Resumen

El presente trabajo se divide en dos partes. En la primera, se buscó evaluar *in vitro* la bioactividad de un cemento de fosfato de calcio, fabricado a partir de fosfato tricálcico alfa (α-TCP) y cuya reacción de fraguado da como resultado la formación de hydroxiapatita (HA). El requisito principal para que un material artificial pueda crear un enlace directo con el hueso es la formación de una capa de apatita, similar a la del hueso, en su superficie después de ser implantado en el cuerpo humano. Para predecir este fenómeno, las muestras fabricadas fueron sumergidas en fluido corporal simulado (SBF – Simulated body fluid) durante 2, 6, 9 y 12 semanas. Esta solución contiene concentraciones de iones casi iguales a las del plasma sanguíneo humano, y por tanto, la bioactividad de un material puede predecirse por medio de la formación de apatita en su superficie cuando se lo sumerge en SBF.

En la segunda parte del estudio, se buscó evaluar el comportamiento *in vitro* del mismo cemento de fosfato de calcio espumado con un surfactante conocido como Tween 80, añadido a la fase líquida del cemento. Este material espumado podría ser utilizado en la fabricación de andamios macroporosos para la regeneración ósea en aplicaciones de ingeniería de tejidos. La macroporosidad es un requisito en la fabricación de tales andamios, porque permite la colonización del material por las células encargadas de regenerar el hueso dañado, actuando como sustrato para su crecimiento. Un alto porcentaje de porosidad también permite lograr una reabsoción más rápida del cemento en el cuerpo, para adecuarlo a la velocidad de crecimiento del nuevo hueso formado. Las muestras fabricadas también fueron sumergidas en SBF durante 2, 6 y 9 semanas. Al mismo tiempo, se buscó evaluar la influencia de las proteínas presentes en el plasma sanguíneo, para lo cual se utilizó suero fetal bovino (FBS – Foetal bovine serum) con los mismos tiempos de inmersión que en caso anterior.

Fueron evaluados los cambios en las concentraciones iónicas de calcio y fósforo del medio, la distribución del diámetro de entrada de poros y el porcentaje de porosidad total, la densidad esquelética, las variaciones en el peso y en el pH, los cambios en la microestructura, las fases cristalinas presentes , la evolución del área superficial del material de las muestras y la resistencia a la compresión de las muestras antes y después del periodo de inmersión en ambos medios.

Sumario

RESUMEN 1

SUMARIO 3

1. GLOSARIO 7

2. INTRODUCCIÓN 11

2.1. Objetivos de la tesis 11

2.2. Alcance de la tesis 11

3. FUNDAMENTOS TEÓRICOS 13

3.1. La ingeniería de tejidos para la regeneración ósea 13

3.1.1. Estrategias de la ingeniería de tejido óseo. 15

3.2. Andamios para Ingeniería de Tejidos 18

3.2.1. Requerimientos en el diseño 18

3.2.2. Clasificación de los substitutos óseos 19

3.3. Materiales Bioactivos 19

3.3.1. Concepto de bioactividad 19

3.3.2. Vidrios bioactivos 20

3.3.3. Cerámicas de fosfatos de calcio 21

3.3.4. Cementos de fosfato de calcio 23

3.4. Obtención de andamios macroporosos para aplicaciones en ingeniería de tejidos a partir de cementos de fosfatos de calcio. 25

3.4.1. Introducción a los surfactantes 26

3.4.2. Tween 80 como agente espumante 28

3.5. Evaluación de la bioactividad 29

3.5.1. Fluido corporal simulado 29

3.5.2. El suero fetal bovino como medio de aportación de proteínas contenidas en el fluido corporal humano para la predicción de la bioactividad en biomateriales. 32

4. MATERIALES Y MÉTODOS 35

4.1. Preparación de los cementos 35

4.1.1. Fase líquida 35

4.1.2. Fase sólida 36

4.2. Fabricación de las probetas 41

4.2.1. Fabricación de las muestras con cemento sin espumar 42

4.2.2. Fabricación de las muestras con cemento espumado 44

4.3. Esterilización de las muestras 45
4.4. Preparación del Fluido Corporal Simulado 46
4.5. Inmersión de las muestras en fluido corporal simulado (SBF) y suero fetal bovino (FBS) 47
4.5.1. Cálculo del volumen de SBF necesario 48
4.5.2. Inmersión de los discos del cemento de fosfato de calcio 48
4.5.3. Inmersión de los cilindros del cemento de referencia y del cemento espumado con Tween. 49
4.6. Métodos experimentales de caracterización 49
4.6.1. Medición del pH 49
4.6.2. Determinación de la concentración iónica del medio 50
4.6.3. Control de la variación del peso 50
4.6.4. Distribución del tamaño de entrada de poros y porosidad 51
4.6.5. Determinación de la densidad esquelética 52
4.6.6. Determinación de la superficie específica 53
4.6.7. Estudio de los cambios morfológicos superficiales 53
4.6.8. Estudio de las fases presentes 54
4.6.9. Resistencia a la compresión 54

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN 57

5.1. Evaluación de la bioactividad de un cemento de fosfato de calcio 57
5.1.1. Estudio de los cambios morfológicos superficiales 57
5.1.2. Estudio de las fases presentes 59
5.1.3. Control de la variación del peso 60
5.1.4. Control de la variación del pH 61
5.1.5. Determinación de la concentración iónica del medio 62
5.2. Evaluación del comportamiento *in vitro* de un cemento de fosfato de calcio espumado para la fabricación de andamios para aplicaciones en ingeniería de tejidos 64
5.2.1. Estudio de los cambios morfológicos superficiales 64
5.2.2. Análisis de las fases presentes 67
5.2.3. Distribución del tamaño de interconexión entre los poros 68
5.2.4. Determinación de la superficie específica 72
5.2.5. Determinación de la densidad esquelética 74
5.2.6. Determinación de la concentración iónica del medio 76
5.2.7. Control de la variación del peso 78
5.2.8. Evaluación de la resistencia mecánica 80

CONCLUSIONES _____ **83**

BIBLIOGRAFIA _____ **85**

1. Glosario

Bioactividad. Capacidad de formar un enlace directo con el hueso, sin interposición de una cápsula fibrosa.

Biomaterial. Material del que se pretende que actúe interfacialmente con sistemas biológicos con el fin de evaluar, tratar, aumentar o substituir algún tejido, órgano o función del organismo.

CaP. Fosfato de calcio (calcium phosphate).

CDHA. Hidroxiapatita deficiente en calcio (calcium deficient hidroxiapatite). Se obtiene a partir de la disolución y precipitación del fosfato tricálcico en solución acuosa. Su fórmula molecualr es: $Ca_9(PO_4)_5(HPO_4)OH$

Densidad aparente. Densidad del volumen del material, incluyendo poros y vacíos presentes en el mismo.

Densidad esquelética. Densidad real del material, sin considerar poros o vacíos presentes en el mismo.

Cemento. Conglomerantes hidráulicos que mezclados con agua fraguan y endurecen, tanto expuestos al aire como sumergidos en agua.

Espuma. Sistema disperso en que la fase continua está formada por un líquido o un sólido mientras que la fase dispersa está constituida por un gas.

FBS. Suero fetal bovino (foetal bovine serum).

HA. Hidroxiapatita.

In vitro. Que se produce u ocurre en un tubo de ensayo.

In vivo. Que está situado u ocurre en el cuerpo vivo

Ingeniería de tejidos. Especialidad que aplica los principios de la ingeniería y las ciencias de la vida a la fabricación de sustitutos biológicos que mantengan, mejoren o restauren la función de órganos y tejidos en el cuerpo humano.

Macroporosidad. Porosidad asociada a interconexiones de poros de un diámetro superior a 10µm.*

Microporosidad. Porosidad asociada a interconexiones de poros de un diámetro de entre 0,1 µm e inferior a 10µm.*

Nanoporosidad. Porosidad asociada a interconexiones de poros de un diámetro inferior a 0,1 µm.*

Osteoconducción. Capacidad que posee un material de conducir o guiar el crecimiento del hueso.

Porosidad. Porcentaje de volumen vacío de un material, que no está ocupado por una fracción sólida.

Reabsorbible. Propiedad de un material de degradarse químicamente, absorbiéndose de forma controlada mientras es reemplazado por tejido óseo.

Reacción de fraguado. Transformación inicial de una pasta formada por una fase sólida en polvo y una fase líquida. Implica la pérdida de la plasticidad de manera que, si se modela nuevamente o se mescla con más agua, la plasticidad no se recupera o se recupera tan solo parcialmente.

Regeneración. Sustitución progresiva de un material por tejido nuevo.

Relación L/P. Es el cociente entre el volumen de una disolución acuosa, o fase líquida, y la masa de la fase sólida en polvo, empleados para la preparación de un cemento de fosfato *de calcio.*

SBF. Fluido corporal simulado (Simulated body fluid). Fluido que posee concentraciones iónicas casi iguales a aquellas del plasma sanguíneo humano, utilizado para la predicción del comportamiento *in vivo* de biomateriales.

Surfactante. Compuesto constituido por una zona de carácter hidrófobo y otra de carácter hidrófilo que se acumula en la interfase de un sistema heterogéneo reduciendo la tensión superficial. Agente tensoactivo.

TCP. Fosfato tricálcico.

Tween 80. Nombre comercial del polisorbato 80, un detergente no iónico y emulsionante derivado del sorbitol, utilizado en la industria alimenticia y farmacéutica. Sirve para estabilizar o "disolver" las grasas o aceites en soluciones acuosas.

---

* La terminología utilizada en biomateriales es diferente a aquella establecida por la IUPAC.

2. Introducción

2.1. Objetivos de la tesis

En este estudio se busca, por un lado, evaluar *in vitro* la bioactividad de muestras fabricadas con un cemento de fosfato de calcio; y por otro, evaluar los efectos que produce el espumado del mismo cemento añadiendo un agente espumante a la fase líquida del mismo. El propósito del espumado es crear una estructura macroporosa que pueda ser utilizada en la fabricación de andamios para aplicaciones de ingeniería de tejidos óseos.

Se fabricaron dos tipos de muestras. En la primera parte de estudio se fabricaron discos de 6 mm de diámetro y 3 mm de alto del cemento sin espumar para evaluar su bioactividad. Y en la segunda, se fabricaron cilindros de 6 mm de diámetro y 12 mm de alto del cemento espumado y sin espumar, para observar las diferencias existentes en la estructura y el comportamiento de ambos cementos, antes y después del periodo de inmersión en los dos medio utilizados. En la segunda parte del estudio se utilizaron cilindros en lugar de discos para poder realizar ensayos de compresión de las muestras.

Se estudió el comportamiento en dos medios de inmersión diferentes. El fluido corporal simulado (Simulated Body Fluid – SBF) fue utilizado para predecir la bioactividad de las muestras. El suero fetal bovino (Foetal Bovine Serum – FBS) fue utilizado para evaluar la influencia de las proteínas presentes en el plasma sanguíneo. Al mismo tiempo, el FBS es el medio de mayor uso para el cultivo de células y los bioreactores, por lo cual, resulta de gran interés determinar el comportamiento de las muestras sumergidas en el mismo.

2.2. Alcance de la tesis

Este proyecto se limita a la evaluación del comportamiento *in vitro* de los cementos espumados y sin espumar. Sin embargo, los resultados del estudio no pueden extrapolarse directamente a la respuesta que se tendría *in vivo*.

3. Fundamentos Teóricos

3.1. La ingeniería de tejidos para la regeneración ósea

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

La ingeniería de tejidos, que aplica métodos de la ingeniería y de las ciencias de la vida para crear elementos artificiales que dirijan la regeneración del tejido, ha atraído a numerosos científicos y cirujanos con la esperanza de tratar pacientes de una manera mínimamente invasiva y menos dolorosa. El paradigma de la ingeniería de tejidos consiste en aislar células específicas a través de una pequeña biopsia del paciente, para hacerlas crecer en un andamio tridimensional bajo condiciones de cultivo controladas apropiadamente, a fin de trasplantar este conjunto a la zona deseada del cuerpo del paciente, y para dirigir la formación del nuevo tejido dentro del andamio que puede ir degradándose a través del tiempo [2] (Fig. 3.1.).

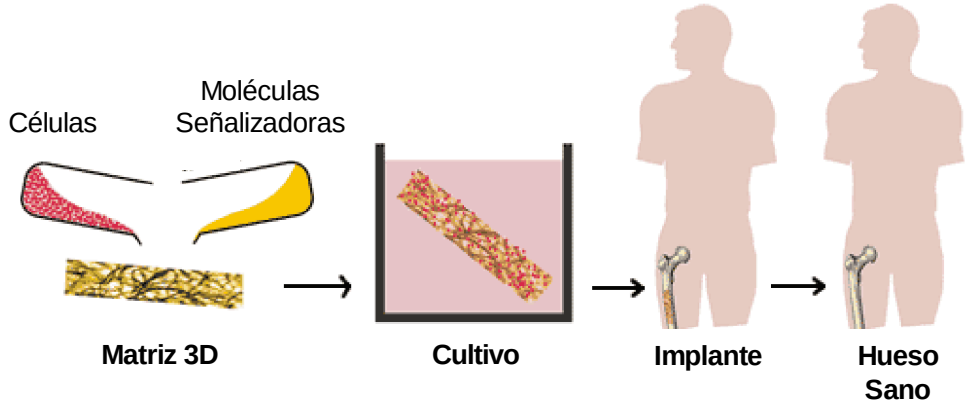

Fig. 3.1 Estratégia de la ingeniería de tejidos [3].

Los tratamientos médicos actuales para daños severos de hueso son muy problemáticos y generan resultados muy pobres. La mejor técnica con la que se cuenta en la actualidad es el trasplante de tejido óseo natural del mismo paciente (autoinjerto). Sin embargo, existen sitios limitados del cuerpo de donde el hueso puede ser extraído sin perder su función. Los autoinjertos son menos efectivos en defectos óseos con formas irregulares y pueden ser reabsorbidos en lugar de completar la curación. Además, existen complicaciones inherentes

a esta técnica como infecciones, fracturas, dolores, parestesia, daños en los nervios o algún tipo de enfermedad en el sitio del cuerpo del paciente del cual se extrae el tejido.

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

Los xenoinjertos, que son tejidos óseos obtenidos de especies diferentes, tampoco resultan una solución debido a los altos riesgo de transmisión de enfermedades y de rechazo inmunológico que poseen.

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

Por otro lado las cerámicas, como los fosfatos de calcio, son también usadas en el tratamiento de daños y problemas óseos. De entre ellas, la hidroxiapatita es una de las mas utilizadas ya que posee una composición similar a la composición de la fase orgánica del hueso. Pero, mientras que las cerámicas pueden ofrecer una excelente biocompatibilidad, son demasiado frágiles para proveer un soporte estructural y resistir a las cargas de los huesos. Además, algunas cerámicas se degradan de manera más lenta que el hueso natural, inhibiendo el crecimiento del nuevo hueso formado dentro del defecto.

El campo emergente de la ingeniería de tejido ofrece nuevas posibilidades de tratamientos que podrían mejorar la cura del tejido dañado sin las limitaciones e inconvenientes de los tratamientos actuales. El propósito de la ingeniería de tejidos es el de restituir la estructura y función de un defecto por medio de la utilización de la respuesta natural de cura del cuerpo humano, conjuntamente con un tratamiento que utilice uno o más de los siguientes tres elementos: células, moléculas de señalización y andamios. Entonces, un defecto óseo puede ser reemplazado potencialmente por tejido óseo natural con una unión y restauración de la función completa, sin el uso de implantes permanentes [4].

3.1.1. Estrategias de la ingeniería de tejido óseo.

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

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

1- Basada en células.

2- Basada en factores de crecimiento.

3- Basada en matrices.

En la práctica, la mayor parte de los trabajos experimentales implementan más de una de estas estrategias juntas. Por ejemplo, un andamio biodegradable puede estar diseñado para transportar células a un defecto mientras libera factores de crecimiento al tejido circundante a medida que se degrada. En el campo de la ingeniería de tejidos, estas estrategias requieren la interacción entre elementos osteogénicos, osteoinductivos y osteoconductivos. Los componentes osteogénicos incluyen células capaces de producir hueso como las células osteoprogenitoras o los osteoblastos diferenciados. Los factores osteoinductivos son elementos químicos bioactivos que inducen al reclutamiento, diferenciación y proliferación de las células apropiadas para la reparación y regeneración de un defecto óseo. Un material osteoconductivo es aquel que actúa como soporte para el crecimiento del hueso. Por ejemplo, un andamio osteoconductivo puede dar soporte mecánico, permitir que las células se adhieran, facilitar la vascularización y actuar como vehículo para las células y los factores de crecimiento [5].

Para lograr un tratamiento efectivo en la regeneración del tejido óseo, un dispositivo diseñado dentro del campo de la ingeniería de tejidos deberá cumplir con los siguientes requerimientos [6]:

1- Proveer de resistencia mecánica de manera temporal en el área afectada.

2- Actuar como un substrato para la deposición y crecimiento de los osteoides.

3- Poseer una estructura porosa que permita la vascularización y el crecimiento óseo.

4- Fomentar la migración de células reparadoras del hueso a la zona del defecto y estimular su actividad para la regeneración y reparación.

5- Degradarse de manera controlada para facilitar la transferencia de la solicitación mecánica al hueso en formación y para permitir su crecimiento dentro del defecto.

6- Degradarse liberando productos no tóxicos que puedan ser eliminados por el cuerpo.

7- No causar una respuesta inflamatoria significativa.

8- Ser esterilizable sin perder su cualidad de bioactivo.

3.1.1.1. Birreactores.

Un método para el cultivo celular de amplia utilización consiste en el cultivo de una capa individual sobre un andamio almacenado en recipientes estáticos, lo cual limita la interacción y actividad tridimensional de las células. Este método se basa solo en la difusión molecular para el transporte de nutrientes, desperdicios y señales bioquímicas entre las células y el medio, y podría no satisfacer las necesidades metabólicas de las células que se encuentran sembradas a profundidades mayores en el andamio durante un periodo de tiempo más largo [9].

Otro método para el cultivo celular, es el de los bioreactores, que simulan las condiciones dinámicas en las que se encuentran las células *in vivo*. Mediante este método se puede mejorar la transferencia de masa a través del andamio. Esto a su vez, permite distribuir uniformemente las células en el andamio con las concentraciones apropiadas de nutrientes, facilitando la transferencia de masa a las células que se encuentran en crecimiento e impartiendo un estímulo mecánico a las mismas.

Bancroft et al. [10] diseñaron un bioreactor de flujo de perfusión que permite que el medio de cultivo fluya a través del andamio basándose en el principio de que el flujo disminuye el gradiente de concentración de nutrientes y aumenta el transporte del medio a través de un andamio poroso mientras que se aplica un esfuerzo cortante a las células en crecimiento (Fig. 3.2.) [10]. Estudios posteriores del mismo grupo de investigadores demostraron que el

flujo de perfusión aumenta la producción de matriz extracelular, el remodelado de la matriz, y la distribución de célula y de la matriz [11].

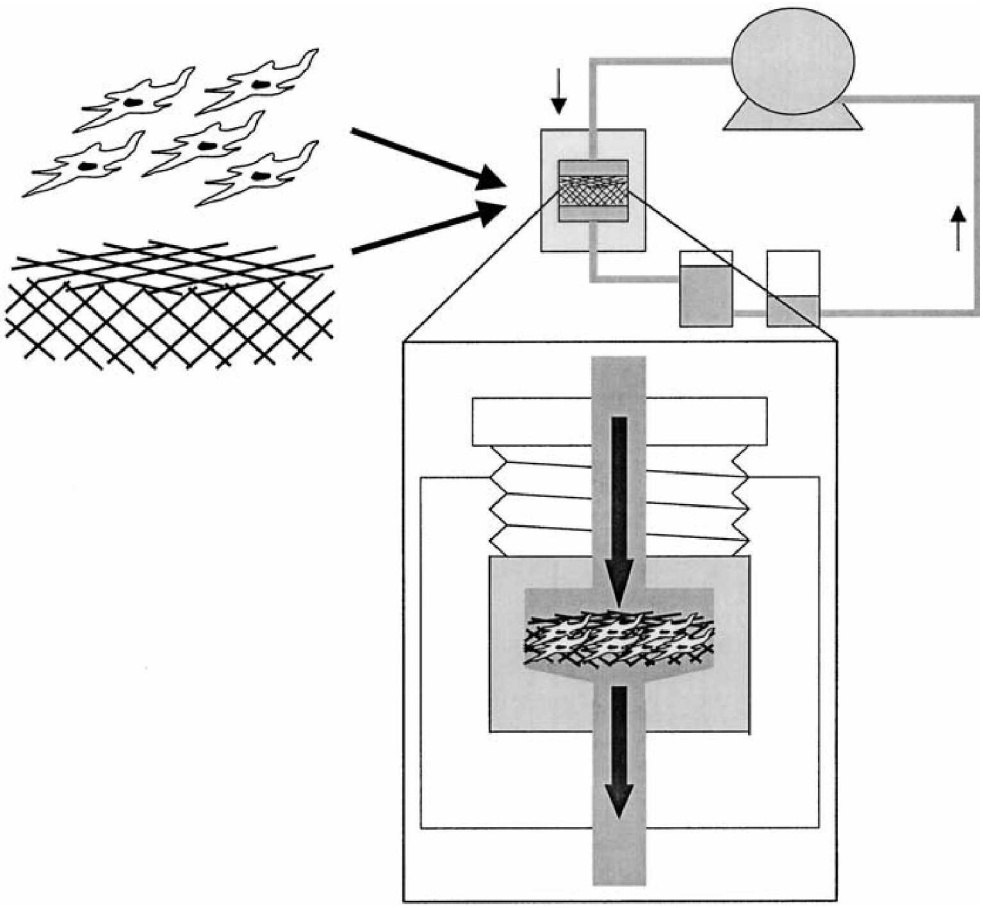

Fig. 3.2 *Bioreactor*: Las células son sembradas en un andamio y puestas dentro de un bioreactor de perfusión. El flujo aumenta el transporte de masa y genera esfuerzo de corte en la células en desarrollo para inducir su diferenciación, proliferación y deposición mineral [4].

Entonces, se puede decir que los bioreactores de perfusión aumentan el transporte de nutrientes y, tal vez más importante aún, imparten esfuerzo de corte sobre las células, lo que motiva la diferenciación y la actividad celular.

3.2. Andamios para Ingeniería de Tejidos

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

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

3.2.1. Requerimientos en el diseño

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

La osteoconductividad se refiere a la capacidad que un material posee para actuar como un substrato en el cual las células puedan adherirse y desarrollar sus funciones, mientras que se facilita el crecimiento del hueso a través de un andamio tridimensional que llene el defecto. Para ello se requiere de una estructura porosa que permita el crecimiento del hueso y la vascularización a través del andamio. Idealmente, un andamio debe estar diseñado para maximizar la porosidad manteniendo unas propiedades mecánicas suficientes, y poseer poros interconectados de aproximadamente 200-400 µm [13]. Este tipo de estructura provee una elevada área superficial para la adhesión, crecimiento y desarrollo de la función de las células, y al mismo tiempo, espacios vacíos de un tamaño suficiente para permitir la formación del hueso y la vascularización. Un biomaterial que pueda ser inyectado ofrece la ventaja adicional de la fabricación de implantes de formas irregulares mediante el uso de moldes o de su inyección directa en un defecto.

El andamio tampoco deberá producir una respuesta inflamatoria significativa que pueda resultar en la formación de capsula fibrosa alrededor del implante, de lo contrario este se

vuelve inefectivo. Una respuesta toxica del tejido circundante al biomaterial causaría la muerte celular y agravaría el daño.

