceso de disolución del HA ha ocurrido antes en esta muestra. Esto, sumado a lo visto en la muestra a 3 días, permite confirmar que ambas composiciones presentan un comportamiento similar, pero en la composición P6W3D las distintas etapas ocurren a una mayor velocidad. De esta forma, las *micrografías 26b* y *26d*, muestran una superficie formada por silicio y calcio, donde todo el HA se ha disuelto.

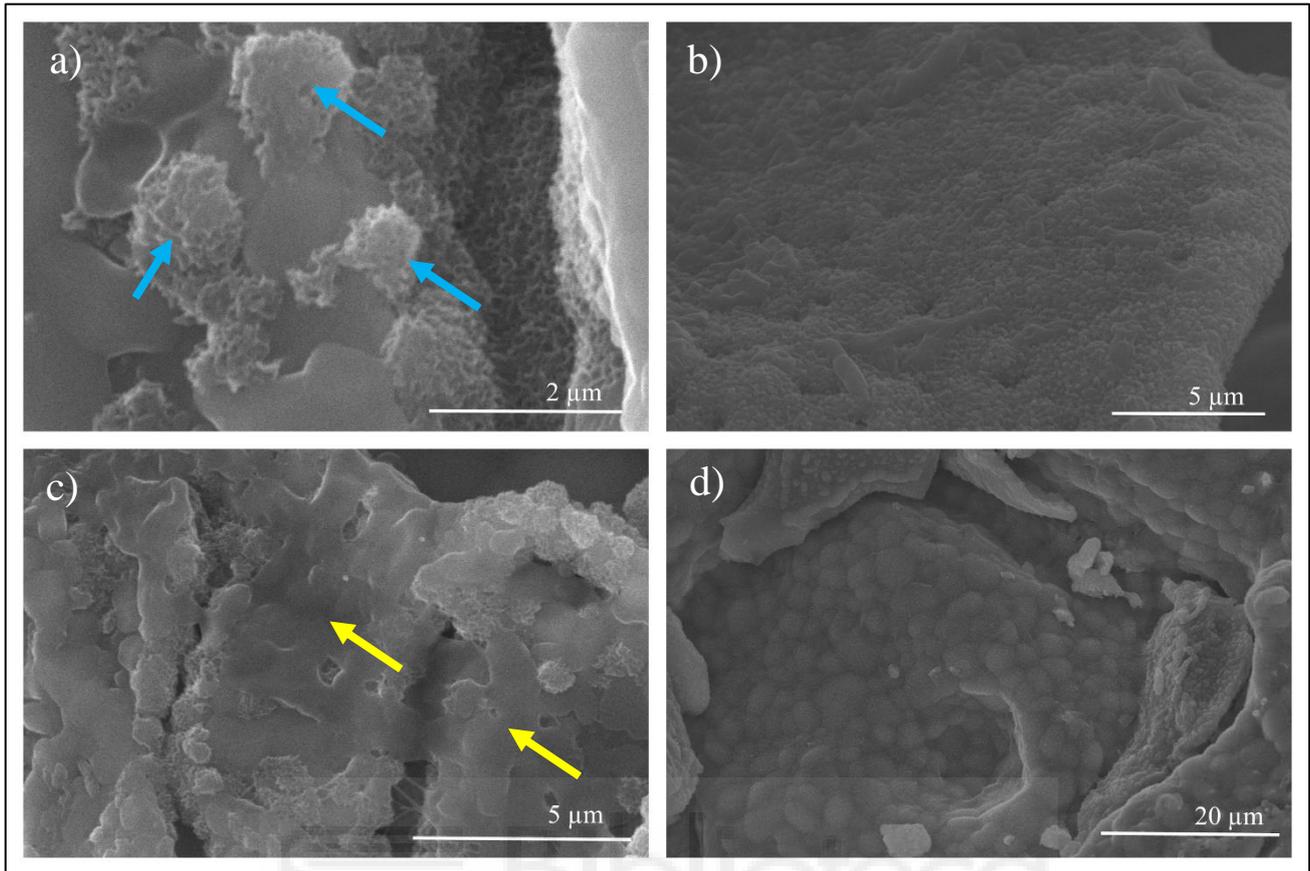


Figura 26: Micrografías SEM de muestras de composición P4W3D/P6W3D tras ensayo de bioactividad a 7D: a) y c) composición P4W3D; b) y d) composición P6W3D.