Finalmente, el biomaterial del andamio debe ser esterilizable sin que este pierda su funcionalidad, es decir, el proceso de esterilización no debe alterar la composición química del material, ya que esto podría afectar su bioactividad, biocompatibilidad y sus propiedades de degradación.

3.2.2. Clasificación de los substitutos óseos

La clasificación de los materiales utilizados como sustitutos óseos dada por biólogos y cirujanos es muy distinta a aquella utilizada por los científicos de materiales, basada en la relación existente entre el hueso y el material después de ser implantado.

Los materiales osteoconductivos son diseñados para proveer de un medio de guía al crecimiento del hueso. El hueso está en contacto con el material sin ninguna interposición de células o tejidos. Su valor depende de la capacidad del lugar del implante de proveer un tejido reparador que contenga osteoblastos o células madres pre-diferenciadas a osteoblastos para su posterior colonización. Estos materiales han sido calificados como bioactivos, lo que significa que están diseñados para provocar o modular una actividad biológica del tejido circundante. En el campo de la regeneración ósea, este término está directamente relacionado con un enlace directo entre el material y el hueso [14].

Los materiales osteoinductivos actúan en la diferenciación de las células que se encuentran próximas. Ellos son capaces de inducir una evolución fenotípica de células multipotenciales o de cualquier célula mesenquimal hacia un tipo osteogénico. De manera sencilla, estos tipos de materiales son capaces de inducir la formación de hueso y por tanto participan en este proceso de manera activa [14].

3.3. Materiales Bioactivos

3.3.1. Concepto de bioactividad

Los materiales artificiales que son implantados en defectos óseos son generalmente aislados del hueso circundante por medio de una capsula fibrosa. Consecuentemente, no pueden adherirse al hueso y esto ha sido un problema crítico en su aplicación para la regeneración

ósea. Desde 1970, este hecho ha podido ser resuelto por medio del uso de materiales bioactivos que espontáneamente crean un enlace y se integran al hueso en el cuerpo.

Diversos tipos de materiales bioactivos han sido desarrollados durante las últimas tres décadas. De entre ellos, los más usados en aplicaciones clínicas son: el Bioglass® en el sistema Na_2O-CaO-SiO_2-P_2O_5, la hidroxiapatita (HA) sinterizada ($Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$, el fosfato tricalcico β sinterizado (TCP) ($Ca_3(PO_4)_2$, la cerámica bifásica HA/TCP, la vitrocerámica A-W que contiene oxifluorapatita cristalina ($Ca_{10}(PO_4)_6(O,F_2)$) y la wollastonita β ($CaO.SiO_2$) en una matriz vítrea MgO-CaO-SiO_2. Estos materiales han sido desarrollados en forma de "bulks" y partículas con estructuras densas y porosas.

Los materiales bioactivos presentan una característica común en la interface con el hueso después de su integración. Por ejemplo, el Bioglass, la HA y la vitrocerámica A-W, revelan una capa de apatita en la interface que es mediadora de la integración con el hueso. Evaluaciones histológicas *in vivo* muestran que esta capa de apatita se forma en la superficie de estos materiales en una etapa temprana del periodo de inmersión, y que más tarde la matriz ósea se integra a esta apatita. Esta capa de apatita consiste en cristales nanométricos de una apatita que contiene iones de carbono, una estructura defectuosa y baja cristalinidad. Estas características son similares a las de la fase mineral del hueso y, entonces, las células encargadas de la regeneración del hueso, pueden proliferar en la apatita y diferenciarse para formar una matriz extracelular compuesta por apatita biológica y colágeno. Como resultado, el hueso circundante se encuentra en contacto directo con la superficie de la capa de apatita. Cuando este proceso ocurre, se crea un enlace químico entre el hueso mineral y la superficie de apatita para disminuir la energía interfacial existente entre ambas [15].

3.3.2. Vidrios bioactivos

Vidrios bioactivos es el nombre de una serie de composiciones de vidrios que poseen la habilidad de crear un enlace con el hueso y otros tejidos, descubiertos por Hench en 1969 [16]. Estos vidrios son producidos como los vidrios convencionales en los cuales los componentes básicos son SiO_2, Na_2O, CaO y P_2O_5, y se comercializan con el nombre de Bioglass®. Una técnica mas reciente para la obtención de los vidrios bioactivos es el uso del proceso de sol-gel que da como resultado estructuras porosas finas con una bioactividad más alta que los vidrios convencionales de la misma composición. Cada componente brinda su propia contribución a los vidrios bioactivos, pero el CaO y el Na_2O pueden ser sustituidos sin afectar en gran medida al enlace con el hueso. Incluso los vidrios sin P_2O_5 son bioactivos, contrariamente a lo que se creía hace unos años que era un componente indispensable. La

habilidad de crear un enlace con el hueso se basa en la reactividad química de los vidrios bioactivos en los cuales los enlaces de silicio están rotos y, finalmente, una capa rica en fosfato de calcio (calcium phosphate – CaP) se deposita en la superficie del vidrio que cristaliza transformándose en hidroxiapatita carbonatada (HCA). Las propiedades mecánicas de estos vidrios no son muy buenas, y por ello, otros componentes cerámicos suelen ser añadidos para resforzarlos.

A fin de fabricar andamios destinados a usos de ingeniería de tejidos, además de la bioactividad, los vidrios bioactivos deben ser degradables y porosos. Los métodos para preparar vidrios bioactivos porosos son similares a los de las cerámicas de fosfato de calcio (apartado 3.3.2.) y su degradación es básicamente un proceso de disolución. La velocidad de disolución puede estar determinada por el tamaño de partícula, el tipo de vidrio y medio en el que se encuentra; sin embargo, la biodegradación de este tipo de materiales es muy lenta. La carga de estos vidrios bioactivos, con factores de crecimientos y drogas, es posible por medio del método de sol-gel.

3.3.3. Cerámicas de fosfatos de calcio

Existen diferentes tipos de cerámicas CaP disponibles para aplicaciones clínicas y de entre ellas las de mayor uso son la hidroxiapatita (HA), los fosfatos tricálcicos alfa o beta (α-TCP y β-TCP), el fosfato de calcio bifásico (BCP), el fosfato de calcio amorfo (ACP), la apatita carbonatada (CA) y la hidroxiapatita deficiente en calcio (CDHA) (Tabla 3.1) [17]

.

NOMBRE	ABREV.	FORMULA	Ca/P
Fosfato tetracálcico	TTCP	$Ca_4(PO_4)_2O$	2,0
Hidroxiapatita	HA	$Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$	1,67
Hidroxiapatita deficiente en calcio	CDHA	$Ca_9(HPO_4)(PO_4)_5(OH)$	1,5
Fosfato de calcio amorfo	ACP	$Ca_{10-X}\ H_{2X}(PO_4)_6(OH)_2$	
Fosfato tricálcico (α,β)	TCP	$Ca_3(PO_4)_2$	1,5
Fosfato octacálcico	OCP	$Ca_8(HPO_4)_2(PO_4)_4.5H_2O$	1,33
Fosfato dicálcico (Monetita)	DCP	$CaHPO_4$	1,0
Fosfato dicálcico dihidratado (Brushita)	DCPD	$CaHPO_4.2H_2O$	1,0
Fosfato monocálcico monohidratado (MCPM)	MCPM	$Ca(H_2PO_4)_2.H_2O$	0,5

Tabla 3.1. Fosfátos de calcio de interés en aplicaciones clínicas [17].

Los fosfatos de calcio poseen una excelente biocompatibilidad debido a su gran parecido químico y cristalino al componente mineral del hueso. Alrededor de un 60% en peso del

hueso esta hecho de hidroxiapatita ($Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$) (HA). Además, son osteoconductivos y pueden formar un enlace directo con el hueso bajo ciertas condiciones (bioactivos). Numerosos experimentos *in vitro* e *in vivo* han demostrado que los fosfatos de calcio, sin importar en qué forma se encuentren (bulk, recubrimientos, polvos o porosos) o fase (cristalina o amorfa), favorecen al enlace, diferenciación y proliferación de células (como los osteoblastos y células mesenquimales), siendo la HA posiblemente la más eficiente de ellas.

Mientras que el desempeño biológico de la HA y los fosfatos de calcio cristalinos está claramente demostrado, su relativa lenta biodegradación limita su aplicación en ingeniería de tejidos óseos. La HA cristalina presenta la velocidad de degradación más lenta entre los fosfatos de calcio.

Algunas cerámicas poseen origen natural con distintas porosidades, como por ejemplo, las cerámicas derivadas de la hidroxiapatita coralina (Interpore® , Pro-Osteon®) y las de origen bovino (Endobon®). Sin embargo, un problema con estas cerámicas comercializadas es que poseen una porosidad y propiedades mecánicas estandarizadas y por tanto, no pueden ser adaptadas a aplicaciones específicas [18].

Las cerámicas influyen positivamente en la diferenciación y proliferación celular. Por ello se suelen utilizar células osteogénicas para acelerar el crecimiento del tejido. La adhesión de células a los andamios es a menudo una necesidad, ya que por más de que el andamio posea macroporos 100% interconectados, existe una mortalidad celular muy alta y la supervivencia se restringe a aquellas que se encuentran en la superficie. La adhesión de factores de crecimiento osteo-inductivos es otra opción, ya que las cerámicas CaP poseen igualmente afinidad a las proteínas y medicamentos. Estos factores de crecimiento también pueden sufrir una degradación en el transcurso del tiempo [19].

Otra posibilidad es el uso de andamios con un potencial osteoinductivo por sí mismo. Varios trabajos de investigación han demostrado que algunos materiales CaP, especialmente los bifásicos y la HA poseen cierta osteoinductividad cuando se encuentran implantados en el tejido muscular [20], [21]. Acerca del proceso de la osteoinductividad existe aun mucha especulación, sin embargo se cree que la presencia de macro y microporosidad es un factor decisivo [22]. En el caso de que las cerámicas solas puedan inducir suficiente formación de hueso y de esta manera no necesitar de terapias con factores de crecimientos y cultivos celulares, haría la aplicación final mucho más sencilla y reduciría considerablemente los costos.

3.3.4. Cementos de fosfato de calcio

Los cementos de fosfato de calcio consisten en una fase en polvo de un fosfato y/o sal de calcio que junto con una fase líquida reaccionan a temperatura ambiente o corporal para formar un precipitado de un fosfato de calcio que fragua por medio del entrecruzamiento de los cristales. Debido a la baja temperatura de procesado, ellos no se ajustan a la definición tradicional de una cerámica, a pesar de que la fase en polvo posee material CaP sinterizado, como por ejemplo α-TCP o HA. Cuando se los compara con las cerámicas, la mayor diferencia radica en que los cementos pueden ser inyectados y fraguan *in situ*, lo que los convierte en un material de fácil manipulación clínica. Una cerámica debe ser conformada de acuerdo al defecto durante la operación lo que representa una complicación y a menudo, no se obtiene un contacto óptimo [23].

Desde que los cementos CaP han sido inventados por Chow et al. [24], una serie de diferentes formulaciones han sido investigadas con diversos resultados. En general existen dos tipos de cementos CaP:

- Cementos de apatita que fraguan dando como producto final HA, CA o CDHA.

- Cementos de brushita que fraguan dando como producto final brushita.

Los cementos de apatita son microporosos y poseen una lenta degradación, pero una mejor estabilidad mecánica. Los cementos de brushita, por otro lado, presentan muy baja resistencia mecánica, pero una velocidad de biodegradación más alta que los cementos de apatita. Los dos tipos de cementos pueden ser aplicados en ingeniería de tejidos. En comparación con las cerámicas CaP, los cementos CaP poseen también una alta micro y nanoporosidad. Esta porosidad permite la vascularización dentro del implante; sin embargo, es muy pequeña para permitir el crecimiento de tejido óseo. La macroporosidad necesaria puede ser introducida usando diferentes métodos y obteniendo una sistema altamente poroso. Algunos ejemplos de estos métodos son el uso de cristales solubles en agua que luego de la inyección se disolverán y el uso de esferas de polímeros degradables, aunque debe destacarse que se requiere un alto porcentaje de cristales o esferas poliméricas para asegurar la conectividad entre los poros. Otro método es la introducción de agentes espumantes dentro del material que generan burbujas de aire en el cemento, como es el caso del Tween y que es abordado con mayor detalle en la siguiente sección. Una consecuencia negativa de obtener un alto porcentaje de porosidad es que la resistencia mecánica decrece considerablemente en comparación con el cemento sin macroporos.

La adhesión celular a los cementos CaP podría verse dificultada por la inestabilidad química del medio o por el proceso de mezclado. Sin embargo, la adición de factores de crecimiento

y medicamentos puede realizarse tan solo añadiéndolos en la fase líquida del cemento y logrando una distribución más homogénea. El proceso de fraguado puede ser influenciado por la adición de proteínas en la fase líquida; y entonces, no pueden incorporarse grandes cantidades de las mismas, porque se retarda el fraguado y se pueden presentar dificultades en el uso clínico [23].

3.3.4.1. Cementos de apatita basados en α-TCP.

En 1983, Brown y Chow demostraron la formación de hidroxiapatita monolítica a temperatura ambiente o del cuerpo por medio de una reacción cementante. Esta fue una importante ruptura en el campo de las biocerámicas, porque fue posible la obtención de un material moldeable. Esta característica hace que el material pueda adaptarse a la cavidad del hueso, presentando una buena fijación y un óptimo contacto con el tejido, necesario para el crecimiento del hueso.

La HA puede tener distintas composiciones. La HA no estequiométrica o la deficiente en calcio (CDHA) puede ser obtenida a bajas temperaturas, con una composición que puede expresarse como $Ca_{10-x}(HPO_4)(PO_4)_{6-x}(OH)_{2-x}$, donde x varía de 0 a 1: x=0 para la HA estequiométrica y x=1 para una total CDHA.

Existen diferentes reacciones de fraguado que pueden llevar a la formación de HA o de CDHA. Las reacciones entre los fosfatos tretracalcicos y otros fosfatos de calcio, como el fosfato monocálcico monohidratado (MCPM), el fosfato dicalcico (DCP) o el fosfato dicalcico dihidratado (DCPD), han demostrado tener una reacción de fraguado apropiada. También es posible obtener HA como producto final de la reacción de fraguado usando mezclas de fosfatos de calcio con una relación entre el calcio y el fosforo (Ca/P) más baja que aquella de la HA añadiendo una fuente adicional de iones de calcio. Una de estas combinaciones es el β-TCP + DCPD + $CaCO_3$. Otras formulaciones contienen α-TCP con otros fosfatos de calcio [25].

Finalmente, se puede obtener HA como producto de la reacción de fraguado del α-TCP. La posibilidad de obtener CDHA a partir de la hidrólisis del α-TCP entre 60° y 100°C fue descrita por Monma y Kanazawa [26] en 1976. Según Monma y colaboradores, la hidratación del α-TCP, bajo ciertas condiciones, puede llevar al fraguado a 37°C, pudiendo obtenerse diferentes productos, dependiendo del pH. La CDHA puede formarse a un pH>7,5.

La reacción de hidrólisis del α-TCP está representada por la siguiente ecuación:

$$3(\alpha\text{-}Ca_3(PO_4)_2) + H_2O \rightarrow Ca_9(HPO_4)(PO_4)_5OH$$

Los factores que afectan a la cinética de la reacción de hidrólisis del α-TCP pueden ajustarse a un modelo que asume la existencia de dos mecanismos, inicialmente el área superficial del reactante, y subsecuentemente la difusión a través de la capa hidratada. El primer mecanismo controla la reacción en las etapas iniciales, y posteriormente, la reacción se convierte en una reacción controlada por difusión [25].

Los mecanismos de fraguado y endurecimiento consisten en una disolución del α-TCP y posterior formación y crecimiento de núcleos cristalinos; y la resistencia mecánica, como fue mencionado anteriormente, se da por el establecimiento de contactos químicos y mecánicos entre los cristales.

3.4. Obtención de andamios macroporosos para aplicaciones en ingeniería de tejidos a partir de cementos de fosfatos de calcio.

La obtención de macroporosidad es de gran importancia para la regeneración ósea, porque facilita la angiogénesis, la colonización del material por el tejido óseo y su reabsorción.

Se han desarrollado diversos métodos para conseguir macroporosidad en cementos de fosfato de calcio. Entre estos métodos se pueden mencionar la generación de la porosidad mediante la incorporación de una fase sólida insoluble en el cemento, que sea eliminada por disolución o mediante sinterización una vez que el cemento haya fraguado; la adición de una fase soluble que sea eliminada o la incorporación de un polímero biodegradable que se reabsorbe una vez implantado y fraguado el cemento. Estos métodos desafortunadamente o requieren una cantidad elevada de agente porogénico (del orden del 50% en volumen), y por tanto, las propiedades del material se ven afectadas de forma importante; u obtienen HA de alta temperatura, que se saben son menos reabsorbibles [18], [27], [28].

Por otro lado, otros métodos de obtención de andamios macroporosos son la mezcla de los cementos de fosfato de calcio con un líquido hidrofóbico para disminuir la tensión superficial y facilitar la formación de una emulsión; o la mezcla de una fuente de carbonato en la fase en polvo del cemento con una solución acuosa con un componente ácido que reaccionen formando dióxido de carbono y produciendo una porosidad interconectada [27].

Ginebra y colaboradores [28] proponen obtener una espuma de fosfato de calcio que sea inyectable y macroporosa, a partir del espumado de la fase líquida o de la pasta de un cemento. La vía que se propone es la adición de moléculas surfactantes a la fase líquida del

cemento para estabilizar las burbujas de aire en la pasta del mismo, obteniéndose el espumado del cemento.

Se ha verificado que la adición del surfactante es realmente eficaz como agente espumante en la matriz del cemento, llegándose a conseguir una elevada macroporosidad, con un alto grado de interconexión entre macroporos. Esta es una opción viable para la fabricación de andamios para aplicaciones en ingeniería de tejidos óseos, ya que se pueden obtener pastas en forma de espumas de fosfato de calcio, que mantienen la macroporosidad incluso después de ser inyectadas. Además, las moléculas de los surfactantes son capaces de generar espuma a concentraciones muy bajas, lo que hace necesaria solo una pequeña concentración de aditivo para asegurar el espumado de la pasta del cemento [28]. La figura 3.4. muestra una imagen ampliada de un andamio macroporoso obtenido por medio de una espuma de fosfato de calcio.

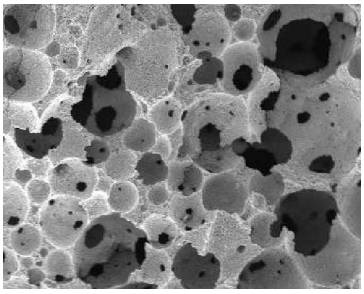

Fig. 3.4. Imagen de un andamio macroporoso obtenido por medio de una espuma de fosfato de calcio [28] .

3.4.1. Introducción a los surfactantes

Los surfactantes son sustancias superficialmente activas que modifican la interfase de sistemas. Su principal característica es que poseen un grupo polar, parte hidrofílica, y otro apolar, parte hidrofóbica. Esta dualidad polar-apolar hace que estas moléculas tengan una fuerte tendencia a migrar y adsorberse en las superficies o interfases, como sucede en la interfase agua-aire, donde se observa un importante cambio de polaridad que conduce a la orientación, perpendicular a la interfase, de las moléculas. Así, la molécula se ubica de forma que el grupo polar se encuentre dentro del agua y el grupo apolar se encuentre orientado hacia la superficie o interfase. La adsorción de un surfactante en la superficie gas-líquido produce, en general, una reducción de la tensión superficial que permite la formación de sistemas dispersos [29], [30].

De manera general los surfactantes se pueden clasificar en función de su ionización en agua [30]:

- *Surfactantes aniónicos*: Se disocian en un anión anfifílico y un catión. Representan más de la mitad de los surfactantes producidos anualmente.

- *Surfactantes no-iónicos*: No se ionizan en solución acuosa y es el segundo grupo en importancia (aproximadamente el 40 %). El grupo hidrófobo es en ocasiones de origen natural (Ej. un ácido graso), especialmente si se necesita una baja toxicidad.

- *Surfactantes catiónicos*: Se disocian en solución acuosa en un catión orgánico anfífilo y un anión generalmente del tipo halogenuro.

- *Surfactantes anfóteros*: Cuando se combinan dos caracteres diferentes dentro de una misma molécula. Por ejemplo, aniónico y catiónico, como es el caso de los aminoácidos.

La capacidad de un surfactante para producir cierta cantidad de espuma depende del sistema en el que se encuentre, de las condiciones físico-químicas del mismo, de su habilidad para reducir la tensión superficial, de su solubilidad y del grado de adsorción dentro de este sistema. Además, la presencia de aditivos y el método de mezcla empleado deben ser evaluados con detalle.

La concentración del surfactante es un factor muy importante, ya que a bajas concentraciones la tensión superficial se parece a la del agua, y por tanto no hay un gradiente de tensión apreciable por estiramiento de la película. Esto concuerda con las medidas experimentales que indican que la espumabilidad aumenta a medida que la concentración de surfactante se incrementa hasta la concentración micelar crítica (CMC), y que a continuación ésta tiende a invertirse como lo indica la figura 3.5.

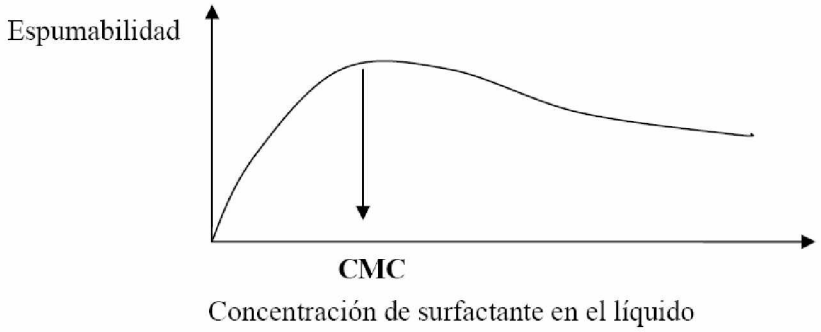

Fig. 3.5. Variación típica de la espumabilidad con la concentración del surfactante en fase líquida [31].

La adición de un surfactante a la fase líquida de un cemento de fosfato de calcio podría contribuir a la incorporación de burbujas de aire durante el proceso de mezclado, formación de espuma y preparación de la pasta. Su capacidad para modificar las propiedades superficiales de la pasta puede facilitar la formación de un sistema disperso (pasta del cemento – aire) en forma de espuma (Fig. 3.6.) [31].

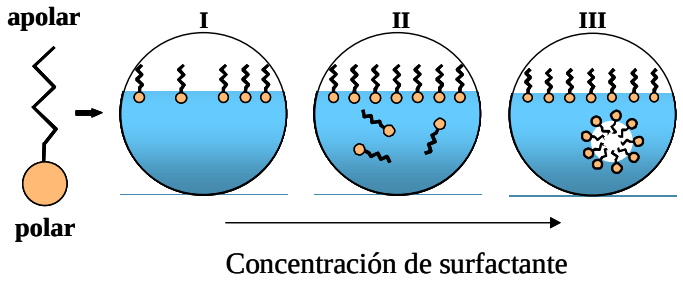

Fig. 3.6. Comportamiento de los surfactantes en solución [32].

3.4.2. Tween 80 como agente espumante

Los polisorbatos son polímeros formados por ésteres parciales de ácidos grasos con sorbitol y sus anhidros, y tienen una determinada cantidad de moléculas de óxido de etileno por mol de sorbitol. El Tween 80, conocido como polisorbato 80 pertenece a esta familia y cuenta con aproximadamente 20 moléculas de óxido de etileno (Fig. 3.7.) y tiene un peso molecular de 1310 g/mol, siendo su nombre químico polioxietileno 20 sorbitan monooleato [33].

El Tween 80 es un surfactante no-iónico, utilizado en gran variedad de formulaciones farmacéuticas. Los polisorbatos en general están considerados como sustancias no tóxicas y no irritantes cuando se utilizan en productos cosméticos, alimentos o medicamentos. Además, el polisorbato 80 está aprobado como aditivo en diversos tipos de parenterales (Ej. administración por vías intravenosa e intramuscular) y otras formulaciones farmacéuticas [33], [34].

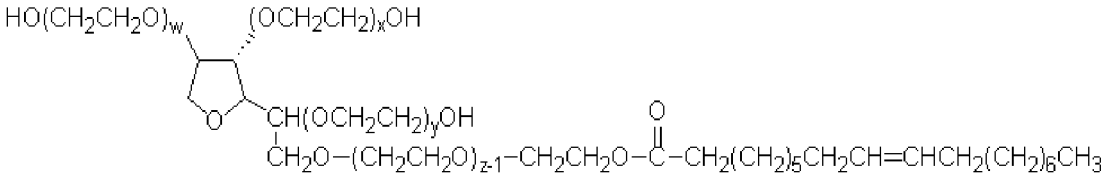

Fig. 3.7. Fórmula química del Tween 80 (w + x + y = 20) [31].

3.5. Evaluación de la bioactividad

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

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

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

3.5.1. Fluido corporal simulado

En el año 1991 fue propuesto por T. Kokubo [35] que el requisito principal para que un material artificial pueda crear un enlace directo con el hueso es la formación de una capa de apatita similar a la del hueso en su superficie, luego de ser implantado en el cuerpo humano. Según Kokubo, esta formación puede ser reproducida en un fluido corporal simulado (SBF – simulated body fluid) que contiene concentraciones de iones casi iguales a las del plasma sanguíneo humano (Tabla 3.2) [35]. Esto significa que la bioactividad de un material puede ser predecida por medio de la formación de apatita en su superficie cuando se lo sumerge en SBF

Ion	Plasma sanguíneo (mM)	SBF (mM)
Na^+	142,0	142,0
K^+	5,0	5,0
Mg^{2+}	1,5	1,5
Ca^{2+}	2,5	2,5
Cl^-	103,0	147,8
HCO^{3-}	27,0	4,2
HPO_4^{2-}	1,0	1,0
SO_4^{2-}	0,5	0,5
pH	7,2-7,4	7,40

Tabla 3.2. Concentración nominal de iones del SBF en comparación con la del plasma sanguíneo humano [36].

Desde entonces, la bioactividad de muchos tipos de materiales ha sido evaluada por medio su inmersión en SBF. Por ejemplo, las vitrocerámicas del tipo A-W han demostrado formar apatita en su superficie al ser sumergidas en SBF, como puede verse en la figuras 3.8 y 3.9. Esto fue confirmado, además, por su capacidad de crear un enlace directo con el hueso en estudios *in vivo (*Fig. 3.10.). Por otro lado, las vitro cerámicas del mismo tipo A-W, pero esta vez con presencia de aluminio, no formaron capa de apatita en su superficie al ser sumergidas en SBF, así como tampoco se observaron enlaces con el hueso en estudios *in vivo*. Existen otros ejemplos en la literatura y son expuestos con mayor detalle en [36]. Para todos estos materiales, la formación de apatita en su superficie, al ser sumergidas en SBF, presenta una buena correlación con su comportamiento bioactivo en estudios realizados *in vivo*.

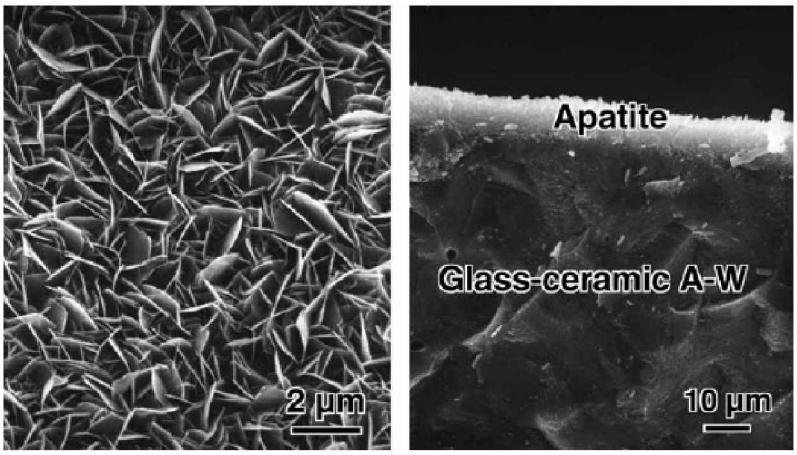

Fig. 3.8. Microscopia electrónica de barrido de la superficie (izq.) y la sección transversal (der.) de una capa de apatita formada en una vitro cerámica A-W en SBF [36].

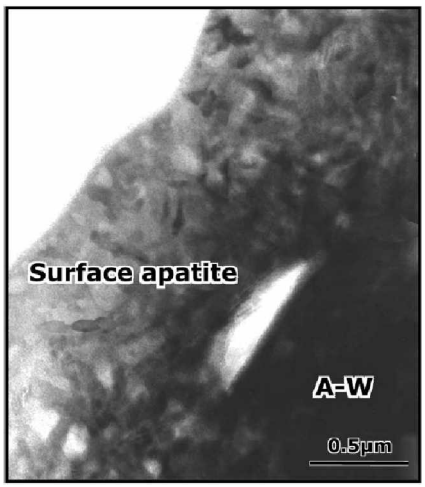

Fig. 3.9. Microscopia electrónica de transmisión de la sección transversal de una capa de apatita formada en una vitro cerámica A-W en SBF [36].

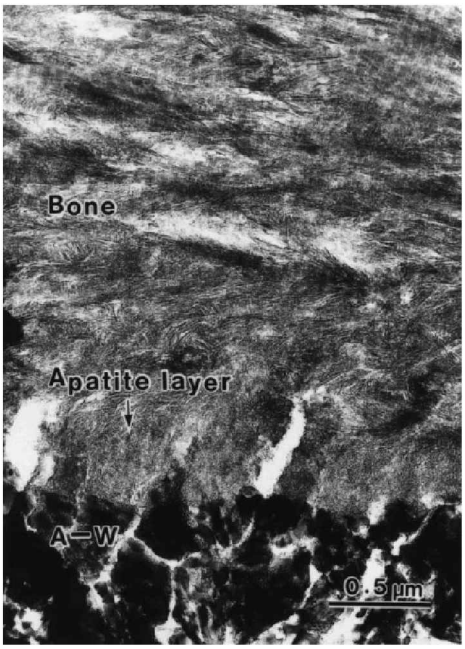

Fig. 3.10. Microscopia electrónica de transmisión de la interface entre una vitrocerámica del tipo A-W y la tibia proveniente de una rata [36].

A partir de estos resultados, se puede decir que si un material es capaz de formar apatita en su superficie al ser sumergido en SBF, podrá crear enlaces directos con el hueso a través de esta capa de apatita que se forma en su superficie *in vivo*, siempre y cuando el material no contenga ninguna sustancia que induzca reacciones de toxicidad o de anticuerpos. Por otro lado, también existen resultados cuantitativos [36] que muestran que el grado de formación de apatita de los materiales inmersos en SBF permite predecir el grado de formación que se tendrá *in vivo*.

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

3.5.2. El suero fetal bovino como medio de aportación de proteínas contenidas en el fluido corporal humano para la predicción de la bioactividad en biomateriales.

El suero fetal bovino (FBS – Foetal bovine serum) es el medio de cultivo *in vitro* y *ex vivo*, de células, tejidos y órganos más utilizado. Este contiene los mismos componentes esenciales del suero humano como hormonas, vitaminas, proteínas de transporte y de adhesión, y factores de crecimiento [37]. El plasma es el componente líquido de la sangre, en el cual las células estas suspendidas; y sin los componentes que producen el coagulo, el plasma sanguíneo es conocido como suero.

El FBS es obtenido a partir de los fetos extraídos de presas bovinas sanas que son destinadas a la consumición humana [38]. Básicamente, consiste en la sangre del feto que es recolectada y separada, de manera aséptica, de los componentes que producen el coagulo y de las células.

Los fluidos fisiológicos poseen grandes concentraciones de sustancias de peso molecular bajo y alto que podrían inhibir la formación de HA. Sus componentes principales son citados en la tabla 3.3; y como puede verse, la mayor parte de los componentes inorgánicos están presentes en concentraciones similares a las del SBF.

A partir de un estudio comparativo de la degradación *in vitro* de un cemento de brucita en FBS, relizado por L. M. Grover y colaboradores [40] se demostró que el efecto de las proteínas puede inhibir la precipitación espontánea de HA. Meyer y Fleisch [41] observaron que la transformación de ACP en PHA, en condiciones fisiológicas normales, es inhibida principalmente por la albúmina, seguida por el magnesio, los pirofosfatos y los citratos. Los mismos autores han observado también que el citrato, el magnesio y la albúmina aumentan la constante de equilibrio de solubilidad de la brucita, mientras que el fosfato provoca su disminución. Cada una de estas especies actúa de manera distinta. R. I. Martin y P. W. Brown [39] exponen que los fluidos biológicos poseen concentraciones significativas de sustancias de bajo y alto peso molecular que pueden inhibir la formación de HA. Además, afirman que la albumina rápidamente cubre la superficie de la PHA formando una capa proteica. Al realizar un estudio comparativo de la formación de HA en agua destilada y en FBS por medio de una reacción de acido-base de dos fosfatos de calcio precursores, han observado que la formación de CDHA es considerablemente inhibida en FBS.

COMPONENTE	Peso Molecular (dalton)	g/l	µmol/l
Ca^{2+}	40,08	0,1	2.500
Na^{+}	22,99	3,31	144.000
K^{+}	39,1	0,196	5.000
Mg^{2+}	24,31	0,036	1.500
Cl^{-}	35,45	3,79	107.000
HCO_3^{-}	60	1,62	27.000
HPO_3^{2-},$H_2PO_4^{-}$	94,97 (PO_4)	0,19	2.000
SO_2^{2-}	64,06	0,032	500
Urea	60,04	0,24	4.000
Albumina	66000	40	600
IgG	150000	8-17	53-113
Glucosa	180	1	5.600
Lactasa	90	0,11	1.200
Otras proteínas	----------	10-20	600

Tabla 3.3. Especies inorgánicas principales y componentes orgánicos seleccionados del suero [39].

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

4. Materiales y métodos

En la primera parte del estudio, se buscó evaluar el comportamiento bioactivo de un cemento apatítico de α-TCP, totalmente inorgánico y cuya reacción de fraguado da como resultado la formación de CDHA (cemento H). El medio de inmersión utilizado fue el fluido corporal simulado (SBF).

En la segunda, se utilizó un agente espumante (Tween 80) en la fase líquida del cemento, a fin de obtener una estructura macroporosa que fuera apta para ser utilizada como andamio en aplicaciones de ingeniería de tejidos óseos. Se buscó determinar la influencia de este aditivo en la bioactividad del cemento. En esta segunda parte del estudio se utilizaron dos medios de inmersión, el fluido corporal simulado (SBF) y el suero fetal bovino (FBS). De acuerdo a lo expuesto anteriormente, el uso del FBS como medio de inmersión permite determinar el efecto que puedan causar las proteínas presentes en el fluido fisiológico.

En este capítulo se detallan los materiales y los métodos utilizados para la obtención de las muestras y su preparación para la posterior inmersión en los medios utilizados para la evaluación de la bioactividad.

4.1. Preparación de los cementos

Los cementos de fosfato de calcio consisten en una fase en polvo y una fase líquida que reaccionan a temperatura ambiente para formar un precipitado de fosfato de calcio.

En esta sección se explica el procedimiento de obtención de las dos fases de los cementos utilizados.

4.1.1. Fase líquida

Para la obtención de la fase líquida del cemento totalmente inorgánico (de referencia) se utilizo la solución de una sal inorgánica que actúa como acelerante de la reacción de fraguado.

Por otro lado, la fase líquida necesaria para la obtención de las probetas con estructura macroporosa, consistió en una mezcla de la solución de sal inorgánica, utilizada en el caso

anterior, y un agente espumante (Tween 80) al 0,5% en peso. Luego, esta fase líquida debe ser espumada, antes de añadir la fase sólida, para que el agente espumante cumpla su función y se obtenga la estructura macroporosa buscada.

4.1.1.1. Solución de sal inorgánica

La fase líquida consiste en una solución de Na_2HPO_4 que acelera la reacción de fraguado del cemento. Esta solución se obtiene disolviendo 2,5 g polvo de Na_2HPO_4 en 100 ml de agua destilada, mediante la utilización de un agitador magnético.

Al entrar en contacto con la fase sólida del cemento, esta solución provoca un aumento en la concentración de iones de fosfato, lo que a su vez, aumenta la velocidad de precipitación de la hidroxiapatita [42].

4.1.1.2. Solución de sal inorgánica y agente espumante

Se utilizó un protocolo desarrollado por el grupo de investigación BIBITE (Biomateriales, Biomecánica e Ingeniería de Tejidos) del Departamento de Ciencias de los Materiales e Ingeniería Metalúrgica de la Escuela Técnica Superior de Ingeniería Industrial de Barcelona, para la obtención de una solución con 2,5% en peso de Na_2HPO_4 y 0,5% en peso de Tween 80.

4.1.2. Fase sólida

La fase solida del cemento consiste en una mezcla de 98% de fosfato tricalcico alfa (α−TCP) y 2% de hidroxiapatita precipitada (PHA). Este pequeño porcentaje de PHA actúa como semilla para la nucleación heterogénea de la PHA durante la reacción de hidrólisis del cemento. Esta mezcla lleva el nombre de cemento H.

4.1.2.1. Obtención del α−TCP

Para obtener el fosfato tricálcico se prepara una mezcla estequiometrica en polvo de fosfato dicálcico ($CaHPO_4$) y de carbonato calcico ($CaCO_3$), con una relación 2:1 respectivamente.

Esta mezcla se sinteriza, a una temperatura máxima de 1.400°C, para favorecer a la siguiente reacción en estado sólido:

$$2CaHPO_4 + CaCO_3 \rightarrow Ca_3(PO_4)_2 + CO_2 + H_2O$$

En el caso del presente estudio, se mezcló 131,589 gr. de $CaHPO_4$ y 48,399 gr. de $CaCO_3$ durante 10 minutos a 1425 rpm, utilizando una mezcladora "Whip Mix" (Fig. 4.1.) para obtener una mezcla homogénea.

Fig. 4.1. Mezcladora Wip Mix.

Despues de obtener la mezcla, se colocó el polvo en un crisol de Platino para realizar la sinterización en un horno Hobersal (CNR-58). Las etapas del sinterizado se detallan a continuación (Fig. 4.2.):

1) Se incrementa la temperatura hasta llegar a 300°C a una velocidad de 2,5 °C/min (2 horas).

2) Se mantiene la temperatura constante a 300°C durante 2 horas. Al final de esta etapa, se espera haber eliminado toda la humedad que pueden contener los reactivos.

3) Se aumenta la temperatura hasta llegar a 1100°C, a una velocidad de 2,5 °C/min (5 horas y 20 minutos) para promover la formación del fosfato tricálcico. Esta formación

se da en dos etapas. Primero se produce una reacción de descomposición del $CaCO_3$ en dióxido de carbono (CO_2) y oxido de calcio (CaO) a partir de la siguiente reacción: $CaCO_3 \rightarrow CO_2 + CaO$. Y luego, el oxido de calcio formado reacciona con el fosfato dicálcico dando como resultado fosfato tricálcico, dióxido de carbono y agua.

4) Se mantiene la temperatura constante a 1100°C durante 2 horas, a fin de asegurar que las reacciones de formación del fosfato tricálcico hayan se completen.

5) Se calienta hasta llegar a 1400°C a una velocidad de 2,5 °C/min (2 horas) para promover la transformación de β-TCP en α-TCP.

6) Se mantiene la temperatura constante a 1400°C durante 2 horas para estabilizar la fase alotrópica α.

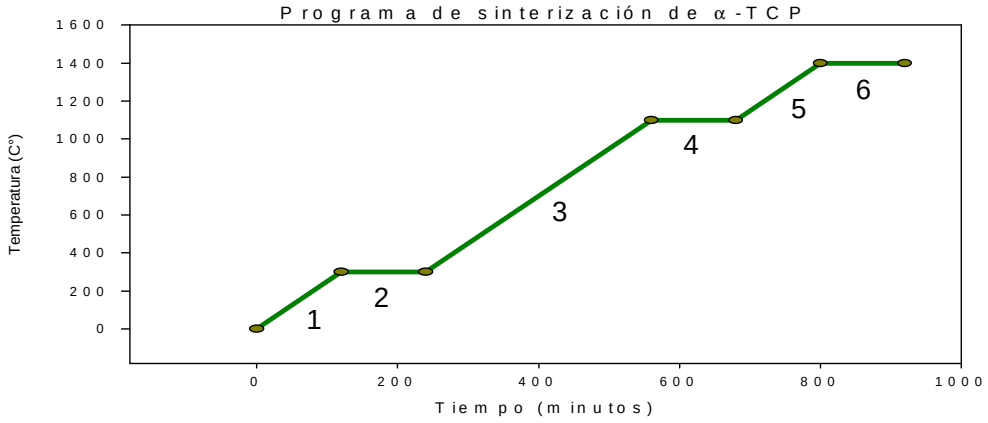

Fig. 4.2. Programa de sintrerización para la obtención del α-TCP.

Después del sinterizado, se realizó un temple en aire utilizando un ventilador y un martillo para partir en trozos el sólido resultante del tratamiento, y de esta manera, lograr mayor contacto superficial del mismo con el aire. Este paso es necesario para estabilizar la fase α y evitar la formación de fase β, ya que como puede apreciarse en el diagrama de equilibrio (Fig. 4.3.) esta última es estable a bajas temperaturas.

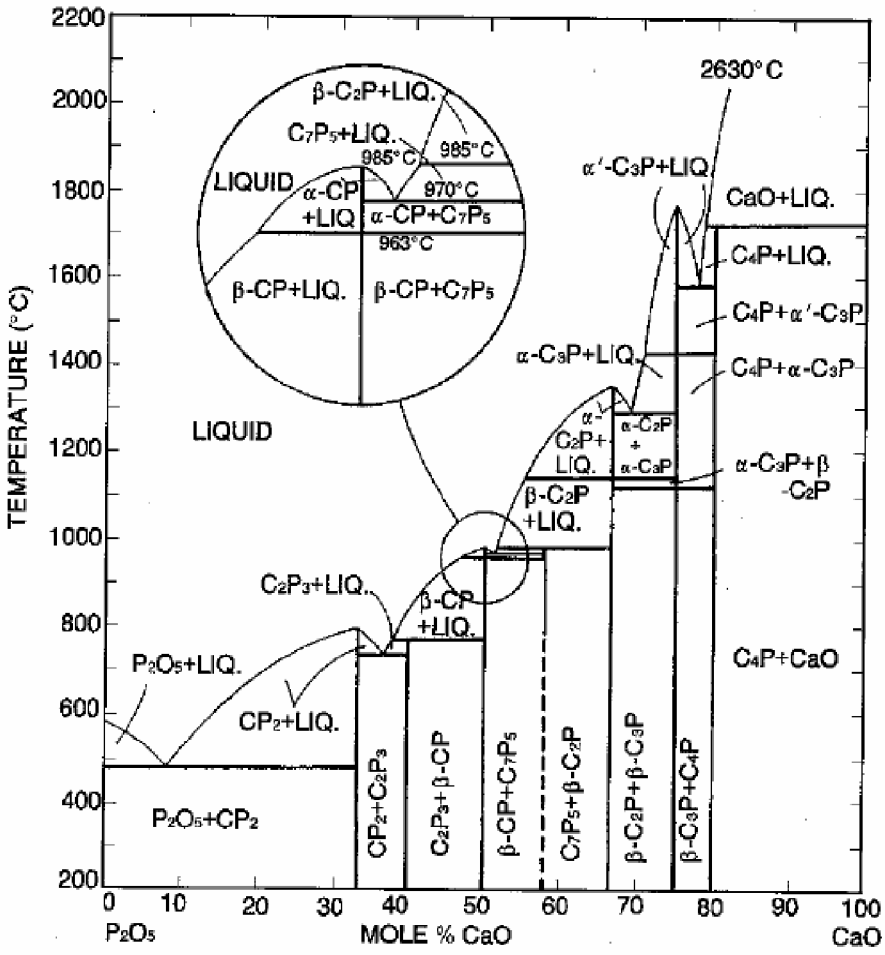

Fig. 4.3. Diagrama de equilibrio del sistema CaO-P_2O_5 [17].

4.1.2.2. Molido del α-TCP

Después de obtener el α-TCP es necesario contar con una distribución determinada del tamaño de partícula. Como fue explicado anteriormente, el area superficial del reactante es un factor determinante en la cinética de la reacción de hidrólisis y transformación del α-TCP a CDHA.

Los trozos de α-TCP obtenidos después del temple fueron molidos utilizando un molino de bolas planetario (Fig. 4.4.), durante 15 minutos a una velocidad de 450 rpm (protocolo de molienda 15:450).

Fig. 4.4. Molino planetario de bolas.

Se utilizaron 10 bolas de ágata (de 30 mm de diámetro), sobre las cuales se depositan los de trozos de α-TCP a ser molidos (Fig. 4.5.). El tamaño medio de partícula que se obtiene mediante este protocolo de molienda es de 5,56 µm y con una densidad específica de 1,16 m²/g.

Fig. 4.5. Trozos de α-TCP listos para ser molidos con bolas de ágata en un recipiente de ágata.

4.1.2.3. Obtención de la fase en polvo

Para obtener la fase en polvo del cemento (cemento H), al α-TCP molido se le añade un 2% en peso de PHA y se mezcla durante 10 minutos en la mezcladora "Whip Mix" mostrada anteriormente (Fig. 4.4.).

La PHA se utiliza como semilla para favorecer la nucleación de la HA y actúa como un acelerante de la reacción de disolución y precipitación del α-TCP.

4.2. Fabricación de las probetas

Para la primera parte del estudio, la evaluación de la bioactividad de un cemento de fosfato de calcio, se fabricaron discos de 6 mm de diámetro y 3 mm de alto utilizando el cemento sin espumar.

Para la segunda parte del estudio, la evaluación del comportamiento *in vitro* de un cemento de fosfato de calcio espumado, se fabricaron cilindros de 6 mm de diámetro y 12 mm de alto, ya que se buscó también determinar la resistencia a compresión de las muestras. Para evaluar la influencia del agente espumante (Tween 80) se fabricaron probetas utilizando el cemento macroporoso espumado y como referencia se utilizó el cemento sin espumar.

En ambas partes del estudio se utilizó un protocolo de fabricación desarrollado por el grupo de investigación BIBITE (Biomateriales, Biomecánica e Ingeniería de Tejidos) del Departamento de Ciencias de los Materiales e Ingeniería Metalúrgica de la Escuela Técnica Superior de Ingeniería Industrial de Barcelona. A diferencia de la fase líquida y del molde de teflón utilizado, el procedimiento de fabricación de las probetas es bastante similar (Fig. 4.6.). A continuación se detalla el procedimiento seguido en la fabricación de las probetas.