Debe tenerse en cuenta que esta disolución del HA es un proceso que solo sucede en estudios *in vitro*, donde el fluido que rodea a las muestras permanece estático. En un estudio *in vivo*, los silicatos que se disuelven durante la formación de los cristales de HA serían eliminados de la zona por la sangre, por lo que no podría volver a precipitar en la zona del implante. De este modo, en estudios *in vivo*, el HA que se ha formado en la superficie de la muestra debería permanecer en ella a lo largo del tiempo.

3.4.3. Composiciones P4BBio/P6BBio

Como se ha descrito en las secciones anteriores, con objeto de controlar la liberación de moléculas por parte del vidrio y obtener bioactividad, también se han desarrollado materiales con un núcleo de alta resistencia mecánica de composición P4Li/P6Li, recubierto de un vidrio de Boro, denominándose estas muestras P4BBio/P6BBio.

- **Ensayo a 3 días**

El recubrimiento de vidrio de Boro solucionó la problemática de la hidrolización del vidrio de fosfato cálcico. Esta vez las muestras no liberaron el precipitado blanco y conservaron la mayor parte de su vidrio, por lo que estarían conservando todas las propiedades mecánicas que este les aporta. Sin embargo, estas muestras no presentan bioactividad a 3 días.

Las imágenes de la *Figura 27* confirman estas afirmaciones. No se encontró precipitado de cristales de HA en la superficie de la muestra, indicando que hay algo que inhibe la aparición de bioactividad en las muestras. En cambio, se puede ver como se conservan grandes cantidades de vidrio. Esto se ve claramente *Figuras 27a y 27b*, donde aparece gran cantidad de vidrio entre los cristales de metafosfato, no generándose huecos entre cristales debido a la pérdida de vidrio, como sí ocurría con otras composiciones.

No se aprecian diferencias considerables entre las dos composiciones estudiadas en este ensayo, ambas presentan una superficie parecida a la de las composiciones P4Li y P6Li, con grandes cristales de metafosfato (flechas amarillas) rodeados por vidrio (flechas azules). No se apreciaron restos de sol-gel o vidrio de Boro, lo que supondría que el recubrimiento de Wollastonita dopada y el de vidrio de Boro se habrían disuelto sin provocar la aparición de bioactividad.

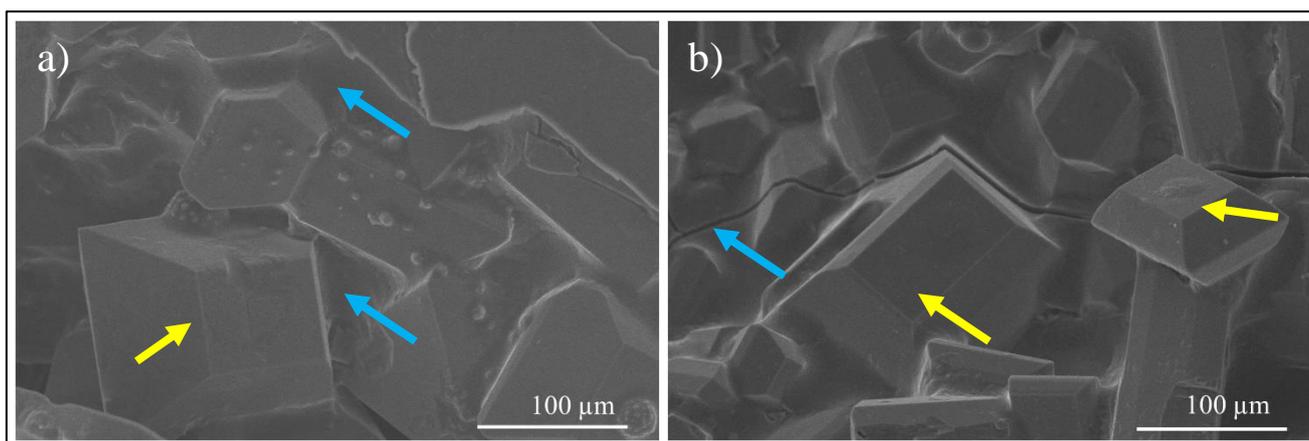


Figura 27: Micrografías SEM de muestras de composición P4BBio/P6BBio tras ensayo de bioactividad a 3D: a) composición P4BBio; b) composición P6BBio.

- **Ensayo a 7 días**

Con el ensayo a 7 días tampoco se obtuvo una superficie bioactiva, además de que apareció de nuevo precipitado blanco en el suero fisiológico, pero esta vez en cantidades mucho menores que las que generaban las composiciones P4WBio y P6WBio.