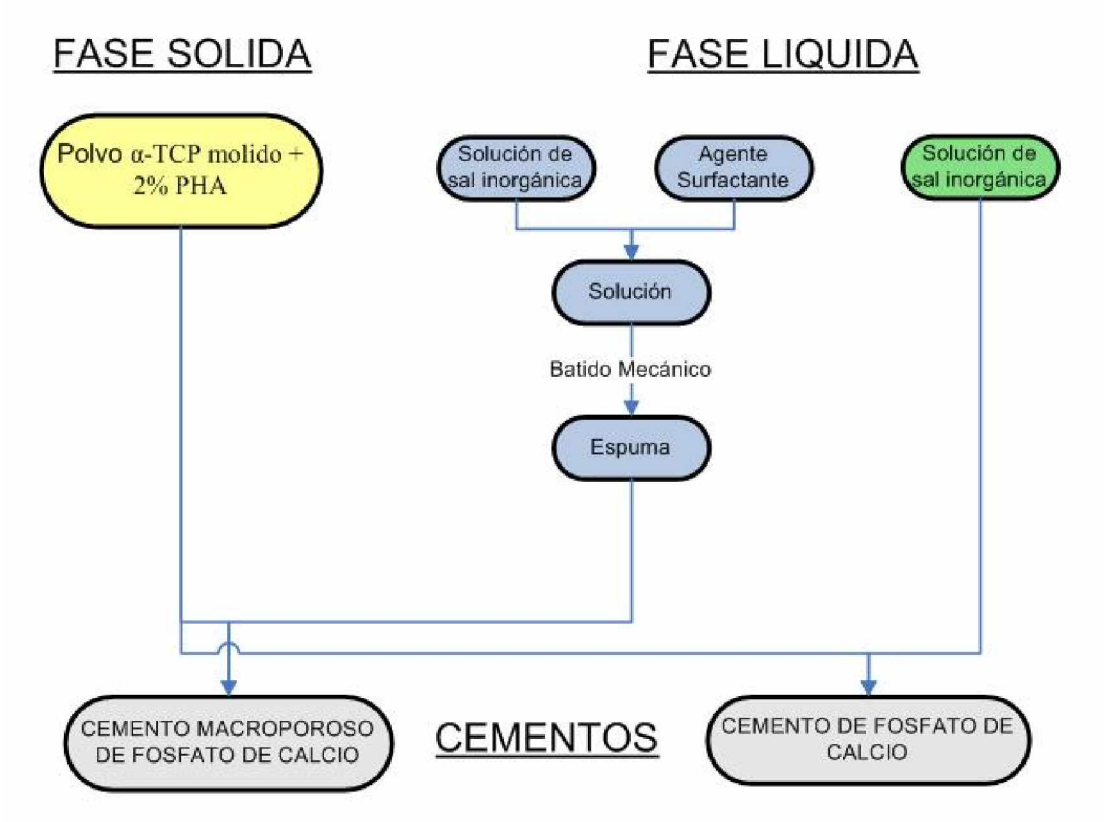

Fig. 4.6. Esquema de la preparación de los cementos de fosfato de calcio espumado y sin espumar.

4.2.1. Fabricación de las muestras con cemento sin espumar

Para la preparación del cemento sin espumar, se utilizó una relación líquido/polvo de 0,35 ml/gr. Los pasos seguidos son los siguientes:

- Se pesa el polvo de la fase sólida del cemento.
- Se coloca la solución acelerante dentro de un mortero y luego se añade el cemento pesado.
- Se mezcla con una espátula y se rellenan los moldes. Se utilizaron dos tipos de moldes, uno para la obtención de discos, y otro para la obtención de los cilindros. Este último es mostrado en la Fig. 4.7.

§ Se almacenan los moldes llenos durante 1 día envueltos en papel de aluminio a 37°C para permitir que el cemento adquiera la cohesión suficiente para ser sumergido en solución de Ringers en el siguiente paso.

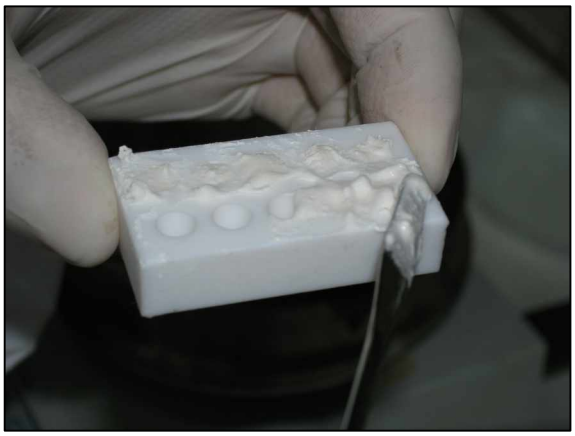

Fig. 4.7. Llenado de un molde para la fabricación de cilindros con la composición del cemento sin espumar de Referencia.

§ Para promover la reacción de fraguado, se sumergen los moldes durante 7 días en solución de Ringer (0,9% NaCl). Estos últimos pasos, aseguran el fraguado del cemento y una completa conversión a hidroxiapatita deficiente en calcio. El porcentaje correspondiente de reacción luego de los 7 días es cercano al 100%.

En el presente estudio, se utilizó el dispositivo mostrado en la Figura 4.8 para desmoldar los cilindros. En el caso de los discos, el desmoldado es más sencillo y no se requiere de un dispositivo extra.

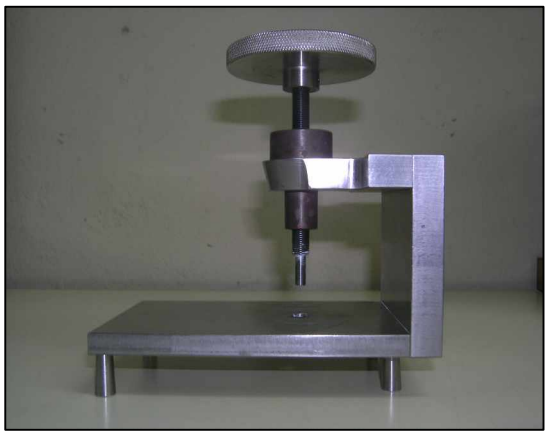

Fig. 4.8. Dispositivo para desmoldar.

4.2.2. Fabricación de las muestras con cemento espumado

A continuación se detallan los pasos seguidos para la preparación de la composición de cemento espumado con Tween 80.

Fase Líquida: 2.5% de Na_2HPO_4 + 0.5% de Tween 80.

Fase Sólida: Cemento H (98% de α-TCP + 2% de HA).

Relación L/P: 0.65

Preparación:

- Se espuma la solución de Tween (Fig. 4.9).
- Se agrega el polvo del cemento a la espuma formada.
- Se mezcla la espuma y el polvo de cemento.
- Se llena una jeringa con la pasta formada (Fig. 4.10).
- Se almacena el molde con los andamios durante 1 día a 37 ºC envuelto en papel aluminio a fin de dotar al cemento de la cohesión necesaria para ser sumergido luego en solución de Ringers.
- Se retira el papel aluminio y se sumerge el molde con los andamios en solución de Ringers (0,9% NaCl) a 37 ºC durante 7 días.
- Por último, se retiran los andamios del molde, con el mismo dispositivo utilizado con los cilindros de referencia (Fig. 4.8).

Fig. 4.9. Solución de Tween siendo espumada.

Fig. 4.10. Llenado de un molde con la composición con mediante una jeringa.

4.3. Esterilización de las muestras

Después de obtenerse la conversión del α-TCP a HA, las muestras (discos y cilindros) deben ser esterilizadas para evitar o disminuir la presencia de bacterias que puedan afectar las condiciones del estudio. Para ello, se recurrió a la esterilización por medio de irradiación gamma a 25 kGy.

La irradiación gamma es una tecnología segura que puede penetrar en el material para eliminar la presencia de microorganismos, sin dañar o cambiar la temperatura del material. Esta técnica posee numerosas ventajas en comparación con otras técnicas de esterilización; entre ellas se pueden mencionar que brinda alta seguridad de esterilización; es un proceso llevado a bajas temperaturas; es más penetrante que, por ejemplo, la irradiación electrónica; y no deja residuos, como es el caso de técnicas de esterilización por medio del contacto con gases que pueden resultar tóxicos [43].

El primer aspecto a considerar cuando se utiliza la esterilización gamma es la tolerancia del material a la radiación. Cuando se utiliza este tipo de irradiación, fotones de alta energía bombardean el material, pudiendo causar el desplazamiento de algunos electrones en el mismo. Estas reacciones generan radicales libres que pueden ayudar a romper algunos enlaces químicos (al crear discontinuidades en el DNA microbial cualquier organismo que pueda sobrevivir al proceso no será capaz de reproducirse).

Al mismo tiempo, estas reacciones de alta energía tienen el potencial de romper enlaces que producen una disminución en la resistencia mecánica de los materiales y que pueden causar cambios en el color, olor y aspecto de las muestras. Por estos motivos se deben realizar pruebas para determinar la influencia de este tipo de esterilización en los materiales. Con este fin, fueron desarrollados, por el grupo de investigación BIBITE (Biomateriales, Biomecánica e Ingeniería de Tejidos) del Departamento de Ciencias de los Materiales e Ingeniería Metalúrgica de la Escuela Técnica Superior de Ingeniería Industrial de Barcelona, estudios comparativos de muestras de cementos de fosfato de calcio antes y después de la esterilización gamma. Se analizaron las propiedades mecánicas, las fases presentes y otras características de las muestras; concluyéndose que no existían influencias negativas del proceso de esterilización. De igual manera, en el presente estudio se analizaron el color, olor y aspecto de las muestras después de la esterilización sin observarse cambios.

4.4. Preparación del Fluido Corporal Simulado

Para la preparación del fluido corporal simulado (SBF) se utilizó el protocolo publicado por T. Kokubo y colaboradores [35], [36] cuyos pasos se detallan a continuación.

1- Se lavan todos los elementos que serán usados en la preparación del SBF con 1M HCl, detergente neutro y agua destilada. Los elementos que deben incluirse son los siguientes: un agitador magnético, ocho bandejas de plástico, un disco petri, un recipiente de plástico de 1000 ml, una botella de plástico de 1000 ml, un matraz aforado de vidrio de 1000 ml, una cuchara, un termómetro, un agitador de plástico, una pipeta desechable para ajustar el pH (a ser utilizada con 1M HCl), un embudo de plástico, un cilindro aforado de 50 ml, un recipiente de 50 ml. Se utilizará un baño térmico para ajustar la temperatura y un equipo de medición de pH para ajustar su valor.

2- Se añade aproximadamente 700 ml de agua pura destilada dentro del recipiente de plástico de 1000 ml y se agita por medio de un agitador magnético mientras se calienta hasta 36,5°C (en el mismo agitador o en un baño térmico).

3- Se añaden los reactivos dentro del recipiente de plástico con agua pura destilada, siguiendo el orden mostrado en la tabla 4.1. y esperando que cada reactivo haya sido completamente disuelto antes de agregar el siguiente.

Reactivos	% de	c-SBF (gr)
NaCl	>99,5	8,036
$NaHCO_3$	>99,5	0,352
KCl	>99,5	0,225
$K_2HPO_4.3H_2O$	>99,0	0,23
$MgCl_2.6H_2O$	>98,0	0,311
1,0M-HCl	—	40
$CaCl_2$	>95,0	0,293
Na_2SO_4	>99,0	0,072
TRIS	>99,9	6,063
1,0M-HCl	—	±0,2

Tabla 4.1. Reactivos con sus respectivas cantidades y pureza para la preparación del SBF [35].

4- Se introduce el recipiente de plástico, con todos los reactivos disueltos, dentro de un baño térmico a 36,5°C y se ajusta el pH a 7,4 mediante la adhesión de 1 M HCl, agita mediante un agitador mecánico. Se lava con agua pura destilada el termómetro, el agitador mecánico y el medidor del pH luego de sacarlos de la solución, y se introduce el agua usada para ello en el recipiente con los reactivos disueltos.

5- Se traspasa la solución del recipiente de plástico de 1000 ml al matraz aforado de vidrio de 1000 ml y se deja enfriar hasta 20°C. Se ajusta el volumen total a 1000 ml añadiendo agua destilada.

6- Se traspasa la solución a la botella de plástico de 1000 ml tapándola. Se mantiene refrigerada la solución a 4°C.

Esta solución es estable hasta 8 semanas, pero si se advierte la presencia de algún tipo de precipitado de alguna de las sales disueltas, debe ser desechada y debe prepararse una nueva solución.

Antes de utilizar el SBF, se debe dejarlo reposar a temperatura ambiente y filtrarlo utilizando filtros estériles de 0,22 µm bajo flujo laminar.

4.5. Inmersión de las muestras en fluido corporal simulado (SBF) y suero fetal bovino (FBS)

El SBF ha demostrado ser un medio eficaz para evaluar la bioactividad de un material, por medio de la formación de una capa de hidroxiapatita precipitada en la superficie de la muestra, como fue discutido en el capítulo de fundamentos teóricos. Por otro lado, también se expuso la importancia de contar con un medio que hiciera posible la evaluación del efecto de las proteínas, presentes en el fluido fisiológico, en el comportamiento bioactivo del material y la utilidad del FBS para este propósito. Por ello, estos dos medios fueron utilizados en el presente estudio.

4.5.1. Cálculo del volumen de SBF necesario

El volumen del SBF necesario fue calculado mediante la Ecuación 4.1 [36]

$$V = A / 10 \qquad \text{(Ec. 4.1)}$$

donde *V* es el volumen del medio necesario por muestra y *A* es el área superficial aparente de una muestra. A fue calculada por medio de la siguiente ecuación (Ec. 4.2):

$$A = 2 \times \pi \times r^2 + 2 \times \pi \times l \qquad \text{(Ec. 4.2)}$$

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

4.5.2. Inmersión de los discos del cemento de fosfato de calcio

En la primera parte de estudio, se buscó evaluar la bioactividad del cemento de fosfato de calcio totalmente inorgánico sin espumar. Para ello, se utilizó el SBF como medio de inmersión. Se prefirió contar con información previa antes de comenzar con la utilización del FBS.

Reemplazando los valores del radio y largo de los discos en la ecuación 4.1. y la ecuación 4.2., se obtiene un volumen necesario de SBF de 11,31 ml por disco. Se optó por utilizar un valor que fuera aproximadamente 1,5 veces mayor para asegurar la formación de la capa bioactiva. De este modo, los discos fueron sumergidos en SBF, utilizando 16,67 ml por disco después de ser esterilizados. Este valor corresponde a una relación entre el volumen y el área superficial de 0,1474 (6 discos en 100 ml).

Los tiempos de inmersión fueron de 2, 6, 9 y 12 semanas, y para ello, fueron utilizados recipientes de polietileno que se conservaron a 37°C. El SBF fue renovado semanalmente para imitar en lo posible, las condiciones reales a las que estaría sometido el material; ya que en el cuerpo, existe una renovación continua del fluido fisiológico. Según L.M. Grover y colaboradores [40], la renovación del medio incrementa la formación de capa de HA.

4.5.3. Inmersión de los cilindros del cemento de referencia y del cemento espumado con Tween.

Una vez que se observó una respuesta bioactiva positiva en los discos y pudo notarse la formación de capa de hidroxiapatita precipitada, se continuó con la segunda parte del estudio. Los cilindros destinados para la evaluación y comparación de la respuesta bioactiva del cemento de fosfato de calcio espumado, fueron sumergidos en SBF y en FBS después de ser esterilizados por medio de la esterilización gamma. Se utilizaron también recipientes de polietileno que fueron conservados a 37°C durante 2, 6 y 9 semanas. Como en el caso de los cilindros, el SBF fue renovado semanalmente.

Reemplazando los valores del radio y el largo de los cilindros en la ecuación 4.1. y la ecuación 4.2., se obtiene un volumen igual a 28,27 ml. Sin embargo, como se decidió utilizar la misma relación entre el volumen y el área superficial de los cilindros sumergidos en SBF y FBS para obtener resultados comparativos, el volumen utilizado fue de 20 ml por cilindro. Este valor es inferior al teórico calculado, pero fue utilizado buscando encontrar un balance entre el volumen necesario y el elevado costo del FBS. Entonces la relación entre el volumen y el área superficia fue de 0,071. Si bien es inferior al recomendado por Kokubo y sus colaboradores, el mismo se encuentra dentro del rango de los valores utilizados y expuestos en la literatura [40], [44] [45],[46].

El FBS fue utilizado como es comercializado (GIBCO – Foetal Bovine Serum) y fue conservado a 4°C, de acuerdo a las recomendaciones del proveedor. Los cilindros sumergidos en él fueron conservados a 37°C en recipientes de polietileno y bajo condiciones estériles (en una sala de cultivos celulares). El FBS también fue renovado cada semana.

4.6. Métodos experimentales de caracterización

4.6.1. Medición del pH

Cada semana fueron medidos los valores del pH de las soluciones de SBF. Estas medidas fueron realizadas mediante un electrodo Metrohm modelo 691, utilizando la solución en la que se encontraban sumergidos los discos durante el estudio.

En las primeras semanas fueron medidos también los valores del pH del FBS utilizado con los cilindros, pero se observaron fluctuaciones muy bruscas, por lo que se decidió no

continuar con ellas. Es probable que algún componente, en las condiciones en las cuales se realizo el estudio y las mediciones, haya sido el causante de estos resultados.

4.6.2. Determinación de la concentración iónica del medio

Debido a la solubilidad de los cementos de las muestras estudiadas y a la posibilidad de predecir la precipitación de HA a partir del medio, es de gran interés analizar la variación de la concentración de iones del medio. Para ello se evaluaron las concentraciones de los iones Ca y P durante el estudio, en ambos medios, SBF y FBS. La técnica utilizada para ello fue la espectroscopía de emisión óptica de plasma acoplado inductivamente (ICP-OES, Inductively Coupled Plasma-Optical Emisión Spectrometry).

La ICP-OES se basa en la vaporización, disociación, ionización y excitación de los diferentes elementos químicos de una muestra en el interior de un plasma. Durante el proceso de desexcitación de los átomos neutros e iones en el interior de un plasma, se producen las emisiones de radiación electromagnética en la zona del UV-visible. Estas radiaciones, características de cada elemento, se separan en función de su longitud de onda y finalmente se mide su intensidad. La selección de la longitud de onda permite determinar los iones cualitativamente, mientras que la intensidad de la radiación emitida proporcionará la información para poder cuantificarlo [47].

4.6.3. Control de la variación del peso

Para el control del peso, se almacenaron muestras del cemento espumado y sin espumar de manera individual en recipientes de polietileno y fueron conservados a 37°C. Se utilizó la misma relación de 20 ml de volumen por cilindro utilizada con las otras muestras.

El almacenamiento de las muestras en forma individual para el control de peso hace posible detectar cambios puntuales que puedan darse en una muestra y que puedan alejar los valores de la media real.

Las mediciones del peso fueron llevadas a cabo cada semana. Para ello, las muestras fueron colocadas sobre papel absorbente durante 2 segundos, a temperatura ambiente, y posteriormente pesadas utilizando una balanza analítica Sartorious BP 211D. Debido a la pérdida del líquido contenido en las muestras, el valor del peso disminuía con gran rapidez al realizar las mediciones, por lo tanto, siempre fueron considerados los primeros valores obtenidos para establecer un estándar que permita comparaciones más acertadas.

4.6.4. Distribución del tamaño de entrada de poros y porosidad

Por medio de la porosimetría de mercurio, utilizando un porosimetro "Autopore IV 9500 Micromeritics", fueron determinados la distribución del tamaño de interconexión entre los poros y la porosidad total de las muestras de cementos sin espumar (microporosas) y de las muestras de cementos espumados (micro y macroporosas).

Esta técnica se basa en el comportamiento de un líquido que no moja un objeto poroso inundado del mismo. El mercurio no moja la mayoría de las sustancias y no penetra en los poros por capilaridad, por tanto, debe ser forzado para que penetre. Por este motivo, se requiere de presión en relación inversa al tamaño de las interconexiones entre los poros para que el mercurio pueda llenar los agujeros de los poros.

Inicialmente el mercurio se encuentra dentro de un dispositivo denominado penetrómetro (Fig. 4.11.). Este dispositivo consiste en un vaso de cristal unido a un vástago capilar de cristal con un revestimiento metálico. Las muestras son colocadas dentro del vaso de cristal y durante el análisis, el mercurio llena el vaso y el vástago capilar. A medida que la presión en el penetrómetro lleno se incrementa, el mercurio se introduce en los poros de la muestra, comenzando por aquellos de mayor diámetro (se suponen poros esféricos). El desplazamiento del mercurio a través del vástago capilar genera un cambio en la capacitancia entre el mercurio que se encuentra dentro y el metal que recubre la superficie exterior del vástago. El porosimetro detecta cambios muy pequeños en la capacitancia (equivalente a la diferencia de menos de 0,1 µl de mercurio), y por tanto, se puede obtener una resolución muy buena.

Fig. 4.11. Penetrómetro.

El ensayo consta de dos partes. En la primera, las presiones aplicadas para la intrusión del mercurio en los poros de las muestras va de 0,5 a 30 psia, y en esta etapa se puede obtener la información referente a la macroporosidad. En la segunda parte, la presión va desde 30 psia a 30.000 psia, lo cual brinda información referente a la microporosidad. Estos rangos de presión permiten la intrusión del mercurio en poros e interconecciones de un tamaño que va desde unos 5 nm hasta 350 µm aproximadamente [48].

4.6.5. Determinación de la densidad esquelética

Para medir la densidad esquelética de las muestras (excluyendo los poros e interconexiones entre los mismos), primero se obtuvo el volumen de las mismas por medio de un picnómetro de helio AccuPycTM 1330 Micromeritics.

Este equipo calcula el volumen de las muestras midiendo los cambios que se dan en la presión cuando un gas se expande desde una cámara que contiene la muestra a otra cámara vacía. El gas utilizado es el Helio por su comportamiento esencialmente ideal y porque posee el menor radio atómico, lo que permite su intrusión en los microporos de la muestra.

La Figura 4.12. muestra un esquema del picnómetro automático utilizado. El sistema es muy simple, consiste en dos cámaras, un transductor para medir la presión y tres válvulas.

Cuando se inicia el ensayo, primero se remueven los gases atmosféricos y vapores contenidos en la muestra y se los reemplaza por helio. Esto se logra por medio de una serie de purgas que se repite, una cantidad de veces determinada por el usuario (en este caso unas 25 veces), hasta que el helio llene el sistema y los gases indeseados sean expulsados fuera.

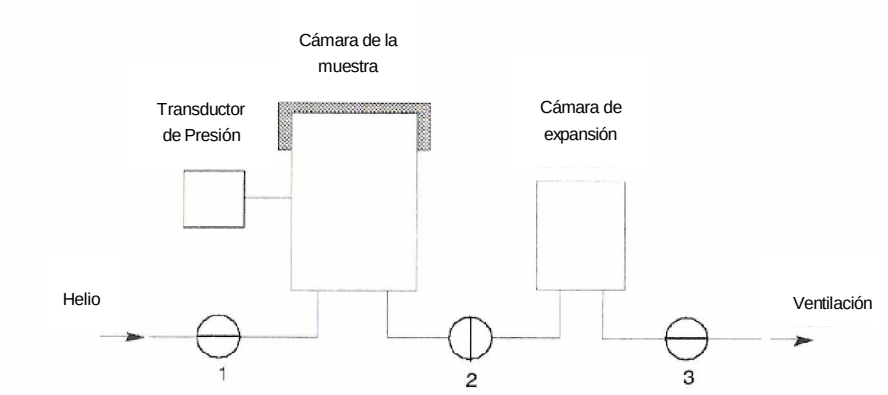

Fig. 4.12. Diagrama esquemático de un picnómetro [48].

Al terminar la serie de purgas se inician las mediciones. Inicialmente el sistema se encuentra a presión atmosférica. Luego, la cámara de la muestra se llena con helio hasta una presión elevada que es medida con precisión. A continuación, se permite la expansión del gas en la cámara de expansión y la segunda presión es medida. Por medio de la ecuación de los gases ideales y de estas dos presiones medidas puede ser calculado el volumen de la

muestra. Por último el gas es expulsado a la atmósfera. El ciclo se repite hasta que un mismo valor del volumen sea obtenido consecutivamente, con los límites prescriptos por el usuario.

Finalmente, se determinó el peso de las muestras utilizando una balanza de precisión. Los valores de la densidad esquelética fueron calculados mediante el cociente entre el volumen y el peso de las muestras.

4.6.6. Determinación de la superficie específica

La superficie específica es una característica importante que influye en aspectos como la cinética de la reacción de fraguado y el endurecimiento, la resistencia mecánica y la tasa de reabsorción del cemento, por ello, su determinación resulta importante. Al mismo tiempo, se buscó evaluar las diferencias entre los resultados de las muestras del cemento de referencia y del cemento espumado con Tween.

El método BET, desarrollado por Brunauer, Emmett y Teller para la determinación de superficies, se basa en la adsorción de un gas inerte a baja temperatura sobre una superficie sólida. En el caso de las muestras con una superficie específica expuesta igual o superior a 1,0 m^2/g, el gas que se utiliza para realizar el análisis es el nitrógeno, mientras que para materiales con superficies específicas inferiores a 1,0 m^2/g, el gas empleado es el criptón. El equipo empleado para realizar estas mediciones fue un “Micromeritics Asap 2000”.

Las muestras no necesitan preparación y para realizar el ensayo fueron utilizados directamente los cilindros fabricados.

4.6.7. Estudio de los cambios morfológicos superficiales

Mediante la obtención de imágenes de las muestras por microscopia electrónica de barrido es posible observar la evolución morfológica de la superficie, la macroporosidad y microporosidad, así como la microestructura de los cristales.

Para ello se utilizó un microscopio “JEOL JSM-6400” empleando un voltaje de entre 15 y 20 eV.

Las muestras fueron colocadas sobre placas de cobre empleando plata coloidal para adherirlas. Luego fueron recubiertas con oro, por medio de sputtering, utilizando un equipo

“Balzer SCD004”. Tanto la plata coloidal como el recubrimiento con oro, permiten mejorar la conductividad y obtener mejores imágenes.

4.6.8. Estudio de las fases presentes

La difracción de rayos X es fundamentalmente una técnica de caracterización estructural de sólidos. Las longitudes de onda de los rayos X empleados son del mismo orden que las distancias interatómicas de los cristales, que actúan como redes de difracción: difractan los rayos X en direcciones y con intensidades determinadas. La señal de difracción de un sólido es reflejo de su estructura cristalina.

Esta técnica de caracterización fue utilizada para analizar los cambios estructurales, las fases cristalinas, posibles transiciones de fase y reacciones en estado sólido. De esta manera se puede observar el grado de transformación del α-TCP a CDHA, cuyos picos cartacterísticos se encuentran en el rango de 25° a 35°. Se busco analizar también los cambios que pueden darse cuando se añade el Tween, por ejemplo, en la velocidad de la reacción de transformación.

Se realizaron dos tipos de caracterizaciones de rayos X. En el caso de los discos, se realizaron los análisis con un ángulo rasante de incidencia de 2°. Con este angulo de incidencia se pueden estudiar capas delgadas. Se trabajó en modo continuo entre 10 y 50 2θ, con un tiempo de 2 segundos, un paso de 0,002°, un voltaje de 40 KV y una intensidad de 30 mA.

Por otro lado, en el caso de los cilindros del cemento espumado y sin espumar se realizaron análisis de rayos X convencionales. Se trabajó en modo continuo entre 10 y 40 2θ, con un tiempo de 6 segundos, un paso de 0,002°, un voltaje de 40 KV y una intensidad de 20 mA.

Para la preparación de las muestras fue utilizado un mortero de ágata, a fin de conseguir un tamaño de partícula pequeño.

4.6.9. Resistencia a la compresión

Para determinar la resistencia mecánica de los cilindros del cemento sin espumar se realizaron ensayos de compresión utilizando un equipo Adamel Lhomargy DY 34. Se trabajó con una celda de carga de 100 N y una velocidad de 1 mm/min hasta la ruptura de las muestras.

Los ensayos fueron realizados con las muestras húmedas. Estas fueron conservadas en el medio de inmersión hasta solo unos minutos antes de realizar la prueba y luego fueron colocadas sobre papel absorbente por dos segundos antes de comenzar con el ensayo. El hecho de trabajar con muestras húmedas ayuda a realizar las mediciones en condiciones más similares a las del cuerpo humano.

5. Resultados y discusión

5.1. Evaluación de la bioactividad de un cemento de fosfato de calcio

5.1.1. Estudio de los cambios morfológicos superficiales

Las imágenes obtenidas por medio de microscopía electrónica de barrido mostradas en la figura 5.1. corresponden a la sección transversal y a la superficie de muestras del cemento sin espumar al tiempo inicial y después de ser sumergidas en SBF durante 2, 6, 9 y 12 semanas.

En el tiempo inicial o tiempo cero, sólo se observan los cristales de CDHA que fueron formados durante la reacción de fraguado. Estos poseen una morfología con forma de lámina y presentan la típica agrupación en círculos de pequeños cristales.

Después de dos semanas de inmersión en SBF puede apreciarse un gran cambio en la morfología superficial. La superficie parece estar recubierta con una capa de un espesor de alrededor de 4 a 5 µm como puede apreciarse en la imagen de la sección transversal. Al mismo tiempo, en la imagen correspondiente a la superficie, se puede ver que los cristales se encuentran recubiertos por dicha capa. Esta capa es probablemente la capa bioactiva de hidroxiapatita que se forma *in vitro* en materiales bioactivos, como por ejemplo, los vidrios bioactivos y las vitrocerámicas; y que permite el enlace directo con el hueso. En un estudio realizado por S. del Valle y colaboradores [49] con cementos de fosfatos de calcio inyectados en fémures de conejos durante 12 semanas, fue observada la formación de esta capa y puede verse claramente en las imágenes mostradas que fueron obtenidas por SEM.

Para los tiempos de inmersión superiores a las dos semanas, no se observan cambios importantes en el espesor de la capa formada como puede verse en las imágenes de la sección transversal. Sin embargo, al observar las imágenes correspondientes a la superficie, se puede notar como la superficie de la capa va adquiriendo un aspecto más homogéneo y, aparentemente, con el mismo espesor.

De igual manera, puede añadirse que la capa formada, que muestran estas imágenes, posee un aspecto amorfo en comparación con el resto del material (el bulk). Al mismo tiempo, la capa parece estar muy bien enlazada a los cristales subyacentes del resto del material.

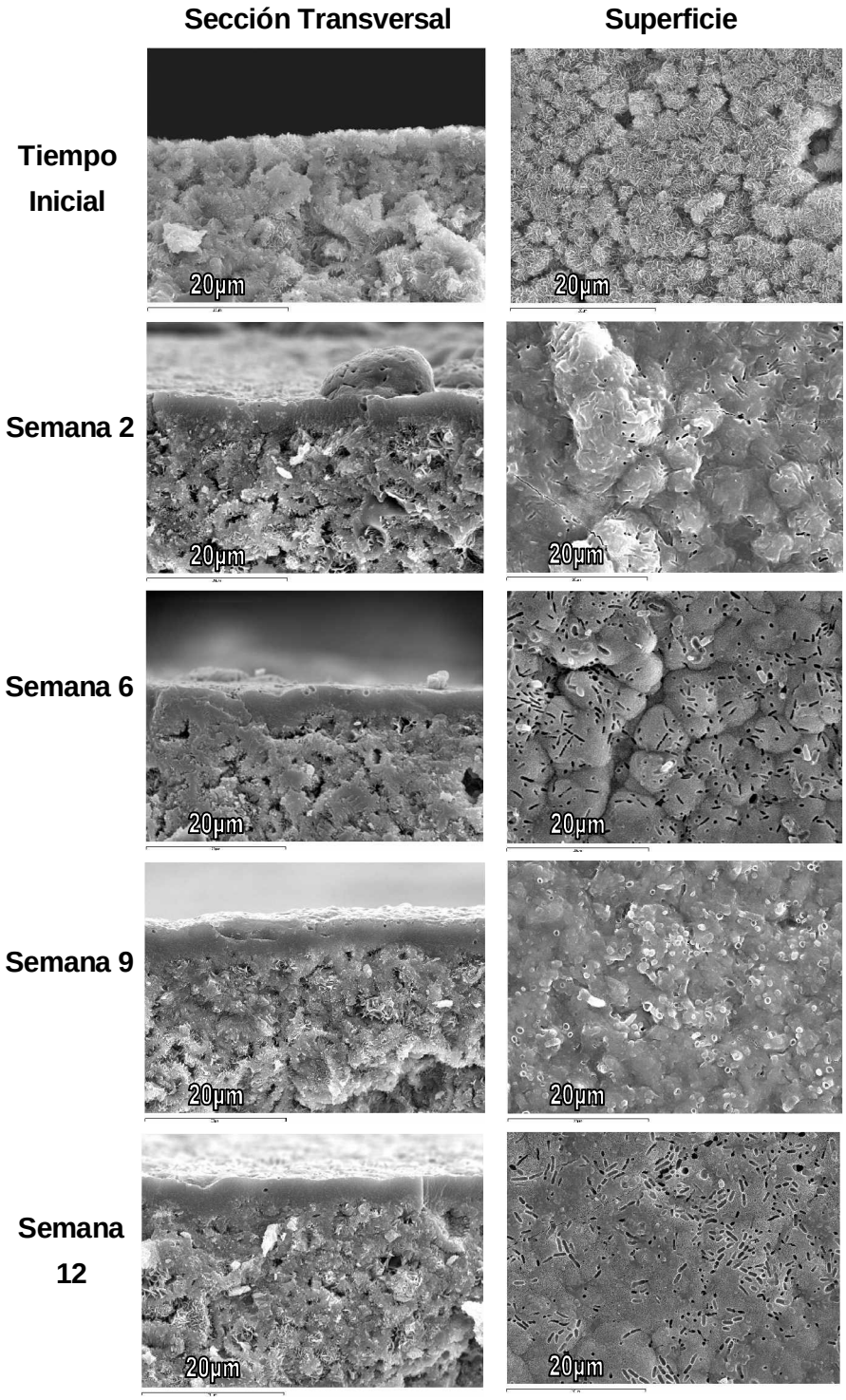

Fig. 5.1. Morfología de la sección transversal y de la superficie, obtenidas por microscopía electrónica de barrido, de discos del cemento de fosfato de calcio sin espumar, al tiempo inicial e inmersas en SBF durante 2, 6, 9 y 12 semanas.

5.1.2. Estudio de las fases presentes

Por medio de la difracción de rayos X se pudo confirmar que la capa formada en la superficie de las muestras consistía en hidroxiapatita con una cristalinidad inferior que aquella del resto del material. En los difractogramas obtenidos de las muestras de cemento sin espumar (Fig. 5.2.) puede observarse como el máximo principal correspondiente a la HA (31,8°) se vuelve más ancho después de dos semanas de inmersión. Este resultado también fue observado por K. Ishikawa y colaboradores [50] en un estudio realizado con discos de fosfato de calcio, cuya fase sólida fue obtenida por medio de una mezcla equimolar de TTCP y DCPA, sumergidos en una solución sin proteínas denominada "Plasma sanguíneo simulado" (solución preparada a partir de la misma concentración de sales que el SBF, con la diferencia de que el plasma sanguíneo simulado no posee SO_4^{2-}) durante 20 semanas. En este estudio se desprendió mecánicamente la capa depositada sobre los discos. Luego se realizó difracción de rayos x de la capa desprendida y del "bulk" del material. Los resultados mostraron claramente que dicha capa estaba compuesta de HA de una cristalinidad inferior al "bulk".

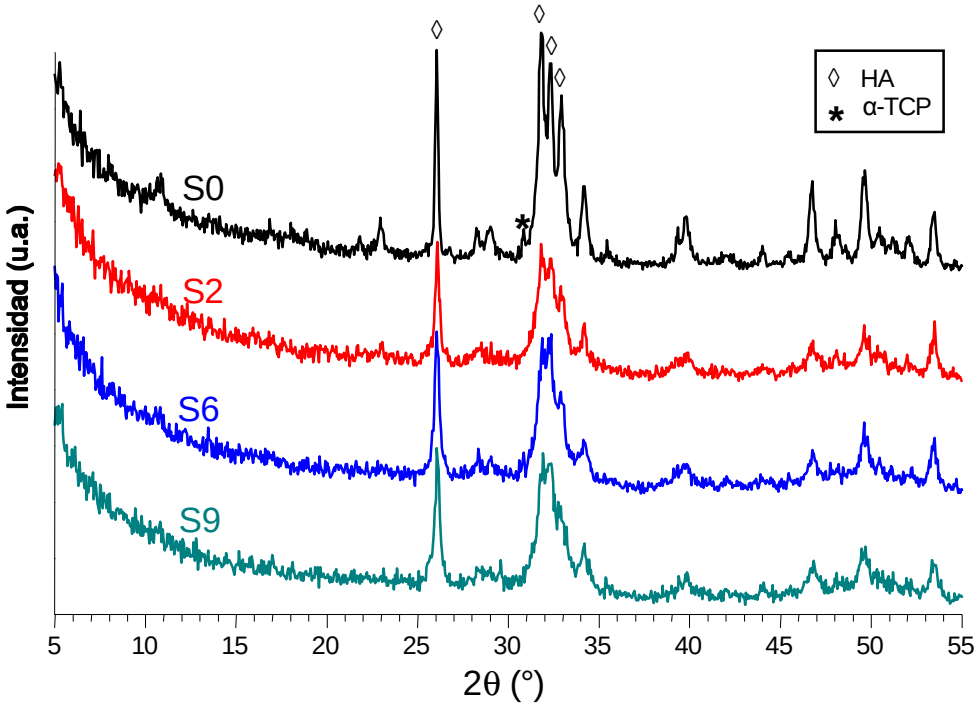

Fig. 5.2. Difractograma rasante de muestras del cemento sin espumar al tiempo inicial S0, después de dos (S2), seis (S6) y nueve (9S) semanas de inmersión en SBF.

Por otro lado, en el difractograma obtenido en el tiempo inicial se puede observar un pico correspondiente al α-TCP (indicado en la figura 5.2.). La intensidad de este pico no es muy elevada, pero indica la presencia de una pequeña proporción de α-TCP en el cemento. En el difractograma correspondiente a dos semanas de inmersión de las muestras, puede verse que el pico mencionando desaparece y por tanto, que la conversión a CDHA es del 100%.

Al mismo tiempo, puede apreciarse que no existen diferencias significativas en los difractogramas de las muestras con tiempos de inmersión superiores a dos semanas. De acuerdo con estos resultados, puede decirse que los mayores cambios se dan en las primeras dos semanas y que después de este periodo no existe un gran crecimiento de la capa formada en la superficie de las muestras ni cambios en su cristalinidad.

5.1.3. Control de la variación del peso

En la figura 5.3. puede observarse la variación del peso de las muestras del cemento de fosfato de calcio sin espumar en función del tiempo de inmersión en SBF. El tiempo 0 corresponde a 24 horas después de sumergir las muestras en SBF, con esto se buscó evitar que se midiera un aumento en el peso causado por la absorción de agua de las muestras. Los resultados muestran que las muestras no sufren una disolución o degradación al encontrarse sumergidas en SBF. Por el contrario, se puede apreciar un incremento en los valores. Si bien las variaciones son pequeñas, el hecho de que exista una tendencia general al aumento en el peso de las muestras podría explicarse mediante la formación de capa de CDHA en la superficie de los discos. La variación de la masa del alrededor de 3% alcanza su valor más elevado en la semana 8 y luego se vuelve constante.

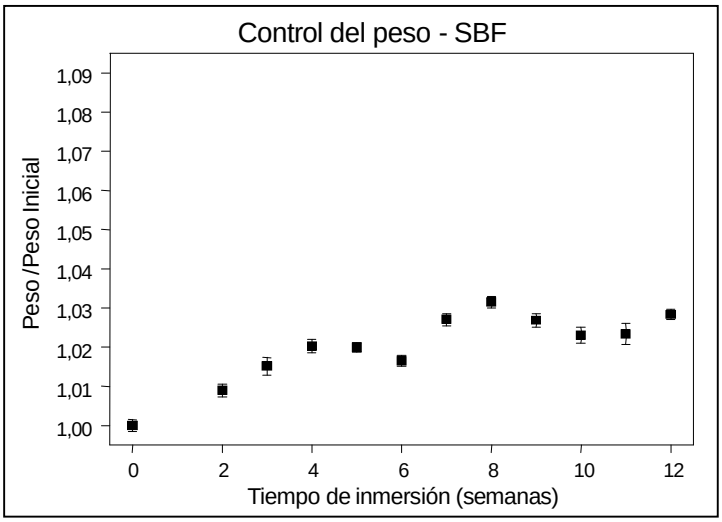

Fig. 5.3. Control de la variación del peso, relativo al peso inicial, de muestras de cemento de fosfato de calcio sin espumar en función del tiempo de inmersión de en SBF.

Por otro lado, en el estudio realizado por Ishikawa y colaboradores [50], mencionado anteriormente, también fue observado un incremento en el peso de los discos de alrededor del 50%. Cabe destacar que en ese caso, las muestras fueron sumergidas en SBF utilizando un flujo continuo. Los autores afirman que al utilizar un volumen fijo del medio de inmersión, las concentraciones de Ca y P pueden cambiar significativamente en el tiempo. Al mismo tiempo, sostienen que en estudios *in vitro* realizados con un volumen fijo del medio de inmersión, puede ser difícil caracterizar el producto que se forma en los cementos de fosfatos de calcio, porque la cantidad puede ser muy limitada cuando el volumen utilizado del medio es relativamente bajo.

Una causa probable del este incremento en el peso es el material que pudo haber sido depositado sobre los discos. Esta afirmación es defendida por el autor del presente estudio y por Ishikawa y sus colaboradores. Por otro lado, se descartó que el aumento en el peso pueda ser causado por la absorción de agua, como se puede ver en un ensayo que se presenta en el apartado 5.2.7. de este estudio.

5.1.4. Control de la variación del pH

Los valores del pH (Fig. 5.4.) se mantienen constantes entre 7 y 7,4. Entre el inicio y la semana doce los valores han permanecido casi estables, con algunas oscilaciones.

La estabilidad relativa del pH a través del periodo de inmersión podría corresponder a la interacción entre la superficie expuesta y los iones del medio de inmersión. Esta interacción comienza en el momento de la inmersión en SBF.

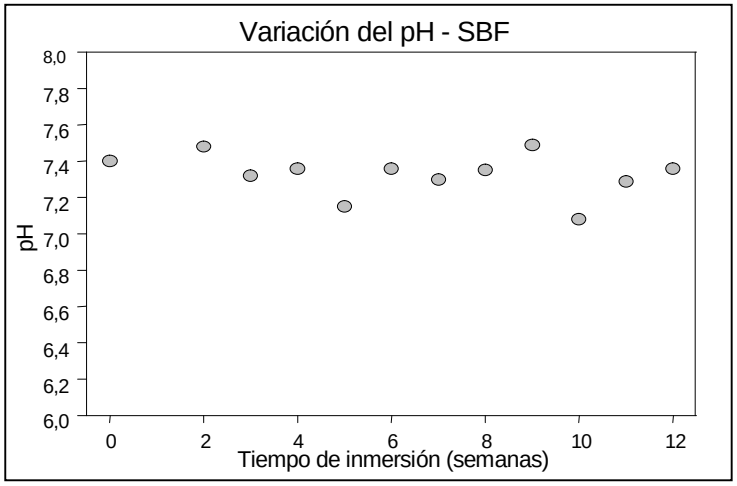

Fig. 5.4. Variación del pH del SBF en el que se encontraban sumergidos los discos en función del tiempo de inmersión.

5.1.5. Determinación de la concentración iónica del medio

Los cambios en las concentraciones de iones de Ca y P se muestran en la figura 5.5. Se puede apreciar que la concentración inicial de los iones de Ca se encuentran por debajo del valor de 2,5 mM teórico. Esto se debió a que el $CaCl_2$ utilizado en la preparación del SBF contenía un porcentaje elevado de humedad, y por tanto, al pesar la cantidad necesaria establecida en el protocolo de preparación, se añadió en realidad un porcentaje inferior de Ca. Para comprobarlo, se realizó una comparación del peso del polvo de $CaCl_2$ antes y luego de ser secado durante 15 horas a 105°C y se pudo constatar que la pérdida de peso fue de alrededor del 27%. Si bien la concentración de Ca de partida fue inferior, el análisis aun es válido, ya que durante todo el estudio se utilizó el mismo protocolo de preparación del SBF, y entonces, es posible analizar las variaciones de la concentración. En el caso del P la concentración de partida fue correcta.

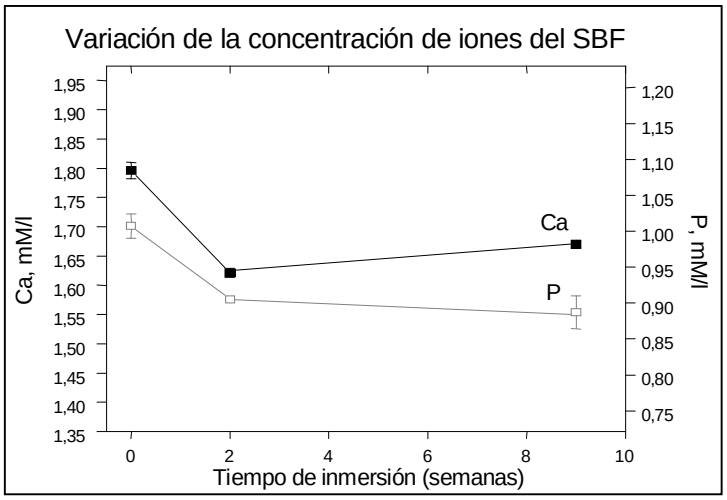

Fig. 5.5. Valores de la concentración de iones de Ca y P de las muestras de cementos de fosfato de calcio sin espumar en función del tiempo de inmersión en SBF, obtenidas por medio de ICP.

Los valores obtenidos para la semana dos muestran un pronunciado descenso en la concentración de ambos iones. Luego, se puede observar que los valores se mantienen constantes hasta la semana nueve. La concentración del fosforo llega hasta alrededor de 0,87 mM/l, mientras que el calcio alcanza aproximadamente los 1,68 mM/l.

Se cree que el material de las muestras libera primero cierta cantidad de iones, para luego comenzar a absorberlos. Esta liberación inicial se da en las primeras horas y depende de la solubilidad del cemento utilizado. Por ejemplo, en el caso de la brushita, la liberación inicial será mayor. Luego, cuando el medio se sobresatura de estos iones, se forman precipitados de hidroxiapatita y se acumulan en la superficie del material formando la capa bioactiva.

En el estudio realizado por Ishikawa y colaboradores [50] mencionado anteriormente, se observó un aumento inicial en la concentración de dichos iones. Este aumento inicial fue atribuido a una primera disolución del material. La fase sólida de este cemento estaba compuesta por una mezcla equimolar de TTCP y DCPA, y como fase líquida se utilizó agua destilada. La disolución primaria se atribuyó al TTCP que aun no había reaccionado. El TTCP es mas soluble que la CDHA, e incluso, mas soluble que el α-TCP.

En el caso de este estudio, el material de partida fue casi 100% HA. Al mismo tiempo, el primer valor medido, durante el periodo de inmersión, corresponde a dos semanas derspués de sumergir las muestras, pero este tipo de aumento suele verse en las primeras horas de la inmersión. Por ello, en los resultados mostrados en la figura 5.5. no se presenta el aumento inicial y se tiene directamente la disminución correspondiente a la precipitación y formación de la capa superficial.