Esta vez, las superficies observadas en la *Figura 28*, presentaron un aspecto muy diferente. El primer fenómeno a tener en cuenta es la aparición de un precipitado en forma de esferas, indicado por las flechas azules de las *Figuras 28a* y *28b*, que podría recordar al HA. El análisis EDX de este precipitado indica relaciones Ca/P de estas esferas de entre 0,5 y 0,7, descartando la idea de que pueda tratarse de HA. Otro análisis EDX, esta vez de la superficie donde se depositan las esferas, indica que la superficie de la muestra está formada por óxidos de silicio. La principal hipótesis de lo ocurrido, tras observar los resultados del ensayo a 3 días, es que los cristales de metafosfato y el vidrio que los rodea se estarían disolviendo, dejando en su lugar una superficie compuesta principalmente por óxidos de silicio y generando precipitado en el suero fisiológico. El precipitado esférico que aparece en la superficie de las muestras serían estos cristales de metafosfato en proceso de disolución, lo que explicaría los resultados del EDX.

En cuanto a diferencias entre las composiciones P4BBio y P6BBio también se tiene, en el ensayo a 7 días, un comportamiento similar, solo que la composición P4BBio tiene mayor cantidad del precipitado de morfología esférica.

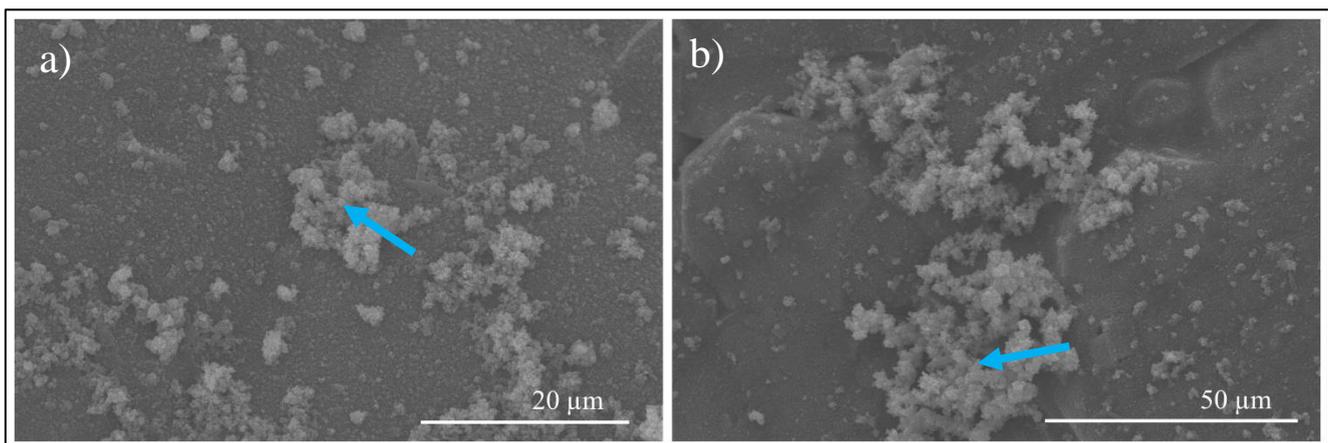


Figura 28: Micrografías SEM de muestras de composición P4BBio/P6BBio tras ensayo de bioactividad a 7D: a) composición P4BBio; b) composición P6BBio.

4. CONCLUSIONES

Una vez expuestos los resultados obtenidos, y en base a ellos, se puede afirmar que se ha logrado con éxito el principal objetivo del presente proyecto: desarrollar estructuras soporte de alta resistencia mecánica. Para ello, se ha utilizado una nueva metodología, versátil, capaz de aportar grandes capacidades mecánicas a todo tipo de scaffolds, si bien estos scaffolds deben ser capaces de resistir las temperaturas conducentes a las fases vítreas. Además del logro de este objetivo, se pueden extraer una serie de conclusiones específicas:

1. Se ha logrado obtener dos composiciones vítreas diferentes, P4Li y P6Li, capaces de aportar grandes propiedades mecánicas a scaffolds de Wollastonita.
2. Se ha observado un mejor comportamiento, en cuanto a propiedades mecánicas, de las muestras basadas en la composición P6Li, al ser capaces de captar más vidrio.
3. Se ha observado, en la superficie de las muestras, grandes cristales de metafosfato unidos por una fase vítrea, lo que explica la obtención de grandes propiedades mecánicas.
4. Se ha desarrollado una metodología para obtener scaffolds con alta bioactividad y buenas propiedades mecánicas (composiciones P4W3D/P6W3D), eliminando la fase vítrea sobrante de las muestras P4WBio/P6WBio, recubriendo las muestras resultantes con Wollastonita dopada con iones Mg^{2+} y K^{+} .
5. Se ha observado un mejor comportamiento de la composición P6W3D ante los ensayos de bioactividad, manteniendo mayor cantidad de vidrio tras la liberación de partículas al suero. Además, se ha observado una mayor rapidez de aparición de HA en la composición bioactiva basada en P6Li (P6W3D).

6. Se ha caracterizado el proceso cíclico que ocurre durante los ensayos de bioactividad *in vitro* de las muestras P4W3D/P6W3D.



5. PROYECCIÓN FUTURA

Las distintas metodologías que se han desarrollado para controlar la solubilidad y bioactividad de las muestras han resultado ser eficaces, pero pueden ser mejoradas si se continúa el con el estudio en la materia del presente este proyecto. Durante el desarrollo de este proyecto, se ha conseguido obtener muestras bioactivas, pero estas han perdido vidrio en el proceso, es decir, se han reducido sus propiedades mecánicas. Aun así, las grandes propiedades mecánicas que aportan las formulaciones vítreas P4Li y P6Li, hacen que resulte interesante continuar con su investigación. En este sentido, se proponen una serie de objetivos para futuras investigaciones en esta materia:

1. Desarrollo de nuevos recubrimientos de alto contenido en calcio, de modo que se aumente el grado de cristalinidad de las muestras, debido a la captación de iones calcio por parte de la fase vítrea.
2. Caracterización mecánica de las muestras bioactivas P4W3D/P6W3D y comparación de sus propiedades mecánicas con las de las muestras previas a la pérdida de vidrio (P4Li/P6Li)
3. Caracterización del tamaño de poro que se puede conseguir con estas muestras vidriadas.
4. Desarrollo de nuevos recubrimientos poliméricos capaces de bloquear la liberación de partículas al SFA.
5. Estudio del comportamiento de las formulaciones vítreas P4Li/P6Li al ser utilizadas para recubrir núcleos distintos al de Wollastonita.
6. Optimización del tratamiento térmico conducente a las fases vítreas P4Li y P6Li.

6. BIBLIOGRAFÍA

- [1] N. Huebsch, D.J. Mooney, “Inspiration and application in the evolution of biomaterials”. *Nature*. (2009) 462(7272), 426–432
- [2] Dra. T. R. Cuadrado, “Biomateriales y Dispositivos Biomédicos hacia la Sofisticación y el Reuso”, Instituto de Investigación en Ciencia y Tecnología de Materiales (INTEMA). (2011)
- [3] M. Navarro, A. Michiardi, O. Castaño, J. A. Planell, “Biomaterials in orthopaedics”, *J. R. Soc. Interface* (2008) 5(27), 1137–1158.
- [4] C. Mijangos y J.S. Moya, “Nuevos materiales en la sociedad del siglo XXI”, Ed. CSIC. (2007)
- [5] J. R. Jones, P. D. Lee, L. L. Hench, “Hierarchical porous materials for tissue engineering”, *Phil. Trans. R. Soc. A* (2006), 364(1838):263-81.
- [6] L. Di Silvio, “Bone tissue engineering and biomineralization” *Tissue Engineering Using Ceramics and Polymers*, (2007) 319-331.
- [7] Fernández-Tresguerres I, Alobera MA, Pingarrón M, Blanco L, “Bases fisiológicas de la regeneración ósea I. Histología y fisiología del tejido óseo” *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. (2006) Vol. 11, Nº. 1, 2006, pags. 32-36
- [8] A. L. Boskey, “Variations in bone mineral properties with age and disease”, *Mineralized Tissue Laboratory, Hospital for Special Surgery, New York*. (2002) 2(6):532-534
- [9] S. V. Dorozhkin y M. Epple, “Biological and Medical Significance of Calcium Phosphates”, *Angew. Chem. Int.* (2002) Ed., 41, 3130-3146.
- [10] D. J. Polak, “Regenerative medicine. Opportunities and challenges: a brief overview”, *J. R. Soc. Interface* 7.(2010)
- [11] S. Bose, M. Roy, A. Bandyopadhyay, “Recent advances in bone tissue engineering scaffolds” *Trends in Biotechnology*, (2012) 30(10), 546–554