Kokubo y colaboradores proponen en [15] que el mecanismo de formación de la capa bioactiva en una HA sinterizada a 800°C se produce de la siguiente manera. Al sumergir las muestras en SBF, la HA posee una carga negativa debido a los iones de OH^- y PO_4^{-3} que se encuentran en la superficie. Estos iones selectivamente se combinan con los iones Ca^{2+} que se encuentran en el fluido, para formar un fosfato de calcio rico en Ca. Cuando los iones de calcio se acumulan, la superficie adquiere una carga positiva, y entonces, puede combinarse con los iones de carga negativa de fosfato que se encuentran en el medio, se forma así un fosfato de calcio amorfo con una relación Ca/P baja. Esta es una fase metaestable y eventualmente se transforma en una apatita similar a la fase mineral del hueso. Un mecanismo similar podría ocurrir en el caso del cemento utilizado en el presente estudio.

El aumento en el peso y las variaciones en las concentraciones de los iones de calcio y fosforo de las muestras, durante la inmersión en SBF, establecen dos etapas de la interacción entre las muestras y el medio. Primero se da una rápida formación de la capa superficial de HA durante las primeras dos semanas; y luego, un ligero aumento del peso, probablemente debido a las precipitaciones que se continúan dando, aunque estas deben ser pequeñas ya que el espesor de la capa casi no varía (apreciación visual mediante imágenes de SEM).

5.2. Evaluación del comportamiento in vitro de un cemento de fosfato de calcio espumado para la fabricación de andamios para aplicaciones en ingeniería de tejidos

Después de evaluar la bioactividad del cemento de fosfato de calcio, en la primera parte del estudio, se buscó evaluar el comportamiento *in vitro* del mismo cemento al ser espumado con Tween. Para ello, como se mencionó anteriormente, se fabricaron cilindros de 6 mm de diámetro y 12 mm de largo del cemento espumado y sin espumar. En la figura 5.6 se puede ver (a) una muestra del cemento sin espumar y (b) una muestra del mismo cemento al ser espumado con un 0,5% en peso de Tween. Las muestras fabricadas con el cemento sin espumar serán denominadas "Referencia" y aquellas fabricadas con el cemento espumado con Tween serán denominadas "Tween". En esta segunda sección del capítulo de resultados y discusiones, se analizaran las diferencias observadas entre estos dos tipos de muestras mediante las técnicas de caracterización utilizadas.

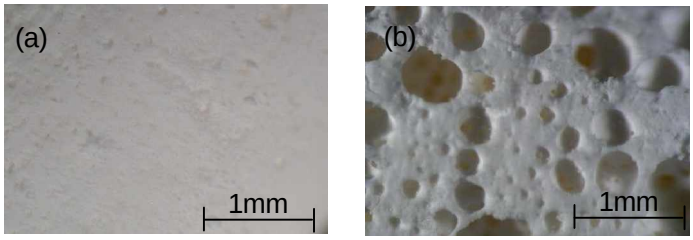

Fig. 5.6. Imagen (a) de una muestra del cemento sin espumar y (b) de una muestra del cemento espumado con un 0,5% en peso de Tween.

5.2.1. Estudio de los cambios morfológicos superficiales

En la Figura 5.7. se pueden apreciar las imágenes obtenidas por SEM de la superficie de muestras de Referencia y de las muestras de Tween, en el tiempo inicial, después de 9 semanas de inmersión en SBF y después de 9 semanas de inmersión en FBS.

En las imágenes correspondientes a las muestras al tiempo inicial se puede observar que la muestra de Referencia posee una superficie con algunos poros muy pequeños, inferiores a los 5 µm, pero que la superficie en general presenta un aspecto regular. En el caso de la imagen correspondiente a las muestras de Tween, la superficie presenta poros de distintos tamaños y algunos de ellos poseen un tamaño cercano a los 25 µm. En esta segunda muestra la porosidad es más importante en tamaño y en cantidad.

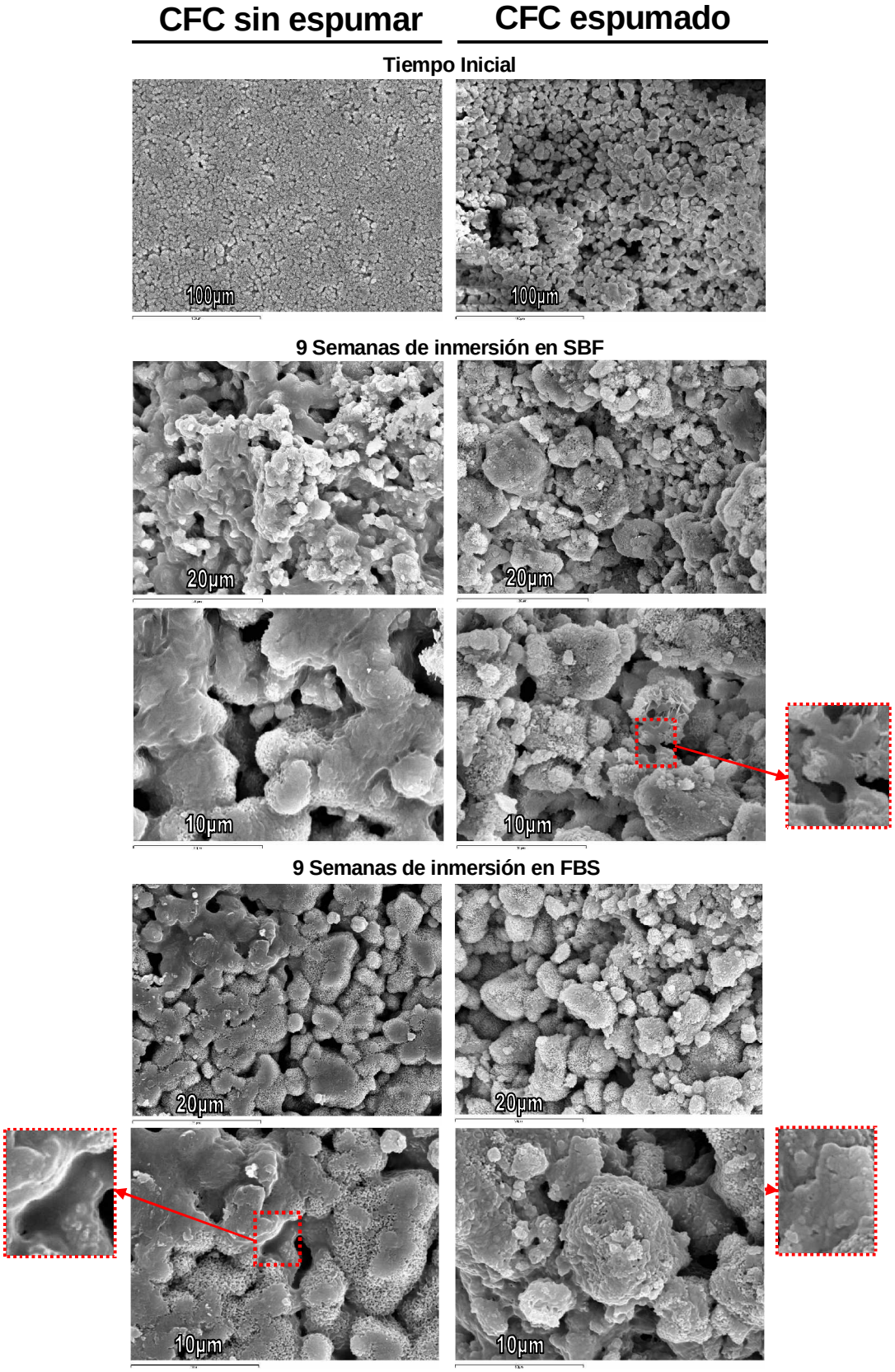

Fig. 5.7. Morfología de la superficie, obtenidas por microscopía electrónica de barrido, de muestras de cemento de fosfato de calcio sin espumar y de cemento espumado con un 0,5% en peso de Tween, al tiempo inicial, sumergidas durante 9 semanas en SBF y sumegidas durante 9 semanas en FBS.

Como fue mencionado anteriormente, la relación entre el líquido y el polvo (L/P) utilizada en la fabricación de las muestras de Referencia fue de 0,35; mientras que para las muestras de Tween se utilizó una relación de 0,65. A medida que el cemento fragua, el agua inicialmente presente va dejando espacios vacios en la estructura. Por tanto, una mayor cantidad de agua inicial, se traduce en una mayor porosidad. Estos poros generados por la diferencia en la relación L/P poseen un tamaño microscópico y pueden observarse en la imagen en el tiempo inicial de la muestra de Tween. Por otro lado, el espumado genera poros de tamaño macroscópicos, sin embargo, estos poros son observados solo a mayores aumentos, com es el caso de la imagen 5.6.b.

Al observar las imágenes correspondientes a las muestras de ambos cementos sumergidas durante 9 semanas en SBF se puede apreciar que los cristales de la muestra de Referencia están recubiertos. En el caso de la muestra de Tween, a mayores aumentos se puede notar que algunos cristales no están recubiertos. Al mismo tiempo, puede notarse la presencia de una sustancia amorfa que une algunos conglomerados del cemento. Haciendo una comparación entre las imágenes obtenidas con el mayor aumento para las muestras de Referencia y de Tween, se podría concluir que la formación de la capa superficial fue mayor en las primeras.

Por otro lado, comparando las imágenes de nueve semanas de inmersión en SBF de los discos, utilizados en la primera parte del estudio, y de los cilindros, ambos con el cemento sin espumar de Referencia, se puede notar claramente como la formación de capa fue mucho mayor en el caso de los discos. La causa más probable es que la relación entre el volumen de SBF utilizado y el área superficial de las muestras sumergidas fue del doble en el caso de los discos. Por tanto, la cantidad de iones de calcio y fosforo disponibles para la precipitación de HA fue menor para los cilindros. En ambos casos, las soluciones fueron renovadas semanalmente.

Al considerar las imágenes obtenidas de las muestras sumergidas en FBS durante 9 semanas, en la superficie de la muestra de Referencia no pueden observarse los cristales de apatita. Es probable que estos se encuentren recubiertos como en el caso anterior de la muestra del mismo cemento sumergida en SBF durante 9 semanas. Sin embargo, haciendo una comparación entre ambas imágenes, parece que la formación de la capa es menor en las muestras sumergidas en FBS. En la superficie de las muestras de Tween tampoco pueden verse los cristales, pero no puede concluirse directamente que exista una capa formada.

R. I. Martin y P. W. Brown [53] han expuesto, en un estudio realizado con muestras fabricadas a partir de una mezcla de dos fosfatos de calcio ($CaHPO_4$ y $Ca_4(PO_4)_2$) sumergidos en suero bovino, que la presencia de albumina en el suero puede causar la

inhibición de la formación de HAp. La albumina es una proteína con carga negativa y ha sido demostrado que es el principal inhibidor de la formación de HA *in vivo* [54]. Los autores manifiestan que el retraso en la formación de HA en suero podría deberse a la absorción de la albumina, por un lado, en la superficie de los reactivos y, por otro, en las superficies de los precipitados de HA en crecimiento. En el caso del presente estudio, las muestras estaban compuestas de HA desde el inicio, por lo tanto, es probable que el segundo factor sea el principal responsable de la inhibición en combinación con la formación de una capa proteica sobre la superficie de las muestras, afirmación también defendida por Martin y Brown.

5.2.2. Análisis de las fases presentes

La Figura 5.8. muestra los difractogramas del polvo obtenido de muestras de Referencia y de Tween en el tiempo inicial, después de 9 semanas de inmersión en SBF y después de 9 semanas de inmersión en FBS.

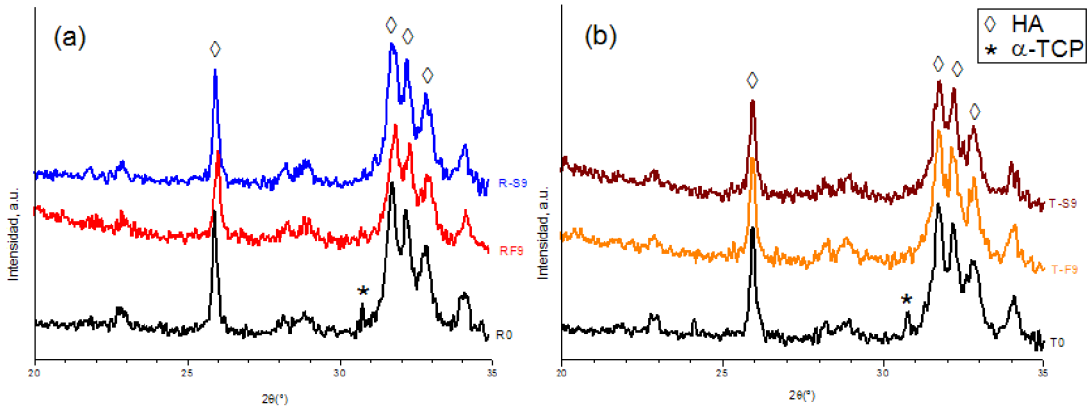

Fig. 5.8. Difractograma del polvo de muestras del cemento sin espumar de referencia (a) al tiempo inicial (R0), luego nueve semanas de inmersión en FBS (RF9), y luego de nueve semanas de inmersión en SBF (RS9); y de muestras del cemento espumado con Tween (b) al tiempo inicial (T0), luego de nueve semanas de inmersión en FBS TF9, y luego de nueve semanas de inmersión en SBF

En el tiempo inicial, se puede apreciar que en el caso de ambos cementos, de referencia (Fig. 5.8.a) y espumado (Fig. 5.8.b), la conversión del α-TCP en CDHA no fue del ciento por ciento en el tiempo inicial, ya que uno de los picos principales característicos del α-TCP (indicado en la figura) se encuentra presente en el difractograma. Este pico no posee una intensidad muy alta, pero aun así implica la existencia de una pequeña proporción de α-TCP. Después de nueve semanas de inmersión, el pico correspondiente al α-TCP, ya no se encuentra presente, y por tanto puede decirse que se alcanza un nivel de conversión del

100% o cercano al mismo. Esta situación se presenta en los difractogramas del cemento espumado y sin espumar sumergidos en SBF y en FBS.

Por otro lado, no se pueden apreciar cambios significativos en la cristalinidad de ambos cementos y en ambos medios de inmersión, como los observados luego de dos semanas de inmersión de los discos utilizados en la primera parte del estudio. En el caso de los discos, los difractogramas fueron realizados por medio de rayos x rasantes, con lo cual, los cambios generados en la superficie de las muestras, como la disminución en la cristalinidad, pueden notarse con mayor facilidad. Sin embargo, en el caso de los cilindros, no se pudo realizar este tipo de difractogramas de rayos x rasantes por causa de la gran rugosidad de las muestras de Tween. Entonces, los difractogramas fueron obtenidos por medio de rayos x convencionales y permitieron poner en evidencia que no se produjeron cambios en las fases presentes después del espumado del cemento, así como después del periodo de inmersión de ambos cementos en ambos medios.

5.2.3. Distribución del tamaño de interconexión entre los poros

Como resultado de los ensayos de porosimetría de mercurio se obtuvieron las curvas de la distribución del diámetro de entrada de los poros o interconexiones de las muestras de Referencia y de las muestras de Tween en el tiempo inicial, después de nueve semanas de inmersión en SBF y después de nueve semanas de inmersión en FBS. El tamaño de las interconexiones está directamente relacionado con el tamaño de los poros, y se considera que los poros poseen un tamaño al menos igual que las interconecciones. En las curvas obtenidas pueden observarse tres rangos de tamaño de interconexiones de poros. Por un lado, se observan interconexiones de poros de tamaño nanométrico (menores a 0,01 µm), que se consideran resultado de la porosidad intrínseca de los cristales de HA. Luego, se observan interconexiones de poros de tamaño micrométrico (mayores que 0,01 µm y menores que 10 µm) que se consideran el resultado del efecto de la relación L/P utilizada en la preparación del cemento. Y, por último, se pueden ver unas interconexiones de tamaño macrométrico (mayores a 10 µm), que se consideran resultantes del espumado del cemento. En la figura 5.9. se muestra un esquema de estos tres tipos de porosidad.

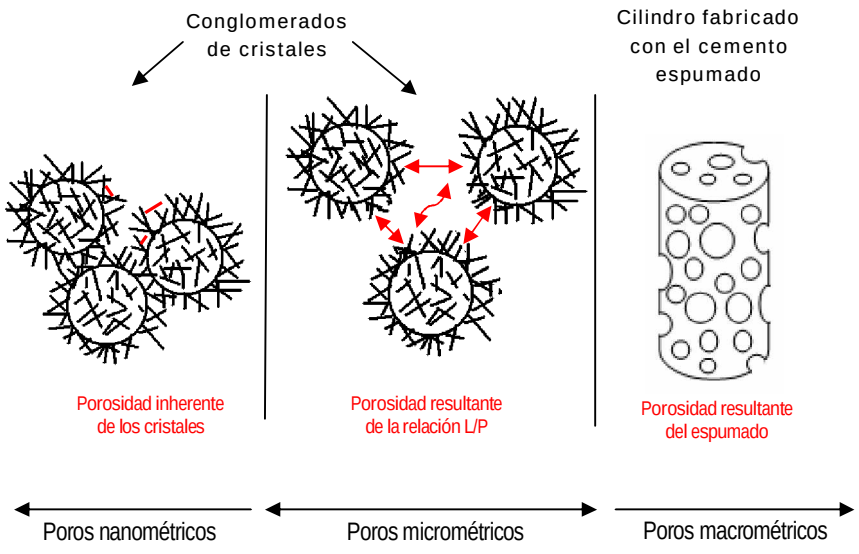

Fig. 5.9. Esquema de los tres tipos de porosidad existentes en las muestras de Tween.

En los resultados de la distribución del tamaño de entrada de poros de las muestras en el tiempo inicial (Fig. 5.10. a) se puede apreciar que las muestras de Referencia poseen un porcentaje bajo de porosidad total, igual a 36%. En estas muestras, las interconexiones de los poros de tamaño nanométrico poseen un diámetro medio de alrededor de los 0,016 µm y las interconexiones de tamaño micrométrico poseen un diámetro medio de 0,6 µm. En el caso de las muestras de Tween, se puede observar un porcentaje de porosidad total del 62,2%, de los cuales un 22,35% son considerados como interconexiones macrométricas (mayores a 10 µm). En estas muestras, se presenta un tamaño de interconexiones nanométricas de alrededor de 0,06 µm, ligeramente superior al observado en las muestras de Referencia. Esto podría indicar un tamaño mayor de los cristales, o bien la existencia de alguna sustancia que cubra, en una pequeña proporción, los cristales. De acuerdo a los resultados obtenidos mediante los difractogramas de rayos x, la cristalinidad de ambos tipos de muestras parece ser igual, y por ende, la adición del Tween podría causar esta pequeña variación en los valores de las interconexiones nanométricas. Por otro lado, en el caso de las interconexiones de tamaño micrométrico, puede notarse claramente el efecto de la relación L/P utilizada en la fabricación de estas muestras. Se produce un incremento en el diámetro medio de estas interconexiones hasta un valor de alrededor de 2 µm y, a la vez, un gran aumento en la proporción de este tipo de porosidad que va desde alrededor de 9% en el caso de las muestras de Referencia, hasta un valor cercano a 30% en las muestras de Tween. Seguidamente, puede observarse el efecto del espumado del cemento por medio de la presencia de interconexiones macrométricas con un tamaño de diámetro de entrada que va desde 50 µm hasta 500 µm aproximadamente. Todo esto, genera un incremento

importante en el porcentaje de porosidad total de las muestras de Tween, y al compararlas con las muestras de Referencia, este aumento va desde un valor de 36% hasta un valor de 62,2%.

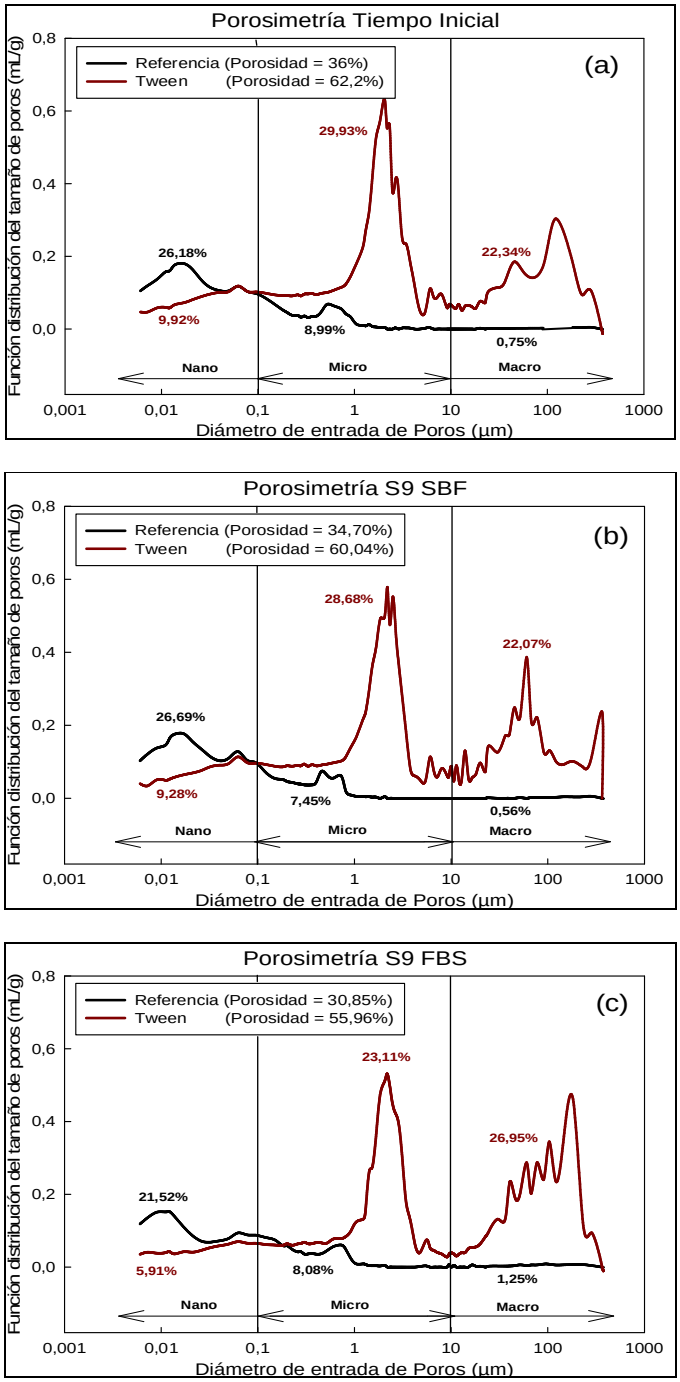

Fig. 5.10. Distribución del diámetro de entrada de poros de muestras del cemento sin espumar de referencia y del cemento espumado con tween en (a) el tiempo inicial, (b) después de nueve semanas de inmersión en SBF, y (c) después de nueve semanas de inmersión en FBS.

Al observar los resultados de las muestras de ambos cementos sumergidas en SBF durante nueve semanas (Fig. 5.10. b) puede notarse que las curvas poseen formas muy similares a aquellas obtenidas en el tiempo inicial. Las modas de los diámetros de entrada de poros se mantienen relativamente constantes. Tampoco se observan cambios en la distribución del tamaño de interconectividad, es decir, los porcentajes correspondientes a las zonas de tamaño macro, micro y nanométrico no presentan grandes variaciones. No obstante, el porcentaje de porosidad total presenta una ligera disminución en los dos cementos. Esta disminución se da principalmente en las interconexiones de tamaño micrométrico en ambos casos. Si se diera la formación de la capa bioactiva de HA precipitada, se esperaría que algunos de los poros de tamaño micro y nanométrico se cierren por causa del material depositado en los mismos. Ishikawa y colaboradores exponen en el estudio mencionado anteriormente [50] que la capa precipitada sobre la superficie del cemento de fosfato de calcio posee una densidad mayor y porosidad menor que el material de partida. En el presente caso la disminución observada es muy pequeña, y por tanto, si existiera formación de capa bioactiva en la superficie de las muestras, esta sería muy escasa. Sin embargo, la variación en el porcentaje de porosidad total es mayor para las muestras del cemento espumado, y de acuerdo, con las imágenes obtenidas por SEM, los cristales están más expuestos y la formación de capa parece ser menor en este cemento. Por lo tanto, esta disminución en los valores del porcentaje de porosidad total no puede ser directamente atribuida al material que pudo precipitar del medio.