- [12] R. A. Surmenev, M. A. Surmeneva, A. A. Ivanova, "Significance of calcium phosphate coatings for the enhancement of new bone osteogenesis", *Acta Biomaterialia*, (2014) 10, 2, 557-579.
- [13] V. Mouriño, A. R. Boccaccini, "Bone tissue engineering therapeutics: controlled drug delivery in three-dimensional scaffolds", *J. R. Soc. Interface* 7. (2009) 43, 209–227
- [14] C. Wu, J. Chang, "Mesoporous bioactive glasses: structure characteristics, drug/growth factor delivery and bone regeneration application", *Interface Focus* (2012) 2(3), 292–306
- [15] L. L. Hench, I. Thompson, "Twenty-first century challenges for biomaterials", *J. R. Soc. Interface* 7. (2010)
- [16] Sang-Hyun An et al., "Porous zirconia/hydroxyapatite scaffolds for bone reconstruction", *Dental Materials*,(2012) 28, 12, 1221-1231.
- [17] F.Baino, S.Hamzehlou, S.Kargozar, "Bioactive Glasses: Where Are We and Where Are We Going?", *Journal of Functional Biomaterials*, (2018) 9(1), 25.
- [18] J.R. Jones, "Review of bioactive glass: From Hench to hybrids". *Acta Biomaterialia*, (2013) 9(1), 4457–4486
- [19] L. L. Hench, "Bioceramics: from concept to clinic", *Journal of the American Ceramic Society*, (1991) 74, 7, 1487-1510.
- [20] D. Groh, F. Döhler, D.S. Brauer, "Bioactive glasses with improved processing. Part 1. Thermal properties, ion release and apatite formation", *Acta Biomaterialia*, (2014) 10(10), 4465–4473.
- [21] M. Plewinski, K. Schickle, M. Lindner, A. Kirsten, M. Weber, H. Fischer, "The effect of crystallization of bioactive bioglass 45S5 on apatite formation and degradation", *Dental Materials*, (2013) 29(12), 1256–1264.
- [22] L.L. Hench, , "Introduction to Bioceramics", (2nd Edition) (Revised ed.). Imperial College Press. (2013)
- [23] M.N. Rahaman, D.E. Day, B. Sonny Bal, Q. Fu, S.B. Jung, L.F. Bonewald, A.P. Tomsia, "Bioactive glass in tissue engineering. *Acta Biomaterialia*", (2011) 7(6), 2355–2373.

- [24] W.E. Müller, X. Wang, B. Diehl-Seifert, K. Kropf, U. Schloßmacher, I. Lieberwirth, G. Glasser, M. Wiens, H.C. Schröder, “Inorganic polymeric phosphate/polyphosphate as an inducer of alkaline phosphatase and a modulator of intracellular Ca²⁺ level in osteoblasts (SaOS-2 cells) in vitro”, *Acta Biomaterialia*, (2011) 7(6), 2661–2671.
- [25] D. Morimoto, T. Tomita, S. Kuroda, C. Higuchi, S. Kato, T. Shiba, H. Nakagami, R. Morishita, H. Yoshikawa, “Inorganic polyphosphate differentiates human mesenchymal stem cells into osteoblastic cells”, *Journal of Bone and Mineral Metabolism*, (2010) 28(4), 418–423.
- [26] S. Best, A. Porter, E. Thian, J. Huang, “Bioceramics: Past, present and for the future”, *Journal of the European Ceramic Society*, (2008) 28(7), 1319–1327.
- [27] L L. Hench y J. K. West, “The Sol-Gel process”, Department of Materials Science and Engineering, Advanced Materials Research Center, Florida. (1989)
- [28] J.C. Brinker, G.W. Scherer, “Sol-Gel Science: The Physics and Chemistry of Sol-Gel Processing”, Academic Press. (1990)
- [29] J. Alcántar, M. Jiménez, R. Rodríguez, “Revisión del Método de Sintetización por Sol-Gel”, *Cimar*. (2011)
- [30] Ebelmen, M. *Ann. Chimie Phys*, (1846), 16, 129.
- [31] C. Navalón, P. Ros-Tárraga, A. Murciano, P. Velasquez, P. Mazón, P.N. de Aza, “Easy manufacturing of 3D ceramic scaffolds by the foam replica technique combined with sol-gel or ceramic slurry”, *Ceramics International*, (2019) 45(15), 18338–18346
- [32] P. N. De Aza, F. Guitian, A. Merlos, Lora-Tamaño y S. De Aza, “Bioceramics-simulated body fluid interfaces: pH and its influence on hydroxyapatite formation”, *J Mater Sci: Mater Med* (1996) 7(7) 399-402.
- [33] R. J. Roy, *Am. Ceram. Soc.* (1956), 36, 145
- [34] T. Kokubo, “Apatite formation on surfaces of ceramics, metals and polymers in body environment”, *Acta mater.* (1998) Vol. 46, No 7, pp. 2519-2527.
- [35] N.A.Mata, P. Velasquez, A. Murciano, P.N. de Aza, “Multilayer Mg-pyrophosphate glass ceramic with discontinuous bioactivity. Physicochemical characterization”, *Ceramics International*, (2021) 47(10), 14612–14620.