Evaluando los resultados obtenidos con las muestras sumergidas en FBS durante nueve semanas (Fig. 5.10. c), se puede apreciar que las curvas presentan la misma forma que en el caso del tiempo inicial y del SBF. Sin embargo, se observa una disminución en el porcentaje de porosidad total de los cementos que llega hasta 30,85% en el caso de las muestras de Referencia y hasta 55,96% en el caso de las muestras de Tween. Al mismo tiempo, se presenta una reducción en la proporción de interconexión de tamaño micro y nanométrico (Fig. 5.11.). Considerando que no existen evidencias claras de la precipitación de HA en este medio, de acuerdo a las imágenes obtenidas por SEM, otra parece ser la causa de este fenómeno. Una posible explicación podría ser el cierre de ciertos poros pequeños por la absorción de componentes orgánicos. De las proteínas que se sabe están presentes en el FBS (tabla 3.3.), la Inmunoglobulina G es la más grande y su dimensión mayor es de alrededor de 4 nm. Por tanto, cualquiera de estos componentes orgánicos podría adsorberse y acumularse sobre las muestras, generando esta reducción. Como puede observarse, la reducción es mayor en el caso del cemento espumado. Este es un resultado esperado, debido a que este cemento posee una mayor permeabilidad, como puede verse claramente en las imágenes obtenidas por SEM al tiempo inicial.

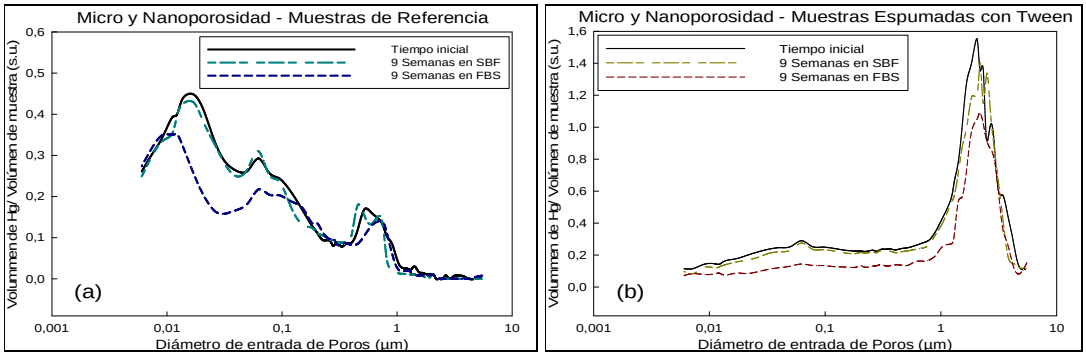

Fig. 5.11. Relación entre el volumen de Hg utilizado y el volumen de muestra en función del diámetro de entrada de poros para (a) el cemento de referencia y (b) el cemento espumado con Tween.

5.2.4. Determinación de la superficie específica

Los resultados de la superficie específica de las muestras de ambos cementos obtenidos mediante la técnica de caracterización BET, son presentados en la figura 5.12.

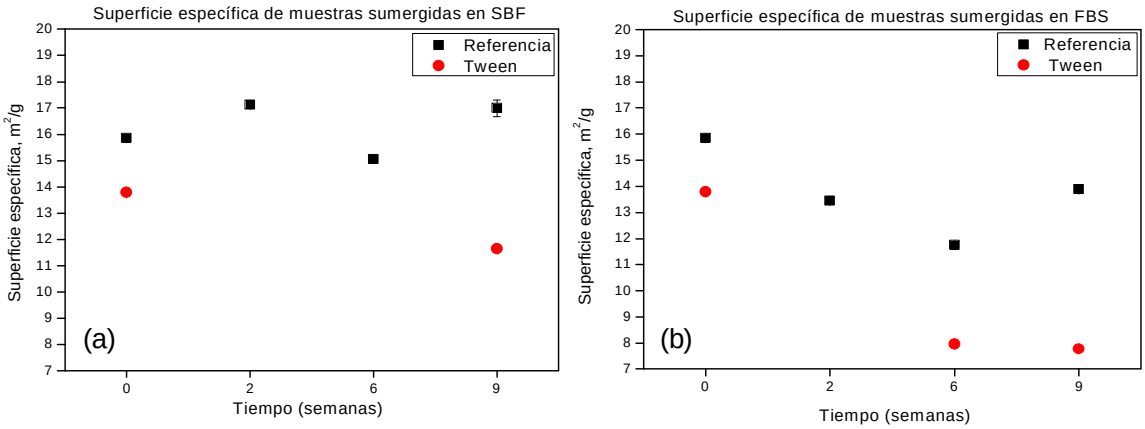

Fig. 5.12. Valores de la superficie específica de las muestras del cemento sin espumar de referencia y del cemento espumado con Tween inmersas en (a) SBF y (b) FBS; durante 2, 6 y 9 semanas.

En los resultados del tiempo inicial o semana 0, puede verse que existe una diferencia en los valores de la superficie específica de ambos cementos. En el caso del cemento espumado se tiene un valor inferior. Esto concuerda con las observaciones realizadas con las interconexiones de poros de tamaño nanométrico en las que se ve un aumento del tamaño en las muestras del Tween. Como se expuso anteriormente, la causa de esto podría ser que

los cristales posean un mayor tamaño en las muestras de Tween, o que los mismos se encuentren recubiertos por alguna sustancia, y en este caso, esta sustancia podría tratarse del Tween añadido al cemento. En este sentido, puede decirse que la presencia del Tween influye en los valores de la superficie específica.

Los resultados de BET de las muestras sumergidas en SBF se muestran en la Fig. 5.12.a. Si existiera formación de la capa observada en los discos utilizados en la primera parte del estudio, se tendría que presentar un aumento en los valores de la densidad específica. Ya que como se expuso en el apartado 5.1.2, la capa formada posee una cristalinidad inferior al resto del material. Entonces, al contarse con una cristalinidad inferior, los cristales poseen un menor tamaño, lo que implica una mayor superficie específica (Fig. 5.13.). En el caso del presente estudio, los valores de la superficie específica de las muestras sumergidas en SBF se mantienen constantes. En el caso de las muestras de Referencia, esta situación puede verse claramente, pero para las muestras de Tween solo pudieron obtenerse dos valores (al tiempo inicial y a la semana nueve). Estos valores del Tween parecen también mantenerse constantes. Por tanto, los resultados avalan la afirmación de que en los cilindros sumergidos en SBF la formación de capa fue nula o muy escasa, ya que no se presenta el aumento esperado en los valores de la superficie específica de las muestras.

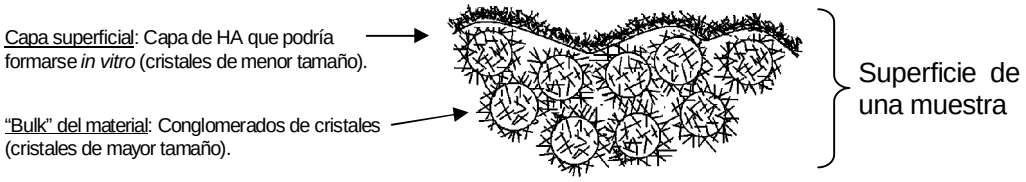

Fig. 5.13. Esquema de la superficie de una muestra, en el que puede verse la diferencia en la cristalinidad existente entre la capa bioactiva y el resto del material, y su posible efecto en los valores de la superficie específica.

Al observar los valores obtenidos de las muestras sumergidas en FBS (Fig. 5.12.b), se observa una tendencia a disminuir en los dos cementos. En el caso de las muestras de Referencia, esta disminución es leve y va aproximadamente desde un valor de 16 m²/g hasta un valor de 14 m²/g. Por otro lado, para las muestras de Tween, la disminución es mayor y va desde un valor cercano a 14 m²/g hasta un valor cercano a los 8m²/g. Esta disminución puede explicarse por medio de la adsorción de proteínas en las muestras. Como en el caso de los resultados de porosimetría, parece haber una mayor adsorción en las muestras del cemento espumado. Esto es debido a la mayor permeabilidad de las muestras del cemento

espumado, como fue expuesto anteriormente. La adsorción de proteínas podría generar esta disminución en los valores de la superficie específica, porque al contrario de lo que ocurre cuando se forma capa bioactiva, en el caso de las proteínas, se reduce el área total expuesta, ya que estas no son cristalinas.

5.2.5. Determinación de la densidad esquelética

Los valores de la densidad esquelética (Fig. 5.14.), obtenidos por medio de la picnometría de helio, en el tiempo inicial muestran que, al parecer, ni el espumado ni la diferencia existente en la relación L/P parecen afectar de manera significativa a la densidad esquelética de las muestras.

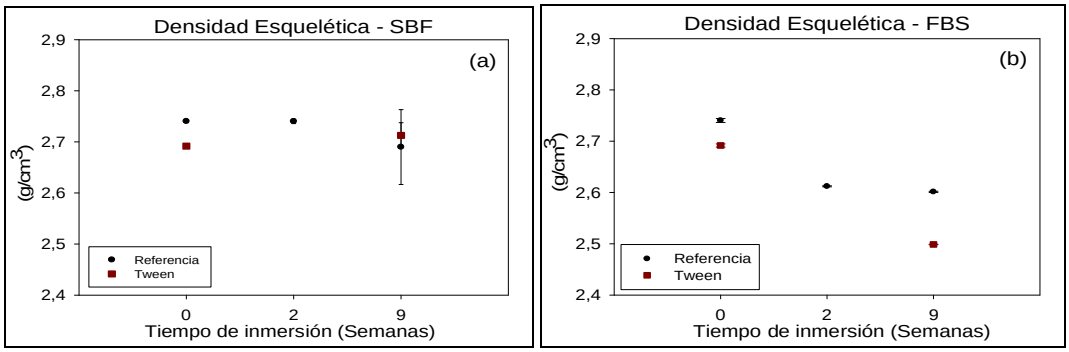

Fig. 5.14. Valores de la densidad esquelética obtenidos por medio de picnometría de helio de (a) muestras del cemento sin espumar de Referencia y del cemento espumado con Tween sumergidas en SBF, y (b) de muestras con la misma composición sumergidas en FBS.

Los valores de las muestras sumergidas en SBF (Fig. 5.14. a) se mantienen constantes en ambos cementos. Si existiera formación de capa superficial precipitada del medio, no se generarían cambios en los valores de la densidad esquelética, debido a que la capa estaría compuesta por el mismo material que el resto del volumen. Ishikawa y colaboradores han obtenido resultados en el estudio mencionado anteriormente [50] que muestran que los precipitados de HA poseen una densidad aparente mayor que el material del volumen inicial y exponen resultados en los que se muestran como dicha capa genera un aumento en los valores de la densidad absoluta de las muestras. En el caso del presente estudio, también fueron determinados los valores de la densidad aparente (Fig. 5.15.), por medio de la porosimetría de mercurio, y se pudo aprecia que se mantuvieron constantes. Con lo cual, si existió formación de capa superficial, esta debió ser muy escasa y no generó cambios apreciables en los valores de la densidad aparente de las muestras.

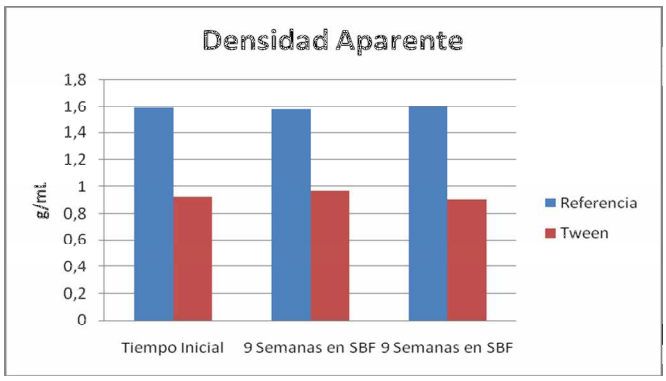

Fig. 5.15. Valores de la densidad aparente de muestras de Referencia y de Tween en el tiempo inicial, después de 9 semanas de inmersión en SBF y después de 9 semanas de inmersión en FBS.

Al mismo tiempo, cabe destacar que la relación entre el volumen del medio y el área de las muestras sumergidas en este estudio fue exactamente la mitad que aquella utilizada por Ishikawa y colaboradores y, por tanto, algunos efectos de la inmersión en SBF podrían ser atenuados. En comparación con los resultados obtenidos con los discos y cilindros, como por ejemplo, las imágenes obtenidas por SEM, se vió que la cantidad de volumen de SBF por muestra influye en gran medida en la formación de la capa bioactiva en la superficie de las muestras.

Por otro lado, los valores de las densidades esqueléticas obtenidas para las muestras sumergidas en FBS (Fig. 5.14. b) presentan un descenso en ambas composiciones. Considerando el cemento sin espumar, puede percibirse un descenso desde un valor de 2,74 g/cm^3, al tiempo inicial, hasta un valor de 2,6 g/cm^3, después de nueve semanas de inmersión. En el caso del cemento espumado con Tween el descenso es mayor y va desde 2,7 g/cm^3 hasta 2,5 g/cm^3. Esto podría explicarse mediante el cierre de poros por causa de la adsorción y por la acumulación de proteínas del FBS sobre la superficie de las muestras, citado anteriormente. En el caso de que esto fuera cierto, se daría un aumento en el volumen medido por el picnómetro y, por ende, un valor más bajo de la densidad esquelética. Igualmente, se puede apreciar que la disminución en los valores de la densidad esquelética es mayor en las muestras del cemento espumado, como se vio con los resultados de la porosimetría de mercurio y BET, lo que confirma una mayor adsorción de proteínas a causa de una mayor permeabilidad de estas muestras.

5.2.6. Determinación de la concentración iónica del medio

A continuación se muestran los valores de la concentración de iones del medio obtenidos por medio de ICP en función del tiempo de inmersión. La razón por la cual las concentraciones iniciales de Ca son inferiores a 2,5 mM fue explicada en la sección 5.1.5.

La figura 5.16. muestra los resultados obtenidos con el SBF. En el caso del SBF en el cual se sumergieron las muestras del cemento de Referencia (Fig. 5.16. a) se puede observar una variación similar de la concentración de calcio y fósforo. Esta variación presenta la misma tendencia observada en la primera parte del estudio, en la cual se tuvo una disminución de los dos tipos de iones en la semana 2. Como fue expuesto anteriormente (apartado 5.1.5.), la disminución inicial en la concentración de los iones está relacionada con la precipitación de la CDHA. Este es el primer resultado dentro del conjunto de los distintos ensayos correspondientes a los cilindros, expuestos hasta este punto, que apoya directamente la formación de capa superficial. Ya que si existe precipitación de HA a partir del medio, estos precipitados se depositarían sobre la superficie de los cilindros formando la capa bioactiva.

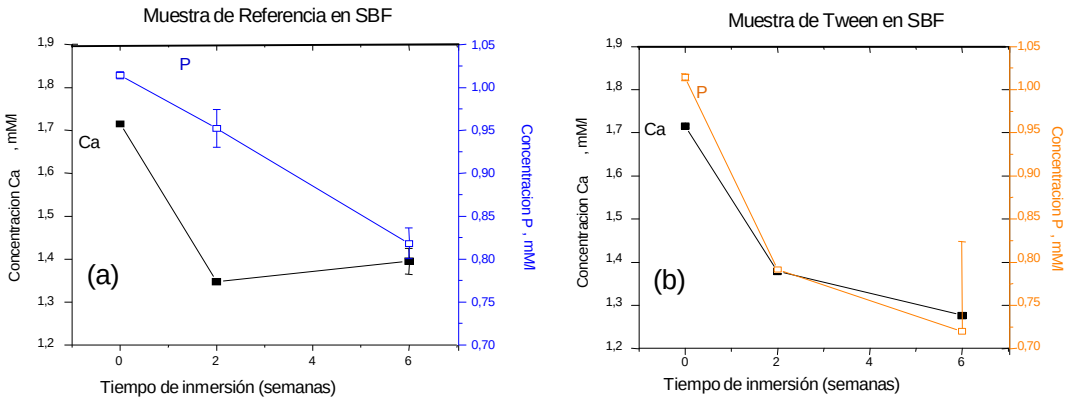

Fig. 5.16. Medición de la concentración de iones de Ca y P de (a) las muestras del cemento sin espumar de Referencia y (b) de las muestras del cemento espumado con Tween en función del tiempo de inmersión en SBF.

Si se comparan los resultados obtenidos con los cilindros y discos del cementos de Referencia, se puede notar como la disminución de la concentración es mayor en el caso de los cilindros. Al tiempo inicial, las concentraciones de Ca y P son iguales en ambos casos. Sin embargo, al observar los valores después de seis semanas de inmersión, la concentración de Ca baja hasta alrededor de 1,68 mM/l y del P hasta 0,89 mM/l en el caso de los discos; y en el caso de los cilindros, la concentración del Ca baja hasta alrededor de 1,36 mM/l y del P hasta alrededor de 0,82 mM/l. La causa de esta mayor disminución observada en el caso de los cilindros, puede ser que la relación entre el volumen del SBF

utilizado y el área superficial de las muestras, como se mencionó anteriormente, fue más del doble con los discos frente a los cilindros. Entonces, los cilindros poseían menos cantidad de Ca y P que pueda precipitar, lo que se traduce en una mayor disminución en la concentración. Como fue mencionado en la discusión de la primera parte del estudio, según Kokubo y colaboradores en [15], el paso inicial en la formación de la capa bioactiva en una HA sumergida en SBF se da por medio de la interacción inicial entre los iones de OH^- y PO_4^{-3} que se encuentran en la superficie y los iones Ca^{2+} que se encuentran en el fluido. Por tanto, si se considera que por un lado la concentración inicial de Ca del SBF utilizado fue de 1,8 mM en lugar de 2,5 mM, y que el volumen de SBF utilizado también fue inferior, es posible que la formación de la capa bioactiva se haya quedado en algún punto intermedio entre la acumulación de los iones de calcio en la superficie y la formación de la fase metaestable que se da cuando la superficie comienza a adquirir una carga positiva.

En el caso del SBF utilizado con las muestras de Tween se puede ver un comportamiento similar, y por tanto podría estimarse que no posee una influencia representativa en la variación de la concentración de estos dos tipos de iones.

Por otro lado, los valores obtenidos con el FBS (Fig. 5.17.) muestran un nivel de concentraciones bastante más elevado que en el caso anterior del SBF. Además, la variación parece ser aleatoria y el comportamiento anteriormente observado y explicado por medio de la precipitación de la CDHA parece no aplicarse. Una posible causa de estos resultados puede ser la diferencia en los componentes de ambos medios. Esta diferencia consiste principalmente en las proteínas presentes en el FBS y, entonces, podría decirse que los resultados obtenidos por medio del ICP se ven alterados por estos elementos.

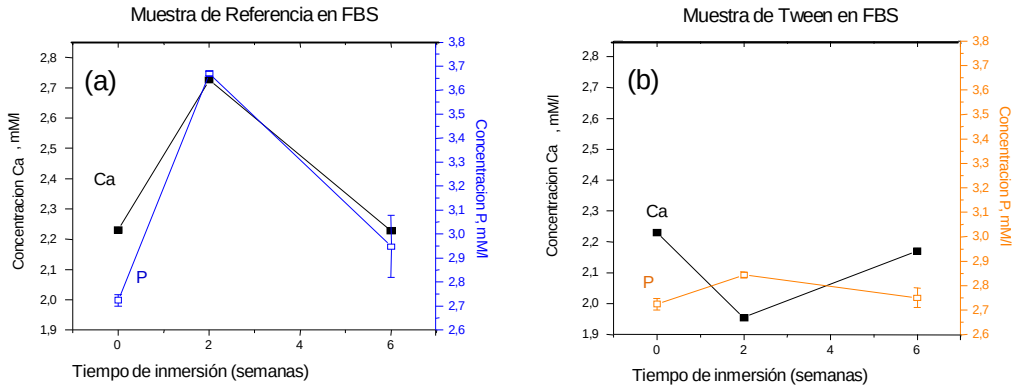

Fig. 5.17. Medición de la concentración de iones de Ca y P de (a) las muestras del cemento sin espumar de Referencia y (b) de las muestras del cemento espumado con Tween en función del tiempo de inmersión en FBS.

5.2.7. Control de la variación del peso

Los resultados del control del peso de las muestras del cemento de Referencia sumergidas durante 9 semanas en SBF y en FBS se muestran en la Fig. 5.18. El tiempo cero, como en el caso de los discos, corresponde a 24 horas de inmersión de las muestras en el medio correspondiente. En la figura 5.18.a, puede verse un comportamiento similar al de los discos, con un aumento en el peso para las muestras de Referencia sumergidas en SBF. En este caso, dicho aumento es un poco menor. Como se expuso anteriormente, la causa del aumento podría ser la presencia de algún material depositado sobre la superficie de las muestras, aunque en el caso de los cilindros, no existen muchas evidencias de que esto sea lo que realmente ocurre. Otra causa podría ser la absorción de agua por parte de las muestras. Con relación a las muestras de Referencia sumergidas en FBS (Fig. 5.18.b), también se observa un aumento y en el caso de que la causa no fuera un material depositado sobre la superficie de las muestras, esto podría explicarse por medio de la adsorción de proteínas.

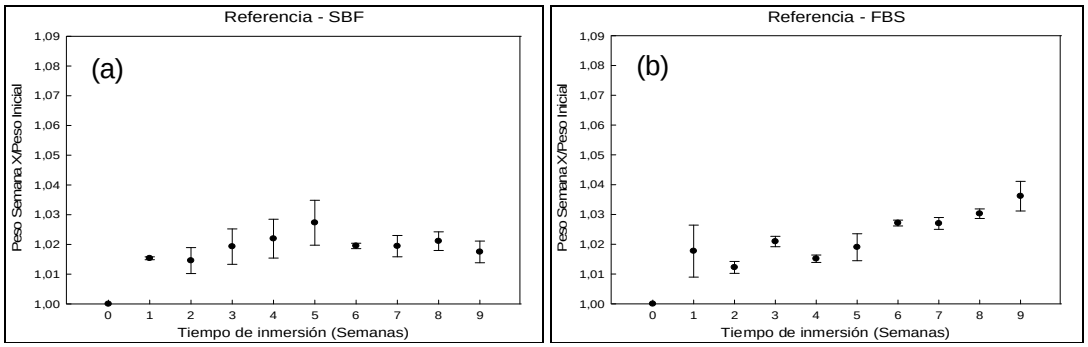

Fig. 5.18. Control del peso de las muestras del cemento de Referencia en función del tiempo de inmersión en (a) SBF y (b) FBS.