- [36] P.Ros-Tárraga, A. Murciano, P. Mazón, S.A. Gehrke, P.N. de Aza, “In vitro behaviour of sol-gel interconnected porous scaffolds of doped wollastonite” *Ceramics International*, (2017) 43(14), 11034–11038.
- [37] C.Sarmiento, Z.B. Luklinska, L. Brown, M. Anseau, P.N. de Aza, S. de Aza, F.J. Hughes, I.J. McKay, “In vitro behavior of osteoblastic cells cultured in the presence of pseudowollastonite ceramic”, *Journal of Biomedical Materials Research*, (2004) 69A(2), 351–358.
- [38] P.N. de Aza, Z.B. Luklinska, A. Martinez, M.R. Anseau, F. Guitian, S. de Aza, “Morphological and structural study of pseudowollastonite implants in bone”, *Journal of Microscopy*, (2000) 197(1), 60–67
- [39] P.N. de Aza, F. Guitian, S. de Aza, “Bioactivity of wollastonite ceramics: In vitro evaluation”, *Scripta Metallurgica et Materialia*, (1994) 31(8), 1001–1005.
- [40] K.Hurle, F. Maia, V. Ribeiro, S. Pina, J. Oliveira, F.Goetz-Neunhoeffler, R. Reis, “Osteogenic lithium-doped brushite cements for bone regeneration”, *Bioactive Materials*, (2022)16, 403–417.
- [41] L.Liu, Y. Liu, C. Feng, J. Chang, R. Fu, T. Wu, F. Yu, X. Wang, L. Xia, C. Wu, B. Fang, “Lithium-containing biomaterials stimulate bone marrow stromal cell-derived exosomal miR-130a secretion to promote angiogenesis”, *Biomaterials*, (2019) 192, 523–536.
- [42] L.Haro Durand, G. Vargas, R. Vera-Mesones, A. Baldi, M. Zago, M. Fanovich, A.Boccaccini, A. Gorustovich, “In Vitro Human Umbilical Vein Endothelial Cells Response to Ionic Dissolution Products from Lithium-Containing 45S5 Bioactive Glass” *Materials*, (2017)10(7), 740.
- [43] E.R. Kreidler, F.A. Hummel, “Phase relations in the system SrO-P₂O₅ and the influence of water vapor on the formation of Sr₄P₂O₉” *Inorganic Chemistry*, (1967) 6(5), 884–891.
- [44] Y. Gu, W. Xiao, L. Lu, W. Huang, M.N. Rahaman, D. Wang, “Kinetics and mechanisms of converting bioactive borate glasses to hydroxyapatite in aqueous phosphate solution” *Journal of Materials Science*, (2010) 46(1), 47–54.

[45] T. Kokubo, H. Takadama, “How useful is SBF in predicting in vivo bone bioactivity?”, *Biomaterials*; (2006) 27(15) 2907-15.

[46] J.R. Caeiro, P. González, D.Guede , “Biomechanics and bone (& II) : Trials in different hierarchical levels of bone and alternative tools for the determination of bone strength”. (2013); 5 (2): 99-108

[47] R.G. Budynas, “DISEÑO EN INGENIERÍA MECÁNICA DE SHIGLEY.”, McGraw-Hill Education. (2008)

[48] N.A. Mata, P. Ros-Tárraga, P. Velasquez, A. Murciano, P.N. de Aza, “New iron-doped multilayer ceramic scaffold with noncontinuous bioactive behavior”, *Ceramics International*, (2020) 46(10), 16388–16396.