En la figura 6.19. se muestran los valores de la variación del peso de las muestras de Tween sumergidas en (a) SBF y (b) FBS. En las mismas gráficas, se volvieron a incluir los valores obtenidos con las muestras de Referencia, a fin de comparar ambos resultados. De este manera, puede notarse que las variaciones observadas en la figura 5.18. en el peso de las muestras de Referencia posee magnitudes prácticamente inapreciables, al ser comparadas con las variaciones que se presentan con las muestras de Tween. En el caso del SBF (Fig. 5.19. a), se puede notar que el peso de las muestras de Tween tiende a disminuir, alcanzando los 2,5% de pérdida en la última semana. En este sentido, puede agregarse que al realizar el cambio de la solución en cada semana, fue constatada la presencia de trozos

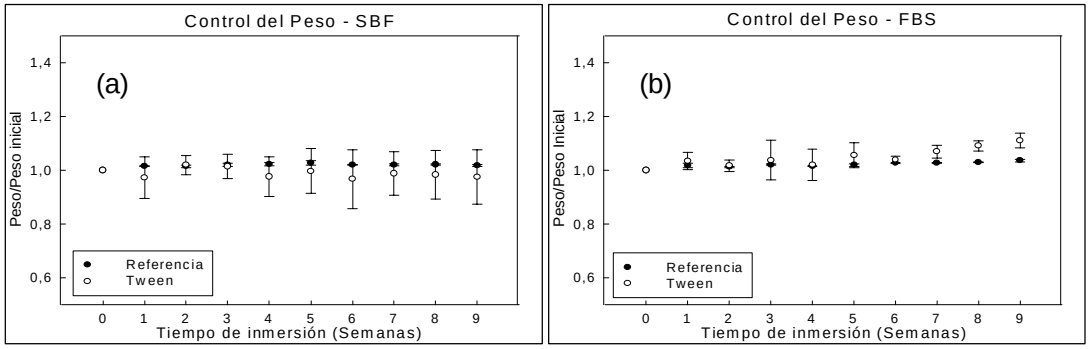

Fig. 5.19. Comparación de la variación del peso entre las muestras (a) del cemento de Referencia y del cemento espumado con Tween en función del tiempo de inmersión en SBF; y entre (b) las muestras del cemento de Referencia y del cemento espumado con Tween en función del tiempo de inmersión en FBS.

de los cilindros del cemento espumado en los recipientes que contenían las muestras. Esta situación se repitió a lo largo de todo el periodo de inmersión de las muestras, con variaciones en la cantidad de material perdido. En algunas ocasiones no se observaron trozos del material, pero esto no fue lo más frecuente. A partir de este hecho puede explicarse la disminución de los valores del peso. En el caso de las muestras del cemento sin espumar de Referencia, la situación más frecuente fue la ausencia de trozos del material, con muy pocas excepciones y cuya posible causa sea la manipulación misma de las muestras.

Al considerar los valores obtenidos de las muestras del cemento espumado con Tween sumergidas en FBS (Fig. 5.19. b) puede verse una situación opuesta a aquella presentada con el SBF. En este caso se tiene un incremento en el peso. En los recipientes que contenían las muestras del cemento espumado sumergidas en FBS también fueron encontrados trozos del material al realizar las mediciones y el cambio de la solución, como en el caso mencionado anteriormente del SBF. Sin embargo, estos trozos fueron más difíciles de distinguir, porque el FBS se volvía turbio conforme transcurría el tiempo de inmersión de las muestras destinadas al control del peso. La razón es que las muestras destinadas al control del peso no fueron conservadas en condiciones estériles, como las demás muestras destinadas a otros ensayos, porque se requería un uso frecuente y un fácil acceso a las mismas en cada semana. El aumento en el peso de estas muestras podría explicarse también por medio de la absorción de ciertas proteínas presentes en el FBS. Como fue explicado anteriormente, dicha absorción sería mayor en la muestras del cemento espumado debido a la mayor permeabilidad de las mismas. Esta situación es reflejada en los valores obtenidos.

Por otro lado, como fue mencionado, otra de las posibles causas del aumento en el peso de las muestras podría ser la absorción de agua por el material. Por este motivo, las muestras fueron sumergidas durante 24 horas en el medio de inmersión respectivo, suponiéndose que luego de este periodo las muestras ya estarían saturadas de agua. Para verificar que esta hipótesis era correcta, se realizo un estudio de 4 semanas de inmersión de las muestras de los dos cementos, espumado y sin espumar, en agua destilada (Fig. 5.20.). En este medio, no se forma ningún precipitado de CDHA en la superficie de las muestras, ya que el mismo no posee calcio ni fosforo y no puede sobresaturarse de ellos mismos. En este medio tampoco se encuentran las proteínas presentes en el FBS, que podrían influir en la variación del peso. Entonces un análisis del comportamiento de las muestras de los dos cementos sumergidas en agua destilada permite determinar el valor real de la pérdida del peso por los trozos que se van desprendiendo. Los resultados revelan como nuevamente las muestras del cemento sin espumar de Referencia se mantienen muy próximas al valor inicial. Por otro lado, las muestras del cemento espumado con Tween pierden peso como en el caso del SBF. Sin embargo, esta pérdida es mucho más acentuada y se llega hasta un 10% en tan solo cuatro semanas. Este resultado permite suponer que en el caso anterior del SBF, la pérdida de peso por causa del desprendimiento de trozos del material se vio aminorada, tal vez por el inicio de la formación de precipitados de CDHA y que los aumentos observados en el peso de las muestras no fue causado por la absorción de agua.

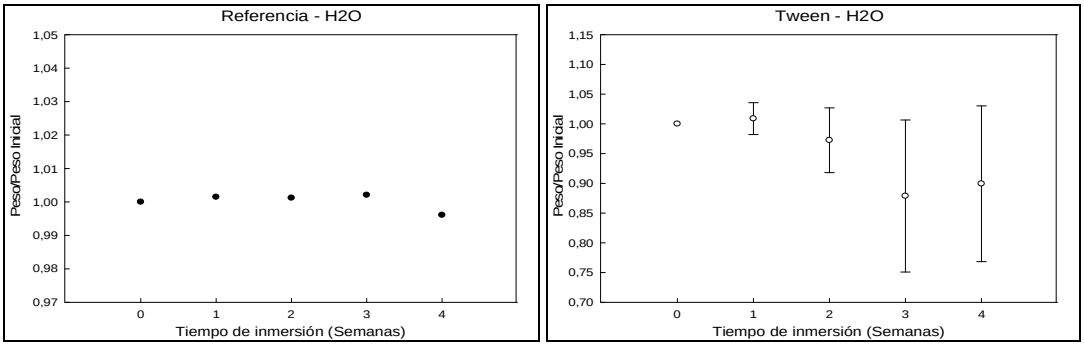

Fig. 5.20. Control del peso de muestras del cemento de Referencia y del cemento espumado con Tween en función del tiempo de inmersión en agua destilada.

5.2.8. Evaluación de la resistencia mecánica

Según los resultados obtenidos mediante los ensayos de compresión de las muestras del cemento de Referencia sumergidas en SBF (Fig. 5.21. a) y en FBS (Fig. 5.21. b) se observa que no existe un cambio importante en el comportamiento mecánico de las muestras y los valores se mantienen cercanos a los 30 MPa. Por tanto, puede afirmarse que el material no sufre de una degradación durante el periódo de inmersión.

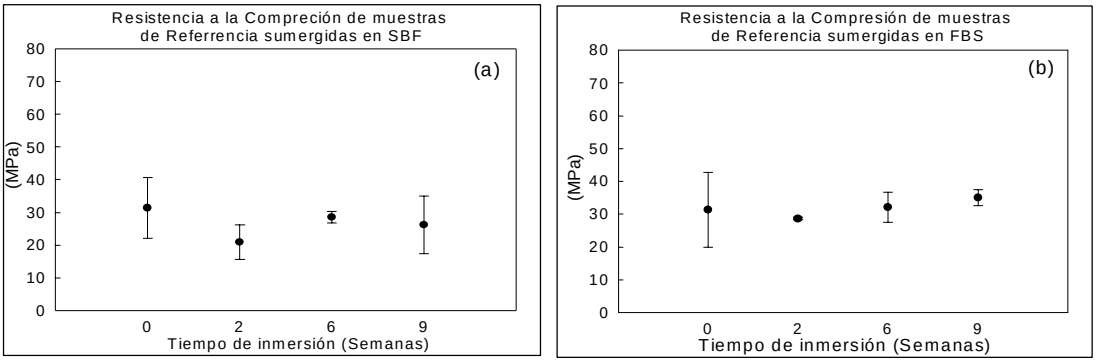

Fig. 5.21. Control de la variación en el peso de las muestras del cemento sin espumar de Referencia sumergidas en (a) SBF y (b) FBS.

Los resultados son muy similares en ambos medios y, al parecer, la resistencia mecánica no se ve influenciada por la diferencia existente entre el SBF y el FBS.

Por otro lado, las muestras de Tween demostraron una cohesión muy baja después de sumergirlas en los medios, a diferencia de las muestras de Referencia. Por este motivo se decidió no realizar ensayos de compresión de estas muestras, ya que no contaron con una superficie adecuadamente lisa ni con una integridad estructural que permitan realizar el ensayo. No obstante, se estima que la resistencia a compresión de estas muestras se encuentra alrededor los 5 MPa.

Por último, cabe destacar que se notó una mejora aparente en la cohesión de las muestras conforme el tiempo de inmersión era mayor, ya que al ser manipuladas para los distintos ensayos o cambios de medio, en las primera semanas se perdía un poco del material al manipular las muestras y esto fue disminuyendo en las últimas semanas.

Conclusiones

- Después de doce semanas de inmersión de los discos en SBF, existe una capa superficial formada por un material precipitado del medio. Esta capa formada estaba compuesta por hidroxiapatita de una cristalinidad inferior que el resto del material y probablemente sea la capa que se forma *in vivo* en materiales bioactivos, permitiendo el enlace directo con el hueso.

- Los mayores cambios en la superficie de las muestras del cemento sin espumar se presentan durante las primeras dos semanas de inmersión en SBF.

- No se observaron diferencias significativas entre el comportamiento del cemento espumado y sin espumar. Por lo tanto, no existió evidencia de que la propiedad bioactiva del material sea afectada por el espumado.

- No se observó la formación de capa bioactiva en los cilindros sumergidos en SBF y utilizados en la segunda parte del estudio, como en el caso de los discos utilizados en la primera parte. Este se atribuye a la relación entre el volumen del SBF utilizado y el área superficial de las muestras. Por tanto, puede concluirse que este es un factor determinante en la formación de la capa bioactiva.

- El espumado del cemento de fosfato de calcio utilizando un 0,5% en peso de Tween, permite la obtención de una estructura macroporosa. De igual manera, un amento en la relación L/P del cemento, permite lograr un incremento en el tamaño de los poros de tamaño micrométrico.

- El aumento en el peso observado en las muestras sumergidas en SBF y en FBS, parece no ser causado por la absorción de agua. En el caso de las muestras sumergidas en SBF, el aumento podría estar dado por el material depositado sobre ellas; y en el caso de las muestras sumergidas en FBS, la causa principal podría ser la adsorción de proteínas.

- El protocolo de preparación del SBF debe ser modificado y se deben secar los reactivos antes de ser utilizados, a fin de quitar la humedad contenida en los polvos a ser pesados.

- Por último puede agregarse que la integridad estructural de las muestras del cemento espumado, con las características utilizadas en el presente estudio, resulta pobre para ser utilizadas en la fabricación de andamios para la ingeniería de tejidos. Una posible solución para esto sería la modificación de la relación L/P utilizada o del protocolo de molienda. Estos resultados deberán ser determinados en futuros estudios.

Bibliografia

[1] F. OREFFO, R. ROSE. «Bone Tissue Engineering: Hope vs Hype.» *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2002: 292: 1-7.

[2] H. SHIN, S. JO, A. G. MIKOS. «Biomimetic materials for tissue engineering.» *Biomaterials*, 2003: 24: 4353-4364.

[3] Carnegie Mellon University. *Bone Tissue Engineering Center.* http://www.btec.cmu.edu/reFramed/tutorial/mainLayoutTutorial.html (acceso el 06-04-2007).

[4] A. S. MISTRY, A. G. MIKOS (2005). Tissue Engineering Strategies for Bone Regeneration. *Adv. Biochem Engin/Biotechnol* , 94: 1-22.

[5] G. N. BANCROFT, A. G. MIKOS (2001). Bone tissue engineering by cell transplantation. *Tissue engineering for terapeutic use 5 (Proceedings of the 5th International Symposium on Tissue Engineering for Therapeutic Use, Tsukuba, 16-17 November 2000 , ICS 1222)*, 5: 151.

[6] J. S. TEMENOFF, A. G. MIKOS. «Injectable biodegradable materials for orthopaedic tissue engineering.» *Biomaterials*, 2000: 21: 2405-2412.

[7] S. P. BRUDER, A. I. CAPLAN. «Bone regeneration through cellular engineering.» En *Principles of Tissue Engineering*, de R. LANGER, J. VACANTI R. P. LANZA, 683. San Diego: Academic Press, 2000.

[8] S. E. HAYNESWORTH, J. GOSHIMA, V. M. GOLDBERG, A. L. CAPLAN. «Characterization of cells with osteogenic potential from human marrow.» *Bone*, 1992: 13: 81-88.

[9] V.I. SIKAVITSAS, G.N. BANCROFT y A.G. MIKOS. «Formation of Three-Dimensional Cell/Polymer Constructs for Bone Tissue Engineering in a Spinner Flask and a Rotating Wall Vessel Bioreactor.» *J. Biomed. Mater. Res.*, 2002: 62: 136-148 .

[10] G.N. BANCROFT, V.I. SIKAVITSAS y A.G. MIKOS. «Design of a Flow Perfusion Bioreactor System for Bone Tissue-Engineering Applications.» *Tissue Eng.*, 2003: 9: 549-554.

[11] G. N. BANCROFT, V. I. SIKAVITSAS, J.van den Dolder, T. L. SHEFFIELD, C. G. AMBROSE, J. A. JANSEN y A. G. Mikos. «Fluid flow increases mineralized matrix deposition in 3D perfusion culture of marrow stromal osteoblasts in a dose-dependent manner.» *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2002: 99: 12600-12605.

[12] J.S. BLUM, M.A. BARRY y A.G. MIKOS. «Bone Regeneration through Transplantation of Genetically Modified Cells.» *Clin. Plast. Surg.*, 2003: 30: 611-620.

[13] B. D. BOYAN, T. W. HUMMERT, D. D. DEAN, Z. SCHWARTZ. «Role of material surfaces in regulating bone and cell response.» *Biomaterials*, 1996: 17:137.

[14] P. FRAYSSINET, J. FAGES, G. BONEL y N. ROUQUET. «Biotechnology, material sciences and bone repair.» *Eur. J. Orthop. Surg. Traumatol*, 1998: 8: 17-25.

[15] T. KOKUBO, H. KIM y M. KAWASHITA. «Novel bioactive materials with different mechanical properties.» *Biomaterials*, 2003: 24: 2161-2175.

[16] HENCH, V. J. SHIRTLIFF y L. L. «Bioactive materials for tissue engineering, regeneration and repair.» *Journal of materials science*, 2003: 38: 4697-4707.

[17] M. P. GINEBRA. *Desarrollo y caracterización de un cemento óseo basado en fosfato tricálcico-α para aplicaciones quirúrgicas.* Memoria de tesis, Barcelona: Universidad Politécnica de Cataluña, 1996.

[18] A. ALMIRALL, G. LARRECQ, J. A. DELGADO, S. MARTINEZ, J. A. PLANELL, M. P. GINEBRA. «Fabrication of low temperature macroporous hydroxyapatite scaffolds by foaming and hydrolysis of an alfa-TCP paste.» *Biomaterials*, 2004: 25: 3671-3680.

[19] W. J. E. M. HABRAKEN, J. G. C. WOLKE y J. A. JANSEN. «Ceramic composites as matrices and scaffolds for drug delivery in tissue engineering.» *Advanced drug delivery*, 2007: 59: 234-248.

[20] H. YUAN, C. A. van BLITTERSWIJK, K. de GROOT y J. D. de BRUIJN. «Cross-species comparison of ectopic bone formation in biphasic calcium phosphate (BCP) and hydroxiapatite (HA) scaffolds.» *Tissue engineering*, 2006: 6: 1607-1615.

[21] H. YUAN, M. van den DOEL, S. H. LI, K. de GROOT y J. D. de BRUIJN. «A comparison of the osteoconductive potential of two calcium phosphate ceramics implanted intramuscularly in goats.» *J. mater. sci., Mater. med.*, 2002: 13: 1272-1275.

[22] P. HABIBOVIC, T. M. SEES, M. A. van den DOEL, C. A. van BLITTERSWIJK y K. de GROOT. «Osteoinduction by biomaterials - Physicochemical and structural influences.» *J. biomed. mater. res.*, 2006: A 77: 747-762.

[23] M. P. GINBRA, E. FERNANDEZ, E. A. P. De MAEYER, R. M. H. VERBEECK, M. G. BOLTONG, J. GINEBRA, F. C. M. DRIESSENS y J. A. PLANELL. «Setting reaction and hardening of an apatitic calcium phosphate cement.» *J Dent Res*, 1997: 76: 905-912.

[24] L. C. CHOW, S. TAKAGI y P. D. COSTANTINO. «Self-setting CaP cements.» *Mater. res. soc. symp. proc.*, 1991: 179: 3-24.

[25] M. P. GINEBRA, E. FERNANDEZ, F. C. M. DRIESSENS y J. A. PLANELL. «Modeling of the hydrolysis of alfa-tricalcium phosphate.» *J. am. ceram. soc.*, 1999: 82: 2808-2812.

[26] H. KANAZAWA, T. MONMA. «The hydration of alfa-tricalcium phosphate» *J. Ceram. Soc. Jpn.*, 1976: 84:209-13.

[27] A. ALMIRAL, G. LARRECQ, J. A. DELGADO, S. MARTINEZ, M. P. GINEBRA y J. A. PLANELL. «Fabrication of low temperature hydroxyapatite foams» Key eng. Mat., 2004. 254-256: 1001-1004.

[28] M. P. GINEBRA, F. J. GILL y J. A. PLANELL. Espuma de fosfato de calcio autofraguable e inyectable. España Brevet P200402045. 2006.

[29] J. L. SALAGER. «Fenómenos Interfaciales en Dispersiones Polifásicas y en Medios Porosos.» *Cuaderno FIRP S122-N. Laboratorio de Formulación, Interfases Reología y Procesos.* Universidad de los Andes, Venezuela. 2002.

[30] J. L. SALAGER. «Surfactantes. Tipos y usos.» *Cuaderno FIRP S300-A, Laboratorio de Formulación, Interfases Reología y Procesos.* Universidad de los Andes, Venezuela, 2002.

[31] J. L. SALAGER, J.M. ANDEREZ y A. FORGIARINI. «Influencia de la Formulación sobre las Espumas». *Cuaderno FIRP 263-A. Laboratorio de Formulación, Interfases Reología y Procesos.* Universidad de los Andes, Venezuela, 2003.

[32] E. B. MONTUFAR, A. ALMIRALL, A. PALMQVIST, T. TRAYKOVA, J. A. PLANELL y M. P. GINEBRA. «Obtención de andamios macroporosos para regeneración ósea a partir del espumado de cementos de fosfato de calcio.» *XXIX Congreso de la Sociedad Ibérica de Biomecánica y Biomateriales. Reus.*, 2006.

[33] R. C. ROWE, P. J. SHESKEY y P. J. WELLER. *The Handbook of Pharmaceutical Excipients. 4 Edición.* Londres: American Pharmaceutical Association y Pharmaceutical Press, 2003.

[34] M. ASH e I. ASH. *Handbook of pharmaceutical additives.* Aldershot: Gower Publishing, 1995.

[35] T. KOKUBO. «Bioactive glass ceramics: properties and applications.» *Biomaterials*, 1991: 12: 155-163.

[36] H. TAKADAMA y T. KOKUBO. «How useful is SBF in predicting *in vivo* bone bioactivity?» *Biomaterials*, 2006. 27: 2907–2915.

[37] J. van der VALKA, D. MELLORB, R. BRANDESC, R. FISCHERD, F. GRUBERE y G. GSTRAUNTHALERF. «The humane collection of fetal bovine serum and possibilities for serum-free cell and tissue culture.» *Toxicology in vitro*, 2004. 18: 1–12.

[38] Biological Industries. *BIOLOGICAL INDUSTRIES. Technical Resources: Sterile Foetal Bovine (Calf) Serum.* 2002. http://www.bioind.com/Media/Uploads/serum_info.pdf (acceso el 03-05-2007).

[39] R. I. MARTIN y P. W. BROWN «Formation of hydroxiapatite in serum» *Journal of materials science: Materials in medicine*, 1994: 5: 96-102.

[40] L. M. GROVER, J. C. KNOWLES, G.J.P. FLEMING y J.E. BARRALET. « *In vitro* ageing of brushite calcium phosphate cement.» *Biomaterials.* 2003: 24: 4133–4141.

[41] J. L. FLEISCH y H. MEYER. «Determination of calcium phosphate inhibitor activity. Critical assessment of the methodology» *Miner Electrolyte Metab.*, 1984: 10(4):249–258.

[42] E. FERNANDEZ, M. G. BOLTONG, M. P. GINEBRA, O. BERMUDEZ, F. C. M. DRIESSENS y J. A. PLANELL. «Common ion effect on some calcium phosphate cements.» *Clin. Mater.*, 1994: 16: 99-103.

[43] FOOD TECHNOLOGY SERVICE INC. *Food Technology Service. Gamma Sterilization.* 2006. http://www.foodtechservice.com/gammasteril.asp (acceso el 03-10-2007).

[44] CHANG., C. WU y J. « Bonelike apatite formation on carbon microspheres.» *Materials Letters.* , 2006: Articulo disponible en línea: MLBLUE-07845.

[45] W. ZHAO, J. WANGC, W. ZHAIA, Z. WANGD, J. CHANGET. « The self-setting properties and *in vitro* bioactivity of tricalcium silicate.» *Biomaterials.*, 2005: 26: 6113–6121.

[46] Y. WANG. S. ZHANG, X. ZENG, K. CHENG, M. QIAN y W. WENG. «*In vitro* behavior of fluoridated hydroxyapatite coatings in organic-containing simulated body fluid.» *Materials Science and Engineering.* , 2007: 27: 244–250.

[47] Universidad de Barcelona. *SERVICIOS CIENTIFICO TECNICOS. Catálogo.* 2006. http://www.sct.ub.es (acceso el 05-23-2007).

[48] P. A. WEBB y C. ORR, *Analytical methods in fine particle technology.* USA: Micromeritics Instruments Corp, 1997.

[49] S. del VALLE, N. MIÑO, F. MUÑOS, A. GONZALEZ, J. PLANELL, M. P. GINEBRA. «In vivo evaluation of an injectable macroporous calcium phosphate cement.» *Journal of materials science: materials in medicine*, 2007: 18: 353-361.

[50] K. ISHIKAWA, S. TAKAGI, L. C. CHOW, Y. ISHIKAWA, E. D. EANES y K. ASAOKA. «Behavior of a calcium phosphate cement in simulated blood plasma *in vitro*.» *Dent. Mater.*, 1994: 10: 26-32.

[51] Y. LEI, B. RAI, K. H. HO, S. H. TEOH. «In vitro degradation of novel bioactive polycaprolactone-20% tricalcium phosphate composite scaffolds for bone engineering.» *Materials science and engineering*, 2007: 27: 293-298.

[52] L. M. GROVER, U. GBURECK, A. J. WRIGHT, M. TREMAYNE, J. E. BARRALET. «Biologically mediated resorption of brushite cement in vitro.» *Biomaterials*, 2006. 27: 2178-2185.

[53] R. I. MARTIN, P. W. BROWN. «Formation of hydroxyapatite in serum.» *Journal of materials science: material in medicine*, 1994. 5: 96-102.

[54] FLEISCH, J. L. MEYER y H. «Determination of calcium phosphate inhibitor activity.» *Mineral electrolyte metab.*, 1984. 10: 249.

[55] M. J. MURA, S. BEHR y J. C. VOEGEL. «Desorption and exchange properties of adsorbed albumin on apatite. Influence of long-term interfacial residence times.» *J. biomed. mater. res.*, 1989. 23: 1411-1422.